

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
CENTRE EAU TERRE ENVIRONNEMENT

**ÉVALUATION DE LA FAISABILITÉ DE L'UTILISATION DE  
DIFFÉRENTS TYPES DE FIBRES CELLULOSIQUES TRAITÉS  
ENZYMATIQUEMENT POUR LA VALORISATION DE L'ACIDE  
POLY-LACTIQUE (PLA)**

Par  
Fatima Ezzahra BENDOUROU

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	Ph.D. Antonio AVALOS RAMIREZ INRS-ETE
Examineur externe	Pr. Hassine BOUAFIF UQAT, Québec
Examineur externe	Pr. Riadh HAMMAMI UOTTAWA, Québec

Québec, Canada



# REMERCIEMENTS

Je remercie tous ceux qui, de près ou de loin, ont contribué à la réussite de ce projet de recherche et à l'achèvement de ce mémoire.

Je voudrais remercier dans un premier temps le Professeure Satinder Kaur Brar, ma Directrice de maîtrise, de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer son équipe de recherche et la confiance de réaliser ce projet. Je suis reconnaissante envers son excellent encadrement, son encouragement constant, ainsi que ses questions et commentaires continus qui ont fait ressortir le meilleur de moi-même et ont fait de moi une bonne étudiante-chercheuse.

Je voudrais également exprimer mes sincères remerciements aux membres de comité pour leur disponibilité, leur temps précieux et leur contribution dans l'évaluation de ce travail : le Docteur Antonio AVALOS RAMIREZ, le Professeur Hassine BOUAFIF et le Professeur Riadh HAMMAMI.

Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Tarek ROUISSI pour sa codirection, son soutien scientifique et pédagogique, ses conseils judicieux et ses explications précieuses tout au cours de ma maîtrise.

Je souhaite remercier aussi le Professeur Denis RODRIGUE et son groupe de recherche de m'avoir permis d'utiliser ses équipements de laboratoire au sein du Département de génie chimique à Université Laval.

Un merci tout spécial à l'ensemble du personnel de l'Institut National de la Recherche Scientifique-Centre Eau, terre et Environnement (INRS-ETE) et de l'Institut Supérieur des Hautes Études en Développement Durable (ISHÉDD) pour leur sympathie ainsi que leur coopération technique et professionnelle.

Je remercie en particulier Monsieur Kamal EL HAJI, Directeur de l'ISHÉDD, pour sa perspicacité scientifique et ses critiques constructives qui ont fait de mes études supérieures un succès.

Mes professeurs, mes collègues, mon équipe de recherche et tous mes amis à l'INRS-ETE méritent également d'être remerciés pour leurs suggestions utiles et pour leur volonté d'entraider. Un merci aussi pour nos collaborateurs d'avoir fourni le financement nécessaire pour la réussite de ce projet de recherche.

Et pour terminer, je voudrais dédier ce mémoire à mes parents, à ma famille et à mon amoureux pour leur amour inconditionnel, leur compréhension, leur patience et leur soutien pour aller de l'avant.



## RÉSUMÉ

L'objectif de cette recherche est de produire de nouveaux matériaux composites à partir des déchets en plastique (post-consommation) des centres de tri au Québec et des fibres naturelles d'origine végétale.

En particulier, l'étude a porté sur la combinaison de l'acide polylactique recyclé (PLAr) qui est l'un des alternatives les plus prometteuses aux polymères à base de pétrole et les microfibrilles de cellulose (MFC) à partir des boues de l'industrie papetière (boues mixtes (BM) et boues de désencrage (BD)) et des fibres de chanvre (FC) considérées comme la nouvelle génération de renforts renouvelables afin de produire des composites biodégradables et de haute performance mécanique (la résistance à la traction et la rigidité).

Afin d'améliorer la compatibilité et l'adhésion interfaciale entre la matrice PLAr et les différents renforts utilisés, les MFC ont été extraites et traitées en utilisant, en premier lieu, un prétraitement physico-chimique à la soude et, en second lieu, un traitement enzymatique (laccases et cellulases). Ensuite, l'effet de la concentration des microfibrilles cellulosiques traitées (1.5, 3 et 6% en poids sec) a été étudié afin de caractériser les échantillons de biocomposites développés en termes de taille, morphologie, propriétés mécaniques (impact et traction) et biodégradabilité.

Les résultats obtenus démontrent que les deux traitements utilisés ont conduit à une diminution considérable de taille des fibres cellulosiques atteignant plus de 90% pour les MFC extraits de BD ainsi qu'une bonne adhésion interfaciale entre la matrice de l'acide poly lactique recyclé et les différents renforts étudiés. L'analyse de la variance suivie par le test de Tukey ont montré que les meilleurs biocomposites, en termes de propriétés mécaniques, sont issus de l'association du PLAr avec les fibres de chanvre (Module d'Young de  $324,53 \pm 3,10$  MPa; résistance à l'impact de  $27,61 \pm 2,94$  kJ/m<sup>2</sup>) suivis des boues mixtes (Module d'Young de  $316,59 \pm 2,80$  MPa; résistance à l'impact de  $20,47 \pm 4,24$  kJ/m<sup>2</sup>) et ensuite les boues de désencrage (Module d'Young de  $315,58 \pm 4,31$  MPa; résistance à l'impact de  $14,59 \pm 2,24$  kJ/m<sup>2</sup>) ce qui a été confirmé par diverses techniques telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), la diffraction des rayons X (DRX) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Le test de biodégradation à l'échelle du laboratoire a montré un taux de biodégradation de 1,97% pour les FC, de 1,57% pour les BD puis de 1,35% pour les BM.

**Mots clés:** nouveau biocomposite, acide polylactique recyclé, microfibrilles cellulosiques, prétraitement physico-chimique, traitement enzymatique, tests mécaniques, tests de biodégradabilité.



# TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS .....	iii
RÉSUMÉ .....	v
TABLE DES MATIÈRES .....	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	ix
LISTE DES FIGURES .....	xi
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	xiii
<b>I. PARTIE I : SYNTHÈSE .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Introduction.....</b>	<b>1</b>
1.1. Problématique .....	2
1.2. Hypothèses.....	3
1.3. Objectifs du travail .....	3
1.4. Organisation du travail .....	4
1.5. Sections du mémoire .....	6
<b>2. Revue de littérature .....</b>	<b>7</b>
2.1. Aperçu général sur les biocomposites à base de biopolymère et de fibres naturelles.....	7
2.2. Les biopolymères.....	12
2.3. Les fibres naturelles pour les biocomposites .....	14
2.4. Le traitement des fibres cellulosiques .....	22
<b>3. Matériels et méthodes expérimentales .....</b>	<b>31</b>
3.1. Matériaux utilisés .....	31
3.2. Procédures expérimentales .....	31
<b>4. Résultats et discussion.....</b>	<b>43</b>
4.1. La production des enzymes ligno-cellulosiques.....	43

4.2.	L'extraction des fibres cellulosiques en utilisant un prétraitement physico-chimique .....	45
4.3.	L'effet des enzymes produites sur les fibres cellulosiques extraites .....	46
4.4.	Les propriétés mécaniques des biocomposites .....	56
4.5.	Le test de biodégradabilité.....	59
5.	Conclusion .....	61
6.	Bibliographie.....	63
II.	Partie II: Article de recherche .....	75
	RÉSUMÉ .....	77
	ABSTRACT .....	78
1.	Introduction.....	79
2.	Materials and methods .....	81
2.1.	Materials.....	81
2.2.	Methods .....	81
3.	Results and discussion.....	91
3.1.	Enzyme production .....	91
3.2.	The alkali pretreatment of the cellulosic fibers .....	94
3.3.	Effect of enzymatic treatment on cellulosic fibers .....	95
3.4.	Mechanical proprieties of the biocomposites .....	103
3.5.	Biodegradation of the biocomposites .....	107
4.	Conclusion .....	109
	Acknowledgements.....	110
	Competing interests.....	110
	References.....	111

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1:</b> Ordre chronologique de quelques études faites sur les matériaux à base de biopolymère et de fibres naturelles.....	9
<b>Tableau 2:</b> Produits PLA commercialisés dans le monde .....	14
<b>Tableau 3:</b> Comparaison entre les fibres naturelles et les fibres de verre .....	15
<b>Tableau 4:</b> Avantages et inconvénients des fibres naturelles.....	16
<b>Tableau 5:</b> Composition chimique et propriétés mécaniques de la fibre de chanvre en comparaison avec d'autres fibres naturelles.....	21
<b>Tableau 6:</b> Les paramètres du traitement alcalin des fibres .....	23
<b>Tableau 7:</b> Champignons et bactéries ayant une activité cellulolytique.....	29
<b>Tableau 8:</b> caractéristiques physico-chimiques du marc de bleuet .....	32
<b>Tableau 9:</b> Plan expérimental utilisé .....	39
<b>Tableau 10:</b> Analyse granulométrique des fibres cellulosiques après le pré-traitement physico-chimique .....	46
<b>Tableau 11:</b> Résultats des tests mécaniques du PLAr et sur ses sur différents biocomposites .....	57
<b>Tableau 12:</b> ANOVA pour les différents types de fibres cellulosiques utilisées. ....	58
<b>Tableau 13:</b> Résultats de la comparaison multiple entre les différents biocomposites. .	59
<b>Table 1:</b> Physicochemical characteristics of blueberry pomace.....	81
<b>Table 2:</b> The experimental plan used for the biocomposites formulation .....	87
<b>Table 3:</b> Standards and number of samples required.....	88
<b>Table 4:</b> Activities comparison of laccase and cellulases produced by various fungi under SSF .....	93
<b>Table 5:</b> Particle size analysis of cellulosic fibers after physicochemical pretreatment. .	95
<b>Table 6:</b> Mechanical properties of rPLA and its biocomposites .....	104
<b>Table 7:</b> The P-value of the different types of cellulosic fibers.....	106
<b>Table 8:</b> Results of the multiple comparison between different biocomposites. ....	106



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1:</b> Organigramme récapitulatif des étapes de la démarche méthodologique.....	5
<b>Figure 2:</b> Quelques applications commerciales de biocomposites à base de fibres naturelles .....	11
<b>Figure 3:</b> Représentation schématique de la diversité de la matière dégradable. ....	12
<b>Figure 4:</b> Synthèse de l'acide polylactique (PLA).....	13
<b>Figure 5:</b> Catégories de fibres naturelles .....	17
<b>Figure 6:</b> Structure de la cellulose .....	18
<b>Figure 7:</b> Schéma de l'organisation structurelle de la paroi cellulaire végétale .....	19
<b>Figure 8:</b> Structure cristalline et amorphe de la cellulose.....	20
<b>Figure 9:</b> les différents types de traitement des fibres cellulosiques .....	23
<b>Figure 10:</b> Illustration schématique de la microstructure de la fibre cellulosique (a) avant traitement et (b) après traitement alcalin .....	24
<b>Figure 11:</b> Micrographies MEB de (a) fibres de chanvre non traitées et (b) fibres traitées à la soude .....	25
<b>Figure 12:</b> Images TEM de nanofibres de cellulose après un traitement chimique; et b traitement enzymatique comprenant un traitement alcalin. Barre d'échelle 2000 nm.....	26
<b>Figure 13:</b> Les trois centres oxydatifs de la laccase.....	27
<b>Figure 14:</b> Schéma des étapes du traitement physico-chimique effectué .....	36
<b>Figure 15:</b> Traitement enzymatiques des trois classes de chaque renfort utilisé.....	37
<b>Figure 16:</b> Étapes de fabrication du biocomposite (PLA / Fibres cellulosiques traitées enzymatiquement).....	40
<b>Figure 17:</b> Test d'impact et de traction.....	41
<b>Figure 18:</b> Bac du test de biodégradabilité .....	43
<b>Figure 19:</b> Profil de l'activité enzymatique des laccases par <i>Trametes versicolor</i> . ....	44
<b>Figure 20:</b> Profil de l'activité enzymatique des cellulases par <i>Aspergillus niger</i> .....	45
<b>Figure 21:</b> Analyse granulométrique des fibres cellulosiques des boues de désencrage (A), des boues mixtes (B) et des fibres de chanvre (C) lors du traitement enzymatique.....	49
<b>Figure 22:</b> Spectres DRX des fibres de chanvre (A), des boues mixtes (B) et des boues de désencrage (C) avant et après le traitement enzymatique.....	51
<b>Figure 23:</b> Microphotographie MEB des fibres de chanvre (A) avant et (B) après traitement enzymatique .....	52

<b>Figure 24:</b> Microphotographie MEB des boues mixtes (A) avant et (B) après traitement enzymatique.....	53
<b>Figure 25:</b> Microphotographie MEB des boues de désencrage (A) avant et (B) après traitement enzymatique .....	53
<b>Figure 26:</b> Les spectres de FTIR pour les fibres de chanvre (A), les boues mixtes (B) et les boues de désencrage (C) avant et après le traitement alcalin et enzymatique.....	55
<b>Figure 27:</b> Poids résiduel du PLAr et de ses biocomposites pendant le test de biodégradation .....	60
<b>Figure 28:</b> Time course of laccase production by the solid-state fermentation of <i>Trametes versicolor</i> .....	91
<b>Figure 29:</b> Time course of cellulase FPase production by the solid-state culture of <i>Aspergillus niger</i> .....	92
<b>Figure 30:</b> Size analysis of cellulosic fibers in hemp fiber (A), mixed sludge (B) and deinked sludge (C) during the enzymatic treatment.....	97
<b>Figure 31:</b> XRD spectra of hemp fibers (A), mixed sludge (B) and deinked sludge (C) before and after enzymatic treatment .....	99
<b>Figure 32:</b> SEM micrographs of mixed sludge (A) before and (B) after enzymatic treatment.....	100
<b>Figure 33:</b> SEM micrographs of hemp fibers (A) before and (B) after enzymatic treatment .....	100
<b>Figure 34:</b> SEM micrographs of deinked sludge (A) before and (B) after enzymatic treatment.....	101
<b>Figure 35:</b> FTIR spectra for hemp fibers (A), mixed sludge (B) and deinked sludge (C) before and after alkali and enzymatic treatment .....	103
<b>Figure 36:</b> Residual weight of rPLA and its biocomposites during the biodegradation test .....	108

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

<b>BD</b>	Boues de désencrage
<b>BM</b>	Boues mixtes
<b>IU</b>	Unité Internationale
<b>FC</b>	Fibres de chanvre
<b>MEB</b>	Microscopie électronique à balayage
<b>PA</b>	Polyamide
<b>PBAT</b>	Polybutylene adipate terephthalate
<b>PBS</b>	Polybutylène succinate
<b>PCL</b>	Polycaprolactone
<b>PE</b>	Polyéthylène
<b>PET</b>	Polytéréphtalate d'éthylène
<b>PHA</b>	Polyhydroxyalcanoate
<b>PLA</b>	Poly lactique acide
<b>PLAr</b>	Poly lactique acide recyclé
<b>PP</b>	Polypropylène
<b>PTT</b>	Polytéréphtalate de triméthylène
<b>rpm</b>	Rotation par minute
<b>TEM</b>	Microscopie électronique en transmission



# I. PARTIE I : SYNTHÈSE

## 1. Introduction

Les préoccupations sur la dégradation de la qualité de l'environnement, en raison des déchets plastiques, et l'épuisement progressif des ressources fossiles ont provoqué une prise de conscience collective permettant aux industriels d'innover dans le domaine des matériaux. D'après une étude menée par l'association mondiale «Plastics Europe» en 2015, la production mondiale en matière plastique a atteint et même dépassé les 300 millions de tonnes en 2014 contre environ 0,5 million de tonnes en 1950 (Europe, 2015).

Conscient de l'importance de l'intégration du concept de développement durable dans l'industrie du plastique, les matériaux traditionnels ont été remplacé par de nouvelles familles de plastique biodégradable issues de ressources renouvelables (Sangeetha et al., 2016). La production de ces biopolymères a augmenté, incluant l'acide polylactique (PLA) qui est le biopolymère le plus utilisé en raison de son faible coût de production, de sa disponibilité commerciale et de ses applications potentielles (Avérous, 2008).

C'est un thermoplastique produit par fermentation de différents polysaccharides naturels, principalement le glucose extrait de l'amidon de maïs, de la canne à sucre, de la betterave à sucre ou du tapioca (Groot et al., 2010). Il peut être également synthétisé soit par polymérisation par condensation de l'acide lactique ou par polymérisation par ouverture de cycle du lactide en présence d'un catalyseur (Sin, 2012).

L'utilisation du PLA a considérablement augmenté depuis de 2008 pour atteindre 1,7 millions de tonnes en 2015. À l'heure actuelle, les technologies de recyclage-valorisation n'ont pas su s'adapter à l'arrivée massive des déchets du PLA. Le recyclage proprement dit du PLA n'est pas intéressant techniquement d'après une étude menée par Kolstad et al. (2012). Il a été également constaté que les propriétés mécaniques du PLA recyclé sont devenues trop faibles pour une application industrielle du polymère (Hamad et al., 2010). Le PLA est une vraie problématique environnementale à l'heure actuelle et comme une nouvelle issue, nous proposons le développement de biocomposite : PLA recyclé-fibres cellulosique. Des travaux préliminaires et antérieurs dans notre équipe ont montré que l'intégration des fibres cellulosiques permet d'aboutir à un biocomposite avec des propriétés mécaniques améliorées (Laadila *et al.*, 2017). Ce biocomposite pourrait être utilisé dans plusieurs applications, en particulier dans l'industrie automobile et dans l'industrie de construction.

Dans une première partie de ce mémoire de maîtrise, nous avons fait une étude bibliographique qui a été divisée en quatre chapitres. Le premier est consacré à la présentation des généralités sur les matériaux biocomposites à base de biopolymère et de fibres naturelles. Le second évoque les variétés des biopolymères biodégradables ainsi que l'acide polylactique utilisé dans la fabrication des biocomposites. Le troisième détaille bien les propriétés des fibres naturelles et l'avantage de leur utilisation comme renfort. Le quatrième et le dernier de cette première partie décrit les méthodes utilisées pour le traitement des fibres cellulosiques pour avoir une meilleure adhésion matrice-renfort.

Dans une deuxième partie de ce mémoire, on a présenté le matériel et les méthodes expérimentales utilisés pour le développement des biocomposites ainsi que pour leurs caractérisations. Ensuite, nous avons présenté la partie interprétation des résultats est abordée pour traiter les résultats obtenus.

On terminera la présentation de ces travaux par une conclusion ainsi qu'une proposition de certaines perspectives offertes par cette étude.

## **1.1.Problématique**

L'industrie de l'emballage fait face à de nombreux défis tels que la raréfaction des ressources pétrochimiques et la persistance de leurs déchets dans l'environnement. C'est ainsi que de nouvelles solutions écologiques ont apparu sur le marché tels que le cas de l'acide poly-lactique (PLA).

Actuellement, ce bioplastique produit à partir de ressources renouvelables a reçu beaucoup d'attention. Il s'agit du plastique le plus utilisé pour les applications d'emballage au Québec en raison de ses excellentes propriétés mécaniques, de sa transparence, de sa biodégradabilité et de sa résistance aux graisses et aux huiles (Tharanathan, 2003).

Cependant, le recyclage et la récupération de ce plastique commence à se poser comme une grande problématique pour les centres de tri de Québec : les volumes récupérés sont en croissance continue les cinq dernières années (Recyc-Québec, 2012), les recycleurs de plastiques n'ont aucun intérêt pour l'utiliser étant donné qu'il perd presque la totalité de ses propriétés après un deuxième cycle d'injection. En plus, les différents essais de compostage ont abouti à un échec, le PLAr est considéré officiellement non compostable (Song *et al.*, 2009).

Afin d'améliorer les performances mécaniques du PLA et de lui offrir une deuxième vie, notre projet propose une alternative verte basée sur le développement de nouveaux biocomposites à partir du PLA post-consommation provenant des centres de tri (de Gaudreau) et des microfibrilles de celluloses extraites à partir des biosolides de l'industrie papetière (boues mixtes et boues de désencrage) et des fibres de chanvre.

En outre, le PLA renforcé par les fibres de cellulose aura des propriétés plus avancées en plus d'une biodégradabilité améliorée. Le biocomposite développé dans ce travail offrira une nouvelle alternative à certains polymères classiques couramment utilisés au Québec.

## **1.2.Hypothèses**

Les principales hypothèses de ce travail sont:

- Les fibres de chanvre ainsi que les boues mixtes et les boues de désencrage des usines de pâtes et papiers ont des caractéristiques physico-chimiques satisfaisantes pour renforcer l'acide polylactique recyclé (PLAr) sans détériorer ses propriétés mécaniques.
- Le traitement enzymatique des biosolides papetiers et des fibres de chanvre pourrait améliorer les propriétés mécaniques du biocomposite fabriqué en réduisant l'hydrophobicité et en améliorant l'adhésion interfaciale entre la matrice de PLAr et les différents types de fibres cellulosiques utilisés.

## **1.3.Objectifs du travail**

### **1.3.1. Objectif principal**

L'objectif principal de ce travail est d'optimiser la formulation des biocomposites à partir des matrices polymères (acide poly-lactique recyclé) et des microfibrilles de celluloses de différentes tailles extraites à partir des biosolides papetiers (boues mixtes et boues de désencrage) et à partir des fibres de chanvre.

### **1.3.2. Objectifs secondaires**

Les objectifs secondaires de ce travail sont:

- Extraction des microfibrilles de celluloses à partir des biosolides papetiers et des fibres de chanvre en utilisant un prétraitement physico-chimique à la soude (NaOH 10% v/v);
- Traitement enzymatique et activation de la surface des microfibrilles cellulosiques en utilisant les enzymes ligno-cellulosiques (cellulases et laccases) produites par fermentation à l'état solide;
- Optimisation et formulation des biocomposites;
- Étude de l'effet de la taille et de l'origine des fibres sur les biocomposites développés en termes de performance mécanique, de résistance, de rigidité et de biodégradabilité.

#### **1.4.Organisation du travail**

Pour aboutir aux objectifs visés par cette étude, nous avons adopté la démarche méthodologique suivante :

1. la première partie consiste à faire une extraction chimique des fibres cellulosiques à partir boues de désencrage et les boues mixtes de l'industrie papetière ainsi que les fibres de chanvre comme source de cellulose.
2. La deuxième partie de cette étude porte sur la production des enzymes laccases et cellulases par fermentation à l'état solide (SSF) en utilisant le marc de bleuet comme substrat de fermentation.
3. Concernant la troisième partie, des mélanges seront effectués entre les fibres cellulosiques traitées préalablement avec les enzymes produites et la matrice de PLAr à différentes concentrations afin de formuler les biocomposites souhaités. Ces nouveaux biocomposites seront soumis à une série de tests (tests d'impact et tests de traction) afin de déterminer leurs propriétés mécaniques dans le but d'optimiser les quantités de renfort utilisées pour avoir un effet significatif quant à l'amélioration des propriétés mécaniques de chacun de ces biocomposites obtenus.
4. Enfin, un test de biodégradabilité sera effectué pour les différents biocomposites formulés. Les échantillons seront enfouis dans le sol et le suivi de la perte de poids sera fait pour une période de 6 mois. Les résultats obtenus permettront, ainsi, de déterminer la cinétique de leur biodégradabilité.

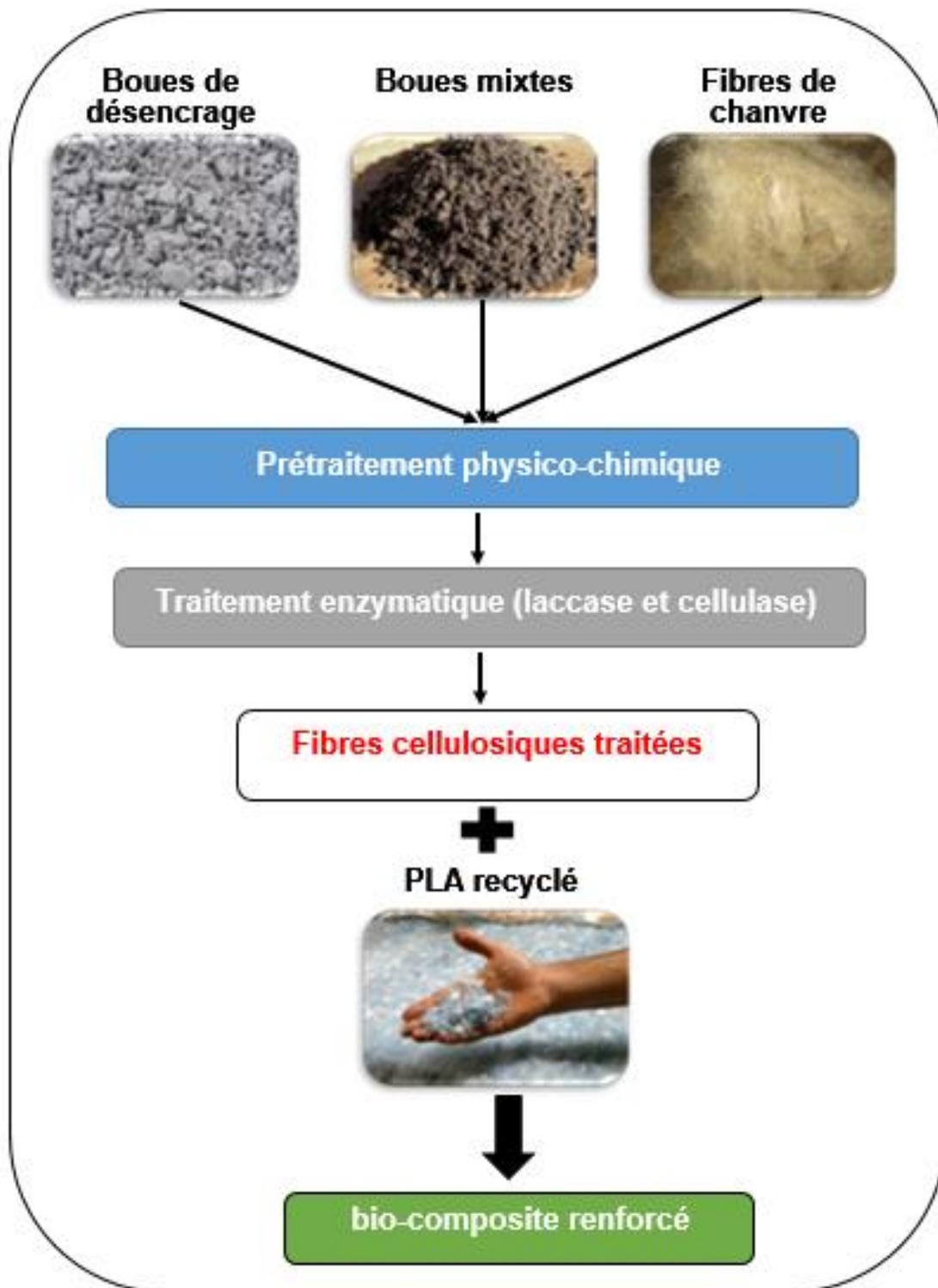


Figure 1: Organigramme récapitulatif des étapes de la démarche méthodologique.

## **1.5. Sections du mémoire**

Outre l'introduction et la conclusion et recommandations, ce travail comprend trois chapitres en plus d'un article de recherche intitulé " feasibility assessment of the use of different types of enzymatically treated cellulosic fibers for polylactic acid (PLA) recycling".

- Le premier chapitre est attelé à la revue de la littérature (renfort, matrice et biocomposite).
- Le deuxième chapitre est consacré à la méthodologie.
- Le troisième chapitre est dédié à la présentation et la discussion des différents résultats obtenus ainsi que leur interprétation.

## **2. Revue de littérature**

Dans le présent chapitre, une attention particulière sera accordée au développement qu'a connu l'industrie des matériaux composites, plus particulièrement, ceux dont tous les composants, fibres et matrice polymère sont d'origines renouvelables.

Nous évoquerons l'effet du renforcement de l'acide poly-lactique (PLA) avec des fibres cellulosiques.

### **2.1. Aperçu général sur les biocomposites à base de biopolymère et de fibres naturelles**

#### **2.1.1. Description d'un biocomposite**

Les mots-clés tels que "biodégradable", "biocomposite", "durable", "biocompatible", "vert", "biosourcé", "renouvelable", "écologique", et "biopolymère" sont très courants dans l'étiquetage des emballages, particulièrement, alimentaires. Ceci démontre clairement la prise de conscience des consommateurs et les nouvelles tendances qui s'orientent de plus en plus envers les bioplastiques biodégradables. Généralement, le terme biocomposite couvre les matériaux composites fabriqués à partir de la combinaison soit de:

1. Polymères non biodégradables dérivés du pétrole renforcés de fibres naturelles,
2. Biopolymères renforcés de fibres naturelles, ou
3. Biopolymères renforcés de fibres synthétiques (verre, carbone, etc.).

Les biocomposites sont définis comme des matériaux dont au moins l'un des constituants proviennent de ressources naturelles (AL-Oqila & Sapuan, 2014). Cela comprend les matériaux fabriqués à partir de polymères non biodégradables dérivés de pétrole renforcés de fibres naturelles et de fibres synthétiques renforcées de biopolymères comme le verre et le carbone (Mohanty et al., 2002). La troisième catégorie renferme les biopolymères renforcés par des fibres naturelles, que l'on appelle communément «biocomposites verts» (John & Thomas, 2008). Les biocomposites biodégradables sont ceux dans lesquels la matrice polymérique est biodégradable. Ils comprennent deux familles différentes: bio-sourcées et à base de pétrole. Les matières premières des polymères biodégradables sont différents des biopolymères. Les polymères

biodégradables peuvent être créés à partir de matières premières renouvelables ou pétrochimiques et peuvent être classés en tant que matrices polymères verts. De plus, les biocomposites biosourcés ou parfois appelés composites verts biodégradables sont des termes utilisés lorsque la fibre et la matrice proviennent toutes les deux de ressources renouvelables.

### **2.1.2. Aperçu sur les biocomposites renforcés avec des fibres naturelles**

Les avancées récentes témoignent bien de l'importance et le potentiel de l'utilisation des biocomposites dans de nombreuses applications. Mise à part ses propriétés remarquables, l'utilisation de composites à base de pétrole est devenue peu attrayante pour de nombreuses raisons, y compris les problèmes d'élimination et de recyclage, ainsi que les préoccupations environnementales et sociétales.

Par conséquent, les biocomposites à base de fibre naturelle ont été étudiés récemment vu leur propriétés remarquables en plus de leur biodégradabilité. Le tableau suivant présente les études les plus pertinentes que nous avons trouvées et qui ont été faites sur les biocomposites.

**Tableau 1: Ordre chronologique de quelques études faites sur les matériaux à base de biopolymère et de fibres naturelles.**

Année	Fibre naturelle	Biopolymères	Étude	Applications	Référence
1999	Chanvre	Acide polylactique (PLA)	Étudier l'effet du traitement chimique sur la fibre de chanvre afin d'améliorer ses propriétés mécaniques en tant que renfort pour les composites à base de PLA	Biocomposites	(Riedel & Nickel, 1999)
2000	Jute	PHBV	Étudier les effets de différents traitements chimiques de la fibre de jute afin d'améliorer ses propriétés en tant que renfort dans les composites à base de PHBV	Biocomposites	(Mohanty <i>et al.</i> , 2000)
2005	Chanvre, lin, fibre de bois et riz	Acide polylactique (PLA)	Étudier la biodégradabilité de différents biocomposites fabriqués à partir de différentes ressources renouvelables et de matériau biodégradable (PLA)	Biocomposites	(Lopez <i>et al.</i> , 2005)
2007	Lin	Résine de soja	Fabrication de composites «verts» respectueux de l'environnement en utilisant des résines à base de concentré de protéines de soja modifiées	Biocomposites	(Huang & Netravali, 2007)
2009	Jute	Polybutylène de succinate (PBS)	Étudier la biodégradabilité des biocomposites à base de PBS et de fibre de jute	Biocomposites	(Liu <i>et al.</i> , 2009)
2010	Lin	Polyhydroxybutyrate (PHB) et son copolymère hydroxyvalérate (HV)	Étudier l'influence de l'ajout des fibres de lin sur les propriétés mécaniques du PHB et de son copolymère HV	Biocomposites	(Barkoula <i>et al.</i> , 2010)
2012	Chanvre	Acide polylactique (PLA)	Étudier le comportement physique des biocomposites de chanvre et de PLA, en particulier les propriétés thermiques et le comportement viscoélastique	Biocomposites	(Song <i>et al.</i> , 2012)
2012	Bambou	Acide polylactique (PLA)	Étudier le développement et la caractérisation mécanique d'un matériau composite fabriqué à partir d'une ressource renouvelable (bambou) et de PLA	Biocomposites	(Porras & Maranon, 2012)
2012	Jute	Résine de soja	Étudier les propriétés mécaniques et de biodégradation du jute, de la matrice de soja et de leurs biocomposites	Biocomposites	(Behera <i>et al.</i> , 2012)
2012	Chanvre	Polyhydroxybutyrate (PHB)	Les biopolymères de PHB et leurs biocomposites à base de chanvre sont soumis à deux procédures d'altération accélérée	Biocomposites	(Michel & Billington, 2012)

2013	Bambou	Acide polylactique (PLA)	Étudier l'influence des paramètres de fabrication sur les propriétés mécaniques du biocomposite bambou-PLA préparé par la méthode de moulage par compression en utilisant la démarche Taguchi	Biocomposites	(Rawi <i>et al.</i> , 2013)
2014	Bambou	Acide polylactique (PLA)	Explorer le potentiel de l'utilisation de biocomposites entièrement verts fabriqués à partir de ressources renouvelables dans les applications d'emballage par rapport aux thermoplastiques classiques	Emballage	(Rawi <i>et al.</i> , 2014)
2015	Lin	Polyhydroxybutyrate (PHB)	Les composés phénoliques des fibres de lin sont étudiés plus en détail afin de déterminer l'impact de leur modification sur le métabolisme des phénylpropanoïdes et établir l'utilité des produits composés de lin et de PHB dans des applications biomédicales, en particulier la production de pansements.	Applications biomédicales	(Kulma <i>et al.</i> , 2015)
2016	Chanvre et Lyocell	Acide polylactique (PLA)	Comparer les caractéristiques mécaniques des biocomposites fabriqués à partir de chanvre / PLA, de chanvre-Lyocell / PLA et de Lyocell / PLA	Biocomposites	(Baghaei & Skrifvars, 2016)
2017	Boues primaires et boues secondaires	Acide polylactique recyclé (PLAr)	Améliorer les propriétés mécaniques du PLA recyclé en utilisant les biosolides de l'industrie papetière traités chimiquement et enzymatiquement	Biocomposites	(Laadila <i>et al.</i> , 2017)
2018	Chanvre, boues mixtes et boues de désencrage	Acide polylactique recyclé (PLAr)	Étudier l'effet d'un traitement physico-chimique couplé à un traitement enzymatique sur les propriétés mécaniques et sur la biodégradabilité des biocomposites fabriqués à partir de PLAr et renforcés par les boues papetières et les fibres de chanvre	Biocomposites	Notre étude

### 2.1.3. Applications des matériaux biocomposites

Le marché nord-américain des composites représente environ la moitié du marché mondial (47%), tandis que l'Europe et l'Asie ont des parts respectives de 28% et 23% (Summerscales et al., 2010). Les composites à base de fibres naturelles, dépendamment de la région, sont utilisés dans plusieurs applications. En Amérique du Nord, ils sont principalement utilisés dans les industries de la construction. De 2000 à 2005, la demande en matériaux composites renforcés de fibres naturelles a triplé en Amérique du Nord (Ton-That & Denault, 2007). En Europe, l'industrie automobile est le principal client pour ces biocomposites (pour principalement réduire le poids total des véhicules). La demande industrielle en biocomposites à base de fibres naturelles a atteint plus de 100.000 tonnes en 2010, soit environ deux fois plus qu'en 2005. Tous les principaux constructeurs automobiles tels que Mercedes-Benz, BMW, Peugeot et Audi utilisent des biocomposites à base de fibres naturelles dans leurs produits (Ton-That & Denault, 2007). Dans l'ensemble, la demande sur les biocomposites est en croissance continue.



Figure 2: Quelques applications commerciales de biocomposites à base de fibres naturelles.

## 2.2. Les biopolymères

Les biopolymères sont des polymères qui sont générés à partir de sources naturelles renouvelables. Ils sont souvent biodégradables et non toxiques. Les matériaux biodégradables sont définis comme les matériaux qui peuvent être dégradés par l'action enzymatique d'organismes vivants produisant, ainsi, du CO<sub>2</sub>, de l'eau et de la biomasse dans des conditions aérobies ou produisant des hydrocarbures, du méthane et de la biomasse dans des conditions anaérobies ( Ren et al., 2009; Guo et al., 2012). Ils peuvent être fabriqués soit à partir de systèmes biologiques tels que les micro-organismes, les plantes et les animaux, ou ils peuvent être chimiquement synthétisés à partir de matériaux biologiques tels que l'amidon, les graisses naturelles, les sucres ou les huiles. Deux approches sont utilisées pour convertir ces matières premières en biopolymères:

1. L'extraction du polymère natif à partir de tissu végétal ou animal; et
2. La polymérisation chimique ou biotechnologique des monomères (Flieger et al., 2003).

La figure 3 illustre schématiquement la variété des plastiques biodégradables.

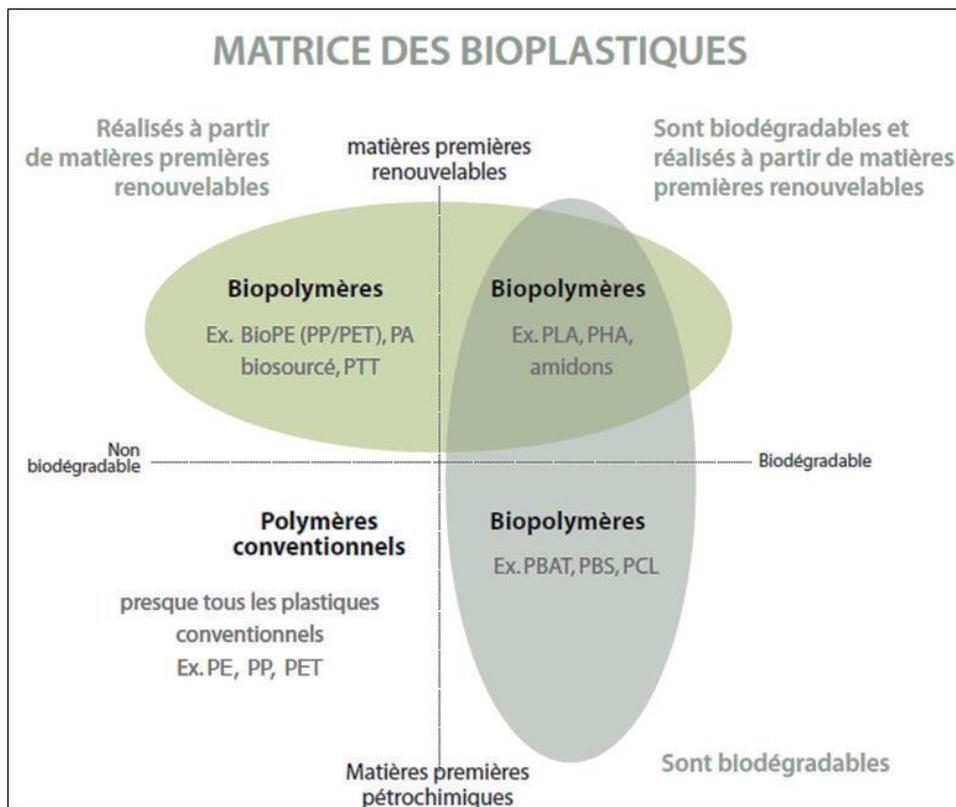


Figure 3: Représentation schématique de la diversité de la matière dégradable (Lapointe, 2012).

### 2.2.1. L'acide poly-lactique (PLA)

L'acide poly-lactique (PLA) qui est un polymère produit à partir de ressources renouvelables, a reçu beaucoup d'attention les dernières années. La matière première renouvelable telle que le maïs et la canne à sucre est fermentée pour obtenir des monomères de lactide et d'acide lactique. La polymérisation en deux étapes du lactide par ouverture de cycle est la méthode la plus courante pour acquérir le poids moléculaire élevé du PLA (supérieur à 100.000 Da).

En 2002, Cargill Dow a utilisé environ 300 millions USD pour commencer à produire en masse son nouveau plastique à base de PLA sous la marque NatureWorks™ (Flieger et al., 2003). La figure 4 présente le processus de synthèse du PLA.

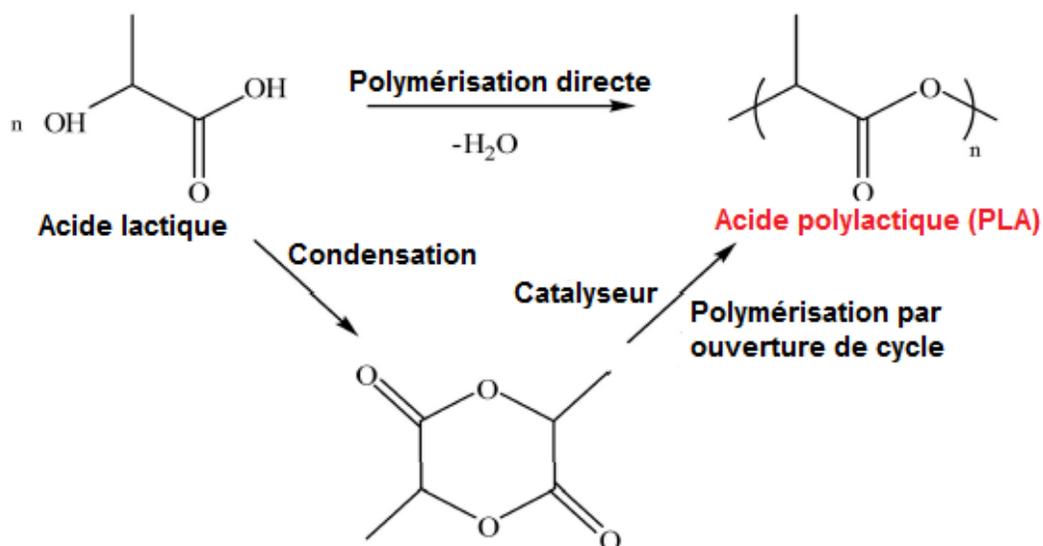


Figure 4: Synthèse de l'acide poly-lactique (PLA) (Bajpai et al., 2014).

Le PLA présente plusieurs avantages, tels que son obtention à partir d'une source agricole renouvelable, sa production qui utilise du dioxyde de carbone et offre d'importantes économies d'énergie, son recyclage et son compostage (dans de bonnes conditions), ainsi que ses propriétés physiques et mécaniques qui peuvent être manipulées à travers l'architecture du polymère (Auras et al., 2004).

Cependant, l'inconvénient du traitement du PLA à l'état fondu est sa tendance à subir une dégradation thermique, qui influence sa température de traitement et le temps de séjour dans l'extrudeuse et le canal chaud. Cela affecte la recyclabilité du PLA (Hamad et al., 2011). Plusieurs rapports ont montré que le PLA est thermiquement instable au-dessus

de sa température de fusion. La présence d'humidité a un effet particulièrement important à des températures plus élevées car elle induit une hydrolyse. Ainsi, il faut veiller à ce que le PLA ne subisse pas de dégradation pendant le traitement. Cependant, le séchage des échantillons avant utilisation ou le traitement sous atmosphère d'azote est recommandé. Du point de vue coût sur le marché, le PLA est comparable avec celui du polyéthylène téréphtalate (PET) et plus élevé que le polyéthylène (PE) et le polypropylène (PP). L'attention primaire du PLA en tant que matériau d'emballage a ciblé les films de haute valeur, les thermoformages rigides, les conteneurs d'aliments et de boissons et les papiers d'emballage. Cependant, étant donné que les technologies de production sont en évolution, cela peut réduire les coûts de production du PLA. À ce moment-là, il pourrait être utilisé dans une plus large gamme de produits d'emballage.

**Tableau 2: Produits PLA commercialisés dans le monde.**

<b>Marque</b>	<b>Entreprise</b>	<b>Pays</b>
NatrueWorks Ingeo®	Cargill Dow	États-Unis (PLLA PDLA PDLLA)
Resomer®	Evonic	Allemagne (PLLA, PDLLA)
L series, D series	Corbion	Hollande (PLLA, PDLA)
Futero®	Futero	Belgique (PDLLA)
Lacea®	Mitsui Chem	Japon (PLGA)
TERRAMAC	UNITIK	japon
ECODEAR™	Toray	japon
REVODE	Hisun	Chine

## **2.3. Les fibres naturelles pour les biocomposites**

### **2.3.1. Avantages et inconvénients**

L'intérêt croissant pour les fibres naturelles est principalement dû à leur faible densité, qui est généralement 1,25-1,50 g / cm<sup>3</sup> par rapport à celle des fibres de verre qui est de 2,6 g / cm<sup>3</sup>, permettant aux fibres naturelles de fournir une résistance spécifique et une rigidité supérieures dans les matériaux plastiques (Hariharan & Khalil, 2005). L'autre moteur clé de la substitution des fibres naturelles pour le verre est lié au prix faible des fibres naturelles (200-1000 US \$ / tonne) par rapport au verre (1200-1800 US \$ / tonne) (Jawaid & Khalil, 2011). Les fibres naturelles offrent également plusieurs avantages car elles sont recyclables, biodégradables, abondantes, présentent de bonnes propriétés mécaniques,

fournissent de meilleures conditions de travail et sont moins abrasives à l'équipement par rapport aux fibres synthétiques communes, ce qui peut contribuer à des réductions de coûts significatives (Faruk et al., 2014). Toutes ces caractéristiques rendent leur utilisation très attrayante pour la fabrication des composites à matrice polymère.

**Tableau 3: Comparaison entre les fibres naturelles et les fibres de verre (Wambua et al., 2003).**

<b>Fibres naturelles</b>	<b>Fibres de verre</b>
Faibles densités	Densité est deux fois celle des fibres naturelles
Faible coût	Faible coût aussi mais supérieur à celui des fibres naturelles
Renouvelables et recyclables	Non renouvelables et recyclables
Large distribution	Large distribution
Non abrasives aux machines	Abrasives aux machines
Aucun risque de santé en cas d'inhalation	Risquées pour la santé en cas d'inhalation
Biodégradables	Non biodégradables

Cependant, les chercheurs qui ont travaillé dans le domaine des fibres naturelles et des biocomposites conviennent que ces sources renouvelables présentent certains inconvénients, tels qu'une mauvaise mouillabilité, une incompatibilité avec certaines matrices polymériques et une forte absorption d'humidité (Duhovic & Jayaraman, 2008; Faruk et al., 2014). Les principales différences entre les fibres naturelles et les fibres de verre sont indiquées dans le tableau 3 ci-dessus. Le problème le plus courant des biocomposites à fibres est par rapport à l'adhérence fibre-matrice. La mauvaise adhérence entre les polymères hydrophobes et les fibres hydrophiles des biocomposites renforcés aux fibres naturelles peuvent conduire à des propriétés mécaniques plus faibles. Par conséquent, un bon lien entre la matrice et les fibres est essentiel. Dans un biocomposite renforcé par des fibres, la matrice joue un rôle important dans le transfert de la charge appliquée aux fibres rigides à travers les contraintes de cisaillement à l'interface. La totalité des capacités des fibres dans le biocomposite ne peuvent pas être exploitées si l'adhérence est médiocre à l'interface, tout en laissant le composite sensible aux attaques environnementales qui peuvent l'affaiblir, réduisant ainsi sa durée de vie. Ces propriétés peuvent être améliorées par des traitements physiques et chimiques (El-Sabbagh, 2014; Le Moigne et al., 2014). Les fibres cellulosiques sont des composés

hydrophiles et sensibles à l'humidité, ce qui peut affecter leurs propriétés mécaniques et physiques et conduire à des variations dimensionnelles des biocomposites. Leur teneur en humidité peut varier entre 5% et 10%. Les autres inconvénients des fibres naturelles sont la sensibilité à l'humidité, l'hétérogénéité et la faible stabilité thermique. La dégradation thermique des fibres naturelles est un processus à trois étapes. La première étape, de 250 à 300 °C, est attribuée aux composants de faible poids moléculaire tels que l'hémicellulose. Le deuxième processus de décomposition est observé dans la gamme de température 300-400 °C et est associé à la dégradation de la cellulose ainsi que le troisième est observé autour de 450 °C et il est dû à la dégradation de la lignine (Lee & Wang, 2006; Tajvidi & Takemura, 2010). La dégradation des fibres naturelles est un aspect crucial dans le développement de biocomposites à base de polymères et de fibres naturelles et peut limiter l'utilisation de certains thermoplastiques.

La dégradation thermique des fibres entraîne également la production de matières volatiles à des températures de traitement au-dessus de 200 °C. Cela peut conduire à des produits polymères poreux avec des densités et des propriétés plus faibles (Reddy & Yang, 2007; Reddy & Yang, 2009). Les principaux avantages et inconvénients de l'utilisation des fibres naturelles dans la fabrication de biocomposites sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4: Avantages et inconvénients des fibres naturelles (Sreekumar et al., 2007; Duhovic & Jayaraman, 2008; Jawaid & Khalil, 2011).**

<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
Un poids spécifique inférieur entraîne une résistance spécifique et une rigidité supérieures à celles du verre	Propriétés mécaniques plus faibles, en particulier la résistance aux chocs
Ressources renouvelables	Hétérogénéité
Production à faible investissement et à cout réduit	Sensibilité à l'humidité
Faible abrasion	Stabilité thermique faible
Non toxique	Faible durabilité
Abondamment disponible	Mauvaise résistance au feu
Biodégradable	Faible adhésion entre la fibre et la matrice
Recyclage thermique possible	fluctuation des prix selon les résultats de la récolte ou de la politique agricole

Une grande variété de fibres peut être appliquée en tant que renfort de structure. Cependant, les fibres naturelles ont trois catégories principales en fonction de leur origine, comme le montre la figure 5 ci-dessous.

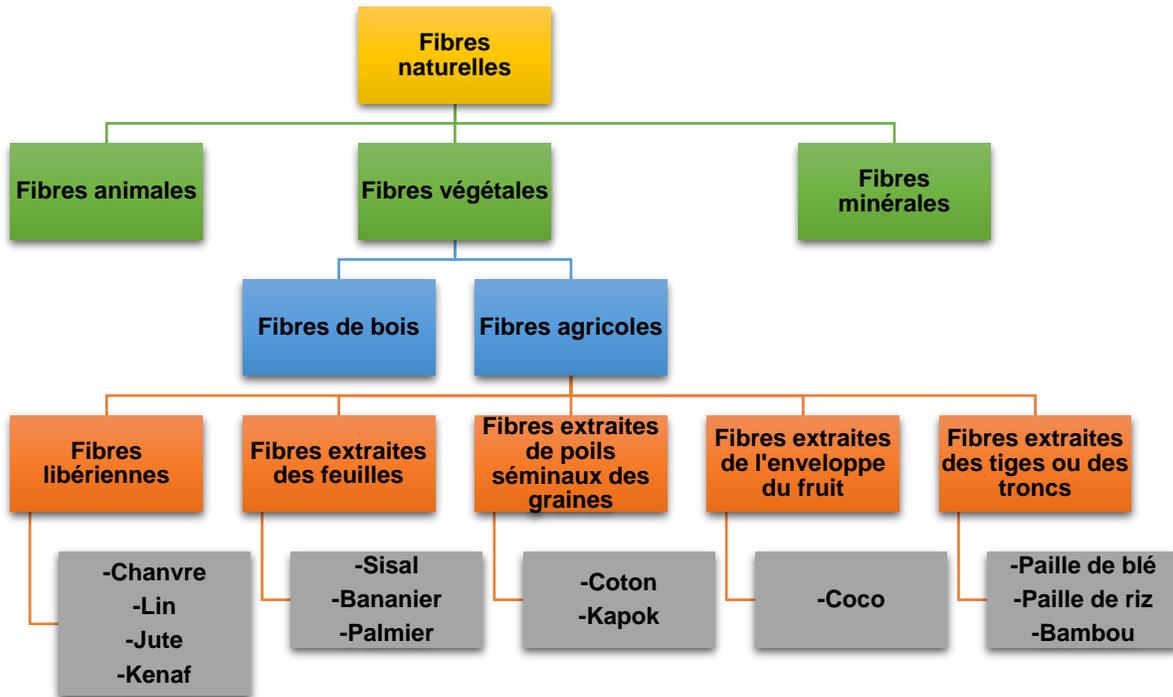


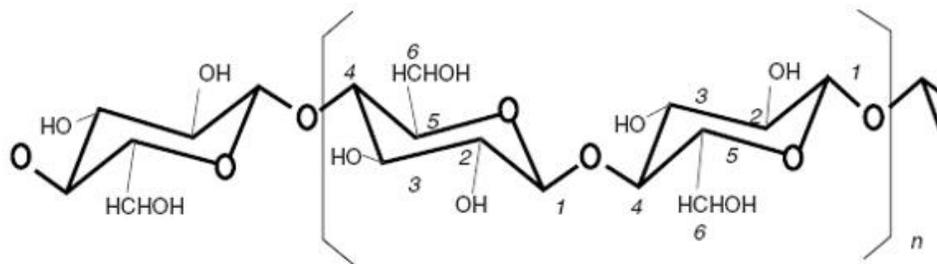
Figure 5: Catégories de fibres naturelles (Duhovic & Jayaraman, 2008; Jawaid & Khalil, 2011; Rowell, 2008).

### 2.3.2. Les fibres de cellulose

La cellulose est l'un des composés organiques les plus abondants trouvés dans la nature. La cellulose est insoluble dans l'eau et dans les solvants organiques, mais peut gonfler dans plusieurs liquides protiques et aprotiques polaires. Le manque de solvant approprié a été l'une des principales raisons de son exploitation limitée. L'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) a estimé qu'environ 3,2 milliards de m<sup>3</sup> de cellulose existent sur terre, dont environ 1% seulement est utilisé (Hatakeyama & Hatakeyama, 2006). La cellulose peut être obtenue à partir des arbres, certaines algues, champignons, bactéries et certains animaux. Lorsque la cellulose est dissoute dans une solution, elle est appelée cellulose régénérée. En comparaison avec les renforts

inorganiques, certains des avantages de l'utilisation de la cellulose comme renforcement de la matrice polymère sont sa nature renouvelable, sa faible densité, sa surface relativement réactive due à la présence de groupes hydroxyles (modification de surface possible), et son faible coût (Azizi Samir et al., 2005).

La fibre cellulosique est un polymère linéaire polydispersé de  $\beta$  (1,4) -D-glucose et a une configuration syndiotactique. Les unités de  $\beta$  -D-glucose existent dans la configuration de chaise  ${}^4C_1$  qui est la conformation d'énergie la plus basse. La figure 6 montre la structure de la cellulose dans sa configuration de chaise (Nevell & Zeronian, 1985).

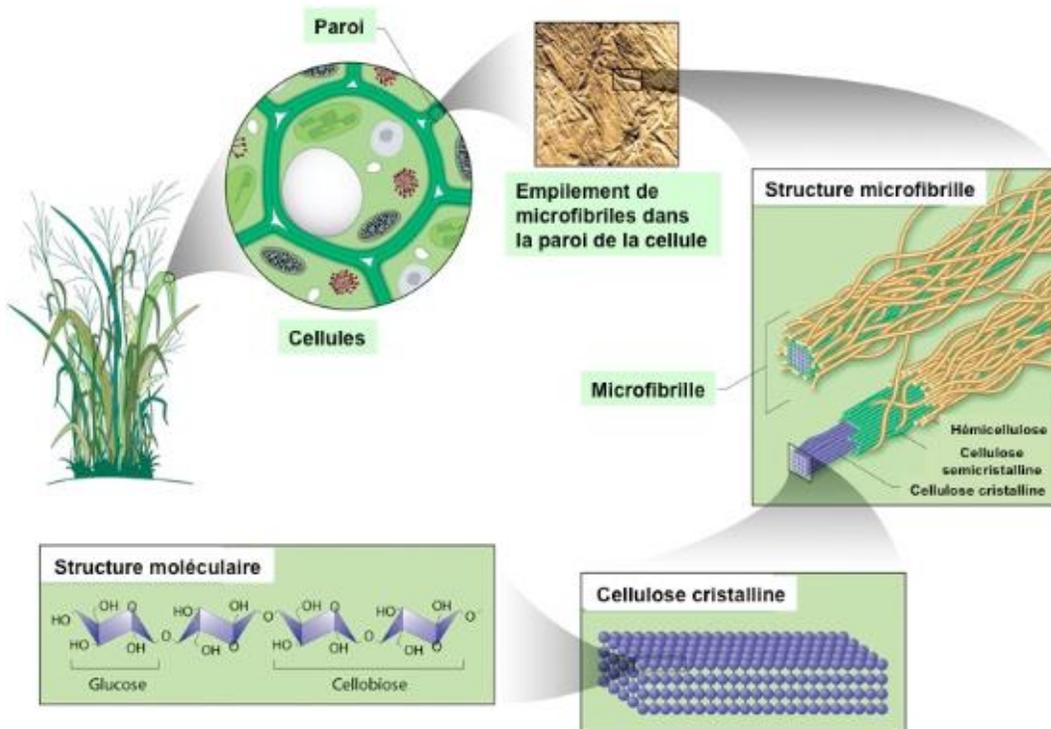


**Figure 6: Structure de la cellulose (Nevell & Zeronian, 1985).**

En raison de la liaison hydrogène entre les groupes hydroxyles des molécules adjacentes, les chaînes de cellulose s'agrègent pour former une fibrille. Une fibrille est un faisceau de molécules stabilisées latéralement par une liaison hydrogène entre des molécules adjacentes. L'arrangement moléculaire de ces faisceaux fibrillaires est appelé microfibrilles. Une microfibrille contient plusieurs fibrilles élémentaires qui sont à leur tour composées de multiples chaînes de cellulose. La disposition des microfibrilles est suffisamment régulière pour présenter une structure cristalline aux rayons X (Sun et al., 2004).

Les microfibrilles ont une largeur d'environ 10 à 30 nm et peuvent contenir 2 à 30.000 molécules de cellulose. Comme mentionné précédemment, la cellulose peut être naturelle (native) ou artificielle (régénérée). Il est très difficile de trouver de la cellulose à l'état pur. Quand elle est dérivée de sa plante source, la cellulose est associée à d'autres substances comme la lignine et l'hémicellulose. En plus de la lignine et de l'hémicellulose, un certain nombre de composants non structuraux tels que des cires, des sels inorganiques et des substances azotées sont également présents (Fry, 2001). La figure 7 montre le schéma de la structure hiérarchique du bois (Levy et al., 2002).

### 2.3.3. Structure cristalline de la cellulose

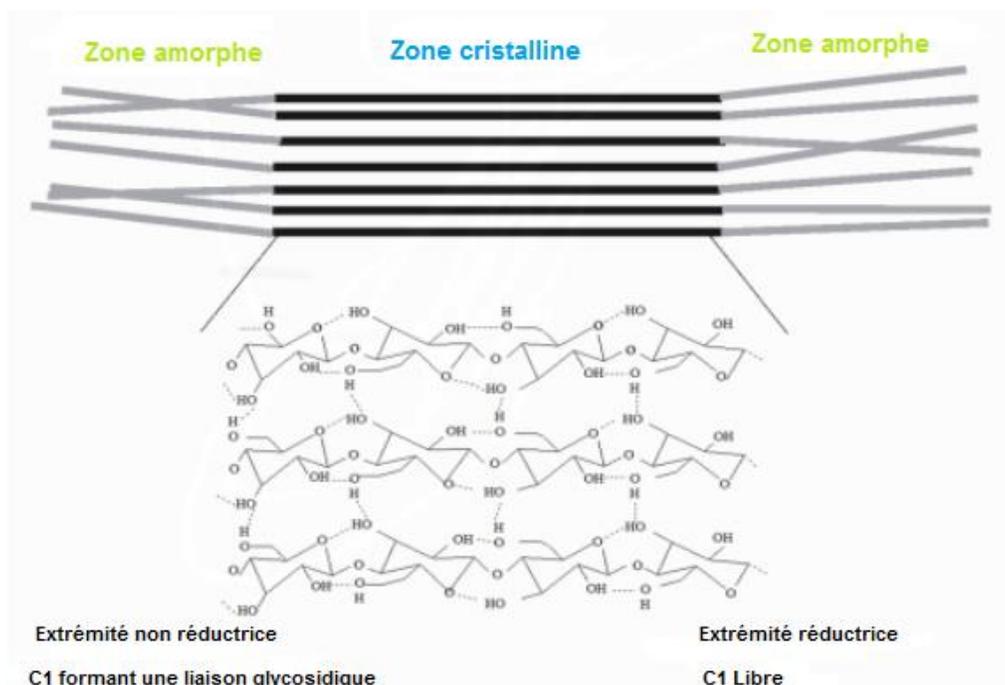


**Figure 7: Schéma de l'organisation structurale de la paroi cellulaire végétale (Source: Office of Biological and Environmental Research of the U.S. Department of Energy Office of Science).**

Chez les plantes, la cellulose est synthétisée par des protéines CESA (Cellulose Synthase) intégrées dans la membrane plasmique disposées en groupes hexamères appelés particules de rosettes (Kimura et al., 1999).

On pense que les cristallites de cellulose sont imparfaites, le modèle traditionnel de la cellulose à deux phases décrit les chaînes de cellulose comme contenant à la fois des régions cristallines (ordonnées) et amorphes (moins ordonnées). La structure cristalline de la cellulose (figure 8) implique une structure dans laquelle tous les atomes sont fixés en position discrète l'un par rapport à l'autre. Une caractéristique importante du réseau cristallin est que les molécules constitutives des microfibrilles individuelles sont suffisamment serrées pour empêcher la pénétration non seulement par des enzymes, mais même par de petites molécules telles que l'eau. Alors que sa résistance à la dégradation enzymatique peut poser des problèmes, un gros avantage de la cellulose est son homogénéité (Lynd et al., 2002; Park et al., 2010; Horn et al., 2012).

Des régions cristallines hautement ordonnées sont intercalées avec des régions contenant de la cellulose désorganisée ou amorphe, qui constituent 5 à 20% de la microfibrille. De nombreuses études ont montré que la cellulose (désordonnée ou amorphe) est hydrolysée rapidement que la cellulose partiellement cristalline; ce fait soutient l'idée que le degré initial de cristallinité est important pour déterminer la digestibilité enzymatique d'un échantillon de cellulose. La cristallinité, est une mesure de la fraction pondérale des régions cristallines, et est l'une des plus importantes propriétés mesurables de la cellulose qui influe sur sa digestibilité enzymatique (Levy et al., 2002; Vaaje-Kolstad et al., 2010).



**Figure 8: Structure cristalline et amorphe de la cellulose (Koyama et al., 1997).**

### 2.3.2.1. *Fibres de chanvre*

Les fibres de chanvre connaissent une utilisation croissante comme renforcements dans les matériaux composites, remplaçant souvent les fibres de verre. Trouvé dans le liber de la plante de chanvre, ces fibres ont une résistance et une rigidité spécifiques qui sont comparables à celles des fibres de verre. Les propriétés physiques et mécaniques de ces fibres sont encore en exploration.

Il a été montré (Yang & Kokot, 1996) que la dégradation thermique des fibres naturelles se produit généralement en deux étapes: une à 220-280 ° C et l'autre à 280-300° C. La première gamme est associée à la dégradation de l'hémicellulose, tandis que la seconde est associée à la dégradation de la cellulose et de la lignine. Pour les fibres de chanvre, Prasad et al. (2005) ont montré que le chauffage des fibres entre 160° C et 260 °C entraîne un ramollissement de la lignine conduisant à l'ouverture des faisceaux de fibres en fibres individuelles. L'effet était plus prononcé pour les fibres chauffées dans l'air que pour celles en environnement inerte (azote).

**Tableau 5: Composition chimique et propriétés mécaniques de la fibre de chanvre en comparaison avec d'autres fibres naturelles (Bledzki et al., 1996; Mohanty et al., 2002; Li et al., 2007).**

Fibre	Cellulose (%)	Hémicellulose (%)	Lignine (%)	Pectine (%)	Elongation (%)	Module d'Young (GPa)	Résistance à la traction (MPa)
chanvre	70.2-74.4	17.9-22.4	2.7-5.7	0.9	1.6	550-900	70
coton	82.7	5.7	1	-	3-10	287-597	5.5-12.6
Lin	71	18.6-20.6	2.2	18.6-20.6	1.2-3.2	345-1500	27,6-80
Jute	61-71.5	13.6-20.4	11-12	0.2	1.5-1.8	393-800	10-30
Sisal	67-78	10-14.2	8-11	10	2-14	400-700	9-38

### 2.3.2.2. Biosolides de l'industrie papetière

Les biosolides papetiers, également appelés boues de l'industrie papetière, sont considérés comme des matériaux cellulosiques (Jang & Lee, 2000) car ils sont principalement composés de fibres cellulosiques et de matériaux inorganiques. Dû à leurs compositions, ils ont le potentiel de remplacer les renforts classiques tels que le talc, le carbonate de calcium et l'argile (Son *et al.*, 2001).

Les boues de papier ne sont pas considérées comme une menace majeure en termes de métaux lourds (Boni et al., 2004) et peuvent être introduites dans les résines phénoliques (Jang et al., 2000) ainsi que dans les thermoplastiques à bas point de fusion comme le polypropylène (PP) (Jang & Lee, 2000).

Généralement, les matériaux cellulosiques sont largement utilisés dans les résines thermodurcissables phénoliques et autres car ils réduisent le rétrécissement pendant le moulage, ce qui entraîne une résistance aux chocs améliorée des produits finis (Simitzis et al., 1996).

Par exemple, les biocomposites de boues de papier / PP peuvent être utilisés comme matériaux de construction dans les bâtiments domestiques et industriels ainsi que dans la fabrication de meubles. L'inconvénient de telles applications est par rapport à leur inflammabilité qui peut être améliorée en ajoutant des matériaux ignifuges (Jang & Lee, 2000).

#### **2.4. Le traitement des fibres cellulosiques**

La performance mécanique des biocomposites polymères dépend principalement de quelques facteurs clés, y compris les propriétés physiques des composants individuels (à savoir la matrice et les fibres de renforcement), l'interaction entre la fibre et la matrice, et l'orientation des fibres de renforcement. La nature hautement polaire et hydrophile de la surface des fibres les rend difficiles à lier avec la matrice non polaire couramment utilisée, par ex. polyoléfine. Par conséquent, l'interface fibre-matrice faible n'est pas efficace pour le transfert des contraintes, conduisant à de mauvaises propriétés mécaniques des biocomposites (Ren et al., 2012a; 2012b; Ren & Li, 2013). Outre l'interface faible, les fibres naturelles ont tendance à s'agréger et ne peuvent pas bien se disperser dans une matrice relativement non polaire dans le processus de fabrication. Clairement, sans distribution uniforme de la fibre dans la matrice, le composite ne peut pas atteindre une performance optimisée. De plus, la surface hydrophile peut facilement absorber l'humidité et provoquer l'affaiblissement des biocomposites.

Par conséquent, le traitement de surface des fibres naturelles est essentiel pour améliorer les performances mécaniques des biocomposites, car les traitements peuvent renforcer l'interface fibre-matrice et réduire la sensibilité à l'humidité (Qiu et al., 2012).

Actuellement, un large éventail de méthodes de traitement de surface a été étudié, qui se répartissent en trois grandes catégories, à savoir le traitement chimique, le traitement physico-chimique et le traitement biologique. Comme il y a beaucoup de rapports sur la modification de surface des fibres cellulosiques, nous nous concentrerons ici sur les traitements utilisés (traitement physico-chimique et enzymatique) dans notre projet.

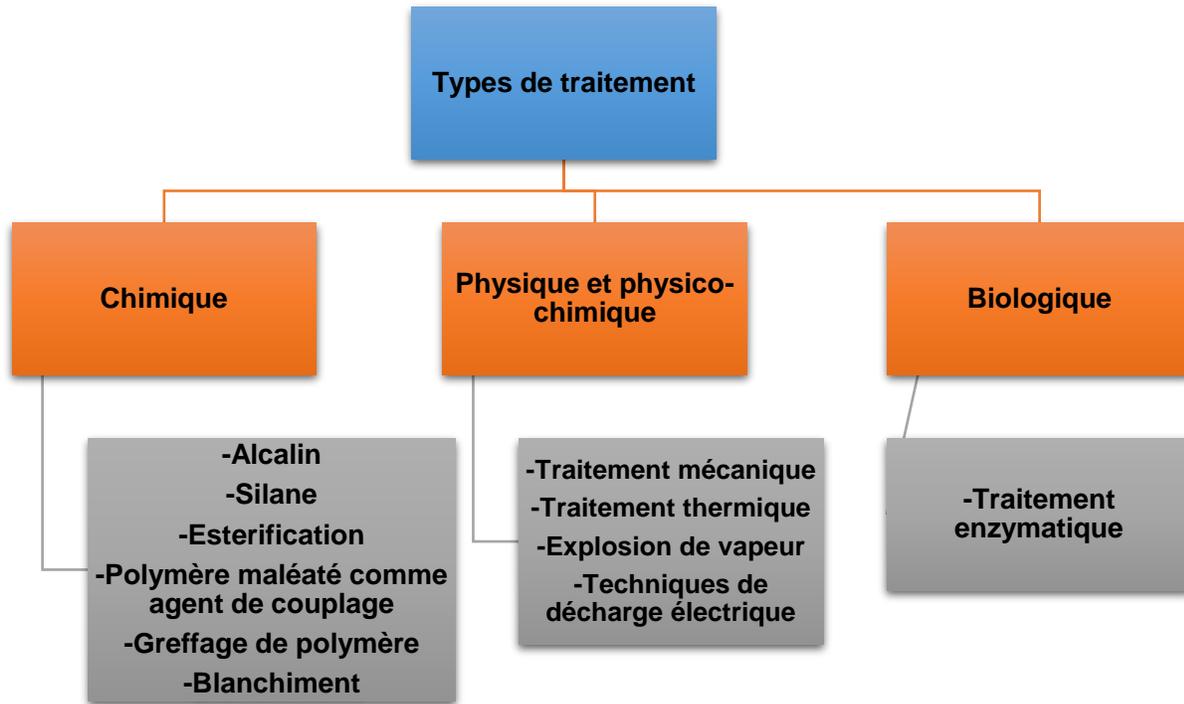


Figure 9: les différents types de traitement des fibres cellulosesques.

#### 2.4.1. Traitement alcalin

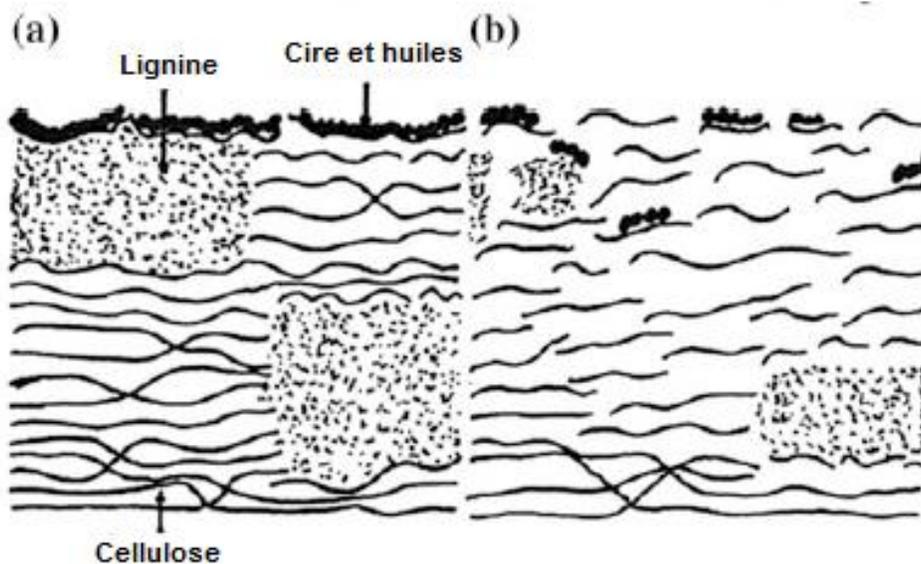
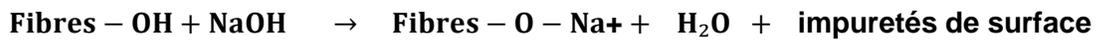
L'alcalinisation (ou mercerisation) est une méthode courante pour le traitement physique des surfaces de fibres naturelles. Dans cette méthode, les fibres lignocellulosiques sont immergées dans une solution aqueuse de l'hydroxyde de sodium (NaOH) pendant un certain temps. La solution de NaOH dissout la lignine, la cire et les huiles de la surface de la fibre et laisse une surface cellulosique propre et poreuse.

Tableau 6: Les paramètres du traitement alcalin des fibres (Saheb & Jog, 1999; Mwaikambo & Ansell, 2002).

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

Ce traitement conduit à des propriétés mécaniques spécifiques plus élevées car la cellulose a des propriétés mécaniques bien supérieures à celles de la lignine et augmente

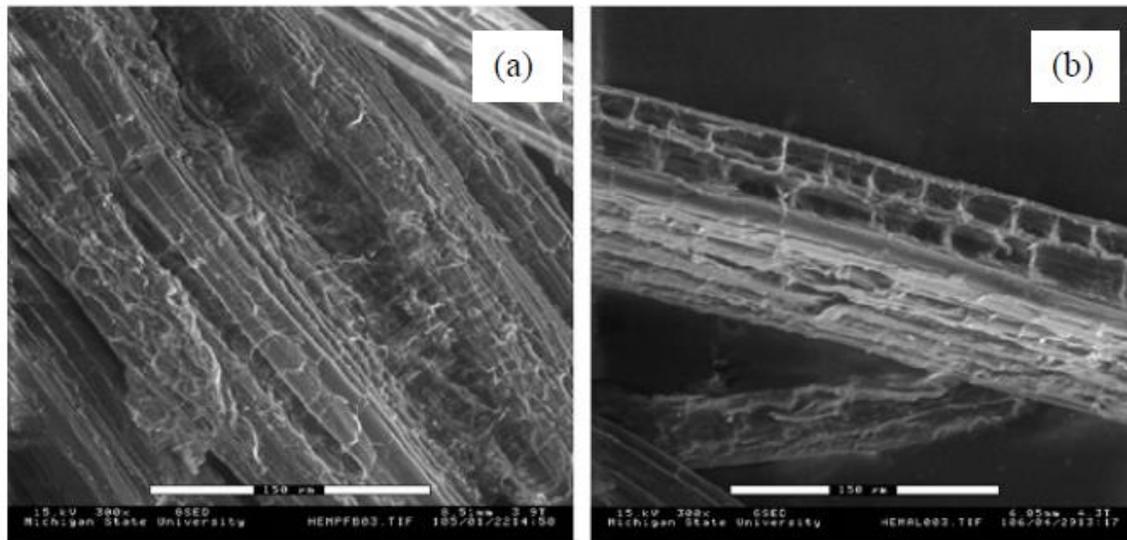
également la surface spécifique conduisant à une meilleure interaction avec la matrice. Le principal inconvénient de cette approche est l'augmentation du comportement hydrophile des fibres naturelles ce qui se produit en raison de la plus forte concentration de groupes hydroxyle sur les molécules de cellulose par rapport à la lignine. C'est pourquoi cette méthode est généralement proposée avec d'autres méthodes de modification chimique telles que l'addition de silanes ou d'anhydride maléique (Bledzki & Gassan, 1999).



**Figure 10: Illustration schématique de la microstructure de la fibre cellulosique (a) avant traitement et (b) après traitement alcalin (Mwaikambo & Ansell, 2002).**

Sgriccia et al. (2008) ont étudié l'effet du traitement alcalin sur les propriétés morphologiques et l'absorption de l'eau de plusieurs fibres naturelles. Les fibres ont été immergées dans une solution à 5% d'hydroxyde de sodium pendant une heure à température ambiante. Ils ont conclu, par microscopie au MEB, que le traitement alcalin des fibres de chanvre conduisait à l'élimination partielle de l'hémicellulose et de la lignine de la surface des fibres. Comme présenté dans la figure 11, la surface des fibres de chanvre est beaucoup plus claire après l'alcalinisation. Les auteurs ont toutefois signalé que l'alcalinisation des fibres augmentait leur absorption d'eau. Après 700 heures d'immersion dans de l'eau distillée, les composites époxy à base de chanvre non traité

absorbaient environ 16% d'eau, tandis que le chanvre traité à la soude présentait une absorption d'eau d'environ 22%.



**Figure 11: Micrographies MEB de (a) fibres de chanvre non traitées et (b) fibres traitées à la soude (Sgriccia et al., 2008).**

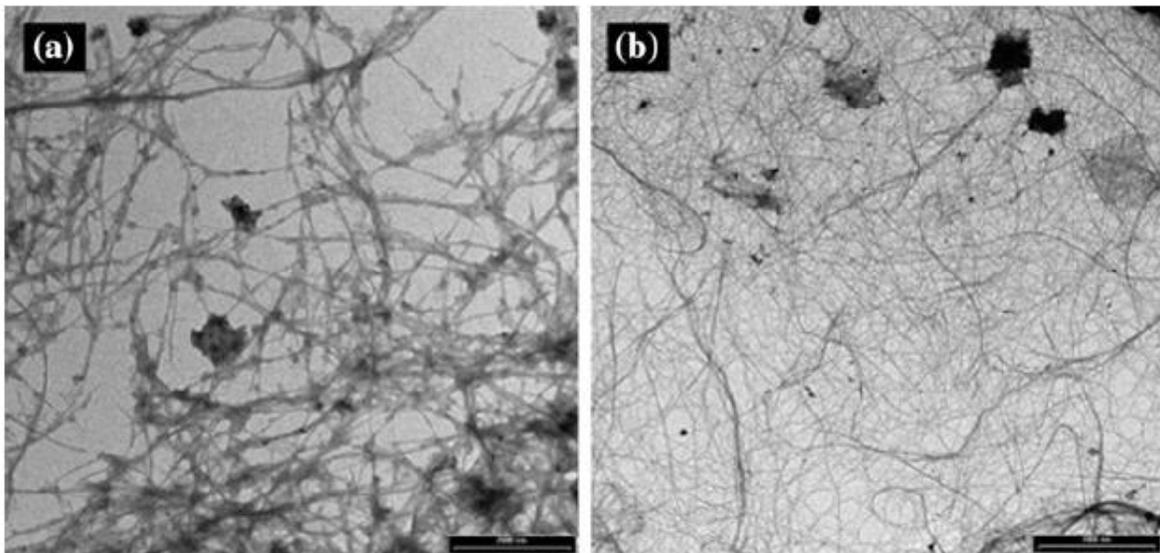
#### **2.4.2. Traitement enzymatique**

Par rapport à d'autres techniques de traitement de surface, l'utilisation d'agents biologiques tels que les enzymes et les champignons attire davantage l'attention en raison de leur processus plus écologique (Gulati & Sain, 2006; Fuqua et al., 2012; Lee et al., 2011).

En particulier, l'étude et l'application du traitement enzymatique ont rapidement augmenté, car elles offrent quelques avantages par rapport aux traitements chimiques conventionnels. Tout d'abord, le traitement enzymatique est plus doux, écologique et à faible consommation d'énergie, un processus sans solvants et très spécifique. Les systèmes enzymatiques pourraient être recyclés si nécessaire (George et al., 2014). Deuxièmement, il permet d'améliorer la propreté de la surface des fibres ainsi que la séparation de leurs faisceaux. Le traitement enzymatique pourrait éliminer sélectivement les composants hémicellulosiques et pectiques dans la fibre de cellulose et puisque la pectine lie l'ensemble la fibre, sa dégradation provoquera une séparation améliorée entre les fibres.

Tibolla et ses collègues ont préparé des nanofibres de cellulose à partir de la peau de banane par un traitement chimique et enzymatique à la fois (Tibolla et al., 2014). Dans

leur procédure, le procédé de traitement chimique comprend un traitement alcalin, un blanchiment et une hydrolyse à l'acide tandis que le traitement enzymatique comprend un traitement alcalin et une hydrolyse par la xylanase, qui est une enzyme hydrolytique. Bien que les deux méthodes fournissent des nanofibres de cellulose isolées, on a constaté que l'hydrolyse enzymatique est moins efficace pour éliminer les composants de la lignine que le blanchiment et l'hydrolyse à l'acide, et donc des suspensions de nanofibres moins pures comme le montre la figure 12. Dans d'autres études, on a constaté que le traitement enzymatique pouvait conduire à une croissance beaucoup plus rapide des moisissures sur les fibres traitées (Nykter et al., 2008).



**Figure 12: Images TEM de nanofibres de cellulose après un traitement chimique; et b traitement enzymatique comprenant un traitement alcalin. Barre d'échelle 2000 nm (Tibolla et al., 2014).**

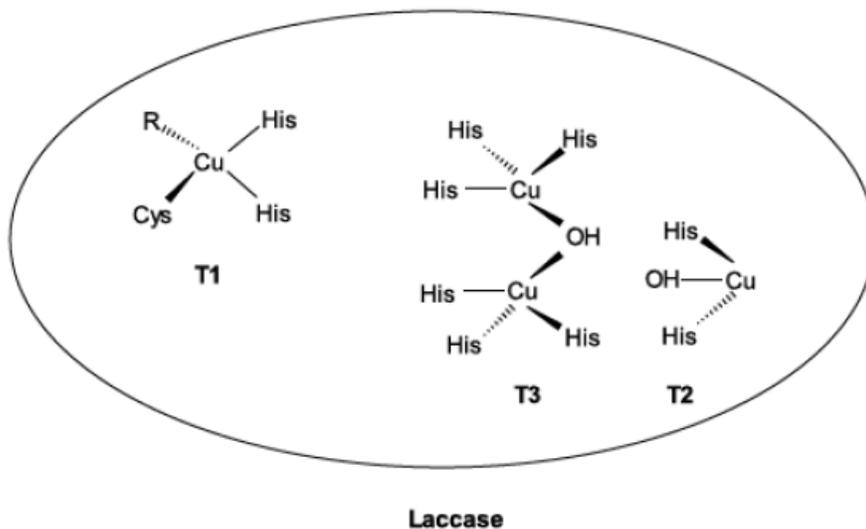
#### 1.4.2.1. Laccase

La laccase est une enzyme oxydoréductase qui contient quatre atomes de cuivre liés à trois sites oxydatifs. Les laccases peuvent être trouvées dans de nombreuses plantes, champignons et micro-organismes, mais les champignons sont connus pour être les principaux producteurs de laccase. La laccase est connue pour provoquer la polymérisation ainsi que la dépolymérisation des composés de la lignine par des réactions radicalaires (Felby et al., 1997a).

Les radicaux libres formés par l'oxydation enzymatique conduisent à la dépolymérisation de substances polymériques comme la lignine (Hammel, 1997) et à une gamme de polluants. Ces radicaux libres pourraient également se réticuler et se polymériser.

Chacune de ces réactions est favorable à une application spécifique. Les laccases, en raison de leur grande spécificité de substrat, sont proposées pour l'oxydation des polluants industriels, y compris ceux de l'industrie textile (Fu & Viraraghavan, 2001) et les polluants du sol tels que les phénols chlorés (Baldrian et al., 2006).

Dans l'industrie des pâtes et papiers, la laccase a été appliquée commercialement pour la délignification de la pâte (bioblanchiment) (Bourbonnais & Paice, 1990) et a également été proposée comme adhésif pour la production de panneaux de fibres. Dans la première application, il se produit une liaison des fibres de bois par activation de la lignine superficielle par oxydation catalysée par une laccase (voir figure 13) au lieu d'adhésifs synthétiques toxiques (Felby et al., 1997). Cette adhésion est liée à la formation de radicaux libres dans la matrice de lignine des fibres qui réagissent entre elles pour former des liaisons covalentes dans la fabrication de matériaux composites à base de lignocellulose tels que les panneaux de fibres (Couto & Herrera, 2006). De plus, les fibres lignocellulosiques peuvent être fonctionnalisées par les laccases afin d'améliorer les propriétés chimiques ou physiques des produits fibreux (Lund & Ragauskas, 2001). Cette application, c'est-à-dire la greffe de différents groupes fonctionnels sur les surfaces des fibres, peut donner des matériaux fibreux avec des propriétés complètement nouvelles telles que l'hydrophobicité ou la charge (Couto & Herrera, 2006).



**Figure 13: Les trois centres oxydatifs de la laccase.**

#### 1.4.2.2. Cellulase

Les cellulases sont les enzymes qui hydrolysent les liaisons  $\beta$ -1,4 dans les chaînes de cellulose, libérant des oligosaccharides, du cellobiose et du glucose. Elles sont produites par des champignons, des bactéries, des protozoaires, des plantes et des animaux (Chapin *et al.*, 2002).

Les cellulases sont des enzymes inductibles par des substrats cellulotiques, qui sont synthétisés par une grande diversité de microorganismes comprenant à la fois des champignons et des bactéries au cours de leur croissance sur des matériaux cellulotiques. Ces microorganismes peuvent être aérobies, anaérobies, mésophiles ou thermophiles (voir tableau ci-dessous). Parmi ces microorganismes, les genres de *Clostridium*, *Cellulomonas*, *Thermomonospora*, *Trichoderma* et *Aspergillus* sont les producteurs de cellulases les plus étudiés (Sukumaran *et al.*, 2005; Kuhad *et al.*, 2011). Les champignons *A. niger*, *A. nidulans*, *A. oryzae* et *A. terreus*, en particulier *A. niger*, produisent de grandes quantités de cellulases commercialisées (Chandra *et al.*, 2007; Harini & Kumaresan, 2014).

Dans la nature, l'hydrolyse complète de la cellulose est faite par une combinaison de trois types principaux d'enzymes cellulolytiques:

1. L'endoglucanase (1,4- $\beta$ -d-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4) attaque de manière aléatoire les liaisons O-glycosidiques internes, ce qui donne des chaînes de glucan de différentes longueurs;
2. L'exoglucanase (1,4- $\beta$ -d-glucan cellobiohydrolase, EC 3.2.1.91), agit sur les extrémités de la chaîne cellulotique et libère le  $\beta$ -cellobiose comme produit final;
3. La  $\beta$ -glucosidase ( $\beta$ -d-glucoside glucohydrolase, EC 3.2.1.21), enzyme qui hydrolyse les résidus  $\beta$ -d-glucosyl terminaux non réducteurs avec libération de  $\beta$ -d-glucose.

Les cellulases sont disponibles dans le commerce depuis plus de 30 ans et ces enzymes ont représenté une cible pour la recherche industrielle (Singh *et al.*, 2007). Des études fondamentales et appliquées sur les cellulases ont démontré leur potentiel biotechnologique dans diverses industries, notamment l'industrie alimentaire, l'agriculture, le raffinage de la biomasse, les pâtes et papiers, le textile et la lessive, etc.

Tableau 7: Champignons et bactéries ayant une activité cellulolytique.

Groupe		Champignons	Enzymes	Substrat	Références
champignons aérobies (enzymes cellulolytiques extracellulaires)	Ascomycètes	<i>Trichoderma reesei</i>	Cellulase, xylanase	Paille de blé	(Kurzatkowski <i>et al.</i> , 1996)
		<i>Trichoderma harzianum</i>	Cellulase	Cellulose	(Do Vale <i>et al.</i> , 2012)
		<i>Aspergillus niger</i>	Cellulase	Bagasse de canne à sucre	(Garcia-Kirchner <i>et al.</i> , 2005)
		<i>Schizophyllum commune</i>	Cellulase, xylanase	Cellulose microcristalline, xylane	(Tsujiyama & Ueno, 2011)
	Basidiomycètes	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Cellulase, xylanase	Chêne rouge, pépin de raisin, son d'orge, sorgho	(Baldrian & Valášková, 2008)
		<i>Bjerkandera adusta</i>	Cellulase, xylanase	Sciure de chêne et de cèdre, cosse de riz, chaume de maïs, paille de blé et enveloppe de graines de jatropha	(Quiroz-Castaneda <i>et al.</i> , 2011)
		<i>Pycnoporus sanguineus</i>			
		<i>Fomitopsis palustris</i>	Cellulase	Cellulose microcristalline	(Ji & Cha, 2010)
Champignons anaérobies	Chytridiomycètes	<i>Anaeromyces mucronatus</i>	Cellulase, xylanase	Foin d'herbe de verger	(Lee <i>et al.</i> , 2001)
		<i>Caecomyces communis</i>	Cellulase	Cellulose microcristalline, foin de luzerne	(Hodrova <i>et al.</i> , 1998)
		<i>Neocallimastix frontalis</i>	Cellulase, xylanase	Paille de blé	(Griffith <i>et al.</i> , 2010)
		<i>Orpinomyces sp.</i>	Cellulase	Avicel ®	(Li <i>et al.</i> , 1997)

		<i>Neocallimastix patriciarum</i>	Cellulase	Carboxymethyl cellulose (CMC)	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
<b>Bactéries aérobies</b>	<b>Actinobactéries</b>	<i>Acidothermus Cellulolyticus</i>	Cellulase	Papier Whatman, cellulose microcristalline, azurine réticulée hydroxyéthylcellulosee (AZCL-HEC)	(Anderson <i>et al.</i> , 2012)
		<i>Actinospica robiniae</i>			
		<i>Actinosynnema mirum</i>			
		<i>Catenulispora acidiphila</i>			
		<i>Cellulomonas flavigena</i>			
		<i>Thermobispora bispora</i>			
		<i>Xylaneimonas cellulasilytica</i>			
<b>Bactéries anaérobies</b>	<b>Firmicutes</b>	<i>Clostridium thermocellum</i>	Cellulase	Cellulose microcristalline	(Freier <i>et al.</i> , 1988)
		<i>Thermomonospora fusca</i>	Cellulase, xylanase	Paille de blé, xylane d'avoine-épeautre	(Tuncer & Ball, 2002)
		<i>Caldicellulosiruptor kristjanssonii</i>	Cellulase	Cellulose microcristalline	(Bredholt <i>et al.</i> , 1999)
		<i>Anaerocellum thermophilum</i>	Cellulase, xylanase	Cellulose microcristalline, xylane	(Yang <i>et al.</i> , 2009)

### **3. Matériels et méthodes expérimentales**

#### **3.1. Matériaux utilisés**

##### **3.1.1. Matrice : PLAr**

Le polymère utilisé pour la matrice des matériaux composites est l'acide poly-lactique recyclé (PLAr) post-consommation provenant des centres de tri de Gaudreau Environnement (Victoria Ville, Québec). Ce polymère a une masse volumique de  $1,25 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$  (Auras et al., 2004) avec une température de fusion de  $188\text{-}210 \text{ }^\circ\text{C}$  et une température de fusion cristalline de  $155\text{-}170 \text{ }^\circ\text{C}$  (Garlotta, 2001).

##### **3.1.2. Renfort : Biosolides papetiers et fibres de chanvre**

Dans ce projet, trois renforts ont été sélectionnés incluant les boues mixtes et les boues de désencrage de l'industrie papetière, et les fibres de chanvre. Les boues mixtes et de désencrage ont été fournies par la firme kruger Wayagamack Inc, (Trois-Rivière, Québec, Canada) et qui ont été conservées à une température de  $4^\circ\text{C}$  pour minimiser l'activité bactérienne.

Les fibres de chanvre proviennent de l'Étoffe rustique Inc (Rimouski, Québec, Canada) et connues pour leurs bonnes rigidités et leur bonnes résistances.

Les trois fibres naturelles reçues ont été broyées puis tamisées entre  $75\mu\text{m}$  et  $1,7\text{mm}$  afin d'en contrôler la granulométrie. Pour rendre négligeable le taux d'humidité dans les fibres, elles ont été séchées dans une étuve, à une température de  $60 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 24 heures. Elles seront, ensuite, utilisées à trois différentes concentrations (1.5, 3 et 6% en poids sec) pour préparer les biocomposites.

#### **3.2. Procédures expérimentales**

##### **3.2.1. Production des enzymes ligno-cellulosiques**

###### *3.2.1.1. Composition du milieu de culture*

Le marc de bleuet (déchet de l'industrie de jus de bleuet) a été utilisé comme substrat de fermentation à l'état solide (SSF) pour la production des enzymes ligno-cellulosiques (laccases et des cellulases) en raison de de la présence d'un rapport carbone / azote (C

/ N) approprié et d'autres nutriments essentiels pour la croissance des champignons. Les caractéristiques physico-chimiques du marc de bleuet sont indiquées dans le tableau 8.

**Tableau 8: caractéristiques physico-chimiques du marc de bleuet.**

<b>Paramètre</b>	<b>Valeur</b>
<b>pH</b>	4.5 ± 0.1
<b>Humidité (% v/p)</b>	75 ± 0.7
<b>Concentration en métaux (ppm)</b>	
<b>Ca</b>	1180.23 ± 45.45
<b>Mg</b>	594.62 ± 3.83
<b>S</b>	808.06 ± 2.61
<b>Mn</b>	107.98 ± 1.91
<b>Na</b>	70.85 ± 1.45
<b>P</b>	1032.63 ± 12.67
<b>Zn</b>	10.06 ± 0.35
<b>Fe</b>	10.16 ± 0.06
<b>K</b>	3499.33 ± 23.49
<b>Cu</b>	4.11 ± 0.12
<b>Carbone total (% p/p)</b>	52.6 ± 0.1
<b>Azote total (% p/p)</b>	2.1 ± 0.2

### 3.2.1.2. Production des laccases

La production des laccases a été effectuée sur le marc de bleuet par le champignon *Trametes versicolor* (ATCC-20869). *T. versicolor* a été fraîchement pré-cultivé dans le milieu de culture liquide PDB (Potato Dextrose Broth) et incubé à 30 ± 1 °C, 150 rpm pendant 7 jours dans un incubateur agitateur. Ensuite, le champignon a été re-cultivé sur la gélose dextrosée à la pomme de terre (PDA) qui est utilisée comme inoculum et laissé incubé à 30 ± 1 °C pendant 10 jours dans l'incubateur statique (Lorenzo *et al.*, 2002; Laadila *et al.*, 2017). Environ 40 grammes du milieu de fermentation (75% v/p d'humidité et pH 4,5), dans un Erlenmeyer de 500 ml, ont été soigneusement mélangés et autoclavés à 121 °C ± 1 °C et à 15 psi pendant 20 minutes. Le substrat est ensuite inoculé par une culture fraîche de PDA et laissé pousser à 30 ± 1 °C dans l'incubateur statique pendant 15 jours (Laadila *et al.*, 2017).

### 3.2.1.3. *Production des cellulases*

La synthèse des cellulases a été effectuée sur le marc de bleuet par le champignon *Aspergillus niger* (ATCC-6275). *A. Niger* a été fraîchement pré-cultivé en milieu liquide (PDB) utilisé comme inoculum. L'incubation a été faite à  $30 \pm 1$  °C et à 150 rpm pendant 6 jours dans un incubateur rotatif. À partir de la solution liquide, le champignon a été cultivé sur le PDA contenu dans les boîtes de pétri à  $30 \pm 1$  °C pendant 5 jours dans un incubateur statique pour la croissance de la culture. Ensuite, les spores produites sont récupérées à partir des boîtes de pétri, en utilisant une solution de Tween-80 solution à 0,1%. Finalement, les spores sont comptées à l'aide d'un hémocytomètre afin de pouvoir les utiliser pour l'inoculation (Dhillon et al., 2011). La fermentation à l'état solide (SSF) a été réalisée sur le marc de bleuet préalablement préparé en ajustant son humidité à 75% (v/p) avec de l'eau stérilisée et son pH à 6.5. Le milieu de fermentation a été inoculé avec la solution de spores ( $1 \times 10^7$  spores / mL) d'*A. Niger* récupérée à partir des boîtes de pétri de PDA et laissée pousser à  $30 \pm 1$  °C dans l'incubateur statique pendant 7 jours (Dhillon et al., 2011).

## 3.2.2. **Extraction des enzymes ligno-cellulosiques**

### 3.2.2.1. *Extraction des laccases*

L'extraction des laccases a été effectuée dans la solution tampon phosphate de sodium 50 mM (10/1 : v/p) à pH 6,5. Un gramme prélevé de chaque milieu de fermentation est mélangé avec 20 ml de la solution tampon. Le mélange a été placé dans un incubateur agitateur à 150 rpm pendant une heure à  $30 \pm 1$  °C. Ensuite le milieu est centrifugé à  $7000 \times g$  pendant 20 min à  $4 \pm 1$  °C (Laadila et al., 2017). Le surnageant recueilli a été ainsi analysé pour l'activité enzymatique.

### 3.2.2.2. *Extraction des cellulases*

L'extraction des cellulases a été réalisée en mélangeant un gramme prélevé de chaque milieu de fermentation avec 50 ml de l'eau distillée. Le mélange a été placé dans un agitateur rotatif pendant 30-45 min à 150 tours par minute à température ambiante (Bansal et al., 2011). Le contenu des flacons a ensuite été centrifugé à  $10000 \times g$  pendant 10 min et à  $4 \pm 1$  °C (Bansal et al., 2012). Le surnageant recueilli a été ainsi analysé pour l'activité enzymatique.

### 3.2.3. Mesure de l'activité enzymatique

#### 3.2.3.1. Activité enzymatique des laccases

L'activité enzymatique des laccases a été déterminée selon la méthode décrite par Laadila et al. (2017) et mesurée à l'aide du spectrophotomètre. Dans une cuvette de 1 cm, on mélange 0,5 ml de l'acide 2,2'- azino bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulfonique) (ABTS) à 0,5 mM avec 2,58 ml de la solution tampon citrate de phosphate à 0,1 M et pH 4. On ajoute 0,02 ml de notre solution d'enzyme au mélange et on laisse incuber pendant 10 min à 45°C. L'oxydation de l'ABTS est déterminé à une longueur d'onde de 420 nm ( $\epsilon_{420} = 36\text{mm} / \text{cm}$ ) (Collins & Dobson, 1997). Une unité d'activité des laccases est définie comme la quantité d'enzymes nécessaire pour oxyder une  $\mu\text{mole}$  de l'ABTS par minute. L'équation de l'activité enzymatique en unité de laccase par gramme est la suivante :

$$EA = \frac{S * \text{cuvette volume}}{\epsilon * \text{wavelength} * \text{enzyme volume}} * \text{buffer volume per 1g of substrate} \quad (1)$$

Où **P** est la pente de la courbe standard de la laccase pure et  $\epsilon$  est le coefficient d'extinction ( $\epsilon_{420} = 36\text{mm} / \text{cm}$ ).

#### 3.2.3.2. Activité enzymatique des cellulases

L'activité enzymatique des cellulases a été déterminée en utilisant le test de papier filtre recommandé par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (UICPA) et est exprimée en unité de papier filtre (FPU) (Adney & Baker, 1996). L'activité enzymatique des cellulases a été mesurée à l'aide du spectrophotomètre aussi. Dans un tube à essai de volume d'au moins 25 ml, on ajoute 1 ml de la solution tampon citrate de sodium à 0.05 M, pH 4.8, ensuite on ajoute 0.5 ml de l'enzyme cellulase diluée dans le citrate de sodium. Au moins deux dilutions doivent être faites pour chaque échantillon enzymatique étudié. Après, on ajoute une bande de papier filtre Whatman (n ° 1, taille de pores de 0,25 mm, diamètre de 1,5 cm) dans le tube et on mélange. On laisse Incuber au Bain-Marie à  $50 \pm 1$  ° C pendant 1h, après, on ajoute 3 ml de DNS et on mélange. On laisse incuber au Bain-Marie à  $100 \pm 1$  ° C pendant 5min, ensuite, on verse le mélange dans une cuvette. On fait la lecture au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 545 nm (Zhang et al., 2007). Les dilutions utilisées en concentrations enzymatiques sont traduites par l'équation suivante :

$$\text{Concentration} = \frac{1}{\text{dilution}} = \frac{\text{Volume d'enzyme diluée}}{\text{Volume total de dilution}} \quad (2)$$

Le calcul du FPU est fait de la façon suivante:

$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{Concentration enzymatique pour libérer 2 mg de glucose}} \quad \text{units/ml} \quad (3)$$

### 3.2.4. Extraction des microfibrilles cellulosiques des biosolides papetiers et des fibres de chanvre

#### 3.2.4.1. Prétraitement physico-chimique

Le prétraitement physico-chimique des 3 sources de fibres cellulosiques (fibres de chanvre, boues mixtes et boues de désencrage) a été réalisé comme suit. Les 3 échantillons de fibres cellulosiques ont été lavés avec de l'eau distillée pour éliminer les contaminants et les impuretés. Par la suite, ils ont été séchés dans un four pendant 24 heures à 60 ° C. Cette étape a été suivie par un broyage et par le traitement alcalin avec une solution de NaOH à 10% (v/v) au ratio solide/liquide 1:8 durant une période d'immersion de 24h. Après ce prétraitement, les fibres ont été rincées à l'eau distillée plusieurs fois jusqu'à ce que le pH atteigne 7. Par la suite, les échantillons de fibres cellulosiques ont été centrifugés à 9000 g pendant 30 minutes à 25±1 °C afin de récupérer que le culot.

Ensuite, les fibres sont séchées à 60± 1 °C pendant 24 heures à nouveau. Cette opération a été suivie encore d'un broyage par un broyeur de laboratoire. Le principe de broyage consiste à écraser les fibres sans détruire les fibrilles (Rokbi et al., 2011). Les fibres résultantes sont ensuite tamisées pour les dés-agglomérer et surtout pour obtenir des fibres fines de tailles très réduites. La longueur des fibres ainsi obtenues varie de 75 µm à 1,7 mm et pour avoir la taille exacte des fibres, elles sont passées à l'analyseur de taille

des particules par diffusion laser. Le schéma, ci-dessous, résume les étapes effectuées pour le prétraitement physico-chimique (figure 14):



Figure 14: Schéma des étapes du traitement physico-chimique effectué.

#### 3.2.4.2. *Traitement enzymatique*

Les fibres cellulosiques extraites après le traitement physico-chimique ont été soumises à un traitement enzymatique pour la modification de leur surface et la dégradation de leur cellulose. Le but de ce traitement est d'activer les fibres cellulosiques en activant les groupes hydroxyles et de dépolymériser la structure de la cellulose.

On a utilisé environ 4 g de fibres cellulosiques des fibres de chanvre, de boues mixtes ainsi que les boues de désencrage préalablement traitées. Pour le contrôle de la taille des fibres cellulosiques traitées avec NaOH, on a utilisé les cellulases (15 IU/g substrat sec) et pour l'activation de la surface et on a utilisé les laccases (20 IU/g substrat sec) dans des Erlenmeyer 200 ml. La réaction a été effectuée à  $30 \pm 1$  °C avec agitation constante à 100 tr/min pendant 7 jours. Des prélèvements quotidiens ont été faits pendant une semaine afin d'analyser l'évolution granulométrique des fibres de celluloses (Tabka et al., 2006).

Toutes les expériences ont été réalisées en duplicat et la moyenne et l'écart-type ont été calculés.

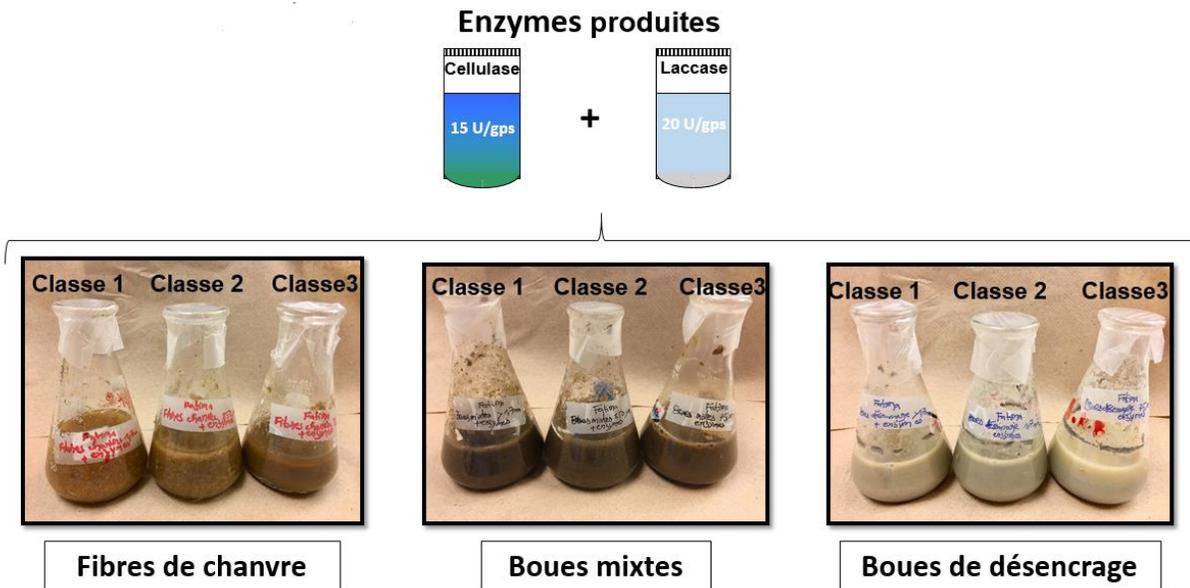


Figure 15: Traitement enzymatique des trois classes de chaque renfort utilisé.

### 3.2.5. Analyse des fibres modifiées

#### 3.2.5.1. Analyse granulométrique

La caractérisation de la taille des particules des fibres de chanvre, des boues mixtes et des boues de désencrage a été effectuée à l'aide d'un analyseur de distribution granulométrique de dispersion laser de Horiba LA-950. La taille des fibres a été mesurée avant et après le traitement physico-chimique et enzymatique respectivement afin d'avoir la taille exacte des fibres de cellulose tamisées. La mesure de la taille des particules a été effectuée par détermination du diamètre moyen  $D_{50}$  (appelé taille moyenne des particules). L'analyse a été réalisée en triple pour chaque échantillon.

#### 3.2.5.2. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microscopie électronique à balayage (MEB) (Carl Zeiss EVO 50) a été utilisée pour étudier la taille et la morphologie des fibres extraites des fibres de chanvre, des boues mixtes ainsi que des boues de désencrage avant et après le traitement enzymatique.

Les différents échantillons de fibres ont été préalablement revêtus d'une fine couche d'alliage or / palladium puis examinés à une tension d'accélération de 12 kV et à des grossissements différents.

#### 3.2.5.3. *Diffraction des rayons X (DRX)*

La diffraction des rayons X (DRX) a été utilisée pour la caractérisation de la structure cristalline des trois renforts cellulosiques utilisés : les fibres de chanvre, les boues mixtes et de désencrage avant et après traitement enzymatique. Les diagrammes de diffraction aux rayons X ont été réalisés sur le diffractomètre à rayons X Siemens D5000 en utilisant la lampe  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0,154059 \text{ nm}$ ) à haute résolution. L'expérience a été réalisée en utilisant une poudre fine des échantillons ( $\leq 100 \mu\text{m}$ ) à 40 KV et 30 mA. Dans chaque cas, deux échantillons ont été testés pour examiner la répétabilité des résultats.

#### 3.2.5.4. *Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF)*

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) a été utilisée comme technique efficace et facile pour comparer et caractériser les principales composantes des échantillons utilisés. Les échantillons de fibres de chanvre, de boues mixtes et de boues de désencrage ont été caractérisées afin d'analyser les changements au niveau des groupes fonctionnels des fibres cellulosiques aux différents stades du traitement physico-chimique et du traitement enzymatique. Les spectres IRTF ont été recueillis sur une gamme de longueur d'onde de  $4000$  à  $500 \text{ cm}^{-1}$  en utilisant le spectromètre (NICOLET IS50 FT-IR). Les données spectrales ont été enregistrées dans le mode d'absorbance en fonction du nombre d'onde.

### **3.2.6. Préparation et caractérisation des biocomposites**

#### 3.2.6.1. *Plan expérimental*

Le plan expérimental utilisé est présenté dans le tableau 9 ci-dessous. Nous avons développé 27 biocomposites qui ont été formulé par différents ratios massiques (1.5, 3 et 6%) de fibres cellulosiques traitées enzymatiquement et de PLA recyclé, en plus du biopolymère vierge formulé uniquement de PLAr. Pour les biocomposites avec le code BD 1.5% 1.7 $\mu\text{m}$ ; BD 3% 1.7 $\mu\text{m}$  et BD 6% 1.7 $\mu\text{m}$  appartenant à la classe 1.7 $\mu\text{m}$  des boues de désencrage, les résultats de leurs tests mécaniques ne seront pas représenté dans la

section " Résultats et discussion " en raison du rapprochement de leur résultats avec ceux de la classe >1.7 mm. Idem pour les biocomposites avec le code FC 1.5% 850µm; FC 3% 850µm et FC 6% 850µm appartenant à la classe 850 µm des fibres de chanvre qui à leur tour, les résultats sont comparativement proches de ceux de la classe 1.7mm. Le code du biocomposite sera le code utilisé tout au long du rapport.

**Tableau 9: Plan expérimental utilisé.**

	Classe	Taille moyenne des fibres après TE* (µm)	Fibre utilisée (%)	PLAr utilisé (%)	Code de l'échantillon
<b>Fibres de chanvre</b>	1.7 mm 850 µm 75 µm	740.07 ± 54.62 662.24 ± 33.41 152.70 ± 7.74	1.5	98.5	FC 1.5% 1.7µm FC 1.5% 850µm FC 1.5% 75µm
	1.7 mm 850 µm 75 µm	740.07 ± 54.62 662.24 ± 33.41 152.70 ± 7.74	3	97	FC 3% 1.7µm FC 3% 850µm FC 3% 75µm
	1.7 mm 850 µm 75 µm	740.07 ± 54.62 662.24 ± 33.41 152.70 ± 7.74	6	94	FC 6% 1.7µm FC 6% 850µm FC 6% 75µm
<b>Boues mixtes</b>	>1.7 mm 850 µm 75 µm	1119.44 ± 29.04 435.16 ± 9.02 168.07 ± 0.29	1.5	98.5	BM 1.5% >1.7µm BM 1.5% 850µm BM 1.5% 75µm
	>1.7 mm 850 µm 75 µm	1119.44 ± 29.04 435.16 ± 9.02 168.07 ± 0.29	3	97	BM 3% >1.7µm BM 3% 850µm BM 3% 75µm
	>1.7 mm 850 µm 75 µm	1119.44 ± 29.04 435.16 ± 9.02 168.07 ± 0.29	6	94	BM 6% >1.7µm BM 6% 850µm BM 6% 75µm
<b>Boues de désencrage</b>	>1.7 mm 1.7 mm 75 µm	169.17 ± 12.62 161.71 ± 5.81 87.83 ± 1.05	1.5	98.5	BD 1.5% >1.7µm BD 1.5% 1.7µm BD 1.5% 75µm
	>1.7 mm 1.7 mm 75 µm	169.17 ± 12.62 161.71 ± 5.81 87.83 ± 1.05	3	97	BD 3% >1.7µm BD 3% 1.7µm BD 3% 75µm
	>1.7 mm 1.7 mm 75 µm	169.17 ± 12.62 161.71 ± 5.81 87.83 ± 1.05	6	94	BD 6% >1.7µm BD 6% 1.7µm BD 6% 75µm
<b>PLA recyclé</b>			<b>0</b>	<b>100</b>	PLAr 100%

\*TE: Traitement enzymatique

### 3.2.6.2. Préparation des biocomposites

Le moulage des échantillons a été fait par presse à compression. Cet appareil permet de former une plaque plus ou moins grande à partir d'un moule dans lequel on insère une certaine quantité de granules. Par la suite, il suffit de découper les différents échantillons

en vue des tests mécaniques. Bien que la presse à compression nécessite généralement moins d'ajustement qu'une presse à injection, il est obligatoire d'y insérer la bonne quantité de produit et de tenir compte de la température et du temps requis pour la création de la plaque (Mehrabzadeh & Farahmand, 2001).

Pour la mise en œuvre des biocomposites renforcées aux microfibrilles cellulosiques, il faut commencer par sécher les fibres et la matrice (PLAr) afin de minimiser l'humidité la teneur en eau du mélange.

Le procédé de fabrication des échantillons comporte quatre étapes (voir figure 16):

1. Le mélange de la matrice et des fibres naturelles: les fibres sont donc mélangées au PLAr dans un bécher et ensuite dans un Blender afin avoir un mélange le plus homogène possible.
2. Le moulage dans un moule rectangulaire de 275 mm de longueur, 215 mm de largeur et 3 mm d'épaisseur. On verse le mélange de PLAr et des différentes fibres cellulosiques traitées dans la moule jusqu'à ce qu'il soit rempli.
3. Le pressage des plaques s'est fait à l'aide d'une presse hydraulique manuelle opérée à  $160 \pm 1$  °C en utilisant une force constante de 2,27 tonnes pour un moule en aluminium de dimensions 80 mm x 100 mm x 3 mm. La pression a été maintenue pendant 20 minutes, puis le moule a été refroidi à  $50 \pm 1$  °C en faisant circuler de l'eau froide à travers le circuit de refroidissement.
4. La formulation des biocomposites et leur découpage selon les normes standards des différents tests à réaliser.

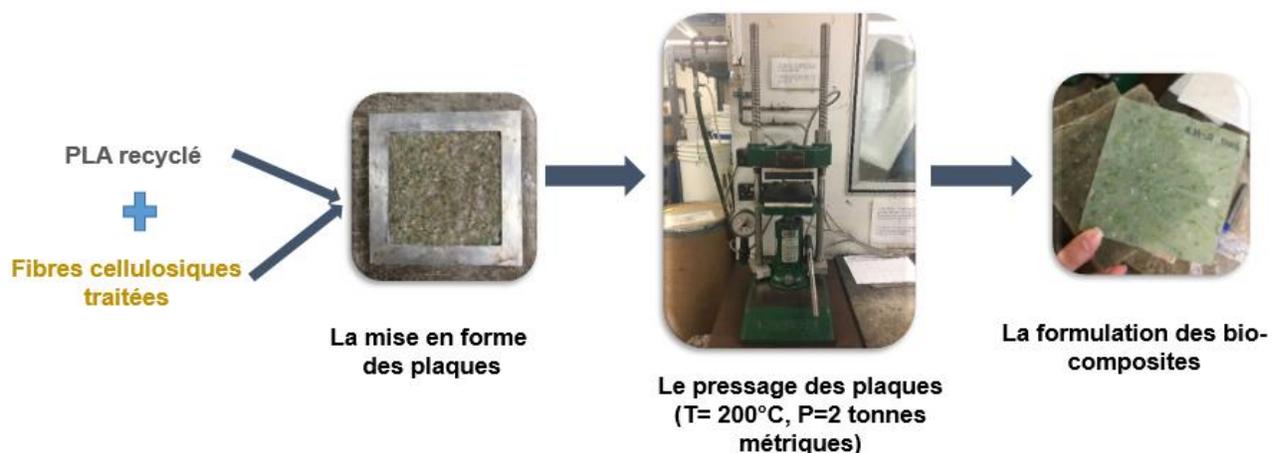


Figure 16: Étapes de fabrication du biocomposite (PLAr / Fibres cellulosiques traitées enzymatiquement).

### 3.2.6.3. Caractérisation mécanique

La caractérisation mécanique des biocomposites préparés a été réalisée en utilisant deux essais classiques. Le test de résistance à la traction et les essais d'impact ont été effectués pour analyser les propriétés mécaniques des nouveaux biocomposites. Les analyses ont été réalisées selon les normes ASTM D638 (type IV) et ASTM D256 pour les essais de résistance à la traction et d'impact, respectivement.

Pour le test de traction, les échantillons de biocomposites ont été découpés sous forme d'os de chien selon les normes ASTM D638 (type IV). Les essais ont été effectués à une vitesse de déformation de 1 mm / min sur un appareil Instron modèle 5565 à température ambiante (23 ° C). Cinq répétitions ont été testées pour chaque échantillon afin d'obtenir l'écart type et la moyenne pour le module de Young, la contrainte de traction à la rupture et la contrainte de traction maximale.

Les essais d'impact de Charpy ont été réalisés sur un appareil Tinius Olsen modèle Impact 104 suivant la norme ASTM D256. Les échantillons aux dimensions 125 × 12,7 × 3 mm<sup>3</sup> ont été entaillés avec une encoche automatique de type Dynisco modèle ASN 120m. Dix échantillons ont été testés pour chaque biocomposite formulé et la valeur moyenne de la résilience avec l'écart-type est rapportée.

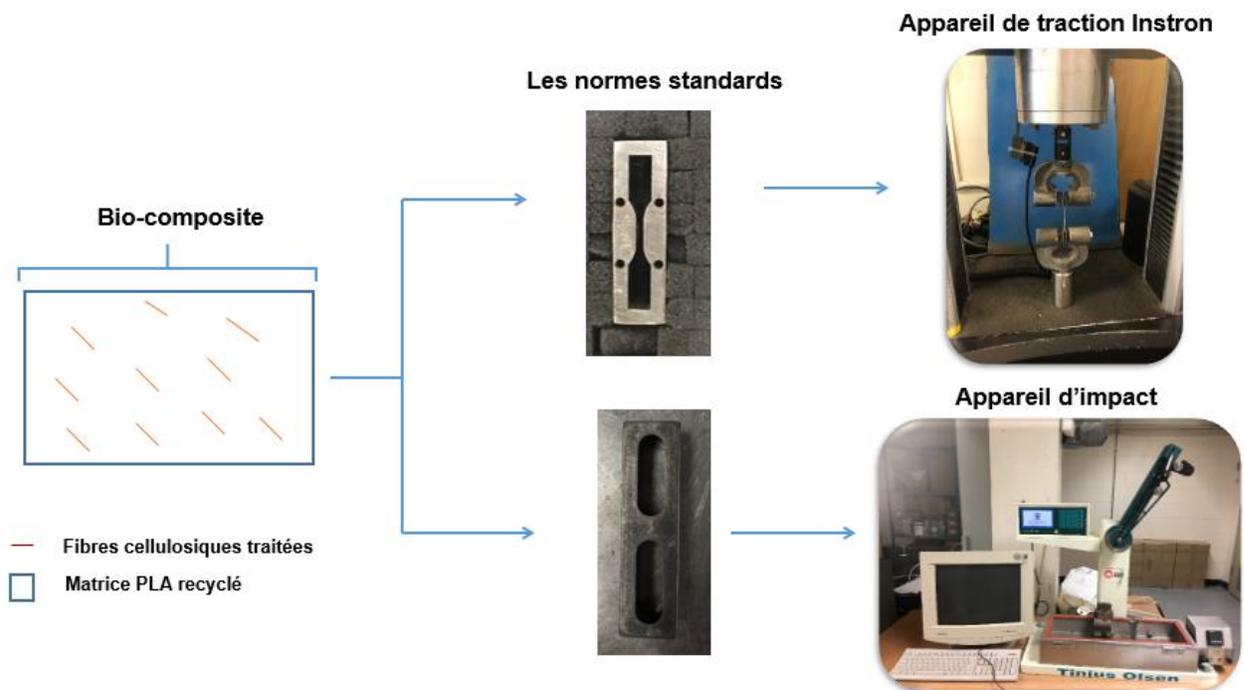


Figure 17: Test d'impact et de traction.

#### 3.2.6.4. Analyse statistique des tests mécaniques

Une ANOVA a été utilisée pour évaluer l'importance de la différence entre les formulations de biocomposites utilisées. Nous avons étudiés l'effet de 2 paramètres (taille et concentration des fibres) pour 27 biocomposites avec le PLAr comme contrôle. Pour certains types d'analyse statistique, ce test peut être suffisant sauf qu'il ne permet pas de conclure qu'un échantillon est différent d'un autre. Dans ce cas-là, la comparaison entre les différents échantillons ne peut être effectuée qu'avec un seul test de Tukey car elle implique plus de trois comparaisons.

Dans notre cas, tous les calculs ont été effectués par le logiciel Statistica version 13.2. Des régressions linéaires simples et multiples ont été utilisées pour évaluer la relation entre les paramètres étudiés (taille et pourcentage) dans ce travail. La régression était considérée comme significative à la valeur  $P < 0,05$  ( $\alpha$  était fixé à 0,05) avec un nombre d'échantillons de 27 (il y a 27 types de biocomposites à comparer avec le PLAr).

#### 3.2.6.5. Test de biodégradation

Le test de biodégradation a été effectué par la méthode d'enfouissement dans le sol. Des échantillons de biocomposites fabriqués (FC 6% 75 $\mu$ m, BM 6% 75 $\mu$ m, BD 6% 75 $\mu$ m, et le contrôle PLAr 100%) ont été enfouis dans un bac contenant 10 cm de compost pris en sandwich entre 10 cm de terreau mûr préparé à partir d'aliments et de plantes de jardin. Les échantillons de biocomposites ayant une dimension de 2 cm x 2 cm ont été enterrés dans la partie médiane du sol de compost mature. Le bac a été laissé à l'air libre et afin d'éviter la perte d'eau par évaporation, une quantité connue d'eau a été ajoutée au sol tous les deux jours. Les échantillons ont été retirés du sol pour évaluer leur taux de biodégradation dans des intervalles de temps prédéterminés allant jusqu'à 6 mois (de juillet à décembre). Après avoir été retirés du sol, les échantillons ont été lavés avec de l'eau stérilisée deux fois pour éliminer les résidus de sol et les saletés, ensuite séchés dans un four à  $60 \pm 1$  °C jusqu'à ce que l'on observe un poids constant. Le pourcentage de biodégradation des échantillons a été évalué chaque mois en mesurant leur perte de poids selon l'équation suivante :

$$\% \text{Perte de poids} = \frac{x_0 - x_t}{x_0} * 100 \quad (4)$$

Où  $x_0$  = poids du biocomposite à  $t = 0$  mois et  $x_t$  = poids du biocomposite à  $t = t$  mois.

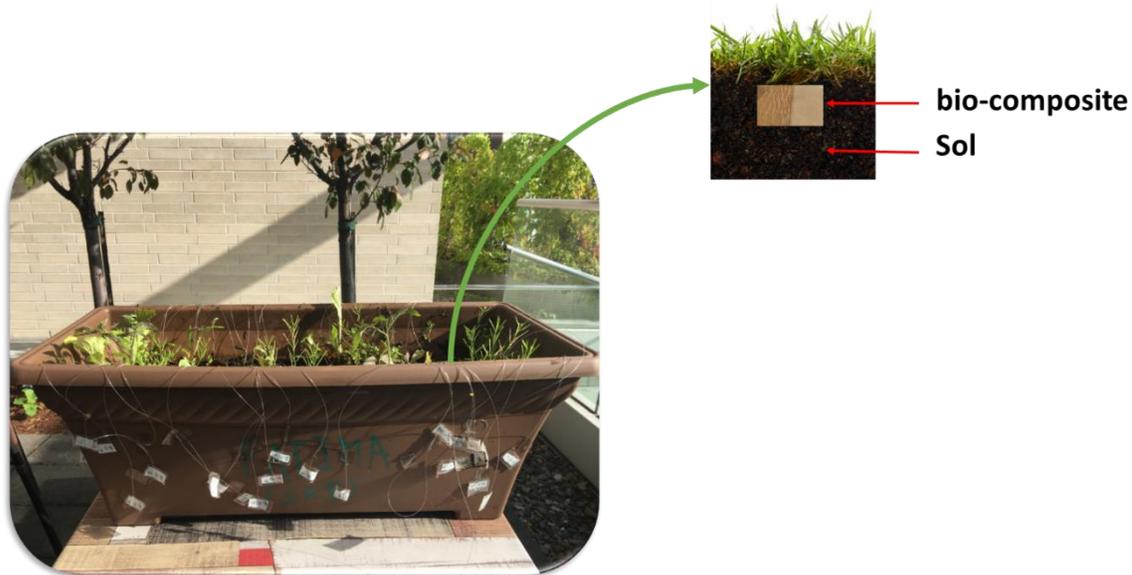


Figure 18: Bac du test de biodégradabilité.

## 4. Résultats et discussion

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication scientifique, sous le titre de : " Évaluation de la faisabilité de l'utilisation de différents types de fibres cellulosiques traitées enzymatiquement pour le recyclage de l'acide polylactique (PLA) ". Dans ce chapitre, nous exposons les principaux résultats obtenus durant ce projet de maîtrise.

### 4.1.La production des enzymes ligno-cellulosiques

Les industries agro-alimentaires génèrent des quantités importantes de déchets dont l'utilisation a été autrefois considérée comme sans valeur. Actuellement, ces déchets sont reconnus comme une matière première de valeur potentielle pour atteindre des rendements en enzymes plus élevés en fermentation à l'état solide (SSF) et pour ainsi réduire le coût global de la production d'enzymes (Karmakar & Ray, 2010). Tel que rapporté par l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture, la production de bleuets a atteint 269 257 tonnes aux États-Unis et 178 745 tonnes au Canada en 2016 (FAOSTAT, 2016). Le marc de bleuet est le déchet obtenu comme sous-produit primaire du traitement du jus et il a été utilisé comme substrat de fermentation en raison de sa forte teneur en carbone avec un pourcentage de 52,6%.

La production des enzymes a été faite par les champignons *Trametes versicolor* et *Aspergillus niger* connus pour leur grande capacité de production des laccases et des cellulases respectivement.

Selon le suivi de la cinétique de production des laccases durant la fermentation (Figure 19), nous remarquons que la production maximale de l'enzyme est de l'ordre de  $37.02 \pm 2.17$  U/g substrat sec obtenue après 8 jours de fermentation.

En ce qui concerne les cellulases (Figure 20), la production a pu atteindre son maximum après 5 jours de fermentation avec une activité enzymatique de l'ordre de  $11.5 \pm 0.11$  U/g substrat sec.

La production d'enzymes dans cette étude est très comparable aux résultats de fermentation cités dans de nombreux rapports sur la production d'enzymes utilisant divers substrats (Bansal et al., 2012; Chaali et al., 2017).

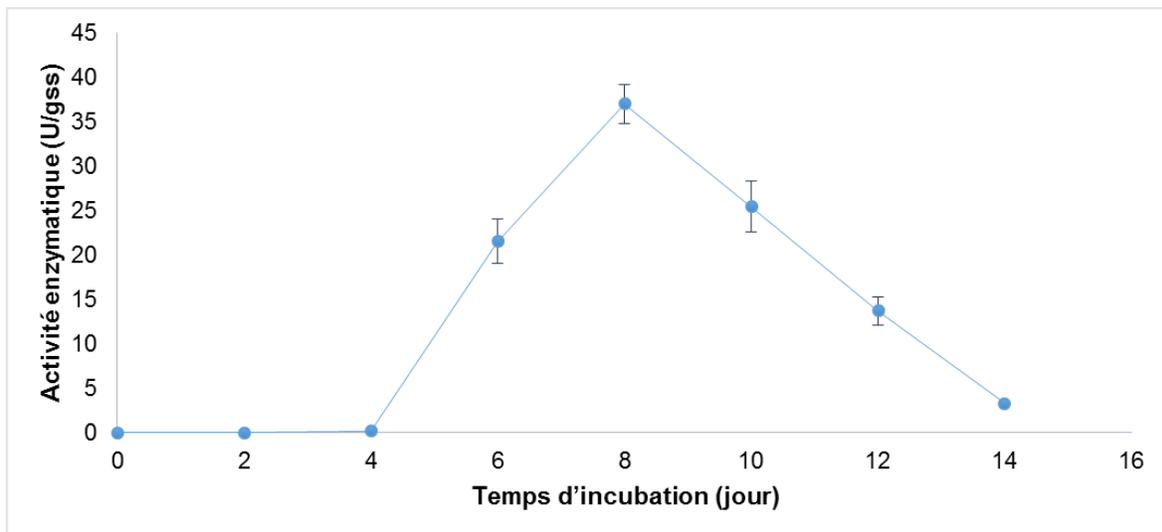
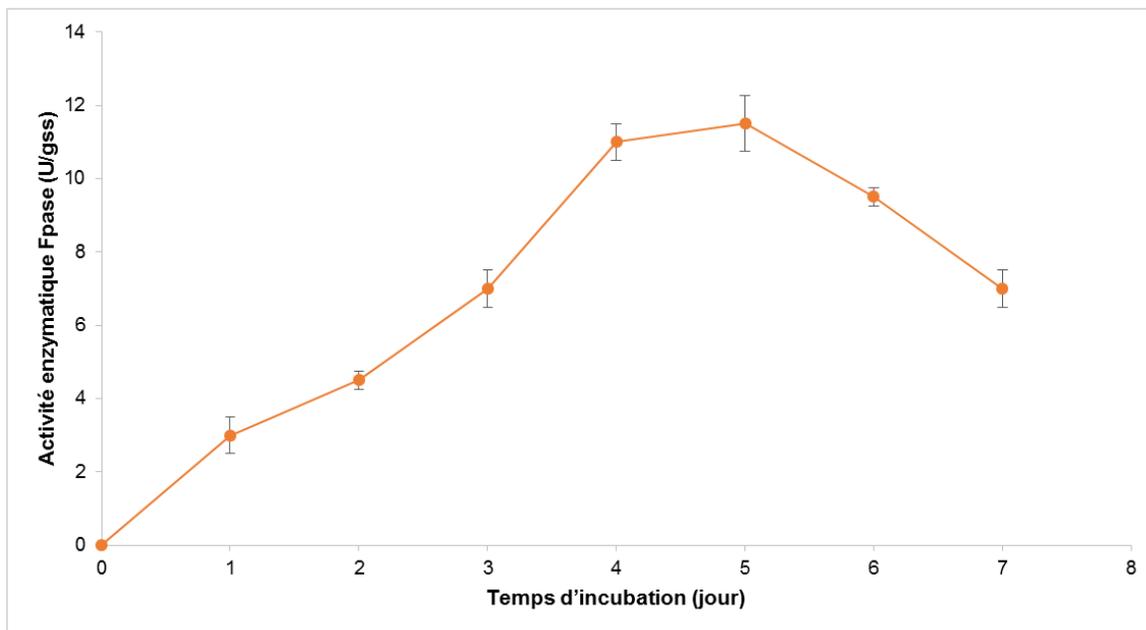


Figure 19: Profil de l'activité enzymatique des laccases par *Trametes versicolor*.



**Figure 20: Profil de l'activité enzymatique des cellulases par *Aspergillus niger*.**

#### **4.2.L'extraction des fibres cellulosiques en utilisant un prétraitement physico-chimique**

Cette partie consiste en l'extraction des fibres cellulosiques issues des fibres de chanvre et des biosolides papetiers (boues mixtes et de désencrage) par le prétraitement physico-chimique.

La taille des 3 classes de fibres a été mesurée par l'analyseur granulométrique. Le tableau 10, ci-dessous, représente la variation de la taille des fibres de chanvre a également connu une réduction. Les résultats montrent que la déclinaison de la première classe a été de 6.40 % (de  $1728.15 \pm 89.65 \mu\text{m}$  à  $1617.50 \pm 101.19 \mu\text{m}$ ), de la seconde classe de 3.40% (de  $1633.71 \pm 125.58 \mu\text{m}$  à  $1578.08 \pm 98.24 \mu\text{m}$ ) ainsi que la troisième classe de 26.36% (de  $845.64 \pm 97.22 \mu\text{m}$  à  $622.71 \pm 47.43 \mu\text{m}$ ).

Idem pour les fibres de boues mixtes après le prétraitement, la taille a été réduite de 5.83% (de  $2578.90 \pm 93.77 \mu\text{m}$  à  $2428.56 \pm 126.50 \mu\text{m}$ ) pour la première classe, de 22.58% (de  $1167.45 \pm 114.89 \mu\text{m}$  à  $903.81 \pm 80.91 \mu\text{m}$ ) pour la deuxième classe et de 33.44% ( $495.34 \pm 54.90 \mu\text{m}$  à  $329.70 \pm 26.42 \mu\text{m}$ ) pour la troisième classe.

Enfin, la taille des fibres de boues de désencrage a également connu une réduction. Les résultats montrent que la déclinaison de la première classe a été de 6.13% (de  $1728.15 \pm$

89.65  $\mu\text{m}$  à  $1617.50 \pm 101.19 \mu\text{m}$ ), de la seconde classe de 39.77% (de  $1633.71 \pm 125.58 \mu\text{m}$  à  $1578.08 \pm 98.24 \mu\text{m}$ ) ainsi que la troisième classe de 59.22% (de  $845.64 \pm 97.22 \mu\text{m}$  à  $622.71 \pm 47.43 \mu\text{m}$ ).

Le traitement de surface réduit les diamètres moyens des fibres traitées aux alcalis. Cela est dû à la dissolution d'une partie des composants de cimentation comme l'hémicellulose et la lignine qui est connue pour être insoluble dans l'eau ou l'alcool mais soluble dans des concentrations faibles de solutions alcalines (Gibson, 2012) et l'élimination partielle des impuretés, de la cire et des huiles (Paul et al., 2010). Ainsi, les résultats obtenus ont montré une réduction de taille acceptable pour toutes les fibres ce qui signifie une élimination partielle d'une certaine quantité des composants de cimentation à la surface externe des fibres, d'où l'utilité de l'utilisation du traitement enzymatique.

**Tableau 10: Analyse granulométrique des fibres cellulósiques après le pré-traitement physico-chimique.**

Type de fibres	Classe	Taille initiale ( $\mu\text{m}$ )	Taille après NaOH 10% ( $\mu\text{m}$ )
Fibres de chanvre	1.7 mm	$1728.15 \pm 89.65$	$1617.50 \pm 101.19$
	850 $\mu\text{m}$	$1633.71 \pm 125.58$	$1578.08 \pm 98.24$
	75 $\mu\text{m}$	$845.64 \pm 97.22$	$622.71 \pm 47.43$
Boues mixtes	>1.7 mm	$2578.90 \pm 93.77$	$2428.56 \pm 126.50$
	850 $\mu\text{m}$	$1167.45 \pm 114.89$	$903.81 \pm 80.91$
	75 $\mu\text{m}$	$495.34 \pm 54.90$	$329.70 \pm 26.42$
Boues de désencrage	>1.7 mm	$1816.32 \pm 76.19$	$1704.93 \pm 40.88$
	1,7 mm	$730.05 \pm 84.89$	$439.69 \pm 27.71$
	75 $\mu\text{m}$	$295.93 \pm 50.34$	$120.69 \pm 20.09$

#### 4.3.L'effet des enzymes produites sur les fibres cellulósiques extraites

Le traitement enzymatique a été effectué en utilisant les enzymes laccases et cellulases produites par fermentation à l'état solide. Actuellement, l'utilisation d'enzymes pour le traitement des fibres naturelles a augmenté rapidement. Parmi les raisons majeures d'avoir adopté cette technologie est le fait qu'elle soit respectueuse de l'environnement et que ses réactions catalytiques aient des actions très spécifiques (Faruk et al., 2012).

La modification enzymatique a été appliquée sur les trois classes de chaque source de cellulose (fibres de chanvre, boues mixtes et boues de désencrage et) après le

prétraitement physico-chimique pour réduire la taille des fibres cellulosiques ainsi que pour l'activation des groupes hydroxyles (OH) à la surface de ces fibres (Henriksson et al., 2005).

L'effet synergique de la laccase et de la cellulase sur les biosolides papetiers et les fibres de chanvre a été davantage analysé par diverses techniques analytiques, à savoir, l'analyseur granulométrique, le microscope électronique à balayage (MEB), la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IR-TF) et la diffraction aux rayons X (DRX) et discuté dans les sections suivantes.

#### **4.3.1. Analyse granulométrique**

Le contrôle de la taille des 3 classes de fibres de chanvre (1.7 mm, 850  $\mu\text{m}$  et 75  $\mu\text{m}$ ), des boues mixtes (> 1.7 mm, 850  $\mu\text{m}$  et 75  $\mu\text{m}$ ) et des boues de désencrage (> 1.7 mm, 1.7 mm et 75  $\mu\text{m}$ ), et après le traitement enzymatique (laccase et cellulase) a été réalisée en utilisant l'analyseur granulométrique. L'analyse des résultats permet d'établir les histogrammes de distribution du diamètre moyen des différentes fibres. Les diagrammes sont représentés sur les figures ci-dessous.

La figure 21 (A) représente la variation de taille des fibres de chanvre pendant le traitement enzymatique. Comme le montre la figure, la taille a été réduite après 7 jours d'incubation de 54.24% (de  $1617.50 \pm 101.19 \mu\text{m}$  à  $740.07 \pm 54.62 \mu\text{m}$ ) pour la première classe, de 58.03% (de  $1578.08 \pm 98.24 \mu\text{m}$  à  $662.24 \pm 33.41 \mu\text{m}$ ) pour la deuxième classe et de 75.48% (de  $622.71 \pm 47.43 \mu\text{m}$  à  $152.70 \pm 70.74 \mu\text{m}$ ) pour la troisième classe.

Idem pour la figure 21 (B), la variation de taille des fibres de boues mixtes pendant le traitement enzymatique a été réduite de 53.9% (de  $2428.56 \pm 126.50 \mu\text{m}$  à  $1119.44 \pm 29.04 \mu\text{m}$ ) pour la première classe, de 51.85% (de  $903.81 \pm 80.91 \mu\text{m}$  à  $435.16 \pm 90.02 \mu\text{m}$ ) pour la deuxième classe et de 49.02% (de  $329.70 \pm 26.42 \mu\text{m}$  à  $168.07 \pm 10.29 \mu\text{m}$ ) pour la troisième classe.

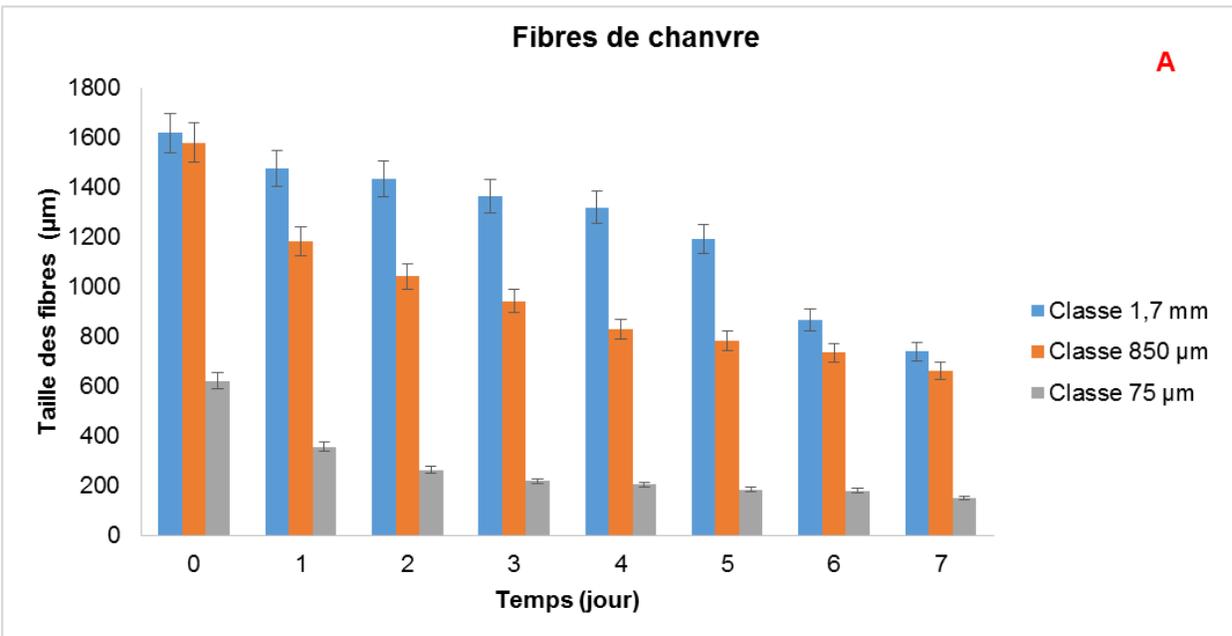
Enfin, pour la figure 21 (C), la taille des fibres des boues de désencrage pendant le traitement enzymatique a été, également, réduite. Les résultats montrent que la déclinaison de la première classe est de 90.08% (de  $1704.93 \pm 40.88 \mu\text{m}$  à  $169.17 \pm 12.62 \mu\text{m}$ ), de la seconde classe est 63.22% (de  $439.69 \pm 27.71 \mu\text{m}$  à  $161.71 \pm 50.81 \mu\text{m}$ ) ainsi que la troisième classe de 27.23% (de  $120.69 \pm 20.09 \mu\text{m}$  à  $87.83 \pm 10.05 \mu\text{m}$ ).

La combinaison entre la laccase et la cellulase pour le traitement enzymatique des des fibres de chanvre et des biosolides papetiers a montré la digestibilité de la cellulose en

réduisant la taille, l'élimination partielle de l'hémicellulose et les composés phénoliques tels que les groupes hydroxyles (Heap et al., 2014). La combinaison des deux permet d'éviter les problèmes d'agrégation des fibres dans les nouveaux biocomposites ce qui peut influencer négativement les propriétés mécaniques de ces biocomposites (Bledzki et al., 2009; Heap et al., 2014).

Le traitement enzymatique a prouvé que la laccase et la cellulase sont très efficaces pour le traitement des fibres cellulosiques des trois sources étudiées. En outre, la laccase et la cellulase éliminent la plupart des substances de revêtement de la surface, telles que l'hémicellulose, la pectine et la lignine produisant des fibres plus rugueuses et hydrophobes pour diverses applications telles que le renforcement des biocomposites et le remplacement des fibres de carbone (George et al., 2014).

Comme il n'y a pas eu une grande variation entre la première et la deuxième classe des fibres de chanvre et des boues de désencrage respectivement, nous n'avons pas considéré et utilisé la deuxième classe dans la préparation de biocomposites.



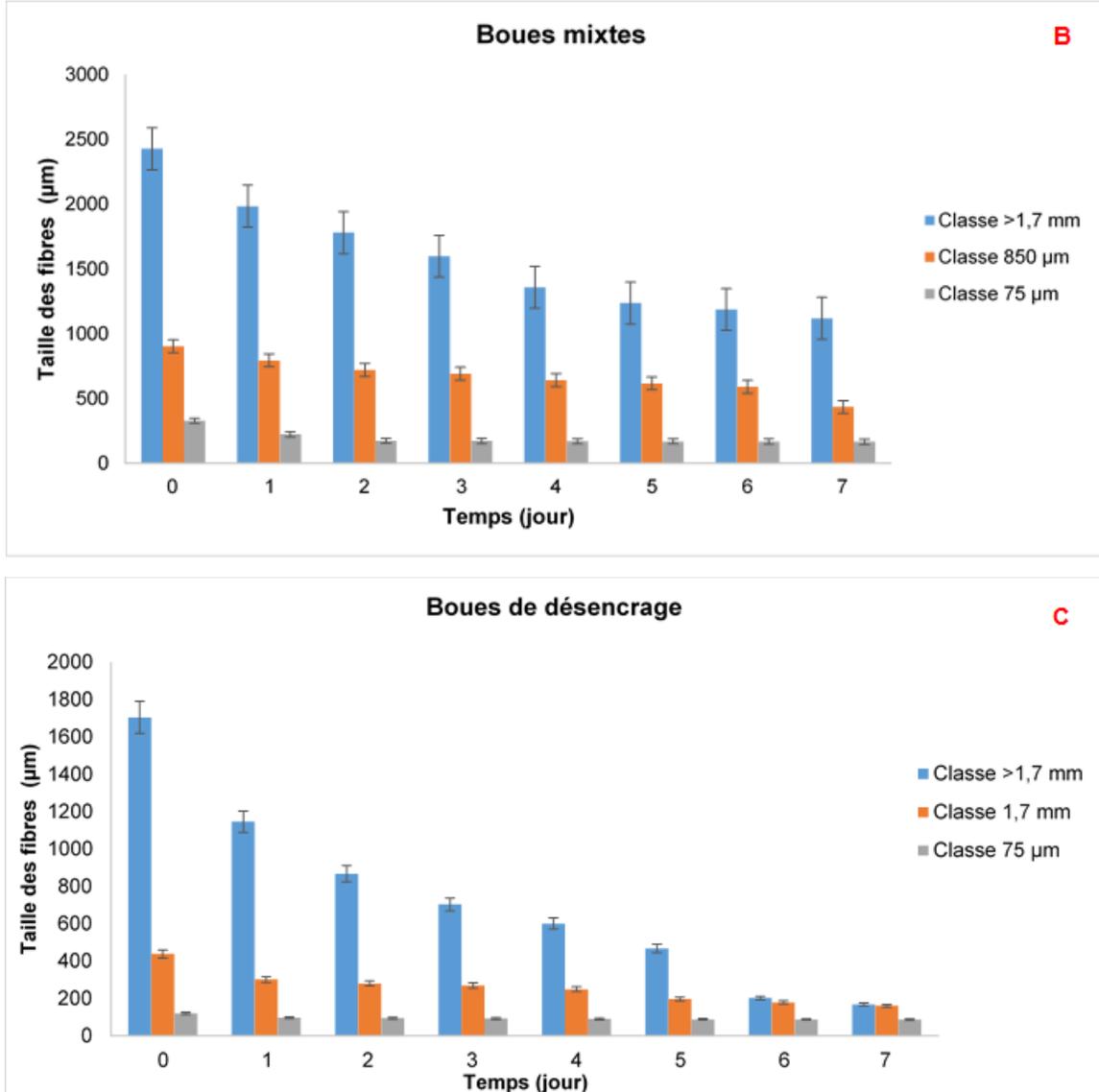


Figure 21: Analyse granulométrique des fibres cellulosiques des boues de désencrage (A), des boues mixtes (B) et des fibres de chanvre (C) lors du traitement enzymatique.

#### 4.3.2. Analyse à la diffraction aux rayons X

Les trois sources de fibres cellulosiques (fibres de chanvre, boues mixtes et boues de désencrage) ont été analysées à la diffraction aux rayons X pour suivre les changements au niveau de la cristallinité pour les trois sources de fibres cellulosiques avant et après le

traitement enzymatique. Nous avons pris les fibres cellulosiques après le prétraitement physico-chimique comme contrôle.

À partir de la Figure 22 (A), nous constatons un changement remarquable au niveau des pics pour les fibres de chanvre. Les principaux pics sont apparus à 14.8, 16.4 et 22.52 ce qui correspond respectivement à des plans de diffraction de (390), (336), (742). À partir de la Figure 22 (B), nous constatons également un changement remarquable au niveau des pics des boues mixtes. Les principaux pics sont apparus à 12.22, 14.28, 16.9 et 22.44 ce qui correspond respectivement à des plans de diffraction de (139), (213), (235) et (374).

Tous ces pics représentaient la région cristalline qui est présente à un pourcentage élevé dans les fibres cellulosiques (Liu & Hu, 2008; Park et al., 2010).

Selon les résultats obtenus, il s'avère que le traitement enzymatique en utilisant les laccases et les cellulases est efficace pour l'extraction de la cellulose en éliminant les zones amorphes principalement l'hémicellulose et la lignine (Pickering et al. 2011b) présentes dans les boues mixtes et les fibres chanvre ce qui favorise l'adhésion interfaciale entre les fibres cellulosiques extraites et la matrice de PLAr. D'autre part, le traitement enzymatique a eu un effet sur les régions amorphes en affectant l'absorption des fibres cellulosiques, ce qui peut empêcher le gonflement, augmenter l'hydrophobicité des fibres cellulosiques et, donc, améliorer la liaison entre les fibres et le PLA recyclé comme en témoignent plusieurs études (Henriksson et al., 2005; Park et al., 2007; Kalia & Vashistha, 2012; Kalia et al., 2013).

Cependant, l'élimination de l'hémicelluloses et des fractions de la lignine modifie considérablement la structure des fibres naturelles, augmente la surface cristalline et l'accessibilité des enzymes à la cellulose (Mussatto et al., 2008).

Par contre, nous remarquons à partir de la figure 22 (C) que la cristallinité des fibres des boues de désencrage après leur traitement enzymatique est légèrement inférieure à celle du témoin (avant traitement enzymatique). Dans ce cas-là, la réduction de la cristallinité a été causé par le traitement enzymatique ce qui fait que la présence des zones amorphes pourrait impacter négativement les propriétés mécaniques de biocomposites à partir des boues de désencrage (Efrati et al., 2013).

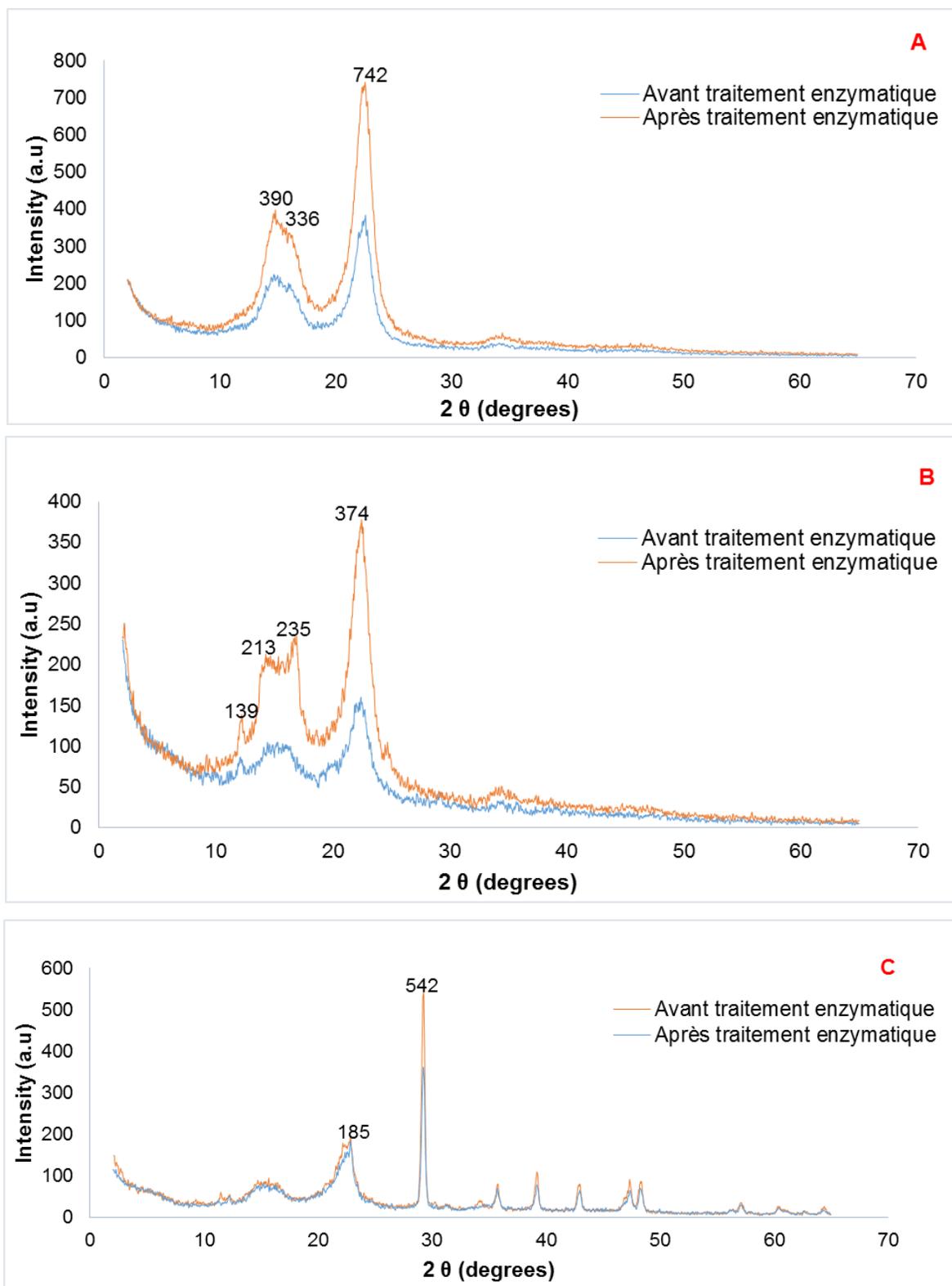


Figure 22: Spectres DRX des fibres de chanvre (A), des boues mixtes (B) et des boues de désencrage (C) avant et après le traitement enzymatique.

### 4.3.3. Analyse au microscope électronique à balayage (MEB)

L'analyse au microscope électronique à balayage (MEB) des trois sources de fibres cellulosiques (fibres de chanvre, boues mixtes et boues de désencrage) après le prétraitement physico-chimique (A) et le traitement enzymatique (B) est montrée sur les figures 23, 24 et 25 respectivement.

Après chaque traitement, nous avons analysé les trois sources de fibres cellulosiques au MEB afin de confirmer l'efficacité du traitement enzymatique. Nous avons pris les fibres cellulosiques après le prétraitement physico-chimique comme contrôle.

D'après les figures 23 et 24, nous constatons une structure irrégulière et un changement remarquable de la morphologie structurelle des fibres cellulosiques des fibres de chanvre et des boues mixtes respectivement après le traitement enzymatique. La taille des fibres cellulosiques a été considérablement réduite ainsi qu'elles ont été largement décollées en fibres individuelles micrométriques ce qui confirme que les matériaux de cimentation à l'instar l'hémicellulose, la lignine et la pectine ont été partiellement éliminées après le traitement enzymatique.

Cependant, pour les boues de désencrage (figure 25) aucun changement n'a été observé après le traitement enzymatique car cette boue ne contient pas une grande fraction de cellulose ce qui empêche l'action enzymatique des cellulases.

Les propriétés mécaniques des biocomposites dépendent, ainsi, de la longueur des fibres qui peuvent affecter l'adhérence entre les fibres et la matrice, ainsi, une plus petite taille favorise une meilleure adhérence de la matrice aux fibres (Mukherjee & Kao, 2011).

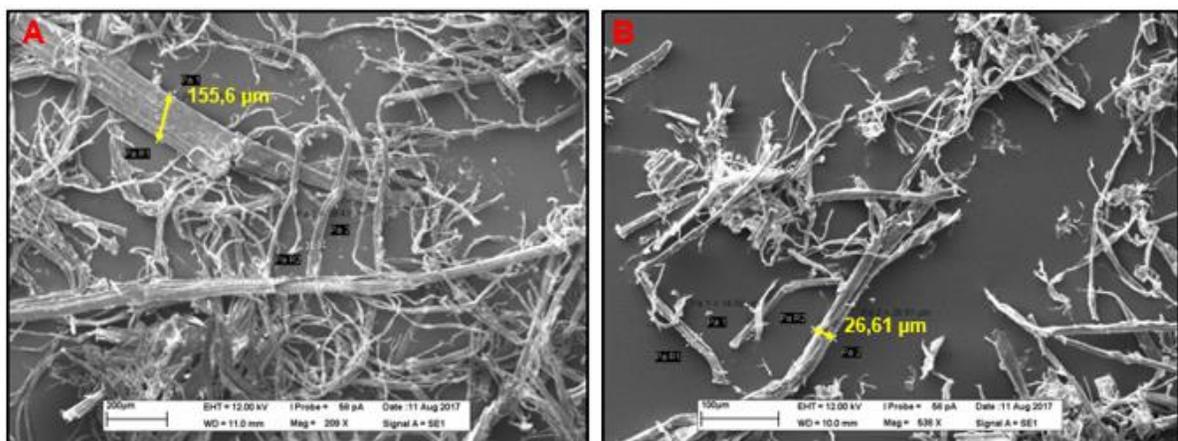


Figure 23: Microphotographie MEB des fibres de chanvre (A) avant et (B) après traitement enzymatique.

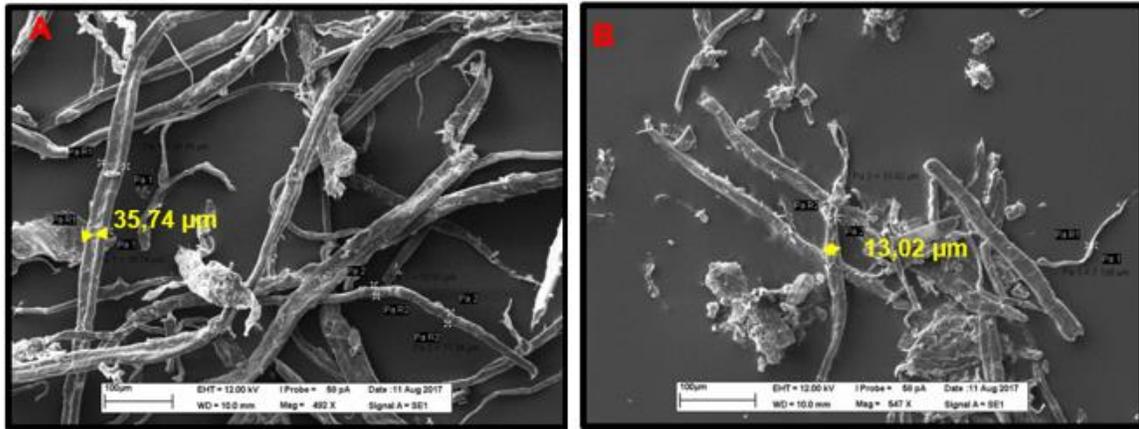


Figure 24: Microphotographie MEB des boues mixtes (A) avant et (B) après traitement enzymatique.

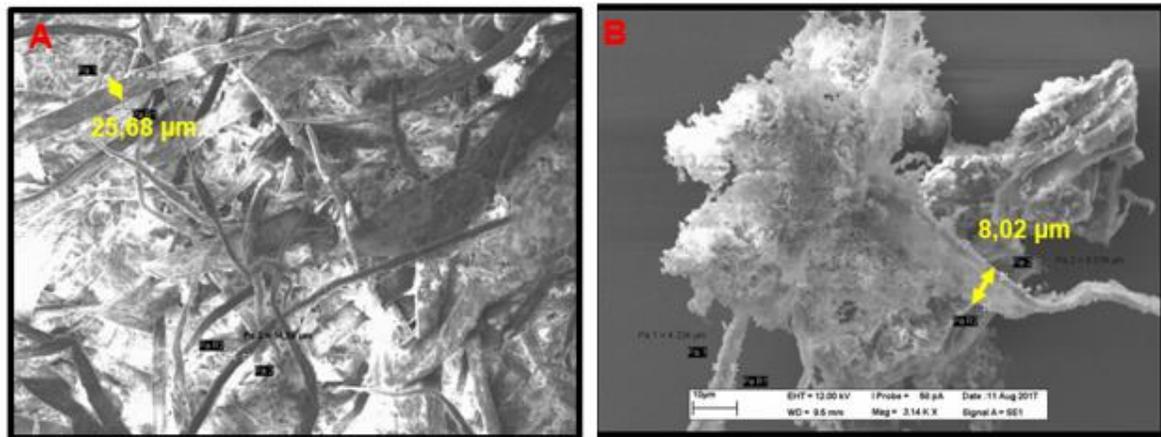


Figure 25: Microphotographie MEB des boues de désencrage (A) avant et (B) après traitement enzymatique.

#### 4.3.4. Analyse au spectroscope infrarouge à transformée de Fourier

Les changements structuraux dans les fibres de cellulose provenant des biosolides papetiers et des fibres de chanvre ont été analysés par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) à différentes étapes, à savoir, avant et après le prétraitement alcalin et le traitement enzymatique respectivement.

Les spectres FTIR des fibres de chanvre (FC), des boues mixtes (BM) et des boues de désencrage (BD) sont respectivement présentés sur les figures 26 (A), 26 (B) et 26 (C). Les bandes relatives à la cellulose étaient plus intenses dans les spectres des échantillons après traitement, car l'élimination de la lignine augmentait leur teneur en cristaux. En effet,

les pics attribués aux groupes C-H cellulosiques s'étendant dans la région de 1400-1300  $\text{cm}^{-1}$  étaient plus intenses dans les échantillons de FC et de BM après leur traitement que dans BD.

Les figures 26 (A) et 26 (B) montrent que les étapes des traitements alcalin et enzymatique éliminent la plus grande partie de la lignine des fibres de cellulose: les bandes à 1525  $\text{cm}^{-1}$  disparaissent après ces traitements (Zuluaga et al., 2009) chose qu'on n'observe pas chez les BD (figure 26 (C)). Le pic attribué aux groupes COOH qui apparaissait dans le spectre des FC et des BM à 1635  $\text{cm}^{-1}$  excepte les BD était associé à de l'eau adsorbée; il pourrait aussi révéler que des groupes carbonyle conjugués existaient dans la structure polyphénolique de la lignine ou résultaient de l'oxydation des hydrates de carbone (Hassan et al., 2010).

Le pic à 1574  $\text{cm}^{-1}$ , qui correspond à la structure benzénique de la lignine, a également été réduit dans les FC et les BM seulement mais un pic très faible reste dans cette région du spectre attestant que les échantillons contenaient des résidus de lignine; c'est-à-dire que le traitement enzymatique n'a pas complètement éliminé la lignine.

En comparant le spectre avant et après le traitement chimique des 3 fibres étudiées, on a observé une réduction très visible du pic de vibration à 2900  $\text{cm}^{-1}$  représentant les groupes C-H présents dans la cellulose (Tang et al., 2015) pour les FC et les BM ainsi qu'une légère réduction chez les BD. Ceci indique l'effet du traitement chimique en utilisant une faible concentration de NaOH sur la dégradation des substances de revêtement (lignine, hémicellulose et pectine) qui pourraient influencer la taille des fibres cellulosiques par rapport à la longueur initiale. Ainsi, le traitement enzymatique était efficace pour extraire les fibres cellulosiques qui sont présentes dans les FC et les BM et par conséquent elles peuvent être utilisées comme renforcement pour l'acide polylactique recyclé.

Ces résultats ont permis d'affirmer que le traitement combiné du traitement enzymatique et chimique utilisant une faible concentration de NaOH (10% v/v) est efficace pour l'élimination des composants amorphes dans les fibres cellulosiques des fibres de chanvre et des boues mixtes surtout. Par conséquent, les changements dans les groupes hydroxyles après le traitement enzymatique indiquaient une résistance accrue à l'humidité. En outre, il reflète également la dégradation des substances de revêtement (Cao & Tan, 2004).

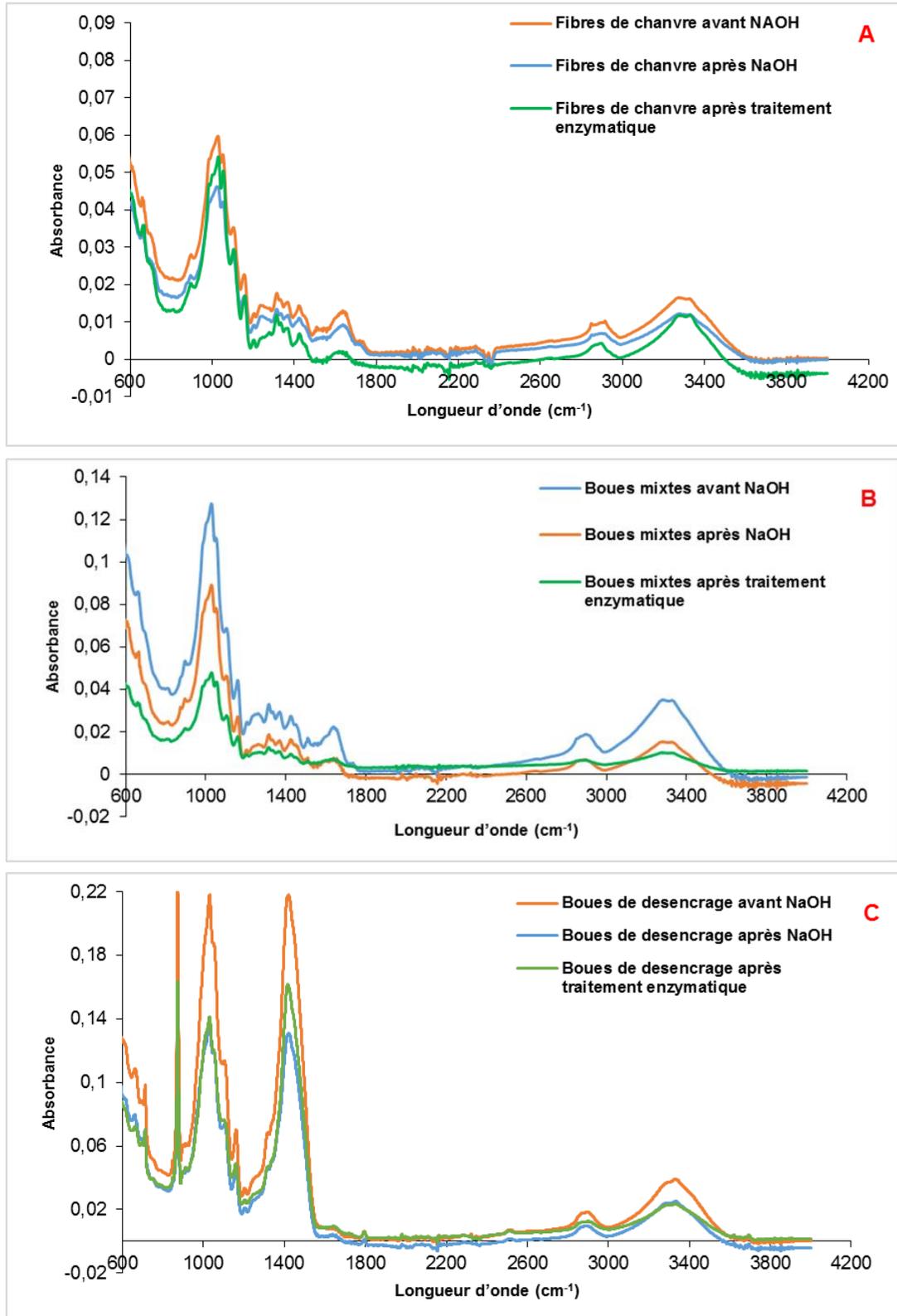


Figure 26: Les spectres de FTIR pour les fibres de chanvre (A), les boues mixtes (B) et les boues de désencrage (C) avant et après le traitement alcalin et enzymatique.

#### **4.4. Les propriétés mécaniques des biocomposites**

La taille et le pourcentage du renfort ont un effet direct sur les propriétés mécaniques du biocomposite. Ceci a été démontré en particulier dans une étude menée par Laadila et al. (2017) sur l'influence de la taille des particules et du pourcentage de fibres cellulosiques sur les propriétés des biocomposites à matrice PLA recyclé. L'étude a révélé que les biocomposites formés avec 2% de fibres cellulosiques ont montré de meilleurs résultats par rapport à 5% et 10%.

Au vu de ces résultats, nous avons voulu affiner encore l'étude tout en restant dans une gamme de pourcentage proche de 2%. Nous avons, donc, travaillé avec des pourcentages de fibres de 1.5%, 3% et 6% et des tailles réduites variant entre 0.075mm et 1.7mm d'où l'utilisation du broyage, traitement alcalin, tamisage et traitement enzymatique.

Les principaux résultats des essais mécaniques (test de traction et d'impact) sur les différentes formulations de biocomposites (27 biocomposites) ont tous été compilés à l'intérieur du tableau 11.

Tout d'abord, l'observation du tableau indique une différence entre les valeurs du module d'Young et la résistance à l'impact du contrôle PLAr et ses biocomposites avec différentes formulations. Le composite PLAr 100% a le module d'Young le plus faible (244.48 MPa) et la résistance à l'impact la plus faible (13.58 MPa).

Comparé à d'autres formulations, le biocomposite FC 3% 75 $\mu$ m a la plus résistance à la traction la plus élevée (324.53 MPa) et le biocomposite FC 1.5% 75 $\mu$ m a la plus grande résistance à l'impact (27.61 kJ/m<sup>2</sup>). Cette augmentation des performances mécaniques peut être associée à l'élimination des matériaux indésirables par le traitement des fibres, ce qui a conduit à une teneur en cellulose plus élevée, une plus grande surface de contact entre la fibre et le PLAr et donc une meilleure adhérence interfaciale.

Dans l'ensemble, les biocomposites renforcés aux fibres de chanvre sont ceux qui ont donné les meilleurs résultats au niveau des propriétés mécaniques par rapport aux biosolides papetiers.

**Tableau 11: Résultats des tests mécaniques du PLAr et sur ses sur différents biocomposites.**

	Code	Test de traction	Test d'impact
		Module d'Young (MPa)	Résistance à l'impact (kJ/m <sup>2</sup> )
<b>Fibres de chanvre</b>	FC 1.5% 1.7µm	314.12 ± 8.96	15.74 ± 2.08
	FC 1.5% 75µm	317.63 ± 26.21	27.61 ± 2.94
	FC 3% 1.7µm	321.60 ± 20.51	16.82 ± 3.17
	FC 3% 75µm	324.53 ± 3.10	14.72 ± 3.11
	FC 6% 1.7µm	304.66 ± 3.32	10.35 ± 1.16
	FC 6% 75µm	313.63 ± 8.10	11.28 ± 1.65
<b>Boues mixtes</b>	BM 1.5% >1.7µm	278.95 ± 3.29	15.47 ± 1.97
	BM 1.5% 850µm	298.50 ± 11.92	16.46 ± 0.38
	BM 1.5% 75µm	304.99 ± 5.61	16.59 ± 1.75
	BM 3% >1.7µm	264.79 ± 9.93	16.10 ± 0.17
	BM 3% 850µm	295.09 ± 6.31	19.04 ± 1.96
	BM 3% 75µm	300.55 ± 16.26	20.47 ± 4.24
	BM 6% >1.7µm	284.95 ± 30.69	8.47 ± 0.60
	BM 6% 850µm	266.73 ± 5.86	11.91 ± 0.75
<b>Boues de désencrage</b>	BD 1.5% >1.7µm	287.27 ± 7.92	13.06 ± 1.24
	BD 1.5% 75µm	313.19 ± 4.61	14.59 ± 2.24
	BD 3% >1.7µm	315.58 ± 4.31	12.92 ± 2.29
	BD 3% 75µm	310.73 ± 3.70	12.53 ± 0.61
	BD 6% >1.7µm	295.66 ± 19.33	11.46 ± 0.60
	BD 6% 75µm	316.59 ± 2.80	7.67 ± 0.74
<b>PLAr (contrôle)</b>	PLAr 100%	244.48 ± 11.23	13.85 ± 0.42

À la lumière des résultats des tests mécaniques, des tests statistiques ont été menés pour mieux évaluer les différents biocomposites préparés. Un test d'ANOVA a été effectué suivi d'un test de Tukey. Les tableaux 12 et 13 résument les conclusions tirées de ces analyses. Les résultats de l'analyse de variance (ANOVA) présentés dans le tableau 11 montrent que le test de traction est statistiquement dépendant de la taille des fibres utilisés dans les biocomposites à des P-value < 0,05 de 0.0373, 0.0138 et 0.0397 pour les boues de désencrage, les boues mixtes et les fibres de chanvre respectivement. Pour le test d'impact est statistiquement dépendant de pourcentage des fibres utilisé dans les biocomposites à des P-value < 0,05 de 0.0813, < 0.0001 et 0.0118 pour les boues de désencrage, les boues mixtes et les fibres de chanvre respectivement.

D'après le tableau 11, les meilleurs résultats de test de traction sont obtenus à une taille des fibres de 75µm et pour le test d'impact à un pourcentage ne dépassant pas les 3%.

**Tableau 12: ANOVA pour les différents types de fibres cellulosiques utilisées.**

		<b>P-value Boues de désencrage</b>	<b>P-value Boues mixtes</b>	<b>P-value Fibres de chanvre</b>
<b>Test de traction</b>	<b>Pourcentage</b>	0.2153	0.6834	0.9616
	<b>Taille</b>	0.0373	0.0138	0.0397
	<b>Pourcentage*Taille</b>	0.1085	0.1359	0.5909
<b>Test d'impact</b>	<b>Pourcentage</b>	0.0813	<0.0001	0.0118
	<b>Taille</b>	0.5736	0.1402	0.8677
	<b>Pourcentage*Taille</b>	0.2307	0.1945	0.1758

*P-value <0,05*

Afin de poursuivre l'analyse des résultats, les groupes formés selon le test de Tukey sont présentés au tableau 13 pour chaque biocomposite formulé.

Afin de faciliter la comparaison entre les différents biocomposites et de tenter de déterminer les meilleures formulations, une façon de comparaison simple a été utilisée. Une annotation de Bien est attribuée pour le groupe A, Moyen pour le groupe B et Faible pour le groupe C.

D'après les constatations, on peut dire que la fibre de chanvre est classée comme la meilleure fibre à utiliser comme renfort (groupe A), suivie par les boues mixtes qui procèdent aussi des propriétés mécaniques intéressantes puisque plus de la moitié de ses biocomposites se retrouvent dans le groupe A et enfin les biocomposites à base de boues de désencrage qui se trouvent en dernière position dans le groupe C (comme le contrôle) ce qui signifie qu'elles sont les moins intéressantes à utiliser.

Tous ces résultats indiquent que la performance mécanique des biocomposites ne dépend pas seulement de la méthode d'extraction des fibres cellulosiques et des traitements utilisés mais aussi dépend du type de fibre naturelle choisie.

**Tableau 13: Résultats de la comparaison multiple entre les différents biocomposites.**

	<b>Code de l'échantillon</b>	<b>Groupe</b>
<b>Fibres de chanvre</b>	FC 1.5% 1.7µm	A
	FC 1.5% 75µm	A
	FC 3% 1.7µm	A
	FC 3% 75µm	A
	FC 6% 1.7µm	A
	FC 6% 75µm	A
<b>Boues mixtes</b>	BM 1.5% >1.7µm	B
	BM 1.5% 850µm	A
	BM 1.5% 75µm	A
	BM 3% >1.7µm	B
	BM 3% 850µm	A
	BM 3% 75µm	A
	BM 6% >1.7µm	B
	BM 6% 850µm	B
BM 6% 75µm	A	
<b>Boues de désencrage</b>	BD 1.5% >1.7µm	C
	BD 1.5% 75µm	C
	BD 3% >1.7µm	C
	BD 3% 75µm	C
	BD 6% >1.7µm	C
	BD 6% 75µm	C
<b>PLAr (contrôle)</b>	PLAr 100%	C

A: Bien      B: Moyen      C: Faible

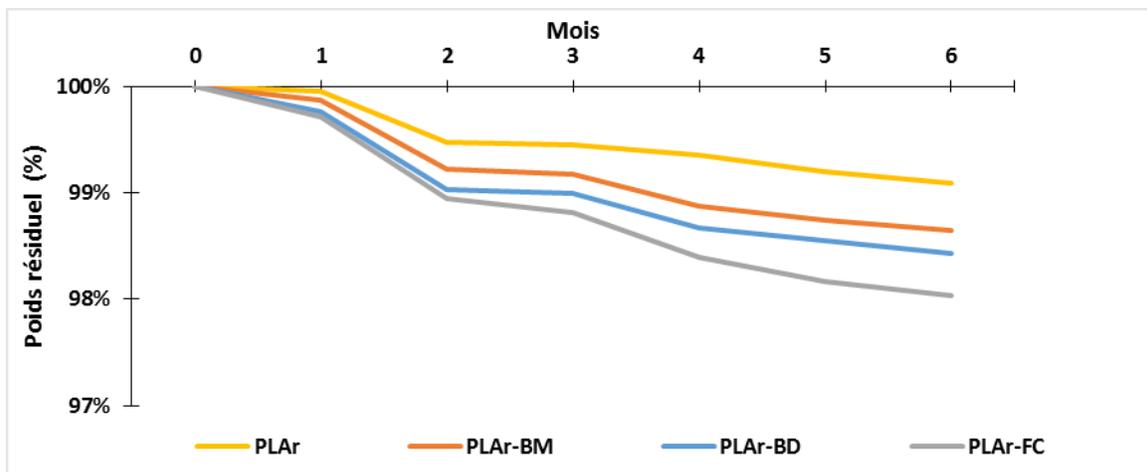
#### **4.5. Le test de biodégradabilité**

Le test de biodégradabilité par enfouissement dans le sol a été effectué pour étudier l'effet réel du compostage sur les échantillons dans les conditions normales de l'environnement. Dans la littérature, de nombreux chercheurs tels qu'Ochi (2008) et Ohkita and Lee (2006) ont effectué des tests de biodégradabilité des composites en utilisant des matériaux enzymatiques et de compostage à haute température et des conditions de compostage contrôlées. Dans ce projet, une approche différente de test a été réalisée. La biodégradabilité a été testée en utilisant un test d'enfouissement dans le sol naturel qui est similaire à l'environnement normal.

Comme la figure 27 le montre, le PLA recyclé et les biocomposites PLAr-fibres de chanvre (PLAr-FC), PLAr-boues de désencrage (PLAr-BD) et PLAr-boues mixtes (PLAr-BM) se dégradent progressivement avec le temps. Comme on peut le voir, jusqu'aux 30 premiers

jours, le taux de biodégradation est presque le même pour tous les échantillons. Puis immédiatement il y a une forte augmentation de la perte de poids, en particulier pour le biocomposite PLAr-FC, qui atteint une perte de poids de 1,97% après 6 mois, chose qui reste très faible et ce très lente par rapport aux techniques enzymatiques utilisées. Par exemple, Ochi (2008) a utilisé du matériel enzymatique lors du compostage pour l'étude du composite PLA-kenaf et a trouvé que le poids du composite diminuait de 38% après 4 semaines de compostage. Mathew et al. (2005) ont atteint un taux de dégradation plus élevé sans matériau enzymatique juste en utilisant une température plus élevée de 58 ° C. Dans ce projet, une température moyenne plus faible de 30 ° C a été utilisée, ce qui serait probablement attribué au taux de dégradation plus lent observé dans ce projet.

Comme on peut l'observer sur la figure 27 après 180 jours (6 mois), la perte de poids est double pour le PLAr-FC par rapport au PLA recyclé suivi de PLAr-BD et enfin le PLAr-BM.



**Figure 27: Poids résiduel du PLAr et de ses biocomposites pendant le test de biodégradation.**

La dégradation plus élevée des biocomposites par rapport au PLAr peut s'expliquer par l'initiation de la dégradation enzymatique des chaînes celluloses dans les fibres. Les taux plus élevés de perte de poids des biocomposites peuvent également être attribués à leur faible cristallinité, car les régions amorphes sont plus sensibles à la dégradation.

En outre, en comparant la biodégradation des biocomposites PLAr-FC, PLAr-BD et PLAr-BM, la plus forte teneur en cellulose des fibres de chanvre conduit à une adsorption d'eau plus élevée qui a un effet synergique sur la biodégradation et par conséquent augmenterait la vitesse de dégradation du biocomposite. En plus de la teneur en cellulose,

la quantité de lignine en tant que composant hydrophobe peut réduire le taux de biodégradation. Cependant, on peut dire que la perte de poids n'a pas été très significative pour tous les biocomposites de PLAr même après 6 mois de compostage.

## 5. Conclusion

La présente étude a permis de mettre en évidence la faisabilité de la valorisation de fibres cellulosiques obtenues à partir des résidus de l'industrie des pâtes et papiers et des fibres de chanvre pour le recyclage de l'acide polylactique. Ce travail a permis le développement d'un nouveau concept de formulation de biocomposite PLAr-fibres cellulosiques en utilisant des matières premières et des techniques peu coûteuses et simples.

Les biocomposites développés à base de PLAr et des fibres cellulosiques présentent des propriétés mécaniques intéressantes. Afin d'évaluer l'effet du prétraitement alcalin sur la taille des fibres, du NaOH à 10% a été testé sur les fibres extraits à partir des boues mixtes, des boues de désencrage et de la plante de chanvre. Le prétraitement avec le NaOH affecte significativement les fibrilles et le degré de polymérisation de la cellulose.

Pour le traitement enzymatique des fibres, la laccase et la cellulase ont été produites par fermentation à l'état solide avec une activité de  $34.8 \pm 5.7$  U / g et de  $11.8 \pm 0.5$  U / g, respectivement. L'application de ces enzymes a réduit la taille des fibres de l'ordre de 90% dans certains cas par l'action de la cellulase et activé leurs surfaces en effectuant des modifications microstructurales et cristallines pour une meilleure adhérence entre le renfort (fibres cellulosiques) et la matrice (acide polylactique recyclé).

La diffraction des rayons X, la microscopie électronique à balayage, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier et les essais mécaniques des nouveaux biocomposites ont montré que les fibres de chanvre avaient les meilleures propriétés (Module d'Young de  $324.53 \pm 3.10$  MPa; résistance à l'impact de  $27.61 \pm 2.94$  kJ/m<sup>2</sup>) suivis des biocomposites à base de boues mixtes (Module d'Young de  $316.59 \pm 2.80$  MPa; résistance à l'impact de  $20.47 \pm 4.24$  kJ/m<sup>2</sup>) et en dernière position les biocomposites à base de boues de désencrage (Module d'Young de  $315.58 \pm 4.31$  MPa; résistance à l'impact de  $14.59 \pm 2.24$  kJ/m<sup>2</sup>). Le test de biodégradation à l'échelle du laboratoire a montré un taux de biodégradation de 1.97% pour les fibres de chanvre, de 1.57% pour les boues de désencrage puis de 1.35% pour les boues mixtes.



## 6. Bibliographie

- Adney B & Baker J (1996) Measurement of cellulase activities. LAP-006 NREL Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden.).
- AL-Oqla F & Sapuan S (2014) Enhancement selecting proper natural fiber composites for industrial applications. *Postgraduate Symposium on Composites Science and Technology 2014 & 4th Postgraduate Seminar on Natural Fibre Composites 2014*.
- Anderson I, Abt B, Lykidis A, Klenk H-P, Kyrpides N & Ivanova N (2012) Genomics of aerobic cellulose utilization systems in actinobacteria. *PloS one* 7(6):e39331.
- Auras R, Harte B & Selke S (2004) An overview of polylactides as packaging materials. *Macromolecular bioscience* 4(9):835-864.
- Avérous L (2008) Polylactic acid: synthesis, properties and applications. *Monomers, polymers and composites from renewable resources* 1.
- Azizi Samir MAS, Alloin F & Dufresne A (2005) Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules* 6(2):612-626.
- Baghaei B & Skrifvars M (2016) Characterisation of polylactic acid biocomposites made from prepregs composed of woven polylactic acid/hemp–lyocell hybrid yarn fabrics. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 81:139-144.
- Bajpai PK, Singh I & Madaan J (2014) Development and characterization of PLA-based green composites: A review. *Journal of Thermoplastic Composite Materials* 27(1):52-81.
- Baldrian P, Merhautová V, Gabriel J, Nerud F, Stopka P, Hrubý M & Beneš MJ (2006) Decolorization of synthetic dyes by hydrogen peroxide with heterogeneous catalysis by mixed iron oxides. *Applied Catalysis B: Environmental* 66(3-4):258-264.
- Baldrian P & Valášková V (2008) Degradation of cellulose by basidiomycetous fungi. *FEMS microbiology reviews* 32(3):501-521.
- Bansal N, Tewari R, Gupta JK, Soni R & Soni SK (2011) A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of hydrolytic depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. *BioResources* 6(1):552-569.
- Bansal N, Tewari R, Soni R & Soni SK (2012) Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management* 32(7):1341-1346.

- Barkoula N, Garkhail S & Peijs T (2010) Biodegradable composites based on flax/polyhydroxybutyrate and its copolymer with hydroxyvalerate. *Industrial Crops and Products* 31(1):34-42.
- Behera AK, Avancha S, Basak RK, Sen R & Adhikari B (2012) Fabrication and characterizations of biodegradable jute reinforced soy based green composites. *Carbohydrate polymers* 88(1):329-335.
- Bledzki A & Gassan J (1999) Composites reinforced with cellulose based fibres. *Progress in polymer science* 24(2):221-274.
- Bledzki A, Reihmane S & Gassan J (1996) Properties and modification methods for vegetable fibers for natural fiber composites. *Journal of applied polymer science* 59(8):1329-1336.
- Bledzki AK, Jaszkievicz A & Scherzer D (2009) Mechanical properties of PLA composites with man-made cellulose and abaca fibres. *Composites Part A: Applied science and manufacturing* 40(4):404-412.
- Boni MR, D'Aprile L & De Casa G (2004) Environmental quality of primary paper sludge. *Journal of hazardous materials* 108(1):125-128.
- Bourbonnais R & Paice MG (1990) Oxidation of non-phenolic substrates: an expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS letters* 267(1):99-102.
- Bredholt S, Sonne-Hansen J, Nielsen P, Mathrani IM & Ahring BK (1999) *Caldicellulosiruptor kristjanssonii* sp. nov., a cellulolytic, extremely thermophilic, anaerobic bacterium. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 49(3):991-996.
- Cao Y & Tan H (2004) Structural characterization of cellulose with enzymatic treatment. *Journal of Molecular Structure* 705(1–3):189-193.
- Chaali M, Lecka J, Suresh G, Salem M, Brar SK, Hernandez-Galan L, Sevigny J & Avalos-Ramirez A (2017) Supplement comprising of laccase and citric acid as an alternative for antibiotics-in vitro triggers of melanin production. *bioRxiv* :179291.
- Chandra RP, Bura R, Mabee W, Berlin dA, Pan X & Saddler J (2007) Substrate pretreatment: The key to effective enzymatic hydrolysis of lignocellulosics? *Biofuels*, Springer. p 67-93.
- Chapin FS, Matson PA & Mooney HA (2002) *Terrestrial decomposition*. Springer,
- Collins PJ & Dobson A (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9):3444-3450.
- Couto SR & Herrera JLT (2006) Industrial and biotechnological applications of laccases: a review. *Biotechnology advances* 24(5):500-513.

- Dhillon GS, Oberoi HS, Kaur S, Bansal S & Brar SK (2011) Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products* 34(1):1160-1167.
- Do Vale L, Gomez-Mendoza D, Kim M, Pandey A, Ricart Filho C & EXF S (2012) MV, 2012. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. *Proteomics* 12:2716-2728.
- Duhovic M, Jayaraman K & Peterson S (2008) Natural-fibre-biodegradable polymer composites for packaging. *Properties and Performance of Natural-Fibre Composites* :301.
- Efrati Z, Talaeipour M, Khakifirooz A & Bazyar B (2013) Impact of cellulase enzyme treatment on strength, morphology and crystallinity of deinked pulp. *Cellulose Chemistry and Technology* 47:547-551.
- El-Sabbagh A (2014) Effect of coupling agent on natural fibre in natural fibre/polypropylene composites on mechanical and thermal behaviour. *Composites Part B: Engineering* 57:126-135.
- Europe P (2015) Plastics- The facts 2014/2015. *The unknown life of plastics*, [www.plasticeuropemarketresearchgroup](http://www.plasticeuropemarketresearchgroup).
- FAOSTAT F (2016) FAOSTAT statistical database.
- Faruk O, Bledzki AK, Fink H-P & Sain M (2012) Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in polymer science* 37(11):1552-1596.
- Faruk O, Bledzki AK, Fink HP & Sain M (2014) Progress report on natural fiber reinforced composites. *Macromolecular Materials and Engineering* 299(1):9-26.
- Felby C, Nielsen B, Olesen P & Skibsted L (1997a) Identification and quantification of radical reaction intermediates by electron spin resonance spectrometry of laccase-catalyzed oxidation of wood fibers from beech (*Fagus sylvatica*). *Applied Microbiology and Biotechnology* 48(4):459-464.
- Felby C, Pedersen LS & Nielsen BR (1997b) Enhanced auto adhesion of wood fibers using phenol oxidases. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood* 51(3):281-286.
- Flieger M, Kantorova M, Prell A, Řezanka T & Votruba J (2003) Biodegradable plastics from renewable sources. *Folia microbiologica* 48(1):27.
- Freier D, Mothershed CP & Wiegel J (1988) Characterization of *Clostridium thermocellum* JW20. *Applied and environmental microbiology* 54(1):204-211.
- Fry SC (2001) Plant cell walls. *eLS*.

- Fu Y & Viraraghavan T (2001) Fungal decolorization of dye wastewaters: a review. *Bioresource technology* 79(3):251-262.
- Fuqua MA, Huo S & Ulven CA (2012) Natural fiber reinforced composites. *Polymer Reviews* 52(3):259-320.
- Garcia-Kirchner O, Segura-Granados M & Rodriguez-Pascual P (2005) Effect of media composition and growth conditions on production of  $\beta$ -glucosidase by *Aspergillus niger* C-6. *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer, p 347-359.
- Garlotta D (2001) A literature review of poly (lactic acid). *Journal of Polymers and the Environment* 9(2):63-84.
- George M, Mussone PG & Bressler DC (2014) Surface and thermal characterization of natural fibres treated with enzymes. *Industrial Crops and Products* 53:365-373.
- Gibson LJ (2012) The hierarchical structure and mechanics of plant materials. *Journal of the Royal Society Interface* :rsif20120341.
- Griffith GW, Baker S, Fliegerova K, Liggerstoffer A, Van Der Giezen M, Voigt K & Beakes G (2010) Anaerobic fungi: Neocallimastigomycota. *IMA fungus* 1(2):181-185.
- Groot W, Van Krieken J, Sliemers O & De Vos S (2010) Production and purification of lactic acid and lactide. *Poly (Lactic Acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing, and Applications* :1-18.
- Gulati D & Sain M (2006) Fungal-modification of natural fibers: a novel method of treating natural fibers for composite reinforcement. *Journal of Polymers and the Environment* 14(4):347-352.
- Guo W, Tao J, Yang C, Song C, Geng W, Li Q, Wang Y, Kong M & Wang S (2012) Introduction of environmentally degradable parameters to evaluate the biodegradability of biodegradable polymers. *PloS one* 7(5):e38341.
- Hamad K, Kaseem M & Deri F (2010) Rheological and mechanical properties of poly (lactic acid)/polystyrene polymer blend. *Polymer bulletin* 65(5):509-519.
- Hamad K, Kaseem M & Deri F (2011) Effect of recycling on rheological and mechanical properties of poly (lactic acid)/polystyrene polymer blend. *Journal of materials science* 46(9):3013-3019.
- Hammel K (1997) Fungal degradation of lignin. *Driven by nature: plant litter quality and decomposition* 33:45.
- Hariharan ABA & Khalil HA (2005) Lignocellulose-based hybrid bilayer laminate composite: Part I-studies on tensile and impact behavior of oil palm fiber-glass fiber-reinforced epoxy resin. *Journal of Composite Materials* 39(8):663-684.

- Harini S & Kumaresan R (2014) Production of cellulase from corn cobs by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *International Journal of Chemtech Research* 6(5):2900-2904.
- Hassan ML, Mathew AP, Hassan EA & Oksman K (2010) Effect of pretreatment of bagasse pulp on properties of isolated nanofibers and nanopaper sheets. *Wood and Fiber Science* 42(3):362-376.
- Hatakeyama T & Hatakeyama H (2006) *Thermal properties of green polymers and biocomposites*. Springer Science & Business Media,
- Heap L, Green A, Brown D, van Dongen B & Turner N (2014) Role of laccase as an enzymatic pretreatment method to improve lignocellulosic saccharification. *Catalysis Science & Technology* 4(8):2251-2259.
- Henriksson G, Christiernin M & Agnemo R (2005) Monocomponent endoglucanase treatment increases the reactivity of softwood sulphite dissolving pulp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(5):211-214.
- Hodrova B, Kopečný J & Káš J (1998) Cellulolytic enzymes of rumen anaerobic fungi *Orpinomyces joyonii* and *Caecomyces communis*. *Research in microbiology* 149(6):417-427.
- Horn SJ, Vaaje-Kolstad G, Westereng B & Eijsink V (2012) Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for biofuels* 5(1):45.
- Huang X & Netravali A (2007) Characterization of flax fiber reinforced soy protein resin based green composites modified with nano-clay particles. *Composites Science and Technology* 67(10):2005-2014.
- Jang J, Chung H, Kim M & Sung H (2000) The effect of flame retardants on the flammability and mechanical properties of paper-sludge/phenolic composite. *Polymer Testing* 19(3):269-279.
- Jang J & Lee E (2000) Improvement of the flame retardancy of paper-sludge/polypropylene composite. *Polymer Testing* 20(1):7-13.
- Jawaid M & Khalil HA (2011) Cellulosic/synthetic fibre reinforced polymer hybrid composites: A review. *Carbohydrate Polymers* 86(1):1-18.
- Ji H-W & Cha C-J (2010) Identification and functional analysis of a gene encoding  $\beta$ -glucosidase from the brown-rot basidiomycete *Fomitopsis palustris*. *The Journal of Microbiology* 48(6):808-813.
- John MJ & Thomas S (2008) Biofibres and biocomposites. *Carbohydrate polymers* 71(3):343-364.
- Kalia S, Thakur K, Celli A, Kiechel MA & 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(3):97-112.

- Kalia S & Vashistha S (2012) Surface modification of sisal fibers (*Agave sisalana*) using bacterial cellulase and methyl methacrylate. *Journal of Polymers and the Environment* 20(1):142-151.
- Karmakar M & Ray R (2010) Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes. *Asian J Biotechnol* 2(1):27-36.
- Kimura S, Laosinchai W, Itoh T, Cui X, Linder CR & Brown RM (1999) Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell* 11(11):2075-2085.
- Kolstad JJ, Vink ET, De Wilde B & Debeer L (2012) Assessment of anaerobic degradation of Ingeo™ polylactides under accelerated landfill conditions. *Polymer Degradation and Stability* 97(7):1131-1141.
- Koyama M, Helbert W, Imai T, Sugiyama J & Henrissat B (1997) Parallel-up structure evidences the molecular directionality during biosynthesis of bacterial cellulose. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94(17):9091-9095.
- Kuhad RC, Gupta R & Singh A (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research* 2011.
- Kulma A, Skórkowska-Telichowska K, Kostyn K, Szatkowski M, Skąła J, Drulis-Kawa Z, Preisner M, Żuk M, Szperlik J & Wang Y (2015) New flax producing bioplastic fibers for medical purposes. *Industrial Crops and Products* 68:80-89.
- Kurzatkowski W, Törrönen A, Filipek J, Mach RL, Herzog P, Sowka S & Kubicek C (1996) Glucose-induced secretion of *Trichoderma reesei* xylanases. *Applied and environmental microbiology* 62(8):2859-2865.
- Laadila MA, Hegde K, Rouissi T, Brar SK, Galvez R, Sorelli L, Cheikh RB, Paiva M & Abokitse K (2017) Green synthesis of novel biocomposites from treated cellulosic fibers and recycled bio-plastic polylactic acid. *Journal of cleaner production* 164:575-586.
- Lapointe R (2012) *Bioplastiques biodégradables, compostables et biosourcés pour les emballages alimentaires, distinctions subtiles mais significatives*. (Université de Sherbrooke.).
- Le Moigne N, Longerey M, Taulemesse J-M, Bénézet J-C & Bergeret A (2014) Study of the interface in natural fibres reinforced poly (lactic acid) biocomposites modified by optimized organosilane treatments. *Industrial Crops and Products* 52:481-494.
- Lee K-Y, Delille A & Bismarck A (2011) Greener surface treatments of natural fibres for the production of renewable composite materials. *Cellulose fibers: bio-and nano-polymer composites*, Springer. p 155-178.
- Lee S-H & Wang S (2006) Biodegradable polymers/bamboo fiber biocomposite with bio-based coupling agent. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 37(1):80-91.

- Lee SS, Ha JK & Cheng K-J (2001) The effects of sequential inoculation of mixed rumen protozoa on the degradation of orchard grass cell walls by anaerobic fungus *Anaeromyces mucronatus* 543. *Canadian journal of microbiology* 47(8):754-760.
- Levy I, Shani Z & Shoseyov O (2002) Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1, 4- $\beta$ -glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular engineering* 19(1):17-30.
- Li X-L, Chen H & Ljungdahl LG (1997) Two cellulases, CelA and CelC, from the polycentric anaerobic fungus *Orpinomyces* strain PC-2 contain N-terminal docking domains for a cellulase-hemicellulase complex. *Applied and environmental microbiology* 63(12):4721-4728.
- Li X, Tabil LG & Panigrahi S (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.
- Liu L, Yu J, Cheng L & Yang X (2009) Biodegradability of poly (butylene succinate)(PBS) composite reinforced with jute fibre. *Polymer Degradation and Stability* 94(1):90-94.
- Liu Y & Hu H (2008) X-ray diffraction study of bamboo fibers treated with NaOH. *Fibers and Polymers* 9(6):735-739.
- Lopez JL, Cooper PA & Sain M (2005) Evaluation of proposed test methods to determine decay resistance of natural fiber plastic composites. *Forest products journal* 55(12):95.
- Lorenzo M, Moldes D, Couto SR & Sanroman A (2002) Improving laccase production by employing different lignocellulosic wastes in submerged cultures of *Trametes versicolor*. *Bioresource Technology* 82(2):109-113.
- Lynd LR, Weimer PJ, Van Zyl WH & Pretorius IS (2002) Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews* 66(3):506-577.
- Lund M & Ragauskas A (2001) Enzymatic modification of kraft lignin through oxidative coupling with water-soluble phenols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 55(6):699-703.
- Mathew AP, Oksman K & Sain M (2005) Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). *Journal of applied polymer science* 97(5):2014-2025.
- Mehrabzadeh M & Farahmand F (2001) Recycling of commingled plastics waste containing polypropylene, polyethylene, and paper. *Journal of applied polymer science* 80(13):2573-2577.

- Michel A & Billington S (2012) Characterization of poly-hydroxybutyrate films and hemp fiber reinforced composites exposed to accelerated weathering. *Polymer degradation and stability* 97(6):870-878.
- Mohanty A, Khan MA & Hinrichsen G (2000) Surface modification of jute and its influence on performance of biodegradable jute-fabric/Biopol composites. *Composites Science and Technology* 60(7):1115-1124.
- Mohanty A, Misra M & Drzal L (2002) Sustainable bio-composites from renewable resources: opportunities and challenges in the green materials world. *Journal of Polymers and the Environment* 10(1):19-26.
- Mukherjee T & Kao N (2011) PLA based biopolymer reinforced with natural fibre: a review. *Journal of Polymers and the Environment* 19(3):714.
- Mussatto SI, Fernandes M, Milagres AM & Roberto IC (2008) Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology* 43(2):124-129.
- Mwaikambo LY & Ansell MP (2002) Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization. *Journal of applied polymer science* 84(12):2222-2234.
- Nevell TP & Zeronian SH (1985) Cellulose chemistry and its applications.
- Nykter M, Kymäläinen H-R, Thomsen AB, Lilholt H, Koponen H, Sjöberg A-M & Thygesen A (2008) Effects of thermal and enzymatic treatments and harvesting time on the microbial quality and chemical composition of fibre hemp (*Cannabis sativa* L.). *Biomass and bioenergy* 32(5):392-399.
- Ochi S (2008) Mechanical properties of kenaf fibers and kenaf/PLA composites. *Mechanics of materials* 40(4):446-452.
- Ohkita T & Lee SH (2006) Thermal degradation and biodegradability of poly (lactic acid)/corn starch biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science* 100(4):3009-3017.
- Park S, Baker JO, Himmel ME, Parilla PA & Johnson DK (2010) Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for biofuels* 3(1):10.
- Park S, Venditti RA, Abrecht DG, Jameel H, Pawlak JJ & Lee JM (2007) Surface and pore structure modification of cellulose fibers through cellulase treatment. *Journal of Applied Polymer Science* 103(6):3833-3839.
- Paul SA, Joseph K, Mathew GG, Pothen LA & Thomas S (2010) Influence of polarity parameters on the mechanical properties of composites from polypropylene fiber and short banana fiber. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 41(10):1380-1387.

- Pillin I, Montrelay N, Bourmaud A & Grohens Y (2008) Effect of thermo-mechanical cycles on the physico-chemical properties of poly (lactic acid). *Polymer Degradation and Stability* 93(2):321-328.
- Porras A & Maranon A (2012) Development and characterization of a laminate composite material from polylactic acid (PLA) and woven bamboo fabric. *Composites Part B: Engineering* 43(7):2782-2788.
- Prasad BM, Sain MM & Roy D (2005) Properties of ball milled thermally treated hemp fibers in an inert atmosphere for potential composite reinforcement. *Journal of materials science* 40(16):4271-4278.
- Qiu R, Ren X & Li K (2012) Effects of sizes, shapes and orientation of bamboo fibers on properties of bamboo-unsaturated polyester composites. *ABSTRACTS OF PAPERS OF THE AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. AMER CHEMICAL SOC* 1155 16TH ST, NW, WASHINGTON, DC 20036 USA.
- Quiroz-Castaneda RE, Pérez-Mejía N, Martínez-Anaya C, Acosta-Urdapilleta L & Folch-Mallol J (2011) Evaluation of different lignocellulosic substrates for the production of cellulases and xylanases by the basidiomycete fungi *Bjerkandera adusta* and *Pycnoporus sanguineus*. *Biodegradation* 22(3):565-572.
- Rawi NFM, Jayaraman K & Bhattacharyya D (2013) A performance study on composites made from bamboo fabric and poly (lactic acid). *Journal of Reinforced Plastics and Composites* 32(20):1513-1525.
- Rawi NFM, Jayaraman K & Bhattacharyya D (2014) Bamboo fabric reinforced polypropylene and poly (lactic acid) for packaging applications: Impact, thermal, and physical properties. *Polymer Composites* 35(10):1888-1899.
- Recyc-Québec (2012) Bilan 2010-2011 de la gestion des matières résiduelles au Québec. In Gouvernement du Québec.
- Reddy N & Yang Y (2007) Preparation and characterization of long natural cellulose fibers from wheat straw. *Journal of agricultural and food chemistry* 55(21):8570-8575.
- Reddy N & Yang Y (2009) Natural cellulose fibers from soybean straw. *Bioresource technology* 100(14):3593-3598.
- Ren P, Shen T, Wang F, Wang X & Zhang Z (2009) Study on biodegradable starch/OMMT nanocomposites for packaging applications. *Journal of Polymers and the Environment* 17(3):203.
- Ren X & Li K (2013) Investigation of vegetable-oil-based coupling agents for kenaf-fiber-reinforced unsaturated polyester composites. *Journal of Applied Polymer Science* 128(2):1101-1109.
- Ren X, Qiu R, Fifield LS, Simmons KL & Li K (2012a) Effects of surface treatments on mechanical properties and water resistance of kenaf fiber-reinforced unsaturated polyester composites. *Journal of Adhesion Science and Technology* 26(18-19):2277-2289.

- Ren X, Qiu R & Li K (2012b) Modifications of kenaf fibers with N-methylol acrylamide for production of kenaf-unsaturated polyester composites. *Journal of Applied Polymer Science* 125(4):2846-2853.
- Riedel U & Nickel J (1999) Natural fibre-reinforced biopolymers as construction materials—new discoveries. *Macromolecular Materials and Engineering* 272(1):34-40.
- Rokbi M, Osmani H, Imad A & Benseddiq N (2011) Effect of chemical treatment on flexure properties of natural fiber-reinforced polyester composite. *Procedia Engineering* 10:2092-2097.
- Rowell R (2008) Natural fibres: types and properties. *Properties and performance of natural-fibre composites*, Elsevier. p 3-66.
- Saheb DN & Jog J (1999) Natural fiber polymer composites: a review. *Advances in polymer technology* 18(4):351-363.
- Sangeetha V, Deka H, Varghese T & Nayak S (2016) State of the art and future prospectives of poly (lactic acid) based blends and composites. *Polymer Composites*.
- Sgriccia N, Hawley M & Misra M (2008) Characterization of natural fiber surfaces and natural fiber composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 39(10):1632-1637.
- Simitzis J, Karagiannis K & Zoumpoulakis L (1996) Influence of biomass on the curing of novolac-composites. *European polymer journal* 32(7):857-863.
- Sin LT (2012) *Polylactic acid: PLA biopolymer technology and applications*. William Andrew,
- Singh A, Kuhad RC & Ward OP (2007) Industrial application of microbial cellulases. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects* :345-358.
- Son J, Kim HJ & Lee PW (2001) Role of paper sludge particle size and extrusion temperature on performance of paper sludge—thermoplastic polymer composites. *Journal of Applied Polymer Science* 82(11):2709-2718.
- Song J, Murphy R, Narayan R & Davies G (2009) Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences* 364(1526):2127-2139.
- Song YS, Lee JT, Ji DS, Kim MW, Lee SH & Youn JR (2012) Viscoelastic and thermal behavior of woven hemp fiber reinforced poly (lactic acid) composites. *Composites Part B: Engineering* 43(3):856-860.
- Sreekumar P, Joseph K, Unnikrishnan G & Thomas S (2007) A comparative study on mechanical properties of sisal-leaf fibre-reinforced polyester composites prepared by resin transfer and compression moulding techniques. *Composites Science and Technology* 67(3):453-461.

- Sukumaran RK, Singhania RR & Pandey A (2005) Microbial cellulases-production, applications and challenges.
- Summerscales J, Dissanayake N, Virk A & Hall W (2010) A review of bast fibres and their composites. Part 2–Composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 41(10):1336-1344.
- Sun J, Sun X, Sun R & Su Y (2004) Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers* 56(2):195-204.
- Tabka M, Herpoël-Gimbert I, Monod F, Asther M & 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(4):897-902.
- Tajvidi M & Takemura A (2010) Thermal degradation of natural fiber-reinforced polypropylene composites. *Journal of Thermoplastic Composite Materials* 23(3):281-298.
- Tang Y, Shen X, Zhang J, Guo D, Kong F & Zhang N (2015) Extraction of cellulose nanocrystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication. *Carbohydrate polymers* 125:360-366.
- Tharanathan R (2003) Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. *Trends in Food Science & Technology* 14(3):71-78.
- Tibolla H, Pelissari FM & Menegalli FC (2014) Cellulose nanofibers produced from banana peel by chemical and enzymatic treatment. *LWT-Food Science and Technology* 59(2):1311-1318.
- Ton-That M & Denault J (2007) Development of composites based on natural fibers. *National Research Council, Industrial Materials Institute, The Institute of Textile Science, Ottawa, Canada.*
- Tsujiyama S-i & Ueno H (2011) Production of cellulolytic enzymes containing cinnamic acid esterase from *Schizophyllum commune*. *The Journal of general and applied microbiology* 57(6):309-317.
- Tuncer M & Ball A (2002) Degradation of lignocellulose by extracellular enzymes produced by *Thermomonospora fusca* BD25. *Applied microbiology and biotechnology* 58(5):608-611.
- Vaaje-Kolstad G, Westereng B, Horn SJ, Liu Z, Zhai H, Sørli M & Eijsink VG (2010) An oxidative enzyme boosting the enzymatic conversion of recalcitrant polysaccharides. *Science* 330(6001):219-222.
- Wambua P, Ivens J & Verpoest I (2003) Natural fibres: can they replace glass in fibre reinforced plastics? *composites science and technology* 63(9):1259-1264.

- Wang T-Y, Chen H-L, Lu M-YJ, Chen Y-C, Sung H-M, Mao C-T, Cho H-Y, Ke H-M, Hwa T-Y & Ruan S-K (2011) Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses. *Biotechnology for biofuels* 4(1):24.
- Yang H-S, Kim H-J, Son J, Park H-J, Lee B-J & Hwang T-S (2004) Rice-husk flour filled polypropylene composites; mechanical and morphological study. *Composite Structures* 63(3):305-312.
- Yang P & Kokot S (1996) Thermal analysis of different cellulosic fabrics. *Journal of Applied Polymer Science* 60(8):1137-1146.
- Yang S-J, Kataeva I, Hamilton-Brehm SD, Engle NL, Tschaplinski TJ, Doeppke C, Davis M, Westpheling J & Adams MW (2009) Efficient degradation of lignocellulosic plant biomass, without pretreatment, by the thermophilic anaerobe “*Anaerocellum thermophilum*” DSM 6725. *Applied and environmental microbiology* 75(14):4762-4769.
- Zhang Q, Lo C-M & Ju L-K (2007) Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Bioresource Technology* 98(4):753-760.
- Zuluaga R, Putaux JL, Cruz J, Vélez J, Mondragon I & Gañán P (2009) Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate Polymers* 76(1):51-59.

## **II. Partie II: Article de recherche**

### **FEASIBILITY ASSESSMENT OF THE USE OF DIFFERENT TYPES OF ENZYMATICALLY TREATED CELLULOSIC FIBERS FOR POLYLACTIC ACID (PLA) RECYCLING**

### **ÉVALUATION DE LA FAISABILITÉ DE L'UTILISATION DE DIFFÉRENTS TYPES DE FIBRES CELLULOSIQUES TRAITÉES ENZYMATIQUEMENT POUR LE RECYCLAGE DE L'ACIDE POLYLACTIQUE (PLA)**

Fatima Ezzahra Bendourou<sup>1</sup>, Mohamed Amine Laadila <sup>1</sup>, Tarek Rouissi<sup>1</sup>,  
Gurpreet Singh Dhillon<sup>2</sup>, Satinder Kaur Brar<sup>1\*</sup>, Rosa Galvez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>INRS-ETE, 490, de la Couronne, Québec, QC G1K 9A9, Canada

<sup>2</sup> University of Alberta, Edmonton, AB T6G 2R3, Canada

<sup>3</sup> Université LAVAL, Québec, QC G1V 0A6, Canada

\* Corresponding author: Email: [satinder.brar@ete.inrs.ca](mailto:satinder.brar@ete.inrs.ca); Phone: +1 418 654 3116;  
Fax: +1 418 654 2600



## RÉSUMÉ

L'objectif de cette recherche est de produire de nouveaux matériaux composites à partir des déchets en plastique (post-consommation) des centres de tri au Québec et des fibres naturelles d'origine végétale.

En particulier, l'étude a porté sur la combinaison de l'acide polylactique recyclé (PLAr) qui est l'un des alternatives les plus prometteuses aux polymères à base de pétrole et les microfibrilles de cellulose (MFC) à partir des boues de l'industrie papetière (boues mixtes (BM) et boues de désencrage (BD)) et des fibres de chanvre (FC) considérées comme la nouvelle génération de renforts renouvelables afin de produire des composites biodégradables et de haute performance mécanique (la résistance à la traction et la rigidité).

Afin d'améliorer la compatibilité et l'adhésion interfaciale entre la matrice PLAr et les différents renforts utilisés, les MFC ont été extraites et traitées en utilisant, en premier lieu, un prétraitement physico-chimique à la soude et, en second lieu, un traitement enzymatique (laccases et cellulases). Ensuite, l'effet de la concentration des microfibrilles cellulosiques traitées (1.5, 3 et 6% en poids sec) a été étudié afin de caractériser les échantillons de biocomposites développés en termes de taille, morphologie, propriétés mécaniques (impact et traction) et biodégradabilité.

Les résultats obtenus démontrent que les deux traitements utilisés ont conduit à une diminution considérable de taille des fibres cellulosiques atteignant plus de 90% pour les MFC extraits de BD ainsi qu'une bonne adhésion interfaciale entre la matrice de l'acide poly lactique recyclé et les différents renforts étudiés. L'analyse de la variance suivie par le test de Tukey ont montré que les meilleurs biocomposites, en termes de propriétés mécaniques, sont issus de l'association du PLAr avec les fibres de chanvre (Module d'Young de  $324.53 \pm 3.10$  MPa; résistance à l'impact de  $27.61 \pm 2.94$  kJ/m<sup>2</sup>) suivis des boues mixtes (Module d'Young de  $316.59 \pm 2.80$  MPa; résistance à l'impact de  $20.47 \pm 4.24$  kJ/m<sup>2</sup>) et ensuite les boues de désencrage (Module d'Young de  $315.58 \pm 4.31$  MPa; résistance à l'impact de  $14.59 \pm 2.24$  kJ/m<sup>2</sup>) ce qui a été confirmé par diverses techniques telles que la microscopie électronique à balayage (MEB), la diffraction des rayons X (DRX) et la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF). Le test de biodégradation à l'échelle du laboratoire a montré un taux de biodégradation de 1.97% pour les FC, de 1.57% pour les BD puis de 1.35% pour les BM.

**Mots clés:** nouveau biocomposite, acide polylactique recyclé, microfibrilles cellulosiques, prétraitement physico-chimique, traitement enzymatique, tests mécaniques, tests de biodégradabilité.

## ABSTRACT

Recent legislation related to the environmental impacts of post-consumer plastic waste has attracted a lot of attention in developing sustainable recycling techniques. Therefore, the aim of this study was to produce novel biocomposite materials from plastic waste and natural fibers.

The study focused on the combination of recycled polylactic acid (rPLA) and cellulosic microfibrils (CMFs) extracted from: pulp and paper solid waste (mixed sludge (MS), deinked sludge (DS)) and hemp fiber (HF).

In order to improve the compatibility and adhesion between the rPLA matrix and the different reinforcements used, the CMFs were extracted and treated using physicochemical method followed by an enzymatic treatment (laccases and cellulases enzymes). Then, the effect of CMFs concentrations (1.5, 3 and 6% w/w) and fiber size (from 75  $\mu\text{m}$  to 1.7 mm) was investigated in order to characterize the biocomposite samples developed in terms of different characteristic properties, such as size, morphology, mechanical properties (impact and tensile) and biodegradability.

The results obtained demonstrated that the combined physicochemical and enzymatic treatments used led to a considerable size reduction of the cellulosic fibers (HF, MS and DS) reaching more than 90% for CMFs extracted from DS as well as good interfacial adhesion for all the biocomposite combinations studied. Analysis of variance followed by Tukey tests showed that the best biocomposites in terms of mechanical properties resulted from the association of rPLA with HF (Young's Modulus of  $324.53 \pm 3.10$  Mpa and impact strength of  $27.61 \pm 2.94$  kJ/m<sup>2</sup>) followed by MS and DS which was confirmed by various techniques such as scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The biodegradation test at the laboratory scale showed a biodegradation rate of 1.97% for HF, 1.57% for DS then 1.35% for MS.

### Keywords

Novel biocomposite; Recycled polylactic acid; Cellulosic microfibrils; Physicochemical pretreatment; Enzymatic treatment; Mechanical tests; Biodegradability test

### Abbreviations

ABTS, 2, 2-Azino bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid); ANOVA, Analysis of Variance; CMF, Cellulosic Microfibrils; DNS, 3,5-Dinitrosalicylic acid; DS, Deinked Sludge; Fpase, Filter Paper cellulase assay; HF, Hemp Fiber; IU/gds, International Unit/gram dry substrate; MS, Mixed Sludge; PLA, Polylactic Acid; rPLA, Recycled Polylactic Acid; SSF, Solid-state fermentation

## 1. Introduction

Recently, the biocomposites are gaining increasing interest mainly due to the strict environmental constraints and increasing consumer preferences. In order to meet the ever-increasing demands of biocomposites, the research efforts are devoted in the search of novel materials. Automotive and construction are the two potential sectors with high demand of biocomposites (Brief, 2011; Dittenber & GangaRao, 2012). The European Union mandates that vehicles should be made of 95% recycled materials by 2025 (Ahmad et al., 2015). The US Department of Energy has set a target of using plant-derived renewable materials to fulfill 10% of chemical feedstock demand by 2020 and up to 50% by 2050 (McLaren, 1999). The major impediment in the production of the biocomposites using natural fibers is to integrate hydrophilic fibers, such as hemp, cotton, flax and sisal in a polymer matrix which is generally of hydrophobic character, such as polylactic acid (PLA). PLA is a biopolymer made from renewable resources (Sangeetha *et al.*, 2016) and presents numerous advantages including: low cost production, commercial availability and potential applications, such as packaging, medical, textile, automotive, etc. (Avérous, 2008). Currently, the recycling techniques of PLA are still limited due to the lack of suitable infrastructure and the logistics required for collecting and sorting PLA from municipal solid waste (Ren, 2011). According to the United States Environmental Protection Agency (US EPA) 2014 report, about 60,000 tons of PLA waste was generated in the USA in 2014, from which only a negligible amount (less than 10%) was composted (EPA, 2015). Many studies showed that mechanical properties of recycled polylactic acid (rPLA) are not of suitable quality for industrial applications (Hamad *et al.*, 2010; Laadila *et al.*, 2017). Hence, the idea of reinforcing the rPLA matrix with cellulosic fibers to develop biocomposites with mechanical properties superior to those of rPLA can be useful approach to increase its applications. Several natural fibers, such as kenaf, jute, flax, abaca, etc. can play the role of reinforcements. The choice of hemp fibers, used exclusively in the fields of medicine, pharmacy and textile (Sair *et al.*, 2017), as reinforcing elements is due to their high cellulose content (70%) and their specific strength and rigidity which are higher than those of glass fibers (Jawaid *et al.*, 2016). Concerning the second choice, the pulp and paper solid waste is considered cellulosic material (Jang & Lee, 2000) because it's mainly composed of cellulosic fibers and inorganic materials. Due to its composition, it have the potential to replace conventional reinforcements such as talc, calcium carbonate and clay (Son *et al.*, 2001).

Interfacial phenomena and its importance in terms of adhesion and charge transfer in natural fibers may be difficult in understanding. Various treatments of natural fibers allow the modification of their surfaces. These treatments reduce water retention, create a strong bond at the fiber-polymer interface and therefore give better mechanical properties to biocomposite materials (Al-Kaabi *et al.*, 2005). The most commonly applied technique is the alkaline treatment. This treatment removes non-cellulosic compounds from the fiber, such as waxy cuticle layers, oils, lignin, hemicellulose, pectin and impurities. Thus, it gives a surface roughness and leads to a better impregnation of the matrix (Al-Kaabi *et al.*, 2005; Faulstich de Paiva & Frollini, 2006).

Recently, the use of enzymatic technology is becoming more and more promising in the modification of the structure and surface of natural fibers (Alix *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012; George *et al.*, 2014; Laadila *et al.*, 2017). A major reason for embracing this technology is the fact that the application of enzymes is environmental friendly. In addition, the action of the enzymes is targeted since they only attack the undesirable constituents without the structural modification of the important components (Bledzki *et al.*, 2010).

The main objective of this study was to produce novel biocomposite materials while evaluating the: effect of different treatments (physical, chemical and enzymatic) on the morphology and biochemical composition of three cellulosic fibers extracted from HF, MS and DS; and finally, on the characteristic properties (mechanical and biological) of rPLA-cellulosic fiber biocomposites.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

All the chemicals used in the experiments were purchased from Fisher Scientific Company (Ottawa, ON, Canada) or Sigma-Aldrich Canada Ltd (Oakville, ON, Canada) and were of high purity. The sources for cellulosic fibers used are: pulp and paper sludge (mixed and deinked sludge) from kruger Wayagamack Inc (Trois Rivieres, Quebec, Canada) and hemp fiber from l'Étoffe rustique Inc (Rimouski, Quebec, Canada). The Post-consumer recycled PLA (rPLA) was provided by Gaudreau Environment (Victoria Ville, Quebec).

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Enzymes production

##### 2.2.1.1. Substrate composition

The blueberry pomace (blueberry juice industry waste) was used as a solid-state fermentation (SSF) substrate for the production of lignocellulosic enzymes (laccases and cellulases) owing to the presence of suitable carbon/nitrogen (C/N) ratio and other vital nutrients required for the fungal growth. The proximate composition of blueberry is provided in Table 1.

**Table 1: Physicochemical characteristics of blueberry pomace.**

Parameter	Value
pH	4.5 ± 0.1
Moisture % (v/w)	75 ± 0.7
<b>Metal concentration (ppm)</b>	
Ca	1180.23 ± 45.45
Mg	594.62 ± 3.83
S	808.06 ± 2.61
Mn	107.98 ± 1.91
Na	70.85 ± 1.45
P	1032.63 ± 12.67
Zn	10.06 ± 0.35
Fe	10.16 ± 0.06

<b>K</b>	3499.33 ± 23.49
<b>Cu</b>	4.11 ± 0.12
<b>Total Carbon % (w/w)</b>	52.6 ± 0.1
<b>Total Nitrogen % (w/w)</b>	2.1 ± 0.2

± represents standard error calculated using duplicate sets.

#### 2.2.1.2. Laccase production

Laccase production was carried out by using blueberry pomace as a fermentation substrate by the fungus *Trametes versicolor* (ATCC-20869). *T. versicolor* was freshly pre-cultured in PDB (Potato Dextrose Broth) liquid culture medium and incubated at 30 ± 1 ° C, 150 rpm for 7 days in a shaking incubator. Then, the fungus was re-cultured on PDA (Potato Dextrose Agar) which was used as an inoculum and incubated at 30 ± 1 ° C for 10 days in the static incubator (Laadila et al., 2017). Forty grams of the substrate (75% w/w moisture and pH 4.5) was placed in 500 mL Erlenmeyer flask and was thoroughly mixed and autoclaved at 121 ± 1 ° C (15 psi) for 20 min. The medium was then cooled down and inoculated with one fresh PDA petri plate of *T. versicolor* and allowed to grow at 30 ± 1 ° C in the static incubator (Laadila et al., 2017). A sample was taken every 24 h and analyzed for laccase activity.

#### 2.2.1.3. Cellulase production

Cellulase production was carried out using blueberry pomace as a substrate by the fungus *Aspergillus niger* (ATCC-6275). *A. Niger* was freshly pre-cultured in PDB and used as an inoculum. The incubation was done at 30 ± 1 ° C and 150 rpm for 6 days in a rotary incubator. From the liquid solution, the fungus was grown on the PDA contained in the petri dishes at 30 ± 1 ° C for 5 days in a static incubator for growth of the culture. Then, the spores produced are recovered from petri dishes, using 0.1% (v/v) Tween-80 as an inducer. Finally, the spores were counted with a hemocytometer so that they can be used for inoculation (Dhillon *et al.*, 2011).

Forty grams of the substrate was placed in 500 mL Erlenmeyer flask and adjusted its moisture to 75% (w/w) with sterilized water and its pH at 6.5 then was thoroughly mixed and autoclaved at 121 ± 1 ° C (15 psi) for 20 min. The fermentation medium was then cooled down and inoculated with the spore solution (1 × 10<sup>7</sup> spores/g dry substrate) of *A. Niger* recovered from PDA petri dishes and allowed to grow at 30 ± 1 ° C in the static

incubator (Dhillon *et al.*, 2011). A sample was taken every 24 h to study and analyzed the production of cellulase.

## **2.2.2. Enzymes extraction**

### *2.2.2.1. Laccase extraction*

The laccase extraction was carried out in 50 mM sodium phosphate buffer solution (10/1: v/w) at pH 6.5. One gram of fermentation medium was mixed with 20 mL of the buffer solution. The mixture was placed in a shaking incubator at 150 rpm for 1 h at  $30 \pm 1$  ° C. Then the medium was centrifuged at  $7000 \times g$  for 20 min at  $4 \pm 1$  ° C (Laadila *et al.*, 2017). The collected supernatant was analyzed by spectrophotometric method for the enzymatic activity.

### *2.2.2.2. Cellulase extraction*

The cellulase extraction was performed by mixing one gram of fermented substrate with distilled water at solid/liquid ratio 1:20. The mixture was placed in a rotary shaker for 30-45 min at 150 rpm at room temperature (Bansal *et al.*, 2011). The contents of the flasks were then centrifuged at  $10000 \times g$  for 10 min at  $4 \pm 1$  ° C (Bansal *et al.*, 2012). The collected supernatant was analyzed for cellulase activity.

## **2.2.3. Enzymes assay**

### *2.2.3.1. Laccase assay*

The laccase activity was assayed using spectrophotometer according to the method described by Laadila *et al.* (2017). In a cuvette, 0.5 mL of 2,2'-azinobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) at 0.5 mM was mixed with 2.58 mL of the phosphate citrate buffer solution at 0.1 M and pH 4. Then, 0.02 mL of the enzyme solution was added to the mixture and incubated for 10 min at  $45 \pm 1$  ° C. The oxidation of the ABTS was determined at a wavelength of 420 nm (Collins & Dobson, 1997). One unit of laccase activity was defined as the amount of enzyme required to oxidize one  $\mu\text{mol}$  of ABTS per minute. The equation of laccase activity in unit per gram is as follows:

$$EA = \frac{S * \text{cuvette volume}}{\epsilon * \text{wavelength} * \text{enzyme volume}} * \text{buffer volume per 1g of substrate} \quad (1)$$

Where **S** is the slope of a pure laccase standard curve and  $\epsilon$  is the extinction coefficient ( $\epsilon_{420} = 36\text{mm} / \text{cm}$ ).

### 2.2.3.2. Filter paper cellulase assay (FPase)

The cellulase activity was determined using the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) recommended filter paper test and was expressed in filter paper unit (FPU) (Adney & Baker, 1996). In a test tube with a working volume of 25 mL, 1 mL of the 0.05 M sodium citrate buffer solution at pH 4.8 was added to 0.5 mL of the crude fermented liquor containing cellulase enzyme diluted. Two dilutions were made for each enzymatic sample studied.

Subsequently, a Whatman filter paper strip (No. 1, 0.25 mm pore size, 1.5 cm diameter) was added to the tube and mixed properly. The mixture was incubated in water bath at  $50 \pm 1$  ° C for 1h. In the test tube, 3 mL of 1 % 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) was added for stopping the reaction and was mixed by vortex. The final mixture was incubated in water bath at  $100 \pm 1$  ° C for 5 min, then the mixture is poured into a cuvette and the activity was measured by spectrophotometer at a wavelength of 540 nm (Zhang et al., 2007). The dilutions used in enzymatic concentrations are translated by the following equation:

$$\text{Concentration} = \frac{1}{\text{dilution}} \quad \left( = \frac{\text{Volume of enzyme in dilution}}{\text{Total volume of dilution}} \right) \quad (2)$$

The calculation of the FPU is done as follows:

$$FPU = \frac{0,37}{\text{Enzyme concentration releasing 2 mg glucose}} \quad \text{units/ml} \quad (3)$$

### 2.2.4. Cellulose extraction from pulp and paper sludge and hemp fibers

#### 2.2.4.1. *Mechanical and chemical pre-treatment*

The chemical pretreatment was performed on different cellulosic fibers i.e. (HF, MS and DS). All the three samples of cellulosic fibers were washed with distilled water to remove contaminants and sticky dirt. Then, they were dried in an oven for 24 h at  $60\pm 1$  ° C. After drying, the samples were grinded by lab grinder and treated with 10% (v/v) sodium hydroxide (NaOH) at solid/liquid ratio 1:8 for 24h. Then, the fibers were washed several times with distilled water to remove NaOH. The traces of NaOH were neutralized with a sulfuric acid (2% (v/v)) solution till the neutral pH was reached. Subsequently, the fibers were dried at  $60\pm 1$  ° C for 24 h. This operation was followed by grinding again. The grinding principle consists in crushing the fibers without destroying the fibrils (Rokbi *et al.*, 2011). The resulting fibers were then sieved to obtain deagglomerate aspect and to reduce the fiber size. The obtained length of the fibers was ranged from 75  $\mu$ m to 1.7 mm and to have the exact size of each class of fibers, they were analyzed by the particle size distribution analyzer.

#### 2.2.4.2. *Enzymatic treatment*

About 4 g of the 3 pretreated fibers (HF, MS and DS) were immersed in an enzyme solution at a concentration of 35 IU/g dry substrate (gds) (20 IU/gds of laccase + 15 IU/gds of cellulase) in 200 mL working volume. The enzymatic treatment was carried out at  $30\pm 1$  ° C at 100 rpm for 7 days. The samples were taken every 24 h to analyze the particle size evolution of the fibers (Tabka *et al.*, 2006).

### **2.2.5. Modified cellulosic fibers analysis**

#### 2.2.5.1. *Particle size distribution analyzer*

The particle size distribution was carried out using the laser diffraction analyzer (Horiba LA-950, output 5 mW, Wavelength 650 nm). The particle size of HF, MS and DS fibers was measured before and after the alkali and the enzymatic treatments. The mean diameter ( $D_{50}$ ) was used to determine the average particle size. Analysis was carried out in triplicates for each sample.

#### 2.2.5.2. *Scanning electron microscopy (SEM)*

SEM (Carl Zeiss EVO 50) was used to characterize the morphology and the approximate size of the fibers before and after enzymatic treatment. The samples were prepared by mounting HF, MS and DS fibers on SEM grid using SPI module sputter coated with gold. These fibers were analyzed by different detectors that reconstruct a three-dimensional image of the surface. The images were obtained under an accelerating voltage of 12 KV.

#### 2.2.5.3. *Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR)*

FTIR was used to analyze the changes in the cellulose functional groups of HF, MS and DS fibers at different stages of alkali treatment and enzymatic treatment, respectively. The FTIR spectra was collected over a wavelength range of 4000 to 500  $\text{cm}^{-1}$  using the spectrometer (NICOLET IS50 FT-IR). The spectral data was recorded in the absorbance mode as a function of the wave number.

#### 2.2.5.4. *X-ray diffraction (XRD)*

XRD was used to analyze the crystalline structure of pulp and paper sludge (MS and DS) and HF before and after the enzymatic treatment. The analysis was performed using Siemens model D5000 with a lamp and anode at a wavelength ( $\lambda=0.154059$  nm), the applied power was of the order of 40kV 30mA - Kristalloflex Generator 710-H. In brief, 1g of the sample in the form of a fine powder ( $\leq 100$   $\mu\text{m}$ ) was put in the plastic support for analyzes.

### **2.2.6. Biocomposites preparation and mechanical characterization**

#### 2.2.6.1. *Experimental plan*

The experimental plan used is shown in Table 2. For the mechanical tests, 27 biocomposites were developed using different percentages (1.5, 3 and 6%) of enzymatically treated cellulosic fibers (HF, MS and DS) and rPLA matrix. Furthermore, the virgin biopolymer formulated only with rPLA was used as control. It's important to note that the fabricated biocomposites belonging to the 1.7 $\mu\text{m}$  class of DS (DS 1.5% 1.7 $\mu\text{m}$ ; DS 3% 1.7 $\mu\text{m}$  and DS 6% 1.7 $\mu\text{m}$ ), their mechanical tests results will not be represented in the

Results and Discussion section because of the comparison to their >1.7 mm class results. Idem for the biocomposites belonging to the 850 µm class of HF (HF 1.5% 850µm; HF 3% 850µm and HF 6% 850µm) which their results are comparatively close to those of the 1.7mm class and will not be represented in the Results and Discussion section too. The biocomposite code will be the code used throughout the report.

**Table 2: The experimental plan used for the biocomposites formulation.**

	<b>Class</b>	<b>Fiber size after E.T* (µm)</b>	<b>Fiber used (%)</b>	<b>rPLA used (%)</b>	<b>Code sample</b>
<b>Hemp fiber</b>	1.7 mm 850 µm 75 µm	740.07 ± 54.62 662.24 ± 33.41 152.70 ± 7.74	1.5	98.5	HF 1.5% 1.7µm HF 1.5% 850µm HF 1.5% 75µm
	1.7 mm 850 µm 75 µm	740.07 ± 54.62 662.24 ± 33.41 152.70 ± 7.74	3	97	HF 3% 1.7µm HF 3% 850µm HF 3% 75µm
	1.7 mm 850 µm 75 µm	740.07 ± 54.62 662.24 ± 33.41 152.70 ± 7.74	6	94	HF 6% 1.7µm HF 6% 850µm HF 6% 75µm
<b>Mixed sludge</b>	>1.7 mm 850 µm 75 µm	1119.44 ± 29.04 435.16 ± 9.02 168.07 ± 0.29	1.5	98.5	MS 1.5% >1.7µm MS 1.5% 850µm MS 1.5% 75µm
	>1.7 mm 850 µm 75 µm	1119.44 ± 29.04 435.16 ± 9.02 168.07 ± 0.29	3	97	MS 3% >1.7µm MS 3% 850µm MS 3% 75µm
	>1.7 mm 850 µm 75 µm	1119.44 ± 29.04 435.16 ± 9.02 168.07 ± 0.29	6	94	MS 6% >1.7µm MS 6% 850µm MS 6% 75µm
<b>Deinked sludge</b>	>1.7 mm 1.7 mm 75 µm	169.17 ± 12.62 161.71 ± 5.81 87.83 ± 1.05	1.5	98.5	DS 1.5% >1.7µm DS 1.5% 1.7µm DS 1.5% 75µm
	>1.7 mm 1.7 mm 75 µm	169.17 ± 12.62 161.71 ± 5.81 87.83 ± 1.05	3	97	DS 3% >1.7µm DS 3% 1.7µm DS 3% 75µm
	>1.7 mm 1.7 mm 75 µm	169.17 ± 12.62 161.71 ± 5.81 87.83 ± 1.05	6	94	DS 6% >1.7µm DS 6% 1.7µm DS 6% 75µm
<b>recycled PLA</b>			<b>0</b>	<b>100</b>	rPLA 100%

\*E.T= Enzymatic treatment

### 2.2.6.2. *Biocomposites preparation*

The biocomposite plates were prepared by blending dry rPLA matrix with enzymatically treated cellulosic fibers at different mass ratios (1.5%, 3% and 6% w/w). These plates were then cut to produce the required samples shape for each mechanical test (tensile and impact). Before being molded into plates, the rPLA matrix and the cellulosic fibers were dried for 24 h at  $90\pm 1$  °C. The Carver Autoseris 3893 model compression press was operated at  $160\pm 1$  °C using a constant force of 2.27 metric tons (5000 pounds) for an aluminum mold of dimensions 80 mm x 100 mm x 3 mm. The pressure was maintained for 20 min, then the mold was cooled to  $50\pm 1$  °C by circulating cold water through the cooling circuit. The number of samples required for each mechanical test, as well as the ASTM standard used for comparisons, are presented in Table 3. The standard is respected in the majority of the biocomposites, except for the impact test where there was a lack of samples.

**Table 3: Standards and number of samples required.**

Test	Number of tests required	Number of tests done	ASTM standard
Tensile	5	5	D683
Impact	10	5	D256

### 2.2.6.3. *Mechanical tests*

The mechanical tensile tests were performed on the Instron 5565 instrument. In total, five dog bone biocomposite specimens used according to ASTM D638 Type V. The movement speed used is 1 mm / min in order to have enough points for the most fragile biocomposites with a concentration of 1.5% of fibers. The mechanical impact test was performed using ASTM standards for a notched Charpy impact test. The device used to make the notch is Dynisco brand and ASN 120-m model. The cuts made are standardized according to ASTM D256 standard, ie a depth of 2.54 mm with an angle of 22.5 degrees. Subsequently, the impact tests were carried out using a Tinius Olsen Impact 104 model. In total about 5 rectangular samples of dimensions 12.7 mm by 125 mm length of biocomposite for each

class of cellulosic fiber (HF, MS and DS) were fractured at room temperature. The samples, used for the determination of the impact resistance, were first cut in order to facilitate the breakage. The pendulum used is that of 23.08 Newtons (2.354 kg) with a capacity of 15 Joules. The results of the impact resistance are the means as well as the standard deviations of each biocomposite repetition.

#### 2.2.6.4. *Statistical analysis of mechanical tests*

In the ANOVA study (Lowry, 2014), a significant F-ratio only indicates that the overall difference between the sample means is significantly different from zero. This type of test does not allow to conclude that any sample is different from another. For some types of analysis, this kind of test may be sufficient. There are, however, many situations where it is desirable to determine precisely whether an "X" value differs substantially from "Y" or "Z". This type of comparison can only be done with a single Tukey test because it involves more than three comparisons. In our case, all the calculations were done by Statistica software version 13.2. The values used for the comparison in this work are a detection threshold of 1%, a number of freedom degrees of 5 and a number of samples of 27 (there are 27 types of biocomposites to be compared with rPLA).

#### 2.2.6.5. *Soil burial biodegradation test*

The biodegradation experiment was performed according to the soil burial method (Yussuf *et al.*, 2010). Based on their satisfying mechanical properties, four formulated biocomposites samples (HF 6% 75 $\mu$ m, MS 6% 75 $\mu$ m, DS 6% 75 $\mu$ m and the control rPLA 100%) were tested and the average and the standard deviation of five replicates were reported.

The samples were buried in a large outdoor planter containing 10 cm of compost soil sandwiched between 10 cm layers of mature soil made from food and garden plants. The biocomposite samples with the dimension of 2 cm x 2 cm were buried in the middle part of the compost soil. The outdoor planter was left in the open air for the photosynthesis process and to prevent the water loss by evaporation, the soil was watered with a known amount of water every two days when it was hot and every four days when it became cold. The samples were withdrawn from the soil to assess their biodegradation rate monthly for total 6 months period (July to December). After being removed from the soil, the samples

were washed with sterilized water to remove soil residues, then dried in an oven at  $60\pm 1$  °C until the weight became constant. The rate of biodegradation of the samples was assessed each month by measuring their weight loss according to the following equation:

$$\% \text{weight loss} = \left( \frac{x_0 - x_t}{x_0} \right) \times 100 \quad (4)$$

Where  $x_0$ =biocomposite weight at  $t=0$  months and  $x_t$ =biocomposite weight at  $t=t$  months.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Enzyme production

The agro-food processing industries generate huge amounts of wastes which currently finds limited applications. As reported by The Food and Agriculture Organization of the United Nations, the blueberry production reached 269,257 tons in USA and 178,745 tons in Canada in 2016 (FAOSTAT, 2016). The blueberry pomace is the waste obtained as a primary by-product of juice processing. This waste is recognized as a potential value raw material for achieving higher enzyme production by SSF (Karmakar & Ray, 2010), especially, due to its high carbon content with a percentage of 52.6 %. Furthermore, the use of low cost substrate and economical technology can help to reduce the overall cost of enzyme production compared to the prices of commercial enzymes. The main purpose of the physicochemical pretreatment has been used as fiber preparation processes to enhance the effect of the enzymatic treatment by obtaining better enzyme accessibility. The purpose of this treatment is the modification of cellulosic structure using cellulase by increasing the crystallinity of the treated fibers and the surface activation using laccase by improving the interfacial adhesion between the matrix and treated fibers. The production of enzymes was carried out by the fungi *Trametes versicolor* and *Aspergillus niger* known for their high production capacity of laccases and cellulases respectively. The maximum laccase production obtained was  $37.02 \pm 2.17$  IU / gds after 8 days of fermentation (Fig. 28). Similarly, cellulases production reached its maximum after 5 days of fermentation with an enzymatic activity of  $11.5 \pm 0.11$  IU / gds (Fig. 29).

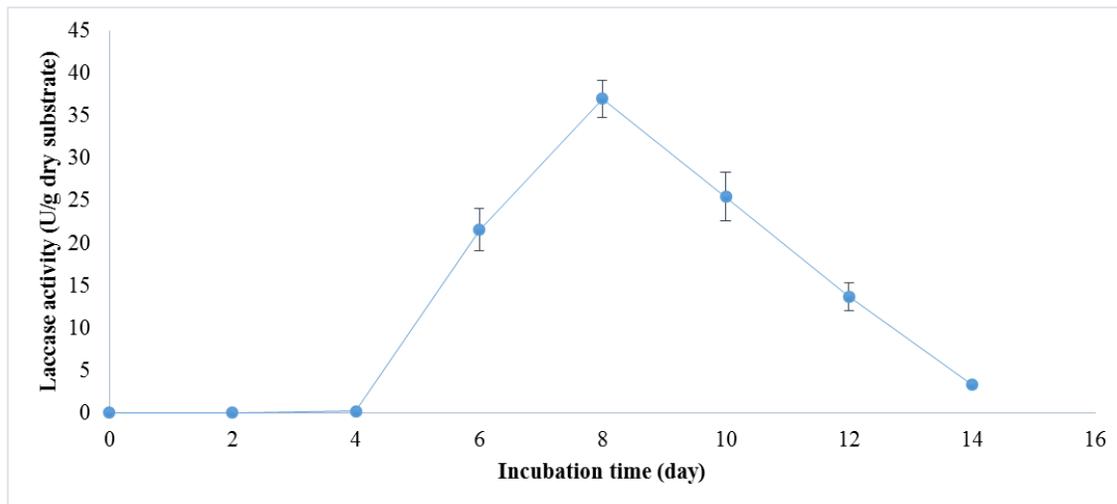
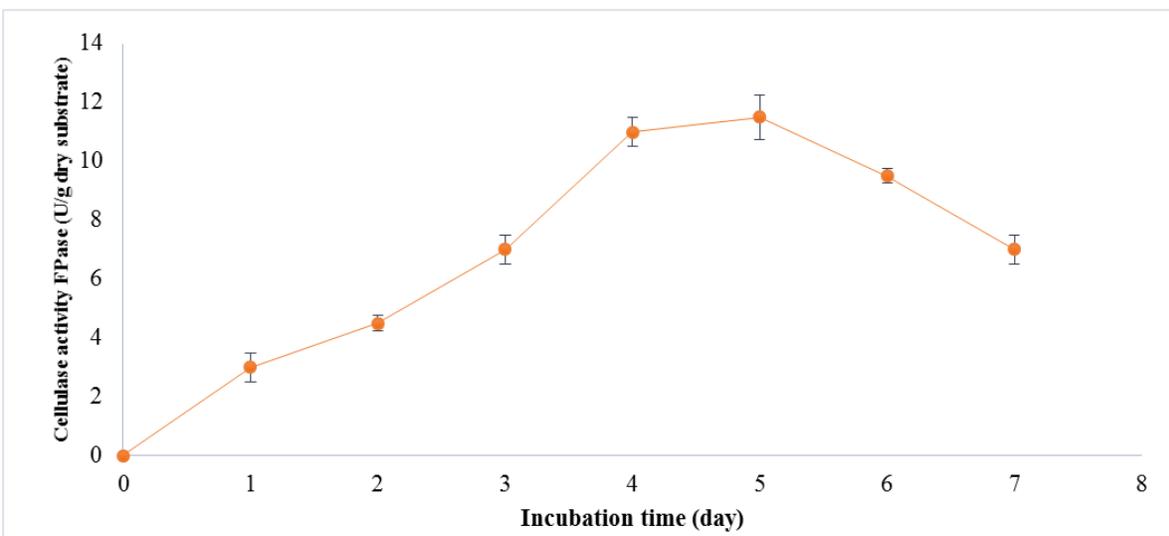


Figure 28: Time course of laccase production by the solid-state fermentation of *Trametes versicolor*.



**Figure 29: Time course of cellulase FPase production by the solid-state culture of *Aspergillus niger*.**

The enzyme production (laccase and cellulases) in this study was compared to the fermentation results cited in many reports on enzyme production using various agro-industrial wastes, such as sugarcane bagasse, wheat bran, rice straw, rice husk, kinnow waste, apple pomace, etc. (Table 4). These wastes were chosen because of their ubiquity, high biodegradability, nutrient richness and negative cost. Wheat bran, however, holds the key and has been most frequently used in the production of various lignocellulosic enzymes (Fadel, 2000; Verma & Madamwar, 2002; Papinutti *et al.*, 2003). However, the low enzymatic activities by some fungi (*Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus niger* and *Trichoderma reesei*) may be due to the suboptimal availability of some nutrients in the substrates or even their absence (Sukumaran *et al.*, 2009; Waghmare *et al.*, 2014). In these cases, it will become necessary to supplement them with an external source. The addition of certain stimulating substances (inducers), namely sucrose, basal mineral salt solution, mineral salt medium, copper sulfate, etc. increases the production of these enzymes (Fadel, 2000; Patel *et al.*, 2009; Sukumaran *et al.*, 2009). The results in Table 4 clearly show the positive effect of different inducers on laccase and cellulases productions, respectively.

The laccase activity of 14,189 IU/gds by *Pleurotus ostreatus* strains grown on wheat straw supplemented with copper sulfate was achieved after 8 days of incubation period by Patel *et al.* (2009). Dhillon *et al.* (2012) evaluated the potential of apple pomace supplemented

with rice husk for production of cellulases enzymes. They achieved max activity around 133.68 IU/gds after 48 h incubation time by *A. niger*. In other study, using *Pleurotus ostreatus* and *Phanerochaete chrysosporium* in mixed culture fermentation, the laccase activity of 772 IU/gds after 20 days fermentation period was achieved by Verma and Madamwar (2002) and using *Trichoderma reesei* and *A. niger* in mixed culture fermentation, the cellulose activity of 28.0 IU/gds after 48 h fermentation period was achieved by Oberoi *et al.* (2010).

It is important to note that the optimization of lignocellulosic enzyme production depends on several parameters. PH, temperature and agitation are important factors that regulate the production of enzymes. The presence of carbon, nitrogen, organic acid and dissolved oxygen in the media are critical factors too. In addition, the production of lignocellulosic enzymes is influenced by the duration of production which is a very important parameter in the enzymatic recovery process.

**Table 4: Activities comparison of laccase and cellulases produced by various fungi under SSF.**

Microorganisms	Substrate	Enzyme activity/incubation time	References
<b>Laccases</b>			
<i>Trametes versicolor</i>	Sugarcane bagasse + nitrogen source	5 U/mL – 5 days	(Pal <i>et al.</i> , 1995)
Mixed culture of <i>Pleurotus ostreatus</i> and <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Wheat bran + neem hull	772 IU/gds – 20 days	(Verma & Madamwar, 2002)
<i>Fomes sclerodermeus</i>	Wheat bran	270 IU/gds – 28 days	(Papinutti <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces psammoticus</i>	Rice straw + copper sulfate	55.4 IU/gds – 48 h	(Niladevi <i>et al.</i> , 2007)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Wheat straw + copper sulfate	14,189 IU/gds – 8 days	(Patel <i>et al.</i> , 2009)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	Sorghum husks	0.128 U/mL – 8 days	(Waghmare <i>et al.</i> , 2014)
<i>Trametes versicolor</i>	Apple pomace + copper sulfate	49.16 IU/gds – 7 days	(Lonappan <i>et al.</i> , 2017)
<i>Trametes versicolor</i>	Blueberry pomace	37.02 IU/gds – 8 days	Present study
<b>Cellulases</b>			
<i>Aspergillus niger</i>	Radicle waste + wheat bran + sucrose	FPase – 59.2 IU/gds – 72 h	(Fadel, 2000)
<i>Aspergillus niger</i>	Rice straw + basal medium	FPase – 19.5 IU/gds – 4 days	(Kang <i>et al.</i> , 2004)

<i>Trichoderma reesei</i>	Sugarcane bagasse + basal mineral salt solution	FPase – 25.6 IU/gds – 67 h	(Mekala <i>et al.</i> , 2008)
<i>Trichoderma reesei</i>	Wheat bran + mineral salt medium	FPase – 22.8 IU/gds – 96 h	(Sukumaran <i>et al.</i> , 2009)
<i>Aspergillus niger</i>	Wheat bran + mineral salt medium	FPase – 4.55 IU/gds – 96 h	(Sukumaran <i>et al.</i> , 2009)
Mixed culture of <i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i>	Kinnow waste + wheat bran	FPase – 28.0 IU/gds – 48 h	(Oberoi <i>et al.</i> , 2010)
Mixed culture of <i>T. reesei</i> and <i>A. niger</i>	Rice straw + wheat bran	FPase – 35.8 IU/gds – 96 h	(Dhillon <i>et al.</i> , 2011)
<i>Aspergillus niger</i>	Apple pomace + rice husk	FPase – 133.68 IU/gds – 48 h	(Dhillon <i>et al.</i> , 2012)
<i>Aspergillus niger</i>	Bluberry pomace	FPase – 11.5 IU/gds – 5 days	Present study

### 3.2. The alkali pretreatment of the cellulosic fibers

The size distribution of the 3 classes of HF (1.7 mm, 850  $\mu$ m, 75  $\mu$ m), MS (>1.7 mm, 850  $\mu$ m, 75  $\mu$ m) and DS (>1.7mm, 1.7mm, 75  $\mu$ m) after the alkali pretreatment was carried out using the particle size distribution analyzer. The obtained results of the average diameter ( $D_{50}$ ) of the fibers were gathered in Table 5. After the alkaline pretreatment, the size reduction after 24 h of incubation for HF was 6.40, 3.40 and 26.36%; for MS fibers was 5.83, 22.58 and 33.44% and finally for DS fibers was 6.13, 39.77 and 59.22%, respectively for the first, second and third class.

The alkali treatment process effects the natural fibers and brings a clear performance towards the quality of the fiber-matrix adhesion. This treatment increases the fiber / polymer contact area. Some authors advocate that this improvement is due to the elimination of non-cellulosic compounds (waxy cuticle layers, oils and impurities) from the surface. Thus, it leads to an improvement in the interfacial bond between the fiber and the matrix (Sreekala *et al.*, 2000; Alvarez & Vazquez, 2006; Faulstich de Paiva & Frollini, 2006). Alkaline treatment is often used to remove residual lignin, hemicellulose, and impurities. It also promotes the fibrillation of the fibers and the ionization of the hydroxyl group of the alcoholate (Al-Kaabi *et al.*, 2005). Rokbi *et al.* (2011) reported that the use of the alkaline solution at 10% v/v concentration and an immersion time of 24 h leads to further reduction of the cementing components and weakening of the consolidation between the fibrils; therefore, the separation of individual fibers becomes easier. Hence, the results obtained showed an acceptable size reduction for all the fibers which means a

partial elimination of a certain quantity of the cementing components at the outer surface of the fibers, thus, the use of the enzymatic treatment.

**Table 5: Particle size analysis of cellulosic fibers after physicochemical pretreatment.**

Cellulose sources	Class	Initial fiber size ( $\mu\text{m}$ )	Fiber size after 10%NaOH ( $\mu\text{m}$ )
<b>Hemp fiber</b>	1.7 mm	1728.15 $\pm$ 89.65	1617.50 $\pm$ 101.19
	850 $\mu\text{m}$	1633.71 $\pm$ 125.58	1578.08 $\pm$ 98.24
	75 $\mu\text{m}$	845.64 $\pm$ 97.22	622.71 $\pm$ 47.43
<b>Mixed sludge</b>	>1.7 mm	2578.90 $\pm$ 93.77	2428.56 $\pm$ 126.50
	850 $\mu\text{m}$	1167.45 $\pm$ 114.89	903.81 $\pm$ 80.91
	75 $\mu\text{m}$	495.34 $\pm$ 54.90	329.70 $\pm$ 26.42
<b>Deinked sludge</b>	>1.7 mm	1816.32 $\pm$ 76.19	1704.93 $\pm$ 40.88
	1.7 mm	730.05 $\pm$ 84.89	439.69 $\pm$ 27.71
	75 $\mu\text{m}$	295.93 $\pm$ 50.34	120.69 $\pm$ 20.09

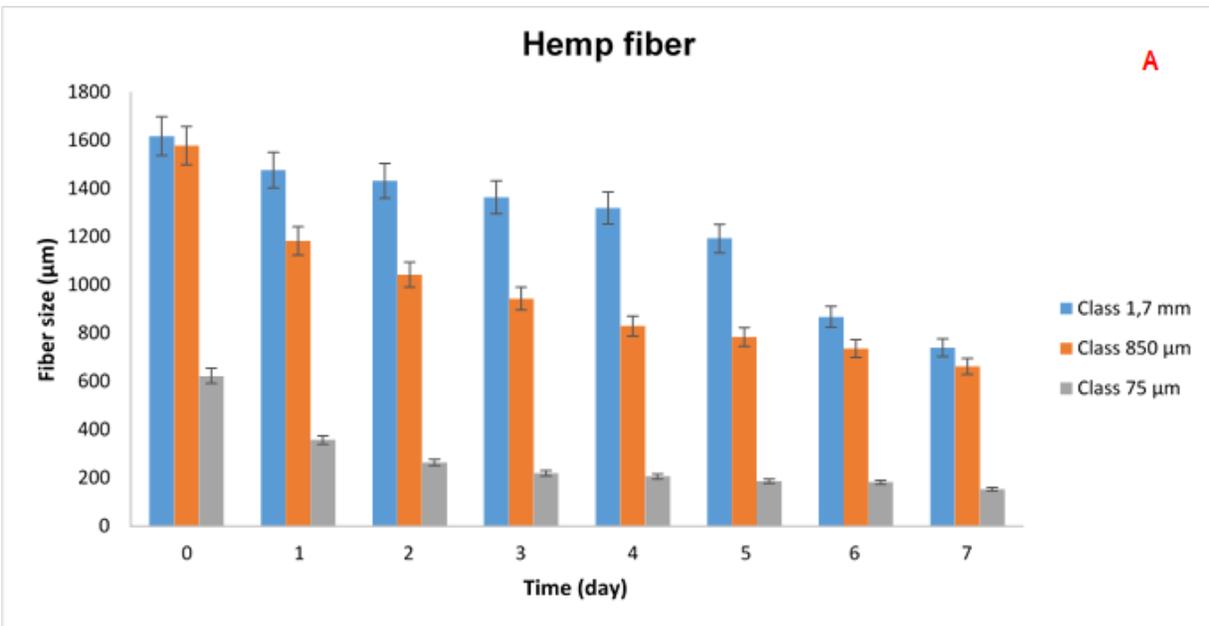
### 3.3. Effect of enzymatic treatment on cellulosic fibers

The enzymatic treatment was performed using in-house produced laccase and cellulase through SSF of blueberry pomace. The enzymatic modification was applied to the 3 classes of each cellulose source (HF, MS and DS) after mechanical and chemical pretreatments. The main aim of this treatment was to reduce the size of cellulosic fibers by cellulase and the activation of their surface by laccase (Henriksson *et al.*, 2005; Faruk *et al.*, 2012). To evaluate the effects of enzymatic treatment and its potential on the interfacial adhesion between cellulosic fibers and rPLA matrix, the XRD, SEM and FTIR techniques were used.

#### 3.3.1. Particle size analysis

The results of the particle size analysis of the 3 classes of HF (1.7 mm, 850  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ ), MS (>1.7 mm, 850  $\mu\text{m}$ , 75  $\mu\text{m}$ ) and DS (>1.7mm, 1.7mm, 75  $\mu\text{m}$ ) after the enzymatic treatment (laccase and cellulase) are presented in Fig. 30. For the hemp fiber (Fig. 30A), the size was reduced after 7 days of incubation by 54.24% for the first class (from 1617.50  $\pm$  101.19  $\mu\text{m}$  to 740.07  $\pm$  54.62  $\mu\text{m}$ ), by 58.03% for the second class (from 1578.08  $\pm$  98.24  $\mu\text{m}$  to 662.24  $\pm$  33.41  $\mu\text{m}$ ) and by 75.48% for the third class (from 622.71  $\pm$  47.43  $\mu\text{m}$  to 152.70  $\pm$  70.74  $\mu\text{m}$ ). The size evolution of MS fibers during the enzymatic treatment (Fig.

30B) followed the same trend as the HF: a size reduction of 53.9% for the first class (from  $2428.56 \pm 126.50 \mu\text{m}$  to  $1119.44 \pm 2904 \mu\text{m}$ ), 51.85% for the second class (from  $903.81 \pm 80.91 \mu\text{m}$  to  $435.16 \pm 90.02 \mu\text{m}$ ) and 49.02% for the third class (from  $329.70 \pm 26.42 \mu\text{m}$  to  $168.07 \pm 10.29 \mu\text{m}$ ). Lastly, Fig. 30C shows that the size of DS fibers during the enzymatic treatment was reduced by 90.08% for the first class (from  $1704.93 \pm 40.88 \mu\text{m}$  to  $169.17 \pm 12.62 \mu\text{m}$ ), by 63.22% for the second class (from  $439.69 \pm 27.71 \mu\text{m}$  to  $161.71 \pm 50.81 \mu\text{m}$ ) and by 27.23% for the third class (from  $120.69 \pm 20.09 \mu\text{m}$  to  $87.83 \pm 10.05 \mu\text{m}$ ). This decrease in the dimensions of the fibers can be attributed to the partial degradation of the extractable organic matters (such as waxes) as well as some of the cementing components (lignin and hemicellulose) after the alkali and enzymatic treatments (Li *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2010). These procedures change the structure of the fibers and make it possible to obtain more separated and more exposed cellulosic fibrils. As a result, the fibers become shorter and thinner after the treatments (Chowdhury *et al.*, 2013). Since there is not a big variation between the first and the second class of the HF and DS after the enzymatic treatment, we will not consider and use their second class in the biocomposite preparation.



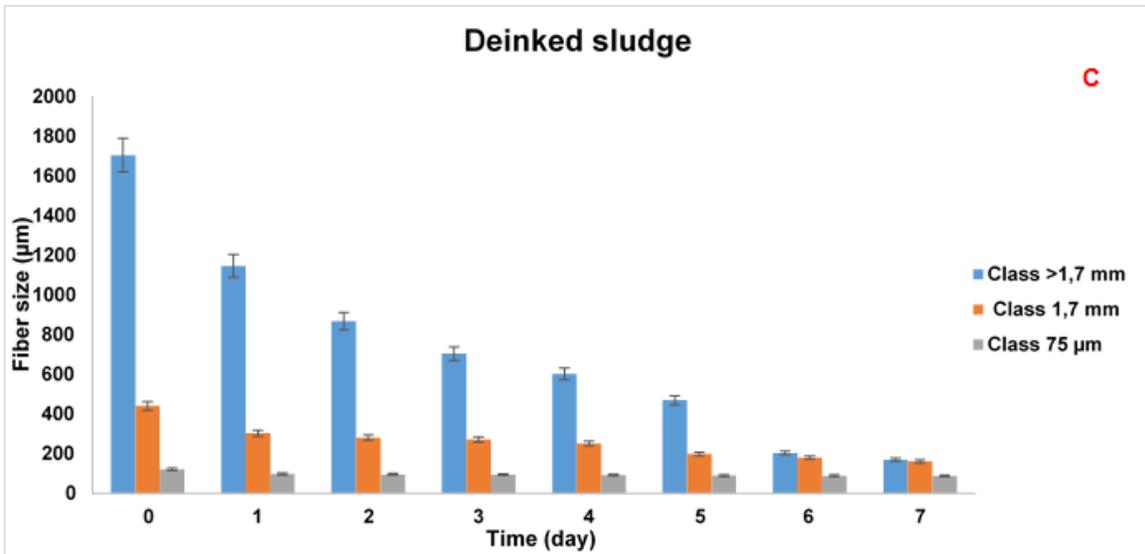
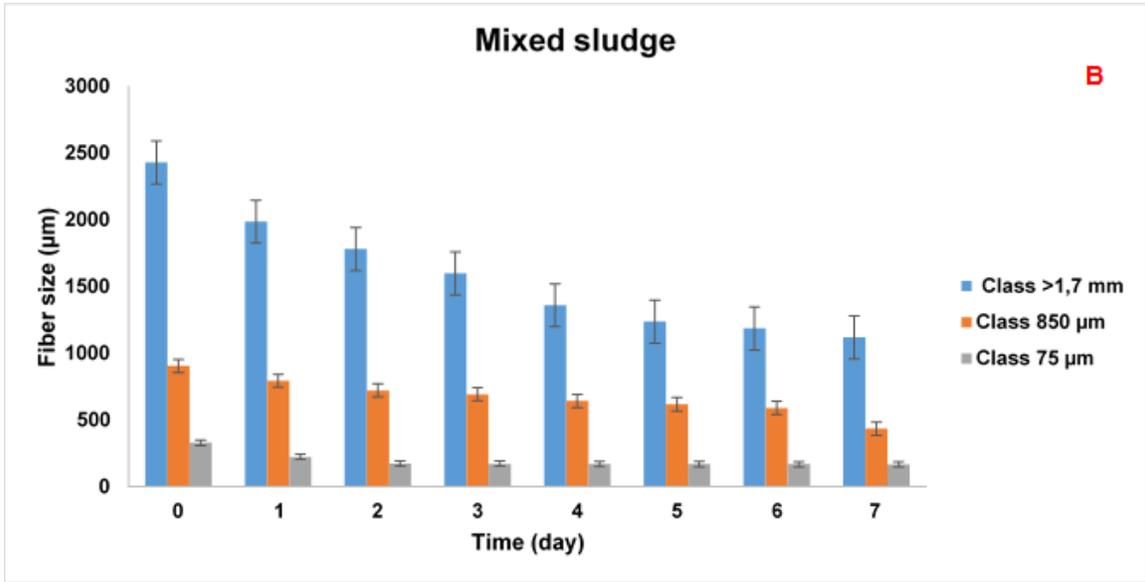
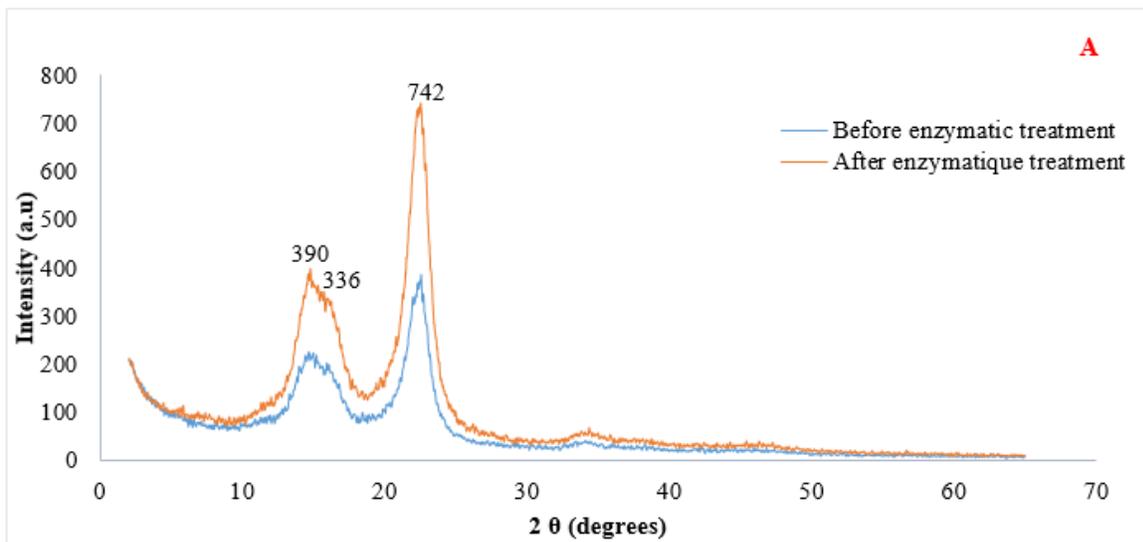


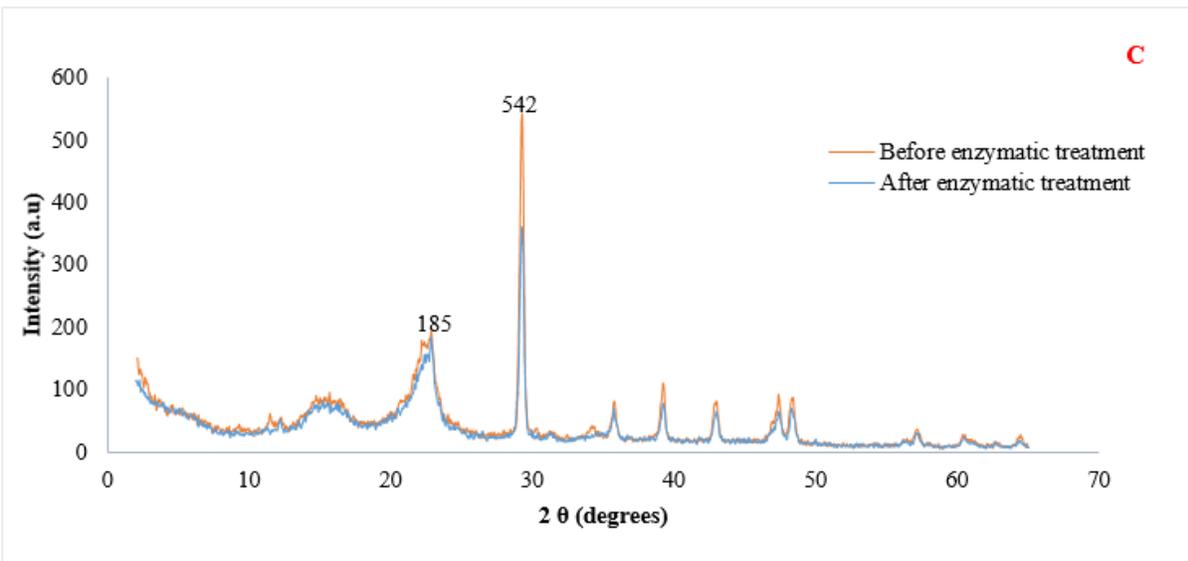
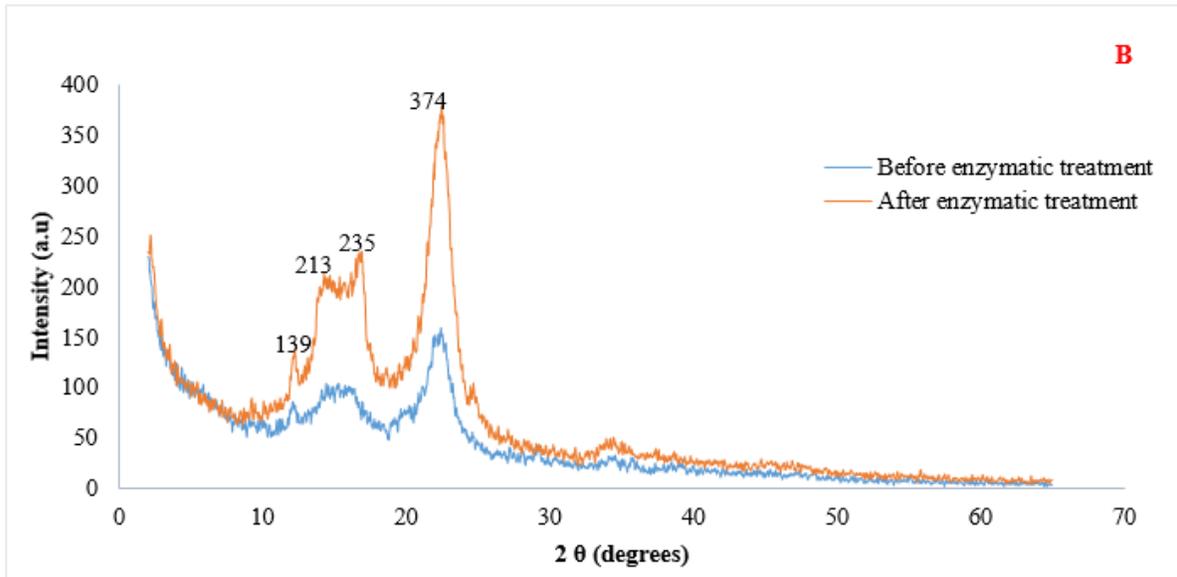
Figure 30: Size analysis of cellulosic fibers in hemp fiber (A), mixed sludge (B) and deinked sludge (C) during the enzymatic treatment.

### 3.3.2. XRD analysis

The structural changes in the three cellulosic fiber sources (HF, MS and DS) were analyzed by X-ray diffraction to track changes in the crystallinity of the cellulosic fibers before and after enzymatic treatment (Fig. 31A, 31B and 31C). Fig. 31A depicts remarkable changes in hemp fibers peaks. The main peaks appeared at 14.8, 16.4 and

22.52 which correspond respectively to diffraction planes of (390), (336) and (742). In Fig. 31B, the structural changes in mixed sludge peaks were apparent. The main peaks appeared at 12.22, 14.28, 16.9 and 22.44 which corresponds respectively to diffraction planes of (139), (213), (235) and (374). However, the crystallinity of the DS fibers (Fig. 31C) after enzymatic treatment was slightly lower than the control (before enzymatic treatment). These results show that crystalline regions are widely present in the enzymatically treated cellulosic fibers of HF and MS, with a high percentage, compared to amorphous regions (Pickering *et al.*, 2011). Thus, the elimination of hemicellulose and lignin fractions increases both the crystalline surface area and the accessibility of enzymes to cellulose and also modifies significantly the structure of natural fibers (Mussatto *et al.*, 2008). In the case of DS, the enzymatic treatment caused the reduction of the crystallinity and the increase of the amorphous zones. This results could negatively impact the mechanical properties of the formulated biocomposites made with the DS (Efrati *et al.*, 2013).





**Figure 31: XRD spectra of hemp fibers (A), mixed sludge (B) and deinked sludge (C) before and after enzymatic treatment.**

### 3.3.3. SEM analysis

After the enzymatic treatment, the three sources of cellulosic fibers were analyzed by SEM to confirm the effectiveness of the enzymatic treatment (Fig. 32-34). The cellulosic fibers

after alkali pretreatment were considered as control. Fig. 32 and 33 depicted an irregular structure and a remarkable change in the morphology of cellulosic fibers of HF and MS respectively after the enzymatic treatment. The size of the cellulosic fibers was considerably reduced as well as they were largely detached in individual microfibrils which confirms that the cementing materials such as hemicellulose, lignin and pectin were significantly removed after the enzymatic treatment. However, for the DS (Fig. 34) slight changes were observed after the enzymatic treatment because of its low cellulose content which prevents the enzymatic action of the cellulase. The size of the fibers significantly affects the adhesion with the matrix. Thus, smaller the size, better is the adhesion which can promote the biocomposite development with high mechanical properties (Mukherjee & Kao, 2011).

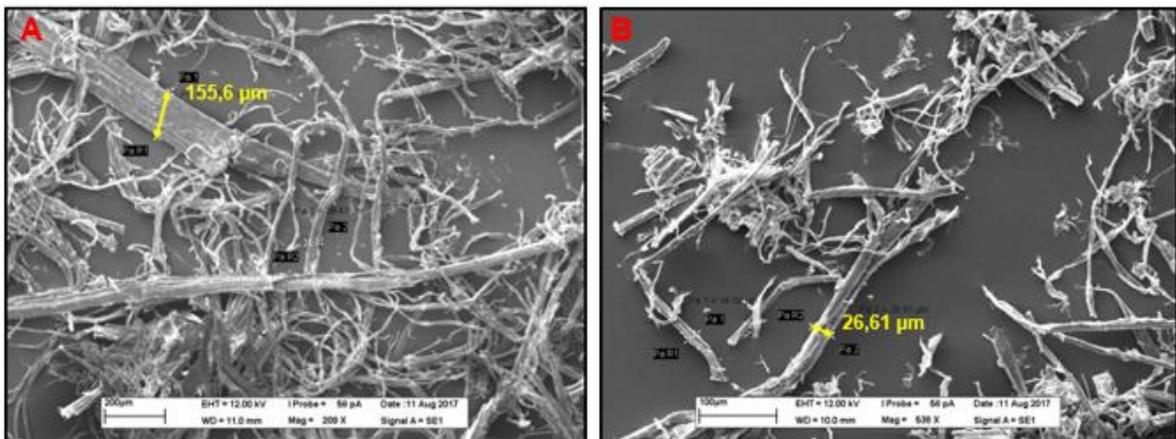


Figure 32: SEM micrographs of hemp fibers (A) before and (B) after enzymatic treatment.

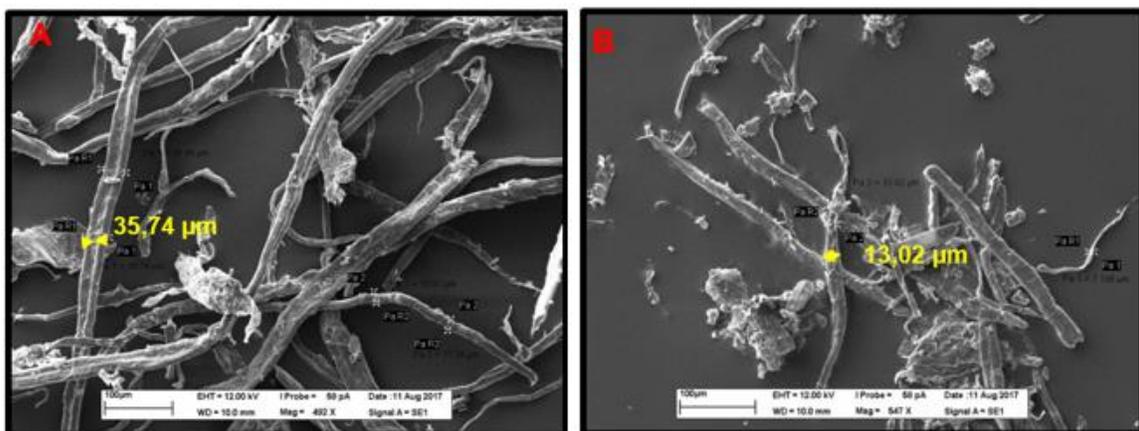


Figure 33: SEM micrographs of mixed sludge (A) before and (B) after enzymatic treatment.

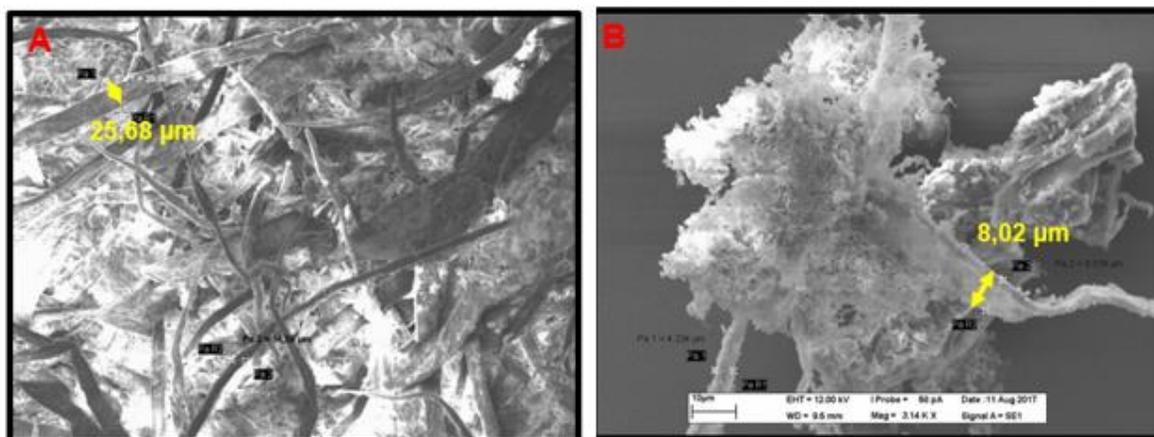


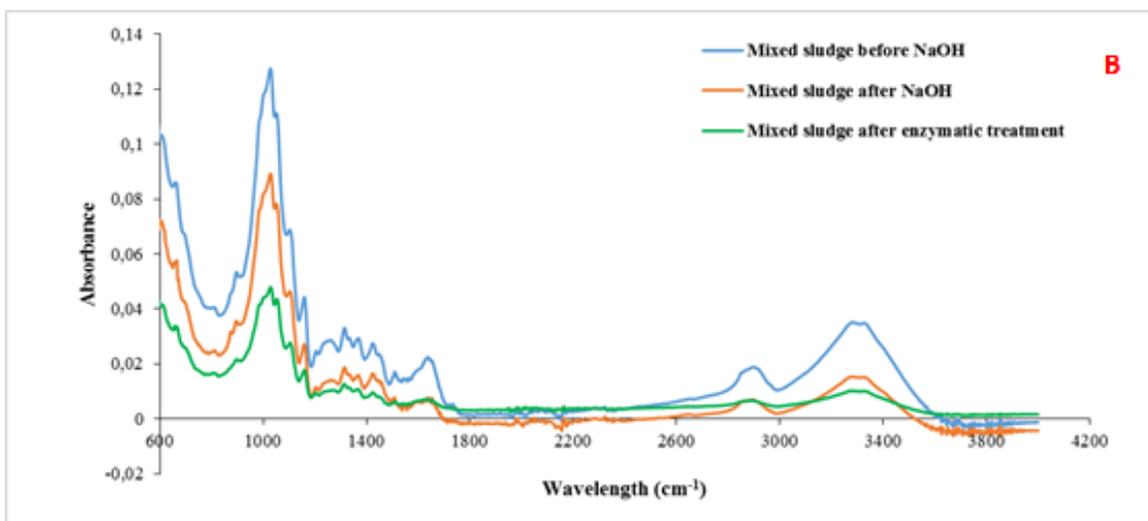
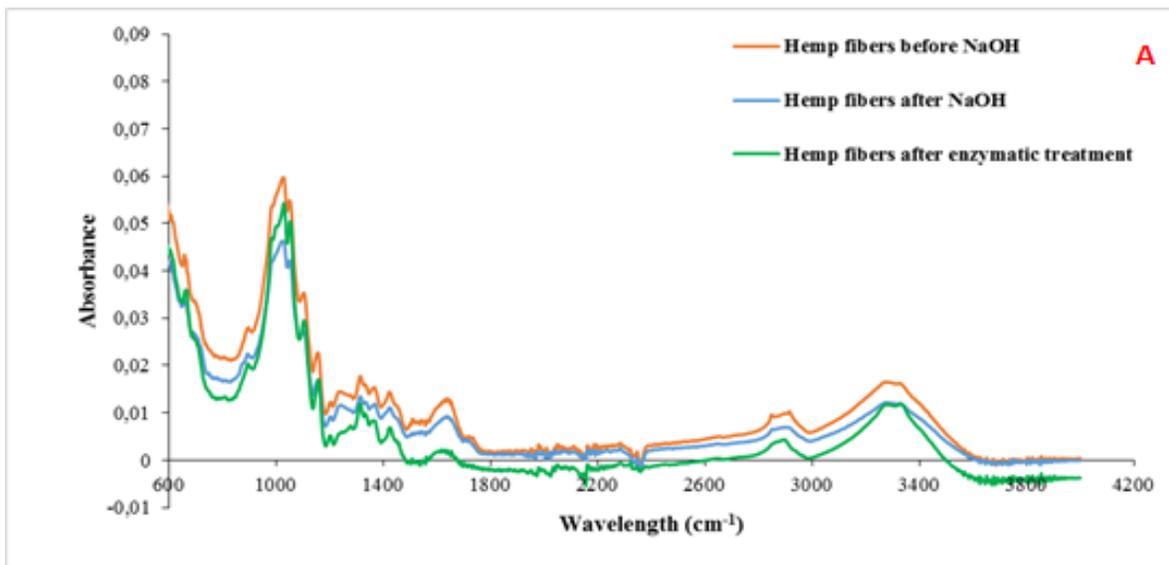
Figure 34: SEM micrographs of deinked sludge (A) before and (B) after enzymatic treatment.

### 3.3.4. FTIR spectra

The structural changes in cellulosic fibers from hemp fibers and pulp and paper biosolids were analyzed by FTIR at different stages, namely, before and after alkaline pretreatment and enzymatic treatment, respectively. The FTIR spectra of HF, MS and DS are respectively shown in Fig. 35A, 35B and 35C. The cellulose bands were more intense in the spectra of the samples after treatment because the removal of lignin increased their crystalline content. Indeed, the peaks attributed to cellulosic C-H groups extending in the region of  $1400\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$  were more intense in the HF and MS samples after their treatment compared to the DS. Fig. 35 (A) and (B) showed that the alkaline and enzymatic treatment steps remove most of the lignin from the cellulose fibers: the  $1525\text{ cm}^{-1}$  bands disappear after these treatments (Zuluaga *et al.*, 2009) which does not observed in DS (Fig. 35 (C)). The peak attributed to the COOH groups that appeared in the HF and BM spectrum at  $1635\text{ cm}^{-1}$  except DS characterize the carboxyl functional group or acid esters. The changes in the peak could be associated to water adsorption or carbohydrates oxidation (Hassan *et al.*, 2010). The peak at  $1574\text{ cm}^{-1}$  which corresponds to the benzene structure of lignin, was reduced in HF and MS only, but a very low peak remains in this region of the spectrum indicating that the samples contained lignin residues and the enzymatic treatment was not able to fully eliminate the lignin. By comparing the spectrum before and after the chemical treatment of the 3 fibers studied, a very visible reduction of the vibration peak at  $2900\text{ cm}^{-1}$  were observed which represented the CH group present

in the cellulose (Tang *et al.*, 2015) in HF and BM and a slight reduction in BD. This indicated the effect of the chemical treatment by using a low concentration of NaOH on the degradation of the coating substances (lignin, hemicellulose and pectin) which could influence on the size of the cellulosic fibers. Thus, the enzyme treatment was effective in extracting the cellulosic fibers that are present in HF and MS and therefore they can be used as a reinforcement for rPLA.

Consequently, the combined enzymatic and chemical treatment using a low concentration of NaOH (10% v/v) was effective for the elimination of the amorphous components in the cellulosic fibers of HF and MS mostly. Therefore, changes in the hydroxyl groups after enzymatic treatment indicated an increased resistance to moisture. In addition, it also reflects the degradation of coating substances (Cao & Tan, 2004).



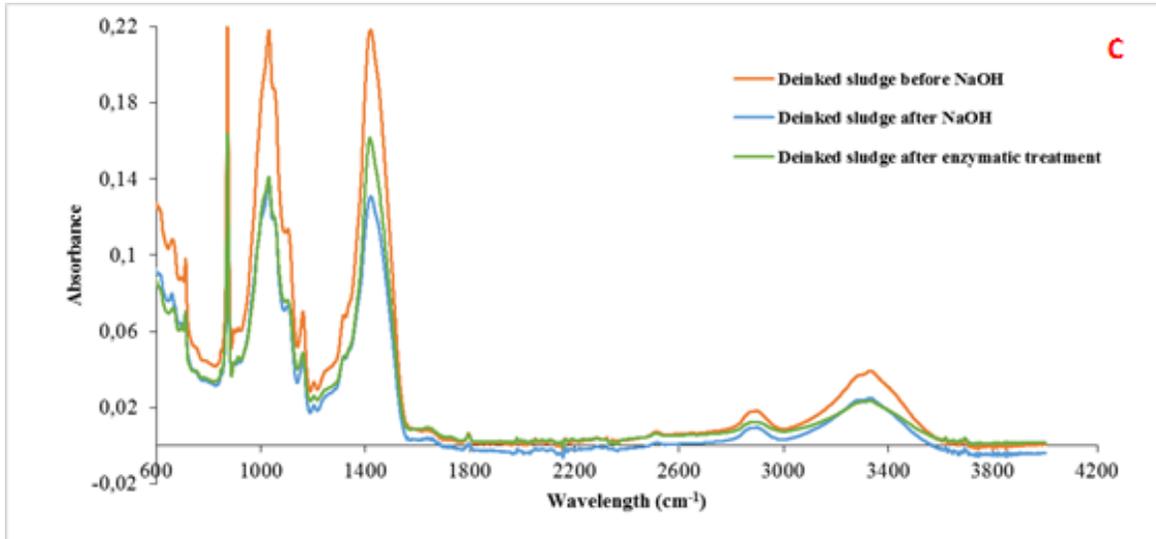


Figure 35: FTIR spectra for hemp fibers (A), mixed sludge (B) and deinked sludge (C) before and after alkali and enzymatic treatment.

### 3.4. Mechanical proprieties of the biocomposites

The size and the percentage of the reinforcement have a direct effect on the mechanical properties of biocomposite. This has been demonstrated by Laadila *et al.* (2017) who studied the effects of particle size and percentage of cellulosic fibers in rPLA matrix and showed that the biocomposite containing rPLA + 2% treated cellulosic fibers was achieved the highest mechanical properties as compared to rPLA, rPLA + 5% and rPLA + 10%. Considering these results, we wanted to further refine the study while remaining in a range close to 2%. We had, therefore, worked with percentages of fibers of 1.5%, 3% and 6% and reduced sizes ranging between 0.075mm and 1.7mm, hence, we applied grinding, alkaline treatment, sieving and enzymatic treatment.

The main results of the mechanical tests (tensile and impact tests) on the different biocomposite formulations (27 biocomposites) are provided in Table 6. The results indicated a difference between the values of the Young's modulus and the impact strength of the control rPLA and the biocomposites with different formulations. The composite control rPLA has the lowest tensile modulus (244.48 MPa) and the lowest tensile strength (13.58 kJ/m<sup>2</sup>) compared to the other fabricated composites. All the biocomposites reinforced with treated cellulosic fibers of HF, MS and DS and show improvement in the

mechanical behavior. This may be due to improved compatibility at the fiber-matrix interface. Compared to other formulations, the HF 3% 75 $\mu$ m biocomposite has the highest tensile strength of 324.53 MPa and the HF 1.5% 75 $\mu$ m biocomposite has highest impact strength of 27.61 kJ/m<sup>2</sup>. This increase in mechanical performance can be associated with the substantial removal of the undesirable materials by the fiber treatment, which has led to a higher cellulose content, a larger fiber / rPLA contact surface and consequently a better adhesion to the interface.

Overall, the HF-reinforced biocomposites were the ones that gave the best results in terms of mechanical properties compared to pulp and paper biosolids because of the cellulose concentration which is the most important chemical component in the manufacture of biocomposite with 74% in hemp fiber and 40-60% in pulp and paper sludge (Mwaikambo & Ansell, 2002; Monte *et al.*, 2009).

Many studies on natural fiber-based PLA biocomposites were carried out because of the emergence of considerations related to sustainable development (Yussuf *et al.*, 2010; Gregorova *et al.*, 2011; Bajpai *et al.*, 2012; Thakur *et al.*, 2014; Laadila *et al.*, 2017). The effect of different natural fibers on the mechanical properties of the resulting biocomposites were studied through tensile and impact tests mainly. Examples include recycled paper waste (67.9  $\pm$  0.5 MPa; 23.5  $\pm$  0.4 J/m), man-made cellulose (92  $\pm$  4.7 MPa; 11.25 KJ/m<sup>2</sup>), abaca (74 MPa; 5.3 KJ/m<sup>2</sup>), kenaf (223 MPa; 9.5  $\pm$  1.3 KJ/m<sup>2</sup>) (Bajpai *et al.*, 2014), jute (93.5 MPa; 14.3 KJ/m<sup>2</sup>) and flax (54.15 MPa; 11.13 KJ/m<sup>2</sup>) (Siakeng *et al.*, 2015). However, good interfacial adhesion between rPLA matrix and the 3 fibers used was clearly observed through mechanical tests due to alkali and enzymatic treatments.

**Table 6: Mechanical properties of rPLA and its biocomposites.**

		Tensile test	Impact test
Code sample		Young's modulus (MPa)	Strength (kJ/m <sup>2</sup> )
<b>Hemp fiber</b>	HF 1.5% 1.7 $\mu$ m	314.12 $\pm$ 8.96	15.74 $\pm$ 2.08
	HF 1.5% 75 $\mu$ m	317.63 $\pm$ 26.21	27.61 $\pm$ 2.94
	HF 3% 1.7 $\mu$ m	321.60 $\pm$ 20.51	16.82 $\pm$ 3.17
	HF 3% 75 $\mu$ m	324.53 $\pm$ 3.10	14.72 $\pm$ 3.11
	HF 6% 1.7 $\mu$ m	304.66 $\pm$ 3.32	10.35 $\pm$ 1.16
	HF 6% 75 $\mu$ m	313.63 $\pm$ 8.10	11.28 $\pm$ 1.65
<b>Mixed sludge</b>	MS 1.5% >1.7 $\mu$ m	278.95 $\pm$ 3.29	15.47 $\pm$ 1.97
	MS 1.5% 850 $\mu$ m	298.50 $\pm$ 11.92	16.46 $\pm$ 0.38
	MS 1.5% 75 $\mu$ m	304.99 $\pm$ 5.61	16.59 $\pm$ 1.75
	MS 3% >1.7 $\mu$ m	264.79 $\pm$ 9.93	16.10 $\pm$ 0.17

	MS 3% 850 $\mu$ m	295.09 $\pm$ 6.31	19.04 $\pm$ 1.96
	MS 3% 75 $\mu$ m	300.55 $\pm$ 16.26	20.47 $\pm$ 4.24
	MS 6% >1.7 $\mu$ m	284.95 $\pm$ 30.69	8.47 $\pm$ 0.60
	MS 6% 850 $\mu$ m	266.73 $\pm$ 5.86	11.91 $\pm$ 0.75
	MS 6% 75 $\mu$ m	312.54 $\pm$ 8.96	12.34 $\pm$ 1.35
<b>Deinked sludge</b>	DS 1.5% >1.7 $\mu$ m	287.27 $\pm$ 7.92	13.06 $\pm$ 1.24
	DS 1.5% 75 $\mu$ m	313.19 $\pm$ 4.61	14.59 $\pm$ 2.24
	DS 3% >1.7 $\mu$ m	315.58 $\pm$ 4.31	12.92 $\pm$ 2.29
	DS 3% 75 $\mu$ m	310.73 $\pm$ 3.70	12.53 $\pm$ 0.61
	DS 6% >1.7 $\mu$ m	295.66 $\pm$ 19.33	11.46 $\pm$ 0.60
	DS 6% 75 $\mu$ m	316.59 $\pm$ 2.80	7.67 $\pm$ 0.74
<b>rPLA (control)</b>	rPLA 100%	244.48 $\pm$ 11.23	13.85 $\pm$ 0.42

In light of the mechanical tests results, statistical tests were conducted to better assess the different biocomposites prepared. A test of ANOVA was carried out to establish any parameter (percentage or size of the fibers) which might affects the biocomposites properties followed by a Tukey test. Table 7 and 8 summarize the conclusions of statistical analysis. The results of ANOVA (Table 7) indicates that the tensile test was statistically dependent on the size of fibers used in biocomposites at P-values <0.05 of 0.0397, 0.0138 and 0.0373 for HF, MS and DS, respectively. For the impact test was statistically dependent on the percentage of the fibers used in the biocomposites at P-value <0.05 of 0.0813, <0.0001 and 0.0118 for HF, MS and DS, respectively.

Increasing the percentage of cellulosic reinforcements improves almost systematically the mechanical performance of biocomposites. However, too much cellulosic fibers implies a difficult adhesion which leads to a decrease in mechanical performances in some cases (Laadila *et al.*, 2017). The size of the reinforcement has not only an influence on the manufacturing process but also on the mechanical properties of the biocomposite. Concerning the tensile strength, it seems that there is an optimal size of 75  $\mu$ m. Any distance from this value leads to a decrease in performance. Further study on the arrangement or distribution of particles will help to explain these later observations more precisely. Indeed, Oksman and Clemons (1998) noted that small and well-dispersed particles generally increase the resistance properties. As evident from Table 6, the best tensile test results are obtained at a fiber size of 75 $\mu$ m and for the impact test at a percentage not exceeding 3%.

**Table 7: The P-value of the different types of cellulosic fibers.**

		<b>P-value Hemp fiber</b>	<b>P-value Mixed sludge</b>	<b>P-value Deinked sludge</b>
<b>Tensile test</b>	<b>Percentage</b>	0.9616	0.6834	0.2153
	<b>Size</b>	0.0397	0.0138	0.0373
	<b>Percentage*Size</b>	0.5909	0.1359	0.1085
<b>Impact test</b>	<b>Percentage</b>	0.0118	<0.0001	0.0813
	<b>Size</b>	0.8677	0.1402	0.5736
	<b>Percentage*Size</b>	0.1758	0.1945	0.2307

*P-value <0.05*

In order to continue the analysis of the results, the groups formed according to the Tukey test are presented in Table 8 for each formulated biocomposite. In order to facilitate the comparison between the different biocomposites and to try to determine the best formulations, a simple way of comparison was used. An annotation of Good is assigned for group A, Medium for group B and Low for group C. According to the observations, it can be considered that HF is classified as the most interesting fiber to use as reinforcement (group A), followed by MS which also produces interesting mechanical properties since more than half of its biocomposites are found in group A and finally biocomposites based on DS are found in the last position in group C (similar to the control) which means that they are the least interesting to use. All these results indicate that the mechanical performance of the biocomposites does not depend only on the extraction method of the cellulosic fibers and the treatments used but also depend on the type of natural fiber chosen.

**Table 8: Results of the multiple comparison between different biocomposites.**

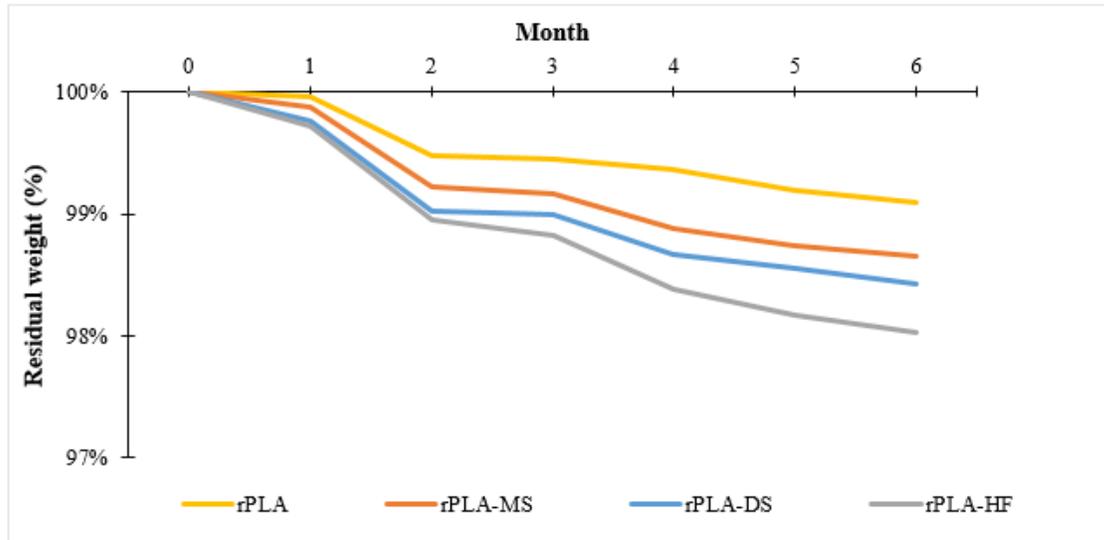
	<b>Code sample</b>	<b>Group</b>
<b>Hemp fiber</b>	HF 1.5% 1.7µm	A
	HF 1.5% 75µm	A
	HF 3% 1.7µm	A
	HF 3% 75µm	A
	HF 6% 1.7µm	A
	HF 6% 75µm	A
<b>Mixed sludge</b>	MS 1.5% >1.7µm	B
	MS 1.5% 850µm	A

	MS 1.5% 75µm	A
	MS 3% >1.7µm	B
	MS 3% 850µm	A
	MS 3% 75µm	A
	MS 6% >1.7µm	B
	MS 6% 850µm	B
	MS 6% 75µm	A
<b>Deinked sludge</b>	DS 1.5% >1.7µm	C
	DS 1.5% 75µm	C
	DS 3% >1.7µm	C
	DS 3% 75µm	C
	DS 6% >1.7µm	C
	DS 6% 75µm	C
<b>rPLA (control)</b>	rPLA 100%	C

A: Good    B: Medium    C: Weak

### 3.5. Biodegradation of the biocomposites

The biodegradability test was performed to study the real effect of composting on samples under normal environmental conditions. In the literature, a lot of research were carried out to test biocomposites biodegradability in controlled composting conditions (Ohkita & Lee, 2006; Ochi, 2008). In this project, a different test approach was realized. The biocomposites were buried in a natural soil and their weight loss was measured every month for 6 months. As shown in Fig. 36, rPLA and biocomposites rPLA-hemp fiber (rPLA-HF), rPLA-deinked sludge (rPLA-DS) and rPLA-mixed sludge (rPLA-MS) degrade progressively over time. As evident from the Fig, the biodegradation rate for initial 30 days was almost the same for all the samples. The weight loss for rPLA-HF biocomposite reached 1.97% after 6 months, which can be considered very low compared to other composting techniques (Yussuf *et al.*, 2010).



**Figure 36: Residual weight of rPLA and its biocomposites during the biodegradation test.**

As described in Fig. 36 after 180 days (6 months), the weight loss of rPLA-HF was twofold compared to rPLA (0.91%) followed by rPLA-DS (1.57%) and finally the rPLA-MS (1.35%). The degradation of biocomposites can be related to the effectiveness of the enzymes in soil able to degrade cellulosic chains in fibers and also to the hydrolytic degradation due to the soil humidity. In addition, by comparing the biodegradation of rPLA-HF, rPLA-DS and rPLA-MS biocomposites, the total biodegradability of hemp fiber and its higher cellulose content lead to increase the degradation rate of its biocomposites. However, it can be said that the weight loss in our study was not very significant for all rPLA biocomposites even after 6 months of composting and the fibers slightly improve the biodegradability of rPLA (Yussuf *et al.*, 2010) compared to other studies (Mathew *et al.*, 2005; Ochi, 2008).

## 4. Conclusion

The present study was carried out to promote the recycling of PLA by manufacturing new biocomposites obeying environmental requirements and the recycling of residues from the pulp and paper industry while taking advantage of the characteristics and properties of their cellulosic fibers. One of the most important points to highlight and which has prompted the development of this research is the fact of using simple and inexpensive techniques compared to others. For the formulation of these biocomposites based on rPLA and cellulosic fibers, two different treatments were used; one to extract the cellulosic fibers and the other to activate the surface of the fibers extracted with lignocellulosic enzymes. To evaluate the effect of the pretreatment on the size of cellulosic fibers, grinding and alkali treatment with 10% NaOH were tested on three substrates: mixed sludge and deinked sludge from pulp and hemp fibers. A series of experiments showed that the sodium hydroxide affects directly the fibrils and the degree of polymerization of cellulose.

The enzymes laccase and cellulase were produced by SSF with an activity of  $34.8.4 \pm 5.7$  IU / gds and  $11.8 \pm 0.5$  IU / gds respectively. The application of these enzymes has reduced the size of the cellulosic fibers by the action of cellulase and activated their surfaces by making microstructural and crystalline modifications for a better adhesion between the reinforcement (cellulosic fibers) and the matrix (recycled polylactic acid). XRD, SEM, FTIR, mechanical tests and biodegradation test of the novel biocomposites showed that HF (Young's Modulus of  $324.53 \pm 3.10$  MPa; impact strength of  $27.61 \pm 2.94$  kJ/m<sup>2</sup>; 1.97% biodegradation rate) performed much better than the other reinforcing fibers followed by MS and finally the DS with less interesting mechanical properties (HF > MS > DS > rPLA). In conclusion, to improve the performance of pulp and paper sludge as reinforcing fibers for rPLA biocomposites, chemical modification remains recommended.

## **Acknowledgements**

The authors gratefully acknowledge the financial support from CRIBIQ and the 'Fonds de recherche du Québec-Nature et technologies (FRQNT). We would like to thank INRS-ETE, the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and Gaudreau Environment.

## **Competing interests**

The authors declare that there exists no conflict of interest.

## References

- Adney B & Baker J (1996) Measurement of cellulase activities. LAP-006 NREL Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden.).
- Ahmad F, Choi HS & Park MK (2015) A Review: Natural Fiber Composites Selection in View of Mechanical, Light Weight, and Economic Properties. *Macromolecular Materials and Engineering* 300(1):10-24.
- Al-Kaabi K, Al-Khanbashi A & Hammami A (2005) Date palm fibers as polymeric matrix reinforcement: DPF/polyester composite properties. *Polymer Composites* 26(5):604-613.
- Alix S, Lebrun L, Marais S, Philippe E, Bourmaud A, Baley C & Morvan C (2012) Pectinase treatments on technical fibres of flax: Effects on water sorption and mechanical properties. *Carbohydrate Polymers* 87(1):177-185.
- Alvarez VA & Vazquez A (2006) Influence of fiber chemical modification procedure on the mechanical properties and water absorption of MaterBi-Y/sisal fiber composites. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 37(10):1672-1680.
- Avérous L (2008) Polylactic acid: synthesis, properties and applications. *Monomers, polymers and composites from renewable resources* 1.
- Bajpai PK, Singh I & Madaan J (2012) Comparative studies of mechanical and morphological properties of polylactic acid and polypropylene based natural fiber composites. *Journal of Reinforced Plastics and Composites* 31(24):1712-1724.
- Bajpai PK, Singh I & Madaan J (2014) Development and characterization of PLA-based green composites: A review. *Journal of Thermoplastic Composite Materials* 27(1):52-81.
- Bansal N, Tewari R, Gupta JK, Soni R & Soni SK (2011) A novel strain of *Aspergillus niger* producing a cocktail of hydrolytic depolymerising enzymes for the production of second generation biofuels. *BioResources* 6(1):552-569.
- Bansal N, Tewari R, Soni R & Soni SK (2012) Production of cellulases from *Aspergillus niger* NS-2 in solid state fermentation on agricultural and kitchen waste residues. *Waste Management* 32(7):1341-1346.
- Bledzki AK, Mamun AA, Jaszkiwicz A & Erdmann K (2010) Polypropylene composites with enzyme modified abaca fibre. *Composites Science and Technology* 70(5):854-860.
- Brief L (2011) Opportunities in natural fiber composites. *Lucintel LLC, Irving (TX)*.

- Cao Y & Tan H (2004) Structural characterization of cellulose with enzymatic treatment. *Journal of Molecular Structure* 705(1–3):189-193.
- Chaali M, Lecka J, Suresh G, Salem M, Brar SK, Hernandez-Galan L, Sevigny J & Avalos-Ramirez A (2017) Supplement comprising of laccase and citric acid as an alternative for antibiotics-in vitro triggers of melanin production. *bioRxiv* :179291.
- Chowdhury M, Beg M, Khan MR & Mina M (2013) Modification of oil palm empty fruit bunch fibers by nanoparticle impregnation and alkali treatment. *Cellulose* 20(3):1477-1490.
- Collins PJ & Dobson A (1997) Regulation of laccase gene transcription in *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology* 63(9):3444-3450.
- Dhillon GS, Oberoi HS, Kaur S, Bansal S & Brar SK (2011) Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. *Industrial Crops and Products* 34(1):1160-1167.
- Dittenber DB & GangaRao HVS (2012) Critical review of recent publications on use of natural composites in infrastructure. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing* 43(8):1419-1429.
- Efrati Z, Talaeipour M, Khakifirouz A & Bazyar B (2013) Impact of cellulase enzyme treatment on strength, morphology and crystallinity of deinked pulp. *Cellulose Chemistry and Technology* 47:547-551.
- Faruk O, Bledzki AK, Fink H-P & Sain M (2012) Biocomposites reinforced with natural fibers: 2000–2010. *Progress in polymer science* 37(11):1552-1596.
- Faulstich de Paiva JM & Frollini E (2006) Unmodified and Modified Surface Sisal Fibers as Reinforcement of Phenolic and Lignophenolic Matrices Composites: Thermal Analyses of Fibers and Composites. *Macromolecular Materials and Engineering* 291(4):405-417.
- George M, Mussone PG & Bressler DC (2014) Surface and thermal characterization of natural fibres treated with enzymes. *Industrial Crops and Products* 53:365-373.
- Gregorova A, Hrabalova M, Kovalcik R & Wimmer R (2011) Surface modification of spruce wood flour and effects on the dynamic fragility of PLA/wood composites. *Polymer Engineering & Science* 51(1):143-150.
- Hamad K, Kaseem M & Deri F (2010) Rheological and mechanical properties of poly (lactic acid)/polystyrene polymer blend. *Polymer bulletin* 65(5):509-519.

- Hassan ML, Mathew AP, Hassan EA & Oksman K (2010) Effect of pretreatment of bagasse pulp on properties of isolated nanofibers and nanopaper sheets. *Wood and Fiber Science* 42(3):362-376.
- Henriksson G, Christiernin M & Agnemo R (2005) Monocomponent endoglucanase treatment increases the reactivity of softwood sulphite dissolving pulp. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 32(5):211-214.
- Karmakar M & Ray R (2010) Extra cellular endoglucanase production by *Rhizopus oryzae* in solid and liquid state fermentation of agro wastes. *Asian J Biotechnol* 2(1):27-36.
- Laadila MA, Hegde K, Rouissi T, Brar SK, Galvez R, Sorelli L, Cheikh RB, Paiva M & Abokitse K (2017) Green synthesis of novel biocomposites from treated cellulosic fibers and recycled bio-plastic polylactic acid. *Journal of cleaner production* 164:575-586.
- Liu L, Cheng L, Huang L & Yu J (2012) Enzymatic treatment of mechanochemical modified natural bamboo fibers. *Fibers and Polymers* 13(5):600-605.
- Lowry R (2014) Concepts and applications of inferential statistics.
- Mathew AP, Oksman K & Sain M (2005) Mechanical properties of biodegradable composites from poly lactic acid (PLA) and microcrystalline cellulose (MCC). *Journal of applied polymer science* 97(5):2014-2025.
- McLaren J (1999) *The technology roadmap for plant/crop-based renewable resources 2020*. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (US); National Renewable Energy Lab., Golden, CO (US). Medium: ED; Size: vp. p. <http://www.osti.gov/scitech/servlets/purl/756319>
- Monte MC, Fuente E, Blanco A & Negro C (2009) Waste management from pulp and paper production in the European Union. *Waste management* 29(1):293-308.
- Mukherjee T & Kao N (2011) PLA based biopolymer reinforced with natural fibre: a review. *Journal of Polymers and the Environment* 19(3):714.
- Mussatto SI, Fernandes M, Milagres AM & Roberto IC (2008) Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. *Enzyme and Microbial Technology* 43(2):124-129.
- Mwaikambo LY & Ansell MP (2002) Chemical modification of hemp, sisal, jute, and kapok fibers by alkalization. *Journal of applied polymer science* 84(12):2222-2234.
- Ochi S (2008) Mechanical properties of kenaf fibers and kenaf/PLA composites. *Mechanics of materials* 40(4):446-452.

- Ohkita T & Lee SH (2006) Thermal degradation and biodegradability of poly (lactic acid)/corn starch biocomposites. *Journal of Applied Polymer Science* 100(4):3009-3017.
- Oksman K & Clemons C (1998) Mechanical properties and morphology of impact modified polypropylene-wood flour composites. *Journal of applied polymer science* 67(9):1503-1513.
- Pickering KL, Sawpan MA, Jayaraman J & Fernyhough A (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.
- Rokbi M, Osmani H, Imad A & Benseddiq N (2011) Effect of chemical treatment on flexure properties of natural fiber-reinforced polyester composite. *Procedia Engineering* 10:2092-2097.
- Sangeetha V, Deka H, Varghese T & Nayak S (2016) State of the art and future prospectives of poly (lactic acid) based blends and composites. *Polymer Composites*.
- Siakeng R, Jawaid M, Ariffin H, Sapuan S, Asim M & Saba N (2015) Natural fiber reinforced polylactic acid composites: A review. *Polymer Composites*.
- Spiridon I, Leluk K, Resmerita AM & Darie RN (2015) Evaluation of PLA–lignin bioplastics properties before and after accelerated weathering. *Composites Part B: Engineering* 69:342-349.
- Sreekala M, Kumaran M, Joseph S, Jacob M & Thomas S (2000) Oil palm fibre reinforced phenol formaldehyde composites: influence of fibre surface modifications on the mechanical performance. *Applied Composite Materials* 7(5):295-329.
- Tabka M, Herpoël-Gimbert I, Monod F, Asther M & 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(4):897-902.
- Tang Y, Shen X, Zhang J, Guo D, Kong F & Zhang N (2015) Extraction of cellulose nanocrystals from old corrugated container fiber using phosphoric acid and enzymatic hydrolysis followed by sonication. *Carbohydrate polymers* 125:360-366.
- Thakur VK, Thakur MK & Gupta RK (2014) Graft copolymers of natural fibers for green composites. *Carbohydrate polymers* 104:87-93.

- Yussuf A, Massoumi I & Hassan A (2010) Comparison of polylactic acid/kenaf and polylactic acid/rise husk composites: the influence of the natural fibers on the mechanical, thermal and biodegradability properties. *Journal of Polymers and the Environment* 18(3):422-429.
- Zhang Q, Lo C-M & Ju L-K (2007) Factors affecting foaming behavior in cellulase fermentation by *Trichoderma reesei* Rut C-30. *Bioresource Technology* 98(4):753-760.
- Zuluaga R, Putaux JL, Cruz J, Vélez J, Mondragon I & Gañán P (2009) Cellulose microfibrils from banana rachis: Effect of alkaline treatments on structural and morphological features. *Carbohydrate Polymers* 76(1):51-59.