

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
CENTRE EAU TERRE ENVIRONNEMENT
&
INSTITUT SUPÉRIEUR DES HAUTES ÉTUDES EN DÉVELOPPEMENT DURABLE
(ISHÉDD)

**DÉVELOPPEMENT DES BIO-COMPOSITES À PARTIR DES FIBRES
CELLULOSIQUES ET DE L'ACIDE POLY-LACTIQUE (PLA) RECYCLÉ**

Par
MOHAMED AMINE LAADILA

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M,Sc,)
en sciences de l'eau

Jury d'évaluation

Directeur de recherche	Pr. Satinder Kaur Brar INRS-ETE
Examineur interne	Pr. Patrick Drogui INRS-ETE
Examineur externe	Pr. Rosa Galvez ULaval, Québec
Examineur externe	Pr. Luca Sorelli ULaval, Québec

REMERCIEMENTS

Ce travail ne serait pas abouti sans l'aide de nombreuses personnes. Je tiens ainsi à remercier toutes les personnes qui m'ont permises d'amener dans des bonnes conditions ce projet de recherche et qui ont contribuées de près ou de loin à sa réussite.

Je souhaite exprimer ma profonde gratitude à ma directrice de recherche le Professeure Satinder Kaur Brar pour avoir accepté de diriger mes travaux de recherche, pour sa disponibilité et son excellent encadrement. Je la remercie également pour la rigueur scientifique et l'excellente formation qu'elle a su me transmettre et qui contribueront en la construction de ma future carrière.

J'adresse mes sincères remerciements aux membres du jury qui m'ont fait l'honneur de juger ce travail : le Professeur Patrick Drogui, le Professeure Rosa Galvez et le Professeur Luca Sorelli.

Je souhaite remercier aussi le Docteur Tarek Rouissi pour ses précieux conseils et son support durant mes travaux de recherche ainsi que pour avoir assuré la codirection scientifique de ce travail.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance pour le corps administratifs de l'Institut Supérieur des Hautes Études en Développement Durable (ISHÉDD) pour la qualité de la formation. Je cite en particulier Monsieur le Directeur Kamal EL HAJI qui, grâce à son abnégation et à sa vision stratégique, nous a mis sur la voie de la réussite.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement les enseignants de l'INRS-ETE, le personnel du laboratoire INRS-ETE, nos collaborateurs, mes collègues et mon équipe de recherche.

Enfin, à qui je ne cesserai jamais de remercier, mes parents pour leurs efforts et leur soutien inconditionnel ainsi que mon frère et mes sœurs pour leur encouragement continus.

RÉSUMÉ

Ces dernières années, plusieurs industries, en particulier l'industrie agroalimentaire se dirigent de plus en plus vers l'utilisation de l'acide poly lactique (PLA) dans leurs emballages. Ceci a commencé à générer des volumes considérables de plastiques dans les centres de tri au Québec, auxquels aucune voie de recyclage n'a été mise en place. Pour ce faire, les techniques de recyclage des déchets de l'acide poly lactique recyclé (PLAr) se développent et se diversifient.

Le présent projet propose une nouvelle voie de recyclage qui consiste à associer l'acide poly lactique recyclé (PLAr) à des fibres cellulosiques, extraites à partir des bio-solides papetières afin de développer de nouveaux bio-composites qui peuvent être commercialisés de nouveau sur le marché.

Afin de développer ce nouveau bio-composite, les fibres cellulosiques ont été extraites et traitées selon deux méthodes, la première méthode consiste à utiliser la technique de micro-onde avec une faible concentration d'acide sulfurique et la deuxième méthode consiste à utiliser les enzymes (cellulases + laccases).

Les résultats de cette étude ont démontré, en premier lieu, que le traitement par micro-onde est efficace pour l'extraction des fibres cellulosiques provenant des bio-solides papetières primaires et mixtes. cette technique a permis également de réduire considérablement la taille des fibres cellulosiques de 1746,71 μm à 341,98 μm pour les boues mixtes et de 894,61 μm à 293,97 μm pour les boues primaires. En deuxième lieu, il a été prouvé que le traitement enzymatique a abouti à une meilleure adhésion interfaciale entre la matrice de l'acide poly lactique recyclé (PLAr) et les fibres cellulosiques traitées, à travers l'activation des groupements hydroxyles. En troisième lieu, les tests mécaniques pour le nouveau bio-composite, issue de l'association : acide poly lactique recyclé (PLAr) + 2% de fibres cellulosiques primaires traitées, ont montré des meilleurs résultats, par rapport à l'acide poly lactique recyclé (PLAr).

Ce projet a mis en évidence que le recyclage-valorisation de l'acide poly lactique recyclé (PLAr) et des déchets bio-solides papetiers est faisable. Dans le but de développer un nouveau bio-composite avec des propriétés mécaniques spécifiques avancée.

ABSTRACT

During the last years, recycling techniques of recycled poly lactic acid (PLAr), and valorization of paper mill biosolids remain limited. In this report, many studies have been developed specifically on mechanical and physical properties of the recycled poly lactic acid (PLAr), this research project investigated a new approach by combining recycled poly lactic acid (PLAr) with cellulosic fibers extracted from the paper mill biosolids, for this purpose, two types of treatments have been used. In first step the extraction of cellulosic fibers by microwave using a low concentration of sulfuric acid was done. In second, the control size of cellulosic fibers by cellulase and improvement of interfacial adhesion between matrix and treated cellulosic fibers by activating their hydroxyl groups were investigated.

The results of this study showed that the microwave treatment was effective for the extraction of cellulose fibers from mixed and primary biosolids, this technique reduced significantly the size of the cellulosic fibers from 894 μm to 293 μm and from 1746 μm to 341 μm for primary cellulosic fibers and mixed cellulosic fibers, respectively. Also, it was observed that the enzymatic treatment performed by laccase and cellulase showed better interfacial adhesion between the matrix recycled Poly lactic acid (PLAr) and cellulosic fibers treated enzymatically by activation of hydroxyl groups. The mechanical tests for the new biocomposites for the association recycled poly lactic acid (PLAr) + 2% of primary treated cellulosic fibers (enzyme treatment) showed better tensile strain at break point and tensile stress at yield as compare to recycled poly lactic acid (PLAr).

Finally, the results of X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy confirmed that mechanical properties of novel biocomposites were improved by association of treated cellulosic fibers and recycling poly lactic acid.

This project has opened a new recycling and valorization method for recycled poly lactic acid (PLAr) and paper mill biosolids by development of a new bio-composite with highest specific mechanical properties compare to the poly lactic recycle.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iii
RÉSUMÉ	v
Abstract	vi
LISTE DES FIGURES	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xiii
INTRODUCTION	1
1.1. Revue de la littérature	3
1.1.1. Les matériaux composites : compositions et caractérisations	3
1.1.2. Traitement enzymatique	9
1.1.3. Productions des enzymes par la fermentation à l'état solides	17
1.2. Hypothèses de recherche, approches méthodologique et expérimentale	23
1.2.1. Hypothèses de recherche	23
1.2.2. Objectifs	24
1.2.3. Méthodologie de recherche	24
1.3. Résultats et discussion	33
1.3.1. La production des enzymes ligno-cellulosiques,	33
1.3.2. L'extraction des fibres cellulosiques en utilisant la nouvelle technique de microonde	34
1.3.3. L'effet des enzymes ligno-cellulosiques sur les fibres cellulosiques extraites ..	37
1.3.4. L'effet du traitement enzymatique sur les tests mécaniques	42
Conclusion et Recommandations	45
BIBLIOGRAPHIE	47
PARTIE II : L'ARTICLE DE RECHERCHE :	53
Green synthesis of novel bio-composites from treated cellulosic fibers and recycled bio-plastic poly lactic acid (PLAr)	53
Résumé	55
Abstract	56
1. Introduction	57
2. Materials and methods	59
2.1. Enzyme production	59
2.1.1. <i>Laccase production</i>	59
2.1.2. <i>Cellulolytic enzyme production</i>	59
2.2. Enzyme extraction	59

2.3. Enzyme assay	60
2.3.1. <i>Laccase</i>	60
2.3.2. <i>Endoglucanase</i>	60
2.3.3. <i>Exoglucanase</i>	60
2.3.4. <i>β-glucosidase</i>	60
2.3.5. <i>Filter paper cellulase assay (FPase)</i>	61
2.4. Cellulose extraction from pulp	61
2.4.1. <i>Ball milling grinder treatment</i>	61
2.4.2. <i>Microwave treatment (MWT)</i>	61
2.5. Statistical Analysis of microwave treatment.....	61
2.6. Enzymatic treatment	62
2.7. Matrix and cellulosic composite preparation and treatment.....	62
2.8. Analysis of mechanically and enzymatically modified fibers and biocomposites.....	62
3. Results and discussion	64
3.1. <i>Enzyme production and activity</i>	64
3.2. <i>Cellulosic fiber extraction using MWT from pulp</i>	66
3.4. <i>FTIR spectra</i>	68
3.5. <i>SEM analysis</i>	70
3.6. <i>XRD analysis</i>	72
3.7. <i>Mechanical proprieties</i>	74
4. Conclusion.....	78
Acknowledgement(s):	78
References	79
PARTIE III: ANNEXES.....	87

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 :	Le pourcentage moyen des trois principaux constituants des fibres naturelles (Oomah et al. 2002b; Wertz 2014).	5
Tableau 2 :	Les productions annuelles des fibres naturelles(Faruk et al. 2012).	5
Tableau 3 :	les propriétés physiques et mécaniques de différentes fibres naturelles (Panigrahi 2007).	6
Tableau 4 :	Les paramètres du traitement alcalin (Saheb et Jog 1999; Mwaikambo et Ansell 2002).	9
Tableau 5 :	Le pourcentage de la cellulose et de la lignine dans les différents types de résidus et de la biomasse.	10
Tableau 6 :	Les molécules graffitées dans les fibres ligno-cellulosiques en utilisant la laccase Source (Kudanga et al. 2011).	17
Tableau 7 :	Les molécules graffitées dans les fibres ligno-cellulosiques en utilisant la laccase.	19
Tableau 8 :	La composition des fibres de chanvre (Oomah et al. 2002a).	26
Tableau 9 :	Paramètres utilisés.	28
Tableau 10 :	La conception de centrale composite pour les bio-solides mixtes et primaires,35	
Tableau 11 :	ANOVA pour les fibres cellulosiques primaires et mixtes (A : température, B : temps, C : Cacide)	36
Tableau 12 :	Résultats des tests mecaniques du nouveau biocomposite	42
Tableau 13 :	Comparaison des résultats obtenus avec la littérature.	44
Table I:	Mechanical strength for novel biocomposites.....	76
Table II:	Central composite design defining temperature, time and acid concentration and results on size of fibers for each run of mixed and primary bio-solids.....	87
Table III:	Summary of ANOVA for mixed sludge	88

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Les différents types de renforts.....	3
Figure 2 :	Les différentes étapes du traitement de la biomasse ligno-cellulosique.	11
Figure 3 :	Représentation générale de la structuration des composés de microfibrilles cellulosiques (Mohamed Ragoubi, 2010)	12
Figure 4 :	Structures des composés de Xylanase (Lisa-Marielanteigne Roch, avril 2010)..	14
Figure 5 :	Les réactions des enzymes dans l'hydrolyse de la cellulose (Lisa-Marielanteigne Roch, avril 2010, modifiée par l'auteur).....	15
Figure 6 :	Principe de la fermentation à l'état solide.....	20
Figure 7 :	Applications de la laccase dans l'industrie.	21
Figure 8 :	Organigramme des étapes méthodologiques.....	25
Figure 9 :	A et B représentent une image de <i>Trametes versicolor</i> et <i>Trichoderma reesei</i> respectivement	26
Figure 10 :	Organigramme des étapes du traitement enzymatique.	29
Figure 11 :	Organigramme des étapes préparatoires de bio-composites.	30
Figure 12 :	L'activité enzymatique pour : (A) exo and endo-glucanase, β -glucosidase et (B) Fpase cellulase.....	33
Figure 13 :	Les spectres d'XRD pour les fibres cellulosiques primaires (A) et mixtes (B) avant et après le traitement enzymatique.....	38
Figure 14 :	Images de microscope électronique à balayage (MEB) pour les bio-solides papetiers avant (A, C) et après (B, D) le traitement enzymatique; (A,B) fibres cellulosiques mixtes, (C, D) fibres cellulosiques primaires.	39
Figure 15 :	Les spectres de FTIR pour les fibres cellulosiques primaires (A) et mixtes (B) avant et après le traitement enzymatique.....	41
Figure 16 :	Enzymes profiling for: (A) exo and endo-glucanase, β -glucosidase and (B) Fpase cellulase (hemp fibers as solid-state fermentation.....	65
Figure 17 :	Comparative analysis of the size of cellulosic fibers before and after enzymatic treatment	68
Figure 18 :	FTIR spectra of: primary (A) and mixed (B) biosolids before and After MWT and enzymatic treatment.....	70
Figure 19 :	SEM micrograph of treated and untreated mixed bio-solids before (A and B) and after (C and D) microwave treatment (MWT).....	71
Figure 20 :	SEM micrograph of treated and untreated primary bio-solids before (A and B) and after (C and D) enzymatic treatment	71
Figure 21 :	XRD spectra for: primary biosolids (A) and mixed biosolids (B) before and after enzymatic treatment.....	73
Figure 22 :	Tensile stress for bio-composites with primary untreated and treated PPWS (a) and (b) PLAr + 2 % primary untreated and treated cellulosic fibers, respectively (c) and (d) PLAr + 5 % primary untreated and treated cellulosic fibers, respectively (e) and (f) PLAr + 10 % primary untreated and treated cellulosic fibers, respectively (g) PLAr	74

Figure 23 : Tensile stress of bio-composites with mixed untreated and treated PPWS (a) and (b) PLAr + 2 % untreated and treated mixed cellulosic fibers, respectively (c) and (d) PLAr + 5 % untreated and treated mixed cellulosic fibers, respectively (e) and (f) PLAr + 10 % untreated and treated mixed cellulosic fibers, respectively (g) PLAr75

LISTE DES ABRÉVIATIONS

PLAr : Acide poly lactique recyclé

PLA : Acide poly-lactique vierge

PP: Polypropylène

PHBv : Polyhydroxyalkanoate

C_{acide} : Concentration de l'acide sulfurique

H₂SO₄ : Acide sulfurique

MPa : Méga pascale

DNS : Acide 3,5-dinitrosalicylique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogéné

HCl : Acide chlorhydrique

MFC : Microfibres cellulosiques

ABTS : 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique acide)

A₄₂₀ : Absorbance à 420 nm

PDB : Dextrose de pomme de terre

PDA : Gélose dextrose de pomme de terre

CMC : Carboxyl-methyl-cellulose

XRD : Diffraction aux rayons X

FTIR : Spectroscopie infrarouge a transformée de Fourier

MEB : Microscope électronique à balayage

RSM : Méthodologie de réponse de surface

U/gps : Unité par gramme du poids sec

ASTM : Tests standards

V : Volume

PCC : Plan central composite

INTRODUCTION

L'utilisation des produits à base de polymères synthétiques, principalement le plastique, a connu une évolution remarquable à l'échelle industrielle. Ce matériau, en perpétuelle production, a fait l'objet de plusieurs travaux de recherche, vu qu'il est utilisé dans tous les domaines et omniprésent dans le secteur industriel. De plus, ce polymère a été largement utilisé dans plusieurs secteurs innovateurs, tels que l'industrie aérospatiale et automobile. Cependant, cette matière a un impact négatif sur notre environnement par ses effets toxiques et sa non-biodégradabilité. (Paul, Joseph et Thomas 1997; Faruk et al. 2012).

Par conséquent, devant cette multiplication évolutive de matériaux à base de plastique, le recours au bioplastique prend une place de plus en plus importante. En ce moment, c'est l'un des produits de substitution recommandés et proposés pour réduire les incidences de la problématique environnementale causée par le plastique pétrochimique. Depuis plusieurs années, les bio-polymères commencent à conquérir le marché des emballages, en 2014, la capacité de production des bio-polymères tels que PLA, PHA dépasse 0,7 millions de tonnes ; selon des études qui ont été faites dernièrement, ce potentiel de production devrait atteindre 1,9 millions de tonnes en 2019., Désormais, outre les obligations réglementaires, dans la stratégie des entreprises, la protection de l'environnement devient essentielle elle s'inscrit dans une démarche globale de développement durable. Dans ce contexte, l'utilisation de l'acide polylactique (PLA) représente une alternative respectueuse de l'environnement, mais le coût de production reste trop élevé par rapport au plastique conventionnel (V.H. Sangeetha 2016).

Malgré ce handicap, les bio-composites à base de PLA recyclé et des fibres naturelles sont de plus en plus utilisés dans de nombreuses applications relatives aux industries de pointe telles que celles d'automobile et d'aérospatiale. , Cependant, le recyclage des emballages fabriqués à base du bioplastique PLA (acide poly-lactique) n'a pas été encore établi au Québec. Par conséquent, les techniques de « recyclage » demeurent encore limitées vu l'absence de voie de valorisation et la faible biodégradabilité due à la présence des impuretés ce qui rend le compostage de PLAr impropre à l'utilisation agricole.

Afin de développer un nouveau bio-composite biodégradable, notre approche consiste à associer le PLAr avec les fibres cellulosiques traitées enzymatiquement. L'obtention d'un bio-composite ayant des propriétés mécaniques et physiques avancées exige de faire des prétraitements pour les fibres afin d'optimiser la taille et les propriétés de surface et d'assurer une parfaite adhésion entre les différents matériaux. Les prétraitements classiques des fibres

sont basés sur l'utilisation des produits chimiques pour la délignification et l'hydrolyse. Ces procédés sont coûteux, car ils nécessitent de grandes quantités de produits chimiques et engendrent des conséquences désastreuses, souvent incontrôlables.

L'alternative proposée dans ce projet consiste à adopter une approche expérimentale, basée principalement sur le traitement enzymatique des fibres naturelles couplée de la technologie de la microonde. Plusieurs techniques seront utilisées, dans le but de contrôler les modifications des propriétés physico-chimiques des fibres naturelles. Ainsi, dans ce travail, notre objectif consiste à renforcer les propriétés mécaniques de l'acide poly lactique recyclé (PLAr) récupérés des centres de tri au Québec en développant de nouveaux composite

PARTIE I : SYNTHÈSE DE LA DÉMARCHE ET DES RÉSULTATS

1.1. Revue de la littérature

Dans le présent chapitre, nous évoquerons les principaux constituants des matériaux composites, les différentes méthodes du traitement des fibres naturelles, les bio-composites à base de PLAr, la production des enzymes ligno-cellulosiques par fermentation à l'état solide et le traitement enzymatique des fibres cellulosiques.

1.1.1. Les matériaux composites : compositions et caractérisations

Les composites sont des matériaux qui se forment par l'assemblage d'ensemble des matériaux dans le but de former un produit macroscopiquement homogène. Les matériaux composites sont constitués suite à une compatibilité optimale entre deux principaux constituants : le premier est le renfort ; le deuxième est la matrice. Ses deux éléments doivent être parfaitement noyés entre eux pour former un matériau résistant et solide (Bledzki et Gassan 1999).

1.1.1.1. Le renfort

Le renfort regroupe tous les produits qui peuvent améliorer les propriétés mécaniques d'une matrice quelconque, comme renfort les fibres naturelles sont parmi les matériaux les plus utilisées pour consolider les propriétés mécaniques des matrices. Nous avons trois principaux groupes des fibres ayant une fonction d'un renfort (Figure1) :

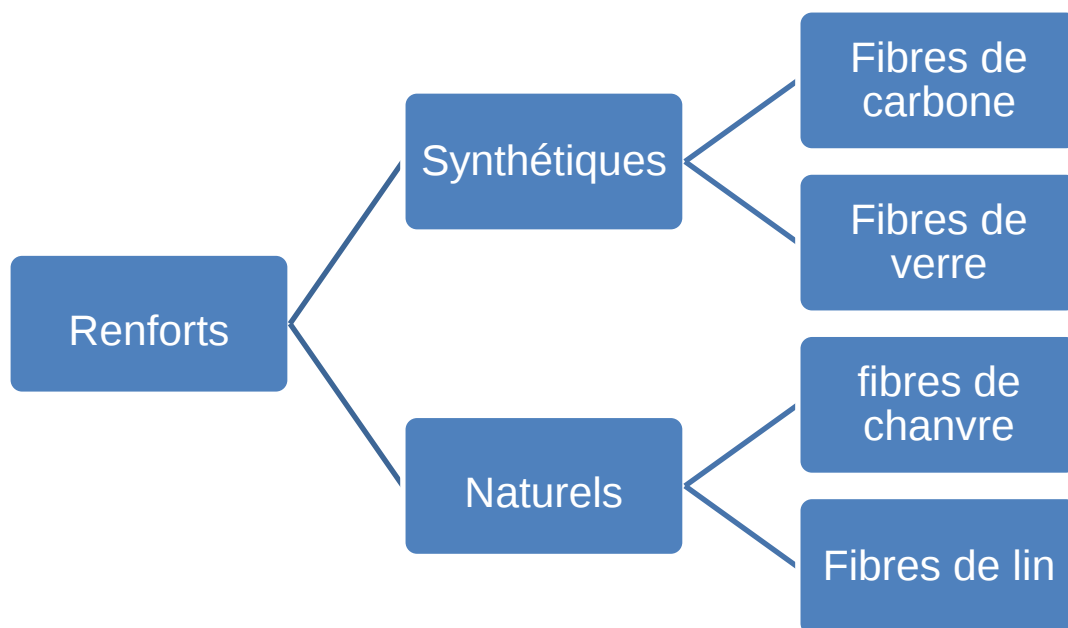


Figure 1 : Les différents types de renforts.

Les fibres naturelles : ce sont les constituants majeurs des plantes ; elles sont essentiellement utilisées comme des renforts, vu leurs propriétés mécaniques intéressantes (Saheb et Jog 1999).

Les fibres synthétiques : un grand nombre des fibres synthétiques ont été obtenues d'extrusion/filage par un solvant organique ou une fondue, Nous avons plusieurs catégories des fibres telles que les fibres à base de polyéther et de polyéthylène.

1.1.1.2. La matrice

La matrice représente la plus grande fraction dans un composite ; elle est généralement sous deux formes : polymère ou résine, formant le support principal pour les fibres. La matrice facilite l'adhésion et la liaison entre les renforts ; elle joue également un rôle de protection pour le renfort (Faruk *et al.* 2012).

Une matrice peut être fabriquée à partir de différents matériaux ; parmi lesquels, nous distinguons (Faruk *et al.* 2012) :

- Les matrices céramiques ;
- les matrices polymériques ;
- les matrices élastomères ;
- les matrices fabriquées à partir des résines thermoplastiques.

1.1.1.3. Les fibres cellulosiques

1.1.1.3.1. Généralités sur les fibres cellulosiques

Le renforcement des composites par des fibres d'origine végétale est devenu l'une des techniques les plus utilisées pour améliorer les propriétés mécaniques et physiques des matériaux composites. Ses fibres naturelles sont disponibles dans la biosphère végétale (telles que les fibres du chanvre, lin et coton...etc.); en plus elles constituent un substrat abondant (Tableau 2), renouvelable, et biodégradable (Saheb et Jog 1999; Panigrahi 2007). Leurs compositions chimiques varient en fonction de leurs sources végétales (Tableau 1) ; mais elles contiennent généralement de la cellulose, hémicellulose et la lignine. De plus, chaque composé se distingue par ses propriétés spécifiques en termes de biodégradabilité, de stabilité thermique et d'humidité spécifique (Saheb et Jog 1999).

Tableau 1 : Le pourcentage moyen des trois principaux constituants des fibres naturelles (Oomah et al. 2002b; Wertz 2014).

Fibres	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)
Coton	92	6	1
Chanvre	78	-	4, 35
Lin	71,2	18,6	2,2

D'après le Tableau ci-dessus, la cellulose qui est une longue chaîne polymérique linéaire de D-glucose est le composant essentiel des fibres naturelles pouvant aller jusqu'à 92% dans le cas du coton ; il s'agit d'un bio-polymère semi-cristallin ; le contenu en hémicellulose est d'environ 20% ; par contre, la teneur en lignine est moins importante, entre 1%-4%.

Tableau 2 : Les productions annuelles des fibres naturelles(Faruk et al. 2012).

Fibres	Production*1000 (t/an)
Jute	2000
Lin	2100
Sisal	500
Abaca	100
Coco	584

1.1.1.3.2. Importance des fibres cellulosiques dans le renforcement des matériaux composites

Dans les différents types de composites actuellement formulés et vendus sur le marché, les matériaux d'origine végétale sont de plus en plus utilisés comme renfort, se substituant ainsi aux fibres synthétiques. Plusieurs travaux de recherche ont montré la capacité des fibres naturelles à renforcer les composites à base de polymères synthétiques en améliorant leurs propriétés mécaniques spécifiques (Tableau 3) (Bitinis et al. 2013; Iuliana Spiridon 2014; Pickering, Efendy

et Le 2015). Ces capacités ouvre un champ d'investigations potentielles à la recherche scientifique en matière de bio-polymères et l'incorporation des fibres naturelles ; en se focalisant sur leurs caractéristiques mécaniques comme la résistance à la traction , le module de Young et élongation qui restent des paramètres très importants, par apport aux fibres synthétiques (Panigrahi 2007).

D'une manière générale, les fibres naturelles sont appropriées pour le renforcement de matière plastique en raison de leur résistance, leur rigidité relativement élevée et leur faible densité (Tableau 3) (Faruk *et al.* 2012). Par ailleurs, il existe quelques inconvénients ; les fibres naturelles présentent un pouvoir d'adsorption élevé, une variabilité dimensionnelle et une faible stabilité thermique (K. Oksmana 2003).

D'une façon générale, la performance des matériaux composites, issus de la combinaison entre une matrice polymérique et un renfort cellulosique dépend de plusieurs facteurs parmi lesquels (Panigrahi 2007) :

- La composition chimique ;
- La structure cristalline ;
- Les propriétés physiques et mécaniques ;
- L'adhésion interfaciale matrice-fibres.

Tableau 3 : les propriétés physiques et mécaniques de différentes fibres naturelles (Panigrahi 2007).

Fibres	Densité (g/cm³)	Elongation (%)	Le module d'Young (GPa)	La résistance à la traction (MPa)
Coton	1,5-1,6	3-10	287-597	5,5-12,6
Chanvre	1,48	1,6	550-900	70
Jute	1,3-1,46	1,5-1,8	393-800	10-30
Lin	1,4-1,5	1,2-3,2	345-1500	27,6-80
Coco	1,2	15-30	175-220	4-6
Sisal	1,33-1,5	2-14	400-700	9-38

1.1.1.4. Traitement des fibres cellulosiques

Le renforcement des bio-composites par les fibres naturelles a connu une évolution remarquable au cours de ces dernières années. Cette association entre les fibres naturelles (lin, coco, sisal et chanvre) et une matrice (soit de type thermoplastique ou thermodurcissable) permet l'amélioration des propriétés mécaniques des bio-composites. Cependant la faible adhésion entre les fibres cellulosiques et la matrice polymérique (PLA, PHB, PE, PP) représente la principale limite pour ces bio-composites, due à la non compatibilité chimique entre les fibres et la plupart des matrices polymériques utilisées (Faruk *et al.* 2012).

Plusieurs types de traitement des fibres naturelles ont été proposés afin de remédier à la problématique de la faible adhésion. Il s'agit principalement des traitements physique, chimique et enzymatique. Ces modifications visent l'amélioration de l'adhésion entre les fibres et les matrices utilisées dans la fabrication des bio-composites (Panigrahi 2007; Rencoret *et al.* 2014b).

1.1.1.5. Traitement physique

L'élimination des substances comme l'hémicellulose, la pectine et la lignine, nécessite un prétraitement rentable en termes de dégradation et d'efficacité. En effet, la modification physique de la biomasse ligno-cellulosique a été largement utilisée (McMillan 1994; Shafiei, Kumar et Karimi 2015). Cette modification peut être faite dans :

- L'extraction des fibres cellulosiques à partir de la biomasse ligno-cellulosique.
- La conversion de la biomasse ligno-cellulosique complexe en biomasse assimilable par les microorganismes lors de la production du bioéthanol.

Plusieurs travaux de recherche ont montré l'efficacité du prétraitement tel que l'extrusion, la pyrolyse par irradiation, l'hydrolyse et le traitement par microonde pour la transformation de la biomasse et l'extraction des fibres. Cependant, ces procédés sont coûteux, consomment beaucoup d'énergie et des fois polluantes.

Il existe deux principaux traitements qui ont été largement utilisés pour la conversion de la biomasse et l'extraction des fibres cellulosiques (Shafiei, Kumar et Karimi 2015), Il s'agit du traitement par microonde et par extrusion.

- Traitement par microonde : le prétraitement par microonde est une technologie relativement récente qui a été utilisée dans l'hydrolyse de la matière ligno-cellulosique, cette technologie est basée principalement sur l'irradiation par des ondes électromagnétiques qui provoquent une rupture totale au niveau des liaisons présentes

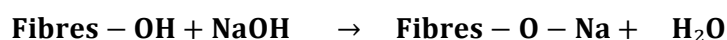
dans la biomasse. Malgré le rendement efficace de cette technique, elle reste très consommatrice d'énergie ; vue qu'elle ne parvient pas à solubiliser la biomasse à des températures et à des pressions très élevées (2450 MHz, 1250 W, 175°C) (Mithun Saha 2011).

- Traitement par extrusion : le prétraitement de la biomasse est réalisé avec deux extrudeuses (humidité de la biomasse de l'ordre de 20%). Cette méthode est utilisée dans le traitement de la biomasse ligno-cellulosique en appliquant des forces de cisaillement sur le matériau. L'efficacité du traitement par extrusion est remarquable lorsqu'il est couplé avec d'autre type de traitement à l'instar des traitements chimique et physique, (Zhao *et al.* 2014; Shafiei, Kumar et Karimi 2015).
- Traitement par explosion à vapeur : cette technique est la plus couramment utilisée pour le prétraitement de la matière ligno-cellulosique. Dans cette méthode, la biomasse est traitée à haute pression de vapeur saturée puis la pression est rapidement réduite, ce qui provoque une décompression explosive de la biomasse. Cette explosion à vapeur est généralement initiée à une température de 160°C à 220°C, correspondant à une pression de l'ordre de 0,69 à 4,83 MPa. D'une durée de quelques secondes à quelques minutes, ce traitement provoque une dégradation totale de l'hémicellulose, de la lignine ainsi que l'hydrolyse de la cellulose. Plusieurs études ont montré qu'une température plus basse et un temps de séjour plus court sont plus favorables à la solubilisation de cellulose (Fletcher 1995; Sun et Cheng 2002).

1.1.1.6. Traitement chimique

Pour une meilleure adhésion interfaciale matrice-fibres, la modification chimique de la surface des fibres cellulosiques est nécessaire. Dans le but d'éliminer les composés non-souhaités comme la lignine, l'hémicellulose et la pectine. Deux principaux traitements sont utilisés pour achever la modification interfaciale :

- Traitement alcalin : ce type de traitement est réalisé en utilisant NaOH, l'objectif principal est d'éliminer la liaison hydrogénée présente dans les fibres cellulosiques, en augmentant la rugosité de la surface des fibres, Il permet aussi de dégrader une partie importante de la lignine et l'hémicellulose.



Les conditions du traitement alcalin sont variables en fonction de l'objectif visé par l'étude. Les paramètres les plus utilisés par les chercheurs sont présentés dans le tableau 4 ci-dessous :

Tableau 4 : Les paramètres du traitement alcalin (Saheb et Jog 1999; Mwaikambo et Ansell 2002).

Temps (h)	Concentration (%)	Température (°C)
2-72	2-100	25-200

En général, le traitement alcalin a deux effets majeurs sur la surface des fibres cellulosiques :

- Il augmente la rugosité de surface qui résulte un meilleur accrochage mécanique ;
 - Il accroît la quantité de cellulose exposée sur la surface des fibres en augmentant les sites de réactions possibles fibres-matrices.
- Traitement avec l'acide : il s'agit du traitement le plus utilisé dans l'extraction des fibres cellulosiques et la dégradation de la lignine et de l'hémicellulose. Il est effectué par un acide dilué ou concentré ; la concentration varie entre (0,2% - 50 % w/v), en utilisant des températures élevées (160 °C - 220 °C), pendant quelques minutes à quelques heures, associées à des pressions de 3 à 15 atm.

Le traitement par un acide dilué a été recommandé par plusieurs travaux de recherche, cependant l'efficacité du procédé dépend plusieurs facteurs : la température, la concentration de l'acide, la pression et la durée du traitement (Shafiei, Kumar et Karimi 2015).

1.1.2. Traitement enzymatique

L'utilisation des enzymes a connu une grande évolution dans plusieurs domaines : agricoles, textiles et industriels. Le cas de l'industrie papetière est un exemple type d'une industrie génératrice des bio-solides, riches en matière ligno-cellulosique. Ces déchets représentent une source potentielle des bioproduits comme les enzymes principalement cellulases et laccases, qui sont largement utilisées dans plusieurs secteurs industriels à l'instar la production de bioéthanol, le biografting dans l'industrie de textile (Thompson *et al.* 2001; Rosyida *et al.* 2015).

De plus, Les boues de papier sont considérées comme l'une des matières cellulosiques prometteuses à une application industrielle, pour ses plusieurs avantages : la grande disponibilité, le coût moins élevé. (Thompson *et al.* 2001; Marques *et al.* 2008).

L'exploitation industrielle des enzymes a été rendue possible grâce au développement des différents modes de fermentation que ce soit à l'état solide ou liquide, ce qui permet la production des enzymes à grande échelle.

Des études récentes ont révélé la capacité de différents champignons, comme le *Trichoderma reesei* et *Trametes versicolor* (Dienes *et al.* 2006; Papinutti et Forchiassin 2007) à produire

plusieurs types d'enzymes hydrolytiques, parmi lesquels on trouve l'endo-glucanase, l'exo-glucanase, la β -l ,4- glucosidase et la laccase. Ces enzymes ont une grande capacité de dégrader la biomasse ligno-cellulosique. Par conséquent, elles peuvent être utilisées dans les différentes phases de traitement (extraction, purification, hydrolyse et activation) des fibres cellulosiques. (Fang et Xia 2015).

Parmi les types de biomasse cellulosique, nous avons les fibres des plantes qui contiennent une quantité importante de cellulose (Tableau 5) ; cette dernière nécessite un traitement spécifique par des produits chimiques ou bien par des bioproduits issus de la biomasse naturelle comme les enzymes ligno-cellulosiques. Ces produits jouent un rôle important dans l'élimination de l'hémicellulose et la lignine, afin d'avoir une très bonne compatibilité entre la matrice et les fibres cellulosiques. Le but de ce traitement consiste à développer et renforcer les propriétés mécaniques et physiques de la matrice (dans notre étude, la matrice est à base du bioplastique PLA recyclé) (Kalia *et al.* 2013; Mai *et al.* 2015).

Tableau 5 : Le pourcentage de la cellulose et de la lignine dans les différents types de résidus et de la biomasse.

Types de la biomasse	Cellulose (% poids)	Lignine (% poids)
Fibres de chanvre	70-78	3,7-5
La canne de maïs	33	14
L'épi de maïs	70	20
Les fibres de sisal	43-88	4-12
Les fibres de feuilles d'ananas	79-83	3-4
Les fibres de lin	60-81	2-3
Les bio-solides papetières	60-70	5-10

Le traitement des fibres est un procédé d'isolement des microstructures cellulosiques. Il consiste à enlever la lignine et l'hémicellulose, réduire la cristallinité de la cellulose et augmenter sa porosité (Sun et Cheng 2002). Le traitement s'effectue en plusieurs étapes (Figure 2) :

- La première étape : est un prétraitement pour enlever partiellement ou totalement des composés associés tels que l'hémicellulose et la lignine ;
- La deuxième étape : consiste à éliminer la lignine afin de libérer les fibres et fibrilles de cellulose (Brinchi *et al.* 2013)

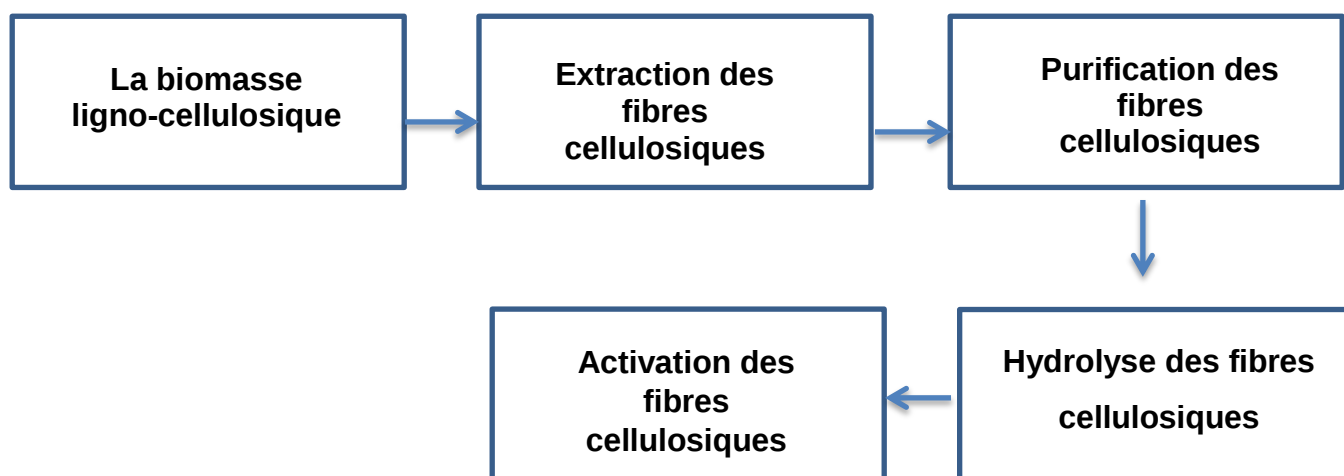


Figure 2 : Les différentes étapes du traitement de la biomasse ligno-cellulosique.

1.1.2.1. Extraction des fibres ligno-cellulosiques

Elle consiste à séparer les fibres cellulosiques des autres constituants des fibres végétales (figure 3) (Abraham *et al.* 2011). Cette technique peut être enzymatique, chimique ou physico-chimique (la section précédente : traitement des fibres cellulosiques). L'extraction enzymatique nécessite l'utilisation de différents types d'enzymes (pectinase, hémicellulase, lignine peroxydase) pour accomplir la délignification totale des fibres cellulosiques. Cette extraction représente une alternative respectueuse de l'environnement, vu qu'elle utilise des produits issus d'une source naturelle (enzymes produites par des microorganismes). En effet, le traitement des polymères par les enzymes reste très efficace et avantageuse par rapport à l'utilisation des produits chimiques ; cela est due à la forte réaction des enzymes avec les fibres ligno-cellulosiques et à la performance des fibres obtenues. Ainsi, la séparation des fibres en appliquant les enzymes est considérée comme la technique la plus prometteuse dans l'amélioration de la qualité des micro-fibrilles cellulosiques (Kalia *et al.* 2013). Toutefois, le pourcentage de la cellulose extraite dépend de la plante utilisée, ainsi que des méthodes appliquées dans l'extraction des macros et microfibrilles ligno-cellulosiques (Brinchi *et al.* 2013).

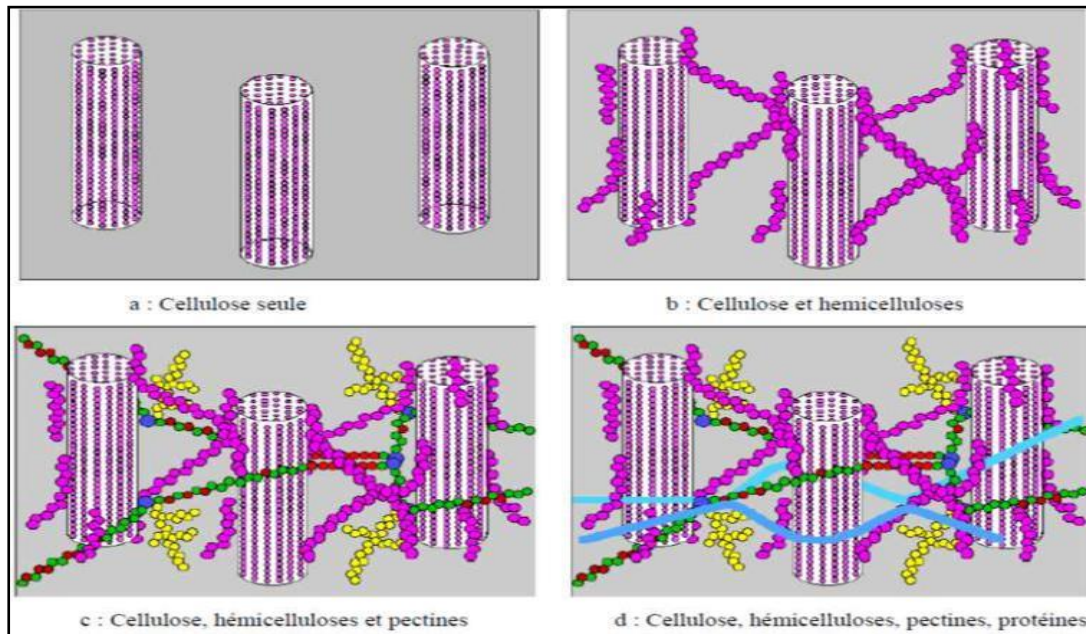


Figure 3 : Représentation générale de la structuration des composés de microfibrilles cellulosiques (Mohamed Ragoubi, 2010)

En effet, plusieurs travaux ont adopté différentes voies d'extraction des fibres ; globalement, pour avoir un rendement optimal, l'extraction des fibres s'effectue selon trois méthodes principales :

- La méthode chimique, en ajoutant des tampons phosphatés et de l'eau ultra-pure (Tang *et al.* 2015);
- La méthode enzymatique, en utilisant des enzymes extraites à partir d'une biomasse (hémi-cellulase) pour catalyser les réactions de la délignification et de l'extraction ;
- La méthode physico-chimique, en appliquant le traitement par microonde (irradiation par des ondes électromagnétiques) avec l'utilisation d'une faible concentration de l'acide (Filson, Dawson-Andoh et Schwegler-Berry 2009),

1.1.2.2. Purification des fibres cellulosiques

La purification des fibres ligno-cellulosiques peut être réalisée avec soit un procédé chimique ou un procédé biologique. Cette purification consiste d'une façon générale à réaliser un blanchiment des fibres cellulosiques, dans le but d'une élimination totale de la lignine et de l'hémicellulose. Pour le procédé chimique, le blanchiment s'effectue en utilisant plusieurs produits chimiques tels que le chlorite de sodium et l'hypochlorite. Pourtant, ces produits ont évidemment de nombreuses conséquences sur l'environnement avec tous ses composants, y compris la biomasse, en particulier sur les fibres (Farooq *et al.* 2013).

- La consommation de l'énergie et les conditions alcalines nécessitent une grande quantité d'énergie ;
- La réduction de la résistance à l'adsorption des fibres cellulosiques.

Le procédé biologique est basé sur l'utilisation des enzymes, ce qui représente une approche durable et respectueuse de l'environnement. L'objectif de cette méthode est d'effectuer une bio-finition et une purification des fibres cellulosiques par des enzymes comme l'hémicellulase, la peroxydase, la laccase et la xylanase,

Le bioblanchiment par la xylanase est un procédé largement utilisé dans la purification des fibres cellulosiques, Il représente une approche intéressante car il permet de réduire le recours à l'utilisation des produits chimiques et réduire ainsi les risques de leurs effets toxiques sur l'environnement. L'action de cette enzyme sur les fibres cellulosiques reste très complexe, vu l'intervention de plusieurs enzymes de la famille de xylanase afin d'accomplir le bioblanchiment des fibres. Plusieurs enzymes entrent donc en action, il s'agit de : la f3-1,4- endoxylanase, la f3-xylosidase, la α -glucuronidase, et l'acide phénolique, (Figure 4), Elles permettent une délignification totale des microstructures cellulosiques (Lin *et al.* 2013).

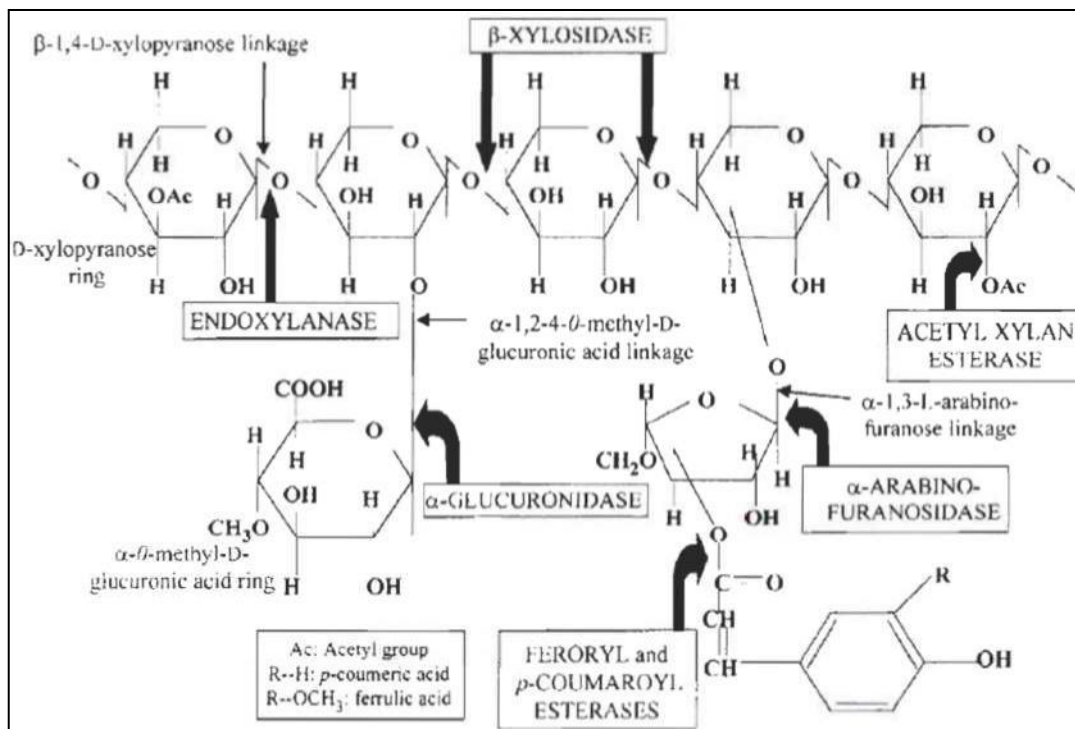


Figure 4 : Structures des composés de Xylanase (Lisa-Marielanteigne Roch, avril 2010)

1.1.2.3. Contrôle de la taille des fibres cellulosiques

Le contrôle de la taille des fibres cellulosiques est un processus important dans la préparation des fibres cellulosiques pour la formulation des bio-composites. Le but de cette étape est de couper ou hydrolyser les fibres cellulosiques déjà extraites (Sun et Cheng 2002; Dionisi *et al.* 2015) (Figure 5).

L'hydrolyse s'effectue selon différents modes de traitements : chimique ou biologique (enzymatique) (Sun et Cheng 2002). Pour hydrolyser la biomasse ligno-cellulosique par voie chimique, nous avons plusieurs méthodes telles que :

- L'hydrolyse alcaline qui est une réaction de saponification des liaisons intermoléculaires d'ester.
- L'hydrolyse par des acides forts en utilisant des acides concentrés (HCl, H₂SO₄).
- La délignification oxydative qui fait intervenir l'enzyme peroxydase en présence de H₂O₂.

L'hydrolyse par voie enzymatique ; plus intéressante sur le plan écologique, elle fait intervenir trois types d'enzymes, l'endo- β -1,4-glucanase, l'exo- β -1,4-glucanase et la β -1,4-glucosidase, qui seront activées tour à tour dans l'hydrolyse des microfibrilles (Lo *et al.* 2010). Cette réaction s'est effectuée en trois phases :

- Dans la première phase, l'endo-glucanase attaquerait les zones amorphes de la cellulose, en créant des failles dans les chaînes linaires des fibres,
- Dans la deuxième phase, l'action de l'exo-glucanase se concentre sur les points faillés néoformés pour libérer la cellubiose.
- Dans la troisième, la combinaison entre les deux enzymes l'endo et l'exoglucanase qui agissent simultanément pour convertir la cellulose en cellubiose et oligoside (Henrissat *et al.* 1985).

Les cellulases jouent un rôle important dans la transformation de la cellulose en sucre simple. Dans le cas de notre travail, l'hydrolyse par voie enzymatique sera utilisée dans le but de réduire la taille des fibres cellulosiques (Pérez *et al.* 2002b).

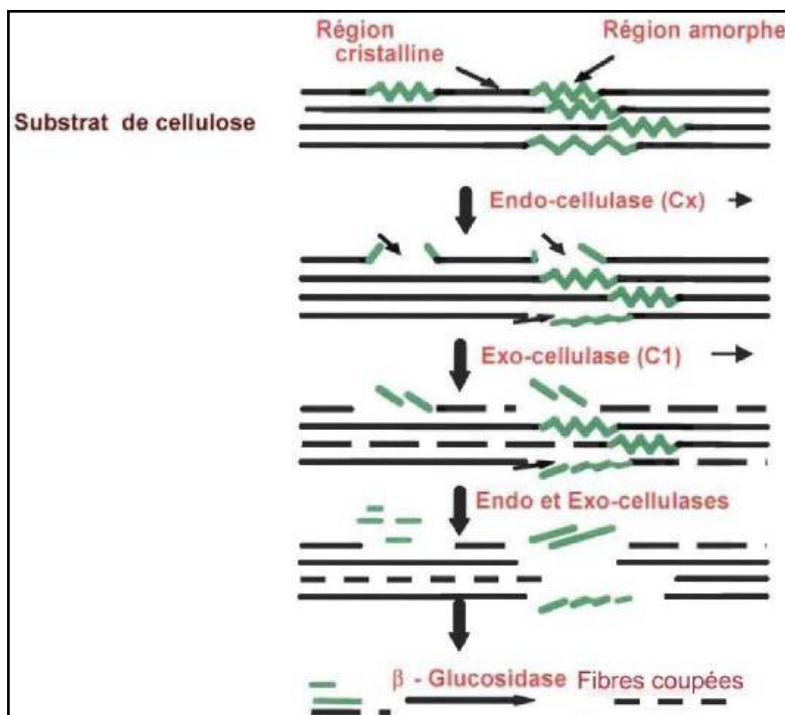


Figure 5 : Les réactions des enzymes dans l'hydrolyse de la cellulose (Lisa-Marielanteigne Roch, avril 2010, modifiée par l'auteur)

1.1.2.4. Activation des fibres cellulosiques par les enzymes

L'activation des fibres cellulosiques est une étape importante dans le traitement des fibres cellulosiques. Son objectif est d'aboutir à la compatibilité entre les fibres traitées et la matrice avec laquelle elles seront combinées.

Selon une étude récente, l'application des enzymes dans l'activation des fibres s'avère efficace dans la modification des fibres par des réactions de couplages, catalysées par des radicales laccases afin de s'adhérer chimiquement à la surface des fibres ligno-cellulosiques (Rencoret *et al.* 2014a).

L'activation des fibres consiste à combiner la laccase, qui est une enzyme composée de quatre atomes de cuivre, avec la lignine ou aux différents types de médiateurs pour améliorer la résistance à l'humidité des fibres. Elle aboutit à la polymérisation de la lignine et à la production des radicaux phénoxyles, assurant la combinaison avec les fibres ligno-cellulosiques (Kudanga *et al.* 2011).

Deux approches principales sont utilisées pour avoir une affinité chimique entre la surface des fibres et la matrice (par exemple le PLA recyclé) :

- La réticulation médiée par la laccase in situ des molécules de lignine ;
- Le couplage des molécules de faibles poids moléculaires (généralement phénoliques) sur des fibres (bio-grafting) (Rencoret *et al.* 2014a).

Tableau 6 : Les molécules greffées dans les fibres ligno-cellulosiques en utilisant la laccase
Source (Kudanga et al. 2011).

Molécules greffées	Matière première	Applications potentielles	Source de la laccase
Phénoliques acides	Papier kraft, résineux pulpe	Amélioration des propriétés mécaniques (augmentation de l'indice de traction)	<i>Trametes villosa</i>
Phénoliques amines	Bois hêtre	Faciliter le grafting, la création d'une surface réactive stable	<i>Trametes villosa</i>

1.1.3. Productions des enzymes par la fermentation à l'état solides

De nos jours, dans le monde industriel, les récentes avancées technologiques ont insisté sur l'importance de la biomasse ligno-cellulosiques (constituée principalement d'une association de polymères : la lignine, l'hémicellulose et lacellulose) comme une des ressources naturelles les plus importantes sur terre (Farinas 2015b), cependant l'exploitation de cette matière génère une grande quantité de déchets agricoles et industriels (Tableau 7). Ces déchets peuvent être réutilisés et reconstituent des matières premières aux industries de transformation à vocation biotechnologique.

Sachant que cette utilisation a un impact minime sur l'environnement et sur les écosystèmes naturels ; le recyclage des matières organiques doit se faire selon des approches biologiques, microbiologiques, biochimiques et écologiques. De part leurs multiples rôles et leurs aptitudes d'adaptation, les microorganismes possèdent des capacités de biodégradation, grâce à l'implication de leurs systèmes enzymatiques (Pandey, Soccol et Mitchell 2000).

Actuellement, dans le secteur industriel, la production des enzymes ligninolytiques s'effectue selon les procédés de la fermentation à l'état solide. Ce mode de fermentation, utilisé depuis des siècles dans la production alimentaire, a considérablement évolué (Farinas 2015a), vu qu'elle représente des potentialités quant à sa valorisation biotechnologique, son avantage économique et sa retombée environnementale, Ce type de fermentation correspond à la multiplication des microorganismes dans des conditions physiques, chimiques et biochimiques

très spécifiques (Pandey, Soccol et Mitchell 2000). Parmi les microorganismes qui sont capables de produire une quantité importante d'enzymes ligno-cellulosiques, on peut citer :

- *Trichoderma reesei* qui est capable de produire la cellulase à partir d'un substrat riche en matière cellulosique (exemple : fibres de chanvre) (Fang et Xia 2015);
- *Trametes versicolor* qui est capable de produire une variété d'enzymes oxydatives principalement les laccases qui dégradent les composées phénoliques et non-phénoliques liés à la lignine ainsi que les polluants organiques (Gassara *et al.* 2010).

De récentes études ont rapporté la forte demande des enzymes lignolytiques et cellulolytiques dans le secteur industriel ; ces enzymes peuvent être potentiellement utilisées dans plusieurs domaines à caractéristiques pharmaceutique, biotechnologique et agro-industrielle (Hirano *et al.* 2000).

Dans ce chapitre, nous présenterons la technologie de la fermentation à l'état solide (SSF) ainsi que les généralités sur les champignons les plus couramment utilisés dans ce type de fermentation, ainsi que leurs applications dans le secteur industriel.

1.1.3.1. Principe de la fermentation à l'état solide

La fermentation à l'état solide est parmi les modes de fermentation les plus utilisés dans le domaine biotechnologique ; ce procédé porte sur la production des produits propres ou à valeur ajoutée comme les enzymes et le biodiesel (Pandey 2003). Les substrats utilisés dans cette fermentation sont constitués, pour la plupart, de déchets recyclables qui peuvent être valorisés et considérés comme une source de carbone réutilisable, ou comme un support pour la biomasse présente dans la fermentation (Singhania *et al.* 2009). Dans la plupart des cas, le substrat peut être classé sous deux formes :

- Un matériau inerte, choisi comme un substrat pour la fixation des micro-organismes ;

- Un matériau non-inerte : un substrat à double rôle, utilisé pour la fixation des micro-organismes et comme une source d'énergie pour leur développement (Couto et Sanromán 2005).

Tableau 7 : Les molécules graffitées dans les fibres ligno-cellulosiques en utilisant la laccase.

Continent	Déchets (%)
Afrique	2,85
Amérique	5,08
Asie	91,3
Europe	0,3
Océanie	0,23

Le principe de la fermentation en milieu solide est quasi-identique à celui de la fermentation conventionnelle ; la différence réside dans la nature du substrat (liquide ou solide) et également dans les conditions physico-chimiques qui contrôlent la prolifération et la croissance des microorganismes, tels que l'humidité, la température et l'oxygène (Figure 6) (Pandey 2003). Généralement les champignons filamenteux sont les microorganismes les plus adaptés à ce type de fermentation. Comme nous l'avons constaté, le procédé reste parmi les procédés les plus avantageux ; il est peu coûteuse (faible consommation d'énergie), facile à contrôler et très productif en termes d'enzymes. Cependant, la fermentation en milieu solide possède des inconvénients comme le nombre limité des microorganismes actifs ; leur implication catalytique reste localisée, efficace seulement à petite échelle (Singhania *et al.* 2009).

Actuellement, la fermentation à l'état solide est l'une des méthodes les plus utilisées dans le secteur industriel ; elle est en perpétuelle évolution. Son objectif principal est de produire différents produits à valeur ajoutée comme : les enzymes, les acides organiques et les acides gras. Cette évolution est due principalement à l'amélioration des bioréacteurs et au développement de la modélisation dans ce type de fermentation. Les enzymes produites à partir de cette fermentation sont appliquées au développement des procédés tels que : la

biorestauration et la bio-remédiation des sites contaminés par les bio-pesticides, les biocarburants et les bio-surfactants (Pandey 2003).

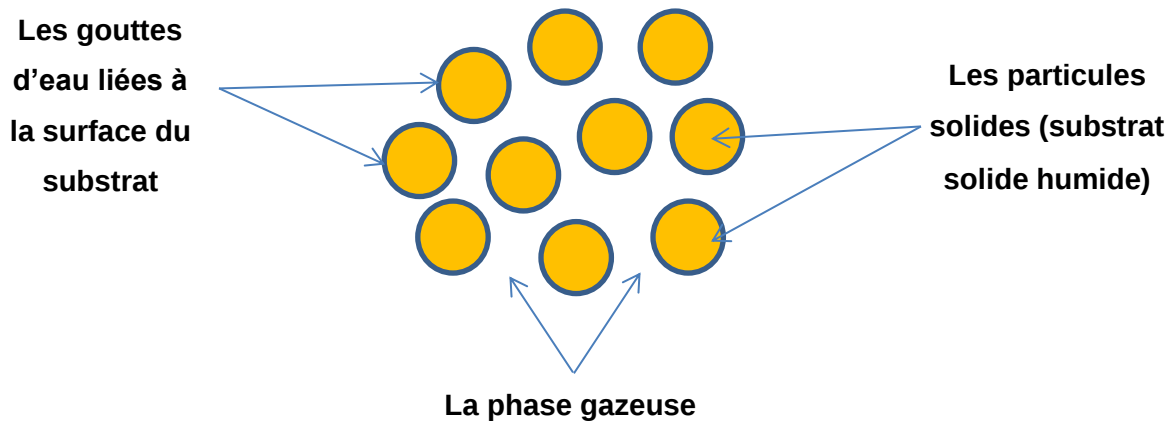


Figure 6 : Principe de la fermentation à l'état solide

1.1.3.2. Généralités sur les champignons : *Trichoderma reesei* et *Taramates versicolor*

- *Trichoderma reesei*

Le *Trichoderma reesei* est un champignon de sol, il est parmi les champignons filamenteux les plus producteurs des enzymes cellulosiques à partir d'une biomasse naturelle. Au cours des dernières années, plusieurs études ont montré la grande productivité des enzymes qui dégradent les parois cellulaires des plantes, principalement la cellulase qui est potentiellement utilisable dans l'hydrolyse des matériaux ligno-cellulosiques (Pandey 2003). À l'échelle industrielle, la quantité de la cellulase produite par le *Trichoderma reesei* dépasse 100g/l (Pandey 2003; Fang et Xia 2015)

- *Tramates versicolor*

Le *Tramates versicolor* est un champignon de pourriture du bois capable de produire des enzymes oxydatives comme les lacasses en utilisant de la matière ligninolytique. Grâce à ces enzymes, il est capable de dégrader la lignine et l'hémicellulose. Dans l'industrie papetière, elles (ces enzymes) jouent un rôle essentiel dans le processus du traitement des fibres utilisées dans la fabrication du papier (Reid *et al.* 1990).

1.1.3.3. L'utilisation du *Trichoderma reesei* et *Taramates versicolor* dans le secteur industriel

La production des enzymes cellulolytiques est l'une des caractéristiques importantes des champignons, appartenant aux genres *Trichoderma* (*T.reesei* et *T.riride*)(Treesukon Treebupachatsakul1 2015). Dans le secteur industriel, cette production a connu une grande évolution, suite à l'intérêt porté sur la valorisation de la biomasse ligno-cellulosique qui est naturellement abondante et disponible (Treebupachatsakul et al. 2016).

Le *Trichoderma reesei* est largement utilisé dans la production de la cellulase, qui reste une enzyme clé dans l'hydrolyse enzymatique de la biomasse ligno-cellulosique pour des fins de production de biocarburants de deuxième génération ou la production d'autres produits à valeur ajoutée (Sun et Cheng 2002; Gusakov 2011).

Le *Tramates versicolor* est parmi les micro-organismes les plus adaptées et convenables à la bio-production des enzymes ligninolytiques qui sont potentiellement appliquées dans le traitement enzymatique de la matière lignocellulosique ; les enzymes obtenues permettent la dégradation de la lignine présente dans la biomasse. Ainsi, le *T.versicolor* constitue le meilleur choix pour la bio-production des oxydants qui seront utilisés dans la délignification de la matière ligno-cellulosique (Shi, Chinn et Sharma-Shivappa 2008). Les applications des enzymes ligninolytiques, principalement la laccase, restent importantes et diversifiées :

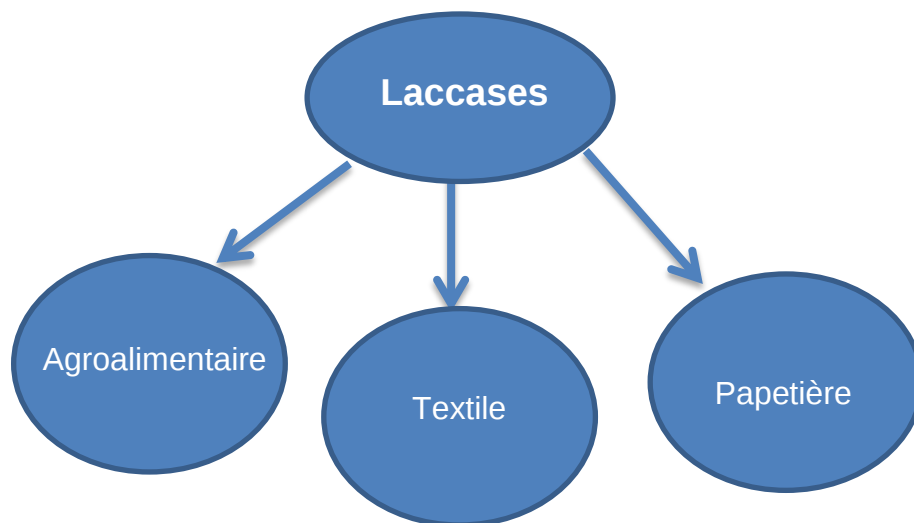


Figure 7 : Applications de la laccase dans l'industrie.

- Dans l'industrie alimentaire, la laccase est appliquée dans la modification et l'amélioration de la couleur des aliments et des boissons par l'élimination des composées phénoliques, responsables de la formation de la turbidité (Couto et Herrera 2006; GASSARA 2012).
- Dans l'industrie papetière, plusieurs travaux de recherche ont montré l'efficacité du traitement par la laccase ; celle-ci joue un rôle dans la délignification et la formation des radicaux réactifs. De même, elle peut être utilisée dans l'activation de la surface des fibres cellulosiques (Couto et Herrera 2006).
- Dans l'industrie de textile, l'utilisation de la laccase montre un développement remarquable ; elle est largement utilisée pour décolorer des effluents, blanchir les textiles et même synthétiser les colorants. (Couto and Herrera 2006).

1.2. Hypothèses de recherche, approches méthodologique et expérimentale

1.2.1. Hypothèses de recherche

Le recyclage des emballages plastiques fabriqués à partir de l'acide poly lactique (PLA), issu de centre de tri de Québec est une problématique environnementale émergente et un défi industriel et technologique ; étant donné que les propriétés mécaniques du PLA recyclé sont très faibles, le renforcement du PLA recyclé par des fibres cellulosiques pourrait offrir une solution efficace. Les fibres cellulosiques lorsqu'elles sont utilisées comme renfort améliorent plusieurs propriétés mécaniques telles que la rigidité et la résistance à la traction. Ce travail porte sur « l'amélioration des propriétés de PLA recyclé, à travers sa combinaison avec des fibres cellulosiques extraites à partir des bio-solides papetières ». À l'issue de cette étude, un nouveau bio-composite sera développé et caractérisé en termes de propriétés mécaniques par rapport au PLA recyclé.

L'approche est basée sur deux hypothèses de recherche qui sont compatibles et complémentaires :

1.2.1.1. Hypothèse 1

Les techniques classiques d'extraction des fibres cellulosiques à partir de la biomasse ligno-cellulosique consistent à éliminer l'hémicellulose, la lignine et la pectine afin de libérer des microfibrilles cellulosiques (MFC) ; en utilisant généralement de l'acide sulfurique à des concentrations très élevées (50%-80%). Un nouveau procédé d'extraction des microfibrilles pourrait être utilisé pour minimiser le recours aux produits chimiques ainsi que la quantité d'énergie dépensée. En effet, l'utilisation de la technologie de la microonde pourrait être considérée comme une alternative efficace et économique en termes d'énergie et de concentration d'acide.

1.2.1.2. Hypothèse 2

Les procédés de traitements enzymatiques des fibres cellulosiques permettent de modifier les propriétés de la surface des microfibrilles cellulosiques (MFC). L'activation des fibres cellulosiques par les enzymes oxydoréductases (laccases) pourrait favoriser l'adhésion interfaciale fibres-matrice, par l'élimination des impuretés qui résident à la surface des fibres cellulosiques. De même, les enzymes de la famille cellulase permettraient de contrôler la taille des fibres cellulosiques.

1.2.2. Objectifs

1.2.2.1. Objectif ultime

L'objectif principal de cette étude est le développement des bio-composites à partir des fibres cellulosiques et de PLA recyclé en utilisant les boues de l'industrie papetière comme source de fibres cellulosiques.

1.2.2.2. Objectifs spécifiques

Pour développer un nouveau bio-composite à partir des fibres cellulosiques, issues de bio-solides papetiers et de PLA recyclé, nous avons fixé plusieurs des sous-objectifs à atteindre :

- Mise en place d'une nouvelle technique d'extraction des fibres à partir des bio-solides en utilisant la technologie de microonde ;
- Traitement enzymatique des fibres cellulosiques en utilisant les enzymes cellulases et les enzymes laccases,
 - i. La production de ces enzymes par fermentation à l'état solide ;
 - ii. Le contrôle de la taille des fibres cellulosiques et l'activation de leurs surfaces par les enzymes produites lors de la fermentation.
- Développement de bio-composites et réalisation des tests mécaniques (tension et impact).

1.2.3. Méthodologie de recherche

- Pour atteindre l'objectif ultime de cette étude, nous avons élaboré une démarche méthodologique qui comporte trois parties essentielles (Figure 8) :
- la première partie consiste à développer et à optimiser une méthode d'extraction des microfibrilles en utilisant les boues primaires et mixtes de l'industrie papetière comme source de fibres cellulosiques. En particulier, lors de l'optimisation, la méthodologie de surface (RSM), basée sur le plan composite centré, a été utilisée pour déterminer les conditions optimales.
- La deuxième partie de cette étude porte sur la production des enzymes laccases et cellulases par fermentation à l'état solide (FSS) en utilisant les résidus des fibres de chanvre et les boues mixtes de l'industrie papetière comme substrats,
- Dans la troisième partie, les fibres cellulosiques seront traitées avec ces enzymes puis utilisées comme renfort pour la matrice à base de PLA recyclé. Les tests mécaniques

standard (ASTM D₂₅₆, ASTM D₆₃₈) seront réalisés afin d'optimiser la quantité de renfort utilisé pour avoir à la fin un bio-composite avec des propriétés mécaniques souhaitées.

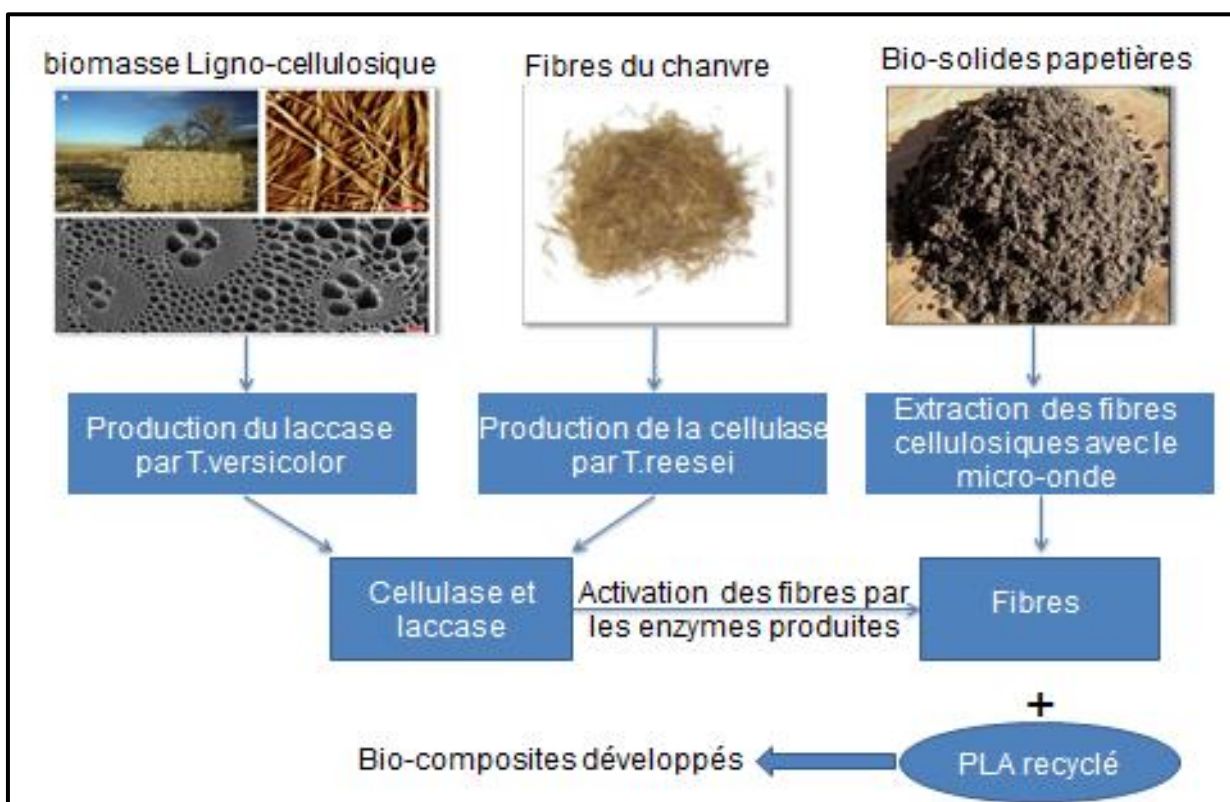


Figure 8 : Organigramme des étapes méthodologiques.

1.2.3.1. Méthodologie expérimentale

1.2.3.1.1. Préparation d'inoculum

- *Trametes versicolor*

Le champignon *Trametes versicolor* (figure 9 (A)) a été cultivé dans le milieu gélose dextrose de pomme de terre (PDA) (C = 39g/l autoclave à T=121°C pour 20 min), ensuite *T. versicolor* a été maintenu dans le milieu préparé précédemment et incubé à T=30 ± 1 °C pendant 14 jours (Lorenzo *et al.* 2002).

- *Trichoderma reesei*

Le champignon *Trichoderma reesei* (figure 9 (B)) a été utilisé dans ce travail pour produire les enzymes cellulases. *T. reesei* a été cultivé d'abord dans un milieu de culture de dextrose de pomme de terre (PDB) (pH=4,8) et incubé à 28 ± 1 °C pendant 3 jours ; puis dans un second

milieu de dextrose de pomme de terre agar-agar (PDA) à 30 ± 1 °C pendant 3 jours. Les spores collectées sont conservées à 4°C (Awafo *et al.* 1996).

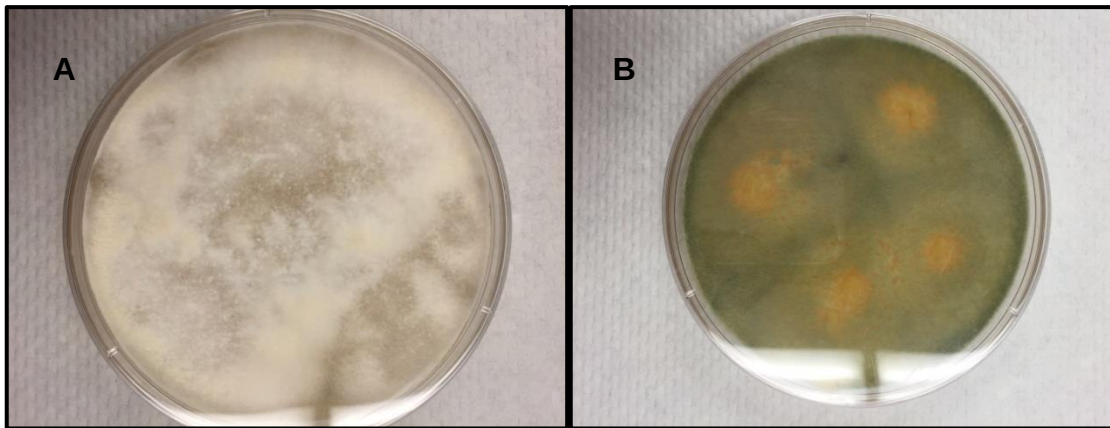


Figure 9: A et B représentent une image de *Tramètes versicolor* et *Trichoderma reesei* respectivement

1.2.3.1.2. Préparation des milieux de culture

- Fibres du chanvre

Les fibres de chanvre ont été utilisées comme substrat de la fermentation à l'état solide, elles ont été coupées en morceaux de 1 cm à 2 cm de long. Ce substrat à base de chanvre est composé principalement de la cellulose avec un pourcentage de 78% (exprimé par rapport au poids de la matière sèche). Le Tableau ci-dessous contient la composition des fibres de chanvre (Oomah *et al.* 2002).

Tableau 8 : La composition des fibres de chanvre (Oomah *et al.* 2002a).

Compositions	Le pourcentage (%) (poids sec)
Humidité	03,07
Protéine	23,90
Cellulose	78
Fibres	17,30
Lignine	04,35

- Les bio-solides de l'industrie papetière

Les bio-solides de l'industrie papetière (primaires et mixtes) ont été utilisés comme substrat pour la production de laccase vue qu'il contient 30% de la matière ligno-cellulosique. Le substrat a été séché à $T=60^{\circ}\text{C}$ pendant 24h (la siccité 21 %, solides totaux $9,7 \pm 0,65$ % pour les biosolides primaires et mixtes)

1.2.3.1.3. Fermentations à l'état solide et échantillonnage

20 g de bio-solides papetière ont été stérilisés dans un erlenmeyer de 500 ml pendant 20min, 15 psi, et à 121°C . L'humidité de milieu de fermentation ainsi que son pH ont été ajustés respectivement à 6.5 et à 75 % (v/w). Par la suite, il a été inoculé avec une boîte de pétri pour chaque 20 g du substrat, par la suite le milieu a été incubé à $T= 30^{\circ}\text{C}$ pendant deux semaines (Gassara et al. 2010).

Le deuxième milieu de fermentation a été préparé dans un erlenmeyer de 500 ml contenant 14 g de fibres du chanvre autoclavées pendant 20 min, à 15 psi et à 121°C . L'humidité a été ajustée à 65 %, puis le milieu de fermentation a été inoculé avec 3% (v/v) d'une suspension de spores 10^6 - 10^7 (spores par mL) de *T. reesei*, à la fin le milieu de fermentation a été incubé à $T= 30^{\circ}\text{C}$ pendant 15 jours (Wen, Liao et Chen 2005).

- L'échantillonnage a été réalisé chaque 24h pour déterminer le profil de production des enzymes cellulases (endoglucanase, exoglucanase et bêta-glucosidase).

Après la fermentation, l'extraction des enzymes produites a été réalisée :

- Pour la laccase : en utilisant le tampon sodium de phosphate (50mM, pH=6,5), le mélange a été incubé pendant 1h, à 150 tours par minute, $T=30^{\circ}\text{C}$ par la suite centrifugé pendant 20min, 7000g (Gassara et al. 2010).
- Pour les cellulases : en utilisant l'eau distillée contenant 0,1% (v/v) de Tween-80 comme tampon, le mélange a été incubé pendant 30 min, 200 tours par minute puis centrifugé pendant 30min, 11000g (Awafo et al. 1996).

1.2.3.1.4. Extractions des fibres cellulosiques

Les bio-solides papetiers ont été utilisés comme source de fibres cellulosiques, l'extraction a été réalisée en utilisant un procédé physico-chimique qui se base sur l'utilisation de la

technologie microonde (1000W) et l'utilisation de l'acide sulfurique (H_2SO_4) avec une concentration entre 0,5% -2,5% (V/V) (Shafiei, Kumar et Karimi 2015).

La planification des expériences a été réalisée en utilisant un plan central composite (PCC). La méthodologie de la réponse de surface (RSM) a été par la suite utilisée pour déterminer les conditions optimales en termes de réduction de la taille des fibres en fonction de temps, la température et la concentration de l'acide sulfurique (Tableau 9) (Karimi 2015). Ces paramètres ont été choisis après une série de travaux de pré-optimisation et en se basant sur la revue de littérature

Tableau 9 : Paramètres utilisés.

Niveaux	Temps (min)	Température (°C)	Concentration d' H_2SO_4 (%)
-1	2,50	86,36	0,12
0	95	120,00	1,30
+1	187,50	153,64	2,48

H_2SO_4 : acide sulfurique ;

L'optimisation de la technique d'extraction par micro-onde a été réalisées pour les boues primaires et mixtes respectivement.

1.2.3.1.5. Traitement enzymatique des fibres cellulosiques

Le traitement enzymatique a été réalisé dans un erlenmeyer de 200ml avec 4 g de bio-solides primaires/mixtes après traitement par micro-onde. Les fibres extraites (à partir de boues primaires et mixtes séparément) ont été mélangées avec les enzymes produites par FSS (cellulase 15 U /gps, laccase 20 U/gps) (Figure 10). Le mélange a été incubé dans un agitateur (100 tours par minute pendant 7 jours à pH = 4,8, T = 30 °C) (Tabka *et al.* 2006).

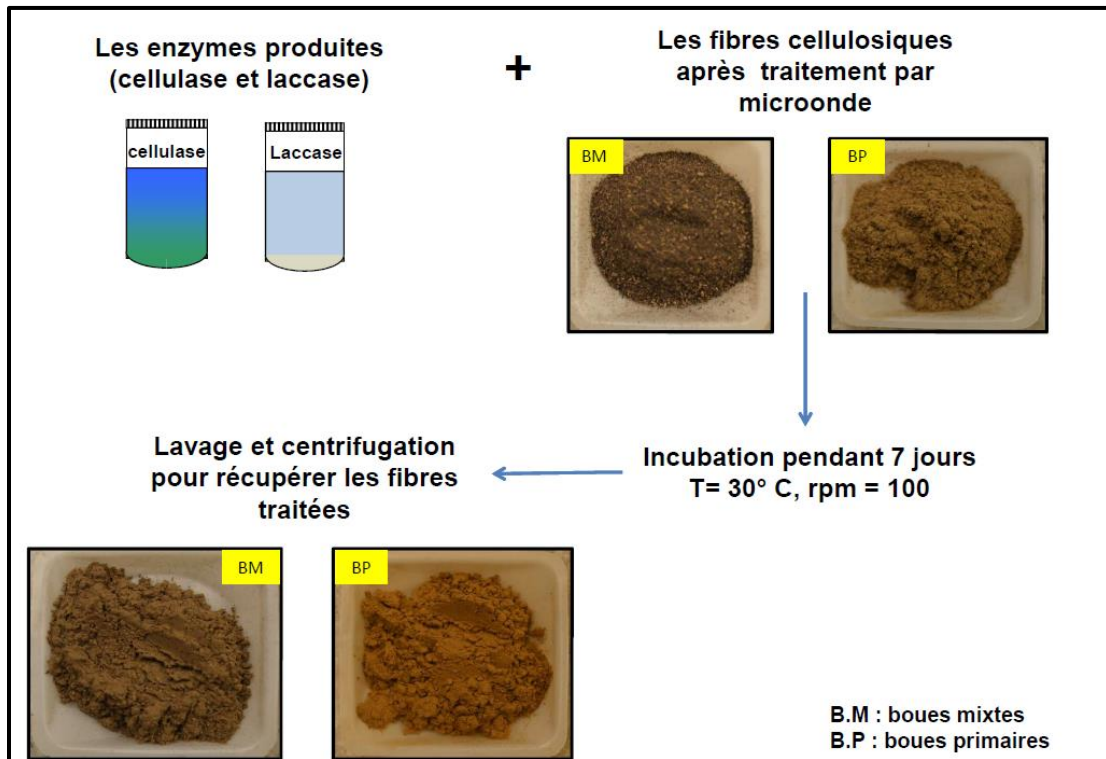


Figure 10 : Organigramme des étapes du traitement enzymatique.

1.2.3.1.6. Préparation des bio-composites

Les échantillons des bio-composites ont été préparé en mélangeant à sec la matrice de PLA recyclé avec les fibres cellulósiques traitées par les enzymes (Figure 11). Les tests mécaniques ont été réalisés selon les standards : ASTM D-638 (type IV) pour l'essai de traction et 127 mm de longueur x largeurs de 12,7 mm pour le test d'impact. Au cours de ces essais nous avons testé différents pourcentages (2%, 5%, 10%, 15%) de fibres cellulósiques non-traitées et traitées enzymatiquement.

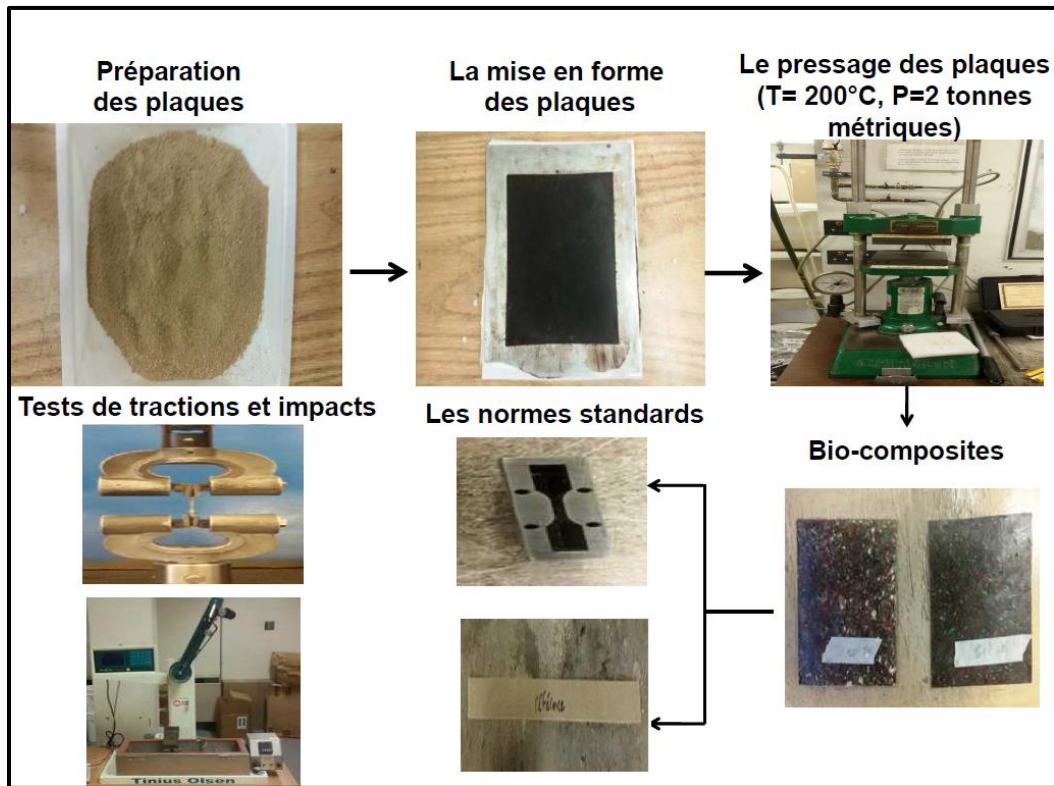


Figure 11 : Organigramme des étapes préparatoires de bio-composites.

1.2.3.2. Méthodologie analytique

1.2.3.2.1. Mesures de l'activité enzymatique

– Endoglucanase

L'activité enzymatique a été déterminée selon la méthode Qin Zhang, et al, 2006. Une solution tampon d'acétate de sodium (0,05M, pH=5) a été préparée avec 1% de CMC carboxyl-méthyl-cellulose, 280 µl de cette solution a été mélangée avec 1 ml de CMC et a été incubée pendant 30 min à une température de 50°C. La réaction est arrêtée en ajoutant 3ml d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (1%). La quantité du sucre réduit a été mesurée pour déterminer l'activité enzymatique de l'endoglucanase. Ainsi :

$$\text{L'activité enzymatique de l'endoglucanase} = \text{le sucre réduit en mg/ml} * 0,66$$

– β-glucanase

Pour la mesure de l'activité enzymatique de β-glucanase, nous avons préparé une solution tampon d'acétate de sodium (0,05 M, pH=5) contenant 2% d'Avicel, 1 ml de cette solution est ensuite mis en réaction avec 1 ml d'enzymes, le mélange obtenu a été incubé pendant 30 min à une température de 40°C. Après l'addition de 3ml d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) pour l'arrêt de la réaction ; le mélange final a été incubé pendant 5 min à une température de 100°C. L'activité enzymatique du β-glucanase a été déterminée par l'équation ci-dessous : (Zhang, Lo et Ju 2007)

$$\text{L'activité enzymatique } \beta\text{-glucanase} = \text{le sucre réduit en mg/ml} * 0,185$$

– β-glucosidase

L'activité enzymatique des β-glucosidase a été déterminée par la méthode de Ghose 1987 ; une solution a été préparée et qui contient 3 ml contenant le cellubiose avec une concentration de 15 mM, 1ml d'une solution tampon de citrate (pH=4,8) et 1ml de notre échantillon, ce mélange réactionnel a été incubé pendant 30 min à une température de 50°C, après, 3ml d'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) ont été ajoutés. La solution finale a été incubée pendant 5 min à une température de 100°C. L'activité enzymatique est calculée par la formule suivante : (Zhang, Lo et Ju 2007)

$$\text{L'activité enzymatique } \beta\text{-glucosidase} = \text{le sucre réduit en mg/ml} * 0,0926$$

– Laccase

L'activité des laccases a été mesurée en utilisant le 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique acide) (ABTS) comme substrat à 420 nm ($\epsilon_{420} = 36000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $T = 45^\circ\text{C}$). Le mélange d'essai contient (0,5 ml, 0,5 mM) ABTS (2,58 ml, 0,1 M) de tampon de citrate de phosphate à pH égale à 4 et 0,02 ml d'enzyme. L'oxydation d'ABTS sera déterminée à une longueur d'onde A420, (Gassara *et al.* 2010).

1.2.3.2.2. Caractérisation morphologiques des fibres cellulosiques

Dans le cadre de ces travaux, le microscope électronique à balayage (MEB, Carl Zeiss EVO 50) a été utilisé pour la caractérisation morphologique des fibres cellulosiques primaires et mixtes avant et après l'extraction par microonde et le traitement enzymatique. La taille des fibres a été mesurée par l'analyseur de la taille des particules par diffusion laser (modèle DL-3147-165, longueur d'onde 650nm) avant et après chaque traitement.

1.2.3.2.3. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

La spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (FTIR) (NICOLET IS50 FT-IR) a été utilisée durant ces travaux de recherche pour déterminer principalement les groupes fonctionnels avant et après le traitement par microonde et enzymatique pour les boues mixtes, primaires et également acide poly lactique PLA recyclé.

1.2.3.2.4. Diffraction aux rayons X (XRD)

La diffraction aux rayons X (XRD) a été utilisée pour analyser la structure cristalline des boues primaires et mixtes avant et après le traitement enzymatique. Le modèle Siemens D5000 avec une Lampe et une anode au Cuivre ayant une longueur d'onde ($\lambda = 1,54059 \text{ \AA}$), la puissance appliquée était de l'ordre de 40kV 30mA - Kristalloflex Générateur 710-H, 1g de l'échantillon sous forme d'un poudre fine ($\leq 100 \text{ }\mu\text{m}$) a été mis dans le support en plastique pour les analyses.

1.2.3.2.5. Les essais mécaniques

Les tests mécaniques ont été effectués selon les normes standards : ASTM D-638 (type IV) pour l'essai de traction (le modèle de l'appareil Instron 5565) et 127 mm de longueur x largeurs de 12,7 mm pour le test d'impact (le modèle de l'appareil Tinius Olsen Impact 104).

1.3. Résultats et discussion

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication scientifique, sous le titre de : « Développement d'un nouveau bio-composite à partir des fibres cellulósiques traitées et des plastiques recyclés à base de l'acide poly lactique (PLAr).

Dans la synthèse qui suit, nous exposons les principaux résultats obtenus durant ce projet de maîtrise :

1.3.1. La production des enzymes ligno-cellulosiques,

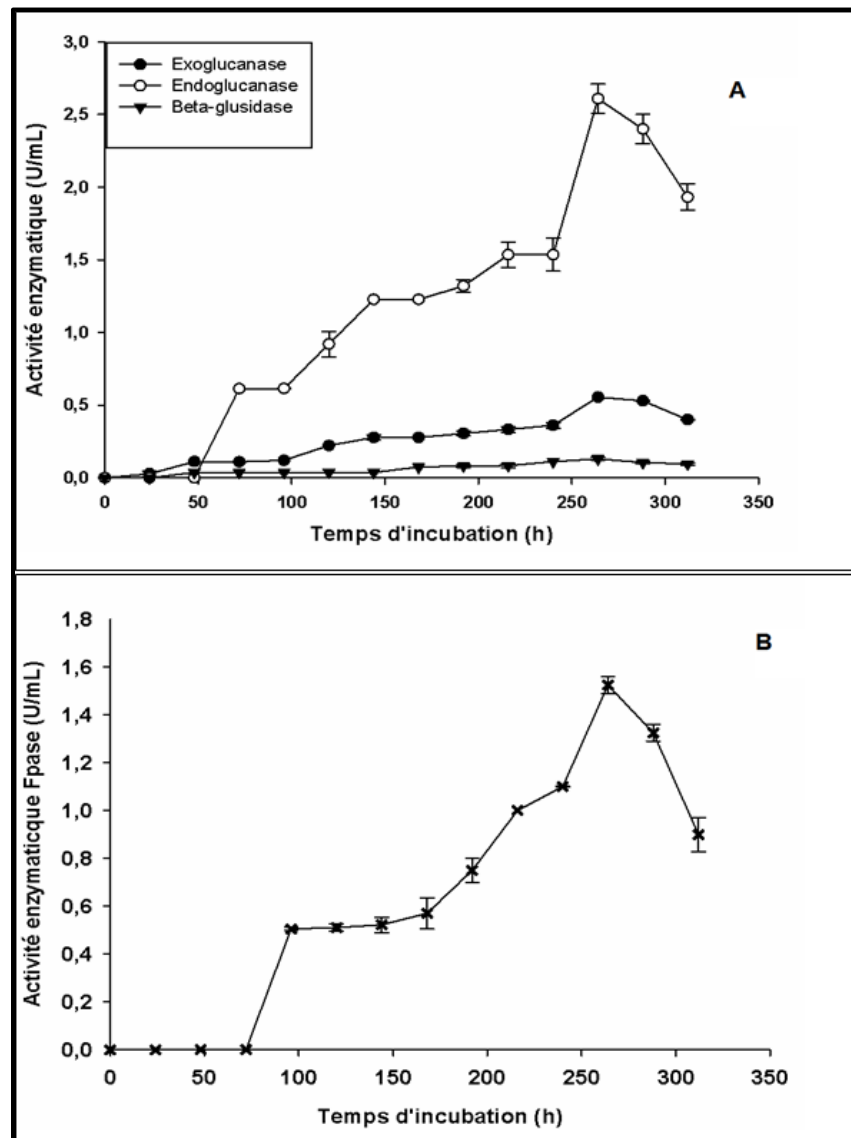


Figure 12: L'activité enzymatique pour : (A) exo and endo-glucanase, β -glucosidase et (B) Fpase cellulaire.

Les enzymes ligno-cellulosiques (cellulase et laccase) ont été produites par fermentation à l'état solide, en utilisant les fibres du chanvre et les boues mixtes de l'industrie papetière comme substrats. Selon le suivi de la cinétique de production des enzymes cellulases (endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase et cellulase) durant la fermentation, nous avons pu atteindre le maximum de production après 12 jours de fermentation (Figure 12). L'activité enzymatique mesurée était de $26 \pm 0,1$ U/gps pour endoglucanase, 5,5 U/gps pour exoglucanase, $1,2 \pm 0,01$ U/gps pour β -glucosidase et $15,2 \pm 0,5$ U/gps pour la cellulase. En ce qui concerne les laccases, elles ont été produites par fermentation à l'état solide aussi avec une activité enzymatique maximale de l'ordre de $50,4 \pm 6,9$ U/gps atteinte après 12 jours de fermentation (Gassara *et al.* 2010), en utilisant Twen-80 comme inducteur.

Nous avons constaté que les quantités produites dans cette étude sont sensiblement proches de celles citées dans les travaux de recherche qui ont utilisé le prétraitement du substrat comme une étape essentielle avant la fermentation (Fang et Xia 2015),

1.3.2. L'extraction des fibres cellulosiques en utilisant la nouvelle technique de microonde

Cette partie consiste à extraire les fibres cellulosiques issues de bio-solides (mixtes et primaires) de l'industrie papetière par la technique de microonde. Pour atteindre cet objectif, nous avons réalisé une optimisation en se basant sur le plan central composite (PCC), en utilisant le logiciel Design-Expert version 7 et en testant deux types de bio-solides papetiers mixtes et primaires. Durant cette optimisation, la réponse étudiée est la taille des fibres cellulosiques qui a été réduite en fonction du temps, de la température et de la concentration de l'acide sulfurique, selon la méthode de la réponse de surface (RSM).

Tableau 10 : La conception de centrale composite pour les bio-solides mixtes et primaires

Series	Temperature (°C)	Temps (min)	C acide (% v/v)	La taille des fibres cellulosiques mixtes (µm)	Ecart-types pour les fibres cellulosiques Mixtes	La taille des fibres cellulosiques primaires (µm)	Ecart-types pour les fibres cellulosiques primaires
1	-	-	-	1746	±50.89	894	±46.67
2	100.00	150.00	2.00	624.62	±94.71	644.79	±71.57
3	120.00	187.50	1.30	664.68	±74.615	623	±120.32
4	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
5	140.00	40.00	2.00	486.51	±56.38	296.03	±30.17
6	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
7	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
8	100.00	40.00	2.00	785.34	±66.01	894.61	±30.17
9	100.00	40.00	0.60	1162.07	±86.39	467.38	±10.13
10	100.00	150.00	0.60	948.65	±79.81	578.91	±34.57
11	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
12	120.00	2.50	1.30	1274.32	±85.25	784.74	±41.42
13	140.00	40.00	0.60	450.91	±28.35	307.86	±14.17
14	120.00	95.00	2.48	341.98	±51.334	318.17	±87.68
15	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.485	502.17	±68.08
16	140.00	150.00	2.00	386.68	±43.45	293.97	±34.57
17	140.00	150.00	0.60	973.62	±14.36	450.89	±24.90
18	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.485	502.17	±68.08
19	120.00	95.00	0.12	1746	±61.43	786.28	±30.87
20	86.36	95.00	1.30	894.44	±108.72	689.15	±70.85
21	153.64	95.00	1.30	447.23	±68.84	440.51	±59.40

D'après le Tableau 10, résumant les différents essais qui ont été effectués, nous remarquons que la taille des fibres pour les boues mixtes et primaires varient respectivement entre 1746,71 μm et 341,98 μm et entre 894,61 μm et 293,97 μm , les valeurs minimales de la taille des fibres cellulosiques mixtes et primaires ne dépassent guère respectivement les valeurs de 341,98 μm et 293,97 μm . L'optimisation réalisée durant cette étape expérimentale a permis de définir les conditions optimales suivantes :

- Dans le cas des fibres cellulosiques mixtes, la température est fixée à 120°C, avec un temps = 95min et la C_{acide} est égale à 2,48% ;
- Dans le cas des fibres cellulosiques primaires, la température est égale à 140°C, le temps par conséquent est de 150min ; la C_{acide} est de 2%.

Tableau 11 : ANOVA pour les fibres cellulosiques primaires et mixtes (A : température, B : temps, C : C_{acide})

Sources	P-value Les bio- solides primaires	P-value Les bio- solides Mixtes
A : Température	0,0567	0,0395
B : Temps	0,2929	0,0117
C : C_{acide}	0,0157	0,0002
AB	0,3081	0,0581
AC	0,0386	0,6767
BC	0,0900	0,1458
A²	0,8861	0,0070
B²	0,0983	0,5164
C²	0,7452	0,8905
ABC	0,4216	0,951
A²B	0,3585	0,0300
A²C	0,0102	0,0076

C_{acide} : Concentration d'acide

Le Tableau 11 présente les résultats de p-value pour les fibres cellulosiques mixtes et primaires; selon ces résultats, le p-value enregistré pour la concentration de l'acide sulfurique est inférieur à 0,05. Ce qui indique alors que la concentration de l'acide sulfurique est le paramètre le plus influent dans les séries d'expérience pour les deux substrats utilisés.

Les équations finales permettant le calcul de la taille des fibres pour les boues primaires et mixtes sont indiquées ci-dessous :

- Les boues primaires :

$$\begin{aligned} \text{Taille des fibres } (\mu\text{m}) = & +506.56 - 98.23 * A - 48.09 * B - 139.17 * C + 34.91 * A * B - 82.73 * A * C - \\ & 63.30 * B * C + 7.91 * A^2 + 42.62 * B^2 - 11.00 * C^2 + 27.03 * A * B * C \\ & + 48.42 * A^2 * B + 179.7 * A^2 * C - 56.38 * A * B^2 \end{aligned}$$

- Les boues mixtes :

$$\begin{aligned} \text{Taille des fibres } (\mu\text{m}) = & +938.12 - 132.96 * A - 181.25 * B - 417.63 * C + 99.63 * A * B + 18.68 * A * C - \\ & 71.23 * B * C - 127.49 * A^2 - 21.90 * B^2 + 4.56 * C^2 - 84.41 * A * B * C + 187.34 * A^2 * B + 261.12 * A^2 * C - \\ & 19.91 * A * B^2 \end{aligned}$$

Le modèle permettant le calcul de la taille des fibres cellulosiques extraites pour les boues primaires et mixtes est significatif avec un p-value de 0,0157 pour les fibres cellulosiques primaires et de 0,0002 pour les fibres cellulosiques mixtes. En résumé, le traitement par microonde a été efficacement employé pour l'extraction des fibres cellulosiques et la réduction de leurs tailles.

1.3.3. L'effet des enzymes ligno-cellulosiques sur les fibres cellulosiques extraites

Le traitement enzymatique a été réalisé en utilisant les enzymes ligno-cellulosiques (cellulase et laccase) produites par la fermentation à l'état solide. Ce type de traitement est appliqué pour réduire la taille des fibres cellulosiques par les cellulases ainsi que l'activation de leur surface par les laccases. Durant cette modification enzymatique, nous avons analysé deux types de substrats : les fibres cellulosiques obtenues à partir des boues mixtes et les fibres cellulosiques obtenues à partir des boues primaires (les fibres sont extraites par la technique microonde).

Pour évaluer les effets du traitement enzymatique et son potentiel effet sur l'adhésion interfaciale entre les fibres cellulosiques et la matrice à base de l'acide poly lactique recyclé (PLAr), nous avons procédé aux techniques d'analyses à la diffraction aux rayons X (XRD), au microscope électronique à balayage (MEB) et à la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR).

1.3.3.1. Analyse à la diffraction aux rayons X

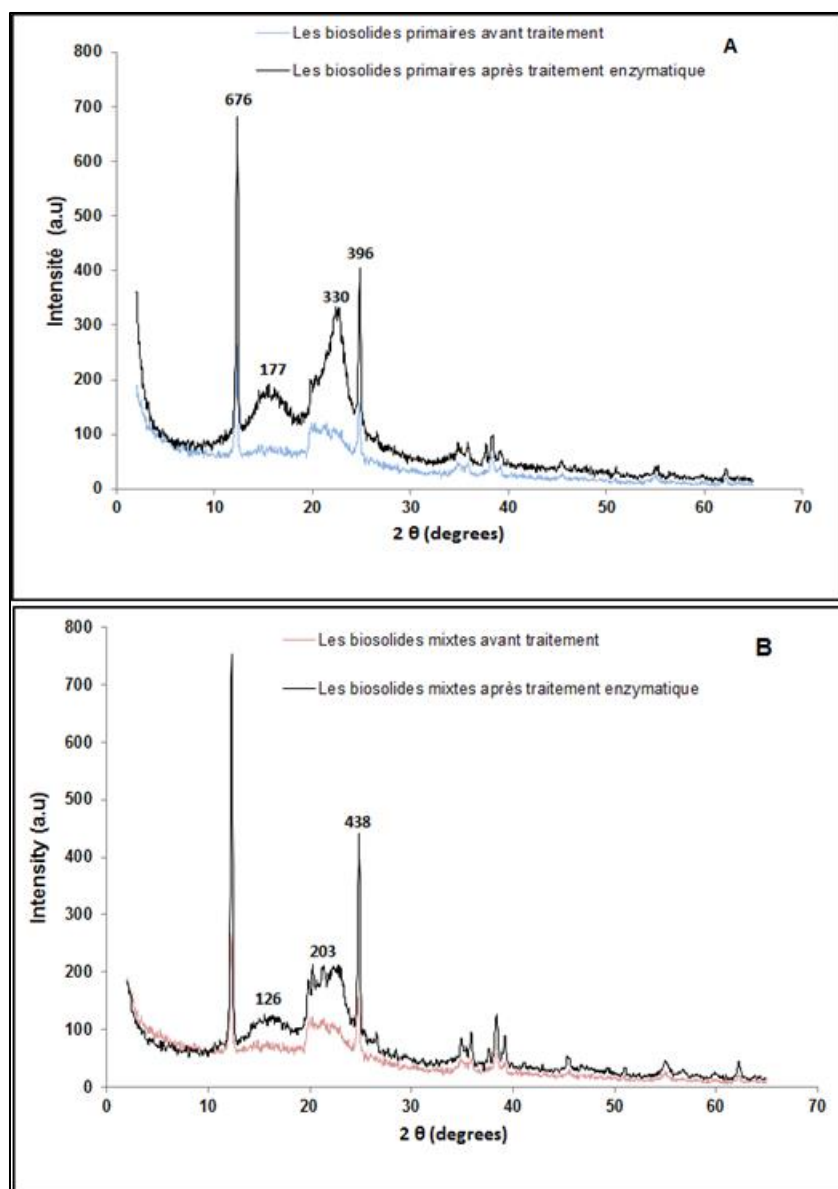


Figure 13 : Les spectres d’XRD pour les fibres cellulosiques primaires (A) et mixtes (B) avant et après le traitement enzymatique.

Les changements de structures des fibres cellulosiques après le traitement enzymatique ont été analysés par la diffraction aux rayons X. Les résultats sont représentés dans la Figure 13, (A) et (B) pour les fibres issues des bio-solides primaires et mixtes respectivement. Concernant, les fibres issues des bio-solides primaires, les principaux pics sont apparus à 12,32, 14,8, 22,2 et

24,86, ce qui correspond respectivement à des plans de diffraction (676), (117), (330) et (396). Quant aux fibres issues des bio-solides mixtes, nous constatons que la majorité des pics sont apparus à 12,34, 14,84, 21,03 et 24,82, correspondant respectivement aux plans (749), (126), (203) et (438). Les résultats montrent également que, dans les fibres cellulosiques primaires et mixtes et, les régions cristallines sont largement présentes, avec un pourcentage élevé, par apport à des régions amorphes (Pickering *et al.* 2011a).

1.3.3.2. Analyse au microscope électronique à balayage

Les résultats d'analyse des fibres cellulosiques primaires et mixtes au microscope électronique à balayage (MEB), avant et après le traitement enzymatique sont présentés dans la Figure 14.

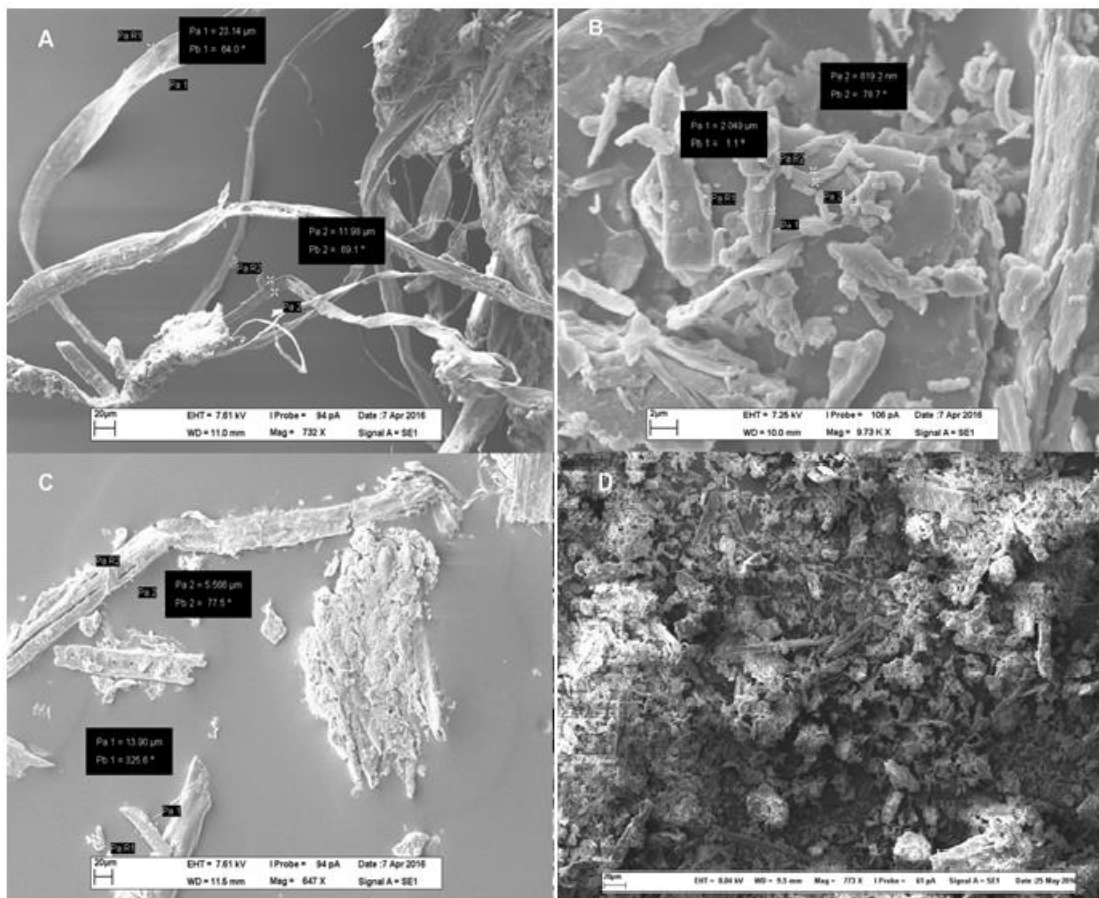


Figure 14 : Images de microscope électronique à balayage (MEB) pour les bio-solides papetiers avant (A, C) et après (B, D) le traitement enzymatique; (A,B) fibres cellulosiques mixtes, (C, D) fibres cellulosiques primaires.

À partir de la Figure 14, nous constatons un changement remarquable dans la morphologie structurale après chaque traitement à savoir le traitement par microonde et le traitement

enzymatique. D'une façon générale, La taille des fibres cellulosiques mixtes et primaires a été sensiblement réduite à une taille micrométrique (entre 280 μm et 350 μm) après le traitement par microonde et le traitement enzymatique.

Il est à noter que les propriétés mécaniques de bio-composites dépendent de la longueur des fibres qui peuvent être affectées par le type du traitement appliqué.

1.3.3.3. Analyse au spectroscope infrarouge à transformée de Fourier

La Figure 15 (A et B) présente les spectres de FTIR avant et après le traitement par microonde et le traitement enzymatique respectivement.

Il ressort les remarques suivantes :

- Le pic de vibration entre 1636 cm^{-1} et 1664 cm^{-1} , caractérisant le groupement fonctionnel carboxyle acide ou esters, a été diminué suite à la dégradation de l'hémicellulose ;
- le pic de vibrations 1263 cm^{-1} , relatif au groupement fonctionnel acétyle qui est omniprésent dans la structure de la lignine, a disparu ce qui signifie que, après le traitement par microonde des bio-solides papetiers, la dégradation de la lignine est totale.
- En comparant les spectres avant et après le traitement par microonde, nous remarquons l'apparition claire d'un pic de vibration 2900 cm^{-1} qui caractérise le groupement C-H, marquant la présence de la cellulose.

Par conséquent, le traitement par microonde a été efficace pour extraire les fibres cellulosiques présentes dans les bio-solides papetiers mixtes et primaires.

Notons de même que, après le traitement enzymatique, nous remarquons des changements au niveau des spectres de FTIR, Ils concernent les points suivants :

- Le pic de vibration entre 1664 cm^{-1} et 1629 cm^{-1} qui caractérise le groupement fonctionnel ester ou carboxyle, a subi une réduction, suite à la dégradation de l'hémicellulose ;
- Le pic de vibrations 2923 cm^{-1} a été diminué, dû à la dégradation de la cellulose et l'hémicellulose ;
- l'apparition des pics de vibrations entre 3335 cm^{-1} et 3600 cm^{-1} , caractéristiques du groupement fonctionnel O-H ; ainsi que l'apparition d'un pic de vibration 1509 cm^{-1} correspondant au benzène, indiquant la présence dans de la lignine.

Selon les résultats susmentionnés, il s'est avéré que pour extraire les fibres cellulosiques à partir des bio-solides papetiers, le traitement enzymatique et le traitement par microonde sont

efficaces et complémentaires, Ils permettent la réduction de leur taille, l'élimination totale ou partielle de la lignine et de l'hémicellulose et l'activation de leur surface (Li, Tabil et Panigrahi 2007).

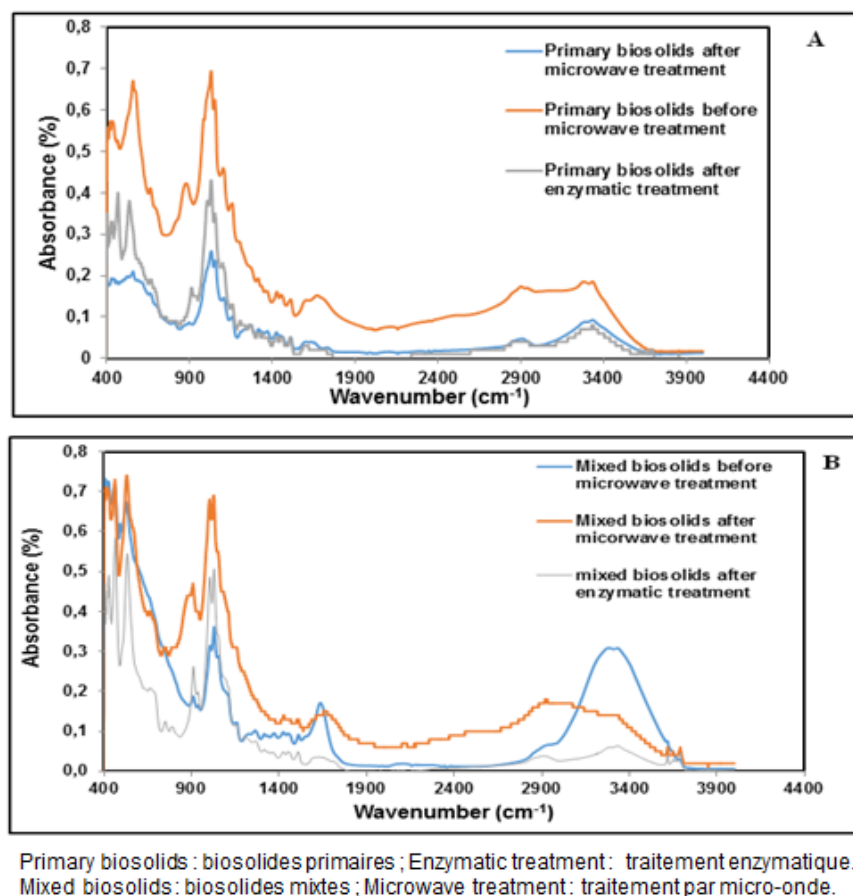


Figure 15 : Les spectres de FTIR pour les fibres cellulosiques primaires (A) et mixtes (B) avant et après le traitement enzymatique.

1.3.4. L'effet du traitement enzymatique sur les tests mécaniques

Tableau 12 : Résultats des tests mecaniques du nouveau biocomposite

			Modules d'Young (MPa)	Contrainte de traction à la rupture (%)	Contrainte de traction Maximale (MPa)
bio- solides primaires	Non-traités	PLA + 2% de fibres	679,7 ± 118,4	6,9 ± 0,6	37,4 ± 5,1
		PLA + 5% de fibres	571,8 ± 59,1	7,1 ± 1,7	29,5 ± 3,5
		PLA + 10% de fibres	592,6 ± 77,9	3,8 ± 0,8	24,6 ± 7,2
	Traités	PLA + 2% de fibres	887,8 ± 3, 6	7, 223 ± 0, 6	41,3 ± 1,7
		PLA + 5% de fibres	649,1 ± 112,1	5, 3 ± 3, 1	41, 1 ± 5, 9
		PLA + 10% de fibres	714,1 ± 52,2	8, 2 ± 0, 8	34,4 ± 6, 3
bio- solides mixtes	Non- traités	PLA + 2% de fibres	687, 3 ± 56, 6	6, 1 ± 2, 3	33,7 ± 8, 8
		PLA + 5% de fibres	598, 7 ± 73,4	6, 1 ± 0, 7	25, 7 ± 3,7
		PLA + 10% de fibres	590, 2 ± 67,8	4, 8 ± 2,8	23, 6 ± 8,6
	Traités	PLA + 2% de fibres	759,8 ± 51,7	7,1 ± 0, 2	37,5 ± 3, 9
		PLA + 5% de fibres	601,1 ± 40,1	5,3 ± 2,9	31, 7 ± 10, 3
		PLA + 10% de fibres	567,9 ± 42,9	1, 7 ± 0,1	5, 2
PLA recyclé			644, 4 ±30, 08	6, 1 ± 0, 8	29, 4 ± 3, 6

Acide poly lactique recyclé, PLAr; fibres ceellulosiques, Fibres ; MPa, megapascal

Durant les tests mécaniques, nous avons testé les fibres cellulosiques traitées enzymatiquement, les formulations obtenues ont été comparées avec l'acide poly lactique recyclé sans fibres cellulosiques.

Les résultats des tests mécaniques pour les différentes formulations des bio-composites fibres cellulosiques-PLA sont représentés dans le Tableau 12, Nous constatons que le module de Young de PLA + 2% de fibres cellulosiques primaires était le plus élevé ($887,8 \pm 36,6$ MPa), environ 37,8% d'amélioration par rapport aux formulations PLA avec 5% ou 10% des fibres cellulosiques primaires et mixtes traités et non traités, Il a apporté une plus grande rigidité de PLA (+ 2% de fibres cellulosiques primaires) par rapport au PLA sans fibres cellulosiques ($658,1 \pm 23,1$ MPa).

La contrainte de traction maximale mesurée durant les tests mécaniques est de ($41,35 \pm 1,764$ MPa) pour l'association PLA + 2% de fibres cellulosiques primaires, en comparaison avec PLA recyclé ($29,4 \pm 3,6$).

La contrainte de traction à la rupture pour PLA + 2% de fibres cellulosiques primaires ($7,2 \pm 0,6\%$) était plus élevée que le PLA recyclé ($6,1 \pm 0,8\%$) et PLA + 2% des fibres cellulosiques primaire non traitées ($6,9 \pm 0,6$ MPa).

Dans l'ensemble, la formulation PLA + 2% de fibres cellulosiques primaires traitées (traitement enzymatique) a donné les meilleurs résultats au niveau des propriétés mécaniques quant à la résistance à la traction, la contrainte de traction maximale et la rupture par rapport au PLA recyclé et aux autres types de plastiques cités dans la littérature (Tableau 13).

Le module d'Young, la contrainte de traction à la rupture et la force de tension au rendement sont statistiquement dépendant des formulations utilisées selon l'ANOVA. Les p value sont de 0,000004 pour le module d'Young, 0,000271 pour la contrainte de traction à la rupture et 0,000007 pour la force de tension au rendement.

Tableau 13 : Comparaison des résultats obtenus avec la littérature.

Matériaux	Module d'Young (Mpa)	Contrainte de traction à la rupture (%)	Force de tension au rendement (Mpa)	Références
Polypropylene (PP)	-	1,5-2	35-40	(Bledzki <i>et al.</i> 2010)
Polyhydroxyalkanoate (PHBv)	400-600	0,5-1	30-40	(Bledzki <i>et al.</i> 2010)
Acide polylactique vierge (PLA)	652-692	11-14	45-47	(Faruk <i>et al.</i> 2012)
Acide polylactique recyclé (PLAr)	644,47 ± 30,086	6,013 ± 0,831	29,499 ± 3,646	La présente étude
PLAr + 2% des fibres cellulosiques primaires traitées	887,83 ± 36,69	7,223 ± 0,623	41,35 ± 1,764	La présente étude

Conclusion et Recommandations

La présente étude a permis de mettre en évidence la possibilité de développer des bio-composites à base de PLAr et de fibres activées avec des propriétés mécaniques intéressantes. Pour ce faire, deux différents traitements ont été utilisés ; l'un pour extraire les fibres cellulosiques et l'autre pour activer la surface des fibres extraites à l'aide des enzymes ligno-cellulosiques.

Afin d'évaluer et d'optimiser les effets de plusieurs paramètres, tels que la température, la concentration de l'acide sulfurique et le temps du traitement, sur la taille des fibres cellulosiques. Nous avons procédé à l'extraction des fibres qui a fait l'objet d'un prétraitement par micro-onde en utilisant la méthodologie de réponse de surface (RSM) et en testant les deux substrats : les boues mixtes et les boues primaires issues de bio-solides papetières, les séries d'expérience montrent que les conditions optimales sont conditionnées par la concentration l'acide sulfurique, dont le p-value est inférieur à 0,05.

Pour le traitement des fibres avec les enzymes laccase et cellulase, les enzymes ont été produites par fermentation à l'état solide, les activités enzymatiques étaient de $50,4 \pm 6,9$ U/gps pour la laccase et de $15,2 \pm 0,5$ U/gps pour les cellulases. L'application de ces enzymes a permis de réduire d'avantage la taille des fibres cellulosiques (par action des cellulases (de $293 \mu\text{m}$ à $142 \mu\text{m}$ pour les fibres cellulosiques primaires, de $341 \mu\text{m}$ à $127 \mu\text{m}$ pour les fibres cellulosiques mixtes) et d'activer leurs surfaces en apportant des modifications microstructurales et cristallines pour une meilleure adhésion entre les fibres cellulosiques et la matrice (l'acide poly lactique)

Les analysés à la diffraction aux rayons X, au microscope électronique à balayage (MEB), au spectroscope infrarouge à transformée de Fourier et les tests mécaniques du nouveau bio-composite ont montré l'intérêt de l'utilisation du traitement enzymatique des fibres cellulosiques.

Ainsi, cette recherche préliminaire a mis en évidence la faisabilité de l'exploitation des fibres cellulosiques et leur utilisation comme renfort pour le PLAr afin d'améliorer ses propriétés mécaniques, l'approche expérimentale utilisée présente une perspective prometteuse. Comme perspectives pour ce travail, on peut proposer :

- L'utilisation des nano-fibres cellulosiques qui pourrait améliorer les propriétés mécaniques des bio-composites, en apportant une meilleure adhérence à la matrice.

- L'amélioration de l'extraction des fibres cellulosiques demeurerait une priorité, en réajustant les conditions expérimentales durant le traitement enzymatique. Un choix mieux approprié de la durée et de la température du traitement serait envisageable, dans le but d'éliminer la totalité des impuretés (hémicellulose, pectine, lignine).
- L'utilisation des quantités de fibres cellulosiques combinées avec la matrice de PLAr à des pourcentages inférieures à 2%.
- L'utilisation d'autres types de fibres cellulosiques pré-hydrolysés issues de la fermentation à l'état solide comme renfort dans l'association avec la matrice de PLAr.

BIBLIOGRAPHIE

Abraham, E., B, Deepa, L, Pothan, M, Jacob, S, Thomas, U, Cvelbar and R, Anandjiwala (2011), "Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: a novel approach," *Carbohydrate Polymers* 86(4): 1468-1475,

Awafo, V, A., D, S, Chahal, B, K, Simpson and G, B, Lê (1996), "Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials," *Applied biochemistry and biotechnology* 57(1): 461-470,

Bitinis, N., R, Verdejo, J, Bras, E, Fortunati, J, M, Kenny, L, Torre and M, A, López-Manchado (2013), "Poly(lactic acid)/natural rubber/cellulose nanocrystal bionanocomposites Part I, Processing and morphology," *Carbohydrate Polymers* 96(2): 611-620,

Bledzki, A, and J, Gassan (1999), "Composites reinforced with cellulose based fibres," *Progress in polymer science* 24(2): 221-274,

Bledzki, A, K., A, A, Mamun, A, Jaszkiwicz and K, Erdmann (2010), "Polypropylene composites with enzyme modified abaca fibre," *Composites Science and Technology* 70(5): 854-860,

Brinchi, L., F, Cotana, E, Fortunati and J, Kenny (2013), "Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications," *Carbohydrate Polymers* 94(1): 154-169,

Couto, S, R, and J, L, T, Herrera (2006), "Industrial and biotechnological applications of laccases: a review," *Biotechnology advances* 24(5): 500-513,

Couto, S, R, and M, A, Sanromán (2005), "Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production," *Biochemical Engineering Journal* 22(3): 211-219,

Dienes, D., J, Börjesson, H, Stålbbrand and K, Réczey (2006), "Production of *Trichoderma reesei* Cel7B and its catalytic core on glucose medium and its application for the treatment of secondary fibers," *Process biochemistry* 41(9): 2092-2096,

Dionisi, D., J, A, Anderson, F, Aulenta, A, McCue and G, Paton (2015), "The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 90(3): 366-383,

Fang, H, and L, Xia (2015), "Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues," *Fuel* 143: 211-216,

Farinas, C, S, (2015), "Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector," *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 52: 179-188,

Farinas, C, S, (2015), "Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector," *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Volume 52, December 2015, Pages 179–

188,

Farooq, A., S, Ali, N, Abbas, G, A, Fatima and M, A, Ashraf (2013), "Comparative performance evaluation of conventional bleaching and enzymatic bleaching with glucose oxidase on knitted cotton fabric," *Journal of Cleaner Production* 42: 167-171,

Faruk, O., A, K, Bledzki, H,-P, Fink and M, Sain (2012), "Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010," *Progress in polymer science* 37(11): 1552-1596,

Filson, P, B,, B, E, Dawson-Andoh and D, Schwegler-Berry (2009), "Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp," *Green Chemistry* 11(11): 1808-1814,

Fletcher, D, (1995), "Steam explosion triggering: a review of theoretical and experimental investigations," *Nuclear engineering and design* 155(1): 27-36,

GASSARA, F, (2012), "PRODUCTION ECONOMIQUE D'ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR FERMENTATION À L'ÉTAT SOLIDE DES DÉCHETS AGROINDUSTRIELS ET LEURS APPLICATIONS," Thèse

Gassara, F,, S, K, Brar, R, D, Tyagi, M, Verma and R, Y, Surampalli (2010), "Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*," *Biochemical Engineering Journal* 49(3): 388-394,

Gusakov, A, V, (2011), "Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production," *Trends in biotechnology* 29(9): 419-425,

Henrissat, B,, H, Driguez, C, Viet and M, Schülein (1985), "Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose," *Nature Biotechnology* 3(8): 722-726,

Hirano, T,, Y, Honda, T, Watanabe and M, Kuwahara (2000), "Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*," *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 64(9): 1958-1962,

Iuliana Spiridon, K, L,, Ana Maria Resmerita a , Raluca Nicoleta Darie (2014), "Evaluation of PLA–lignin bioplastics properties before and after accelerated weathering," *Composites: Part B* 69 (2015) 342–349,

K, Oksmana, M, S,, J,-F, Selinc (2003), "Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites," *Composites Science and Technology* 63 (2003) 1317–1324,

Kalia, S,, K, Thakur, A, Celli, M, A, Kiechel and C, L, Schauer (2013), "Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: a review," *Journal of Environmental Chemical Engineering* 1(3): 97-112,

Karimi, K, (2015), *Lignocellulose-Based Bioproducts*, Springer,

Kudanga, T,, G, S, Nyanhongo, G, M, Guebitz and S, Burton (2011), "Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review," *Enzyme and microbial technology* 48(3): 195-208,

Li, X,, L, G, Tabil and S, Panigrahi (2007), "Chemical treatments of natural fiber for use in natural fiber-reinforced composites: a review," *Journal of Polymers and the Environment* 15(1): 25-33,

Lin, X,-q,, S,-y, Han, N, Zhang, H, Hu, S,-p, Zheng, Y,-r, Ye and Y, Lin (2013), "Bleach boosting effect of xylanase A from *Bacillus halodurans* C-125 in ECF bleaching of wheat straw pulp," *Enzyme and microbial technology* 52(2): 91-98,

- Lo, C.-M., Q, Zhang, N, V, Callow and L.-K, Ju (2010), "Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction," *Bioresource technology* 101(2): 717-723,
- Lorenzo, M., D, Moldes, S, R, Couto and A, Sanroman (2002), "Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*," *Bioresource Technology* 82(2): 109-113,
- Mai, F., W, Tu, E, Bilotti and T, Peijs (2015), "Preparation and properties of self-reinforced poly (lactic acid) composites based on oriented tapes," *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 76: 145-153,
- Marques, S., L, Alves, J, Roseiro and F, Gírio (2008), "Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*," *Biomass and Bioenergy* 32(5): 400-406,
- McMillan, J, D, (1994), *Pretreatment of lignocellulosic biomass*, ACS symposium series (USA),
- Mithun Saha, C, E., Juan Marin (2011), "Microwave, ultrasonic and chemo-mechanical pretreatments for enhancing methane potential of pulp mill wastewater treatment sludge," *Bioresource Technology* 102 (2011) 7815–7826,
- Mwaikambo, L, Y, and M, P, Ansell (2002), "Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization," *Journal of Applied Polymer Science* 84(12): 2222-2234,
- Oomah, B, D., M, Busson, D, V, Godfrey and J, C, Drover (2002), "Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil," *Food Chemistry* 76(1): 33-43,
- Oomah, B, D., M, Busson, D, V, Godfrey and J, C, G, Drover (2002), "Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil," *Food Chemistry* 76(1): 33-43,
- Pandey, A, (2003), "Solid-state fermentation," *Biochemical Engineering Journal* 13(2): 81-84,
- Pandey, A., C, R, Soccol and D, Mitchell (2000), "New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products," *Process biochemistry* 35(10): 1153-1169,
- Panigrahi, X, L, Æ, L, G, T, Æ, S, (2007), "Chemical Treatments of Natural Fiber for Use in Natural Fiber-Reinforced Composites: A Review," *J Polym Environ*,
- Panigrahi, X, L, Æ, L, G, T, Æ, S, (2007), "Chemical Treatments of Natural Fiber for Use in Natural Fiber-Reinforced Composites: A Review," *J Polym Environ*,
- Papinutti, V, and F, Forchiassin (2007), "Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation," *Journal of Food Engineering* 81(1): 54-59,
- Paul, A., K, Joseph and S, Thomas (1997), "Effect of surface treatments on the electrical properties of low-density polyethylene composites reinforced with short sisal fibers," *Composites Science and Technology* 57(1): 67-79,
- Pérez, J., J, Munoz-Dorado, T, de la Rubia and J, Martinez (2002), "Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview," *International Microbiology* 5(2): 53-63,

Pickering, K, L., M, G, A, Efendy and T, M, Le (2015), "A review of recent developments in natural fibre composites and their mechanical performance," *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*,

Pickering, K, L., M, A, Sawpan, J, Jayaraman and A, Fernyhough (2011), "Influence of loading rate, alkali fibre treatment and crystallinity on fracture toughness of random short hemp fibre reinforced polylactide bio-composites," *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 42(9): 1148-1156,

Reid, I, D., M, G, Paice, C, Ho and L, Jurasek (1990), "Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*," *Tappi journal* 73(8): 149-153,

Rencoret, J., E, Aracri, A, Gutiérrez, J, C, del Río, A, L, Torres, T, Vidal and A, T, Martínez (2014), "Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers," *Biochemical Engineering Journal* 86: 16-23,

Rencoret, J., E, Aracri, A, Gutiérrez, C, José, A, L, Torres, T, Vidal and A, T, Martínez (2014), "Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers," *Biochemical Engineering Journal* 86: 16-23,

Rosyida, V, T., A, W, Indrianingsih, R, Maryana and S, K, Wahono (2015), "Effect of Temperature and Fermentation Time of Crude Cellulase Production by *Trichoderma Reesei* on Straw Substrate," *Energy Procedia* 65: 368-371,

Saheb, D, N, and J, Jog (1999), "Natural fiber polymer composites: a review," *Advances in polymer technology* 18(4): 351-363,

Shafiei, M., R, Kumar and K, Karimi (2015), *Pretreatment of lignocellulosic biomass, Lignocellulose-Based Bioproducts*, Springer: 85-154,

Shi, J., M, S, Chinn and R, R, Sharma-Shivappa (2008), "Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*," *Bioresource Technology* 99(14): 6556-6564,

Singhania, R, R., A, K, Patel, C, R, Soccol and A, Pandey (2009), "Recent advances in solid-state fermentation," *Biochemical Engineering Journal* 44(1): 13-18,

Sun, Y, and J, Cheng (2002), "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review," *Bioresource technology* 83(1): 1-11,

Tabka, M., I, Herpoël-Gimbert, F, Monod, M, Asther and J, Sigoillot (2006), "Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment," *Enzyme and Microbial Technology* 39(4): 897-902,

Tang, Y., X, Shen, J, Zhang, D, Guo, F, Kong and N, Zhang (2015), "Extraction of cellulose nano-crystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication," *Carbohydrate polymers* 125: 360-366,

Thompson, G., J, Swain, M, Kay and C, Forster (2001), "The treatment of pulp and paper mill effluent: a review," *Bioresource technology* 77(3): 275-286,

Treebupachatsakul, T., H, Nakazawa, H, Shinbo, H, Fujikawa, A, Nagaiwa, N, Ochiai, T, Kawaguchi, M, Nikaido, K, Totani and K, Shioya (2016), "Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to

commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases," *Journal of bioscience and bioengineering* 121(1): 27-35,

Treesukon Treebupachatsakul¹, H, N., Hideaki Shinbo¹, Hiroki Fujikawa¹, Asami Nagaiwa¹, Nobuhiro Ochiai¹, Takashi Kawaguchi², Mitsuru Nikaido³, Kazuhide Totani³, Koki Shioya¹, Yosuke Shida¹, Yasushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹, , , Hirofumi Okada¹, † (2015), "Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases,"

V,H, Sangeetha, H, D., T,O, Varghese,¹ S,K, Nayak (2016), "State of the Art and Future Prospectives of Poly(Lactic Acid) Based Blends and Composites,"

Wen, Z., W, Liao and S, Chen (2005), "Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure," *Bioresource Technology* 96(4): 491-499,

Wertz, J,-L, (2014), "Les biocomposites et composites polymère-chanvre en particulier,"

Zhang, Q., C,-M, Lo and L,-K, Ju (2007), "Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30," *Bioresource Technology* 98(4): 753-760,

Zhao, C., W, Ding, F, Chen, C, Cheng and Q, Shao (2014), "Effects of compositional changes of AFEX-treated and H-AFEX-treated corn stover on enzymatic digestibility," *Bioresource technology* 155: 34-40,

PARTIE II : L'ARTICLE DE RECHERCHE :

Green synthesis of novel bio-composites from treated cellulosic fibers and recycled bio-plastic poly lactic acid (PLAr)

Le développement d'un nouveau bio-composite à partir des fibres cellulosiques traitées et l'acide poly lactique recyclé (PLAr)

Mohamed Amine Laadila ^{1†}, Krishnamoorthy Hegde^{1†}, Tarek Rouissi¹, Satinder Kaur Brar^{1*},
Ridha Ben Cheikh², Maria Paiva³

¹INRS ETE, Québec, QC, Canada G1K 9A9

²Ecole Nationale d'Ingénieurs de Tunis, Tunisia

³Universidade do Minho, Portugal

[†]Co-first authors

Corresponding author: email: satinder.brar@ete.inrs.ca; Phone: +1 418 654 3116;
Fax: +1 418 654 2600

Journal: Journal of Cleaner Production

Date de la soumission : 03/10/2016

Le numéro : JCLEPRO-D-16-044

Résumé

Les propriétés mécaniques d'un nouveau bio-composite, développé à partir de la combinaison des emballages en plastique (l'acide poly lactique - PLAr) et des fibres cellulosiques traitées, ont été étudiées selon deux types de traitements conjugués: le traitement par micro-onde et le traitement enzymatique pour l'extraction des fibres cellulosiques hydrophiles et la modification de leurs surfaces. Le traitement par micro-ondes a été utilisé pour extraire les fibres cellulosiques à partir des bio-solides primaires et mixtes ; la taille obtenue après l'extraction est respectivement de 293 μm et 341 μm .

Le traitement enzymatique a été effectué pour :

- Contrôler la taille des fibres cellulosiques avec une réduction environ de 50%, par rapport au traitement par micro-onde. Après ce traitement, la taille obtenue est de 142 μm et 127 μm pour respectivement les bio-solides primaires et mixtes.
- Activer les groupements hydroxyles qui résident à la surface des fibres et améliorer l'adhérence des fibres à la matrice.

Les propriétés mécaniques de l'association PLAr + 2% (w / w) de fibres cellulosiques traitées sont remarquables : le module d'Young est de 887,83 MPa, la contrainte de traction au rendement est de 7,22 %, la contrainte de traction à la rupture est de 41,35 MPa par rapport au PLA recyclé. La microscopie électronique à balayage a révélé une réduction de la taille des fibres cellulosiques. Les résultats de diffraction aux rayons X et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier mettent en évidence des modifications chimiques et confirment l'amélioration de l'adhésion interrassiale entre le PLA recyclé et les fibres cellulosiques traitée et par conséquent le développement des propriétés mécaniques au sein du bio-composite obtenu.

Mots clés : bio-composites, fibres cellulosiques, traitement par micro-onde, traitement enzymatique, tests mécaniques

Abstract

The present study investigates mechanical properties of biocomposites developed based on recycled polylactic acid from recycling packaging industry and treated cellulosic fibers from pulp and paper solid waste. Two types of treatments, namely microwave and enzymatic treatments were used for extraction and surface modification of hydrophilic cellulosic fibers. Enzymatic treatment was performed for activation of hydroxyl groups and improvement of adhesion between matrix and fibers including controlling the length of cellulosic fibers with reduction of around 50 % (142 and 127 μm for primary and mixed biosolids, respectively after enzymatic treatment) as compared to microwave treatment, that produced cellulosic fibers of size 293 μm and 341 μm , for primary and mixed biosolids respectively. Mechanical results indicates that biocomposites with 2 % (w/w) of treated cellulosic fibers (Young's Modulus 887.83 MPa with tensile strain at breakpoint of 7.22 %, tensile stress at yield 41.35 MPa) were the highest compared to recycled PLA. Scanning electron microscopy revealed size reduction of cellulosic fibers. The results of X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy confirmed the development of mechanical properties of novel biocomposites by improving of interfacial adhesion between treated cellulosic fibers and recycling polylactic acid after microwave treatment and enzymatic modification.

Keywords: biocomposites, cellulosic fibers, microwave treatment, enzymatic treatment, mechanical tests

1. Introduction

Bioomposites are composed of polymeric matrix and reinforcement. Biocomposites are now evolving as environmental friendly and low cost materials. Numerous studies have shown that synthetic fibers, such as glass fibers and carbon fibers are commonly used as reinforcement for composites materials due to their high mechanical proprieties. In recent times, a wide range of attractive alternative materials that can replace synthetic fibers, such as natural or cellulosic fibers are increasingly being used as 'eco-friendly materials' (Faruk et al., 2012). Natural fibers offer several advantages over synthetic materials as reinforcement composites, such as good mechanical and physical proprieties, high tensile strength and stiffness (Pickering et al., 2016). Furthermore, they are renewable, biodegradable and abundantly available in nature (Karaduman et al., 2013).

There are several types of natural fibers, such as jute, hemp, kenaf, flax, sisal and ramie, which have excellent potential as reinforcement of composites (Saheb and Jog, 1999). However, natural fibers in their native form have many disadvantages, such as poor compatibility with matrix. The poor compatibility between cellulosic fibers and matrix occurs due to hydrophilic nature of cellulosic fibers when used as reinforcement component resulting in poor adhesion and resistance to moisture adsorption of biocomposites. Consequently, pretreatment of natural fibers is necessary to improve the biocompatibility between matrix and fibers, often by the activation of hydroxyl groups of these fibers. The most common methods of pretreatment are, chemical, physical and enzymatic treatments (Henriksson et al., 2007). Chemical modification of fibers, such as treatment with alkali, acid and organic solvents are most useful due to its efficiency in improving compatibility between matrix and fibers (Kabir et al., 2012). Additionally, physical modifications, such as microwave irradiation (MWI) or thermal pretreatment are very efficient in terms of degradation and solubilization of extracellular polymers. Nevertheless, these methods have many disadvantages, such as toxicity of chemicals used in this treatment and high cost of treatment process. On the other hand, enzymatic treatment of natural fibers using enzymes, such as laccase and cellulolytic enzymes have been used for the modification of natural fibers (Henriksson et al., 2007). These methods are environmental friendly, and more efficient in terms of controlled reactions. However, methods that combine physical- enzymatic-chemical-pretreatment showed promising results in terms of delignification, fiber extraction and indirect reduction of fiber size (Saha et al., 2011).

Several fungi are known to produce cellulose modifying extracellular enzymes, of which *Trametes versicolor* and *Trichoderma reesei* have been documented extensively for production

of laccase and cellulolytic enzymes, respectively (Pazarlioglu et al., 2005). Studies have shown that cellulase can modify and degrade lignocellulosic materials and convert them to simple sugars (Perez et al., 2002). Laccase is used for degradation of phenolic compounds (Rencoret et al., 2014), activation of cellulosic fibers and improvement of adhesion between fibers and matrix in composite materials (George et al., 2014). The fact that cellulose is naturally covered by lignin consist of phenolic compounds, its removal by biocatalytic degradation using enzymes, such as laccase improves the interaction of cellulose fraction with polylactic acid leading to an improved adhesion between fibers and matrix. Pulp and paper solid sludge (PPSW) constitutes one third of total waste in Canada. However, only 25 % of PPSW is recycled, and this leads to environmental issues (Oral et al., 2005). PPSW can also be converted to high value products, such as enzymes and bio-products. In addition, PPSW contains high amount of cellulose (Das et al., 2016) so that it could be a potential source for extraction of renewable cellulosic fibers. Polylactic acid (PLA) is gaining attention as an attractive bioplastic because of its unique properties such as, it is biodegradable and renewable, superior hydrophobicity, high tensile strength and high rigidity. PLA can be applied in automobiles, packaging, aerospace and pharmaceutical industries (Bitinis et al., 2013). However, these biopolymers have many disadvantages, such as the molten state, thermal degradation and residence time in the extruder, which consequently affect the recyclability of PLA and decrease the mechanical and physical properties of PLA after each recycle. Nevertheless, these properties can be improved by incorporating cellulosic fibers from PPSW (Mukherjee and Kao, 2011). In addition, recycled PLA (PLAr) become more resistant to biodegradation with increase in number of recycle. The degradability of PLAr could be prolonged up to 24 weeks (Unpublished data of our lab) in comparison to pure PLA, which degrades completely in 5 weeks (Ashter, 2016). Nevertheless, the degradation time can be reduced remarkably to 4-8 weeks by blending PLAr with different percentage of cellulose fibers ranging from 2-30% (Park, 1995).

In the present study, we investigated two types of treatment for cellulosic fibers: a physicochemical method of extraction using microwave irradiation (MWI) with dilute sulfuric acid and an enzymatic treatment for surface activation of extracted fibers. Further, different proportion of these treated cellulosic fibers were used as reinforcement to prepare biocomposites with PLAr to study the effect of treated cellulosic fibers on the mechanical proprieties of biocomposites.

2. Materials and methods

All the chemicals used were of high purity and purchased from Fisher Scientific (Ottawa, Ontario, Canada). Pulp and paper solid waste (PPSW) (kruger Wayagamack Inc, TroisRivieres, Quebec, Canada) was used as source for cellulosic fibers. PLAr ($\leq 600\mu\text{m}$) was procured from Gaudreau Environment (Victoria Ville, Quebec).

2.1. Enzyme production

2.1.1. Laccase production

Fungal strain, *Trametes versicolor* (ATCC-20869) was used for production of laccase enzyme using pulp and paper solid waste (PPSW) as carbon source (410 g per kg dry substrate of total carbon). PPSW was washed and dried at 60 °C for 24 hours and used as substrate in solid state fermentation (SSF).

T. versicolor was freshly grown from stock in potato agar dextrose (PDA) at 30 °C for 3 days and used as inoculum. The SSF was carried out in PPSW supplemented with Twen 80 at 0.5 % (v/v) (moisture adjusted to 75 % (w/w) with sterilized water), the medium was inoculated with fresh culture from PDA plate and grown at 30 °C for 15 days (Pazarlioglu et al., 2005).

2.1.2. Cellulolytic enzyme production

Fungal strain, *Trichoderma reesei* (NRRC-207F) was used for production of cellulolytic enzymes (Endoglucanase, β -glucanase, β -glucosidase and Cellulase) using hemp fiber as carbon source (70 % w/w of cellulose). The fibers were cut into small pieces of 1 to 2 cm in length and used as substrate for fermentation (Awafo et al., 1996).

T. reesei was freshly grown from stock in PDA plate at 28 °C for 3 days and the spores used as inoculum. The SSF medium with 20 g of solid substrate was taken in 500 mL Erlenmeyer flasks, the moisture was adjusted to 75 % (w/w) with sterilized water and the pH was adjusted to 6.5). The medium was inoculated with *T. reesei* spores 106-107 (spores per mL) from PDA plate and grown at 30 °C for 15 days (Wen et al., 2005).

2.2. Enzyme extraction

Laccase enzyme extraction was performed in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5). The SSF medium was mixed with buffer at ratio of 20:1 (v/w), for 1 h with constant stirring and centrifuged at 7000g for 20 min at 4 °C. The supernatant was used as source of crude enzyme for further studies and analysis (Gassara et al., 2010).

Cellulolytic enzyme extraction was performed in sterile distilled water with 0.1 % Tween 80 as extraction buffer. The SSF medium was mixed with extraction buffer at ratio of 4 g per 100 mL with constant stirring for 30 min and centrifuged at 11000g for 30 min at 4 °C. The supernatant was used as source of crude enzyme for further studies and analysis (Awafo et al., 1996).

2.3. Enzyme assay

2.3.1. Laccase

Laccase activity was determined according to the method described by Gassara et al. (2010). In brief, the reaction mixture consisted of 1.5 mM 2, 2-azino bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) in 100 mM phosphate-citrate buffer (pH 3.5). The reaction mixture was incubated in 0.2 mL reaction volume for 20 min at 45 °C. The oxidation of ABTS was spectrometrically determined at 420 nm. One unit of laccase activity was defined as the quantity of enzyme required to oxidize 1 μ mol of ABTS per min.

2.3.2. Endoglucanase

The endoglucanase assay was performed according to the method described by Zhang et al. (2007). In brief, the reaction mixture contained 50 mM sodium acetate buffer (pH 5) with 1 % carboxyl-methyl-cellulose (CMC). About one mL reaction mixture was incubated with 0.28 mL of enzyme solution at 50 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 3 mL of 1 % 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS). The amount of reducing sugar was measured (using spectrophotometer at 540 nm) to calculate the enzymatic activity of endoglucanase.

2.3.3. Exoglucanase

The exoglucanase assay was performed according to the method described by Zhang et al. (2007). In brief, the reaction mixture contained 50 mM sodium acetate buffer (pH 5) with 2 % Avicel suspension. 1 mL reaction mixture was incubated with 1 mL enzyme at 40 °C for 30 min. The reaction was stopped by adding 3 mL of 1 % DNS. The final mixture was incubated for 5 min at 100 °C. The activity of β -glucanase was determined spectrometrically at 540 nm.

2.3.4. β -glucosidase

β -glucosidase assay was performed according to the method described by Zhang et al. (2007). In brief, the reaction mixture contained 15 mM cellubiose in 15 mM of citrate buffer (pH 4.8). 1 mL reaction mixture was incubated with 1 mL enzyme at 50 °C for 30 min. The reaction was

stopped by adding 3 mL of 1 % DNS. The final mixture was incubated for 5 min at 100 °C. The activity of β -glucosidase was determined spectrometrically at 540 nm.

2.3.5. Filter paper cellulase assay (FPase)

The cellulase assay was performed as follows. The reaction mixture contained 125 μ L of enzyme solution in 250 μ L of 50 mM sodium citrate buffer (pH 4.8) with Whatman filter paper (Whatman no. 1. 0.25 mm pore size, 1.5 cm diameter). The mixture was incubated at 50 °C for 30 min. the cellulase activity was calculated using the concentration of reducing sugar. One international unit of FPase activity is the amount of enzyme that forms 1 mmol of glucose.

2.4. Cellulose extraction from pulp

The microwave treatment (MWT) was performed for both primary and mixed PPSW collected from pulp and paper industry wastewater treatment plant to extract cellulosic fibers. epaper waste water plant after pretreatment or primary treatment. The mixed biosolids is a mixture of primary sludge and secondary sludge (obtained after biological treatment) in 4:6 ratio.

2.4.1. Ball milling grinder treatment

Primary and mixed PPSW was grinded using Ball milling in a planetary ball mill (PM100; Retsch Corporation) at 25 °C. Grinding was performed in a 500 mL stainless steel jar with 15 g of primary or mixed PPSW using stainless steel balls with a diameter of 2.4 mm. The number of balls was fixed to 800, which was equal to 45 g (Schwanninger et al., 2004)

2.4.2. Microwave treatment (MWT)

The microwave treatment of primary and mixed PPSW samples was performed as follows. The sample was treated within the range of 300 MHz to 300 GHz frequency (1000 W power) for both mixed and primary PPSW. The pretreatment was performed at different time intervals (30, 60, 90 and 120 min) at various temperatures (80, 100, 120, 140 °C) in presence of dilute sulfuric acid (0.5-2 % (v/v)). After MWT, cellulosic fiber sample was centrifuged at 9000g for 30 minutes at 25 °C and the supernatant was discarded. The sample was washed several times with distilled water till the pH reach 7. The washed sample was dried in an oven at 60 °C for 24 h and used for the further experiments

2.5. Statistical Analysis of microwave treatment

The cellulose extraction from pulp was optimized using statistical design (using *statistical Analysis System Software Version 7*) for higher yield. The central composite design was used in

order to design experiments of size reduction for primary and mixed cellulosic fibers using response surface methodology (RSM), with 3 factors (temperature, time and sulfuric acid concentration) and one response length of cellulosic fibers using 20 runs as represented in Supplementary Table. 1 (Mithun Saha 2011). All the experiments were carried out in duplicates and the average and standard deviation were calculated. An analysis of variance (ANOVA) was used considering *P-value* < 0.05 as significant (Rouissi *et al.* 2013).

2.6. Enzymatic treatment

The cellulose extraction from pulp was optimized using statistical design (using statistical Analysis System Software Version 7) for higher yield. The central composite design was used to design experiments of size reduction for primary and mixed cellulosic fibers using response surface methodology (RSM), with 3 factors (temperature, time and sulfuric acid concentration) and one response length of cellulosic fibers using 20 runs as represented in Supplementary Table. S1 (Saha *et al.*, 2011). All the experiments were carried out in duplicates and the average and standard deviation were calculated. An analysis of variance (ANOVA) was used considering *P-value* < 0.05 as significant (Rouissi *et al.*, 2013).

2.7. Matrix and cellulosic composite preparation and treatment

The extracted cellulosic fibers after MWT were subjected to an enzymatically surface modification. The aim of this treatment is to activate cellulosic fibers by activating hydroxyl groups. About 4 g of cellulosic fibers from primary and mixed biosolids (after MWT) was used for surface modification using different combinations of cellulolytic enzyme (15 U/g) and laccase (20 U/g) in 200 mL working volume (100 mM phosphate-citrate buffer pH 4.8). The reaction was performed at 30 °C with constant shaking at 100 rpm for 7 days. The samples were then taken out periodically for various analysis and further experiments (Tabka *et al.*, 2006).

2.8. Analysis of mechanically and enzymatically modified fibers and biocomposites

Particle size was measured using laser scattering particle size distribution analyzer (model DL-3147-165, output 5 mW, Wavelength 650 nm) for both primary and mixed PPWS, the fiber size was measured before and after MWT and enzymatic treatment.

Scanning electron microscopy (SEM), (Carl Zeiss EVO 50) was used to investigate the size and morphology of fibers extracted from PPSW before and after microwave and enzymatic

treatment. The samples for SEM were prepared by mounting PPSW on SEM grid using (SPI module sputter cotter) with gold.

The changes in the functional groups of the cellulose at different stages of microwave and enzymatic treatment were analyzed using Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (NICOLET IS50 FT-IR). The samples were prepared as filaments.

X-ray diffraction (XRD) (Siemens D5000) was used for characterization of molecular structure for two organic materials, viz. primary and mixed biosolids. The experiment was performed using fine powder of the samples at 40 kV per 30 mA power for lamp using Cu lamp ($\lambda=0.154059$ nm).

The mechanical characterization of the prepared bio-composites was performed using two conventional tests. The tensile strength test (model Instron 5565) and the impact tests (model Tinius Olsen 104) were performed to analyze the mechanical proprieties of novel biocomposites. The analyses were completed according to standards ASTM D638 (type IV) and ASTM D256 for the tensile strength and impact tests, respectively. An ANOVA was used to evaluate the significance of difference between the biocomposite formulations used. Difference was considered significant at $P\text{-value} < 0.05$ (α was fixed to 0.05). Bonferroni's post hoc analysis was applied for the comparison between the biocomposite formulations used (Hochberg, 1988).

3. Results and discussion

3.1. Enzyme production and activity

The enzymes used for the cellulose modification was produced using renewable and waste material as a feedstock by SSF. The laccase production using PPWS as sole carbon source and Tween 80 as inducer showed maximum production after 12 days of fermentation with 50.4 ± 6.9 U/g dry substrate (U/gds).

Fig. 16 depicts the production profile of cellulolytic enzymes from *T. reesei*. Hemp fibers with around 78% cellulose were found to be excellent substrate for cellulolytic enzyme production. Under optimal fermentation conditions (moisture content 75%, pH 6.5, 14 days of incubation at 30°C), the maximum production of endoglucanase, exoglucanase, β -glucosidase and cellulase was found to be 26 ± 0.1 U/gds, 5.5 U/gds, 1.2 ± 0.01 U/gds and 15.2 ± 0.5 U/gds, respectively. There are numerous reports on production of cellulolytic enzymes using various substrates (Mandels, Hontz et Nystrom 1974; Awafo *et al.* 1996). However, we found that hemp fibers is one of the low cost and abundantly available substrate and also it contains high amount of cellulose compared to corn stover and rice straw, which can be used for sustainable enzyme production from *T. reesei*. The enzyme production in this study is highly comparable to other result of fermentation using substrates, such as corn stover pretreated with sodium hydroxide (Fang et Xia 2015).

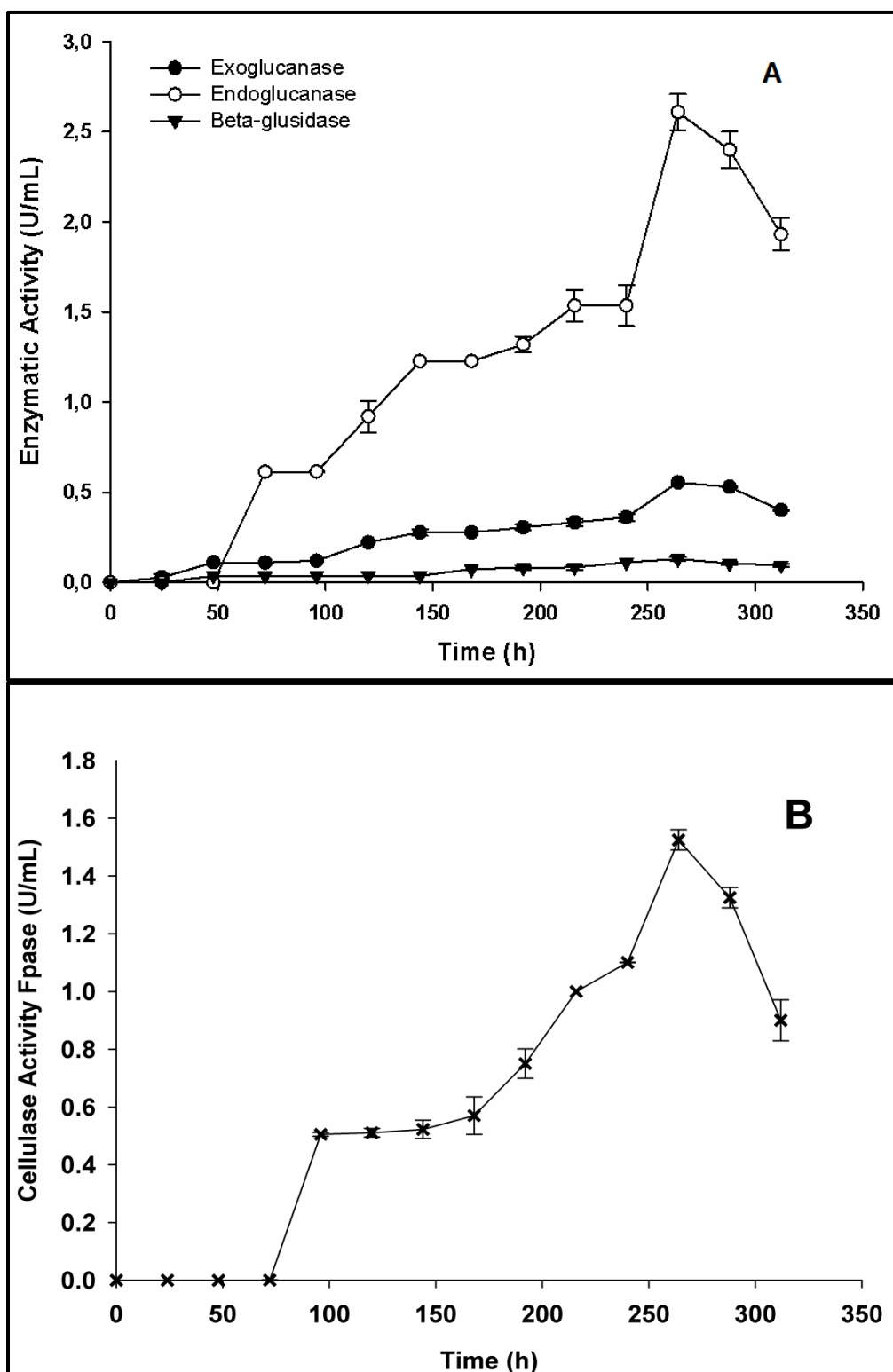


Figure 16 Enzymes profiling for: (A) exo and endo-glucanase, β -glucosidase and (B) Fpase cellulase (hemp fibers as solid-state fermentation)

3.2. Cellulosic fiber extraction using MWT from pulp

The cellulose fibers were extracted from PPWS using MWI and dilute sulfuric acid 0.5% - 2.5% (v/v) for improving extraction yield and using eco-friendly method. This extraction was performed for two different substrate form PPWS primary and mixed wastes, which contained high amount of cellulosic fibers according to (Gassara *et al.* 2010). The extraction process yielded around 75% cellulose after combined physical and chemical treatment (Chen *et al.* 2011b).

As reported by (Graupner *et al.* 2016; Virtanen *et al.* 2016), the size of cellulosic fibers used as reinforcement of composite is very critical and influence the mechanical proprieties of biocomposites. To find the optimum process conditions for cellulose fiber extraction with reduced size using primary and mixed PPWS, surface response methodology was used to optimize the physio-chemical process parameters, viz., temperature, time and concentration of dilute sulfuric acid. The results, according to the corresponding design matrix for primary and mixed biosolids are listed in Supplementary Table II. Variation in the treatment time, temperature and concentration of acid inferred that the reduced fiber size is strongly associated with the process parameters. Wide variation of fiber size from 894 μm (run No. 1) to 293 μm (run No. 16) for primary biosolids and 1746 μm (run No. 1) 341 μm (run No. 14) for mixed biosolids, reflect the importance of the parameter optimization. Our study indicated that primary biosolids yield smaller cellulose (293 μm) in comparison to mixed biosolids (341 μm). Further, it is interesting to see that the optimum temperature and time to obtain minimum size cellulose fiber from primary biosolids was 100°C and 40 min, respectively at 2% acid, whereas for mixed biosolids, all the three parameters, viz., temperature, time and acid concentration for treatment increased to 120°C, 95 min and 2.48%, respectively. The variation in treatment parameters and yield of smaller cellulose fiber might be attributed to degradation of fiber-coat substances, such as hemicellulose pectin and lignin. The decomposition of covering substances started at 200°C up to 315°C (Morán *et al.* 2008). In fact, MWT using low concentration of sulfuric acid was highly efficient in terms of energy compared to other reported treatments, which were performed with high temperature or high concentration of chemicals (Chen *et al.* 2011a; Saha, Eskicioglu et Marin 2011).

The validation of the results analyzed by ANOVA is shown in Supplementary Table 2. As seen in Supplementary Table III, the two models have p-value 0.0002 and 0.0157 which is less than minimum limit value of 0.05, indicating statistical significance. According to p-value, the parameter that influences the optimal condition for length of cellulosic fibers in case of treated mixed and primary PPSW with MWT is the concentration of sulfuric acid and temperature as

reported by (Taherzadeh et Karimi 2008). Thus, optimal conditions for mixed and primary biosolids were 150°C, 95 min 2.48 % of sulfuric acid and 140°C, 150 min 2 % of sulfuric acid, respectively.

3.3. Effect of enzymatic treatment on cellulosic fibers

Enzymatic treatment was performed for both primary and mixed cellulosic fibers with laccase and cellulolytic enzymes for reducing size of fibers and also activation of interfacial hydroxyl groups of these fibers (Henriksson *et al.* 2007). These two enzymes have been extensively reported for treatment of natural fibers for their specific action on the fibers (Faruk *et al.* 2012). The effect of enzymatic treatment using laccase and cellulolytic enzymes was investigated for primary and mixed biosolids of fiber length 293 μm and 341 μm , respectively. Fig. 17 represented size variation of primary and mixed cellulosic fibers after enzymatic treatment. As evident from Fig. 2, after 7 days of incubation with the size of cellulosic fibers was reduced from 293 μm to $142 \pm 17.6 \mu\text{m}$ for primary biosolids and 341 μm to $127 \pm 5.65 \mu\text{m}$ for mixed biosolids. On the other hand, the combination between laccase and cellulolytic enzymes showed removal of hemicellulose, digestibility of cellulose by reducing the size and elimination of phenolic compounds, such as hydroxyl groups (Heap *et al.* 2014). The combination of the two can prevent aggregation problems of fibers in the novel bio-composites as it can negatively influence mechanical properties of bio-composites (Bledzki, Jaszkiwicz et Scherzer 2009; Heap *et al.* 2014). The synergistic effect of laccase and cellulolytic enzymes on the primary and mixed biosolids was further analyzed by various analytical techniques, viz., SEM, FTIR and XRD and discussed in the further sections.

The enzymatic treatment proved that laccase and cellulolytic enzymes are highly efficient for PPSW cellulosic fiber treatment. Further, laccase and cellulase eliminated most of the coating substances in the surface, such as hemicellulose, pectin and lignin producing fibers with higher roughness and superior hydrophobicity for various applications, such as reinforcement of composite and also replacement for carbon fibers (George, Mussone et Bressler 2014).

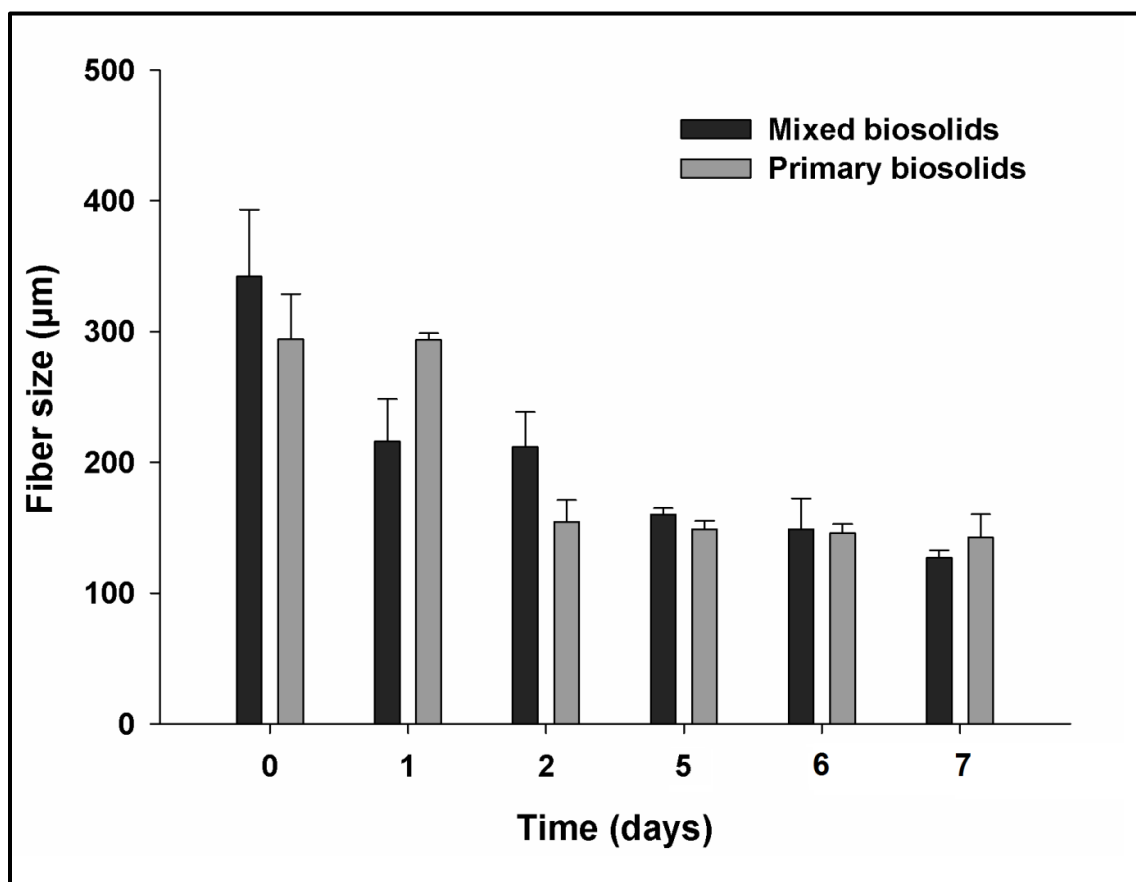


Figure 17 : Comparative analysis of the size of cellulosic fibers before and after enzymatic treatment

3.4. FTIR spectra

The structural changes in the cellulose fibers from primary and mixed biosolids were analyzed by FTIR at different stages, viz., before and after MWT and enzymatic treatment. The effect of enzymatic treatment on primary and mixed biosolids are depicted in Fig. 3 (A and B) respectively. As depicted in Fig. 18 (A and B) for primary biosolids (A) and mixed biosolids (B) that represented the spectrum of FTIR analysis. The peaks at 1636 cm^{-1} for primary biosolids (Fig. 3 (A)) and 1664 cm^{-1} for mixed biosolids (Fig. 3 (B)), characteristic of the carboxyl functional group or acid esters, were reduced by the degradation, of hemicellulose after MWT. Secondly, the vibration peak at 1236 cm^{-1} corresponding to the acetyl functional groups present in lignin, were also reduced, thus indicating the degradation of lignin present in cellulose extracted from both primary and mixed biosolids. Further, by comparing the spectrum before and after MWT treatment, the appearance of a vibration peak at 2900 cm^{-1} is seen (Fig. 3) for primary and

mixed biosolids respectively. This characterizes the C-H groups present in cellulose (Tang *et al.* 2015), which indicate the effect of MWT using lower concentration of sulfuric acid on the degradation of coating substances, such as hemicellulose lignin and pectin that can influence the size of cellulosic fibers compare to initial length. Thus, the FTIR study of the cellulosic fibers before and after MWI inferred that the MWT was effective to extract the 'cellulosic fibers that are present in higher percentage in PPSW, and hence it can be used as reinforcement for recycled PLA.

The peak at 2923 cm^{-1} and 3330 cm^{-1} , corresponding both to hydroxyl groups were substantially reduced after treatment for mixed biosolids indicating the fiber activation after treatment with laccase and cellulolytic enzymes through the reduction of hydroxyl groups for both primary and mixed cellulosic fibers. This result is in accordance with a study that showed effect of cellulolytic enzymatic treatment on the reduction of hydroxyl groups (Cao et Tan 2004). However, there was noticeable change in the peak at 2923 cm^{-1} representing cellulose. This phenomenon could be explained by the degradation of cellulose by cellulase. Further, it is noteworthy that the peak at 1509 cm^{-1} , which corresponds to benzene structure of the lignin also reduced in primary and mixed biosolids which indicated the degradation of lignin through enzymatic treatment (Liu *et al.* 2004)

The enzymatic treatment and MWT are complementary for the extraction and activation of hydroxyl groups in cellulosic fibers (Li, Tabil et Panigrahi 2007). Consequently, the changes in the hydrophilic hydroxyl groups after enzymatic treatment indicated increased resistance to moisture in cellulosic fibers. Further, it also reflected the degradation of coating substances, such as hemicellulose, lignin and pectin (Cao et Tan 2004) from cellulosic fibers (Tang *et al.* 2015).

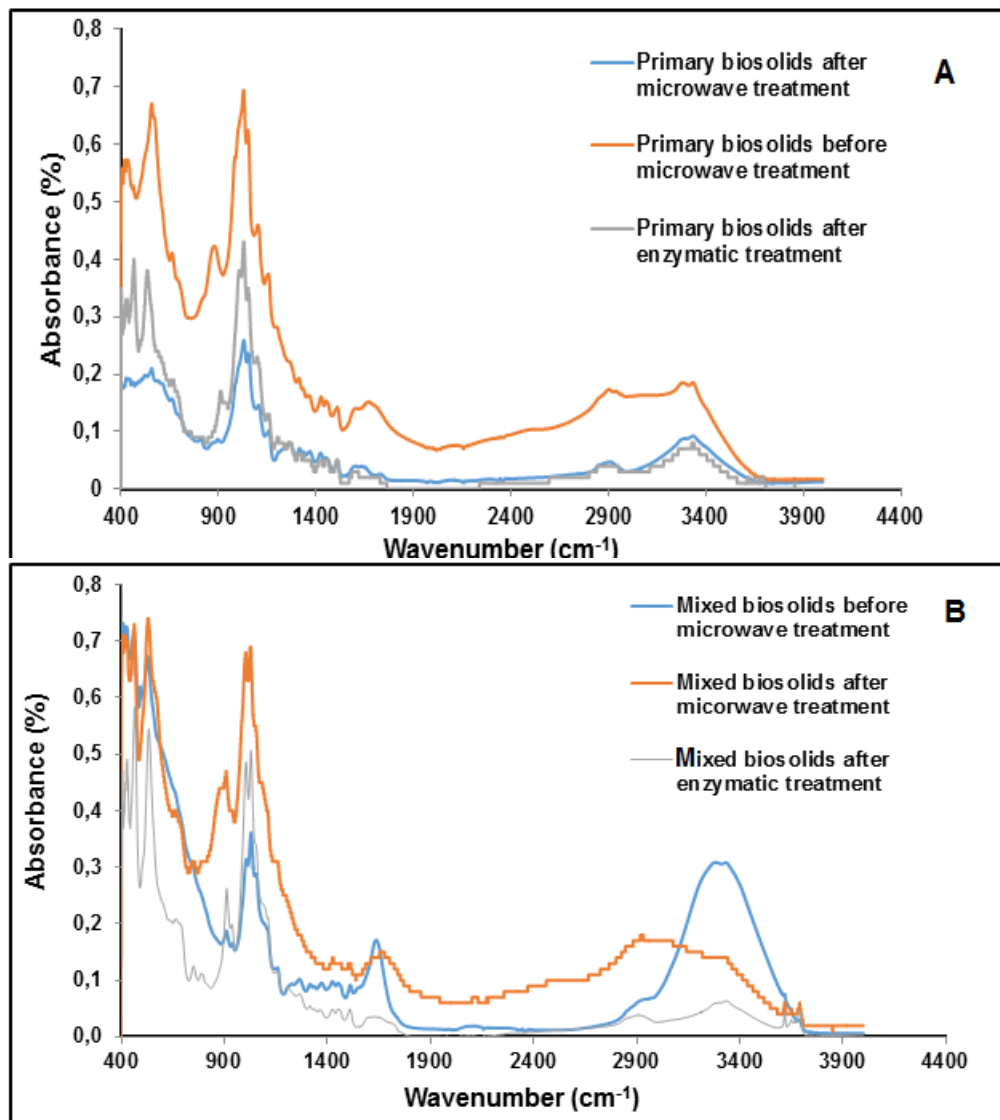


Figure 18 : FTIR spectra of: primary (A) and mixed (B) biosolids before and After MWT and enzymatic treatment

3.5. SEM analysis

The SEM analysis of cellulosic fibers for mixed and primary sludge before and after MWT and enzymatic treatment are shown in Fig. 19 and Fig. 20, respectively. Mechanical proprieties of biocomposites depend on the length of fibers which can affect the adhesion between fibers and matrix, thus, smaller size favor the better adhesion of matrix to the fibers (Mukherjee et Kao 2011). As it is evident from the Fig. 4 and 5, there was a remarkable change in the structural morphology after each treatment viz., MWT and enzymatic treatment. The size of both mixed

and primary biosolids in millimeter size was substantially reduced to micrometer size after treatment with enzymes and MWT.

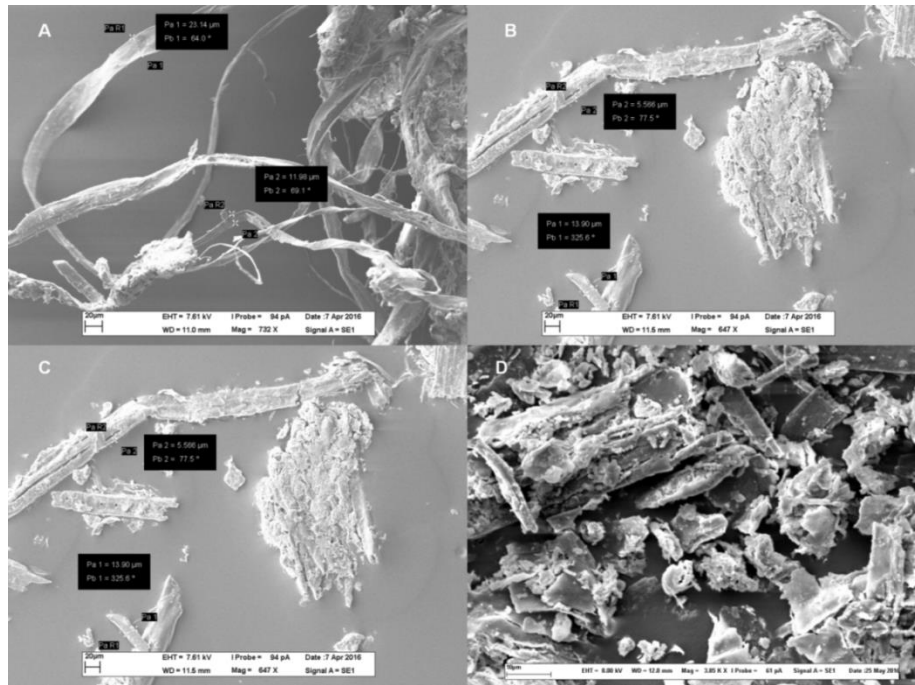


Figure 19 : SEM micrograph of treated and untreated mixed bio-solids before (A and B) and after (C and D) microwave treatment (MWT)

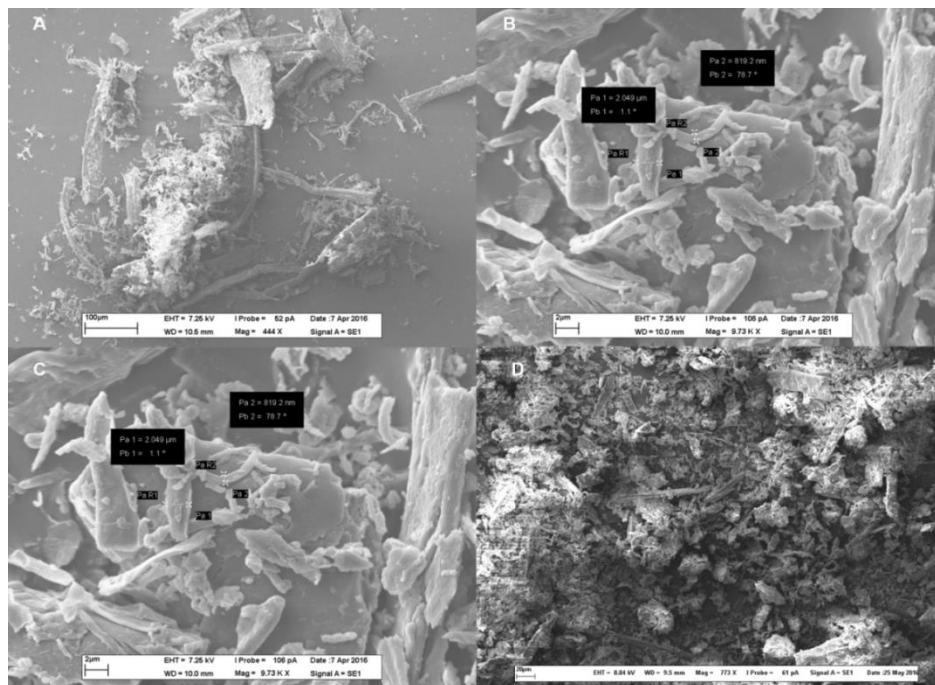


Figure 20 : SEM micrograph of treated and untreated primary bio-solids before (A and B) and after (C and D) enzymatic treatment

3.6. XRD analysis

The structural changes in the cellulosic fibers after enzymatic treatment analyzed by XRD is depicted in Fig. 21 (A) and (B) for primary and mixed biosolids, respectively. The main peaks for primary biosolids appeared at 12.32, 14.8, 22.2, and 24.86, which corresponded to diffraction planes of (676), (117), (330), and (405), respectively. Also for mixed biosolids, all the peaks appeared at 12.34, 14.84, 21.03 and 24.82, corresponding to (749), (126), (203), and (438), respectively. All these peaks represented the crystalline region which is present at a high percentage of cellulosic fibers (Liu et Hu 2008; Park *et al.* 2010). These results showed an increase in crystallinity for both primary and mixed biosolids after enzymatic treatment in comparison to untreated primary and mixed biosolids due to decrease in amorphous region as reported by (Pickering *et al.* 2011b).

Consequently, the enzymatic treatment had an effect on amorphous region that affected adsorption of cellulosic fibers, which can prevent the swelling, increase the hydrophobicity of cellulosic fibers and improve the binding between fibers and recycled PLA as reported in several studies (Henriksson, Christiernin et Agnemo 2005; Park *et al.* 2007; Kalia et Vashistha 2012; Kalia *et al.* 2013).

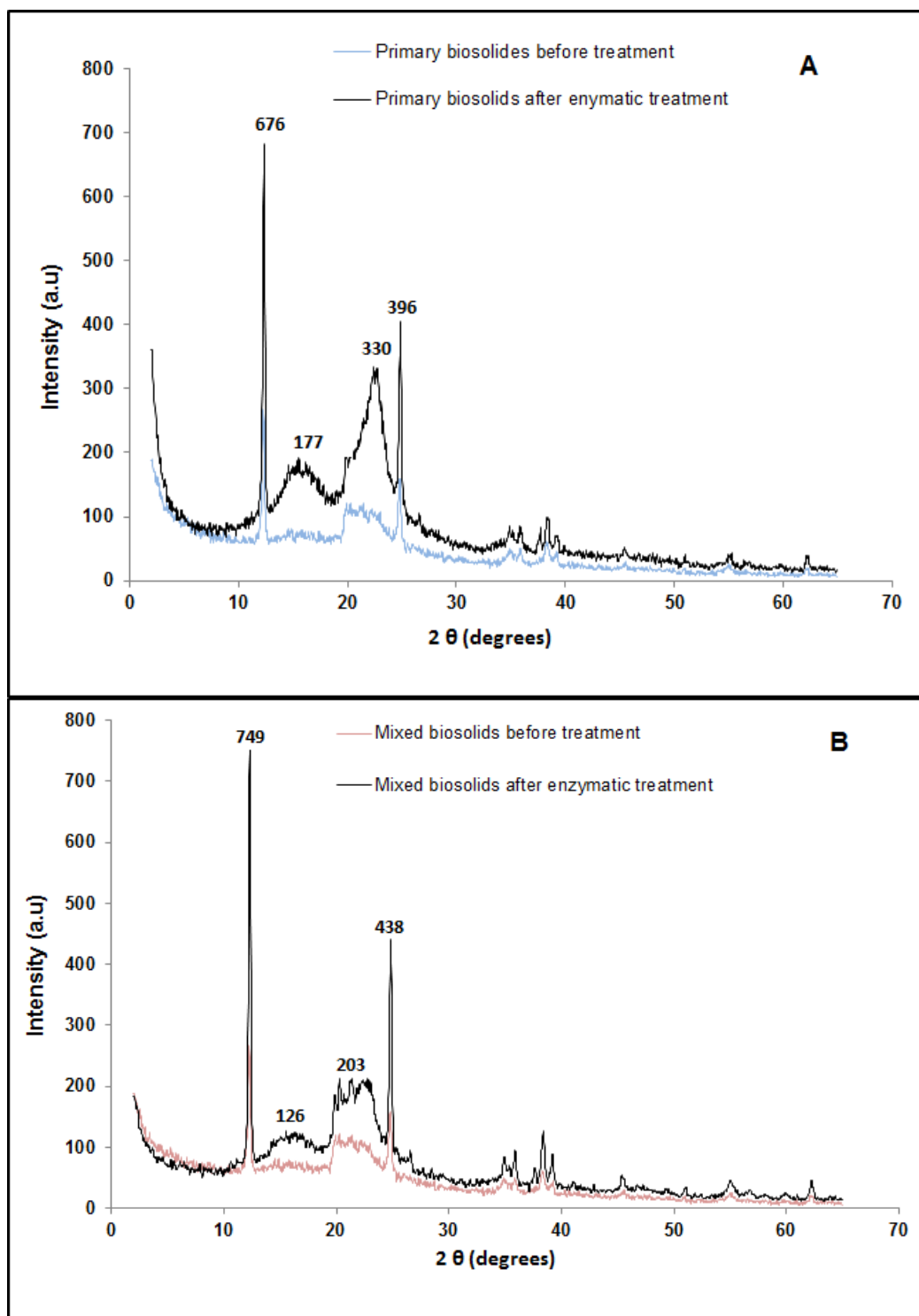


Figure 21: XRD spectra for: primary biosolids (A) and mixed biosolids (B) before and after enzymatic treatment

3.7. Mechanical proprieties

The biocomposites were prepared using recycled PLA and untreated and treated primary and mixed cellulosic fibers. It has been reported that the mechanical proprieties of recycled PLA decrease after one cycle of injection(Hamad, Kaseem et Deri 2011). Hence, we used different percentages of untreated and treated cellulosic fibers to test the effect of amendment and the size of fibers.

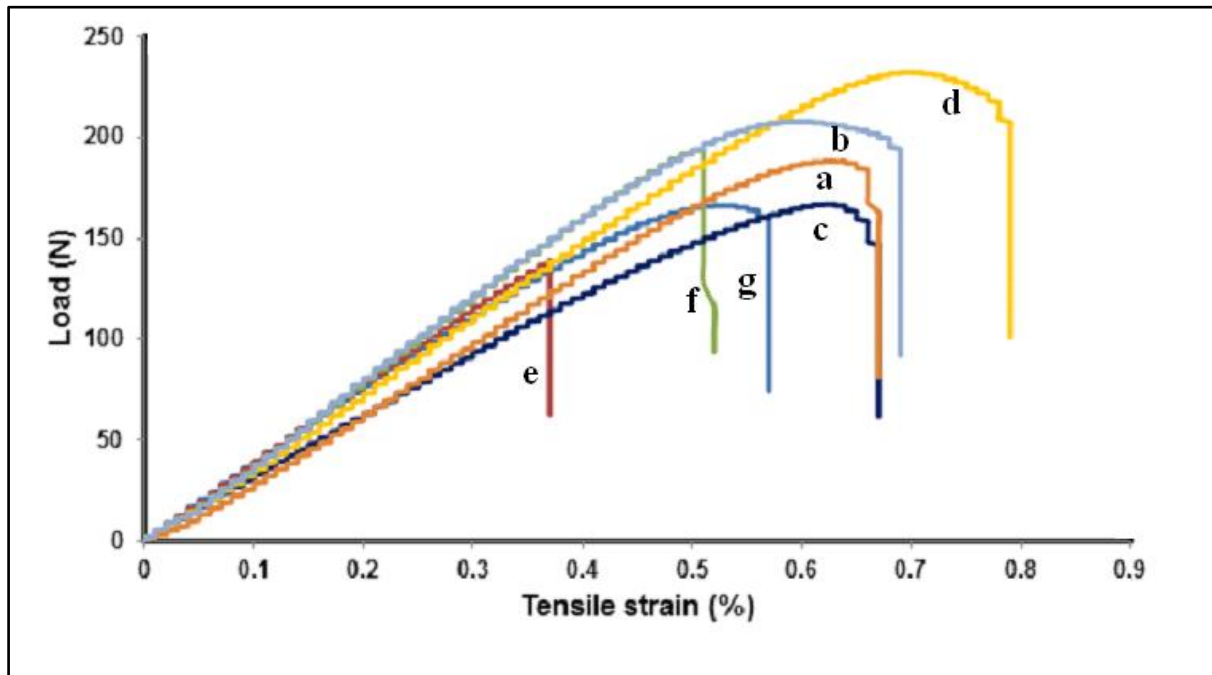


Figure 22 : Tensile stress for bio-composites with primary untreated and treated PPWS (a) and (b) PLAr + 2 % primary untreated and treated cellulosic fibers, respectively (c) and (d) PLAr + 5 % primary untreated and treated cellulosic fibers, respectively (e) and (f) PLAr + 10 % primary untreated and treated cellulosic fibers, respectively (g) PLAr

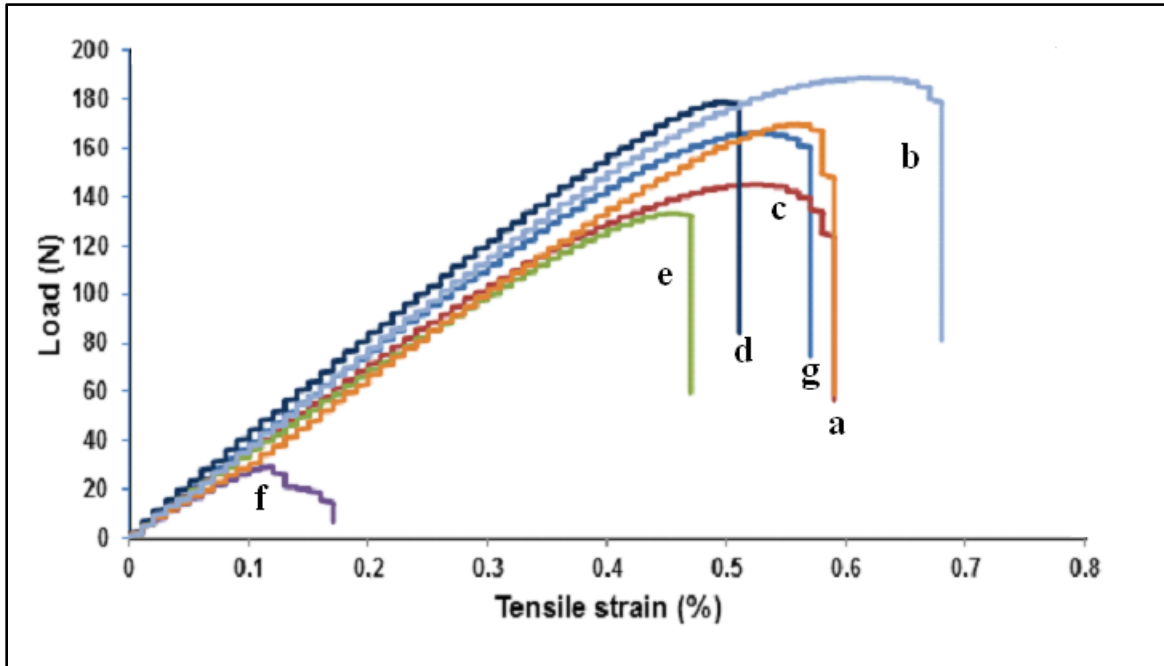


Figure 23 : Tensile stress of bio-composites with mixed untreated and treated PPWS (a) and (b) PLAr + 2 % untreated and treated mixed cellulosic fibers, respectively (c) and (d) PLAr + 5 % untreated and treated mixed cellulosic fibers, respectively (e) and (f) PLAr + 10 % untreated and treated mixed cellulosic fibers, respectively (g) PLAr

The mechanical properties of the cellulose PLAr composite with different percentages of composition are shown in Fig. 22 and 23, respectively for primary and mixed biosolids. As seen in Fig. 22 and 23, the biocomposites with 5 % treated cellulosic fibers for both primary and mixed biosolids showed higher load (around 250 N and 180 N respectively), when compared to PLAr and 10 %, 2 % untreated/treated fibers.

Mechanical tests (Young's Modulus) and tensile strength were measured for each biocomposite formulation (2, 5, 10 %) of primary and mixed untreated and treated cellulosic fibers to comprehend stiffness and elasticity of biocomposites.

Table I: Mechanical strength for novel biocomposites

			Young's Modulus (MPa)	Tensile strain at break point (%)	Tensile stress at Yield (MPa)
Primary biosolids	Untreated	PLA + 2% of fibers	679.7 ± 118.4	6.9 ± 0.6	37.4 ± 5.1
		PLA + 5% of fibers	571.8 ± 59.1	7.1 ± 1.7	29.5 ± 3.5
		PLA + 10% of fibers	592.6 ± 77.9	3.8 ± 0.8	24.6 ± 7.2
	Treated	PLA + 2% of fibers	887.8 ± 36.6	7.223 ± 0.6	41.3 ± 1.7
		PLA + 5% of fibers	649.1 ± 112.1	5.3 ± 3.1	41.1 ± 5.9
		PLA + 10% of fibers	714.1 ± 52.2	8.2 ± 0.8	34.4 ± 6.3
Mixed biosolids	Untreted	PLA + 2% of fibers	687. 3 ± 56.6	6.1 ± 2.3	33.7 ± 8.8
		PLA + 5% of fibers	598.7 ± 73.4	6.1 ± 0.7	25.7 ± 3.7
		PLA + 10% of fibers	590.2 ± 67.8	4.8 ± 2.8	23.6 ± 8.6
	Treated	PLA + 2% of fibers	759.8 ± 51.7	7.1 ± 0.2	37.5 ± 3.9
		PLA + 5% of fibers	601.1 ± 40.1	5.3 ± 2.9	31.7 ± 10.3
		PLA + 10% of fibers	567.9 ± 42.9	1.7 ± 0.1	5.2
Recyled PLA			644.4 ±30.08	6.1 ± 0.8	29.4 ± 3.6

Recycled poly lactic acid, PLAr; Cellulosic fibers, fibers; MPa, megapascal

The results of different cellulose fibers and PLAr compositions are summarized in Table I. Further, the statistical validation of these tests by Bonferroni's post hoc analysis. As seen in Table I, the Young's Modulus of PLAr + 2 % cellulosic fibers for primary biosolids was highest (887.8 ± 36.6 MPa) with around 37.8 % improvement as compared to PLAr with 5 % or 10 % untreated and treated cellulosic fibers, indicating higher stiffness of PLAr + 2 % cellulosic fibers as compared to PLAr alone (658.1 ± 23.1 MPa). Further, Bonferroni's post hoc analysis showed that the Young Modulus for PLAr + 2 % of treated primary cellulosic fibers was significantly high (887.8 ± 36.6)

For PLAr + 2 % primary cellulosic fibers, the tensile stress was higher (41.35 ± 1.764 MPa) as compared to PLAr (29.4 ± 3.6 MPa) alone. The tensile strain at breakpoint for PLAr + 2 %

primary cellulosic fibers (7.2 ± 0.6 %) was higher than PLAr (6.1 ± 0.8 %) and PLAr + 2 % untreated primary cellulosic fibers (6.9 ± 0.6 MPa).

Thus, PLAr + 2 % primary cellulosic fibers was shown to have enhanced tensile stress and tensile strain at breakpoint compared to PLAr. These results showed the effect of primary cellulosic fibers as reinforcement comparable to polypropylene (30 MPa tensile stress and 3 % tensile strain at break and polypropylene-abaca fibers (44 MPa tensile stress and 5 kJ/m² impact stress and 1.3 GPa Young modulus) (Bledzki et al., 2010). Additionally, Bonferroni's post hoc analysis showed that developed biocomposites with 2 % of treated primary cellulosic fibers was comparable to the control except for biocomposite PLAr + 10 % treated mixed cellulosic fibers, which was significantly lower than the control. Furthermore, the formulation of primary treated cellulosic fibers improved mechanical properties of PLAr as compare to polypropylene also this results was comparable to pure polylactic acid reinforced by cellulose kraft fibers and polypropylene reinforced by abaca fibers (Bledzki and Jaskiewicz, 2010).

By the addition of 2 % (w/w) untreated and treated mixed and primary cellulosic fibers to PLAr matrix, the mechanical proprieties of biocomposites, such as tensile stress, Young's Modulus and the tensile strain at breakpoint increased compared to PLAr and 5 %, 10 % of untreated and treated cellulosic fibers. This indicated that, at 5 % and 10 % of cellulosic fibers, mechanical proprieties decreased except for 10 % treated primary cellulosic fibers as shown in Table I. These results were further confirmed by impact tests for different formulations, where highest value was for PLAr + 2 % untreated and treated cellulosic fibers with 9.3 ± 2.5 kJ/m² and 12.5 ± 2.5 kJ/m² as compared to PLAr with 5.6 ± 2.57 kJ/m² value. These values are superior to the properties of pure polylactic acid and PLAr. The superior properties are attributed by proper adhesion between cellulosic fibers and matrix, the crystallinity of fibers before and after enzymatic treatment, the percentage of reinforcement on the matrix and the fibers size.

As reported in the enzymatic treatment, the activation of hydroxyl groups is one of the most important parameters for compatibility between reinforcement and matrix (Kalia and Vashistha, 2012). It was seen that there was a decrease in the adsorption of hydroxyl groups implying the fact that the enzymatic treatment was efficient for both primary and mixed biosolids. This activation was clearly shown by the increase of mechanical properties for PLAr with different percentages of cellulosic fibers. However, the percentage of treated cellulosic fibers was very important parameter in this formulation (Kalia and Vashistha, 2012). If the percentage is higher, the mechanical properties decrease as shown in Table 1, except in the case of 5 % and 10 % treated cellulosic fibers. On the other hand, the size of treated cellulosic fibers was affected as

confirmed by mechanical test, specifically for PLAr with 2 % primary cellulosic fibers compared to mixed cellulosic fibers.

Thus, the mechanical properties for PLAr + 2 % treated primary cellulosic fibers was the highest as compared to PLAr, polypropylene (PP), polyhydroxyalkanoate (PHB) as reported earlier Bledzki et al. (2009). Also, it was comparable to pure polylactic acid and PLA reinforced by untreated and enzymatically treated fibers. Consequently, the improvement of adhesion between treated fibers and PLAr was clearly shown through mechanical tests because of enzymatic modification on adhesion fiber-matrix as reported by Spiridon et al. (2016). Moreover, it also proved that enzymatic treatment was specific and rapid as compared to chemical modification.

4. Conclusion

The effect of treated cellulosic fibers on mechanical properties of PLAr was tested using microwave and enzymatic treatment. The microwave irradiation used for extraction of cellulosic fibers from pulp and paper solid waste (PPSW) was efficient for extraction and size reduction. In addition, reinforcement of PLAr with treated cellulosic fibers was investigated through mechanical tests, such as impact and tensile strain test. The most significant result was obtained for PLAr + 2 % treated primary cellulosic fibers, that showed the efficiency of enzymatic treatment for increasing the adhesion between treated cellulosic fibers and PLAr through the modification of crystallinity and the surface activation. Mechanical properties of novel biocomposites demonstrated the applicability of materials in several fields, such as automobile and packing in food industry. Further, the study showed pulp and paper solid waste (PPSW) could be one of the most reliable reinforcements for biocomposites, and could open other valorization options for these residuals

Acknowledgement(s):

The authors are sincerely thankful to the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (Discovery Grant 355254 and NSERC CRD Grant), and CRIBIQ for financial support. We would like to thank Mr. R. Fortin and Colin Jacob Vaillancourt from Gaudreau Environment for providing rPLA samples. Likewise, the support of Ozymes Inc. is equally appreciated for valuable comments by Dr. Kofi Abokitse during the experimental planning from industrial perspective. Financial assistance by the 'Fonds de recherche du Québec-Nature et technologies (FRQNT)' and INRS-ETE has been thankfully acknowledged by K Hegde.

References

- Abraham E, Deepa B, Pothan L, Jacob M, Thomas S, Cvelbar U et Anandjiwala R. 2011. Extraction of nanocellulose fibrils from lignocellulosic fibres: a novel approach. *Carbohydrate Polymers*, 86 : 1468-1475.
- AWAFO VA. 1997. Thesis : BIOSYNTHESIS OF CELLULASE-SYSTEM FROM TRICHODEW RESEEI AND ITS CHARACTERISTIC. 226 pages.
- Awafo VA, Chahal DS, Simpson BK et Lê GB. 1996. Production of cellulase systems by selected mutants of *Trichoderma reesei* in solid-state fermentation and their hydrolytic potentials. *Applied biochemistry and biotechnology*, 57 : 461-470.
- Bitinis N, Verdejo R, Bras J, Fortunati E, Kenny JM, Torre L et López-Manchado MA. 2013a. Poly(lactic acid)/natural rubber/cellulose nanocrystal bionanocomposites Part I. Processing and morphology. *Carbohydrate Polymers*, 96 : 611-620.
- Bitinis N, Verdejo R, Bras J, Fortunati E, Kenny JM, Torre L et López-Manchado MA. 2013b. Poly (lactic acid)/natural rubber/cellulose nanocrystal bionanocomposites Part I. Processing and morphology. *Carbohydrate Polymers*, 96 : 611-620.
- Bledzki A et Gassan J. 1999. Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in polymer science*, 24 : 221-274.
- Bledzki A et Jaszkievicz A. 2010. Mechanical performance of biocomposites based on PLA and PHBV reinforced with natural fibres—A comparative study to PP. *Composites Science and Technology*, 70 : 1687-1696.
- Bledzki AK, Jaszkievicz A et Scherzer D. 2009. Mechanical properties of PLA composites with man-made cellulose and abaca fibres. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 40 : 404-412.
- Bledzki AK, Mamun AA, Jaszkievicz A et Erdmann K. 2010. Polypropylene composites with enzyme modified abaca fibre. *Composites Science and Technology*, 70 : 854-860.
- Brinchi L, Cotana F, Fortunati E et Kenny J. 2013. Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: technology and applications. *Carbohydrate Polymers*, 94 : 154-169.
- Cao Y et Tan H. 2004. Structural characterization of cellulose with enzymatic treatment. *Journal of molecular structure*, 705 : 189-193.
- Chandra RP et Ragauskas AJ. 2005. Modification of High-Lignin Kraft Pulps with Laccase. Part 2. Xylanase-Enhanced Strength Benefits. *Biotechnology progress*, 21 : 1302-1306.
- Chen W, Yu H, Liu Y, Hai Y, Zhang M et Chen P. 2011a. Isolation and characterization of cellulose nanofibers from four plant cellulose fibers using a chemical-ultrasonic process. *Cellulose*, 18 : 433-442.
- Chen W, Yu H, Liu Y, Chen P, Zhang M et Hai Y. 2011b. Individualization of cellulose nanofibers from wood using high-intensity ultrasonication combined with chemical pretreatments. *Carbohydrate Polymers*, 83 : 1804-1811.
- Couto SR et Sanromán MA. 2005. Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal*, 22 : 211-219.

Couto SR et Herrera JLT. 2006. Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology Advances*, 24 : 500-513.

Dienes D, Börjesson J, Ståhlbrand H et Réczey K. 2006. Production of *Trichoderma reesei* Cel7B and its catalytic core on glucose medium and its application for the treatment of secondary fibers. *Process Biochemistry*, 41 : 2092-2096.

Dionisi D, Anderson JA, Aulenta F, McCue A et Paton G. 2015. The potential of microbial processes for lignocellulosic biomass conversion to ethanol: a review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90 : 366-383.

Fang H et Xia L. 2015. Cellulase production by recombinant *Trichoderma reesei* and its application in enzymatic hydrolysis of agricultural residues. *Fuel*, 143 : 211-216.

Farinas CS. 2015a. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 52, December 2015, Pages 179–188.

Farinas CS. 2015b. Developments in solid-state fermentation for the production of biomass-degrading enzymes for the bioenergy sector. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 52 : 179-188.

Farooq A, Ali S, Abbas N, Fatima GA et Ashraf MA. 2013. Comparative performance evaluation of conventional bleaching and enzymatic bleaching with glucose oxidase on knitted cotton fabric. *Journal of Cleaner Production*, 42 : 167-171.

Faruk O, Bledzki AK, Fink H-P et Sain M. 2012. Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in polymer science*, 37 : 1552-1596.

Filson PB, Dawson-Andoh BE et Schwegler-Berry D. 2009. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. *Green Chemistry*, 11 : 1808-1814.

Fletcher D. 1995. Steam explosion triggering: a review of theoretical and experimental investigations. *Nuclear engineering and design*, 155 : 27-36.

GASSARA F. 2012. PRODUCTION ECONOMIQUE D'ENZYMES LIGNINOLYTIQUES PAR FERMENTATION À L'ÉTAT SOLIDE DES DÉCHETS AGROINDUSTRIELS ET LEURS APPLICATIONS. Thèse.

Gassara F, Brar SK, Tyagi RD, Verma M et Surampalli RY. 2010. Screening of agro-industrial wastes to produce ligninolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Biochemical Engineering Journal*, 49 : 388-394.

George M, Mussone PG et Bressler DC. 2014. Surface and thermal characterization of natural fibres treated with enzymes. *Industrial Crops and Products*, 53 : 365-373.

Graupner N, Albrecht K, Ziegmann G, Enzler H et Müssig J. 2016. Influence of reprocessing on fibre length distribution, tensile strength and impact strength of injection moulded cellulose fibre-reinforced polylactide (PLA) composites. *EXPRESS Polymer Letters*, 10.

Gusakov AV. 2011. Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in biotechnology*, 29 : 419-425.

- Hamad K, Kaseem M et Deri F. 2011. Effect of recycling on rheological and mechanical properties of poly (lactic acid)/polystyrene polymer blend. *Journal of materials science*, 46 : 3013-3019.
- Heap L, Green A, Brown D, van Dongen B et Turner N. 2014. Role of laccase as an enzymatic pretreatment method to improve lignocellulosic saccharification. *Catalysis Science & Technology*, 4 : 2251-2259.
- Henriksson G, Christiernin M et Agnemo R. 2005. Monocomponent endoglucanase treatment increases the reactivity of softwood sulphite dissolving pulp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32 : 211-214.
- Henriksson M, Henriksson G, Berglund L et Lindström T. 2007. An environmentally friendly method for enzyme-assisted preparation of microfibrillated cellulose (MFC) nanofibers. *European Polymer Journal*, 43 : 3434-3441.
- Henrissat B, Driguez H, Viet C et Schülein M. 1985. Synergism of cellulases from *Trichoderma reesei* in the degradation of cellulose. *Nature Biotechnology*, 3 : 722-726.
- Hirano T, Honda Y, Watanabe T et Kuwahara M. 2000. Degradation of bisphenol A by the lignin-degrading enzyme, manganese peroxidase, produced by the white-rot basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 64 : 1958-1962.
- Ilgin Dog˘an FDS. 2009. Alkaline solubilization and microwave irradiation as a combined sludge disintegration and minimization method. *water research*, 43 (2009) 2139–2148.
- Iuliana Spiridon KL, Ana Maria Resmerita a , Raluca Nicoleta Darie 2014. Evaluation of PLA–lignin bioplastics properties before and after accelerated weathering. *Composites: Part B*, 69 (2015) 342–349.
- K. Oksmana MS, J.-F. Selinc. 2003. Natural fibres as reinforcement in polylactic acid (PLA) composites. *Composites Science and Technology*, 63 (2003) : 1317–1324.
- Kabir M, Wang H, Lau K et Cardona F. 2012. Chemical treatments on plant-based natural fibre reinforced polymer composites: An overview. *Composites Part B: Engineering*, 43 : 2883-2892.
- Kalia S et Vashistha S. 2012. Surface modification of sisal fibers (*Agave sisalana*) using bacterial cellulase and methyl methacrylate. *Journal of Polymers and the Environment*, 20 : 142-151.
- Kalia S, Thakur K, Celli A, Kiechel MA et Schauer CL. 2013. Surface modification of plant fibers using environment friendly methods for their application in polymer composites, textile industry and antimicrobial activities: a review. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 1 : 97-112.
- Karimi K. 2015. *Lignocellulose-Based Bioproducts*. Springer.
- Karimi K. October 2014. *Lignocellulose-Based Bioproducts*. Biofuel and Biorefinery Technologies.
- Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM et Burton S. 2011. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 48 : 195-208.

Kumar S, Purohit R et Malik MM. 2015. Properties and Applications of Polymer Matrix Nano Composite Materials. *Materials Today: Proceedings*, 2 : 3704-3711.

Li X, Tabil LG et Panigrahi S. 2007. Chemical treatments of natural fiber for use in natural fiber-reinforced composites: a review. *Journal of Polymers and the Environment*, 15 : 25-33.

Lin X-q, Han S-y, Zhang N, Hu H, Zheng S-p, Ye Y-r et Lin Y. 2013. Bleach boosting effect of xylanase A from *Bacillus halodurans* C-125 in ECF bleaching of wheat straw pulp. *Enzyme and Microbial Technology*, 52 : 91-98.

Liu W, Mohanty A, Drzal L, Askel P et Misra M. 2004. Effects of alkali treatment on the structure, morphology and thermal properties of native grass fibers as reinforcements for polymer matrix composites. *Journal of materials science*, 39 : 1051-1054.

Liu Y et Hu H. 2008. X-ray diffraction study of bamboo fibers treated with NaOH. *Fibers and Polymers*, 9 : 735-739.

Lo C-M, Zhang Q, Callow NV et Ju L-K. 2010. Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction. *Bioresource Technology*, 101 : 717-723.

Lorenzo M, Moldes D, Couto SR et Sanroman A. 2002. Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology*, 82 : 109-113.

Mai F, Tu W, Bilotti E et Peijs T. 2015. Preparation and properties of self-reinforced poly (lactic acid) composites based on oriented tapes. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 76 : 145-153.

Mandels M, Hontz L et Nystrom J. 1974. Enzymatic hydrolysis of waste cellulose. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*, 16 : 1471-1493.

Marques S, Alves L, Roseiro J et Gírio F. 2008. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*. *Biomass and Bioenergy*, 32 : 400-406.

MARY MANDELS LH, and JOHN NYSTROM, U. S. Army Natick Laboratories, Natick Massachusetts. 1974. Enzymatic Hydrolysis of Waste Cellulose. *BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING*.

McMillan JD. Pretreatment of lignocellulosic biomass. Dans : *ACS symposium series (USA)*, 1994.

Michael George PGM, David C. Bressler*. 2013. Surface and thermal characterization of natural fibres treated with enzymes. *Industrial Crops and Products*, 53 (2014) 365– 373.

Mithun Saha CE, Juan Marin. 2011. Microwave, ultrasonic and chemo-mechanical pretreatments for enhancing methane potential of pulp mill wastewater treatment sludge. *Bioresource Technology*, 102 (2011) 7815–7826.

Morán JI, Alvarez VA, Cyras VP et Vázquez A. 2008. Extraction of cellulose and preparation of nanocellulose from sisal fibers. *Cellulose*, 15 : 149-159.

Mukherjee T et Kao N. 2011. PLA based biopolymer reinforced with natural fibre: a review. *Journal of Polymers and the Environment*, 19 : 714-725.

- Mwaikambo LY et Ansell MP. 2002. Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization. *Journal of Applied Polymer Science*, 84 : 2222-2234.
- Nurdan Kaşıkara Pazarlıoğlu MSi, Azmi Telefoncu. 2005. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*, 40 (2005) : 1673–1678.
- Oomah BD, Busson M, Godfrey DV et Drover JC. 2002a. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76 : 33-43.
- Oomah BD, Busson M, Godfrey DV et Drover JCG. 2002b. Characteristics of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil. *Food Chemistry*, 76 : 33-43.
- Oral J, Sikula J, Puchyr R, Hajny Z, Stehlik P et Bebar L. 2005. Processing of waste from pulp and paper plant. *Journal of Cleaner Production*, 13 : 509-515.
- Pandey A. 2003. Solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 13 : 81-84.
- Pandey A, Soccol CR et Mitchell D. 2000. New developments in solid state fermentation: I- bioprocesses and products. *Process Biochemistry*, 35 : 1153-1169.
- Panigrahi XLÆLGTÆS. 2007. Chemical Treatments of Natural Fiber for Use in Natural Fiber-Reinforced Composites: A Review. *J Polym Environ*.
- Panigrahi XLÆLGTÆS. 2007 Chemical Treatments of Natural Fiber for Use in Natural Fiber-Reinforced Composites: A Review. *J Polym Environ*.
- Papinutti V et Forchiassin F. 2007. Lignocellulolytic enzymes from *Fomes sclerodermeus* growing in solid-state fermentation. *Journal of Food Engineering*, 81 : 54-59.
- Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA et Johnson DK. 2010. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for biofuels*, 3 : 1.
- Park S, Venditti RA, Abrecht DG, Jameel H, Pawlak JJ et Lee JM. 2007. Surface and pore structure modification of cellulose fibers through cellulase treatment. *Journal of Applied Polymer Science*, 103 : 3833-3839.
- Paul A, Joseph K et Thomas S. 1997. Effect of surface treatments on the electrical properties of low-density polyethylene composites reinforced with short sisal fibers. *Composites Science and Technology*, 57 : 67-79.
- Pérez J, Muñoz-Dorado J, de la Rubia T et Martínez J. 2002a. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5 : 53-63.
- Pérez J, Munoz-Dorado J, de la Rubia T et Martinez J. 2002b. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*, 5 : 53-63.
- Pickering KL, Efendy MGA et Le TM. 2015. A review of recent developments in natural fibre composites and their mechanical performance. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*.

- Pickering KL, Sawpan MA, Jayaraman J et Fernyhough A. 2011a. Influence of loading rate, alkali fibre treatment and crystallinity on fracture toughness of random short hemp fibre reinforced polylactide bio-composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*, 42 : 1148-1156.
- Pickering KL, Sawpan MA, Jayaraman J et Fernyhough A. 2011b. Influence Of Loading Rate, Alkali Fibre Treatment And Crystallinity On Fracture Toughness Of Random Short Hemp Fibre Reinforced Polylactide Bio-composites.
- Ratul Kumar Das SKB, Mausam Verma 2015. Potential use of pulp and paper solid waste for the bio-production of fumaric acid through submerged and solid state fermentation. *Journal of Cleaner Production*, 112 (2016) : 4435-4444.
- Reid ID, Paice MG, Ho C et Jurasek L. 1990. Biological bleaching of softwood kraft pulp with the fungus *Trametes (Coriolus) versicolor*. *Tappi journal*, 73 : 149-153.
- Rencoret J, Aracri E, Gutiérrez A, José C, Torres AL, Vidal T et Martínez AT. 2014a. Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers. *Biochemical Engineering Journal*, 86 : 16-23.
- Rencoret J, Aracri E, Gutiérrez A, del Río JC, Torres AL, Vidal T et Martínez AT. 2014b. Structural insights on laccase biografting of ferulic acid onto lignocellulosic fibers. *Biochemical Engineering Journal*, 86 : 16-23.
- Rosyida VT, Indrianingsih AW, Maryana R et Wahono SK. 2015. Effect of Temperature and Fermentation Time of Crude Cellulase Production by *Trichoderma Reesei* on Straw Substrate. *Energy Procedia*, 65 : 368-371.
- Rouissi T, Mahmoudi A, Tyagi RD, Brar SK, Prévost D et Surampalli RY. 2013. Optimisation of spray drying by response surface methodology for the production of *Sinorhizobium meliloti* powder formulation by using starch industry wastewater. *Biosystems engineering*, 114 : 334-343.
- Saha M, Eskicioglu C et Marin J. 2011. Microwave, ultrasonic and chemo-mechanical pretreatments for enhancing methane potential of pulp mill wastewater treatment sludge. *Bioresource Technology*, 102 : 7815-7826.
- Saheb DN et Jog J. 1999. Natural fiber polymer composites: a review. *Advances in polymer technology*, 18 : 351-363.
- Shafiei M, Kumar R et Karimi K. 2015. Pretreatment of lignocellulosic biomass. Dans : *Lignocellulose-Based Bioproducts*. Springer, p. 85-154.
- Shi J, Chinn MS et Sharma-Shivappa RR. 2008. Microbial pretreatment of cotton stalks by solid state cultivation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Bioresource Technology*, 99 : 6556-6564.
- Singhania RR, Patel AK, Soccol CR et Pandey A. 2009. Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 44 : 13-18.
- Spiridon I, Darie RN et Kangas H. 2016. Influence of fiber modifications on PLA/fiber composites. Behavior to accelerated weathering. *Composites Part B: Engineering*, 92 : 19-27.
- Sun Y et Cheng J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 83 : 1-11.

Tabka M, Herpoël-Gimbert I, Monod F, Asther M et Sigoillot J. 2006. Enzymatic saccharification of wheat straw for bioethanol production by a combined cellulase xylanase and feruloyl esterase treatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 39 : 897-902.

Taherzadeh MJ et Karimi K. 2008. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *International journal of molecular sciences*, 9 : 1621-1651.

Tang Y, Shen X, Zhang J, Guo D, Kong F et Zhang N. 2015. Extraction of cellulose nano-crystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication. *Carbohydrate Polymers*, 125 : 360-366.

Thompson G, Swain J, Kay M et Forster C. 2001. The treatment of pulp and paper mill effluent: a review. *Bioresource Technology*, 77 : 275-286.

Treebupachatsakul T, Nakazawa H, Shinbo H, Fujikawa H, Nagaiwa A, Ochiai N, Kawaguchi T, Nikaido M, Totani K et Shioya K. 2016. Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases. *Journal of bioscience and bioengineering*, 121 : 27-35.

Treesukon Treebupachatsakul¹ HN, Hideaki Shinbo¹, Hiroki Fujikawa¹, Asami Nagaiwa¹, Nobuhiro Ochiai¹, Takashi Kawaguchi², Mitsuru Nikaido³, Kazuhide Totani³, Koki Shioya¹, Yosuke Shida¹, Yasushi Morikawa¹, Wataru Ogasawara¹, , , Hirofumi Okada¹, †. 2015. Heterologously expressed *Aspergillus aculeatus* β -glucosidase in *Saccharomyces cerevisiae* is a cost-effective alternative to commercial supplementation of β -glucosidase in industrial ethanol production using *Trichoderma reesei* cellulases.

V.H. Sangeetha HD, T.O. Varghese,¹ S.K. Nayak. 2016. State of the Art and Future Prospectives of Poly(Lactic Acid) Based Blends and Composites.

Virtanen S, Wikström L, Immonen K, Anttila U et Retulainen E. 2016. Cellulose kraft pulp reinforced polylactic acid (PLA) composites: effect of fibre moisture content.

Wang Y, Zhao Y et Deng Y. 2008. Effect of enzymatic treatment on cotton fiber dissolution in NaOH/urea solution at cold temperature. *Carbohydrate Polymers*, 72 : 178-184.

Wen Z, Liao W et Chen S. 2005. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*, 96 : 491-499.

Wertz J-L. 2014. Les biocomposites et composites polymère-chanvre en particulier.

Y Karaduman DGaLO. 2012. Effect of enzymatic pretreatment on the mechanical properties of jute fiber-reinforced polyester composites. *JOURNAL OF COMPOSITE Article MAT ERIALS*.

Zhang Q, Lo C-M et Ju L-K. 2007. Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Bioresource Technology*, 98 : 753-760.

Zhao C, Ding W, Chen F, Cheng C et Shao Q. 2014. Effects of compositional changes of AFEX-treated and H-AFEX-treated corn stover on enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*, 155 : 34-40.

PARTIE III: ANNEXES

Table II: Central composite design defining temperature, time and acid concentration and results on size of fibers for each run of mixed and primary bio-solids

Runs	Temperature (°C)	Time (min)	C acid (H ₂ SO ₄ (% v/v)	Mixed cellulosic fiber size (µm)	Standard deviation for mixed cellulosic fiber	Primary cellulosic fiber size (µm)	Standard deviation for mixed cellulosic fiber
1	-	-	-	1746	±50.89	894	±46.67
2	100.00	150.00	2.00	624.62	±94.71	644.79	±71.57
3	120.00	187.50	1.30	664.68	±74.615	623	±120.32
4	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
5	140.00	40.00	2.00	486.51	±56.38	296.03	±30.17
6	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
7	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
8	100.00	40.00	2.00	785.34	±66.01	894.61	±30.17
9	100.00	40.00	0.60	1162.07	±86.39	467.38	±10.13
10	100.00	150.00	0.60	948.65	±79.81	578.91	±34.57
11	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.48	502.17	±68.08
12	120.00	2.50	1.30	1274.32	±85.25	784.74	±41.42
13	140.00	40.00	0.60	450.91	±28.35	307.86	±14.17
14	120.00	95.00	2.48	341.98	±51.334	318.17	±87.68
15	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.485	502.17	±68.08
16	140.00	150.00	2.00	386.68	±43.45	293.97	±34.57
17	140.00	150.00	0.60	973.62	±14.36	450.89	±24.90
18	120.00	95.00	1.30	932.78	±93.485	502.17	±68.08
19	120.00	95.00	0.12	1746	±61.43	786.28	±30.87
20	86.36	95.00	1.30	894.44	±108.72	689.15	±70.85
21	153.64	95.00	1.30	447.23	±68.84	440.51	±59.40

C_{acid}: Concertation of acid. H₂SO₄: Sulfuric acid

Table III: Summary of ANOVA for mixed sludge

Source	P value Mixed biosolids	P value Primary biosolids
A : temperature	0.0395	0.0567
B : time	0.0117	0.2929
C : C_{acide}	0.0002	0.0157
AB	0.0581	0.3081
AC	0.6767	0.0386
BC	0.1458	0.0900
A²	0.0070	0.8861
B²	0.5164	0.0983
C²	0.8905	0.7452
ABC	0.951	0.4216
A²B	0.0300	0.3585
A²C	0.0076	0.0102