



**HAL**  
open science

# Fractionnement et polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium : études structurale, chimique, physico-chimique et cinétique

Nidal Madad

► **To cite this version:**

Nidal Madad. Fractionnement et polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium : études structurale, chimique, physico-chimique et cinétique. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2011. Français. NNT : 2011INPL055N . tel-01749518

**HAL Id: tel-01749518**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749518>**

Submitted on 29 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

**THÈSE**

*Présentée à l'INPL par*

**Nidal MADAD**

*En vue d'obtenir le grade de*

**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

*Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires*

---

**Fractionnement et polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium : études structurale, chimique, physico-chimique et cinétique**

---

Soutenue publiquement le 23 Septembre 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs Mr S. Kermasha  
Mr P-Y. Pontalier

Professeur à l'Université Mc Gill, Canada  
HDR à l'ENSIACET-INPT, Toulouse

Examineurs Mme C. Gérardin  
Mme A. Cordin-Falcimaigne  
Mr M. Ghoul  
Mme L. Chebil

Professeur à l'UHP, Nancy  
Maître de Conférences à l'UTC, Compiègne  
Professeur à l'ENSAIA-INPL, Nancy  
Maître de Conférences à l'ENSAIA-INPL, Nancy



# Remerciements

Les travaux présentés dans cette thèse ont été menés essentiellement au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) à Nancy. Je tiens à exprimer ma gratitude à Monsieur Joël Scher, professeur à l'INPL et directeur du LIBio, de m'avoir accueilli dans son équipe.

J'adresse mes sincères remerciements à Monsieur Selim Kermasha, professeur à l'université Mc Gill et à Monsieur Pierre-Yves Pontalier HDR à l'ENSIACET pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail en tant que rapporteurs.

Je remercie Monsieur Mohamed Ghoul, professeur à l'ENSAIA, qui a dirigé mes travaux de recherche pour sa disponibilité, le temps qu'il a consacré à mon travail, et ses conseils pertinents. Je suis honorée d'avoir pu mener ce travail sous sa direction. Sa compétence, son esprit critique et ses larges connaissances m'ont permis d'apprendre beaucoup à ses côtés.

Je remercie Madame Latifa Chebil, maître de conférences à l'ENSAIA, pour avoir co-encadré cette thèse et pour son aide autant sur le plan scientifique et humain. Elle a su m'épauler, me soutenir et me conseiller tout au long de cette thèse. Merci pour tout.

Je remercie Madame Christine Gérardin, professeur à l'UHP et Madame Aude Cordin-Falcimaigne maître de conférences à l'UTC pour avoir accepté de participer au jury de thèse.

Je remercie Monsieur Nicolas Brosse, professeur à l'UHP, de m'avoir permis d'intégrer le laboratoire LERMAB pour réaliser les analyses RMN, pour sa disponibilité et son aide dans l'interprétation des spectres RMN.

Je remercie Madame Catherine Humeau, maître de conférences à l'ENSAIA, mon encadrante de Master recherche pour son encouragement, son amitié et sa sympathie.

Je remercie Mademoiselle Celine Charbonnel pour sa sympathie, pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail et pour ses précieux conseils techniques et scientifiques.

Merci à l'équipe physico-chimie du LIBio de m'avoir permis de réaliser les analyses physico-chimiques et pour leur sympathie et leurs conseils.

Mes remerciements vont à toutes les personnes des différents laboratoires qui m'ont accompagnée durant ces 4 ans : Thésards, chercheurs et personnels du laboratoire pour leur

gentillesse et disponibilité. Un grand merci à Carole Jeandel et Evelyne Renaud pour leur sympathie et leurs soutiens techniques. Merci à Anne Laplace pour son aide et sa gentillesse.

Merci à l'équipe d'enseignement OUGA pour les bons moments passés : Irinna, Eric, Isabelle, Bouchra, la petite carole et Fred.

Merci tout particulier à Nabila, à Leïla et à Christelle, qui m'ont aidée, soutenue, réconfortée et accompagnée. Je remercie également Inès, Hugues et Florent sans lesquels les journées seraient bien moins pétillantes.

Je tiens également à remercier mes amis qui m'ont écoutée et soutenue, merci à Cedric, Amir, Ali, Nolwenn et Ramine.

Enfin, mes remerciements, ma reconnaissance et toute ma gratitude sont adressés à mes parents et à ma sœur Nada qui ont su me soutenir, m'encourager tout au long de ces années. Sans oublier ma cousine Rania qui a toujours été là pour moi. Merci à Safaa, ma sœur, ma copine et ma collocataire et à Lad pour sa patience, son encouragement et le réconfort qu'il a pu me transmettre.

Je dédie ce travail à ma tante Nassiba !

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAPH	2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride
ABTS	Acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique)
ACV	Acétovanillone
ASG	Acétosyringone
AUC	Aire sous la courbe de décroissance de la fluorescence
AV	Alcool vanillique
BSL	Laccase de <i>Bacillus subtilis</i>
C	Carbone
CPG	Chromatographie de perméation de gel
Da	Dalton
DLS	Diffusion dynamique de la lumière
DMP	2,6-diméthylphénol
D <sub>T</sub>	Coefficients de diffusion translationnelle
DV	Volume de diafiltration
DVS	L'adsorption dynamique de la vapeur d'eau
E	Champ électrique
EM	Ethyl vanilline
ET	transfert d'électrons
E <sup>0</sup>	Potentiel Redox
F	Fraction
FA	Acide férulique
FTIR	Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier
H	Hydrogène
HAA	Acide 3-hydroxyanthranilique
HAT	Transfert d'atomes d'hydrogène
HBT	1-hydroxybenzotriazole
HNNS	Acide 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonique
HPI	1N-hydroxyphthalimide
k <sub>B</sub>	Constante de Boltzmann
LMT	Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>
LRV	Laccase de <i>Rhus vernicifera</i>
LS	Lignosulfonates
LS-Ca	Lignosulfonates de calcium
LS-Mg	Lignosulfonates de magnésium
LS-Na	Lignosulfonates de sodium
LS-NH <sub>4</sub>	Lignosulfonates d'ammonium
LTV	Laccase de <i>Trametes versicolor</i>
MALLS	Angles de diffusion multiple de la lumière laser

$M_n$	Masse moléculaire en nombre
MV	Méthyl vanillate
$M_w$	Masse moléculaire en poids
$n$	Densité de charge
N	Azote
NF	Nanofiltration
NHA	N -hydroxyacetanilide
NNDS	Acide 1-nitroso--naphthol-2,6-disulfonique
O	Oxygène
PCA	acide p-coumarique
Pdi	Polydispersité
$R_h$	Rayon hydrodynamique
RH	Humidité relative
RI	Indice de réfraction
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
S	Soufre
SA	Acide sinapique
SEC	Chromatographie à exclusion stérique
SGD	Syringaldéhyde
TEMPO	2,2,6,6-Tetramethyl-1-piperidinyloxy, free radical, 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine 1-oxyl
$T_g$	Température de transition vitreuse
THF	Tétrahydrofurane
THL	Laccase de <i>Trametes hirsuta</i>
TMP	2,4,6-trimethoxyphenol
UV	Ultraviolet
VA	Vanilline
VLA	Acide violurique
$h$	Viscosité du solvant
$\epsilon$	Constante diélectrique du milieu
$\epsilon_0$	Permittivité du vide
$\mu_E$	Mobilité électrophorétique
$v$	Vitesse des particules
$\zeta$	Potentiel zêta
$\kappa$	Paramètre électrostatique de Debye-Hückel
Z	Valence des charges
$\psi_{DON}$	Potentiel de Donnan
$\psi_0$	Potentiel à la limite de la surface



## SOMMAIRE GÉNÉRAL

<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I</b>	
<b>ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>5</b>
<b>CHAPITRE II</b>	
<b>MATÉRIELS &amp; MÉTHODES</b>	<b>62</b>
<b>CHAPITRE III RÉSULTATS</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE III.1</b>	
<b>FRACTIONNEMENT PAR PROCÉDÉ MEMBRANAIRE ET CARACTÉRISATION             PHYSICO-CHIMIQUES DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>92</b>
<b>CHAPITRE III.2</b>	
<b>LE COMPORTEMENT DES LIGNOSULFONATES EN SOLUTION</b>	<b>117</b>
<b>CHAPITRE III.3</b>	
<b>POLYMÉRISATION ENZYMATIQUE DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>123</b>
<b>CHAPITRE III.4</b>	
<b>EFFET DU MODE DE CONDUITE DE LA POLYMÉRISATION DES             LIGNOSULFONATES</b>	<b>147</b>
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>169</b>



# *INTRODUCTION GÉNÉRALE*



## **INTRODUCTION GÉNÉRALE**

---

Dans un contexte socio-économique marqué par le développement durable et la volonté de substituer les ressources fossiles, de nouvelles voies alternatives basées sur l'exploitation de ressources renouvelables et respectueuses de l'environnement ont été développées ces dernières années.

Parmi ces ressources renouvelables, l'utilisation de la biomasse végétale constitue le gisement le plus important et le plus prometteur. En effet, l'utilisation des végétaux présente plusieurs avantages ; elle permet i) de fournir des produits utilisables comme bases chimiques et en énergie, ii) de favoriser la création de l'emploi et l'aménagement du territoire, iii) la diversification de l'agriculture et la valorisation des déchets et enfin iv) de lutter contre le réchauffement climatique par la diminution d'émissions de gazs à effets de serre.

La France est le pays européen qui possède le gisement en biomasse le plus important, principalement constitué de plantes lignocellulosiques. On distingue deux origines principales, la biomasse agricole et les résidus des industries de transformation de l'industrie de la fabrication de la pâte à papier (liqueurs noirs).

La lignine, principal constituant du bois, est après la cellulose le deuxième composé des agroressources renouvelables. Constituée de polymères polyphénoliques de compositions et de structures très variées, elle résulte de la polymérisation oxydative de trois alcools phénoliques : l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. La structure des lignines dans les liqueurs noires est modifiée sous l'effet des procédés de transformation. Elles sont souvent fragmentées et des groupements fonctionnels sont incorporés à leurs structures. Les formes majoritaires sont les lignines Kraft obtenues par dissolutions alcalines ou les lignosulfonates issus des dissolutions acides.

Actuellement, les lignines et notamment les lignosulfonates sont commercialisés pour diverses applications. Ils sont utilisés dans la fabrication de résines, d'adhésifs, d'émulsifiants, de stabilisants et comme additifs aux ciments, au caoutchouc ou aux revêtements des routes. Ils sont aussi employés comme liant dans l'alimentation animale, agent de tannage végétal, séquestrant d'ions métalliques ou agent antioxydant. Dans ce cadre, les propriétés antioxydantes des lignines sont particulièrement recherchées. La formation de complexes macromoléculaires composés de lignosulfonates et de macromolécules biologiques ou synthétiques ouvre également la voie à des applications dans le domaine de la nano- et microencapsulation. Les lignosulfonates sont aussi utilisés dans la fabrication de produits de chimie fine (vanilline, pyrocatechine, gaïacols, etc...), et comme support pour les vitamines liposolubles et les caroténoïdes.

Cependant, les lignosulfonates sont des molécules très hétérogènes d'un point de vue chimique, structural et distribution moléculaire. Or, les applications à valeurs ajoutées nécessitent des biopolymères plus homogènes et de qualité reproductible. Il a été également démontré que selon leurs poids moléculaires, ils peuvent avoir des propriétés très différentes et par conséquent des applications différentes.

Pour réduire leurs hétérogénéités, plusieurs approches ont été décrites dans la littérature. Parmi ces techniques, la séparation membranaire, la polymérisation, la dégradation et la fonctionnalisation par greffage de groupements fonctionnels sont les plus citées.

Les procédés membranaires sont devenus ces dernières années une technologie de choix dans le domaine de séparation des biomolécules. Les principaux avantages des procédés membranaires résident dans leur aptitude à fonctionner dans une large gamme de température, de pH et de seuil de coupure, sans ajout de produits chimiques, à être modulables et d'agencements faciles. De plus, leur consommation d'énergie est relativement faible comparée aux autres procédés de séparation. Ils permettent d'obtenir des fractions de biopolymères avec une distribution moléculaire plus contrôlée.

La polymérisation enzymatique de biomolécules est une autre voie intéressante permettant de réduire l'hétérogénéité des lignosulfonates et d'obtenir des structures mieux

définies. Elle peut être menée en milieu aqueux et dans des conditions douces de température, de pH et de pression.

Pour contribuer à l'amélioration des propriétés physico-chimiques et fonctionnelles des lignosulfonates, nous nous sommes intéressés dans ce travail à la séparation par techniques membranaires et à la polymérisation enzymatique de ces biopolymères. L'utilisation de ces procédés permet d'obtenir des structures contrôlées tout en favorisant le développement d'une chimie verte des polymères plus respectueuse de l'environnement. Par ailleurs, dans la littérature, la séparation par techniques membranaires et la polymérisation enzymatique des lignosulfonates ont fait l'objet de peu d'études et les rares données disponibles sur leurs performances sont souvent contradictoires.

Les résultats attendus sont l'obtention de lignosulfonates avec une distribution moléculaire plus contrôlée et avec de nouvelles fonctionnalités permettant d'améliorer leurs propriétés et de développer de nouvelles niches d'utilisation à valeur ajoutée de ces biopolymères.

La thèse a donc pour objectifs de :

- déterminer l'effet d'un procédé physique, en l'occurrence la diafiltration sur l'hétérogénéité, la pureté et la composition chimique des lignosulfonates.
- étudier l'effet de la distribution du poids moléculaire et de la composition chimique sur les propriétés physico-chimiques et le comportement en solution des fractions de lignosulfonates obtenues.
- comprendre le rôle des différents facteurs pouvant affecter les rendements de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates tels que l'origine de la laccase, l'utilisation d'un médiateur ou non, l'effet de la nature du médiateur, la distribution moléculaire initiale du substrat et les concentrations initiales du substrat et de l'enzyme.
- déterminer l'effet du mode de conduite de polymérisation (discontinu, en continu et en semi continu) sur le rendement de la réaction.

Ainsi, pour réaliser ces objectifs, plusieurs investigations ont été menées :

- dans une première étape, la diafiltration de lignosulfonates commerciaux en cascade utilisant différents seuils de coupure a été réalisée. Par la suite, le comportement en solution, la composition chimique et les propriétés physicochimiques des différentes fractions ont été déterminés par différentes techniques physicochimiques et leurs performances (tension de surface, propriétés antioxydantes ...) ont été comparées.
- dans une deuxième partie, une étude cinétique de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates a été effectuée pour quantifier les effets de plusieurs facteurs importants pouvant influencer les performances des réactions de synthèse. Ces facteurs sont l'origine et la concentration de la laccase (*Trametes versicolor*, *Myceliophthora thermophila* et *Rhus vernicifera*), la distribution moléculaire initiale du substrat et sa concentration et l'utilisation ou non d'un médiateur (l'acide violurique, l'acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique), le 1-hydrobenzotriazole, l'acétosyringone et l'acétovanillone).
- dans une troisième étape, l'étude cinétique de différents modes de conduite de la réaction de polymérisation enzymatique des lignosulfonates a été reportée. Les réactions en continu, en discontinu et en semi continu ont été étudiées. L'évolution de l'oxygène consommé par la laccase, de l'oxydation des groupements phénoliques, de la distribution moléculaire et de la polydispersité au cours du temps a été quantifiée et comparée pour en déterminer le mode le plus approprié selon les objectifs applicatifs recherchés.



*CHAPITRE I*

*ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE*



# **Chapitre I : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

<b>INTRODUCTION</b>	<b>5</b>
<b>I.1 LES LIGNOSULFONATES : ORIGINE, STRUCTURE ET PROPRIÉTÉS</b>	<b>5</b>
<b>I.1.1 PROCÉDÉS DE PRODUCTION DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>5</b>
<b>I.1.2 RÉCUPÉRATION DES LIGNOSULFONATES A PARTIR DE LA LIQUEUR NOIRE</b>	<b>6</b>
<b>I.1.2.1 METHODE DE PRECIPITATION</b>	<b>7</b>
<b>I.1.2.2 FRACTIONNEMENT MEMBRANAIRE</b>	<b>8</b>
<b>I.1.2.3 EXTRACTION AMINE</b>	<b>12</b>
<b>I.1.3. STRUCTURE ET COMPORTEMENT DES MACROMOLÉCULES</b>	<b>13</b>
<b>I.1.3.1 STRUCTURE DES MONOMERES DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>13</b>
<b>I.1.3.2 GROUPEMENTS FONCTIONNELS DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>14</b>
<b>I.1.3.3 COMPORTEMENT ET STRUCTURE GLOBALE DES MACROMOLECULES DE LIGNOSULFONATES</b>	<b>15</b>
<b>I.1.4 PROPRIÉTÉS DES LIGNOSULFONATES ET LEURS APPLICATIONS</b>	<b>17</b>
<b>I.1.4.1 TEMPERATURE DE TRANSITION VITREUSE</b>	<b>17</b>
<b>I.1.4.2 SOLUBILITE DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>18</b>
<b>I.1.4.3 DISTRIBUTION DES MASSES MOLECULAIRES</b>	<b>18</b>
<b>I.1.4.4 ACTIVITES DE SURFACE</b>	<b>18</b>
<b>I.1.4.5 PROPRIETES ANTIOXYDANTES ET ANTIFONGIQUES DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>19</b>
<b>I.1.4.6 PROPRIETES COMPLEXANTES DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>20</b>
<b>I.1.5 APPLICATIONS DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>21</b>
<b>I.2 MÉTHODES DE CARACTÉRISATION DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>22</b>
<b>I.2.1 CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STÉRIQUE</b>	<b>22</b>
<b>I.2.2 SPECTROSCOPIE INFRAROUGE</b>	<b>25</b>
<b>I.2.3 RÉSONANCE MAGNETIQUE NUCLÉAIRE</b>	<b>28</b>
<b>I.3. MODIFICATION DE LA DISTRIBUTION MOLÉCULAIRE DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>29</b>
<b>I.3.1 FRACTIONNEMENT DES LIGNOSULFONATES PAR PROCÉDÉS MENBRANAIRES</b>	<b>30</b>
<b>I.3.2 POLYMÉRISATION ENZYMATIQUE DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>32</b>
<b>I.3.2.1 LA LACCASE</b>	<b>32</b>
<b>I.3.2.2 MEDIATEUR</b>	<b>35</b>
<b>I.3.2.3 MECANISME DE POLYMERISATION</b>	<b>38</b>
<b>I.3.2.4 POLYMERISATION DES LIGNOSULFONATES PAR LES LACCASES</b>	<b>39</b>
<b>I.3.2.5 ETUDE DES PARAMETRES AFFECTANT L'OXYDATION ENZYMATIQUE DES LIGNOSULFONATES</b>	<b>46</b>
<b>CONCLUSION</b>	<b>50</b>

## **FIGURES**

Figure I. 1 Procédé de récupération des lignosulfonates à partir de la liqueur noire au bisulfite	8
Figure I. 2 Schéma représentatif de la récupération des lignosulfonates par ultrafiltration	11
Figure I. 3 Représentation schématique de l'extraction de lignosulfonates par extraction amine	12
Figure I. 4 Structure typique des lignosulfonates	13
Figure I. 5 Schéma représentant la forme générale des macromolécules de lignosulfonates	16
Figure I. 6 La formation de complexes multicovalents avec des groupements donneurs des lignosulfonates	20
Figure I. 7 Structure des modèles de lignosulfonates étudiés par RMN	28
Figure I. 8 Structure d'un monomère de la laccase de <i>Trametes versicolor</i>	33
Figure I. 9 Les médiateurs synthétiques les plus utilisés en industrie	35
Figure I. 10 L'oxydation d'un composé modèle de la lignine non phénolique par le système médiateur laccase	36
Figure I. 11 Les médiateurs naturels les plus utilisés	37

## **TABLEAUX**

Tableau I. 1 Récupération des lignosulfonates par méthodes membranaires	9
Tableau I. 2 Groupements de la structure typique des lignosulfonates	14
Tableau I. 3 Les groupements fonctionnels dans des lignosulfonates de différents fournisseurs	15
Tableau I. 4 Analyse des lignosulfonates par SEC	23
Tableau I. 5 Groupements fonctionnels des lignosulfonates déterminés par infrarouge	26
Tableau I. 6 Fractionnement des lignosulfonates par procédés membranaires	31
Tableau I. 7 Polymérisation des lignosulfonates et de diverses lignines	41
Tableau I. 8 Polymérisation par le système laccase médiateur	44
Tableau I. 9 Les laccases utilisées dans la polymérisation des lignosulfonates	47
Tableau I. 10 Caractéristiques des lignosulfonates étudiés	49

## **CHAPITRE I**

### **ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

---

#### **Introduction**

Comme mentionné précédemment, les lignosulfonates sont des polymères polyphénoliques, produits de la dégradation de la lignine par le procédé au bisulfite. Ces biopolymères conservent la structure très complexe et riche en groupements fonctionnels des lignines. La présence des groupements sulfoniques leur confèrent des propriétés différentes ou/et améliorées et un comportement différent en solution.

Le travail de thèse se focalise essentiellement sur la modification de la distribution moléculaire des lignosulfonates par séparation membranaire et par oxydation enzymatique.

Cette étude bibliographique sera focalisée, dans une première partie, sur les procédés de fabrication de la pâte au bisulfite, de la récupération des lignosulfonates à partir de la liqueur noire et sur la structure, les propriétés et les applications de ces biopolymères. Dans une seconde partie, les procédés de modification des lignosulfonates, dont le but est de diminuer leur hétérogénéité structurale et moléculaire, seront récapitulés.

#### **I.1 Les lignosulfonates : origine, structure et propriétés**

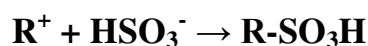
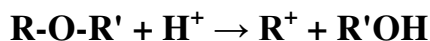
##### **I.1.1 Procédés de production des lignosulfonates**

Le procédé de fabrication de la pâte à papier génère de grands volumes de liqueur noire et des effluents qui constituent la source la plus abondante de lignines industrielles. Cette forme de digestion permet de récupérer la pâte de cellulose également appelée pâte à papier. Dans le procédé au bisulfite les espèces actives de délignification sont le dioxyde de soufre (anhydride sulfureux) ( $\text{SO}_2$ ), les ions sulfite d'hydrogène ( $\text{HSO}_3^-$ ) et les ions sulfite ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) [1]. Ces conditions chimiques peuvent être atteintes avec des mélanges d'acide sulfureux et de bisulfite sous la forme de calcium, de magnésium, de sodium ou d'ammonium. La digestion est réalisée sous de hautes pressions et dans des récipients construits en matériaux résistants aux acides et à des températures élevées (environ  $150^\circ\text{C}$ ). Le procédé au bisulfite le plus utilisé est à base d'acide au bisulfite de calcium. Il présente plusieurs

avantages notamment la possibilité de travailler dans la quasi-totalité de la gamme de pH. Quatre conditions de mise en œuvre sont utilisées :

1. *La pâte au bisulfite acide* - a un pH de 1 à 2, à la suite d'un excès de SO<sub>2</sub> libre. Presque toutes les formes de bisulfite peuvent être utilisées.
2. *La pâte au bisulfite* - il n'y a pas d'excès de SO<sub>2</sub> libre et le pH est compris entre 2 et 6. Le magnésium est la base couramment utilisée dans cette fabrication de pâte et, dans certains cas le bisulfite de sodium et d'ammonium peuvent également être utilisés.
3. *La pâte au bisulfite neutre* - le pH est de l'ordre de 6 à 9.
4. *La fabrication de pâte sulfite alcalin* - la liqueur de cuisson consiste en du sulfite de sodium, de l'hydroxyde de sodium et / ou du carbonate de sodium. Le pH est compris entre 9 et 13. Ce type de délignification est généralement catalysé par l'anthraquinone.

Le clivage des liaisons éthers lors du procédé au bisulfite produit des carbocations. Ces carbocations électrophiles produits au cours de cette acidification réagissent avec les ions bisulfite (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) pour obtenir des groupements sulfonâtes :



Le principal site pour les liaisons éthers est le carbone  $\alpha$  de la chaîne latérale du propyle. Ces réactions mènent à des structures et des mélanges très complexes.

### **I.1.2 Récupération des lignosulfonates à partir de la liqueur noire**

Les lignosulfonates sont récupérés de la liqueur noire issue du procédé au bisulfite. La liqueur noire contient des déchets solubles, dont la partie principale est constituée de composants non celluloses du bois (polysaccharides, sulfure, solvants, aldéhydes, acide uronique, résines, acides volatiles et autres...) et principalement de lignosulfonates, ainsi que des hémicelluloses, présentes sous forme partiellement ou totalement hydrolysée [2].

La récupération des lignosulfonates à partir de la liqueur noire se fait par plusieurs méthodes notamment, par procédé d'échange d'ions [3], par précipitation, par fractionnement

membranaire ou par extraction. Dans cette étude bibliographique, les procédés basés sur la précipitation, l'extraction et le fractionnement membranaire sont détaillés.

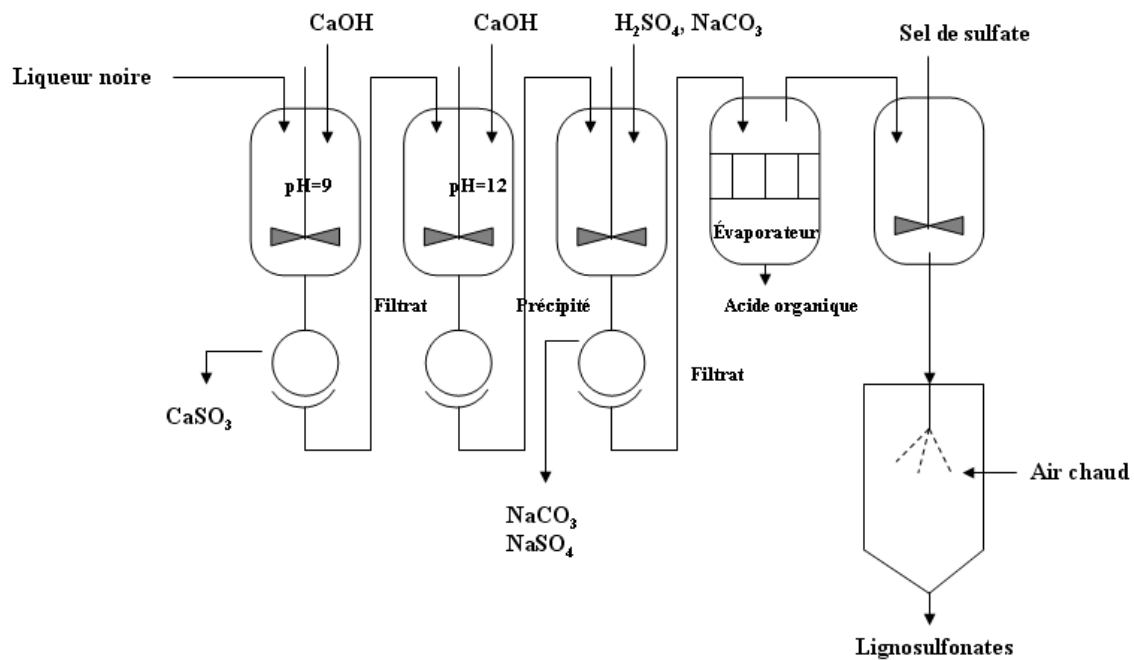
### **I.1.2.1 Méthode de précipitation**

La méthode de précipitation est un procédé en continu qui se fait en plusieurs étapes (**Figure I.1**) [4]:

-La première étape consiste à traiter la liqueur noire avec de l'hydroxyde de calcium à un pH 9, afin de précipiter le calcium inorganique et le sulfure en sulfite de calcium, qui est retiré par filtration sous vide et recyclé.

-Le filtrat récupéré de la première étape est pompé dans un second réservoir de précipitation où l'hydroxyde de calcium est rajouté pour modifier le pH à 12 ce qui fait précipiter les lignosulfonates de calcium, qui seront récupérés par une seconde filtration sous vide.

-Après filtration, les lignosulfonates précipités sont recyclés dans un réservoir pour être traités avec du carbonate de sodium et de l'acide sulfurique afin de précipiter le calcium en carbonate de calcium et en sulfate de calcium qui sont par la suite filtrés et séparés du reste. Les acides organiques sont évaporés dans un évaporateur afin de les éliminer de la solution de lignosulfonates. Un sel de sulfate (ammonium, sodium, calcium, chromium ou d'autres) est rajouté pour produire les lignosulfonates. Par la suite la solution est évaporée et séchée afin d'obtenir la poudre de lignosulfonates.



**Figure I.1** Procédé de récupération des lignosulfonates à partir de la liqueur noire au bisulfite.

### I.1.2.2 Fractionnement membranaire

L'ultrafiltration a été étudiée par plusieurs auteurs et considérée comme étant une technique économique et moins polluante [5-9] pour la récupération des lignosulfonates. Elle peut être effectuée en continu ou en discontinu. Le **Tableau I.1** regroupe les conditions opératoires de différentes études utilisant des techniques membranaires comme méthode de récupération des lignosulfonates.



**Tableau I.1** Récupération des lignosulfonates par des méthodes membranaires à partir des liqueurs noires. (UF) Ultrafiltration, (NF) Nanofiltration.

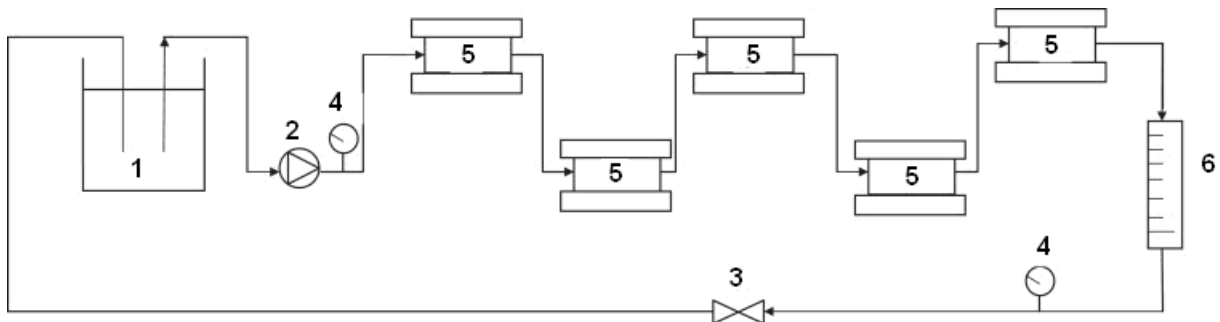
Technique de séparation	Membranes	Seuils de coupure	Conditions opératoires				Référence
			Solvant	Température	Pression	Volume de lavage	
UF/NF	Acétate de cellulose Polysulfone Polymère composite fluoré	0,4kDa -20 kDa	Eau	25 °C	2-26 bars	-	[6]
UF	Acétate de cellulose Polysulfone Polymère composite fluoré	1kDa -100 kDa	Eau	25°C	0,2 bars	5 fois	[9]
UF	Cellulose Polyethersulfone	1kDa -100 kDa	Eau	45 °C	4 bars	-	[10, 11]
UF	Polysulfonamide	10kDa-50 kDa	Eau	25 °C	1–32 bars	-	[12]
UF	Cellulose acétate Céramique Fibre de verre	1-100 kDa	Eau	40- 55°C	-	-	[7, 8]
UF	Polysulfone	-	Eau	25 °C	-	-	[13]

UF/NF	Polyamide aromatique	0,4-20 kDa	Eau	40°C	6 bars	-	[14]
UF	Polyalcool vanylique Polysulfone Polysulfone	25-65 kDa	Eau	55°C	-	-	[15]
UF	Polyvinylidene fluoide Cellulose Polyethersulfone Polyamide	3 kDa-300 kDa	Eau	26-28°C	5 bars	-	[16]

Wilde et al. [8] ont utilisé des membranes d'ultrafiltration de différents seuils de coupure pour la récupération des lignosulfonates de la liqueur de bisulfite de calcium. La liqueur au bisulfite forme une membrane dynamique qui diminue la perméabilité de la membrane.

Bhattacharya et al. [9] ont utilisé des membranes d'ultrafiltration à base de polysulfone, d'acétate de cellulose et de polymère fluoré. Les seuils de coupure étaient de 1, 5, 10, 20, 25, 50 et 100 kDa. La diafiltration a été utilisée comme technique afin de concentrer et de purifier les lignosulfonates. Les membranes de seuil de coupure entre 20 et 100 kDa ont retenu entre 80 et 84% des lignosulfonates. Les effets de la pression transmembranaire, de la dilution, du type de membrane sur le flux et sur la rétention ont été reportés. La diafiltration en continu sur une membrane de grand seuil de coupure (100 kDa) conduit à un flux régulier et une bonne rétention des lignosulfonates.

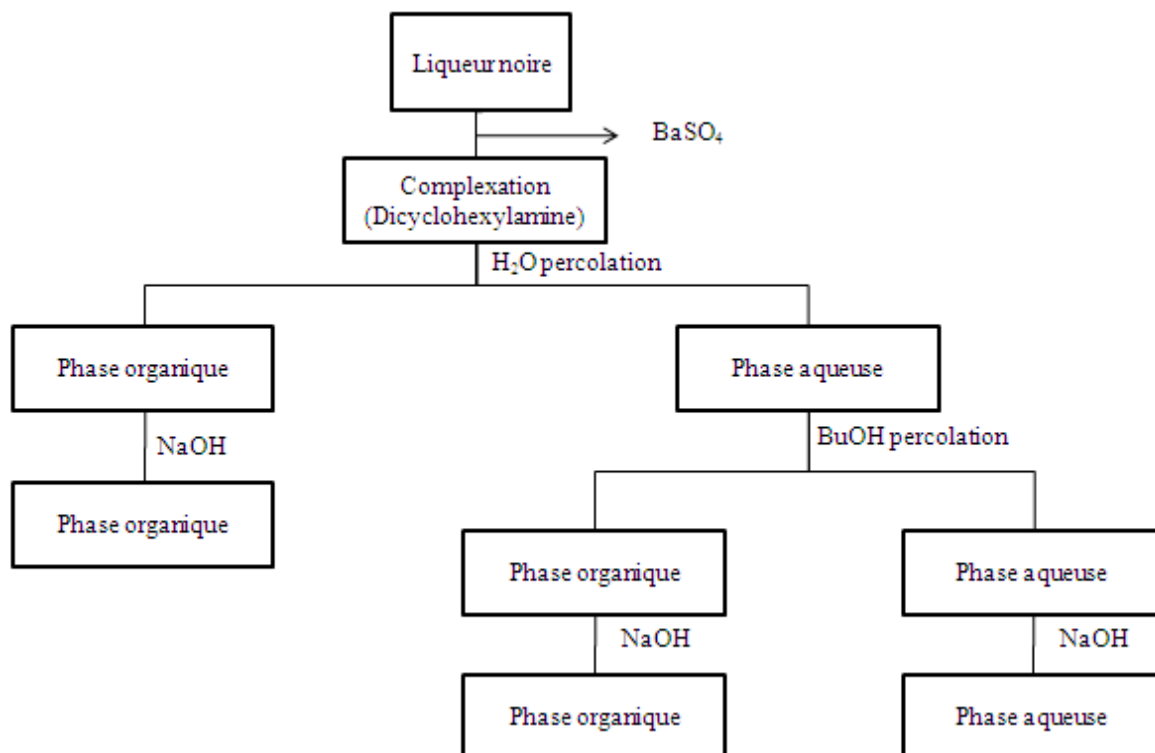
La **figure I.2** est un exemple de schéma représentatif de l'ultrafiltration de la liqueur noire.



**Figure I.2** Schéma représentatif de la récupération des lignosulfonates par ultrafiltration (UF). (1) réservoir d'alimentation contenant la liqueur noire, (2) pompe à palettes, (3) vanne à aiguille, (4) jauges de pression, (5) membrane d'ultrafiltration, (6) débitmètre.

### I.1.2.3 Extraction amine

Les lignosulfonates peuvent aussi être récupérés par extraction amine (**Figure I.3**). Ils réagissent avec l'amine pour former de l'acide lignosulfonique aminé qui n'est pas soluble dans l'eau. Les lignosulfonates sont extraits par la suite par extraction liquide-liquide. Cependant, cette méthode a plusieurs inconvénients comme la difficulté de l'élimination de l'amine, la formation de NaCl au cours de l'extraction de l'amine, la formation de mousse et le temps important d'extraction [17-20].



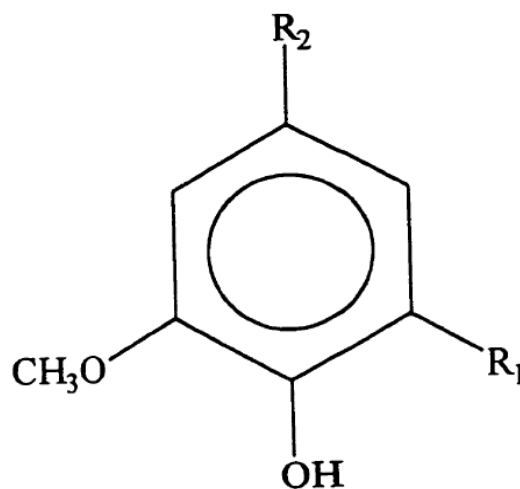
**Figure I.3** Représentation schématique de l'extraction de lignosulfonates par extraction amine [11]. Les lignosulfonates sont récupérés dans les phases organiques. Des traces de lignosulfonates peuvent aussi être décelées dans les phases aqueuses.

### I.1.3. Structure et comportement des macromolécules

La structure globale de la lignine et des lignosulfonates est complexe et n'est pas encore totalement élucidée. La plupart des études ont montré que les lignines notamment les lignosulfonates sont des polymères tridimensionnels constitués de réseaux hétérogènes [21, 22]. A ce jour, les études effectuées sur la structure des lignosulfonates sont limitées et se sont focalisées sur leurs monomères, leurs groupements fonctionnels et leurs structures macromoléculaires.

#### I.1.3.1 Structure des monomères des lignosulfonates

Les premières études sur la structure des monomères de lignosulfonates ont été effectuées par Mothershead et al. [23]. Ces auteurs ont isolé et identifié des unités monomères des lignosulfonates extraits à partir de l'*Alnus Rubra Bong*. Ainsi, la préparation des lignosulfonates se fait par chauffage des morceaux de l'arbuste dans une solution aqueuse de bisulfite de sodium. Ils ont distingué une série de lignosulfonates monomériques à partir de la matrice de base comme le montre la **figure I.4**.



**Figure I.4** Structure typique des lignosulfonates

Les groupements  $R_1$  et  $R_2$  sont identifiés dans le **tableau I.2**.

**Tableau I.2** Groupements de la structure typique des lignosulfonates.

$R_1$	$R_2$	Monomère
H	$\text{CH}(\text{SO}_3\text{Na})\text{CH}=\text{CH}_2$	vinyl vanillyl sulfonate
$\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{SO}_3\text{Na})\text{CH}=\text{CH}_2$	vinyl syringyl sulfonate
H	$\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$	coniferyl sulfonate
$\text{OCH}_3$	$\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$	sinapyl sulfonate
H	$\text{CH}(\text{SO}_3\text{Na})\text{CH}_2-\text{CHO}$	coniferylaldéhyde sulfonate
$\text{OCH}_3$	$\text{CH}(\text{SO}_3\text{Na})\text{CH}_2-\text{CHO}$	sinapalaldéhyde sulfonate

Les quantités relatives des différentes unités structurales des lignosulfonates sont difficiles à déterminer. Le vinyl syringyl sulfonate apparaît comme étant le constituant monomérique majeur des lignosulfonates obtenue après la première étape de sulfonation.

### I.1.3.2 Groupements fonctionnels des lignosulfonates

Les groupements fonctionnels sont à l'origine des propriétés des lignosulfonates et donc la connaissance de leurs distributions sur la macromolécule est importante. Outre, les groupements hydrophobes (groupements méthoxyles, carbonyles et les chaînes aliphatiques), il y a un grand nombre de groupements hydrophiles (sulfoniques, carboxyliques, et hydroxyles) existant dans les lignosulfonates. La proportion de ces groupements dépend de l'origine et des procédés de récupération [24]. Les pourcentages des groupements fonctionnels les plus étudiés dans différents lignosulfonates de différentes origines et sels associés sont regroupés dans le **tableau I.3**.

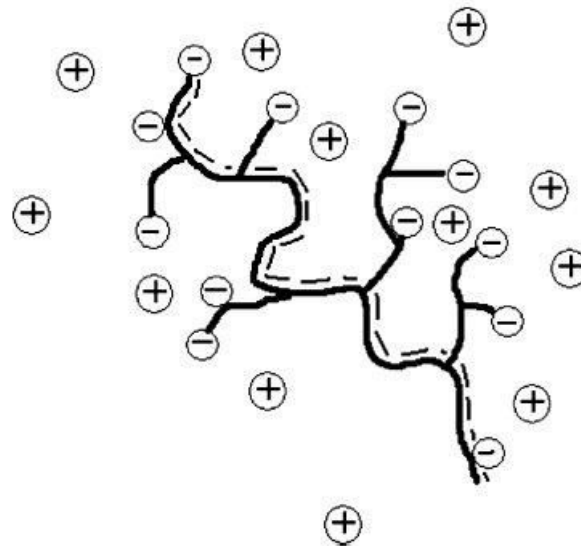
**Tableau I.3** Les groupements fonctionnels dans des liginosulfonates de différents fournisseurs. (LS) Liginosulfonates.

Origine	Fournisseur	Groupements SO <sub>3</sub> (%)	Groupements COOH (%)	Groupements OH-Ph (%)	Référence
LS de Calcium	Ligno-Tech Iberica	12,2	4,5	2,5-1,8	[25]
LS de Calcium	Guangzhou papermaking	10,3-4,4	17,1-2,4	2,0-1,3	[26]
LS de Sodium	Borregaard LignoTech	7,1-6,2	5,9-4,5	2,4	[27]
LS de Magnésium	Chemische Werke Zell-Wildshausen	-	-	2,2-3,9	[10]
LS de Calcium	Borregaard LignoTech	-	7,5	1,9	[28]

On remarque que la quantité de liginosulfonates varie en fonction de l'origine du bois et du sel associé. L'hétérogénéité, la structure non linéaire et la variation du poids moléculaire des liginosulfonates, sont aussi à l'origine de la variation des groupements fonctionnels.

### I.1.3.3 Comportement et structure globale des macromolécules de liginosulfonates

Les liginosulfonates sont des macromolécules très complexes, formés par clivage des liaisons  $\alpha$ -O-4 qui constituent le réseau infini des lignines, et une sulfonation des positions  $\alpha$  et/ou  $\gamma$  dans les chaînes latérales. Les molécules de liginosulfonates en solution s'agrègent pour former une macromolécule de forme plus au moins sphérique ou ellipsoïdale avec les groupements sulfonates positionnés sur la surface entourant les squelettes aromatiques [29, 30] (**figure I.5**).



**Figure I.5** Schéma représentant la forme générale des macromolécules de lignosulfonates. Les cercles indiquent les groupements sulfoniques. Les tirets décrivent la plus longue chaîne continue [30].

La structure des lignosulfonates a fait l'objet de plusieurs études. Olleman et al. [31] ont postulé, à partir de mesures de coefficient de distribution (loi de Fick) que les lignosulfonates sont de formes non sphériques par la détermination du diamètre des particules selon l'équation de Stokes-Stutherland-Einstein. Ce postulat a été appuyé par d'autres études. Ainsi, Moacanin et al. [32] ont étudié différentes fractions de lignosulfonates en solution et ont établi une relation entre les poids moléculaires et les coefficients de diffusion de ces molécules. Ces auteurs ont considéré que les lignosulfonates sont formés de chaînes non rigides de forme non sphériques.

Goring et al. [33] ont démontré que les lignosulfonates de grandes masses moléculaires en solution se composent de réticulations linéaires des chaînes d'unités de propane. Cette équipe a également [34] réalisé des observations par microscopie électronique et a rapporté que les lignosulfonates forment des macromolécules de formes irrégulières et de tailles différentes. Ces macromolécules ont des tailles moyennes d'environ 2 nm d'épaisseur. Par ailleurs, le diamètre varie d'une macromolécule à une autre.

Myrvold et al. [30], à partir de la théorie des lois d'échelles, introduite par Gennes (1979), proposent que les lignosulfonates sont des polyélectrolytes ramifiés. La théorie des lois d'échelles décrit le comportement de macromolécules de lignosulfonates en solution et détermine une relation directe entre leurs masses moléculaires et leurs propriétés en solution. Ces auteurs [30] montrent que la plus longue chaîne de la molécule de lignosulfonates représente l'épine dorsale, à laquelle d'autres chaînes latérales sont rattachées. Dans cette



structure, la plus longue chaîne est moins sulfonée que les chaînes latérales et, par conséquent, plus hydrophobe [30]. Par ailleurs, la concentration en sels d'un solvant aurait un effet sur le comportement des molécules de lignosulfonates, puisque la répulsion électrostatique entre les molécules voisines serait réduite par les forces ioniques. Cet effet limite l'expansion de la molécule de lignosulfonates. L'ajout de sel à une concentration bien déterminée permet de transformer la macromolécule de lignosulfonates d'un polyélectrolyte ramifié chargé à un polymère ramifié non chargé. Les lignosulfonates sont aussi définis comme étant des particules molles. Les particules molles sont définies comme des particules ellipsoïde qui ont un noyau dense entouré par une couche de surface moins dense de chaînes polymères contenant des groupes hydroxyle et sulfonique [33, 35, 36].

#### **I.1.4 Propriétés des lignosulfonates et leurs applications**

Dans la littérature, les lignosulfonates sont connus pour leurs nombreuses propriétés et activités qui sont dues à [37-39]:

- La diversité des groupements fonctionnels qui constituent les molécules de lignosulfonates ainsi que la structure et la distribution des charges.
- De bonnes propriétés rhéologiques et colloïdales.
- Leur compatibilité avec d'autres produits chimiques.
- La présence d'un grand nombre de points réactifs sur leur squelette où il peut se produire plusieurs types de réactions. Ils sont aussi affectés par d'autres facteurs : le pH, l'addition d'électrolyte, la structure et les cations multivalents associés aux ions sulfoniques. Nous nous sommes principalement intéressés à quelques propriétés physico-chimiques, en l'occurrence aux activités antioxydantes et antifongiques, leurs propriétés de dispersion et de complexation.

##### **I.1.4.1 Température de transition vitreuse**

La température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est la gamme moyenne de température à laquelle de petits segments des chaînes de polymère passent d'un état caoutchouteux à un état vitreux, solide. En dessous de cette température, les molécules présentent une faible mobilité. Elle correspond à la plus grande capacité de déformation d'un polymère [40]. La lignine a un point de température de transition vitreuse qui varie considérablement en fonction de l'origine du bois et la méthode d'isolement, ces températures varient entre 135 à 190°C [41]. Ce paramètre est fortement influencé par la teneur en humidité, les traitements thermiques et la structure moléculaire [41]. Dans une étude sur des mélanges d'amidon et de lignosulfonates, la  $T_g$  des lignosulfonates a été signalée à 130 °C [42].

#### I.1.4.2 Solubilité des lignosulfonates

Les lignosulfonates sont solubles dans l'eau à une large gamme de pH. Ceci est dû à l'introduction des groupements sulfoniques durant le procédé au bisulfite. Cependant, ces molécules sont insolubles dans certains solvants organiques notamment l'éthanol et le tétrahydrofurane (THF) [43].

#### I.1.4.3 Distribution des masses moléculaires

La distribution de la masse moléculaire de la lignine isolée varie entre des valeurs inférieures à  $10^3$  Da et des valeurs supérieures à  $10^6$  Da. Les lignosulfonates sont caractérisés par une polydispersité moléculaire beaucoup plus élevée que la lignine Kraft [44]. Les données analytiques des lignines notamment les lignosulfonates sont exprimées en formule C<sub>9</sub>, depuis sa structure (unités phényle propane) contenant neuf carbones [1]. La formule C<sub>9</sub> de lignosulfonates résineux a été signalée comme C<sub>9</sub>H<sub>11.18</sub>O<sub>4.94</sub>N<sub>0.03</sub>S<sub>0.40</sub>(OCH<sub>3</sub>)<sub>0.73</sub> avec un monomère de masse moléculaire de 220,89 mol/g [25]. La distribution des masses moléculaires est un facteur important dans l'utilisation des lignosulfonates comme colloïdes industriels, additifs, dispersants, adhésifs, diluants et gélifiants [45].

#### I.1.4.4 Activités de surface

Les lignosulfonates, tout comme la lignine peuvent avoir une grande activité de surface. L'activité de surface des lignosulfonates varie en fonction du pH et de la concentration. Cette activité permet d'utiliser les lignosulfonates comme agent dispersant.

Ratinac et al. [46] ont étudié l'adsorption des lignosulfonates sur la poudre de titanium zirconate de suspensions aqueuses à différents pH. Leurs résultats montrent que la quantité de lignosulfonates adsorbée sur la poudre de titanium zirconate diminue avec l'augmentation du pH.

Des études antérieures [26, 47-49] ont également démontré que le poids moléculaire et la structure des lignosulfonates influencent leurs propriétés de surface. L'activité de surface des lignosulfonates en solution aqueuse dépend de la composition et du poids moléculaire. La capacité d'adsorption et la stabilité de certaines particules solides (comme le béton, le charbon, et les particules de TiO<sub>2</sub>) augmentent lorsque les lignosulfonates sont utilisés comme dispersants.

L'oxydation et la sulfomethylation peuvent aussi améliorer l'activité de surface et le pouvoir moussant des lignosulfonates [48]. En comparaison avec lignosulfonates de calcium

non modifiés, les capacités d'adsorption des lignosulfonates de calcium oxydés, et sulfométhylés sur le béton ont été améliorées. La sulfomethylation et l'oxydation peuvent améliorer la capacité de dispersion des lignosulfonates de calcium dans des suspensions en béton, mais l'hydroxyméthylation des lignosulfonates de calcium affaiblit cette capacité de dispersion. Cependant, les travaux de recherches concernant l'effet d'autres réactions sur les propriétés physico-chimiques des lignosulfonates sont très limités.

#### **I.1.4.5 Propriétés antioxydantes et antifongiques des lignosulfonates**

La recherche de nouvelles applications potentielles des lignosulfonates dans différentes industries est d'une grande importance. Leurs pouvoirs antioxydants et antifongiques leur confèrent des avantages potentiels pour la santé et les applications industrielles et donc font d'eux une ressource de recherches prometteuses.

Thobunluepop et al. [50] ont étudié le pouvoir antifongique de mélange de lignosulfonates, d'eugénol et de chitosan afin de palier les effets phytotoxiques de certaines espèces fongiques comme *Alternaria podwicki*, *Rhizoctonia solani*, *Sp Curvularia*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus niger* sur les graines de riz. Les résultats obtenus montrent que l'association des lignosulfonates à l'eugénol et au chitosan a un important effet inhibiteur contre ces espèces fongiques.

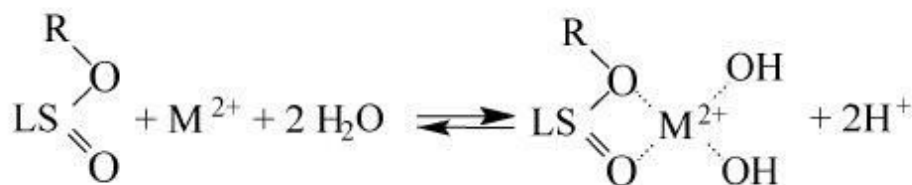
De nombreux mécanismes de défense ont été mis au point dans les organismes vivants afin de limiter les niveaux des espèces réactives oxygénées et les dommages qu'ils infligent. En plus de ces mécanismes endogènes, une grande attention a été accordée au pouvoir antioxydant de certains composés naturels. Pour confirmer que la lignine exerce son activité de protection par action antioxydante, plusieurs tests de pouvoir antioxydant notamment la peroxydation des lipides ont été effectués. Dans l'étude menée par Vinardell et al. [51], des cellules d'érythrocytes exposées au peroxyde d'hydrogène, en présence ou en absence de lignosulfonates, ont été testées. Il a été démontré que les lignosulfonates présentaient un bon pouvoir antioxydant.

Cependant, il a été signalé que le poids moléculaire, l'hétérogénéité et la polydispersité sont des facteurs qui réduisent l'activité anti-radicalaire [52]. Le poids moléculaire élevé, peut être considéré comme l'un des les principaux facteurs réduisant l'activité de piégeage de radicaux. En raison de la complexité moléculaire des lignosulfonates, il est difficile de déterminer une activité antioxydante exacte en comparaison à d'autres composés de structure connue, à titre d'exemple les tanins et les flavonoïdes [53].

L'inhibition de l'hémolyse induite par l'AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride) en présence de lignosulfonates en solutions à différentes concentrations a été étudiée [51]. En plus d'être inoffensifs sur les yeux et la peau, il a été observé que les lignosulfonates présentent un important pouvoir antioxydant. Ces propriétés intéressantes des lignosulfonates leur permettent d'être utilisés dans les produits cosmétiques et des médicaments topiques.

#### I.1.4.6 Propriétés complexantes des lignosulfonates

Les propriétés complexantes des lignosulfonates étudiées jusqu'à ce jour s'appliquent aux métaux [54]. Les lignosulfonates forment des complexes stables avec des métaux de transition ( $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  et  $Cu^{2+}$ ). Ces macromolécules contiennent dans leurs unités structurales des groupements donneurs (groupements méthoxyles, carbonyles et phénoliques), qui peuvent interagir avec des atomes d'oxygène et des cations ayant des orbitales vacantes (**Figure I.6**). En fait, les lignosulfonates peuvent être considérés comme des liants contenant des sites de groupements donneurs de compositions chimiques différentes.



**Figure I.6** La formation de complexes multicovalents avec des groupements donneurs des lignosulfonates.

En raison de leur forte solubilité dans l'eau et la présence de sites donneurs, les lignosulfonates sont utilisés comme complexants bon marché et non toxiques dans la préparation d'agents de pulvérisation pour l'alimentation des plantes. Les groupements fonctionnels capables d'interagir comme donneur-accepteur, sont les groupements méthoxyles (~12-13%) et les groupements hydroxyles. Le contenu en groupements hydroxyles phénoliques est en moyenne, de 2,5 à 3 fois plus faible que le contenu en groupements méthoxyles, et la teneur totale des groupements carbonyles, ne dépasse pas la moitié de la teneur en groupements méthoxyles. Ainsi, dans les lignosulfonates, les atomes d'oxygène capables de donner une paire d'électron au cation est d'environ ~25%. Shul'ga et al. [54] ont reporté des mesures de pouvoir complexant des lignosulfonates de calcium par méthode

potentiométrique. Les complexes formés avec les métaux se font majoritairement avec les groupements hydroxyles.

### **I.1.5 Applications des lignosulfonates**

Les propriétés citées dans le paragraphe précédent élargissent l'utilisation des lignosulfonates à plusieurs applications. Les applications techniques des lignosulfonates industriels comprennent les domaines des thermoplastiques, des résines adhésives, des fibres de carbone, des additifs de ciment, des matériaux absorbants et actifs, des médicaments antioxydants, des freins de l'automobile, des mastics, des mousses de polyuréthane, des charges de caoutchouc, des tensioactifs, des dispersants, du blindage électrique et des plaques des batteries de stockage [25, 37, 55-57] :

- La plus grande utilisation des lignosulfonates repose sur leur effet dispersant pour les particules de ciment dans le béton, ce qui représente environ 50% de l'utilisation des lignosulfonates à travers le monde [58]. L'ajout de lignosulfonates à un mélange de béton améliore sa viscosité et réduit la quantité d'eau [58, 59]. Les lignosulfonates sont aussi utilisés dans la production de réducteurs d'eau et d'additifs qui réduisent la quantité d'eau pour atteindre une certaine fluidité dans le béton [60, 61].
- La fabrication de plastiques biodégradables à base de protéines de soja et de lignosulfonates ainsi que la production de films biodégradables à partir d'un mélange de lignosulfonates - amidon présentent des avantages par rapport aux matériaux synthétiques dans le secteur de l'emballage [42, 62-64].
- Les lignosulfonates peuvent être considérés comme un polymère phénolique condensé, et donc utilisés pour la production de résine à la place des phénols. Les résines à base de lignosulfonates présentent de meilleures propriétés mécaniques et d'étanchéité [65, 66]. D'un point de vue structural, la présence de groupements sulfoniques fonctionnels dans une structure très polaire et hydrophobe, confère des propriétés de solubilité dans l'eau et donc une activité de surface importante [42, 45, 56].
- Les lignosulfonates sont utilisés dans la fabrication d'implants médicaux et des systèmes de libération contrôlée de médicaments [63].

D'autre part, les lignosulfonates peuvent être également utilisés dans la production de produits de chimie fine (vanilline, pyrocatechine ...) [67,68], ainsi que sous forme de liants

dans les aliments en raison de leurs propriétés antioxydantes et leurs capacités comme séquestrant d'ions métalliques.

## **I.2 Méthodes de caractérisation des lignosulfonates**

Il y a un besoin important de caractériser les lignines et notamment les lignosulfonates afin d'avoir une meilleure compréhension des propriétés physiques et chimiques de ces macromolécules. Un grand nombre de méthodes d'analyses a été développé à des fins analytiques ou industrielles, à titre d'exemples, la détection des lignosulfonates dans les effluents des industries de papeterie, l'élucidation des changements structuraux dans les lignosulfonates au cours d'un procédé de modification, ou l'identification des propriétés qui peuvent influencer sur une formulation lors de leurs utilisations. Plusieurs approches analytiques existent pour la caractérisation des lignosulfonates. Dans les paragraphes suivants, les techniques les plus prometteuses sont discutées.

### **I.2.1 Chromatographie d'exclusion stérique**

La connaissance de la distribution des poids moléculaires des lignosulfonates est importante dans l'élucidation de leurs propriétés macromoléculaires et pour une meilleure compréhension de leurs comportements dans différents procédés physiques, chimiques et biologiques. Durant les dernières années, des efforts importants ont été réalisés pour déterminer la distribution des poids moléculaires des lignosulfonates. Dans la chromatographie à exclusion stérique (SEC), la séparation régit uniquement par le principe de l'exclusion de taille. Toutefois, des effets tels que l'adsorption et l'exclusion d'ions peuvent affecter sérieusement les résultats obtenus [10, 69, 70].

**Le tableau I.4** récapitule les études effectuées sur les lignosulfonates par SEC et les différentes conditions opératoires. A titre d'exemple, Baumberger et al. [71] ont testé la fiabilité des méthodes d'élution et d'acquisition dans la caractérisation des lignines et notamment les lignosulfonates par SEC. Cette étude a été effectuée afin d'acquérir une meilleure compréhension des facteurs clés affectant la méthode SEC. Les résultats montrent que le système utilisant le THF comme solvant ne s'applique pas aux lignosulfonates. Les lignosulfonates peuvent seulement être dissous dans les phases mobiles aqueuses alcalines (0,5 M ou 0,1 M de NaOH). Par ailleurs, la plus forte variation des résultats de la distribution de poids moléculaire a été observée pour les lignosulfonates (9-11%) (**Tableau I.4**).

**Tableau I.4** Analyse des lignosulfonates par SEC, (LS) lignosulfonates, (LS-Mg) lignosulfonates de magnésium, (LS-NH<sub>4</sub>) lignosulfonates d'ammonium, (LS-Ca) lignosulfonates de calcium, (LS-Na) lignosulfonates de sodium, (UV) détection ultraviolet, (RI) détection d'indice de réfraction, (MALLS) la détection par angles de diffusion multiple de la lumière laser, (SDS) sodium dodecyl sulfate, (DMSO) dimethyl sulfoxide, (DMAc) N-N-Diméthylacetamide, (LiBr) bromure de lithium, (LiCl) chlorure de Sodium, (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) dibasique phosphate de sodium.

<b>Matière première/ référence</b>	<b>Colonne (gel)</b>	<b>Conditions opératoires</b>	<b>Phase Mobile</b>	<b>Calibration</b>	<b>Type de détection</b>
LS-Mg [10]	polyacrylate methacrylate	T 60 °C, 0,4 mL/min	0,05M LiBr, DMSO/eau (9:1)	Pullulanes	UV-280 nm, RI et viscosimètre
LS-NH <sub>4</sub> [65]	Silice	T 25°C, 0,5 mL/min	0,05M solution de NaOH	_____	UV
LS-Na [72]	Ultradragel	0,5 mL/min	0,10M NaNO <sub>3</sub> à pH 8	Polystyrènes sulfonâtes	UV
LS-Na [60]	polydivinylbenzène	T 60°C, 1 mL/min	Solvant aqueux contenant 10% de DMSO et 0,05M de Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	_____	UV-RI- MALLS
LS [58]	polydivinylbenzène	T 60°C, 1 mL/min	Tampon phosphate DMSO/SDS, pH 10,5	LS standard	UV
LS-Ca, LS-Na [73]	Styrène divinylbenzène	T 40°C, 1mL/min	0,15M NaCl, eau	Polyacrylique	UV (280 et 220 nm)
LS-Na [74]	Silice	0,5 mL/min	0,3M NaCl, tampon phosphate (0,5M, pH 6,9)	_____	UV (280 nm)

LS [64]	Ultragegel	T 80°C, 0,8 mL/min	0,1 M NaNO <sub>3</sub> et pH 11,5	Pullulanes	RI
LS-Na, LS-Ca [70]	polydivinylbenzène	T 60°C 1 mL/min	Tampon Phosphate/DMSO/SDS pH 10,5	LS standard de masse connues	UV-RI-MALLS
LS [75]	polyacrylate methacrylate,	0.4 mL/min T 60 °C	0,05M LiBr DMSO/eau (9:1)  DMAc/LiCl 0,11M	Pullulanes	UV, RI, viscosimètre et MALLS
LS [71]	Ethylène glycol-méthacrylate, Silice	T 60°C 1 mL/min	(0,5 M ou 0,1 M de NaOH)	Polystyrènes	UV, RI et MALLS
LS [25]	Styrène-di vinylbenzène	1mL/min	Tampon Phosphate pH 7	polystyrènes	UV (254 nm)



### I.2.2 Spectroscopie infrarouge

La spectroscopie infrarouge permet de déterminer et de quantifier les groupements fonctionnels des lignines et des lignosulfonates, ce qui permet d'établir une relation groupement fonctionnel/activité.

Une étude comparative entre plusieurs types de lignines, isolées par procédé de délignification ou par procédé de récupération a montré une ressemblance de composition chimique (excepté pour les groupements sulfoniques présents dans les lignosulfonates) [76].

Le **tableau I.5** regroupe les différentes fréquences et groupements identifiés dans les lignosulfonates et les lignines cités dans la littérature.

Les unités des lignines et des lignosulfonates, unités guaiacyles et syringyles, présentent des vibrations entre  $1100\text{ cm}^{-1}$  et  $1300\text{ cm}^{-1}$ . Les fréquences de vibrations spécifiques des lignosulfonates sont celles des groupements sulfoniques vers  $1040\text{ cm}^{-1}$  et des liaisons C-S vers  $650\text{ cm}^{-1}$ .

**Tableau I.5** Groupements fonctionnels des lignosulfonates déterminés par infrarouge.

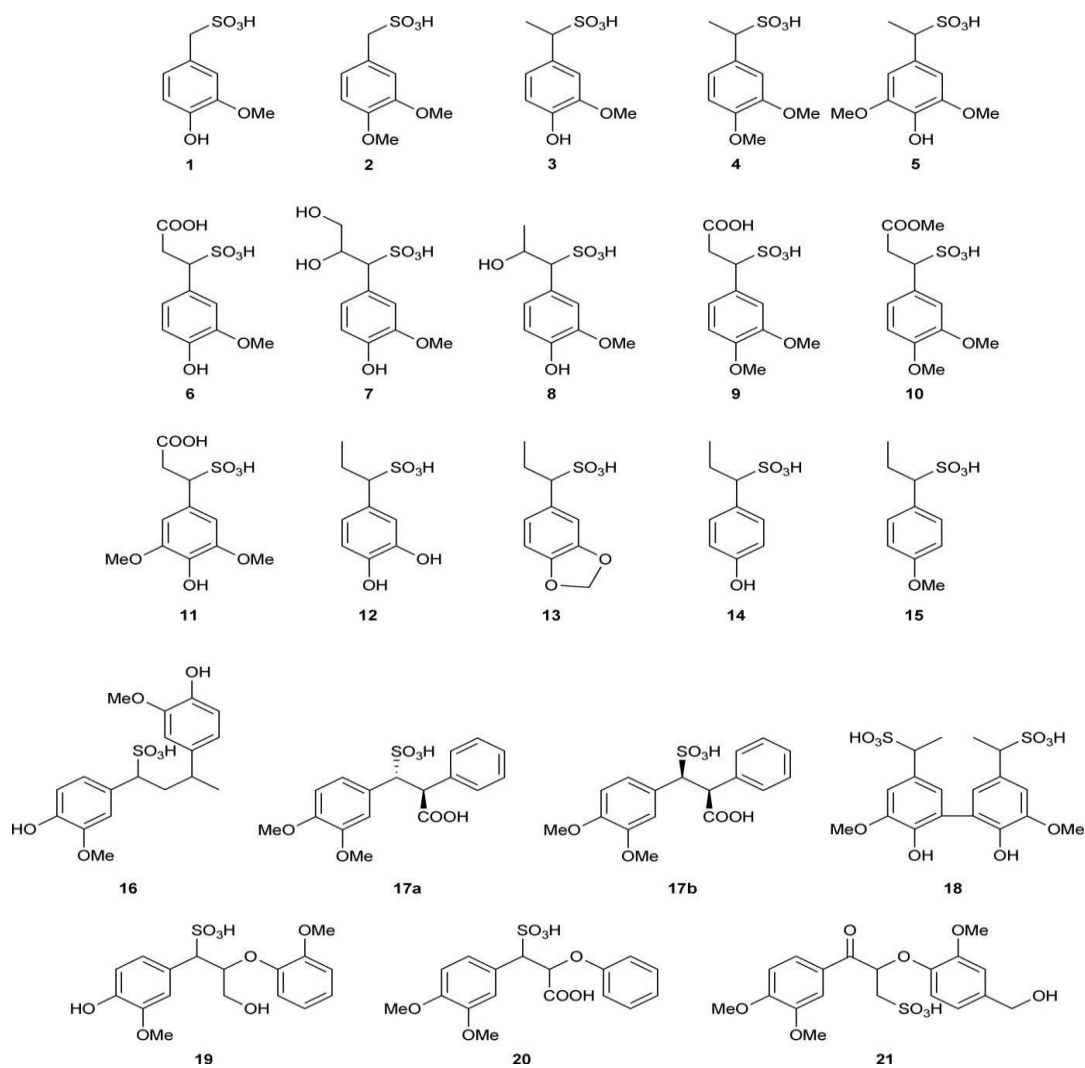
<u>Fréquence (cm<sup>-1</sup>)</u>	<u>Groupement fonctionnel</u>	<u>Mode de vibration</u>
3320- 3450	Liaison O-H	Elongation [77, 78]
2820-2940	Groupements méthyle CH <sub>3</sub> et méthylène CH <sub>2</sub>	[76, 79]
3000-2860 (a) 3000-3100 (b) 2843-2940 (c)	Liaison C-H(a)aliphatique(b) aromatique (c) des groupements OCH <sub>3</sub> et CH <sub>3</sub>	Elongation [76, 80-82]
2839-2930	Groupements méthoxyle OCH <sub>3</sub>	[65, 76, 81, 83]
1771	Groupement (-OCOCH <sub>3</sub> )	[84]
1705-1720(a) 1680(b)	Carbonyle /carboxyle (C=O, CO <sub>2</sub> H) (a)conjugué (b) non conjugué	Elongation [84]
1716-1720	CO <sub>2</sub> H non conjugué	Elongation [85]
1640-1730 1690-1738 (a) 1646-1680 (b)	C=O (a) non conjugué (b) conjugué	Elongation [76, 79, 81, 85-88]
1500-1690	Squelette aromatique	[26, 88-90]

1420-1470 (a) 1365-1375 (b) 1460-1470(c) 1030-1085 (d)	Liaisons C-H (a) des groupements OCH <sub>3</sub> et CH <sub>3</sub> (b) asymétrique (c) symétrique (d) aromatique	Déformation  [89, 91]
1365 (a)1375 (b) 1120 (c)	Liaison O-H (a) primaire (b) phénolique (c) lignosulfonate	Déformation dans le plan [91]
1330-1375 1221-1224	Groupe Syringyl (alcool sinapylique)	(CO stretching) [92, 93]
1260-1279	Groupe Guaiacyl (alcool coniferylique)	(CO stretching) [92, 93]
1210-1230	Liaisons C-O (a) Aromatique	[26, 91, 92]
1040-1060	Groupe sulfonique (caractéristique des lignosulfonates)	[80] Elongation
1167-1127	Liaison C-O-C (éther)	[86]
1200-1160 (a) 1120-1060 (a) 844 (c)	Aromatique C-H (a)de type guaiacyl (b) de type syringyl(c) de type p-hydroxy phenylpropane (alcool p-coumaryl)	Déformation [76, 84, 88] à l'extérieur du plan et à l'intérieur du plan
651-655	C-S groupe sulfonique (caractéristique des lignosulfonates)	Elongation [82, 87]

### I.2.3 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

L'analyse par RMN est une méthode très utile pour l'élucidation de la structure complexe des lignines et des liginosulfonates. Une grande bibliothèque de modèle de lignine existe. Les études sur l'analyse des liginosulfonates par RMN sont très limitées à notre connaissance (trois études).

Lutnaes et al. [94] ont préparé 15 modèles de monomères et 7 modèles de dimères sulfonés des liginosulfonates (**Figure I.7**). Ils ont été analysés par RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ . Les modèles ont été choisis de telle sorte qu'ils reflètent les différents groupements aromatiques retrouvés dans les liginosulfonates et aussi en tenant compte des modifications qui peuvent avoir lieu au cours du procédé de fabrication de pâte à papier.



**Figure I.7** Structure des modèles de liginosulfonates étudiés par RMN [94].

L'analyse RMN est surtout utilisée pour quantifier et déterminer les changements lors de la modification des lignosulfonates par un procédé.

Nugorho et al. [28] ont utilisé la RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  ainsi que la RMN 2D afin de déterminer les changements structuraux et le type de liaisons formés lors du traitement des lignosulfonates par voie enzymatique. De nouvelles liaisons éthers, C-C aryle et alkyle ont été déterminées.

La RMN  $^{31}\text{P}$  a également été utilisée pour la quantification des groupements fonctionnels lors du traitement des lignosulfonates par voie enzymatique et par ozonolyse [95].

### **I.3. Modification de la distribution moléculaire des lignosulfonates**

Comme mis en évidence dans le paragraphe I.1.5, les lignosulfonates sont des biopolymères utilisés dans plusieurs domaines et applications industriels. Cependant, des limitations et inconvénients à l'utilisation de ces macromolécules telles que la pureté, l'odeur, la couleur, l'hétérogénéité de leurs distributions moléculaires et de leurs compositions chimiques affectent leurs propriétés et applications.

L'hétérogénéité des lignosulfonates est due au clivage aléatoire que subit la lignine native lors du procédé au bisulfite. La distribution moléculaire, la concentration dans la liqueur noire et la composition chimique de ces biopolymères dépendent du type de bois utilisé et des différentes conditions opératoires appliquées dans le procédé de fabrication de la pâte à papier.

Cependant, les lignosulfonates sont moins performants que d'autres produits utilisés pour les mêmes applications tels que les dérivés pétroliers. Les facteurs cités ci-dessus limitent leurs utilisations, puisque la matière mono disperse est plus avantageuse en application industrielle et en analyse structurale.

Afin de palier ces limitations, plusieurs études se sont intéressées à transformer ces molécules en modifiant :

- Leur composition chimique, par l'incorporation de certains groupements fonctionnels par modifications chimiques ou enzymatiques afin d'introduire des sites réactifs dans la molécule tels que les groupements hydroxyles, carboxyles, et sulfoniques ou greffes de groupements polaires. En raison du grand nombre de groupements fonctionnels dans les

lignosulfonates, presque une infinité de possibilités existe. Les réactions les plus citées dans la littérature sont l'oxydation, l'hydroxyméthylation, la sulfométhylation, l'estérification, l'éthérification, l'acétylation des groupements hydroxyles, la sulfonation, l'amination et la nitration [48, 49, 96].

- La distribution moléculaire par séparation membranaire ou/et par oxydation par voie enzymatique [95] ou chimique [97]. Le poids moléculaire influence les propriétés des lignosulfonates. Des études comparatives sur des lignosulfonates de différentes origines et donc de différentes distributions moléculaires ont montré que les lignosulfonates de faible poids moléculaire ont tendance à s'associer en solution et que les lignosulfonates de haut poids moléculaire ont un plus grand degré de ramification [98, 99]. Ces différences de structure affectent les propriétés. D'autres études ont montré que les lignosulfonates peuvent être utilisés comme dispersant ou flocculant selon leurs poids moléculaires [100-102]. Les lignosulfonates à faible poids moléculaire ont un grand pouvoir stabilisant. Ceux ayant un grand poids moléculaire sont constitués de longues chaînes d'atomes qui ne leurs permettent pas de s'absorber sur la surface des particules.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à la modification par séparation membranaire et par oxydation enzymatique.

### **I.3.1 Fractionnement des lignosulfonates par procédés membranaires**

Les procédés membranaires (l'ultrafiltration (UF) et la nanofiltration (NF)) sont surtout utilisés dans les industries de papeteries pour la récupération des lignines notamment les lignosulfonates à partir des liqueurs noirs (paragraphe I.1.2.2) et pour le traitement des eaux usées et des effluents [9, 13, 103]. Par ailleurs, les procédés membranaires ont été aussi mis en œuvre pour fractionner les lignosulfonates, préalablement purifiés, afin d'obtenir des fractions de distribution de poids moléculaire et de composition chimique différentes. Par la suite, les propriétés physico-chimiques des fractions obtenues ont été comparées. **Le tableau I.6** présente les différentes études effectuées sur le fractionnement des lignosulfonates par procédés membranaires.

**Tableau I.6** Fractionnement des lignosulfonates par procédés membranaires ; (UF) ultrafiltration ; (LS) Lignosulfonates.

Technique de séparation	Membranes	Seuil de coupure	Solution à filtrer	Conditions opératoires			Référence
				Solvant	Température	Pression	
UF	Polysulfone	5 kDa-50kDa	LS Calcium et Sodium	Eau	50 °C	20-40 bars	[26, 72, 104]
UF	Polysulfone	5 kDa-50kDa	LS Calcium	Eau	50 °C	5 bars	[47]
UF	polysulfonamide	10kDa-50kDa	LS Calcium	Eau	25 °C	1-16 bars	[105]

Comme présenté dans le **tableau I.6**, peu d'études relatent le fractionnement des lignosulfonates purifiés par procédés membranaires.

Tsapyuk et al. [105] ont été les premiers à étudier le fractionnement par ultrafiltration de lignosulfonates précédemment récupérés de la liqueur noire à des fins de séparation par taille et non pour la purification. Le fractionnement a été effectué en utilisant des membranes de différents seuils de coupure et à différentes pressions.

Ouyang et al. [47] ont utilisé le fractionnement membranaire pour obtenir des lignosulfonates de calcium de différents poids moléculaires. Les propriétés physico-chimiques de ces fractions ont été étudiées et comparées. Il a été constaté que la capacité d'adsorption à la surface des particules de ciment et l'activité de production de mousse sont plus importantes pour les lignosulfonates de poids moléculaire entre 30000 et 50000 Da. Toutefois, les valeurs de potentiel zêta à la surface des particules de ciment sont plus élevées pour les lignosulfonates de calcium de faible poids moléculaire (5000-10,000 Da).

La même équipe [26] reporte l'effet du poids moléculaire sur le pouvoir dispersant des lignosulfonates dans de la boue de charbon. Les résultats montrent que les lignosulfonates de sodium ayant un poids moléculaire entre 10000 et 50000 Da ont un grand pouvoir d'adsorption et un grand potentiel zêta à la surface. Ce qui permet une meilleure réduction de la viscosité de la boue de charbon.

Yang et al. [72], en étudiant l'effet du fractionnement sur les propriétés physico-chimiques des lignosulfonates de sodium en solution, ont montré que la fraction avec le plus grand poids moléculaire présente la plus grande capacité de dispersion.

### I.3.2 Polymérisation enzymatique des lignosulfonates

Les enzymes présentent un certain nombre de caractéristiques qui rendent leur utilisation avantageuse, en comparaison aux catalyseurs chimiques classiques ou microbiens, avec un haut niveau d'efficacité catalytique, un degré élevé de spécificité (régio, chimio et enantio-sélectivité) et l'absence de réactions secondaires [106-108]. Aussi, les enzymes sont biodégradables, facilement retirées et récupérées de l'eau et des solvants contaminés, couramment standardisés dans les préparations commerciales et fonctionnent généralement dans des conditions douces de température, de pression, et de pH. Ces caractéristiques permettent d'importantes économies d'énergie. Elles peuvent être classifiées en six groupes [108]: transférases, hydrolases, lyases, isomérases, ligases et les oxydoréductases.

Les réactions d'oxydation des lignosulfonates sont catalysées par des oxydoréductases en présence ou en absence de médiateur. Un médiateur est une molécule de faible poids moléculaire qui étend l'activité catalytique de la laccase vers les unités non phénoliques des lignines. Au cours de notre étude, nous nous sommes intéressés plus particulièrement aux laccases et à la combinaison laccase/médiateur.

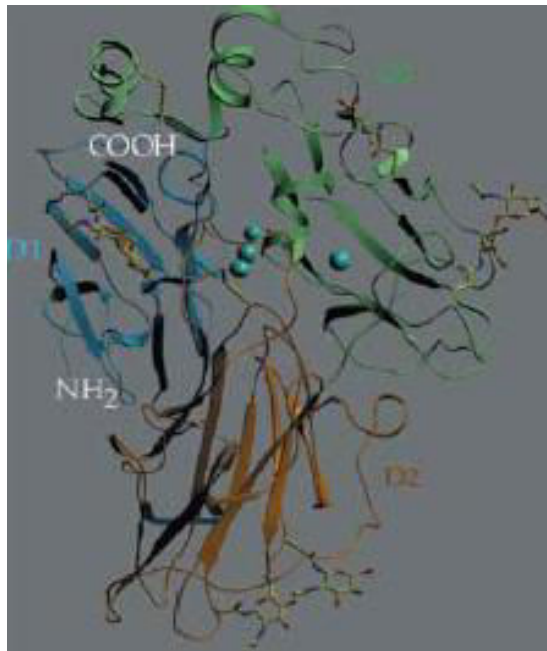
#### I.3.2.1 La laccase

##### Origine

La laccase a été découverte par Yoshida dans les plantes. Il a observé que le latex des arbres chinois (*Rhus sp.*) a rapidement été durci en présence d'air. L'enzyme a été nommée laccase environ 10 ans plus tard, après son isolement et sa purification [109]. Ces enzymes sont produites par les cellules eucaryotes, telles que les champignons, les plantes et les insectes [110].

Les laccases (CE 1.10.3.2) sont des oxydoréductases multi-cuivre, c'est des oxydases bleues à sites cuivriques multiples qui catalysent une oxydation d'électrons de plusieurs substances organiques et inorganiques, couplée avec une réduction à quatre électrons de l'oxygène en eau [111, 112]. C'est une phénol oxydase d'environ 70 kDa de structure dimérique et tétramérique comptant trois atomes de cuivre par monomère [113] (**Figure I.8**).





**Figure I.8** Structure d'un monomère de la laccase de *Trametes versicolor* [113]. Les 4 cuivres sont représentés par des sphères bleues : un cuivre de type 1 à 12,5 Å du cluster T2/T3 composé de 1 cuivre de type 2 et de 2 cuivres de type 3.

### Réactions catalysées par la laccase

Les laccases catalysent non seulement l'oxydation de groupements hydroxyles de monophénols, de molécules méthoxy substituées, d'ortho et para diphénols, mais aussi d'autres substrats tels que les amines aromatiques, la syringaldazine, pour former des radicaux libres [114, 115]. L'oxydation d'un substrat réducteur par la laccase implique la formation d'un radical qui est précurseur soit de l'oxydation ou/et de la dégradation (formation de quinone) ou de réactions non enzymatique tel que l'hydratation ou la polymérisation. On sait que les laccases peuvent catalyser la polymérisation de divers phénols, d'halogènes, d'alkyls et d'anilines alkoxy-substitués [108, 116]. Chez les plantes, la réticulation des précurseurs phénoliques par des laccases est une partie du processus de lignification. Des études ont montré que les laccases sont impliquées dans les premières réactions de lignification, tandis que les peroxydases interviennent plus tard. Entre autres, les laccases protègent les plantes des champignons pathogènes, de la phytoalexines toxiques et des tanins [117, 118].

### Applications

Les laccases sous leur forme libre ou immobilisée ont trouvé diverses applications dans la biotechnologie et l'environnement, comme biocapteurs pour les phénols, pour le développement de cathodes d'oxygène dans les piles à combustible, dans la dégradation des colorants textiles, la synthèse organique, la délignification, la déméthylation, et, le blanchiment de la pâte à papier [110, 111, 114, 115, 119-136].

### Structure et mécanisme d'oxydation

Les quatre atomes de cuivre sont classés selon leur caractéristique spectroscopique, type 1 (T1) (610 nm, bleu, paramagnétique), type 2 (T2) (non bleu, paramagnétique) et type 3 (T3) (330 nm, dimagnétique). Le phénomène d'oxydation se développe à partir de l'atome de cuivre type 1 [112], c'est également l'étape limitante du processus. Le  $K_m$  est généralement de 1-10 mM, ce qui suggère une faible spécificité. Ces observations sont à corrélérer avec la théorie de Marcus pour laquelle, le stade déterminant serait la réduction du substrat via le site T1 par une réaction de sphère externe dans laquelle, le taux de transfert des électrons augmente avec la différence de potentiel ; entre le potentiel redox du substrat donneur et celui du site T1 accepteur [111, 137, 138]. On différencie les laccases à faible potentiel redox (400 mV par rapport à une électrode à hydrogène normale) et à hauts potentiel redox (700-800 mV)  $E^0$ . Les laccases catalysent l'oxydation de molécules dont le potentiel redox est relativement plus faible que leurs potentiels redox (0,4-0,8 V) [111, 139]. Elles présentent en revanche une préférence marquée pour l' $O_2$  comme substrat oxydé [111, 112, 139, 140].

### Limitations

Comme cité précédemment, les laccases possèdent un faible potentiel redox (<0,8V), d'où l'oxydation catalysée par ces enzymes est limitée aux hydroxyles phénoliques des lignines, ce qui représente que 20% de ces polymères [141]. Cependant les substrats non phénoliques (les chaînes aliphatiques) ont un potentiel redox d'environ 1,3 V qui ne peut être oxydé par les laccases directement [109]. Néanmoins, ces limitations peuvent être contournées à l'aide de l'utilisation des médiateurs redox dans les systèmes d'oxydation.

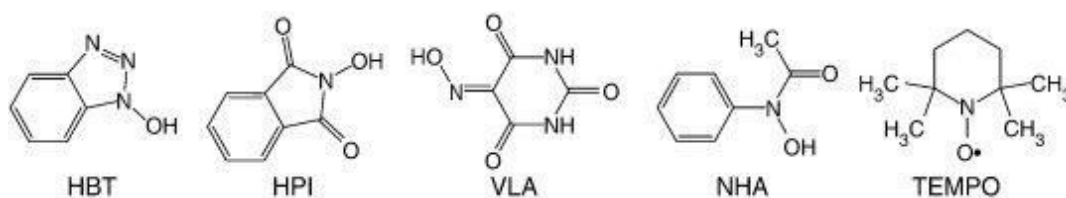
### I.3.2.2 Médiateur

Un médiateur est une molécule de faible poids moléculaire qui étend l'activité catalytique de la laccase vers les unités non phénoliques des lignines.

La laccase oxyde les médiateurs et des radicaux plus ou moins stables sont formés. Ces radicaux diffusent loin de la poche enzymatique et, par des mécanismes différents de la voie enzymatique, permettant l'oxydation de composés cibles qui, en principe, ne sont pas des substrats de laccase en raison de leur grande taille ou leur fort potentiel redox [114, 119, 141]. Le médiateur redox idéal serait un composé de petite taille, capable de générer des radicaux stables (dans sa forme oxydée) qui n'inactive pas l'enzyme, et qui permettrait son recyclage sans perte. En outre, du point de vue de leur application industrielle et environnementale, les médiateurs doivent être respectueux de l'environnement et disponibles à faible coût.

#### Médiateurs synthétiques

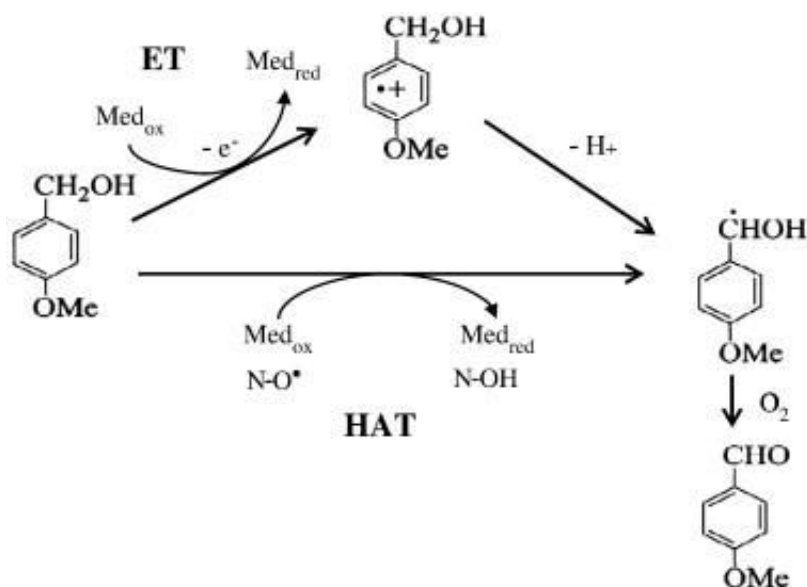
Le premier composé synthétique qui a été utilisé en tant que médiateur pour l'oxydation des composés non-phénoliques de la lignine est l'ABTS (l'acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) [119]. La première étape de l'oxydation de l'ABTS génère le radical cationique (ABTS<sup>•+</sup>) qui s'oxyde lentement en dication (ABTS<sup>2+</sup>). L'oxydation des composés non phénoliques de la lignine [142] et des colorants organiques [143] par la laccase-ABTS se produit via un transfert d'électrons (ET) [144].



**Figure I.9** Les médiateurs synthétiques les plus utilisés en industrie. 2,2,6,6-Tetraméthylpiperidine 1-oxyl (TEMPO) ; 1-hydroxybenzotriazole (HBT) ; 1N-hydroxyphthalimide (HPI) ; l'acide violurique (VLA) ; N -hydroxyacetanilide (NHA)

Par ailleurs, de nombreux efforts ont été orientés vers la recherche de nouveaux médiateurs synthétiques et l'élucidation de leurs mécanismes d'oxydation. Les médiateurs les plus efficaces pour l'oxydation des chaînes aliphatiques sont les médiateurs contenant les liaisons N-OH, comme le 1-hydroxybenzotriazole (HBT), le N-hydroxyphthalimide (HPI), l'acide violurique (VLA) ou le N-hydroxyacetanilide (NHA) [145-147] (**Fig. I.9**). L'oxydation de ce type de médiateurs par la laccase génère un très réactif radical nitroxyl (> N-O•), en

raison de l'enlèvement d'un électron suivie par la libération d'un proton. Les radicaux nitroxyles oxydent le substrat cible par transfert d'atomes d'hydrogène (HAT) [114, 147-150] (Fig. I.10).



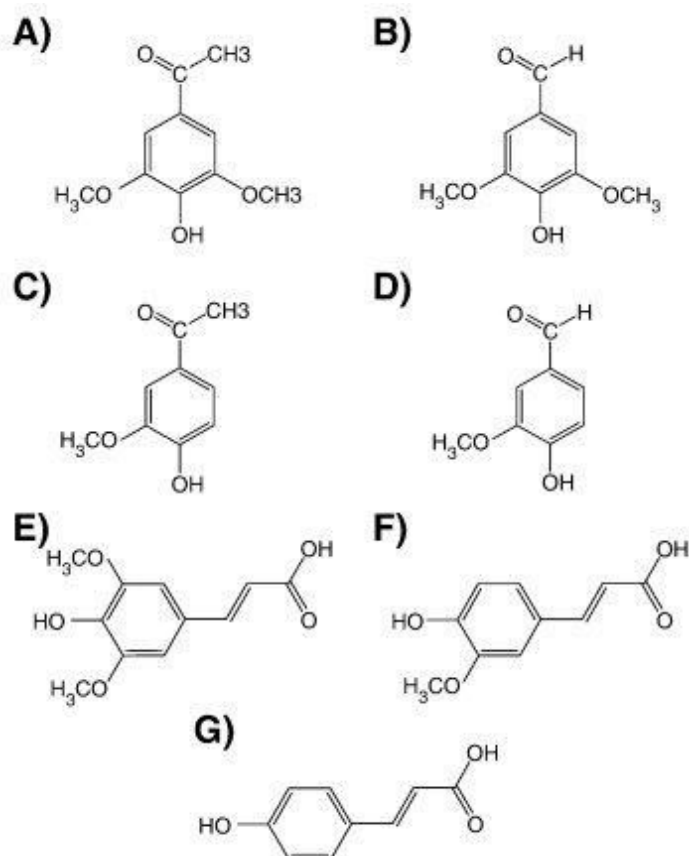
**Figure I.10** L'oxydation d'un composé modèle de la lignine non phénolique (alcool p-anisilique) par le système médiateur laccase par deux mécanismes d'oxydation différents : ET (transfert d'électrons) et HAT (par transfert d'atome d'hydrogène)[151].

### Médiateurs naturels

Le terme naturel est attribué à ces médiateurs non seulement par rapport à leur origine (matériaux lignocellulosiques, fruits, graines, etc), mais aussi pour leur rôle dans la nature. Ces composés phénoliques sont présents dans les plantes, ou proviennent de la dégradation de la lignine (les aldéhydes phénoliques, les cétones et les acides provenant de l'oxydation des unités phényle propane de la lignine).

A l'origine, les médiateurs naturels sont des phénols qui jouent le rôle de médiateur pour la laccase pendant la biodégradation des polymères de lignine en présence de champignons de pourriture blanche. En effet, la biodégradation de la lignine est un processus oxydatif dans lequel des réactions radicalaires entraînent une dégradation des structures non phénoliques. Dans ce processus, les radicaux libres de métabolites fongiques ou des produits dérivés du processus de biodégradation naturelle sont censés agir comme médiateurs redox des oxydoréductases ligninolytique. Ainsi, les radicaux phénoxyles générés par l'oxydation de la lignine par la laccase (ou autre oxydoréductase ligninolytique), de certains résidus

monomériques de la biosynthèse de la lignine, pourraient oxyder les composés aliphatiques de la lignine. L'efficacité de phénols d'origine naturelle à agir comme médiateurs a été décrite [152]. Les médiateurs naturels les plus utilisés sont : la syringaldéhyde, l'acétosyringone, la vanilline, l'acétovanillone, l'acide férullique, l'acide synapique et l'acide p-coumarique (**Fig. I.11**).



**Figure I.11** Les médiateurs naturels les plus utilisés : A) Acétosyringone, B) syringaldéhyde, C) vanilline, D) acetovanillone, E) Acide sinapique, F) Acide ferulique et G) Acide p-coumarique.

La dégradation de la lignine par les oxydoréductases fongiques a été l'objet de recherches depuis des années en raison de l'importance de ce processus dans la délignification de la pâte à papier. La syringaldéhyde a été décrite comme un médiateur pour l'oxydation des composés modèles de la lignine non-phénoliques et de l'alcool vératrylique [141] [119]. Plus récemment, l'oxydation de différents alcools benzyliques (modèles non-phénoliques de la lignine) par la laccase en utilisant des médiateurs phénoliques a été effectuée avec succès [150, 153, 154]. Les études bibliographiques montrent que la syringaldéhyde et

l'acétosyringone sont des médiateurs prometteurs dans l'oxydation de la lignine [155]. Quatre composés naturels p-hydroxycinnamiques ont également été récemment testés en tant que médiateurs pour le blanchiment de la pâte à papier [155, 156]. Plusieurs études sur la décoloration des teintures par la laccase en présence de médiateurs naturels phénoliques d'origine naturelle ont été publiées récemment. L'acétosyringone et la syringaldéhyde, les deux phénols di-méthoxy substitués dérivés des unités de lignine syringyl, ont été décrits comme les médiateurs naturels les plus rapides et les plus efficaces [152, 157-159].

L'utilisation des composés phénoliques dérivés du polymère de la lignine et des constituants des acides humiques sur la transformation des polluants oxydants tels que les phénols chlorés, en présence de laccase a déjà été démontrée [160]. Ces phénols d'origine naturelle ont été également utilisés pour la dégradation de différents pesticides et des polluants halogénés émergents tels que les agents antibactériens ou des molécules utilisées dans les produits cosmétiques et dans les médicaments [161-163].

### I.3.2.3 Mécanisme de polymérisation

Les radicaux générés de l'oxydation des lignosulfonates par la laccase en présence ou en absence de médiateur mènent soit à la dégradation ou à la polymérisation. La polymérisation et/ou la dépolymérisation semble être simultanée et dépend du poids moléculaire de départ [164]. Lors de la polymérisation, ces radicaux interagissent entre eux, formant ainsi des polymères [165].

Les réactions radicalaires se décomposent en trois étapes :

$M \rightarrow M^{\cdot}$  : L'initiation ou l'amorçage consiste en la formation des radicaux à partir d'une espèce qui n'en possède pas, mais qui peut en générer facilement. Dans ces travaux l'initiation est catalysée par la laccase. C'est la première étape de la chaîne cinétique.

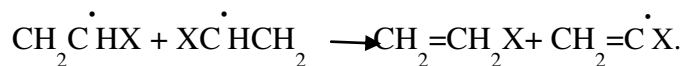
$M^{\cdot} + M \rightarrow MM^{\cdot}$  : La propagation est une étape rapide. La molécule formée par l'initiation est porteuse d'un centre actif et donc capable d'attaquer une nouvelle molécule, et ainsi de suite. La chaîne cinétique se poursuit par un grand nombre de réaction de cette nature.

$M^{\cdot} + M^{\cdot} \rightarrow MM$  ;  $MM^{\cdot} + MM^{\cdot} \rightarrow MMMM$  :

La réaction de terminaison consiste en la destruction du centre actif qui est localisé à l'extrémité de la chaîne en croissance. Dans leur grande majorité les réactions de terminaison se font par combinaison ou par couplage, c'est-à-dire que deux radicaux se couplent pour

former une seule molécule. Dans certains cas, un mécanisme par dismutation peut avoir lieu ainsi :  $\text{CH}_2\dot{\text{C}}\text{HX} + \text{XC}\dot{\text{H}}\text{CH}_2 \longrightarrow \text{CH}=\text{CHX} + \text{XCH}_2\text{CH}_2$ .

En marge de ces 3 étapes, des réactions de transfert peuvent avoir lieu. Une réaction de transfert implique que le centre actif de l'extrémité de la chaîne soit transféré sur un autre composé, qui est dit alors agent de transfert :



Le plus souvent, cette réaction provoque l'activation de l'agent de transfert qui peut alors amorcer la croissance d'une autre chaîne. La réaction de transfert arrête la croissance de la chaîne initiale, ce qui affecte la masse molaire moyenne du polymère. Plus il y aura de transferts, plus la masse molaire sera limitée.

En outre un phénomène de transfert par le solvant peut avoir lieu. Il a été établi que plus ce type de transfert est favorisé, plus le mécanisme de terminaison sera prépondérant [166]. Ainsi, le contrôle de la réaction radicalaire nécessite une durée d'amorçage de chaînes radicalaires courte par rapport à celle de la propagation et des réactions de terminaison fortement minimisées [167].

Dans le cas d'une polymérisation radicalaire, la principale difficulté pour maintenir la propagation est de contrôler la très grande réactivité des radicaux vis-à-vis du transfert et surtout vis-à-vis de la terminaison. En effet, les constantes de vitesses des réactions de terminaison sont élevées. Dans le cas des polymères synthétiques elles sont de l'ordre de  $10^6$  à  $10^8 \text{ s}^{-1}$ .

#### I.3.2.4 Polymérisation des lignosulfonates par les laccases

Durant ces dernières années, plusieurs études *in vitro* se sont intéressées à l'oxydation des phénols par les laccases et aux réactions radicalaires qu'elles génèrent, à des fins industrielles et d'autres applications tels que la récupération des phénols à partir des effluents [168-171]. Concernant les lignines, les études de recherche se sont essentiellement focalisées sur l'élucidation du mécanisme de formation de la lignine afin de déterminer les types de liaisons qui forment la structure très complexe de ce polymère [172-176]. Peu d'études ont été consacrées à l'étude de l'oxydation des lignines commerciales malgré la présence de groupements phénoliques très réactifs. Ces études sont menées soit en absence ou en présence de médiateur.

Polymérisation par la laccase en absence de médiateur

Le **tableau I.7** regroupe quelques études qui ont été menées sur la polymérisation des lignines et des lignosulfonates par les laccases, les peroxydases ou en présence d'espèces fongiques. Concernant la polymérisation des lignosulfonates, trois publications relatent l'oxydation par la laccase :

Une première étude menée sur l'oxydation des lignosulfonates par la laccase de *Trametes versicolor* comme catalyseur montre une double activité de cette enzyme ; la polymérisation des lignosulfonates de faible poids moléculaire (5 kDa) et la dépolymérisation des lignosulfonates de grand poids moléculaire (92 kDa) [164]. Par ailleurs, les quantités de produits de dépolymérisation sont inférieures à ceux de polymérisation et varient en fonction du temps. Cette étude a aussi montré que la polymérisation est l'activité dominante et la plus stable. En conclusion, le type de réaction de réarrangement dépend de la masse moléculaire initiale.

Récemment, Kim et al. [177] ont étudié la polymérisation de lignosulfonates de calcium par la laccase de *Myceliophthora thermophila*. Les effets de la polymérisation sur le potentiel zêta et la coloration des tissus lignocellulosiques ont été reportés. Les résultats montrent une augmentation du poids moléculaire, de la charge de surface et du potentiel zêta après traitement par la laccase.

Areskog et al. [178] ont étudié l'oxydation des lignosulfonates de calcium et de sodium de différentes distributions moléculaires et compositions chimiques par la laccase de *Myceliophthora thermophila* et de *Trametes vilosa* à différentes concentrations initiales. Les résultats montrent une augmentation considérable du poids moléculaire en fonction des concentrations des substrats et de l'enzyme.



**Tableau I.7** Polymérisation des lignosulfonates et de diverses lignines. (LS) Lignosulfonates.

Enzyme	Substrat	Solvant	Conditions opératoires						Référence
			Température	pH	C [Substrat]	C [Enzyme]	Temps	Agitation	
Laccase de <i>Trametes villosa</i>	LS Calcium, LS Sodium	Tampon acétate	50°C	5	1-100 g/L	1U/mL-10 U/mL	24 heures	-	[178]
Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	LS Calcium, LS Sodium	Tampon tris	40°C	7,5	1-100 g/L	1U/mL-10 U/mL	24 heures	-	
Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	LS Calcium	Tampon phosphate	50°C	5	2 g/L	0,6 U/mL	6 jours	80 rpm	[177]
Laccase de <i>Trametes hirsuta</i>	Lignine Dixane et dioxane, lignine acidolysée	Tampon sodium citrate	20°C	5	1 g/L	10 U/mL	24 heures	-	[179]
Milieu de cultures de <i>Pleurotus ostreatus</i>	LS	-	25°C	5,6	0,4 g/L	-	22 jours	-	[180]

Milieu de cultures de <i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LS Calcium, LS Sodium	-	39°C	7,6	2,5 g/L	-	5 jours	120 rpm	[181]
Manganese peroxidase	LS	-	50°C	5,6	0,6 g/L	-	14 jours	180 rpm	[182]
Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	LS	Tampon phosphate citrate	20°C	4,5	1 g/L	-	8 heures	-	[164]
Milieu de cultures de <i>Steptomyces viridosporus</i>	LS	-	20°C	7	1 g/L	-	7 jours	-	[183]
Laccase de <i>Polyporus versicolor</i>	Lignine de bois blanchi	Tampon acétate	30°C	4	5 g/L	-	4 jours	-	[184]
Champignon de pourriture blanche	Lignine d' Hêtres et d'épicéas	-	24°C	6,0 – 6,5	10 g/L	-	14-28 jours		[185]
<i>Sporobolomyces roseus</i>	Lignine	Eau	28°C	6,5	3 g/L	-	21 jours	270 rpm	[186]
Milieu de cultures de <i>Peroxydase de Bjerkandera sp</i>	Lignine sulfurée	Tampon tartare sodium	30°C	4 ou 5,3	0,05 g/L	-	4 heures	90 rpm	[187]

Polymérisation par les systèmes laccase/médiateurs

Beaucoup d'études exposent la dégradation des lignosulfonates [188], des phénols et d'autres molécules par le système laccase/médiateur (**tableau I.8**). Par ailleurs, peu d'études relatent la polymérisation comme réaction générée par les radicaux produits par le système laccase/médiateur.

A notre connaissance, une seule étude reporte la polymérisation des lignosulfonates en présence de médiateurs. Nugroho et al. [28] ont étudié la polymérisation de lignosulfonates de calcium par les laccases de *Trametes villosa*, de *Myceliophthora thermophila*, de *Bacillus spore*, de *Trametes hirsuta* en présence du 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) ou du 1-hydroxybenzotriazole. Les radicaux formés par le système laccase/médiateur ont permis de polymériser les lignosulfonates. A ce jour, concernant les lignosulfonates, aucune étude ne reporte une étude comparative entre l'utilisation de la laccase seule ou en présence de médiateur dans l'oxydation des lignosulfonates.

Cho et al. [188] ont étudié l'effet d'ajout d'acétosyringone et d'acétovanillone sur l'oxydation des lignosulfonates de faible poids moléculaires par la laccase de *Trametes Versicolor*. Une nette dégradation des lignosulfonates est observée et semble être favorisée à la polymérisation. Les auteurs ont supposé que les médiateurs peuvent empêcher la repolymérisation des lignosulfonates de faible poids moléculaire (5kDa).

**Tableau I.8** Polymérisation de différents substrats par le système laccase/médiateur. (LS) Lignosulfonates, (ABTS) 2,2 '-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique, (HBT) 1-hydroxybenzotriazole.

Substrat	Enzyme	Médiateur	Milieu	Conditions opératoires							Référence
				Temp	pH	C [Substrat]	C [enzyme]	C [médiateur]	Temps	Agitation	
LS de Calcium	Laccase de <i>Trametes villosa</i>	ABTS/ HBT	Eau	30 °C	4,0 – 4,5	20 g/L	1,8 U/mL	1 mM	17 heures	150 rpm	[28]
LS de Calcium	Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	ABTS/ HBT	Eau	30 °C	6	20 g/L	1,8 U /mL	1 mM	17 heures	150 rpm	
LS de Calcium	Laccase de <i>Trametes hirsuta</i>	ABTS/ HBT	Eau	30 °C	4,0 – 4,5	20 g/L	1,8 U /mL	1 mM	17 heures	150 rpm	
LS de Calcium	Laccase de <i>Bacillus spore</i>	ABTS/ HBT	Eau	30 °C	6	20 g/L	1,8 U /mL	1 mM	17 heures	150 rpm	
Lignine	Peroxydase, Phenol oxydase, Aryl-alcohol oxydase	ABTS/HBT	NaOH	20°C	6	1 g/L	0,25 U/mL	1 mM	6 jours	-	[189]
Lignine Kraft	Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	ABTS/ HBT	Acétate de sodium	20°C	5	0,4 g/L	0,25 U/mL	1 mM	6 jours	-	[190]
Catéchine	laccase d' <i>Aspergillus oryzae</i>	ABTS	Acétate de sodium	20°C	5	2 mM	31,7 U/mL	0.4 mM	0,5 heures	-	[191]

Modèle de lignine	Laccase de <i>Trametes hirsuta</i>	ABTS	Acétate de sodium	25 °C	4,5	5 mM	5.5 U/mL	5 mM	3 heures	-	[16]
Acrylamide	Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	2,4-pentandione	Tampon acide citrique /dipotassium hydrogène phosphate	25 °C	4,5	25 mM	4 U/mL	1 mM	72 heures	-	[192]

### I.3.2.5 Etude des paramètres affectant l'oxydation enzymatique des lignosulfonates

Comme le montrent les données de la littérature, les réactions enzymatiques peuvent être affectées par de nombreux paramètres. Nous nous sommes donc intéressés aux principaux facteurs pouvant influencer les performances de la polymérisation des lignosulfonates.

#### Nature et concentration du biocatalyseur

Les premières études d'oxydation des lignosulfonates ont été menées *in vivo* dans des cultures fongiques ou en utilisant des liquides de cultures cellulaires (paragraphe I.3.4.2).

Leonowicz et al. [164] furent les premiers à utiliser de la laccase pure isolée avant traitement par oxydation.

Des études comparatives du pouvoir oxydant de la laccase de différentes origines ont été menées par la suite (**Tableau I.9**).

Nugroho et al. [28] ont comparé la capacité des laccases de *Trametes villosa* (TVL), *Myceliophthora thermophila* (LMT), *Trametes hirsuta* (THL) et de *Bacillus subtilis* (BSL) à polymériser les lignosulfonates en présence d'1-hydroxybenzotriazole. Les lignosulfonates traités par TVL et THL présentent une augmentation du poids moléculaire initial, après 17 heures d'incubation, de 107% et 376% respectivement.

Aregsho et al. [178] ont aussi mené une étude comparative sur l'effet de la laccase de *Myceliophthora thermophila* et de *Trametes villosa* sur les performances de la polymérisation. L'étude montre une efficacité prédominante de la laccase de *Trametes villosa*.

Les laccases bleues peuvent être d'origine végétale, bactérienne ou fongique. Cependant, les performances de l'oxydation étant affectées par les conditions opératoires, il est donc difficile de comparer et de prédire quelle sera l'enzyme la plus efficace pour la polymérisation d'un produit.

**Tableau I.9** Les laccases utilisées dans la polymérisation des lignosulfonates.

Enzyme	Potentiel redox	Nature	Conditions opératoires			C [Substrat]	Augmentation du poids moléculaire (%)	Temps	Référence
			Temp	pH	C [Enzyme]				
Laccase de <i>Trametes villosa</i>	0.79 V	Champignon	50°C	5	1U/mL- 10 U/mL	1-100g/L	10-106 %	24 heures	[178]
Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	0.46 V	Champignon	40°C	7,5	1U/mL- 10 U/mL	1-100g/L	10-105 %	24 heures	
Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	0.46 V	Champignon	50°C	5	0,6 U/mL	2 g/L	24%	6 jours	[177]
Laccase de <i>Trametes versicolor</i>	0.80 V	Champignon	20°C	4,5	-	1 g/L	-	1 heure	[164]
Laccase de <i>Trametes villosa</i>	0.79 V	Champignon	30 °C	4,0 – 4,5	1,8 U/mL	4 g/L	43%	17 heures	[28]
Laccase de <i>Myceliophthora thermophila</i>	0.46 V	Champignon	30 °C	6	1,8 U/mL	4 g/L	-	17 heures	
Laccase de <i>Trametes hirsuta</i>	0.79 V	Champignon	30 °C	4,0 – 4,5	1,8 U/mL	4 g/L	376%	17 heures	

Laccase de <i>Bacillus spore</i>	0.41 V	Bactérie	30 °C	6	1,8 U/mL	4 g/L	-	17 heures	
-------------------------------------	--------	----------	-------	---	----------	-------	---	-----------	--



Influence de la concentration et de la composition chimique du substrat

Une seule étude porte sur l'effet de la composition (chimique et moléculaire) et la concentration initiale des lignosulfonates.

Areskog et al. [95], ont étudié les facteurs affectant la polymérisation de quatre lignosulfonates (**tableau I.10**).

**Tableau I.10** Caractéristiques des lignosulfonates étudiés.

Origine des lignosulfonates	Sel associé	Poids moléculaire (Da)	Groupements phénoliques (%)	Sulfure organique (%)
Bois tendre	Calcium	28 400	1,20 – 1,23	5,7
Bois tendre	Sodium	46 500	1,40 – 1,43	6,2
Bois tendre	Sodium	9 000	2,83 – 2,88	3
Bois dur	Calcium	5 900	1,56 – 1,59	4,7

La plus grande augmentation de poids moléculaire a été observée pour les réactions conduites avec les lignosulfonates de poids moléculaires de 5900 Da.

Les facteurs qui influencent l'augmentation du poids moléculaire sont :

- La concentration en groupement phénolique qui est l'une des caractéristiques majeures pour parvenir à une grande augmentation du poids moléculaire.
- Le degré de sulfonation: des expériences menées sur des composés modèles de lignine ont révélé que les liaisons formées lors de la polymérisation sont improductives entre les groupements phénoliques dont les liaisons  $\alpha$ -carbone sont sulfonées [193].
- La concentration initiale des lignosulfonates : la polymérisation est grandement améliorée à des concentrations élevées de lignosulfonates.

## **Conclusion**

Les lignosulfonates sont des macromolécules récupérées des liqueurs noires essentiellement par techniques membranaires. Ils se caractérisent par une grande hétérogénéité structurale, moléculaire et chimique ainsi qu'un large spectre de propriétés et d'applications. Cependant, leur polydispersité limite leurs utilisations.

Dans la littérature, plusieurs méthodes sont suggérées pour palier ces limitations. Parmi ces méthodes, la séparation membranaire et la polymérisation enzymatique. Ces études se sont focalisées sur l'effet de la séparation sur les propriétés de dispersion et la faisabilité de la polymérisation des lignosulfonates par les laccases. Les effets de facteurs, comme la nature et le potentiel redox de l'enzyme et la concentration du substrat sur la polymérisation enzymatique ont été également reportés.

Cependant, à notre connaissance, aucune étude ne relate une étude comparative entre l'utilisation ou non d'un médiateur sur la polymérisation enzymatique des lignosulfonates. Concernant la séparation membranaire, peu d'études reportent ces techniques comme méthode pour palier l'hétérogénéité des lignosulfonates et l'effet de la séparation sur les propriétés structurales et physico-chimiques des lignosulfonates obtenus.

**Références**

- [1] Ullmann F. Ullmann's encyclopedia. In: Wiley, (ed). 2003.
- [2] Salvesen JR, Hogan D. Analysis of sulfite waste liquor and lignosulfonates: Determination of neutralized solids and wet oxidation for determination of total sulfur and cations. *Analytical Chemistry*. 1948;20(10):909-11.
- [3] Eugene L, inventor Lignosulfonate recovery from waste sulfite liquor. In US patent, (Ed).1652.
- [4] Ndp d'aquitaine, inventor Lignosulfonates. France. In: S.Nd.Pn (Ed).1984.
- [5] Claussen PH. Membrane filtration of SSL for byproduct recovery and pollution control Pulp and Paper Canada. 1978;79(3):41-5.
- [6] Restolho JA, Prates A, de Pinho MN, Afonso MD. Sugars and lignosulphonates recovery from eucalyptus spent sulphite liquor by membrane processes. *Biomass and Bioenergy*. 2009;33(11):1558-66.
- [7] Bansal IK, Wiley AJ. Fractionation of spent sulfite liquors using ultrafiltration cellulose acetate membranes. *Environmental Science and Technology*. 1974;8(13):1085-90.
- [8] Wilde FGND. Recovery of lignosulphonate from a calcium bisulphite pulp mill effluent by ultrafiltration. *Desalination*. 1987;67(C):495-505.
- [9] Bhattacharya PK, Todi RK, Tiwari M, Bhattacharjee C, Bhattacharjee S, Datta S. Studies on ultrafiltration of spent sulfite liquor using various membranes for the recovery of lignosulphonates. *Desalination*. 2005;174(3):287-97.
- [10] Ringena O, Saake B, Lehen R. Characterization of electrolyzed magnesium spent-sulfite liquor. *Holzforschung*. 2005;59(6):604-11.
- [11] Ringena O, Saake B, Lehen R. Isolation and fractionation of lignosulfonates by amine extraction and ultrafiltration: A comparative study. *Holzforschung*. 2005;59(4):405-12.
- [12] Tsapiuk E, Kochkonan V, Badekha V. Change in molecular weight retention curves of ultrafiltration membranes with respect to lignosulfonates under gel formation conditions. *Journal of Membrane Science*. 2002;210(2):183-96.
- [13] Collins JW, Boggs LA, Webb AA, Wiley AA. Spent sulfite liquor reducing sugar purification by ultrafiltration with dynamic membranes TAPPI. 1973;56(6):121-4.
- [14] Nystrom M, Kaipia L, Luque S. Fouling and retention of nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. 1995;98(3):249-62.
- [15] Eriksson P. Ultrafiltration fore recovery of lignosulfonates from spent sulfite liquor AIChE Symposium Series. 1980;76(197):316-20.
- [16] Rittstieg K, Suurnakki A, Suortti T, Kruus K, Guebitz G, Buchert J. Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31(4):403-10.
- [17] Eisenbraun EW. The separation and fractionation of lignosulfonic acids from spent sulfite liquor with tri-n-hexyl-amine in organic solvents. *Tappi*. 1963;2:104-7.
- [18] Haars A, Lohner S, Hutterman A. Quantitative determination of lignosulfonates from spent liquors using precipitation with polyethyleneimine *Holzforschung*. 1975;3:59-65.
- [19] Luthe CE, Lewis N. Identification and characterisation of paucidisperse lignosulfonates *Holzforschung*. 1986;40:153-7.
- [20] Konturri AK, Sundholm; G. The extraction and fractionation of lignosulfonates with long chain aliphatic amine. *Acta chem*. 1986;40:121-4.
- [21] Freudenberg K. Lignin: Its constitution and formation from p-hydroxycinnamyl alcohols. *Science*. 1965;148(3670):595-600.
- [22] Bolker HI, Brenner HS. Polymeric structure of spruce lignin. *Science*. 1970;170(3954):173-6.

- [23] Mothershead JS, Glennie DW. Chemical structure of lignin sulfonates Part II Identification of monomeric lignin sulfonates from red alder Tappi Journal. 1964;47(8):519-24.
- [24] Gosselink RJA, De Jong E, Guran B, Abacherli A. Co-ordination network for lignin - Standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN). Industrial Crops and Products. 2004;20(2):121-9.
- [25] El Mansouri NE, Farriol X, Salvado J. Structural modification and characterization of lignosulfonate by a reaction in an alkaline medium for its incorporation into phenolic resins. Journal of Applied Polymer Science. 2006;102(4):3286-92.
- [26] Zhou M, Qiu X, Yang D, Lou H. Properties of different molecular weight sodium lignosulfonate fractions as dispersant of coal-water slurry. Journal of Dispersion Science and Technology. 2006;27(6):851-6.
- [27] Askvik KM, Hetlesather S, Sjoblom J, Stenius P. Properties of the lignosulfonate-surfactant complex phase. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. 2001;182(1-3):175-89.
- [28] Nugroho Prasetyo E, Kudanga T, Astergaard L, Rencoret J, Gutierrez A, del Rio JC, et al. Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. Bioresource Technology. 2010;101(14):5054-62.
- [29] Rojas O, Salager J-L. Surface activity of bagasse lignin derivatives found in the spent liquor of soda plants. Tappi journal. 1994;77(3):169-74.
- [30] Myrvold BO. The polyelectrolyte behavior of randomly branched lignosulfonates. Tappi Journal. 2007;6(11):10-5.
- [31] Olleman ED, Pennington DE, Ritter DM. A diffusion analysis of refined lignin sulfonic acid. Journal of Colloid Science. 1948;3(3):185-95.
- [32] Moacanin J, Felicetta VF, Haller W, McCarthy JL. Lignin. VI. Molecular weights of lignin sulfonates by light scattering. Journal of the American Chemical Society. 1955;77(13):3470-5.
- [33] Goring DAI. The physical chemistry of lignin. Pure Applied Chemistry. 1962;5(1-2):233-310.
- [34] Goring DAI, Vuong R, Gancet C, Chanzy H. Flatness of lignosulfonate macromolecules as demonstrated by electron microscopy Journal of Applied Polymer Science. 1979;24(4):931-6.
- [35] Vainio U, Lauten RA, Serimaa R. Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of aqueous lignosulfonate solutions. Langmuir. 2008;24(15):7735-43.
- [36] Browning WC. Flow Properties of Lignosulfonates. Industrial Engineering Chemistry. 1957;49(9):1401.
- [37] Glasser WG. Cross-linking options for lignins. ACS Symposium Series; 1989; 1989. p. 43-54.
- [38] Glasser WGB, C. A.; Muller, P. C.; Sarkanen, K. V. The chemistry of several model bioconversion lignins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1983;31(5):921-30.
- [39] Hu TQ. Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin In : Springer (Ed) 2002.
- [40] Canevarolo SV. Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros. In Artliver (Ed) 2002.
- [41] Klock UM, G. I. B.; Hernandez, J. A.; Andrade, A. S. Química da Madeira. 2005 (cited; Available from: <http://marioloureiro.net/ciencia/biomass/quimicadamadeira.pdf>).
- [42] Baumberger S, Lapierre C, Monties B, Lourdin D, Colonna P. Preparation and properties of thermally moulded and cast lignosulfonates-starch blends. Industrial Crops and Products. 1997;6(3-4):253-8.

- [43] Qiu X, Kong Q, Zhou M, Yang D. Aggregation behavior of sodium lignosulfonate in water solution. *Journal of Physical Chemistry B*. 2008;114(48):15857-61.
- [44] Kirk T K. *Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology* 2005.
- [45] Fredheim GEC, B. E. Polyelectrolyte complexes: interactions between lignosulfonate and chitosan. *Biomacromolecules*. 2003;4:232-9.
- [46] Ratinac KR, Standard OC, Bryant PJ. Lignosulfonate adsorption on and stabilization of lead zirconate titanate in aqueous suspension. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2004;273(2):442-54.
- [47] Ouyang X, Qiu X, Chen P. Physicochemical characterization of calcium lignosulfonate-A potentially useful water reducer. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2006;282-283:489-97.
- [48] Pang YX, Qiu XQ, Yang DJ, Lou HM. Influence of oxidation, hydroxymethylation and sulfomethylation on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2008;312(2-3):154-9.
- [49] Li C, Pan Q, Zhang J, Qin X, Wang Z, Liu L, et al. The modification of calcium lignosulfonate and its applications in cementitious materials. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2007;28(8):1205-8.
- [50] Thobunluepop P. The inhibitory effect of the various seed coating substances against rice seed borne fungi and their shelf-life during storage. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2009;12(16):1102-10.
- [51] Vinardell MP, Ugartondo V, Mitjans M. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crops and Products*. 2008;27(2):220-3.
- [52] Pan X, Kadla JF, Ehara K, Gilkes N, Saddler JN. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: Relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2006;54(16):5806-13.
- [53] Sakagami H, Hashimoto K, Suzuki F, Ogiwara T, Satoh K, Ito H, et al. Molecular requirements of lignin-carbohydrate complexes for expression of unique biological activities. *Phytochemistry*. 2005;66(17 SPEC. ISS.):2108-20.
- [54] Shul'ga NV, Krut'ko NP, Martynov VA. Complexation in aqueous solutions of lignosulfonates. *Russian Journal of Applied Chemistry*. 2010;83(5):906-10.
- [55] Kosikova B, Labaj J, Gregorova A, Slameaova D. Lignin antioxidants for preventing oxidation damage of DNA and for stabilizing polymeric composites. *Holzforschung*. 2006;60(2):166-70.
- [56] Huang J, Zhang L, Wang X. Soy protein-lignosulphonate plastics strengthened with cellulose. *Journal of Applied Polymer Science*. 2003;89(6):1685-9.
- [57] Kadla JF, Kubo S. Lignin-based polymer blends: Analysis of intermolecular interactions in lignin-synthetic polymer blends. *Composites Part A: Applied Science and Manufacturing*. 2004;35(3):395-400.
- [58] Dizhbite T, Zakis G, Kizima A, Lazareva E, Rossinskaya G, Jurkjaane V, et al. Lignin - A useful bioresource for the production of sorption-active materials. *Bioresource Technology*. 1999;67(3):221-8.
- [59] Thielemans W, Can E, Morye SS, Wool RP. Novel applications of lignin in composite materials. *Journal of Applied Polymer Science*. 2002;83(2):323-31.
- [60] Ansari A, Pawlik M. Floatability of chalcopyrite and molybdenite in the presence of lignosulfonates. Part I. Adsorption studies. *Minerals Engineering*. 2007;20(6):600-8.
- [61] Gargulak JD, Lebo SE. Commercial use of lignin-based materials. *ACS Symposium Series* 1999:304-20.

- [62] Matsushita Y, Yasuda S. Preparation and evaluation of lignosulfonates as a dispersant for gypsum paste from acid hydrolysis lignin. *Bioresource Technology*. 2005;96(4):465-70.
- [63] Nadif A, Hunkeler D, Kuper P. Sulfur-free lignins from alkaline pulping tested in mortar for use as mortar additives. *Bioresource Technology*. 2002;84(1):49-55.
- [64] Morais LC, Curvelo AAS, Zambon MD. Thermoplastic starch-lignosulfonate blends. 1. Factorial planning as a tool for elucidating new data from high performance size-exclusion chromatography and mechanical tests. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62(2):104-12.
- [65] Alonso MV, Oliet M, Rodriguez F, Garcia J, Gilarranz MA, Rodriguez JJ. Modification of ammonium lignosulfonate by phenolation for use in phenolic resins. *Bioresource Technology*. 2005;96(9):1013-8.
- [66] Benar P, Goncalves AR, Mandelli D, Schuchardt U. Eucalyptus organosolv lignins: Study of the hydroxymethylation and use in resols. *Bioresource Technology*. 1999;68(1):11-6.
- [67] Bjorsvik HR, Liguori L. Organic processes to pharmaceutical chemicals based on fine chemicals from lignosulfonates. *Organic Process Research and Development*. 2002;6(3):279-90.
- [68] El-Gammal AA, Kamel Z, Adeeb Z, Helmy SM. Biodegradation of lignocellulosic substances and production of sugars and lignin degradation intermediates by four selected microbial strains. *Polymer Degradation and Stability*. 1998;61(3):535-42.
- [69] Fredheim GE, Braaten SM, Christensen BE. Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *Journal of Chromatography A*. 2002;942(1-2):191-9.
- [70] Fredheim GE, Braaten SM, Christensen BE. Comparison of molecular weight and molecular weight distributions of softwood and hardwood lignosulfonates. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. 2003;23(2):197-215.
- [71] Baumberger S, Abaecherli A, Fasching M, Gellerstedt G, Gosselink R, Hortling B, et al. Molar mass determination of lignins by size-exclusion chromatography: Towards standardisation of the method. *Holzforschung*. 2007;61(4):459-68.
- [72] Yang D, Qiu X, Pang Y, Zhou M. Physicochemical properties of calcium lignosulfonate with different molecular weights as dispersant in aqueous suspension. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2008;29(9):1296-303.
- [73] Mai C, Majcherczyk A, Huttermann A. Chemo-enzymatic synthesis and characterization of graft copolymers from lignin and acrylic compounds. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;27(1-2):167-75.
- [74] Hernandez-Perez G, Goma G, Rols JL. Degradation of lignosulfonated compounds by *Streptomyces viridosporus*: Effect of the culture medium and the nature of the lignosulfonate molecule. *Water Research*. 1999;33(8):1837-44.
- [75] Ringena O, Lebioda S, Lehnen R, Saake B. Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. *Journal of Chromatography A*. 2006;1102(1-2):154-63.
- [76] Nada AAMA, El-Sakhawy M, Kamel SM. Infra-red spectroscopic study of lignins. *Polymer Degradation and Stability*. 1998;60(2-3):247-51.
- [77] Kihara M, Takayama M, Wariishi H, Tanaka H. Determination of the carbonyl groups in native lignin utilizing Fourier transform Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2002;58(10):2213-21.
- [78] Mollah MYA, Yu W, Schennach R, Cocke DL. Fourier transform infrared spectroscopic investigation of the early hydration of Portland cement and the influence of sodium lignosulfonate. *Cement and Concrete Research*. 2000;30(2):267-73.
- [79] Lopez Pasquali CE, Herrera H. Pyrolysis of lignin and IR analysis of residues. *Thermochimica Acta*. 1997;293(1-2):39-46.

- [80] Pandey KK, Pitman AJ. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2003;52(3):151-60.
- [81] Sharma RK, Wooten JB, Baliga VL, Lin X, Chan WG, Hajaligol MR. Characterization of chars from pyrolysis of lignin. *Fuel*. 2004;83(11-12):1469-82.
- [82] Takayama M, Johjima T, Yamanaka T, Wariishi H, Tanaka H. Fourier transform Raman assignment of guaiacyl and syringyl marker bands for lignin determination. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 1997;53(10):1621-8.
- [83] Dawy M, Shabaka AA, Nada AMA. Molecular structure and dielectric properties of some treated ligulus. *Polymer Degradation and Stability*. 1998;62(3):455-62.
- [84] Boeriu CG, Bravo D, Gosselink RJA, Van Dam JEG. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Industrial Crops and Products*. 2004;20(2):205-18.
- [85] Sun R, Lu Q, Sun XF. Physico-chemical and thermal characterization of lignins from *Caligonum monogoliacum* and *Tamarix* spp. *Polymer Degradation and Stability*. 2001;72(2):229-38.
- [86] Yang H, Yan R, Chen H, Lee DH, Zheng C. Characteristics of hemicellulose, cellulose and lignin pyrolysis. *Fuel*. 2007;86(12-13):1781-8.
- [87] Singh R, Singh S, Trimukhe KD, Pandare KV, Bastawade KB, Gokhale DV, et al. Lignin-carbohydrate complexes from sugarcane bagasse: Preparation, purification, and characterization. *Carbohydrate Polymers*. 2005;62(1):57-66.
- [88] Lawther JM, Sun RC, Banks WB. Rapid isolation and structural characterization of alkali-soluble lignins during alkaline treatment and atmospheric refining of wheat straw. *Industrial Crops and Products*. 1996;5(2):97-105.
- [89] Chen M, McClure JW. Altered lignin composition in phenylalanine ammonia-lyase-inhibited radish seedlings: Implications for seed-derived sinapoyl esters as lignin precursors. *Phytochemistry*. 2000;53(3):365-70.
- [90] Dang VQ, Bhardwaj NK, Hoang V, Nguyen KL. Determination of lignin content in high-yield kraft pulps using photoacoustic rapid scan Fourier transform infrared spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*. 2007;68(3):489-94.
- [91] Tejado A, Pea C, Labidi J, Echeverria JM, Mondragon I. Physico-chemical characterization of lignins from different sources for use in phenol-formaldehyde resin synthesis. *Bioresource Technology*. 2007;98(8):1655-63.
- [92] Liu Q, Wang S, Zheng Y, Luo Z, Cen K. Mechanism study of wood lignin pyrolysis by using TG-FTIR analysis. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2008;82(1):170-7.
- [93] del Rio JC, Gutierrez A, Rodriguez IM, Ibarra D, Martinez AT. Composition of non-woody plant lignins and cinnamic acids by Py-GC/MS, Py/TMAH and FT-IR. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*. 2007;79(1-2 SPEC. ISS.):39-46.
- [94] Lutnaes BF, Myrvold BO, Lauten RA, Endeshaw MM. <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data of benzylic sulfonic acids - Model compounds for lignosulfonate. *Magnetic Resonance in Chemistry*. 2008;46(3):299-305.
- [95] Areskog D, Li J, Gellerstedt G, Henriksson G. Structural modification of commercial lignosulphonates through laccase catalysis and ozonolysis. *Industrial Crops and Products*. 2010;32(3):458-66.
- [96] Yanhua J, Weihong Q, Zongshi L, Lubai C. A Study on the Modified Lignosulfonate from Lignin. *Energy Sources*. 2004;26(4):409-14.
- [97] Yang D, Qiu X, Chen H. Study of the oxidative modification of calcium lignosulfonate. *Jingxi Huagong/Fine Chemicals*. 2001;18(3):128-30.

- [98] Shotton PG, Hewlett PC, James AN. Polydisperse nature of lignosulfonates. *Tappi*. 1972;55(3):407-15.
- [99] Gardon JL, Mason SG. Polyelectrolytic properties of ligninsulfonic acids. *Journal of Chemical and Engineering Data*. 1958;3(1):115-9.
- [100] Chan SLH, Baker CJ, Beeckmans JM. Flocculating properties of high molecular weight lignosulphonates *Powder Technology*. 1976;13(2).
- [101] Rezanowich A, Goring DAI. Polyelectrolyte expansion of a lignin sulfonate microgel. *Journal of Colloid Science*. 1960;15(5):452-71.
- [102] Tadros TF. Adsorption of lignosulphonates on polystyrene latex particles from aqueous solution and flocculation of the dispersions by electrolytes. *Colloid and Polymer Science Kolloid Zeitschrift & Zeitschrift fur Polymere*. 1980;258(4):439-46.
- [103] Tsapiuk EA, Bryk MT, Medvedev MI, Kochkodan VM. Fractionation and concentration of lignosulphonates by ultrafiltration. *Journal of Membrane Science*. 1989;47(1-2):107-30.
- [104] Yang D, Qiu X, Zhou M, Lou H. Properties of sodium lignosulfonate as dispersant of coal water slurry. *Energy Conversion and Management*. 2007;48(9):2433-8.
- [105] Tsapyuk EA, Bryk MT, Dmitriev AA, Kochkodan VM, Falikman VR. Ultrafiltrational fractionation of lignosulfonates under conditions of gel formation on membranes with various pore sizes and at various pressures. *Soviet journal of water chemistry and technology*. 1990;12(1):87-91.
- [106] Kaplan DL DJ, Gross RA, Swift G,. *Enzymes in polymer science: an introduction, in Enzymes in polymer synthesis*. In ACS series 1998.
- [107] Uyama H, Kobayashi S. Enzyme-catalyzed polymerization to functional polymers. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002;19-20:117-27.
- [108] Kobayashi S, Uyama H, Kimura S. Enzymatic polymerization. *Chemical Reviews*. 2001;101(12):3793-818.
- [109] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 2006;24(5):219-26.
- [110] Mayer AM, Staples RC. Laccase: New functions for an old enzyme. *Phytochemistry*. 2002;60(6):551-65.
- [111] Xu F. Catalysis of novel enzymatic iodide oxidation by fungal laccase. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*. 1996;59(3):221-30.
- [112] Solomon EI, Sundaram UM, Machonkin TE. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chemical Reviews*. 1996;96(7):2563-605.
- [113] Piontek K, Antorini M, Choinowski T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90Å resolution containing a full complement of coppers. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(40):37663-9.
- [114] Bourbonnais R, Paice MG, Freiermuth B, Bodie E, Borneman S. Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(12):4627-32.
- [115] Li K, Xu F, Eriksson KEL. Comparison of fungal laccases and redox mediators in oxidation of a nonphenolic lignin model compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65(6):2654-60.
- [116] Hoff T, Liu SY, Bollag JM. Transformation of halogen-, alkyl-, and alkoxy-substituted anilines by a laccase of *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1985;49(5):1040-5.



- [117] Pezet R, Pont V, Hoang-Van K. Evidence for oxidative detoxication of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 1991;39(6):441-50.
- [118] Johansson M, Denekamp M, Asiegbu FO. Production and isozyme pattern of extracellular laccase in the S and P intersterility groups of the root pathogen *Heterobasidion annosum*. *Mycological Research*. 1999;103(3):365-71.
- [119] Bourbonnais R, Paice MG. Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1992;36(6):823-7.
- [120] Ghindilis AL, Makower A, Scheller FW. Laccase-glucose dehydrogenase recycling-enzyme electrode based on potentiometric mediatorless electrocatalytic detection. *Analytical methods & instrumentation*. 1995;2(3):129-32.
- [121] Gardiol AE, Hernandez RJ, Reinhammar B, Harte BR. Development of a gas-phase oxygen biosensor using a blue copper-containing oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*. 1996;18(5):347-52.
- [122] Schneider P, Caspersen MB, Mondorf K, Halkier T, Skov LK, Åstergaard PR, et al. Characterization of a *Coprinus cinereus* laccase. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999;25(6):502-8.
- [123] Hublik G, Schinner F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000;27(3-5):330-6.
- [124] Lante A, Crapisi A, Krastanov A, Spettoli P. Biodegradation of phenols by laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochemistry*. 2000;36(1-2):51-8.
- [125] Duran N, Duran M. Enzyme applications in the textile industry. *Review of Progress in Coloration and Related Topics*. 2000;30:41-4.
- [126] Kuznetsov BA, Shumakovich GP, Koroleva OV, Yaropolov AI. On applicability of laccase as label in the mediated and mediatorless electroimmunoassay: Effect of distance on the direct electron transfer between laccase and electrode. *Biosensors and Bioelectronics*. 2001;16(1-2):73-84.
- [127] Barton SC, Kim HH, Binyamin G, Zhang Y, Heller A. Electroreduction of  $O_2$  to water on the "wired" laccase cathode. *Journal of Physical Chemistry B*. 2001;105(47):11917-21.
- [128] Haghghi B, Jarosz-Wilko, azka A, Ruzgas T, Gorton L, Leonowicz A. Characterization of graphite electrodes modified with laccases from *Trametes hirsuta* and *Cerrena unicolor* and their use for flow injection amperometric determination of some phenolic compounds. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. 2005;85(9-11):753-70.
- [129] Karamyshev AV, Shleev SV, Koroleva OV, Yaropolov AI, Sakharov IY. Laccase-catalyzed synthesis of conducting polyaniline. *Enzyme and Microbial Technology*. 2003;33(5):556-64.
- [130] Wesenberg D, Kyriakides I, Agathos SN. White-rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents. *Biotechnology Advances*. 2003;22(1-2):161-87.
- [131] Martins MAM, Lima N, Silvestre AJD, Queiroz MJ. Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes. *Chemosphere*. 2003;52(6):967-73.
- [132] Blanquez P, Casas N, Font X, Gabarrell X, Sarra M, Caminal G, et al. Mechanism of textile metal dye biotransformation by *Trametes versicolor*. *Water Research*. 2004;38(8):2166-72.

- [133] Maximo C, Costa-Ferreira M. Decolourisation of reactive textile dyes by *Irpex lacteus* and lignin modifying enzymes. *Process Biochemistry*. 2004;39(11):1475-9.
- [134] Novotno A, Svobodovo K, Erbanova P, Cajthaml T, Kasinath A, Lang E, et al. Ligninolytic fungi in bioremediation: Extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology and Biochemistry*. 2004;36(10):1545-51.
- [135] Camarero S, Garcia O, Vidal T, Colom J, Del Rio JC, Gutiurrez A, et al. Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system. *Enzyme and Microbial Technology*. 2004;35(2-3):113-20.
- [136] Ciecholewski S, Hammer E, Manda K, Bose G, Nguyen VTH, Langer P, et al. Laccase-catalyzed carbon-carbon bond formation: Oxidative dimerization of salicylic esters by air in aqueous solution. *Tetrahedron*. 2005;61(19):4615-9.
- [137] Marcus RA, Sutin N. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Bioenergetics*. 1985;811(3):265-322.
- [138] Garavaglia S, Teresa Cambria M, Miglio M, Ragusa S, Iacobazzi V, Palmieri F, et al. The structure of *Rigidoporus lignosus* laccase containing a full complement of copper ions, reveals an asymmetrical arrangement for the T3 copper pair. *Journal of Molecular Biology*. 2004;342(5):1519-31.
- [139] Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*. 1999;3(1):1-25.
- [140] Petersen LC, Degn H. Steady state kinetics of laccase from *Rhus vernicifera*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1978;526(1):85-92.
- [141] Kawai S, Umezawa T, Higuchi T. Degradation mechanisms of phenolic b-1 lignin substructure model compounds by laccase of *Coriolus versicolor*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1988;262(1):99-110.
- [142] Bourbonnais R, Paice MG, Leech D, Rochefort D. Laccase/mediator bleaching of kraft pulps: Identification of mediator active species and their role in oxidation of residual lignin subunits. *Proceedings of the International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry*; 1998; 1998.
- [143] Solos-Oba M, Ugalde-Saldavar VM, Gonzalez I, Viniegra-Gonzalez G. An electrochemical-spectrophotometrical study of the oxidized forms of the mediator 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) produced by immobilized laccase. *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2005;579(1):59-66.
- [144] Baiocco P, Barreca AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: A mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. *Organic and Biomolecular Chemistry*. 2003;1(1):191-7.
- [145] Paice MG, Bourbonnais R, Reid I, Archibald FS. Kraft pulp bleaching by redox enzymes. *Proceedings of the ACM Workshop on Role-Based Access Control*; 1997; 1997.
- [146] Srebotnik E, Hammel KE. Degradation of nonphenolic lignin by the laccase/1-hydroxybenzotriazole system. *Journal of Biotechnology*. 2000;81(2-3):179-88.
- [147] Xu F, Kulys JJ, Duke K, Li K, Krikstopaitis K, Deussen HJW, et al. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000;66(5):2052-6.
- [148] Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Comparing the catalytic efficiency of some mediators of laccase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*. 2002;16(5-6):231-40.
- [149] Barreca AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P, Ljunggren S. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2003;26(1-2):105-10.

- [150] Calcaterra A, Galli C, Gentili P. Phenolic compounds as likely natural mediators of laccase: A mechanistic assessment. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2008;51(3-4):118-20.
- [151] Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2002;18(1-3):169-71.
- [152] Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez AT. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(4):1775-84.
- [153] Ibarra D, Romero J, Martinez MJ, Martinez AT, Camarero S. Exploring the enzymatic parameters for optimal delignification of eucalypt pulp by laccase-mediator. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(6):1319-27.
- [154] Bourbonnais R, Paice MG. Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator. *Tappi Journal*. 1996;79(6):199-204.
- [155] Camarero S, Ibarra D, Martinez AT, Romero J, Gutierrez A, del Rio JC. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(5):1264-71.
- [156] Aracri E, Colom JF, Vidal T. Application of laccase-natural mediator systems to sisal pulp: An effective approach to biobleaching or functionalizing pulp fibres? *Bioresource Technology*. 2009;100(23):5911-6.
- [157] Campos R, Cavaco-Paulo A, Robra KH, Schneider M, Gabitz G. Indigo degradation with laccases from *Polyporus* sp. and *Sclerotium rolfsii*. *Textile Research Journal*. 2001;71(5):420-4.
- [158] Dubé E, Shareck F, Hurtubise Y, Daneault C, Beauregard M. Homologous cloning, expression, and characterisation of a laccase from *Streptomyces coelicolor* and enzymatic decolourisation of an indigo dye. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;79(4):597-603.
- [159] Murugesan K, Yang IH, Kim YM, Jeon JR, Chang YS. Enhanced transformation of malachite green by laccase of *Ganoderma lucidum* in the presence of natural phenolic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;82(2):341-50.
- [160] Park JW, Dec J, Kim JE, Bollag JM. Effect of humic constituents on the transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of oxidoreductive enzymes or birnessite. *Environmental Science and Technology*. 1999;33(12):2028-34.
- [161] Marco-Urrea E, Perez-Trujillo M, Cruz-Morato C, Caminal G, Vicent T. Degradation of the drug sodium diclofenac by *Trametes versicolor* pellets and identification of some intermediates by NMR. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;176(1-3):836-42.
- [162] Murugesan K, Chang YY, Kim YM, Jeon JR, Kim EJ, Chang YS. Enhanced transformation of triclosan by laccase in the presence of redox mediators. *Water Research*. 2008;44(1):298-308.
- [163] Torres-Duarte C, Roman R, Tinoco R, Vazquez-Duhalt R. Halogenated pesticide transformation by a laccase-mediator system. *Chemosphere*. 2009;77(5):687-92.
- [164] Leonowicz A, Szklarz G, Wojtas-Wasilewska M. The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (peritan Na). *Phytochemistry*. 1985;24(3):393-6.
- [165] Akta N, Tanyola A. Reaction conditions for laccase catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology*. 2003;87(3):209-14.
- [166] Hutchinson RA. Free-radical polymerization: Homogeneous, in *Handbook of polymereaction engineering*. In Wiley (Ed) 2005.
- [167] Fontanille M GY. Chimie et physico-chimie des polymères In Duner (Ed) 2002.

- [168] Steevensz A, Al-Ansari MM, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Comparison of soybean peroxidase with laccase in the removal of phenol from synthetic and refinery wastewater samples. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2009;84(5):761-9.
- [169] Kurniawati S, Nicell JA. A comprehensive kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnology Progress*. 2009;25(3):763-73.
- [170] Kurniawati S, Nicell JA. Kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnology and Bioengineering*. 2005;91(1):114-23.
- [171] Mita N, Tawaki SI, Hiroshi U, Kobayashi S. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols. *Macromolecular Bioscience*. 2003;3(5):253-7.
- [172] Nakamura W. Studies on the biosynthesis of lignin: I. disproof against the catalytic activity of laccase in the oxidation of coniferyl alcohol. *Journal of Biochemistry*. 1967;62(1):54-61.
- [173] Higuchi T. Lignin biochemistry: Biosynthesis and biodegradation. *Wood Science and Technology*. 1990;24(1):23-63.
- [174] Liu L, Dean JFD, Friedman WE, Eriksson KEL. A laccase-like phenoloxidase is correlated with lignin biosynthesis in *Zinnia elegans* stem tissues. *Plant Journal*. 1994;6(2):213-24.
- [175] Higuchi T. Pathways for monolignol biosynthesis via metabolic grids: Coniferyl aldehyde 5-hydroxylase, a possible key enzyme in angiosperm syringyl lignin biosynthesis. *Proceedings of the Japan Academy Series B: Physical and Biological Sciences*. 2003;79(8):227-36.
- [176] Harakava R. Genes encoding enzymes of the lignin biosynthesis pathway in *Eucalyptus*. *Genetics and Molecular Biology*. 2005;28(3 SUPPL.):601-7.
- [177] Kim S, Silva C, Zille A, Lopez C, Evtuguin DV, Cavaco-Paulo A. Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polymer International*. 2009;58(8):863-8.
- [178] Areskog D, Li J, Gellerstedt G, Henriksson G. Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. *Biomacromolecules*. 2010;11(4):904-10.
- [179] Mattinen ML, Suortti T, Gosselink R, Argyropoulos DS, Evtuguin D, Suurnakki A, et al. Polymerization of different lignins by laccase. *BioResources*. 2008;3(2):549-65.
- [180] Wojta-Wasilewska M, Trojanowski J, Luterek J. Biotransformation of sodium lignosulfonates of different molecular weights by the fungus *Pleurotus ostreatus*. *Acta Microbiologica Polonica*. 1980;29(4):353-64.
- [181] Ritter D, Jaklin-Farther S, Messner K, Stachelberger H. Polymerization and depolymerization of lignosulfonate by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on foam. *Journal of Biotechnology*. 1990;13(2-3):229-41.
- [182] Dzedzvilva EI, Bekker EG, Reshetnikova IA. Lignosulfonate polymerization by Mn<sup>2+</sup> dependent peroxidase from the fungus *Bjerkandera adusta*. *Biochemistry (Moscow)*. 1996;61(9):1201-5.
- [183] Hernandez-Perez G, Goma G, Rols JL. Enhanced degradation of lignosulfonated compounds by *Streptomyces viridosporus*. *Water Science and Technology*. 1998;38(4-5 -5 pt 4):289-97.
- [184] Miyazaki IA. Milled wood lignin oxidized by laccase or peroxidase. *Holzforschung*. 1972.
- [185] Haars A, Tautz D, Huttermann A. Bioconversion of organosoluble lignins by different types of fungi. *Resources and Conservation*. 1986;13(1):37-51.

- [186] Kosikova B, Slavikova E, Labaj J, Slameova D. Biological conversion of lignin waste products from chemical wood treatment into anticarcinogenic preparations. *Wood Research*. 2006;51(2):41-8.
- [187] Moreira PR, Almeida-Vara E, Malcata FX, Duarte JC. Lignin transformation by a versatile peroxidase from a novel *Bjerkandera* sp. strain. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2007;59(3 SPEC. ISS.):234-8.
- [188] Cho NS, Shin W, Jeong SW, Leonowicz A. Degradation of lignosulfonate by fungal laccase with low molecular mediators. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2004;25(10):1551-4.
- [189] Hernandez Fernaud JR, Carnicero A, Perestelo F, Hernandez Cutuli M, Arias E, Falc n MA. Upgrading of an industrial lignin by using laccase produced by *Fusarium proliferatum* and different laccase-mediator systems. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;38(1-2):40-8.
- [190] Bourbonnais R, Paice MG, Reid ID, Lanthier P, Yaguchi M. Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61(5):1876-80.
- [191] Osman AM, Wong KKY, Fernyhough A. The laccase/ABTS system oxidizes (+)-catechin to oligomeric products. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;40(5):1272-9.
- [192] Majcherczyk A, Johannes C, Huttermann A. Oxidation of aromatic alcohols by laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;51(2):267-76.
- [193] Areskog D, Nousiainen P, Li J, Gellerstedt G, Sipila J, Henriksson G. Original Research: Sulfonation of phenolic end groups in lignin directs laccase-initiated reactions towards cross-linking. *Industrial Biotechnology*. 2008;6(1):50-9.



## *CHAPITRE II*

### *MATÉRIELS ET MÉTHODES*





## CHAPITRE II : MATÉRIELS ET MÉTHODES

II.1. MATÉRIELS	62
II.1.1 RÉACTIFS	62
II.1.2 BIOCATALYSEURS	62
II.1.3 SOLUTIONS TAMPONS	63
II.1.4 MÉDIATEURS	63
II.2 FRACTIONNEMENT MEMBRANAIRE DES LIGNOSULFONATES	65
II.3. CARACTÉRISATION STRUCTURALE ET MOLÉCULAIRE DES LIGNOSULFONATES	67
II.3.1 DOSAGE DU POURCENTAGE EN LIGNOSULFONATES	67
II.3.2 DOSAGE DES GROUPEMENTS PHÉNOLIQUES	67
II.3.3 DOSAGE DES SUCRES RÉDUCTEUR	67
II.3.4 ANALYSE ÉLÉMENTAIRE	70
II.3.5 DÉTERMINATION DE LA DISTRIBUTION MOLÉCULAIRE DES LIGNOSULFONATES PAR CHROMATOGRAPHIE D'EXCLUSION STERIQUE	70
II.3.6 ANALYSE DES LIGNOSULFONATES PAR SPECTROSCOPIE INFRAROUGE A TRANSFORMÉE DE FOURIER	73
II.3.7 ANALYSE DES LIGNOSULFONATES PAR RÉSONANCE MAGNÉTIQUE NUCLÉAIRE PHOSPHORE	31 73
II.3.8 MESURE DE TAILLE DES MACROMOLÉCULES DE LIGNOSULFONATES	74
II.3.9 MESURES DU POTENTIEL ZETA ET DE LA MOBILITÉ ÉLECTROPHORETIQUE DES PARTICULES	75
II.3.10 MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE A TRANSMISSION	78
II.4. PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES LIGNOSULFONATES	79
II.4.1 COURBES DE SORPTION	79
II.4.2 PROPRIÉTÉS DE SURFACE	80
II.4.3. DÉTERMINATION DE LA VISCOSITÉ APPARENTE	81
II.4.4. PROPRIÉTÉS RADICALAIRES	82
II.5. POLYMÉRISATION DES LIGNOSULFONATES	84
II.6. EFFET DU MODE DE CONDUITE DE LA RÉACTION DE POLYMÉRISATION DES LIGNOSULFONATES	86
II.6.1 RÉACTION EN DISCONTINU	86
II.6.2 RÉACTION EN SEMI CONTINU	87
II.6.3 RÉACTION EN CONTINU	88

## **FIGURES**

Figure II.1 Schéma représentatif du principe de la diafiltration discontinu par réduction de volume	65
Figure II.2 Procédé de séparation des lignosulfonates en cascade	66
Figure II.3 Courbes d'étalonnages	69
Figure II.4 Représentation schématique de la séparation par exclusion stérique	71
Figure II.5 Courbe d'étalonnage de polystyrène sulfonates	72
Figure II.6 Evolution de la mobilité électrophorétique $\mu$ de particules chargées négativement en fonction de la concentration en électrolytes du milieu	77
Figure II.7 Schéma représentatif du microscope électronique à transmission	78
Figure II.8 Schéma représentatif de l'installation du DVS	80
Figure II.9 Mesure de la tension superficielle entre la solution tensioactive et l'air selon la méthode de la lame de Wilhelmy	81
Figure II.10 Plate-forme et réacteurs chemspeed pour synthèse en parallèles	84
Figure II.11 Schéma représentatif du réacteur discontinu	87
Figure II.12 Schéma représentatif du réacteur semi continu	88
Figure II.13 Schéma représentatif du réacteur continu	89

## **TABLEAUX**

Tableau II.1 Caractéristiques des lignosulfonates de sodium	62
Tableau II.2 Caractéristiques des médiateurs utilisés dans les réactions de polymérisation.	64
Tableau II.3 Caractéristiques des membranes de diafiltration	66
Tableau II.4 Analyse élémentaire des lignosulfonates commerciaux (LS) et des fractions obtenues par diafiltration	70
Tableau II.5 Les régions des groupements fonctionnels des lignines dans l'intégration des spectres RMN $^{31}\text{P}$ quantitative.	73
Tableau II.6 Effet de l'origine de la laccase	85
Tableau II.7 Effet du poids moléculaire initial	85
Tableau II.8 Effet de la concentration initiale en substrat et en enzyme	86
Tableau II.9 Effet de l'ajout du médiateur	86

## CHAPITRE II

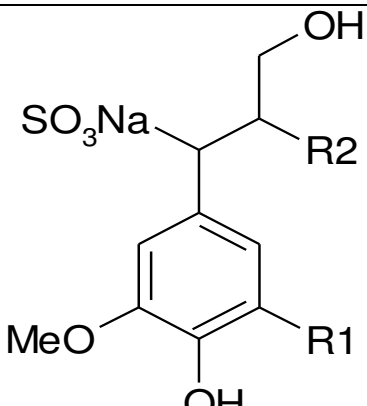
### MATÉRIELS & MÉTHODES

#### II.1. Matériels

##### II.1.1 Réactifs

Les lignosulfonates de sodium étudiés proviennent de chez Sigma/Aldrich (**Tableau II.1**).

**Tableau II.1** Caractéristiques des lignosulfonates de sodium.

<b><u>Lignosulfonates de sodium : Poids moléculaires et pureté</u></b>	
<div style="text-align: center;">  </div> <p style="text-align: center;">R1= OMe ou H ou fragment de lignine R2= fragment de lignine</p>	<p style="text-align: center;"><b><math>M_n \sim 7000</math> Da</b> <b><math>M_w \sim 52000</math> Da</b></p> <p style="text-align: center;"><b>90 % Lignosulfonates de sodium</b> <b>4 % Sucre réducteur</b> <b>6 % (autres)</b></p>

##### II.1.2 Biocatalyseurs

Les enzymes (1.10.3.2.) utilisées pour la polymérisation des lignosulfonates sont :

- La laccase de *Trametes versicolor* ayant une activité de 20,7 U/mg (Sigma, Aldrich).
- La laccase de *Myceliophthora thermophila* ayant une activité de 1200 U/mg (Novozym).
- La laccase de *Rhus vernicifera* ayant une activité de 120 U/mg (Sigma, Aldrich).

Une unité correspond à la quantité d'enzyme convertissant 1  $\mu\text{mol}$  de catéchol par minute.

### II.1.3 Solutions tampons

Les solutions tampons utilisées dans les milieux réactionnels ont été préparées à partir de la solution de sodium (dibasique et monobasique) à 0,2 M et d'acide citrique 0,1 M :

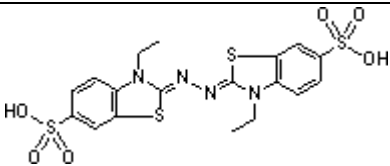
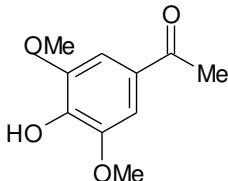
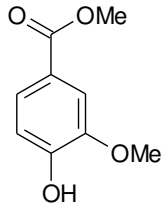
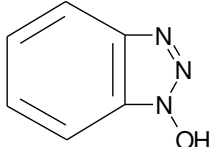
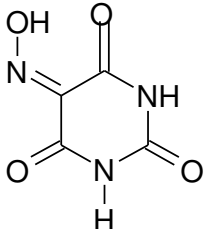
- Tampon sodium phosphate à pH 7 et 0,5 M.
- Tampon citrate phosphate à pH 4,5 et 0,1 M.
- Tampon citrate phosphate à pH 5 et 0,1M.
- Tampon sodium phosphate à pH 7,4 et 0,1M.

Le pH des solutions finales a été vérifié par un pH mètre avec une erreur de 0,1 unité pH.

### II.1.4 Médiateurs

Les médiateurs utilisés proviennent de Sigma/Aldrich et sont regroupés dans le **tableau II.2.**

**Tableau II.2** Caractéristiques des médiateurs utilisés dans les réactions de polymérisation.

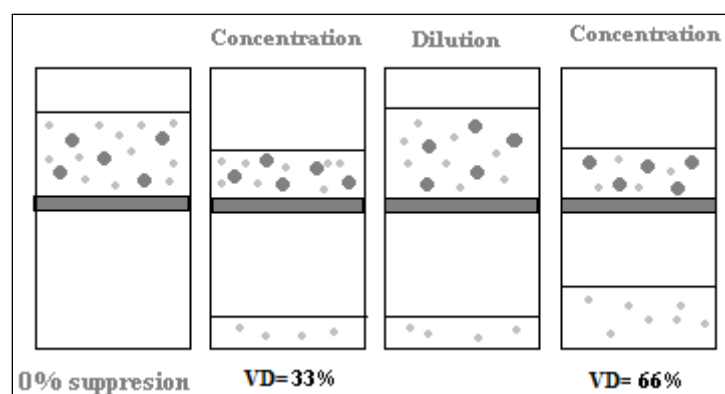
Médiateur	Structure
<p><b>2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS),</b>  <b>Pureté 97%, M= 548,68 g/mol</b></p>	
<p><b>Acétosyringone (ASG)</b>  <b>Pureté 97%, M= 196,20 g/mol</b></p>	
<p><b>Acétovanillone (ACV)</b>  <b>Pureté 97%, M= 166,17 g/mol</b></p>	
<p><b>1-Hydroxybenzotriazole (HBT)</b>  <b>Pureté 97%, M= 135,12 g/mol</b></p>	
<p><b>Acide violurique (VLA)</b>  <b>Pureté 97%, M= 175,10 g/mol</b></p>	

## II.2 Fractionnement membranaire des lignosulfonates

### Principe

La diafiltration est une technique de séparation qui utilise des membranes d'ultrafiltration (membrane permsélective) afin d'enlever complètement des petites molécules ou de concentrer des solutions. C'est une opération qui consiste à ajouter de l'eau ou une solution appropriée au retentât, qui est retraité dans le module (recirculation). La solution de traitement est habituellement diluée par un facteur donné, puis ramenée à la concentration initiale. La diafiltration peut être procédée en continu, par concentration et en discontinu par dilution séquentielle ou par réduction de volume.

Le mode de diafiltration par réduction de volume a été utilisé dans ce travail. Dans ce cas, l'échantillon est d'abord concentré à un volume prédéterminé, puis dilué afin de revenir au volume initial (**Figure II.1**).



**Figure II.1** Schéma représentatif du principe de la diafiltration discontinu par réduction de volume. (VD= Volume de diafiltration). (•) Molécule de taille inférieure au seuil de coupure (●) Molécule de taille supérieure au seuil de coupure.

### Protocole

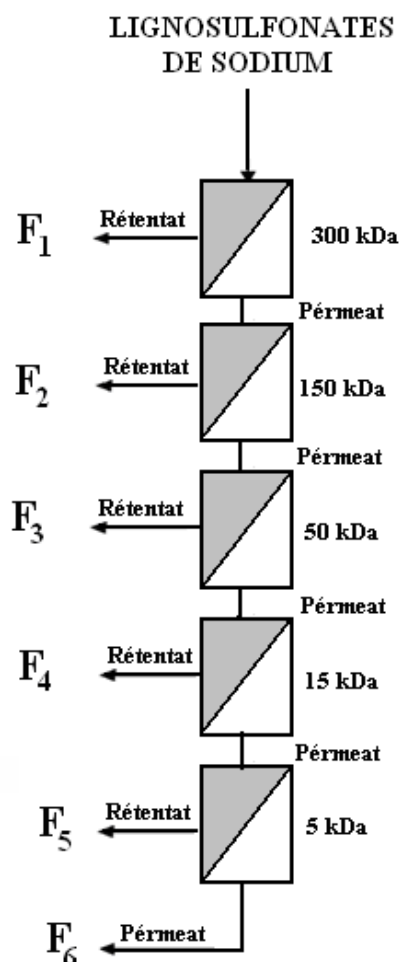
Les lignosulfonates commerciaux ont été fractionnés en utilisant des membranes de seuil de coupure de 300, 150, 50, 150 et 5 kDa. Ces membranes ont été fournies par TAMI industries (France). Les caractéristiques de ces membranes sont regroupées dans le **tableau II.3**.

**Tableau II.3** Caractéristiques des membranes de diafiltration.

<b>Seuil de coupure</b>	5-15-50-150-300 (kDa)
<b>Longueur</b>	254 mm
<b>Membrane</b>	ZrO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub>
<b>Pression maximale</b>	10 bars
<b>Gamme de pH</b>	0-14
<b>Température de process</b>	<300°C

En utilisant la diafiltration discontinue par réduction de volume, une dilution par ajout de 10% du volume initial a été effectuée après passage du même volume (10%).

La séparation a été réalisée en cascade en commençant par le plus grand seuil de coupure (**Figure II.2**). A chaque étape, le retentât est concentré et réutilisé pour l'étape de séparation suivante, en utilisant un nouveau seuil de coupure. Cette séparation a été procédée à 50°C et sous une pression de 5 bars et à un débit de 1,23 L/h.

**Figure II.2** Procédé de séparation membranaire des lignosulfonates en cascade (F= Fraction).

L'étape de lavage a été réalisée en ajoutant constamment de l'eau déminéralisée jusqu'à 5 volumes de la solution initiale de lignosulfonates (1L). Le retentât a été concentré à l'aide d'un évaporateur rotatif, lyophilisé et pesé. Après chaque étape, le perméat obtenu est ensuite fractionné en utilisant la membrane dont le seuil de coupure est inférieur à la précédente. De ce fait, les lignosulfonates ont été séparés en six fractions avec des gammes de poids moléculaire de : plus de 300 kDa (F<sub>1</sub>), 300 kDa ~ 150 kDa (F<sub>2</sub>), 150 kDa ~ 50 kDa (F<sub>3</sub>), 50 kDa ~ 15 kDa (F<sub>4</sub>), 15 kDa ~ 5 kDa (F<sub>5</sub>) et moins de 5 kDa (F<sub>6</sub>). Ce procédé a été répété 5 fois et la valeur moyenne des rendements est retenue.

### **II .3. Caractérisation structurale et moléculaire des lignosulfonates**

La caractérisation structurale et moléculaire des lignosulfonates a été réalisée sur les échantillons de lignosulfonates commerciaux et issus de la diafiltration.

#### **II.3.1 Dosage du pourcentage en lignosulfonates**

Les lignosulfonates ont été solubilisés dans de l'eau et analysés au spectromètre UV 6000LP (Thermo, France) à une longueur d'onde de 280 nm. Les lignosulfonates commerciaux ont été utilisés comme standards en raison de leur pureté (90% de lignosulfonates) (**Figure II.3.a**) [1]. Toutes les mesures ont été répétées 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

#### **II.3.2 Dosage des groupements phénoliques**

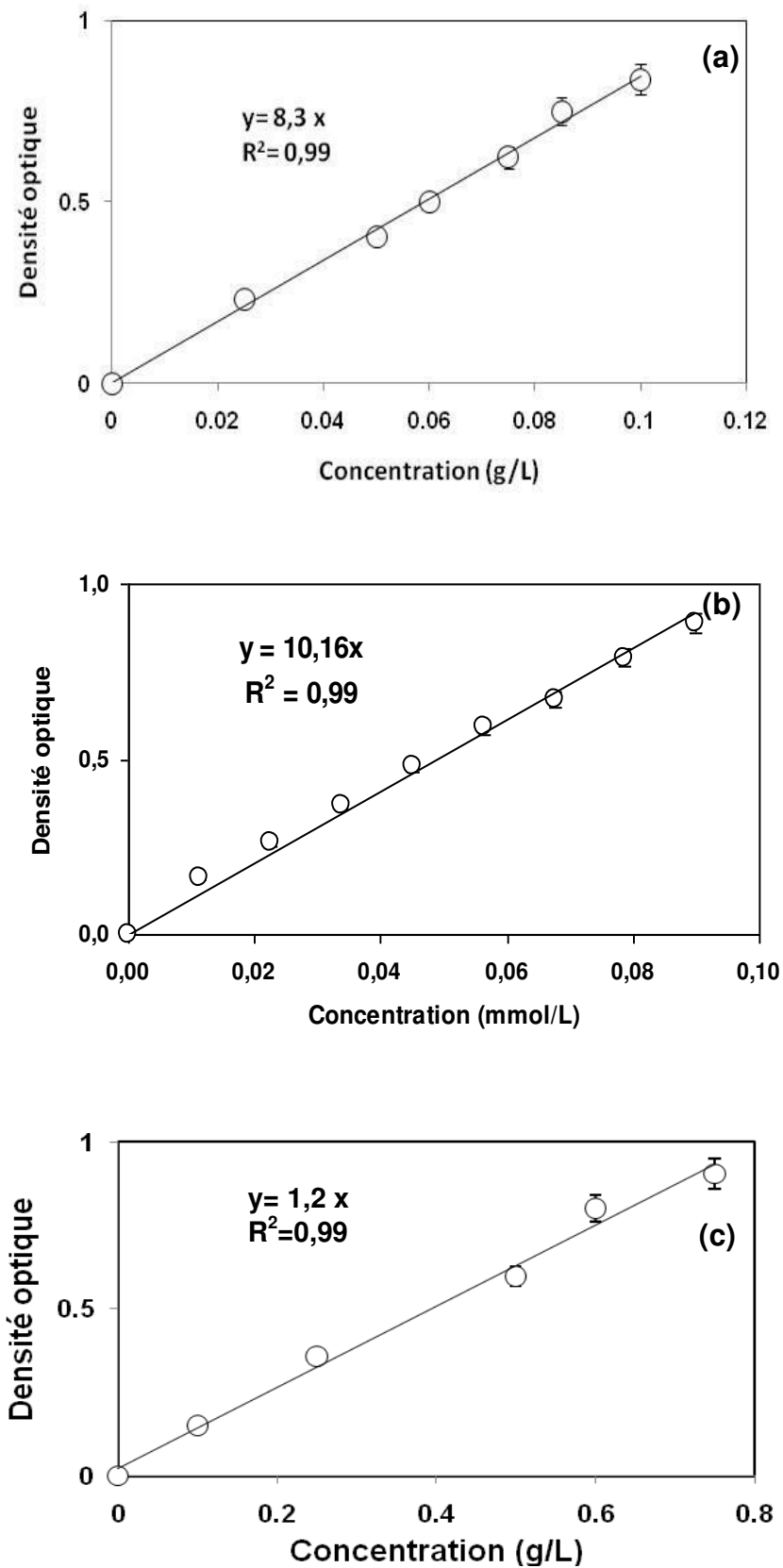
1 mL des solutions de concentration donnée de lignosulfonates a été transféré dans une fiole jaugée de 50 mL à laquelle 3 mL du réactif de Folin et Ciocalteu et 30 mL d'eau distillée y sont rajoutés. Après 5 min, 10 mL d'une solution de carbonate de sodium à une concentration de 200 g/L ont été ajoutés. Finalement, le volume a été ajusté à 50 mL avec de l'eau distillée. Le mélange a été maintenu sous agitation pendant 2 h, puis la densité optique a été mesurée à 760 nm au spectromètre UV 6000LP (Thermo, France). La courbe d'étalonnage a été réalisée en utilisant la vanilline comme standard (**Figure II.3.b**) [2]. Toutes les mesures ont été répétées 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

#### **II.3.3 Dosage des sucres réducteurs**

1 ml des solutions de lignosulfonates de concentrations connues a été ajouté à 1,5 mL d'acide nitrosalicylique (réactif de Miller) [3]. Le mélange a été agité puis chauffé à 100°C pendant 15 minutes dans un bain marie. Ensuite, les solutions ont été refroidies dans un bain de glace jusqu'à ce que la température soit ambiante. L'absorbance a été mesurée à 640 nm



dans un spectromètre UV 6000LP (Thermo, France). La courbe d'étalonnage a été effectuée en utilisant le glucose (**Figure II.3.c**). Toutes les mesures ont été répétées 3 fois et la valeur moyenne est retenue.



**Figure II.3** Courbes d'étalonnages : lignosulfonates (a), vanilline (b) et glucose (c).

### II.3.4 Analyse élémentaire

L'analyse élémentaire a été réalisée par un analyseur élémentaire (Thermo Finnigan EA 1112, France), équipé d'un passeur automatique de 32 échantillons et d'une colonne chromatographique Porapak. Le système est géré par le logiciel Eager 300. Les éléments dosés sont C, H, N, S et O. Les résultats sont fournis avec une précision absolue de  $\pm 0,2 \%$  et sont validés pour deux essais. 10 mg de lignosulfonates ont été pesés et analysés. Les résultats de l'analyse élémentaire des lignosulfonates commerciaux et des fractions obtenues sont regroupés dans le **Tableau II.4**. Toutes les mesures ont été répétées 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

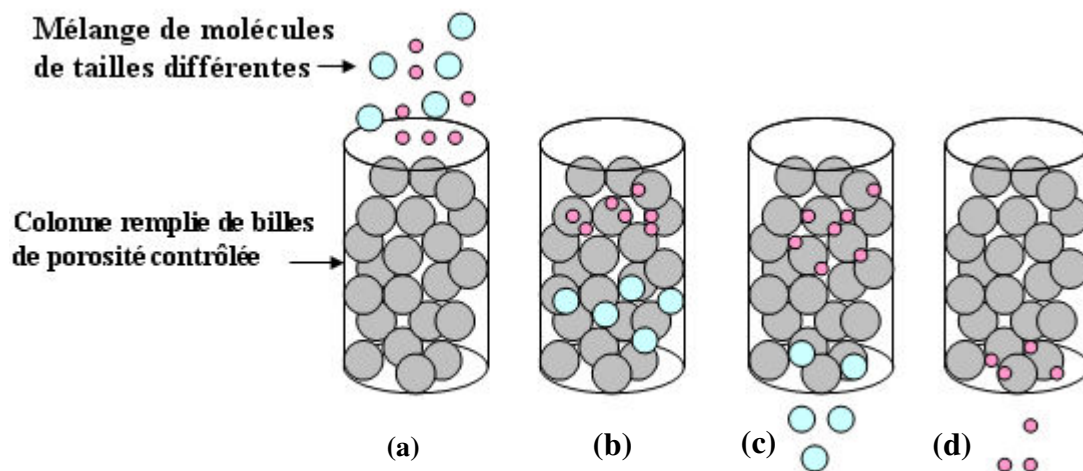
**Tableau II.4** Analyse élémentaire des lignosulfonates commerciaux (LS) et des fractions obtenues par diafiltration (F). (C) Carbone ; (H) Hydrogène ; (N) Azote ; (O) Oxygène ; (S) Soufre.

Fractions	Pourcentage en élément				
	%C	%H	%N	%O	%S
LS	40,39 $\pm$ 0,01	4,19 $\pm$ 0,04	0,14 $\pm$ 0,01	35,98 $\pm$ 0,04	4,42 $\pm$ 1,12
F <sub>1</sub>	47,27 $\pm$ 0,11	4,57 $\pm$ 0,28	0,32 $\pm$ 0,01	33,22 $\pm$ 0,27	3,53 $\pm$ 1,22
F <sub>2</sub>	42,15 $\pm$ 0,07	4,45 $\pm$ 0,24	0,30 $\pm$ 0,01	34,88 $\pm$ 0,04	2,77 $\pm$ 1,01
F <sub>3</sub>	40,33 $\pm$ 0,63	3,95 $\pm$ 0,32	0,55 $\pm$ 0,01	33,11 $\pm$ 0,19	2,15 $\pm$ 0,03
F <sub>4</sub>	33,36 $\pm$ 0,06	3,80 $\pm$ 0,04	0,48 $\pm$ 0,01	36,30 $\pm$ 0,28	2,09 $\pm$ 0,02
F <sub>5</sub>	34,92 $\pm$ 0,01	3,85 $\pm$ 0,09	0,51 $\pm$ 0,00	35,37 $\pm$ 0,23	1,17 $\pm$ 0,01
F <sub>6</sub>	28,21 $\pm$ 0,09	3,59 $\pm$ 0,32	0,37 $\pm$ 0,01	39,15 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,00

### II.3.5 Détermination de la distribution moléculaire des lignosulfonates par chromatographie d'exclusion stérique

La chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ou la chromatographie par perméation de gel (CPG) est une technique chromatographique de séparation selon la masse. Cette séparation est basée sur la diminution d'entropie d'une macromolécule lorsqu'elle pénètre dans un pore de diamètre comparable à ses propres dimensions. Le nombre de conformations permises pour un polymère flexible diminue fortement à l'approche d'une paroi solide. Pour éviter ces régions de faible entropie, le polymère garde une distance de séparation entre son centre de gravité et l'interface solvant/gel qui est, en moyenne, de l'ordre du rayon hydrodynamique de la molécule. La rétention d'un soluté en SEC peut être exprimée en fonction du coefficient de partage, du volume de la phase mobile et du volume des pores. Le coefficient de partage dépend de la taille relative de la macromolécule par rapport au diamètre des pores. Les molécules qui sont exclues des pores sortent en premier, alors que celles qui

peuvent explorer la totalité du volume des pores sortent en même temps que le solvant (**figure II.4**).



**Figure II.4** Représentation schématique de la séparation par exclusion stérique.  
 (a) Ajout du mélange de molécules de tailles différentes (b) Séparation des molécules par entropie à l'intérieur de la colonne (c) Sortie des molécules exclues des pores (d) sortie des molécules qui peuvent explorer la totalité du volume des pores.

### Protocole

Les échantillons de lignosulfonates (brut et fractions) ont été analysés par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) (HPLC LaChrom Merck, Allemagne) afin de déterminer leur distribution moléculaire ( $M_w$ ,  $M_n$  et  $P_{di}$ ).

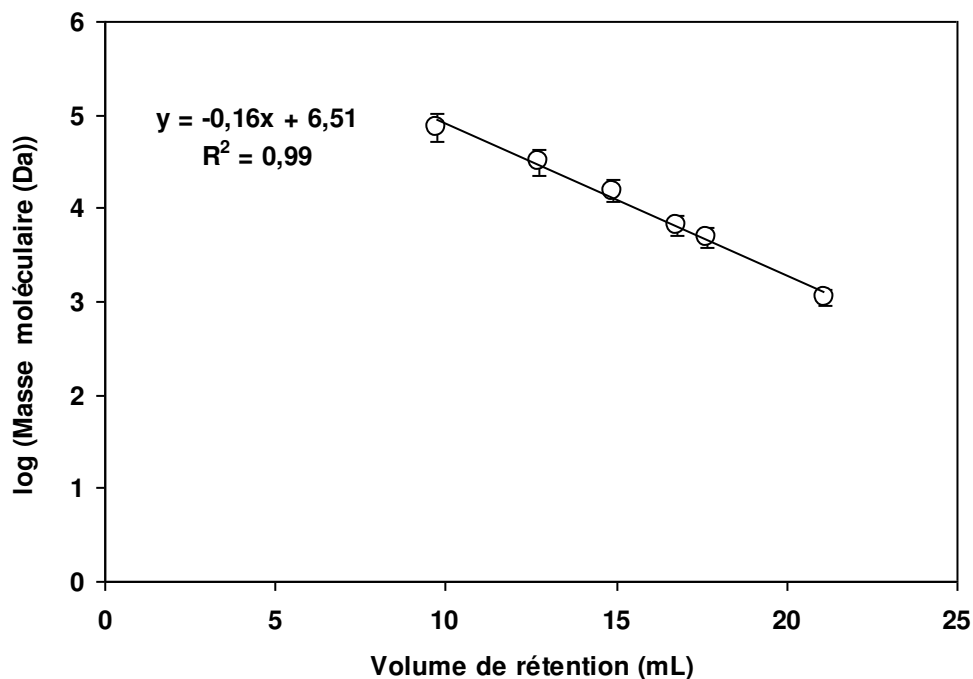
Le système se compose de :

- Une pompe L-2130.
- Un échantillonneur automatique L-2200.
- Une colonne Superdex 200HR 10/30 (24ml, 13  $\mu$ m, dextran / matrice d'agarose).
- Un four de colonne L-7350.
- Un logiciel d'acquisition et de traitement de chromatogramme EZ-Chrom®.

La détection a été effectuée en utilisant un détecteur UV diode L-2455 à 280 nm.

Avant d'être analysés, les échantillons ont été filtrés à travers une membrane en cellulose régénérée (0,22  $\mu$ m). 50  $\mu$ L des échantillons ont été injectés dans le système SEC. Les fractions de lignosulfonates ont été dissoutes dans une solution de 0,1 % de tampon phosphate à pH 7 contenant 0,15 M de NaCl. Cette même solution a été utilisée comme phase mobile. Le débit est de 0,4 mL à 25°C et à 11 bars. La calibration a été effectuée en utilisant les

polystyrènes sulfonâtes (PSS) en tant que standards pour définir le poids moléculaire des fractions (**figure II.5**).



**Figure II.5** Courbe d'étalonnage de polystyrène sulfonâtes.

Les chromatographes ont été intégrés à partir de segments d'intervalle de trente secondes. Le poids moléculaire moyen en nombre ( $M_n$ ), le poids moléculaire moyen en poids ( $M_w$ ), et la polydispersité ( $Pdi$ ) ont été calculés comme suit :

$$\text{Masse moléculaire moyen en nombre } Mn = \frac{\sum_{i=1}^n Aire_i}{\sum_{i=1}^n \frac{Aire_i}{M_i}} \quad (\text{Eq.1})$$

$$\text{Masse moléculaire moyen en poids } Mw = \frac{\sum_{i=1}^n Aire_i \times M_i}{\sum_{i=1}^n Aire_i} \quad (\text{Eq.2})$$

$$\text{Polydispersité } Pdi = \frac{M_w}{M_n} \quad (\text{Eq. 3})$$

Où  $M_i$  et  $Aire_i$  sont respectivement la masse moléculaire et l'aire de chaque segment  $i$  [4]. Toutes les mesures ont été répétées 3 fois.

### II.3.6 Analyse des lignosulfonates par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR)

L'analyse FTIR des lignosulfonates a été effectuée avec un cristal à réflexion totale atténuée ATR (Bruker, France) et un détecteur à sulfate de triglycine deutéré (DTGS).

Les échantillons (1% de la masse totale) ont été mélangés avec du bromure de potassium (KBr). Le mélange en poudre a été ensuite broyé dans une presse mécanique afin de former une pastille translucide à travers laquelle le faisceau du spectromètre peut passer. Le diaphragme a été fixé à 4 mm et la vitesse de balayage à 10 kHz. Les spectres ont été obtenus à partir de 256 scans. La gamme de nombre d'ondes utilisée est de 4000 et 900  $\text{cm}^{-1}$  avec une résolution de 2  $\text{cm}^{-1}$ . Toutes les mesures ont été répétées 3 fois.

### II.3.7 Analyse des lignosulfonates par Résonance Magnétique nucléaire Phosphore 31 (RMN $^{31}\text{P}$ )

#### Principe

La RMN  $^{31}\text{P}$  est l'une des techniques de RMN les plus courantes. Le noyau 31 phosphore a une abondance isotopique de 100% et un ratio gyromagnétique relativement élevé. Il dispose également d'un spin  $\frac{1}{2}$ , rendant les spectres relativement faciles à obtenir et à interpréter. Le phosphore est généralement trouvé dans les composés organiques et dans les complexes de coordination (comme les phosphines). Cette technique a été développée par Argyropoulos [5] et ses collaborateurs afin de quantifier les groupements hydroxyles fonctionnels dans les lignines et elle est largement décrite dans la littérature (**Tableau II.5**).

**Tableau II.5** Les régions des groupements fonctionnels des lignines, phosphorylés par le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1,2,3-dioxaphospholane, utilisées dans l'intégration des spectres RMN  $^{31}\text{P}$  quantitative.

Structure ou groupement fonctionnel	Région d'intégration (ppm)
Cyclohexanol (standard interne)	145,3-139,8
OH aliphatique	150,0-145,3
OH des unités syringyl	144,0-141,0
OH des unités guaiacyl	141,0-137,0
COOH	136,2-134,0

## Protocole

Les expériences de RMN ont été effectuées à l'aide d'un appareil Bruker Avance-400 spectromètre (Bruker, France), en utilisant un découplage inverse-dépendants (Valse-16) paramétré à un angle de 30° et à 25 impulsions. Les données de RMN<sup>31</sup>P ont été traitées en utilisant le logiciel NUTS RMN (Acorn RMN Inc).

Les lignosulfonates ont été phosphorylés avec le 2-chloro-4,4,5,5-tétraméthyl-1, 2,3-dioxaphospholane en présence de cyclohexanol comme standard interne. Les spectres ont été analysés par RMN<sup>31</sup>P quantitative selon une méthode décrite par Granata et Argyropoulos [5]. La concentration de chaque groupement fonctionnel hydroxyle (mmol / g) a été calculée à l'aide de l'étalon interne (cyclohexanol) dont on connaît le nombre de ses fonctions hydroxyles.

### II.3.8 Mesure de taille des particules de lignosulfonates en solution

Les mesures de taille des lignosulfonates commerciaux et des fractions obtenues par diafiltration ont été réalisées en utilisant le Nanosizer ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre). C'est un appareil de diffusion dynamique de la lumière type qui permet une mesure de taille de 0,6 nm à 6 µm. Il est équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) ayant une longueur d'onde de 633 nm, d'un détecteur à photodiode, d'un photomultiplicateur et d'un corrélateur.

Les mesures ont été effectuées à une concentration de 0,5 g/L, 1 g/L en présence ou en absence de NaCl à un angle de diffusion de 173° et à une température de 25°C, pour toutes les fractions. Des cuvettes verticales de 10 mm de trajet optique ont été utilisées comme cellules de mesure. Les fonctions d'autocorrélation ont été analysées par l'algorithme d'analyse CONTIN (modèle de calcul intégré dans le logiciel Malvern) permettant de déterminer la distribution des coefficients de diffusion translationnelle (DT). Le coefficient de diffusion DT (m<sup>2</sup>.s<sup>-1</sup>) est relié au rayon hydrodynamique (R<sub>h</sub>) des particules qui diffusent selon la relation de Stokes-Einstein :

$$D_T = K_B T / 6 \pi \eta R_h \text{ (Eq. 4)}$$

Où  $\eta$  est la viscosité du solvant (Pa.s) et  $k_B T$  est l'énergie thermique. Les résultats obtenus par l'algorithme CONTIN permettent de déterminer à la fois les distributions de R<sub>h</sub> et l'amplitude respective de chaque population de particules. Toutes les mesures ont été répétées 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

### II.3.9 Mesures du potentiel zêta et de la mobilité électrophorétique des particules

#### Principe

Le principe de cette technique est de provoquer la migration des particules d'un échantillon contenu dans la cellule de mesure en appliquant un champ électrique. Les particules sont en mouvement dans un réseau d'interférences généré par le croisement de deux faisceaux laser. La vitesse de déplacement des particules (vélocité) est ainsi évaluée par mesure de fluctuation temporelle de l'intensité diffusée par les particules en mouvement. La mobilité électrophorétique est calculée à partir de la vitesse des particules en appliquant la théorie de von Smoluchowski modifiée par Henry [6] selon l'équation (5) :

$$\mu_E = v / E \text{ (Eq.5)}$$

où  $\mu_E$  est la mobilité électrophorétique ( $\mu\text{m.cm.s}^{-1}.\text{V}^{-1}$ ),  $v$  est la vitesse des particules ( $\mu\text{m.s}^{-1}$ ) et  $E$  le champ électrique appliqué par unité de longueur ( $\text{V.cm}^{-1}$ ). L'appareil a d'abord été étalonné avec une solution standard DTS005 de latex (potentiel Zêta de -50 mV). Les mesures ont été effectuées à une température de 25 °C.

La mobilité électrophorétique d'une particule est sa vitesse par unité de champ électrique. Elle est convertie en valeur de potentiel Zêta en la multipliant par un facteur dépendant de la permittivité et de la nature du milieu, comme cela est décrit par l'équation de Henry :

$$\zeta = (3 \eta f(\kappa a)) / 2 \varepsilon \mu_E \text{ (Eq.6)}$$

où  $\varepsilon$  est la permittivité,  $\eta$  la viscosité du milieu de dispersion,  $f(\kappa a)$  est une fonction liée à la proportion entre la taille ( $a$ ) caractéristique du système et la longueur de Debye ( $1/\kappa$ ) [7].

#### Théorie

La théorie d'analyse des particules molles est un modèle validé [8-12], qui suggère la présence autour du noyau des particules, d'une couche de polymère accessible aux contre-ions. Récemment, ce modèle a été utilisé pour étudier les propriétés de surface de différentes bactéries [11-18], de macromolécules [19, 20], de nanoparticules [21-23] ainsi que pour étudier les interactions électrostatiques entre particules molles [19, 24, 25].

Ce modèle vise à déterminer ZN, où Z correspond à la valence de ces charges et N représente la densité de charge dans la région polyélectrolytique (charges/m<sup>3</sup>). Le modèle



permet également la détermination de  $1/\lambda$ , qui est liée à la profondeur de la couche accessible aux contre-ions. Ce paramètre est généralement décrit comme le degré de résistance à l'écoulement du liquide dans la région polyélectrolytique [26]. Un sel, tel que le NaCl est utilisé pour masquer progressivement les charges des polymères. Le modèle théorique appliqué aux résultats obtenus prend comme paramètres ajustables ZN et  $1/\lambda$ .

La mobilité électrophorétique ( $\mu_E$ ) d'une particule molle est exprimée par l'équation 7 :

$$\mu_E = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r}{\eta} \frac{\psi_0 / \kappa_m + \psi_{DON} / \lambda}{1 / \kappa_m + 1 / \lambda} + \frac{eZN}{\eta \lambda^2} \quad (\text{Eq.7})$$

où  $\eta$  est la viscosité du milieu (exprimée en  $\text{Pa.s}^{-1}$ ).  $\kappa_m$  est le paramètre de Deby Hückel de la couche de polyélectrolytes calculé à partir de l'équation suivante (A représente  $ZN/2zn$ ) :

$$\kappa_m = \kappa [1 + A^2]^{1/4} \quad (\text{Eq.8})$$

$\kappa$  est le paramètre de Deby Hückel des particules et il est défini par l'équation 9 :

$$\kappa = \left( \frac{2z^2 e^2 n}{\varepsilon_0 \varepsilon_r \kappa T} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq.9})$$

$z$  est la valence de la solution électrolytique utilisée afin de modifier la force ionique du milieu. Du chlorure de sodium a été utilisé comme électrolyte, par conséquent  $z = 1$  ;  $e$ , est la charge électrique élémentaire ( $1,6 \times 10^{-19}$  C) ;  $\varepsilon_r$  et  $\varepsilon_0$  sont respectivement la permittivité relative de la solution d'électrolyte et la permittivité absolue du vide ( $\varepsilon_r = 80$  et  $\varepsilon_0 = 8,85 \times 10^{-23}$   $\text{JK}^{-1}$ ),  $T$  ( $^{\circ}\text{K}$ ) est la température thermodynamique,  $k$  la constante de Boltzmann et  $n$  est la valeur de la concentration en électrolytes (exprimée en  $\text{osmoles.m}^{-3}$ ).

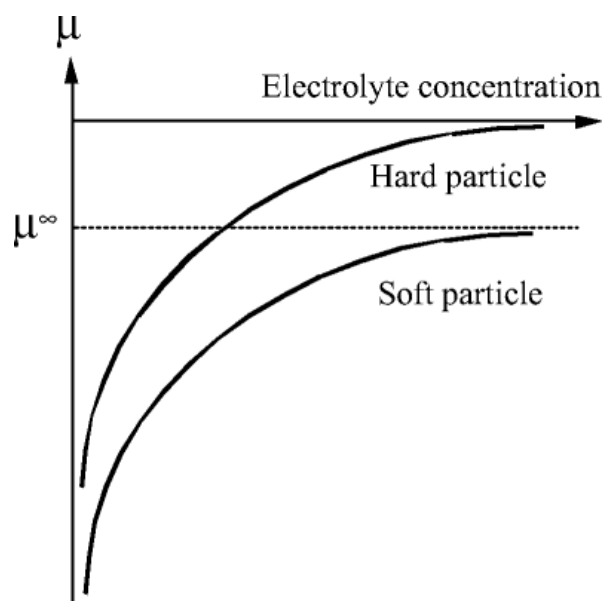
$\psi_{DON}$  est le potentiel de Donnan et peut être défini par l'équation 10:

$$\psi_0 = \frac{\kappa T}{ze} \ln(A + (A^2 + 1)^{1/2}) \quad (\text{Eq.10})$$

$\psi_0$  est le potentiel à la limite de la surface. Il est représenté par l'équation 11 :

$$\psi_0 = \frac{\kappa T}{ze} \ln(A + (A^2 + 1)^{1/2}) + \frac{1}{A} \times (1 - (A^2 + 1)^{1/2}) \quad (\text{Eq.11})$$

En résumé, la théorie nous permet d'établir et de tracer  $\mu$  en fonction de  $n$  (**Figure II.6**). La mobilité électrophorétique des particules molles tend vers des valeurs non nulles même aux concentrations limites en sel, contrairement à celles des particules dures qui elles, tendent vers zéro [8, 27].



**Figure II.6** Evolution de la mobilité électrophorétique  $\mu$  de particules chargées négativement en fonction de la concentration en électrolytes du milieu

### Protocole

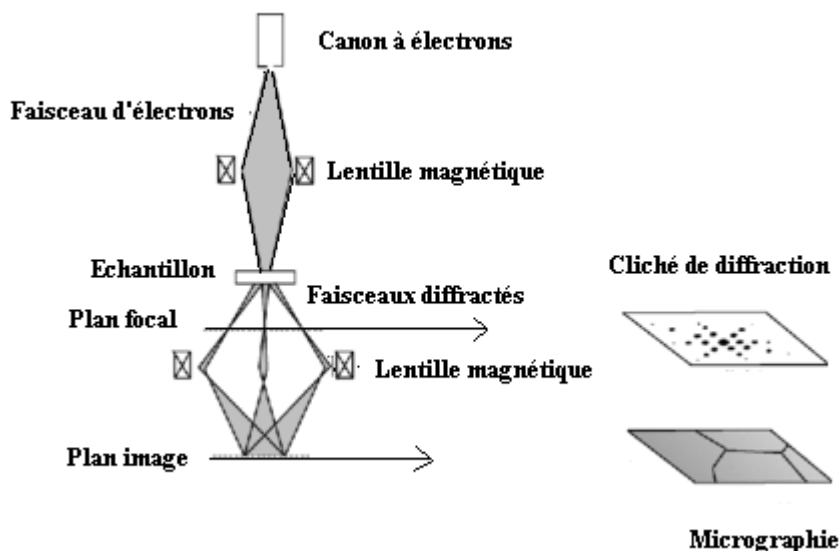
Les mesures de mobilité électrophorétique réalisées avec les différentes fractions de lignosulfonates ont été effectuées à l'aide d'un Zetasizer ZS (HPPS 5001, Malvern Instruments, Angleterre) équipé d'un faisceau laser de type He/Ne (puissance 4 mW) de longueur d'onde 633 nm. Les mesures de mobilité électrophorétique sont alors effectuées par Electrophorèse Laser Doppler (ELD). L'influence de la concentration en sel (NaCl) du milieu sur la mobilité électrophorétique des lignosulfonates en solution aqueuse a été étudiée (1 g/L).

La théorie d'analyse des particules molles [9] a été appliquée aux lignosulfonates commerciaux et aux fractions obtenues. Cette étude a permis de caractériser les propriétés de surface des particules. Les concentrations en sel (NaCl) du milieu varient de 0 à 200 mM. Les résultats de mesure de la mobilité électrophorétique sont exprimés en fonction de la concentration en sel. Toutes les mesures ont été répétées 2 fois et la valeur moyenne est retenue.

### II.3.10 Microscopie électronique à transmission

#### Principe

La microscopie électronique à transmission (MET) est une technique de microscopie basée sur le principe de diffraction des électrons et pouvant atteindre un grossissement de 5000000 fois. Cette technique consiste à placer un échantillon suffisamment mince sous un faisceau d'électrons ce qui permet de visualiser l'hologramme obtenu qui est la figure de diffraction dans le plan focal de l'objectif. Suivant l'épaisseur, la densité ou la nature chimique de l'échantillon, les électrons sont plus ou moins absorbés. Le faisceau est diffracté en plusieurs petits faisceaux, et ceux-ci se recombinaient pour former l'image, grâce à des lentilles magnétiques (**Figure II.7**).



**Figure II.7** Schéma représentatif du microscope électronique à transmission.

## Protocole

Les observations microscopiques ont été réalisées avec un microscope électronique à transmission CM20 (Philips, Pays-Bas). Ces observations ont été effectuées pour une solution préparée (0,5 g/L) avec la fraction F<sub>3</sub> dans de l'eau ultra pure. Une goutte de cette solution a été déposée à la surface d'une grille de cuivre (Quantifoil, Jena, Allemagne) recouverte par un film continu de carbone. La grille a été ensuite séchée à l'air avant d'être introduite dans le microscope électronique.

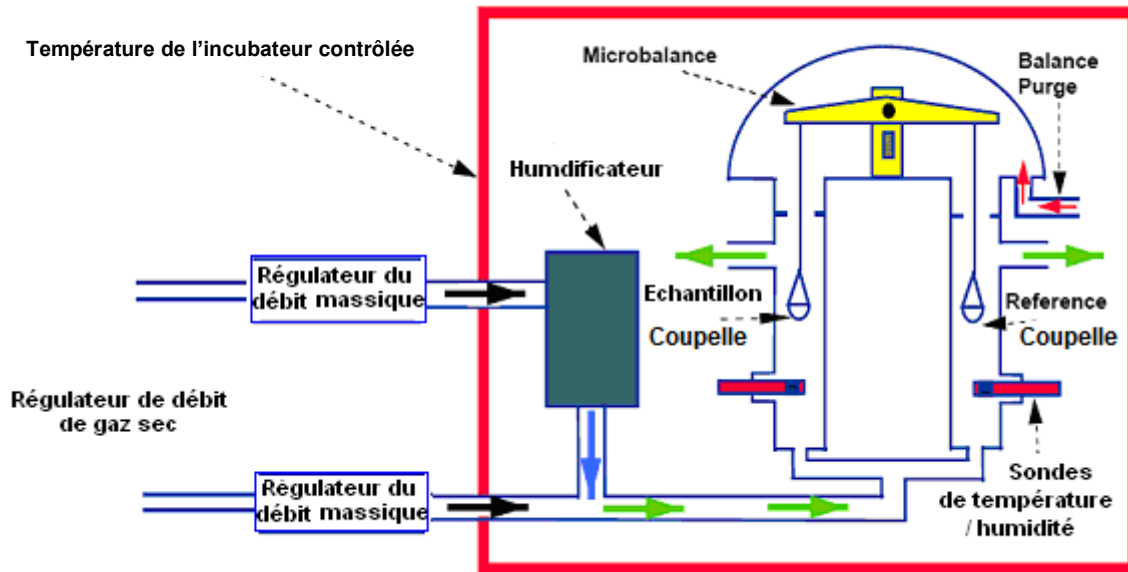
## II.4. Propriétés physico-chimiques des lignosulfonates

### II.4.1 Courbes de sorption

L'adsorption dynamique de la vapeur d'eau (DVS) est une technique développée pour suivre et collecter le changement de poids d'un échantillon en continu en fonction du temps à toute humidité relative (RH) souhaitée entre 0 et 98% dans un court laps de temps. Au cœur du système DVS, une microbalance ultrasensible est capable de mesurer des changements de masse inférieure à 1 partie par 10 millions au niveau de l'échantillon.

L'instrument principal de mesure est logé dans un incubateur à température constante contrôlée avec précision. Ce qui assure une stabilité de base très élevée à l'instrument, ainsi que le contrôle précis de l'humidité relative. La microbalance est située dans une zone de température séparée de l'échantillon en raison de la plage de température étendue de l'incubateur (5-85 °C).

L'humidité nécessaire est générée en mélangeant le poids sec et le débit de vapeur de gaz saturé dans les proportions correctes à l'aide des contrôleurs de débit massique. Les sondes d'humidité et de température sont situées juste en dessous de l'échantillon et de la coupelle de référence pour donner une vérification indépendante de la performance du système. Les coupelles de référence et de l'échantillon sont mises sur une boucle connectée à la microbalance. La figure **II.8** est une représentation de l'installation du DVS.



**Figure II,8** Schéma représentatif de l'installation du DVS.

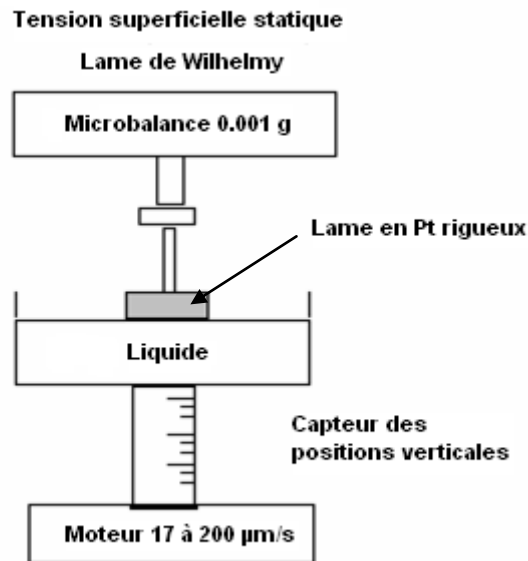
### Protocole

Des échantillons d'environ 15-20 mg ont été déposés sur un côté de la balance à deux plateaux et le programme permet de contrôler l'humidité de 0% pendant 5 h (phase de séchage). Cette étape a permis de réduire et de stabiliser l'humidité de l'échantillon à zéro avant l'humidification. Puis la RH a été portée à différentes valeurs entre 5% et 95%. Les formulations des changements de masse ( $m$ ) et le taux des changements de masse ( $dm / dt$ ) ont été limités. L'erreur de toutes les mesures est de 0,2%.

### II.4.2 Propriétés de surface

Cette méthode consiste à placer une lame de platine au dessus de la surface de 50 mL de solution tensioactive contenue dans un cristalliseur posé à son tour sur un plateau. En faisant remonter le plateau, la lame est plongée dans la solution et la force nécessaire pour la ramener à sa position initiale correspond à la tension superficielle exprimée en mN/m.

Les mesures de tension superficielle ont été réalisées selon la méthode de la lame de Wilhelmy (**figure II.9**).



**Figure II.9** Mesure de la tension superficielle entre la solution tensioactive et l'air selon la méthode de la lame de Wilhelmy.

### Protocole

Les lignosulfonates à étudier ont été solubilisés dans de l'eau distillée à différentes concentrations (entre 1 g/L et 100 g/L). Les mesures ont été réalisées à l'aide d'un tensiomètre Krüss modèle K12 à température ambiante. Chaque mesure est répétée 3 fois et la valeur moyenne est retenue.

### II.4.3. Détermination de la viscosité apparente

L'analyse a été réalisée par un rhéomètre StressTech couplé à un bain-marie (RMS Lauda). L'ensemble des tests a été conduit avec un module plan de 40 mM de diamètre. Un couvercle a été placé au dessus de l'échantillon pendant l'analyse afin de limiter l'évaporation.

Les lignosulfonates ont été préparés à différentes concentrations : 10, 50 et 100 g/L dans l'eau à 20 °C. La viscosité apparente a été mesurée pour une force appliquée comprise entre 0,05 et 10 Pa selon les concentrations en lignosulfonates. Pour chaque échantillon, trois répétitions ont été effectuées.

#### II.4.4. Propriétés radicalaires

La méthode de mesure du pouvoir anti-radicalaire par piégeage de radicaux ABTS<sup>•+</sup> et la méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) ont été utilisées afin d'étudier les propriétés anti-radicalaires des lignosulfonates.

##### Principes

##### Dosage par piégeage des radicaux ABTS<sup>•+</sup>

En réagissant avec le persulfate de potassium (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>), l'ABTS (acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenz-thiazoline-6-sulfonique)) forme le radical ABTS<sup>•+</sup>. La réaction entre le cation radical dérivé ABTS<sup>•+</sup> et la molécule antioxydante est la suivante :



L'ajout d'un antioxydant va réduire ce radical et provoquer la décoloration du mélange. La décoloration du radical est proportionnelle à la concentration en antioxydant.

##### Méthode ORAC

Le test mesure la dégradation oxydative par la décomposition thermique (37°C) de la fluorescéine par l'AAPH (2,2'-azobis (2 amidinopropane) dihydrochloride). La présence d'antioxydant dans l'échantillon retarde la dégradation. L'AAPH produit le radical peroxy par chauffage, ce qui endommage la molécule fluorescente, et entraîne la perte de fluorescence. Les antioxydants protègent la fluorescéine de la dégradation oxydative et donc ralentissent la décroissance de la fluorescence. Le degré de protection est quantifié à l'aide d'un fluorimètre.

##### Protocoles

La mesure de l'activité anti-radicalaire a été réalisée à l'aide d'un lecteur de microplaques (en polystyrène, 96 puits) Xenius multi détection (SAFAS, Monaco).

##### Dosage par piégeage des radicaux ABTS<sup>•+</sup>

L'activité anti-radicalaire des lignosulfonates a été évaluée par le piégeage des radicaux libre ABTS<sup>•+</sup>. Les radicaux libres obtenus à partir de l'ABTS (ABTS<sup>•+</sup>) ont été produits par la réaction d'une solution de 7 mM d'ABTS et de 2,45 mM de persulfate de potassium. Avant d'être utilisée, cette solution doit être laissée dans le noir à température ambiante entre 12 à 16 heures. La solution d'ABTS<sup>•+</sup> a été diluée dans du tampon phosphate salin (pH 7,4) jusqu'à obtenir une absorbance de 0,5 à une longueur d'onde de 734 nm et équilibrée à 30 ° C. Par la suite, 200 µl d'ABTS<sup>•+</sup> et (10, 20, 35, 50, 70, 80 µl) de solutions

de lignosulfonates (10 mg/L) ont été mélangés et ajustés à 300 µl avec la solution tampon. Après 15 min d'incubation, la densité optique a été mesurée.

Le pourcentage d'inhibition d'ABTS<sup>•+</sup> est calculé par la formule suivante :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{DO_{\text{initial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{initial}}} \times 100 \text{ (Eq. 13)}$$

La valeur du TEAC correspondant à la concentration molaire de trolox (µM) équivalente permettant d'avoir le même pourcentage d'inhibition qu'à 10 mg/L de produit est déterminée à partir des courbes d'inhibition en fonction de la concentration.

#### Méthode ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

Des solutions d'AAPH et de fluorescéine ont été préparées dans une solution tampon phosphate de 75 mM à pH 7,4. Le contrôle de cette réaction est le Trolox qui est également disposé dans le même tampon.

Six différentes quantités (10, 20, 35, 50, 70, 80 µl) de solutions de lignosulfonates après séparation membranaire, à une concentration de 10 mg/L ont été placées dans les puits d'une microplaque contenant la fluorescéine. Le volume a été ajusté au même volume (80 µL) avec la solution de tampon phosphate. Par la suite, le mélange a été préincubé pendant 30 min à 37°C, avant d'ajouter rapidement la solution d'AAPH (220 µL) à l'aide d'une pipette multicanaux. La microplaque a été immédiatement placée dans le lecteur et la fluorescence est enregistrée toutes les 6 minutes durant 240 min. La fluorescence est lue à une longueur d'onde d'excitation de 485 nm et un filtre d'émission de 528 nm. Un blanc contenant la fluorescéine, l'AAPH et la solution de tampon phosphate, au lieu de la solution antioxydante, a été analysé dans les mêmes conditions que les solutions de lignosulfonates. La capacité d'inhibition a été exprimée en équivalence Trolox (µM), et est quantifiée grâce à l'intégration de l'aire sous la courbe (AUC). Toutes les mesures ont été répétées 20 fois. L'aire sous la courbe de décroissance de la fluorescence (AUC) a été calculée selon l'équation

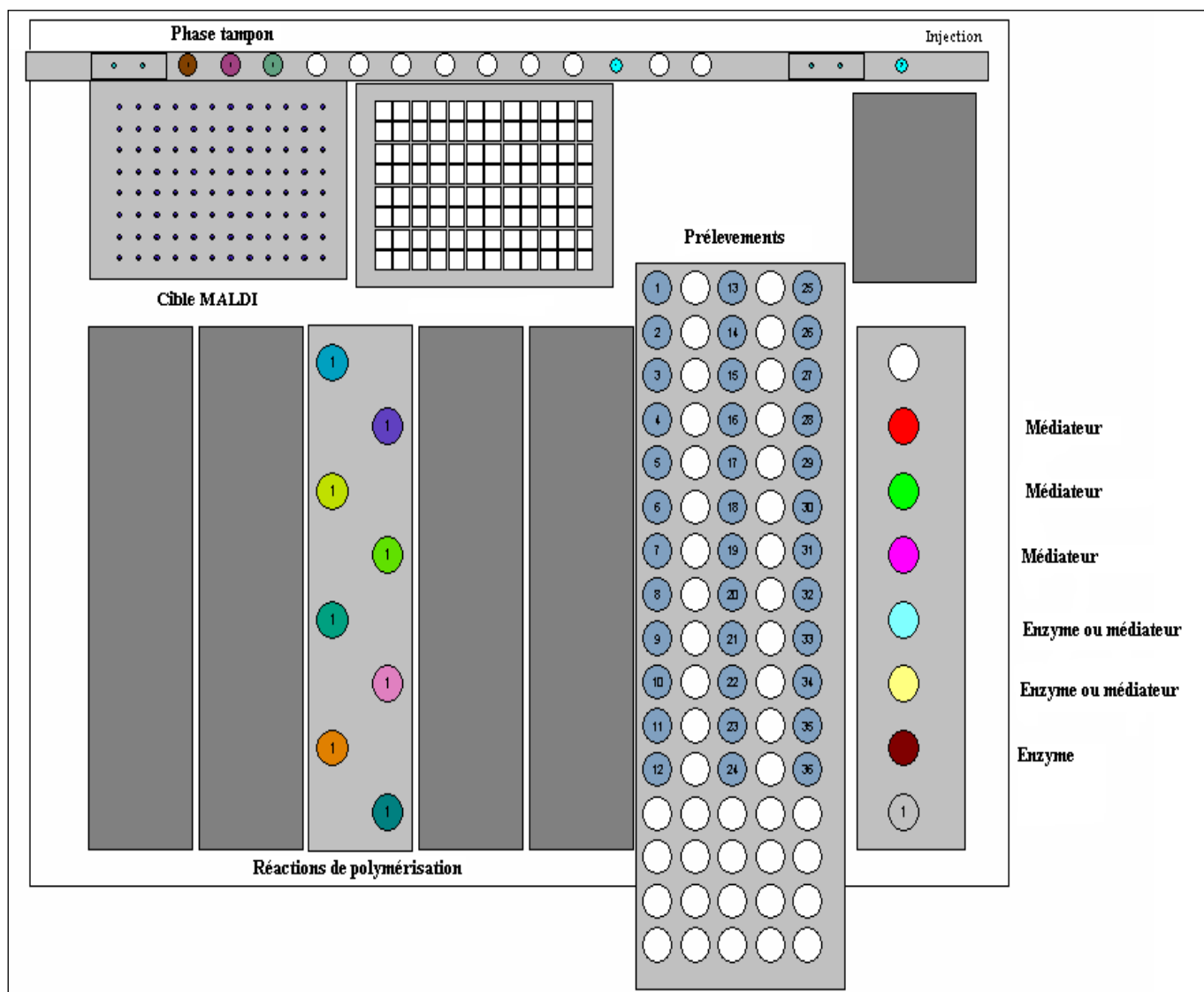
$$AUC = 1 + \sum_{i=6}^{i=240} f_i / f_0 \text{ (Eq. 14)}$$

où  $f_0$  et  $f_i$  sont la fluorescence initiale lue à 0 min et à  $i$  min, respectivement.



## II.5. Polymérisation des lignosulfonates

Les réactions de polymérisation des lignosulfonates par différentes laccases et dans différentes conditions opératoires ont été menées grâce à une plateforme automatisée ASW2000 (Chemspeed, Suisse). Cette installation est équipée de 8 blocs de réacteurs de 27ml (figure II.10).



**Figure II.10** Plate-forme et réacteurs chemspeed pour synthèse en parallèles.

L'installation est totalement automatisée et permet de mener plusieurs synthèses en parallèle. La température, l'agitation par vortex ainsi que l'atmosphère sont contrôlées.

Le protocole général suivi est constitué de plusieurs étapes :

- Ajout automatique de la solution de lignosulfonates.
- Ajout automatique du médiateur pour les réactions conduites en présence d'un médiateur.
- Mise sous agitation de l'ensemble à 850 rpm.
- Prélèvement du  $t_0$  avant l'ajout de l'enzyme.
- Déclenchement de la réaction par ajout de la solution enzymatique.
- Prélèvements durant 96 heures.
- Arrêt de la réaction par chauffage à 90°C.

Les tableaux II.6, II.7, II.8 et II.9 regroupent les différentes réactions conduites lors de la polymérisation des lignosulfonates. A travers ces réactions, les effets de l'origine de la laccase, de la concentration de substrat et d'enzyme, la distribution moléculaire initiale et l'utilisation ou non d'un médiateur sur les performances de la polymérisation des lignosulfonates ont été étudiés.

**Tableau II.6** Effet de l'origine de la laccase.

<i>Origine de la laccase</i>	<i>Fraction de lignosulfonates</i>	<i>T (°C)</i>
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20
<i>Rhus vernicifera</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20
<i>Myceliophthora thermophila</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	50

**Tableau II.7** Effet du poids moléculaire initial.

<i>Origine de la Laccase</i>	<i>Substrat</i>	<i>T (°C)</i>
	Lignosulfonates commercial	
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	(1 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>4</sub> (1 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>5</sub> (1 g/L)	20

**Tableau II.8** Effet de la concentration initiale de substrat et d'enzyme.

<i>Origine de la laccase</i>	<i>Substrat</i>	<i>T (°C)</i>
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	Lignosulfonates commercial (1 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	Lignosulfonates commercial (10 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	Lignosulfonates commercial (50 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (30 U/mL)	Lignosulfonates commercial (1 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (30 U/mL)	Lignosulfonates commercial (10 g/L)	20
<i>Trametes versicolor</i> (30 U/mL)	Lignosulfonates commercial (50 g/L)	20

**Tableau II.9** Effet de l'ajout du médiateur

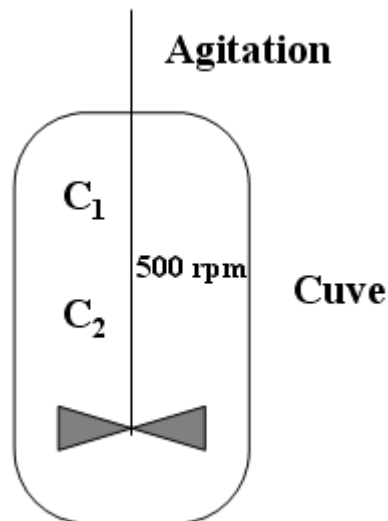
<i>Origine de la laccase</i>	<i>Fraction lignosulfonates</i>	<i>T (°C)</i>	<i>Médiateur</i>
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20	ABTS (0,2 mM)
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20	HBT (0,2 mM)
<i>Trametes versicolor</i> (3U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20	VLA (0,2 mM)
<i>Trametes versicolor</i> (3 U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20	ACV (0,2 mM)
<i>Trametes versicolor</i> (3 U/mL)	F <sub>3</sub> (1 g/L)	20	ASG (0,2 mM)

## **II.6. Effet du mode de conduite de la réaction de polymérisation des lignosulfonates**

### **II.6.1 Réaction en discontinu**

Un réacteur (SGI, France) a été utilisé pour mener les réactions de polymérisation des lignosulfonates par la laccase de *Trametes versicolor*. Il est muni de sondes d'oxygène, de température et de pH. La température est réglée par un cryostat.

Les lignosulfonates (10 g/L) sont initialement solubilisés dans 1 litre de tampon phosphate à pH 4,5, à 500 rpm et à 20°C (**Figure II.11**). Puis la laccase (30 U/mL) a été ajoutée pour initier la réaction de polymérisation. La réaction dure 24 heures. Des prélèvements ont été effectués au cours du temps. Les prélèvements sont chauffés à 90°C dans un bain marie pour inactiver la laccase et arrêter la réaction.

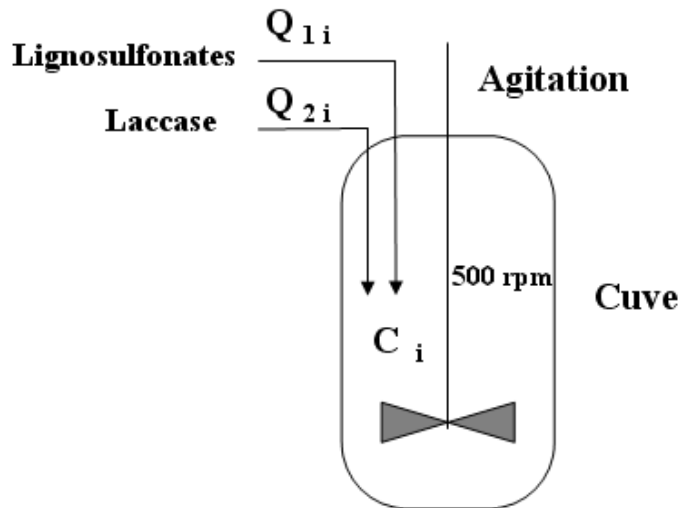


**Figure II.11** Schéma représentatif du réacteur discontinu ;  $C_1=10$  g/L de lignosulfonates,

$C_2= 30$  U/mL de laccase.

### II.6.2 Réaction en semi continu

Les réactions en semi continu ont été opérées dans les mêmes conditions que les réactions en discontinu sauf que l'enzyme seule, le substrat seul ou les deux en même temps ont été ajoutés en 10 fois, durant les dix premières heures de réaction. Les concentrations finales d'enzyme et de substrat pour les trois manipulations sont 10 g/L et 30 U/mL de lignosulfonates et de laccase, respectivement. La réaction a été arrêtée au bout de 24 heures (**Figure II.12**). Des prélèvements ont été effectués au cours du temps. Les échantillons prélevés sont chauffés à 90°C dans un bain marie pour inactiver la laccase et arrêter la réaction.

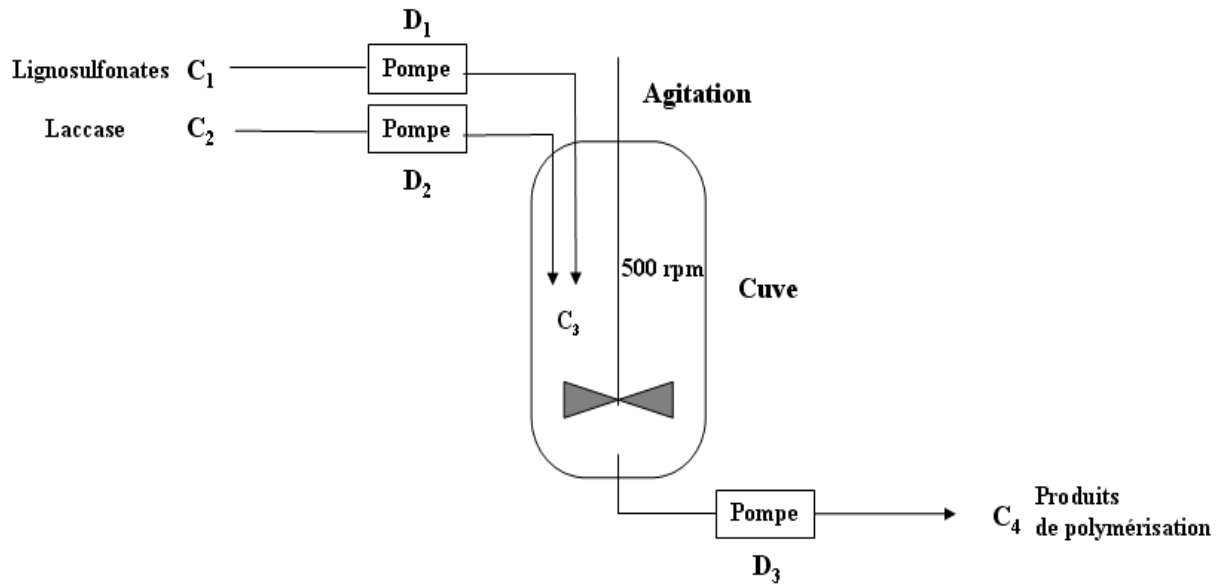


**Figure II.12** Schéma représentatif du réacteur semi continu ( $Q_{1i}$ ) = 1 g ;

( $Q_{2i}$ ) := 300 U ;  $i=10$  (heure) ;  $C_i$  varie en fonction du temps.

### II.6.3 Réaction en continu

Les lignosulfonates et la laccase sont introduits à l'aide d'une pompe dans le réacteur (**Figure II.13**). Deux bouteilles de la même taille ont été installées sur deux pompes  $D_1$  et  $D_2$ . L'une a été remplie avec la solution de lignosulfonates tamponnée à pH 4,5 et l'autre avec la solution de laccase tamponnée au même pH. Ces solutions ont été introduites dans le réacteur (initialement rempli avec la solution tampon) à un débit de 0.021 L/h par  $D_1$  et  $D_2$ . Le réacteur a été aussi relié à une autre pompe ( $D_3$ ) permettant de soutirer le milieu avec un débit constant pour garder le volume du réacteur constant (1 L) et une concentration finale de 10 g/L et 30 U/mL de lignosulfonates et de laccase, respectivement. Des prélèvements ont été récupérés à différents intervalles de temps. Les échantillons prélevés sont chauffés à 90°C dans un bain marie pour inactiver la laccase et arrêter la réaction.



**Figure II.13** Schéma représentatif du réacteur continu ;  $C_1=31,84$  g/L ;  $C_2= 63,08$  U/mL ;

$C_{3i}$ = Concentration du produit de polymérisation,  $C_{4i}$ = Concentration du prélèvement ;  $D_1=D_2=0,021$  L/h ;  $D_3=0,042$  L/h.

**Référence**

- [1] O. Ringena, B. Saake, R. Lehnen, Isolation and fractionation of lignosulfonates by amine extraction and ultrafiltration: A comparative study *Holzforschung* 59 (2005) 405-412.
- [2] D. Areskog, J. Li, G. Gellerstedt, G. Henriksson, Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis *Biomacromolecules* 11 (2010) 904-910
- [3] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar *Analytic chemistry* 31 (1959) 426-428.
- [4] O. Faix, Lange, W and E.C. Salud, The use of hplc for the determination of average molecular weights and molecular weight distributions of milled wood lignins from *Shorea polysperma*, *Holzforschung* 35 (1981) 3-9.
- [5] A. Granata, D.S. Argyropoulos, 2-Chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,3,2-dioxaphospholane, a reagent for the accurate determination of the uncondensed and condensed phenolic moieties in lignins *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43 (1995) 1538-1544.
- [6] R.J. Hunter, Transport properties of suspensions. Dans Hunter, R.J. (Eds), *Foundations of Colloid Science*, 1986, pp. 449-536.
- [7] K. Kimura, S. Takashima, H. Ohshima, Molecular approach to the surface potential estimate of thiolate-modified gold nanoparticles, *J. Phys. Chem. B* 106 (2002) 7260-7266.
- [8] H. Ohshima, Electrophoretic mobility of soft particles, *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Aspects* 103 (1995) 249-255.
- [9] H. Ohshima, *Electrical Phenomena at Interfaces*, second ed., Marcel Dekker, New York, 1998.
- [10] H. Ohshima, T. Kondo, Electrophoretic mobility and Donnan potential of a large colloidal particle with a surface charge layer, *J. Colloid Interface Sci.* 116 (1987) 305-311.
- [11] S. Tsuneda, H. Aikawa, H. Hayashi, A. Hirata, Significance of cell electrokinetic properties determined by soft-particle analysis in bacterial adhesion onto a solid surface, *J. Colloid Interface Sci.* 279 (2004) 410-417.
- [12] S. Tsuneda, J. Jung, H. Hayashi, H. Aikawa, A. Hirata, H. Sasaki, Influence of extracellular polymers on electrokinetic properties of heterotrophic bacterial cells examined by soft particle electrophoresis theory, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 29 (2003) 181-188.
- [13] R. Bos, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, 'Soft-particle' analysis of the electrophoretic mobility of a fibrillated and non-fibrillated oral streptococcal strain: *Streptococcus salivarius*, *Biophys. Chem.* 74 (1998) 251-255.
- [14] M.N. Chandraprabha, K.A. Natarajan, J.M. Modak, Effect of LPS removal on electrophoretic softness of *Acidithiobacillus ferrooxidans* cells, *Biohydrometallurgy: From the Single Cell to the Environment*, IBS 2007, 2007, pp. 341-344.
- [15] P.J.M. Kiers, R. Bos, H.C. van der Mei, H.J. Busscher, The electrophoretic softness of the surface of *Staphylococcus epidermidis* cells grown in a liquid medium and on a solid agar, *Microbiology* 147 (2001) 757-762.
- [16] H. Morisaki, S. Nagai, H. Ohshima, E. Ikemoto, K. Kogure, The effect of motility and cell-surface polymers on bacterial attachment, *Microbiology* 145 (1999) 2797-2802.
- [17] C. Murata, H. Tabuchi, H. Morisaki, A new method to analyze particle surface properties by using electrophoresis under different electric potential, *Polymer Preprints, Japan*, 2005, p. 3561.
- [18] J.F.L. Duval, H.J. Busscher, B. Van De Belt-Gritter, H.C. Van Der Mei, W. Norde, Analysis of the interfacial properties of fibrillated and nonfibrillated oral streptococcal strains from electrophoretic mobility and titration measurements: Evidence for the shortcomings of the 'classical soft-particle approach', *Langmuir* 21 (2005) 11268-11282.

- [19] V. Ducel, P. Saulnier, J. Richard, F. Boury, Plant protein-polysaccharide interactions in solutions: application of soft particle analysis and light scattering measurements, *Colloids Surf. B. Biointerfaces* 41 (2005) 95-102.
- [20] E. Rotureau, F. Thomas, J.F.L. Duval, Relationship between swelling and the electrohydrodynamic properties of functionalized carboxymethyl dextran macromolecules, *Langmuir* 23 (2007) 8460-8473.
- [21] J. López-Viota, S. Mandal, A.V. Delgado, J.L. Toca-Herrera, M. Möller, F. Zanuttin, M. Balestrino, S. Krol, Electrophoretic characterization of gold nanoparticles functionalized with human serum albumin (HSA) and creatine, *J. Colloid Interface Sci.* 332 (2009) 215-223.
- [22] Y.C. Kuo, S.C. Lin, Effect of glutamate on the electrical properties of cationic solid lipid nanoparticles containing stearylamine and dioctadecyldimethyl ammonium bromide, *J. Phys. Chem. B* 112 (2008) 4454-4460.
- [23] T. Phenrat, Y. Liu, H.J. Kim, N.B. Saleh, K. Sirk, R.D. Tilton, L. Glowry, Effect of adsorbed polyelectrolytes on TCE dechlorination and product distribution by Fe(0)/Fe-oxide nanoparticles, *ACS National Meeting Book of Abstracts*, 2007.
- [24] H. Ohshima, Electrostatic interaction between soft particles, *J. Colloid Interface Sci.* 328 (2008) 3-9.
- [25] V. Tolstoguzov, Some thermodynamic considerations in food formulation, *Food Hydrocolloids* 17 (2003) 1-23.
- [26] H.N. Kim, Y. Hong, I. Lee, S.A. Bradford, S.L. Walker, Surface characteristics and adhesion behavior of *Escherichia coli* O157:H7: Role of extracellular macromolecules, *Biomacromolecules* 10 (2009) 2556-2564.
- [27] H. Ohshima, Electrokinetics of soft particles, *Colloid. Polym. Sci.* 285 (2007) 1411-1421.



## *CHAPITRE III*

### *RÉSULTATS*



*CHAPITRE III.1*

*FRACTIONNEMENT ET CARACTÉRISATION DES  
LIGNOSULFONATES*



**Chapitre III.1****FRACTIONNEMENT PAR PROCÉDÉ  
MEMBRANAIRE ET CARACTÉRISATION PHYSICO-  
CHIMIQUES DES LIGNOSULFONATES****Introduction**

Les lignosulfonates sont des biopolymères très hétérogènes en termes de distribution moléculaire, de degré de polydispersité, de structure ainsi que de composition en groupements fonctionnels. Ces disparités affectent leurs propriétés physico-chimiques et leurs applications et limitent leurs utilisations à des domaines à faible valeur ajoutée.

Dans la littérature, quelques travaux ont relaté l'efficacité du fractionnement par procédés membranaire pour palier à l'hétérogénéité des lignosulfonates, en diminuant leur polydispersité et en obtenant une distribution moléculaire moins hétérogène. Peu d'études ont rapporté l'effet du fractionnement sur les propriétés physico-chimiques des fractions obtenues à partir de ce procédé. Par ailleurs, les données sur les propriétés physico-chimiques sont souvent contradictoires due aux différentes origines et conditions expérimentales de récupération des lignosulfonates utilisés pour le fractionnement.

Pour approfondir et compléter ces travaux, nous nous sommes intéressés dans cet article au fractionnement par diafiltration d'un lot de lignosulfonates, afin de lessiver au maximum les molécules dont les masses moléculaires sont inférieures au seuil de coupure utilisé et à l'étude de plusieurs propriétés physico-chimiques et structurales, dans des conditions expérimentales bien contrôlées. Ceci dans le but de déterminer l'effet de ce procédé sur la structure et la distribution moléculaire des biopolymères obtenus et élucider par la suite l'effet de la composition chimique et moléculaire de ces derniers sur leurs propriétés physico-chimiques.

3 axes d'études complémentaires ont été entrepris :

La séparation des lignosulfonates par diafiltration :

Dans un premier temps, des lignosulfonates de sodium commerciaux ont été fractionnés par diafiltration en utilisant cinq seuils de coupure différents afin d'obtenir 6 fractions de différentes tailles et distributions moléculaires. Le fractionnement s'est fait dans les conditions optimales citées dans la littérature (P=5bars et T=50°C). La composition chimique des fractions obtenues a été caractérisée par la détermination du pourcentage en lignosulfonates et en sucre réducteur. Les rendements du procédé de diafiltration des diverses fractions ont été aussi calculés.

Etude structurale et moléculaire :

Par la suite, les diverses fractions ont été caractérisées d'un point de vue structural et moléculaire par la détermination et la quantification des groupements fonctionnels (hydroxyles phénoliques, hydroxyles aliphatiques et les groupements carboxyliques) et de la distribution moléculaire (masses moléculaires en nombre et en poids et la polydispersité) par les méthodes SEC, FTIR et RMN <sup>31</sup>P.

Détermination des propriétés physico-chimiques :

Les propriétés de surface (la tension de surface et les charges), d'hydratation (les courbes de sorption), rhéologiques (la viscosité apparente) et antioxydantes ont été déterminées pour chaque fraction et comparées à celles des lignosulfonates commerciaux.

**Les résultats de cette partie ont fait l'objet d'une publication « Effect of molecular weight distribution on chemical, structural and physicochemical properties of sodium lignosulfonates », parue dans Rasayan Journal of Chemistry (Volume 4, numéro 1 (2011), 189-202).**

**Article****EFFECT OF MOLECULAR WEIGHT DISTRIBUTION ON  
CHEMICAL, STRUCTURAL AND PHYSICOCHEMICAL  
PROPERTIES OF SODIUM LIGNOSULFONATES****Nidal Madad, Latifa Chebil, Christian Sanchez and Mohamed Ghoul**

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy, France

\*E-mail: mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr

**ABSTRACT**

Chemical, structural and physico-chemical properties of six sodium lignosulfonates (SLS) fractions with high purity and narrow molecular weight distribution ( $M_w$ ) ranked between 2300 and 19500  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  were studied. Structural characterization of these fractions, using  $^{31}\text{P}$  Phosphor Nuclear Magnetic Resonance ( $^{31}\text{P}$  NMR) and Fourier Transformed InfraRed (FTIR) analysis, was reported.  $^{31}\text{P}$  NMR and FTIR analyses show that these fractions present an important variability of hydroxyl, carboxyl and sulfonic group content. The adsorption isotherms of SLS fractions; fitted by Guggenheim–Andersen–de-Boer model; present different isotherms profiles and different values of binding energy and adsorption capacities. SLS fractions were found to be highly charged and present the behaviour of soft particle. Intermediate fractions with  $M_w$  of 4300 and 2500  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$  give the highest surface activity and antioxidant capacity. Moreover, fractions with the highest molecular weight,  $M_w$  more than 7000  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , present the greatest charge density and apparent viscosity. This data can help to develop new niche applications for the SLS.

**Keywords:** Sodium lignosulfonates, diafiltration, physicochemical properties, antioxidant capacity.

## INTRODUCTION

Lignosulfonates (LS) are commercially available lignins obtained from sulphite pulping of wood. More than 1,000 000 tons are annually marketed<sup>1</sup>. The presence of the sulfonate groups confers to them a high solubility in water. Taking into account to their structure, LS exhibit dispersive, stabilizing, binding, complexing, antioxidant and antifungal properties<sup>2-6</sup>. These properties open to LS several applications. So, they can be used as concrete admixtures, gelling additive in resins preparation, stabilizing agent of emulsions and foams, raw material in the production of fine chemicals (vanillin, pyrocatechol ...), as well as binders in feed due to their antioxidant and sequestering metal ions capacity<sup>7-11</sup>. However, their effective industrial use takes place mainly in dispersing and binding applications characterized by very low added values. This limitation is due to the pulping method, the salt used and the origin of wood<sup>12,13</sup>. Thus the obtained LS are characterized by a relatively complex chemical composition, a wide range of molecular weight distribution and therefore a high heterogeneity of their physico-chemical properties<sup>12</sup>. Depending on the pulping method, unless four LS (Calcium LS, Sodium LS, Ammonium LS and magnesium LS) are available. The main studied ones are calcium LS (CLS). The obtained results with these biopolymers showed that the structure, the molecular weight distribution and as well as additives affect strongly the physico-chemical properties and application performances of LS<sup>14, 15</sup>. Due to the difficulties of fractionation of LS few papers investigated the effect of molecular weight distribution on the reactivity and physicochemical properties of these biomolecules. For CLS, Ouyang et al.<sup>16</sup> studied the dispersive and adsorption capacity of different fractions obtained by ultrafiltration, and observed that, in aqueous suspension, these two properties increase when the molecular weight increases. Moreover, Yang et al.<sup>17</sup> reported that for fractions obtained with higher molecular weight the hydrophobic interactions is the main driving forces for adsorption, while for fraction with lower molecular weight the hydrogen-bonds and the attractive power of anionic groups are the main driving forces for adsorption. These latter showed also, that the potential zeta is depending on mass concentration and lowest values are reached with fractions characterized by intermediate molecular weight. For Sodium lignosulfonates (SLS), Li et al.<sup>18</sup> showed that the dispersion ability increased with molecular weight and increasing sulfonic groups. Yang et al.<sup>19</sup> studied the effects of the molecular weight of SLS on their capacity to reduce the viscosity of the coal water slurry, the adsorption behaviour and the zeta potential. They reported that fractions with molecular weight between (10 kDa and 30 kDa)



lead to a better effect on reducing viscosity while fraction greater than 10 kDa is more adsorbed on the coal surface. The potential zeta is more linked to the presence or the absence of the sulfonic and carboxyl groups.

As it was mentioned previously the main study was focused on the CLS properties. Few studies were dedicated to SLS where these biopolymers exhibit interesting properties of adsorption and viscosity reducer<sup>20</sup>. The aim of this work is to study the effect of molecular weight distribution on the structural and physicochemical properties of different SLS fractions, obtained by diafiltration process using five membranes with a cut off in the range of 5 to 300 kDa. To remove salts and to obtain fractions with a narrow molecular weight distribution, the diafiltration was fed by a five volume of demineralised water/volume of SLS solution. For each fraction chemical and structural characteristics (molecular weight distribution and functional groups) and physico-chemical properties (hydration and charge properties, surface activity, antioxidant capacity and rheological property) were investigated and discussed.

## EXPERIMENTAL

### Materials

Sodium lignosulfonates (SLS) composed by 90 wt. % of LS, 4 wt. % of reducing sugars and 6 wt% of total impurities and AAPH 2,2'-Azino[2-methyl-propionomidin] dihydrochlorid 97% purity, were furnished by (Aldrich, Sweden).

ABTS 2,2-Azino-bis(3-ethylbenzo-thiozoline-6-sulfonic acid) 98% purity was provided by (Sigma, Sweden).

FL Fluoroscein (free acid) was furnished by Flucka (Sweden).

### Diafiltration

Diafiltration (DF) in feed and bleed mode was carried out to remove impurities, like sulphur, ash and salts and to obtain different fractions with a narrow molecular weight distribution. The washing step was realized at a constant volume by adding continuously demineralized water until 5 volumes of SLS solution. Five ceramic tubular membranes (TAMI, France) with successively molecular weight cut-off (MWCO) (300000, 150000, 50000, 15000 and 5000 Da) were used. The retentat was concentrated using a rotary evaporator, freeze-dried and weighed. After each step the obtained permeate was then fractionated using the next MWCO

membrane. SLS was separated into six fractions with molecular weight ranges: more than 300000 (F<sub>1</sub>), 300000~150000 (F<sub>2</sub>), 150000~50000 (F<sub>3</sub>), 50000~15000 (F<sub>4</sub>), 15000~5000 (F<sub>5</sub>) and less than 5000 (F<sub>6</sub>). DF was performed under pressure and temperature of 5 bars and 50°C, respectively.

### **SLS determination**

The SLS content of the commercial sample and the different fractions was determined as reported by Ringena et al.<sup>21</sup>, at 280 nm, using UV detector 6000LP (Thermo, France). Commercial SLS were used as a calibration standard due that their content of LS is known (90%).

### **Reducing sugar content**

Reducing sugar was determined using method described by Miller<sup>22</sup>.

### **Size exclusion chromatography analysis**

Commercial SLS and their fractions were analysed by Size Exclusion Chromatography (SEC) (HPLC LaChrom Merck, Germany). The system consists of a pump L-2130, an autosampler L-2200, and a Superdex 200HR 10/30 column (24ml, 13 µm, dextran/cross linked agarose matrix). Detection was performed using UV detector diode L-2455 at 280 nm. Before analysis, the samples were filtered using regenerated cellulose membrane (0.22 µm) and aliquots of 50 µl were injected to the SEC system. Commercial SLS and their fractions were dissolved in 0.1% solution of Buffer Phosphate pH 7, 0.15 M NaCl. The same solution was used as an eluent. The flow rate was 0.4 ml at 25°C and 11 bars. The calibration was performed using polystyrenes sulfonate (PSS) with weight average molecular weight between 73900 Da and 1100 Da as standard.

### **Fourier transformed infrared analysis**

Transmission infrared spectra of the SLS fractions were performed using Fourier Transformed InfraRed (FTIR) spectrometer tensor 27 (Bruker, France) equipped with a Platinum ATR optical cell and a deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector. Samples (powder) were placed directly on the crystal. The diaphragm was set to 6 mm and the scanning rate to 10 kHz. Each spectrum was recorded 156 scans. The wave number range used is 4000 and 800 cm<sup>-1</sup> with resolution of 2 cm<sup>-1</sup>. The spectra were baseline corrected for further analysis.

**<sup>31</sup>P NMR**

NMR experiments were performed on a Bruker Avance-400 spectrometer (Bruker, France), using an inverse-gated decoupling (Waltz-16) pulse sequence with a 30° pulse angle and 25 s pulse delay. The analyses were done by derivatising 30 mg of each fraction with 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1-1,3,2-dioxaphospholane (TMDP)<sup>23</sup>. <sup>31</sup>P NMR data were processed offline using NUTS NMR data processing software (Acorn NMR Inc.).

Commercial SLS and their fractions were phosphitylated with 2-chloro-4,4,5,5-tetramethyl-1,2,3-dioxaphospholane in presence of cyclohexanol as an internal standard and analyzed with quantitative <sup>31</sup>P NMR according to a method described by Granata and Argyropoulos<sup>23</sup>.

The concentration of each hydroxyl functional group (mmol/g) was calculated using the internal standard (cyclohexanol) with known hydroxyl functional number. From the concentration of hydroxyl functional group (mmol/g) and the C9 unit formula, the number of functional group per C9 unit (group/C9) was also calculated.

**Dynamic vapour sorption**

Water sorption isotherms of commercial SLS and their fractions were determined using dynamic vapour sorption (DVS) technique (Surface Measurement Systems, United Kingdom). The principle of this method is an evaluation of sample weight changes over time at 25°C and at relative humidity (RH) between 0% and 95%. About 40 mg of sample was loaded into the quartz sample pan. A first step (drying phase) consists to control the humidity at 0% for 10 h to obtain internally equilibrates. The sample was then subjected to successive ten steps of 10% RH increase, up to 95%. For each step the mass changes (m) were plotted against time. The equilibrium was considered to be reached when changes in mass with time (dm/dt) was lower than 0.002 %/min. The accuracy of the system was ±1.0% and ±0.2 °C for RH and the temperature respectively. Error for each sample is 2%.

The water vapour adsorption isotherms were described by using GAB (Guggenheim–Andersen–de Boer) model, which is the most commonly used isotherm model for moisture sorption isotherms of foods<sup>24</sup>:

$$X = X_m \frac{C_{GAB} K_{GAB} a_w}{(1 - K_{GAB} a_w)(1 - K_{GAB} a_w + C_{GAB} K_{GAB} a_w)} \quad (\text{Eq.1})$$

where  $X_m$  is the monolayer moisture content,  $X$  is the equilibrium water content,  $C_{GAB}$ , is the characteristic energy constant,  $K_{GAB}$  is the characteristic constant correcting the properties of

the multilayer molecules with respect to the bulk liquid. The parameters were calculated by Origin software<sup>25</sup>.

### The electrophoretic mobility investigation

The velocity of a particle in a unit electric field is referred to its electrophoretic mobility ( $\mu_E$ ). Determination of  $\mu_E$  values permit to assess the electrical charge of macromolecules. Soft particles are characterized by the presence of an ion penetrable layer at the outer surface exposed to the continuous medium. Ohshima<sup>26</sup> proposed a model (equation 2) for  $\mu_E$  that allowing determining  $1/\lambda$ , which is related to the length of accessible layer and  $ZN$  when  $Z$  corresponding to the valences of charge density in the polyelectrolytic region and  $N$  represents the electrical charge density in the polyelectrolytic region (charges/m<sup>3</sup>). The  $\mu_E$  of soft particles is described in the equation 2:

$$\mu_E = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \psi / Km + \psi_{DON} / \lambda}{\eta} + \frac{eZN}{\eta \lambda^2} \quad (\text{Eq.2})$$

$\eta$  is the viscosity of the medium (Pa/s)

$\varepsilon_0$  is the absolute permittivity of vacuum

$\varepsilon_r$  is the relative permittivity of the electrolyte solution

$e$  is the elementary charge ( $1.6 \cdot 10^{-19}$  C)

$$\psi_{DON} = \frac{KT}{ze} \ln \left\{ \frac{ZN}{2zn} + \left( \left( \frac{ZN}{2zn} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right\} \quad (\text{Eq.3})$$

$\psi_{DON}$  is the Donnan potential define like :

$\psi_0$  is the potential at the boundary of the surface region define like :

$$\psi_0 = \frac{KT}{ze} \left\{ \ln \left\{ \frac{ZN}{2zn} + \left( \left( \frac{ZN}{2zn} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right\} + \frac{2zn}{ZN} \left( 1 - \left( \left( \frac{ZN}{2zn} \right)^2 + 1 \right)^{1/2} \right) \right\} \quad (\text{Eq.4})$$

$Km$  is the Debye Hückel parameter in the surface layer that involved the contribution of the

$$\text{fixed-charges } ZeN \quad Km = k \left[ 1 + \left( \frac{ZN}{2zn} \right)^2 \right]^{1/4} \quad (\text{Eq.5})$$

$k$  is the Debye Hückel parameter define like :

$$k = \left( \frac{2z^2 e^2 n}{\varepsilon_0 \varepsilon_r kT} \right)^{1/2} \quad (\text{Eq.6})$$

$z$  is the valence of the electrolyte solution.

$T$  is the thermodynamic temperature.

k the Boltzmann constant and n is the bulk concentration of the electrolyte solution.

NaCl was the electrolyte used so  $z=1$ , e the elementary electric charge.

$\mu_E$  of commercial SLS and their fractions was performed using Zetasizer ZS equipment HPPS 5001 (Malvern Instrument, United Kingdom) by means of laser Doppler electrophoresis.

### Determination of surface tension

Measurements of surface tension of SLS solutions prepared in demineralised water, at concentration ranging from 0 to 10 g.L<sup>-1</sup>, at 25°C, were made using a tensiometer model K12 (Krüss, Germany). The results have been accomplished by the method of Wilhelmy plate. This method based on placement of a sheet over the surface of the solution. The plate is immersed in the solution and the force necessary to return it to its original position equals to the surface tension.

### Rheological measurements

The rheological measurements were carried out in a Stress Tech Rheometer (Reologica AB, Sweden) using a cone and plate geometry (volume sample 1.2 mL, cone angle 4°, diameter 40 mm). A lid was added into the sample to prevent evaporation at high temperatures.

The rheometer was connected to a thermostatically controlled bath. Samples at range of concentration from 5% to 20%, dissolved in demineralised water, were allowed to equilibrate at 25 °C and shear rate increasing from 0.03 to 0.2 s<sup>-1</sup> were imposed. The GNF (generalized Newtonian fluid) model was used to determine the apparent viscosity of commercial SLS and

their fractions; where the shear stress  $\tau$  is proportional to the strain-rate  $\dot{\gamma}$ .

$$\tau = \eta_a \dot{\gamma} \quad (\text{Eq.7})$$

### Antioxidant activity determination

The antioxidant activity was performed using Xenius multidetection microplate reader (Safas, Monaco). 96-well with black (Trolox equivalent antioxidant capacity assay) and clear (Oxygen radical absorbance capacity assay) polystyrene microplates were used.

#### *Trolox equivalent antioxidant capacity*

The antiradical activity of commercial SLS and their fractions was evaluated by scavenging the radical ABTS<sup>•+</sup>. ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) was produced by reacting 7 mM ABTS

stock solution with 2.45 mM potassium persulfate and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 12–16h before being used. Next ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted with PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH 7.4) to an absorbance of 0.5 at 734 nm and equilibrated at 30°C. 200 µl of ABTS<sup>•+</sup> and (10, 20, 35, 50, 70, 80 µl) of SLS solutions (10 mg.L<sup>-1</sup>) was mixed and adjusted to 300 µl with buffer solution. After 15 min incubation, the optical density was measured.

The percentage inhibition of ABTS<sup>•+</sup> is calculated by using equation 8.

$$\% \text{ inhibition} = \frac{DO_{\text{initial}} - DO_{\text{final}}}{DO_{\text{initial}}} \times 100 \quad (\text{Eq.8})$$

The Trolox equivalent antioxidant capacity TEAC represents the molar concentration of trolox (µM) with the same antioxidant activity of 1 mg.L<sup>-1</sup> of SLS solutions.

### ***Oxygen radical absorbance capacity***

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) measures the ability of a molecule to prevent the oxidation of FL by free radicals from the decomposition of AAPH at 37°C. Fluorescence was read with an excitation wavelength of 485 nm and an emission filter of 528 nm. AAPH solution and FL were prepared in a phosphate buffer solution at 75 mM at pH 7.4. The control of this reaction is the trolox which is also prepared in the same buffer.

Six different quantities (10, 20, 35, 50, 70, 80 µl) of commercial SLS and their fractions at a concentration of 10 mg.L<sup>-1</sup> were placed in the wells of the microplate with FL and adjusted at the same volume with buffer solution (80 µl). The mixture was preincubated for 30 min at 37 °C, before rapidly adding the AAPH solution (220 µl) using a multichannel pipette. The microplate was immediately placed in the reader and the fluorescence recorded every 6 min for 240 min. A blank with FL and AAPH using sodium phosphate buffer instead of the antioxidant solution was used. The inhibition capacity was expressed as Trolox equivalents (µM), and is quantified by integrating of the area under the curve (AUC). All reaction mixtures were prepared in twenty times. The area under the fluorescence decay curve (AUC) was calculated using the equation 9.

$$AUC = 1 + \sum_{i=6}^{i=240} f_i / f_0 \quad (\text{Eq.9})$$

where  $f_0$  and  $f_i$  are the initial fluorescence read at 0 min and at  $i$  min, respectively. The net AUC corresponding to the sample was calculated by subtracting the AUC corresponding to the blank.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Chemical and structural characterization

For all fractions of SLS, obtained after each step of diafiltration, the main structural and chemical characteristics were monitored.

#### *Composition and SLS recovery of different fractions*

Recoveries rates, percentage of LS and percentage of reducing sugar of SLS fractions are given in Table 1.

**Table 1** Percentage of recovery rate, percentage of SLS content and percentage of reducing sugar of commercial SLS and their fractions.

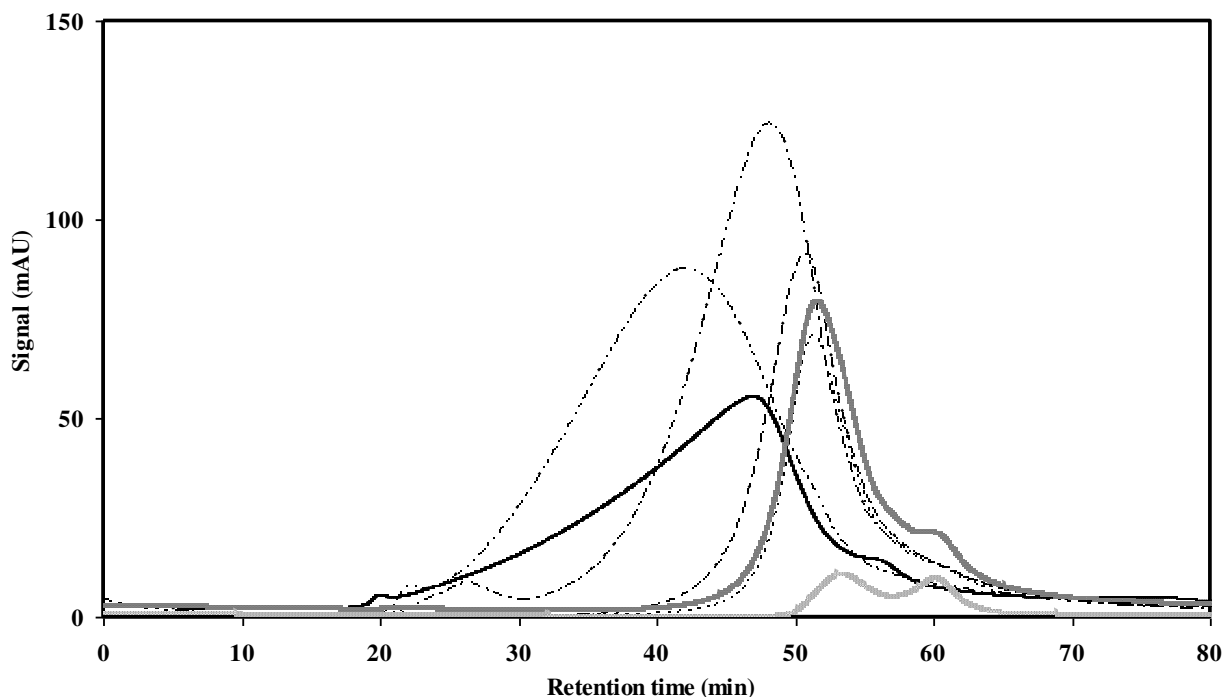
Fraction	Cut-off range (Da)	%Recovery rate	% SLS content	%Reducing sugar
Commercial SLS	----	-----	91.45 ± 1.47	3.68 ± 0.06
F <sub>1</sub>	More than 300000	48.38 ± 2.66	99.59 ± 0.82	1.33 ± 0.04
F <sub>2</sub>	150000~300000	14.88 ± 4.96	97.08 ± 0.27	1.65 ± 0.14
F <sub>3</sub>	50000~150000	6.55 ± 1.49	95.34 ± 1.91	2.55 ± 0.01
F <sub>4</sub>	15000~50000	5.31 ± 0.20	93.98 ± 2.36	4.23 ± 0.10
F <sub>5</sub>	5000~15000	10.48 ± 2.72	75.59 ± 0.52	4.52 ± 0.11
F <sub>6</sub>	Less than 5000	4.19 ± 0.92	19.81 ± 1.81	19.22 ± 0.28

The obtained results showed that fraction F<sub>1</sub> is the most important one in commercial SLS. It represents more than 48% w/w of the total mass. While for F<sub>3</sub> (50 ~ 150 kDa) and F<sub>4</sub> (15 ~ 50 kDa) the recoveries rates were only about to 6% and 5%, respectively. Similar results for recovery of intermediaries fractions obtained by ultrafiltration were reported by Ringena et al.<sup>21</sup>. The percentage of SLS of each fraction was also determined. It is equal to 99%, 97%, 95%, 93% and 75% respectively for F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> and F<sub>5</sub>. For F<sub>6</sub> this percentage is relatively low (19 %) and percentage of reducing sugar is high (19%) compared to the proportion in the other fractions. Therefore, except for F<sub>6</sub> and F<sub>5</sub>, diafiltration allows obtaining

high pure fractions. These fractions will be deeply characterized to enhance the development of new niche applications.

#### *Determination of molecular weight distribution*

Figure 1 shows the chromatogram profiles of commercial SLS and their fractions analyzed by SEC-UV.



**Figure 1** UV detected SEC elution profiles of commercial SLS and their fractions obtained after diafiltration. (— Commercial SLS - - - F<sub>1</sub> - - - F<sub>2</sub> - - - F<sub>3</sub> - - - F<sub>4</sub> - - - F<sub>5</sub> - - - F<sub>6</sub>)

Except for F<sub>6</sub>, SLS fraction profiles, compared to that of commercial SLS, showed a narrow and symmetrical distribution. The behaviour of F<sub>6</sub> can be explained by the high impurities content in this fraction. Moreover, the weight average molecular weight ( $M_w$ ), the number average molecular weight ( $M_n$ ) and the polydispersity  $D$  ( $M_w/M_n$ ) were calculated and summarized in Table 2.



**Table 2** Molecular weight distribution and polydispersity obtained by SEC-UV of commercial SLS and their fractions.

Fraction	Cut-off range (Da)	Mn (g.mol <sup>-1</sup> )	Mw (g.mol <sup>-1</sup> )	Polydispersity
Commercial SLS	----	2900 ± 400	17800 ± 1500	6.2 ± 0.3
F <sub>1</sub>	More than 300000	5700 ± 400	19500 ± 700	3.5 ± 0.1
F <sub>2</sub>	150000~300000	3200 ± 100	7000 ± 100	2.1 ± 0.1
F <sub>3</sub>	50000~150000	2400 ± 150	4300 ± 400	1.8 ± 0.1
F <sub>4</sub>	15000~50000	1700 ± 100	2500 ± 50	1.4 ± 0.1
F <sub>5</sub>	5000~15000	1400 ± 50	2300 ± 100	1.7 ± 0.1

It appears that the polydispersity decreases progressively with the decrease of the cut off of membrane. It is equal to 6.2, 3.5, 2.1, 1.8, 1.4 and 1.7 for commercial SLS, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> and F<sub>5</sub> respectively. The M<sub>w</sub> of the fractions varied from (2300 to 19500 g.mol<sup>-1</sup>) and M<sub>n</sub> from (1400 to 5700 g.mol<sup>-1</sup>). Due the high impurities of F<sub>6</sub>, molecular weight and polydispersity of this fraction were not determined. Similar behaviour was observed by Ringena and al.<sup>21</sup>. This result confirms, as it was indicated by these authors, that no correlation can be established between the cut off of used membranes and the actual molecular weight of SLS fractions. This is due to the complexity of LS structures compared to the PSS standards used as reference for weight determination. In fact, PSS are rather linear<sup>27</sup> while the structure of SLS are highly heterogeneous and complex<sup>28</sup>. This structural difference can leads to the underestimation of the molecular weight values of SLS. Due to the high heterogeneity of F<sub>6</sub> (low LS content and high impurities content), the next analyses were not realized to this fraction.

### ***Determination of functional groups***

#### *FTIR investigation*

The functional properties of SLS depend strongly on the nature of the different groups forming the skeleton of these polymers. FTIR analysis allows the identification of these groups. The assignments and the intensity (ATR units) of these spectres are given in table 3.

**Table 3** Assignment of FTIR spectra and their intensity (ATR Units) of commercial SLS and their fractions.

Wave number ( $\text{cm}^{-1}$ )	Functional Groups	Signal Intensity (ATR Units)					
		Commercial SLS	$F_1$	$F_2$	$F_3$	$F_4$	$F_5$
3392	OH Stretching	0,151	0,070	0,101	0,230	0,142	0,082
1690	C=O stretch unconj	0,074	0,069	0,072	0,086	0,102	0,081
1650	C=O stretch conj	0,097	0,079	0,082	0,122	0,117	0,097
1565	Aromatic squeel vibration	0,145	0,153	0,156	0,163	0,17	0,111
1420	CH deformations of $\text{OCH}_3$ groups	0,074	0,068	0,070	0,84	0,114	0,078
1180	C-H deformation of Guaiacyl units	0,112	0,091	0,132	0,154	0,152	0,131
1125	C-H deformation of Syringyl units	-	-	-	0,101	0,134	0,097
1040	C-S elongation	0,118	0,103	0,135	0,154	0,156	0,120

These results indicate that several variation of the profile and the intensity of adsorption were occurred in different regions of the spectrum. The band at  $3392 \text{ cm}^{-1}$  was assigned to hydroxyl groups.  $F_3$  presents the highest adsorption of hydroxyl groups. The bands between  $1690 \text{ cm}^{-1}$  and  $1650 \text{ cm}^{-1}$  are due to carbonyl/carboxyl groups,  $F_3$  and  $F_4$  have higher adsorption of carbonyl/ carboxyl groups than the other fractions. Similar results were found for the band at  $1040 \text{ cm}^{-1}$  which mean that these fractions ( $F_3$  and  $F_4$ ) contain more sulfonic groups than  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_5$  and commercial SLS. The FTIR analyses show that fractions characterized by a low  $M_w$  ( $F_3$ ,  $F_4$  and  $F_5$ ) absorb at  $1125 \text{ cm}^{-1}$  which mean that this fractions contain syringyl units specifically. This observation was confirmed by the highest absorption of these fractions at  $1420 \text{ cm}^{-1}$  related to the C-H deformation of  $\text{OCH}_3$  groups. The variation in the functional groups can be in the origin of new and specific surface properties which can be exploited for the development of new applications to these polymers.

<sup>31</sup>P NMR analysis

The concentration of hydroxyl functional groups of commercial SLS and their fractions are presented on Table 4.

**Table 4** Commercial SLS and their fraction characteristics calculated from <sup>31</sup>P NMR data.

(a) Determined by integration with cyclohexanol as an internal standard.

Chemical shift range $\delta^{31}\text{P}$ -NMR	Assignment	Commercial SLS		$F_1$		$F_2$		$F_3$		$F_4$		$F_5$	
		mmol/g <sup>a</sup>	Group/C9 <sup>b</sup>	mmol/g <sup>a</sup>	Group/C9 <sup>b</sup>	mmol/g <sup>a</sup>	Group/C9 <sup>b</sup>	mmol/g <sup>a</sup>	Group/C9 <sup>b</sup>	mmol/g <sup>a</sup>	Group/C9 <sup>b</sup>	mmol/g <sup>a</sup>	Group/C9 <sup>b</sup>
145.5–150.0	1-Aliphatic OH	2,240	0,601	1,832	0,419	2,432	0,624	1,581	0,426	2,235	0,729	1,619	0,504
141.8–143.5	2a-Syringyl OH	-	-	-	-	-	-	0,049	0,013	0,015	0,005	0,080	0,025
138.7–140.1	2b-Guaiacyl OH	0,314	0,084	0,478	0,109	0,434	0,111	0,465	0,125	0,266	0,087	0,300	0,093
134–135.7	3-Carboxylic acid	0,070	0,019	0,033	0,008	0,056	0,014	0,057	0,015	0,266	0,087	0,232	0,072

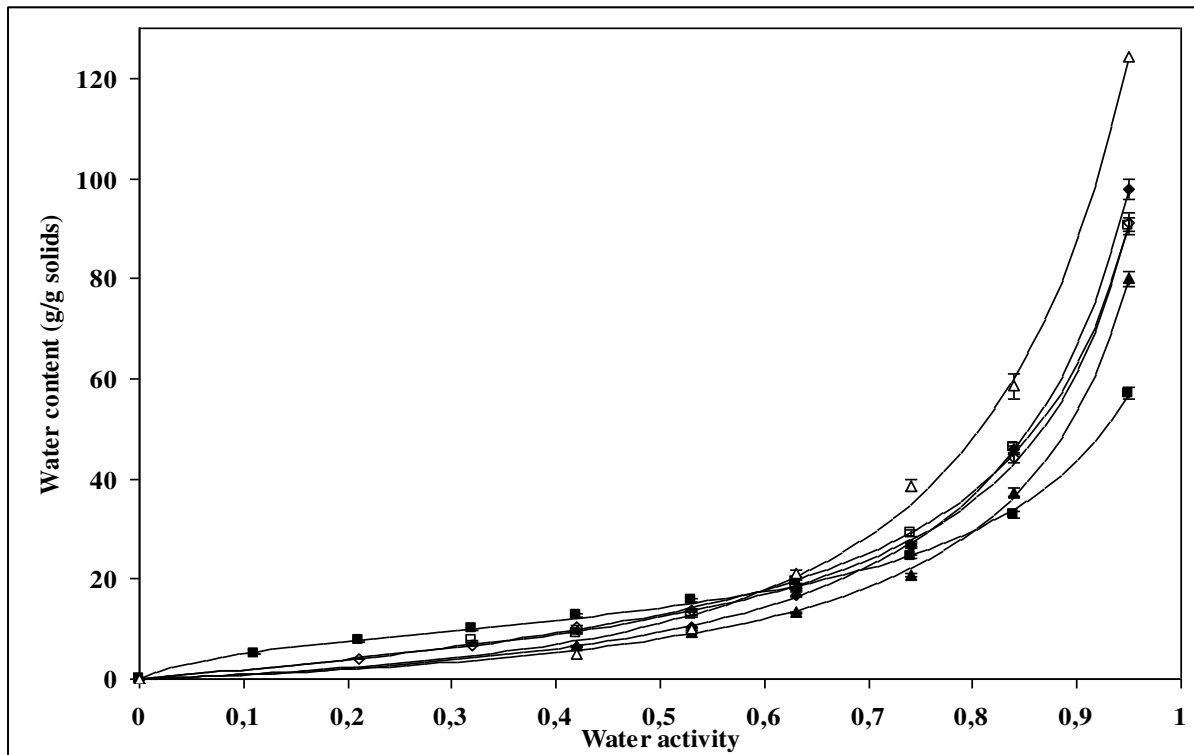
These results show that all fractions contain aliphatic OH, guaiacyl OH and carboxylic acid. For Commercial SLS and their fractions, OH-guaiacyl and OH-syringyl groups were detected.  $F_3$  and  $F_4$  contain the highest OH-guaiacyl (0.125/C9) and carboxylic acid (0.087/C9), respectively. OH-Syringyl groups (0.013/C9), (0.005/C9) and (0.025/C9) were identified only for  $F_3$ ,  $F_4$  and  $F_5$ , respectively. Observations of <sup>31</sup>P NMR spectra confirm FTIR results. Both of them, show that  $F_3$  has a highest OH hydroxyl groups content and  $F_4$  a highest carboxyl groups content and also confirm the presence of syringyl groups in the lowest fractions. It appears from these results that the fractionation of SLS by diafiltration allows the production of lignosulfonates with a wide range of  $M_w$  and structural properties which could in the origin of the development of new applications.

### Physicochemical properties

Chemical and structural investigations revealed that DF can furnish SLS fractions with different molecular weight distribution and functional groups. The variation of molecular weight and the composition can affect the colloidal and physicochemical properties. So, deep investigations of the main colloidal properties of the obtained fractions were performed and compared.

### Sorption isotherms study

The quality of most raw materials depends to a great extent upon their physical and chemical stability. This stability is mainly a consequence of the relationship between the equilibrium moisture content and the corresponding water activity ( $a_w$ ), at a given temperature. These water sorption isotherms are unique for a given composition of the raw materials. Many empirical and semi-empirical equations describing the sorption characteristics of different raw materials have been proposed in the literature. The kinetic models based on a multi-layer and condensed film (GAB model) is considered to be the most versatile sorption model available in the literature. As for several applications the capability of the water retention of LS is an important criterion, thus the sorption isotherm of commercial SLS and their fractions were investigated at 25 °C. The results are summarized in Figure 2 and according to Brunauer<sup>29</sup> classification they belong to type II curve shape.



**Figure 2** Sorption isotherm profile obtained for commercial SLS and their fractions estimated at 25 °C from 0% to 98% RH and modelled up with the GAB model.

(◆ Commercial SLS ■ F<sub>1</sub> ▲ F<sub>2</sub> ◇ F<sub>3</sub> □ F<sub>4</sub> △ F<sub>5</sub> — GAB FIT)

The GAB model was used to fit these data. The three parameters of this model  $X_m$  (monolayer moisture content),  $k_{GAB}$ , and  $C_{GAB}$  values are reported in Table 5 together with the mean relative percentage deviation module (E) and  $R^2$ .

**Table 5** Parameters  $X_m$ ,  $C_{GAB}$  and  $k_{GAB}$  obtained from the fitted curves with GAB for commercial SLS and their fractions.

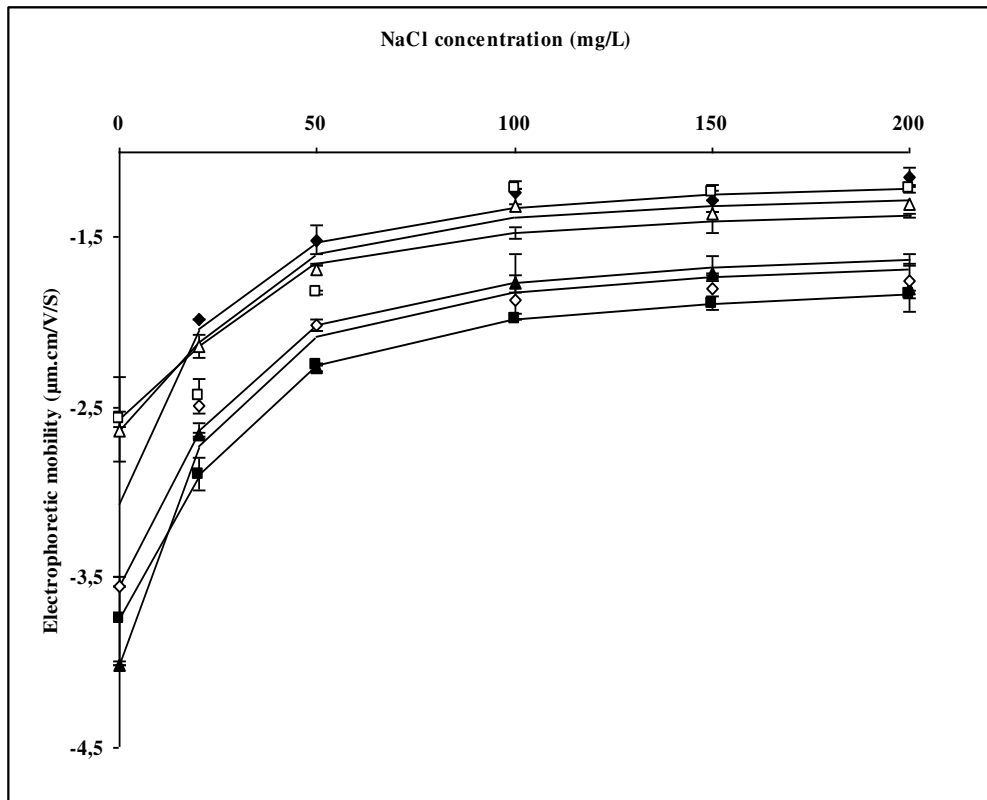
Fraction	$X_m$	$C_{GAB}$	$k_{GAB}$	E	$R^2$
Commercial SLS	17.79	0.48	0.90	4.39	0.99
F <sub>1</sub>	8.79	11.89	0.89	3.62	0.99
F <sub>2</sub>	11.14	0.72	0.92	4.50	0.99
F <sub>3</sub>	12.30	1.34	0.92	2.64	0.99
F <sub>4</sub>	13.31	1.15	0.91	4.87	0.99
F <sub>5</sub>	28.53	0.36	0.89	7.26	0.99

Examination of these results indicates that the GAB model fits well the experimental adsorption kinetic for SLS and the different fractions throughout the entire range of water activity. The GAB model, gives E values ranging from 2.64% to 7.26 %, with average value of 4%. The GAB model parameters  $X_m$  (monolayer moisture content dry basis),  $k_{GAB}$ , and  $C_{GAB}$  values provide an indication of the monolayer water adsorption capacity, the binding energy of the water and the monolayer heat of sorption respectively. For several material particularly foodstuff and biopolymers,  $X_m$  varies from 0.5 to 15,  $k_{GAB}$  between 0.7 and 1 and  $C_{GAB}$  is in the range of 1 to 20. It appears that for the three GAB parameters the obtained values for SLS are comparable to those reported for foodstuff. The lowest value of  $X_m$  (8.8) was obtained with F<sub>1</sub> and the highest value (28.5) with F<sub>5</sub>. The variation of GAB parameters can be attributed to a combination of factors, which include the conformation and topology of molecule and the hydrophilic/hydrophobic sites adsorbed at the interface. The observed variation of  $X_m$  and  $C_{GAB}$  confirms the structural and chemical differences occurred between SLS fractions. Despite the importance of knowledge on the mechanism of water-binding of LS the data on isotherm sorption are scarce and no comparison can be made. The results obtained in this study can help to understand the behaviour of the biopolymer when used in different formulation.

### ***Electrophoretic measurements***

The variation of the morphology and the functional groups of the different fractions of SLS can affect their interactions and complex formation with other macromolecules. To quantify these possible effects, the electrophoretic mobility ( $\mu_E$ ) and conformation of commercial SLS

and their fractions were investigated. The obtained  $\mu_E$  profiles for different fractions were reported in Figure 3.



**Figure 3** Profile of electrophoretic mobility measurements of commercial SLS and their fractions. Solid lines represent the best-fitted theoretical mobility curves. (◆ Commercial SLS ▲ F<sub>1</sub> ■ F<sub>2</sub> ◇ F<sub>3</sub> △ F<sub>4</sub> □ F<sub>5</sub> — FIT)

Negative  $\mu_E$  were observed due to the negative charge of sulfonic groups. Moreover, the absolute value of  $\mu_E$  across non-zero values and decreases when the NaCl concentration increases. These profiles are characteristic of soft particles. In fact, SLS was previously described like ellipsoid particles would have a dense core surrounded by a less dense surface layer of polymeric chains containing hydroxyl and sulfonic groups<sup>20</sup>.

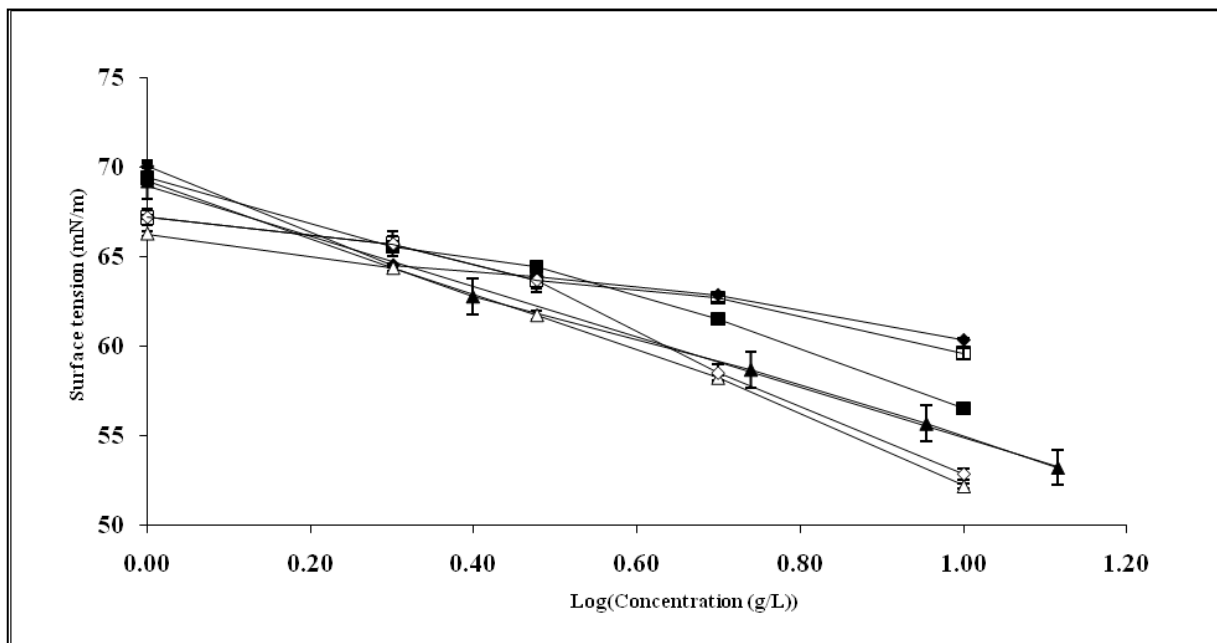
Table 6 reports the values of charge density (ZN) and the particle softness parameters ( $1/\lambda$ ). ZN seems to be molecular weight dependent and present a high value for high molecular weight. As an example, ZN for F<sub>1</sub> and F<sub>5</sub>, is equal -40,5 mM and -27.5 mM respectively. Also,  $1/\lambda$  values, about 2 nm, doesn't appeared depending on molecular weight, it was assumed that this parameters depend on the polymer conformation<sup>30</sup>.

**Table 6** Determination of the surface charge properties (ZN, the spatial charge density in the polyelectrolyte region, and  $1/\lambda$ , the softness parameter) of commercial SLS and their fractions using the Ohshima's method.

Fraction	ZN(mM)	$1/\lambda$ (nm)
Commercial SLS	$-31.0 \pm 1.41$	$1.91 \pm 0.01$
F <sub>1</sub>	$-40.5 \pm 0.28$	$1.98 \pm 0.01$
F <sub>2</sub>	$-41.0 \pm 0.07$	$2.10 \pm 0.01$
F <sub>3</sub>	$-39.5 \pm 0.42$	$2.00 \pm 0.01$
F <sub>4</sub>	$-31.5 \pm 0.28$	$1.95 \pm 0.01$
F <sub>5</sub>	$-27.5 \pm 4.41$	$2.20 \pm 0.01$

### Surface tension

The surface tension of aqueous solutions of commercial SLS and their fractions is shown in figure 4. It appears that the increase of the concentration in the solution lead to a decrease of the surface tension.



**Figure 4** Surface tension of commercial SLS and their fractions according to concentration (g/L).

(▲ Commercial SLS ◆ F<sub>1</sub> ■ F<sub>2</sub> △ F<sub>3</sub> ◇ F<sub>4</sub> □ F<sub>5</sub> — FIT)

However, the commercial SLS and their fractions are not able to form micelle. This behaviour could be attributed to the spherical shape of their hydrophobic skeleton, which

hinders the formation of a regular arrangement at the interfacial phase and thus affects their surface activity<sup>17</sup>. In spite of the no formation of micelle, some of these fractions; particularly F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub> lead to an interesting decrease of surface tension with an increase of the concentration. For 10 g/L these two fractions reduce the surface tension to a value around of 52 mN/m. This behaviour could be attributed to the presence of the hydroxyl and sulfonic groups as it was shown previously by Infrared spectra analysis and <sup>31</sup>P NMR. The effect of a high density of sulfonic and hydroxyl groups of a modified LS on the surface properties was reported by Pang and al.<sup>31</sup>. These authors studied the effect of hydroxylation and sulfonation of CLS and they demonstrated that the content of the hydroxyl groups and sulfonic groups are important to enhance the surface activity.

### ***Rheological investigation***

In order to evaluate the effect of the fractionation of LS on their colloidal properties, the apparent viscosity of the different fractions was determined and compared to commercial SLS. The obtained data, for the imposed shear rate, were modelled as a Newtonians fluid. The calculated apparent viscosity ( $\eta_a$ ) of SLS solutions at three different concentrations (20%, 10% and 5%) are given in table 7.

**Table 7** Apparent viscosities at different concentration (5%, 10% and 20%) of commercial SLS and their fractions.

Fraction	$\eta_a (10^{-3} \text{ N.m}^{-2}.\text{s})$		
	200g/L	100 g/L	50g/L
Commercial SLS	1.99 ± 0.04	1.57 ± 0.09	1.43 ± 0.06
F <sub>1</sub>	2.19 ± 0.07	1.76 ± 0.22	1.36 ± 0.11
F <sub>2</sub>	2.16 ± 0.01	1.74 ± 0.23	1.30 ± 0.07
F <sub>3</sub>	1.55 ± 0.02	1.32 ± 0.01	1.29 ± 0.03
F <sub>4</sub>	1.53 ± 0.05	1.33 ± 0.04	1.28 ± 0.05
F <sub>5</sub>	1.54 ± 0.05	1.37 ± 0.03	1.28 ± 0.02

The highest apparent viscosity  $2.19 \cdot 10^{-3}$  and  $2.16 \cdot 10^{-3} \text{ N.m}^{-2}.\text{s}$  were obtained respectively with fraction F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> at 20%. For others fractions  $\eta_a$  was about of  $1.5 \cdot 10^{-3} \text{ N.m}^{-2}.\text{s}$ . These apparent viscosity decreases as the concentration and the molecular weight of the fraction is decreasing. The lowest value ( $1.28 \cdot 10^{-3} \text{ N.m}^{-2}.\text{s}$ ) is obtained with F<sub>5</sub> and F<sub>4</sub> at 5 %. This difference, observed between  $\eta_a$  values of SLS solutions can be attributed to the presence of



more sodium in the fractions characterized by low molecular weight. In fact, as reported by Browning et al.<sup>20</sup>, the presence of sodium can promote the repulsive forces and therefore reduce the viscosity. The effect of sodium on the viscosity was stated by comparing the viscosity of SLS and CLS. SLS viscosity is lower compared to that of CLS due to the stronger electrokinetic repulsive force of the sodium<sup>20</sup>.

### *Antioxidant capacity*

The antioxidant activity of commercial SLS and their fractions, evaluated by TEAC and ORAC assays, are reported in table 8.

**Table 8** Antioxidant capacity evaluated by TEAC and ORAC methods of commercial SLS and their fractions.

<u>Fraction</u>	<u>TEAC (<math>\mu\text{M}</math>)</u>	<u>ORAC (<math>\mu\text{M}</math>)</u>
Commercial SLS	$2.52 \pm 0.08$	$1.92 \pm 0.13$
F <sub>1</sub>	$2.51 \pm 0.21$	$1.91 \pm 0.23$
F <sub>2</sub>	$2.45 \pm 0.10$	$1.76 \pm 0.13$
F <sub>3</sub>	$2.83 \pm 0.12$	$2.47 \pm 0.17$
F <sub>4</sub>	$2.86 \pm 0.18$	$2.53 \pm 0.10$
F <sub>5</sub>	$1.67 \pm 0.19$	$2.18 \pm 0.06$

It indicates that the TEAC values of commercial SLS and their fractions ranked from 1.67 to 2.86  $\mu\text{M}$  and from 1.76 to 2.53  $\mu\text{M}$  for ORAC values. F<sub>3</sub> (2.83  $\mu\text{M}$ ) and F<sub>4</sub> (2.86  $\mu\text{M}$ ) showed the greatest TEAC values. ORAC method are also showed that F<sub>3</sub> (2.47  $\mu\text{M}$ ) and F<sub>4</sub> (2.53  $\mu\text{M}$ ) are the fraction which have the greatest antioxidant capacity. Compared to the most known antioxidant molecules, such as vitamin C (TEAC, 5.68  $\mu\text{M}$ ), vitamin E (TEAC, 2.32  $\mu\text{M}$ ) and rutin (TEAC, 3.97  $\mu\text{M}$ )<sup>32</sup>, SLS fractions exhibit a relatively interesting antioxidant power. The fractionation allows obtaining fractions (F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub>) with a relatively highest antioxidant activity compared to SLS. Both the used methods (TEAC and ORAC) lead to a similar conclusion. The variation of the antioxidant power between fractions could be attributed to the structural difference observed previously. In fact, Zhou et al.<sup>33</sup> studied the antioxidant capacity, using TEAC method, of different phenolic acid (4-OH benzoic, vanillic, and syringyl acids) and they observed that the presence of methoxyl groups (OCH<sub>3</sub>) in the ortho position to the hydroxyl position on the phenyl ring (syringyl acid) enhances the antioxidant activity. The presence of syringyl units in fractions F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> and F<sub>5</sub> may be in the

origin of the more important antioxidant capacity. However, values obtained by TEAC are slightly lower compared to ORAC. This difference is attributed to the fact that TEAC assay uses exogenous  $ABTS^{\bullet+}$  radicals, whereas the ORAC assay uses more physiologically relevant peroxy radicals, and can react with non-lignosulfonates components<sup>34</sup>. F<sub>5</sub> evaluated by TEAC present an antioxidant activity less than commercial SLS due to the presence of impurities.

## CONCLUSION

Diafiltration achieved five SLS fractions with different molecular weight and polydispersity ranking from 1400 g.mol<sup>-1</sup> to 19500 g.mol<sup>-1</sup> and 1.4 to 3.5, respectively. Structural investigation by FTIR analyses and <sup>31</sup>P NMR show a high content on hydroxyl and sulfonic groups for fractions with molecular weight ranking from 2500 g.mol<sup>-1</sup> to 4300 g.mol<sup>-1</sup> (F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub>). The physico-chemical properties of SLS fractions were also investigated and compared to the commercial SLS. The adsorption isotherms of commercial SLS and their fractions present different isotherms profiles and well fitted by GAB model. The parameters of this model indicated that the energy binding and adsorption capacities differ from one fraction to another. Thereafter, surface activity were evaluated, results emphasize that fractions with molecular weight with M<sub>w</sub> of 4300 and 2500 g.mol<sup>-1</sup> (F<sub>3</sub> and F<sub>4</sub>) have a higher surface activity than commercial SLS. These two fractions display also the highest antioxidant activity. In this work, we also demonstrated that LS are soft particle and we determined the charge density. F<sub>1</sub> (with M<sub>w</sub> of 19500 g.mol<sup>-1</sup>) and F<sub>2</sub> (with M<sub>w</sub> of 7000 g.mol<sup>-1</sup>) present the highest charge density (-40.5 mM and 41 mM) and the highest apparent viscosity (2.19 10<sup>-3</sup> and 2.16 10<sup>-3</sup> N.m<sup>2</sup>.s). The analysis of the whole results indicated that diafiltration permits the obtaining for at least one fraction that shows greater activity in a given property compared to commercial SLS.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors gratefully acknowledge Doctor Nicolas BROSSE from LERMAB Laboratory for the <sup>31</sup>P NMR analysis.

## REFERENCES

1. R. J. A. Gosselink, E. De Jong, B. Guran and A. Abächerli, *Ind. crop. prod.*, **20**, 121 (2004).
2. X. Qiu, M. Yan, D. Yang, Y. Pang and Y. Deng, *J. Colloid. Interface. Sci.*, **338**, 151 (2009).
3. T. D. Degtyarenko, V. A. Zavgordinii, V. V. Vasil'ev and A. S. Makarov, *Solid. Fuel. Chem.*, **22**, 81 (1988).
4. H. Liu, S. Fu, H. Li and H. Zhan, *Ind. Crop. Prod.*, **30**, 287 (2009).
5. P. Thobunluepop, *Pak. J. Bio. Sci.*, **12**, 1102 (2009).
6. M. P. Vinardell, V. Ugartondo and M. Mitjans, *Ind. crop. prod.*, **27**, 220 (2008).
7. D. Y. Chang, S. Y. N. Chan and R. P. Zhao, *Constr. Build. Mater.*, **9**, 205 (1995).
8. N. E. E. Mansouri and J. Salvado, *Ind. Crop. Prod.*, **24**, 8 (2006).
9. F. Q. Chu and J. G. Hong, *Linchan Huaxue Yu Gongye/ Chem. Ind. For. Prod.*, **26**, 23 (2006).
10. A. S. Jahonsson, A. K. Nordin and O. Wallberg, *Chem. Eng. Res. Des.*, **86**, 1271 (2008).
11. E. A. Flickinger, J. M. Campbell, L. G. Schmitt and G. C. Fahey Jr, *FASEB J.*, **11** (1997).
12. G. E. Fredheim, S. M. Braaten and B. E. Christensen, *J. Wood. Chem. Technol.*, **23**, 197 (2003).
13. G. Richardson, Y. Sun, M. Langton and A. M. Hermansson, *Carbohydr. Polym.*, **57**, 369 (2004).
14. S. A. Gundersen and J. Sjöblom, *Colloid. Polym. Sci.*, **277**, 462 (1999).
15. D. Heath and T. F. Tadros, *Colloid Polym.Sci.*, **261**, 49 (1983).
16. X. Ouyang, X. Qiu and P. Chen, *Colloid. Surface. A*, **282-283**, 489 (2006).
17. D. Yang, X. Qiu, Y. Pang and M. Zhou, *J. Disper. Sci. Technol.*, **29**, 1296 (2008).
18. Z. Li, Y. Pang, X. Li and X. Qiu, *J. Chem. Ind. Eng.*, **59**, 2127 (2008).
19. D. Yang, X. Qiu, M. Zhou and H. Lou, *Energ. Convers. Manage.*, **48**, 2433 (2007).
20. W. Browning, C., *Ind. Eng. Chem. Res.*, **49**, 1401 (1950).
21. O. Ringena, B. Saake and R. Lehnen, *Holzforschung*, **59**, 405 (2005).
22. G. L. Miller, *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959).
23. A. Granata and D. S. Argyropoulos, *J. Agric. Food. Chem.*, **43**, 1538 (1995).
24. P. P. Lewicki, *Int. J. Food Sci.Tech.*, **32**, 553 (1997).
25. OriginLab, 2000.
26. H. Ohshima, *Adv. Colloid. Interfac.*, **62**, 189 (1995).
27. A. K. Sen, S. Roy and V. A. Juvekar, *Polym. Int.*, **56**, 167 (2007).
28. U. Vainio, R. A. Lauten and R. Serimaa, *Langmuir*, **24**, 7735 (2008).
29. S. Brunauer, P. H. Emmett and E. Teller, *J. Am. Chem. Soc.*, **60**, 309 (1938).
30. V. Ducel, P. Saulnier, J. Richard and F. Boury, *Colloid Surface B*, **41**, 95 (2005).
31. Y. X. Pang, X. Q. Qiu, D. J. Yang and H. M. Lou, *Colloid Surface A*, **312**, 154 (2008).
32. P. Pietta, P. Simonetti, C. Gardana and P. Mauri, *J. Pharmaceut. Biomed.*, **23**, 223 (2000).
33. K. Zhou, J. J. Yin and L. Yu, *Food Chem.*, **95**, 446 (2006).
34. V. Ugartondo, M. Mitjans and M. P. Vinardell, *Ind. crop. prod.*, **30**, 184 (2009).

### **Contribution de l'article**

Cet article relate la séparation des lignosulfonates par procédés membranaires (diafiltration), en six fractions, et leurs caractérisations chimiques et physico-chimiques.

Les fractions obtenues présentent des compositions et des comportements en solution différents l'une par rapport à l'autre, mais aussi par rapport aux lignosulfonates commerciaux.

La caractérisation de la distribution moléculaire des différentes fractions a montré que les poids moléculaires et la polydispersité varient de 1400 g/mol à 19500 g/mol et de 1,4 à 3,5, respectivement. Tandis que les lignosulfonates commerciaux utilisés pour la séparation membranaire ont une masse moléculaire en nombre de  $2900 \pm 400$  g/mol, une masse moléculaire en poids de  $17800 \pm 1500$  g/mol et une polydispersité de  $6,2 \pm 0,3$ .

Les techniques spectroscopiques FTIR et RMN  $^{31}\text{P}$  ont été utilisées pour caractériser les groupements fonctionnels. Les résultats montrent que les fractions dont les masses moléculaires en poids sont entre 2500 et 4300 g/mol contiennent le plus de groupements hydrophiles (hydroxyles et sulfoniques). Ce qui influence leurs propriétés physico-chimiques.

Les résultats des propriétés physico-chimiques des fractions de lignosulfonates ont également permis de reporter que :

-Les isothermes d'adsorption, modélisés par le modèle GAB, des lignosulfonates commerciaux et leurs fractions présentent différents profils. Les paramètres du modèle utilisé indiquent que les capacités d'énergie de liaison et d'adsorption diffèrent d'une fraction à une autre. La fraction F<sub>5</sub> (masse moléculaire en nombre de  $1400 \pm 50$  g/mol, masse moléculaire en poids de  $2300 \pm 100$  g/mol et polydispersité de  $1,7 \pm 0,1$ ) présente la plus grande valeur de la capacité d'adsorption de la monocouche d'eau (28,5).

-L'activité de surface a été déterminée par la méthode de wilhelmy, les résultats montrent que les fractions de poids moléculaire entre 4300 et 2500 g/mol ont une activité de surface supérieure aux lignosulfonates commerciaux. Ces mêmes fractions (poids moléculaire entre 4300 et 2500 g/mol) montrent aussi la plus forte activité anti-oxydante.

-Il a été démontré aussi que les lignosulfonates ont un comportement de particules molles à partir du model d'Oshima. La densité de charge des fractions a été reportée, F<sub>1</sub> (19500 g/mol)

et F<sub>2</sub> (7000 g/mol) présentent la plus grande densité de charge à savoir -40,5 mM et -41,0 mM respectivement.

-Les fractions F<sub>1</sub> et F<sub>2</sub> avec un poids moléculaire de 7000 g/mol et 19500 g/mol, présentent la plus grande viscosité apparente  $2,19 \cdot 10^{-3}$  et  $2,16 \cdot 10^{-3}$  N.m<sup>-2</sup>.s, respectivement.

L'analyse de l'ensemble des résultats indique que la diafiltration est un outil intéressant pour obtenir des fractions avec des propriétés structurales et physico-chimiques différentes. Ces fractions peuvent être exploitées dans des niches d'applications qui nécessitent des propriétés précises et recherchées.



## *CHAPITRE III.2*

### *LE COMPORTEMENT DES LIGNOSULFONATES EN SOLUTION (PHÉNOMÈNE D'AGRÉGATION)*





## **CHAPITRE III.2**

### **LE COMPORTEMENT DES LIGNOSULFONATES EN SOLUTION (PHENOMENE D'AGREGATION)**

---

Selon la propriété et/ou l'application envisagée des lignosulfonates, la formation d'agrégats ou de micelles peut être un phénomène recherché. Certaines études ont rapporté que les lignosulfonates en solution aqueuse forment des micelles [1, 2]. Cette formation dépend du pH, de la force ionique, de la distribution moléculaire, des charges et des concentrations utilisées. La formation de micelles de lignosulfonates est un phénomène continu qui accroît en fonction de la concentration.

Pour vérifier cette propriété, les lignosulfonates et les fractions obtenues ont été analysés par DLS à des concentrations variables de 1 g/L, 0,5 g/L et 1 g/L en milieu salin (0,1 M). Les résultats obtenus en termes de distribution de diamètre hydrodynamique et les pourcentages en volume des lignosulfonates et des fractions obtenues sont reportés dans le **tableau III.2**.

Comme le montre le tableau, un même comportement en fonction des concentrations est observé pour toutes les fractions.

Ainsi à titre d'exemple, à une concentration de 0,5 g/L, 3 régions de diamètre hydrodynamique différentes sont observées, la première au environ de 200 nm, la deuxième au environ de 20 nm et la troisième entre 2 et 7 nm. Ces observations, en comparaison avec les données de la littérature (diamètre des lignosulfonates de 2 nm), laissent supposer qu'un phénomène d'agrégation a lieu.

Qiu et al.,[2] ont déterminé la concentration critique d'agrégation (CAC) des lignosulfonates, d'un poids moléculaire de 20291 Da, et ont rapporté qu'elle est de l'ordre de 0,38 g/L. Au-delà, de cette concentration les lignosulfonates s'agrègent. Ce résultat confirme nos

observations et suppositions. En effet, dans une solution de 1 g/L de lignosulfonates la région des diamètres hydrodynamiques de 2 à 7 nm n'est plus détectée.

Par ailleurs, à la même concentration en lignosulfonates (1 g/L) et en présence de NaCl (0,1M), la région des diamètres hydrodynamiques de 2 à 7 nm réapparaît. Ceci indique clairement le rôle de la force ionique dans le processus d'agrégation des lignosulfonates. En effet, l'ajout de sel réduit les interactions entre les macromolécules et donc le phénomène de formation des micelles.

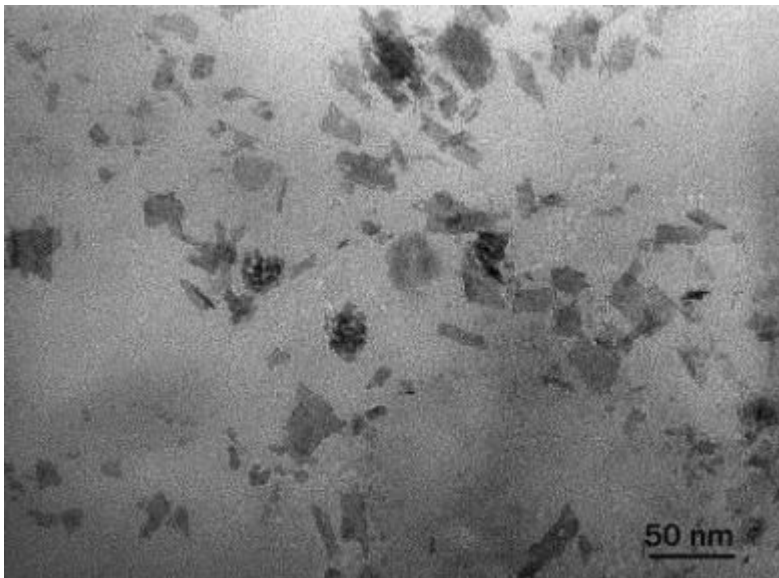
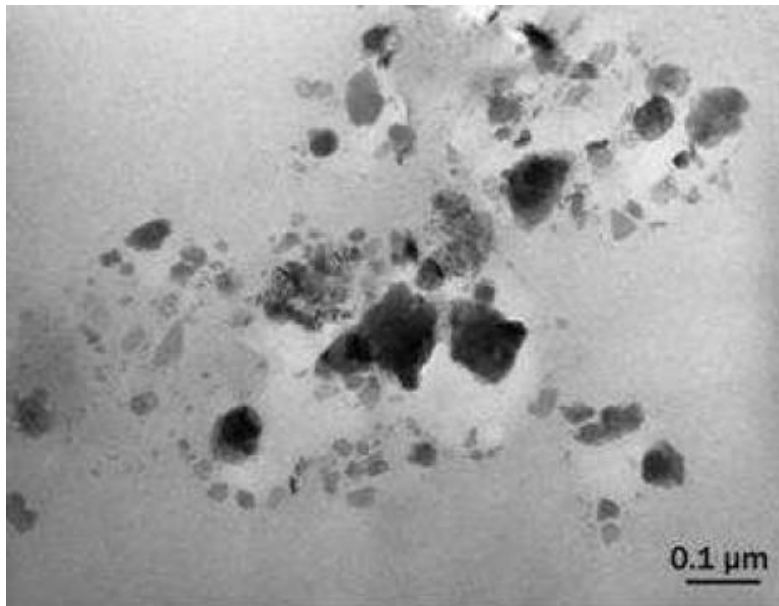
Pour la troisième région, qui est caractérisée par un diamètre hydrodynamique entre 2 et 7 nm, on remarque que le diamètre décroît en fonction de la distribution moléculaire (selon la fraction). A titre d'exemple, F<sub>2</sub> (7000 Da), F<sub>4</sub> (2500 Da), et F<sub>5</sub> (2300 Da), présentent des diamètres de 4, 3 et 2 nm, respectivement.

**Tableau III.2** Distribution des diamètres hydrodynamiques des lignosulfonates et des fractions obtenues et leurs pourcentages en volume.

Fraction	Milieu	Distribution du diamètre hydrodynamique			Pourcentage en volume (%)		
		1 <sup>er</sup> pic	2 <sup>ème</sup> pic	3 <sup>ème</sup> pic	1 <sup>er</sup> pic	2 <sup>ème</sup> pic	3 <sup>ème</sup> pic
Lignosulfonates commerciaux	1g/L	193 ± 15	17 ± 3	0	89 ± 1	11 ± 1	0
	0,5 g/L	196 ± 7	18 ± 2	7 ± 2	92 ± 3	5 ± 1	2 ± 1
	Salin (0,1M)	161 ± 10	12 ± 1	7 ± 1	76 ± 3	21 ± 1	3 ± 1
F <sub>1</sub>	1g/L	220 ± 17	22 ± 4	0	86 ± 4	14 ± 4	0
	0,5 g/L	200 ± 9	22 ± 4	5 ± 0	82 ± 1	11 ± 1	7 ± 0
	Salin (0,1M)	198 ± 3	14 ± 2	5 ± 0	68 ± 3	16 ± 3	11 ± 1
F <sub>2</sub>	1g/L	202 ± 5	19 ± 2	0	96 ± 3	4 ± 3	0
	0,5 g/L	200 ± 14	19 ± 2	4 ± 0	82 ± 1	9 ± 1	8 ± 1
	Salin (0,1M)	171 ± 8	12 ± 2	4 ± 0	65 ± 2	20 ± 1	15 ± 4
F <sub>3</sub>	1g/L	196 ± 17	20 ± 1	0	88 ± 1	11 ± 1	0
	0,5 g/L	200 ± 13	19 ± 2	3 ± 0	84 ± 1	10 ± 1	5 ± 0
	Salin (0,1M)	179 ± 5	19 ± 0	3 ± 0	62 ± 3	25 ± 4	12 ± 1
F <sub>4</sub>	1g/L	196 ± 11	18 ± 2	0	79 ± 2	20,5 ± 2	0
	0,5 g/L	190 ± 9	18 ± 2	3 ± 0	77 ± 1	18 ± 1	5 ± 0
	Salin (0,1M)	178 ± 6	18 ± 2	3 ± 0	62 ± 3	24 ± 1	14 ± 1
F <sub>5</sub>	1g/L	196 ± 6	16 ± 2	0	91 ± 3	9 ± 3	0
	0,5 g/L	190 ± 9	15 ± 2	2 ± 0	72 ± 3	24 ± 3	4 ± 0
	Salin (0,1M)	166 ± 4	16 ± 2	2 ± 1	57 ± 3	23 ± 4	19 ± 1

Afin d'observer le phénomène d'agrégation des lignosulfonates en solution, la fraction F<sub>3</sub> a été analysée par Microscopie Electronique à Transmission (MET) à une concentration de 0,5 g/L. Les résultats obtenus sont consignés dans la **Figure III.2**. Ces images confirment que les lignosulfonates en solution sont sous forme d'agrégats et sont caractérisés par une distribution de taille des particules de diamètre compris entre 2 nm et 200 nm.

Goring et al. [3] ont étudié, par granulométrie, la taille des particules des lignosulfonates de sodium caractérisées par une  $M_w$  égale à 143000 Da et ont observé un diamètre hydrodynamique d'environ 2 nm. De leur côté, Vainio et al. [1] ont mentionné une valeur de 8 nm pour des lignosulfonates de sodium de  $M_w$  égale à 18000 Da et ont reporté le phénomène d'agrégation. Les variations observées de la taille des particules de lignosulfonates pourraient être attribuées aux interactions des forces attractives hydrophiles et hydrophobes (liaisons hydrogène et van der Waals) entre les macromolécules de lignosulfonates [4]. Ce phénomène d'agrégation est à prendre en compte lors de l'utilisation des lignosulfonates dans différentes applications et selon l'application recherchée un ajustement de l'environnement physico-chimique de la préparation de ces biopolymères est nécessaire.



**Figure II.2.** Image obtenue par MET de la fraction F<sub>3</sub> (0,5 g/L).

**Références**

- [1] X. Qiu, Q. Kong, M. Zhou, D. Yang, Aggregation behavior of sodium lignosulfonate in water solution, *J Physic Chem B* 114 (2010) 15857-15861.
- [2] U. Vainio, R.A. Lauten, R. Serimaa, Small-angle X-ray scattering and rheological characterization of aqueous lignosulfonate solutions, *Langmuir* 24 (2008) 7735-7743.
- [3] D.A.I. Goring, R. Vuong, C. Gancet, H. Chanzy, Flatness of lignosulfonate macromolecules as demonstrated by electron microscopy *J Appl Polym Sci* 24 (1979) 931-936.
- [4] M. Micic, K. Radotic, I. Benitez, M. Ruano, M. Jeremic, V. Moy, M. Mabrouki, R.M. Leblanc, Topographical characterization and surface force spectroscopy of the photochemical lignin model compound, *Biophysic Chem* 94 (2001) 257-263.

*CHAPITRE III.3*

*POLYMÉRISATION ENZYMATIQUE  
DES LIGNOSULFONATES*





## **Chapitre III.3**

# **POLYMÉRISATION ENZYMATIQUE DES LIGNOSULFONATES**

---

### **Introduction**

L'hétérogénéité des lignosulfonates, d'un point de vue composition chimique et distribution moléculaire, affecte leurs propriétés physico-chimiques et limite leurs applications à des domaines à faible valeur ajoutée. Pour réduire cette disparité plusieurs méthodes ont été reportées dans la littérature.

Dans le premier chapitre des résultats, nous avons étudié la capacité du fractionnement par procédés membranaires à fournir des fractions avec une structure, une composition chimique et une distribution moléculaire moins hétérogènes et mieux définies et l'effet de ce procédé sur plusieurs propriétés physico-chimiques.

Une autre approche, la polymérisation des lignosulfonates, permet aussi d'apporter des modifications au niveau de la distribution du poids moléculaire, de la structure et de la composition chimique et par conséquent sur les propriétés de ces biopolymères. La polymérisation peut être obtenue par voie chimique et/ou enzymatique. La voie chimique met en œuvre des conditions drastiques de température et de pression et utilise des catalyseurs organométalliques peu respectueux de l'environnement, alors que la voie enzymatique se fait dans des conditions douces et sélectives ce qui permet d'obtenir des biopolymère avec des structures et des distributions de masses moléculaires plus contrôlées.

Dans cette étude, une première approche a consisté en une étude comparative entre la polymérisation des lignosulfonates par voie enzymatique et par voie chimique. En vue des résultats et des arguments cités dans le paragraphe précédent, notre choix a porté sur l'étude de la polymérisation des lignosulfonates par les laccases. Les laccases utilisent l'oxygène comme initiateur de la réaction d'oxydation des groupements phénoliques. La plupart des laccases dites « bleue » ne peuvent pas oxyder directement les hydroxyles aliphatiques des

lignosulfonates. Pour élargir les activités catalytiques des laccases aux groupements non phénoliques des lignosulfonates certaines études ont proposé l'utilisation des médiateurs qui sont des petites molécules avec un potentiel d'oxydoréduction.

Pour déterminer l'efficacité de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates par les laccases, deux approches complémentaires ont été menées :

- La polymérisation enzymatique des lignosulfonates sans médiateur : l'effet de plusieurs facteurs a été étudié (concentrations d'enzyme et de substrat, l'origine de l'enzyme, la distribution moléculaire initiale). Les fractions étudiées sont nommées SLS commerciaux, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> et F<sub>3</sub> (ce sont les fractions SLS commerciaux, F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> respectivement dans le chapitre III.1 et III.2).

- La polymérisation enzymatique des lignosulfonates en présence de médiateurs : l'effet de cinq médiateurs naturels et synthétiques (l'acétosyringone, la acétovanillone, l'acide 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique), le 1-hydroxybenzotriazole et l'acide violurique) sur le processus de polymérisation des lignosulfonates par la laccase de *Trametes versicolor* a été analysé et comparé à l'oxydation par la laccase seule.

Les réactions ont été menées à la température et au pH optimal de chaque laccase étudiée. Pour imposer les mêmes conditions opératoires, les réactions ont été réalisées dans un pilote de réacteurs de synthèse en parallèles.

Les performances des réactions ont été quantifiées par la détermination des poids moléculaires par chromatographie d'exclusion stérique, l'évolution des différents groupements par FTIR et le dosage des hydroxyles phénoliques par méthode spectroscopique.

**Les résultats de cette partie font l'objet d'une publication intitulée 'Enzymatic polymerization of sodium lignosulfonates : effect of catalysts, initial molecular weight and mediators' qui est soumise au journal 'Process Biochemistry'.**

## Article

### **Enzymatic polymerization of sodium lignosulfonates: effect of catalysts, initial molecular weight and mediators**

Nidal Madad, Latifa Chebil\*, Celine Charbonnel, Irina Ioannou, Mohamed Ghoul

Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, ENSAIA-INPL, Vandoeuvre-les-Nancy, France

\*Author for correspondence E-mail: [latifa.Chebil@ensaia.inpl-nancy.fr](mailto:latifa.Chebil@ensaia.inpl-nancy.fr)

#### **Abstract**

The aim of this study was to investigate the impact of different factors on the performance of sodium lignosulfonates (SLS) polymerization. Different initial molecular weight of SLS: commercial SLS (17800 Da), F<sub>1</sub> (4300 Da), F<sub>2</sub> (2500 Da) and F<sub>3</sub> (2300 Da) were tested.

Size Exclusion Chromatography (SEC-UV), Fourier Transform InfraRed (FT-IR) and phenolic group determination showed that SLS molecular weight increases depending on the laccase origin, the enzyme and the substrate concentrations and the initial molecular weight of SLS fractions. The highest molecular weight was obtained by fungal laccase (*Trametes versicolor*) while no reactivity was observed by plant laccase (Rhus laccase). The largest increase of M<sub>w</sub> (108600 Da) is reached with SLS (17800 Da) at 50 g/L at 30 U/mL of laccase. The laccase polymerization of SLS is affected also by the presence of mediator. Five mediators were studied for F<sub>1</sub> polymerization by laccase from *Trametes versicolor*; acetosyringone (ASG), violuric acid (VLA), 1-hydroxy-benzotriazole (HBT), acetovanillone (ACV) and 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS). In the presence of F<sub>1</sub>, only ASG and VLA lead to a higher molecular weight (7500 Da) compared to reactions carried without mediator (6600 Da).

**Keywords** Sodium lignosulfonates, oxidation, polymerization, laccase, mediator.

## 1. Introduction

Lignosulfonates (LS) are by-products of wood sulfite pulping process [1]. They are anionic polyelectrolytes, composed by several sulfonate, hydroxyl, phenolic and carboxyl groups. Due to their interesting physico-chemical properties and as renewable vegetable resources, LS are used in several industrial fields such as dispersant, surfactant, stabilizing agent and concrete admixture [2-6]. However, the drastic operating conditions applied during sulfite pulping process leads to LS with a variable structure and a wide molecular weight distribution. This heterogeneity influences their physico-chemical properties and their performances in use [7-10].

To overcome these drawbacks, increase the LS molecular weight and/or reduce their polydispersity were suggested as a promising way. These modifications can be reached either by fractionation of LS [7, 10, 11] or by polymerization. The fractionation, using membranes and chromatography processes, reduces the heterogeneity of LS, but it is relatively expensive. The polymerization of LS can be obtained by either chemical or enzymatic processes. The main chemical processes used are ozonolysis and manganese III methods. The ozonolysis generates active oxygen radical species which undergo polymerization [12], while manganese III oxidation of phenols contributes to cross linkage of lignin units [13]. However, the non reproducibility of ozonolysis results [14, 15] and the formation of manganese IV oxide precipitation make these methods less attractive [16].

A more suitable option would be the enzymatic way. Enzymatic oxidation allows a high specificity of the radical generation, with reactions carried out under mild operating conditions and generating few undesired by-products. Peroxidases and laccases, particularly blue laccase, are the most used enzymes in lignin oxidation [17]. Peroxidases use hydrogen peroxide as oxidant, whereas blue laccases reduce di-oxygen to water and simultaneously eliminate one electron from phenolic and amine groups. Beside blue laccase, some papers described another laccase called 'yellow laccase' which is able to oxidize non phenolic groups. The mechanism of oxidation by this last enzyme is not yet elucidated. It seems that aromatic lignin linked to the active site of laccase play a role of mediator in the reaction of oxidation of non-phenolic compounds [18]. The fact that blue laccase requires di-oxygen as oxidant confers them an advantage compare to peroxidases. Di-oxygen, unlike hydrogen peroxide, has high stability and does not decompose on radicals which cause the inactivation of the enzyme.

Oxidation of LS by blue laccase was earlier reported. The first studies conducted by Leonwicz et al. [19] were focused on the effect of laccase from *Trametes versicolor* on fractionated LS. Results indicated that laccase possesses both polymerization (predominant form) and depolymerization activities. Recently, Kim et al. [20] studied the feasibility of calcium LS (CLS) polymerization by laccase from *Ascomycete myceliophthora*. They observed an increase of molecular weight, of surface charge and of zeta potential. Areskog et al. [16] studied the oxidation by laccase from *Myceliophthora thermophila* and *Trametes villosa* of CLS and sodium LS (SLS) at different concentrations and initial molecular weights and observed a high increase of molecular weight.

Using only blue laccase in order to perform oxidation has some limitations. Blue laccases have a low redox potential, compared to other oxydo-reductive enzymes. Unlike yellow laccases, blue laccases are able to oxidize only phenolic groups and have no effect on non-phenolic units of lignin. To oxidize the non phenolic units, redox mediators with low molecular weight were used to expand the catalytic activity of laccase [21-29].

Recently, Nugroho and al. [26] reported the ability of laccases from different sources to oxidize CLS in the presence of 2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonate (ABTS) and hydroxybenzotriazole (HBT); the most commonly used mediator. They found that the molecular weight had significantly increased. Acetosyringone (ASG), violuric acid (VLA) and acetovanillone (ACV) were also used as mediator on laccase lignin systems to perform degradation reactions [30-32]. Literature on the oxidation of LS by laccase with or without mediator indicates that it is a new way to improve the properties and the applications of LS. However, the effect of the nature of mediator on LS polymerization is still matter of debate and no comparison among reactions with or without a mediator has been described.

The aim of this study is to determine the key factors affecting the LS polymerization. So, the effect of substrate and enzyme concentrations, the origin of enzyme, and the initial molecular weight were investigated. Then, the performances of polymerization in presence of five mediators were studied and compared to the oxidation by laccase alone. The five used mediators are ABTS, HBT, VLA, ACV and ASG. In buffered media, they have different mechanisms during LS oxidation: i) An electron transfer route for mediators such as ABTS and (ii) A radical hydrogen atom transfer route for VLA and HBT of the -NOH- type. (iii) Phenoxy radicals formed during the oxidation of ACV and ASG by laccase act similarly to the -NO•- radicals by extracting a hydrogen atom from LS [26, 33].

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

#### 2.1.1 Lignosulfonates

Sodium lignosulfonates (SLS) composed of 90 wt. % of LS, 4 wt. % of reducing sugars and 6 wt% of total impurities were provided by Sigma-Aldrich (Sweden).

#### 2.1.2 Catalyst

Blue Laccases from *Trametes versicolor* (LTV) (20.7 U/mg) and from *Rhus vernicifera* (LRV) (EC 1.10.3.2, 120 U/mg) were purchased from Fluka (Sweden).

Blue Laccase from *Myceliophthora thermophila* (LMT) (1664 U/mg) was donated by Novozymes (Denmark).

Manganese III acetate dihydrate was purchased from Sigma-Aldrich (Sweden).

#### 2.1.3 Mediators

2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 1-Hydroxybenzotriazole (HBT), violuric acid (VLA), acetovanilline (ACV) and acetosyringone (ASG) were procured from Fluka (Sweden).

## 2.2 Methods

### 2.2.1 Fractionation

SLS were fractionated by diafiltration. Ceramic tubular membranes (TAMI, France) with molecular weight cut-off (MWCO) (300, 150, 50, 15 and 5 kDa) were sequentially used to obtain five fractions [34].

Table 1 shows weight average molecular weight ( $M_w$ ), number average molecular weight ( $M_n$ ), polydispersity (Pdi), SLS and phenolic contents (paragraph 2.2.4) of commercial SLS, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>.

**Table 1** Molecular weights distribution, percentage of SLS content, polydispersity and phenolic content of commercial SLS, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>.

SLS	M <sub>n</sub> (Da)	M <sub>w</sub> (Da)	% SLS	Pdi	Ar-OH (mmol/g)
Commercial SLS	2900 ± 400	17800 ± 1500	91.4 ± 1.5	6.2 ± 0.3	2.2 ± 0.1
F <sub>1</sub>	2400 ± 150	4300 ± 400	95.3 ± 1.9	1.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1
F <sub>2</sub>	1700 ± 100	2500 ± 50	94.0 ± 2.4	1.4 ± 0.1	2.6 ± 0.1
F <sub>3</sub>	1400 ± 50	2300 ± 100	75.6 ± 0.5	1.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1

### 2.2.2 Polymerization of sodium lignosulfonates

SLS polymerization was performed by enzymatic and chemical ways.

Chemical reaction was performed in a Wheaton reactor (200 mL) (Wheaton, USA). F<sub>1</sub> was dissolved in 30 mL of water. This solution was added dropwise to 40 mL of water containing 2 mL of acetic acid and saturated MnIII acetate hydrate (3 g was used) under stirring. Each sample was filtered before analysis.

Enzymatic reactions were carried out in a Chemspeed ASW1000 automated synthesizer (Chemspeed, Netherlands). Eight reactions were simultaneously performed. Fractions (1g/L or 10 g/L or 50 g/L) were suspended in 20 mL reactor vessels in phosphate buffer at pH 4.5 for reactions catalyzed by LTV and pH 5 for reactions catalyzed by LRV and LMT. Laccase (3 U/mL or 30 U/mL) and Mediators (0.2 mM) were added to the mixture. The reaction media were stirred at 850 rpm for at least 96h, at 20°C with LRV and LTV and at 50°C with LMT. Reactions were stopped by heating to 90°C in order to inhibit laccase activity.

### 2.2.3 Size exclusion chromatography analysis (SEC)

Reactions were analysed by Size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom Merck, Germany). The system consists of a pump L-2130, an autosampler L-2200, and a Superdex 200HR 10/30 column (24mL, 13 µm, dextran/ cross-linked agarose matrix). Detection was performed using UV detector diode L-2455 at 280 nm. Before analysis, the samples were filtered using regenerated cellulose membrane (0.22 µm) and 50 µl were injected into the SEC system. Commercial SLS, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> were dissolved in 0.1% solution of buffer phosphate pH 7, 0.15 M NaCl. The same solution was used as an eluent. The flow rate was 0.4 mL at 25°C and 11 bars. Calibration was performed using polystyrenes sulfonate (PSS) as a standard to define the molecular weight distribution of fractions.

#### 2.2.4 Determination of phenolic content

Phenolic content was determined using the method described by Areskog et al. [16].

#### 2.2.5 Fourier transformed infrared analysis

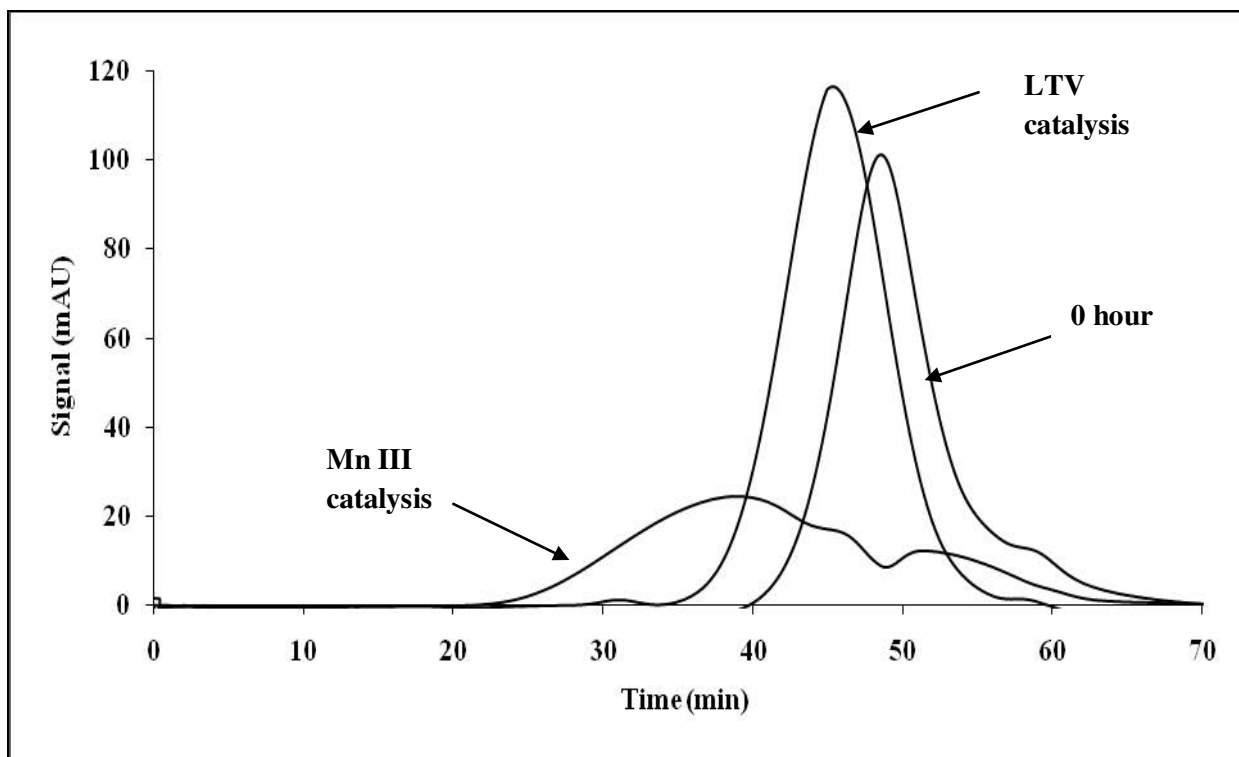
Transmission infrared spectra of Commercial SLS, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub> were performed using FTIR spectrometer tensor 27 (Bruker, France) with a deuterated triglycine sulphate (DTGS) detector. Samples (1% of total molecular mass) were mixed with KBr. The powder mixture was then crushed in a mechanical die press to form a translucent pellet through which the beam of the spectrometer could pass. The diaphragm was set to 4 mm and the scanning rate to 10 kHz. Each spectrum was recorded 256 scans. The wave number range used was between 4000 and 900 cm<sup>-1</sup> with resolution of 2 cm<sup>-1</sup> resolution. The spectra baseline was corrected for further analysis.



### 3. Results

#### 3.1 Effect of catalyst nature

To compare the performance of chemical and enzymatic SLS polymerization performances,  $F_1$  (1g/L) was oxidized either by LTV or Mn III. The obtained results are shown in figure 1. It appears that for both reactions  $M_w$  increases. This increase is more important in presence of Mn III (10600 Da) than with LTV (6600 Da). However, the reaction carried out with manganese led to a high polydispersity (5.4). Since a low polydispersity of the obtained polymers is an important criterion for the industrial application, the enzymatic polymerisation seemed to be more adapted than the chemical one.



**Figure 1** UV detected SEC elution profiles after 4 days of reaction carried out by  $F_1$  (1 g/L) as substrate and LTV (3 U/mL) or manganese III as catalyst.

#### 3.2. Effect of the origin of laccase

The enzymatic polymerization of a SLS fraction ( $F_1$ ), characterized by an  $M_w$  of 4300 Da, was studied using three enzymes, either a two fungal laccase (LTV and LMT) or a plant laccase (LRV), in a buffer solution at their pH and temperature optima. The enzyme concentration was 3U/mL.

The obtained results for molecular weight, polydispersity and phenolic OH group content are summarized in table 2.

**Table 2** Evolution of molecular weights, polydispersity and phenolic OH groups during polymerization of F<sub>1</sub> with different laccases.

Laccase	Time (h)	M <sub>n</sub> (Da)	M <sub>w</sub> (Da)	Pdi	Ar-OH (%)
LTV	0	2300	4200	1.8	100 ± 3
	0.5	2700	5500	2.0	55 ± 4
	24	3900	5800	1.5	45 ± 1
	96	4500	6600	1.5	44 ± 1
LMT	0	2300	4100	1.8	100 ± 2
	0.5	2700	5200	1.9	76 ± 3
	24	3000	5500	1.8	53 ± 2
	96	3100	6100	2.0	48 ± 1
LRV	0	2300	4200	1.8	100 ± 2
	0.5	2300	4200	1.8	99 ± 1
	24	2300	4200	1.8	100 ± 2
	96	2300	4200	1.8	100 ± 1

An increase of M<sub>w</sub> and M<sub>n</sub> was observed for reactions carried out with LTV and LMT. This increase is greater for the reaction realized with LTV than with LMT. No M<sub>w</sub> and M<sub>n</sub> changes were detected for the reaction catalyzed by LRV. Moreover, it was observed that there was a greater reduction of phenolic OH group in the reaction catalyzed by LTV than that with LMT.

For reactions catalyzed by LTV and LMT, it was observed that not all OH phenolic groups were oxidized. After 30 minutes of reaction, OH phenolic content reach a plateau while M<sub>w</sub> values continue to grow. This behaviour could be explained by the fact that during the reaction of polymerization by laccase either C-O or C-C alkylation are involved in parallel [35]. So the increase of M<sub>w</sub>, without variation of OH phenolic content, is due to the C-C linkages which generate OH phenolic groups. Thus, the observed plateau of OH phenolic groups could be equilibrium between the consumption and the generation of these groups.

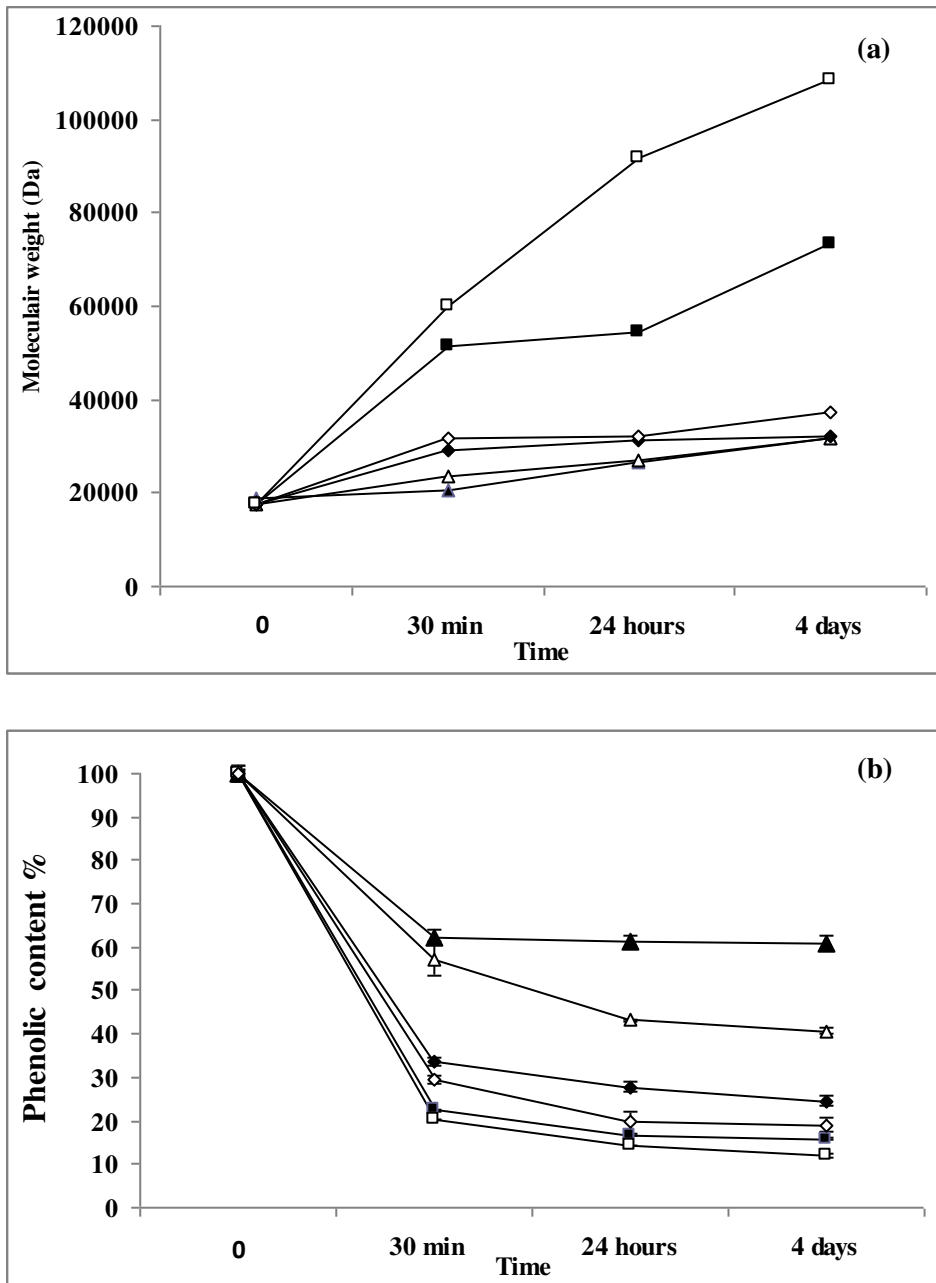
FTIR analyses confirm this assumption (refer to supporting data 1). The spectra show that the intensity of both hydroxyl, between 3400 cm<sup>-1</sup> and 3450 cm<sup>-1</sup>, and aromatic skeletal (1600 cm<sup>-1</sup>) contents was decreased. The polydispersity (Pdi) was calculated also from M<sub>w</sub> and M<sub>n</sub>. It's slightly decreases for LTV and remains almost constant for LMT.

The lack of the reactivity with LRV compared to LTV and LMT is due to its origin. LRV is plant laccase, while LTV and LMT are fungal laccases. The non reactivity of LRV was already observed during the oxidation of coniferyl alcohol and p-coumaryl alcohol [36]. The

difference of reactivity between LRV and the two fungal laccases (LTV and LMT) could be due to the fact that even if they exhibit a common 3-D architecture, they have significant differences in their catalytic site. Fungal laccase has a larger substrate binding site cavity compared to plant laccase [37]. Moreover, LTV had a highest potential redox (0.8 mV), followed by LMT (0.46 mV) and LRV (0.41 mV). So, the difference of reactivity between LMT and LTV can be attributed to their different redox potential.

### **3.3 Effect of the enzyme and substrate concentrations**

In polymerization reactions, laccase acts in the initial step. During this step, phenoxy radicals are generated by oxidation which trigger radical-radical coupling to form polymerized products [38, 39]. So, the initial enzyme and substrate concentrations can affect the polymerization performance (kinetic, molecular weight and conversion rate). However, few papers analyzed the effect of these factors [16]. In these studies, reactions were realized in the presence of 3 and 30 U/mL of LTV and 1, 10 and 50 g/L of commercial SLS. Obtained values of  $M_w$ ,  $M_n$ , Pdi and phenolic content are summarized on figure 2 and table 3.



**Figure 2** (a) Evolution of  $M_w$  and (b) phenolic content of commercial SLS ( $M_n=2900 \pm 400$  Da,  $M_w=17800 \pm 1500$  Da,  $PDI=6.2 \pm 0.3$ ) during the polymerization reaction with LTV.

SLS concentration and LTV dosage were as follows: 50 g/L and 30 U/mL (□), 50 g/L and 3 U/mL (■), 10 g/L and 30 U/mL (◇), 10 g/L and 3 U/mL (◆), 1 g/L and 30 U/mL (△), 1 g/L and 3 U/mL (▲).

**Table 3** Evolution of molecular weights and polydispersity during polymerization of commercial SLS with LTV.

		LTV concentration						
		3U/mL			30U/mL			
SLS concentration	1 g/L	time (h)	M <sub>n</sub> (Da)	M <sub>w</sub> (Da)	Pdi	M <sub>n</sub> (Da)	M <sub>w</sub> (Da)	Pdi
		0	3000	18800	6.3	2700	17700	6.5
		0.5	3800	20500	5.3	5100	23700	4.7
		24	4500	26500	6.0	5700	26900	4.7
	96	7100	31600	4.4	7100	31700	4.5	
	10 g/L	0	2900	17700	6.1	2900	17700	6.0
		0.5	5300	29200	5.5	6300	31500	5.0
		24	5900	31100	5.3	6700	32300	4.8
		96	7800	32200	4.1	7900	37300	4.7
	50 g/L	0	2800	17700	6.3	2800	17700	6.3
		0.5	8700	51400	5.9	10300	59800	5.8
		24	8900	54500	6.1	11000	91800	8.4
		96	9700	73300	7.5	11100	108600	9.7

It appeared that whatever the enzyme and substrate concentrations,  $M_w$  increases with time (refer to supporting data 2). This increase is more pronounced in presence of 50 g/L and it is 6 fold compared to the initial  $M_w$ . The enzyme and substrate concentrations affect also Pdi. For 1 and 10 g/L of SLS, Pdi values decrease for the two LTV concentrations (table 3). For 50 g/L, Pdi arises particularly for LTV, 30 U/mL. This behaviour suggested that the presence of high content of radicals at the initial step of the reaction led to high polydispersity of polymers. The concentration of phenolic OH groups at the end of reaction is also affected by both enzyme and substrate concentrations. The decrease of these groups is more pronounced for high substrate and enzymes concentrations (figure 2b).

### 3.4 Effect of initial molecular weight

The drastic pulping process of wood generated LS with different molecular weight distributions. These variations of initial molecular weight can affect the performance of the enzymatic polymerization of SLS. To study this effect, fractions with different molecular weight (SLS ( $17800 \pm 1500$  Da), F<sub>1</sub> ( $4300 \pm 400$  Da), F<sub>2</sub> ( $2500 \pm 50$  Da) and F<sub>3</sub> ( $2300 \pm 100$  Da)) obtained by diafiltration were oxidized with LTV as enzyme. The evolution of  $M_w$ ,  $M_n$ , Pdi and phenolic content are summarized in Table 4.

**Table 4** Evolution of molecular weights, polydispersity and phenolic OH groups during polymerization of commercial SLS, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> and F<sub>3</sub>, with LTV.

SLS	Time (h)	M <sub>n</sub> (Da)	M <sub>w</sub> (Da)	Pdi	Ar-OH (%)
Commercial SLS	0	2900	18800	6.3	100 ± 1
	0.5	3800	20500	5.3	61 ± 3
	24	4500	26600	6.0	60 ± 3
	96	7100	31600	4.4	60 ± 3
F <sub>1</sub>	0	2300	4200	1.8	100 ± 3
	0.5	2700	5500	2.0	55 ± 4
	24	3900	5800	1.5	45 ± 1
	96	4500	6600	1.5	44 ± 1
F <sub>2</sub>	0	1700	2500	1.5	100 ± 2
	0.5	2600	3300	1.3	65 ± 1
	24	3100	4000	1.3	58 ± 3
	96	3700	4300	1.1	57 ± 1
F <sub>3</sub>	0	1400	2300	1.7	100 ± 1
	0.5	2000	2600	1.3	71 ± 3
	24	1600	2700	1.6	66 ± 3
	96	1700	2700	1.6	62 ± 1

The obtained data indicates an increase of M<sub>w</sub> over time and for all fractions. Wherever, the initial molecular weight of SLS, the magnitude of the increase of M<sub>w</sub> is comparable, except for F<sub>3</sub>. This is may be due to the low purity of this fraction (75%). Also, Pdi values indicated a decrease, after 4 days. However, this variation is independent to the initial molecular weight of LS. The analyses of phenolic groups indicate a significant decrease during the first 30 minutes of reaction and then a gradual reduction until the end of incubation. The amplitude of this decrease is also independent of the initial molecular weight of SLS. The lack of correlation between initial and final M<sub>w</sub>, Pdi and phenolic content was already observed for reaction led with different laccases [16] but not yet elucidated. It could be attributed to the fact that according to reactional mechanisms either C-C or C-O-C linkage are occurred which affect final Mw and residual phenolic groups.

### 3.5. Effect of mediator on SLS polymerization by laccase

To expand the catalytic activity of laccase towards non-phenolic LS units and then enhance their polymerization, the use of mediators has been suggested as a promising way and experimented by some authors [26]. However, the laccase-mediator system is mainly used in delignification process, the bleaching of paper pulps and tail recoveries [21, 40-42]. Few

papers dialled on the polymerization of LS in presence of mediator. For this reason, 5 mediators with different types of transfer mechanisms were tested in the presence of SLS fraction (1 g/L) with  $M_w$  of 4300 Da and LTV as enzyme (3 U/mL). The amount of mediator concentration is 0.2 mM. The evolution of  $M_n$ ,  $M_w$ , Pdi and phenolic group amount was determined during the incubation. The obtained results are summarized on table 5.

**Table 5** Evolution of molecular weights, polydispersity and phenolic OH groups during polymerization of  $F_1$  with LTV in presence of different mediators.

Mediator	Time (h)	$M_n$ (Da)	$M_w$ (Da)	Pdi	Ar-OH (%)
ASG	0	2400	4200	1.8	100 ± 1
	1	3600	5700	1.6	66 ± 2
	5	4100	6000	1.5	59 ± 1
	96	5000	7500	1.5	50 ± 1
VLA	0	2400	4200	1.8	100 ± 1
	1	3800	5500	1.4	61 ± 1
	5	3600	5900	1.6	55 ± 1
	96	4600	6800	1.5	50 ± 1
Without mediator	0	2300	4200	1.8	100 ± 3
	0.5	2700	5500	2.0	55 ± 4
	24	3900	5800	1.5	45 ± 1
	96	4500	6600	1.5	44 ± 1
HBT	0	2400	4300	1.8	100 ± 1
	1	3000	5200	1.7	56 ± 2
	5	3200	5400	1.7	49 ± 1
	96	3800	6300	1.6	45 ± 2
ACV	0	2400	4300	1.8	100 ± 1
	1	3500	5200	1.5	55 ± 3
	5	3700	5800	1.5	52 ± 1
	96	4000	6200	1.6	49 ± 1
ABTS	0	2400	4300	1.8	100 ± 1
	1	2900	4400	1.5	51 ± 3
	5	3200	4400	1.4	52 ± 1
	96	3400	4800	1.4	51 ± 1

The effect of mediator on polymerization was compared to standard reaction without mediator. The analysis of these results revealed two groups of mediators. The first group (ASG and VLA) led to a great increase of  $M_w$  and  $M_n$  compared to the standard, while the second group (HBT, ABTS and ACV) led to an  $M_w$  lower or with same magnitude than the standard. The increase of  $M_w$  with ASG and VLA could be attributed to their rapid oxidation and to the stability of the generated radicals. ASG and ACV are phenols leading to phenoxy

radicals in the presence of laccase. The presence of electron donor methoxy substitute at the benzenic ring of ASG and ACV decreases redox potential and then enhances laccase activity. The effect of ASG is more pronounced compared to ACV. This behaviour could be due in one hand to a lower pka value (7.88) for ASG [43] compared to ACV (8.9) [44], and on the other hand to the presence of two methoxy substitutions on ASG. The efficiency of ASG was reported by Camarero et al. [33] and [41] respectively for the decolorization of different types of recalcitrant dyes and paper pulp delignification. The reactivity of VLA is due to the presence of N-OH links which are easily oxidized by laccase to a highly reactive nitroxyl radical ( $>N-O\cdot$ ). Nitroxyl radicals initiate the polymerization reaction [30, 32, 45]. The high reactivity of laccase in presence of VLA was reported by Barreca et al. [40] during wood delignification.

The lower reactivity observed for HBT is due to its higher oxydability, leading to the formation of benzotriazole and other inactive compounds [43].

In the presence of laccase, ABTS is oxidized to  $ABTS^{\cdot+}$  and subsequently to  $ABTS^{2+}$ . The oxidation of non phenolic aromatic groups is occurred only by  $ABTS^{2+}$ [46]. However, the availability of  $ABTS^{2+}$  in the reaction medium is limited by its lower solubility. This fact can explain the lack of reactivity with this mediator. The deficiency of ABTS as mediator was also reported by Baiocco et al. [24] during the oxidation of benzyl alcohols with laccase from *Trametes villosa*.

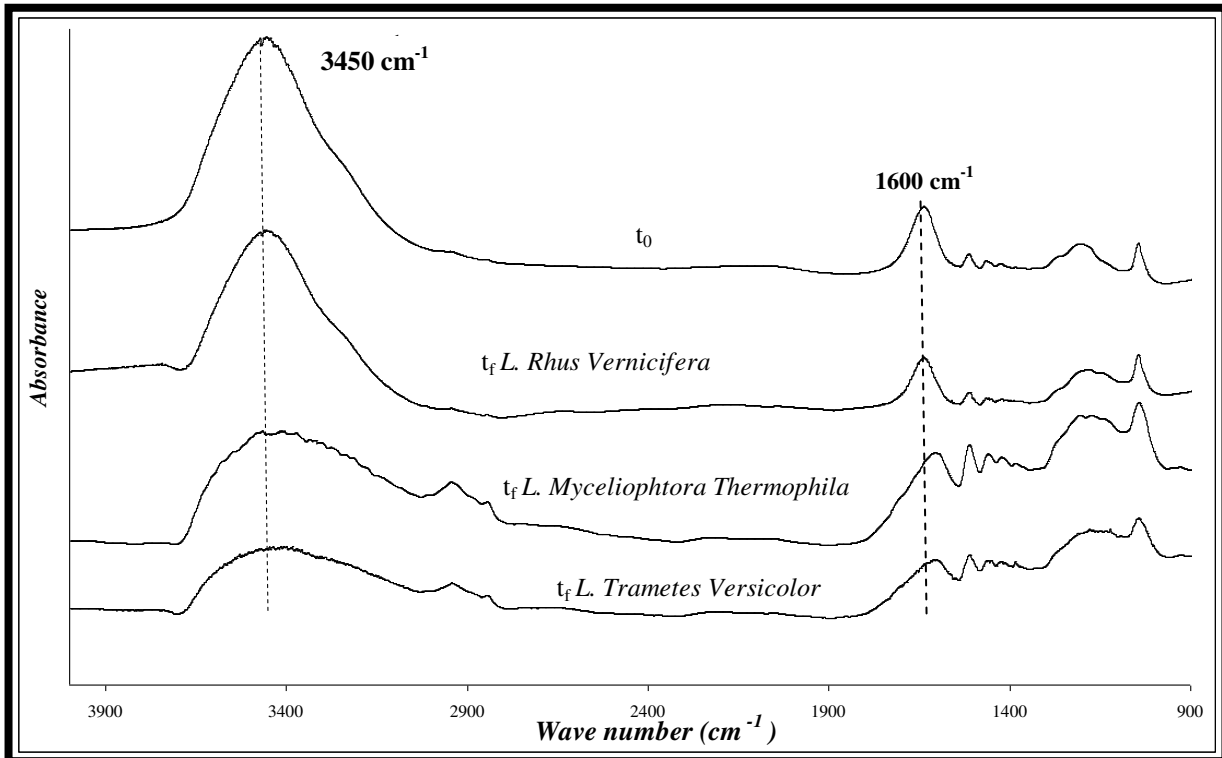
Moreover, the deficiency of ACV could be attributed to the presence of only one methoxy group on the aromatic ring which led to a less stable radical.

For all investigated reactions, Pdi values showed a decrease with time. The magnitude of this decrease is comparable for reactions carried out with or without mediator. Similar trend was observed for phenolic group content.



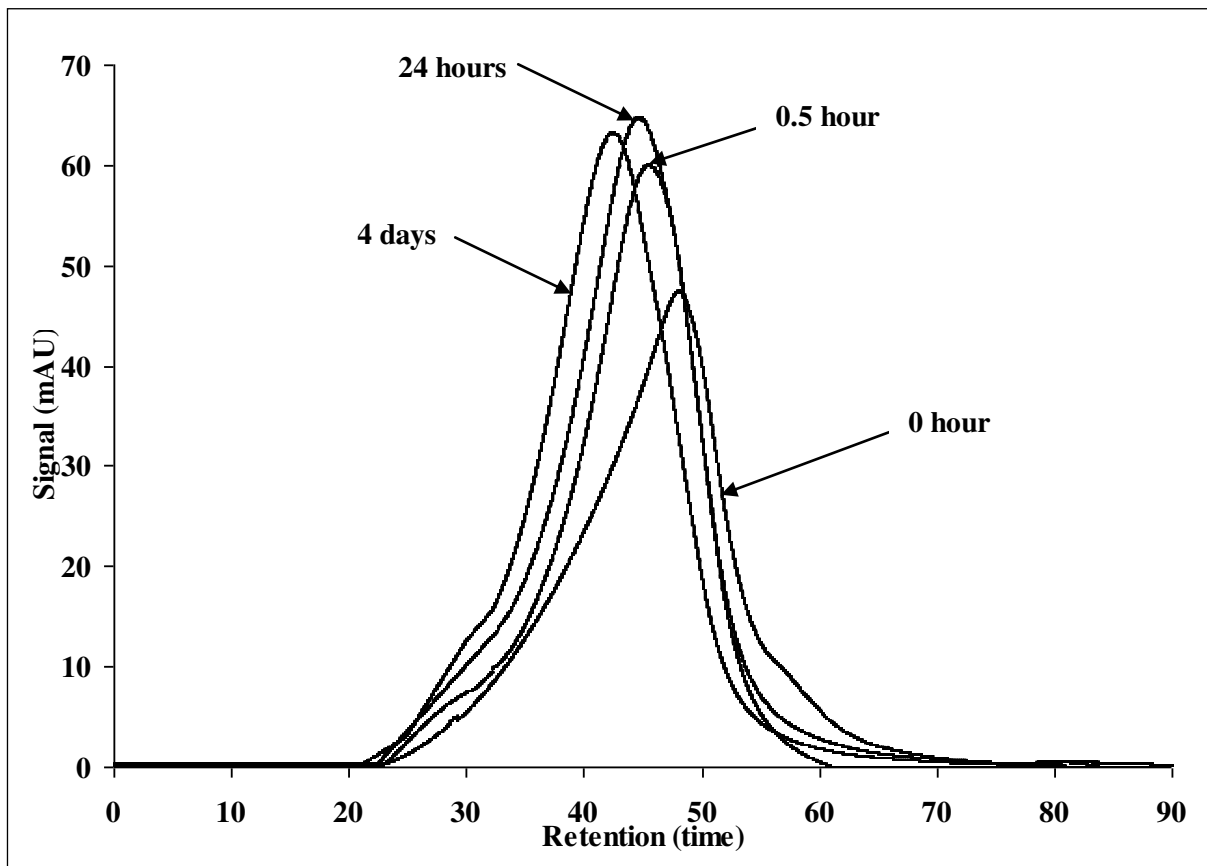
#### 4. Conclusion

The results of this study showed that the polymerization of SLS, using laccase ( $Pd_{\text{finale}} = 1.5$ ) as enzyme, is more efficient than MnIII catalyst ( $Pd_{\text{finale}} = 5.4$ ). Several factors (origin of the laccase, laccase and SLS concentrations, initial molecular weight of SLS and nature of mediator) affect the performance of SLS polymerization. A high commercial SLS (50 g/L) and laccase (30 U/mL) concentrations lead to the formation of polymers with interesting molecular weight (108600 Da). The effect of mediators depends on their ability to form stable radicals and to their rapidity to oxidize the used substrate. In presence of ASG and VLA as mediators and fraction F<sub>1</sub> with an initial weight of 4300 Da, the increase of molecular weight is higher (7500 Da) than reactions realized without mediator (6600 Da).



**Supplementary data 1** FTIR spectra of F<sub>1</sub> oxidized by LTV, LTM and LRV.

\*



**Supplementary data 2** UV detected SEC elution profiles of commercial SLS (1 g/L) by LTV (3 U/mL).

## References

- [1] Gosselink RJA, De Jong E, Guran B, Abächerli A. Co-ordination network for lignin - Standardisation, production and applications adapted to market requirements (EUROLIGNIN) *Ind crop prod* 2004 20:121-9.
- [2] Chang DY, Chan SYN, Zhao RP. The combined admixture of calcium lignosulphonate and sulphonated naphthalene formaldehyde condensates *Constr Build Mater*. 1995; 9:205-9.
- [3] Qiu X, Yan M, Yang D, Pang Y, Deng Y. Effect of straight-chain alcohols on the physicochemical properties of calcium lignosulfonate. *J Colloid Interface Sci*. 2009;338:151-5.
- [4] Degtyarenko TD, Zavgordinii VA, Vasil'ev VV, Makarov AS. Properties of highly concentrated aqueous suspensions of coal with the addition of lignosulfonate and an alkaline component. *Solid Fuel Chem*. 1988;22:81-5.
- [5] Mansouri NEE, Salvado J. Structural characterization of technical lignins for the production of adhesives: Application to lignosulfonate, kraft, soda-anthraquinone, organosolv and ethanol process lignins *Ind Crop Prod* 2006;24:8-16.
- [6] Chu FQ, Hong JG. Study on preparation of modified Lignosulfonate/acrylate copolymerization emulsion. *Linchan Huaxue Yu Gongye/Chem Ind For Prod*. 2006;26:23-6.
- [7] Zhou M, Qiu X, Yang D, Lou H. Properties of different molecular weight sodium lignosulfonate fractions as dispersant of coal-water slurry. *J Disper Sci Technol*. 2006;27:851-6.
- [8] Yang D, Qiu X, Zhou M, Lou H. Properties of sodium lignosulfonate as dispersant of coal water slurry. *Energy Convers Manage*. 2007;48:2433-8.
- [9] Gundersen SA, Sjöblom J. High- and low-molecular-weight lignosulfonates and Kraft lignins as oil/water-emulsion stabilizers studied by means of electrical conductivity. *Colloid and Polymer Science*. 1999;277:462-8.
- [10] Ouyang X, Qiu X, Chen P. Physicochemical characterization of calcium lignosulfonate-A potentially useful water reducer. *Colloids Surf A*. 2006;282-283:489-97.
- [11] Yang D, Qiu X, Pang Y, Zhou M. Physicochemical properties of calcium lignosulfonate with different molecular weights as dispersant in aqueous suspension *J Disper Sci Technol* 2008;29:1296-303.
- [12] Wang R, Chen CL, Gratzl JS. Ozonation of pine kraft lignin in alkaline solution. Part 1: Ozonation, characterization of kraft lignin and its ozonated preparations. *Holzforschung*. 2004;58:622-30.
- [13] Onnerud H, Zhang L, Gellerstedt G, Henriksson G. Polymerization of monolignols by redox shuttle-mediated enzymatic oxidation: A new model in lignin biosynthesis I. *Plant Cell*. 2002;14:1953-62.
- [14] Holocher-Ertl M, Kratzl K. Model experiments on oxygen bleaching of pulp. 4. Oxidative degradation of lignin: degradation of creosol (2-methoxy-4-methylphenol) with oxygen, hydrogen peroxide and ozone. *Holzforschung*. 1982;36:11-6.
- [15] Mbachu RAD, Manley RSJ. Degradation of lignin by ozone - 1. The kinetics of lignin degradation of ozone *J polymer sci*. 1981;19(8):2053-63.
- [16] Areskog D, Li J, Gellerstedt G, Henriksson G. Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. *Biomacromolecules*. 2010;11(4):904-10.
- [17] Azevedo AM, Martins VC, Prazeres DMF, Vojinovic V, Cabral JMS, Fonseca LP. Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review* 2003:199-247.

- [18] Leontievsky A, Myasoedova N, Pozdnyakova N, Golovleva L. 'Yellow' laccase of *Panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators. *FEBS Letters*. 1997;413:446-8.
- [19] Leonowicz A, Szklarz G, Wojtas-Wasilewska M. The effect of fungal laccase on fractionated lignosulphonates (peritan Na). *Phytochem*. 1985;24:393-6.
- [20] Kim S, Silva C, Zille A, Lopez C, Evtuguin DV, Cavaco-Paulo A. Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polymer International*. 2009;58:863-8.
- [21] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 2006;24:219-26.
- [22] Galli C, Gentili P. Chemical messengers: Mediated oxidations with the enzyme laccase. *J Physic Organic Chem*. 2004;17:973-7.
- [23] Leonowicz A, Cho N, Luterek J, Wilkolazka A, Wojtas-Wasilewska M, Matuszewska A, et al. Fungal laccase: Properties and activity on lignin. *J Basic Microb*. 2001;41:185-227.
- [24] Baiocco P, Barreca AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Promoting laccase activity towards non-phenolic substrates: A mechanistic investigation with some laccase-mediator systems. *Org Biomol Chem*. 2003;1:191-7.
- [25] Ibarra D, Camarero S, Romero J, Martinez MJ, Martinez AT. Integrating laccase - Mediator treatment into an industrial-type sequence for totally chlorine-free bleaching of eucalypt kraft pulp. *J ChemTechnol Biotechnol*. 2006;81:1159-65.
- [26] Nugroho Prasetyo E, Kudanga T, Ostergaard L, Rencoret J, Gutierrez A, del Rio JC, et al. Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. *Bioresource Technol*. 2010;101:5054-62.
- [27] Kurniawati S, Nicell JA. Efficacy of mediators for enhancing the laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Enzyme Microbial Technol*. 2007;41:353-61.
- [28] Bourbonnais R, Paice MG. Oxidation of non-phenolic substrates. An expended role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS Letters*. 1990;267:99-102.
- [29] Paice MG, Archibald FS, Bourbonnais R, Jurasek L, Reid ID, Charles T, et al. *Enzymology of Kraft Pulp Bleaching by Trametes versicolor*. *ACS Symposium Series* 1996:151-64.
- [30] Chakar FS, Ragauskas AJ. Biobleaching chemistry of laccase-mediator systems on high-lignin-content kraft pulps. *Canadian J Chem*. 2004;82:344-52.
- [31] Cho NS, Shin W, Jeong SW, Leonowicz A. Degradation of lignosulfonate by fungal laccase with low molecular mediators. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 2004;25:1551-4.
- [32] Knutson K, Ragauskas A. Laccase-mediator biobleaching applied to a direct yellow dyed paper. *Biotechnol Progress*. 2004;20:1893-6.
- [33] Camarero S, Ibarra D, Martinez MJ, Martinez ET. Lignin-derived compounds as efficient laccase mediators for decolorization of different types of recalcitrant dyes. *Applied Environ Microbiol*. 2005;71:1775-84.
- [34] Madad N, Chebil L, Sanchez C, Charbonnel C, Ghouil M. Effect of molecular weight distribution on chemical, structural and physicochemical properties of sodium lignosulfonates *Rasyan J chem*. 2011;4:182-222.
- [35] Areskog D, Li J, Nousiainen P, Gellerstedt G, Sipila J, Henriksson G. Oxidative polymerisation of models for phenolic lignin end-groups by laccase. *Holzforschung*. 2010;64:21-34.
- [36] Wan Y, Lu R, Akiyama K, Miyakoshi T, Du Y. Enzymatic synthesis of bioactive compounds by *Rhus* laccase from Chinese *Rhus vernicifera*. *Sci China, Ser B*. 2007;50:179-82.

- [37] Dwivedi UN, Singh P, Pandey VP, Kumar A. Structure-function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J Mol Catal B Enzym.* 2011;68:117-28.
- [38] Crestini C, Argyropoulos DS. On the role of 1-hydroxybenzotriazole as mediator in laccase oxidation of residual kraft lignin. *ACS Symposium Series* 2001:373-90.
- [39] Shleev S, Persson P, Shumakovich G, Mazhugo Y, Yaropolov A, Ruzgas T, et al. Interaction of fungal laccases and laccase-mediator systems with lignin. *Enzyme Microbial Technol.* 2006;39:841-7.
- [40] Barreca AM, Fabbrini M, Galli C, Gentili P, Ljunggren S. Laccase/mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *J Mol Catal B Enzym.* 2003;26:105-10.
- [41] Camarero S, Ibarra D, Martinez AT, Romero J, Gutierrez A, del Rio JC. Paper pulp delignification using laccase and natural mediators *Enzyme Microb Technol.* 2007;40:1264-71.
- [42] Cañas AI, Camarero S. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnol Adv.* 2010;28:694-705.
- [43] Ragnar M, Lindgren CT, Nilvebrant NO. pKa values of guaiacyl and syringyl phenols related to lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology.* 2000;20:277-305.
- [44] Hansch C, Leo A. In: *Substituent constants for correlation analysis in chemistry and biology.* New York 1979.
- [45] Fabbrini M, Galli C, Gentili P. Radical or electron-transfer mechanism of oxidation with some laccase/mediator systems. *J MolCatal B Enzym.* 2002;18:169-71.
- [46] Bourbonnais R, Leech D, Paice MG. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. *Biochim Biophys Acta* 1998;1379:381-90.

### **Contribution de l'article**

Dans cet article, les effets de la nature du catalyseur, de la masse moléculaire initiale des lignosulfonates, de la concentration en substrat et en enzyme, de l'origine de la laccase et de la nature du médiateur sur la polymérisation des lignosulfonates ont été étudiés.

En premier lieu, afin de comparer les performances de la polymérisation chimique et enzymatique, une fraction de lignosulfonates ( $F_1$ ) a été traitée par la laccase de *Trametes versicolor* et par le manganèse III. Les résultats montrent que l'utilisation du manganèse III comme catalyseur, permet une plus grande augmentation de la masse moléculaire en poids que celle obtenue par la réaction de polymérisation menée en présence de la laccase. Cependant, les polymères obtenus en utilisant le manganèse III ont une polydispersité plus grande que celle du produit initiale et celle obtenue en utilisation la laccase comme catalyseur. Ces résultats confirment que la voie enzymatique permet d'obtenir une distribution moins hétérogène de lignosulfonates que la voie chimique.

Par la suite, les facteurs clés de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates par la laccase ont été étudiés, les réactions de polymérisation ont été effectuées soit en présence de la laccase seule ou en présence d'un système laccase-médiateur.

Des fractions de lignosulfonates avec différents poids moléculaires initiaux et à différentes concentrations, ont été utilisées comme substrats pour les réactions catalysées par la laccase sans médiateur. Les résultats obtenus pour ces réactions montrent que les masses moléculaires augmentent tout au long de la réaction. Cependant, la concentration en groupements hydroxyles phénoliques est plus au moins stable après 30 minutes de réaction. Ceci peut être expliqué par la formation de liaisons C-C qui régénère les hydroxyles phénoliques. Ce qui justifie l'augmentation significative du poids moléculaire malgré la stabilisation de la concentration en hydroxyles phénoliques. Les analyses FTIR montrent clairement une diminution des vibrations des groupements hydroxyles (entre  $3400\text{ cm}^{-1}$  et  $3450\text{ cm}^{-1}$ ) et des squelettes aromatiques ( $1600\text{ cm}^{-1}$ ). Cette diminution pourrait être expliquée par la formation de liaisons entre les unités aromatiques des lignosulfonates. De même, on a observé que l'activité de la laccase dépend de sa source, de sa structure primaire, de son potentiel redox et de sa concentration dans le milieu réactionnel. Ainsi, l'absence de polymérisation par la laccase de *Rhus vernicifera* (LRV) contrairement à la laccase de *Trametes versicolor* (LTV) et de laccase de *Myceliophthora thermophila* (LMT) a été attribuée à son origine végétale ; alors que LTV et LMT sont les laccases fongiques. Puisque

les laccases fongiques ont une cavité du site catalytique plus large que des laccases d'origine végétales. Par ailleurs, LTV (0,8 mV) et LMT (0,46 mV) ont un potentiel redox plus élevé que LRV (0,41 mV). La structure, la composition chimique, la concentration et la pureté de lignosulfonates initiaux jouent aussi des rôles majeurs sur le déroulement de la réaction et ses performances.

Les résultats obtenus pour les réactions de polymérisation des lignosulfonates par la laccase de *Trametes versicolor* en présence de médiateur ont montré que l'utilisation de l'acétosyringone (ASG) et de l'acide violurique (VLA) comme médiateur, permet une plus grande augmentation du poids moléculaire que la réaction catalysée avec LTV seule. Ce qui mène à conclure que les médiateurs sont importants pour augmenter le taux de conversion des lignosulfonates et que l'utilisation de médiateurs naturels respectueux de l'environnement (ASG) représente des solutions de rechange à des médiateurs synthétiques (l'acide 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonique) diammonium (ABTS), 1-Hydroxybenzotriazole (HBT) et VLA).



## *CHAPITRE III.4*

### *EFFET DU MODE DE CONDUITE DE LA POLYMÉRISATION DES LIGNOSULFONATES*



## **Chapitre III.4**

# **EFFET DU MODE DE CONDUITE DE LA POLYMÉRISATION DES LIGNOSULFONATES**

---

### **Introduction**

Dans le chapitre précédent, l'intérêt a été focalisé sur la faisabilité de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates avec ou sans médiateurs et la détermination de l'effet de plusieurs facteurs clefs tels que les concentrations en substrat et en enzyme, la nature de l'enzyme et l'utilisation ou non d'un médiateur sur la réaction étudiée. Cependant, ces réactions aussi bien dans ce travail que dans la majorité des études décrites dans la littérature, ont été réalisées en réacteur discontinu. De même, peu de travaux ont fourni des informations sur l'évolution de l'oxygène dissous dans le milieu, bien qu'il soit considéré comme étant un élément important dans l'initiation de la réaction de polymérisation par les laccases.

Durant le déroulement de la réaction de polymérisation, en réacteur discontinu, nous avons observé que les hydroxyles phénoliques des lignosulfonates ne sont pas totalement oxydés par la laccase. Plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer ce comportement notamment la capacité de la laccase à oxyder que les hydroxyles phénoliques présents sur la surface de la molécule, l'éventuelle inactivation de l'enzyme par les polymères formés, son inhibition par les lignosulfonates, la régénération des hydroxyles phénoliques par les liaisons formées ou également une limitation due au déficit d'oxygène dissous dans le milieu réactionnel. Pour essayer d'apporter des réponses à ces interrogations, nous avons comparé différentes mises en œuvre de cette réaction en mode continu, discontinu et semi continu et nous avons également suivi l'évolution de l'oxygène dissous dans le milieu.

Les réactions de polymérisation ont été menées dans un bioréacteur muni de sondes pH, température et oxygène dissous. Dans toutes les réactions et mode de mise en œuvre, le substrat utilisé sont les lignosulfonates commerciaux dont le poids moléculaire moyen ( $M_w$ ) est de 17800 Da et comme catalyseur la laccase de *Trametes versicolor* à une température de 20°C et à un pH 4,5.

L'oxydation a été suivie en mesurant la consommation de l'oxygène dissous, l'augmentation du poids moléculaire, la diminution de la polydispersité et la consommation des groupements hydroxyles phénoliques.

Les réactions menées en discontinu ont été réalisées avec différents ratios substrat/enzyme afin de déterminer l'effet des concentrations initiales sur le profil de consommation de l'oxygène dissous et la distribution du poids moléculaire.

Les réactions en semi continu ont été menées selon trois variantes : ajout du substrat seul, enzyme seule ou substrat et enzyme simultanément.

La réaction en continu a été réalisée avec un temps de séjour égal aux autres réacteurs et nous avons procédé par ajout de l'enzyme et du substrat en continu avec un débit de soutirage égal au débit d'alimentation.

**Les résultats de cette partie font l'objet d'un projet de publication intitulée 'Comparison of the performance of the laccase polymerisation of lignosulfonates in batch, continuous and fed batch reactors'.**

## **Article**

### **Comparison of the performance of the laccase polymerisation of lignosulfonates in batch, continuous and fed batch reactors**

Nidal Madad<sup>a</sup>, Latifa Chebil<sup>a</sup>, Celine Charbonnel<sup>a</sup> and Mohamed Ghoui<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules, ENSAIA-INPL, Vandœuvre-lès-Nancy, France

\*Author for correspondence E-mail: [mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr](mailto:mohamed.ghoul@ensaia.inpl-nancy.fr)

#### **Abstract**

The polymerization by laccase from *Trametes versicolor* of Sodium lignosulfonates (SLS) with a weight average initial molecular weight ( $M_w$ ) equal to 17800 Da and polydispersity (6.2) was investigated under batch, continuous and fed batch processes. In batch mode, the ratio of the enzyme/substrate was varied. While in fed batch mode, the reactor was fed either with substrate or with enzyme or with substrate and enzyme together. For continuous polymerisation both SLS and laccase were added simultaneously. The degree of the oxidation was monitored by the determination of the hydroxyl phenolic groups consumption, the average of molecular weight and the polydispersity evolutions. The oxygen uptake rate was also evaluated. The obtained results showed that for batch, high initial concentration of SLS (10 g/l) leads to the highest average of  $M_w$  (31400 Da) and oxygen consumption. For fed batch, the feeding by the enzyme led to the highest average  $M_w$  (29400 Da) compared to the two other operating conditions. The comparison of the results of the three processes indicated that batch and continuous modes lead to the highest increase of  $M_w$  (31400 Da and 30600 Da). However, continuous feeding of reactor allowed reaching the lowest polydispersity values of synthesized polymers (3.7). Thus, this mode of the conduction of the reaction is more adapted to obtain homogenous products. The evolution of the oxygen consumption revealed that for high concentrations of enzyme and substrate this factor could become a limiting step whatever the system used for the realisation of the reaction.

**Keywords:** Sodium lignosulfonates, polymerization, Oxygen consumption, reactor, laccase.

## 1. Introduction

Wood and food processes generate important quantities of by-products such as lignin, lignosulfonates and free phenols [1]. These compounds are natural molecules and renewable resources, but they constitute an important source of pollution. However they can undergo several transformations (hydrolysis, polymerization and fractionation) to provide fractions with interesting properties as antioxidants, dispersing agent and plasticizer [2-6]. The recovery and valorisation of these by-products are mainly carried out by chemical or physical processes such as thermal decomposition [7], liquid [8] or membrane fractionation [9-11]. The chemical way is often not environmentally friendly and may be expensive. To overcome some drawbacks of the above mentioned processes, last year's enzymes hydrolysis or polymerization of these raw materials is presented as a promising way [12]. In fact, the enzymatic processes can be conducted under mild reaction conditions and without using toxic reagents. Moreover, in some cases, they lead to a more controlled structures of obtained products and thus with a better properties [12-17].

The use of enzymes is firstly applied to the delignification and the removal of free phenols from wastewaters [18-22]. Recently, the aptitude of some oxidoreductases and laccase to polymerize phenols have received a great attention and applied with success in the field of wood by-products [23-26].

Depending on the enzyme nature, enzymatic polymerization of phenols requires either oxygen or oxygen peroxide. The availability and the concentration of these substrates are essential to these reactions. Ghosh et al. [27] studied the effect of dissolved oxygen concentration on laccase efficiency during the removal of 2,4-dimethylphenol. These authors experimented several techniques such as dissolution by stirring or bubbling or a high initial saturation of the medium by oxygen. Their results showed, whatever the used technique, as long as dissolved oxygen inside the reactor remains high, initial rates of reactions were similar and high compared to a reaction control with a low concentration of oxygen.

The main investigations in the domain of the enzymatic polymerization were carried out in batch mode [27-29]. However, in this mode, the degree of polydispersity remains high and hydroxyl phenolic groups often are only partially oxidized. This behavior, according to Areskog et al. [30] would be due to the aptitude of the lignosulfonates to form a spherical microgel makes inaccessible the phenolic groups buried in the core of the gel. It could also be allotted to the inhibition of laccase by formed polymers [31]. Another explanation is that the reaction of polymerization by laccase is done according to two ways leading either to C-O-C or to C-C linkages. The last way generates phenolic groups by ionic tautomerisation [32]. The

concentration of the lignosulfonates also seems to influence the conversion rate of the phenolic groups, the polydispersity and the average molecular weight of formed polymers. High  $M_w$  were reached with high lignosulfonates concentrations [30].

Fed batch and continuous modes are used in chemical polymerisation to control the average  $M_w$  evolution and the polydispersity and could also overcome some drawbacks of batch reactions; because fed batch allows controlling the concentration of the enzyme and the substrate in the medium while the continuous system avoids the accumulation of the formed polymers in the medium. In spite of the potential of those two modes of reaction few data are available on their performance in the field of laccase polymerisation of phenols. Wu et al. [33] compared phenols removal efficiency by horseradish peroxidase in batch, continuous stirred tank, fed batch and a plug flow reactors. They reported that the plug flow reactor was the more adapted for this reaction. Areskog et al. [30] compared also the effect of a successive addition of laccase during the lignosulfonates (SLS) polymerization. They observed only minor differences in the average molecular weight increase and it is dependent to the amount of the enzyme added.

The aim of this paper is to compare the efficiency of lignosulfonates polymerisation by laccase in terms of phenolic groups consumption, average molecular weight and degree of polydispersity evolution under three modes of reaction conduction: batch with different ratio enzyme/substrate, continuous addition of laccase and lignosulfonates and three alternatives of fed batch feeding. The oxygen consumption is also monitored.

## 2. Materials and methods

### 2.1 Materials

#### 2.1.1 Substrate

Sodium lignosulfonates (SLS) from (Aldrich, Sweden): 90 wt. % of SLS, 4 wt. % of reducing sugars and 6 wt% of total impurities. The average molecular weight ( $M_w$ ), the number molecular weight ( $M_n$ ) and the polydispersity (Pdi) values are equal to 17800 Da  $\pm$  1500, 2900 Da  $\pm$  400, and  $6.2 \pm 0.3$ , respectively.

#### 2.1.2 Laccase

Laccase from *Trametes versicolor* (21.4 U/mg) was purchased from Fluka (Sweden).

### 2.2 Methods

#### 2.2.1 Batch operation

Batch operations were performed in a bioreactor with a working volume of 1L equipped with dissolved oxygen, pH and temperature sensors. Reactor was stirred vigorously at 500 rpm to solubilise SLS at 20°C and throughout the reactions. The lignosulfonates was solubilised in phosphate buffer solution at pH 4.5 and laccase was added to initiate reactions. For the analyses, samples were drawn out from the reactor at different interval of time and laccase activity was stopped by heating at 90°C during five minutes.

#### 2.2.2 Fed batch operation

Fed batch operations were the same as batch operations while enzyme alone, substrate alone or both were added progressively at different time intervals (every 30 minutes during the first 5 hours). The total amounts of enzyme and substrate for the three fed batch operations were 10g/L and 30 U/mL of SLS and laccase, respectively. Samples were taken at different time intervals and enzyme activity was stopped by heating to 90°C during five minutes.

#### 2.2.3 Continuous stirred tank reactor operation

The continuous stirred tank reactor was similar to the one used in batch step. SLS (32 g/L) and laccase (63 U/mL) were prepared into two flasks separately and 500 mL of each solution were added progressively with at the constant flow-rate into the reactor initially filled with buffered solution (1 L). The reactor was aerated and stirred vigorously at 500 rpm. Samples were taken at different time intervals and the enzyme activity was stopped by heating to 90°C during five minutes.

#### 2.2.4 Size exclusion chromatography analysis (SEC)

Samples were analysed by Size exclusion chromatography (SEC) (HPLC LaChrom Merck, Germany). The system consists of a pump L-2130, an autosampler L-2200, and a Superdex 200HR 10/30 column (24 mL, 13  $\mu$ m, dextran/cross linked agarose matrix). Detection was



performed using UV detector diode L-2455 at 280 nm. Before analysis, the samples were filtered using regenerated cellulose membrane (0.22  $\mu\text{m}$ ) and aliquots of 50  $\mu\text{l}$  were injected into the SEC system. A Buffer Phosphate pH 7, 0.15 M NaCl solution was used as an eluent. The flow rate was 0.4 mL at 25°C and the pressure is maintained to 11 bars. The calibration was performed by using polystyrenes sulfonate (PSS) as standard to define molecular weight distribution.

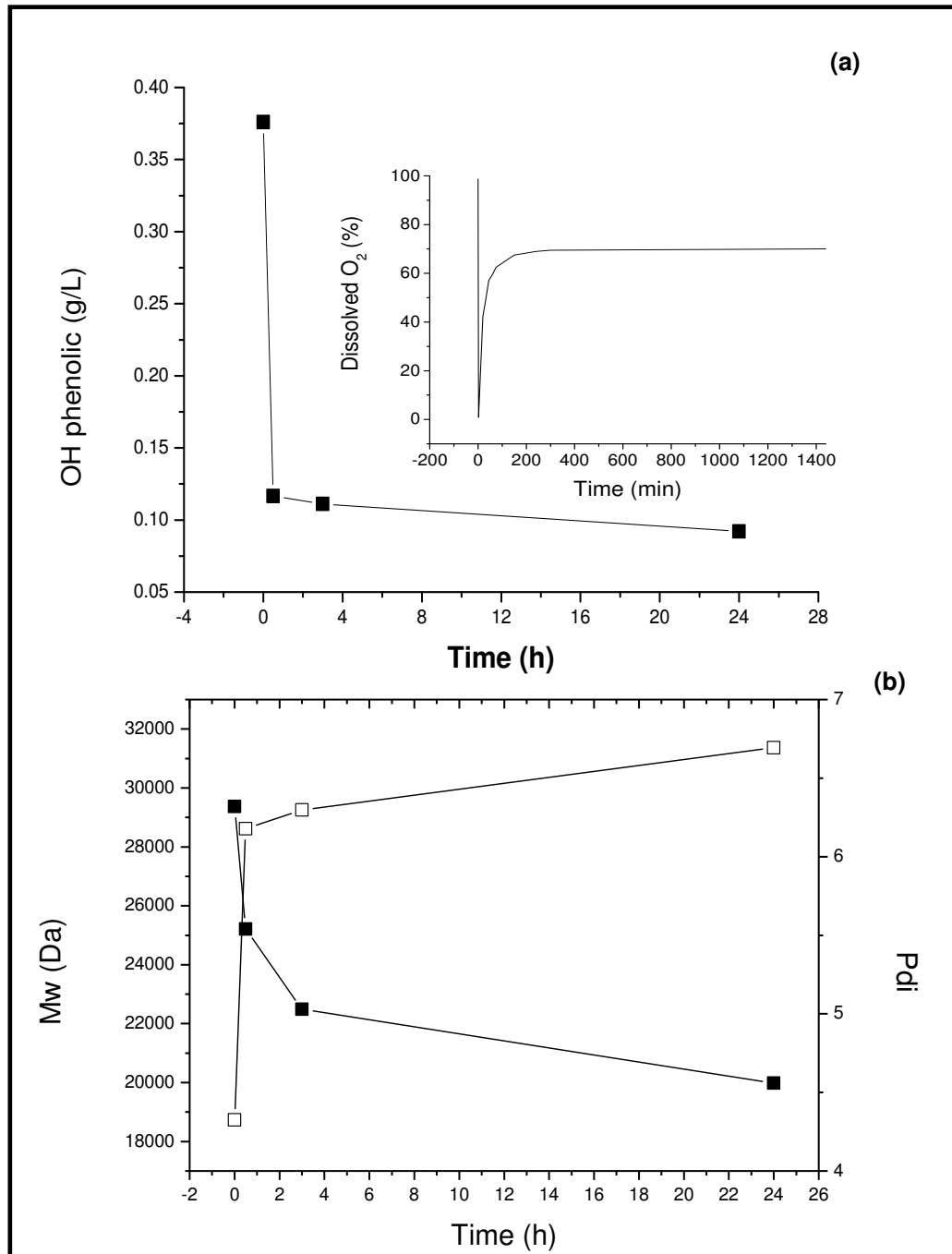
### 2.2.5 Determination of Phenolic Content

Phenolic content was determined using the method described by Areskogh et al. [30].

## 3. Results and discussion

### 3.1 Kinetic study of enzymatic polymerization in batch mode

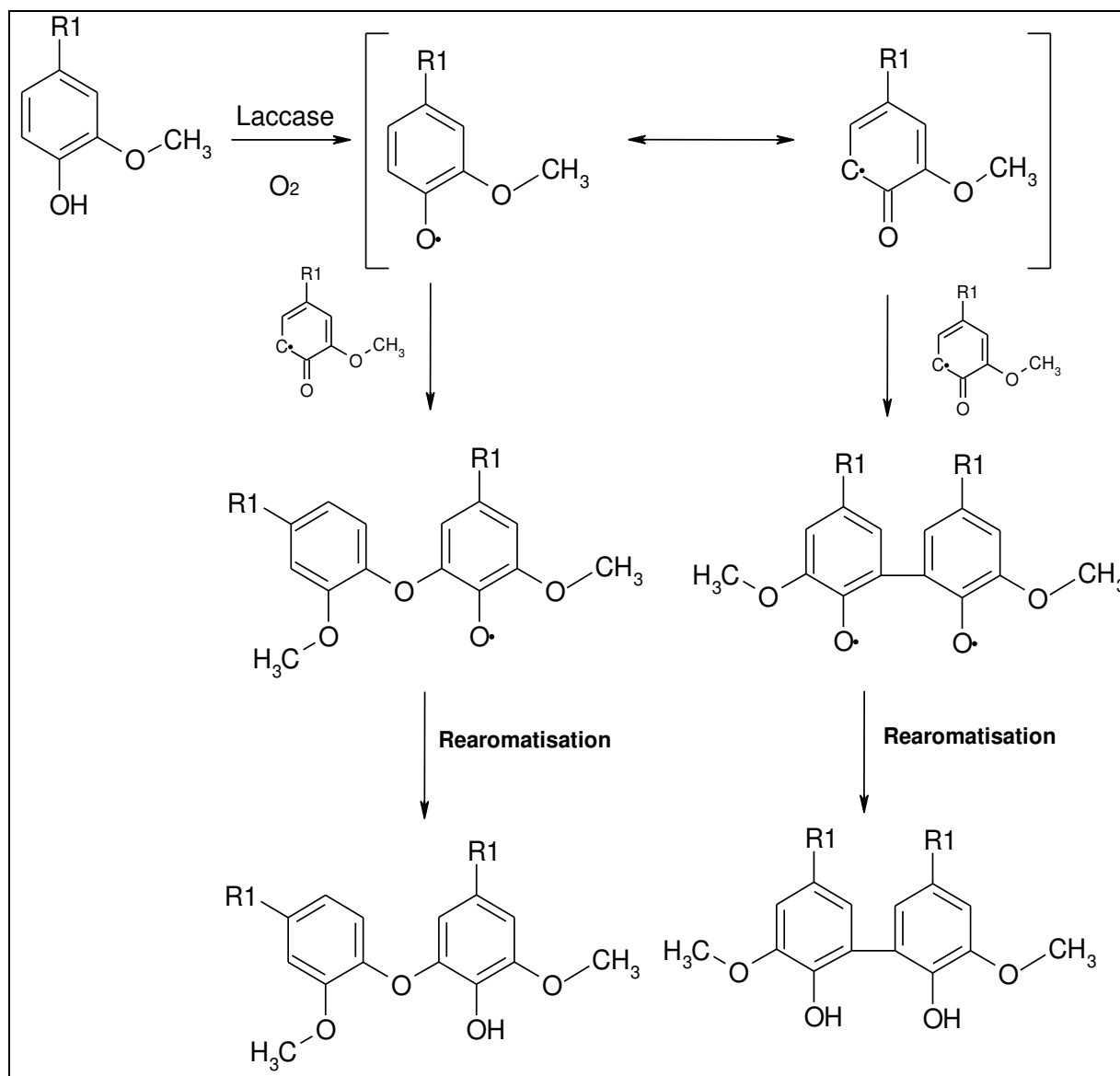
The performance of the reaction of polymerization of lignosulfonates by laccase can be affected by the ratio of SLS/laccase. To verify this assumption, the reaction of polymerization was carried out with different ratios SLS/laccase; (1g/L) / (3U/mL), (1g/L)/ (30U/mL), (10 g/L)/ (3U/mL) and (10g/L)/ (30U/mL); in stirred and aerated reactor. For the different assays the average  $M_w$ , Pdi, phenol groups, and oxygen consumption were determined along the reaction. The results obtained with the four studied ratios, indicated similar profiles for the consumption of hydroxyl phenolic groups and oxygen. As an illustration, figure 1 represents the variation of the average  $M_w$ , Pdi, hydroxyl phenolic groups and oxygen evolution for the reaction with a ratio SLS/laccase equals to (10g/L) / (30U/mL). It appears that this reaction is constituted by a two distinct steps. The first one is characterized by a rapid decrease of hydroxyl phenolic groups amount, dissolved oxygen, and Pdi value and an important increase of the average of  $M_w$ . The second one shows an increase of the dissolution of the oxygen to reach a plateau near the saturation of the medium, a progressive deceleration in the decrease of Pdi and in the increase of the average  $M_w$  and a stabilisation of hydroxyl phenolic groups content around 0.1 g/L. These profiles could be explained by the fact that the first step consists of the initiation and the propagation of the enzymatic polymerization. The rapid consumption of the oxygen ensures the formation of the SLS phenoxy radicals via laccase reduction. So, the role of the oxygen is major and can become a limiting step. The rapid decrease of dissolved oxygen were already reported by Ghosh et al. [27] during the 2,4-dimethylphenol polymerization by laccase. The second step is rather a combination stage where the need for oxygen is negligible.



**Figure 1** OH phenolic residual (a), dissolved O<sub>2</sub> (a), M<sub>w</sub> (b) and Pdi (b) variations in batchwise operation of reaction carried out with 10 g/L and 30 U/mL of SLS and laccase over time.

(■) Pdi and (□) M<sub>w</sub>.

The observed increase of the dissolved oxygen while  $M_w$  is still growing confirms these assumption. After 24 h of reaction the hydroxyl phenolic groups are not totally oxidized; this is an expected results due to the fact that when the reaction of polymerisation is finished, the final obtained structure of polymers still contains hydroxyl groups (schema 1) [32].



**Schema 1** Proposed reaction mechanism for the formation of C-O-C and C-C bonds when a lignosulfonates model is oxidized by laccase. (R1) lignin fragment.

**Table 1** reports the conversion rate of hydroxyl phenolic groups and the final  $M_w$  and Pdi values of batch reactions.

These results showed also that regardless of the enzyme concentration, either 3 or 30 U/mL, the highest conversion rate of phenolic groups (73 % and 75 %) is observed at the highest SLS concentration (10g/L). For a given concentration of liginosulfonates, the enzyme concentration weakly affects the conversion rate; this means that a concentration of 3 U/mL of laccase is sufficient to polymerize the concentrations of the liginosulfonates tested in this work. It also appears that whatever the concentration of the enzyme is, the average of  $M_w$  is significantly improved at high concentrations of liginosulfonates (10 g/L). It increases from 17800 Da to 30600 Da and 31400 Da successively for 3 U/mL and 30 U/mL of laccase. Pdi values decrease approximately to a value of 4 independently to the enzyme and liginosulfonates concentrations. The high conversion yield of phenolic groups obtained at 10 g/L of liginosulfonates suggests that the consumption of phenolic groups and  $M_w$  values is higher when the phenoxy radicals generated are higher. This may be due to the fact that the probability to establish a contact between two phenoxy radicals is increased when their concentration in the medium is high and the C-O-C coupling is also favoured. So, this reaction is under a “kinetic control”. The low  $M_w$  (26400 Da) observed with 1 g/L suggests that in the presence of a diluted solution and acid pH (4.5), the reaction undergo a “thermodynamic control” which promotes C-C linkages.

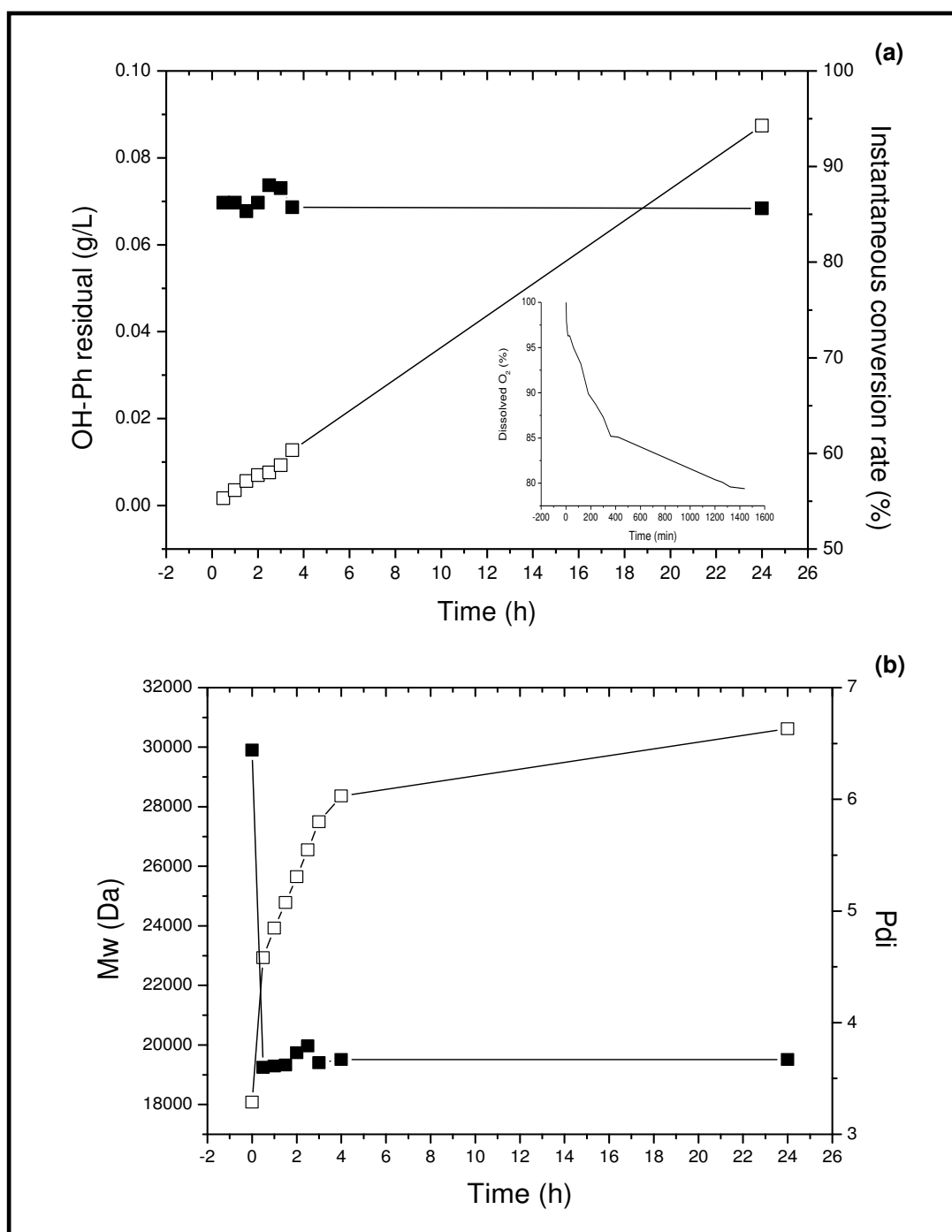
**Table 1** Conversion rate, Final  $M_w$  and final Pdi of reactions carried out in batchwise operation. (S) Substrate; (E) Enzyme

Reaction	Conversion Rate (%)	Final $M_w$	Final Pdi
1 g/L of S and 3 U/mL of E	47 %	25700	4.6
1 g/L of S and 30 U/mL of E	52 %	26400	4.1
10 g/L of S and 3 U/mL of E	73 %	30600	4.4
10 g/L of S and 30 U/mL of E	75 %	31400	4.6

### **3.2 Kinetic study of enzymatic polymerization in continuous reactor**

The operating conditions for the continuous feeding of the enzyme and lignosulfonates were chosen to add 16 g/L and 32 U/mL of lignosulfonates and laccase successively and to have the same residence time (24 h) as the one used in the batch mode.

The obtained results are summarized in **figure 2 a and 2 b**.



**Figure 2** OH phenolic residual (a), dissolved O<sub>2</sub> (a), instantaneous conversion rate (a), M<sub>w</sub> (b) and Pdi (b) variations in continuous operation over time.

(a) (■) Instantaneous conversion rate (□) OH-Ph residual

(b) (■) Pdi and (□) M<sub>w</sub>

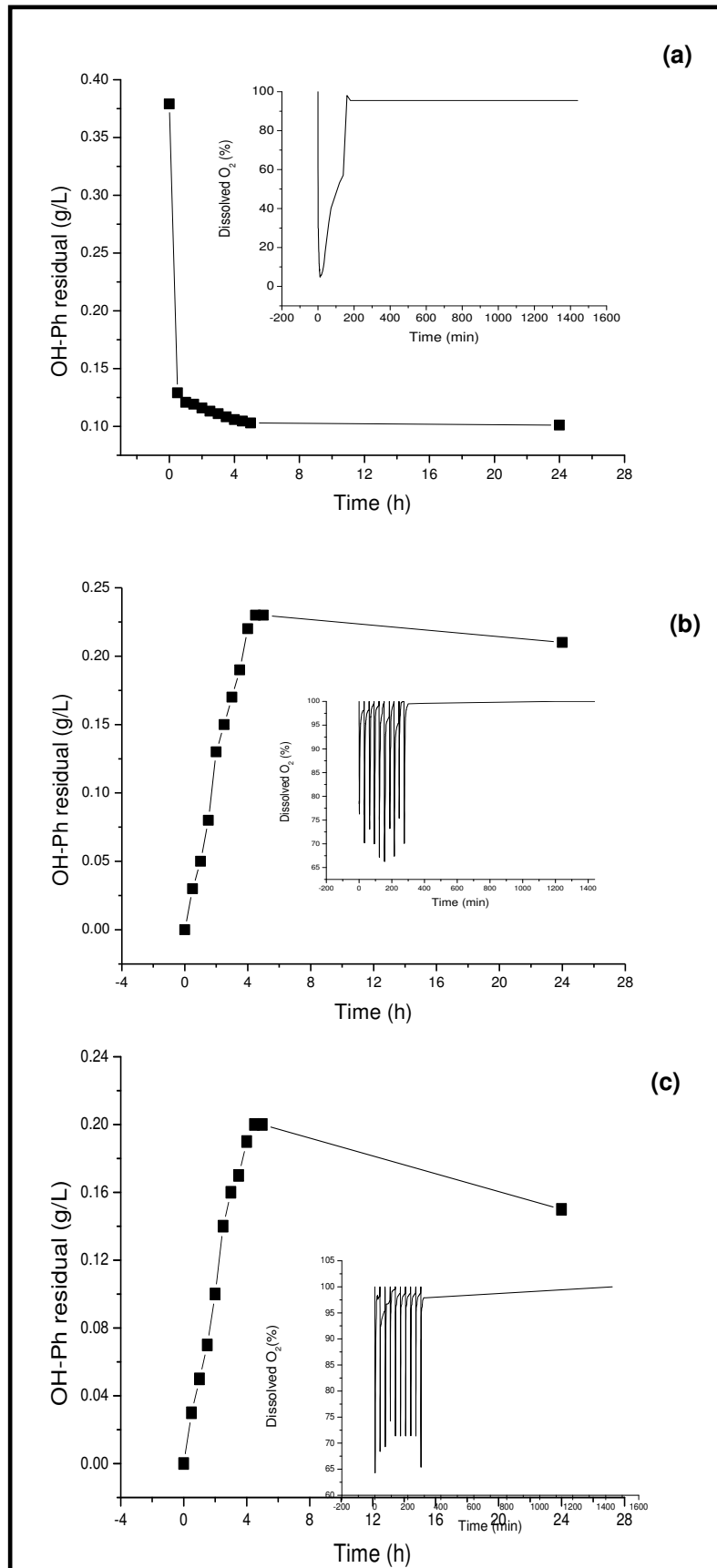
It appears that the phenolic groups increases slightly in the medium to reach the same level that was observed at the end of the batch reaction (~0.1 g/L) ; while the conversion rate of

phenolic groups remains constant near 85 % along the time duration of the reaction. The average molecular weight ( $M_w$ ) of formed polymers increases gradually until 28400 Da during the first four hours and then, as in batch mode, this increase becomes less pronounced. The Pdi values decrease quickly to reach a low value (3.7) and remain more or less constant along the time incubation (figure 2b). The dissolved oxygen (figure 2a) decreases also with time due to its continuous consumption by added laccase.

Although 16 g/L of SLS were added during the 24h of the reaction, the final average of  $M_w$  is of the same order of magnitude as the batch with 10 g/L of SLS. These results indicate that the increase of the average  $M_w$  is rather favoured by the conditions allowing a high amount and instantaneous generation of free radicals rather than a progressive feeding of a high quantity of SLS. However, continuous adding of substrate and enzyme allows to reach a low degree of polydispersity (3.7) compared to the batch (4.6). The low residual phenolic groups in the media and their high conversion rate suppose that the continuous mode promotes the C-O-C linkage.

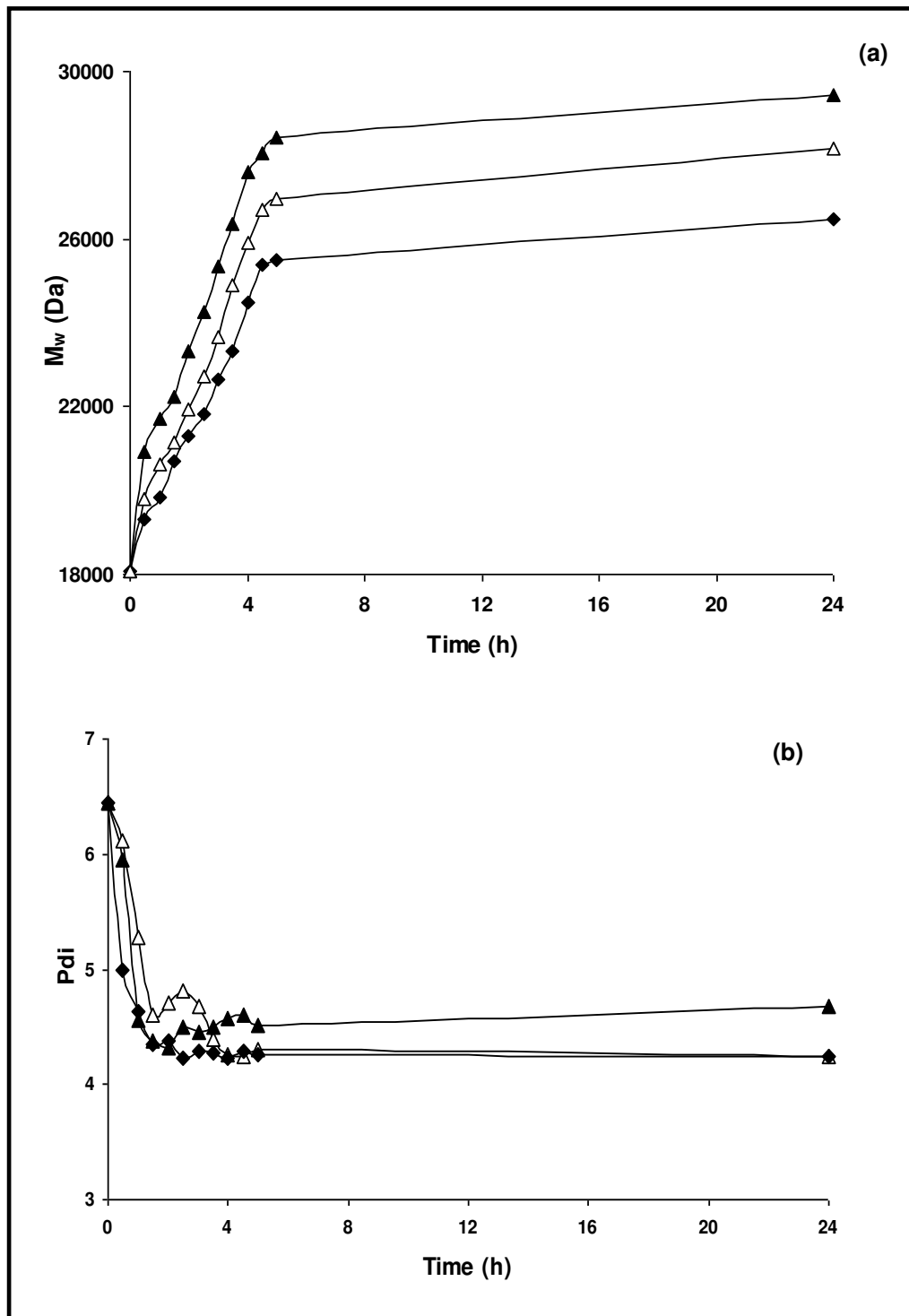
### 3.3 Kinetic study of enzymatic polymerization in fed batch operation

In fed batch mode three alternatives were tested feeding i) with substrate alone, ii) with enzyme iii) or with both enzyme and substrate. For each assay the addition was carried out in stepwise mode in 10 times at a rate of 1g or 3000 U or both of every 30 minutes during the five first hours of the reaction. Results are shown in figure 3, figure 4 and table 2.



**Figure 3** OH phenolic residual and dissolved O<sub>2</sub> variations in semi batch operations over time. (a) Adding enzyme; (b) Adding substrate; (c) Adding both enzyme and substrate.





**Figure 4**  $M_w$  (a) and Pdi (b) variations in semi batch operations over time.

(▲) Adding enzyme; (△) Adding both enzyme and substrate; (◆) Adding substrate.

Concerning reaction carried out with enzyme feeding of the reactor (figure 3 a), similar results as batch mode operation were observed for both residual hydroxyl phenolic groups and

oxygen consumption. In a first step a fast oxidation of hydroxyl phenolic groups and oxygen uptake rate were observed, followed by an increase of the dissolved oxygen in the medium and a low oxidation of hydroxyl phenolic groups is observed during a second step. This behaviour confirms that only a few amounts of enzyme is needed to oxidise the 10 g/L of SLS and the oxygen consumption occurs only during this first step of free radicals generation.

**Table 2** Conversion rate after 5 h and 24 h of reaction, final  $M_w$  and final Pdi of reactions carried out in semi batch operations.

Reaction	Conversion Rate		Final $M_w$ (Da)	Final Pdi
	5h (%)	24 h (%)		
Semi batch by adding enzyme	72 %	73 %	29400	4.7
Semi batch by adding both enzyme and substrate	48 %	61 %	28200	4.2
Semi batch by adding substrate	39 %	44 %	26500	4.2

Conversion rate is also similar to the batch mode with about 73 % of hydroxyl phenolic groups oxidation after 24 hours of reaction (table 2). As it is indicated in figure 4 and table 2, the average  $M_w$  rises gradually during the period of enzyme addition (5h) and then stabilizes around 29000 Da along the left time of the reaction. Pdi value decreases rapidly and stabilises more or less at 4.7 until the end of the reaction (24 hours).

For reactions carried out with the addition of substrate or enzyme and substrate, a progressive increase of phenolic groups during the first 5 hours to reach at least 0.2 g/L followed by a slight decrease were observed. Moreover, dissolved oxygen decreases and then increases quickly after each addition, in a repetitive way (figure 3b and 3c). The conversion rate of hydroxyl phenolic groups oxidation after 24 hours is 61 % for enzyme and substrate addition and 44 % for substrate feeding.

As for continuous mode a progressive increase of  $M_w$  was observed to reach 28200 Da and 26400 Da respectively for enzyme and substrate addition and substrate feeding. The Pdi drops

quickly to 4.2 and remains constant throughout the duration of the reaction (Figure 4 and Table 2).

The final  $M_w$  which is relatively low and the conversion rate particularly in the case of substrate feeding and the accumulation of phenolic groups indicated that similar mechanisms, as the one observed in batch mode with 1 g/L, occur. This means that these two modes of reaction promote a “thermodynamic control” and then lead to C-C linkages instead of C-O-C coupling.

#### 4. Conclusion

The obtained results in this work indicated that the increase of the average of  $M_w$  and the decrease of the polydispersity depends on the operating conditions. Batch mode with high concentration of SLS (10 g/L), promotes the increase of the  $M_w$  and probably the C-O-C coupling route. This seemed to be due to the high and instantaneous generation of free radicals, favouring the “kinetic control” of reaction. The continuous mode also favours the C-O-C but indicates that the increase of  $M_w$  is more impacted by the high amount of phenoxy radicals than the quantity of substrate added. However, continuous feeding of enzyme and substrate leads to a low Pdi. Fed batch with enzyme feeding is comparable to batch with 10 g/L; the enzyme plays a minor role and a low amount is enough to oxidise the tested concentration of SLS.

The addition of substrate or both enzyme and substrate adding works as a dilute batch system promotes C-C coupling (thermodynamic control) and so a low  $M_w$  increase. These results likely open new ways to control the enzymatic polymerisation of lignosulfonates. However these assumptions need to be verified by some spectroscopy analyses of formed polymers in order to have a better understanding of free radical coupling (C-C or C-O-C).

**Reference**

- [1] Rodrigues S, Pinto GAS, Fernandes FAN. Optimization of ultrasound extraction of phenolic compounds from coconut (*Cocos nucifera*) shell powder by response surface methodology. *Ultrason Sonochem.* 2008;15(1):95-100.
- [2] Zhou M, Qiu X, Yang D, Lou H. Properties of different molecular weight sodium lignosulfonate fractions as dispersant of coal-water slurry. *J Dispersion Sci Technol.* 2006;27(6):851-6.
- [3] Madad N, Chebil L, Sanchez C, Charbonnel C, Ghouil M. Effect of molecular weight distribution on chemical, structural and physicochemical properties of sodium lignosulfonates *Rasyan J chem.* 2011;4(1).
- [4] Ouyang X, Qiu X, Chen P. Physicochemical characterization of calcium lignosulfonate-A potentially useful water reducer. *Colloids Surf A.* 2006;282-283:489-97.
- [5] Yang D, Qiu X, Pang Y, Zhou M. Physicochemical properties of calcium lignosulfonate with different molecular weights as dispersant in aqueous suspensio *J Disper Sci Technol* 2008;29(9):1296-303
- [6] Benavente-Garcia O, Castillo J, Lorente J, Ortao A, Del Rio JA. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000;68(4):457-62.
- [7] Jiang H, Fang Y, Fu Y, Guo QX. Studies on the extraction of phenol in wastewater. *J Hazard Mater.* 2003;101(2):179-90.
- [8] Correia PFMM, Ferreira LM, Reis MTA, de Carvalho JMR. A study on the selective recovery of phenol and formaldehyde from phenolic resin plant effluents by liquid-liquid extraction. *Solvent Extr Ion Exch.* 2007;25(4):485-501.
- [9] Ferreira FC, Peeva L, Boam A, Zhang S, Livingston A. Pilot scale application of the Membrane Aromatic Recovery System (MARS) for recovery of phenol from resin production condensates. *J Membr Sci.* 2005;257(1-2):120-33.
- [10] Venkateswaran P, Palanivelu K. Recovery of phenol from aqueous solution by supported liquid membrane using vegetable oils as liquid membrane. *J Hazard Mater.* 2006;131(1-3):146-52.
- [11] Bhattacharya PK, Todi RK, Tiwari M, Bhattacharjee C, Bhattacharjee S, Datta S. Studies on ultrafiltration of spent sulfite liquor using various membranes for the recovery of lignosulphonates. *Desalination.* 2005;174(3):287-97.
- [12] Kobayashi S, Uyama H, Kimura S. Enzymatic polymerization. *Chemical Reviews.* 2001;101(12):3793-818.

- [13] Kobayashi S. Enzymatic polymerization: a new method of polymer synthesis. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. 1999;37(16):3041-56.
- [14] Kobayashi S, Uyama H. Enzymatic Polymerization for Synthesis of Polyesters and Polyaromatics. *ACS Symposium Series* 1998:58-73.
- [15] Kobayashi S, Shoda SI, Uyama H. Enzymatic polymerization and oligomerization. *Advances in Polymer Science*. 1995;121:1-30.
- [16] Gross SM, Givens RD, Jikei M, Royer JR, Khan S, DeSimone JM, et al. Synthesis and swelling of poly(bisphenol a carbonate) using supercritical CO<sub>2</sub>. *Macromolecules*. 1998;31(25):9090-2.
- [17] Joo H, Yoo YJ, Dordick JS. Polymers from biocatalysts. *Korean J Chem Eng*. 1998;15(4):362-74.
- [18] Riva S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. *Trends in Biotechnology*. 2006;24(5):219-26.
- [19] Husain Q. Peroxidase mediated decolorization and remediation of wastewater containing industrial dyes: A review. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 9(2):117-40.
- [20] Widsten P, Kandelbauer A. Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb Technol*. 2008;42(4):293-307.
- [21] Nazari K, Esmaili N, Mahmoudi A, Rahimi H, Moosavi-Movahedi AA. Peroxidative phenol removal from aqueous solutions using activated peroxidase biocatalyst. *Enzyme Microb Technol*. 2007;41(3):226-33.
- [22] Dasgupta S, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Inactivation of enzyme laccase and role of cosubstrate oxygen in enzymatic removal of phenol from water. *Water Environment Research*. 2007;79(8):858-67.
- [23] Jeon JR, Kim EJ, Murugesan K, Park HK, Kim YM, Kwon JH, et al. Laccase-catalysed polymeric dye synthesis from plant-derived phenols for potential application in hair dyeing: Enzymatic colourations driven by homo- or hetero-polymer synthesis. *Microb Biotechnol*. 2010;3(3):324-35.
- [24] Mita N, Tawaki SI, Hiroshi U, Kobayashi S. Laccase-catalyzed oxidative polymerization of phenols. *Macromolecular Bioscience*. 2003;3(5):253-7.
- [25] Ikeda R, Uyama H, Kobayashi S. Laccase-catalyzed curing of vinyl polymers bearing a phenol moiety in the side chain. *Polymer J*. 2001;33(7):540-2.
- [26] Reihmann M, Ritter H. Synthesis of phenol polymers using peroxidases. *Advances in Polymer Science* 2006:1-49.

- [27] Ghosh JP, Taylor KE, Bewtra JK, Biswas N. Laccase-catalyzed removal of 2,4-dimethylphenol from synthetic wastewater: Effect of polyethylene glycol and dissolved oxygen. *Chemosphere*. 2008;71(9):1709-17.
- [28] Nugroho Prasetyo E, Kudanga T, Ostergaard L, Rencoret J, Gutierrez A, del Rio JC, et al. Polymerization of lignosulfonates by the laccase-HBT (1-hydroxybenzotriazole) system improves dispersibility. *Bioresource Technol*. 2010;101(14):5054-62.
- [29] Kim S, Silva C, Zille A, Lopez C, Evtuguin DV, Cavaco-Paulo A. Characterisation of enzymatically oxidised lignosulfonates and their application on lignocellulosic fabrics. *Polymer International*. 2009;58(8):863-8.
- [30] Areskog D, Li J, Gellerstedt G, Henriksson G. Investigation of the molecular weight increase of commercial lignosulfonates by laccase catalysis. *Biomacromolecules*. 2010;11(4):904-10.
- [31] Kurniawati S, Nicell JA. A comprehensive kinetic model of laccase-catalyzed oxidation of aqueous phenol. *Biotechnology Progress*. 2009;25(3):763-73.
- [32] Areskog D, Li J, Nousiainen P, Gellerstedt G, Sipila J, Henriksson G. Oxidative polymerisation of models for phenolic lignin end-groups by laccase. *Holzforschung*. 2010;64(1):21-34.
- [33] Wu Y, Taylor KE, Biswas N, Bewtra JK. Kinetic model-aided reactor design for peroxidase-catalyzed removal of phenol in the presence of polyethylene glycol. *J Chem Technol Biotechnol*. 1999;74(6):519-26.

**Contribution de l'article**

L'effet du mode de conduite de la réaction de polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium a été reporté. Les résultats obtenus révèlent que le mode de conduite et le ratio laccase/lignosulfonates jouent un rôle majeur dans la polymérisation enzymatique des lignosulfonates.

Ainsi, l'étude de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium en mode discontinu montre que la plus importante augmentation de la  $M_w$  (31400 Da) et la plus grande consommation d'oxygène sont observées pour la réaction menée avec la concentration la plus élevée de lignosulfonates (10g/L). La laccase de *Trametes versicolor* catalyse la polymérisation oxydative de lignosulfonates, en fonctionnement discontinu, avec un taux de conversion de 75 % en présence de 10 g/L de lignosulfonates et de 30 U/mL de laccase. Par ailleurs, en mode discontinu et à une concentration de 10 g/L de lignosulfonates, la formation de liaisons C-O-C semble être favorisée à la formation des liaisons C-C. Ceci peut être dû à la génération instantanée d'une grande quantité de radicaux phénoxy à des concentrations importantes de SLS (10 g/L) et donc dans ces conditions, la réaction est contrôlée par un 'mécanisme cinétique'.

La réaction réalisée en mode continu dans les mêmes conditions a permis d'obtenir également un taux de conversion élevé (85 %), et une plus faible valeur finale de Pdi (3,7) par comparaison au mode discontinu. Ce mode de conduite semble aussi favoriser la formation de liaisons C-O-C.

Le mode de mise en œuvre en semi continu par ajout d'enzyme, conduit à la plus grande  $M_w$  (29400 Da) par rapport aux deux autres modes, en semi continu par ajout de substrat seul ou de substrat et d'enzyme simultanément. Par ailleurs, il semble qu'une quantité d'enzyme égale à 3U/mL soit suffisante pour oxyder la concentration testée de lignosulfonates (10 g/L) puisque les résultats de l'évolution des paramètres étudiés (OH phénoliques, Pdi,  $O_2$  dissous et  $M_w$ ) sont comparable au mode discontinu (10 g/L de lignosulfonates et 30 U/mL de laccase). Le mode semi continu par ajout de substrat seul et par ajout de substrat et d'enzyme sont des systèmes dilués qui sont contrôlés par un 'mécanisme thermodynamique' de la réaction et donc favorisent la formation des liaisons C-C et une faible augmentation de  $M_w$ . La plus faible oxydation des lignosulfonates a été obtenue par l'addition de substrat au cours du temps (44 %).

La comparaison des résultats des trois modes de mise en œuvre a indiqué que le mode en continu conduit à une augmentation importante de  $M_w$  (30600 Da) et surtout à la plus basse polydispersité des polymères synthétisés (3,7). Ainsi, ce mode de conduite de la réaction est plus adapté pour obtenir des produits homogènes. L'évolution de la consommation d'oxygène a révélé qu'en présence des concentrations élevées d'enzyme et de substrat, ce facteur pourrait devenir une étape limitant la polymérisation quel que soit le système utilisé pour la réalisation de la réaction.



## *CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES*



## **CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

---

L'objectif principal de ce travail était de palier l'hétérogénéité des lignosulfonates de sodium afin d'obtenir des fractions avec des propriétés améliorées et susceptibles d'être utilisées dans des nouvelles niches d'applications à valeur ajoutée.

Pour parvenir à cet objectif deux approches complémentaires ont été utilisées ; Il s'agit d'une part, de fractionner les lignosulfonates de sodium par procédés à membranes en mode diafiltration et d'autre part, de les polymériser.

Le fractionnement des lignosulfonates par diafiltration a permis d'obtenir plusieurs fractions avec des distributions de masse moléculaire variables. Le comportement en solution, la composition chimique et les propriétés physico-chimiques de ces différentes fractions ont été reportés et comparés.

Pour la mise en œuvre de la réaction de polymérisation des lignosulfonates, les travaux ont porté dans un premier temps sur une étude comparative entre la polymérisation des lignosulfonates par voie enzymatique et par voie chimique. Dans un deuxième temps et en vue des résultats, les effets de l'origine de l'enzyme, la concentration du substrat et de l'enzyme, le poids moléculaire initial et l'utilisation des médiateurs sur les performances de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates ont été reportés. Finalement, l'étude cinétique de différents modes de conduite de cette réaction (discontinu, continu et semi continu) a été menée et comparée.

Les résultats issus de ces différentes expériences ont mené aux conclusions suivantes :

### **Résultats du fractionnement des lignosulfonates par procédé membranaire et de la caractérisation physico-chimique des fractions obtenues**

Le fractionnement par diafiltration des lignosulfonates a permis d'obtenir 6 fractions. La fraction F<sub>1</sub> issue d'un seuil de coupure de 300 kDa, représente plus de 48% p / p de la

masse totale des lignosulfonates initiaux. Les fractions F<sub>3</sub> (50 ~ 150 kDa) et F<sub>4</sub> (15 ~ 50 kDa) présentent de faibles taux de récupération de 6% et 5%, respectivement. Les fractions F<sub>2</sub> et F<sub>5</sub> représentent 14,8% et 10,5%, respectivement, des lignosulfonates initiaux.

Excepté F<sub>5</sub> et F<sub>6</sub>, les différentes fractions sont caractérisées par une grande pureté (jusqu'à 99%) supérieure à celle des lignosulfonates utilisés pour le fractionnement (90%).

Les lignosulfonates utilisés dans cette opération de fractionnement sont caractérisés par un poids moléculaire en nombre de  $2900 \pm 400$  Da, un poids moléculaire moyen en poids de  $17800 \pm 1500$  Da et une polydispersité de  $6,2 \pm 0,3$ . Les fractions obtenues ont des masses moléculaires variables allant de 1400 Da à 19500 Da et des polydispersités inférieures aux lignosulfonates initiaux (1,4 à 3,5).

La composition en groupements fonctionnels a été déterminée pour l'ensemble des fractions obtenues. Il s'avère que les fractions F<sub>3</sub> et F<sub>4</sub> contiennent de grandes quantités de groupements sulfoniques, de groupements hydroxyles, d'unités guaiacyles et de groupements carboxyliques. De même, les fractions F<sub>3</sub>, F<sub>4</sub> et F<sub>5</sub> sont les seules à contenir des unités syringyles.

Les fractions dont les masses moléculaires en poids sont entre 2500 et 4300 Da (F<sub>3</sub> et F<sub>4</sub>) présentent des propriétés de surface (52 mN/m) et antioxydantes (2,86  $\mu$ M en TEAC) plus intéressantes que les autres fractions et les lignosulfonates initiaux. Alors que les fractions F<sub>1</sub> (19500 Da) et F<sub>2</sub> (7000 Da) sont caractérisées par des valeurs de densité de charge (-40,5 mM et -41 mM) et de viscosité apparente ( $2.19 \cdot 10^{-3}$  N.m<sup>2</sup>.s et  $2.16 \cdot 10^{-3}$  N.m<sup>2</sup>.s) plus importantes par comparaison aux autres fractions et aux lignosulfonates commerciaux.

Les isothermes d'adsorption des différentes fractions ont été parfaitement ajustées par l'équation de GAB (Guggenheim-Anderson-De Boer). Cette modélisation a montré des différences significatives entre les valeurs des capacités d'énergie de liaison et d'adsorption. La plus basse valeur de la capacité d'adsorption de la monocouche d'eau (8,79) a été obtenue avec la fraction F<sub>1</sub> et la valeur la plus élevée (28,5) avec la fraction F<sub>5</sub>. Les résultats montrent une capacité élevée d'adsorption d'eau des fractions de lignosulfonates de faibles poids moléculaires.

L'analyse de l'ensemble de ces résultats indique que la diafiltration permet l'obtention de fractions dans la structure et les propriétés sont améliorées.

### **Résultats de l'étude du comportement des lignosulfonates en solution**

La détermination des tailles des lignosulfonates en solution a montré qu'il existe 3 régions caractérisées par des diamètres hydrodynamiques d'environ de 200 nm, 20 nm et la troisième entre 2 à 7 nm respectivement.

La présence de la troisième région (entre 2 et 7 nm) en présence d'une concentration de 1 g/L de NaCl indique clairement le rôle de la force ionique dans le processus d'agrégation des lignosulfonates. En effet, l'ajout de sel réduit les interactions entre les macromolécules et donc le phénomène de formation des micelles.

Les résultats obtenus de la troisième région (entre 2 et 7 nm) indiquent aussi que pour toutes les fractions, ce diamètre décroît en fonction de la distribution moléculaire. En effet, pour F<sub>1</sub> caractérisée par un poids moléculaire de 19500 Da, le diamètre hydrodynamique est de 7 nm. Alors, que pour F<sub>5</sub> caractérisée par un poids moléculaire de 2300 Da, le diamètre hydrodynamique est de 2 nm.

L'analyse de la fraction F<sub>3</sub> par Microscopie électronique à transmission (MET) à une concentration de 0,5 g/L confirme que les lignosulfonates en solution sont sous forme d'agrégats et sont caractérisés par une distribution de taille des particules de diamètre entre 2 et 200 nm. Les variations observées de la taille des particules de lignosulfonates pourraient être attribuées aux interactions des forces attractives hydrophiles et hydrophobes entre les macromolécules de lignosulfonates.

En conclusion de cette partie, le comportement des lignosulfonates en solution dépend de leurs distributions de poids moléculaires, de leurs concentrations en solution et de leurs compositions chimiques. Ces macromolécules ont tendance à s'agréger et à former des micelles ce qui affecte leurs propriétés physico-chimiques.

### **Résultats de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates**

L'étude comparative entre la polymérisation des lignosulfonates par le manganèse III et la laccase de *Trametes versicolor* montre que l'enzyme permet d'obtenir des polymères avec des masses moléculaires en poids moins importantes que celles obtenues avec le manganèse III mais mène à une polydispersité moins élevée. Ce qui laisse conclure que la voie enzymatique permet d'obtenir une distribution moléculaire moins hétérogène.

L'analyse des différents résultats issus de la cinétique de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium montre clairement la faisabilité de cette réaction et que l'obtention des fractions avec des masses moléculaires élevées nécessitent la maîtrise de plusieurs facteurs clefs tels que l'origine de l'enzyme, les concentrations de substrat et de l'enzyme, la présence ou l'absence des médiateurs.

- L'activité de la laccase dépend de l'organisme source, de sa structure primaire et de son potentiel redox. Les résultats de la polymérisation ont montré que la laccase de *Trametes versicolor* (LTV) permet d'obtenir la plus grande augmentation du poids moléculaire. Cette augmentation est moins importante en présence de la laccase de *Myceliophthora thermophila* (LMT) et inexistante avec la laccase de *Rhus vernicifera* (LRV). Il apparaît donc que l'origine de la laccase est un paramètre à considérer puisque la LRV est une laccase issue des plantes et LTV et LMT sont des laccases fongiques. Ces laccases présentent des différences au niveau du site actif. Ces résultats s'expliquent aussi par la différence de la valeur du potentiel redox entre les trois enzymes. En effet, la laccase LTV a le plus grand potentiel redox (0,8 mV), suivie par LMT (0,46 mV) et LRV (0,41 mV).

- Une pureté et une concentration initiale élevée de lignosulfonates utilisés dans la réaction de polymérisation par une laccase donnée favorisent l'augmentation du poids moléculaire.

- Les laccases fongiques n'oxydent en général que les groupements phénoliques. Pour étendre l'oxydation aux autres groupements des lignosulfonates ou améliorer le taux de conversion, l'utilisation des médiateurs est une technique courante. Nous avons démontré dans ce travail que l'augmentation du poids moléculaire des polymères synthétisés est effectivement améliorée par la présence des médiateurs mais l'efficacité dépend de la stabilité et la réactivité du radical formé par l'oxydation du médiateur par la laccase. Parmi les différents médiateurs testés, en présence de la laccase de *Trametes versicolor*, l'acétosyringone (ASG) et l'acide violurique (VLA), ont permis d'obtenir les poids moléculaires les plus élevés. Ces résultats

s'expliquent par le fait que le VLA est facilement oxydé par la laccase et les radicaux nitroxyles obtenus sont très stables. L'efficacité de l'ASG est due d'une part, à sa faible valeur de pKa (7,88) qui facilite sa rapide oxydation par la laccase et d'autre part, la présence de deux groupements méthoxyyles sur le noyau aromatique qui conduit à des radicaux plus stables.

### **Résultats de l'étude de l'effet du mode de conduite de la polymérisation enzymatique des lignosulfonates**

Quelques travaux ont montré que l'oxydation des hydroxyles phénoliques par la laccase n'est pas totale. Ceci peut être expliqué par le fait que cette enzyme est soit inactivée par les produits synthétisés, soit inhibée par les lignosulfonates, soit limitée par la consommation d'oxygène ou soit les hydroxyles phénoliques sont régénérés par la formation des liaisons. La plupart de ces résultats ont été obtenus en mode de conduite discontinu de la réaction. Dans le cas où l'enzyme est inactivée, la mise en œuvre en continu ou en semi continu pourrait atténuer son inactivation. Ainsi nous avons comparé les performances de la polymérisation en modes continu, discontinu et semi continu. Nous avons aussi mesuré la consommation de l'oxygène au cours du temps puisque ce substrat peut être aussi un autre facteur limitant cette réaction.

Les résultats obtenus montrent qu'en discontinu l'augmentation de la concentration en lignosulfonates favorise l'augmentation du poids moléculaire et la consommation d'oxygène dissous. Toutefois quelque soit la condition expérimentale testée, l'oxydation des hydroxyles phénoliques n'est pas totale. Ceci peut être attribué à la régénération des groupements hydroxyyles due à la formation des liaisons entre les radicaux phénoxy obtenus par l'oxydation des lignosulfonates par la laccase. En présence de la laccase de *Trametes versicolor*, le taux de conversion maximal est de l'ordre de 75 % avec 10g/L de lignosulfonates et 30 U/mL de laccase. Par ailleurs, en mode discontinu et à une concentration de 10 g/L de lignosulfonates, la formation de liaisons C-O-C semble être favorisées à la formation des liaisons C-C. Ceci peut être du à la génération instantanée d'une grande quantité de radicaux phénoxy et donc dans ces conditions la réaction est contrôlée par un 'mécanisme cinétique'.

Le mode de mise en œuvre en semi continu par ajout d'enzyme de manière à obtenir les mêmes concentrations finales en substrat et en enzyme qu'en discontinu, conduit à la plus grande augmentation du poids moléculaire (29400 Da) comparé au poids moléculaire obtenu par l'ajout de substrat seul ou du substrat et l'enzyme simultanément. Par ailleurs, les résultats de l'évolution des paramètres étudiés en mode semi continu par ajout d'enzyme (OH phénoliques, Pdi, O<sub>2</sub> dissous et M<sub>w</sub>) sont comparable au mode discontinu (10 g/L de lignosulfonates), ce qui laisse supposer qu'une quantité d'enzyme égale à 3U/mL d'enzyme soit suffisante pour oxyder la concentration testée de lignosulfonates (10g/L).

Le mode semi continu par ajout de substrat seul et par ajout de substrat et d'enzyme sont des systèmes dilués qui contrôlés par un 'mécanisme thermodynamique' de la réaction, favorisent la formation des liaisons C-C et donc mènent à une faible augmentation des M<sub>w</sub>. La plus faible oxydation des lignosulfonates a été obtenue par l'addition du substrat au cours du temps avec un taux de conversion de 44 %.

La réaction réalisée en mode continu par ajout de l'enzyme et du substrat a permis d'obtenir également un taux de conversion instantané élevé (85 %), et la plus faible valeur finale Pdi (3,7) par comparaison au mode discontinu et semi continu. Ce mode de conduite semble favoriser la formation de liaisons C-O-C.

Ces résultats suggèrent donc que pour obtenir une masse moléculaire élevée et une polydispersité faible, le mode de conduite en continu semble être le plus approprié.

En présence des concentrations élevées d'enzyme et de substrat, la concentration en oxygène dissous dans le milieu pourrait devenir une étape limitant la polymérisation quelque soit le système utilisé pour la réalisation de la réaction.



## Perspectives

Pour compléter et approfondir ces résultats plusieurs perspectives sont envisageables :

*D'un point de vue fractionnement des lignosulfonates et phénomènes d'agrégation*

Il serait intéressant d'effectuer des manipulations RMN  $^{13}\text{C}$  afin d'identifier les structures des lignosulfonates pour établir des relations structure/propriété. Ceci permet une meilleure compréhension de l'effet de la structure et des groupements fonctionnels sur le comportement en solution et les propriétés physico-chimiques de ces macromolécules.

*D'un point de vue polymérisation enzymatique des lignosulfonates et facteurs affectant la réaction*

La détermination des différents types de liaisons formées par les radicaux, générés suite à l'oxydation des lignosulfonates, que ce soit par la laccase seule ou par le système laccase-médiateur (analyses RMN et EPR), est une étape essentielle pour déterminer le rôle exact du médiateur, en particulier s'il contribue à l'oxydation d'autres groupements que les OH phénoliques des lignosulfonates et le type de liaisons formées. De même, l'étude de l'effet de la concentration du médiateur ainsi que la détermination de la concentration maximale de l'enzyme sont indispensables pour une optimisation du procédé enzymatique.

*D'un point de vue effet de la conduite de la polymérisation des lignosulfonates*

La maîtrise de l'aération est un paramètre important. Il serait souhaitable de tester des concentrations constantes tout au long de la réaction par un contrôle en ligne de l'oxygène dissous dans le milieu réactionnel.

Il est également intéressant de poursuivre cette étude par la détermination des propriétés physico-chimiques des fractions obtenues à partir de la polymérisation enzymatique et de les comparer aux fractions obtenues par diafiltration.

Finalement, il est aussi envisageable de tester un procédé intégré membrane-enzyme pour le fractionnement et la fonctionnalisation des biopolymères de lignosulfonates.



AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE  
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL  
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur Selim KERMASHA, Professeur, McGill University, Canada**

**Monsieur Pierre-Yves PONTALIER, Maître de conférences, ENSIACET, TOULOUSE**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

**Madame MADAD Nidal**

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,  
une thèse intitulée :

**"Fractionnement et polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium : études  
structurale, chimique, physico-chimique et cinétique. "**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Procédés Biotechnologiques et Alimentaires** »

Fait à Vandoeuvre, le 14 septembre 2011

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



---

**Titre : Fractionnement et polymérisation enzymatique des lignosulfonates de sodium : études structurale, chimique, physico-chimique et cinétique.**

---

**Résumé :** Ce travail a pour objectif d'étudier l'effet de la diafiltration et de la polymérisation enzymatique sur l'hétérogénéité, la composition chimique et les propriétés physico-chimiques des lignosulfonates en solution. Le fractionnement par procédé membranaire a été mené par diafiltration. Les lignosulfonates ont été fractionnés en cinq fractions de différents poids moléculaire et polydispersité variant de 1400 g.mol<sup>-1</sup> à 19500 g.mol<sup>-1</sup> et de 1,4 à 3,5 respectivement. Les résultats indiquent que la diafiltration permet d'obtenir des fractions qui présentent des propriétés augmentées et/ou différentes du produit non fractionnés et une distribution moins hétérogène. Les fractions de poids moléculaire en poids de 2500 g.mol<sup>-1</sup> et 4300 g.mol<sup>-1</sup> ont la plus grande concentration en groupements hydroxyles et sulfoniques, ce qui affecte leurs propriétés, puisqu'elles présentent des activités de surface et antioxydantes supérieures aux lignosulfonates non fractionnés. La polymérisation enzymatique des lignosulfonates par la laccase a été étudiée en présence ou en absence de médiateur. La polymérisation des lignosulfonates a été constatée comme produit de leurs oxydations (SEC). Les principaux facteurs influant sur la polymérisation des lignosulfonates sont (i) une très grande concentration en lignosulfonates, (ii) l'utilisation des laccases fongiques (laccase de *Trametes versicolor*) avec un potentiel redox élevé et (iii) l'utilisation de l'acétosyringone ou l'acide violurique comme médiateur. L'effet du mode de conduite (discontinu, continu et semi continu) de la réaction de polymérisation des lignosulfonates a été rapporté. La comparaison des résultats des trois modes de mise en œuvre a indiqué que le mode en continu conduit à une augmentation importante du poids moléculaire (30600 Da) et à la diminution la plus importante de la polydispersité des polymères synthétisés (3,7). Ainsi, ce mode de conduite de la réaction est plus adapté pour obtenir des produits homogènes.

**Mots clés :** Lignosulfonates, laccase, polymérisation, diafiltration, réacteur.

---

**Abstract:** This work aims to study the effect of diafiltration and enzymatic polymerization on the heterogeneity, the chemical composition and physicochemical properties of lignosulfonates in solution. Membrane fractionation process was carried out by diafiltration. The lignosulfonates were fractionated into five fractions with different molecular weights and polydispersity ranging from 1400 g mol<sup>-1</sup> to 19500 g mol<sup>-1</sup> and from 1.4 to 3.5, respectively. The results indicate that diafiltration allows obtaining fractions which have enhanced and/or different properties from unfractionated product and a less heterogeneous distribution. Fractions with a weight average molecular weight between 2500 g mol<sup>-1</sup> and 4300 g mol<sup>-1</sup> have the largest concentration of hydroxyl and sulfonic groups which affect their properties, since they exhibit surface and antioxidant activities higher than unfractionated lignosulfonates. The enzymatic polymerization of lignosulfonates by laccase was studied in the presence or absence of mediator. The polymerization of lignosulfonates was observed as a product of their oxidation by SEC. The main factors influencing the polymerization of lignosulfonates are (i) a very high concentration of lignosulfonates (ii) the use of fungal laccases (laccase from *Trametes versicolor*) with a high redox potential (iii) the use of acetosyringone or violurique acid as mediator. The effect of the reactor mode (batch, continuous and semi continuous) of the polymerization of lignosulfonates has been reported. Comparison of the results of the three modes has shown that the continuous mode led to a significant increase in molecular weight (30600 Da) and the largest decrease of the polydispersity of the synthesized polymers (3.7). Thus, this mode of conducting the reaction is more suitable for homogeneous products.

**Keywords:** Lignosulfonates, laccase, polymerization, diafiltration, reactor.

---