

COMMUNAUTÉ FRANÇAISE DE BELGIQUE  
UNIVERSITÉ DE LIÈGE – GEMBLoux AGRO-BIO TECH

**Diversifier l'industrie papetière  
vers la nanocellulose :  
l'approche enzymo-mécanique**

Pierre-Louis Bombeck

Dissertation originale présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en  
sciences agronomiques et ingénierie biologique

Co-Promoteurs : Prof. Jacques Hébert & Prof. Aurore Richel

Année civile : 2019



## Abstract

As a major player of the forest-based industry, the pulp and paper industry is seeking to diversify its production and become part of a development focused on the bioeconomy. Pulp mills have become experts in the deconstruction of this unique natural material that is wood, which is the result of an assembly of different components where each element can be used. In this context, the concept of Integrated Forest Biorefinery (IFBR), for which the principles of refining apply to forest biomass, has been developed within integrated facilities in existing pulp mills. Among the new products that can come from the wood-industry, nanocellulose has a high potential of valorization in a variety of uses. It can be produced from conventional cellulosic wood pulp, and this way of diversification is easily implantable within existing paper mills.

This research tackles the different forms of nanocellulose and focuses on one of these forms, cellulose nanofibers (CNF), and on the production methods from wood pulp, especially unbleached wood pulp. We demonstrate the advantages of a CNF production process that combines enzymatic pretreatment of the pulp, followed by a mechanical treatment. This pretreatment by enzymatic hydrolysis is the main interest of the production process. The selected enzymes selectively attack the components of the fiber, leading to modifications which facilitate subsequent treatments. The development of a simple and rapid method for evaluating the impact of hydrolysis on fibers makes it possible to select the most appropriate wood pulp / enzyme cocktail combinations according to the targeted end products (nanocellulose, modified paper fibers, bioethanol, etc.).

Pretreatment by enzymatic hydrolysis can also be controlled in order to optimize certain cellulosic and hemicellulosic carbohydrates releases. The use of hydrolysis in successive stages allows the evacuation of the hydrolysis products. This attenuates the inhibitory effect of these products, but also allows a better yield and a better selectivity of the products obtained by the enzymatic pretreatment. This optimized pretreatment is compatible with the production of CNF.

This research demonstrates the use potential of the main types of unbleached virgin wood pulp produced by the paper industry, through a nanocellulose production process that also generates value-added co-products. This process can be controlled according to the targeted products and / or the desired degree of modification of the surface of the fiber.

## Résumé

Acteur majeur de l'industrie du bois, l'industrie papetière cherche à diversifier sa production et à s'inscrire dans un développement résolument axé vers la bioéconomie. Les papetiers sont devenus experts dans la déconstruction de cette matière naturelle unique qu'est le bois, lui-même le fruit d'un assemblage de différents composants dont chaque élément est valorisable indépendamment. C'est dans ce contexte que s'est développé le concept de bioraffinerie forestière intégrée (IFBR), pour lequel les principes du raffinage s'appliquent à la biomasse forestière, au sein d'installations intégrées dans les unités papetières existantes. Parmi les nouveaux produits qui peuvent être issus de la filière bois, la nanocellulose présente un haut potentiel de valorisation dans une diversité d'usages. Cette nanocellulose peut être produite au départ de pâte cellulosique classique de papeterie, dont la transformation en nanocellulose constitue une voie de diversification aisément implantable au sein des unités papetières déjà en place.

Cette recherche aborde les différentes formes de nanocellulose et se focalise sur une de ces formes, la cellulose nanofibrillée (CNF), et sur les méthodes de production de celle-ci au départ de pâte de papeterie, plus particulièrement de pâte non-blanchie. Nous démontrons les avantages d'un procédé de production de CNF qui combine un prétraitement enzymatique de la pâte, suivi d'un traitement mécanique. Ce prétraitement par hydrolyse enzymatique constitue le principal intérêt du procédé de production. Les enzymes sélectionnées attaquent de manière sélective les composants de la fibre, amenant à des modifications de celle-ci qui facilitent les traitements ultérieurs. La mise au point d'une méthode simple et rapide d'évaluation de l'impact de l'hydrolyse sur les fibres permet de sélectionner les combinaisons type de pâte / type d'enzymes les plus adéquates selon les produits finaux visés (nanocellulose, fibres papetières modifiées, bioéthanol, etc.).

Le prétraitement par hydrolyse enzymatique peut également être piloté afin d'optimiser la libération de certains sucres cellulosiques et hémicellulosiques. L'emploi d'une hydrolyse en plusieurs étapes successives permet l'évacuation des produits d'hydrolyse. Cette évacuation atténue l'effet inhibiteur de ces produits, mais permet également un meilleur rendement et une meilleure sélectivité dans les produits obtenus par le prétraitement enzymatique. Ce prétraitement optimisé s'avère compatible avec la production de CNF.

Cette recherche démontre le potentiel de valorisation des principaux types de pâtes de bois vierges non-blanchies issues de l'industrie papetière, par un procédé de production de nanocellulose qui génère également des coproduits d'intérêts. Ce procédé peut être piloté selon les produits visés et/ou le degré souhaité de modification de la surface de la fibre.

## Remerciements

Cette thèse aura été le fruit d'un long travail, entrecoupé de hauts et de bas, de moments de joies et d'autres plus délicats. J'ai cependant pu compter sur le soutien, les conseils et l'aide de nombreuses personnes que je tiens à remercier de m'avoir conduit jusqu'ici.

Merci à l'équipe passée et présente du laboratoire de Biomasse et Technologies vertes (ex-CBI) de Gembloux Agro-Bio Tech pour avoir accueilli un forestier dans votre univers de chimistes. Merci à mes anciens collègues de bureau, du bout du couloir ou de la « grotte » : Sébastien, Caroline, Diana, Thomas, Thibaut, Quentin, Briec, Glenn, Mario, Guillaume et Maroua pour la très bonne ambiance et vos réponses patientes, et jamais condescendantes, à mes questions. Merci à la formidable équipe technique qui m'a tant appris sur l'expérimentation et les bonnes pratiques en laboratoire : Virginie, Catherine, Alex, Fred, Isabelle, Mathilde, Gamin, Olivia et Eric. Un merci particulier à Virginie, sans qui les hydrolyses et ces beaux pics de chromatogrammes n'auraient pas été possibles. Merci à Briec pour sa bonne humeur, ses bonnes idées et son soutien de « co-assistant ». Merci à Glenn pour sa précieuse aide dans la relecture en anglais des publications. Merci à Nicolas pour m'avoir fait découvrir le microfluidiseur et les vins français. Merci à ma copromotrice, la Professeur Aurore Richel, pour avoir accueilli la chimie du bois et un forestier au sein de son équipe expérimentée. Merci également à tous ceux que j'ai pu oublier de citer dans ces lignes.

Je tiens à remercier toute l'équipe du « couloir de forêt ». Merci pour votre bonne humeur, pour ces pauses cafés et pour votre accueil toujours chaleureux, même quand j'avais quitté ces murs. Un merci particulier à Stéphanie, pour son soutien, son écoute attentive et sa joie à mon égard, même quand nos succès n'étaient pas réciproques. Merci à Philippe de croire en l'avenir de la chimie du bois à Gembloux.

Merci à Barbara, pour l'amie extraordinaire qu'elle est.

Une grande partie des résultats obtenus n'aurait pas été possible sans les quatre mois passés dans l'équipe du Professeur Marc Beauregard de l'unité de Biotechnologies protéiques et d'enzymologie industrielle de l'Université du Québec à Trois-Rivières : Marc, Fatma, Manel, Vinay et Nikolas. Merci de votre accueil et de l'opportunité que vous m'avez offerte. Merci en particulier à Vinay et Nikolas pour tous ces bons souvenirs, au labo et en dehors. Ce temps passé chez vous aura été une expérience magnifique.

Merci aux entreprises Burgo Ardennes et SAPPI Lanaken, en particulier Mr Paul Lemmens, pour les échantillons de pâte à papier gracieusement fournis tout au long de cette recherche.

Merci à Bertrand et à la direction de ValBiom de m'avoir soutenu et encouragé à terminer cette thèse. Merci à mes collègues géniaux pour leur soutien et leurs encouragements.

La rédaction de ce manuscrit n'aurait pas été possible sans le soutien inconditionnel de Clémence, qui a partagé et partage encore les bons et moins bons moments. Un énorme merci à Louis pour son aide plus que précieuse dans la mise

en page du manuscrit. Merci à mes parents de m'avoir soutenu et encouragé à aller jusqu'au bout de cette aventure.

Enfin, cette thèse n'aurait pas vu le jour ni n'aurait été finalisée s'il n'y avait pas eu mon co-promoteur Jacques Hébert. Ses conseils avisés, sa disponibilité, ses encouragements et son soutien sans faille, quels qu'aient été mes choix professionnels, m'auront conduit à finaliser ce projet et marqueront durablement mon esprit. Jacques, merci pour tout ce que tu m'auras apporté au cours de ces années, intellectuellement et humainement.

# Table des matières

Abstract .....	3
Résumé .....	4
Remerciements .....	5
Table des matières .....	7
Liste des figures.....	11
Liste des tableaux .....	13
Liste des abréviations .....	14
Chapitre 1. Introduction.....	15
1. Introduction .....	17
2. L'industrie papetière en Belgique.....	20
3. Objectifs de la thèse.....	21
Chapitre 2. Le bois : formation, fonctions et déconstruction .....	25
1. Introduction .....	27
2. Formation et anatomie du bois .....	27
3. Structure des cellules du bois .....	29
4. Composition chimique du bois.....	33
4.1. La cellulose.....	34
4.2. Les hémicelluloses.....	34
4.3. Les lignines.....	36
4.4. Les extractibles.....	37
5. Déconstruire la structure du bois.....	37
5.1. Procédés de mise en pâte.....	38
6. Prétraitement de la biomasse bois .....	41
7. Conclusion.....	44
Chapitre 3. Produire de la nanocellulose au sein d'une bioraffinerie forestière intégrée.....	45
1. Mise en contexte.....	47
2. Introduction .....	48
3. La cellulose.....	49

4.	Bioraffinerie forestière intégrée à une usine de pâte chimique de type kraft	51
5.	La nanocellulose issue de pâte à papier .....	53
5.1.	Cellulose micro-fibrillée (MFC) .....	54
5.2.	Cellulose nanocristalline (CNC) .....	54
6.	Les prétraitements enzymatiques .....	55
7.	Potentiel d'intégration d'une ligne de production de nanocellulose dans une usine de pâte Kraft .....	57
8.	Marchés ciblés et potentiel commercial .....	57
9.	Conclusion .....	59
10.	Résumé original de l'article .....	60
Chapitre 4. Analyser l'impact des prétraitements enzymatiques à la surface des fibres cellulosiques .....		61
1.	Remise en contexte .....	63
2.	Introduction .....	64
3.	Material and methods .....	66
3.1.	Lignocellulosic biomass .....	66
3.2.	Enzyme solutions .....	67
3.3.	Enzymatic treatments of pulp .....	67
3.4.	Handsheet and paper disc preparation .....	68
3.5.	Construction of recombinant probe expression systems .....	68
3.6.	Expression and purification of probes .....	68
3.7.	Quantification of the carbohydrates on the surface of fiber paper disc using FTCM .....	68
3.8.	Sugar analysis .....	68
3.9.	Scanning electron microscope (SEM) images .....	68
3.1.	Statistical analysis .....	69
4.	Results and discussion .....	69
4.1.	Enzyme characterization .....	69
4.2.	Pulp fiber characterization .....	69
4.3.	Hydrolysate analysis .....	71
4.4.	Effect of enzymatic treatment on pulp fiber .....	73



---

4.5. Detection of pulp fiber polymers using FTCM analysis before and after enzymatic treatments .....	75
4.6. Surface polymer distribution after enzymatic treatments .....	81
5. Conclusions .....	84
6. Acknowledgements .....	84
7. Original article abstract .....	85
Chapitre 5. Production enzymo-mécanique de nanocellulose : optimisation de l'hydrolyse et de ses coproduits .....	87
1. Remise en contexte.....	89
2. Méthodologie.....	91
2.1. Pâtes cellulosiques.....	91
2.2. Enzymes .....	91
2.3. Hydrolyses enzymatiques.....	91
2.4. Analyse des hydrolysats .....	92
2.5. Indice de cristallinité .....	92
2.6. Production de nanocellulose (cellulose nanofibrillée) par microfluidisation .....	92
3. Résultats .....	93
3.1. Concentration en mono- et disaccharides dans les hydrolysats.....	93
3.2. Indice de cristallinité .....	100
3.3. Production de cellulose nanofibrillée .....	101
3.4. Bilan-type du procédé de production de nanocellulose.....	102
4. Conclusions .....	103
5. Remerciements .....	104
Chapitre 6. Discussions générales, conclusions et perspectives.....	105
1. Retour sur les objectifs initiaux .....	107
2. Le prétraitement enzymatique .....	109
3. L'utilisation d'enzymes .....	110
4. La nanocellulose: applications et marchés potentiels.....	110
4.1. Applications de la nanocellulose .....	111
4.2. Marchés potentiels.....	112

5. La production de CNF à partir de pâte à papier.....	114
6. L'intérêt des coproduits valorisables .....	115
7. Perspectives de recherche .....	115
8. De la papeterie à l'IFBR via la nanocellulose: conclusions .....	117
Références .....	119

## Liste des figures

<b>Figure 1-1.</b> Évolution de la consommation mondiale de différents produits papetiers de 1996 à 2016 (Food and Agriculture Organization - FAO, 2018). .....	18
<b>Figure 1-2.</b> Localisation des différents industries papetières en Belgique (Bays, 2018), dont Burgo Ardenne à l'extrême sud et SAPPI Lanaken au nord-est. ....	21
<b>Figure 2-1.</b> Représentation schématique de la structure pariétale d'une cellule de bois (M : lamelle moyenne, P : paroi primaire, S1 + S2 + S3 : paroi secondaire (Badel <i>et al.</i> , 2015). .....	31
<b>Figure 2-2.</b> Représentations schématiques de la structure pariétale des cellules de bois normaux et de réaction chez les résineux (A : bois normal, B : bois de compression) et chez les feuillus (C : bois normal, D : bois de tension) (M : lamelle moyenne, P : paroi primaire, S1 + S2 + S3 : paroi secondaire, G : couche gélatineuse) (Badel <i>et al.</i> , 2015). .....	33
<b>Figure 2-3.</b> Agencement de la cellulose, des hémicelluloses et des lignines au sein du complexe lignocellulosique (US DOE, 2007). .....	35
<b>Figure 2-4.</b> Exemples de molécules qui peuvent être obtenues au départ de transformations de biomasse lignocellulosique. Les molécules-plateformes sont identifiées en rouge (Espro <i>et al.</i> , 2017). .....	42
<b>Figure 2-5.</b> Objectif et impacts d'un prétraitement sur une matière lignocellulosique (US DOE, 2007). .....	43
<b>Figure 3-1.</b> Structure hiérarchique du bois : de l'arbre à la cellulose (d'après Postek <i>et al.</i> , 2011. © IOP Publishing. Reproduit avec la permission d'IOP Publishing. Tous droits réservés) .....	51
<b>Figure 3-2.</b> Schéma synthétique des processus et plateformes impliqués dans une Bioraffinerie Forestière Intégrée (IFBR) (d'après Christopher, 2013). .....	52
<b>Figure 4-1.</b> SEM micrographs obtained from (SM) untreated softwood CTM pulp (a, b), and from (SK) untreated softwood Kraft pulp (c, d) at two levels of resolution .....	70
<b>Figure 4-2.</b> Lignin and carbohydrate monomer content of pulps. <i>HM</i> hardwood CTM pulp, <i>SM</i> softwood CTM pulp, <i>HK</i> hardwood kraft pulp, and <i>SK</i> softwood kraft pulp .....	71
<b>Figure 4-3.</b> Concentrations of selected carbohydrates in hydrolysate recovered after hydrolysis of pulp. T and A refer to mixtures of enzymes used for hydrolysis .....	71
<b>Figure 4-4.</b> Weighted average values of fiber lengths (mm) and standard deviations for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp. ....	73
<b>Figure 4-5.</b> Weighted proportion (%) and standard deviations of fines (fibers with length <0.2 mm) for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp. ....	74
<b>Figure 4-6.</b> Arithmetic average values ( $\mu\text{m}$ ) and standard deviations of fiber widths for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM)	

hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp. ....	74
<b>Figure 4-7.</b> Zero span breaking length (km) for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp. ....	75
<b>Figure 4-8.</b> CBM binding to the surface of untreated pulps. The quantity of probe bonded to crystalline cellulose (in green) and amorphous cellulose (in red) .....	77
<b>Figure 4-9.</b> CBM binding to the surface of untreated pulps. The quantity of probe bonded to xylan and mannan are shown in orange and cyan, respectively. ....	77
<b>Figure 4-10.</b> Impact of enzyme (T and A) hydrolysis on the binding of different polymer by probes (Crystalline cellulose bound by GC3a, amorphous cellulose bound by CC17, xylan bound by OC15 and mannan by CC27), on the surface of fiber discs. Results that did not deviate significantly from untreated (Std) values (where significance was determined using Dunnet's comparison test) are indicated with an asterisk (*). ....	79
<b>Figure 4-11.</b> Proportion (in percent) of each probe by treatment on the total probes content for each pulp .....	82
<b>Figure 5-1.</b> Concentration cumulée en glucose, xylose et cellobiose dans l'hydrolysate issu l'hydrolyse multi-étapes des différentes pâtes testées.....	96
<b>Figure 5-2.</b> Évolution des concentrations de glucose, xylose et cellobiose dans l'hydrolysate de chacune des quatre étapes d'hydrolyse multi-étapes. ....	97
<b>Figure 5-3.</b> Concentrations cumulées en glucose (a), xylose (b) et cellobiose (c) dans l'hydrolysate en fin d'hydrolyses mono- et multi-étapes.....	98
<b>Figure 5-4.</b> Rendements d'hydrolyse, exprimé comme le rapport entre la quantité de sucre libéré et la quantité de ce sucre présente dans la pâte (le glucose et le cellobiose libérés sont associés au glucose de la cellulose dans la pâte).....	99
<b>Figure 5-5.</b> Diffractogrammes de l'analyse par DRX des échantillons de pâtes à papier (ech1 : CTMP Épicéa, ech2 : CTMP Peuplier, ech3 : Kraft Feuillus).....	100
<b>Figure 5-6.</b> Indices de cristallinité (et écart-type) des pâtes testées (en vert) et indices issus de la littérature (en bleu).....	101
<b>Figure 5-7.</b> Images SEM des différences de structure des échantillons lyophilisés de nanocellulose obtenue après 5 passages au microfluidiseur sans (a, b) et avec prétraitement enzymatique multi-étapes (c, d). ....	102
<b>Figure 5-8.</b> Bilan de masse théorique d'une production de nanocellulose par prétraitement enzymatique multi-étapes et homogénéisation mécanique à l'échelle pilote, au départ d'une pâte kraft de feuillus .....	103

## Liste des tableaux

<b>Tableau 2-1.</b> Les différents types de cellules du bois et du liber formées par le cambium (Trouy, 2015).....	28
<b>Tableau 2-2.</b> Composition chimique moyenne du bois de résineux et de feuillus d'essences de la zone tempérée (d'après (Thomas, 1977; Stevanovic and Perrin, 2009)). .....	33
<b>Tableau 2-3.</b> Composition chimique du bois de cinq feuillus nord-américains (Timell, 1967; Saka, 2001; Stevanovic and Perrin, 2009).....	35
<b>Tableau 2-4.</b> Composition chimique du bois de cinq résineux nord-américains (Timell, 1967; Saka, 2001; Stevanovic and Perrin, 2009).....	36
<b>Tableau 2-5.</b> Longueur moyenne des fibres du bois de plusieurs essences européennes (Ilvessalo-Pfäffli, 1995).....	39
<b>Tableau 2-6.</b> Rendement massique des différents types de procédés de fabrication de pâte (Bary-Lenger, Pierson and Poncelet, 1999) .....	39
<b>Tableau 3-1.</b> Les différents types de nanocelluloses (d'après Klemm et al., 2011 ; Dufresne, 2012) .....	49
<b>Tableau 3-2.</b> Constituants majeurs du bois .....	50
<b>Tableau 3-3.</b> Applications potentielles de la nanocellulose selon les volumes utilisables (d'après Shatkin et al., 2014) .....	58
<b>Tableau 4-1.</b> Protein content and activities of the two commercial enzymes mixtures (enzymes T refers to CelluClast 1.5L from <i>Trichoderma reesei</i> and enzymes A refers to Carezyme 1000L from <i>Aspergillus</i> sp).....	69
<b>Tableau 4-2.</b> Pulp fibers properties before enzymatic treatments .....	70
<b>Tableau 5-1.</b> Composition chimique des trois pâtes étudiées, exprimée en masse (g) des différents composants lignocellulosiques dans 10 g de matière sèche (la teneur en éléments minéraux et extractibles est négligeable et négligée) .....	94
<b>Tableau 6-1.</b> Domaines d'utilisation des enzymes cellulase et xylanase dans l'industrie papetière (Bajpai, 2015a) .....	110
<b>Tableau 6-2.</b> Principales catégories d'applications identifiées, actuelles ou potentielles, de la nanocellulose (Chauve and Bras, 2014; Lin and Dufresne, 2014; Shatkin <i>et al.</i> , 2014; Abitbol <i>et al.</i> , 2016; Lengowski <i>et al.</i> , 2019) .....	111

## Liste des abréviations

AMF: angle de microfibrilles

AFM : atomic force microscopy

CNC: cellulose nanocrystals (EN) / nanocristaux de cellulose (FR)

CNF: cellulose nanofibers (synonym of NFC) (EN) / nanofibres de cellulose (FR)

CTMP: chemi-thermo-mechanical pulping (EN) / pâte chimico-thermo-mécanique (FR)

DRX: diffraction par rayons X

FTCM: fluorescent-tagged carbohydrate-binding module

FTIR: Fourier transform infrared spectroscopy

GC: gas chromatography

HK: hardwood kraft pulp

HM: hardwood chemi-thermo-mechanical pulp

HPLC: high performance liquid chromatography

IFBR: integrated forest biorefinery

MFC: microfibrillated cellulose

NFC: nanofibrillated cellulose (synonym of CNF)

NMR: nuclear magnetic resonance

PCS: pouvoir calorifique supérieur

SEM : scanning electron microscopy

SK: softwood kraft pulp

SM: softwood chemi-thermo-mechanical pulp

TEM: transmission electron microscopy

XPS: X-ray photoelectron spectroscopy

XRD: X-ray diffraction

# 1

---

## Introduction



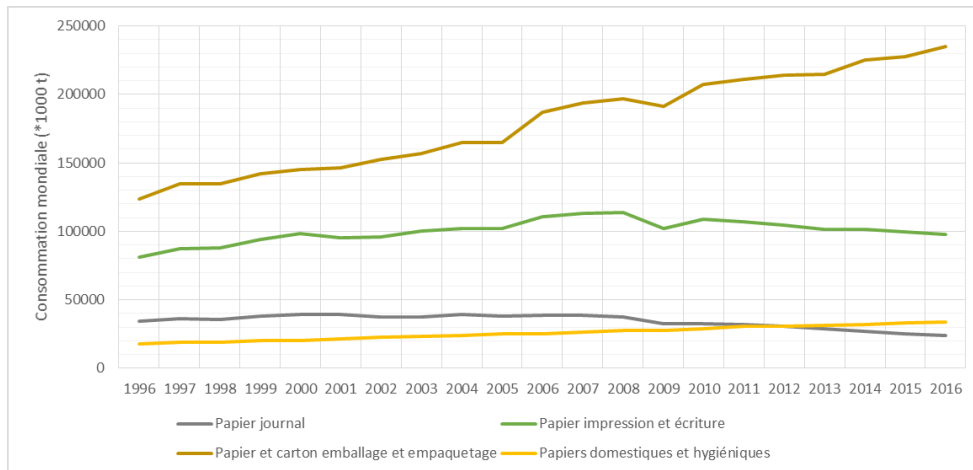


# 1. Introduction

De par sa composition et sa structure, le bois est source de matériaux, de fibres et de molécules depuis des siècles. Compagnon millénaire de l'Humanité, le bois a fourni à l'Homme les manches de ses outils, les structures de ses constructions, l'équipement de ses logements et le combustible pour ses feux. Aujourd'hui encore, les propriétés naturelles exceptionnelles du bois en font un matériau aux multiples avantages, mais également une ressource énergétique renouvelable et une matière première pour de nombreux produits, dont les usages et innovations ne cessent de se multiplier. Ces dernières décennies, la recherche a démontré le potentiel de l'utilisation du bois comme matière première à la création d'une multitude de nouveaux produits, dans une large gamme de domaines allant des composites aux bioénergies, en passant par la pharmacutique, la médecine, l'électronique, l'aéronautique et encore d'autres (Zhu *et al.*, 2016).

L'agencement particulier des composants des parois des cellules du bois font de celles-ci une merveille d'ingénierie naturelle (détaillée au Chapitre 2). À l'inverse d'autres sources de cellulose, la fibre de bois mérite que les nouveaux usages qui lui sont envisagés tirent parti de ses propriétés et de son agencement naturel. L'usage « matière » du bois, en particulier le bois d'industrie, est alors souvent vu comme concurrent à l'usage « énergie » ou « composés chimiques ». Or, il existe des possibilités de valorisation du bois qui combinent ces deux aspects à l'apparence antagoniste. Dans l'industrie du bois, il existe un secteur qui a appris à isoler les éléments fibreux du bois et à s'en servir pour leurs propriétés « matière », tout en créant de l'énergie au départ des procédés de production employés. Il s'agit du secteur papetier.

Avec une production mondiale annuelle de 184 millions de tonnes de pâte à papier (FAO, 2018), l'industrie papetière est un acteur majeur de la filière forêt-bois. Cette industrie a été et est encore aujourd'hui profondément impactée par la digitalisation de nos sociétés (Bajpai, 2017). Ces impacts peuvent être négatifs, comme le déclin des marchés du papier graphique (Figure 1-1), avec une tendance qui ne semble pas prête de s'arrêter (digitalisation de l'information, des supports de communication, etc.). La consommation mondiale de papier journal a baissé de 38 % entre 2006 et 2016, celle de papier d'impression et d'écriture de 12 % sur la même période (Food and Agriculture Organization - FAO, 2018). À l'inverse, certains produits ont vu leur consommation augmenter sur la même période : + 35 % pour les papiers hygiéniques et domestiques, + 26 % pour les papiers et cartons d'emballage et d'empaquetage (Food and Agriculture Organization - FAO, 2018). Ces derniers profitent, entre autre, de l'augmentation de volume du commerce en ligne, qui a ici un impact positif sur le secteur papetier de l'empaquetage.



**Figure 1-1.** Évolution de la consommation mondiale de différents produits papetiers de 1996 à 2016 (Food and Agriculture Organization - FAO, 2018).

L'industrie papetière se caractérise également par les investissements conséquents nécessaires à la mise en place de moyens de production. Les coûts d'investissements spécifiques, exprimés en capacité de production, sont de l'ordre de 1500 à 2000 USD/(tonne/an) pour une usine de pâte chimique moderne (Börjesson and Ahlgren, 2015). La concurrence internationale est sévère, en particulier provenant des pays tropicaux aux coûts de production bas, et s'exprime par une volatilité du prix des pâtes sur les marchés mondiaux (Benali *et al.*, 2013).

Soucieuse de valoriser au mieux ses investissements face aux modifications des habitudes de consommation, à la concurrence internationale accrue mais également pour répondre à la demande générale d'alternatives au pétrosourcé, cette industrie veille à s'inscrire en leader de l'économie biobasée. La confédération européenne des industries papetières (CEPI) vise ainsi dans ses objectifs 2050, sur une plus-value totale de 8,5 milliards d'euros d'ici 2050 par rapport à 2010, une part de plus de 3,5 milliards d'euros provenant des nouveaux produits biobasés issus de ses membres (Confederation of european paper industries (CEPI), 2017). D'autres études évaluent à 40 % la part du chiffre d'affaire de l'industrie papetière européenne dédiée aux nouveaux produits, pour répondre à cette transition vers une bioéconomie (Toppinen *et al.*, 2017).

Ces nouveaux produits, fabriqués par l'industrie papetière au départ de la même matière première que le papier, couvrent des gammes d'applications larges, allant du textile à l'aéronautique en passant par les plastiques, la pharmaceutique et les biocarburants (Zhu *et al.*, 2016; Hurmekoski *et al.*, 2018).

Pour s'orienter vers la production de ces nouveaux produits, en complément ou en substitution totale de leurs produits cellulosiques traditionnels, les usines de pâte de bois devront effectuer une conversion du secteur papetier classique vers celui du bioraffinage. Au même titre que la raffinerie pétrolière, la bioraffinerie est définie comme une installation qui convertit, grâce à différents procédés et équipements,

une matière première (ici de la biomasse) en carburant, énergie, chaleur et composés chimiques à haute valeur (NREL, 2019). Quand ce type de bioraffinerie emploie de la biomasse forestière et s'intègre dans une installation de production de pâte de bois, on parle alors de bioraffinerie forestière intégrée, ou IFBR pour *Integrated Forest BioRefinery* (Christopher, 2013). Ce concept n'est pas neuf, et les possibilités de conversion en IFBR sont à l'étude depuis plus de quinze ans, tant sur les aspects techniques qu'économiques (Van Heiningen, 2006; Chambost, McNutt and Stuart, 2008; Hytönen, 2009; Huang *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2010; Zhang, Paice and Deng, 2011; Bajpai, 2013; Christopher, 2013).

La valorisation des différents composants du bois par des procédés de bioraffinage et la production de nouveaux produits semblent une alternative économiquement crédible au déclin de certaines productions et une voie de diversification pour l'industrie du bois en général (Stern *et al.*, 2015). Cependant, les propriétés conférées au bois par l'assemblage bien particulier de ses composants méritent de considérer le bois comme une ressource plus noble qu'une simple matière première cellulosique pour la production de biocarburant ou de produits chimiques. De plus, la composition et l'agencement naturel du bois en font une ressource plus difficile à déconstruire en molécules simples que certaines matières agricoles (maïs, blé) ou certains résidus lignocellulosiques (pailles, bagasse, etc.). Cela peut mettre en difficulté la compétitivité d'une IFBR vis-à-vis de certains produits, comme par exemple le bioéthanol de 1<sup>ère</sup> génération (Van Heiningen, 2006).

Voilà pourquoi une IFBR maintient parmi ses produits principaux la pâte cellulosique (Mongkhonsiri *et al.*, 2018). Quand celle-ci est d'un très haut degré de pureté, on parle alors de cellulose de spécialité ou de cellulose « à dissoudre », destinée à être transformée en fibres textiles reconstituées ou en dérivés de la cellulose (Kamide, 2005). Par contre, lorsque les propriétés physiques et mécaniques naturelles des éléments fibreux (les fibres et vaisseaux des feuillus et les trachéides des résineux) sont maintenues ou améliorées, la valorisation peut soit se faire avec des fibres classiques dans le domaine du papier et de l'emballage, soit s'orienter vers de nouveaux matériaux, comme c'est le cas avec la nanocellulose (Dufresne, 2013). Il est important de noter dès maintenant que l'usage du terme papetier « fibre » fait référence aux éléments anatomiques du bois que sont les fibres (chez les feuillus) et aussi les trachéides (chez les résineux).

Obtenu au départ d'une fibre déconstruite en des sous-éléments d'un diamètre nanoscopique, la nanocellulose présente des propriétés particulières qui en font un matériau aux applications potentielles très variées (Dufresne, 2012; Jorfi and Foster, 2015; Abitbol *et al.*, 2016). La production de nanocellulose au départ de cellulose de bois génère également une série de coproduits valorisables, principalement des glucides (Henriksson *et al.*, 2007; Pääkkö *et al.*, 2007).

Les différents traitements et prétraitements que l'on peut faire subir à la fibre pour produire ou faciliter la production de nanocellulose sont généralement les mêmes types que ceux employés pour déconstruire la biomasse bois en ses différents constituants. Il s'agit de traitements mécaniques, thermiques, chimiques, enzymatiques, biologiques ou de combinaisons de ceux-ci. Dans le cas des

prétraitements, l'objectif alors visé est de faciliter l'étape suivante du procédé. Par exemple, une hydrolyse légère à l'acide ou une hydrolyse enzymatique peut faciliter l'étape suivante de traitement mécanique des fibres dans le cas de la production de nanocellulose (voir Chapitre 3).

Le (pré)traitement adéquat selon le type de produit et les coproduits visés va dépendre de considérations économiques mais également de plus en plus de considérations environnementales (Shen, Worrell and Patel, 2010).

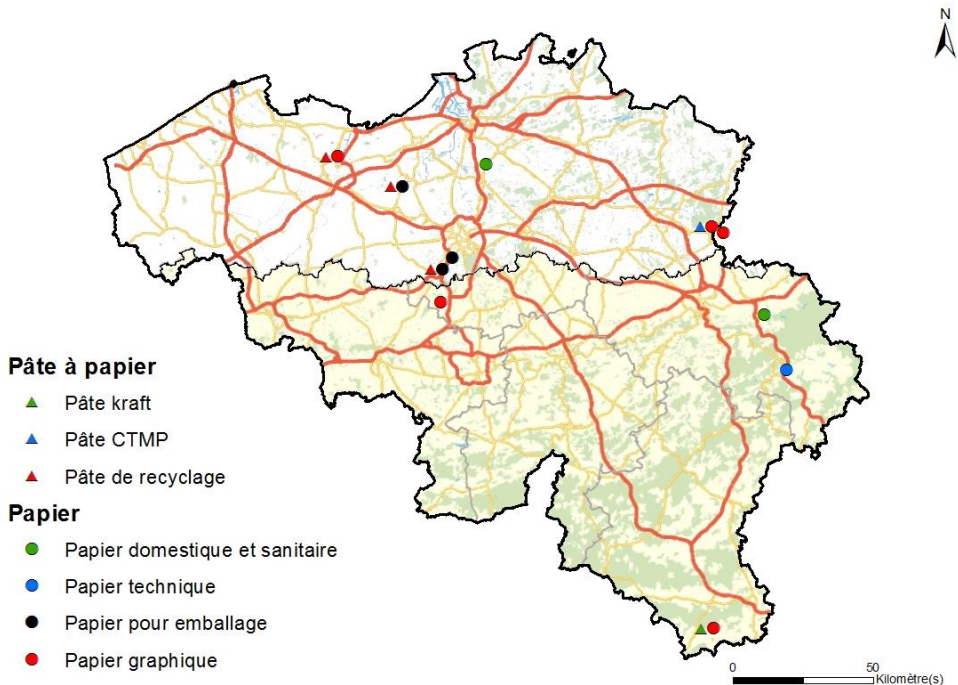
Quand le prétraitement n'affecte que la surface de la fibre, il devient plus difficile d'évaluer son efficacité et son impact dès lors que certaines modifications de composition et de propriétés de surface de la fibre traitée apparaissent. Ces changements de surface ont une influence sur l'étape suivante du procédé mais également sur le type de coproduits générés. Les différentes méthodes existantes d'analyse des modifications de surface font généralement appel à des équipements coûteux et/ou des tests chronophages, dont l'interprétation des résultats nécessite également des qualifications particulières (voir Chapitre 4). Si l'on souhaite pouvoir tester différents prétraitements sur différents types de biomasse forestière avec un test simple d'utilisation, et qui informe à la fois sur les changements de surface mais également sur le type de coproduits que l'on peut espérer, il convient de développer ou adapter de nouvelles méthodes.

## **2. L'industrie papetière en Belgique**

La Belgique compte différentes industries papetières sur son territoire (Figure 1-2). Il n'y existe cependant que deux unités de production de pâte cellulosique vierge au départ de bois : une usine de pâtes chimico-thermo-mécaniques (CTMP) issues de feuillus et de résineux située en Flandre (SAPPI Lanaken) et une installation de pâte chimique de type kraft au départ de feuillus en Wallonie (Burgo Ardenne, Virton). Les autres unités produisent soit de la pâte issue de papiers et cartons recyclés, soit uniquement des produits papetiers à partir de pâtes produites ailleurs.

Bien que, de par les procédés chimiques déjà mis en place, l'usine wallonne de pâte kraft soit la plus adaptée à la conversion en IFBR, les décisions stratégiques de ses dirigeants excluent pour l'instant cette voie de diversification. À l'inverse, la multinationale à laquelle appartient l'usine de pâte CTMP est activement à la recherche de nouveaux produits et débouchés, parmi lesquels la nanocellulose (SAPPI, 2018).

Les différents types de pâtes produites se prêtent particulièrement bien à la comparaison pour l'analyse de potentiel pour de nouveaux produits, avec d'un côté une pâte mécanique qui contient encore la majorité des constituants initiaux du bois, et de l'autre une pâte chimique dont la majorité de la lignine (et une partie des hémicelluloses) a été dissoute et extraite. Dans les deux cas et selon les caractéristiques voulues pour le produit final, ces pâtes peuvent subir des étapes supplémentaires de blanchiment.



**Figure 1-2.** Localisation des différents industries papetières en Belgique (Bays, 2018), dont Burgo Ardenne à l'extrême sud et SAPPI Lanaken au nord-est.

### 3. Objectifs de la thèse

La présente thèse s'inscrit dans la recherche d'une piste de diversification pour l'industrie papetière. L'orientation donnée à cette diversification se base sur trois principaux constats.

Premièrement, l'industrie papetière, en particulier occidentale, se retrouve aujourd'hui confrontée à un important besoin de diversification. La conversion des unités de production de pâte en IFBR est souvent présentée dans la littérature comme la solution idéale. Or, comme pour la raffinerie pétrolière, la gamme de produits finaux qui peuvent être issus d'une IFBR est très large et variée. De plus, la conversion complète d'une unité de production de pâte vers une IFBR exige d'investir ou de réinvestir dans des installations déjà initialement coûteuses, pour s'orienter vers des marchés parfois très éloignés de ceux du domaine papetier (biocarburants, construction, pharmaceutique, etc.). Même s'il s'agit d'une conversion partielle, la variété des choix technologiques et des nouveaux produits présents dans la littérature peut générer de la confusion et engendrer une barrière à la diversification (Näyhä and Pesonen, 2012). Pour lutter contre cet effet, et pour garantir un débouché à une partie significative de ces nouveaux produits, l'industrie papetière a un intérêt à développer de nouveaux produits dont elle serait à la fois le

producteur et, en même temps, un consommateur d'importance (Shatkin *et al.*, 2014).

Deuxièmement, les études existantes sur les possibilités d'implémentation d'une IFBR au sein d'unité de pâte à papier se focalisent généralement sur les procédés de production de nouveaux produits qui peuvent être mis en œuvre avant l'étape de mise en pâte (Van Heiningen, 2006; Christopher, 2013; Rafione *et al.*, 2014). Ce nouveau schéma impacte le fonctionnement traditionnel des unités de production de pâte et apporte avec lui de nouveaux risques et barrières (financiers, technologiques, etc.) qui sont alors autant d'obstacles à la diversification de cette industrie (Chambost, McNutt and Stuart, 2008; Hytönen, 2009; Gonzalez *et al.*, 2011; Benali *et al.*, 2013; Hurmekoski *et al.*, 2018; Mongkhonsiri *et al.*, 2018). Proposer une piste de diversification que ne nécessite pas une refonte complète des procédés existants, mais se base sur des produits et techniques connus, est préférable d'ici le déploiement, à large échelle, des IFBR. Il existe donc un fort intérêt à employer comme matière première la pâte traditionnelle vierge produite actuellement. L'utilisation de cette ressource en tant que matière première d'un nouveau procédé ne nécessite pas de modifier les procédés de mise en pâte déjà en place. Il s'agirait d'une voie de valorisation qui s'ajouterait en fin de ligne et en détournerait une partie de la production de pâte. Il serait également possible de détourner une partie de la pâte à valoriser avant les étapes de blanchiment, ne destinant ce blanchiment et son coût uniquement aux voies de valorisation qui nécessiteraient de la pâte à un certain degré de blancheur. Un autre avantage non négligeable serait de ne pas créer de pression supplémentaire sur l'approvisionnement en matière première forestière (Näyhä and Pesonen, 2012). Si la présente recherche est particulièrement axée sur les pâtes cellulosiques produites par l'industrie belge, la diversité de celles-ci (essences employées et procédés de mise en pâte) permet l'extrapolation des résultats aux principaux types de pâtes produits à l'échelle mondiale.

Troisièmement, dans la recherche de nouvelles voies de valorisation, les études qui visent la valorisation des constituants des fibres de bois (très majoritairement l'hydrolyse des polysaccharides des parois cellulaires pour les convertir en biocarburant) se focalisent peu sur l'usage « matière » qui peut être fait des fibres. La structure et l'agencement des composants de celles-ci sont vues comme des obstacles à l'hydrolyse. À l'inverse, les recherches sur les modifications et fonctionnalisation des fibres emploient généralement des réactifs et/ou procédés qui peuvent rendre difficile la valorisation des coproduits de ces traitements (Daoud, Xin and Zhang, 2005; Boucher, Chirat and Lachenal, 2014; Karim *et al.*, 2017). Or, dans une logique d'IFBR, un juste milieu peut être trouvé et générer à la fois des fibres modifiées et des coproduits facilement récupérables et valorisables. Pour atteindre ce juste milieu, il est nécessaire d'identifier et de combiner le type de matière première avec les traitements les plus adéquats.

Afin de tester et pouvoir comparer les différentes combinaisons, il est essentiel de disposer d'une technique d'analyse de l'impact des différents traitements investigués. Dans l'idéal, cette technique doit être simple d'utilisation, fournir des informations sur l'état et la composition de surface des fibres traitées (Hebert-

Ouellet *et al.*, 2017; Khatri, Meddeb-Mouelhi and Beauregard, 2018). Elle doit, également et avant tout, être applicable aux types de pâtes étudiées et aux traitements appliqués.

Au départ de ces constats, la recherche d'une voie de diversification optimale pour l'industrie papetière actuelle amène à une série d'interrogations qui peuvent être regroupées comme telles :

1) Au départ de pâte cellulosique de qualité « papier », quel est le meilleur produit qui permette de valoriser les propriétés particulières des fibres de bois et qui s'intègre le mieux à une (future) IFBR ? Cette voie de valorisation est-elle applicable à de la pâte non-blanchie ?

2) Quelles combinaisons de (pré)traitements s'y appliquent le mieux, en prenant en compte les aspects environnementaux et économiques du nouveau processus de production ?

3) Après prétraitement des pâtes cellulosiques, quels sont les changements observables à la surface des fibres traitées ? Ces changements observés permettent-ils d'orienter le choix du type de pâte selon les produits finaux et coproduits envisagés ?

4) Est-il possible d'appliquer une méthode d'analyse simple d'utilisation, fiable, pour quantifier l'impact des (pré)traitements sur les fibres et identifier alors les débouchés fibres et coproduits les plus opportuns ?

Cette thèse s'attache à répondre à ces questions et vise à identifier une combinaison optimale de produits et coproduits qu'il est possible d'obtenir au départ de pâte à papier, à proposer et valider un procédé optimisé et à accompagner celui-ci d'une méthode d'analyse simple d'utilisation.

Pour arriver à ces objectifs, cette recherche sera structurée selon les différents chapitres suivants :

Le **chapitre 2** s'intéressera au processus naturel de construction, à la composition et à la structure du bois au sein de l'arbre. Ces éléments sont déterminants pour comprendre la spécificité de la matière bois et les traitements de déconstruction les plus pertinents à appliquer. Certains de ces traitements, en relation avec les objectifs posés, seront également abordés au sein de ce chapitre.

Le **chapitre 3** identifiera et confirmera le choix d'un nouveau produit d'intérêt qui valorise la structure de la fibre de bois : la nanocellulose. Ce chapitre détaillera les intérêts de ce nouveau produit et présentera une méthode de production particulièrement bien adaptée à son intégration, au sein d'installations papetières existantes, et qui génère des coproduits valorisables dans une logique de mutation vers une IFBR.

Le **chapitre 4** sera consacré à la recherche et à l'application concluante d'une nouvelle méthode d'analyse des impacts des prétraitements de production de nanocellulose. Cette méthode convient à la fois au type de biomasse retenu (fibres papetières) et aux traitements appliqués.

Le **chapitre 5** analysera l'efficacité d'un prétraitement enzymatique multi-étapes avant la production de nanocellulose, en particuliers l'efficacité de la production et la valorisation de ses coproduits.

Enfin, le **chapitre 6** présentera une discussion générale des résultats de cette recherche, à la manière dont celle-ci s'intègre dans le cadre plus large de la diversification du secteur papetier, ses conclusions et les perspectives de recherche qui peuvent en être tirées.



---

## **Le bois: formation, fonctions et déconstruction**



## 1. Introduction

Le bois est un matériau composite naturel remarquable. Majoritairement composé de cellulose, d'hémicelluloses et de lignines, les cellules du bois se forment et se structurent pour remplir non seulement le double rôle de soutien de l'arbre et d'éléments conducteurs, mais aussi de stockage des réserves, de défense et de contrôle de la posture de l'arbre. Séparer les composants du bois, pour ensuite les recomposer, fait partie des procédés de fabrication de produits bois comme les panneaux de fibres ou les papiers et cartons. Cette séparation fait appel à différentes méthodes de « déconstruction » dont les procédés et les produits finaux diffèrent. Ce chapitre passe en revue la formation du bois, sa structure et sa composition chimique et aborde ensuite différentes manières de le déconstruire pour en valoriser certains éléments en particulier.

## 2. Formation et anatomie du bois

Quand l'arbre grandit, le bois qui le compose va se former par la multiplication, la croissance, la différenciation et l'accumulation de nouvelles cellules. À la différence d'autres éléments de l'arbre, le bois est constitué de tissus secondaires, c'est à dire formés à partir des méristèmes secondaires ou latéraux. D'un point de vue anatomique, le *bois* est l'ensemble des tissus formés au départ du cambium (assise génératrice libéro-ligneuse) libéroligneux vers l'intérieur de l'arbre.

Le méristème secondaire que forme le cambium est situé entre le bois et le phloème, formant une couche cellulaire cylindrique (Trouy, 2015). Il s'agit d'une assise génératrice libéroligneuse, qui produit des cellules dans deux directions : les unes en direction de l'intérieur de l'arbre et les autres, de l'autre côté du cambium, vers l'écorce. Les cellules produites vers l'intérieur (vers la moelle) forment le xylème secondaire (le bois), qui transportera la sève brute (sève minérale, ascendante). Les cellules produites par le cambium vers l'extérieur de l'arbre formeront le phloème secondaire (appelé aussi liber) qui transportera la sève élaborée (sève organique, descendante). À noter que la quantité de cellules de xylème produite est toujours supérieure à celle de cellules de phloème (Stevanovic and Perrin, 2009). De plus, sous nos climats tempérés, chaque année les nouvelles cellules du xylème forment un cerne annuel qui se superpose aux cernes formés précédemment et s'accumulent à l'intérieur de l'arbre. En l'absence d'altération par des agents biologiques lignivores, le bois mis en place y restera durant la vie entière de l'arbre.

Xylème et phloème sont composés de différents types de cellules qui assurent les rôles de conduction, de soutien et de stockage. Chez les feuillus, les cellules de vaisseaux forment les éléments conducteurs longitudinaux du bois, tandis que les cellules de fibres assurent le rôle mécanique de soutien dans le bois. Chez les résineux, les trachéides assurent le double rôle de conduction et de soutien. Enfin, les cellules parenchymateuses assurent la fonction de stockage. Alignées radialement, elles constituent les rayons ligneux. Ces rayons servent d'éléments conducteurs radiaux et permettent le transport latéral de l'eau et des éléments

nutritifs. Des cellules de parenchyme axial sont aussi présentes dans le bois. Les cellules de parenchyme jouent également le rôle de cellules de stockage des nutriments et de sécrétion d'autres substances organiques (Tableau 2-1).

**Tableau 2-1.** Les différents types de cellules du bois et du liber formées par le cambium (Trouy, 2015)

Fonction	Résineux		Feuillus	
	Bois	Liber	Bois	Liber
Conduction longitudinale	<b>Trachéide</b>	Cellule criblée	<b>Éléments de vaisseaux</b>	Éléments de tubes criblés
Soutien	<b>Trachéide</b>	<b>Fibre libérienne</b>	<b>Fibre</b>	<b>Fibre libérienne</b>
Stockage de réserve et élaboration de substances	Cellules de parenchyme axial ligneux	Cellules de parenchyme axial libérien	Cellules de parenchyme axial ligneux	Cellules de parenchyme axial libérien
Conduction radiale	<i>Cellules de parenchyme radial ligneux + parfois petites trachéides horizontales (rayons ligneux)</i>	<i>Cellules de parenchyme radial libérien (rayons libériens)</i>	<i>Cellules de parenchyme radial ligneux (rayons ligneux)</i>	<i>Cellules de parenchyme radial libérien (rayons libériens)</i>
Les caractères en gras indiquent les cellules mortes (en opposition aux vivantes). En italique les cellules orientées radialement (en opposition à une orientation axial).				

Sous nos latitudes, l'arbre interrompt sa croissance durant l'hiver. Il poursuit une activité physiologique ralentie en vivant sur ses réserves, stockées sous forme d'amidon dans ses cellules parenchymateuses. L'activité du cambium (et des méristèmes primaires) reprend au printemps et forme alors de nouvelles couches de cellules. Celles du bois se distinguent des cellules de la couche précédente. Cette succession de couches distinctes forme les cernes annuels de croissance.

Au sein du jeune xylème issu de l'assise génératrice cambiale, les cellules vont se différencier et se spécialiser en différents tissus. À l'exception du parenchyme, les autres types cellules finissent par mourir quelques semaines après leur différenciation. Cette partie du bois, dotée de cellules mortes et de cellules parenchymateuses encore vivantes, est appelée l'aubier (ou bois vivant). Les cellules mortes, dont le protoplasme a disparu, conservent néanmoins leurs parois et remplissent toujours leurs rôles de conduction et de soutien. Les cellules vivantes remplissent elles aussi ces rôles et ont également la possibilité de se défendre activement contre les attaques extérieures (champignons et autres). L'aubier est donc constitué des cellules du bois les plus récemment formées, et la sève brute va circuler seulement au sein des cellules des cernes les plus récents et les plus

externes. Les divisions anticlines et périclines des cellules du cambium permettent au xylème et au phloème d'accompagner la croissance en diamètre de l'arbre. L'anneau cambial étant sans cesse repoussé en périphérie du xylème, cela signifie que les parties vitales de cet arbre sont situées en périphérie de celui-ci.

Avec la croissance et le vieillissement de l'arbre, la structure et la composition chimique des cellules de bois de la partie centrale, de plus en plus enfouie à l'intérieur, changent (Bary-Lenger, Pierson and Poncelet, 1999; Stevanovic and Perrin, 2009; Trouy, 2015). Ce phénomène appelé « duraminisation » conduit à la formation du bois parfait, le bois de cœur, également nommé duramen lorsqu'il est différencié par une coloration. Ce duramen ne contient plus du tout de cellules vivantes ni de matières de réserve, le parenchyme ayant également subi un vieillissement physiologique conduisant à sa mort. Duramen et aubier forment deux types de bois différents, et pas uniquement par la présence ou non de cellules de parenchyme vivantes. Bien que les cellules du bois parfait soient mortes et ne soient donc plus en mesure de se défendre activement en cas d'agression (pathogènes, champignons), cette partie du bois n'est pas sans défense. En effet, avant de mourir, les cellules de parenchyme vont élaborer, au départ de leurs réserves d'amidon, des composés qui seront relâchés à la mort de ces dernières (Trouy, 2015; Kebbi-Benkeder *et al.*, 2016). Ces composés sont nommés les extractibles, et seront abordés plus en détail par après. Notons pour l'instant que ces extractibles vont imprégner le duramen et lui conférer une série de propriétés, dont une durabilité naturelle via cette protection chimique que joueront les extractibles. Outre cette élaboration et ce relargage d'extractibles, la formation du bois parfait implique d'autres phénomènes, dont une forme d'imperméabilisation par l'obturation des éléments conducteurs, le tout associé au sein d'un processus actif augmentant la durabilité du bois de l'arbre.

Chez certaines essences (épicéa, sapin, hêtre, peuplier, bouleau, etc.), l'évolution de l'aubier vers le bois parfait ne s'est pas accompagnée d'un changement de coloration et l'aubier ne peut être distingué du duramen (bois blancs ou bois à aubier non différencié). Cette absence de coloration distincte n'est pas anodine : ce sont les extractibles qui donnent sa couleur au duramen, mais qui lui confèrent aussi sa durabilité. Les essences à aubier non différencié possèdent certes du bois parfait, mais celui-ci est alors d'une durabilité plus faible par rapport au duramen coloré des autres essences (Scheffer and Morrell, 1998; Taylor, Gartner and Morrell, 2002; Trouy, 2015).

### **3. Structure des cellules du bois**

La structure du bois est complexe et lui permet de remplir un double rôle. D'une part cette structure assure un rôle de soutien mécanique (aspect biomécanique), et de l'autre elle joue un rôle physiologique en permettant la circulation de la sève via les éléments de conduction spécifiques que sont les trachéides, les vaisseaux et les rayons (aspect hydraulique). À cela s'ajoute la fonction de réserve jouée également par les cellules du parenchyme.

Au sein du bois, on distingue plusieurs types de cellules :

- Les trachéides (chez les résineux, 90 % de la masse ligneuse), qui assurent le rôle de soutien et de conduction ;
- Les éléments de vaisseaux et les fibres, qui forment la majeure partie du bois chez les feuillus. Les premiers assurent la conduction tandis que les seconds assurent le soutien.

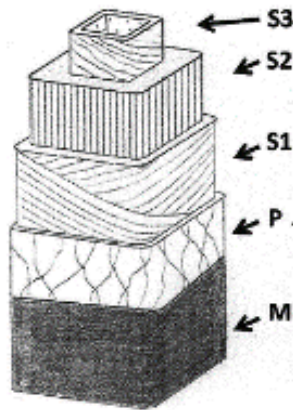
Ces cellules, qui meurent quelques semaines après leur différenciation, sont orientées verticalement et dotées de parois épaisses. Elles jouent véritablement le rôle de charpente.

- Les cellules parenchymateuses sont dotées d'une paroi plus fine et d'une durée de vie plus longue. Elles peuvent être orientées dans le sens de la croissance de l'arbre mais également horizontalement en suivant un axe radial. Cette orientation radiale leur permet de remplir un rôle de réseau vital au sein du bois.

Les cellules du bois se caractérisent par une structure pariétale particulière. En effet, partant de l'extérieur vers l'intérieur, la paroi cellulaire de ces cellules ligneuses est composée d'une fine paroi primaire et d'une seconde paroi, dite paroi secondaire, bien plus épaisse et plus dense (Figure 2-1).

La paroi primaire est celle dont la cellule est dotée après la division cellulaire à partir de l'assise cambiale. Cette paroi relativement extensible permet la croissance de la cellule axialement, radialement et tangentiellement, ce qui constitue le début de la différenciation cellulaire (Trouy, 2015). Après cette différenciation, la paroi primaire sera fortement lignifiée.

La paroi secondaire est déposée sur la face interne de la paroi primaire par la cellule encore vivante une fois ses dimensions finales atteintes. Cette paroi secondaire est subdivisée en 3 couches et est composée en grande partie de cellulose, ainsi que d'hémicelluloses, de lignine et de pectine. Entre les cellules, il existe une couche intercellulaire appelée lamelle moyenne. Celle-ci est principalement composée de lignine (Saka, 2001; Stevanovic and Perrin, 2009). Cette lignine sert de liant entre les cellules du bois pour former un tissu continu.



**Figure 2-1.** Représentation schématique de la structure pariétale d'une cellule de bois (M : lamelle moyenne, P : paroi primaire, S1 + S2 + S3 : paroi secondaire (Badel *et al.*, 2015).

Les parois des cellules de bois sont composées en majorité de cellulose, qui est leur constituant de base. La cellulose est un homopolymère constitué de chaînes de glucose. Ces chaînes de cellulose s'associent parallèlement par des liaisons hydrogènes pour former une fibrille élémentaire. Ces fibrilles sont elles-mêmes associées entre-elles et organisées en longs filaments, appelés microfibrilles de cellulose, qui alternent des zones d'agencement ordonné des chaînes de cellulose (zones cristallines) et des zones désordonnées (zones amorphes). La composition, la structure de la cellulose et son agencement sont expliqués en détail au chapitre 3.

Les microfibrilles de cellulose sont agencées différemment au sein des parois primaires et secondaires des cellules du bois. Au sein des parois primaires, les microfibrilles n'ont aucune organisation particulière (Stevanovic and Perrin, 2009). Elles forment un réseau lâche et extensible qui permettra la croissance cellulaire au cours de la différenciation cellulaire (Trouy, 2015). Dans les couches de la paroi secondaire, les microfibrilles sont orientées selon des angles particuliers, appelés angles de microfibrille (AMF). Cet angle de microfibrille se mesure par rapport à l'axe longitudinal de la cellule, et il est différent d'une couche à l'autre entre la première et la deuxième couche, ainsi qu'entre la deuxième et la troisième couche. Au sein de ces trois couches, les microfibrilles s'organisent sous forme de structures hélicoïdales.

La première couche de la paroi secondaire, la couche S1, est celle qui est en contact avec la paroi primaire. Cette couche est composée de sous-couches qui alternent deux orientations de microfibrilles différentes, avec changement du sens d'enroulement (structure hélicoïdales en S et en Z), ce qui lui donne une structure fibrillaire croisée.

Dans la couche S2, les microfibrilles sont orientées dans le même sens et leurs microfibrilles ont un AMF compris entre 5° et 10°, ce qui les oriente presque dans l'axe longitudinal de la cellule. Cette couche S2 est aussi la plus épaisse, et l'orientation de ses microfibrilles lui confère une grande importance dans les

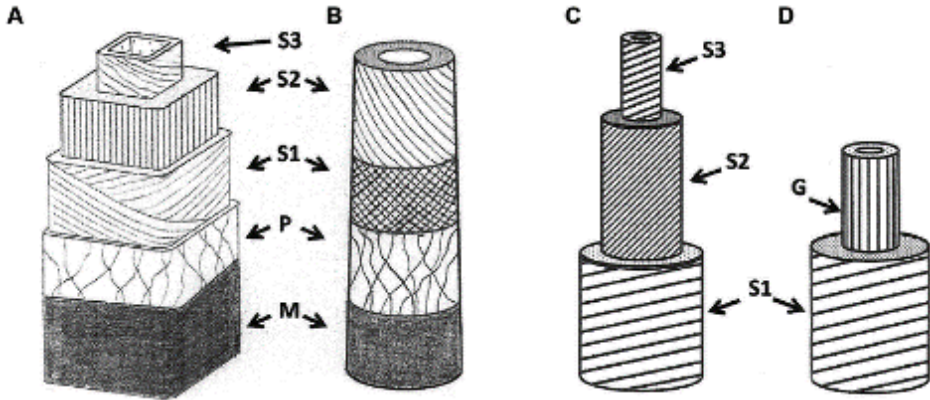
propriétés mécaniques du bois, en particulier sa résistance en tension (Barnett and Bonham, 2004; Donaldson, 2008).

La couche S3, la plus interne à la cellule, est elle aussi constituée de sous-couches et possède des microfibrilles dont la structure hélicoïdale est toujours celle d'une hélice S.

Du fait de son épaisseur et de l'angle de ses microfibrilles de cellulose, la couche S2 joue un rôle important dans les parois des cellules de bois juvénile et de bois de réaction. Le bois juvénile est le bois qui a été formé par un cambium jeune, ce bois se retrouve dans la région de la moelle (centre) de l'arbre. Le bois juvénile s'avère moins résistant au niveau mécanique que le bois mature. Cette différence s'explique en partie par l'angle plus important des microfibrilles de cellulose de la couche S2 du bois juvénile par rapport au bois mature. Or, si l'angle des microfibrilles augmente, le module d'élasticité E du bois diminue, ce qui entraîne une plus faible rigidité et une plus grande flexibilité (Barnett and Bonham, 2004).

Le bois de réaction est un type de bois particulier, formé par l'arbre lorsqu'il est soumis à des contraintes gravitationnelles qui induisent un déséquilibre morphologique. L'arbre produit alors un bois de réaction qui vise à contrebalancer ces contraintes et à restaurer son équilibre. Chez les résineux, le bois de réaction se situe du côté soumis à la compression (bois de compression). À l'inverse, le bois de réaction des feuillus se situe du côté soumis à la tension (bois de tension). La différenciation entre le bois de réaction et le bois normal est due à des ajustements au niveau pariétal lors de l'étape de différenciation et de maturation des cellules. L'angle des microfibrilles et la composition chimique du bois de réaction va différer de ceux du bois normal (Figure 2-2). Pour le bois de compression des résineux, la teneur en lignine des parois sera plus élevée, la couche S3 sera absente tandis que la couche S2 sera plus épaisse et l'AMF sera plus grand (Timell, 1982; Donaldson and Singh, 2013). Chez les feuillus, l'inverse se produit (AMF plus faible et moins de lignine) avec en plus la présence possible de fibres qualifiées de gélatineuses. Ces fibres possèdent une couche appelée G, contenant de la cellulose avec un plus haut degré de cristallinité que dans le bois normal (Trouy, 2015).





**Figure 2-2.** Représentations schématiques de la structure pariétale des cellules de bois normaux et de réaction chez les résineux (A : bois normal, B : bois de compression) et chez les feuillus (C : bois normal, D : bois de tension) (M : lamelle moyenne, P : paroi primaire, S1 + S2 + S3 : paroi secondaire, G : couche gélatineuse) (Badel *et al.*, 2015).

## 4. Composition chimique du bois

Le bois est un matériau lignocellulosique naturel, dont la composition organique élémentaire approximative est de 50 % de carbone, 43 % d'oxygène, 6 % d'hydrogène et 1 % d'azote (en % de la masse organique anhydre). À cette partie organique s'ajoute également dans la composition totale quelques pourcents provenant de la partie inorganique (minérale). Ces éléments sont assemblés pour former les constituants du bois. Celui-ci est alors composé majoritairement de cellulose formant des microfibrilles, elles-mêmes enrobées de deux autres polymères amorphes que sont les hémicelluloses et les lignines. Au sein du composite qu'est le bois et en particulier les parois de ses cellules, les hémicelluloses et la lignine jouent le rôle de matrice, alors que les microfibrilles de cellulose forment les fibres de renfort.

La proportion de ces trois polymères diffère entre les bois de résineux et ceux de feuillus (Tableau 2-2). Si le taux de cellulose est relativement le même (entre 40 et 50 %), le bois de feuillus est composé de plus d'hémicelluloses et moins de lignines que celui de résineux. À ces trois composés structuraux s'ajoutent également des substances protéiques, des extractibles et des éléments minéraux.

**Tableau 2-2.** Composition chimique moyenne du bois de résineux et de feuillus d'essences de la zone tempérée (d'après (Thomas, 1977; Stevanovic and Perrin, 2009)).

Constituant	Résineux	Feuillus
Cellulose	42 ± 2	45 ± 2
Hémicelluloses	27 ± 2	30 ± 5
Lignines	28 ± 3	20 ± 4
Extractibles et autres (pectine, éléments minéraux, etc.)	3 ± 2	5 ± 3

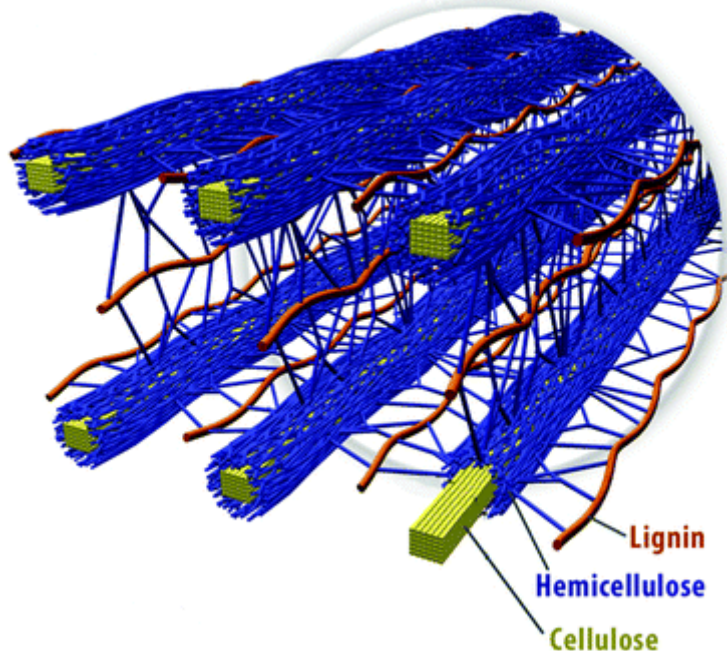
### **4.1. La cellulose**

La cellulose, composant principal du bois, est un homopolymère linéaire de  $\beta$ -glucopyranose. Elle est décrite en détail au chapitre 3.

### **4.2. Les hémicelluloses**

Les hémicelluloses sont des hétéropolymères ramifiés constitutifs de la paroi cellulaire mais de plus faible masse moléculaire que la cellulose. Contrairement à cette dernière, qui est un homopolysaccharide formé exclusivement d'un seul type de glucide (le glucose), les hémicelluloses sont composées de glucides de différentes catégories. Bien que, du fait de leur variété, il soit impossible de décrire de manière exhaustive tous les types d'hémicelluloses, on y retrouve le plus souvent les monosaccharides (et dérivés) suivants : glucose, acide glucuronique, galactose, acide galacturonique, xylose et arabinose. Dans le bois, les plus importants types d'hémicelluloses sont les glucanes, les xylanes, les mannanes et les galactanes. Les xylanes sont des pentosanes (sucre à cinq carbones, C5) tandis que les trois autres sont des hexosanes (C6).

Au sein des parois cellulaires, les hémicelluloses se retrouvent étroitement associées avec la cellulose (Figure 2-3). Elles jouent le rôle d'intermédiaire entre la matrice de lignine et le renfort des microfibrilles de cellulose en assurant les liaisons chimiques entre ces deux constituants. Les hémicelluloses et la cellulose forment l'holocellulose, que l'on obtient par une délignification sélective du bois. La composition des hémicelluloses diffère entre les bois de feuillus et de résineux.



**Figure 2-3.** Agencement de la cellulose, des hémicelluloses et des lignines au sein du complexe lignocellulosique (US DOE, 2007).

Les hémicelluloses du bois de feuillus contiennent une large proportion de xylanes et de mannanes, avec toutefois de cinq à dix fois plus xylanes que de mannanes (Tableau 2-3).

**Tableau 2-3.** Composition chimique du bois de cinq feuillus nord-américains (Timell, 1967; Saka, 2001; Stevanovic and Perrin, 2009)

Composant (% du bois anhydre)	<i>Acer rubrum</i>	<i>Betula papyrifera</i>	<i>Fagus grandifolia</i>	<i>Populus tremoloides</i>	<i>Ulmus americana</i>
Cellulose	45	42	45	48	51
Lignines	24	19	22	21	24
Hémicelluloses					
• Glucorono- xylane	25	35	26	14	-
• Glucoman- nane	4	3	3	3	4
Pectine, amidon, cendres, ...	2	1	4	4	2

Dans le bois de résineux, les xylanes et mannanes constituent également les principaux types d'hémicelluloses. Ce sont cependant ici les mannanes qui dominent en général les xylanes (Tableau 2-4) (Timell, 1967; Saka, 2001; Stevanovic and Perrin, 2009).

**Tableau 2-4.** Composition chimique du bois de cinq résineux nord-américains (Timell, 1967; Saka, 2001; Stevanovic and Perrin, 2009)

Composant (% du bois anhydre)	<i>Abies balsamea</i>	<i>Picea glauca</i>	<i>Pinus strobus</i>	<i>Tsuga canadensis</i>	<i>Thuja occidentalis</i>
Cellulose	42	41	41	41	41
Lignines	29	27	29	33	31
Hémicelluloses					
• Glucorono- xylane	9	13	9	7	14
• Glucoman- nane	18	18	18	16	12
Pectine, amidon, cendres, ...	2	1	3	3	2

### 4.3. Les lignines

La lignine est le constituant structural caractéristique des plantes vasculaires et le composé structural du bois le plus complexe et le moins bien connu. À l'inverse de la cellulose et des hémicelluloses, la lignine n'est pas composée de glucides mais d'unités phénoliques formant des polymères aromatiques associés au sein de macromolécules amorphes. Les structures de la lignine, basées sur trois monolignols précurseurs différents, sont si variées qu'il serait plus juste de parler des lignines que de la lignine. Ces structures sont également d'une grande variabilité inter- et intra-spécifique.

Les lignines sont en interaction étroite avec la cellulose et les hémicelluloses au sein des parois végétales. Elles forment avec les hémicelluloses une matrice qui entoure les microfibrilles de cellulose. Lors de la formation des parois, la lignine est l'élément déposé en dernier lieu et qui vient alors combler les espaces vides au sein de la paroi. Les réseaux de microfibrilles étant plus lâches dans la paroi primaire, celle-ci contient alors plus de vide à combler et donc, proportionnellement, plus de lignine. Bien que moins épaisse que la paroi secondaire, la paroi primaire est en fait la plus lignifiée.

En plus de jouer un rôle de matrice adhésive, les lignines sont hydrophobes et diminuent la perméabilité des parois, permettant alors à la cellule de jouer un rôle d'élément conducteur. Les lignines confèrent également de la rigidité aux parois cellulaires. Elles jouent le rôle de barrière physique hydrophobe et apportent aux tissus lignifiés une forte résistance aux attaques biologiques. La lamelle moyenne intercellulaire, qui permet l'assemblage de différents types de cellules, est également presque exclusivement composée de lignines.

#### **4.4. Les extractibles**

On désigne sous le terme générique d'extractibles la large gamme de composés de faible poids moléculaire que l'on retrouve dans la structure poreuse du bois. Leur nom provient du fait qu'il est possible d'extraire la majorité de ces composés à l'aide de solvants organiques ou d'eau, sans qu'il soit nécessaire de traiter et modifier chimiquement les autres constituants structuraux du bois (cellulose, hémicelluloses et lignines). La plupart des extractibles sont des métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils ne sont pas indispensables à la croissance de l'arbre (comme l'est la cellulose, les hémicelluloses et les lignines). Ils contribuent malgré tout de manière significative aux propriétés physiques et technologiques du bois, comme sa durabilité, sa stabilité dimensionnelle ou encore son acoustique. Ces métabolites secondaires sont formés par les cellules de parenchyme qui, avant de mourir, vont produire à partir des réserves d'amidon ces métabolites secondaires qui seront ensuite relargués et iront alors imprégner le bois et en modifier les propriétés.

Bien que la plupart des extractibles ne soient pas liés chimiquement à la structure des parois cellulaires, certains (comme les tannins condensés) le sont mais font tout de même partie de l'appellation extractibles. À l'inverse, on considère parfois à tort certaines molécules, comme les sucres extractibles (par exemple de l'érable à sucre), comme des extractibles alors qu'il s'agit en fait de polysaccharides solubles dans l'eau. La gamme des molécules considérées comme extractibles est donc large, et un extrait obtenu par un solvant contient presque toujours un mélange complexe de molécules. Les extractibles comprennent des composés phénoliques (stilbènes, tannins, etc.) et des composés terpéniques (colophane, térébenthine, résines, etc.), mais aussi des graisses et des cires.

Il arrive que la définition d'extractibles inclue également les composés inorganiques, que l'on retrouve dans les cendres après combustion du bois, bien qu'il ne s'agisse pas réellement de composés extractibles.

### **5. Déconstruire la structure du bois**

La composition et l'agencement des composants et des cellules du bois lui donnent les propriétés particulières (résistance mécanique, durabilité, etc.) qui en font un matériau de grand intérêt. Certains usages visent à exploiter les propriétés de certains éléments en particulier et non plus du bois dans son ensemble. Le bois devient alors une source de matières premières qu'il est nécessaire de déconstruire, à un degré de déconstruction plus ou moins poussé.

Lorsqu'on lui applique un traitement de défibrage destiné à en individualiser les cellules, la matière bois entre dans la production de panneaux de fibres de bois et de papier. Dans ce cas-ci, le terme « fibre » est celui employé par l'industrie de la trituration pour désigner les cellules de bois qui comprennent les fibres, les vaisseaux, les trachéides et les cellules de parenchyme.

Déconstruite totalement à l'état de molécules, la cellulose et les hémicelluloses deviennent source de sucres simples qui peuvent être utilisés dans l'industrie

chimique. La lignine, solubilisée et extraite, trouve elle aussi d'autres usages hors du bois.

Les procédés industriels de déconstruction qui visent à isoler les « fibres » (ou certains de leurs constituants pariétaux) peuvent être mécaniques, chimiques ou un mélange de deux. Ces procédés peuvent générer des coproduits qui sont vus comme une plus-value ou une contrainte selon le procédé employé et le produit final visé.

Cette section se concentrera sur les méthodes de déconstruction du bois qui visent à isoler les fibres en les dégradant le moins possible afin d'en conserver certaines propriétés, en particuliers mécaniques. Bien que la cellulose et les hémicelluloses de bois puissent également être considérées comme des sources de glucides, cet usage entre en concurrence avec des méthodes de séparation et de valorisation de glucides issus de ressources ou résidus agricoles qu'il paraît difficile de pouvoir concurrencer directement en terme de coûts.

### ***5.1. Procédés de mise en pâte***

La pâte est définie comme une « matière fibreuse, généralement d'origine naturelle et végétale, préparée en vue de subir d'autres traitements de fabrication » (Petit-Conil, 1999). Dans le cas de l'industrie papetière, on parlera de pâte à papier, destinée à la fabrication des papiers et cartons.

Historiquement, l'industrie papetière s'est tournée vers le bois comme source de fibres vers le milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle. La pâte à papier était alors produite à cette époque principalement au départ de vieux chiffons, desquels il était relativement aisé d'en isoler les fibres. Avec l'accroissement de la demande, l'industrie papetière s'est tournée vers une autre source abondante de fibres cellulosiques : le bois.

Une distinction est faite entre les fibres longues issues des bois de résineux et les fibres courtes issues des bois de feuillus (Tableau 2-5). Le terme papetier « fibre » est employé ici autant pour les feuillus que pour les résineux, bien qu'il désigne en fait chez ces derniers les trachéides, qui assurent également la fonction de soutien. Ces types de fibres de résineux ou de feuillus ont des propriétés mécaniques et optiques différentes et sont utilisées dans des proportions variables selon le produit papetier désiré (carton, papier journal, papier graphique, etc.). Notons que les dimensions des différents constituants du bois (trachéides, fibres, vaisseaux, etc.) varient également selon l'essence et l'origine du bois (lieux de croissance, conditions stationnelles, etc.). C'est ainsi que les résineux de l'Europe du Nord (Scandinavie) sont réputés pour leurs trachéides plus longues et que la pâte issue de ces bois est considérée comme une référence dans le secteur papetier (Petit-Conil, 1999).

**Tableau 2-5.** Longueur moyenne des fibres du bois de plusieurs essences européennes (Ilvessalo-Pfäffli, 1995)

Essence	Longueur moyenne des fibres (mm)
<i>Populus tremuloïdes</i>	1,0
<i>Betula sp.</i>	1,3
<i>Fagus silvatica</i>	1,2
<i>Fraxinus excelsior</i>	0,9
<i>Quercus robur</i>	1,1
<i>Abies alba</i>	3,7
<i>Picea abies</i>	3,7
<i>Pinus sylvestris</i>	3,1
<i>Pseudotsuga menziesii</i>	3,9

### 5.1.1. Procédés mécaniques de mise en pâte

Les procédés mécaniques de mise en pâte séparent et isolent les fibres sans en éliminer la lignine. Comme la quasi-totalité des composants du bois est conservée (cellulose, hémicelluloses et lignines), ce type de pâte est appelé « pâte avec bois » et les procédés associés se caractérisent par des hauts rendements pâte/bois (Tableau 2-6). Néanmoins, ce type de procédé endommage aussi une certaine proportion des fibres et conduit à un mélange de fibres entières et de fragments de fibres.

**Tableau 2-6.** Rendement massique des différents types de procédés de fabrication de pâte (Bary-Lenger, Pierson and Poncelet, 1999)

Type de pâte	Procédé de mise en pâte	Rendement (% de la masse de bois anhydre)
Pâtes mécaniques	Thermo-mécanique (TMP)	90 %
	Chimico-thermo-mécanique (CTMP)	85 – 90 %
Pâtes chimiques	Kraft (procédé alcalin)	40 – 50 %
	Bisulfite (procédé acide)	45 – 55 %

Ce type de séparation mécanique est obtenu soit en râpant directement les rondins écorcés sur une meule, soit en défibrant, à l'aide d'un défibreux, du bois préalablement réduit en copeaux (*woodchips*). À côté des procédés purement mécaniques, il existe des combinaisons employant aussi de la chaleur (TMP, *thermo-mechanical pulping*) et des réactifs chimiques (CTMP, *chemico-thermo-mechanical pulping*). L'emploi de chaleur (110 à 140 °C) permet de ramollir la lignine qui est thermoplastique et de faciliter la séparation des fibres. L'emploi de réactifs chimiques (soude ou sulfite de sodium) vise à améliorer les propriétés mécaniques de la pâte produite et son aptitude au blanchiment.

Comme la quasi-totalité de la lignine est encore présente sur et dans les fibres, celles-ci possèdent une grande rigidité. Cet avantage est néanmoins contrebalancé par le caractère photosensible de la lignine, lequel contribue au jaunissement du

papier. Il est néanmoins possible d'appliquer à ce type de pâte des procédés de blanchiment visant à diminuer l'effet jaunissant de la lignine.

### **5.1.2. Procédés chimiques de mise en pâte**

Les procédés de séparation des fibres de bois, d'abord mécaniques, se sont progressivement développés vers des procédés chimiques. Les papetiers, premiers véritables chimistes industriels du bois, ont développé des procédés chimiques de mise en pâte dont l'objectif était de dissoudre la lignine en attaquant le moins possible la fibre et sa cellulose.

Les procédés chimiques de mise en pâte visent à dissoudre la lignine et à récupérer les fibres quasi intactes. Ce type de procédé amène à une pâte qui ne contient pas ou peu de lignine et qui est alors appelée « pâte sans bois ». Comme la lignine (mais également une part plus ou moins importante des hémicelluloses) est extraite du bois, ce type de procédé se caractérise par un rendement massique pâte/bois plus faible que ceux des pâtes mécaniques, de l'ordre de 40 à 50 %. L'absence de lignine rend également les fibres plus souples et plus faciles à blanchir.

Dans l'industrie papetière classique, les pâtes chimiques sont obtenues par la dissolution de la lignine à haute température et en présence d'un réactif chimique soit alcalin, soit acide. Les procédés alcalins emploient le sulfate de soude (procédé kraft) ou le sulfate anthraquinone. Les procédés acides sont utilisés uniquement pour les bois de résineux (Petit-Conil, 1999). Ils emploient du bisulfite (hydrogénosulfite) de calcium, de sodium, d'ammonium ou de magnésium selon le type de bois (teneur et composition en résine, composés phénoliques, etc.). Un procédé plus récent, appelé Organosolv, fait appel à des solvants organiques (méthanol, éthanol) pour dissoudre la lignine (Johansson, Aaltonen and Ylinen, 1987; Mcdonough, 1992).

Les lignines dissoutes peuvent être récupérées pour des valorisations non-énergétiques (Ragauskas *et al.*, 2014; Beckham *et al.*, 2016). Selon le réactif employé pour dissoudre la lignine, celle-ci sera récupérée selon divers procédés et possèdera des caractéristiques différentes. Les lignines précipitées issues du procédé kraft (lignines kraft ou sulfate) sont ainsi différentes des lignosulfonates isolées des liqueurs des procédés aux sulfites. Les lignosulfonates sont les lignines industrielles actuellement les plus couramment disponibles sur le marché. Les lignines organosolves sont quant à elles obtenues par évaporation des solvants organiques employés.

### **5.1.3. Le procédé kraft**

Le procédé kraft (ou sulfate) est le procédé de mise en pâte le plus employé au monde. En 2016, la production mondiale de pâte kraft représentait 76 % de la production mondiale (Food and Agriculture Organization - FAO, 2018). Ce procédé alcalin bien connu a été mis au point dans les années 1880 par un chimiste allemand, Carl Dahl (Dahl, 1884). Dans ce procédé, les agents de dissolution de la lignine sont la soude (NaOH) et le sulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S) qui forment des conditions basiques ( $\pm$  pH 12) de cuisson du bois préalablement réduit en plaquettes. La cuisson s'effectue sous pression, entre 160-180°C et durant 30 à 180 minutes (Biermann, 1996). Ce procédé s'applique aussi bien au bois de feuillus que de résineux, et il



produit une pâte caractérisée par sa très grande résistance (*kraft* signifie *fort* en allemand et en suédois). Ce procédé est également tolérant à la présence résiduelle d'écorce.

La caractéristique première, qui fait le succès mondial du procédé kraft, est son procédé de récupération et régénération de ses réactifs (appelés liqueurs) qui combine recyclage et production énergétique (sous forme de chaleur au sein de la chaudière de récupération). Les lignines dissoutes lors de la cuisson sont valorisées énergétiquement par combustion lors de la phase de recyclage des liqueurs. Le haut contenu énergétique des lignines, avec un pouvoir calorifique supérieur (PCS) de l'ordre de 21 à 28 MJ/kg (Demirbas, 2001, 2017) rend leur valorisation énergétique particulièrement intéressante. La lignine dissoute qui est contenue dans la liqueur noire (après cuisson) confère ainsi à cette liqueur un PCS de 13 à 15,5 MJ/kg de liqueur noire sèche (Gavrilescu, 2008). Quand cette énergie est valorisée en cogénération, cela permet à une unité de production de pâte kraft d'être autonome énergétiquement.

Il est intéressant de noter que le plus faible rendement matière du procédé kraft s'explique non seulement par la dissolution de la lignine, mais également par celle d'une partie de la cellulose et des hémicelluloses. En effet, en milieu fortement basique, la cellulose et toutes les hémicelluloses qui sont liées par le même type de liaison  $\beta$ -(1,4) peuvent être attaquées au départ de leur extrémité réductrice (Gellerstedt, 2001). Cette réaction, bien connue des papetiers, est nommée *peeling*. Pendant la cuisson kraft, c'est de cette façon que de grandes quantités de xylanes sont perdues. Cependant, de par leur structure, les xylanes sont moins sensibles à cette réaction de *peeling* que les mannanes. Les bois de résineux perdent ainsi environ 75% de leurs glucomannanes (Stevanovic and Perrin, 2009).

## 6. Prétraitement de la biomasse bois

Si les procédés de déconstruction du bois abordés jusqu'ici visaient à conserver l'intégrité de la fibre (et de sa cellulose), il existe des cas dans lesquels une déconstruction presque totale est l'objectif visé. C'est par exemple le cas des procédés de production de biocarburant au départ de biomasse lignocellulosique, procédés qui cherchent à hydrolyser les polysaccharides de la biomasse pour ensuite permettre la fermentation des sucres simples produits et, *in fine*, obtenir du bioéthanol (Balat, 2011). La récupération de molécules plus ou moins élémentaires issues du bois est également visée pour des valorisations chimiques, par exemple en molécules-plateformes (Figure 2-4).

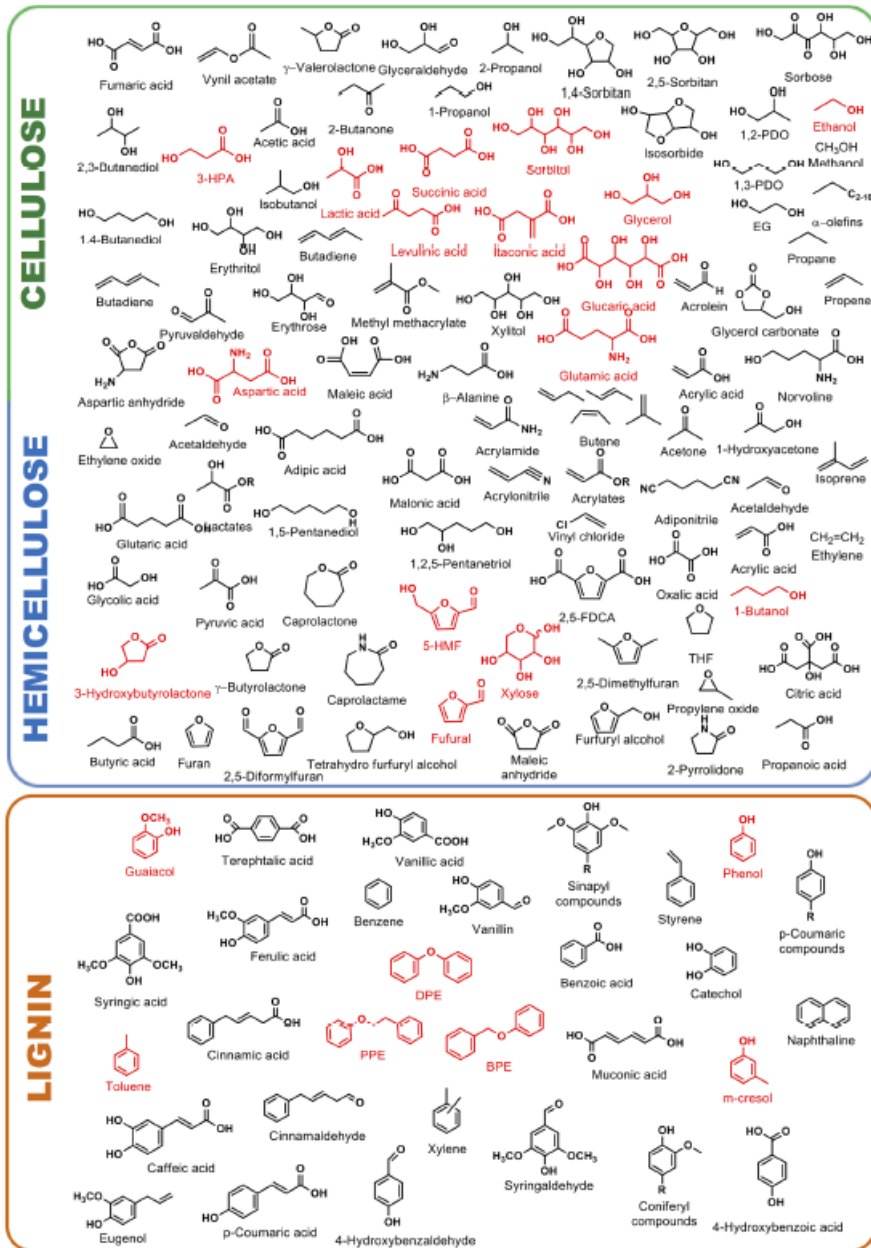
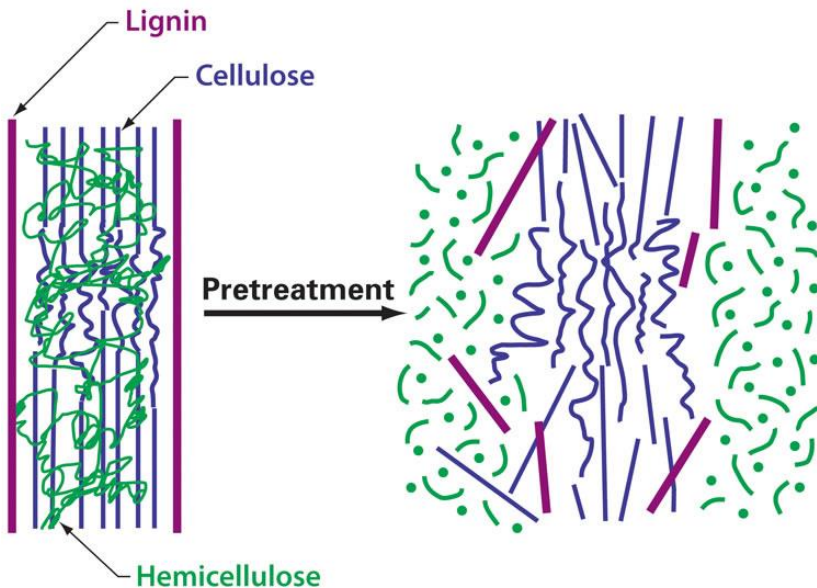


Figure 2-4. Exemples de molécules qui peuvent être obtenues au départ de transformations de biomasse lignocellulosique. Les molécules-plateformes sont identifiées en rouge (Espro *et al.*, 2017).

Dans ces cas où l'on vise la déconstruction totale du bois, certains composants (comme la lignine) ou certaines particularités (comme les zones cristallines des microfibrilles de cellulose) du bois sont considérés comme des obstacles à franchir. On appelle prétraitements les procédés appliqués ayant pour objectif de rendre accessible les différents constituants du bois (ou de la biomasse lignocellulosique) pour une variété d'applications. Par exemple, ces prétraitements peuvent être appliqués afin de faciliter l'étape d'hydrolyse de la cellulose en mono- ou disaccharides. Dans ce cas, ces prétraitements ont pour but de diminuer la taille des particules traitées et d'ouvrir leur structure (Figure 2-5) (Isikgor and Becer, 2015). Les prétraitements agissent afin d'enlever les lignines et les hémicelluloses, de diminuer la cristallinité de la cellulose, d'accroître la porosité et la surface accessible des différents éléments afin de faciliter les procédés suivants, généralement l'hydrolyse de la cellulose (Sun and Cheng, 2002; Liu *et al.*, 2006; Amidon *et al.*, 2008; Hendriks and Zeeman, 2009). L'objectif visé est de pouvoir passer d'un rendement d'hydrolyse de la cellulose inférieur à 20 % (sans prétraitement) à un rendement supérieur à 90 % (Lynd, 1996).



**Figure 2-5.** Objectif et impacts d'un prétraitement sur une matière lignocellulosique (US DOE, 2007)

Un nombre varié de méthodes de prétraitement existe. On peut catégoriser ceux-ci selon le type de méthode (physique, chimique, etc.), bien qu'il existe également des combinaisons de méthodes. Citons, de manière non-exhaustive, les prétraitements suivants (Chum *et al.*, 1999; Sun and Cheng, 2002; Jorgensen, Kristensen and Felby, 2007; Zhu, 2008) :

- Physiques : broyage mécanique, cryobroyage, exposition à des rayonnements (rayon X, faisceau d'électrons, micro-ondes) ;
- Physicochimiques : vapocraquage (*steam explosion*) avec ou sans détente explosive, à l'ammoniaque, au CO<sub>2</sub>, au SO<sub>2</sub> ;
- Chimiques : bases, acides dilués, ozone, agents oxydants, solvants organiques, solvant ioniques ;
- Biologiques : enzymes, champignons ;
- Électriques

## 7. Conclusion

Le bois est un élément naturel d'une complexité remarquable. Tout, depuis l'organisation moléculaire de ses trois polymères principaux (cellulose, hémicelluloses, lignines) jusqu'au type, à l'agencement et au vieillissement de ses cellules, concourent à lui conférer ses propriétés particulières. Celles-ci influent sur la valorisation qui peut en être faite. Comprendre la construction du bois permet de comprendre comment l'utiliser de la manière la plus adéquate, mais également comment le déconstruire.

L'industrie papetière est devenue maître de la déconstruction du bois. Ce savoir-faire, combiné à l'évolution de la consommation de papier et la demande croissante en produits biosourcés, poussent désormais certains acteurs à ne plus regarder le bois comme une simple source de fibres. Le bois devient la matière première à un ensemble de procédés de déconstruction/valorisation qui visent à produire à la fois des molécules d'intérêts, de l'énergie, des carburants et des matériaux. Ce concept est le même que la raffinerie pétrolière mais, quand il est appliqué à la matière première bois au sein d'une unité du secteur bois, devient une bioraffinerie lignocellulosique forestière.

---

## Produire de la nanocellulose au sein d'une bioraffinerie forestière intégrée

Adapté de

*L'utilisation de l'hydrolyse enzymatique pour la production de nanocellulose dans une stratégie de bioraffinage forestier intégré (synthèse bibliographique)*

Pierre-Louis Bombeck<sup>1</sup>, Jacques Hébert<sup>1</sup>, Aurore Richel<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech. Département BIOSE. Unité de Gestion des Ressources forestières et des Milieux naturels. Passage des Déportés, 2. BE-5030 Gembloux (Belgique).

<sup>2</sup>Université de Liège – Gembloux Agro-Bio Tech. Département AgroBioChem. Unité de Chimie biologique et industrielle. Passage des Déportés, 2. BE-5030 Gembloux (Belgique).

Publié dans *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, 2016 **20**(1), 94-103.



## 1. Mise en contexte

Certaines industries, comme celle de la pâte à papier ou des panneaux MDF, maîtrisent des procédés de déconstruction du bois qui visent à en isoler les fibres individuellement. Les autres composants du bois sont perçus comme des obstacles à l'isolement de la fibre, et sont au mieux valorisés ensuite énergétiquement. Dans une bioraffinerie forestière lignocellulosique, l'objectif est de séparer l'ensemble des constituants du bois (cellulose, hémicelluloses, lignines, extractibles) afin de les valoriser tous et sous des formes diverses et variées (énergie, composés chimiques, matériaux, etc.).

Ce chapitre, qui reprend le contenu du premier article rédigé en début de thèse, fait le point sur le composant principal du bois : la cellulose. Il aborde l'intégration des notions de bioraffinage au sein d'unités papetières existantes selon le concept de la bioraffinerie forestière intégrée (IFBR). L'approche retenue est celle de la valorisation, au sein de ces IFBR, de la pâte cellulosique en nanocellulose, identifiée depuis plusieurs années comme un produit d'avenir aux multiples applications potentielles.

Ce chapitre/article aborde également, au départ de la littérature existante, les différents types de nanocelluloses, les procédés de production existants et les marchés potentiels. Il présente également l'intérêt et les avantages des prétraitements enzymatiques en comparaison des autres méthodes facilitant la production de nanocellulose.

## 2. Introduction

La raréfaction attendue des ressources fossiles et la volonté internationale de réduire les émissions de CO<sub>2</sub> amène de plus en plus la recherche à s'orienter vers des solutions alternatives à la production d'énergie et aux produits issus classiquement de la pétrochimie. Tout en prenant en compte ces considérations, l'industrie papetière, secteur exigeant des investissements initiaux lourds, est également à la recherche de nouveaux produits et procédés permettant l'exploitation et la valorisation la plus judicieuse de l'intégralité des constituants du bois qu'elle consomme.

C'est dans ce contexte qu'émerge le concept de bioraffinerie forestière intégrée (Zhang, Paice and Deng, 2011; Browne *et al.*, 2012; Christopher, 2013). Ce type de bioraffinerie, alimentée par la biomasse lignocellulosique forestière et dont l'infrastructure s'appuie sur les installations d'une usine de pâte chimique, cherche à valoriser au maximum tous les composants de cette biomasse à travers des procédés à faible impact environnemental.

Le principal constituant de cette biomasse forestière est la cellulose, dont les principaux usages en termes de volumes restent dans le domaine des pâtes et papiers (FAO, 2013). Il est cependant possible de déconstruire la paroi des fibres et trachéides afin d'en libérer les éléments cellulosiques dont le diamètre va jusqu'à l'échelle nanométrique (Brinchi *et al.*, 2013; Dufresne, 2013; Isogai, 2013). On obtient alors une gamme de produits, aux propriétés différentes des fibres proprement dites, dont l'appellation varie avec les dimensions de ceux-ci.

On distingue déjà ainsi, selon le degré croissant de déconstruction, les filaments de cellulose (produits commercialement sous la marque FiloCell™), d'un diamètre allant de 80 à 300 nm et d'une longueur de 100 à 2000 µm, et les nanocelluloses à proprement parler (Tableau 3-1). Les propriétés particulières de ces nanocelluloses permettent une variété d'usages dans des domaines à haute valeur ajoutée, allant du secteur pharmaceutique à l'aérospatial (Dufresne, 2013; Cowie *et al.*, 2014; Shatkin *et al.*, 2014).

Cette valorisation supérieure de la cellulose peut s'associer avec les objectifs visés par le bioraffinage de la biomasse forestière. En effet, les procédés de production de nanocellulose utilisent habituellement une cellulose d'une pureté élevée (Brinchi *et al.*, 2013). Cela s'explique par l'influence des hémicelluloses et lignines résiduelles, qui forment alors une barrière limitant l'accès des réactifs à la cellulose et augmentent également la consommation de réactifs et d'énergie pendant le processus de séparation (Jonoobi *et al.*, 2015). Notons que la présence d'hémicelluloses peut être aussi vue comme un avantage car favorisant alors par la suite l'individualisation des nanofibres produites (Chaker *et al.*, 2013). La séparation des différents constituants de la biomasse lignocellulosique, suivie de leur valorisation optimale telle qu'envisagée dans une bioraffinerie forestière intégrée, en fait une source de cellulose idéale pour cette filière.

Dans certains pays, les techniques de production actuelles de nanocellulose font parfois appel à des procédés chimiques qui peuvent s'avérer lourds et peu



écologiques sans contrôles strictes et si aucune optique de recyclage n'est envisagée. D'autres pays, comme le Canada, s'orientent ainsi vers des procédés avec des empreintes environnementales globales plus faibles en employant, par exemple, des techniques d'hydrolyse en conditions acides très contrôlées ou bien mécano-enzymatiques.

La présente étude fait le point sur le potentiel d'utilisation de l'hydrolyse par voie enzymatique en tant qu'un de ces traitements, apportant ainsi une plus-value à la cellulose et pouvant s'intégrer également dans le cadre d'une bioraffinerie forestière intégrée.

**Tableau 3-1.** Les différents types de nanocelluloses (d'après Klemm et al., 2011 ; Dufresne, 2012)

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

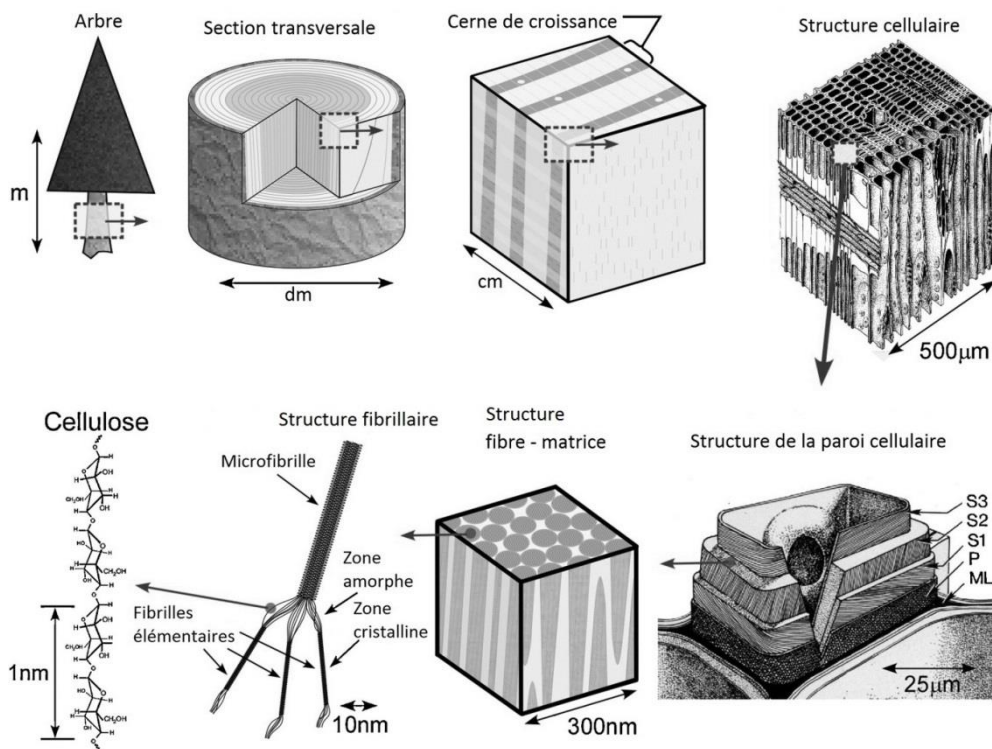
### 3. La cellulose

La cellulose est le biopolymère naturel et renouvelable le plus abondant sur terre. Elle provient majoritairement de la paroi cellulaire des plantes (le bois, source principale de cellulose, en contient de 40 à 50 %, le coton 90 %, le lin 80 % et le chanvre 70 % (Stevanovic and Perrin, 2009) mais peut aussi être d'origine bactérienne (*Acetobacter xylinum*) ou animale (chez les invertébrés marins du sous-embanchement des Tuniciers ou Urochordés) (Klemm *et al.*, 2011). On estime la production mondiale annuelle de cellulose par les plantes à plus de  $50.10^9$  tonnes, et la ressource totale dépasserait les  $10^{11}$  tonnes (Habibi, Lucia and Rojas, 2010). Les forêts regroupant 80 % de cette cellulose, le bois représente la source principale de cellulose sur terre (Stevanovic and Perrin, 2009).

**Tableau 3-2.** Constituants majeurs du bois

<b>Composants du bois</b>	<b>Contenu (%)</b>
<b>Cellulose</b>	40 - 50
<b>Hémicelluloses</b>	15 - 35
<b>Lignines</b>	20 - 30
<b>Extractibles</b>	1 - 5

La cellulose est le constituant principal du bois (Tableau 3-2) où elle forme l'élément structurant des parois cellulaires et joue le rôle de renfort axial. Elle se présente sous la forme de microfibrilles de longueurs variables. De manière simplifiée, ces microfibrilles sont elles-mêmes composées de microfibrilles de cellulose, dont l'orientation et le degré de cristallinité déterminent les propriétés chimiques, physiques et mécaniques du bois. Les microfibrilles sont caractérisées par un diamètre variant de 10 à 25 nm (selon l'origine de la cellulose) et une longueur pouvant atteindre plusieurs dizaines de micromètres. Ces microfibrilles sont composées de fibrilles dites « élémentaires », d'un diamètre moyen de 3,5 nm, formées de chaînes de cellulose (homopolysaccharide linéaire formé par la condensation de D-glucopyranose unies par des liaisons  $\beta$  (1→4)) (Fengel and Wegener, 1989; Brinchi *et al.*, 2013). Ces chaînes de cellulose ne sont pas individuellement isolées, mais assemblées et liées (tant au niveau intra- que intermoléculaire) par des liaisons hydrogènes. Ces liaisons résultent de l'interaction physico-chimique entre les groupements hydroxyles de chaînes macromoléculaires voisines (Stevanovic and Perrin, 2009). Une hiérarchie a été identifiée et définie depuis longtemps, dans laquelle les fibrilles élémentaires s'assemblent en plus larges unités appelées microfibrilles, elles-mêmes assemblées entre elles et formant les microfibrilles de cellulose (Figure 3-1) qui entrent dans la composition des parois cellulaires (Fengel and Wegener, 1989). Il s'avère que le caractère ordonné des molécules n'est pas uniforme dans les microfibrilles, formant ainsi des zones cristallines (zones ordonnées) et des zones amorphes (zones peu ordonnées) (Moon *et al.*, 2011). Dans le bois comme chez les plantes, la cellulose est présente en association avec d'autres biopolymères tels que les hémicelluloses et les lignines, formant des complexes lignine-polysaccharides (en anglais *lignin-carbohydrates complex* (LCC)) (Fengel and Wegener, 1989; Stevanovic and Perrin, 2009; Christopher, 2013).

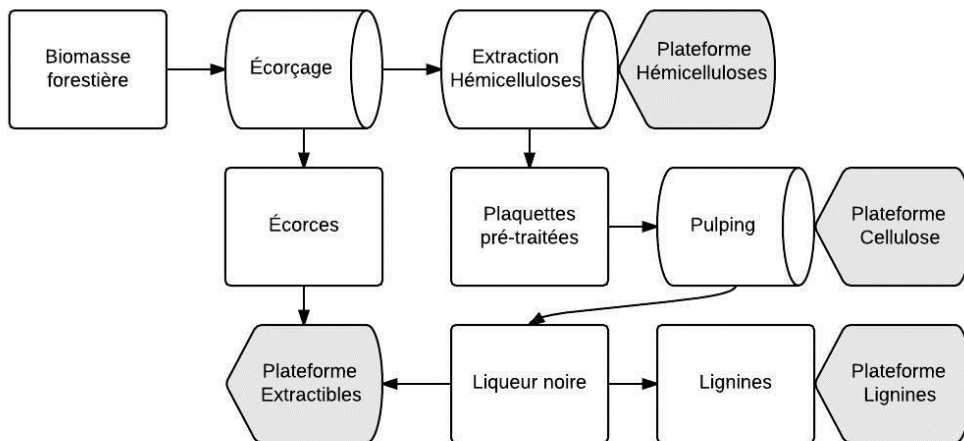


**Figure 3-1.** Structure hiérarchique du bois : de l'arbre à la cellulose (d'après Postek et al., 2011. © IOP Publishing. Reproduit avec la permission d'IOP Publishing. Tous droits réservés)

## 4. Bioraffinerie forestière intégrée à une usine de pâte chimique de type kraft

Avec le souci actuel de rechercher des alternatives ou compléments aux ressources fossiles, le concept de bioraffinerie forestière intégrée est de plus en plus mis en avant (Christopher, 2013; Rafione *et al.*, 2014). Comme pour la bioraffinerie, il s'agit d'installations qui intègrent les équipements et les procédés durables destinés à convertir la biomasse (ici forestière) en un large spectre de bioproduits à haute valeur ajoutée d'une part et, d'autre part, en bioénergie (bioéthanol, chaleur, électricité). Le concept est analogue aux raffineries pétrolières qui génèrent une variété de produits et de sources d'énergie à partir du pétrole. Il s'agit de tirer avantage au maximum de la variété de composants et d'intermédiaires de la biomasse pour en maximiser la valeur ajoutée. Cette approche multidisciplinaire intègre des procédés de conversion physiques, mécaniques, chimiques, biologiques, ainsi que des catalyses et biocatalyses pour augmenter l'efficacité, diminuer les coûts et la consommation d'énergie.

Dans le cas d'une bioraffinerie forestière intégrée (*Integrated forest biorefinery*, IFBR), c'est la biomasse lignocellulosique forestière (bois et résidus forestiers) qui est utilisée. Comme cette biomasse lignocellulosique est constituée majoritairement de quatre composants (Tableau 3-2), une IFBR intègre donc quatre plateformes dans une optique de valorisation de l'ensemble de ces composants (Figure 3-2).



**Figure 3-2.** Schéma synthétique des processus et plateformes impliqués dans une Bioraffinerie Forestière Intégrée (IFBR) (d'après Christopher, 2013).

Les usines de pâte chimique fonctionnant déjà comme des bioraffineries forestières élémentaires, elles constituent une base de départ idéale pour leur évolution complète en IFBR (Zhang, Paice and Deng, 2011; Bajpai, 2013; Machani, Nourelfath and D'Amours, 2014). En effet, l'industrie papetière (pâte et papier) est une des plus importantes industries de biomasse non-alimentaire au niveau mondial, avec une capacité de production de pâte d'environ 180 millions de tonnes par an (FAO, 2013). Cependant, l'évolution négative du marché papetier au niveau mondial, à l'exception des secteurs de l'emballage et des papiers domestiques et sanitaires, oblige ces industries à réduire encore leurs coûts de fabrication, mais surtout à identifier de nouveaux débouchés et à générer de nouveaux revenus issus de ces nouveaux produits.

Parmi les usines de production de pâte à papier, celles employant les procédés dits « chimiques » sont parfaitement indiquées pour jouer la transition de l'usine de pâte « classique » à l'IFBR. Ces usines, via leurs procédés, produisent et valorisent déjà une partie des coproduits issus de la fabrication de la pâte. Le procédé chimique le plus employé dans le monde est le procédé au sulfate, produisant une pâte dite « Kraft ». Les installations employant ce procédé sont particulièrement bien adaptées pour évoluer de plus en plus vers une IFBR (Moshkelani *et al.*, 2013; Rafione *et al.*, 2014). Le procédé Kraft consiste en la cuisson, à haute température (170 - 175°C) et

pendant une durée de deux à cinq heures, des copeaux de bois dans un mélange d'hydroxyde de sodium et de sulfure de sodium. Cette cuisson provoque la dissolution de la majeure partie des lignines et hémicelluloses contenues dans le bois pour récupérer in fine des éléments cellulosiques fibreux relativement intacts. Ces fibres, au sens papetier du terme, contiennent néanmoins encore des teneurs non nulles de lignines et d'hémicelluloses. Outre cette dissolution, le procédé Kraft se distingue par le taux élevé de récupération (98 %) des réactifs chimiques utilisés. Cette récupération passant par une étape de combustion des lignines et hémicelluloses dissoutes, les usines de pâtes Kraft sont actuellement capables, par cogénération, d'assurer leur autosuffisance énergétique et d'en dégager un surplus.

Un procédé de production de fibres papetières déjà fortement optimisé et qui permet une valorisation des coproduits, des installations existantes et performantes, une main-d'œuvre spécialisée, une logistique d'approvisionnement en matières premières et de traitement des effluents déjà en place font des usines de pâtes chimiques le point de départ idéal à l'évolution de ces installations en IFBR.

Bien que les usines de production de pâtes chimiques selon le procédé sulfite puissent être également des exemples de bioraffineries intégrées, l'utilisation prédominante du procédé Kraft dans le monde (près de 90% des pâtes chimiques (Christopher, 2013; FAO, 2013)), ainsi que la qualité différente des lignines qui peuvent en être récupérées, semble en faire le premier choix en terme de conversion totale vers une IFBR (Bajpai, 2013; Moshkelani *et al.*, 2013; Rafione *et al.*, 2014).

## 5. La nanocellulose issue de pâte à papier

Si, actuellement, la principale application en terme de volume (FAO, 2013) de la pâte de cellulose est son utilisation pour la fabrication des papiers et cartons, une autre application porteuse à plus haute valeur ajoutée est étudiée depuis plusieurs années : utiliser une partie de la pâte produite en tant que matière première pour la fabrication de nanocellulose (Henriksson *et al.*, 2007; Pääkkö *et al.*, 2007; Spence *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2012). En effet, en arrivant à en extraire de la cellulose à une échelle nanoscopique, la majorité des imperfections associées à la structure hiérarchique des fibres disparaît (Moon *et al.*, 2011). Cette nanocellulose possède des caractéristiques mécaniques, chimiques et optiques largement étudiées qui ouvrent la voie à de nombreux usages allant des applications directes dans l'industrie papetière aux biocomposites, en passant par les domaines tels que le pharmaceutique et le biomédical (Habibi, Lucia and Rojas, 2010; Siró and Plackett, 2010; Klemm *et al.*, 2011; Moon *et al.*, 2011; Brinchi *et al.*, 2013; Dufresne, 2013; Isogai, 2013; Lindström and Aulin, 2014; Jorfi and Foster, 2015).

Le terme « nanocellulose » fait généralement référence à un matériau cellulosique dont au moins une des dimensions est inférieure à 100 nm. Selon les dimensions et le procédé de fabrication, on différencie plusieurs types de nanocellulose (Klemm *et al.*, 2011; Dufresne, 2012). La cellulose microfibrillée (*microfibrillated cellulose*, MFC) provient de la délamination de pâte de bois par pression mécanique en combinaison avec un traitement chimique ou enzymatique. La cellulose nanocristalline (*cellulose nanocrystals*, CNC) est obtenue par hydrolyse d'une

cellulose pouvant provenir de plusieurs sources. Notons également la nanocellulose bactérienne (*bacterial nanocellulose*, BNC) synthétisée par certaines bactéries du genre *Gluconacetobacter*. Selon la littérature, ces différents types de nanocellulose peuvent être nommés différemment. Des recueils non-exhaustifs des termes anglophones utilisés ont été proposés par Klemm et al. (2011) et Dufresne (2012) (Tableau 3 – 1).

### **5.1. Cellulose micro-fibrillée (MFC)**

La cellulose microfibrillée (*microfibrillated cellulose*, MFC) est obtenue par destruction mécanique de l'organisation naturelle des macrofibrilles de cellulose en soumettant une suspension de pâte à des forces de cisaillement très élevées. Une fois la structure originale de la fibre déconstruite, on obtient alors des microfibrilles (seules ou en paquets) d'un diamètre de l'ordre de 10 à 100 nm et d'une longueur pouvant atteindre plusieurs micromètres (Dufresne, 2012). Différents traitements mécaniques peuvent être utilisés pour cette déconstruction. Taniguchi et al. (1998) et Iwamoto et al. (2007) ont ainsi obtenu de la MFC par une méthode de broyage (*grinding*) (Taniguchi and Okamura, 1998; Iwamoto, Nakagaito and Yano, 2007). Une technique de cryobroyage a été mise au point par Chakraborty et al. (2005) mais n'a mené qu'à des diamètres de microfibrilles de l'ordre de 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  (Chakraborty, Mohini and Mark, 2005). D'autres méthodes ont également été répertoriées par Dufresne (2012) comme les ultrasons haute intensité ou l'électrospinning. Cependant, la technique la plus utilisée reste l'homogénéisation sous haute pression.

Les premiers travaux sur cette méthode de production à partir de pâte de résineux ont été développés par Herrick et al. (1983) et Turbak et al. (1983) en utilisant un homogénéisateur à lait (Herrick *et al.*, 1983; Turbak, Snyder and Sandberg, 1983). Il s'agit de forcer sous pression (55 MPa), le passage d'une suspension diluée de pâte (1 – 2 % en masse) à travers une mince fente. Les fibres sont alors soumises à d'importantes forces d'impact et de cisaillement qui provoquent un haut degré de fibrillation et conduisent à la production de MFC. Une autre technique d'homogénéisation est celle basée sur l'utilisation d'un microfluidiseur (Microfluidics Inc., USA), dans lequel la suspension de pâte est pompée et injectée sous pression à travers des chambres en forme de Z où elle est soumise également à des forces d'impact et de cisaillement. La méthode, efficace, présente cependant aussi des inconvénients : colmatages fréquents des chambres dans les appareils et consommation énergétique élevée due au nombre de cycles nécessaires (Herrick *et al.*, 1983; Spence *et al.*, 2011).

### **5.2. Cellulose nanocristalline (CNC)**

La préparation de cellulose nanocristalline (*cellulose nanocrystals*, CNC) à partir de pâte de cellulose consiste en une hydrolyse acide contrôlée qui dissout préférentiellement les régions amorphes des microfibrilles pour libérer les domaines cristallins (Dufresne, 2012). La CNC issue du bois se présente sous forme de bâtonnets de 3 – 5 nm de diamètre et d'une longueur de 100 - 200 nm (Brinchi *et al.*,

2013). Ces bâtonnets sont composés à 100% de cellulose hautement cristalline (cristallinité entre 54% et 88%, (Moon *et al.*, 2011)). Il est possible d'obtenir de la CNC à partir de pâte chimique de type Kraft (blanchie ou non) en employant de l'acide sulfurique pour l'hydrolyse (Kontturi and Vuorinen, 2009). C'est d'ailleurs souvent la technique employée pour obtenir des nanofibres directement à partir de pâte Kraft (Orts *et al.*, 2005; Ioelovich and Leykin, 2006; Stenstad *et al.*, 2008). L'utilisation d'une hydrolyse enzymatique pour la production de CNC a été utilisée par Siqueira *et al.* (2010) en combinaison avec des traitements mécaniques (Siqueira *et al.*, 2010). Selon les combinaisons de traitements appliquées, de la CNC pouvait être produite mais en combinaison avec de la MFC.

## 6. Les prétraitements enzymatiques

Dans le cas de production de MFC par homogénéisation à partir de fibres de bois, deux principaux inconvénients apparaissent. Le premier est celui posé par les colmatages fréquents de l'appareil qui, combiné avec le nombre de passages nécessaires (généralement de dix à vingt), impliquent de fréquentes interventions manuelles de débouchage. Ces colmatages imposent de travailler avec des concentrations initiales en cellulose très faibles (de 0,1 à 2 %). Le second est l'importante consommation énergétique engendrée par les multiples passages nécessaires de la suspension à travers les appareils. Cette consommation a été évaluée par Spence *et al.* (2011) selon l'appareil utilisé (broyeur, homogénéisateur ou microfluidiseur) et allait de 2.280 kWh/tonne à 21.900 kWh/tonne (Spence *et al.*, 2011), mais des valeurs supérieures à 30.000 kWh/tonne ont aussi été observées (Nakagaito and Yano, 2004).

Afin de diminuer le nombre de passes nécessaires et donc aussi la consommation énergétique, des prétraitements chimiques ou enzymatiques peuvent être appliqués à la cellulose avant ces traitements mécaniques. Les prétraitements chimiques étudiés comprennent l'hydrolyse acide, la carboxyméthylation ou encore une oxydation des fibres par du 2,2,6,6-tétraméthylpipéridine-1-oxyl (TEMPO) (Mishra *et al.*, 2012; Isogai, 2013). Ces méthodes font cependant appel à des réactifs coûteux qui ne peuvent, dans certains cas, pas être recyclés. Bien que des prétraitements d'hydrolyse à l'acide puissent aussi être employés, cette technique est préférentiellement utilisée pour attaquer les zones amorphes de la structure dans un objectif de production de cellulose nanocristalline (Orts *et al.*, 2005; Bondeson, Kvien and Oksman, 2006; Dufresne, 2006; Morán *et al.*, 2008), dont les applications diffèrent de la MFC. L'utilisation d'enzymes lors de prétraitements (Henriksson *et al.*, 2007; Pääkkö *et al.*, 2007; Zhu, Sabo and Luo, 2011) présente quant à elle les avantages suivants : coûts moins élevés des enzymes par rapport aux réactifs chimiques spécifiques (e.g. TEMPO), caractère écologique, absence d'installations spécifiques résistantes aux réactifs chimiques et possibilité plus aisée de récupération et valorisation des produits de l'hydrolyse. Ces avantages en font la méthode à favoriser dans le cadre d'un bioraffinage qui cherche à diminuer son impact sur l'environnement et à valoriser un maximum de ses coproduits.

L'hydrolyse enzymatique de la cellulose est un processus complexe du fait de la nature, structure et organisation des chaînes de cellulose. Le mécanisme d'hydrolyse fait intervenir trois différents types d'enzymes, dont les actions indépendantes agissent en synergie pour former un système cellulase complet durant le processus d'hydrolyse (Rabinovich, Melnick and Bolobova, 2002; Percival Zhang, Himmel and Mielenz, 2006; Liu *et al.*, 2009). Ces trois groupes de cellulase se distinguent par leur activité :

- les endoglucanases (ou  $\beta$ -1,4-endoglucanases), qui hydrolysent au hasard les liaisons glucosidiques internes d'une chaîne dans les zones amorphes, créant ainsi de nouvelles chaînes de longueur variable ainsi que de nouvelles extrémités de chaînes ;
- les exoglucanases qui hydrolysent les chaînes pour libérer du glucose à partir d'une extrémité réductrice (glucanohydrolase) ou du cellobiose (dimère de glucose) à partir d'une extrémité non-réductrice (cellobiohydrolase) ;
- les cellobiases (ou  $\beta$ -glucosidases) qui hydrolysent le cellobiose en glucose.

Il est donc possible de favoriser certaines activités en jouant sur la composition du mélange enzymatique utilisé. On distingue généralement les préparations de cellulases qui regroupent principalement les activités endoglucanase et cellobiohydrolase de celles à activité principalement cellobiase, bien que celles-ci soient souvent utilisées en combinaison avec les premières. Les cellulases ont d'ailleurs déjà trouvé des applications dans le secteur papetier, principalement dans les étapes de raffinage des fibres papetières ou de recyclage des papiers (Dufresne, 2012; Torres *et al.*, 2012). La plupart des cellulases utilisées industriellement sont d'origine fongique ou microbienne et leur production est assurée par des entreprises spécialisées dans le domaine. Les principales souches fongiques utilisées sont *Trichoderma* spp. (*T. reesei*, *T. viride* et *T. longibrachiatum*) et *Aspergillus* spp. (*A. niger* et *A. oryzae*) mais il est également possible d'extraire des cellulases de cultures de *Penicillium funiculosum*, d'*Humicola insolens*, de *Bacillus* spp. ou de *Saccharomyces* spp. Il est important de noter que les complexes cellulasiques obtenus à partir de ces différentes souches possèdent généralement des propriétés variables. Ainsi, les cellulases produites par *Aspergillus* spp. sont principalement des endoglucanases avec de faibles quantités d'exocellulases tandis que *Trichoderma* spp. produit surtout des cellobiohydrolases. Ces cellulases de différentes origines possèdent cependant un pH optimal assez similaire (aux environs de 5) alors que la température optimale est plus variable, allant de 45°C (souches d'*Aspergillus* sp.) à 65°C (souches de *Penicillium* sp.).

Bien que les enzymes soient déjà utilisées par les industries du secteur cellulosique, leur utilisation dans la production de nanocellulose (plus particulièrement de MFC) est en pleine croissance (Dufresne, 2012). Les sources de cellulose utilisées sont d'ailleurs variées, allant de la pâte à papier blanchie (Henriksson *et al.*, 2007; Pääkkö *et al.*, 2007) aux fibres de sisal (*Agave sisalana* Perrine) (Siqueira *et al.*, 2010, 2011). Dans tous les cas, le traitement enzymatique est en réalité un prétraitement à l'application indispensable de forces mécaniques de



cisaillement. Pääkkö et al. (2007) ont ainsi démontré qu'une étape de prétraitement enzymatique employant uniquement des endoglucanases sur de la pâte à papier blanchie facilitait l'étape d'homogénéisation en diminuant les cas de colmatages des chambres ainsi que la consommation énergétique des appareils mécaniques (Pääkkö *et al.*, 2007). La MFC produite possédait également des caractéristiques de tailles et de formes plus homogènes. Il faut cependant noter que la concentration et le type d'enzymes peuvent également affecter la longueur des fibres et la proportion de fibres dites fines. Une charge enzymatique peu élevée est toutefois suffisante pour faciliter la désintégration par homogénéisation, même si un meilleur résultat et une diminution des cas de colmatages sont obtenus en combinant ce prétraitement enzymatique avec un prétraitement mécanique visant à diminuer la longueur des fibres avant l'étape d'homogénéisation (Henriksson *et al.*, 2007).

## **7. Potentiel d'intégration d'une ligne de production de nanocellulose dans une usine de pâte Kraft**

Comme la production de nanocellulose peut se faire en employant une partie de la pâte produite directement par une usine de pâte de type Kraft classique, l'intégration d'une telle ligne de production ne nécessite pas de modifier le fonctionnement des installations déjà existantes.

Les principaux freins à son développement résident dans la variabilité des caractéristiques de la nanocellulose produite en fonction du processus employé (Klemm *et al.*, 2011; Dufresne, 2012) et dans le contrôle des coûts de production afin que ce produit puisse économiquement rivaliser avec certains dérivés de synthèse issus de la filière pétrochimique (agents de renfort, de densification, modificateurs rhéologique, etc.). La mise au point de techniques de production assurant une uniformité des caractéristiques et restant économiquement compétitive est actuellement à l'étude (Nelson and Retsina, 2014).

Certaines firmes ont cependant déjà intégré, sur un site de production de pâte, une unité de valorisation de leur cellulose (en Filament de cellulose (Kruger, Québec, Canada), en nanocellulose cristalline (Domtar, Québec, Canada)).

## **8. Marchés ciblés et potentiel commercial**

Le secteur papetier a bien compris l'avantage qu'il aurait à tirer de la production de nanocellulose et investit dans la recherche, comme en témoignent les usines pilotes construites en collaboration entre des industriels et des universités ou centres de recherche. Citons ainsi, de manière non-exhaustive, certaines collaborations au Canada (Québec) (joint-venture entre Domtar Corporation et FPInnovations, Kruger et FPInnovations), aux Etats-Unis dans le Maine (University of Maine et USDA Forest Service) et le Wisconsin (US Forest Products Laboratory), en France (CTP et FCBA) ou encore en Suède (collaboration entre le Royal Institute of Technology et Innventia). Très récemment, SAPPI (South Africa Pulp and Paper Industries) et la Edinburgh Napier University faisait part dans la presse de la création future d'une

unité pilote après la découverte d'un nouveau procédé de fabrication de nanocellulose (Griffiths, 2015).

Plusieurs études de marché pour ces nanocelluloses ont été réalisées. Citons, parmi elles, celle de Future Markets (2015) ou celle de Shatkin et al. (2014) qui ont réalisé récemment une synthèse du marché potentiel de la nanocellulose et de ses applications selon les volumes utilisables (Tableau 3-3) (Shatkin *et al.*, 2014; FutureMarkets, 2015). Si la nanocellulose peut être utilisée dans des produits papetiers traditionnels (papiers, emballages), elle peut également l'être dans de nouveaux secteurs où la valeur ajoutée est importante pour une faible quantité de nanocellulose (e.g. pharmaceutique). Les applications nécessitant des volumes plus importants pourraient influencer la demande en nanocellulose et jouer sur les prix de celle-ci. Cowie et al. (2014) estime ainsi raisonnable que la taille potentielle du marché mondial atteigne plus de 32 millions de tonnes de nanocellulose pour les marchés à grands volumes et plus de 2 millions pour les marchés à faibles volumes (Cowie *et al.*, 2014). À cela doit s'ajouter le marché des applications émergentes dont le volume est encore difficile à estimer.

**Tableau 3-3.** Applications potentielles de la nanocellulose selon les volumes utilisables (d'après Shatkin et al., 2014)

<b>Applications à grands volumes</b>	<b>Applications à faibles volumes</b>	<b>Applications nouvelles ou émergentes</b>
Ciment	Panneaux muraux	Capteurs
Packaging	Isolation	Fibre de renforcement
Papier	Peinture	Filtration (air et eau)
Produits d'hygiène	Aérogels (industrie des gaz et huiles)	Modificateurs de viscosité
Textiles pour l'habillement	Aérospatial (structure et intérieur)	Purification
Automobile (carrosserie et intérieur)		Cosmétiques
Remplacement plastique (packaging et film)		Excipients
		LED organique
		Électronique flexible et recyclable
		Photovoltaïque
		Impression 3D
		Films photoniques

## 9. Conclusion

L'utilisation d'enzymes dans l'industrie papetière est déjà d'actualité (désencrage, raffinage, etc.). Les entreprises spécialisées dans la production industrielle d'enzymes ont d'ailleurs déjà une gamme de mix à destination de cette industrie et ne cessent pas d'étoffer leur offre. Le concept d'IFBR est de plus en plus étudié et apparaît comme une solution qui se doit d'être technologiquement et économiquement viable pour l'industrie papetière. Les techniques de production de nanocellulose (CNC et MFC) et les applications de celles-ci sont également déjà bien identifiées. Des applications nouvelles sont par ailleurs découvertes chaque année et le marché potentiel pour ces produits est estimé à plus de 34 millions de tonnes de nanocellulose.

On remarque cependant que l'utilisation d'enzymes pour la production de nanocellulose reste confinée à des étapes de prétraitements, qui emploient principalement des endoglucanases. Or, l'objectif d'une IFBR est de valoriser au maximum ses produits et coproduits. Si la production de glucose destiné au secteur des biocarburants par hydrolyse enzymatique est déjà employée, d'autres produits d'hydrolyse peuvent également être valorisés. Par exemple, Vanderghem et al. (2012) ont montré la possibilité d'optimiser un processus d'hydrolyse de pâte à papier par des exoglucanases qui favorise la production de cellobiose (Vanderghem *et al.*, 2012).

Avec l'intérêt croissant porté par le secteur papetier, la recherche future devrait s'orienter vers des méthodes de prétraitements enzymatiques qui permettent également la production et la valorisation de ce type de coproduits. Cette valeur ajoutée justifierait l'utilisation préférentielle des enzymes dans la production de nanocellulose et s'intégrerait dans la vision de valorisation maximale qui définit le concept d'IFBR.

## 10. Résumé original de l'article

Dans un monde qui cherche à se défaire de sa dépendance à la pétrochimie, le concept de bioraffinage de la biomasse forestière est de plus en plus étudié. Dans une recherche de valorisation maximale des composants de cette biomasse, la transformation de fibres de cellulose en nanocellulose séduit de plus en plus l'industrie papetière par sa haute valeur ajoutée.

Le concept de bioraffinage forestier intégré vise l'adaptation des usines de pâte à papier en bioraffineries où un maximum des coproduits sont valorisés. Au départ de la cellulose contenue dans la pâte, deux types de nanocellulose peuvent être obtenus en déstructurant les fibres selon différents moyens. Comme elle génère des coproduits valorisables, l'hydrolyse enzymatique constitue un moyen de production de nanocellulose mais doit néanmoins être combinée à des traitements mécaniques. La production de nanocellulose au départ de pâte à papier chimique est une étape de fin de chaîne qui peut même s'envisager sans modifier le fonctionnement des usines actuelles. La viabilité économique de cette production et la taille du marché potentiel sont l'objet d'études récentes qui s'avèrent encourageantes.

La nanocellulose est un biomatériau d'avenir dont le domaine d'application ne cesse de grandir. La cellulose contenue dans la pâte à papier peut servir de matière première à la production de nanocellulose à l'aide de prétraitements enzymatiques générateurs de coproduits valorisables. Cette production peut s'intégrer dans une usine chimique classique de pâte et constituer ainsi un élargissement de la gamme de produits proposés par l'industrie papetière.

---

## Analyser l'impact des prétraitements enzymatiques à la surface des fibres cellulosiques

Adapté de:

*Predicting the most appropriate wood biomass for selected industrial applications: comparison of wood, pulping, and enzymatic treatments using fluorescent-tagged carbohydrate-binding modules*

Pierre-Louis Bombeck<sup>1</sup>, Vinay Khatri<sup>2,3</sup>, Fatma Meddeb-Mouelhi<sup>2,3</sup>, Daniel Montplaisir<sup>4</sup>, Aurore Richel<sup>1</sup> and Marc Beauregard<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>AgroBioChem Department, Laboratory of Biomass and Green Technologies, University of Liège, Gembloux Agro-Bio Tech, 5030 Gembloux, Belgium.

<sup>2</sup>Université du Québec à Trois-Rivières, Centre de Recherche sur les Matériaux Lignocellulosiques, C.P. 500, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada.

<sup>3</sup>PROTEO, Université Laval, Québec, QC G1V 0A6, Canada.

<sup>4</sup>Université du Québec à Trois-Rivières, Département de Chimie, Biochimie et Physique, C.P. 500, Trois-Rivières, QC G9A 5H7, Canada.

Publié dans *Biotechnology for Biofuels* (2017) **10**:293.



## 1. Remise en contexte

Dans le chapitre précédent, nous avons vu que la pâte à papier pouvait être employée comme matière première à la production de nanocellulose, en particulier de cellulose nanofibrillée. L'utilisation d'une hydrolyse enzymatique comme prétraitement à l'étape d'homogénéisation mécanique présentait une série d'avantages en comparaison à d'autres prétraitements, essentiellement chimiques.

Si tous les types de pâtes cellulosiques (pâtes mécaniques et pâtes chimiques) peuvent, en théorie, être hydrolysés par voie enzymatique, ces différentes pâtes ne réagiront cependant pas de la même manière selon leur composition chimique et selon le mélange enzymatique employé.

Dans des conditions particulières d'hydrolyse, seuls les éléments présents à la surface des fibres subiront les effets de l'hydrolyse. Ces modifications de surface ne sont cependant pas anodines en termes de valorisation ultérieure des pâtes prétraitées (capacité des fibres à former des liaisons entre elles et avec d'autres éléments, compatibilité avec une matrice dans un composite, etc.). Il s'agit également d'une bonne indication de la réactivité du substrat cellulosique vis-à-vis des enzymes, permettant alors de déterminer la meilleure combinaison substrat-enzymes à appliquer. L'analyse des modifications subies en surface des fibres fournit donc de précieuses informations, utiles au développement de nouvelles voies de valorisation. Cependant, ces analyses font généralement appel à des techniques chronophages et coûteuses en termes d'équipements.

Le présent chapitre reprend, sous la forme de l'article original publié, les résultats de la recherche menée dans l'objectif de valider l'utilisation d'une nouvelle méthode d'analyse. Nous démontrons qu'il est possible d'appliquer la méthode sur différentes pâtes non-blanchies et pour les types de traitement enzymatique étudiés. Cette méthode se base sur l'utilisation de sondes protéiques fluorescentes, qui permettent d'identifier et de quantifier les changements survenus à la surface des fibres après l'hydrolyse par une simple mesure de fluorescence. L'analyse de ces modifications de surface permet également d'identifier et d'orienter les fibres traitées et les coproduits d'hydrolyse vers les meilleurs débouchés possibles selon la combinaison pâte-enzymes utilisée.

## 2. Introduction

Global production of biofuels and bioproducts is increasing steadily because such products are greener alternatives to fossil fuels and their derivatives (Naik *et al.*, 2010; Scheffran, 2010; Nigam and Singh, 2011). Concomitantly, numerous new products and technologies based on the conversion of biomass have been developed over the last decade (Agbor *et al.*, 2011; Zhang, Paice and Deng, 2011; Dufresne, 2012; Christopher, 2013; Wegner, Ireland and Jones, 2013; Zhu *et al.*, 2016). Securing sufficient biomass as raw materials is a prerequisite to moving from a petro-chemical to a bio-chemical economy. Using feedstocks to support first-generation biofuel and bioproducts has shown its limits and produces certain undesirable socio-economic and environmental outcomes (Runge and Senauer, 2007; Fargione *et al.*, 2008). The use of lignocellulosic biomass (LCB, including dedicated lignocellulosic crops, agricultural and forestry residues and municipal and industrial wastes) to produce second-generation biofuel and bioproducts would avoid the negative impacts associated with first-generation feedstocks use (Eisentraut, 2010; Mohr and Raman, 2013).

Although LCB is a promising, abundant and renewable resource, it is difficult to treat due to its complex structure consisting of cellulose fibrils wrapped in a network of lignin and hemicelluloses. This network, collectively referred to as the lignin-carbohydrate complex, is highly recalcitrant and difficult to modify (Fengel and Wegener, 1984; Goldsworthy, Chandrakant and Opuku-Ware, 2003; Himmel *et al.*, 2007; Hendriks and Zeeman, 2009; Stevanovic and Perrin, 2009; Christopher, 2013). Consequently, several steps of pretreatments are needed to isolate each of the components before they can be used in value-added applications.

For the production of biofuels based on carbohydrates from LCB, such as bioethanol, the principal goal is the complete hydrolysis of polysaccharide components (mainly cellulose) of the raw material into monomers for subsequent fermentation (Sun and Cheng, 2002; Himmel *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Limayem and Ricke, 2012; Chaturvedi and Verma, 2013). Utilization of all other lignocellulosic components is not as well developed but is the focus of intensive research efforts (FitzPatrick *et al.*, 2010; Zhang, Paice and Deng, 2011; Zhang, Tu and Paice, 2011; Christopher, 2013). This “integrated biorefinery” concept involves a succession of steps for transforming the entire lignocellulosic biomass into biofuels and bioproducts. This concept has been demonstrated using a variety of physical, chemical and biological treatments (Huang *et al.*, 2008; Sims *et al.*, 2010; Gupta *et al.*, 2014) in a range of configurations (Clark *et al.*, 2006; Alvira *et al.*, 2010; Budarin *et al.*, 2011; Sheldon, 2014). Total utilization of LCB will permit commercial exploitation of the entire lignocellulosic biomass in a wide spectrum of bioproducts and bioenergy (Ragauskas, Williams, *et al.*, 2006; Yang and Yu, 2013; Zhu *et al.*, 2016). In this context, new bioproducts (e.g. biomaterials, biocomposites, biomembranes and biofilms) from previously unused components of LCB are receiving growing interest because they are also biodegradable, produced from a renewable carbon source and can have a wide variety of applications (Mohanty,



Misra and Hinrichsen, 2000; Mohanty, Misra and Drzal, 2002; John and Thomas, 2008; Dufresne, 2012; Zhu *et al.*, 2016). Unlike bioethanol, specific bioproducts based on lignocellulosic fibers do not require complete separation or deconstruction of the raw lignocellulosic polymers. Removal of some specific components or alteration of structural features of fibers leading to modulation of their physical and chemical properties is often sufficient (Orts *et al.*, 2005; Ragauskas, Williams, *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2011; Xu and Rowell, 2011; Dufresne, 2012; Zhu *et al.*, 2016).

A largely used green process for the removal or alteration of specific structural features of the biomass is the enzymatic hydrolysis or biocatalysis. Enzymes have been used for improving papermaking processes (for fiber cutting action, peeling, delamination, weakening effect, bleaching, refining) (Oksanen *et al.*, 1997; Bajpai, 1999; Cui *et al.*, 2015) and also for the deconstruction of lignocellulosic biopolymers (Pääkkö *et al.*, 2007; Siqueira *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2011; Gehmayr, Schild and Sixta, 2011; Dufresne, 2012; Torres *et al.*, 2012; de Campos *et al.*, 2013; Qing *et al.*, 2013; Sabo and Zhu, 2013; Yarbrough *et al.*, 2017). Actually, cellulases from *Trichoderma reesei* are subject to many studies and have been used to efficiently hydrolyze cellulose for decades (Oksanen *et al.*, 1997; Mansfield, Mooney and Saddler, 1999). Enzymes have high selectivity and turnover frequency, permitting processes with high selectivity and increased productivity on a variety of substrates (Ho, Ngo and Guo, 2014). For example, enzymatic hydrolysis avoids or drastically decreases the production of degradation products that are generated by classical acid hydrolysis (e.g. 5-hydroxymethylfurfural, 2-furfural) (Larsson *et al.*, 1999; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000). Many types of enzyme can catalyze LCB hydrolysis: endo- and exo-glucanase, cellobiase, xylanase, mannanase and many others. Synergy between several enzymes in a mixture of their lignocellulosic substrates has also been demonstrated, but are not yet completely known (Mansfield, Mooney and Saddler, 1999; Hall *et al.*, 2010; Hu, Arantes and Saddler, 2011; Várnai *et al.*, 2011). In addition to this, enzymes are costly, and accordingly, real-time dosage control is an important parameter in most industrial processes (Merino and Cherry, 2007; Hu, Arantes and Saddler, 2011; Klein-Marcuschamer *et al.*, 2012; Lee and Lavoie, 2013; Penttilä *et al.*, 2013; Lennartsson, Erlandsson and Taherzadeh, 2014).

The effectiveness and impact of enzymatic processes on a substrate can be quantified using physical and chemical methods. Among them, the most commonly used are: compositional analysis of the substrate after treatment (using FTIR, XPS) or of the hydrolysates (hydrolysis products content, using GC or HPLC), surface imaging (using SEM, TEM and AFM), index of crystallinity (using XRD and NMR) and mass balance calculations (Miller, 1959; Berezin, Rabinovich and Sinitsyn, 1977; Berlin *et al.*, 2006). However, current methods of analysis cannot directly monitor enzymatic action. It is not possible to determine the precise order in which components of the substrate were hydrolyzed as the enzymes penetrate the materials and what components are left exposed on fibers after treatment. While direct chemical characterization of the surface is possible with XPS, it remains that this

method is expensive and does not distinguish between different polysaccharides because they harbor similar functional groups (Khatri *et al.*, 2016).

The ability to directly monitor changes to the surface of LCB fibers during enzymatic treatment is essential for controlling and optimizing processes according to the final bioproducts targeted. To this end, a rapid and low-cost method to directly monitor the deconstruction of heterogeneous LCB during enzymatic hydrolysis has been developed (Khatri *et al.*, 2016; Hebert-Ouellet *et al.*, 2017). Called fluorescent-tagged carbohydrate-binding module method, or FTCM, this method is based on the use of four specific ready-to-use probes made of fluorescent-tagged recombinant carbohydrate-binding modules (named ft-CBM or probes throughout the text). In these probes, the recombinant CBM part binds to a specific component of the substrate surface. The fluorescence of the probe permits rapid quantification of the probes bound to the surface. The fluorescence can be measured by using an ordinary fluorescence plate reader. This new approach allows for specific surface changes to be tracked and for changes to biopolymers, in this case mannan, xylan, crystalline and amorphous cellulose, to be monitored. FTCM can detect these polymers at the surface of the substrate before and after any given treatment, be it mechanical, chemical or enzymatic (Khatri *et al.*, 2016; Hebert-Ouellet *et al.*, 2017).

In this study, we use FTCM to characterize how the surfaces of a variety of lignocellulosic biomass are modified by two different commercial enzyme cocktails. The substrates include two chemical-thermo-mechanical pulps, referred to as CTM pulps, and two Kraft wood pulps. This investigation provides information on which combination of enzyme treatment and biomass substrate is best suited for industrial applications in which various levels of fiber deconstruction and precise control of fiber surface composition are desirable, such as the production of nanocellulose, fiber-reinforce composites, or paper.

### **3. Material and methods**

#### **3.1. Lignocellulosic biomass**

Four wood pulps were selected to evaluate the effect of woody biomass composition and pretreatment on the experiment. Hardwood mix Kraft pulp (here referenced as HK) was kindly provided by Burgo Ardennes S.A. (Virton, Belgium). Softwood from spruce chemical-thermo-mechanical pulp (referenced as SM) and hardwood from poplar chemical-thermo-mechanical pulp (referenced as HM) were kindly provided by SAPPI Lanaken N.V. (Lanaken, Belgium). Softwood mix Kraft pulp (referenced as SK) was kindly provided by Kruger Wayagamac Inc. (Trois-Rivières, Canada). All pulps used in this study were unbleached. The chemical composition of the pulps was determined according to the NREL-TP-510-42618 standard method (Sluiter *et al.*, 2008). The length, width, fine percentage and zero span breaking length of wood pulp fibers were analyzed with a fiber quality analyzer (FQA) (LDA02-090 HiRes, OpTest Equipment Inc, Hawkesbury Canada) following the TAPPI T271 om-12 and T231 standard methods.

### **3.2. Enzyme solutions**

Two different commercial enzyme mixtures were used in this study, CelluClast 1.5L (Cat No #C2730) and Carezyme 1000L (Cat No #C2605), which were purchased from Sigma-Aldrich. CelluClast 1.5L (named “T” in this study) is a mixture of fungal hydrolytic enzymes from *T. reesei* and principally consists of two cellobiohydrolases and two endoglucanases, as well as small amounts of other cellulases and also various accessory enzymes which function as hemicellulases (Oksanen *et al.*, 1997; Hu, Arantes and Saddler, 2011; Gourlay *et al.*, 2015). Carezyme 1000L (named “A” in this study) consists of a mixture of several hydrolytic enzymes mixture from *Aspergillus* sp.

Both enzyme mixtures are widely employed for hydrolysis and deconstruction of lignocellulosic biomass. Both enzymes mixtures contain cellulase (CMCase), xylanase, and mannanase enzymes, whose activities were tested using carboxymethyl cellulose, xylan from birch wood, and galactomannan as substrates, respectively. The activities of cellulase, mannanase, and xylanase were assayed quantitatively using the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method which measures the reducing sugars generated by enzymatic hydrolysis from their absorption at 540 nm) as described by Miller (Miller, 1959). Protein content was quantified using the assay developed by Bradford (Bradford, 1976).

### **3.3. Enzymatic treatments of pulp**

Three samples of each pulp were prepared in suspension for three different treatments: one without enzyme addition (control sample, called “Std”), a second to which CelluClast 1.5L was added (called “T”), and third to which Carezyme 1000L was added (called “A”). Prior to enzyme addition, each sample was disintegrated in citrate buffer (having a concentration of 0.05 M and pH 4.8) at 1.2% consistency (24 grams of pulp on an oven dry matter basis in 2 L of buffer) with a standard pulp disintegrator and transferred into a 4-L Erlenmeyer flask. Suspensions were pre-heated until 50 °C using a controlled-environment incubator-shaker (New Brunswick Scientific Inc.). Enzyme solutions were then added to a final loading of 1275 mg of enzyme per gram of oven dry pulp. Hydrolysis was carried out in the incubator at 50 °C for 4 h under continuous orbital agitation (150 rpm). Enzymatic hydrolysis was stopped by incubating the pulp on ice for 15 min. Each sample was filtered and filtrate was boiled in a 95 °C water bath for 10 min and kept frozen at –20 °C until sugars analysis. Filtration of untreated and enzymes treated pulps produced paper sheets, of  $60 \pm 2$  g m<sup>-2</sup> in basis weight, as per the TAPPI T205 sp-02 standard methodology. The pH was measured before and after enzymatic treatment.

Optimization of hydrolysis conditions, such as duration and enzymes loading, was done on a small scale at high throughput using 96-wells microtiter plates with 3 mm diameter paper discs. After enzymatic digestion of the discs, FTCM test was applied to detect the optimal condition required for enzymes to promote the efficient degradation in cellulose and hemicellulose.

### ***3.4. Handsheet and paper disc preparation***

Four different pulps were used for the preparation of handsheets and paper discs. Handsheets of  $60 \pm 2$  g m<sup>-2</sup> basis weight were prepared as per the TAPPI T205 sp-02 standard. 3-mm paper discs were punched from handsheet (Khatri *et al.*, 2016).

### ***3.5. Construction of recombinant probe expression systems***

All carbohydrate-recognition probe genes were inserted into pET11a expression vectors. CBM 372 3a (*Clostridium thermocellum* CipA, NZYTech), CBM15 (*Cellvibrio japonicas*, Z48928), CBM17 (*Clostridium cellulovorans*, U37056), and CBM27 (*Thermotoga maritima*, NP\_229032) genes were synthesized by GenScript. The fluorescent protein genes (eGFP, mOrange2, mCherry, and eCFP) were cloned into the DraIII and BamHI sites while the CBM genes were introduced into the BsrGI and BamHI sites. All encoding genes were sequenced to ascertain the integrity and fidelity of the probes. The resulting probes GC3a, OC15, CC17, and CC27 (Khatri *et al.*, 2016; Hébert-Ouellet *et al.*, 2017) were used to detect crystalline cellulose, xylan, amorphous cellulose, and mannan, respectively.

### ***3.6. Expression and purification of probes***

All probes were produced in *E. coli* BL21(DE3) Gold pLysS cells and purified as described by Hébert-Ouellet *et al.* (Hébert-Ouellet *et al.*, 2017).

### ***3.7. Quantification of the carbohydrates on the surface of fiber paper disc using FTCM***

Tracking of the variation of carbohydrate on the surface of paper discs using the four different probes was done as described by Khatri *et al.* and Hébert-Ouellet *et al.* (Khatri *et al.*, 2016; Hébert-Ouellet *et al.*, 2017). Note that lignin fluorescence was subtracted from total fluorescence and that affinity of all probes used here for their respective substrates was previously characterized, as detailed in (Khatri *et al.*, 2016; Hébert-Ouellet *et al.*, 2017).

### ***3.8. Sugar analysis***

After enzymatic hydrolysis, a filtered hydrolysate was analyzed for cellobiose, glucose, xylose, and mannose concentrations using a HPAEC-PAD (Dionex ICS-5000+) and a GC-FID (Agilent Technologies 7890B) following methods from the work of Vanderghem *et al.* (Vanderghem *et al.*, 2009, 2012). Results were processed using Chromeleon 7® and OpenLAB CDS ChemStation software.

### ***3.9. Scanning electron microscope (SEM) images***

Scanning electron microscope (SEM) images were used to analyze surface morphology and to characterize the effect of the pulping process on paper fibers. Samples of dried handsheets having a basis weight of  $60 \pm 2$  g m<sup>-2</sup> were coated with gold in a Quorum SC-7620 sputter-coater. Images were produced of several different locations on the surface of SM and SK pulp samples with a scanning electron microscope (JEOL, JSM-5500).

### 3.1. Statistical analysis

Minitab 17© and Microsoft Excel 2010© software were used for statistical analysis of data.

## 4. Results and discussion

### 4.1. Enzyme characterization

Two commercial enzyme mixtures produced by *T. reesei* and by *Aspergillus sp.* were used for this study. Under our specific assay conditions, both commercial preparations contained cellulase (CMCase), xylanase, and moderate mannanase activities. Enzyme mixture T was characterized by higher cellulase and xylanase activities, although its low mannanase activity was roughly equal to mixture A (Tableau 4-1).

**Tableau 4-1.** Protein content and activities of the two commercial enzymes mixtures (enzymes T refers to CelluClast 1.5L from *Trichoderma reesei* and enzymes A refers to Carezyme 1000L from *Aspergillus sp.*)

Characteristic	Enzymes T	Enzymes A
Protein content (mg.ml <sup>-1</sup> )	55.42	10.85
CMCase activity (IU.mg <sup>-1</sup> )	24.70	17.87
Xylanase activity (IU.mg <sup>-1</sup> )	18.95	13.76
Mannanase activity (IU.mg <sup>-1</sup> )	3.94	4.17

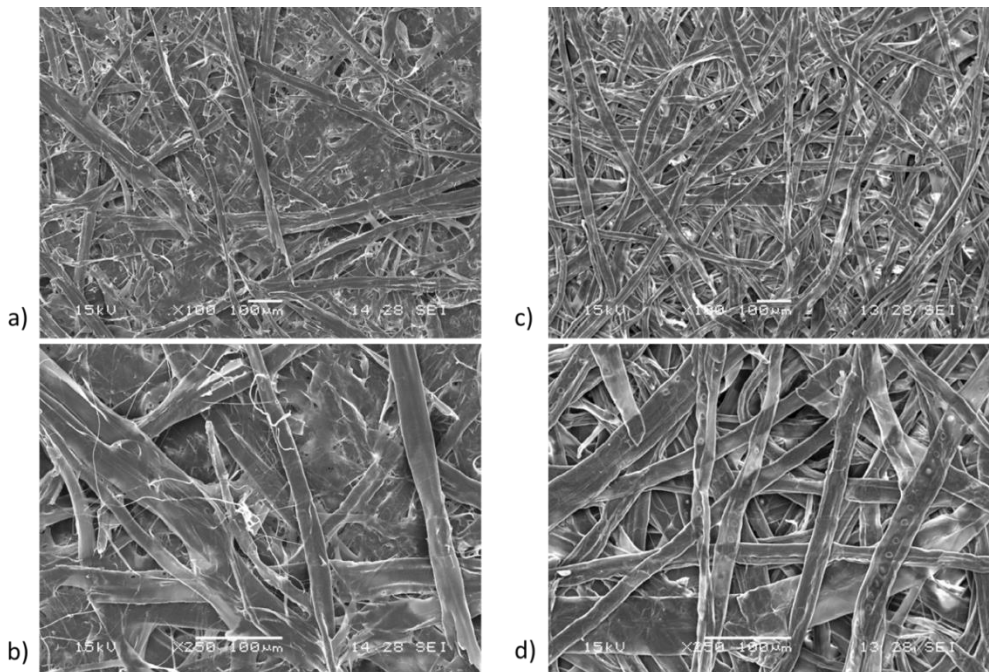
### 4.2. Pulp fiber characterization

Pulp fiber characteristics prior to treatments are presented in Table 4-2, which show how the pulp grades used in this experiment differed from one another. As expected, softwood fibers were longer and wider than hardwood fibers (Stevanovic and Perrin, 2009). All of the grades contained similar quantities of fine fibers except for the softwood Kraft pulp. These fine fibers could impair hydrolysis yield on full fibers because finer fibers have a greater susceptibility for hydrolysis, so hydrolysis yield is altered by the quantity of fine fiber in a sample during our 4-h hydrolysis (Mooney *et al.*, 1999). Hardwood pulp was only slightly affected by Kraft pulping, while for softwood pulp, the Kraft treatment had an obvious impact on length and fines, but none on width. SEM images showed that softwood Kraft pulp has lower fibrillation and greater homogeneity than softwood CTM (Figure 4-1) as observed earlier (Biermann, 1996; Sixta, 2006) and which is fully compatible with a decreased content in fines.

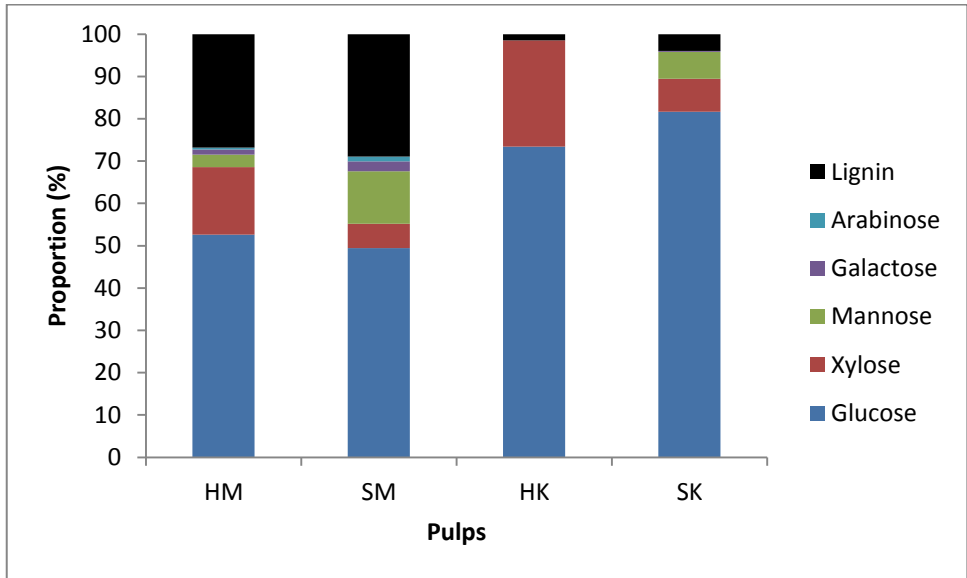
**Tableau 4-2.** Pulp fibers properties before enzymatic treatments.

Fibers characteristics (average values)	HM	SM	HK	SK
Length (mm)	0.71	1.31	0.76	2.35
Fines (0 – 0.2 mm) (%)	15.31	13.25	13.64	3.01
Width ( $\mu\text{m}$ )	22.6	27.4	17.7	26.0
<i>HM</i> hardwood CTM pulp, <i>SM</i> softwood CTM pulp, <i>HK</i> hardwood kraft pulp, and <i>SK</i> softwood kraft pulp				

Mechanically treated pulps contained more lignin than the Kraft pulps (Figure 4-2). The Kraft process dissolves lignin from wood raw material to liberate fibers, while by contrast mechanical separation of wood fibers does not involve the extraction of lignin (Sixta, 2006). Lignin protects the other components of the biomass against degradation, so the absence of lignin in Kraft pulp permits enzymatic hydrolysis to occur more effectively (Rahikainen *et al.*, 2011). As expected, softwood hemicelluloses were glucomannan-rich, while hardwood hemicelluloses were xylose-rich (Timell, 1967; Ek, Gellerstedt and Henriksson, 2009; Stevanovic and Perrin, 2009). HK and SK pulps yield the greatest quantity of glucose, making them the most promising of the samples as a potential biofuel substrate.



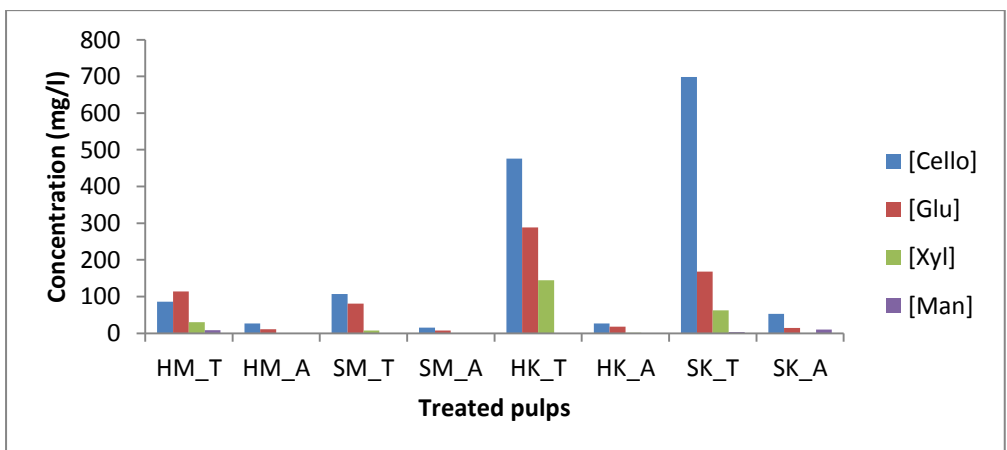
**Figure 4-1.** SEM micrographs obtained from (SM) untreated softwood CTM pulp (a, b), and from (SK) untreated softwood Kraft pulp (c, d) at two levels of resolution.



**Figure 4-2.** Lignin and carbohydrate monomer content of pulps. *HM* hardwood CTM pulp, *SM* softwood CTM pulp, *HK* hardwood kraft pulp, and *SK* softwood kraft pulp.

### 4.3. Hydrolysate analysis

Hydrolysate sugar content of the control samples (i.e. without enzyme addition) was negligible (data not shown). This demonstrates that hydrolysis did not occur in the absence of enzymes. Figure 4-3 shows cellobiose, glucose, xylose, and mannose concentration of hydrolysate solutions recovered after treating pulps with T and A enzyme cocktails.



**Figure 4-3.** Concentrations of selected carbohydrates in hydrolysate recovered after hydrolysis of pulp. T and A refer to mixtures of enzymes used for hydrolysis.

Figure 4-3 presents the amounts of selected mono- and disaccharides which were liberated by enzymatic hydrolysis of pulp fibers. The quantity of sugar detected in the hydrolysate was better related to pulp grade than to the enzyme cocktail used. Kraft pulps released more of each sugar, indicating they are more susceptible to enzymatic hydrolysis in the relevant conditions. This can be explained by the difference in lignin content, since the presence of lignin protects polysaccharides from enzymatic hydrolysis (Mooney *et al.*, 1998; Öhgren *et al.*, 2007; Studer *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2011; Zhang, Tang and Viikari, 2012; Penttilä *et al.*, 2013). As discussed earlier and in the literature, pretreatments which remove lignin and hemicellulose expose a greater proportion of the cellulose in the substrate and increase pore volume and surface area, which results in increased hydrolysis rate (Zhu *et al.*, 2008). The high glucose content of the Kraft pulps presented in Figure 4-2 suggests that these pulps are composed primarily of cellulose, an inference that is consistent with the composition of the hydrolysate produced from their enzymatic hydrolysis. Hydrolysate sugar content also demonstrated that enzyme “A” was less effective than “T” under same hydrolysis conditions. More xylose was released from hardwood pulp in the presence of T enzyme cocktail, which again corresponds with the abundance of xylose monomers in the substrate, as shown in Figure 4-2. The cellobiose yield from hydrolysis of SK was greater than that from hydrolysis of HK, although HK hydrolysis produced more glucose when catalyzed by T treatment. Finally, hydrolysate composition suggests that the mannanase activity of both enzyme cocktails is low. Such results may indicate that mannans are not as accessible as other polymers, or that mannanase activity is too low (consistent with activity measurements for both enzyme preparations; see Table 4-1). The sugar content of the hydrolysates is a good indicator of enzyme activity with respect to specific carbohydrates, but does not provide any information on the surface chemistry of the treated fiber.

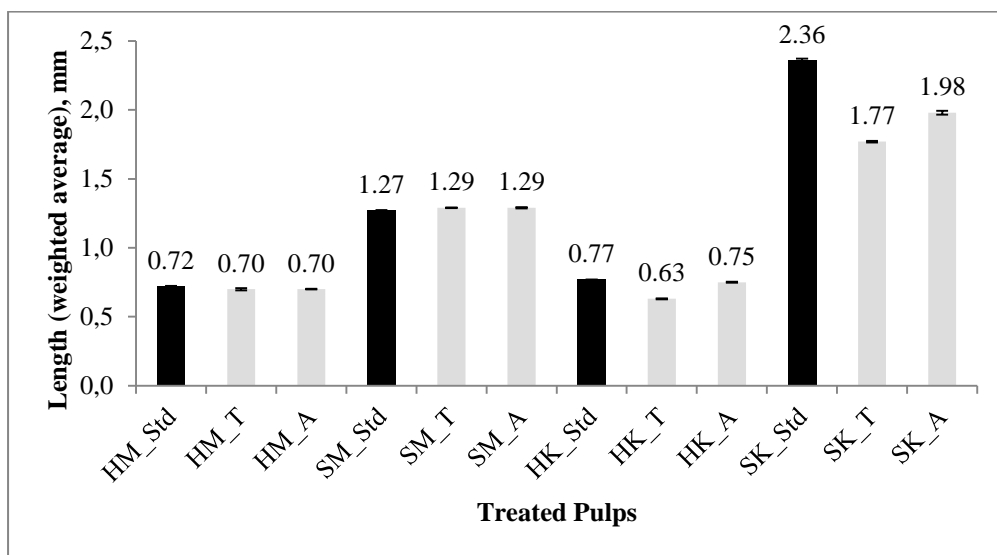


#### 4.4. Effect of enzymatic treatment on pulp fiber

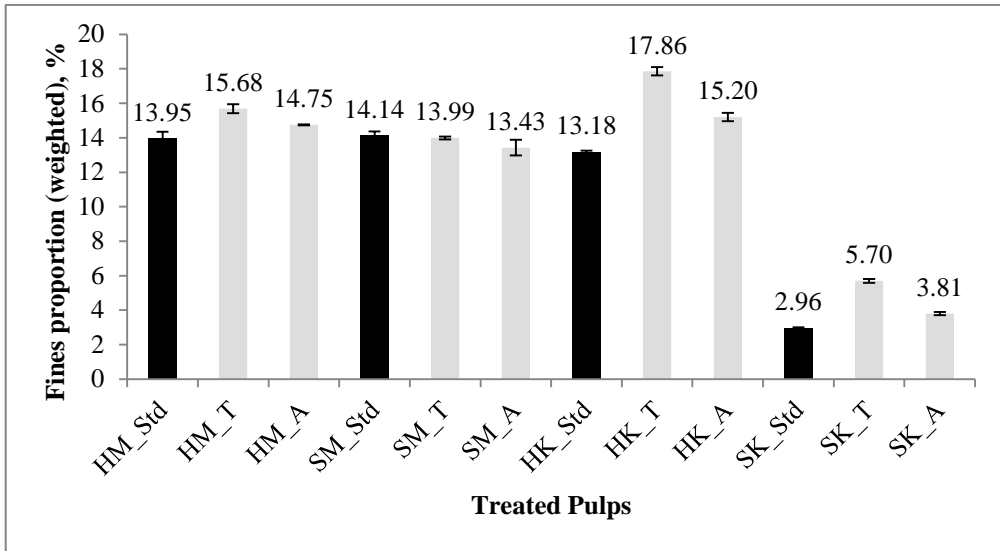
Biofuel production from LCB depends on polymer accessibility during enzymatic treatment, but many other applications require specific surface functionality linked to distribution of polymers left after treatment at the surface of fibers. One way to obtain information about the outcome of an enzymatic treatment on LCB is by investigating properties of its fibers and of paper formed using these fibers. Enzyme hydrolysis used here only affected the length of Kraft pulp grade. Treatment of hardwood Kraft pulp with T enzymes decreased length by 20%. Enzymes, A and T, decreased softwood Kraft fiber length by 15 and 25%, respectively (Figure 4-4). These results suggest a fiber cutting action, ascribed to endoglucanase activity in enzyme cocktails (Hu, Arantes and Saddler, 2011; Gourlay *et al.*, 2015).

While Kraft pulp fiber length decreased as a consequence of treatment, fines (fibers with length < 0.2 mm) increased (Figure 4-5). This phenomenon has been suggested as a consequence of the combination of cutting, peeling, delaminating, and weakening effects on the surface of the fibers by enzymatic hydrolysis (Oksanen *et al.*, 1997; Bajpai, 1999; Cui *et al.*, 2015).

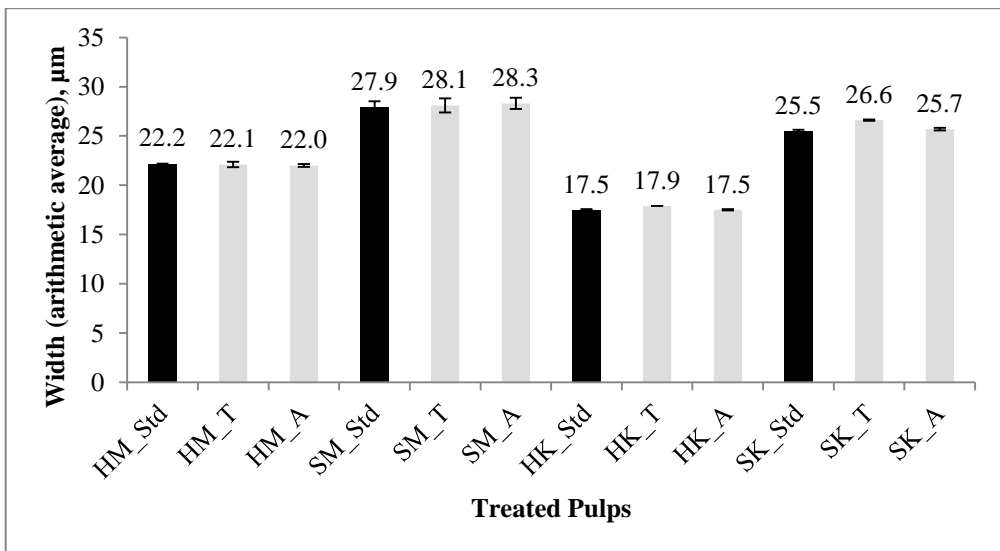
Although the enzymatic hydrolysis reduced the length of some fibers, it did not affect the average width of any samples, regardless of pulping or enzymes used (Figure 4-6).



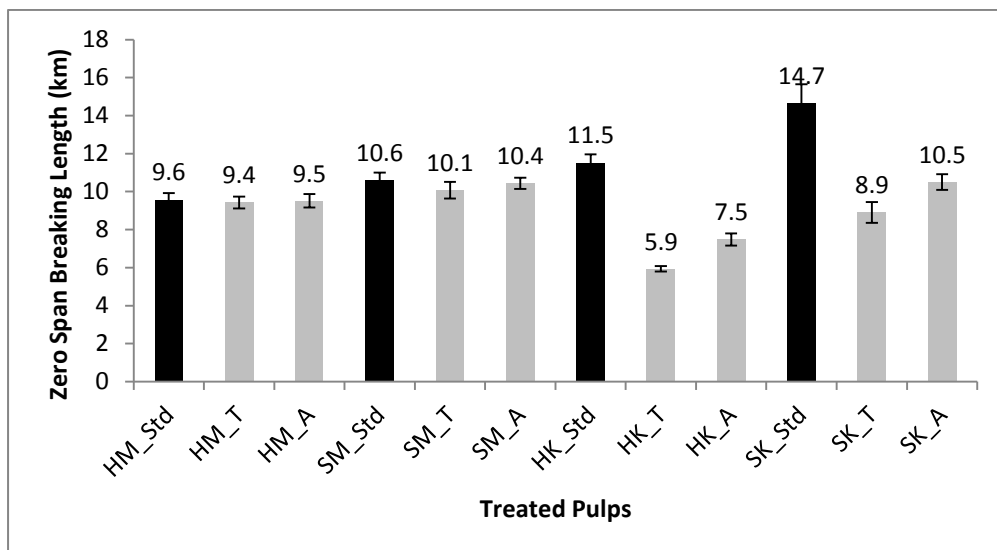
**Figure 4-4.** Weighted average values of fiber lengths (mm) and standard deviations for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp.



**Figure 4-5.** Weighted proportion (%) and standard deviations of fines (fibers with length <0.2 mm) for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp.



**Figure 4-6.** Arithmetic average values (μm) and standard deviations of fiber widths for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp.



**Figure 4-7.** Zero span breaking length (km) for control Std, T and A enzymes treated pulps of different grades. (HM) hardwood CTM pulp; (SM) softwood CTM pulp; (HK) hardwood Kraft pulp and (SK) softwood Kraft pulp.

Concerning zero span breaking length, a measure of the average strength of individual fibers (Figure 4-7), treatment had no effect on mechanical CTM pulps but both enzymes degraded chemical Kraft pulp strength. The higher lignin content of the mechanical pulps may explain why their mechanical strength was not affected by the treatment.

Analysis of these paper properties corroborates previous studies of simple sugars release by hydrolysis of paper pulp and confirms that Kraft pulps are more susceptible to enzymatic treatments (Gehmayr, Schild and Sixta, 2011; Mittal *et al.*, 2011; Torres *et al.*, 2012; Yamada *et al.*, 2015). For applications where strength properties are very important, such combination pulp-enzymatic treatments (Kraft pulps treated with cellulase mixtures) would be deleterious.

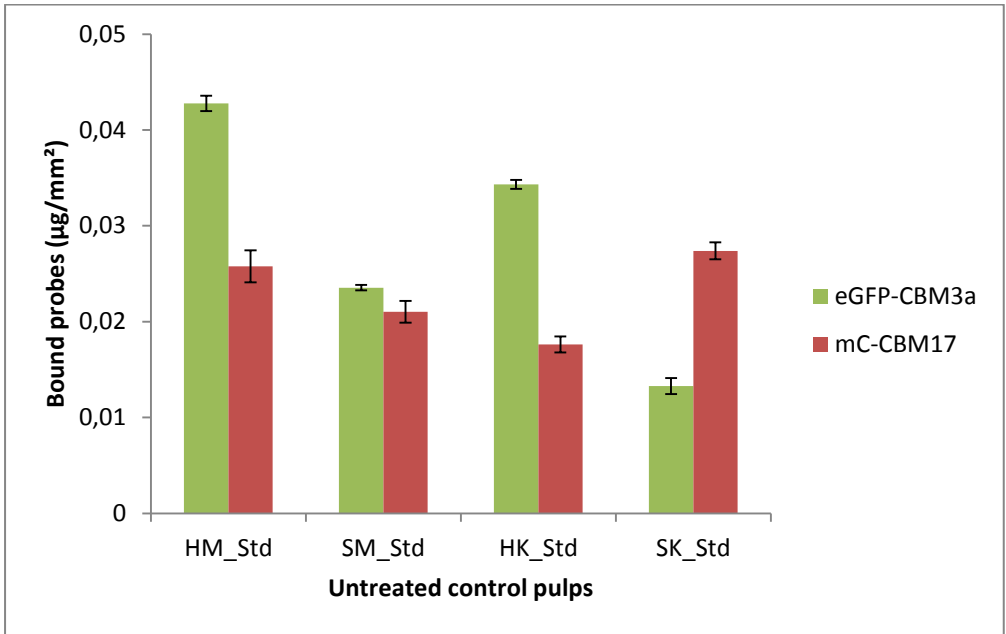
#### ***4.5. Detection of pulp fiber polymers using FTCM analysis before and after enzymatic treatments***

Fluorescent-tagged carbohydrate-binding module probes provide a rapid and cost-effective method to map the surface of LCB samples in terms of composition. Running 96 experiments requires a simple plate reader, is currently performed in less than 3 h, and would cost a few dollars when scaled up. Here this analysis was performed using the four probes in order to characterize pulp fibers prior to enzymatic treatments (Figures 4-8 and 4-9). A probe (GC3a) which indicates the presence of crystalline cellulose regions (referred to here as CC) indicated greater CC exposure on hardwood surfaces than on softwood. CC made up a greater proportion of CTM pulps surface than of Kraft pulps surface, despite the higher

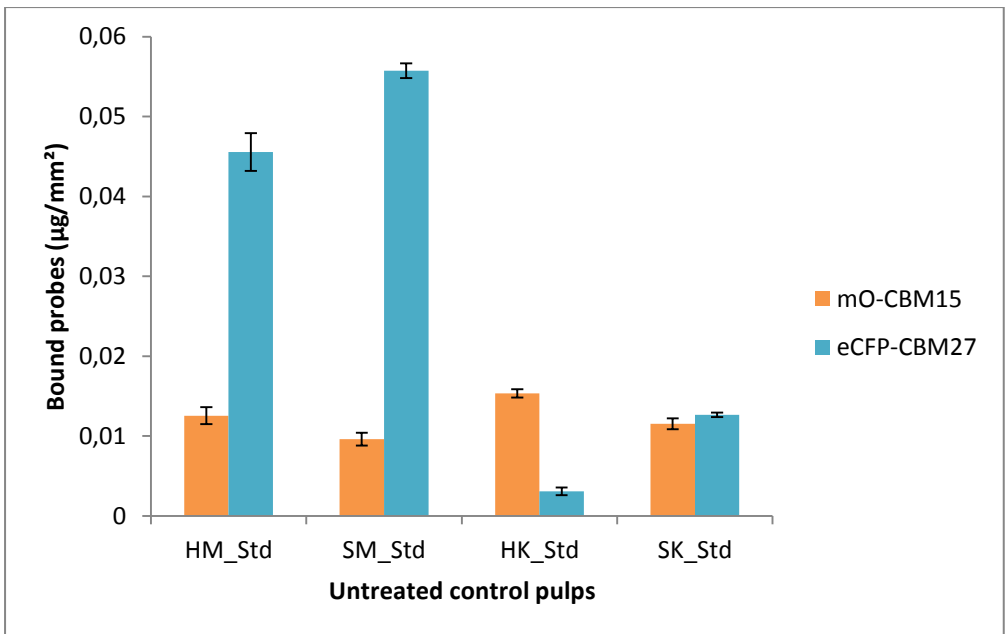
lignin content of CTM pulps. This result is counterintuitive, since lignin is thought to act as protective barrier around cellulose, but the higher proportion of fibrils and fines in CTM pulps may explain the result since fine fibers tend to have greater specific area and, therefore, offer the most accessible polymers for the probes (Hebert-Ouellet *et al.*, 2017). Fibrils and fines are partially removed by Kraft pulping, which may explain such results.

Figure 4-8 also shows the FTICM performed using the amorphous cellulose (referred to as AC) specific probe (named CC17). Mechanical pulps had the strongest AC-binding signal, also in accordance with the explanation of its higher content in high specific surface areas such as fibrils. Although three of the four pulps exposed much less AC than CC, the opposite was observed for SK pulp, where twice as much AC was detected compared to CC. Clearly, the distribution of AC did not parallel CC distribution on the surface of untreated fibers. The total cellulose (CC and AC) detected at the surface was the lowest for SK pulp, where the fibrillations are almost nonexistent as was observed in Figure 4-1. This leads to a decrease in high surface area fibrils or fiber fragments, which are primary targets for CBMs binding to fiber polymers. Despite containing more cellulose than CTM pulps, the Kraft pulps returned a weaker binding signal for both CC and AC. Even if the abundance of glucose in the Kraft pulp hydrolysates is consistent with higher cellulose content (Figures 4-2 and 4-3), FTICM shows that CTM pulp fiber surface has a greater number of exposed binding sites for cellulose-specific probes, despite containing less cellulose than Kraft pulps overall. One has to consider that the size of probes used here, with diameters of few nanometers, is closer to water than to most fibrous material. Any probe used here has access to all interstices detectable by electronic microscopy.

OC15 probe, which was used to signal the presence of xylan, returned a more intense signal from untreated hardwood pulps than for softwood (Figure 4-9), which is consistent with the previously reported tendency of hardwoods to have a greater xylan content than softwoods (Timell, 1967; Stevanovic and Perrin, 2009), and with the monosaccharide content of the samples already shown in Figure 4-2. This phenomenon resembles the one observed for CC (Figure 4-8), with higher signal for hardwood pulps than for softwood.



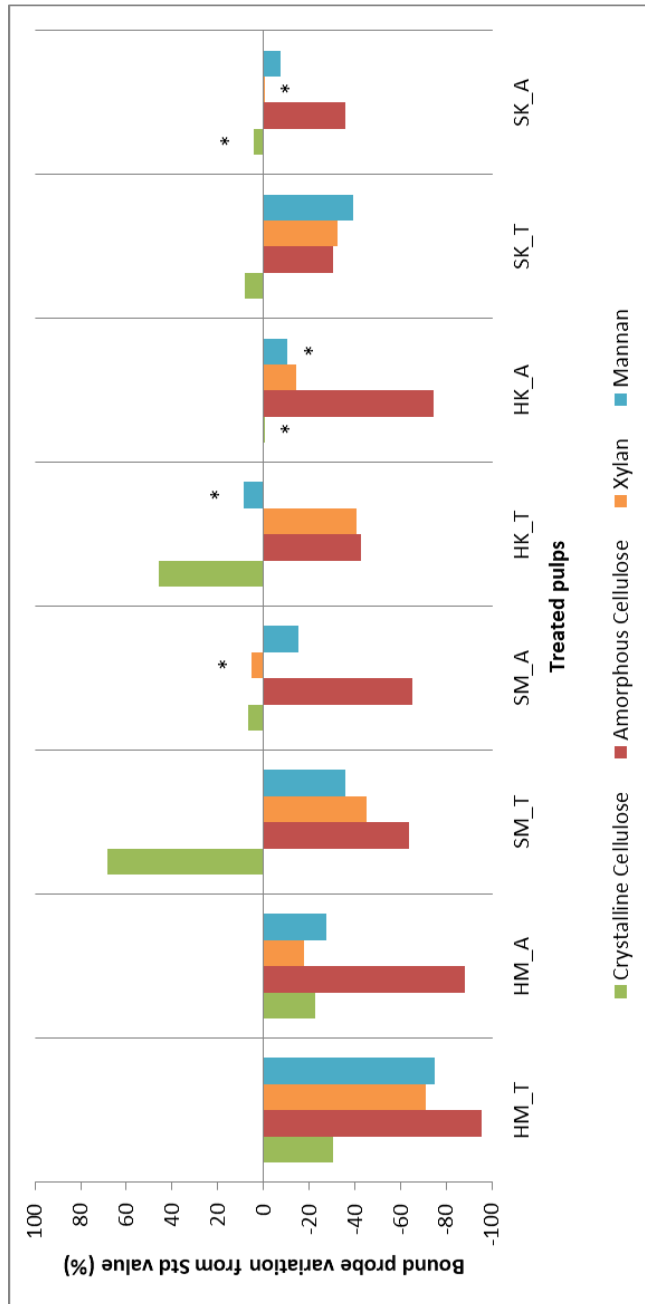
**Figure 4-8.** CBM binding to the surface of untreated pulps. The quantity of probe bonded to crystalline cellulose (in green) and amorphous cellulose (in red).



**Figure 4-9.** CBM binding to the surface of untreated pulps. The quantity of probe bonded to xylan and mannan are shown in orange and cyan, respectively.

The signal produced by the mannan-specific probe (CC27) does not follow the trend described by the probes that have already been described in this section. Mannans were detected in greater abundance on the surfaces of the CTM pulps and were nearly absent from the Kraft pulps. Mechanical pulping of softwoods has been known to partially dissolve mannans (Thornton *et al.*, 1994), but the dearth of mannan on the probe-accessible surface of Kraft pulps suggests that some element of the Kraft process removes mannans even more extensively (Ragauskas, Nagy, *et al.*, 2006), while by contrast the mechanical treatment leaves them available for probe binding. The disparity in mannan detected on SK and HK corresponds to the relative abundance of mannose contained in the samples as determined in Figure 4-2. Comparison of the four pulps' signals suggests that mannans are strongly associated with lignin. These observations confirm other studies on the lignin-carbohydrate complex organization and changes according to the pulping process (Lawoko, Henriksson and Gellerstedt, 2003, 2005; Lawoko *et al.*, 2004; Choi, Choi and Faix, 2007; Stevanovic and Perrin, 2009).

The impact of enzymatic treatments on the amount of each polymer present on the surface of paper discs was characterized using FTCM. In Figure 4-10, the signal intensity from each probe is presented in terms of its change relative to the intensity of the corresponding probe on untreated (Std) pulps shown in Figures 4-8 and 4-9. Generally, enzymatic treatments resulted in a decrease in the number of bound probes, although there were some exceptions. This decrease can be a consequence of the preferred degradation of high specific surface components such as fines, filaments and fibrils by enzymes as discussed above. The overall diminution of probe signal intensity may also indicate that the enzymatic treatment results in an increase in the proportion of substances on the substrate surface which are affected neither by the enzymes nor by the probes (e.g. lignin). AC detection invariably decreased after enzymatic treatments, which supports the hypothesis that this component was degraded preferentially by cellulases in both enzymatic cocktails during short-time hydrolysis suggested by several studies (Lynd *et al.*, 2002; Pu, Ziemer and Ragauskas, 2006; Stevanovic and Perrin, 2009; Hall *et al.*, 2010). In our assay, changes in AC probe binding did not directly correlate to the yield of hydrolysis products of cellulose (cellobiose and glucose, Figure 4-3). Generation of simple sugars such as glucose or cellobiose is a consequence not only of AC but of CC hydrolysis, and the proportions of AC and CC hydrolysis may vary for different pulps and enzyme cocktails.



**Figure 4-10.** Impact of enzyme (T and A) hydrolysis on the binding of different polymer by probes (Crystalline cellulose bound by GC3a, amorphous cellulose bound by CC17, xylan bound by OC15 and mannan by CC27), on the surface of fiber discs. Results that did not deviate significantly from untreated (Std) values (where significance was determined using Dunnet's comparison test) are indicated with an asterisk (\*).

A general inspection of Figure 4-10 reveals that differences in signal intensity from probes bound to the substrate were due to a combination of the disparity in pulp properties and the character of the enzyme cocktails used for their treatment (which both have cellulase, xylanase, and mannanase activity). The results of Figure 4-10 show that removal of surface hemicelluloses appeared to be more substantial with T enzymes treatment. This corroborates chromatographic analyses showing higher liberation of xylose and mannose after T enzyme treatment and may be attributed to a superior cellulase and xylanase activities in T enzyme preparation. Also, it can be seen that CTM softwood pulp (SM) responded differently to enzymatic treatments compared to HM. After enzymatic treatment, more CC was detected on the surface of the SM substrate, but less on the surface of the HM substrate. The concurrent increase in CC and decrease in AC indicate that the glucose and cellobiose recovered from the hydrolysate (shown in Figure 4-3) are principally the products of AC hydrolysis, as opposed to CC hydrolysis. CC hydrolysis cannot be ruled out, however, since FTCM detects CC probe-binding sites left after treatment. Hydrolysis of first polymers on the surface (including CC) can lead to exposure of previously buried CC.

When treated by A enzymes, the increase in CC at the surface of SM pulp was not as significant as after treatment with T enzymes. AC was decreased with similar efficacy, but other polymers were removed with different intensity. The signal from xylan-binding probes was found to be unaffected at the fiber surface after treatment with A enzymes, while that from mannan-binding probes decreased by 15%. As shown in Figure 4-3, no xylose was detected in the hydrolysate from treatment with enzymes A, while the hydrolysate produced by T enzymes cocktail contained some xylose. The absence of xylose in A hydrolysate is consistent with the hypothesis that xylan was not consumed in this treatment, as shown in FTCM results, although xylanase activity was measured in this enzyme cocktail.

Despite major differences in fiber properties and pulping conditions, the proportion of HK-binding sites is modified in a similar way to SM when HK pulp was exposed to enzymatic hydrolysis. More CC was exposed at the surface of HK after T enzyme treatment, despite results on fiber length (Figure 4-4) and simple sugar analysis (Figure 4-3) that suggests extensive cellulose hydrolysis. Although more CC was exposed on the surface of SM after treatment with T enzymes, this was not accompanied either by fiber length reduction or by substantial hydrolysate sugar yields, which suggests that enzyme treatment was less severe with SM than with HK. The change in CC exposure was limited to 46% for HK (less CC was left on the surface of HK after T enzyme than on SM). Regarding HK pulp, Figure 4-10 shows that both AC and xylan decreased on the surface of HK paper discs after either enzymatic treatment, but mannan variations were not significant. These results were suggested by chromatographic analyses but were confirmed by FTCM, which also reveals that CC exposure increased after T treatment, information that cannot be obtained by any other method discussed here.

Enzymatic hydrolysis of SK and HK Kraft pulps occurred in an approximately similar pattern, although both enzymes A and T lead to a smaller change in CC on

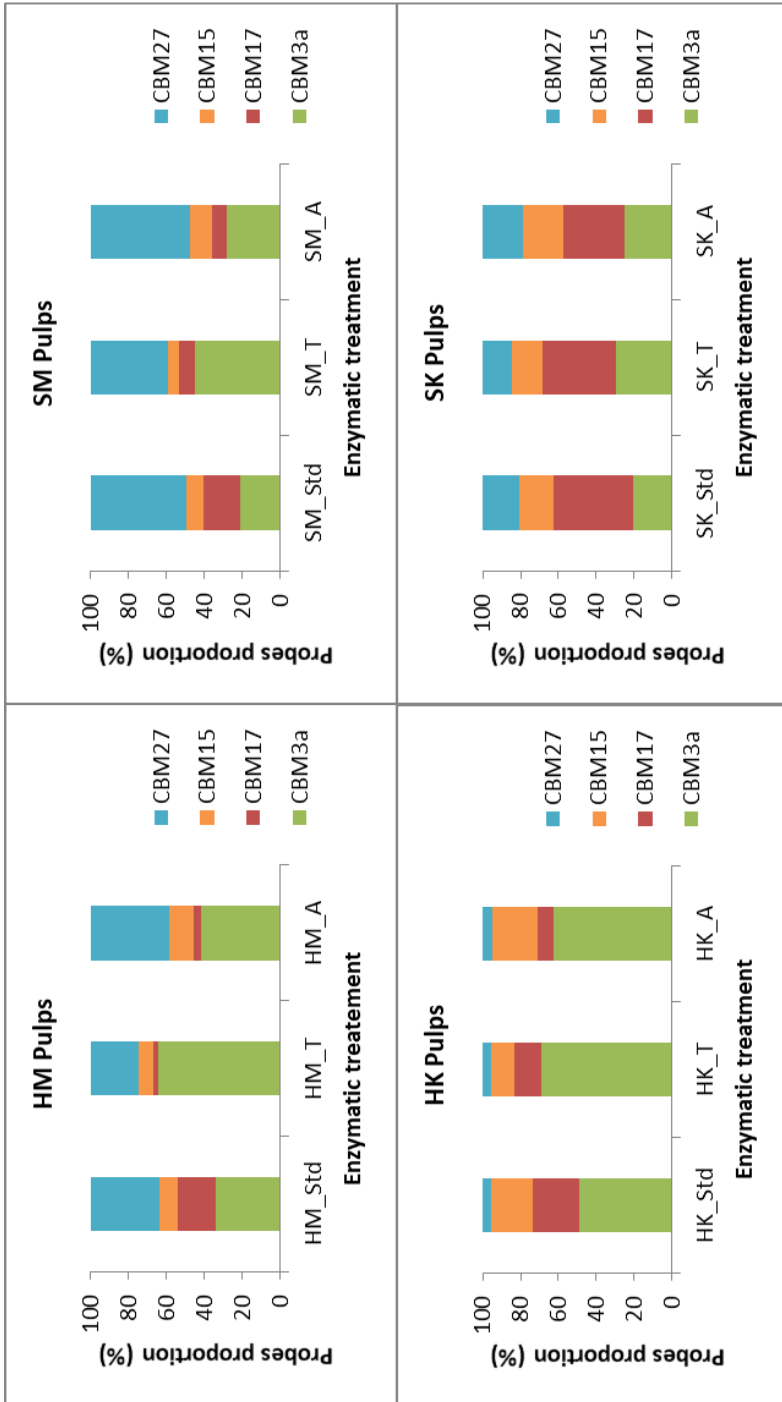


the fiber surface of SK pulp than on HK pulp. AC decreased after both treatments by about 30%. Hydrolysis with cocktail T leads to a 33% decrease in xylan binding in FCTM but treatment with A enzyme left xylan unchanged. This observation is compatible with the detection of free xylose in the hydrolysate. Mannans were consumed to a greater extent in the softwood pulp. Changes in mannan surface coverage observed by FTCM for SK with T enzymes (a decrease of 40%) were not indicated by hydrolysate analysis, although a decrease in surface polymers does not necessarily lead to simple sugar release if the enzymes involved are also of endo-type. In this case, a drop in relative abundance of mannan at the fiber surface cannot be revealed by a chromatographic analysis of simple sugars but is easily detected using FTCM.

#### **4.6. Surface polymer distribution after enzymatic treatments**

Here the quantity of each probe bound to surface is expressed as a percent of the total number of probes detected, removing from our assessment any general change in surface binding or availability for binding (such as the decrease in binding due to loss of high surface fragments in Kraft pulps or change in sheet density as hypothesized earlier (Hebert-Ouellet *et al.*, 2017)). There might be some cross-reactivity among substrates and CBM15 (i.e. OC15 binding mainly to xylan, but having some affinity toward cellulose). We found that the affinity of each probe for its main target surpassed affinity for a similar target by tenfold or more (Khatri *et al.*, 2016; Hebert-Ouellet *et al.*, 2017).

The proportions of polymers on the surface of pulps prior to enzymatic treatment are shown in Figure 4-11. As expected, given the nature of Kraft pulping, the proportion of AC and CC on the surface of Kraft pulps is higher than in CTM pulps, and although the number of cellulose-binding probes detected on the Kraft pulps surface is less than what was detected on mechanical pulps, a greater proportion of the probes detected on the Kraft pulps were cellulose binding. Also, softwood exposed proportionally more mannan and hardwood more xylan, although the difference between hardwood and softwood was less pronounced for the mechanical pulps. Such distribution of hemicelluloses on the surface is compatible with bulk composition of fibers, and also compatible with the generally accepted understanding of softwood and hardwood hemicellulose composition (Timell, 1967; Stevanovic and Perrin, 2009). In general, CC exposure detection was greater than that of AC regardless of wood or pulping, except for SK pulp, where amorphous regions' exposure was twice the exposure of CC (the same trend was observed in Figure 4 – 8).



**Figure 4-11.** Proportion (in percent) of each probe by treatment on the total probes content for each pulp.

Treatment with enzyme cocktail T consistently left a larger proportion of CC on substrate surfaces, at the expense of AC at the fiber surface. An exception was for SK pulp, where relative amount of AC probe remained stable regardless of enzymatic treatment. SK pulp had the most balanced proportions of probe binding, and this equilibrium between various fractions was barely affected by hydrolysis with T enzyme cocktail. Because analysis of hydrolysates (Figure 4-3) revealed a significant release of simple sugars for SK pulp treated with T enzyme, all of the components must have been degraded equally during hydrolysis. Conversely, the relatively small yield of hydrolysate sugars from SK pulp after A enzyme treatment, correlated with nearly same balanced proportion of probe binding, means that SK pulp was not significantly degraded after A enzyme hydrolysis.

Inspection of proportions, and not individual probe binding, allows reconciliation of apparent contradictions between the increase in CC in the SM pulp, shown in Figure 4-10, and the low release of sugar after T enzyme treatment (Figure 4-3), because the proportion of CC for SM is lower than in HK and HM pulps.

Treatment with enzyme cocktail T results in decreased hemicellulose binding (in proportion to total binding) for all pulps, while treatment with enzyme cocktail A results in probe signal proportions that are in between the control and enzyme T treated substrates. Enzyme A also left larger proportions of hemicelluloses on the surface of fibers at the expense of AC or CC.

The results presented here can be useful in predicting whether an enzymatic treatment of a given biomass is well suited for a given application of wood biomass. For biofuel production, for example, the hydrolysate analysis suggests that best conditions would involve using the most aggressive enzyme (T) with the most exposed fibers (Kraft pulp). Absolute change in probe binding observed by FTCM confirmed the reduction of cellulose at the surface of fibers. FTCM analysis can also be useful for biofuel production, because it can provide precious information about the deconstruction of complex substrates and can monitor the progressive removal of polymers, which permits the optimization of enzymatic treatments. For example, treatment with T enzymes left a higher number of CC-binding sites on all pulps tested here. FTCM would be instrumental in determining the operating conditions which allow for total digestion of CC with minimal costs.

Fluorescent-tagged carbohydrate-binding module method could also provide information for partial hydrolysis of fibers for specific applications. Unlike other methods, such as hydrolysate analysis, chemical analysis, or XPS, FTCM can characterize the surface after treatment. This information can be used to select biomass stock and treatment that will yield the surface properties or composition needed for a given application.

Enzyme T was the most effective for increasing the crystalline cellulose surface proportion and decreasing amorphous cellulose and hemicelluloses. A high production of CC was observed for CTM pulps but Kraft hardwood harbored the highest proportion of CC at surface after treatment. Treatment of HK with T enzymes would be more appropriate for production of purified cellulose products,

such as nanocellulose. Treatment with enzyme T would promote generating fiber surfaces that are mechanically stronger, more chemically resistant, and less sensitive to humidity. These characteristics suggest applications like reinforcement in composite materials (in industries like transport, furniture or construction).

Enzyme A is more selective than T. Its use resulted in a significant reduction of the proportion of AC on substrate surfaces while leaving mannan and xylan proportions relatively untouched. This enzyme mixture also hydrolyzed CTM more efficiently than Kraft pulp. Enzyme A allowed the relatively reactive xylan and mannan polymers to be preserved, yielding a product which could be used to develop specialty paper products or insulation materials. The enzymatic treatment of Kraft softwood pulp appears more relevant for applications where an equilibrated distribution of amorphous cellulose and hemicelluloses is preferred. This includes paper products with controlled physical properties, although the strength of these paper products may be decreased by either enzyme.

## 5. Conclusions

Fluorescent-tagged carbohydrate-binding module method can be used as a rapid, affordable, and direct method to evaluate the surface composition of lignocellulosic substrates, thereby permitting processes to be understood in terms of compositional changes on the substrate surface which could not otherwise have been observed. Comparable methods for fiber analysis such as compositional analysis of the substrate after treatment (using FTIR, XPS) or of the hydrolysates (hydrolysis products content, using GC or HPLC), surface imaging (using SEM, TEM, and AFM), index of crystallinity (using XRD and NMR) and mass balance calculations (Miller, 1959; Berezin, Rabinovich and Sinitsyn, 1977; Berlin *et al.*, 2006) cannot directly monitor processing by enzymatic action. The FTCM analysis presented here directly provided valuable information about the quantification of exposed amorphous and crystalline cellulose, xylan, and mannan, which could then be used to determine the effects of pulping and enzymatic hydrolysis on the surface composition of substrates. The variation of these components at surface before and after treatment can guide strategies for preparation of wood fiber derived products.

## 6. Acknowledgements

This work was supported by Wallonie-Bruxelles International through the WBI World program and by grants awarded by the Consortium de recherche et innovations en bioprocédés industriels au Québec (CRIBIQ) and Kruger inc. The skillful technical assistance of Nikolas Beauchesne and Virginie Byttebier is acknowledged. The authors would like to thank Glenn Bousfield (University of Liège) for his valuable support and editorial contributions.

## 7. Original article abstract

Lignocellulosic biomass will progressively become the main source of carbon for a number of products as the Earth's oil reservoirs disappear. Technology for conversion of wood fiber into bioproducts (wood biorefining) continues to flourish, and access to reliable methods for monitoring modification of such fibers is becoming an important issue. Recently, we developed a simple, rapid approach for detecting four different types of polymer on the surface of wood fibers. Named fluorescent-tagged carbohydrate-binding module (FTCM), this method is based on the fluorescence signal from carbohydrate-binding modules-based probes designed to recognize specific polymers such as crystalline cellulose, amorphous cellulose, xylan, and mannan.

Here we used FTCM to characterize pulps made from softwood and hardwood that were prepared using Kraft or chemical-thermo-mechanical pulping. Comparison of chemical analysis (NREL protocol) and FTCM revealed that FTCM results were consistent with chemical analysis of the hemicellulose composition of both hardwood and softwood samples. Kraft pulping increased the difference between softwood and hardwood surface mannans, and increased xylan exposure. This suggests that Kraft pulping leads to exposure of xylan after removal of both lignin and mannan. Impact of enzyme cocktails from *Trichoderma reesei* (Celluclast 1.5L) and from *Aspergillus sp.* (Carezyme 1000L) was investigated by analysis of hydrolyzed sugars and by FTCM. Both enzymes preparations released cellobiose and glucose from pulps, with the cocktail from *Trichoderma* being the most efficient. Enzymatic treatments were not as effective at converting chemical-thermomechanical pulps to simple sugars, regardless of wood type. FTCM revealed that amorphous cellulose was the primary target of either enzyme preparation, which resulted in a higher proportion of crystalline cellulose on the surface after enzymatic treatment. FTCM confirmed that enzymes from *Aspergillus* had little impact on exposed hemicelluloses, but that enzymes from the more aggressive *Trichoderma* cocktail reduced hemicelluloses at the surface.

Overall, this study indicates that treatment with enzymes from *Trichoderma* is appropriate for generating crystalline cellulose at fiber surface. Applications such as nanocellulose or composites requiring chemical resistance would benefit from this enzymatic treatment. The milder enzyme mixture from *Aspergillus* allowed for removal of amorphous cellulose while preserving hemicelluloses at fiber surface, which makes this treatment appropriate for new paper products where surface chemical responsiveness is required.



---

## **Production enzymo-mécanique de nanocellulose : optimisation de l'hydrolyse et de ses coproduits**





## 1. Remise en contexte

Dans le chapitre 3, nous avons identifié la combinaison d'un prétraitement enzymatique suivi d'un traitement mécanique comme une piste prometteuse de production de nanocellulose au départ de pâte à papier. Cette piste a déjà été testée avec succès dans d'autres études (Henriksson *et al.*, 2007; Pääkkö *et al.*, 2007; Zhu, Sabo and Luo, 2011). Cette combinaison « enzymo-mécanique » a l'avantage de générer également des coproduits récupérables et valorisables. Le chapitre 4 a démontré que les effets d'une hydrolyse enzymatique légère (en termes de charge enzymatique et de durée) étaient bien perceptibles en surface de la fibre traitée. Les modifications de surface des différents types de pâtes avaient différé entre les pâtes et entre les deux types de mélanges enzymatiques testés.

Il paraît raisonnable d'émettre l'hypothèse qu'une production combinée de nanocellulose et de glucides valorisables par cette combinaison de traitements « enzymo-mécaniques » génère un rendement d'hydrolyse inférieur aux procédés axés sur l'hydrolyse la plus complète possible de la matière traitée.

Or, dans le cas d'une bioraffinerie forestière intégrée, il peut être avantageux de pouvoir piloter l'étape d'hydrolyse enzymatique afin d'être en mesure d'orienter celle-ci à produire plus ou moins de glucides hydrolysés, selon les besoins industriels et la demande du marché concerné. Les travaux de Zhu *et al.* (2011) et Sabo *et al.* (2013) ont démontré que l'utilisation de l'hydrolyse enzymatique pouvait parfaitement combiner la production de nanocellulose cristalline et celle de monosaccharides valorisables issus de l'hydrolyse de pâte blanchie (Zhu, Sabo and Luo, 2011; Sabo and Zhu, 2013). Les résultats du chapitre 4 ont démontré que c'était le cocktail enzymatique issu de *Trichoderma reesei* qui permettait l'hydrolyse la plus poussée du substrat.

Parmi les produits de l'hydrolyse enzymatique de la pâte cellulosique, le cellobiose présente un intérêt pour ses usages variés dans différents domaines tels que l'alimentaire, le cosmétique ou le pharmaceutique (Kim and Day, 2010). Son faible pouvoir calorifique (2 kcal/g) et son activité prébiotique en font un sucre d'intérêt utilisable en aliment fonctionnel (Nakamura, Oku and Ichinose, 2004; Sanz, Gibson and Rastall, 2005). D'anciennes recherches font état des propriétés anti-cancérogènes du cellobiose (Riggs *et al.*, 1977; Calabresse *et al.*, 1993). Le cellobiose, quand il est totalement ou partiellement estérifié, est un agent épaississant utilisé en cosmétique (Franklin *et al.*, 2001).

Les hémicelluloses également hydrolysées durant le processus présentent elles aussi un intérêt en termes de valorisation. Le xylose issu de l'hydrolyse des xylanes trouve des valorisations comme édulcorant, peut être dérivé en xylitol, converti en furfural, transformé en acides organiques ou fermenté en éthanol (Arora, Sharma and Kumar, 2017).

Cependant, lorsque l'on souhaite employer des enzymes afin d'hydrolyser autant que possible un substrat tel que la pâte à papier, on se heurte au problème d'inhibition de l'hydrolyse par les produits de cette même hydrolyse. Cet effet

inhibiteur des produits d'hydrolyse est bien connu (Holtzapple *et al.*, 1990; Xiao *et al.*, 2004; Qing, Yang and Wyman, 2010; Hsieh *et al.*, 2014).

Afin d'apporter une solution à ce problème d'inhibition, Vanderghem *et al.* (2009, 2012) ont proposé une méthode d'hydrolyse multi-étapes visant à augmenter les rendements d'hydrolyse de la cellulose. Cette méthode emploie la capacité de certaines enzymes impliquées dans l'hydrolyse à rester adsorbées au substrat cellulosique. Cette propriété permet de renouveler le milieu tampon dans lequel se déroule l'hydrolyse selon le principe suivant : après une certaine durée d'hydrolyse, le mélange formé par le substrat cellulosique et son milieu d'hydrolyse contenant les hydrolysats est filtré afin de séparer le substrat du milieu tampon alors enrichi en sucres hydrolysés. Le substrat est ensuite remis en suspension dans du milieu tampon frais pour être soumis à une nouvelle étape d'hydrolyse. Les résultats de ces travaux démontraient que cette méthode d'hydrolyse multi-étapes permettait d'obtenir une plus grande proportion de cellobiose qu'une hydrolyse de même durée totale réalisée en continu.

Cependant, les substrats employés dans ces travaux étaient soit de la cellulose de grande pureté de qualité « laboratoire », soit de la pâte à papier kraft blanchie de feuillus. Dans ce chapitre, connaissant désormais les réactions différentes à l'hydrolyse enzymatique entre les pâtes mises en évidence au chapitre 4, nous appliquons la méthode multi-stades à des pâtes à papier non-blanchies de feuillus et de résineux. L'utilisation de pâtes non-blanchies est ici testée dans une logique d'up-scaling futur du procédé, permettant de s'affranchir de l'étape de blanchiment et de valoriser des pâtes dites « lavées » (rincées des éventuels réactifs utilisés dans le procédé de mise en pâte). Il est également à noter que les techniques et réactifs utilisés pour le blanchiment diffèrent entre les pâtes mécaniques et chimiques : alors que le blanchiment des pâtes chimiques vise à éliminer le peu de lignines résiduelles via des agents délignifiants, celui des pâtes mécaniques vise une décoloration des lignines via des agents blanchissants (Petit-Conil, 1999).

La méthode d'hydrolyse enzymatique multi-stades est donc appliquée à des pâtes non-blanchies dans le but de confirmer les hypothèses suivantes :

- Ce type d'hydrolyse multi-étapes permet une production plus élevée de sucres hydrolysés qu'une hydrolyse mono-étape de mêmes conditions (charge enzymatique et durée totale) ;
- Ce type d'hydrolyse multi-étapes permet de maintenir un rendement d'hydrolyse élevé d'une étape à l'autre, par substitution des produits d'hydrolyse ;
- Ce procédé présente un intérêt particulier pour la production de cellobiose et de xylose au départ de pâte à papier non-blanchie ;
- Le substrat hydrolysé peut ensuite être transformé en nanofibres de cellulose ;
- Ce procédé constitue une méthode de prétraitement facilitant et améliorant l'efficacité du traitement mécanique pour produire des nanofibres de cellulose.

## 2. Méthodologie

### 2.1. Pâtes cellulosiques

Trois pâtes cellulosiques non-blanchies ont été utilisées : une pâte kraft de feuillus (mélange indéterminé d'essences feuillues) (fournie par Burgo Ardenne, Belgique), une pâte CTMP de peuplier (*Poplar sp.*) et une pâte CTMP d'épicéa (toutes deux fournies par SAPPI Lanaken, Belgique).

La teneur en matière sèche des pâtes séchées a été mesurée (105°C, 24h).

La méthode d'évaluation de la composition chimique des pâtes et les résultats sont les mêmes que ceux présentés au chapitre 4 (point 4.2.).

Le substrat cellulosique standard, utilisé comme témoin, est de la cellulose de haute pureté (98%) (Alba-Fibre ; C-200).

### 2.2. Enzymes

Le mélange de cellulases employé est le CelluClast (Sigma-Aldrich, ATCC 26921), composé de cellulases issues de *Trichoderma reesei*. L'activité enzymatique du lot utilisé a été évaluée à 19 FPU/ml.

### 2.3. Hydrolyses enzymatiques

Toutes les hydrolyses ont été réalisées en dupliqué pour chacune des pâtes et des conditions testées.

#### 2.3.1. Hydrolyses multi-étapes

La méthodologie employée a été adaptée des travaux de Vanderghem et al. (Vanderghem *et al.*, 2009).

Pour chacune des trois pâtes, 10 g (en équivalent de matière sèche) ont été mis en suspension dans 250 ml de tampon citrate 0,05 M, dont le pH a été stabilisé à 4,8. L'ensemble a été homogénéisé à l'aide d'un désintégrateur papetier de laboratoire et ensuite transféré dans un erlenmeyer d'une capacité de 500 ml. Ce contenu a été porté et maintenu à la température de 50°C en bain marie, sous agitation magnétique (400 rpm) à l'aide d'un agitateur magnétique submersible.

Avant addition des enzymes, un échantillon de milieu d'hydrolyse a été prélevé afin d'établir une valeur zéro de concentration en sucres d'hydrolysat. Le mélange enzymatique a ensuite été ajouté à la suspension de pâte pour atteindre une charge enzymatique de 0,4 FPU/g de pâte. L'ensemble a été maintenu à 50°C au bain marie et sous agitation magnétique (400 rpm) durant toute la durée de l'hydrolyse.

L'hydrolyse multi-étapes a été conduite en 4 x 6 heures. À l'issue de chacun des cycles de 6 heures, le contenu de l'erlenmeyer était transféré et filtré sous vide sur un filtre en verre fritté (40-100 µm de taille de pores, Robu Glasfilter-Geräte GmbH). Le substrat filtré a ensuite été récupéré sur le filtre et remis en suspension dans du tampon frais à la même concentration, pour subir une autre hydrolyse d'une durée de 6 heures. Le procédé a été répété trois fois pour atteindre une durée d'hydrolyse totale de 24h. Aucune enzyme n'a été rajoutée entre les étapes successives. Des échantillons d'hydrolysat ont été prélevés avant la filtration aux

temps 0, 6, 12 et 24 h. Avant analyse, les enzymes présentes dans les échantillons prélevés ont été dénaturées au bain marie (100°C, 10 min).

### **2.3.2. Hydrolyse mono-étape**

L'hydrolyse en une seule étape a été réalisée pour chacune des pâtes étudiées dans les mêmes conditions de matériel, de charge en substrat et en enzymes et de procédure que l'hydrolyse multi-étapes. L'hydrolyse a été menée sans interruption durant 24h. Un échantillon de l'hydrolysats a été prélevé pour analyse à la fin de la durée d'hydrolyse.

### **2.4. Analyse des hydrolysats**

Les échantillons d'hydrolysats prélevés ont été filtrés et analysés afin de déterminer leurs concentrations en cellobiose, glucose et xylose au moyen d'un HPAEC-PAD (Dionex ICS-5000+) et un GC-FID (Agilent Technologies 7890B) en suivant le protocole de Vanderghem et al. (Vanderghem *et al.*, 2009, 2012). L'analyse des résultats a été réalisée à l'aide des logiciels Chromeleon 7® et OpenLAB CDS ChemStation.

### **2.5. Indice de cristallinité**

L'indice de cristallinité des pâtes avant hydrolyse a été mesuré en adaptant la méthode de Jacquet et al. (2012) : l'état de cristallinité a été mesuré de manière isothermale au moyen d'un diffractomètre à rayons X (D8 Advance diffractometer – Bruker) ( $\lambda$  Cu=1.54178 Å, 40 kV, 30 mA) équipé d'un détecteur Vantec (Bruker), une chambre basse température TTK450 et une unité de contrôle de température TCU 110 (Anton Paar) connecté à un bain à eau circulant (Julabo). L'intensité de diffraction a été mesurée entre les angles  $15^\circ < 2\theta < 27^\circ$  d'après la loi de Bragg. L'indice de cristallinité a été obtenu par la méthode de Segal (Segal *et al.*, 1959). Le logiciel Diffrac.Suite EVA version 3.0 (Bruker) a été utilisé pour l'analyse des résultats.

### **2.6. Production de nanocellulose (cellulose nanofibrillée) par microfluidisation**

L'efficacité du prétraitement enzymatique multi-étapes a été testé en comparant la pâte kraft hydrolysée à la pâte kraft non-hydrolysée.

Les deux types de pâtes ont été traités à haute pression au moyen d'un Microfluidizer Processor M-110EH (Microfluidics) muni de deux chambres successives (respectivement 200  $\mu$ m et 100  $\mu$ m). Une suspension de pâte d'une concentration massique de 0,5 % a été réalisée dans de l'eau déminéralisée. Les suspensions ont subi 5 passages successifs à une pression de 1500 bars dans l'homogénéisateur. Les suspensions ont ensuite été séchées par lyophilisation et observées par microscopie électronique SEM (JEOL JSM 840-A).

### 3. Résultats

#### 3.1. Concentration en mono- et disaccharides dans les hydrolysats

La Figure 5-1 présente l'évolution cumulée de la concentration totale en glucose, xylose et cellobiose présents dans les hydrolysats des quatre pâtes étudiées. On y observe une augmentation variable au cours du temps, selon les glucides analysés et selon les pâtes traitées. Ces variations de rendement de l'hydrolyse entre les quatre étapes sont représentées sur la Figure 5-2. Ces variations peuvent s'expliquer par les différences entre les pâtes (composition chimique, composition de surface) et leurs interactions avec les enzymes employées, comme déjà mis en évidence au chapitre 4. Étant donné que les produits d'hydrolyse ont été extraits entre chacune des quatre étapes, la diminution de rendement d'hydrolyse entre chaque étape, observable pour les trois glucides étudiés, pourraient être due à la perte d'enzymes lors des étapes de filtration. Bien que des travaux précédents aient démontré l'adsorption des enzymes de *T. reesei* sur leur substrat (Saddler and Penner, 1995; Suurnäkki *et al.*, 2000), ce phénomène nécessite que l'enzyme puisse physiquement accéder au substrat. La présence d'éléments jouant un rôle barrière, comme de la lignine résiduelle, peut diminuer le nombre d'enzymes adsorbées sur le substrat au moment de la filtration. L'effet positif de l'annulation des effets inhibitoires des produits d'hydrolyse sur le rendement d'hydrolyse observé par Vanderghem *et al.* (2009) avec la méthode multi-étapes est alors contrebalancée par la perte d'enzymes lors des étapes de filtration. Notons néanmoins qu'une diminution, faible mais constante, de rendement entre les étapes était également présente dans les résultats de Vanderghem *et al.* (2009).

Après 24h, la concentration en cellobiose est à chaque fois supérieure à celle des autres sucres étudiés (Figure 5-1), ce qui permet de confirmer l'intérêt d'un procédé multi-étapes pour la production plus spécifique de cellobiose à partir de pâte à papier avec le cocktail enzymatique de *Trichoderma reesei*. La concentration finale en cellobiose de l'hydrolysats de pâte kraft de feuillus est même supérieure à celle du témoin de cellulose de haute pureté C-200. Alors que l'on pourrait émettre l'hypothèse que cette différence serait due à la proportion plus élevée de zones cellulosiques amorphes dans une pâte chimique industrielle que dans une cellulose de laboratoire de haute pureté, cette hypothèse est écartée par les résultats obtenus par DRX.

À l'inverse, les pâtes obtenues par procédé CTMP ont moins bien réagi à l'hydrolyse que la pâte kraft ou le témoin de C-200, en atteignant à peine au bout des 24h les quantités de cellobiose ou de glucose produites par l'hydrolyse de la pâte kraft en 6h. Cela s'explique par les différences intrinsèques de composition chimique et de surface des pâtes CTMP. Celles-ci sont plus riches en lignines, qui n'ont pas été extraites lors du processus de mise en pâte (voir chapitres 2 et 4). Ces lignines sont également encore présentes à la surface des fibres, jouant alors un rôle de barrière physique bloquant l'accès aux enzymes. De plus, en limitant l'accès des enzymes au substrat cellulosique ou hémicellulosique, la lignine empêche ces

enzymes de rester adsorbées au substrat. Les enzymes risquent donc d'être emportées dès la première filtration, et donc de ne plus être présentes pour les étapes suivantes. Cette perte d'enzymes peut également contribuer à la perte de rendement de l'hydrolyse.

La production de xylose est inférieure au départ de la pâte CTMP de résineux, ce qui peut s'expliquer à la fois par l'effet barrière de la lignine résiduelle, mais surtout par le taux de xylanes naturellement plus bas dans le bois de résineux que celui de feuillus (voir chapitre 2).

En comparaison avec une hydrolyse mono-étape, l'hydrolyse multi-étapes permet d'obtenir des résultats supérieurs pour la récupération de xylose et de cellobiose, quelle que soit la pâte concernée (Figure 5-3). De manière surprenante, il n'y a pas de différence (ou très faible) entre les deux méthodes d'hydrolyse en ce qui concerne la production de glucose. Des travaux précédents ont pourtant démontré que l'enzyme responsable de la conversion du cellobiose en glucose (la  $\beta$ -glucosidase) ne bénéficiait pas de la même capacité d'adsorption au substrat que les autres enzymes impliquées dans le processus d'hydrolyse (Saddler and Penner, 1995; Suurnäkki *et al.*, 2000).

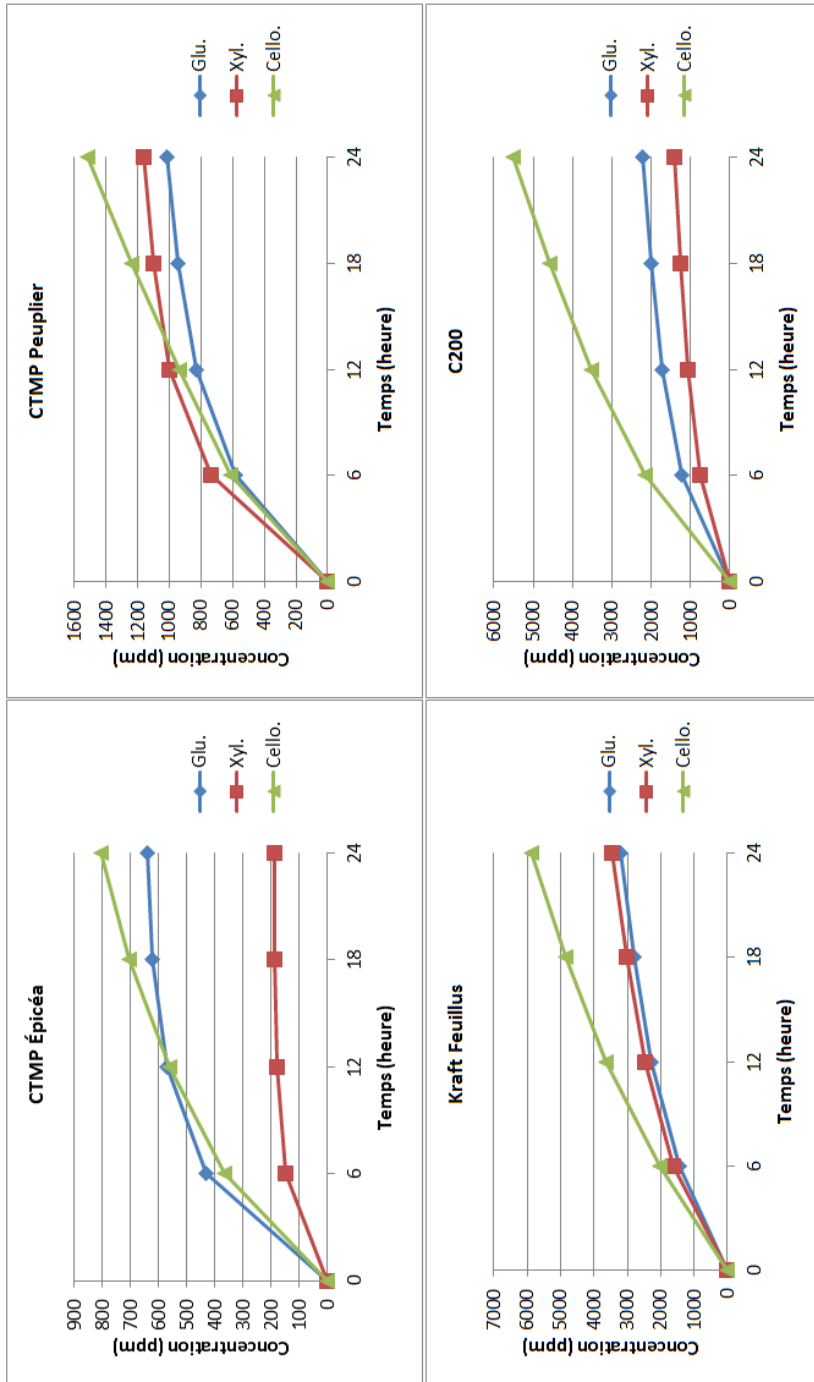
**Tableau 5-1.** Composition chimique des trois pâtes étudiées, exprimée en masse (g) des différents composants lignocellulosiques dans 10 g de matière sèche (la teneur en éléments minéraux et extractibles est négligeable et négligée)

	CTMP Épicéa	CTMP Peuplier	Kraft Feuillus
Glucose	4,95	5,26	7,34
Xylose	0,57	1,60	2,51
Mannose	1,24	0,30	0,00
Galactose	0,23	0,12	0,00
Arabinose	0,11	0,04	0,00
Lignines	2,90	2,68	0,15

En se basant sur les quantités de glucose, xylose et cellobiose libérées par le procédé multi-étape et en les comparant avec la composition chimique des pâtes développée au chapitre 4 (Tableau 5-1), il est possible d'exprimer le rendement de l'hydrolyse par le rapport entre la quantité du sucre concerné libéré et la quantité présente initialement au sein de la pâte (Figure 5-4). L'expression des rendements d'hydrolyse apporte une information supplémentaire dans l'analyse de l'efficacité du procédé. Dans le cas des pâtes CTMP, les différences observées dans les concentrations de sucres libérés entre la pâte d'épicéa et celle de peuplier (Figure 5-1) se retrouvent également en termes de rendement pour le glucose et le cellobiose, mais pas pour le xylose. La concentration de celui-ci, six fois plus élevée dans l'hydrolysate de CTMP de peuplier, n'est la conséquence que d'un rendement deux fois plus important, mais sur une pâte trois fois plus riche en xylose. Les rendements élevés de l'hydrolyse de la pâte kraft de feuillus, combinés à sa teneur initiale la plus élevée en xylose et glucose, explique la forte concentration de ces sucres dans

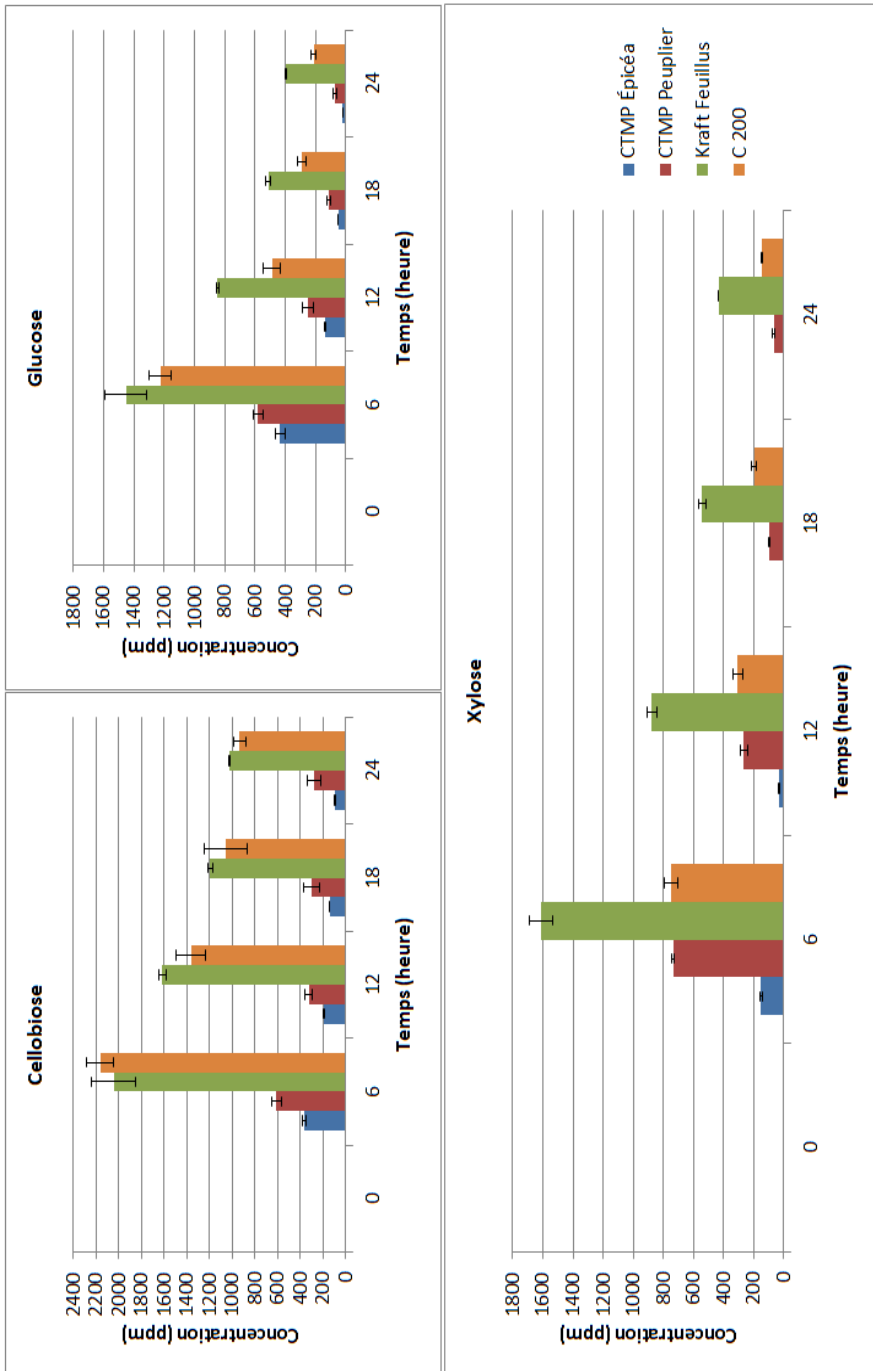
l'hydrolysats. Pour les trois pâtes, l'hydrolyse du xylane est celle qui obtient le meilleur rendement. Ce polymère d'hémicellulose étant présent en surface des fibres, il est naturellement plus accessible aux xylanases présentes dans le mélange enzymatique. Pour la pâte kraft de feuillus, cela se traduit par la libération de près d'un tiers du xylose disponible.

Il est intéressant de remarquer que Vanderghem et al. (2009) n'avaient pas mesuré ni tenu compte de la libération du xylose, au départ de C-200, par le mélange enzymatique CelluClast. Sa présence dans l'hydrolysats, mise en lumière ici (Figure 5-3, b), confirme la présence de xylane dans ce type de cellulose de haute pureté. Le calcul de rendement massique appliqué par Vanderghem et al. (2009) était donc légèrement faussé.

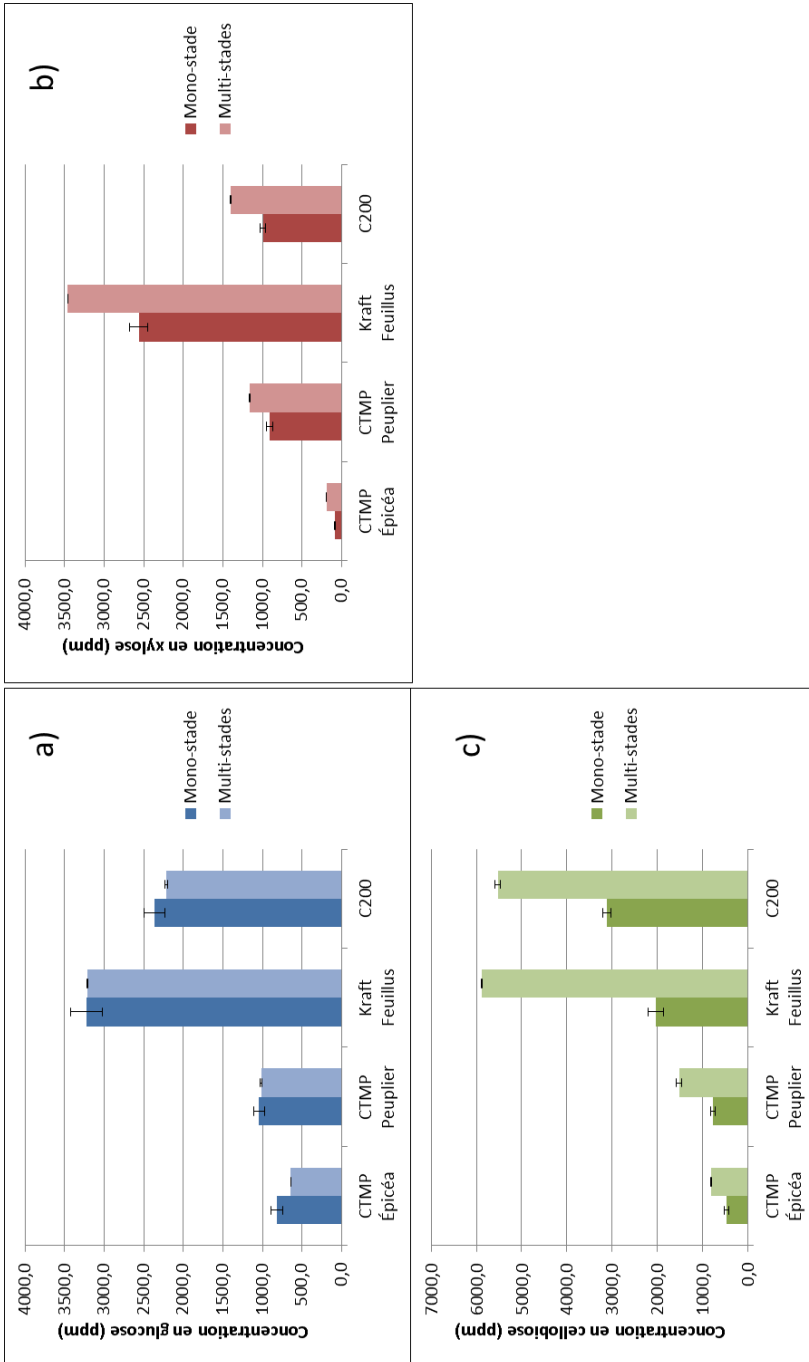


**Figure 5-1.** Concentration cumulée en glucose, xylose et cellobiose dans l'hydrolysats issu l'hydrolyse multi-étapes des différentes pâtes testées.

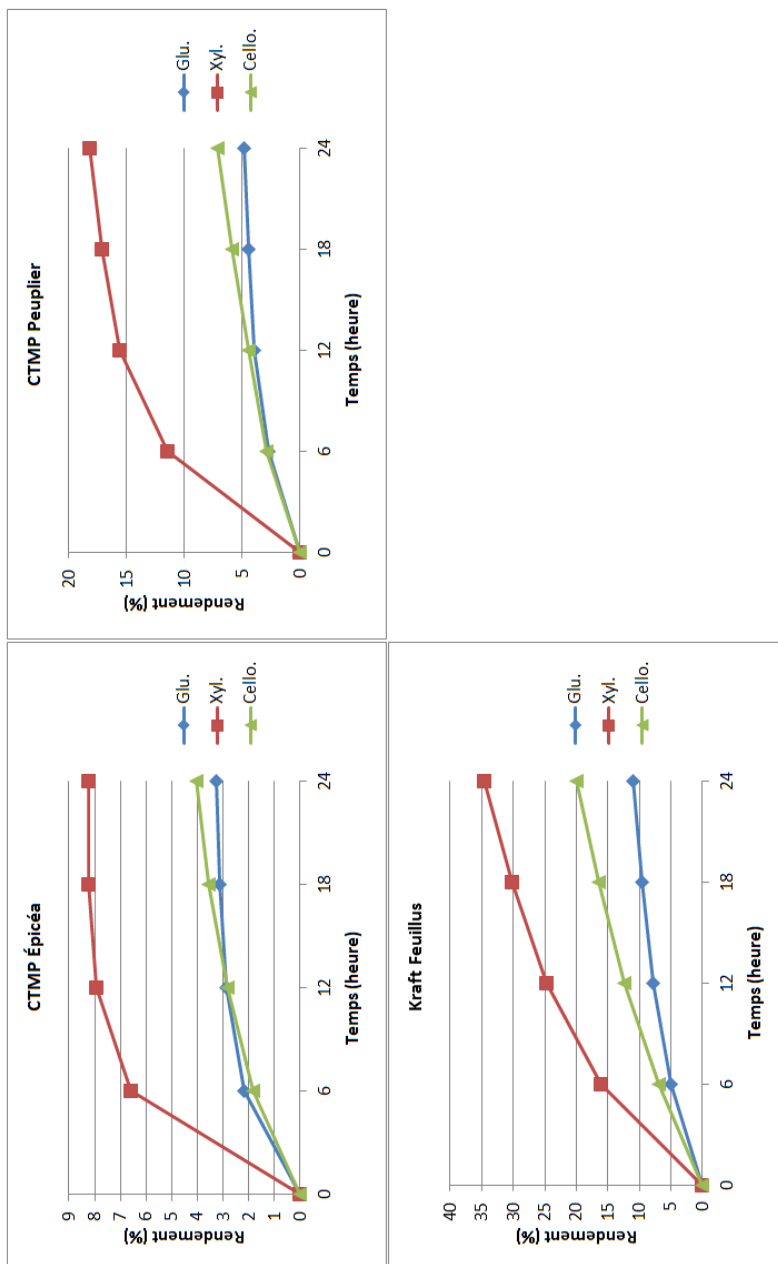




**Figure 5-2.** Évolution des concentrations de glucose, xylose et cellobiose dans l'hydrolysats de chacune des quatre étapes d'hydrolyse multi-étapes.



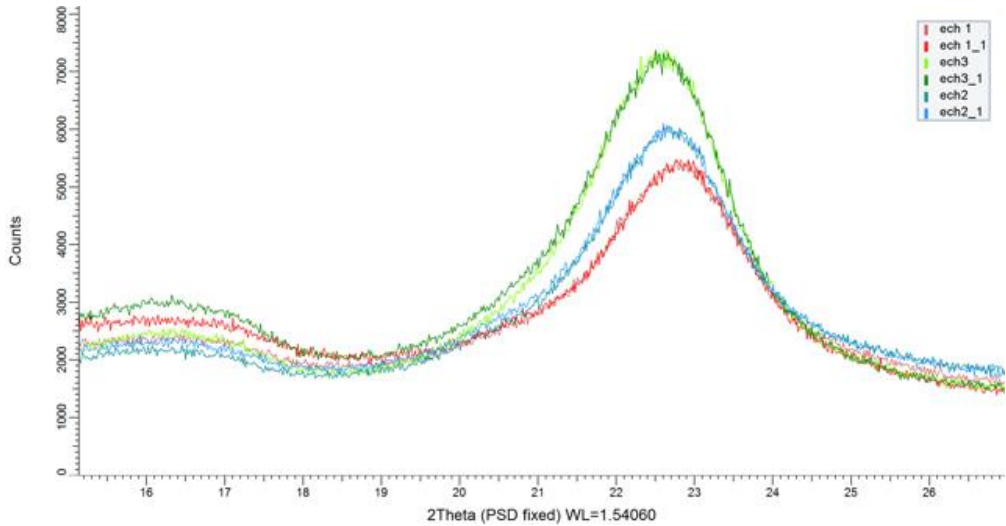
**Figure 5-3.** Concentrations cumulées en glucose (a), xylose (b) et cellobiose (c) dans l'hydrolysate en fin d'hydrolyses mono- et multi-étapes.



**Figure 5-4.** Rendements d'hydrolyse, exprimé comme le rapport entre la quantité de sucre libéré et la quantité de ce sucre présente dans la pâte (le glucose et le cellobiose libérés sont associés au glucose de la cellulose dans la pâte).

### 3.2. Indice de cristallinité

Les mesures par DRX relatives à l'état de cristallinité des échantillons sont présentées ci-dessous (Figure 5-5). L'échantillon de pâte kraft de feuillus se distingue des échantillons de pâtes mécaniques.

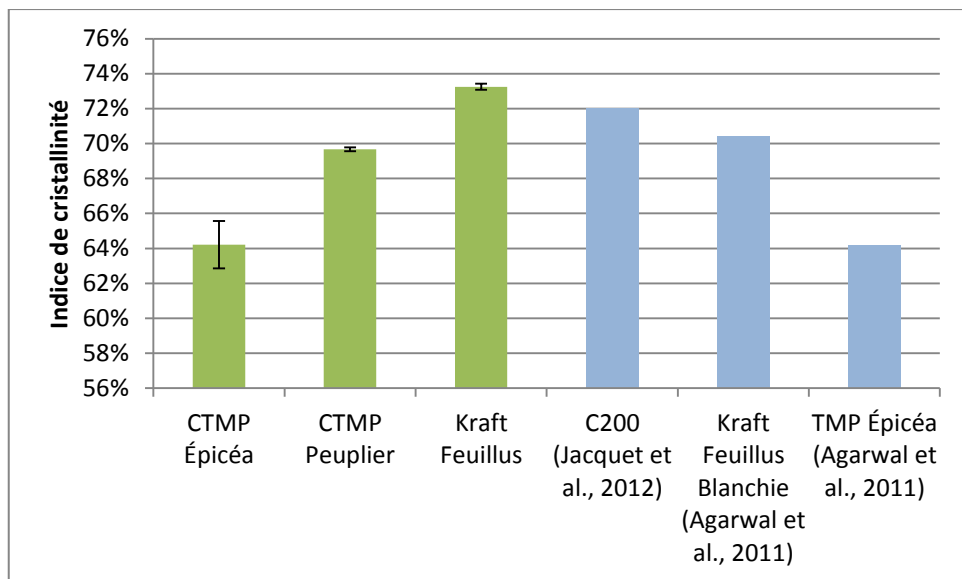


**Figure 5-5.** Diffractogrammes de l'analyse par DRX des échantillons de pâtes à papier (ech1 : CTMP Épicéa, ech2 : CTMP Peuplier, ech3 : Kraft Feuillus).

Les indices de cristallinité mesurés par la méthode de Segal (Segal *et al.*, 1959) sur les échantillons de pâtes sont comparés aux valeurs de la littérature obtenues selon la même méthode (Agarwal, Reiner and Ralph, 2011; Jacquet *et al.*, 2012) (Figure 5-6). Il est important de signaler que le calcul d'un indice de cristallinité par la méthode de Segal est une technique semi-quantitative, dont l'interprétation et la comparaison des résultats entre différentes sources doit être faite en connaissance de la formule de calcul utilisée et avec précaution. Dans le cas des trois pâtes étudiées, la méthodologie est exactement identique et la pâte kraft feuillus présente alors le plus haut indice de cristallinité. Cette hiérarchie est également observée sur les diffractogrammes (Figure 5-5). Dans le cas de la comparaison avec les indices issus d'autres études, l'indice de cristallinité de la cellulose témoin (C200) de haute pureté est également obtenu via la même formule que les trois pâtes de cette étude. Tenant compte de la subjectivité de la méthode Segal, il est néanmoins raisonnable d'affirmer que la pâte kraft feuillus présente un indice de cristallinité plus élevé que celui de la C200.

Selon les résultats de la littérature, la valeur de cet indice de cristallinité diminue entre une pâte kraft non-blanchie et une pâte blanchie (Agarwal, Reiner and Ralph, 2011). Cette diminution s'observe également ici en comparant les résultats de la pâte kraft non-blanchie utilisée dans notre étude avec la valeur obtenue par Agarwal *et al.* (2011) pour une pâte kraft blanchie. Notons néanmoins qu'une partie de cette

différence peut s'expliquer, comme précisé précédemment, par la subjectivité de la méthode de calcul de l'indice utilisée.



**Figure 5-6.** Indices de cristallinité (et écart-type) des pâtes testées (en vert) et indices issus de la littérature (en bleu).

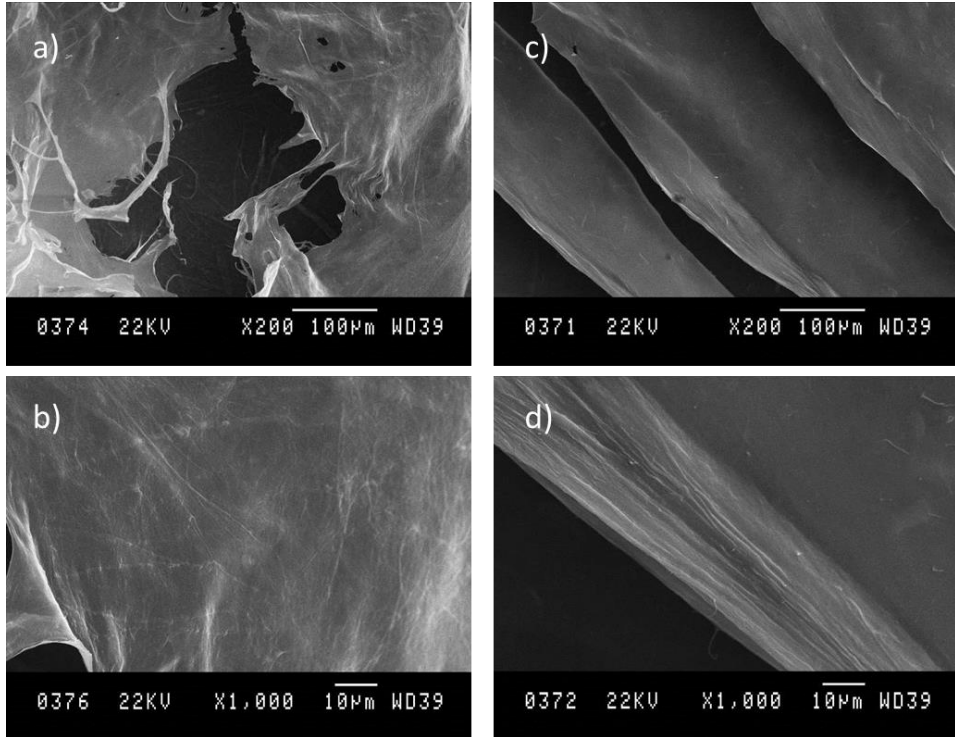
Néanmoins, les meilleurs résultats d'hydrolyse observés pour la pâte kraft en comparaison à la C200 (Figure 5-3) ne peuvent donc pas être justifiés par une proportion plus importante de cellulose amorphe dans la pâte kraft.

### 3.3. Production de cellulose nanofibrillée

Lors du traitement d'homogénéisation, la pâte kraft non-prétraitée enzymatiquement a provoqué un colmatage de l'appareil lors de son 1<sup>er</sup> et 2<sup>ème</sup> passage. La pâte qui avait subi le prétraitement enzymatique multi-étapes n'a pas colmaté l'appareil, et ce même au 1<sup>er</sup> passage.

L'observation de la structure de la nanocellulose produite, via les images obtenues par SEM (Figure 5-7), montre que l'échantillon non-prétraité conserve des éléments fibrillaires visibles après homogénéisation. Comme ces éléments fibrillaires ne sont pas détectables sur les images de l'échantillon prétraité, cela peut nous amener à conclure que la dimension des fibrilles de l'échantillon prétraité est inférieure à l'échelle microscopique employée. De plus, la structure de l'échantillon prétraité, homogénéisé et lyophilisé est typique de celle observée lorsque de la nanocellulose est soumise à un séchage par lyophilisation (comportement d'auto-assemblage de nanofibres) (Trache *et al.*, 2017). Néanmoins, les contraintes techniques de l'imagerie SEM n'ayant pas permis d'observer une nanofibre isolées, il n'est pas possible de confirmer totalement que, dans les conditions testées, le traitement par microfluidisation a permis d'obtenir des nanofibres de cellulose.

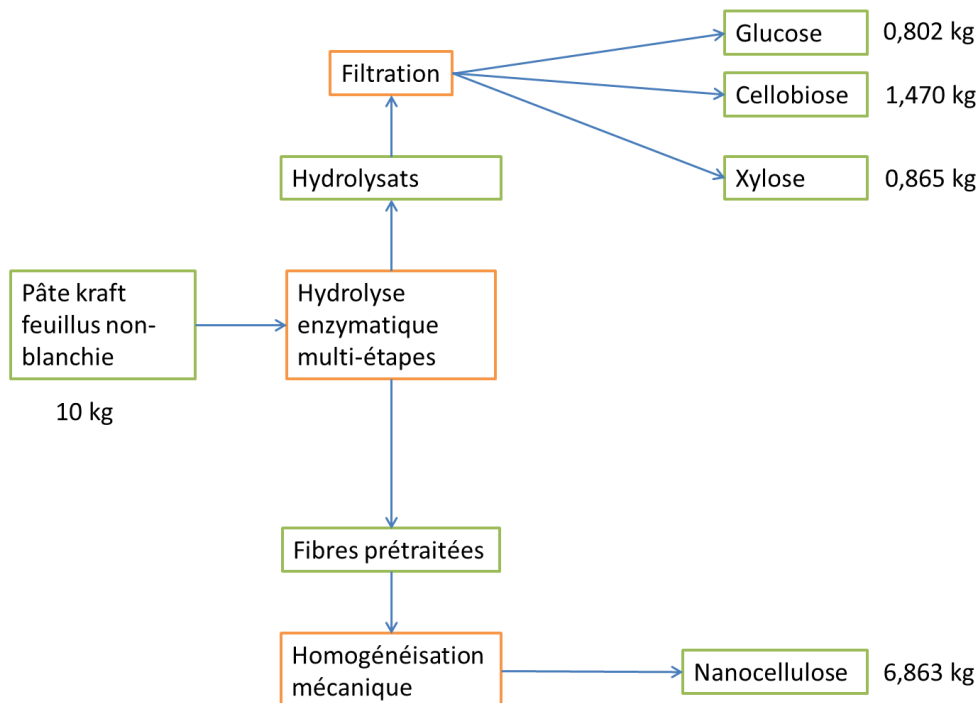
Dans un objectif de facilitation de l'étape de traitement mécanique de production de cellulose nanofibrillée, l'emploi d'une hydrolyse multi-étapes permet d'obtenir de meilleurs résultats pour un même nombre de passages dans l'homogénéisateur que sans prétraitement.



**Figure 5-7.** Images SEM des différences de structure des échantillons lyophilisés de nanocellulose obtenue après 5 passages au microfluidiseur sans (a, b) et avec prétraitement enzymatique multi-étapes (c, d).

### ***3.4. Bilan-type du procédé de production de nanocellulose***

Au départ des résultats de la pâte kraft de feuillus, pâte ayant présenté les meilleurs résultats en terme de produits d'hydrolyse et compatible à un traitement au microfluidiseur, il est possible de dresser le bilan de masse théorique d'un procédé à l'échelle pilote de production de nanocellulose par prétraitement enzymatique multi-étapes avec récupération et valorisation des coproduits d'hydrolyse (Figure 5-8). Ce bilan théorique comprend une hypothèse de récupération de la totalité de la pâte traitée et sa transformation intégrale en nanocellulose.



**Figure 5-8.** Bilan de masse théorique d'une production de nanocellulose par prétraitement enzymatique multi-étapes et homogénéisation mécanique à l'échelle pilote, au départ d'une pâte kraft de feuillus.

En contrepartie des avantages développés précédemment, notons que la mise en œuvre à plus grande échelle de ce procédé multi-étapes à l'identique de ce qui a été testé ici générera une grande quantité d'hydrolysat à filtrer et d'effluents à traiter. Pour traiter 1 kg de pâte dans les conditions d'expérience appliquées, chacune des 4 étapes nécessitera 25 l de milieu tampon, soit un total de 100 l de milieu tampon qui nécessiteront d'être filtrés et desquels il faudra ensuite isoler les glucides qui y sont solubilisés. La réduction de la quantité de milieu tampon nécessaire figurera parmi les challenges d'une montée en échelle de ce procédé multi-étapes.

## 4. Conclusions

Dans ce chapitre, nous visons à déterminer la réaction de différentes pâtes de cellulose non-blanchies à un prétraitement hydrolytique multi-étapes, et si celui-ci permettait d'optimiser la production de certains sucres d'intérêt, par rapport à une hydrolyse en une seule étape. Le prétraitement hydrolytique multi-étapes devait également faciliter l'étape d'homogénéisation mécanique visant à produire de la cellulose nanofibrillée.

Concernant la production de glucose, il n'y a pas de différence observable entre les deux types d'hydrolyse permettant de justifier le choix préférentiel de la solution multi-étapes. Par contre, les productions de xylose et de cellobiose sont supérieures

dans le cas de l'hydrolyse multi-étapes, quelle que soit la pâte testée. Ces différences peuvent aller jusqu'à une production multipliée par trois (cas du cellobiose avec la pâte kraft de feuillus). Les rendements d'hydrolyse décroissent cependant invariablement au cours des étapes successives de l'hydrolyse, quelle que soit la pâte ou le sucre concerné.

Les pâtes CTMP ont obtenu des concentrations en sucres dans leurs hydrolysats inférieures aux résultats de la cellulose témoin C200. Par contre, la pâte kraft de feuillus a montré des résultats supérieurs pour les trois sucres par rapport à la cellulose C200. L'hypothèse selon laquelle le taux de cristallinité inférieur de cette pâte kraft par rapport à la C200 pouvait expliquer sa meilleure réactivité à l'hydrolyse a été invalidée par les mesures d'indice de cristallinité.

Le prétraitement enzymatique s'est avéré efficace en facilitant l'étape d'homogénéisation mécanique, supprimant les problèmes de colmatage et améliorant visiblement l'efficacité du traitement mécanique sur le diamètre des fibres.

Quand il s'agit d'y appliquer une hydrolyse enzymatique, le choix du type de pâte à papier employée reste l'élément le plus déterminant du succès de cette hydrolyse. Quand il s'agit d'optimiser la récupération de xylose et de cellobiose, la méthode multi-étapes amène à de meilleurs résultats que la mono-étape, quelle que soit le type de pâte employé.

## **5. Remerciements**

Les mesures de diffraction aux rayons X ont été réalisées par Mr Sandrino Filocco, sous la direction de Mme Sabine Danthine du Smart Technologies for Food and Biobased Products (SMARTECH) (ULiège). Les images de microscopie électronique SEM ont été réalisées par Mr Jean-Michel Thomassin (CERM / ULiège).



# 6

---

## **Discussions générales, conclusions et perspectives**



## 1. Retour sur les objectifs initiaux

L'industrie papetière a la volonté et la nécessité de se diversifier afin de maintenir sa compétitivité et répondre à la demande actuelle et future en produits biosourcés (Toppinen *et al.*, 2017). Cette industrie, qui se caractérise par des investissements lourds dans les moyens de production, doit pouvoir identifier les débouchés porteurs et développer des méthodes de production rentables. Le principe de conversion des unités de production de pâte à papier en bioraffineries forestières intégrées (IFBR), de plus en plus présentée comme la solution idéale, n'est cependant pas encore une réalité industrielle largement répandue. En attendant cette conversion, le produit principal de la transformation du bois par cette industrie, la pâte cellulosique, peut être employé comme source de nouveaux produits à plus haute valeur ajoutée. La Belgique possède sur son territoire deux unités de production de pâte qui se différencient tant par les essences que par le procédé de mise en pâte employé (CTMP ou kraft). Si ces pâtes sont généralement blanchies pour un usage papetier, elles peuvent également être employées non-blanchies pour de nouveaux produits. C'est en s'inscrivant dans ce contexte que cette recherche visait à répondre aux questions suivantes :

- 1) Au départ de pâte cellulosique, idéalement non-blanchie, quel(s) est/sont le(s) meilleur(s) produit(s) qui permet(tent) de valoriser les propriétés particulières des fibres de bois et qui s'intègre le mieux à une IFBR ?
- 2) Quelles combinaisons de (pré)traitements s'y appliquent le mieux, en tenant compte des aspects environnementaux et économiques du processus de production ?
- 3) Après prétraitement des pâtes cellulosiques, quels sont les changements observables à la surface des fibres traitées ? Ces changements observés permettent-ils d'orienter le choix du type de pâte selon les produits finaux et coproduits envisagés ?
- 4) Est-il possible d'appliquer une méthode d'analyse simple d'utilisation, fiable, pour quantifier l'impact des (pré-)traitements sur les fibres et identifier alors les débouchés fibres et coproduits les plus opportuns ?

Le chapitre 2 a été l'occasion de rappeler combien le matériau bois était complexe, tout comme son assemblage naturel et ses composants qui sont alors autant d'obstacles naturels à sa déconstruction par l'homme. Les différents composants chimiques du bois, ainsi que leur arrangement, constituent autant de pistes de développement de nouveaux produits et applications que de barrières à franchir selon les produits finaux visés. Le bois d'industrie regroupe par définition les compartiments de l'arbre qui ne sont pas valorisables par débit (sciage, tranchage, déroulage), de même que les grumes déclassées. Or, ces compartiments ou ces grumes déclassées sont plus susceptibles de contenir un bois dont la composition et la structure s'éloigne du bois normal : part importante de bois juvénile pour les bois issus de coupes d'éclaircies, bois de réaction pour les grumes déclassées ou certains

compartiments tels que les branches, longueur des fibres de résineux augmentant avec la distance par rapport à la moelle, etc. Il est intéressant de remarquer que les propriétés et la composition particulières de ces types de bois, pourtant principales sources de bois d'industrie, sont bien connues du secteur et de la recherche académique du domaine forestier mais rarement mises en évidence dans les études provenant du domaine de la chimie. Cela démontre également que si certains envisagent le bois comme une matière première homogène, la réalité est toute autre. Pour valoriser au mieux cette ressource, la recherche devra prendre en compte ces différences propres à l'hétérogénéité de la ressource bois.

Le chapitre 3 a apporté des éléments de réponse aux questions 1) et 2). La demande pour de nouveaux produits biobasés, qui doivent s'inscrire dans la substitution progressive au pétrosourcé, sera vraisemblablement axée vers les produits qui présentent un procédé de production lui aussi respectueux de l'environnement. La nanocellulose, dont la production s'intègre facilement dans une logique d'IFBR et qui peut être produite par une combinaison enzymo-mécanique de traitements, présente une série de propriétés qui en font vraisemblablement un produit d'avenir au sein de la filière papetière. C'est ce potentiel d'intégration qui a été démontré au chapitre 3. Cette nanocellulose devra trouver sa place dans les pistes de diversifications qui apparaissent les plus pertinentes au secteur papetier : textiles, biocarburants, molécules plateformes, plastiques et emballages (Hurmekoski *et al.*, 2018). De cette diversification, il en découle que la méthode de prétraitement enzymo-mécanique est préférable car elle permet alors la valorisation des coproduits d'hydrolyse au sein d'autres de ces marchés d'avenir.

Avant d'observer la conversion totale et à large échelle des usines de pâte à papier en IFBR, il est nécessaire de démontrer la possibilité de développer de nouveaux produits au départ des produits « classiques » de cette industrie. Le chapitre 4 s'est attaché à répondre aux questions 3) et 4) et a démontré l'impact de la diversité des pâtes et des mélanges enzymatiques employés sur les modifications et coproduits générés, qui préfigurent des voies de diversification différentes selon le procédé de mise en pâte initialement employé. Ce chapitre a également démontré avec succès l'applicabilité d'une méthode simple et rapide d'analyse des modifications de surface subies par les fibres suite à une hydrolyse enzymatique. Cette méthode d'analyse devrait faciliter les projets de R&D au sein de l'industrie papetière.

L'hydrolyse enzymatique de pâte cellulosique est un terme simple qui cache en réalité une complexité de procédés, de molécules et de produits aux interactions complémentaires mais également antagonistes. Le chapitre 5 a été l'occasion de démontrer qu'il était possible d'optimiser volontairement la production de certains coproduits lors du prétraitement enzymatique, apportant des éléments de réponse complémentaires aux questions 1) et 2). La récupération de ces coproduits valorisables contribue à la diversification de la production de l'industrie papetière.

## 2. Le prétraitement enzymatique

L'intérêt de l'hydrolyse enzymatique, déjà appliquée avec succès dans d'autres conditions par d'autres études, a également été démontré dans les cas abordés par la présente recherche. Ce type de prétraitement, plus environnementalement bénéfique à l'inverse de certains prétraitements chimiques, a confirmé ici aussi sa capacité à générer des coproduits valorisables (cellobiose, xylose et glucose). Quand elle a été menée à faible charge enzymatique, comme c'est le cas ici, l'hydrolyse enzymatique a affecté principalement les composants en surface de la fibre papetière. Ces fibres modifiées peuvent alors également trouver d'autres formes de valorisations, pas nécessairement sous forme de nanocellulose. L'utilisation d'enzymes à ces fins est d'ailleurs déjà connue et employée dans l'industrie papetière (Bajpai, 1999). L'hydrolyse enzymatique présente aussi l'avantage de pouvoir contrôler, via la composition en enzymes du cocktail employé et les conditions d'hydrolyse, les modifications qui sont apportées aux fibres traitées ou le type de coproduit que l'on souhaite favoriser. Les différences observées entre les cocktails enzymatiques, les pâtes (Chapitre 4) et les prétraitements enzymatiques mono- et multi-étapes (Chapitre 5), en particulier sur les productions de cellobiose et xylose, en sont un exemple probant.

En ce qui concerne la production de nanocellulose, le prétraitement enzymatique s'est avéré ici également efficace, comme les autres prétraitements qui visent à affaiblir la structure des fibres avant leur fractionnement par voie mécanique. Une étude précédente avait également démontré le succès de cette combinaison, mais ne se focalisait que sur un type de pâte (kraft blanchie d'eucalyptus) et un seul coproduit (le glucose) (Zhu, Sabo and Luo, 2011). Nous avons démontré ici que cette combinaison peut s'appliquer non seulement à des pâtes non-blanchies mais également à des pâtes mécaniques. Ces dernières sont évidemment moins impactées par l'hydrolyse, leurs fibres étant protégées par la lignine résiduelle (Mansfield, Mooney and Saddler, 1999; Chandra *et al.*, 2007; Zhu *et al.*, 2008). Dans le cas d'une hydrolyse appliquée seulement afin de récupérer des sucres simples valorisables, la présence de cette lignine résiduelle constitue un frein et est donc généralement évitée. Mais, dans le cas d'une production de nanocellulose, cette lignine résiduelle peut s'avérer être un avantage. En effet, la nanocellulose présente un caractère hydrophile. Cette caractéristique pose problème dans le cas d'une valorisation de la nanofibre comme renfort d'un bio-composite. Les caractéristiques de la matrice de ce dernier, généralement hydrophobe, entraînent alors des problèmes de dispersion des fibres au sein de la matrice. Bien que la lignine constitue un obstacle à l'efficacité du prétraitement, une nanofibre qui conserve un *coating* de lignine possède un caractère hydrophobe qui permet de faciliter son intégration et sa dispersion au sein de matrice hydrophobe d'un bio-composites. Ces nanofibres enrobées de lignine ont d'ailleurs déjà attiré l'intérêt d'une firme, American Process Inc., qui en a fait la force de son produit (Nelson *et al.*, 2016).

Si elles sont souvent ignorées des études de production de nanocellulose au profit d'une source de cellulose d'une plus grande pureté (grade de qualité « *dissolving*

*pulp* »), les pâtes mécaniques non-blanchies méritent néanmoins d’être, elles-aussi, investiguées lors du développement de ces voies de valorisation.

### 3. L’utilisation d’enzymes

Les différentes expérimentations d’hydrolyse enzymatique menées lors de cette recherche ont employé des mélanges enzymatiques produits par des fabricants bien connus du secteur papetier. Ce secteur utilise déjà depuis des années diverses enzymes comme réactifs verts dans ses procédés de production. Les enzymes peuvent y intervenir dans les étapes de désencrage des papiers recyclés, de blanchiment des pâtes, de mise en pâtes, etc. Leur utilisation et les avantages qu’elles entraînent sont bien connus des papetiers (Tableau 6-1). Ces avantages concernent principalement un gain de productivité, une diminution de l’impact environnemental et une diminution de la consommation énergétique (Bajpai, 1999, 2015a). Ceux-ci peuvent également compter sur l’existence de divers producteurs (au moins huit clairement identifiés) de stature internationale pour garantir l’approvisionnement actuel et futur en enzymes (Bajpai, 2015b).

**Tableau 6-1.** Domaines d’utilisation des enzymes cellulase et xylanase dans l’industrie papetière (Bajpai, 2015a).

Cellulase	Xylanase
Drainage	Blanchiment
Raffinage	Raffinage
Imprimabilité	Drainage
Désencrage	Pâte de haute pureté
	Elimination des impuretés

Le procédé enzymo-mécanique étudié dans la présente recherche possède l’avantage d’employer deux technologies (utilisation d’enzymes et traitement mécanique des fibres) qui sont connues et maîtrisées par l’industrie papetière. Le choix de technologies connues et éprouvées pourrait aider à faciliter l’acceptation et l’implémentation d’un procédé enzymo-mécanique de fabrication de nanocellulose en fin de ligne pour valoriser une partie de la production de pâte.

### 4. La nanocellulose: applications et marchés potentiels

Si la méthode enzymo-mécanique développée ici doit un jour être appliquée à l’échelle industrielle par un acteur papetier, encore faut-il s’assurer de l’existence d’utilisations de cette nanocellulose, de ses éventuels marchés et des volumes concernés. Ce volet économique, brièvement abordé au chapitre 3, mérite d’être approfondi.

### 4.1. Applications de la nanocellulose

Les propriétés particulières de la nanocellulose ouvrent à celle-ci une large variété de domaines d'applications. Incorporable dans une large gamme de produits, la nanocellulose leur apporte alors de nombreux bénéfices avec, entre autres :

- Une augmentation de la résistance à la traction du produit ;
- Une diminution du poids tout en conservant ou améliorant certaines propriétés physiques ;
- Une augmentation des propriétés barrières vis-à-vis du son, de l'oxygène et dans une certaine mesure de l'humidité ;
- Un revêtement transparent ou coloré ;
- Une faible toxicité ;
- Une biodégradabilité, un composé biosourcé renouvelable.

**Tableau 6-2.** Principales catégories d'applications identifiées, actuelles ou potentielles, de la nanocellulose (Chauve and Bras, 2014; Lin and Dufresne, 2014; Shatkin *et al.*, 2014; Abitbol *et al.*, 2016; Lengowski *et al.*, 2019)

Applications à grand volume	Applications à faible volume	Applications nouvelles et/ou émergentes
Construction (ciments)	Construction (revêtement de panneaux muraux, isolation sonore et thermique)	Electronique (OLED)
Automobile (structure et habillage intérieur)	Aérospatial (structure et habillage intérieur)	Coloration (sans pigments)
Emballages (revêtement et renfort)	Aérogels (filtration)	Impression 3D
Papiers (renfort)	Peintures (viscosité, durabilité)	
Emballages et films plastiques (remplacement ou renfort)	Additifs (viscosité)	
Produits d'hygiène (effet absorbant)	Médical et pharmaceutique (excipient, hydratation)	
Textiles (fibre)	Détecteurs (humidité, conductivité électrique)	

Les applications de la nanocellulose sont généralement différenciées en deux grandes catégories (Shatkin *et al.*, 2014). Dans la première catégorie, le matériau nanocellulosique vient remplacer un autre matériau existant (métal, plastique, etc.). Il s'agit là des applications dites à grand et faible volume, en rapport avec le volume absorbé de nanocellulose par ces applications. La seconde catégorie relève des applications nouvelles ou émergentes, qui visent alors des marchés de niches.

Différentes études de synthèse ont identifié les nombreuses applications potentielles de la nanocellulose. Celles-ci sont regroupées et présentées selon la classification du volume de marché (Tableau 6-2). Notons que ce tableau représente également une mise à jour des applications identifiées au début de la recherche et présentées au Chapitre 3.

Les domaines d'applications ne cessent de s'élargir, comme en témoigne l'augmentation exponentielle du nombre annuel de publications (qui a atteint plus de 300 en 2016) et de brevets (plus de 500 en 2016) relatifs à la nanocellulose (Klemm *et al.*, 2018).

## **4.2. Marchés potentiels**

Diverses entreprises d'études économiques stratégiques se sont penchées sur l'estimation des marchés potentiels de la nanocellulose. Ce type d'étude évalue le potentiel de marché de la nanocellulose, en distinguant cellulose nanofibrillée (CNF) et cellulose nanocristalline (CNC), sur la base du taux d'incorporation probable de ces produits dans divers produits de différents secteurs. La nanocellulose peut y être utilisée pour substituer des produits issus de la pétrochimie (ex : les fibres de carbone), et alors être introduite dans des marchés existants, ou pour améliorer certaines propriétés des produits concernés (ex : renfort de nanocellulose dans les produits papetiers). Ces marchés potentiels totalisent un volume évalué entre 19 et 56 millions de tonnes par an, selon le type de nanocellulose, les études, les applications et les scénarios de percée des marchés envisagés (Cowie *et al.*, 2014; Miller, 2014). La taille du marché global de la nanocellulose était estimée à 87,5 millions US\$ en 2016, avec un taux de croissance annuel attendu de près de 34 % d'ici 2024, pour atteindre alors environ 910 millions US\$ (Pulidindi and Pandey, 2018). Actuellement, cette taille de marché de 87,5 millions US\$ reste néanmoins anecdotique (0,077 %) en comparaison des 113 milliards US\$ du marché global des pâtes de bois sur la même année (Hetemäki and Hurmekoski, 2016).

Les marchés potentiels de la nanocellulose sont généralement divisés en trois groupes : grands volumes, faibles volumes et nouvelles applications aux volumes encore indéterminables. Dans leur étude, qui a l'avantage de détailler clairement la méthodologie suivie, Cowie *et al.* (2014) estiment ainsi dans un scénario raisonnable un marché potentiel global annuel d'environ 33 millions de tonnes pour les applications à grands volumes de nanocellulose (packaging, remplacement de plastiques, produits papetiers, ciments, etc.) et d'environ 2 millions de tonnes pour les applications à faible volume (isolation, aérogels, peintures, etc.). Ces auteurs estiment également que le potentiel de marché dans un avenir proche concernera majoritairement la CNF au lieu de la CNC. Ces informations tendent à confirmer l'intérêt du procédé enzymo-mécanique développé dans les précédents chapitres, lequel est apparu bien adapté à la production de CNF. Précision importante, leurs estimations partent des postulats d'un prix de la nanocellulose entre 4,4 et 11 US\$/kg et de l'hypothèse que les investissements dans la production de ces produits employant des nanocelluloses généreront des profits suffisants et de faibles risques pour rester compétitifs vis-à-vis des investissements dans la production des produits



qu'ils visent à remplacer. Ici encore, le procédé enzymo-mécanique présente de sérieux avantages : coproduits d'hydrolyse valorisables et pilotabilité du procédé, équipements moins coûteux (en comparaison aux méthodes de production employant des acides forts), diminution de la consommation énergétique de l'étape mécanique, disponibilités des enzymes et des fournisseurs, etc.

En ce qui concerne les capacités de production déjà existantes de nanocellulose, on identifie des installations allant de l'échelle labo/pilote (de l'ordre du kg/jour) à la production industrielle (d'environ 1 t/jour) (Chauve and Bras, 2014). Miller (2014) identifiait huit installations en activité pour la production de nanocristaux de cellulose, la plus importante allant jusqu'à une capacité de 1 tonne sèche par jour (l'entreprise CelluForce, liée au groupe papetier Domtar et basée au Québec). La production de nanofibres, combinée avec celle de microfibrilles de cellulose (MFC), se répartissait entre au moins dix-neuf installations, dans la même gamme de capacité de production (jusqu'à 1 t/jour pour l'unité basée à l'Université du Maine (USA)) (Chauve and Bras, 2014). Ces auteurs identifient l'année 2012 comme le point de départ de l'industrialisation de la production de MFC/CNF. Ils soulignent également un point important : chacune de ces compagnies produisant son propre type de MFC ou CNF et selon son propre procédé, ces différences amènent à une large gamme de produits. Cette diversité rend difficile la classification de ceux-ci selon les standards décrits dans la littérature (voir Chapitre 3), pouvant amener des utilisateurs potentiels à se désintéresser de ce produit dont les caractéristiques sont perçues comme trop peu homogènes (Chauve and Bras, 2014).

Enfin, la question du prix reste primordiale pour une acceptation et une utilisation par le marché. Avec un coût de production estimé entre 7 et 12 US\$/kg, le rapport performance/coût et la compétitivité avec les coûts de production des produits déjà existants sont perçus comme les principales faiblesses et désavantages de la nanocellulose (Chauve and Bras, 2014). Notons que le coût de production estimé par Chauve & Bras (2014) est presque identique au prix de vente considéré par Cowie et al. (2014), hypothéquant alors fortement les perspectives prometteuses de marché estimées par ces derniers. Dans le cas de la méthode de production enzymo-mécanique au départ de pâte à papier, ces coûts de production pourraient être abaissés par la valorisation des coproduits générés lors de l'hydrolyse enzymatique. Allant dans ce sens, une synthèse récente évaluait que la méthode la moins coûteuse de production de cellulose nanofibrillée était probablement celle qui emploierait des prétraitements enzymatiques. Cette étude mettait également en avant tout l'intérêt de l'intégration de ces étapes de production au sein d'un unité de production de pâte, permettant alors de faire chuter les coûts de production de 2,5 €/kg à 0,4 €/kg (Klemm *et al.*, 2018). Malheureusement, aucune information ne figurait dans cette synthèse sur la méthode de calcul ayant amené à ces valeurs.

En conclusion, il existe encore une grande variabilité en ce qui concerne le marché de la nanocellulose, tant sur les coûts (de production, de vente) que sur la taille de marché.

## 5. La production de CNF à partir de pâte à papier

La production de nanocellulose au départ de différentes sources cellulosiques, forestières ou non, a déjà été bien étudiée (Dufresne, 2012; de Campos *et al.*, 2013; Deepa *et al.*, 2015) (voir également Chapitre 3). La nature de la source cellulosique joue un rôle dans les propriétés de la nanocellulose obtenue, tout comme le procédé de production appliqué (Deepa *et al.*, 2015). Si la matière bois est considérée comme une source prometteuse, la présente recherche conforte des résultats obtenus dans d'autres travaux et démontre qu'il est possible de s'affranchir des étapes de déconstruction du matériau bois en partant directement de la pâte à papier comme source cellulosique. De plus, la présente recherche a mis en avant la possibilité d'utiliser des pâtes non-blanchies comme matière première, permettant alors de s'affranchir des étapes (et des coûts) de blanchiment. Le papetier devient le producteur et le détenteur de cette matière première, et il se retrouve en bonne position pour valoriser lui-même cette matière via la mise en œuvre de procédés dont il possède déjà la maîtrise.

La méthode étudiée ici fait appel à des procédés enzymatiques et mécaniques, connus des papetiers. Elle permet de produire de la nanocellulose au départ de pâte à papier non-blanchie, principalement sous forme de CNF. En comparaison avec les travaux de Zhu *et al.* (2011), l'hydrolyse enzymatique telle qu'elle a été employée ici, avec des charges enzymatiques relativement faibles, est trop légère pour isoler les zones cristallines en hydrolysant complètement les zones amorphes, comme c'est le cas avec les méthodes de production de CNC à l'aide d'acide fort. Cependant, les perspectives de marchés et les coûts de production inférieurs (bien que variables selon les études) de la CNF rendent ce type de nanocellulose plus prometteur sur le court terme que la CNC.

Ces arguments économiques, ainsi que les applications possibles de la CNF dans le domaine des produits papetiers, ont conduit de grands groupes papetiers à investiguer cette piste, voire à développer leurs propres unités de production. Citons parmi eux les groupes Borregaard, UPM, SAPPI, Domtar, Stora Enso, Nippon Paper ou encore Kruger, tous devenant ou visant à devenir des acteurs importants du secteur. La possibilité de produire à la fois de la nanocellulose au départ de pâte à papier et d'incorporer cette nanocellulose dans ses produits papetiers (ou d'autres applications) met l'industrie papetière dans une position avantageuse et unique de producteur et d'utilisateur de produits nanocellulosiques (Shatkin *et al.*, 2014). À titre d'exemple, le papetier UPM annonçait récemment le lancement d'un de ses produits de soin (un pansement) qui incorporait et bénéficiait des propriétés des nanofibres de cellulose produites via la technologie qu'il avait développée (Bio-basedNews, 2019).

En ce qui concerne l'industrie papetière en Belgique, différents échanges informels avec les responsables de production et R&D d'usines de pâtes ont permis de confirmer l'intérêt de ces acteurs pour la diversification de leur production, que ce soit vers la nanocellulose ou vers d'autres produits. Néanmoins, ces échanges ont surtout mis en évidence la frilosité de ce secteur à investir dans ces nouvelles voies

sans garanties solides de l'existence de marchés pour ces produits. La modification des procédés actuels de production, connus et maîtrisés, n'était également pas souhaitée à l'heure actuelle.

## **6. L'intérêt des coproduits valorisables**

Dans leurs travaux, Zhu et al. (2011) avaient démontré l'intérêt d'une combinaison de traitements enzymo-mécaniques pour produire de la nanocellulose et des coproduits d'hydrolyse valorisables au départ de pâte à papier. Cependant, seule une pâte kraft blanchie d'eucalyptus avait été testée, et le seul produit d'hydrolyse investigué avait été le glucose, en vue d'une fermentation en bioéthanol. Bien que le bioéthanol soit souvent considéré comme le principal produit à valoriser au départ d'une source lignocellulosique en bioraffinerie, il n'est pas nécessairement le plus intéressant en termes de compétitivité. En effet, la compétition existante sur le marché de l'éthanol est sévère et mérite qu'une entreprise papetière qui souhaite se diversifier se pose la question de la pertinence et de l'opportunité de s'orienter vers ce produit (Chambost and Stuart, 2007). Dans ce cas, le bois entre alors directement en compétition avec les sources agronomiques de sucres fermentescibles (amidon et saccharose), dont le prix est inférieur à celui de la pâte cellulosique (Cherisey, 2015).

La présente recherche a démontré que le prétraitement enzymatique appliqué amenait également à la libération de glucose, mais surtout aussi à la possibilité, et l'intérêt, de récupérer également d'autres produits tels que le cellobiose ou le xylose. En plus des possibilités de valorisations de ces sucres (développées au Chapitre 5), une précédente étude illustre l'impact positif, en termes économiques, de la production de plusieurs types de coproduits et de l'opportunité de présenter une gamme diversifiée au lieu d'un seul type de produit (Van Heiningen, 2006).

Notre recherche a également permis de démontrer que la méthode optimisée d'hydrolyse multi-étapes développée par Vanderghem et al. (2009) pouvait s'appliquer sur différents types de pâtes celluloses, mais avec des résultats plus contrastés que ceux de l'étude de référence. La possibilité d'optimiser l'étape de prétraitement pour en soutirer un maximum de coproduits valorisables est un élément important, alors qu'il est connu que cette optimisation reste un élément critique à la valorisation des composants lignocellulosiques (Abejón, 2018).

## **7. Perspectives de recherche**

De nombreuses études sont encore actuellement menées sur les possibilités d'utilisation de la nanocellulose. Un des facteurs essentiels au succès de ces nouveaux produits est le coût de production de cette nanocellulose. Si les résultats obtenus au cours de la présente recherche ont démontré la faisabilité technique du procédé à l'échelle laboratoire, des essais à une échelle pilote permettraient de vérifier son applicabilité à plus large échelle mais également une quantification des coûts de production engendrés (consommation en enzymes, en énergie). Si la mise en œuvre d'hydrolyse enzymatique sur de plus grands volumes ne devrait pas poser de problème, la faisabilité d'un traitement d'homogénéisation sur ces mêmes grands

volumes mérite d'être testée. De plus, étant donné la concentration très faible de la solution de pâtes prétraitées injectée dans le microfluidiseur (0,5 % massique), cette étape risque de constituer le goulot d'étranglement du procédé. Certains industriels produisant déjà des microfibrilles de cellulose au moyen d'un défibreux adapté, il serait pertinent de tester ce procédé mécanique sur les pâtes prétraitées enzymatiquement. Les propriétés des micro- ou nanocelluloses obtenues par cette méthode devrait également être mesurées.

Lors de nos essais, les conditions d'hydrolyse ont été relativement légères en termes de charge enzymatique. Pour optimiser cette hydrolyse, le procédé multi-étapes a été testé avec succès. Cependant, ce procédé entraîne de nombreuses manipulations et de longues filtrations. Il conviendrait d'évaluer dans quelle mesure une augmentation de la charge enzymatique dans un procédé mono-étape permettrait d'obtenir des rendements d'hydrolyse approchant ceux du procédé multi-étapes. L'optimum devrait également être établi entre augmentation de la charge enzymatique, coûts engendrés en enzymes et rendement d'hydrolyse.

L'application d'un traitement enzymatique plus sévère devrait se ressentir sur la surface des fibres. La méthode d'analyse par FTCM permettrait d'obtenir de manière simple et rapide de précieuses informations sur les changements de surfaces subies par les fibres par comparaison avec une hydrolyse enzymatique légère. De même, la méthode FTCM devrait être testée sur la nanocellulose produite, afin de vérifier dans quelle mesure les composants présents en surface des fibres après hydrolyse se retrouvent également sur les fibres de nanocellulose produites.

Pour démontrer l'intérêt d'intégrer une production et une utilisation de nanocellulose dans une unité papetière, il conviendrait d'évaluer l'amélioration des propriétés d'un produit papetier dans lequel serait intégré un pourcentage de nanofibres produites au départ de pâte à papier non-blanchie.

Enfin, si un marché de la nanocellulose existe et que le potentiel de croissance est encourageant, la diversification reste le maître-mot. Il conviendrait alors de se pencher également sur la valorisation des autres composants principaux du bois que sont les lignines et les hémicelluloses. Et, dans le même objectif de diversification, une plus grande attention devrait être apportée aux autres de l'industrie papetière, comme les *tail oil*, mais également aux coproduits actuellement les moins bien valorisés de l'industrie papetière, comme les écorces ou les nœuds. Ces coproduits ont déjà démontré via certaines études leur potentiel en tant que source d'extractibles d'intérêts. Une recherche qui porterait sur la faisabilité et l'optimisation d'une valorisation chimique de ce type de coproduits, comme par exemple les écorces obtenues par l'écorçage industriel des rondins en début de procédé papetier, trouverait tout son sens dans le contexte actuel.

## **8. De la papeterie à l'IFBR via la nanocellulose: conclusions**

Bien qu'elle soit activement en recherche de voies de diversification, l'industrie papetière avance encore lentement et avec prudence vers de nouveaux produits, de nouveaux procédés et de nouveaux *business models*. La nanocellulose, bien que prometteuse en terme de marchés et d'applications, reste encore trop peu considérée dans cette recherche de diversification. La valorisation chimique des composants du bois attire également de plus en plus l'attention des industriels. Dans ce cas, l'intégration d'une production de nanocellulose au moyen d'un procédé qui génère également une diversité d'autres produits présente un intérêt et un avantage économique non négligeable. Les résultats obtenus au long de cette recherche ont démontré qu'il était possible de s'engager sur la voie de la diversification sans changer ses méthodes de production mais en utilisant un produit final brut, la pâte cellulosique de bois non-blanchie, comme point de départ à la production de divers autres produits : nanocellulose, sucres valorisables, fibres modifiées. Cette recherche a également démontré qu'une méthode simple et rapide d'analyse de l'effet des traitements testés était désormais applicable aux différents types de pâtes du marché. L'intégration au sein d'unités de production de pâte déjà existantes sera vraisemblablement un indispensable à la compétitivité de ces nouveaux produits. Avant de voir se développer de véritables IFBR, il est néanmoins déjà possible de développer une piste de diversification pour l'industrie papetière, au départ de sa production classique, au moyen de procédés économiquement intéressants, respectueux de l'environnement et qui génèrent des nouveaux produits de plus haute valeur ajoutée.



## Références

- Abejón, R. (2018) 'A Bibliometric Study of Scientific Publications regarding Hemicellulose Valorization during the 2000–2016 Period: Identification of Alternatives and Hot Topics', *ChemEngineering*, 2(1), p. 7. doi: 10.3390/chemengineering2010007.
- Abitbol, T. *et al.* (2016) 'Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications', *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 39(I), pp. 76–88. doi: 10.1016/j.copbio.2016.01.002.
- Agarwal, U. P., Reiner, R. R. and Ralph, S. A. (2011) 'Cellulose Crystallinity of Woods, Wood Pulps, and Agricultural Fibers By Ft-Raman Spectroscopy', in *Proceedings of the 16th ISWFPC*, pp. 69–75.
- Agbor, V. B. *et al.* (2011) 'Biomass pretreatment: Fundamentals toward application', *Biotechnology Advances*, 29(6), pp. 675–685. doi: <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.05.005>.
- Alvira, P. *et al.* (2010) 'Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review', *Bioresour Technol*, 101. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093.
- Amidon, T. E. *et al.* (2008) 'Biorefinery: Conversion of woody biomass to chemicals, energy and materials', *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 2(2), pp. 100–120. doi: 10.1166/jbmb.2008.302.
- Arora, R., Sharma, N. K. and Kumar, S. (2017) *Valorization of By-Products Following the Biorefinery Concept: Commercial Aspects of By-Products of Lignocellulosic Biomass. Commercial Aspects of By-Products of Lignocellulosic Biomass., Advances in Sugarcane Biorefinery: Technologies, Commercialization, Policy Issues and Paradigm Shift for Bioethanol and By-Products*. Edited by A. Chandel and M. H. L. Silveira. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-804534-3.00008-2.
- Badel, E. *et al.* (2015) 'Acclimation of mechanical and hydraulic functions in trees: impact of the thigmomorphogenetic process', *Frontiers in Plant Science*, 6(May). doi: 10.3389/fpls.2015.00266.
- Bajpai, P. (1999) 'Application of enzymes in the pulp and paper industry', *Biotechnology progress*, 15(2), pp. 147–57. doi: 10.1021/bp990013k.
- Bajpai, P. (2013) *Biorefinery in the pulp and paper industry*. 1st editio. Academic Press.
- Bajpai, P. (2015a) 'Enzymes', in Bajpai, P. (ed.) *Pulp and Paper Industry: Chemicals*. Elsevier Inc., pp. 275–293. doi: 10.1201/9781315372914.
- Bajpai, P. (2015b) 'Major Pulp and Paper Chemical/Enzyme Suppliers', in Bajpai, P. (ed.) *Pulp and Paper Industry: Chemicals*. Elsevier Inc., pp. 295–314. doi: 10.1016/b978-0-12-803408-8.00005-6.
- Bajpai, P. (2017) 'The pulp and paper industry', in Bajpai, P. (ed.) *Pulp and Paper Industry: Emerging waste water treatment technologies*. Elsevier Inc., pp. 9–29. doi: 10.1021/ie50305a006.

Balat, M. (2011) 'Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review', *Energy Conversion and Management*. Elsevier Ltd, 52(2), pp. 858–875. doi: 10.1016/j.enconman.2010.08.013.

Barnett, J. R. and Bonham, V. A. (2004) 'Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres', *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 79(2), pp. 461–472. doi: 10.1017/S1464793103006377.

Bary-Lenger, A., Pierson, J. and Poncelet, J. (1999) *Transformation, utilisation et industries du bois en Europe*. Allieur - Liège: Edition du Perron.

Bays, E. (2018) *PanoraBois 2017*.

Beckham, G. T. *et al.* (2016) 'Opportunities and challenges in biological lignin valorization', *Current Opinion in Biotechnology*, 42, pp. 40–53. doi: 10.1016/j.copbio.2016.02.030.

Benali, M. *et al.* (2013) 'Implementation of lignin-based biorefinery into a Canadian softwood kraft pulp mill: Optimal resources integration and economic viability assessment', *Biomass and Bioenergy*, 67, pp. 473–482. doi: 10.1016/j.biombioe.2013.08.022.

Berezin, I. V., Rabinovich, M. L. and Sinitsyn, A. P. (1977) 'Applicability of quantitative kinetic spectrophotometric method for glucose determination', *Biokhimiia (Moscow, Russia)*, 42(9), p. 1631–1636.

Berlin, A. *et al.* (2006) 'A rapid microassay to evaluate enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates', *Biotechnology and Bioengineering*. Wiley Subscription Services, Inc., A Wiley Company, 93(5), pp. 880–886. doi: 10.1002/bit.20783.

Biermann, C. J. (1996) '3 - Pulping Fundamentals', in Biermann, C. J. (ed.) *Handbook of Pulping and Papermaking (Second Edition)*. Second Edi. San Diego: Academic Press, pp. 55–100. doi: <https://doi.org/10.1016/B978-012097362-0/50007-8>.

Bio-basedNews (2019) *UPM's FibDex (c), a wood-based innovation for wound care, receives regulatory approval and CE mark*, *Bio-based News*. Available at: <http://news.bio-based.eu/upms-fibdex-a-wood-based-innovation-for-wound-care-receives-regulatory-approval-and-ce-mark/> (Accessed: 4 June 2019).

Bondeson, D., Kvien, I. and Oksman, K. (2006) 'Strategies for preparation of cellulose whiskers from microcrystalline cellulose as reinforcement in nanocomposites', in Oksman, K. and Sain, M. (eds) *Cellulose Nanocomposites: Processing, characterization and properties*. Washington: American Chemical Society, pp. 10–25.

Börjesson, M. H. and Ahlgren, E. O. (2015) 'Pulp and Paper Industry Intelligence', *IEA ETSAP - Technology Brief*, 107(May), pp. 1–9. doi: 10.1016/B978-0-12-803408-8.00006-8.

Boucher, J., Chirat, C. and Lachenal, D. (2014) 'Extraction of hemicelluloses from wood in a pulp biorefinery, and subsequent fermentation into ethanol', *Energy Conversion and Management*. Elsevier Ltd, 88, pp. 1120–1126. doi: 10.1016/j.enconman.2014.05.104.

Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of



microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), pp. 248–254. doi: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

Brinchi, L. *et al.* (2013) 'Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications', *Carbohydrate Polymers*. Elsevier, 94(1), pp. 154–169. doi: 10.1016/J.CARBPOL.2013.01.033.

Browne, T. *et al.* (2012) 'Forest Biorefinery: Current State of the Art', in Stuart, P. R. and El-Halwagi, M. M. (eds) *Integrated Forest Biorefineries: design, analysis and optimization*. Boca Raton, FL, USA: CRC Press, pp. 491–516.

Budarin, V. L. *et al.* (2011) 'Use of green chemical technologies in an integrated biorefinery', *Energy & Environmental Science*. The Royal Society of Chemistry, 4(2), pp. 471–479. doi: 10.1039/C0EE00184H.

Calabresse, C. *et al.* (1993) 'Butyric acid and its monosaccharide ester induce apoptosis in the HL-60 cell line', *Biochemical and biophysical research communications*, 195(1), pp. 31–38.

de Campos, A. *et al.* (2013) 'Obtaining nanofibers from curauá and sugarcane bagasse fibers using enzymatic hydrolysis followed by sonication', *Cellulose*, 20(3), pp. 1491–1500. doi: 10.1007/s10570-013-9909-3.

Chaker, A. *et al.* (2013) 'Key role of the hemicellulose content and the cell morphology on the nanofibrillation effectiveness of cellulose pulps', *Cellulose*, 20(6), pp. 2863–2875. doi: 10.1007/s10570-013-0036-y.

Chakraborty, A., Mohini, S. and Mark, K. (2005) 'Cellulose microfibrils: A novel method of preparation using high shear refining and cryocrushing', *Holzforschung*, p. 102. doi: 10.1515/HF.2005.016.

Chambost, V., McNutt, J. and Stuart, P. R. (2008) 'Guided tour: Implementing the forest biorefinery (FBR) at existing pulp and paper mills', *Pulp and Paper Canada*, 109(7), pp. 1–9.

Chambost, V. and Stuart, P. R. (2007) 'Selecting the most appropriate products for the forest biorefinery', *Industrial Biotechnology*, 3(2), pp. 112–119. doi: 10.1089/ind.2007.3.112.

Chandra, R. P. *et al.* (2007) 'Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics?', in *Biofuels*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 67–93. doi: 10.1007/10\_2007\_064.

Chaturvedi, V. and Verma, P. (2013) 'An overview of key pretreatment processes employed for bioconversion of lignocellulosic biomass into biofuels and value added products', *3 Biotech*, 3(5), pp. 415–431. doi: 10.1007/s13205-013-0167-8.

Chauve, G. and Bras, J. (2014) 'Industrial Point of View of Nanocellulose Materials and Their Possible Applications', in Oksman, K. *et al.* (eds) *Handbook of Green Materials*. World Scientific, pp. 233–252. doi: 10.1142/9789814566469\_0014.

Cherisey, H. de (2015) *Etat de l'art sur la production de molécules chimiques issues du bois en France: Synthèse*.

Choi, J. W., Choi, D.-H. and Faix, O. (2007) 'Characterization of lignin-

carbohydrate linkages in the residual lignins isolated from chemical pulps of spruce (*Picea abies*) and beech wood (*Fagus sylvatica*)', *Journal of Wood Science*, 53(4), pp. 309–313. doi: 10.1007/s10086-006-0860-x.

Christopher, L. (2013) 'Integrated forest biorefineries: current state and development potential', in Christopher, L. (ed.) *Integrated Forest Biorefineries: challenges and opportunities*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, pp. 1–66.

Chum, H. L. *et al.* (1999) 'Organosolv pretreatment for enzymatic hydrolysis of poplars: isolation and quantitative structural studies of lignins', *Clean Products and Processes*, 1(3), pp. 187–198. doi: 10.1007/s100980050027.

Clark, J. H. *et al.* (2006) 'Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future', *Green Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 8(10), pp. 853–860. doi: 10.1039/B604483M.

Confederation of european paper industries (CEPI) (2017) *Investing in Europe for Industry Transformation - 2050 Roadmap to a low-carbon bioeconomy*.

Cowie, J. *et al.* (2014) 'Market projections of Cellulose nanomaterial-enabled products - Part 2: Volume estimates', *Tappi Journal*, 13(6), pp. 57–69.

Cui, L. *et al.* (2015) 'Effect of commercial cellulases and refining on kraft pulp properties: Correlations between treatment impacts and enzymatic activity components', *Carbohydrate Polymers*, 115, pp. 193–199. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.08.076.

Dahl, G. F. (1884) 'Process of manufacturing cellulose from wood', *US Patent 0,002,969* 35.

Daoud, W. A., Xin, J. H. and Zhang, Y. H. (2005) 'Surface functionalization of cellulose fibers with titanium dioxide nanoparticles and their combined bactericidal activities', *Surface Science*, 599(1–3), pp. 69–75. doi: 10.1016/j.susc.2005.09.038.

Deepa, B. *et al.* (2015) 'Utilization of various lignocellulosic biomass for the production of nanocellulose: a comparative study', *Cellulose*, 22(2), pp. 1075–1090. doi: 10.1007/s10570-015-0554-x.

Demirbas, A. (2001) 'Relationships between lignin contents and heating values of biomass', *Energy Conversion and Management*, 42(2), pp. 183–188. doi: 10.1016/S0196-8904(00)00050-9.

Demirbas, A. (2017) 'Higher heating values of lignin types from wood and non-wood lignocellulosic biomasses', *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects*. Taylor & Francis, 39(6), pp. 592–598. doi: 10.1080/15567036.2016.1248798.

Donaldson, L. (2008) 'Microfibril angle: Measurement, variation and relationships - A review', *IAWA Journal*, 29(4), pp. 345–386. doi: 10.1163/22941932-90000192.

Donaldson, L. and Singh, A. (2013) 'Formation and structure of compression wood', in Fromm, J. (ed.) *Cellular aspects of wood formation*. Berlin: Springer-Verlag, pp. 225–256.

Dufresne, A. (2006) 'Comparing the Mechanical Properties of High Performances Polymer Nanocomposites from Biological Sources', *Journal of Nanoscience and*

*Nanotechnology*, 6(2), pp. 322–330. doi: 10.1166/jnn.2006.906.

Dufresne, A. (2012) *Nanocellulose: From nature to high performance tailored materials*. Berlin: de Gruyter.

Dufresne, A. (2013) ‘Nanocellulose: a new ageless bionanomaterial’, *Materials Today*. Elsevier, 16(6), pp. 220–227. doi: 10.1016/J.MATTOD.2013.06.004.

Duran, N. *et al.* (2011) ‘A minireview of cellulose nanocrystals and its potential integration as co-product in bioethanol production’, *Journal of the Chilean Chemical Society*. scielocl, 56, pp. 672–677.

Eisentraut, A. (2010) *Sustainable Production of Second-Generation Biofuels: Potential and perspectives in major economies and developing countries*, International Energy Agency. doi: 10.1787/20792581.

Ek, M., Gellerstedt, G. and Henriksson, G. (2009) *Wood Chemistry and Biotechnology*. Walter de Gruyter (Pulp and Paper Chemistry and Technology).

Espro, C. *et al.* (2017) ‘Upgrading Lignocellulosic Biomasses: Hydrogenolysis of Platform Derived Molecules Promoted by Heterogeneous Pd-Fe Catalysts’, *Catalysts*, 7(12), p. 78. doi: 10.3390/catal7030078.

FAO (2013) *Pulp and paper capacities, survey 2012-2017*. Roma.

FAO (2018) *Pulp and paper capacities 2017-2022*.

Fargione, J. *et al.* (2008) ‘Land Clearing and the Biofuel Carbon Debt’, *Science*, 319(6174), pp. 1017–1021. doi: 10.1126/science.1245938.

Fengel, D. and Wegener, G. (1984) *Wood: Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. Berlin: de Gruyter.

Fengel, D. and Wegener, G. (1989) *Wood*. Berlin: Walter de Gruyter GmbH.

FitzPatrick, M. *et al.* (2010) ‘A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products’, *Bioresource Technology*, 101(23), pp. 8915–8922. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.125>.

Food and Agriculture Organization - FAO (2018) *Forest Products 2016 yearbook*. Available at: <http://www.fao.org/3/I9987M/i9987m.pdf>.

Franklin, K. *et al.* (2001) ‘Cosmetics compositions’. US Patent.

FutureMarkets (2015) *The global market for nanocellulose to 2024*. Available at: <http://www.futuremarketsinc.com/the-global-market-for-nanocellulose-to-2024/> (Accessed: 24 November 2015).

Gavrilescu, D. (2008) ‘Energy from biomass in pulp and paper mills’, *Environmental Engineering and Management Journal*, 7(5), pp. 537–546.

Gehmayr, V., Schild, G. and Sixta, H. (2011) ‘A precise study on the feasibility of enzyme treatments of a kraft pulp for viscose application’, *Cellulose*, 18(2), pp. 479–491. doi: 10.1007/s10570-010-9483-x.

Gellerstedt, G. (2001) ‘Pulping chemistry’, in Hon, D. and Shiraishi, N. (eds) *Wood and Cellulosic Chemistry*. second edi. CRC Press, pp. 859–905.

Goldsworthy, G., Chandrakant, S. and Opuku-Ware, K. (2003) ‘Adipokinetic hormone enhances nodule formation and phenoloxidase activation in adult locusts

injected with bacterial lipopolysaccharide', *Journal of Insect Physiology*, 49, pp. 795–803. doi: 10.1016/S0022-1910(03)00118-5.

Gonzalez, R. *et al.* (2011) 'Economics of cellulosic ethanol production: Green liquor pretreatment for softwood and hardwood, greenfield and repurpose scenarios', *BioResources*, 6(3), pp. 2551–2567.

Gourlay, K. *et al.* (2015) 'The use of carbohydrate binding modules (CBMs) to monitor changes in fragmentation and cellulose fiber surface morphology during cellulase- And swollenin-induced deconstruction of lignocellulosic substrates', *Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 2938–2945. doi: 10.1074/jbc.M114.627604.

Griffiths, S. (2015) *New low-cost process to make nanocellulose*, *The journal of the Institute of Food Science and Technology*. Available at: <https://fstjournal.org/news/new-low-cost-process-make-nanocellulose/670> (Accessed: 24 November 2015).

Gupta, V. K. *et al.* (2014) 'Bioenergy research: an overview on technological developments and bioresources', in Gupta, V. *et al.* (eds) *Bioenergy Research: Advances and Applications*. Amsterdam: Elsevier Ltd, pp. 23–47.

Habibi, Y., Lucia, L. A. and Rojas, O. J. (2010) 'Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications', *Chemical Reviews*, 110(6), pp. 3479–3500. doi: 10.1021/cr900339w.

Hall, M. *et al.* (2010) 'Cellulose crystallinity - A key predictor of the enzymatic hydrolysis rate', *FEBS Journal*, 277(6), pp. 1571–1582. doi: 10.1111/j.1742-4658.2010.07585.x.

Hebert-Ouellet, Y. *et al.* (2017) 'Tracking and predicting wood fibers processing with fluorescent carbohydrate binding modules', *Green Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, (19), pp. 2603–2611. doi: 10.1039/C6GC03581G.

Van Heiningen, A. (2006) 'Converting a kraft pulp mill into an Integrated Forest BioRefinery ( IFBR )', *Pulp Paper Canada*, 107(6), pp. 38–43.

Hendriks, A. T. W. M. and Zeeman, G. (2009) 'Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass', *Bioresource Technology*, 100(1), pp. 10–18. doi: 10.1016/j.biortech.2008.05.027.

Henriksson, M. *et al.* (2007) 'An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers', *European Polymer Journal*, 43(8), pp. 3434–3441. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2007.05.038.

Herrick, F. W. *et al.* (1983) 'Microfibrillated cellulose: morphology and accessibility', in United States. Available at: <https://www.osti.gov/servlets/purl/5039044>.

Hetemäki, L. and Hurmekoski, E. (2016) 'Forest Products Markets under Change: Review and Research Implications', *Current Forestry Reports*. Current Forestry Reports, 2(3), pp. 177–188. doi: 10.1007/s40725-016-0042-z.

Himmel, M. E. *et al.* (2007) 'Biomass Recalcitrance: Engineering Plants and Enzymes for Biofuels Production', *Science*, 315(5813), pp. 804 LP – 807.

Ho, D. P., Ngo, H. H. and Guo, W. (2014) 'A mini review on renewable sources

for biofuel', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 169, pp. 742–749. doi: 10.1016/j.biortech.2014.07.022.

Holtzapple, M. *et al.* (1990) 'Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents', *Biotechnology and Bioengineering*, 36(3), pp. 275–287. doi: 10.1002/bit.260360310.

Hsieh, C. C. *et al.* (2014) 'Cellulase Inhibition by High Concentrations of Monosaccharides', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, pp. 3800–3805. doi: 10.1021/jf5012962.

Hu, J., Arantes, V. and Saddler, J. N. (2011) 'The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect?', *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), p. 36. doi: 10.1186/1754-6834-4-36.

Huang, H.-J. *et al.* (2008) 'A review of separation technologies in current and future biorefineries', *Separation and Purification Technology*, 62(1), pp. 1–21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.011>.

Huang, H. J. *et al.* (2010) 'Process modeling and analysis of pulp mill-based integrated biorefinery with hemicellulose pre-extraction for ethanol production: A comparative study', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101(2), pp. 624–631. doi: 10.1016/j.biortech.2009.07.092.

Hurmekoski, E. *et al.* (2018) 'Diversification of the forest industries: role of new wood-based products', *Canadian Journal of Forest Research*, 48(12), pp. 1417–1432. doi: 10.1139/cjfr-2018-0116.

Hytönen, E. S. (2009) 'Integrating Bioethanol Production into an Integrated Kraft Pulp and Paper Mill: Techno-Economic Assessment', *Pulp & Paper Canada*, (June), pp. 25–32.

Ivessalo-Pfäffli, M.-S. (1995) *Fiber Atlas : Identification of Papermaking Fibers*. Springer Berlin Heidelberg.

Ioelovich, M. and Leykin, A. (2006) 'Microcrystalline cellulose: nano-structure formation', *Cellulose chemistry and technology*, 40(5), pp. 313–317.

Isikgor, F. H. and Becer, C. R. (2015) 'Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers', *Polymer Chemistry*. Royal Society of Chemistry, 6(25), pp. 4497–4559. doi: 10.1039/c5py00263j.

Isogai, A. (2013) 'Wood nanocelluloses: fundamentals and applications as new bio-based nanomaterials', *Journal of Wood Science*, 59(6), pp. 449–459. doi: 10.1007/s10086-013-1365-z.

Iwamoto, S., Nakagaito, A. N. and Yano, H. (2007) 'Nano-fibrillation of pulp fibers for the processing of transparent nanocomposites', *Applied Physics A*, 89(2), pp. 461–466. doi: 10.1007/s00339-007-4175-6.

Jacquet, N. *et al.* (2012) 'Influence of steam explosion on physicochemical properties and hydrolysis rate of pure cellulose fibers', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 121, pp. 221–227. doi: 10.1016/j.biortech.2012.06.073.

Jiang, L. *et al.* (2011) 'Development of Biodegradable Polymer Composites', in

Zhu, J., Zhang, X., and Pan, X. (eds) *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass*. American Chemistry Society, pp. 367–391.

Johansson, A., Aaltonen, O. and Ylinen, P. (1987) ‘Organosolv pulping - methods and pulp properties’, *Biomass*, 13(1), pp. 45–65. doi: 10.1016/0144-4565(87)90071-0.

John, M. J. and Thomas, S. (2008) ‘Biofibres and biocomposites’, *Carbohydrate Polymers*, 71(3), pp. 343–364. doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.05.040>.

Jonoobi, M. *et al.* (2015) ‘Different preparation methods and properties of nanostructured cellulose from various natural resources and residues: a review’, *Cellulose*, 22(2), pp. 935–969. doi: 10.1007/s10570-015-0551-0.

Jorfi, M. and Foster, E. J. (2015) ‘Recent advances in nanocellulose for biomedical applications’, *Journal of Applied Polymer Science*, 132(14), p. 41719. doi: 10.1002/app.41719.

Jorgensen, H., Kristensen, J. B. and Felby, C. (2007) ‘Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities’, *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 1(2), pp. 119–134. doi: 10.1002/bbb.

Kamide, K. (2005) *Cellulose and cellulose derivatives: Molecular characterization and its applications*. Amsterdam: Elsevier.

Karim, Z. *et al.* (2017) ‘Necessity of enzymatic hydrolysis for production and functionalization of nanocelluloses’, *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(3), pp. 355–370. doi: 10.3109/07388551.2016.1163322.

Kebbi-Benkeder, Z. *et al.* (2016) ‘Les noeuds : un bois méconnu et une source importante de composés extractibles’, *Revue Forestière Française*, (1), pp. 7–26. doi: 10.4267/2042/61591.

Khatri, V. *et al.* (2016) ‘Specific tracking of xylan using fluorescent-tagged carbohydrate-binding module 15 as molecular probe’, *Biotechnology for Biofuels*. BioMed Central, 9(1), p. 74. doi: 10.1186/s13068-016-0486-1.

Khatri, V., Meddeb-Mouelhi, F. and Beauregard, M. (2018) ‘New insights into the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic polymers by using fluorescent tagged carbohydrate-binding modules’, *Sustainable Energy and Fuels*, 2(2), pp. 479–491. doi: 10.1039/c7se00427c.

Kim, M. and Day, D. F. (2010) ‘Use of cellulase inhibitors to produce cellobiose’, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(5), pp. 1379–1390. doi: 10.1007/s12010-010-8915-2.

Klein-Marcuschamer, D. *et al.* (2012) ‘The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels.’, *Biotechnology and bioengineering*, 109(4), pp. 1083–7. doi: 10.1002/bit.24370.

Klemm, D. *et al.* (2011) ‘Nanocelluloses: A New Family of Nature-Based Materials’, *Angewandte Chemie International Edition*, 50(24), pp. 5438–5466. doi: 10.1002/anie.201001273.

Klemm, D. *et al.* (2018) ‘Nanocellulose as a natural source for groundbreaking applications in materials science: Today’s state’, *Materials Today*. Elsevier Ltd, 21(7), pp. 720–748. doi: 10.1016/j.mattod.2018.02.001.

Kontturi, E. and Vuorinen, T. (2009) 'Indirect evidence of supramolecular changes within cellulose microfibrils of chemical pulp fibers upon drying', *Cellulose*, 16(1), pp. 65–74. doi: 10.1007/s10570-008-9235-3.

Kumar, P. *et al.* (2009) 'Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production', *Ind Eng Chem Res*, 48, pp. 3713 – 3729. doi: 10.1021/ie801542g.

Larsson, S. *et al.* (1999) 'The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood', *Enzyme and Microbial Technology*, 24(3), pp. 151–159. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229\(98\)00101-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0141-0229(98)00101-X).

Lawoko, M. *et al.* (2004) 'Changes in the lignin-carbohydrate complex in softwood kraft pulp during kraft and oxygen delignification', *Holzforschung*, p. 603. doi: 10.1515/HF.2004.114.

Lawoko, M., Henriksson, G. and Gellerstedt, G. (2003) 'New Method for Quantitative Preparation of Lignin- Carbohydrate Complex from Unbleached Softwood Kraft Pulp: Lignin-Polysaccharide Networks I', *Holzforschung*, p. 69. doi: 10.1515/HF.2003.011.

Lawoko, M., Henriksson, G. and Gellerstedt, G. (2005) 'Structural differences between the lignin-carbohydrate complexes present in wood and in chemical pulps', *Biomacromolecules*, 6(6), pp. 3467–3473. doi: 10.1021/bm058014q.

Lee, R. A. and Lavoie, J.-M. (2013) 'From first- to third-generation biofuels: Challenges of producing a commodity from a biomass of increasing complexity', *Animal Frontiers*, 3(2), pp. 6–11. doi: 10.2527/af.2013-0010.

Lengowski, E. C. *et al.* (2019) 'Nanocellulose in the Paper Making', in Inamuddin, T., Kumar Mishra, R., and Asiri, A. (eds) *Sustainable Polymer Composites and Nanocomposites*. Springer, pp. 1027–1066. doi: 10.1007/978-3-030-05399-4\_36.

Lennartsson, P. R., Erlandsson, P. and Taherzadeh, M. J. (2014) 'Integration of the first and second generation bioethanol processes and the importance of by-products', *Bioresource Technology*, 165, pp. 3–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.127>.

Limayem, A. and Ricke, S. C. (2012) 'Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects', *Progress in Energy and Combustion Science*, 38(4), pp. 449–467. doi: <http://doi.org/10.1016/j.pecs.2012.03.002>.

Lin, N. and Dufresne, A. (2014) 'Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect', *European Polymer Journal*. Elsevier Ltd, 59, pp. 302–325. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2014.07.025.

Lindström, T. and Aulin, C. (2014) 'Market and technical challenges and opportunities in the area of innovative new materials and composites based on nanocellulosics', *Scandinavian Journal of Forest Research*. Taylor & Francis, 29(4), pp. 345–351. doi: 10.1080/02827581.2014.928365.

Liu, H. *et al.* (2009) 'Visualization of enzymatic hydrolysis of cellulose using AFM phase imaging', *Enzyme and Microbial Technology*. Elsevier, 45(4), pp. 274–

281. doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2009.06.009.

Liu, S. *et al.* (2006) 'From forest biomass to chemicals and energy', *Industrial Biotechnology*, 2(2), pp. 113–120. doi: 10.1089/ind.2006.2.113.

Lynd, L. R. (1996) 'Overview and Evaluation of Fuel Ethanol from Cellulosic Biomass: Technology, Economics, the Environment, and Policy', *Annual Review of Energy and the Environment*, 21, pp. 403–465. doi: 10.1146/annurev.energy.21.1.403.

Lynd, L. R. *et al.* (2002) 'Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology', *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), pp. 506–577. doi: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002.

Machani, M., Nourelfath, M. and D'Amours, S. (2014) 'A mathematically-based framework for evaluating the technical and economic potential of integrating bioenergy production within pulp and paper mills', *Biomass and Bioenergy*. Pergamon, 63, pp. 126–139. doi: 10.1016/J.BIOMBIOE.2014.02.024.

Mansfield, S. D., Mooney, C. and Saddler, J. N. (1999) 'Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis', *Biotechnology Progress*, 15(5), pp. 804–816. doi: 10.1021/bp9900864.

Mao, H. *et al.* (2010) 'Kraft mill biorefinery to produce acetic acid and ethanol: Technical economic analysis', *BioResources*, 5(2), pp. 525–544.

McDonough, T. J. (1992) 'The chemistry of organosolv delignification', *IPST Technical paper series*, 455, pp. 1–17.

Merino, S. T. and Cherry, J. (2007) 'Progress and challenges in enzyme development for Biomass utilization', *Biofuels*, 108. doi: 10.1007/10\_2007\_066.

Miller, G. L. (1959) 'Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar', *Analytical Chemistry*. American Chemical Society, 31(3), pp. 426–428. doi: 10.1021/ac60147a030.

Miller, J. (2014) 'Nanocellulose: Technology, Applications and Markets.', in *TAPPI International Conference on Nanotechnology for Renewable Materials*. Available at: <http://www.risiinfo.com/product/nanocellulose-technology-applications-markets/>.

Mishra, S. P. *et al.* (2012) 'Production of nanocellulose from native cellulose - various options utilizing ultrasound', *Bioresources*, 7(1), pp. 422–436.

Mittal, A. *et al.* (2011) 'Effects of alkaline or liquid-ammonia treatment on crystalline cellulose: changes in crystalline structure and effects on enzymatic digestibility', *Biotechnology for Biofuels*, 4(1), p. 41. doi: 10.1186/1754-6834-4-41.

Mohanty, A. K., Misra, M. and Drzal, L. T. (2002) 'Sustainable Bio-Composites from Renewable Resources: Opportunities and Challenges in the Green Materials World', *Journal of Polymers and the Environment*, 10(1), pp. 19–26. doi: 10.1023/A:1021013921916.

Mohanty, A. K., Misra, M. and Hinrichsen, G. (2000) 'Biofibres, biodegradable polymers and biocomposites: An overview', *Macromolecular Materials and Engineering*. WILEY-VCH Verlag GmbH, 276–277(1), pp. 1–24. doi: 10.1002/(SICI)1439-2054(20000301)276:1<1::AID-MAME1>3.0.CO;2-W.



Mohr, A. and Raman, S. (2013) 'Lessons from first generation biofuels and implications for the sustainability appraisal of second generation biofuels', *Energy Policy*, Elsevier, 63, pp. 114–122. doi: 10.1016/j.enpol.2013.08.033.

Mongkhonsiri, G. *et al.* (2018) 'Integration of the biorefinery concept for the development of sustainable processes for pulp and paper industry', in Eden, M., Ierapetritou, M., and Towler, G. (eds) *13th International Symposium on Process System Engineering*. Elsevier Masson SAS, pp. 1136–1140. doi: 10.1016/j.compchemeng.2018.07.019.

Moon, R. J. *et al.* (2011) 'Cellulose nanomaterials review: structure, properties and nanocomposites', *Chem. Soc. Rev.* The Royal Society of Chemistry, 40(7), pp. 3941–3994. doi: 10.1039/C0CS00108B.

Mooney, C. A. *et al.* (1998) 'The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods', *Bioresource Technology*, 64(2), pp. 113–119. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(97\)00181-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(97)00181-8).

Mooney, C. A. *et al.* (1999) 'The effect of fiber characteristics on hydrolysis and cellulase accessibility to softwood substrates', *Enzyme and Microbial Technology*, 25(8), pp. 644–650. doi: 10.1016/S0141-0229(99)00098-8.

Morán, J. I. *et al.* (2008) 'Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers', *Cellulose*, 15(1), pp. 149–159. doi: 10.1007/s10570-007-9145-9.

Moshkelani, M. *et al.* (2013) 'The forest biorefinery and its implementation in the pulp and paper industry: Energy overview', *Applied Thermal Engineering*. Pergamon, 50(2), pp. 1427–1436. doi: 10.1016/J.APPLTHERMALENG.2011.12.038.

Naik, S. N. *et al.* (2010) 'Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review', *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(2), pp. 578–597. doi: 10.1016/j.rser.2009.10.003.

Nakagaito, A. N. and Yano, H. (2004) 'The effect of morphological changes from pulp fiber towards nano-scale fibrillated cellulose on the mechanical properties of high-strength plant fiber based composites', *Applied Physics A*, 78(4), pp. 547–552. doi: 10.1007/s00339-003-2453-5.

Nakamura, S., Oku, T. and Ichinose, M. (2004) 'Bioavailability of cellobiose by tolerance test and breath hydrogen excretion in humans', *Nutrition*, 20(11–12), pp. 979–983. doi: 10.1016/j.nut.2004.08.005.

Näyhä, A. and Pesonen, H. L. (2012) 'Diffusion of forest biorefineries in Scandinavia and North America', *Technological Forecasting and Social Change*. Elsevier Inc., 79(6), pp. 1111–1120. doi: 10.1016/j.techfore.2012.01.006.

Nelson, K. *et al.* (2016) 'American Process: Production of low cost nanocellulose for renewable, advanced materials applications', in Madsen, L. and Svedberg, E. (eds) *Materials Research for Manufacturing*. Springer International Publishing Switzerland, pp. 267–302. doi: 10.1007/978-3-319-23419-9.

Nelson, K. and Retsina, T. (2014) 'Innovative nanocellulose process breaks the cost barrier', 13(5), pp. 19–23.

Nigam, P. S. and Singh, A. (2011) 'Production of liquid biofuels from renewable

resources', *Progress in Energy and Combustion Science*. Elsevier Ltd, 37(1), pp. 52–68. doi: 10.1016/j.pecs.2010.01.003.

NREL (2019) *National Renewable Energy Laboratory*. Available at: <https://www.nrel.gov/bioenergy/ibrf.html> (Accessed: 3 March 2019).

Öhgren, K. *et al.* (2007) 'Effect of hemicellulose and lignin removal on enzymatic hydrolysis of steam pretreated corn stover', *Bioresource Technology*, 98(13), pp. 2503–2510. doi: 10.1016/j.biortech.2006.09.003.

Oksanen, T. *et al.* (1997) 'The effect of *Trichoderma reesei* cellulases and hemicellulases on the paper technical properties of never-dried bleached kraft pulp', *Cellulose*, 4(4), pp. 329–339. doi: 10.1023/A:1018456411031.

Orts, W. J. *et al.* (2005) 'Application of Cellulose Microfibrils in Polymer Nanocomposites', *Journal of Polymers and the Environment*, 13(4), pp. 301–306. doi: 10.1007/s10924-005-5514-3.

Pääkkö, M. *et al.* (2007) 'Enzymatic Hydrolysis Combined with Mechanical Shearing and High-Pressure Homogenization for Nanoscale Cellulose Fibrils and Strong Gels', *Biomacromolecules*. American Chemical Society, 8(6), pp. 1934–1941. doi: 10.1021/bm061215p.

Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000) 'Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition', *Bioresource Technology*, 74(1), pp. 25–33. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(99\)00161-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(99)00161-3).

Penttilä, P. A. *et al.* (2013) 'Xylan as limiting factor in enzymatic hydrolysis of nanocellulose', *Bioresource Technology*, 129, pp. 135–141. doi: 10.1016/j.biortech.2012.11.017.

Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M. E. and Mielenz, J. R. (2006) 'Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies', *Biotechnology Advances*, 24(5), pp. 452–481. doi: 10.1016/j.biotechadv.2006.03.003.

Petit-Conil, M. (1999) 'Procédés papetiers - Fabrication des pâtes', *Techniques de l'Ingénieur, les Sélections*, j6900.

Pu, Y., Ziemer, C. and Ragauskas, A. J. (2006) 'CP/MAS 13C NMR analysis of cellulase treated bleached softwood kraft pulp', *Carbohydrate Research*, 341(5), pp. 591–597. doi: 10.1016/j.carres.2005.12.012.

Pulidindi, K. and Pandey, H. (2018) *Nanocellulose market size by product, by application: industry analysis report, regional outlook, growth potential, price trends, competitive market share & forecast, 2017-2024*.

Qing, Q., Yang, B. and Wyman, C. E. (2010) 'Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes', *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 101(24), pp. 9624–9630. doi: 10.1016/j.biortech.2010.06.137.

Qing, Y. *et al.* (2013) 'A comparative study of cellulose nanofibrils disintegrated via multiple processing approaches', *Carbohydrate Polymers*, 97(1), pp. 226–234. doi: <http://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.04.086>.

Rabinovich, M. L., Melnick, M. S. and Bolobova, A. V (2002) 'The Structure and Mechanism of Action of Cellulolytic Enzymes', *Biochemistry (Moscow)*, 67(8), pp. 850–871. doi: 10.1023/A:1019958419032.

- Rafione, T. *et al.* (2014) 'The Green Integrated Forest Biorefinery: An innovative concept for the pulp and paper mills', *Applied Thermal Engineering*, 73(1), pp. 72–79. doi: 10.1016/j.applthermaleng.2014.07.039.
- Ragauskas, A. J., Nagy, M., *et al.* (2006) 'From wood to fuels: Integrating biofuels and pulp production', *Industrial Biotechnology*. Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2(1), pp. 55–65. doi: 10.1089/ind.2006.2.55.
- Ragauskas, A. J., Williams, C. K., *et al.* (2006) 'The Path Forward for Biofuels and Biomaterials', *Science*, 311(5760), pp. 484 LP – 489.
- Ragauskas, A. J. *et al.* (2014) 'Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery', *Science*, 344(6185), pp. 709–719. doi: 10.1126/science.1246843.
- Rahikainen, J. *et al.* (2011) 'Inhibition of enzymatic hydrolysis by residual lignins from softwood-study of enzyme binding and inactivation on lignin-rich surface', *Biotechnology and Bioengineering*, 108(12), pp. 2823–2834. doi: 10.1002/bit.23242.
- Riggs, M. *et al.* (1977) 'n-Butyrate causes histone modification in HeLa and friend erythroleukemia cells', *Nature*, 268, pp. 462–463.
- Runge, C. F. and Senauer, B. (2007) 'How Biofuels Could Starve the Poor', *Foreign Affairs*. Council on Foreign Relations, 86(3), pp. 41–53.
- Sabo, R. and Zhu, J. (2013) 'Integrated Production of Cellulose Nanofibrils and Cellulosic Biofuels by Enzymatic Hydrolysis of Wood Fibers', in Postek, M. *et al.* (eds) *Production and Applications of Cellulose Nanomaterials*. TAPPI Press, pp. 191–194.
- Saddler, J. N. and Penner, M. H. (1995) *Enzymatic degradation of insoluble carbohydrates*. Edited by A. C. Society. Washington.
- Saka, S. (2001) 'Chemical composition and distribution', in Hon, D. and Shiraishi, N. (eds) *Wood and Cellulosic Chemistry*. second edi. New York: Marcel Dekker, pp. 51–81.
- Sanz, M. L., Gibson, G. R. and Rastall, R. A. (2005) 'Influence of disaccharide structure on prebiotic selectivity in vitro', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(13), pp. 5192–5199. doi: 10.1021/jf050276w.
- SAPPI (2018) *Sappi Research and development initiatives*. Available at: <https://www.sappi.com/fr/research-and-development> (Accessed: 4 March 2019).
- Scheffer, T. C. and Morrell, J. J. (1998) 'Natural durability of wood: a worldwide checklist of species', *Research Contribution*, 22(November), p. 58.
- Scheffran, J. (2010) 'The Global Demand for Biofuels: Technologies, Markets and Policies', in Vertès, A. *et al.* (eds) *Biomass to Biofuels: Strategies for Global Industries*. Wiley and Sons, pp. 27–54. doi: 10.1002/9780470750025.ch2.
- Segal, L. *et al.* (1959) 'An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer', *Textile Research Journal*. SAGE Publications, 29(10), pp. 786–794. doi: 10.1177/004051755902901003.
- Shatkin, J. A. *et al.* (2014) 'Market projections of cellulose nanomaterial-enabled products – Part 1: applications', *TAPPI Journal*, 13(5), pp. 9–16.
- Sheldon, R. A. (2014) 'Green and sustainable manufacture of chemicals from

biomass: state of the art', *Green Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 16(3), pp. 950–963. doi: 10.1039/C3GC41935E.

Shen, L., Worrell, E. and Patel, M. K. (2010) 'Environmental impact assessment of man-made cellulose fibres', *Resources, Conservation and Recycling*. Elsevier B.V., 55(2), pp. 260–274. doi: 10.1016/j.resconrec.2010.10.001.

Sims, R. E. H. *et al.* (2010) 'An overview of second generation biofuel technologies', *Bioresource Technology*, 101(6), pp. 1570–1580. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.11.046>.

Siqueira, G. *et al.* (2010) 'Morphological investigation of nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers', *Cellulose*, 17(6), pp. 1147–1158. doi: 10.1007/s10570-010-9449-z.

Siqueira, G. *et al.* (2011) 'Mechanical properties of natural rubber nanocomposites reinforced with cellulosic nanoparticles obtained from combined mechanical shearing, and enzymatic and acid hydrolysis of sisal fibers', *Cellulose*, 18(1), pp. 57–65. doi: 10.1007/s10570-010-9463-1.

Siró, I. and Plackett, D. (2010) 'Microfibrillated cellulose and new nanocomposite materials: a review', *Cellulose*, 17(3), pp. 459–494. doi: 10.1007/s10570-010-9405-y.

Sixta, H. (2006) 'Fiber Properties', in Sixta, H. (ed.) *Handbook of Pulp*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 1269–1280. doi: 10.1002/9783527619887.ch31.

Sluiter, A. *et al.* (2008) 'Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass', *Laboratory Analytical Procedure (LAP)*.

Spence, K. L. *et al.* (2011) 'A comparative study of energy consumption and physical properties of microfibrillated cellulose produced by different processing methods', *Cellulose*, 18(4), pp. 1097–1111. doi: 10.1007/s10570-011-9533-z.

Stenstad, P. *et al.* (2008) 'Chemical surface modifications of microfibrillated cellulose', *Cellulose*, 15(1), pp. 35–45. doi: 10.1007/s10570-007-9143-y.

Stern, T. *et al.* (2015) 'Biorefineries' impacts on the Austrian forest sector: A system dynamics approach', *Technological Forecasting and Social Change*. Elsevier Inc., 91, pp. 311–326. doi: 10.1016/j.techfore.2014.04.001.

Stevanovic, T. and Perrin, D. (2009) *Chimie du bois*. Lausanne: PPUR.

Studer, M. H. *et al.* (2011) 'Lignin content in natural Populus variants affects sugar release', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(15), pp. 6300–6305. doi: 10.1073/pnas.1009252108.

Sun, Y. and Cheng, J. (2002) 'Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review', *Bioresource technology*, 83(1), pp. 1–11. doi: 10.1016/S0960-8524(01)00212-7.

Suurnäkki, A. *et al.* (2000) 'Trichoderma reesei cellulases and their core domains in the hydrolysis and modification of chemical pulp', *Cellulose*, 7(2), pp. 189–209. doi: 10.1023/A:1009280109519.

Taniguchi, T. and Okamura, K. (1998) 'New films produced from microfibrillated natural fibres', *Polymer International*. John Wiley & Sons, Ltd, 47(3), pp. 291–294.

doi: 10.1002/(SICI)1097-0126(199811)47:3<291::AID-PI11>3.0.CO;2-1.

Taylor, A., Gartner, B. and Morrell, J. J. (2002) 'Heartwood formation and natural durability - a review', *Wood and Fiber Science*, 34(4), pp. 587–611.

Thomas, R. J. (1977) 'Wood: structure and chemical composition', *ACS Symposium Series*, 43, pp. 1–23.

Thornton, J. *et al.* (1994) 'Polysaccharides Dissolved from Norway Spruce in Thermomechanical Pulping and Peroxide Bleaching', *Journal of Wood Chemistry and Technology*. Taylor & Francis, 14(2), pp. 159–175. doi: 10.1080/02773819408003092.

Timell, T. E. (1967) 'Recent progress in the chemistry of wood hemicelluloses', *Wood Science and Technology*, 1(1), pp. 45–70. doi: 10.1007/BF00592255.

Timell, T. E. (1982) 'Recent progress in the chemistry and topochemistry of compression wood', *Wood Science and Technology*, 16, pp. 83–122.

Toppinen, A. *et al.* (2017) 'The European pulp and paper industry in transition to a bio-economy: A Delphi study', *Futures*. Elsevier Ltd, 88, pp. 1–14. doi: 10.1016/j.futures.2017.02.002.

Torres, C. E. *et al.* (2012) 'Enzymatic approaches in paper industry for pulp refining and biofilm control', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 96(2), pp. 327–344. doi: 10.1007/s00253-012-4345-0.

Trache, D. *et al.* (2017) 'Recent progress in cellulose nanocrystals: Sources and production', *Nanoscale*, 9(5), pp. 1763–1786. doi: 10.1039/c6nr09494e.

Trouy, M.-C. (2015) *Anatomie du bois: Formation, fonctions et identification*. Versailles: Quae (Synthèses). Available at: <https://books.google.be/books?id=dovHCgAAQBAJ>.

Turbak, A. F., Snyder, F. W. and Sandberg, K. R. (1983) 'Microfibrillated cellulose, a new cellulose product: properties, uses, and commercial potential', in United States. Available at: <https://www.osti.gov/servlets/purl/5062478>.

US DOE (2007) *Biofuels primer placemat: from biomass to cellulosic ethanol and understanding biomass: plant cell walls*. Available at: <https://public.ornl.gov/site/gallery/detail.cfm?id=248&topic=&citation=&general=&restsection=public&webid=> (Accessed: 23 February 2019).

Vanderghem, C. *et al.* (2009) 'A Multistage Process to Enhance Cellobiose Production from Cellulosic Materials', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160(8), pp. 2300–2307. doi: 10.1007/s12010-009-8724-7.

Vanderghem, C. *et al.* (2012) 'Effect of Physicochemical Characteristics of Cellulosic Substrates on Enzymatic Hydrolysis by Means of a Multi-Stage Process for Cellobiose Production', *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(6), pp. 1423–1432. doi: 10.1007/s12010-011-9535-1.

Várnai, A. *et al.* (2011) 'Synergistic action of xylanase and mannanase improves the total hydrolysis of softwood', *Bioresource Technology*, 102(19), pp. 9096–9104. doi: 10.1016/j.biortech.2011.06.059.

Wegner, T. H., Ireland, S. and Jones, J. P. E. (2013) 'Cellulosic Nanomaterials: Sustainable Materials of Choice for the 21st Century', in Postek, M. *et al.* (eds)

*Production and Applications of Cellulose Nanomaterials*. TAPPI Press, pp. 3–8.

Xiao, Z. *et al.* (2004) ‘Effects of sugar inhibition on cellulases and  $\beta$ -glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates’, *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 115(1–3), pp. 1115–1126. doi: 10.1385/ABAB:115:1-3:1115.

Xu, Y. and Rowell, R. (2011) ‘Biofibers’, in Zhu, J., Zhang, X., and Pan, X. (eds) *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass*. American Chemistry Society, pp. 323–366.

Yamada, R. *et al.* (2015) ‘Effective saccharification of kraft pulp by using a cellulase cocktail prepared from genetically engineered *Aspergillus oryzae*’, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. Taylor & Francis, 79(6), pp. 1034–1037. doi: 10.1080/09168451.2015.1006568.

Yang, S.-T. and Yu, M. (2013) ‘Integrated Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers’, in Yang, S.-T., El-Enshasy, H. A., and Thongchul, N. (eds) *Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals and Polymers*. First. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., pp. 1–26. doi: 10.1002/9781118642047.

Yarbrough, J. M. *et al.* (2017) ‘Multifunctional Cellulolytic Enzymes Outperform Processive Fungal Cellulases for Coproduction of Nanocellulose and Biofuels’, *ACS Nano*. American Chemical Society, 11(3), pp. 3101–3109. doi: 10.1021/acsnano.7b00086.

Yu, Z. *et al.* (2011) ‘The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis’, *Bioresource Technology*, 102(19), pp. 9083–9089. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.001>.

Zhang, J., Tang, M. and Viikari, L. (2012) ‘Xylans inhibit enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials by cellulases’, *Bioresource Technology*. Elsevier Ltd, 121, pp. 8–12. doi: 10.1016/j.biortech.2012.07.010.

Zhang, X., Paice, M. G. and Deng, J. (2011) ‘Modify existing pulp and paper mills for biorefinery operations’, in Zhu, J., Zhang, X., and Pan, X. (eds) *Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Fibers from Forest Biomass*. American Chemical Society, pp. 395–408. doi: 10.1021/bk-2011-1067.

Zhang, X., Tu, M. and Paice, M. G. (2011) ‘Routes to Potential Bioproducts from Lignocellulosic Biomass Lignin and Hemicelluloses’, *BioEnergy Research*, 4(4), pp. 246–257. doi: 10.1007/s12155-011-9147-1.

Zhu, H. *et al.* (2016) ‘Wood-Derived Materials for Green Electronics, Biological Devices, and Energy Applications’, *Chemical Reviews*. American Chemical Society, 116(16), pp. 9305–9374. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00225.

Zhu, J. Y., Sabo, R. and Luo, X. (2011) ‘Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers’, *Green Chemistry*. The Royal Society of Chemistry, 13(5), pp. 1339–1344. doi: 10.1039/C1GC15103G.

Zhu, L. *et al.* (2008) ‘Structural features affecting biomass enzymatic digestibility’, *Bioresource Technology*, 99(9), pp. 3817–3828. doi:

10.1016/j.biortech.2007.07.033.

Zhu, S. (2008) 'Use of ionic liquids for the efficient utilization of lignocellulosic materials', *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 83(6), pp. 777–779. doi: 10.1002/jctb.