



**HAL**  
open science

# Procédés membranaires et biotechnologiques pour la valorisation de ressources végétales résiduelles : cas de la lignine thermomécanique

Virginie Steinmetz

► **To cite this version:**

Virginie Steinmetz. Procédés membranaires et biotechnologiques pour la valorisation de ressources végétales résiduelles : cas de la lignine thermomécanique. Génie des procédés. Université de Strasbourg, 2020. Français. NNT : 2020STRAF033 . tel-03402625

**HAL Id: tel-03402625**

**<https://theses.hal.science/tel-03402625>**

Submitted on 25 Oct 2021

**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.

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES CHIMIQUES**

**DSA IPHC UMR CNRS 7178**

Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM)

**THÈSE** présentée par :

**Virginie STEINMETZ**

Soutenue le : **03 Juillet 2020**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Génie des Procédés - Biotechnologies

**Procédés membranaires et  
biotechnologiques pour la valorisation  
de ressources végétales résiduelles  
Cas de la lignine thermomécanique**

**THÈSE dirigée par :**

**M TREBOUET Dominique**  
**M DUMARCAY Stéphane**

Professeur, Université de Strasbourg  
Professeur, Université de Lorraine

**RAPPORTEURS :**

**Mme BAUMBERGER Stéphanie**  
**M PONTALIER Pierre-Yves**

Professeur, Institut Jean-Pierre Bourgin, AgroParisTech  
Maître de conférences, HDR, ENSIACET

**AUTRES MEMBRES DU JURY :**

**Mme VILLAIN GAMBIER Maud**  
**M PETIT-CONIL Michel**  
**M SORMANI Rodney**

Maître de conférences, Université de Strasbourg  
Directeur de recherches, Centre Technique du Papier  
Maître de conférences, Université de Lorraine



*« Si nous prenons la nature pour guide, nous ne nous égarerons jamais. »*

**Cicéron**



## REMERCIEMENTS

---

C'est avec beaucoup d'enthousiasme et de plaisir que je débute ce manuscrit en remerciant toutes les personnes qui ont contribué, de près ou de loin, à la bonne réalisation de ma thèse. Je commencerai par remercier le Pr Barbara Ernst et le Pr Philippe Gérardin de m'avoir permis d'intégrer leurs équipes de recherche et de rencontrer les membres du RePSeM et du Lermab qui ont fait de ces trois années une succession de souvenirs impérissables (j'y reviendrai plus tard !). Je remercie également les membres de mon jury de thèse, le Pr Stéphanie Baumberger, le Dr Pierre-Yves Pontalier, le DR Michel Petit-Conil et le Dr Rodney Sormani, de l'intérêt qu'ils ont porté à mes travaux. Je les remercie plus particulièrement pour les moments d'échanges et de partage de connaissances et d'expérience que nous avons pu avoir. J'adresse également mes remerciements à M Armand KLEM qui a soutenu le projet Reva Coppa depuis ses débuts au sein de la papèterie NSG.

Je tiens aussi à remercier le Pr Alexandra Knaebel, directrice de l'IUT Louis Pasteur de Schiltigheim, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son établissement et m'avoir permis d'accéder à tout le matériel nécessaire à la bonne conduite de ma recherche. J'en profite pour remercier chaleureusement tous les membres du personnel de l'IUT que j'ai pu côtoyer ainsi que les membres de l'équipe DIHP : Patrick (mon premier voisin à Strasbourg et un bricoleur de vélo hors pair), Pascal, Dominique, Angélique (Lauch) et Valentina (les membres de l'équipe technique qui m'ont apporté leur aide précieuse), Christophe, Angélique (Bohl) et Caroline (enseignants passionnés qui m'ont formé à leur discipline) et enfin Clémentine, Jeanne et Fadoua (avec qui j'ai partagé mes repas et mes états d'âme). Je vous remercie tous sincèrement d'avoir partagé cette tranche de vie avec moi, de m'avoir formé, de m'avoir conseillé, de m'avoir aidé à trouver le matériel dans les nombreux placards de TP, de vous être arrêtés discuter dans les couloirs, de m'avoir tenue compagnie les week-end, ... et pour tant d'autres choses. Grâce à vous, à votre accueil et à votre disponibilité, mes deux années passées à l'IUT resteront mémorables. Sans oublier que j'ai vécu avec vous la plus incroyable expérience de ma thèse avec le grand retour de mon vélo rose !

A présent, je souhaite plus particulièrement remercier mes directeurs de thèse, Dominique et Stéphane, ainsi que Maud, ma co-encadrante. Merci à vous d'avoir retenu ma candidature et de m'avoir offert la chance de participer à votre projet de recherche. Merci de m'avoir fait confiance durant ces trois années passées ensemble et de m'avoir permis

d'évoluer en grande autonomie tout en m'apportant le soutien technique et moral nécessaire à l'avancement efficace de mes travaux. Je retiendrai de cette belle aventure vos nombreuses qualités humaines, votre passion pour votre métier et votre envie de la partager. Merci également de m'avoir permis de m'épanouir professionnellement en m'autorisant à représenter les laboratoires au cours de plusieurs événements scientifiques d'envergure internationale : Reims, Nancy, Wageningen et bientôt ... Osaka ! Toutes ces opportunités m'ont permis de faire de très belles rencontres, d'élargir mon réseau professionnel et de gagner en expérience. Elles m'ont aussi permis de contribuer à la diffusion des savoir-faire de nos laboratoires et d'initier des discussions qui, je l'espère, mèneront à de fructueuses collaborations.

Il me tient également à cœur de remercier les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de mes expérimentations et, sans qui, ce travail n'aurait pu être aussi complet. Je pense en particulier à certains membres du Lermab du 4<sup>ème</sup> étage ! Tout d'abord, un grand merci à toi, Nicolas, de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire et de m'avoir ainsi permis de mener à bien une grande partie du travail analytique rapporté dans ce manuscrit. Merci pour ta bonne humeur et tes sifflements d'oiseau. Merci à toi également, Isabelle, pour ta disponibilité, ta gentillesse, ta patience et ta pédagogie. Sans tes compétences techniques et tes explications je ne m'en serais jamais sortie avec mes centaines d'analyses. Enfin, merci à toi, François, tu as été le premier à m'accueillir au 4<sup>ème</sup> étage et à m'intégrer à l'équipe. Tu m'as aussi apporté une aide précieuse à la réalisation de mes analyses tant sur le plan technique que par tes connaissances théoriques et ta super pédagogie. Merci d'avoir rédigé de magnifiques protocoles d'utilisation de la SEC, d'avoir été mon fournisseur officiel de mini barreaux aimantés, d'avoir pris le temps de passer et d'analyser certains de mes échantillons et d'avoir régulièrement actualisé ma base bibliographique. De l'autre côté de la fac de science, au laboratoire IAM, je pense aussi à toi Rodnay. Merci pour ta formation initiale en culture fongique et pour la mise à disposition de ton petit préféré *P. chrysosporium*. Merci aussi d'avoir suivi mes travaux avec intérêt et de t'être rendu disponible pour des discussions constructives à chacun de mes oraux. Enfin, du côté du RePSeM, je tiens à remercier Apolline et Jeanne pour leur contribution à ce travail et leur bonne humeur pendant leur stage d'IUT ! Merci de m'avoir permis de grandir à vos côtés et d'aiguiser mes capacités managériales et de travail en équipe.

Et puisque la thèse est aussi une grande aventure humaine, je tiens à remercier les personnes qui ont rendu mon aventure inoubliable. Et il y en a ... ! Alors merci à :

- ♥ Marie et Clémentine : mes confidentes d'Alsace et de Lorraine ! Plus que des amies, vous avez été mes piliers tout au long de cette aventure ! Merci tout simplement d'être vous, de m'avoir accepté comme je suis, d'avoir toujours été là (pour le meilleur et pour le pire !) et pour tous les beaux souvenirs créés ensemble ! Je vous laisse vous reconnaître dans cette petite liste non-exhaustive : partenaire de piscine dominicale, future associée gérante d'un salon de thé, animatrice d'ateliers bredeles et queue de sirène, gérante d'une coloc'-canapé en or, amatrice de crêpes licornes et de pizzas du jeudi soir, organisatrice de collectes de premières nécessités pour les étudiants SDF ;)
- ♥ Matthieu, Clémence, princesse Guillaume et Rawa : mes super collègues de bureau, qui sont maintenant bien plus que ça ! Merci d'avoir égayé mes journées par votre présence, votre bonne humeur, vos petits post-it et votre grand sens de l'humour ! Guillaume, je sais à quel point tu as travaillé dur à coup de running gag pour tenter de m'inculquer ne serait-ce qu'une base de culture G ... alors cette citation est pour toi : « Tu étais gai comme un italien, quand il sait qu'il aura de l'amour et du vin ... » Rawa, notre histoire en tant que collègues n'a duré qu'un an mais l'amitié qui s'est créée au R3N0 n'est pas prête de s'arrêter ! Il nous reste encore beaucoup de beaux moments de complicité et de sorties à Europapark à venir ;)
- ♥ Paul (alias Polo l'asticot ou le neveu) : l'un des petits derniers arrivés au cours de ma thèse mais qui a tellement changé le cours de ma troisième année ! Tu es vite devenu bien plus qu'un collègue et tu as pris une place importante dans ma petite vie de famille : dans la cuisine, sur le canapé ou autour de la table ;) Tu rayannes au quotidien, toujours partant pour une soirée ou une sortie, surtout quand il y a à boire et à manger ! Merci pour ton énergie et ta joie de vivre ! Et je n'oublie pas bien entendu tes compétences indéniables en lyophilisation qui ont sauvées mes dernières expériences de thèse !
- ♥ Christine, Jérémy et Sylvie : d'autres collègues qui sont aussi devenus plus que ça ! Christine, je ne te remercierais jamais assez pour ta compassion, ton soutien, ton écoute, ta générosité et ta super énergie ! Tu as été ma famille quand j'en ai eu besoin. Jérémy, un grand merci pour nos nombreuses parties de mots fléchés avec humour, pour ton soutien infailible dans ma carrière parallèle de cheffe pâtissier et pour les incroyables soirées tordantes qu'on a passées ensemble ! Et Sylvie, mille mercis pour ton amitié, ta luminosité, nos conversations de couloir, nos soirées Flam's, belotte, rhum et autres délices des îles et merci d'être la meilleure des marraines pour Sasha !



♥ Et à Sylvia, Caroline, Anne, Pascale, Islah, Zineb, Cléopée, Abderrazak, Thibaut, Marie-Christine, Zahra, Morad, Hélène, Christ, Henri et Mahdi : tous mes autres formidables collègues du RePSeM et du Lermab avec qui j'ai pu partager quelques belles discussions et quelques éclats de rire au grès des divers évènements du quotidien (pauses repas, pauses café, pots de thèse, d'anniversaire, de mariage etc...).

Pour finir, je remercie ma famille, et plus particulièrement mes parents, pour leur amour, leur confiance en moi et leur soutien inconditionnels, pas seulement au cours de ces trois dernières années mais tout au long de ma vie. Sans vous, je n'en serais pas là aujourd'hui. Merci aussi à Sasha, mon fournisseur officiel de tendresse et d'ocytocine sans qui je n'aurais pas aussi bien vécu la fatidique épreuve de la rédaction ! Enfin (last but not least), un immense merci à toi, mon Amour ! Merci d'avoir toujours été là pour moi, malgré la distance, et d'avoir fait de mon bien être ta priorité. Merci de m'avoir supporté au quotidien, tout au long de cette aventure mais aussi bien avant dans tous mes choix de vie. Merci pour tes relectures d'articles et du manuscrit, pour ta présence infaillible à mes répétitions PPT et pour tes commentaires toujours constructifs (non sans indélicatesse mais c'est aussi ce qui fait ton charme). Je n'y serais pas arrivé sans toi, ce travail est pour toi.

## COMMUNICATIONS

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, F. GAMBIER, A. KLEM, S. DUMARCA Y, D. TREBOUET. Unveiling TMP Process Water Potential As an Industrial Sourcing of Valuable Lignin–Carbohydrate Complexes toward Zero-Waste Biorefineries. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, **2019**, 7(6), 6390-6400.

<https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00181>

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, A. KLEM, I. ZIEGLER, S. DUMARCA Y, D. TREBOUET. Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valorization after recovery from industrial process water. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2020**, 157, 726-733.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, A. KLEM, I. ZIEGLER, S. DUMARCA Y, D. TREBOUET. *In-situ* extraction of depolymerization products by membrane filtration against lignin condensation. *Bioresource Technology*, **2020**, in press since May.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123530>

### LISTE DES PRESENTATIONS

#### CONFERENCE

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, A. KLEM, S. DUMARCA Y, D. TREBOUET. *In-situ* extraction of phenolic compounds by membrane filtration against lignin repolymerization: a first proof of concept. **Congrès international Woodchem** (Nancy, France, 20-22 Novembre 2019).

#### CONFERENCE INVITEE

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, A. KLEM, S. DUMARCA Y, D. TREBOUET. Green separation and downstream processes for lignin carbohydrate complexes production from industrial process water. **Congrès international World Chemistry Forum** (Osaka, Japon, 16-18 Septembre 2020).

## ***POSTERS SCIENTIFIQUES***

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, A. KLEM, S. DUMARCAÏ, D. TREBOUET. Comparison of two different drying processes applied to a lignin-rich fraction from the paper industry and implications regarding its valorization. **Congrès international Woodchem** (Nancy, France, 6-7 Décembre 2017) – *Avec Flashtalk de 3 min.*

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, F. GAMBIER, I. ZIEGLER, A. KLEM, S. DUMARCAÏ, D. TREBOUET. Analytical characterization of a soluble lignin fraction from thermomechanical softwood treatment: toward a biorefinery concept. **Congrès international Exploring Lignocellulosic Biomass** (Reims, 26-29 Juin 2018) – *Avec Flashtalk de 3 min.*

Prix du meilleur poster dans la catégorie « caractérisation de la biomasse lignocellulosique ».

V. STEINMETZ, M. VILLAIN-GAMBIER, A. KLEM, S. DUMARCAÏ, D. TREBOUET. Comparison of two different drying processes applied to a lignin-rich fraction from the paper industry and implications regarding its valorization. **Ecole thématique d'été Zelcor** (Wageningen, 2-6 Septembre 2018)

## SOMMAIRE

---

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 / ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Sources, diversité et valorisation des lignines techniques .....</b>	<b>9</b>
1.1. Origines des lignines techniques .....	9
1.1.1. La biomasse lignocellulosique.....	9
1.1.2. Les bioraffineries.....	24
1.2. Structures et propriétés des lignines techniques .....	27
1.2.1. Les procédés de fractionnement .....	28
1.2.2. Les lignines bioénergies .....	30
1.2.3. Les lignines papetières.....	34
1.3. Valorisations des lignines techniques.....	38
1.3.1. Applications directes des lignines techniques .....	39
1.3.2. Réticulation des lignines techniques .....	40
1.3.3. Dépolymérisation des lignines techniques .....	42
1.3.4. Bilan sur les voies de valorisation des lignines techniques.....	51
1.3.5. Choix de la voie de valorisation d'une lignine technique .....	54
1.3.6. Valorisation de la lignine thermomécanique.....	55
<b>2. Dépolymérisation enzymatique des lignines : acteurs et mécanismes .....</b>	<b>58</b>
2.1. Dégradation naturelle des lignines natives .....	58
2.1.1. Les micro-organismes lignolytiques.....	59
2.1.2. Les enzymes lignolytiques.....	61
2.2. Dépolymérisation des lignines techniques en laboratoire .....	68
2.2.1. Les différentes approches.....	68
2.2.2. La production des enzymes lignolytiques au laboratoire .....	71
2.2.3. La dépolymérisation oxydante de la LTM .....	72
<b>3. Procédés membranaires et bioraffineries .....</b>	<b>73</b>
3.1. Les notions de base des procédés membranaires.....	73
3.1.1. Principe et modes de fonctionnement des procédés à gradient de pression .....	74
3.1.2. Accumulation de matière et perte de productivité .....	76
3.1.3. Choix de la membrane de filtration .....	77
3.2. Les procédés membranaires en bioraffinerie.....	78
3.2.1. Procédés membranaires et bioraffineries énergétiques .....	79
3.2.2. Procédés membranaires dans l'industrie papetière .....	80
3.3. Dépolymérisation de la LTM en bioréacteur membranaire .....	82

4. Références .....	84
---------------------	----

## **CHAPITRE 2 / PRODUCTION ET CARACTERISATION ANALYTIQUE DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE..... 99**

1. Contexte et objectifs du chapitre 2 .....	99
2. Production du lot référent de lignine thermomécanique.....	99
2.1. Composition du filtrat clair.....	99
2.2. Opérations de filtration membranaire .....	102
2.3. Production du lot référent.....	104
3. Caractérisation de la lignine thermomécanique .....	105
3.1. Stratégie de caractérisation.....	105
3.2. Résultats .....	106
4. Conclusions du chapitre 2.....	124
5. Références .....	126

## **CHAPITRE 3/ ETUDE DE L'IMPACT STRUCTURAL DE PROCEDES DE TRANSFORMATION SUR LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE..... 131**

1. Contexte et objectifs du chapitre 3 .....	131
2. Stérilisation, concentration et déshydratation de la lignine thermomécanique .....	132
2.1. Stratégie de transformation de la lignine thermomécanique.....	132
2.2. Résultats .....	134
3. Conclusions du chapitre 3.....	149
4. Références .....	150

## **CHAPITRE 4 / BIOCONVERSION DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE PAR UN COCKTAIL D'ENZYMES LIGNOLYTIQUES DE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*..... 153**

1. Contexte et objectifs du chapitre 4 .....	153
2. Production du cocktail enzymatique par FMS .....	154
2.1. Tests de croissance et de contamination .....	154
2.2. Production des enzymes lignolytiques en FMS : cinétique, quantification et caractérisation .....	156
2.3. Exploration des conditions de FMS .....	162
3. Dépolymérisation de la LTM en milieu liquide .....	166
3.1. Exploration des conditions de bioconversion en batch.....	166
3.1.1. Cocktail enzymatique seul et en présence de cofacteurs et médiateurs .....	166

3.1.2.	Amélioration de la solubilité de la LTM par addition de co-solvant .....	170
3.1.3.	Modification de la composition du tampon .....	173
3.2.	Bilan sur la dépolymérisation de la LTM en milieu liquide avec le cocktail enzymatique de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	175
<b>4.</b>	<b>Conclusions du chapitre 4</b> .....	<b>178</b>
<b>5.</b>	<b>Références :</b> .....	<b>179</b>

## **CHAPITRE 5 / BIOCONVERSION DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE PAR UNE LACCASE COMMERCIALE D'ASPERGILLUS SP..... 183**

<b>1.</b>	<b>Contexte et objectifs du chapitre 5</b> .....	<b>183</b>
<b>2.</b>	<b>Dépolymérisation en batch de la LTM</b> .....	<b>184</b>
2.1.	Etude de l'activité de la Laccase d' <i>Aspergillus sp.</i> .....	184
2.2.	Exploration des conditions de bioconversion en batch.....	185
2.3.	Conclusions sur la dépolymérisation en batch de la LTM.....	191
<b>3.</b>	<b>Dépolymérisation de la LTM en réacteur membranaire</b> .....	<b>192</b>
3.1.	Introduction.....	192
3.2.	Résultats .....	193
<b>4.</b>	<b>Conclusions du chapitre 5</b> .....	<b>216</b>
<b>5.</b>	<b>Perspectives</b> .....	<b>216</b>
<b>6.</b>	<b>Références</b> .....	<b>219</b>

## **CONCLUSION GENERALE ..... 223**

## **PARTIE EXPERIMENTALE ..... 229**

## **ANNEXE 1/ EFFET DES ENZYMES LIGNOLYTIQUES PRODUITES PAR PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM SUR LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE EN MILIEU SOLIDE ..... 239**



## LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1</b> : schéma récapitulatif des travaux menés dans le cadre de cette thèse et de l'organisation du manuscrit. ....	6
<b>Figure 2</b> : schéma de la biomasse lignocellulosique à l'échelle cellulaire et macromoléculaire (Isikgor and Becer, 2015). ....	11
<b>Figure 3</b> : le cellobiose : unité de base de la cellulose. ....	12
<b>Figure 4</b> : les différents niveaux d'arrangement de la cellulose (Lavoine <i>et al.</i> , 2012). ....	12
<b>Figure 5</b> : structures chimiques des monomères de sucre constituant les hémicelluloses (De Cherisey, 2015). ....	13
<b>Figure 6</b> : exemple de structure d'un galactoglucomanane O-acétylé (M. Rowell, 2012). ....	14
<b>Figure 7</b> : réactions menant à la production de furfural (A) et de HMF (B) à partir des monomères de sucre (Brandt-Talbot <i>et al.</i> , 2017). ....	16
<b>Figure 8</b> : structures des alcools phénylpropanoïques et des unités phénoliques de bases constituant la lignine. ....	17
<b>Figure 9</b> : structures des principales liaisons inter-unités rencontrées au sein de la lignine. ...	18
<b>Figure 10</b> : structures des principales liaisons covalentes qui composent les LCCs (Giummarella <i>et al.</i> , 2019). ....	20
<b>Figure 11</b> : exemple de structure de lignine native de résineux incluant ses interactions avec les hémicelluloses majoritaires environnantes. ....	21
<b>Figure 12</b> : schéma de fonctionnement d'une industrie traditionnelle de transformation de la biomasse lignocellulosique (A) et d'une bioraffinerie (B). ....	26
<b>Figure 13</b> : les principaux procédés de fractionnement de la biomasse lignocellulosique. ....	29
<b>Figure 14</b> : nombre de publications contenant les termes « lignin valorization » dans leurs titres, leurs résumés ou leurs mots clés des années 2000 à aujourd'hui ; données tirées du site Web of Science. ....	39
<b>Figure 15</b> : principaux procédés de dépolymérisation des lignines techniques et molécules cibles associées. ....	43
<b>Figure 16</b> : axes de recherche récents sur la dépolymérisation des lignines (Behling <i>et al.</i> , 2016). ....	51
<b>Figure 17</b> : résumé des différentes voies de valorisation des lignines techniques. ....	52
<b>Figure 18</b> : les lignines, résumé des chiffres clés en tonnes par an (Caillol, 2018). ....	53



<b>Figure 19</b> : corrélation entre la production annuelle de lignine (en tonne/an), sa valeur de vente (en €/tonne) et la valeur marchande de ses dérivés en fonction du type de lignines techniques (Gosselink, 2011). .....	55
<b>Figure 20</b> : cycle catalytique des LiP en présence d'alcool vératric (AV) ; VAD = véraldéhyde (Wong, 2009). .....	61
<b>Figure 21</b> : mécanisme d'oxydation d'un dimère modèle de lignine non phénolique de type $\beta$ -O-4 catalysé par des LiP (Wong, 2009). .....	62
<b>Figure 22</b> : cycle catalytique des MnP en présence d'H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> et de manganèse (Wong, 2009). .....	64
<b>Figure 23</b> : cycle catalytique des laccases en présence de dioxygène (Wong, 2009). .....	66
<b>Figure 24</b> : structures et masses moléculaires de trois médiateurs synthétiques de laccase. ..	67
<b>Figure 25</b> : procédés multienzymatiques de dépolymérisation de lignine impliquant (A) des O-Méthyltransférases et des LiP (Pham and Kim, 2014) ou (B) un système LMS, des $\beta$ -étherases et une glutathion-lyase (Picart <i>et al.</i> , 2017). .....	70
<b>Figure 26</b> : domaines d'application des procédés de filtration membranaire en fonction de la taille des particules retenues (Bacchin, 2005). .....	74
<b>Figure 27</b> : les différents modes de fonctionnement en filtration tangentielle. ....	76
<b>Figure 28</b> : les différentes utilisations des procédés membranaires dans le cadre de la production de bioéthanol ; PV : pervaporation. ....	79
<b>Figure 29</b> : schéma du procédé de production de la pâte thermomécanique avec point de prélèvement du filtrat clair (documentation interne de NSG revisitée). .....	100
<b>Figure 30</b> : procédé de filtration utilisé pour le fractionnement du filtrat clair de NSG ; UF : ultrafiltration ; NF : nanofiltration. ....	102
<b>Figure 31</b> : Suivi massique des fractions liquides produites lors du fractionnement du filtrat clair de NSG ; MS : matière sèche. ....	105
<b>Figure 32</b> : opérations unitaires de production et de transformation post-production de la LTM. Les numéros rouges correspondent aux points d'échantillonnage : 1- rétentat lyophilisé ; 2- rétentat concentré ; 3- rétentat atomisé et 4- rétentat liquide autoclavé. ....	134
<b>Figure 33</b> : poudre de LTM produite en sortie d'atomisation. ....	149
<b>Figure 34</b> : conditions réalisées pour les tests de croissance et de contamination avec le rétentat 1 kDa (R1kDa) et les spores de <i>P. chrysosporium</i> . ....	155
<b>Figure 35</b> : photographies des boîtes de Pétriensemencées et contrôles après 7 jours d'incubation dans une étuve à 37 °C. ....	156

<b>Figure 36 :</b> cinétique de production des enzymes lignolytiques par <i>P. chrysosporium</i> au contact de la LTM : activité enzymatique totale (orange), MnP (vert), LiP (bleu) et laccase (rouge).	157
<b>Figure 37 :</b> composition relative du cocktail enzymatique au maximum de production (J3_15h).	159
<b>Figure 38 :</b> photographies des triplicats biologiques de FMS prises avant chaque extraction de cocktail enzymatique sur les 7 jours d'expérimentation.	161
<b>Figure 39 :</b> photographies des boîtes de FMS à pH 4 et pH 7 après 3 jours d'incubation à 37 °C et de leur témoin de contamination.	163
<b>Figure 40 :</b> évolution de l'activité enzymatique totale du cocktail produit par FMS en fonction de la concentration en spores de l'inoculum et du temps de congélation.	164
<b>Figure 41 :</b> témoin analytique et conditions de bioconversion étudiées dans le cadre de la première série d'expériences (SE1).	167
<b>Figure 42 :</b> résultats de SEC associés à la première série d'expériences (SE1) : effet du cocktail enzymatique sur la LTM et impact de l'addition de substrat (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), de cofacteur (Mn) et de médiateurs (ABTS, VA).	169
<b>Figure 43 :</b> témoins analytiques et conditions de bioconversion étudiées dans le cadre de la deuxième série d'expériences (SE2).	171
<b>Figure 44 :</b> résultats de SEC associés à la deuxième série d'expériences (SE2) : impact de l'addition co-solvant (10 % IPA) sur l'effet du cocktail enzymatique vis-à-vis de la LTM.	172
<b>Figure 45 :</b> témoins analytiques et conditions de bioconversion étudiées dans le cadre de la troisième série d'expériences (SE3).	173
<b>Figure 46 :</b> résultats de SEC associés à la troisième série d'expériences (SE3) : effet du cocktail enzymatique sur la LTM en présence d'acide oxalique.	174
<b>Figure 47 :</b> évolution de l'activité enzymatique de la laccase d' <i>Aspergillus sp.</i> (A) à 30°C en fonction du pH puis (B) à pH 4 en fonction de la température.	184
<b>Figure 48 :</b> témoins analytiques et conditions de bioconversion étudiées avec la laccase d' <i>Aspergillus sp.</i> et le rétentat 1 kDa.	185
<b>Figure 49 :</b> résultats de SEC obtenus avec la laccase d' <i>Aspergillus sp.</i> : effet de la laccase seule, en présence de médiateurs ou avec un co-solvant sur la LTM.	187
<b>Figure 50 :</b> structures des produits d'oxydation du β-guaiacyl éther de guaiacyl-glycérol (molécule modèle d'unité phénolique de lignine) par la laccase de <i>Trametes versicolor</i> en présence d'ABTS (Hilgers <i>et al.</i> , 2018).	189

<b>Figure 51 :</b> CCM des échantillons prélevés lors de la bioconversion de la LTM avec la laccase seule (condition A) ; L = lignine Kraft, E = épicatechine, V = vanilline. ....	190
<b>Figure 52 :</b> proposition de montage pour la suite des essais de dépolymérisation de la LTM en réacteur membranaire. ....	218
<b>Figure 53 :</b> schéma du processus général de valorisation d'une ressource résiduaire (A) et état d'avancement du projet de valorisation de la LTM (B). ....	226
<b>Figure 54 :</b> schéma d'assemblage d'une cellule d'ultrafiltrion Amicon®. ....	230
<b>Figure 55 :</b> résultats de SEC associés aux extraits de FMS du jour 1 au jour 7. ....	240
<b>Figure 56 :</b> CCM des extraits de FMS à 15 heures, du jour 1 au jour 7 (le numéro inscrit en légende sous les dépôts correspond au jour de fermentation). De la lignine Kraft (L), de la vanilline (V) et de l'épicatechine (E) ont été déposées en tant que standards et un extrait de boîte de FMS non inoculée sert de témoin (T) de composition initiale des géloses. ....	241

## LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1 :</b> composition pariétale de différentes biomasses lignocellulosiques (Isikgor and Becer, 2015). .....	10
<b>Tableau 2 :</b> compositions des principales hémicelluloses constituant les bois de feuillus et de résineux (M. Rowell, 2012).....	15
<b>Tableau 3 :</b> quelques exemples de structures et de propriétés des grandes familles d'extractibles (De Cherisey, 2015; Gerardin, 2019). .....	22
<b>Tableau 4 :</b> caractéristiques structurales et propriétés des principales lignines techniques....	37
<b>Tableau 5 :</b> principaux paramètres de fonctionnement de la filtration membranaire. ....	75
<b>Tableau 6 :</b> composition des filtrats clairs de NSG et de deux eaux de procédés suédoises. * (Courbalay, 2018) ** (Persson <i>et al.</i> , 2010) *** (Krawczyk and Jönsson, 2011).....	101
<b>Tableau 7 :</b> membranes et paramètres de filtrations utilisés lors de la montée en échelle. ..	104
<b>Tableau 8 :</b> exemples de production d'enzymes lignolytiques par des champignons de pourriture blanche en FMS ; lac = activité laccase, AV = alcool vératrique. ....	160
<b>Tableau 9 :</b> conditions opératoires de FMS étudiées pour la production du cocktail enzymatique par <i>P. chrysosporium</i> . .....	162
<b>Tableau 10 :</b> activités enzymatiques du cocktail produit pour SE1. ....	168
<b>Tableau 11 :</b> activités enzymatiques du cocktail produit pour SE2. ....	170
<b>Tableau 12 :</b> activités enzymatiques du cocktail produit pour SE3. ....	175
<b>Tableau 13 :</b> comparaison des différentes productions de cocktails enzymatiques par FMS. ....	176
<b>Tableau 14 :</b> comparaison des conditions de bioconversion avec la littérature. ....	177
<b>Tableau 15 :</b> évolution des masses moléculaires moyennes de la LTM en fonction du temps et des conditions de bioconversion.....	189



## LISTE DES ABREVIATIONS

---

<b>ABTS</b>	Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)
<b>AE</b>	Activité enzymatique
<b>AV</b>	Alcool vératrique
<b>CCM</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>DMP</b>	2,6-diméthoxyphénol
<b>FMS</b>	Fermentation en milieu solide
<b>GGM</b>	galactoglucomannane
<b>IPA</b>	Isopropanol
<b>LCC</b>	Complexes de lignine et d'hydrates de carbone ou « Lignin Carbohydrate Complexe » en anglais
<b>LiP</b>	Lignine-peroxydase
<b>LMS</b>	Système laccase/médiateur ou « Laccase Mediator System » en anglais
<b>LTM</b>	Lignine thermomécanique
<b>MF</b>	Microfiltration
<b>MnP</b>	Manganèse-peroxydase
<b>MS</b>	Matière sèche
<b>Mw</b>	Masse moléculaire ou « Molecular weight » en anglais
<b>MWL</b>	Lignine de Björkman ou « Milled Wood Lignin » en anglais
<b>NF</b>	Nanofiltration
<b>NSG</b>	Norske Skog Golbey
<b>OI</b>	Osmose inverse
<b><i>P. chrysosporium</i></b>	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>
<b>PES</b>	Polyéthersulfone
<b>PTM</b>	Pression transmembranaire
<b>PV</b>	Pervaporation
<b>RMN</b>	Résonance magnétique nucléaire
<b>SE1 à 4</b>	Série d'expériences n° 1 à 4
<b>SEC</b>	Chromatographie d'exclusion stérique ou « Size Exclusion Chromatography » en anglais
<b>UF</b>	Ultrafiltration
<b>VA</b>	Acide violurique



# Introduction générale





## INTRODUCTION GENERALE

L'ensemble des travaux de cette thèse porte sur la valorisation de la lignine thermomécanique dissoute dans les effluents de la papèterie Norske Skog, située à Golbey dans les Vosges (NSG). Cette entreprise, leader européen dans la production de papier journal, s'est inscrite depuis plusieurs années dans une démarche d'économie circulaire favorisant les circuits courts et le développement de la bioéconomie. Cette démarche se traduit par la mutualisation d'actifs, de savoir-faire, de flux de matières et d'énergie entre la papèterie et différents acteurs industriels dans le domaine des éco-matériaux, de la chimie du végétal et de l'énergie verte. Cette synergie permet de réduire substantiellement l'impact environnemental du consortium industriel tout en générant des réels bénéfices économiques pour les entreprises engagées. Afin de résister à la chute de la demande en papier tout en maîtrisant son empreinte carbone, NSG a décidé d'investir dans la création de nouveaux revenus grâce à la valorisation de ses coproduits et travaille en étroite collaboration avec différents laboratoires de recherche et centres universitaires.

Le procédé thermomécanique, utilisé par NSG, consiste à transformer la matière bois en pâte à papier en lui appliquant un traitement thermique à la vapeur d'eau (étuvage : 100 à 160 °C) suivi par un traitement mécanique de défibrage et de raffinage sous pression (4 à 5 bars). Les coproduits générés se retrouvent majoritairement sous forme dissoute à de très faibles concentrations dans les eaux de procédé. Ces eaux, d'abord mise en recirculation puis traitées en station d'épuration, représentent d'importants flux, de l'ordre de 700 à 3000 m<sup>3</sup> par jour. L'équipe de « Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire » (RePSeM), de l'institut mixte et pluridisciplinaire de recherche Huber Curien à Strasbourg, a identifié en 2014 le potentiel de valorisation de ces effluents. En effet, ils contiennent une grande variété de molécules valorisables parmi lesquelles des composés phénoliques dont les multiples propriétés suscitent un intérêt industriel croissant dans le contexte de la bioéconomie.

Les procédés membranaires, domaine d'expertise du RePSeM, sont particulièrement adaptés au traitement de larges volumes d'effluents très dilués. Ils permettent d'extraire par filtration les coproduits à valoriser tout en régénérant de l'eau de qualité industrielle réutilisable par le papetier. En 2014 démarre ainsi le projet REVA COPPA dont l'objectif est le développement d'un procédé de filtration membranaire innovant permettant la récupération

et la concentration des composés phénoliques dissouts dans les eaux de NSG. L'absence d'utilisation de produits chimiques lors du procédé papetier garantie une haute qualité des composés ainsi récupérés qui peuvent de ce fait répondre à des chartes exigeantes de type « label vert ». Le projet REVA COPPA est un projet de recherche appliquée qui réunit différents acteurs dont des laboratoires de recherche académiques et des partenaires industriels dans une démarche d'accompagnement à la mutation des industries papetières par le développement de nouvelles filières de valorisation.

Ce sujet de thèse s'inscrit dans la continuité de ce projet en s'intéressant tout particulièrement à une catégorie de biomolécules aromatiques dissoute dans les effluents de NSG : la lignine. La lignine est un polymère phénolique largement distribué dans le règne végétal constituant avec la cellulose et les hémicelluloses les parois cellulaires de la biomasse lignocellulosique. Un grand enjeu résulte de sa valorisation industrielle puisqu'elle représente l'une des sources naturelles les plus abondantes de composés aromatiques pouvant permettre le développement de biomolécules et de biomatériaux alternatifs aux actuels dérivés pétrochimiques. Comme le soulignera la revue bibliographique présentée en chapitre 1 du manuscrit, très peu d'informations existent dans la littérature au sujet de la lignine présente dans les eaux de procédé de papeteries thermomécaniques. L'intégralité du travail se rapportant à sa valorisation est à mener, incluant sa caractérisation structurale, pour l'évaluation de son potentiel ainsi que la mise en place de procédés de transformation conduisant à ses différentes applications. C'est pour répondre à cette problématique qu'a été pensé et réalisé l'ensemble des expérimentations de cette thèse.

Dans un premier temps, le procédé de fractionnement membranaire, développé dans le cadre du projet REVA COPPA et permettant la récupération de la lignine dissoute dans l'effluent papetier, a été appliqué à l'échelle pilote en mode semi-continu pour la production d'un lot référent de lignine, appelée tout au long de ce manuscrit lignine thermomécanique (LTM). Par la suite, un travail de caractérisation analytique détaillé a été mené sur la LTM dans le but de générer des données structurales essentielles à l'évaluation de son potentiel de valorisation. Cette partie expérimentale a été largement facilitée grâce à la codirection mise en place pour l'encadrement de cette thèse avec le Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois (Lermab) de l'Université de Lorraine. Son expertise dans le domaine de l'étude des biopolymères du bois ainsi que sa large gamme d'équipements analytiques dédiée à cette fonction ont été essentiels à la réalisation de cette thèse. L'ensemble des résultats de production et de caractérisation sont présentés en chapitre 2 du manuscrit.

D'après les données analytiques générées, deux voies de valorisation de la LTM ont été envisagées : sa valorisation directe par intégration de la LTM dans des produits finaux des secteurs de la détergence, de la cosmétique et de la phytopréservation, ainsi que sa valorisation par dépolymérisation pour la production de composés phénoliques de faibles masses moléculaires à haute valeur ajoutée. La possibilité de valorisation directe de la LTM a été externalisée par l'envoi d'échantillons à des entreprises partenaires portées sur l'évaluation d'efficacité de biomolécules. Toutefois, des procédés de transformation post-production (concentration, déshydratation et stérilisation) ont été d'abord appliqués à la LTM au laboratoire afin d'assurer sa bonne conservation et de faciliter son transport ainsi que son stockage. Une étude a été menée dans le cadre de cette thèse afin d'évaluer l'impact de ces procédés sur la structure de la LTM finalement produite. Les résultats de cette étude sont présentés en chapitre 3 du manuscrit.

La valorisation de la lignine par dépolymérisation a, quant à elle, été intégralement étudiée en interne et fait l'objet des résultats présentés en chapitre 4 et 5 du manuscrit. Une approche écoresponsable a été adoptée favorisant l'utilisation de catalyseurs enzymatiques pour la dépolymérisation de la LTM. Ces catalyseurs, actifs en milieu aqueux à des températures proches de la température ambiante, permettent de réaliser des bioconversions en conditions opératoires douces limitant la consommation énergétique du procédé et l'utilisation de solvants. Ces conditions douces ont également permis d'orienter les recherches vers le développement d'un bioréacteur membranaire permettant l'extraction *in-situ* des composés phénoliques de faibles masses moléculaires produits lors de la dépolymérisation de la LTM, comme détaillé en toute dernière partie du manuscrit.

Une représentation visuelle et schématique de l'agencement des travaux couverts dans le cadre de cette thèse est proposée en Figure 1, en complément de cette introduction.

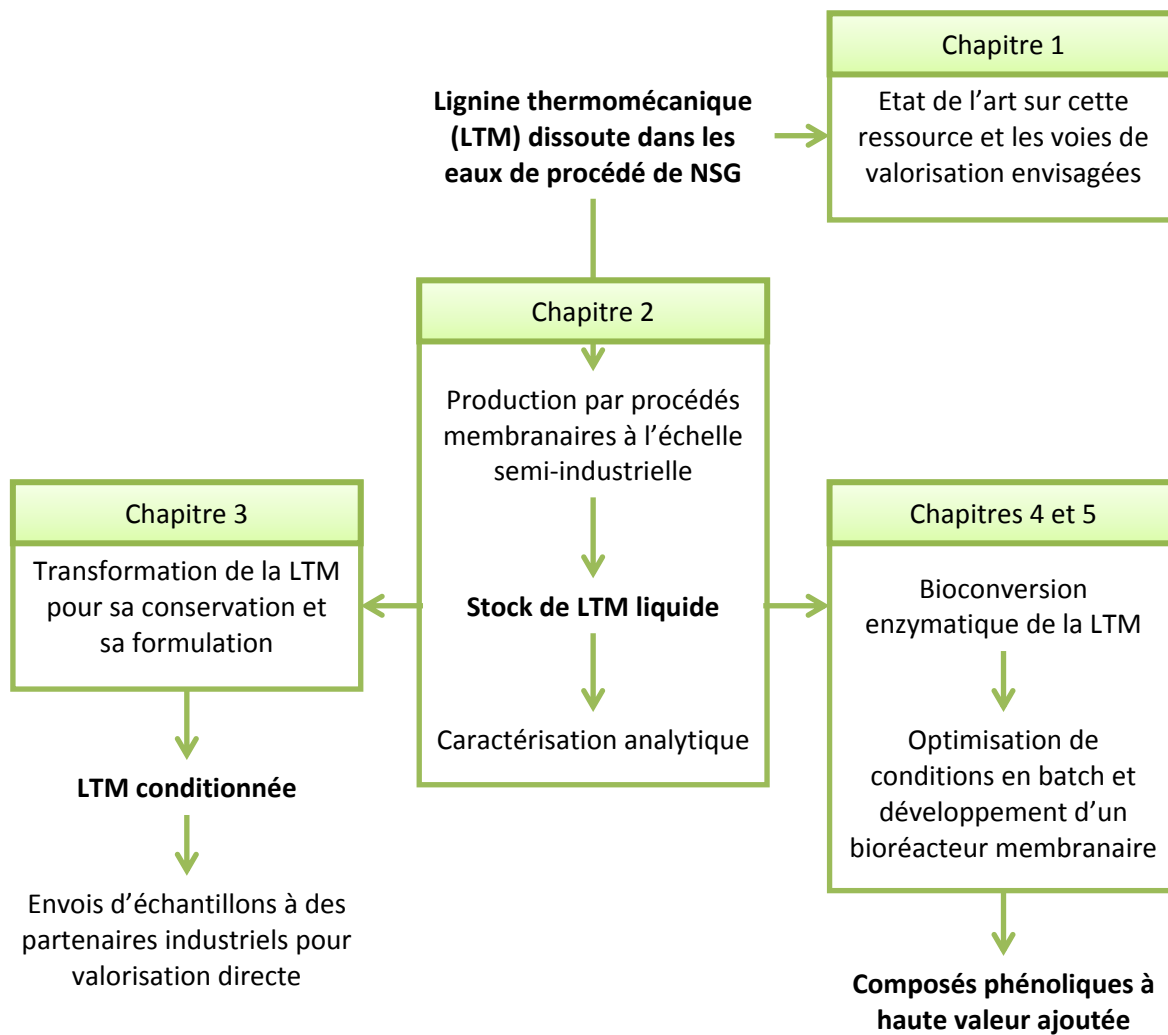


Figure 1 : schéma récapitulatif des travaux menés dans le cadre de cette thèse et de l'organisation du manuscrit.

# Chapitre 1



# CHAPITRE 1 / ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Ce chapitre d'introduction est consacré à une étude de la littérature récente sur les thèmes de la lignine, des enzymes lignolytiques et des procédés membranaires en bioraffinerie. Chaque thème est abordé dans une partie indépendante. L'ensemble de ces parties constitue la base des connaissances sur laquelle s'est appuyé ce projet de thèse afin de définir une stratégie de valorisation pour la lignine thermomécanique.

## 1. SOURCES, DIVERSITE ET VALORISATION DES LIGNINES TECHNIQUES

### 1.1. ORIGINES DES LIGNINES TECHNIQUES

#### 1.1.1. *La biomasse lignocellulosique*

La biomasse est définie par la loi n°2005-781 du 13 Juillet 2005 sur la politique française de transition énergétique comme « la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers ». Il s'agit ainsi de l'ensemble de la matière organique d'origine animale et végétale sur Terre (Morot-Gaudry, 2016).

Parmi les sources de biomasses végétales, l'une des plus abondantes est la biomasse lignocellulosique qui assimile près de 59 milliards de tonnes de carbone par an pour sa croissance (Morot-Gaudry, 2016). Elle correspond à l'ensemble des plantes vasculaires dont la paroi cellulaire est constituée de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine. Sur le plan industriel, elle comprend à la fois les produits issus de la culture et de la transformation de ces plantes ainsi que les coproduits ou déchets biodégradables associés. Parmi ces derniers, il est possible de citer les coproduits agricoles tels que les pailles de blé, les balles de riz, les tiges de coton, ou encore la bagasse de canne à sucre; les coproduits forestiers sous forme de sciures, de plaquettes, de granulés ou d'écorces ainsi que les coproduits et effluents des industries de transformation de matières végétales tels que les résidus de papeteries ou d'industries agroalimentaires (Bichat and Mathis, 2013). Cette biomasse regroupe des plantes ligneuses (arbres, arbustes, arbrisseaux) ainsi que des plantes herbacées qui se différencient par leurs teneurs en constituants pariétaux.



Quelques exemples de biomasses lignocellulosiques et de leur composition pariétale sont présentés dans le Tableau 1.

*Tableau 1 : composition pariétale de différentes biomasses lignocellulosiques (Isikgor and Becer, 2015).*

Biomasse lignocellulosique		Cellulose (%)	Hemicelluloses (%)	Lignine (%)
<b>Feuillus</b>	Bois de peuplier	50,8–53,3	26,2–28,7	15,5–16,3
	Bois de chêne	40,4	35,9	24,1
	Bois d’eucalyptus	54,1	18,4	21,5
<b>Résineux</b>	Bois de pin	42,0–50,0	24,0–27,0	20,0
	Bois de douglas	44,0	11,0	27,0
	Bois d’épicéa	45,5	22,9	27,9
<b>Résidus agricoles</b>	Paille de blé	35,0–39,0	23,0–30,0	12,0–16,0
	Balle d’orge	34,0	36,0	13,8–19,0
	Paille d’orge	36,0–43,0	24,0–33,0	6,3–9,8
	Paille de riz	29,2–34,7	23,0–25,9	17,0–19,0
	Balle de riz	28,7–35,6	12,0–29,3	15,4–20,0
	Paille d’avoine	31,0–35,0	20,0–26,0	10,0–15,0
	Rafle de maïs	33,7–41,2	31,9–36,0	6,1–15,9
	Tige de maïs	35,0–39,6	16,8–35,0	7,0–18,4
	Bagasse de canne à sucre	25,0–45,0	28,0–32,0	15,0–25,0
	Paille de sorgho	32,0–35,0	24,0–27,0	15,0–21,0

La cellulose, les hémicelluloses et la lignine sont les macromolécules responsables des propriétés physiques et mécaniques de la biomasse lignocellulosique. Ces trois polymères sont étroitement enchevêtrés par l’intermédiaire de liaisons faibles et de liaisons covalentes et forment la paroi des cellules végétales de la biomasse lignocellulosique. La Figure 2 schématise la composition à l’échelle cellulaire et macromoléculaire de cette biomasse. Traditionnellement, les constituants chimiques de cette biomasse sont classés en deux groupes distincts comprenant d’une part les composés pariétaux, qui représentent la majeure partie de la matière sèche de la biomasse, et d’autre part les substances intracellulaires appelées « extractibles » qui sont issues du métabolisme secondaire.

Les paragraphes qui suivent présentent une description détaillée de la structure, du rôle et des propriétés de chacun de trois polymères pariétaux ainsi qu'une brève présentation des principales familles d'extractibles. Cette thèse portant plus particulièrement sur la valorisation d'un coproduit issu de bois, un grand nombre d'exemples cités font référence à cette source de biomasse lignocellulosique.

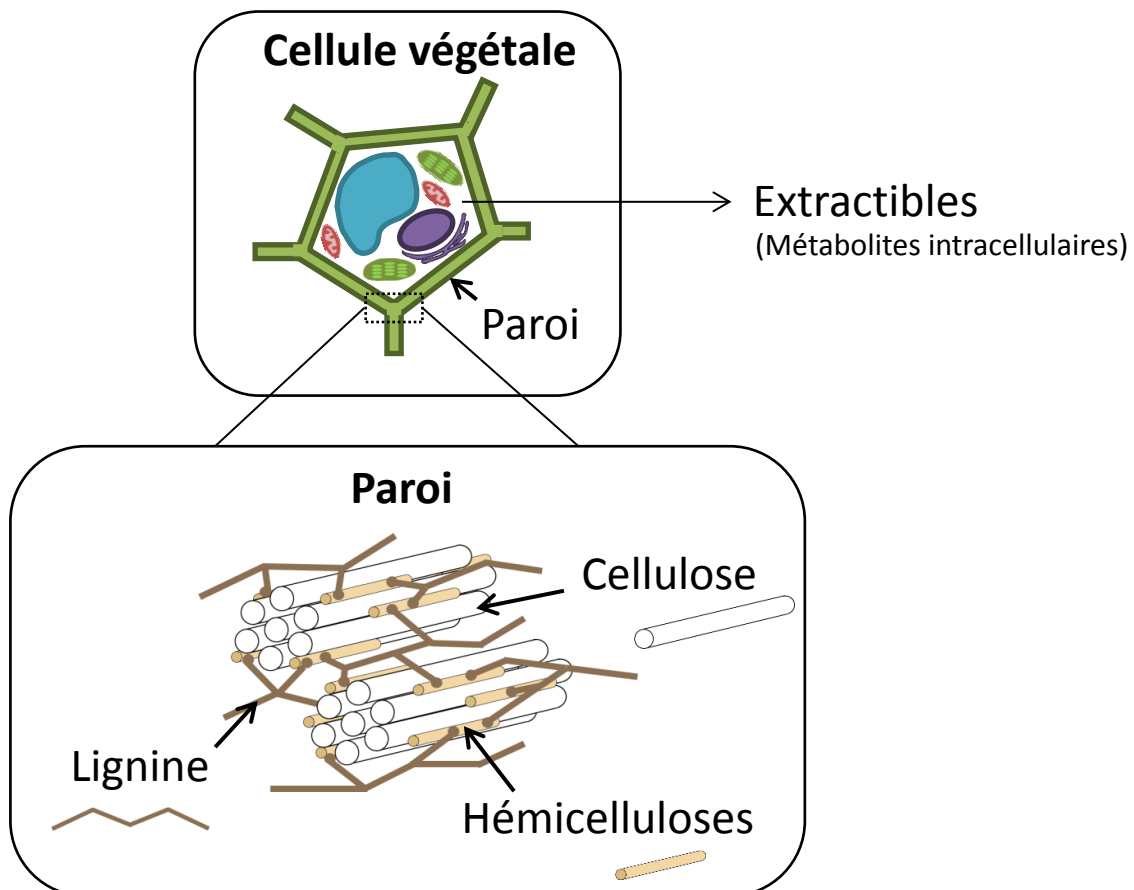


Figure 2 : schéma de la biomasse lignocellulosique à l'échelle cellulaire et macromoléculaire (Isikgor and Becer, 2015).

#### 1.1.1.1. La cellulose

La cellulose est le constituant principal de la biomasse lignocellulosique non transformée. Il s'agit d'un homopolymère linéaire constitué de molécules de D-glucose reliées entre elles par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4). Structuralement, le motif de base qui se répète est un dimère appelé cellobiose, représenté en Figure 3. Le degré de polymérisation de la cellulose, qui fait référence au nombre d'unités de glucose dans la molécule, est très variable en fonction de son origine. Il est estimé, pour exemple, à environ 10 000 pour la cellulose du bois ce qui correspondrait à des fibres d'environ 5  $\mu$ m (M. Rowell, 2012).

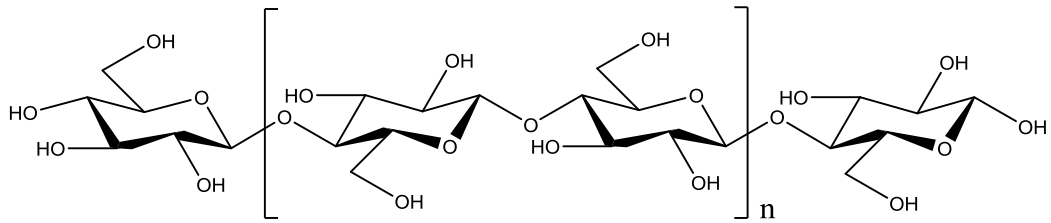


Figure 3 : le cellobiose : unité de base de la cellulose.

Grâce aux nombreux groupements hydroxyles présents à leurs surfaces, les molécules de cellulose peuvent former de nombreuses liaisons hydrogènes intra et intermoléculaires. Ces liaisons hydrogènes permettent aux chaînes de cellulose de s'assembler sous forme de fibres selon différents niveaux d'arrangements successifs comme présenté en Figure 4. Tout d'abord, les molécules de cellulose s'assemblent sous forme de faisceaux, d'une quarantaine de molécules, appelés fibrilles élémentaires. En fonction de leur compaction, ces fibrilles peuvent adopter différentes conformations alternant ainsi la présence de régions amorphes et cristallines (Fengel and Wegener, 2011). Les régions cristallines rendent la cellulose insoluble dans l'eau et particulièrement résistante aux attaques chimiques. Les régions amorphes, moins denses, laissent quant à elles l'eau pénétrer dans les fibrilles et sont de ce fait des régions plus sensibles aux attaques enzymatiques et chimiques (De Cherisey, 2015). Les fibrilles élémentaires s'assemblent à leur tour par le biais de liaisons hydrogènes directes ou impliquant des molécules d'eau pour former des microfibrilles de cellulose qui elles-mêmes se regroupent sous forme de fibres.

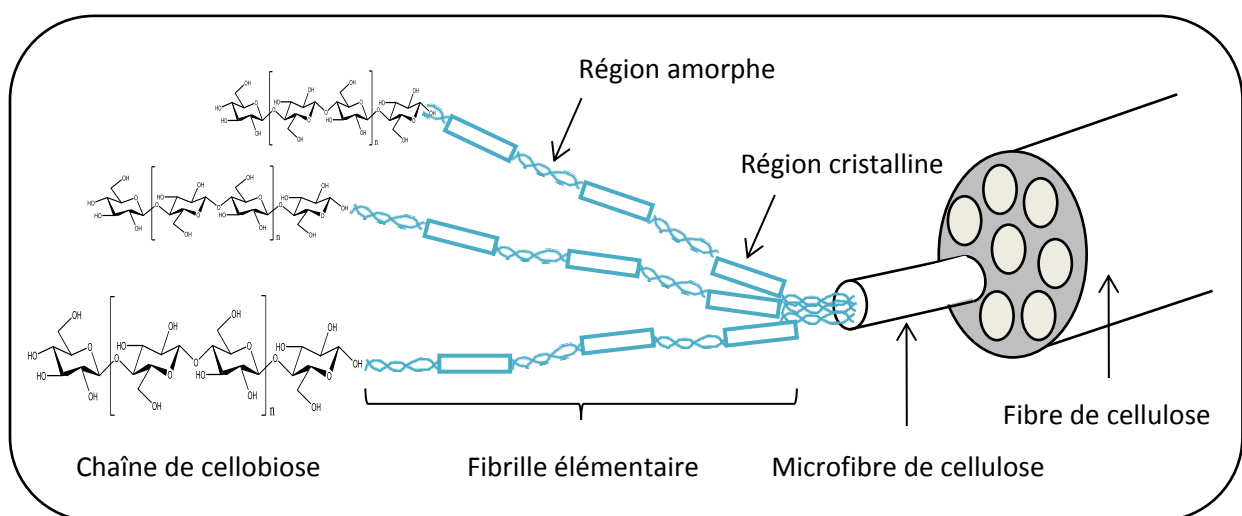


Figure 4 : les différents niveaux d'arrangement de la cellulose (Lavoine et al., 2012).

Les fibres de cellulose se présentent à l'échelle macroscopique sous la forme d'un matériau blanc duveteux. Le coton est l'exemple le plus pur de cellulose retrouvé à l'état naturel puisqu'il est composé à plus de 90 % de fibres de cellulose (McCall and Jurgens, 1951).

### 1.1.1.2. Les hémicelluloses

Les hémicelluloses constituent une famille hétérogène de polysaccharides formant une matrice autour des fibres de cellulose. Avec cette dernière, elles forment la fraction glucidique des parois végétales appelée holocellulose. Il existe différents types d'hémicelluloses en fonction de leur composition. En effet, contrairement à la cellulose, plusieurs monomères entrent dans la constitution des hémicelluloses. Elles peuvent contenir à la fois des pentoses, monomères à 5 carbones tels que l'arabinose ou le xylose, des hexoses, monomères à 6 carbones incluant le glucose, le mannose et le galactose, ainsi que des désoxyhexoses comme le rhamnose et le fucose et certains acides uroniques (De Cherisey, 2015). Les structures de l'ensemble de ces monomères sont présentées en Figure 5.

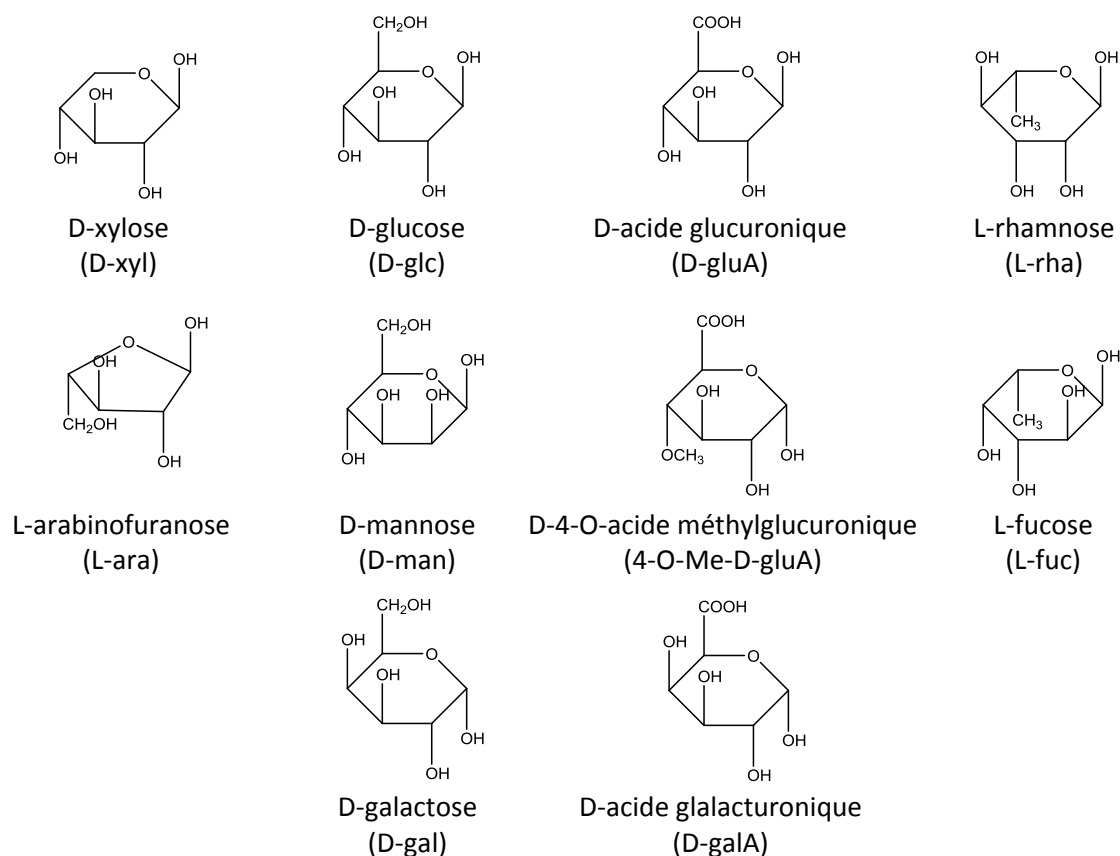


Figure 5 : structures chimiques des monomères de sucre constituant les hémicelluloses (De Cherisey, 2015).



Tableau 2 : compositions des principales hémicelluloses constituant les bois de feuillus et de résineux (M. Rowell, 2012).

	Type d'hémicellulose Degré de polymérisation	Pourcentage du bois	monomères	Ratio molaire	liaison
<i>Principales hémicelluloses du bois de feuillus</i>	Glucuronoxylane 200	15-30	D-xyl	10	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
			4-O-Me-D-gluA	1	$\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2
			Acétyle	7	
	Glucomannane 200	2-5	D-man D-glc	1-2 1	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
<i>Principales hémicelluloses du bois de résineux</i>	Galactoglucomannane 100	5-8	D-man	3	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
			D-glc	1	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
			D-gal	1	$\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6
	Galactoglucomannane 100	10-15	D-man	4	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
			D-glc	1	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
			D-gal	0,1	$\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6
			Acétyle	1	
	Arabinoglucuronoxylane 100	7-10	D-xyl	10	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4
			4-O-Me -D-gluA	2	$\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2
			L-ara	1,3	$\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2
Arabinogalactane 200	5-35	D-gal	6	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 4	
		L-ara	2-3	$\alpha$ 1 $\rightarrow$ 6	
		D-ara	1-3	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 3	
		D-gluA	trace	$\beta$ 1 $\rightarrow$ 6	

De par leur structure amorphe, les hémicelluloses sont solubles en milieu aqueux basique et facilement hydrolysables en milieu acide. Elles sont également sensibles à la chaleur qui catalyse la rupture des liaisons éther de leurs groupements acétyles en milieu aqueux. Cette réaction entraîne alors une libération d'acide acétique dans le milieu qui diminue le pH environnant et catalyse la rupture des liaisons glycosidiques (Kapu and Trajano, 2014). Ce phénomène d'autohydrolyse est proportionnel à l'augmentation de la température et devient particulièrement important à des températures proches de 170-180 °C (Giummarella and Lawoko, 2017). La dépolymérisation des hémicelluloses peut également être catalysée lors de procédés thermiques à sec, tels que la pyrolyse, à des températures plus élevée de l'ordre de 200-250 °C. En même temps que la dépolymérisation, les monomères libérés sont également dégradés par réarrangement du cycle et déshydratation formant des dérivés de furane tels que le 5-hydroxyméthylfurfural (HMF) et le furfural dont les structures et voies de production sont représentées en Figure 7 (Candelier *et al.*, 2016; Lei *et al.*, 2019).

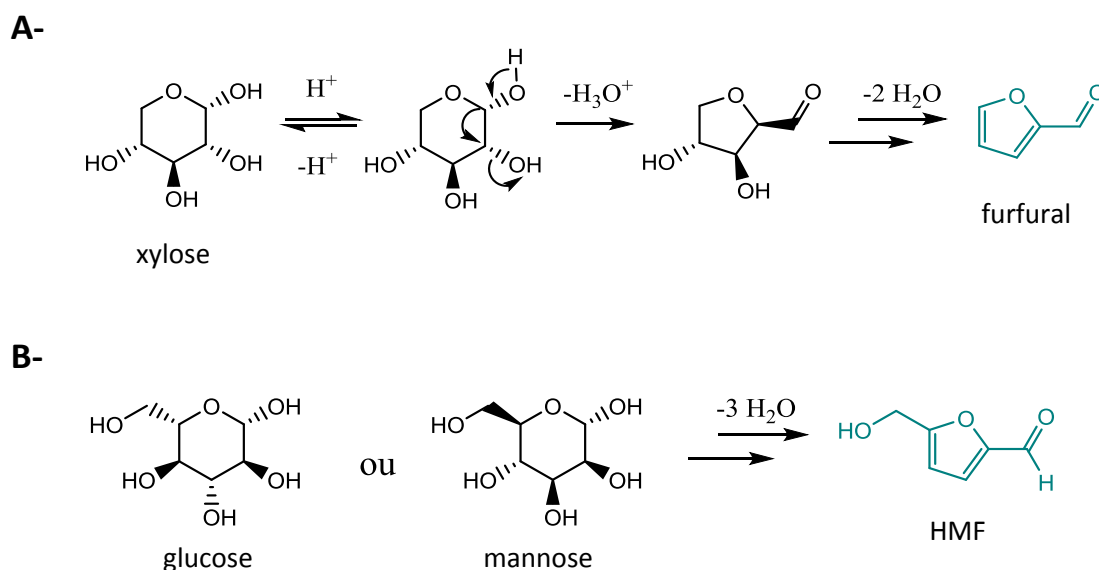


Figure 7 : réactions menant à la production de furfural (A) et de HMF (B) à partir des monomères de sucre (Brandt-Talbot et al., 2017).

### 1.1.1.3. La lignine

A la différence des deux polymères précédents composés de sucres, la lignine est un polymère constitué de molécules aromatiques. Il s'agit d'un polymère hétérogène, hydrophobe, rigide et cassant, constituant les parois cellulaires de toutes les plantes vasculaires. La lignine joue un rôle de ciment dans la paroi végétale en s'associant aux molécules d'hémicelluloses pour envelopper et fixer les fibres de cellulose. Elle est le deuxième composant principal de la biomasse lignocellulosique. Sa masse cumulée avec celle de la cellulose représente environ 70 % de la biomasse totale (De Cherisey, 2015).

Le terme « lignine » dérive du mot « lignum » qui signifie « bois » en latin (Wong, 2009). En effet, la lignine est un composant essentiel du matériau bois et lui confère la plupart de ses propriétés mécaniques, notamment de résistance. La lignification est un processus fondamental dans l'évolution des plantes terrestres qui apporte la rigidité nécessaire au tissu végétal pour assurer son port dressé et sa croissance en hauteur, optimisant de ce fait la réception de l'énergie lumineuse. La présence de lignine rend également la surface des parois hydrophobes et résistantes à l'eau ce qui a permis le développement de canaux de conduction dédiés au transport de la sève et assure une protection des polysaccharides pariétaux contre les attaques microbiologiques (Vanholme *et al.*, 2010).

Actuellement, malgré plus de 50 ans de recherche, la structure exacte de la lignine au sein de la biomasse lignocellulosique, appelée lignine *in-situ*, lignine native ou encore protolignine, reste floue. Bien que des techniques de marquages et d'imageries permettent d'étudier sa localisation ainsi que son accumulation au sein des végétaux (Coletta *et al.*, 2013; Schmidt *et al.*, 2009), de nombreuses techniques analytiques permettant sa caractérisation chimique impliquent en amont sa dégradation ou sa séparation des autres composants de la paroi lignocellulosique. Différents procédés peuvent être utilisés à cet effet, cependant, les lignines obtenues sont alors partiellement dégradées ou chimiquement modifiées et leurs propriétés diffèrent de celles de la structure native (M. Rowell, 2012).

D'un point de vue chimique, la lignine peut être définie comme une molécule complexe et ramifiée, formée à partir de trois précurseurs phénylpropanoïques de base : les alcools para-coumarylique, coniférylique et sinapylique. Ces précurseurs, également appelés monolignols, définissent respectivement les unités hydroxyphényles (H), guaïacyles (G) et syringyles (S) permettant de décrire la lignine (De Cherisey, 2015). L'ensemble de ces structures sont présentées en Figure 8. Les carbones du noyau aromatique sont numérotés de 1 à 6, et ceux de la chaîne propanoïde sont appelés C $\alpha$ , C $\beta$  et C $\gamma$ . Différents groupements chimiques de type phénols, alcools, aldéhydes, cétones ou encore méthoxyles fonctionnalisent ces unités.

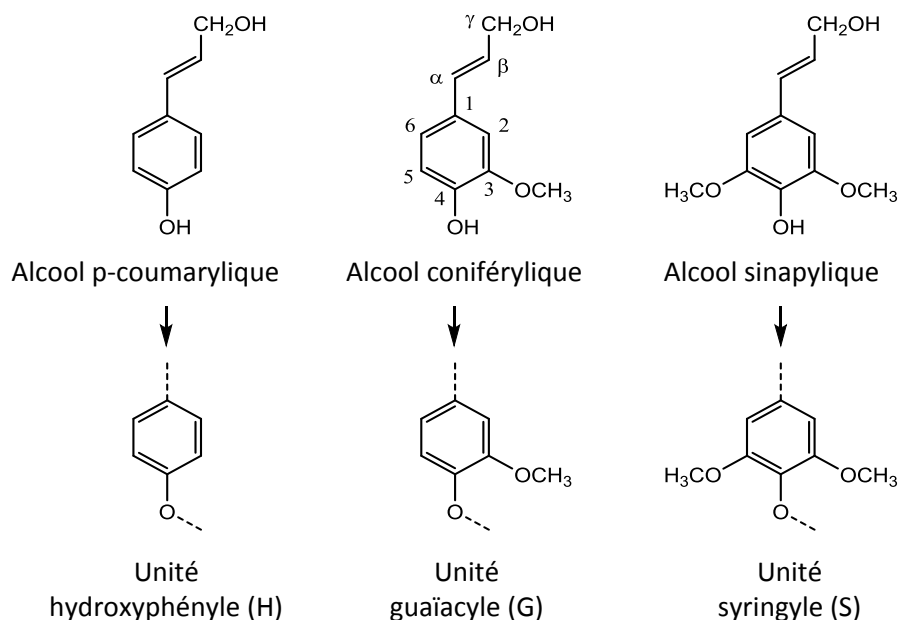


Figure 8 : structures des alcools phénylpropanoïques et des unités phénoliques de bases constituant la lignine.



Les monolignols sont synthétisés au sein des cellules végétales puis transportés à l'extérieur de la membrane plasmique où ils sont oxydés par des systèmes pluri-enzymatiques sous la forme de radicaux phénoxy. La synthèse de la lignine se fait ensuite par polymérisation radicalaire et mène à une grande diversité de liaisons inter-unités (Vanholme *et al.*, 2010). La Figure 9 illustre les principales liaisons identifiées au sein de la lignine. La liaison  $\beta$ -O-4, de type éther (C-O-C), est dite labile car la polarisation induite par l'atome d'oxygène facilite la rupture de cette liaison. Toutes les autres liaisons, de type carbone-carbone (C-C), sont dites condensées car elles sont beaucoup plus stables et résistantes à la dégradation chimique ou physique.

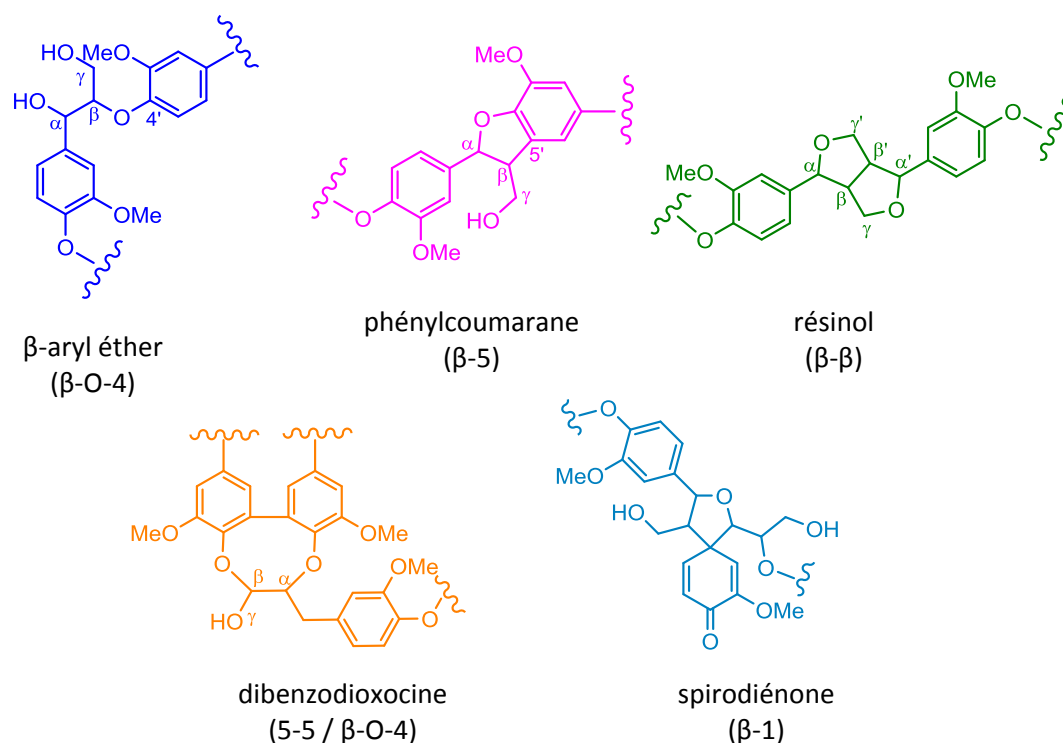


Figure 9 : structures des principales liaisons inter-unités rencontrées au sein de la lignine (Boerjan *et al.*, 2003 ; Giummarella *et al.*, 2019 ; Vanholme *et al.*, 2010).

L'abondance relative de chacune de ces liaisons dépend de la nature chimique des monomères polymérisés ainsi que des conditions dans la paroi cellulaire. Toutefois, les radicaux de monolignols, stabilisés par leur structure conjuguée, favorisent leur couplage en position  $\beta$  ce qui conduit principalement à la formation de liaisons  $\beta$ - $\beta$ ,  $\beta$ -O-4 et  $\beta$ -5, la liaison éther  $\beta$ -O-4 étant la plus fréquente (Boerjan *et al.*, 2003).

Un très grand nombre de structures complexes peuvent ainsi découler de l'assemblage radicalaire des différents monolignols et répondre à la définition chimique très générale de la lignine. Il est de ce fait préférable de parler de lignines au pluriel afin de représenter toute cette diversité.

Ceci est d'autant plus vrai que, à la complexité chimique de base des lignines, s'ajoute également une variabilité structurale d'origine biologique. En effet, tout comme pour les hémicelluloses, la composition et la structure des lignines varient en fonction des espèces végétales et même en fonction de leur localisation spatiale au sein d'une plante donnée. Pour reprendre l'exemple du bois, les lignines de résineux sont constituées presque exclusivement d'unités phénoliques G, avec quelques unités H, alors que les lignines de feuillus comprennent à la fois des unités G et S. De ce fait, les lignines de résineux présentent une teneur en groupements méthoxy de l'ordre de 15 à 16 % alors que les lignines de feuillus en contiennent 21 % (M. Rowell, 2012). De plus, les lignines uniquement composées d'unités G contiennent plus de liaisons intramoléculaires condensées que les lignines incorporant des unités S à cause de la disponibilité de leur position C5 pour les réactions de couplage (Boerjan *et al.*, 2003).

Des questions subsistent encore concernant l'organisation spatiale des lignines *in-situ*. En revanche, il est de nos jours reconnu que les lignines se fixent aux hémicelluloses pariétales par le biais de liaisons covalentes pour former le ciment composite qui assure la stabilité des cellules végétales (Giummarella *et al.*, 2019). Ces complexes covalents de lignines et d'« hydrates de carbones » sont plus connus sous leur acronyme anglais LCCs pour « Lignin-Carbohydrates Complexes ». La Figure 10 illustre les différentes liaisons covalentes qui forment ces complexes. Le type de liaison reliant les lignines aux hémicelluloses est dépendent de la nature du monosaccharide engagé dans la liaison. Cette distribution s'explique par la conformation plus favorable de certains sucres à s'engager dans l'une ou l'autre des liaisons représentées. Par exemple, dans le bois d'épicéa, il a été rapporté que le xylose est principalement engagé dans les liaisons de type benzyl-éther alors que le mannose est impliqué dans les liaisons de type phényl-glucoside (Giummarella *et al.*, 2016).

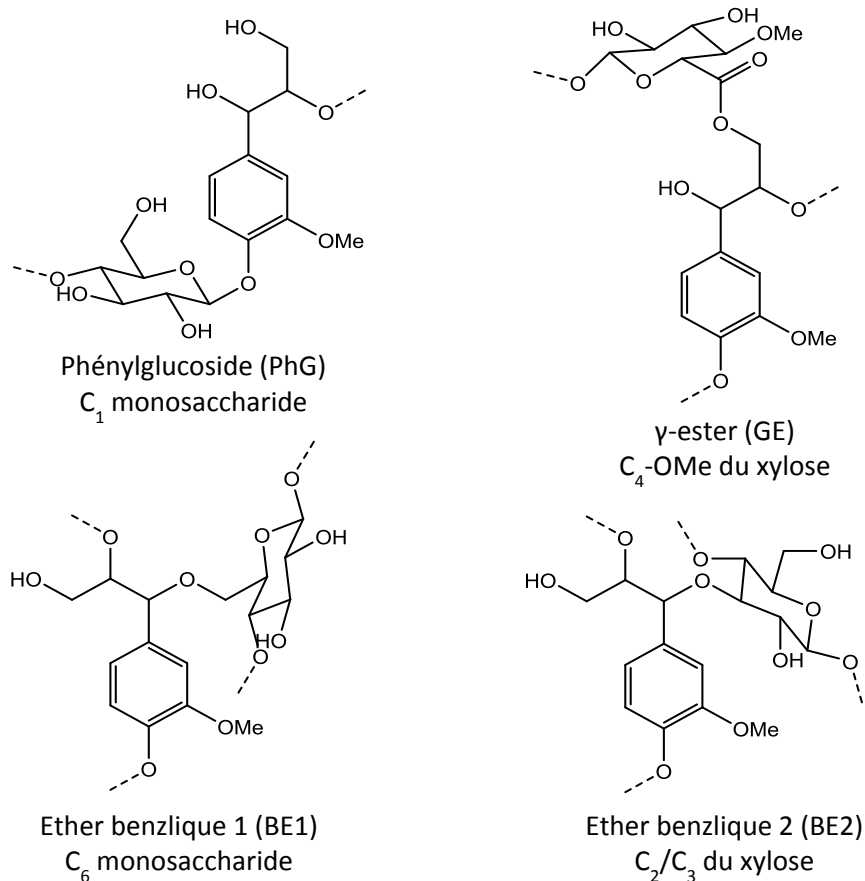


Figure 10 : structures des principales liaisons covalentes qui composent les LCCs (Giummarella et al., 2019).

Un exemple de structure de lignine native de résineux incluant ses interactions avec les hémicelluloses est proposé en Figure 11. Sur ce schéma, l'ensemble des fonctions phénoliques de la lignine sont engagées dans des liaisons inter-unités ou avec les hémicelluloses environnantes. Toutefois, *in-situ*, certaines unités des lignines natives présentent des fonctions phénoliques libres. Elles sont alors souvent distinguées des unités non-phénoliques de lignine à cause de leur différence de réactivité, notamment lors de leur dépolymérisation enzymatique qui sera abordée plus loin dans ce chapitre. Les unités phénoliques constituent environ 10 à 20 % de la structure des lignines natives contre 80 à 90 % pour les unités non-phénoliques (Cañas and Camarero, 2010).

A l'échelle macromoléculaire, la conjugaison des fonctions chimiques et des noyaux aromatiques des lignines est responsable de leurs propriétés d'absorption des rayonnements UV et visibles. Les lignines sont ainsi caractérisées par une couleur brune et sont responsables de la coloration du bois.

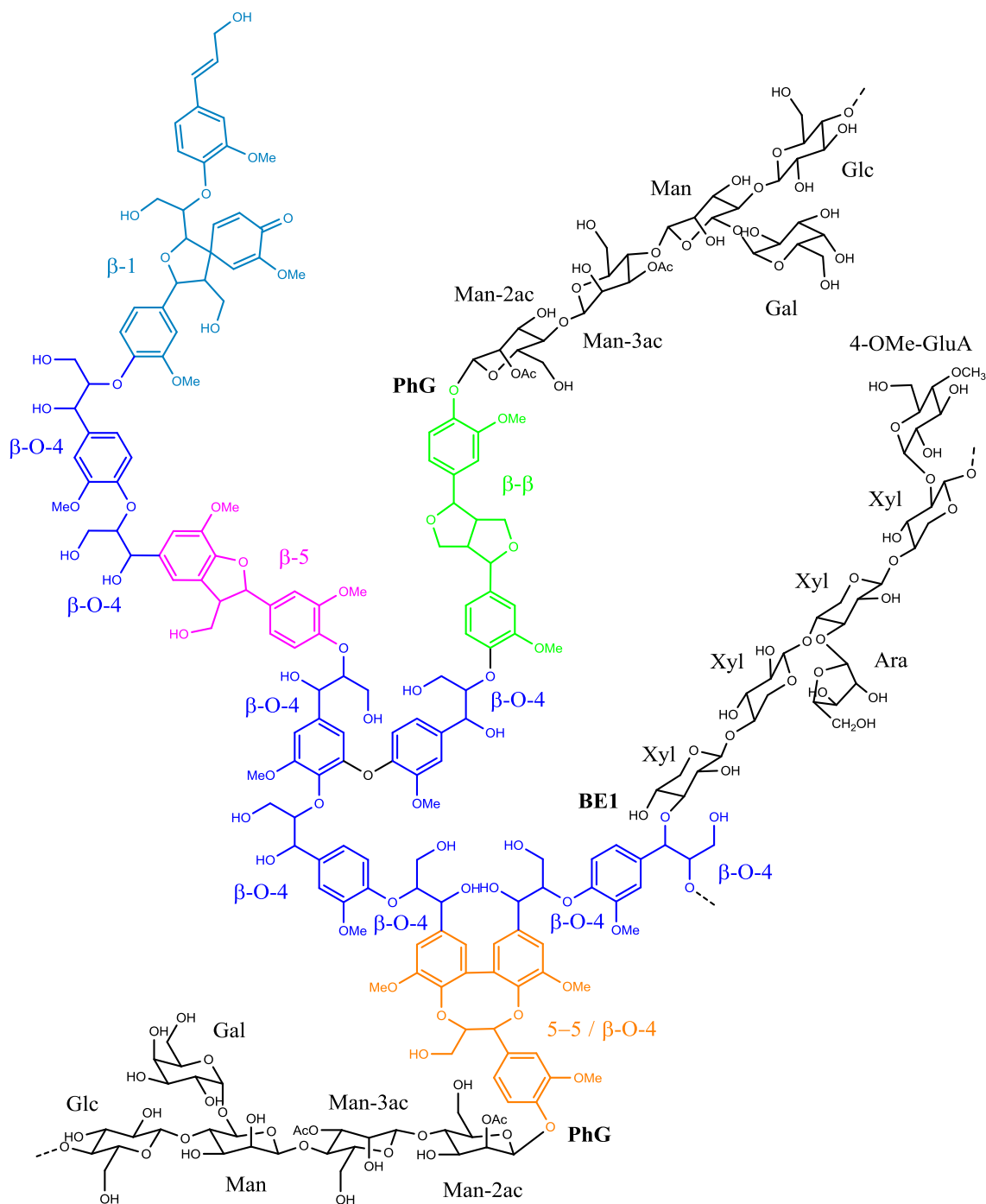


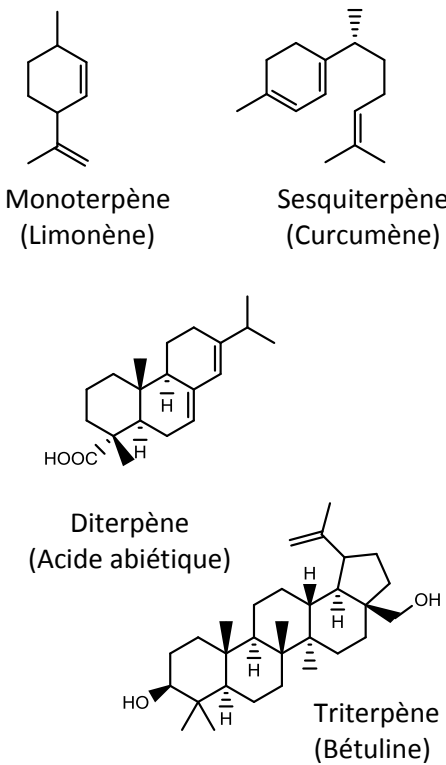
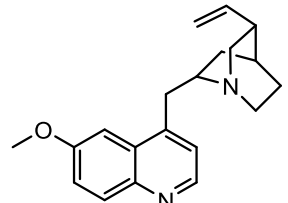
Figure 11 : exemple de structure de lignine native de résineux incluant ses interactions avec les hémicelluloses majoritaires environnantes.

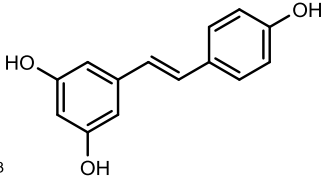
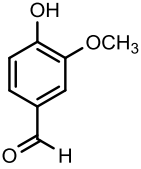
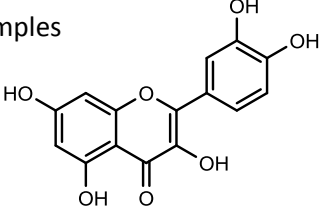
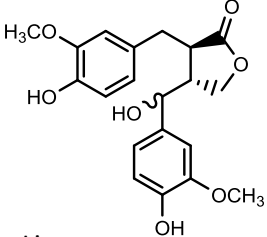
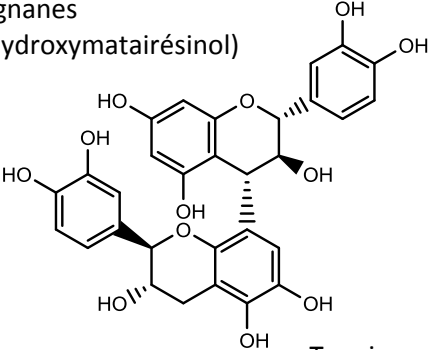
#### 1.1.1.4. Les extractibles

Le terme « extractibles » est générique et provient du domaine des sciences du bois. Il regroupe par définition l'ensemble des molécules de faibles masses moléculaires pouvant être extraites à l'eau ou par l'utilisation de solvants organiques sans prétraitement préalable de la biomasse. Leur concentration varie en fonction de l'espèce végétale mais également au sein

d'une même plante, comme, par exemple, dans les arbres où ils se concentrent majoritairement dans les nœuds et les écorces (Kebbi-Benkeder *et al.*, 2017). Issus du métabolisme secondaire des plantes, ils ont généralement un rôle de défense contre les maladies fongiques et bactériennes ainsi que les insectes et présentent, de ce fait, des propriétés biologiques très intéressantes à valoriser. Il existe plusieurs familles d'extractibles qui sont regroupés en fonction de leur structure chimique de base. Le Tableau 3 présente ces différentes familles en apportant quelques exemples de leurs structures, de leurs propriétés ainsi que de leurs applications.

Tableau 3 : quelques exemples de structures et de propriétés des grandes familles d'extractibles (De Cherisey, 2015; Gerardin, 2019).

Familles	Structures	Propriétés	Applications
<b>Terpènes</b>	 <p>Monoterpène (Limonène)</p> <p>Sesquiterpène (Curcumène)</p> <p>Diterpène (Acide abiétique)</p> <p>Triterpène (Bétuline)</p>	<p>Olfactives</p> <p>Antibactériennes</p> <p>Anti-inflammatoires</p> <p>Anticancéreuses</p> <p>Antiseptiques</p> <p>...</p>	<p>Pharmacologie</p> <p>Parfumerie</p> <p>Cosmétologie</p> <p>Aromathérapie</p> <p>Solvant</p> <p>Matériaux (latex)</p>
<b>Alcaloïdes</b>	 <p>Ex : quinine</p>	<p>Analgésiques</p> <p>Psychotropes</p> <p>Stimulantes</p> <p>Antipaludiques</p> <p>Anticancéreuses</p> <p>...</p>	<p>Pharmacologie</p>

Familles	Structures	Propriétés	Applications
<b>Composés phénoliques</b>	 <p>Stilbénoides (Trans-resvératrol)</p>	Antioxydantes Analgésiques Anti-inflammatoires Anticancéreuses Aromatiques Complexantes Anti-UV Colorantes	Pharmacologie Cosmétologie Œnologie Alimentaire Matériaux (tannins)
	 <p>Phénols simples (Vanilline)</p>		
	 <p>Flavonoïdes (Quercétine)</p>		
	 <p>Lignanes (Hydroxymatairesinol)</p>		
	 <p>Tannins (Proanthocyanidine B3)</p>		

La biomasse lignocellulosique contient également, en fonction des espèces, d'autres constituants tels que des pectines ou des cires, ainsi que des composants intracellulaires inorganiques ou encore des sucres de réserve et des acides gras essentiels. La description de la biomasse réalisée dans cette partie n'est bien évidemment pas exhaustive mais la diversité des structures présentées suffit à expliquer l'intérêt que l'Homme porte à l'utilisation de cette biomasse depuis la nuit des temps.

### ***1.1.2. Les bioraffineries***

En effet, en plus de sa culture ou de sa cueillette à des fins alimentaires, la biomasse lignocellulosique a été exploitée depuis des millénaires par la société comme source d'énergie, de matériaux et de produits de commodité. Le bois, par exemple, a été l'une des premières sources d'énergie pour l'Homme qui a appris à maîtriser le feu. Il a été et reste également un matériau de construction très employé dans les domaines du bâtiment et de l'ameublement grâce à ses propriétés mécaniques (Trouy-Triboulot and Triboulot, 2012). Depuis l'Antiquité, les fibres végétales ont aussi été utilisées pour la confection de vêtements et de cordages et la fabrication du papier. Sans oublier que la biomasse lignocellulosique a joué un rôle primordial dans le développement de notre pharmacopée.

En revanche, depuis les grandes révolutions industrielles et l'essor de la pétrochimie, la biomasse a été remplacée, pour beaucoup de ces applications, par des dérivés synthétiques issus du pétrole. Toutes les grandes avancées technologiques des deux derniers siècles et le confort de notre société moderne reposent sur l'exploitation de cette ressource fossile. Toutefois, bien que performants, l'avenir des produits pétrochimiques se voit menacé par la raréfaction de la ressource, renouvelable sur une échelle de temps bien trop longue pour assurer la demande croissante en énergie et autres produits de consommation de la population mondiale. De plus, une prise de conscience, à l'échelle planétaire, de la pollution associée à l'exploitation des ressources fossiles et de leurs dérivés participe également à réorienter les industries vers des sources de carbone plus écoresponsables (De Bhowmick *et al.*, 2018).

De ce fait, la biomasse lignocellulosique, qui représente la biomasse renouvelable à courte échelle la plus abondante sur Terre, revient au centre des considérations économiques. Il s'agit en effet d'une source de carbone dite neutre, c'est-à-dire dont l'utilisation n'entraîne pas la création et l'accumulation de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) dans l'atmosphère. Ce postulat prend en compte que l'ensemble du carbone constituant la biomasse provient initialement du CO<sub>2</sub> atmosphérique qui a été capté et transformé en molécules organiques grâce à l'énergie lumineuse du soleil et selon le processus de photosynthèse (Isikgor and Becer, 2015). Toutefois, il ne prend pas en compte les procédés de transformation de la biomasse qui doivent, de ce fait, limiter au maximum leur impact environnemental pour une exploitation réellement durable de cette source de carbone renouvelable.

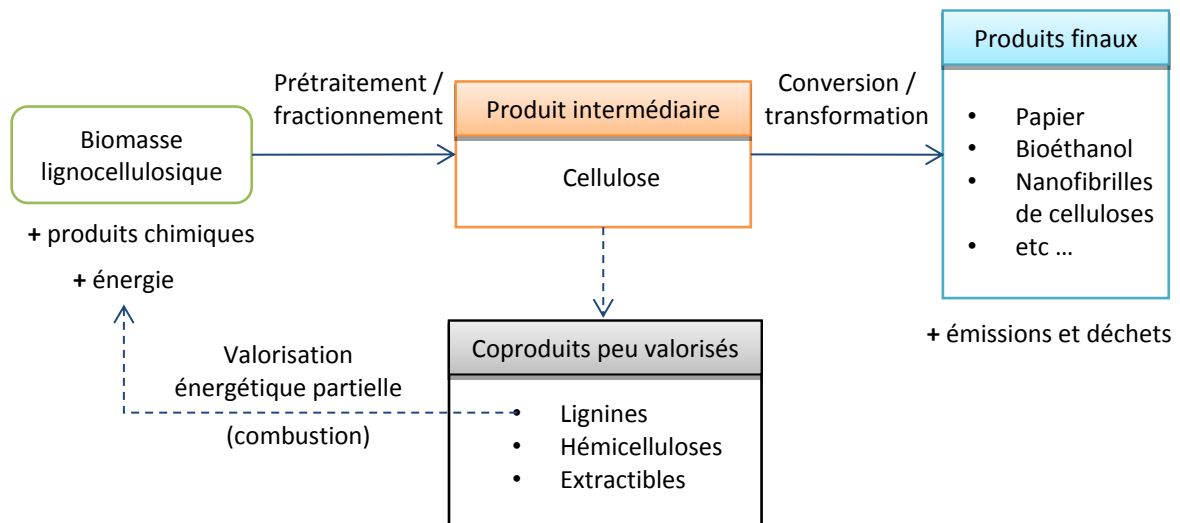
De nombreux pays, dont ceux de l'Union Européenne, ont misé sur sa valorisation pour le développement d'un nouveau modèle économique plus respectueux de l'environnement et viable sur le long terme appelé « bioéconomie ». L'engagement fort de l'Europe dans cette direction peut être notamment apprécié par les nombreux projets initiés et financés dans le cadre du programme Horizon 2020 pour la Recherche et l'Innovation.

Actuellement, les principales utilisations de cette biomasse sur le plan industriel, telles que la production de bioéthanol, de celluloses de spécialités ou encore de papier, ne valorisent que la fraction cellulosique de la matière. Un schéma représentant le fonctionnement de ces industries traditionnelles est présenté en Figure 12A. Une première étape de fractionnement de la biomasse, appelée prétraitement, permet de séparer les différentes fibres des parois pour en extraire la cellulose. Par la suite divers procédés chimiques ou enzymatiques sont employés pour convertir la cellulose en énergie ou matériaux (Schröder *et al.*, 2019). Les autres constituants, hémicelluloses, lignines, et extractibles, sont générés en tant que coproduits du procédé mais ne sont à ce jour pas ou très peu valorisés.

L'évolution de ces industries en bioraffineries est considérée comme l'un des piliers de la bioéconomie. Elle est indispensable au développement d'industries biosourcées rentables et concurrentielles des usines pétrochimiques. Une bioraffinerie, par analogie avec l'industrie pétrochimique, est une usine regroupant l'ensemble des processus capables de produire à la fois de l'énergie, du carburant, des matériaux et des molécules chimiques renouvelables à partir de la biomasse. Pour cela, une bioraffinerie doit permettre la valorisation optimisée de l'ensemble des constituants de la matière (Clark *et al.*, 2006). Afin de ne pas entrer en compétition avec les activités alimentaires, seules les sources résiduelles ou secondaires de biomasse, tels que des déchets alimentaires, des résidus agricoles ou des résidus de sylviculture, sont considérées comme sources de carbone par les bioraffineries de dernière génération (Posada and Osseweijer, 2016). Ce choix s'inscrit également dans une optique d'économie circulaire permettant de cibler des matières premières peu coûteuses tout en réduisant l'impact environnemental d'industries déjà existantes. Enfin, le concept de bioraffinerie implique aussi de concevoir l'ensemble des processus de transformation de façon durable en privilégiant les procédés de chimie verte et écoresponsables (Agarwal *et al.*, 2017; Valoppi *et al.*, 2019; Yiin *et al.*, 2018). Un schéma représentant le fonctionnement d'un bioraffinerie lignocellulosique est présenté en Figure 12B.



**A- Industries traditionnelles de transformation de la biomasse lignocellulosique**  
(papèteries, usines de production de biodiesel ou de celluloses de spécialités, etc...)



**B- Bioraffineries lignocellulosiques**

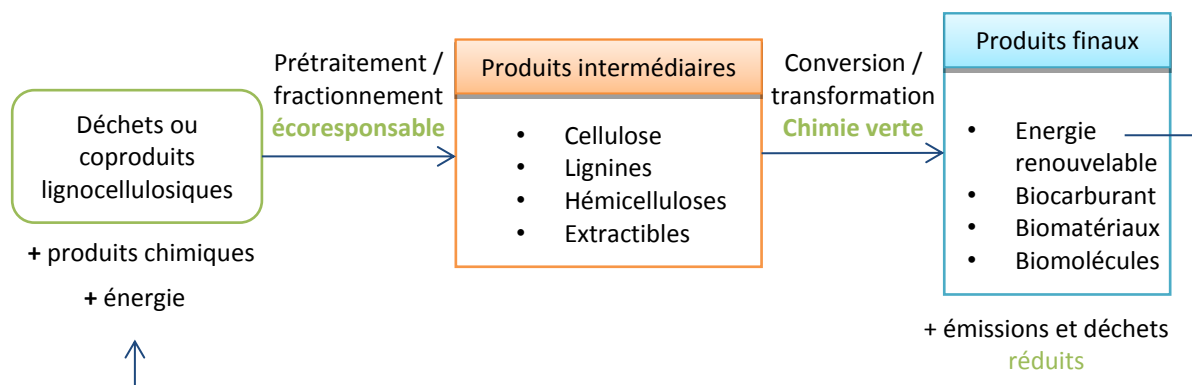


Figure 12 : schéma de fonctionnement d'une industrie traditionnelle de transformation de la biomasse lignocellulosique (A) et d'une bioraffinerie (B).

La diversification et l'augmentation des revenus découlant de la valorisation des coproduits est un atout majeur des bioraffineries. Pour les papèteries, leur évolution en bioraffineries représente également une opportunité de choix afin de maîtriser, voir d'améliorer, leur impact environnemental (Schröder *et al.*, 2019). La valorisation des coproduits pour la production de biomatériaux et biomolécules à hautes valeurs ajoutées est également indispensable pour assurer la rentabilité des industries énergétiques produisant du bioéthanol (Treasure *et al.*, 2014).

Les lignines étant les coproduits les plus abondants résultant du prétraitement de la biomasse lignocellulosique, leur valorisation représente un enjeu majeur de la bioéconomie. Avec le développement des bioraffineries à l'échelle mondiale, de grandes quantités de lignines seront disponibles à l'échelle industrielle (Gellerstedt *et al.*, 2010). Actuellement, les procédés papetiers à eux seuls en produisent plus de 50 millions de tonnes par an (De Cherisey, 2015). Une bonne connaissance de leurs structures est nécessaire à la compréhension de leurs réactivités et au développement de procédés performants menant à leurs valorisations. La prochaine section de ce chapitre présente la diversité structurale des lignines issues du prétraitement de la biomasse lignocellulosique.

## **1.2. STRUCTURES ET PROPRIETES DES LIGNINES TECHNIQUES**

Le terme « lignines techniques » est employé dans ce manuscrit pour désigner les lignines générées par des procédés de transformation de la biomasse lignocellulosique à visée industrielle. Les lignines techniques présentent ainsi un intérêt de valorisation dans le cadre de la bioéconomie et font l'objet de nombreuses études portant sur leurs structures ainsi que leurs propriétés. Certaines de ces lignines sont déjà disponibles sur le marché tandis que d'autres sont produites à l'échelle du laboratoire ou du pilote.

D'autres lignines dites « modèles » sont également produites à l'échelle du laboratoire telles que les lignines de Björkman (ou MWL), obtenues par un broyage mécanique poussé de la biomasse suivi d'un fractionnement organique, ou encore les lignines enzymatiques produites par hydrolyse enzymatique de la fraction glucidique de la biomasse (M. Rowell, 2012). Ces lignines présentent un grand intérêt scientifique pour le développement de connaissances sur les lignines natives et leurs interactions *in-situ* avec les autres constituants de la biomasse. En revanche, elles ne présentent aucun potentiel de valorisation industrielle et ne seront donc pas mentionnées dans la suite de ce chapitre.

Il existe un très grand nombre de lignines techniques qui diffèrent entre elles et avec les lignines natives par leurs structures. En effet, le fractionnement de la biomasse lignocellulosique implique la dégradation des liaisons entre les constituants pariétaux et induit de ce fait leur modification structurale. La nature et l'importance de ces modifications sont directement liées aux conditions de prétraitement utilisées. De ce fait, il est possible de dire que chaque bioraffinerie mène à la production d'une lignine technique unique dont la structure dépend de son procédé de prétraitement ainsi que de sa source de biomasse

lignocellulosique. Il est toutefois raisonnable de dire que les modifications structurales apportées aux lignines lors de leur extraction sont prépondérantes dans la détermination de leur réactivité et de leurs propriétés par rapport à leurs différences structurales d'origine biologique. Ainsi les différentes lignines techniques peuvent être regroupées en fonction du procédé de fractionnement dont elles sont issues.

### ***1.2.1. Les procédés de fractionnement***

De nombreux procédés de fractionnement existent pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique, expliquant la grande diversité des lignines techniques. Ils font appel à des méthodes chimiques, physico-chimiques, biologiques ou encore mécaniques. La Figure 13 liste les principaux procédés utilisés à l'échelle industrielle ou pilote actuellement. Toutefois, il est important de souligner qu'un grand nombre d'autres procédés innovants sont également en cours d'étude et de développement à l'échelle du laboratoire bien qu'ils ne soient pas référencés. En effet, la recherche dans le domaine du fractionnement de la biomasse est à ce jour très active avec l'essor des bioraffineries. Parmi les nombreux projets de recherche, il est intéressant de noter que la tendance porte sur le développement de technologies innovantes permettant la valorisation de l'ensemble des constituants pariétaux. De nouveaux concepts sont proposés tels que les procédés « hemicelluloses first » ou « lignin first » visant à replacer la valorisation de ces macromolécules au centre des priorités des bioraffineries, et non plus à les considérer comme des produits secondaires issus de la purification de cellulose (Korotkova *et al.*, 2015; Lourencon *et al.*, 2020; Matsakas *et al.*, 2019; Renders *et al.*, 2017). De gros efforts sont également faits afin d'assurer l'aspect écoresponsable des procédés émergents ou d'améliorer l'impact environnemental des procédés existants. Certains travaux récents sur les procédés organosolv, par exemple, proposent d'utiliser des solvants toujours plus verts, telle que la  $\gamma$ -valerolactone, ou encore de développer de nouvelles configurations de réacteurs permettant de mieux préserver la structure des lignines solubilisées (Quang Lê *et al.*, 2016; Zhou *et al.*, 2019).

Il est possible de regrouper les procédés présentés en Figure 13 en deux grandes catégories : ceux développés pour la production d'énergies renouvelables et ceux utilisés par l'industrie papetière et les entreprises de celluloses de spécialités pour la production de biomatériaux. Les termes « lignines bioénergies » et « lignines papetières » sont employés dans ce manuscrit pour désigner les lignines issues de chacune de ces catégories de procédés.

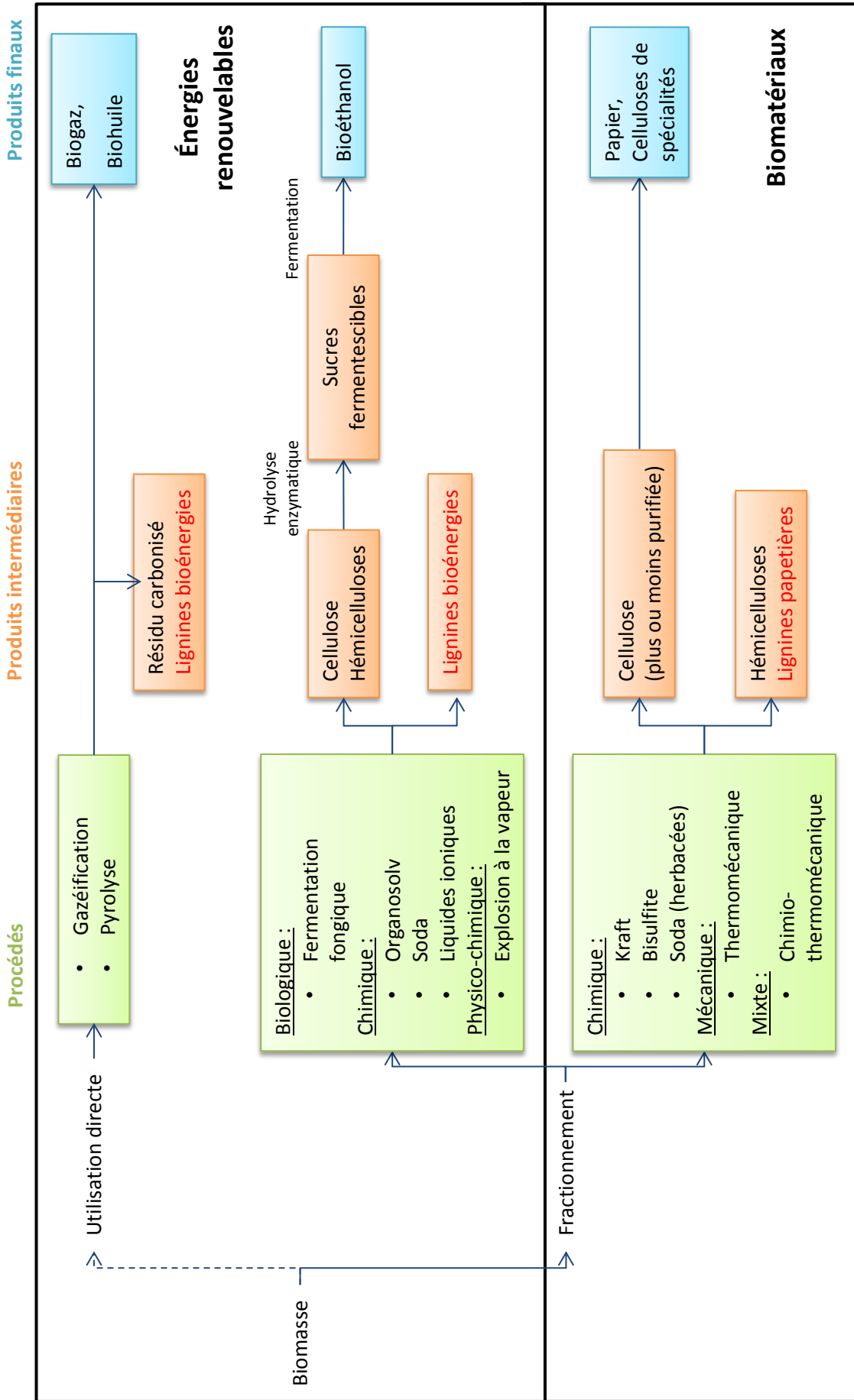


Figure 13 : les principaux procédés de fractionnement de la biomasse lignocellulosique.

Les procédés de fractionnement visant la production de bioéthanol sont développés dans l'objectif d'améliorer l'accessibilité de la cellulose aux enzymes hydrolytiques. Pour ce faire, ils doivent permettre une bonne séparation des constituants pariétaux initialement très enchevêtrés tout en diminuant l'indice de cristallinité de la cellulose (Ogier *et al.*, 1999). En revanche, ils doivent également éviter une trop forte dégradation des hémicelluloses et de la lignine dont les produits de décomposition (furfural et acides phénoliques par exemple) présentent une forte activité d'inhibition enzymatique (García-Aparicio *et al.*, 2006; Zeng *et al.*, 2014). Le challenge des chercheurs dans ce domaine réside donc dans la mise au point de conditions de prétraitement dites « douces » mais qui permettent tout de même d'engendrer une désorganisation efficace de la paroi lignocellulosique connue pour sa grande récalcitrance. Les lignines bioénergies résultantes sont en général considérées comme peu modifiées ou peu dénaturées comparativement aux lignines papetières décrites par la suite.

En effet, les cuissons chimiques papetières, qui sont les prétraitements les plus anciens et les plus courants à l'échelle industrielle, ont été développées dans le but de produire de la cellulose hautement purifiée. Pour y parvenir, elles emploient des conditions relativement drastiques acides ou basiques menant à d'importantes modifications structurales des lignines qui y sont associées (Sun *et al.*, 2018). Bien que fortement altérées, ces lignines papetières conservent toutefois un fort intérêt de valorisation puisqu'il s'agit de la plus importante source de lignines techniques. En effet, à eux seuls, les procédés Kraft et Bisulfite produisent plus de 90 % des lignines techniques actuellement sur le marché (Hu *et al.*, 2018).

Les paragraphes qui suivent décrivent plus en détail la structure des lignines bioénergies et papetières associées aux procédés listés en Figure 13.

## **1.2.2. Les lignines bioénergies**

### **1.2.2.1. Les lignines organosolv**

Parmi les procédés de prétraitement menant à la production de lignines bioénergies, les procédés Organosolv sont les plus avancés. L'entreprise Lignol Innovation Ltd., basée à Vancouver, est la première bioraffinerie organosolv implantée sur le marché qui produit de l'éthanol, du furfural et de la lignine de haute pureté à partir de biomasse lignocellulosique. Cette lignine organosolv est actuellement la seule source commerciale de lignine bioénergie. Un certain nombre d'autres procédés organosolv sont également en cours de développement à l'échelle pilote pour la production de bioéthanol (Alcell, Acetosolv, Organocell, ASAM, FormicoFib) (Condassamy, 2016).

Les procédés organosolv consistent à prétraiter la biomasse lignocellulosique avec des solvants organiques, tels que l'éthanol, le méthanol, l'acétone, l'acide formique ou encore l'acide acétique, à des températures relativement élevées de l'ordre de 140 à 200 °C. Ces solvants organiques sont souvent utilisés en mélange avec de l'eau et un catalyseur chimique (acide sulfurique ou chlorhydrique) peut être additionné afin d'augmenter les rendements d'extraction (Ragauskas *et al.*, 2014). Dans ces conditions, les hémicelluloses ainsi que la lignine sont solubilisées tandis que la cellulose est récupérée sous forme de résidu solide. Par la suite, les hémicelluloses peuvent être isolées par précipitation dans de l'éthanol ou solubilisées en phase aqueuse par dépolymérisation. Les lignines quant à elles sont contenues dans la phase organique et peuvent être récupérées par évaporation des solvants (Katahira *et al.*, 2014).

Les lignines organosolv produites sont caractérisées par de faibles masses moléculaires ( $\leq 2500$  Da) et une grande pureté (très faible teneur en sucres). Leur extraction est principalement liée à la rupture des liaisons aryl-éther mise en évidence par l'augmentation du nombre de fonctions hydroxyles phénoliques libres (Behling *et al.*, 2016). Elles sont également caractérisées par un degré de condensation relativement variable en fonction des conditions opératoires utilisées. Il a été démontré qu'un excès de catalyseur, par exemple, entraîne une condensation plus importante des lignines, c'est-à-dire une augmentation de la proportion de liaisons inter-unités de type C-C (Katahira *et al.*, 2014). Enfin, les lignines organosolv sont hydrophobes et par conséquent faiblement solubles dans l'eau mais solubles dans beaucoup de solvants organiques (Korotkova *et al.*, 2015).

Les procédés organosolv sont considérés comme écoresponsables car les solvants utilisés peuvent être recyclés. En revanche, le coût de ce recyclage est relativement élevé et reste un frein important à l'utilisation plus avancée de ces procédés à l'échelle industrielle. En effet, bien que les procédés organosolv aient été initialement développés pour des applications en papèterie, leur coût élevé ainsi que la moins bonne qualité de leurs pâtes à papier ne leur permettent pas, pour l'instant, de concurrencer les autres procédés (Rakotovelo, 2017). Pour amortir le coût de production, de nombreuses recherches portent sur l'optimisation de ces procédés afin de préserver la structure des lignines isolées en vue de leur valorisation économique (Dong *et al.*, 2019).

#### 1.2.2.2. *Les lignines d'explosion à la vapeur*

Le procédé d'explosion à la vapeur consiste à imprégner la biomasse lignocellulosique avec de la vapeur d'eau (180-250 °C) et sous haute pression (14-35 bars) pendant une durée relativement courte de l'ordre d'une à quelques dizaines de minutes. Cette imprégnation est directement suivie par une dépressurisation rapide du réacteur jusqu'à pression atmosphérique provoquant ainsi une explosion (Lange *et al.*, 2013). Une partie de la matière lignocellulosique est alors récupérée sous forme de résidu solide constitué majoritairement de cellulose et de lignine. Les hémicelluloses quant à elles sont en grande partie hydrolysées et solubilisées dans la phase aqueuse produite par condensation de la vapeur d'eau (García-Aparicio *et al.*, 2006). L'explosion de la biomasse engendrée par le procédé modifie physiquement les fibres de cellulose qui sont alors accessibles aux enzymes hydrolytiques.

Les lignines issues de ces procédés peuvent être récupérées en amont du traitement enzymatique par extraction du résidu solide en condition alcaline (Rocha *et al.*, 2015). Ces lignines sont caractérisées par des masses moléculaires très dispersées comprises entre 6000 et 25000 Da (Wang and Chen, 2013). Elles possèdent une structure relativement condensée riche en liaisons inter-unités de type C-C et en fonction hydroxyles phénoliques libres suite à la rupture des liaisons labiles de type aryl-éther. Leurs cycles aromatiques présentent également une faible fréquence de méthylation (Behling *et al.*, 2016).

Le procédé d'explosion à la vapeur présente l'avantage d'être peu consommateur en énergie et en réactifs chimiques et de générer peu de rejets. Il est également adapté au prétraitement de particules de grandes tailles, limitant les besoins en broyage préalable. En revanche, la solubilisation des hémicelluloses n'est souvent que partielle et l'explosion entraîne la production d'inhibiteurs de fermentation par dégradation des pentoses et de la lignine (García-Aparicio *et al.*, 2006). Des variantes ont été développées plus récemment pour augmenter les rendements et éviter la formation d'inhibiteurs, par ajout d'acide ou de dioxyde de carbone (Castro *et al.*, 2014). La plus prometteuse est l'explosion à la vapeur en conditions acides douces. Cette technique est utilisée par l'université de Floride sur le site de leur bioraffinerie pilote. Elle a également déjà été développée à l'échelle industrielle par la bioraffinerie canadienne Iogen, en revanche la lignine générée par cette société n'est pas disponible sur le marché.

#### 1.2.2.3. *Les lignines extraites par les liquides ioniques*

Une des technologies émergentes pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique est l'utilisation de liquides ioniques. Les liquides ioniques sont des sels

organiques uniquement composés d'ions (sans eau) dont la température de fusion est inférieure ou égale à 100 °C. Ils sont plus précisément constitués d'un cation organique auquel est associé un anion organique ou inorganique (Ghandi, 2014). Ces liquides possèdent des propriétés de solvation extrêmement variables en fonction de leur composition. Hors, il existe presque une infinité de combinaisons d'anions et de cations possibles ce qui souligne la très grande versatilité de ces solvants. Les liquides ioniques sont considérés comme des solvants verts du fait de leur très faible pression de vapeur à température ambiante et pression atmosphérique (très faible volatilisation), de leur grande stabilité thermique et de leur potentiel de recyclage en fin de procédé. En revanche, peu d'informations sont, à ce jour, disponibles sur la biodégradabilité et l'écotoxicité des liquides ioniques (Sheldon, 2001).

La majorité des liquides ioniques étudiés pour le prétraitement de la biomasse lignocellulosique sont basés sur des dérivés cationiques d'imidazole (Pu *et al.*, 2007). Certains de ces liquides permettent la liquéfaction complète de la biomasse lignocellulosique tandis que d'autres peuvent être utilisés pour l'extraction spécifique de la cellulose ou des lignines en fonction du contre ion (anion) utilisé (Honglu and Tiejun, 2006; Lee *et al.*, 2009). C'est cette propriété de solubilisation sélective qui inspire aujourd'hui les chercheurs dans le développement de nouveaux procédés de fractionnement utilisant les liquides ioniques (Elgharbawy *et al.*, 2016).

La solubilisation des lignines dans les liquides ioniques est en grande partie liée à leur dépolymérisation entraînée par la rupture des liaisons labiles de type  $\beta$ -O-4 (Liu *et al.*, 2018; Sathitsuksanoh *et al.*, 2014). La dégradation de ses liaisons peut être plus ou moins maîtrisée par le choix des conditions de prétraitement notamment en jouant sur la température du procédé. En effet, des températures de plus en plus élevées conduisent à une dépolymérisation de plus en plus extensive et ainsi à des lignines de masses moléculaires de plus en plus petites (Sathitsuksanoh *et al.*, 2014). Lors de leur solubilisation, d'autres modifications structurales peuvent également être apportées aux lignines comme par exemple l'addition de nouveaux groupements fonctionnels provenant des liquides ioniques (Tan *et al.*, 2009). Il est de ce fait difficile d'attribuer des caractéristiques générales aux lignines extraites par les liquides ioniques puisque leur masse ainsi que leurs fonctionnalités dépendent directement des conditions opératoires et de la nature des ions utilisées (George *et al.*, 2011; Sathitsuksanoh *et al.*, 2014; Tan *et al.*, 2009).



### **1.2.3. Les lignines papetières**

#### **1.2.3.1. Les lignines Kraft**

Les lignines techniques les plus abondantes actuellement sont les lignines Kraft qui représentent plus de 80 % de la production mondiale de lignines soit 40 millions de tonnes par an (Hu *et al.*, 2018). Elles sont générées en tant que coproduit lors de la production de pâte à papier par prétraitement de la biomasse à chaud (environ 4h à 150-170 °C) en milieu alcalin (NaOH) et en présence de sulfure de sodium (Na<sub>2</sub>S) (Chakar and Ragauskas, 2004). Ces lignines sont caractérisées par de faibles masses moléculaires (autour de 2000 à 5000 Da) et par la présence de groupements sulfhydryles leurs conférant le nom de thiolignines. En moyenne, 1,5 à 3 % de soufre est incorporé à leur structure (Sun *et al.*, 2018). Elles sont également décrites comme des lignines hautement condensées, c'est-à-dire que le procédé Kraft entraîne la rupture d'un grand nombre de liaisons aryl-éther labiles qui sont remplacées par des liaisons C-C très stables et résistantes à la dégradation chimique et thermique (Constant *et al.*, 2016; Lange *et al.*, 2013).

Les lignines Kraft peuvent être récupérées de la liqueur noire résultant de la cuisson papetière par précipitation en acidifiant le milieu. Il est important de noter que bien que la production de lignines Kraft représente de loin le plus gros volume de lignines techniques, seule une partie de ces lignines peut être valorisée pour des applications autres qu'énergétique sans porter préjudice aux papèteries. En effet, la combustion de la liqueur noire pour la production d'énergie et la régénération des réactifs de cuisson est indispensable à la rentabilité des usines Kraft (Mongkhonsiri *et al.*, 2018).

#### **1.2.3.2. Les lignosulfonates**

Le procédé bisulfite est le deuxième procédé papetier le plus utilisé à l'échelle mondiale. Il contribue à la production de 8 à 10 millions de lignines techniques, également appelées lignosulfonates (Hu *et al.*, 2018). L'entreprise de matériaux innovants Rayonier (USA, ex-Tembec) ainsi que la bioraffinerie Borregaard lignotech (Norvège) sont les principaux producteurs de lignosulfonates. Au cours de ce procédé, la biomasse est traitée en milieu acide à chaud, à des températures de l'ordre de 130-160 °C, pendant plusieurs heures en présence d'ions sulfites (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>) et hydrosulfites (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Bien que ce procédé papetier ait été développé en 1840, soit quarante ans avant le procédé Kraft, le risque de fuite de sulfure d'hydrogène, gaz hautement toxique (H<sub>2</sub>S), ainsi que le manque de régénération des réactifs de cuisson l'ont rapidement relayé au second plan (Hu *et al.*, 2018).

Les lignosulfonates sont caractérisés par de très hautes masses moléculaires, de l'ordre de 20000 à 50000 Da, et par la présence de groupements sulfonates en positions  $\alpha$  et  $\beta$  des chaînes aliphatiques (Condassamy, 2016). En moyenne, 4 à 8 % de soufre est incorporé à leur structure (Sun *et al.*, 2018). Cette fonctionnalité particulière les rend solubles dans l'eau ainsi que dans les solvants organiques polaires et les amines (Behling *et al.*, 2016). Elle est également à l'origine des propriétés colloïdales et de surface des lignosulfonates qui présentent une structure amphiphile et peuvent être utilisés en tant que tensioactifs ou encore dispersants (Rakotovelo, 2017).

#### 1.2.3.3. Les lignines alcalines ou Soda

Le procédé Soda a été développé à la même période que le procédé bisulfite et breveté dans les années 1850. Dans ce procédé, une solution de soude concentrée (10 à 15 % de NaOH) est utilisée pour dissoudre les lignines à des températures de l'ordre de 140 à 170 °C (Korotkova *et al.*, 2015). Il s'agit ainsi du premier procédé de délignification en condition alcaline développé à l'échelle industrielle avant l'invention du procédé Kraft. Toutefois, cette cuisson papetière fait appel à des conditions relativement drastiques qui entraînent également la dégradation partielle des fibres de cellulose. Le papier résultant est de ce fait moins résistant au déchirement que celui produit par les deux procédés précédemment cités. L'utilisation d'antraquinone comme additif de cuisson permet cependant de limiter la dégradation des polysaccharides et d'améliorer les rendements de délignification (Bhardwaj *et al.*, 2005). Aujourd'hui, le procédé Soda trouve un intérêt économique pour la production de papier à partir de biomasses alternatives au bois et facilement transformables telles que les plantes herbacées et les résidus agricoles. Il est également étudié en tant que procédé de fractionnement de la biomasse lignocellulosique dans le cadre des bioraffineries énergétiques.

Les lignines alcalines, aussi appelées lignines Soda, peuvent être isolées de la liqueur noire de cuisson par acidification du milieu et précipitation. Elles sont caractérisées par des masses moléculaires relativement faibles (2000-3000 Da) et une structure condensée avec de nombreuses liaisons C-C créées suite à la rupture des liaisons de type  $\beta$ -O-4 (Constant *et al.*, 2016). Elles possèdent des fonctionnalités particulières avec une déméthoxylation des cycles aromatiques et une augmentation du nombre de fonctions acides carboxyliques (Mousavioun and Doherty, 2010). De par leur origine, ces lignines sont également plus riches en motifs p-hydroxyphényle (unités H) que les autres lignines papetières. Enfin, les lignines alcalines sont solubles dans l'eau à pH basique ainsi que dans des solvants organiques polaires.

#### 1.2.3.4. Les lignines thermomécaniques

Contrairement aux procédés papetiers précédemment cités, le procédé thermomécanique est le seul à ne pas produire de papier à base de cellulose hautement purifiée. En effet, la majeure partie des hémicelluloses et des lignines sont également intégrées à la pâte à papier (Sundholm, 1999). Ce procédé permet la production de papier journal dont la couleur jaunâtre est caractéristique de la présence de lignines. Lors de ce prétraitement, la biomasse lignocellulosique, préalablement débitée sous forme de copeaux, est imprégnée par de la vapeur d'eau à une température souvent comprise entre 110 et 130 °C. Suite à cet étuvage, elle est transformée en pâte à papier par une étape de défibrage mécanique réalisée dans un ou plusieurs raffineurs en série et sous haute pression (2 à 3 bar) (Petit-Conil, 1999). Environ 2 à 5 % de la matière lignocellulosique composés d'extractibles, d'hémicelluloses et de lignines se retrouve alors entraînée dans les eaux de procédé constituant le principal coproduit liquide des papeteries thermomécaniques (Sjostrom, 1990).

De nombreuses études sont disponibles au sujet de la caractérisation des extractibles et des hémicelluloses présentes dans ces eaux de procédé (Opedal *et al.*, 2011; Persson and Jönsson, 2017; Willför *et al.*, 2003). En revanche, la structure des lignines thermomécaniques reste très peu documentée. Une seule étude a été trouvée lors de cette revue bibliographique proposant un protocole d'extraction et de purification de ces lignines en vue de leur caractérisation (Pranovich *et al.*, 2005). Sur le plan structural, elles y sont comparées aux lignines de Björkman (MWL) qui sont considérées comme des références de lignines natives en laboratoire. Cette étude souligne que les lignines thermomécaniques sont très peu modifiées lors de leur extraction. Elles présentent toutefois une masse moléculaire très faible suite à leur fragmentation mécanique (1470 Da).

Bien qu'une seule publication rapporte ces faits, les informations structurales générées au sujet des hémicelluloses soulignent également le caractère très « doux » de l'extraction thermomécanique qui préserve même les fonctions les plus labiles des hémicelluloses tels que les groupements acétyles (Willför *et al.*, 2003).

Le tableau 4 résume les différentes caractéristiques des lignines techniques décrites dans ce chapitre (Behling *et al.*, 2016; Condassamy, 2016; Constant *et al.*, 2016; Hu *et al.*, 2018; Katahira *et al.*, 2014; Korotkova *et al.*, 2015; Lange *et al.*, 2013; Mousavioun and Doherty, 2010; Narron *et al.*, 2016; Pranovich *et al.*, 2005; Rakotoveloa, 2017; Sathitsuksanoh *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2018; Tan *et al.*, 2009; Wang and Chen, 2013).

Tableau 4 : caractéristiques structurales et propriétés des principales lignines techniques.

Type de lignines	Masse moléculaire Mw (Da)	disponibilité	Caractéristiques structurales et propriétés
Lignines pyrolytiques	600-1300	Laboratoire et pilote	Solubles dans les solvants organiques; chaînes latérales majoritairement à 2 carbones (au lieu de 3); très faible masse moléculaire, condensées avec de nombreuses liaisons C-C
Lignosulfonates	20000-50000	commerciale	Solubles dans l'eau en milieu acide et basique, dans des solvants organiques très polaires et dans les amines; très haute masse moléculaire; sulfonatées en positions aliphatiques (taux de soufre : 4 à 8 %); propriétés colloïdales et tensioactives liées à leur structure amphiphile
Lignines Kraft	2000-5000	commerciale	Solubles en milieu alcalin et dans des solvants organiques très polaires; condensées avec de nombreuses liaisons C-C (5-5); soufrées : formation de thiols en positions aliphatiques (taux de soufre : 1,5 à 3 %); fonctionnalisées : augmentation du nombre de OH phénoliques libres par rupture des liaisons éther
Lignines alcalines (SODA)	~ 2000-3000	Commerciale	Solubles en milieu alcalin et dans les solvants organiques polaires; enrichies en motif H; condensées avec de nombreuses liaisons C-C; fonctionnalisées : augmentation du nombre de fonctions acide carboxylique et déméthoxylation des cycles aromatiques
Lignines d'explosion à la vapeur	6000-25000	Laboratoire et pilote	Condensées avec de nombreuses liaisons C-C; fonctionnalisées : augmentation du nombre de fonctions OH phénoliques libres par rupture des liaisons éther et déméthoxylation des cycles aromatiques.
Lignines organosolv	≤ 2500	Commerciale et pilote	Solubles dans les solvants organiques et en solution aqueuse basique; très hydrophobes; fonctionnalisées : augmentation du nombre de OH phénoliques libres par rupture des liaisons éther; plus ou moins condensées selon le procédé; haute pureté
Lignines dissoutes par les liquides ioniques	Faible Ex : 3000-4000	Laboratoire	Faible masse moléculaire : plus ou moins dépolymérisées en fonction des conditions; fonctionnalité : dépendante des ions utilisés, ajustable
Lignines thermo-mécaniques	Faible Ex : 1470	Laboratoire	Structure « native » comparable à celle des MWL mais plus faible masse moléculaire

+ Dégradations/modifications structurales -

Ce tableau récapitulatif souligne la grande diversité en termes de taille, de fonctionnalités et de propriétés des différentes lignines techniques. De cette grande diversité structurale découlent de nombreuses applications, souvent spécifiques à un ou plusieurs types de lignines. La section suivante de ce chapitre décrit donc les différentes voies de valorisation existantes ou envisagées pour ces lignines techniques ainsi que le rationnel permettant de sélectionner la ou les voies de valorisation les plus adaptées en fonction des caractéristiques de la ressource en lignine.

### **1.3. VALORISATIONS DES LIGNINES TECHNIQUES**

Actuellement sur le plan industriel, les lignines techniques sont majoritairement utilisées pour la production d'énergie de par leur forte densité en atome de carbone et leur grand pouvoir calorifique. C'est notamment le cas des lignines papetières dont 98 % sont incinérés pour la production de chaleur et la régénération des actifs de cuisson (Cao *et al.*, 2018). Il existe toutefois une multitude d'autres voies de valorisation qui permettraient de remplacer un grand nombre de produits issus du pétrole par des produits biosourcés dérivés de lignines. Dans le cadre de la bioéconomie, les lignines pourraient en effet trouver des applications dans trois grands domaines industriels : le domaine des énergies renouvelables (biocarburants et biogaz), celui des biomatériaux et enfin celui des biomolécules actives ou de spécialité tels que les composés pharmaceutiques, cosmétiques ou phytosanitaires, par exemple.

Bien que peu de valorisations de lignines, autres qu'énergétique, soient développées sur le marché aujourd'hui, de très nombreux projets sont à l'étude à l'échelle du laboratoire ou du pilote industriel. Avec l'essor des bioraffineries et l'urgence écologique qui requiert le développement d'alternatives aux ressources fossiles, le nombre de recherches sur la valorisation des lignines ne cesse d'augmenter depuis ces 20 dernières années comme en témoigne la Figure 14 qui illustre le nombre de publications dans la littérature portant sur ce sujet des années 2000 à aujourd'hui.

Certaines voies de valorisation peuvent être directement mise en œuvre suite au fractionnement de la biomasse lignocellulosique tandis que d'autres impliquent une modification préalable des lignines techniques telles que leur fonctionnalisation, leur réticulation ou encore leur dépolymérisation.

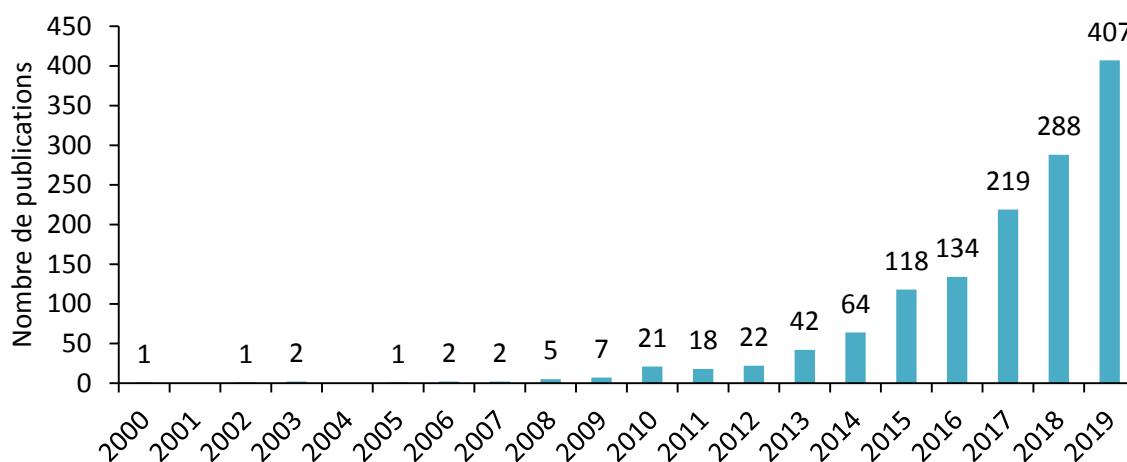


Figure 14 : nombre de publications contenant les termes « lignin valorization » dans leurs titres, leurs résumés ou leurs mots clés des années 2000 à aujourd'hui ; données tirées du site Web of Science.

### 1.3.1. Applications directes des lignines techniques

Les lignines en tant que telles possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques qui peuvent être valorisées par leur incorporation directe en tant qu'additifs fonctionnels ou molécules bioactives dans divers produits de commodité.

Les lignosulfonates, par exemple, avec leur structure amphiphile et leur bonne solubilité aqueuse peuvent être utilisés en tant que molécules tensioactives dispersantes ou plastifiantes dans les ciments et les bétons (Plank, 2004). Il s'agit d'ailleurs, de loin, de l'application commerciale la plus importante à l'heure actuelle avec près d'un million de tonnes de lignosulfonates employés chaque année par l'industrie de la construction (Rakotovelo, 2017). A l'échelle du laboratoire, il a également été rapporté que les lignines Kraft peuvent être utilisées dans la formulation de biomatériaux composites en mélange avec un polymère hydrophile tel que l'amidon. Leur caractère hydrophobe et leur faible solubilité en milieu aqueux, à des pH acide et neutre, permettent d'améliorer la résistance de ce biomatériau à l'humidité et d'envisager son application pour le développement d'emballages biodégradables pour les denrées alimentaires (Baumberger *et al.*, 1998).

Les lignines possèdent également grâce à leur structure aromatique fonctionnalisée des propriétés biologiques telles que des propriétés antioxydantes, anti-UV, antimicrobiennes ou encore bactériostatiques (Dong *et al.*, 2011; Ugartondo *et al.*, 2008; Vinardell *et al.*, 2008). Ces propriétés biologiques leur confèrent un fort potentiel de valorisation notamment dans le

secteur de la chimie fine où elles peuvent être incorporées en tant que biomolécules actives dans des produits pharmaceutiques ou cosmétiques (Ugartondo *et al.*, 2008; Vinardell *et al.*, 2008). Elles peuvent aussi trouver des applications en tant que conservateurs ou antifongiques naturels dans des produits de biocontrôle ou des produits phytosanitaires. Une entreprise autrichienne (Bioconsult Gesellschaft fuer Biotechnologie mbH) a, par exemple, développé une formulation à base de lignine Soda issue de lin permettant de prévenir la croissance microbologique dans les eaux industrielles de papeteries en recirculation. Cette formule est actuellement utilisée par un grand nombre de papetier en Europe (Lora and Glasser, 2002).

Ces propriétés biologiques peuvent enfin être valorisées par l'incorporation de lignines techniques dans la formulation de matériaux en tant que charges ou additifs. Elles permettent alors d'améliorer leurs performances en les rendant plus stables aux radiations UV, en leur apportant de nouvelles fonctionnalités (comme des propriétés antioxydantes) ou en les rendant plus écoresponsables par substitution de certains de leurs composés non-biodégradables ou écotoxiques. Par exemple, la dispersion de 10 % en masse de lignines dans une matrice thermoplastique d'acide poly-lactique confère au matériau la capacité de piéger les radicaux libres environnants tout en préservant sa résistance mécanique. La nouvelle propriété de barrière à l'oxygène de ce matériau en fait alors un candidat de choix pour le développement d'emballage dits « actifs » permettant la protection de denrées sensibles à l'oxydation (Domenek *et al.*, 2013).

### ***1.3.2. Réticulation des lignines techniques***

Outre leur rôle d'additif, les lignines techniques peuvent également être utilisées en tant que macromonomères dans le domaine des matériaux. Leurs fonctions hydroxyles libres, en positions aliphatiques et phénoliques, peuvent être utilisées comme sites réactionnels de réticulation et mener à la production de matériaux renouvelables inédits ou au remplacement de composés toxiques dans des matériaux existants (Gandini *et al.*, 2002). Les lignines présentent de nombreux avantages pour cette utilisation puisqu'elles sont biodégradables, abondantes et qu'elles possèdent des propriétés physico-chimiques et biologiques intéressantes pour la fonctionnalité et la durabilité des matériaux qui en dérivent. Elles peuvent être utilisées directement en tant que macromonomères ou fonctionnalisées en amont de leur réticulation afin d'améliorer leur solubilité, leur réactivité ou leur compatibilité avec d'autres polymères (Chung and Washburn, 2012; Ponnusamy *et al.*, 2019).

### 1.3.2.1. *Incorporation à des matériaux existants*

Il existe quatre grands exemples très étudiés d'incorporation de lignines techniques dans des matériaux existants qui sont les polyuréthanes, les polyesters, les résines phénol-formaldéhyde et les résines époxy. En remplaçant les polyols synthétiques lors de la production des polyuréthanes, les lignines permettent d'améliorer leur biodégradabilité (Zhang *et al.*, 2015). Des exemples de production de polyuréthanes avec des lignines techniques, telles que les lignines organosolv, Kraft, d'explosion à la vapeur ou encore bisulfites, ont été rapportés dans la littérature à l'échelle du laboratoire et également brevetés par quelques industriels (Upton and Kasko, 2016). De la même façon, de nombreux types de lignines techniques ont été étudiés pour la production de polyesters. Il a alors été rapporté que l'addition de lignine permet de moduler certaines de leurs propriétés telles que leur température de fusion ou leur module élastique et également d'améliorer leur stabilité thermique (Upton and Kasko, 2016). En ce qui concerne la production des résines phénol-formaldéhyde, les lignines peuvent être utilisées comme substitut du phénol. Les résines ainsi formulées à base de lignine sont moins toxiques et coûtent moins cher à produire que celles à base de phénol (Donmez Cavdar *et al.*, 2008). Enfin, par époxydation, il est également possible d'envisager leur utilisation pour la production de résines époxy. Il a été rapporté par la société américaine IBM que la production de circuits imprimés avec une résine époxy à base de lignine (à hauteur de 50 % en masse) permettrait de diminuer leur empreinte carbone de 40 % sur leur cycle de vie (Lora and Glasser, 2002). Toutes ces recherches jouent un rôle clé pour le développement de matériaux de plus en plus écoresponsables (Sen *et al.*, 2015).

### 1.3.2.2. *Développement de nouveaux biomatériaux*

Les fibres de carbone représentent l'exemple le plus avancé de développement de biomatériau innovant à base de lignine. Traditionnellement, ces fibres sont produites à partir d'une source de carbone pétrochimique relativement coûteuse : les polyacrylonitriles. Leur production à partir de lignine représente une alternative écoresponsable et moins coûteuse à leur voie de synthèse traditionnelle. Cette application est notamment très étudiée comme voie de valorisation des lignines Kraft isolées de la liqueur noire par le procédé LignoBoost™ (Gellerstedt *et al.*, 2010). Ce procédé permet l'extraction de lignines Kraft de grande pureté par acidification de la liqueur au dioxyde de carbone suivi d'une double étape de lavage acide des lignines précipitées (Tomani, 2010). Ces lignines, constituées à plus de 60 % de carbone, sont alors de bons candidats pour la production de fibres de carbone. Le laboratoire national d'Oak Ridge aux Etats-Unis est le pionnier dans la production de fibres de carbone à base de lignine. La plateforme Canoé est également un acteur majeur de ce domaine en France.



Une autre approche consiste à développer des biomatériaux à base de lignine associée à d'autres polymères naturels (Chung *et al.*, 2013). Il est possible de citer par exemple la production de films polymériques très fins et antioxydants pouvant être utilisés comme revêtement de packaging alimentaire par la copolymérisation de lignine et de chitosan (Crouvisier-Urien *et al.*, 2019). Cette polymérisation fait réagir les fonctions amines du chitosan avec les fonctions hydroxyles des lignines et peut être réalisée dans un solvant écoresponsable selon les principes de la chimie verte. Bien qu'il ne s'agisse que d'une étude à l'échelle du laboratoire, cet exemple de biomatériau entièrement biodégradable et issu de ressources résiduelles souligne le potentiel très prometteur de cette voie de valorisation des lignines techniques.

### ***1.3.3. Dépolymérisation des lignines techniques***

Le développement de procédés de dépolymérisation des lignines techniques pour leur valorisation industrielle fait partie des plus grands enjeux de la bioéconomie. En tant que principales sources naturelles de composés phénoliques, disponibles en grande quantité, les lignines représentent, en effet, une source renouvelable de choix pour la production de biomolécules aromatiques et de biomatériaux capables de remplacer celles et ceux actuellement issus de la pétrochimie.

#### ***1.3.3.1. Procédés et molécules cibles***

La dépolymérisation des lignines techniques mène à un grand éventail de molécules cibles en fonction du procédé et de la sévérité de conditions utilisées. La figure 15 illustre cette diversité en présentant les principaux procédés ainsi que les molécules cibles qui y sont associées.

La gazéification des lignines techniques fait appel à des conditions de dépolymérisation très dures et mène à la production de monomères de faibles masses moléculaires ainsi qu'à la perte d'aromaticité des composés (Figure 15). Elle est réalisée à des températures comprises entre 600 et 1200 °C dans une atmosphère contrôlée en oxygène et produit principalement des gaz tels que le monoxyde de carbone (CO), le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>), l'hydrogène (H<sub>2</sub>) ou encore le méthane (CH<sub>4</sub>) (Wang *et al.*, 2019). Ces gaz en mélange, couramment appelés syngaz (pour gaz de synthèse), peuvent être convertis par la suite en énergie renouvelable (biocarburant), en molécules chimiques ou en solvants grâce aux technologies développées pour le pétrole (Ponnusamy *et al.*, 2019).

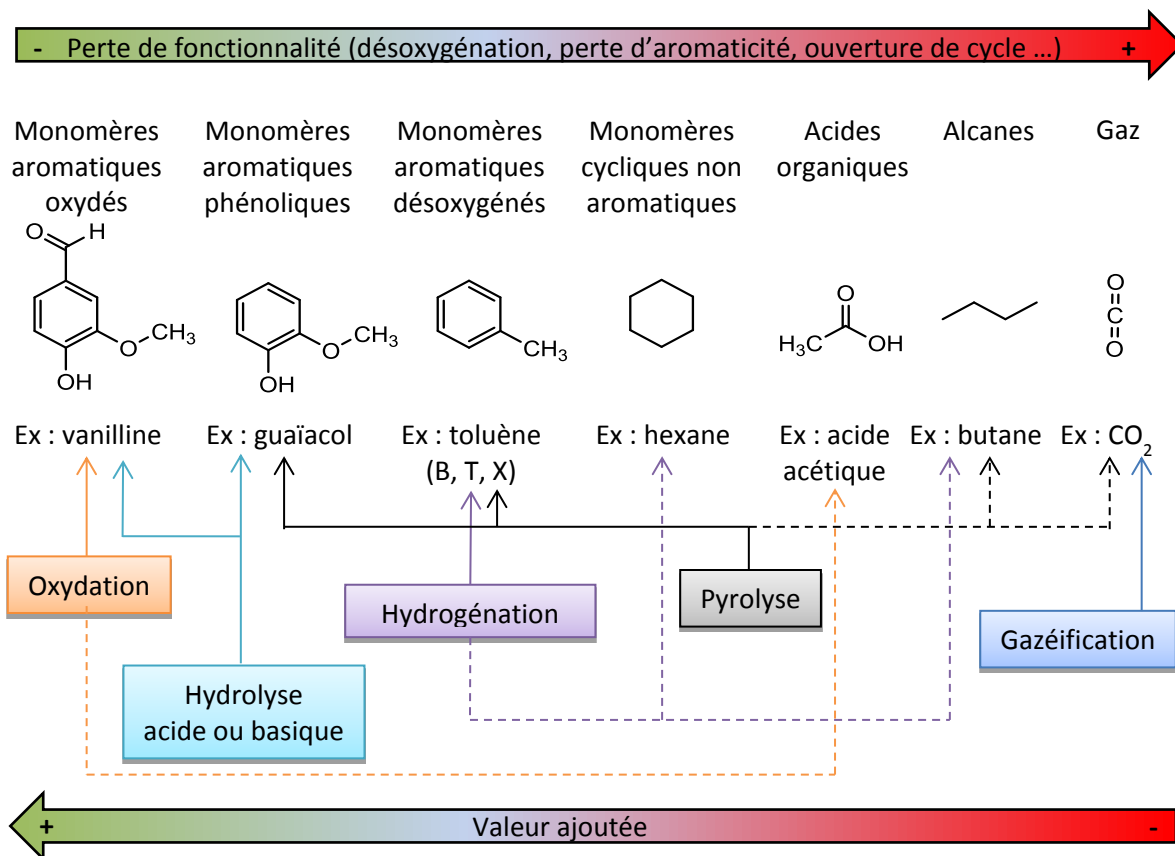


Figure 15 : principaux procédés de dépolymérisation des lignines techniques et molécules cibles associées.

La pyrolyse des lignines est un traitement thermique conduit dans des conditions plus douces que la gazéification, à des températures de l'ordre de 450 à 650 °C, et en absence d'oxygène. Elle mène à la production de trois catégories de produits : des biogaz contenant du monoxyde et du dioxyde de carbone ainsi que des petits hydrocarbures de 1 à 4 carbones ; des biohuiles composées d'un très grand mélange de monomères aromatiques oxygénés et des résidus solides carbonisés de structure polycyclique aromatique formés par réarrangement et condensation des intermédiaires de dégradation (Wang *et al.*, 2019). La quantité de chacune de ces catégories de produits dépend des conditions opératoires utilisées. Toutefois, la pyrolyse vise principalement la production des biohuiles tout en limitant la formation des biogaz et des résidus carbonisés (Figure 15). Les biohuiles, constituées de monolignols, de phénols, de benzène et de leurs dérivés alkylés ou oxygénés, peuvent être valorisées comme source de biocarburant. En revanche, une étape préalable de désoxygénation est nécessaire afin de réduire leur teneur en oxygène, leur viscosité ainsi que leur acidité. Certains procédés en développement permettent la dépolymérisation des lignines et la réduction simultanée des biohuiles grâce à l'addition de catalyseurs lors de la pyrolyse (Joffres *et al.*, 2013).

L'hydrolyse en milieu aqueux acide ou basique s'inspire des procédés de prétraitement de la biomasse lignocellulosique visant à dissoudre les lignines par rupture des liaisons éther. L'objectif de ce procédé est de dépolymériser les lignines sous forme de monomères aromatiques phénoliques tels que le guaiacol ou la syringaldéhyde (Figure 15). En revanche, les liaisons éther ne représentant que 70 % des liaisons inter-unités des lignines natives et encore moins dans les lignines techniques, ces méthodes mènent également à la production de dimères ou d'oligomères aromatiques. Les principaux acides utilisés pour la dépolymérisation des lignines sont les acides de Lewis et notamment les chlorures de métaux comme les chlorures de fer ( $\text{FeCl}_3$ ), de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) ou d'aluminium ( $\text{AlCl}_3$ ). En conditions alcalines, les hydroxydes de sodium ( $\text{NaOH}$ ), de calcium ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) et de magnésium ( $\text{Mg(OH)}_2$ ) ainsi que la potasse sont majoritairement utilisés (Wang *et al.*, 2019). Le plus souvent, l'utilisation d'acides et de bases pour la dépolymérisation des lignines permet d'améliorer les rendements d'autres procédés tels que l'oxydation ou l'hydrogénation des lignines qui sont les deux méthodes de dépolymérisation les plus développées.

La dépolymérisation des lignines par voie réductrice, ou hydrogénation, consiste à traiter les lignines à haute température (300-600 °C) et sous pression en présence d'hydrogène. L'hydrogène peut être apporté soit sous forme de gaz ( $\text{H}_2$ ) soit par l'intermédiaire de solvants donneurs d'hydrogènes tels que l'acide formique (Upton and Kasko, 2016). Ce procédé de dépolymérisation est réalisé en deux étapes : une première dite d'hydrogénolyse qui mène à la rupture des liaisons éthers puis une deuxième d'hydrodésoxygénation qui mène à la perte de fonctionnalité des monomères. Cette approche suscite un fort intérêt puisqu'elle permet de réduire la complexité du mélange de monomères produit (Sun *et al.*, 2018). En effet, l'hydrogénation des lignines mène majoritairement à la production de monomères aromatiques désoxygénés tels que le benzène, le toluène et le xylène (BTX). Ces trois monomères aromatiques, actuellement issus de la pétrochimie, sont très utilisés par l'industrie chimique comme précurseurs pour la synthèse de molécules actives ou de matériaux. Ils sont notamment très importants pour le domaine pharmaceutique où près de 80 % des médicaments synthétisés possèdent un noyau aromatique (Almada, 2015). En 2010, la production mondiale de BTX a atteint les 100 millions de tonnes avec une évolution du marché estimée à 4,4 % d'augmentation par an jusqu'en 2020. La production de BTX à base de lignines en est actuellement au stade de recherche en R&D avec une mise sur le marché envisagée dans les 10 à 20 prochaines années (Wang *et al.*, 2019). Le challenge des chercheurs dans le domaine consiste à mettre au point des conditions de réduction

suffisamment efficaces afin de maximiser le rendement en monomères désoxygénés tout en évitant une hydrogénation trop poussée qui mène à la production d'alcane cycliques ou linéaires par perte d'aromaticité et ouverture de cycle (comme indiqué en Figure 15 par les flèches en pointillé). L'hydrogénation de lignine en condition alcaline par ajout de soude, par exemple, permet d'améliorer les rendements en monomères ainsi que la sélectivité de la dépolymérisation sans avoir à durcir les conditions de réaction (Konnerth *et al.*, 2015).

La dépolymérisation oxydante des lignines techniques s'inspire des procédés de blanchiment de la pâte à papier à base de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), de peracide ( $RCOOOH$ ) ou d'oxygène ( $O_2$ ). Contrairement à la dépolymérisation réductrice des lignines, la voie oxydante mène à la production de monomères phénoliques fonctionnalisés, possédant des fonctions alcools, aldéhydes ou encore acides carboxyliques (Sun *et al.*, 2018). Ce procédé nécessite donc des conditions plus douces que l'hydrogénation afin de préserver l'aromaticité et les groupements fonctionnels des monomères. Il doit également être sélectif afin d'éviter la suroxydation des composés aromatiques menant à la production de molécules saturées, linéaires et oxygénées telles que les acides organiques (Figure 15, flèche pointillé) (Lange *et al.*, 2013). La synthèse de molécules aromatiques oxygénées par les procédés pétrochimiques classiques peut s'avérer difficile. La dépolymérisation oxydante des lignines a donc pour avantage de permettre d'envisager des applications à plus haute valeur ajoutée pour les monomères générés. En revanche, la fonctionnalité des monomères a pour effet secondaire d'augmenter la complexité du mélange de produits obtenu et de diminuer la sélectivité du procédé pour la production d'un monomère aromatique défini (Sun *et al.*, 2018). Les molécules aromatiques fonctionnalisées produites par oxydation des lignines peuvent être valorisées pour des applications inédites telles que le développement de nouveaux biomatériaux ou comme alternatives renouvelables pour l'approvisionnement de circuits déjà existants. C'est le cas, par exemple, de la vanilline. La bioraffinerie norvégienne Borregaard commercialise depuis les années 1940 de la vanilline produite par dépolymérisation oxydante des lignosulfonates en conditions alcaline (Ponnusamy *et al.*, 2019). Cette vanilline produite à base de lignine représente aujourd'hui 15 % du marché global de la vanilline (soit 3000 tonnes commercialisées par an) et substitue la vanilline synthétique pour des applications dans les domaines de la parfumerie, des cosmétiques ou de l'agroalimentaire, notamment dans les produits biologiques ou de niche (Caillol, 2018).

### 1.3.3.2. Les catalyseurs

Afin d'améliorer la sélectivité et les rendements des procédés précédemment décrits, et notamment pour résoudre les problèmes d'hydrogénation ou d'oxydation trop poussées, la dépolymérisation des lignines techniques nécessite l'utilisation de catalyseurs. Les catalyseurs sont des additifs chimiques ou biologiques qui permettent de diminuer l'énergie d'activation de la rupture des liaisons inter-unités et de ce fait de travailler dans des conditions opératoires plus douces. Les conséquences directes de leur utilisation sont une amélioration des rendements en monomères aromatiques ainsi qu'une meilleure transférabilité du procédé à l'échelle industrielle avec des paramètres de température et de pression abaissés. En revanche, il est primordial de prendre en compte le coût des catalyseurs dès leur développement à l'échelle du laboratoire afin de concevoir des procédés de dépolymérisation rentables.

Les catalyseurs les plus utilisés dans les procédés de dépolymérisation en conditions réductrices sont les catalyseurs d'origine métallique développés à partir de métaux nobles tels que le platine, le palladium, le ruthénium, le rhénium et le rhodium ou de métaux plus abondants tels que le nickel, le cobalt, le cuivre, le fer et le zinc (Wang *et al.*, 2019). Leur utilisation, seuls ou combinés, permet d'améliorer la sélectivité de l'hydrogénation et de la réaliser dans des conditions beaucoup plus douces. L'utilisation d'un catalyseur à base de nickel, par exemple, permet d'hydrogéner de la lignine à des températures comprises seulement entre 80 et 120 °C avec 1 bar d'hydrogène gazeux (Upton and Kasko, 2016). La combinaison du palladium et du fer sur un support de charbon présente quant à elle une forte sélectivité pour la production de benzène tout en évitant la saturation des noyaux aromatiques ou leur ouverture de cycles (Sun *et al.*, 2018). L'objectif de toutes les recherches sur l'hydrogénation catalytique des lignines est de développer un catalyseur actif, peu cher, stable et sélectif pour la production de monomères aromatiques avec une consommation minimum de dihydrogène (Wang *et al.*, 2019).

En dépolymérisation oxydante, il existe deux grandes voies de catalyse : celle qui fait appel à des catalyseurs chimiques et celles qui implique l'utilisation de catalyseurs biologiques (enzymes lignolytiques). Par voie chimique, les catalyseurs les plus utilisés font partie de la famille des composés organométalliques. Cette famille comprend par exemple, le trioxyde de méthylrhénium (MTO), les polyoxométallates (POM) et les complexes de salen avec des métaux de transition. Ces composés organométalliques sont capables d'activer le peroxyde d'hydrogène ainsi que l'oxygène moléculaire afin de catalyser la dépolymérisation des lignines techniques. Une autre famille de catalyseurs chimiques très étudiée est la famille

des catalyseurs biomimétiques dont font partie les métalloporphyrines. Ces molécules organiques associées à un atome métallique ont pour rôle de mimer le site catalytique des enzymes lignolytiques responsables de la dépolymérisation naturelle des lignines (Lange *et al.*, 2013). En effet, dans la nature, les lignines sont dégradées par des micro-organismes capables de produire deux grandes familles d'enzymes lignolytiques : les peroxydases et les laccases. Ces enzymes peuvent également être utilisées directement en tant que catalyseur de la dépolymérisation oxydante des lignines techniques. C'est la voie de catalyse biologique.

La dépolymérisation enzymatique des lignines est réalisée en présence de peroxyde d'hydrogène avec les peroxydases ou de dioxygène avec les laccases. L'utilisation de ces catalyseurs biologiques permet de dépolymériser la lignine dans les conditions les plus douces possibles à savoir à des températures proches de la température ambiante et à pression atmosphérique (Wong, 2009). Il s'agit d'une voie de choix pour le développement de procédés écoresponsables puisque la catalyse enzymatique est un procédé principalement aqueux qui ne requiert pas l'utilisation de solvants ou d'additifs toxiques et que les conditions opératoires douces impliquent une faible consommation énergétique. En revanche, de tels procédés peuvent être limités dans leur développement industriel par le coût associé à l'utilisation de cofacteurs ou à la production des enzymes.

#### *1.3.3.3. Les défis de la dépolymérisation des lignines techniques*

Si la dépolymérisation des lignines techniques est une voie prometteuse en termes de diversité d'applications et de valeur ajoutée des produits formés, elle reste aujourd'hui principalement étudiée à l'échelle du laboratoire. Un seul exemple de procédé de dépolymérisation de lignines est actuellement en cours de développement à l'échelle pilote. Il s'agit du procédé METNIN™ développé par l'entreprise finlandaise MetGen. De nombreux défis restent à relever avant de rendre d'autres procédés suffisamment rentables et sélectifs pour leur développement industriel. Certaines limites de cette voie de valorisation sont directement liées à la structure des lignines techniques tandis que d'autres trouvent leur source dans les mécanismes réactionnels de dépolymérisation.

De façon générale, la valorisation des lignines techniques est fortement limitée par la complexité de leur structure qui est l'un des freins majeur au développement de procédés de dépolymérisation sélectifs, c'est-à-dire visant la production d'une molécule cible à haut rendement. En effet, chaque type de liaison inter-unités présentant une énergie de dissociation qui lui est propre, leur grande diversité rend difficile la mise au point de conditions menant à

la rupture efficace et homogène de l'ensemble de ces liaisons (Wang *et al.*, 2019). A cela s'ajoute la variabilité de la composition monomérique des lignines et leur dépolymérisation mène finalement à un mélange complexe de molécules aromatiques plus ou moins fonctionnalisées. Il est alors souvent nécessaire de combiner à la dépolymérisation des lignines un procédé permettant la séparation des produits formés (Behling *et al.*, 2016). Enfin, la plupart des lignines techniques, ayant subi une condensation plus ou moins importante lors de leur extraction, ne sont pas des candidats de choix pour une valorisation par dépolymérisation du fait de leur forte teneur en liaisons C-C très stables.

Afin de remédier à ces problématiques, il est possible d'agir soit en amont de l'extraction des lignines techniques soit lors du fractionnement de la biomasse lignocellulosique. En amont, les solutions envisageables font appel à la sélection ou à la modification génétique de la biomasse. Il est alors intéressant, par exemple, de sélectionner ou de produire des plantes contenant de la lignine uniquement composée d'unités S et polymérisée selon un modèle régulier formant une structure riche en liaison de type  $\beta$ -O-4. Ces plantes sont alors plus facilement transformables dans le cadre des bioraffineries et la diversité des produits de dépolymérisation réduite. De plus, les réactions de condensation liées aux procédés de prétraitement sont alors fortement diminuées du fait de la présence des groupements méthoxyles en position 3 et 5 des unités S qui limitent la création de nouvelles liaisons C-C (Ragauskas *et al.*, 2014). En ce qui concerne les solutions à l'étude lors du prétraitement de la biomasse, une approche nommée dépolymérisation par réduction catalytique des lignines semble prometteuse. Cette méthode consiste à coupler en une seule et même étape le fractionnement des fibres de la paroi lignocellulosique avec la dépolymérisation des lignines en conditions réductrices et en présence d'un catalyseur. L'objectif de cette approche est d'augmenter les rendements de dépolymérisation en partant de la structure native des lignines au lieu de partir de lignines déjà fractionnées et condensées (Renders *et al.*, 2018).

Outre les freins liés à la structure des lignines techniques, les procédés de dépolymérisation eux-mêmes présentent encore certaines limites à leur développement industriel. Malgré de nombreuses recherches et de nombreux progrès qui ont été fait dans le domaine, les chercheurs doivent encore travailler à l'optimisation des conditions de dépolymérisation afin d'améliorer la rentabilité des procédés. Cette optimisation concerne à la fois l'augmentation des rendements en monomères ainsi que la diminution du coût et de l'impact environnemental des procédés.

Tout comme lors du fractionnement de la biomasse lignocellulosique, la dépolymérisation des lignines entraîne des réactions secondaires de repolymérisation et de condensation qui limitent fortement les rendements en monomères (Sun *et al.*, 2018). La repolymérisation des fragments ou des monomères de lignine est une problématique commune à l'ensemble des procédés de dépolymérisation. En revanche, différents mécanismes en sont responsables en fonction du procédé employé. Dans les procédés en conditions acides, les groupements hydroxyles en position  $\alpha$  des chaînes latérales de lignine sont impliqués dans la formation de carbocations benzyliques menant à des réactions de substitutions électrophiles aromatiques et à la création de nouvelles liaisons de type C-C. Les fonctions aldéhydes et cétones résultant de la rupture des liaisons aryl éther peuvent également repolymériser suivant une réaction de crotonisation et former d'autres liaisons condensées (Li *et al.*, 2018). En conditions basiques, les réactions de repolymérisation sont induites par la formation de méthylène quinones suite à la déprotonation des fonctions phénoliques (Kim *et al.*, 2017). Enfin, lors des procédés thermiques et enzymatiques, la condensation des lignines est liée à des réactions de couplage radicalaire entre les fragments générés par rupture homolytique des liaisons  $\beta$ -O-4 (procédé thermique) ou par abstraction d'hydrogène au niveau des groupements hydroxyles et phénoliques (procédé enzymatique) (Braun *et al.*, 2005; Higuchi, 1989).

Le plus grand défi mécanistique à relever pour une dépolymérisation efficace et rentable des lignines techniques est donc la mise au point de conditions réactionnelles permettant un clivage efficace des liaisons inter-unités tout en évitant la repolymérisation des monomères aromatiques produits. Différentes méthodes ont déjà été rapportées dans la littérature à ce sujet. L'une d'entre elles concerne l'utilisation de solvants spécifiques ou d'additifs, tels que l'éthylène glycol et le carbonate de diméthyle, afin de limiter la condensation des lignines par dérivatisation et donc stabilisation *in-situ* des produits de dépolymérisation (Dabral *et al.*, 2018; Deuss *et al.*, 2017). Une autre stratégie consiste à modifier chimiquement les lignines en amont de leur dépolymérisation afin de bloquer les groupements réactifs impliqués dans la formation des intermédiaires réactionnels (carbocation benzylique et méthylène quinones). La méthylation sélective des fonctions phénoliques, par exemple, permet de limiter la formation de résidu carbonisé lors du traitement thermique des lignines (Kim *et al.*, 2017). La réaction du formaldéhyde avec les groupements hydroxyles en position  $\alpha$  et  $\beta$  des chaînes latérales des lignines permet également leur protection par formation de structures 1,3-dioxane et améliore les rendements en monomères lors de la



dépolymérisation des lignines ainsi modifiées par hydrogénolyse (Shuai *et al.*, 2016). Une dernière approche intéressante consiste à dépolymériser les lignines à l'état solide, c'est-à-dire en amont de leur extraction de la biomasse lignocellulosique (Li *et al.*, 2018). Cette méthode permet de limiter physiquement la mobilité des intermédiaires réactionnels et, par conséquent, de prévenir leur interaction directe et leur couplage. Il s'agit d'une technique de prévention intéressante puisqu'elle ne nécessite pas l'utilisation de produits chimiques additionnels. En revanche, ce procédé ne peut être appliqué à la dépolymérisation des lignines techniques déjà isolées de la biomasse lignocellulosique par des prétraitements conventionnels.

L'ensemble des optimisations qui viennent d'être listées auront cependant un impact direct sur le coût et l'empreinte environnementale des procédés de dépolymérisation. Il est de ce fait primordial de considérer ces aspects dès leur développement à l'échelle du laboratoire. Afin d'améliorer la rentabilité des procédés de dépolymérisation catalytiques, de plus en plus d'études s'orientent vers le développement de catalyseurs hétérogènes. Ces catalyseurs ont pour propriété de ne pas être solubles dans le milieu réactionnel et de former une deuxième phase permettant ainsi de simplifier leur recyclage en fin de réaction (Behling *et al.*, 2016). Ils peuvent également permettre de stabiliser et de prolonger la durée de vie des catalyseurs dans le milieu réactionnel (Lange *et al.*, 2013). Pour produire de tels catalyseurs, la principale stratégie consiste à immobiliser les catalyseurs homogènes tels que les composés organométalliques ou les enzymes sur des supports en matériau inerte peu cher ou de former des oxydes de métaux. Toutefois, cette stratégie fait encore face à un certain nombre de limitations dont notamment les problèmes de transfert de matière entre les deux phases ou la diminution d'activité des catalyseurs immobilisés (Behling *et al.*, 2016). D'autres études récentes proposent comme alternative le développement de méthodes d'activation non conventionnelles. Ces dernières font appel à des sources d'énergie extérieures telles que la lumière (Liu *et al.*, 2019a), les ondes électromagnétiques (micro-ondes) (Dai *et al.*, 2018), les ultrasons ou encore le courant électrique. Enfin, d'autres voies d'optimisation portent sur l'utilisation de nouveaux milieux réactionnels tels que les fluides supercritiques ou les liquides ioniques qui permettent de faciliter la séparation des produits de dépolymérisation (Behling *et al.*, 2016). Les liquides ioniques attirent plus particulièrement l'attention des chercheurs grâce à leur double emploi en tant que solvant et catalyseur menant à la solubilisation et à la dépolymérisation simultanées des lignines selon un mécanisme d'hydrolyse acide (Wang *et al.*, 2019). Un schéma regroupant ces axes de recherche récents dans le domaine de la dépolymérisation des lignines techniques est présenté en Figure 16.

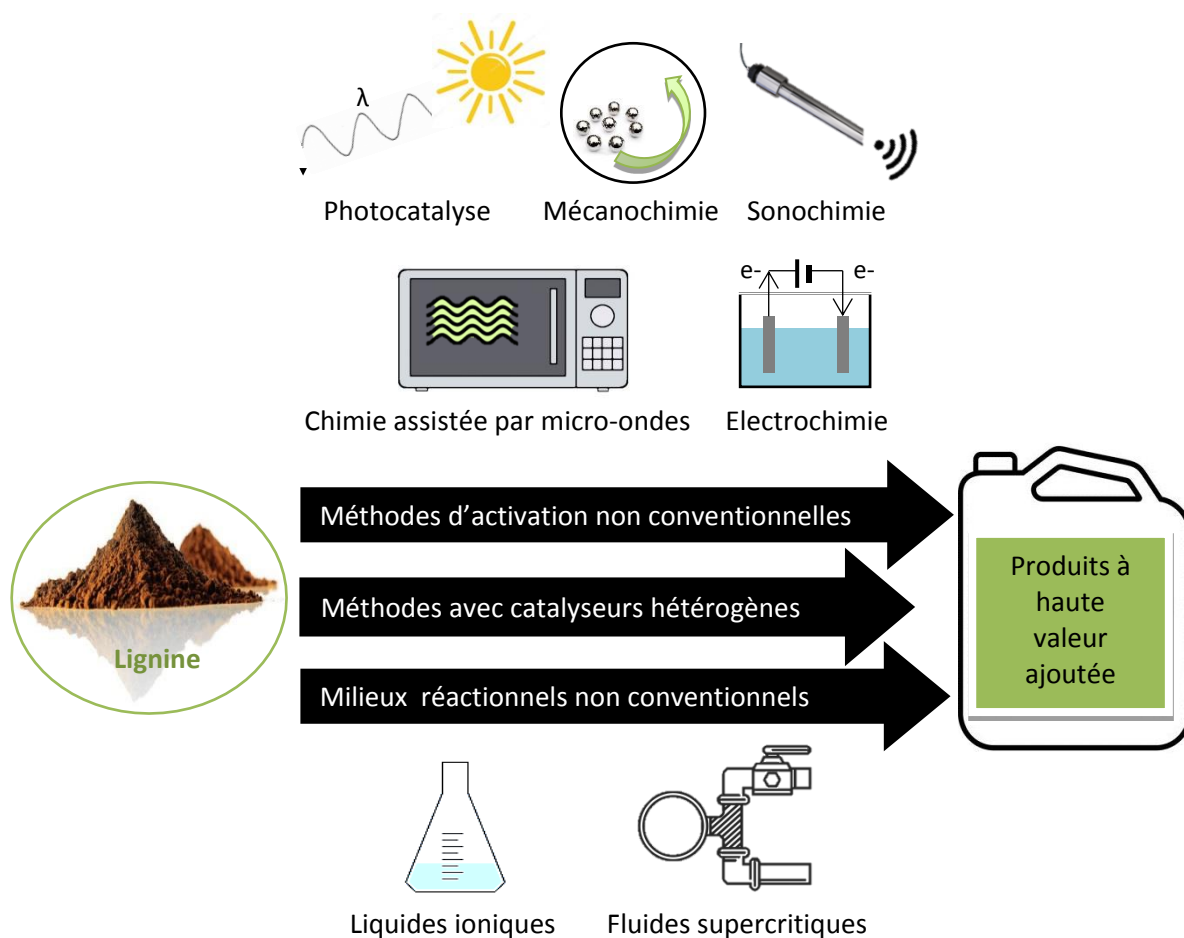


Figure 16 : axes de recherche récents sur la dépolymérisation des lignines (Behling et al., 2016).

#### 1.3.4. Bilan sur les voies de valorisation des lignines techniques

La Figure 17 reprend les différentes voies de valorisation envisageables pour les lignines techniques ainsi que les principaux produits qui en émergent.

Aujourd'hui, la disponibilité commerciale des lignines est d'environ 1 100 000 tonnes par an. Cette quantité représente uniquement 2 % de la quantité totale de lignines techniques produites à l'échelle industrielle. Sur ces 1 100 000 tonnes, 90 % proviennent de la valorisation de lignosulfonates par les bioraffineries Borregaard (groupe norvégien) et Rayonier Advanced Materials (groupe canadien) pour des applications en tant qu'adjuvants de matériaux de construction ainsi que pour la production de vanilline (Caillol, 2018). Les 10 % restants proviennent de la valorisation des lignines Kraft.

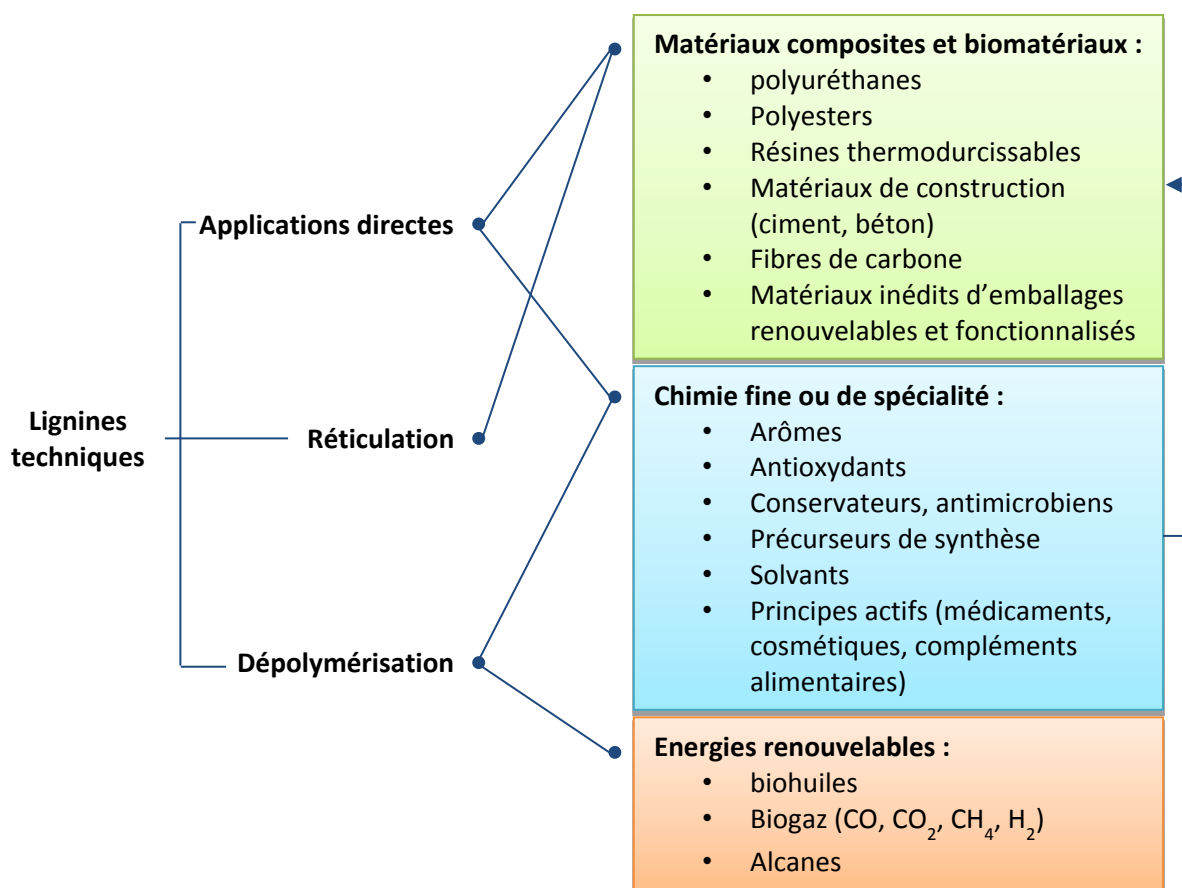


Figure 17 : résumé des différentes voies de valorisation des lignines techniques.

Jusqu'en 2007, les lignines Kraft étaient principalement utilisées pour la production de sulfure de diméthyle et de diméthylsulfoxyde par réaction des lignines avec du soufre fondu en conditions alcalines (Upton and Kasko, 2016). Avec le développement du procédé LignoBoost™ à l'échelle industrielle par le papetier américain Domtar, en 2013, les lignines Kraft sont depuis également commercialisées pour leur incorporation dans des produits de types adhésifs, résines ou revêtements. C'est le cas par exemple de la lignine BioChoice™ de Domtar, produite à hauteur de 25 000 tonnes par an ou encore de la gamme de lignines Lineo™ de Stora Enso (papetier finno-suédois) produites à hauteur de 50 000 tonnes par an. Stora Enso utilise également une partie de ses lignines en remplacement de 70 % des gaz naturels dans son four à chaux ce qui lui permet de réduire ses émissions de CO<sub>2</sub> d'origine fossile de 27 000 tonnes par an. Domtar, de son côté, a récemment investi dans l'entreprise Prisma Renewable Composite, qui développe notamment des plastiques à base de lignines BioChoice™, afin d'accélérer le développement et la mise sur le marché de cette application à plus haute valeur ajoutée.

Les chiffres clés du marché des lignines sont résumés en Figure 18. Il existe un paradoxe important entre la très grande quantité de lignines disponible dans la biomasse et même produite à l'échelle industrielle et la très faible quantité de lignines actuellement valorisée. L'exploitation des lignines est encore relativement sous développée par rapport à celle d'autres ressources renouvelables telles que les huiles végétales et la cellulose (Caillol, 2018). Deux principaux freins sont à l'origine de ce paradoxe. D'une part, la complexité des lignines (leur structure polymérique, la difficulté de leur extraction ainsi que leur variabilité en fonction de la ressource en biomasse et du procédé de fractionnement) les empêche d'être réellement considérées comme des matières premières industrielles. D'autre part, leur plus grand potentiel de valorisation réside dans la production de monomères aromatiques pouvant substituer les dérivés pétrochimiques dans les domaines de la chimie fine et des biomatériaux. Hors, cette voie de valorisation nécessite le développement de procédés de dépolymérisation efficaces, sélectifs, rentables et écoresponsables et de tels procédés n'ont à ce jour toujours pas atteint l'échelle industrielle (Behling *et al.*, 2016). Il s'agit d'un des plus grands défis de la bioéconomie. Des chercheurs du monde entier tentent de trouver les clés permettant de lever les verrous techniques de cette voie de valorisation aux vues de la grande quantité encore inexploitée de lignines, du potentiel des produits de dépolymérisation pour des applications à haute valeur ajoutée et des nombreuses opportunités d'innovations qui y sont associées.

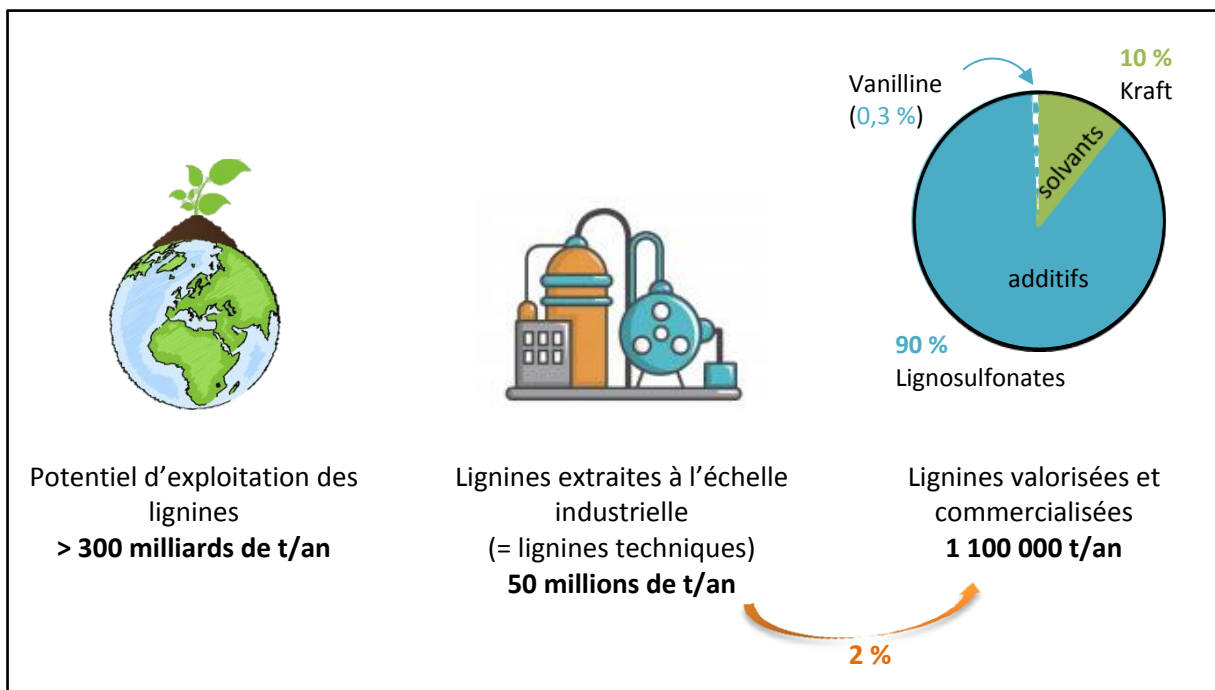


Figure 18 : les lignines, résumé des chiffres clés en tonnes par an (Caillol, 2018).

### ***1.3.5. Choix de la voie de valorisation d'une lignine technique***

La dernière clé de la réussite de la valorisation des lignines techniques consiste à sélectionner la voie de valorisation la plus appropriée à la ressource disponible. Ce choix repose principalement sur deux critères.

Le premier est la structure de la lignine technique ainsi que sa pureté. Il est primordial de bien maîtriser la caractérisation de la ressource en lignine afin de pouvoir anticiper sa solubilité ou sa réactivité en fonction notamment de sa masse moléculaire et de ses groupements fonctionnels. Il est également important de connaître la teneur et la composition de ses éventuels contaminants qui peuvent avoir un impact important sur les procédés de transformation ultérieurs envisagés. La présence de forts taux de cendres, de sucres résiduels ou de soufre, par exemple, peut entraîner une instabilité voire une inactivation de certains catalyseurs de dépolymérisation, notamment ceux développés à base de métaux nobles. En revanche, la présence de soufre est au contraire avantageuse lors de l'utilisation de catalyseurs sulfurés (Constant *et al.*, 2016). Les impuretés présentes dans la ressource en lignine peuvent ainsi représenter des freins ou des opportunités à leur valorisation.

Le deuxième critère concerne la disponibilité (tonnage de production annuel) et le coût de production de la lignine technique à l'échelle industrielle. Les applications retenues pour sa valorisation doivent être sélectionnées en fonction de leur valeur ajoutée et en adéquation avec le coût de production de la lignine technique afin d'assurer la rentabilité du procédé (Behling *et al.*, 2016). La valeur marchande des dérivés de lignine ne peut être que supérieure à la valeur de vente de la lignine dont ils sont issus. Le marché de ces applications doit également être adapté à celui de la ressource en terme de tonnage afin d'assurer un approvisionnement suffisant. En 2011, le chercheur Richard Gosselink a proposé dans ces travaux de thèse un graphique permettant de visualiser la corrélation entre la production annuelle d'une lignine technique, sa valeur de vente et la valeur marchande de ses dérivés (Gosselink, 2011). Ce graphique a été reproduit en Figure 19 pour illustrer ce dernier paragraphe.

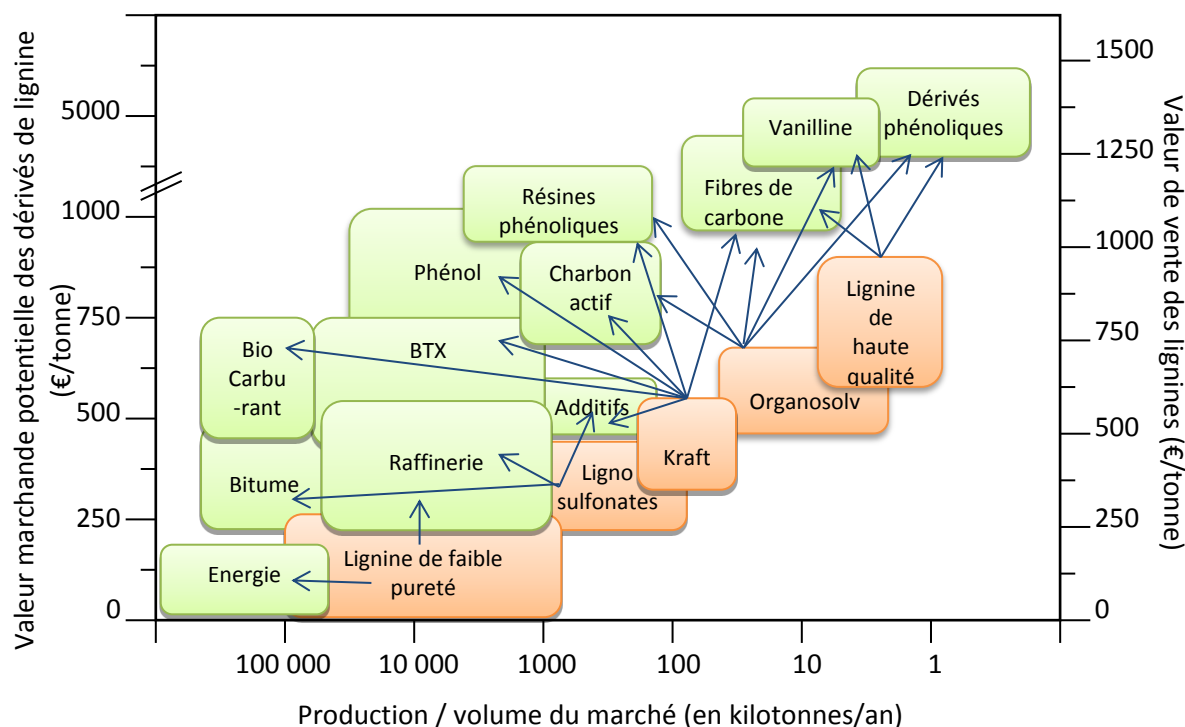


Figure 19 : corrélation entre la production annuelle de lignine (en tonne/an), sa valeur de vente (en €/tonne) et la valeur marchande de ses dérivés en fonction du type de lignines techniques (Gosselink, 2011).

### 1.3.6. Valorisation de la lignine thermomécanique

Actuellement, les eaux de procédés thermomécaniques sont traitées en station d'épuration après plusieurs cycles de recirculation suite à leur enrichissement en coproduits organiques (hémicelluloses, extractibles, lignines) qui impacte négativement la qualité du papier. Toutefois, la valorisation de ces coproduits représente une opportunité financière majeure pour les papeteries thermomécaniques qui doivent depuis quelques années résister au recul de la demande en papier journal liée à l'émergence du numérique (-7,6 % en 2018 par rapport à 2017 en Europe) (COPACEL, 2019). Plusieurs projets de valorisation des coproduits contenus dans ces eaux sont à l'étude à l'échelle du laboratoire ou du pilote semi-industriel toutefois aucune application n'est encore arrivée sur le marché. Ces travaux de recherche portent principalement sur la valorisation des hémicelluloses pour le développement de nouveaux biomatériaux (Krawczyk *et al.*, 2013; Oinonen *et al.*, 2013; Thuvander and Jönsson, 2016). Il n'existe en revanche aucun projet connu à ce jour concernant la valorisation des lignines thermomécaniques, de même qu'il n'en existe aucune source commerciale.

Le manque de procédés efficaces et économiques permettant leur extraction sélective des eaux de procédé est le principal frein à leur valorisation. Une simple étape de précipitation, comme pour les lignines Kraft par exemple, ne serait pas envisageable du fait de leur forte dilution dans les eaux de procédé (matière organique  $< 1-2 \text{ g.L}^{-1}$ ) et des très grands volumes d'eau à traiter (de l'ordre de  $700 \text{ à } 3000 \text{ m}^3$  par jour) (Jönsson, 2016). Leur extraction par adsorption sur des résines polymériques ou du charbon actif a été étudiée dans le cadre de l'amélioration du circuit de recirculation d'eau des papeteries thermomécaniques (Andersson *et al.*, 2008; Oveissi and Fatehi, 2014). En revanche, dans le cas des résines polymériques, plusieurs étapes de fractionnement à l'aide de solvants organiques (MTBE et méthanol) sont par la suite nécessaires pour parvenir à séparer la lignine des autres composés organiques. Ce procédé n'est donc pas particulièrement adapté à un développement industriel pour la valorisation des coproduits thermomécaniques. Au laboratoire, un procédé membranaire en cascade a été développé dans le cadre du projet RevaCoppa permettant la récupération et la séparation des différentes familles de coproduits présentes dans les eaux de procédé de la papeterie Norske Skog, située à Golbey dans les Vosges (Courbalay, 2018). Une étude technico-économique de ce procédé a permis de démontrer son applicabilité pour le traitement des eaux de procédé thermomécanique à l'échelle industrielle (Villain-Gambier *et al.*, 2020). Cette étude souligne ainsi la pertinence de l'étude des voies de valorisation des hémicelluloses, des extractibles ainsi que de la lignine thermomécanique (LTM) issus de ce procédé et justifie l'ensemble des travaux de cette thèse.

La LTM issue du projet RevaCoppa est produite sous la forme d'une fraction liquide aqueuse concentrée, enrichie en lignine mais contenant également d'autres composés d'origine organique et inorganique à caractériser et quantifier. Elle provient du prétraitement thermomécanique d'une biomasse composée exclusivement de bois de résineux et se compose de ce fait uniquement de motifs G et H comme expliqué au tout début de ce chapitre bibliographique (paragraphe 1.1.1.3). Toutefois, aucune autre information n'est disponible au sujet de ses caractéristiques structurales telles que ses fonctionnalités ou ses types de liaisons inter-unités. Puisqu'il a été souligné par cette revue bibliographique qu'une bonne connaissance de la ressource en lignine est essentielle à sa valorisation, le premier objectif de cette thèse a été de générer des données analytiques structurales, quantitatives et qualitatives, sur la LTM. Cette caractérisation a été réalisée sur un lot référent de LTM produit lors d'une montée en échelle du procédé membranaire de RevaCoppa en approvisionnement semi-continu. Ce lot a également servi de substrat pour l'ensemble des travaux de cette thèse.

Ces données analytiques n'étant pas encore disponible à l'origine du projet, le choix des voies de valorisation de la LTM a été anticipé sur la base de ses données de marché et sur les informations disponibles dans la littérature, même si peu fournies (paragraphe 1.2.3.4). Tout d'abord, le procédé thermomécanique ne comprenant pas d'étape de délignification à proprement parlé, la LTM est produite en très faible quantité, comparativement aux autres lignines techniques, et n'est donc que peu disponible à l'échelle industrielle. Le choix de ses voies de valorisation doit donc s'orienter préférentiellement vers des marchés de niche à faible tonnage. En revanche, la valeur ajoutée des produits issus ou intégrant la LTM doit alors être élevée afin d'assurer la rentabilité du procédé. Ensuite, la relative « douceur » du procédé thermomécanique ayant été démontrée, il est possible d'assumer sans trop se tromper que la LTM possède une structure relativement peu dénaturée. De plus, aucun produit chimique n'est utilisé lors de sa production que ce soit au niveau du procédé thermomécanique ou au niveau du fractionnement membranaire. Ainsi, la LTM peut être qualifiée de lignine de haute qualité, c'est-à-dire de lignine naturelle et non contaminée chimiquement. Cette lignine peut ainsi bénéficier de labels de qualité tel que le label vert Ecocert® qui certifie l'origine biologique et la production durable d'ingrédients cosmétiques.

Si l'on place ainsi la LTM sur le graphique reproduit en Figure 19, la voie de valorisation la plus adaptée à cette ressource en lignine apparaît comme étant la production de composés aromatiques de faibles masses moléculaires tels que la vanilline ou les dérivés phénoliques à haute valeur ajoutée. Cette voie de valorisation, impliquant la dépolymérisation oxydante de la LTM, a donc été retenue dans le cadre de cette thèse. En parallèle, une autre voie de valorisation, qui n'apparaît pas sur la Figure 19, a également été étudiée pour la LTM en partenariat avec des entreprises extérieures. Il s'agit de sa valorisation directe en tant que biomolécule active (antioxydante, antimicrobienne et anti-UV) dans des produits des secteurs de la cosmétique, de la détergence et de la phytopréservation. Afin de faciliter les échanges de matière avec ces entreprises et d'assurer la bonne conservation du lot référent de LTM, différents procédés de transformation post-production lui ont été appliqués en interne. Une étude a par la suite été menée dans le cadre de cette thèse à propos de l'impact de ces procédés sur la structure de la LTM.

En ce qui concerne la dépolymérisation oxydante de la LTM, il a été décidé de se concentrer sur le développement d'un procédé biotechnologique employant un catalyseur enzymatique. Cette stratégie permet de travailler dans des conditions de dépolymérisation douces, respectueuses de l'environnement, ne nécessitant pas ou peu de produits chimiques et



intégrables dans un contexte de bioraffinerie. En revanche, comme évoqué au paragraphe 1.3.3.3, le principal frein de cette méthode de dépolymérisation est la repolymérisation des fragments aromatiques radicalaires menant à la production de structures condensées avec de nombreuses liaisons C-C. Une approche originale a été étudiée dans le cadre de cette thèse pour lutter contre ces réactions délétères. Cette méthode repose sur la séparation physique des produits de dégradation radicalaires afin de limiter leurs réactions de couplage. En effet, un bioréacteur membranaire a été développé afin de catalyser la dépolymérisation enzymatique de la LTM tout en permettant l'extraction continue des produits de dépolymérisation. Il s'agit d'une solution technique, relevant du domaine du génie des procédés, qui s'appuie sur un principe physique et non sur l'utilisation de produits chimiques additionnels. Grâce à cette approche, le caractère labellisable de la LTM peut être transféré à ses produits de dépolymérisation.

Les deux prochaines parties de ce chapitre présentent les procédés biocatalytiques et membranaires actuellement étudiés ou développés dans le cadre des bioraffineries.

## **2. DEPOLYMERISATION ENZYMATIQUE DES LIGNINES : ACTEURS ET MECANISMES**

### **2.1. DEGRADATION NATURELLE DES LIGNINES NATIVES**

Dans la nature, certains micro-organismes, dits lignolytiques, sont capables de dégrader efficacement les lignines malgré leurs propriétés antimicrobiennes. Ils jouent ainsi un rôle important dans le cycle du carbone en participant au recyclage de la matière organique. Pour dégrader les lignines, ces microorganismes produisent et sécrètent une panoplie d'enzymes oxydantes extracellulaires qui agissent en synergie (Wong, 2009). Ces enzymes, appelées enzymes lignolytiques, appartiennent à différentes familles, dont les plus connues et étudiées sont les lignine-peroxydase (LiP), les manganèse-peroxydases (MnP) et les laccases. Toutes ces enzymes appartiennent à la même classe des oxydoréductases. Toutefois, les mécanismes d'oxydation menant à la dégradation des lignines diffèrent en fonction de chaque famille d'enzymes. Ils impliquent également différents composés non protéiques ainsi que diverses enzymes auxiliaires, nécessaires à leur fonctionnement. Les paragraphes qui suivent présentent les différents micro-organismes lignolytiques ainsi que les principales caractéristiques de ces trois familles enzymatiques et de leurs cycles catalytiques.

### 2.1.1. Les micro-organismes lignolytiques

Les principaux micro-organismes lignolytiques sont les champignons de la pourriture blanche, du genre basidiomycète. En présence d'oxygène, ces champignons sont capables de minéraliser totalement les lignines contenues dans le bois en libérant des molécules d'eau et de dioxyde de carbone, notamment grâce à la sécrétion d'enzymes lignolytiques. Il existe également des bactéries capables de produire des enzymes lignolytiques, dont des laccases et des peroxydases bactériennes, et de dégrader les lignines (Bugg and Rahmanpour, 2015). L'une des voies métaboliques, la plus étudiée récemment chez les bactéries lignolytiques, est la voie des  $\beta$ -éthérases. Cette dernière permet la dégradation sélective des liaisons  $\beta$ -O-4 entre les unités de lignine en impliquant, de façon séquentielle, des déshydrogénases (LigD, LigL, LigN, LigO), des  $\beta$ -éthérases (LigE, LigF, LigP) et des lyases (LigG) (Gall *et al.*, 2017). Ces enzymes présentent un grand intérêt pour le développement de procédés biotechnologiques, dont certains seront mentionnés au paragraphe 2.2.1. Toutefois, la majeure partie de cette étude bibliographique sur la dépolymérisation biologique des lignines natives se concentre sur les acteurs et les mécanismes fongiques.

Le champignon de pourriture blanche le plus étudié comme microorganisme lignolytique modèle est *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*). Son génome a été séquencé en 2004, démontrant sa capacité à produire et sécréter à la fois des peroxydases (LiP et MnP) et des laccases (Martinez *et al.*, 2004). Ce n'est pas le cas, en revanche, de tous les champignons lignolytiques puisque certains, comme *Pycnoporus cinnabarinus*, sont uniquement spécialisés dans la production de laccases (Scheel *et al.*, 2000). Ainsi, la composition des cocktails enzymatiques sécrétés par les champignons de la pourriture blanche diffère d'une espèce à l'autre. Il en est de même concernant leur activité vis-à-vis de la biomasse lignocellulosique. Certains champignons de la pourriture blanche sont capables d'attaquer simultanément les lignines, les hémicelluloses et la cellulose. C'est le cas par exemple de *Trametes versicolor* et de *P. chrysosporium*. D'autres, quant à eux, attaquent sélectivement les lignines comme *Ceriporiopsis subvermispora* (Zhu *et al.*, 2016).

La production des enzymes lignolytiques chez les champignons de la pourriture blanche est fortement influencée par leur environnement. Elle est favorisée par la présence de certains métabolites fongiques dans le milieu de bioconversion, comme les acides et les alcools organiques (acide malonique, acide 2-hydroxybutyrique, alcool vétratrique) (Wong,

2009). Il a aussi été démontré que certains éléments tels que les métaux (cuivre et manganèse) jouent un rôle dans la régulation de l'expression des gènes codant pour ces enzymes (Gassara *et al.*, 2011; Scheel *et al.*, 2000). Enfin, la source et la concentration en nutriments essentiels, comme l'azote et le carbone, impactent également directement la production des enzymes lignolytiques. Lors de cultures sur milieux synthétiques, il est possible, par exemple, d'induire leur production chez *P. chrysosporium* en limitant l'apport en azote dans le milieu. Toutefois, de façon assez contradictoire, une concentration importante en azote organique favorise leur expression lorsque ce micro-organisme est cultivé en présence d'un substrat lignocellulosique (Songulashvili *et al.*, 2007). Ainsi, non seulement le patrimoine génétique mais aussi les conditions de croissance des champignons de la pourriture blanche sont déterminants pour l'expression et la sécrétion de leurs enzymes lignolytiques.

Le mécanisme par lequel les différentes enzymes lignolytiques sécrétées coopèrent ensuite lors de la dégradation fongique des lignines demande encore à être élucidé. Bien que des études aient démontré un effet synergique entre ces enzymes, le rôle exact de chaque famille dans la dépolymérisation des lignines n'a pas été identifié (Camarero *et al.*, 1997; Galliano *et al.*, 1991; Longe *et al.*, 2018). La complexité des systèmes multienzymatiques, produits par certains micro-organismes, ainsi que l'évolution de leur composition, en fonction des conditions et de leur substrat, suggèrent que chacune de ces enzymes joue un rôle complémentaire et très régulé dans les mécanismes de délignification. Toutefois, l'action mutuelle de toutes ces enzymes ne semble pas non plus indispensable à la dégradation des lignines, comme le soulignent les capacités de délignification de certains champignons spécialisés dans la production d'une seule famille d'enzyme. L'étude des mécanismes de dégradation fongique des lignines reste donc un sujet de recherche actuel et très complexe, de par la diversité des métabolismes lignolytiques qui existent au sein des basidiomycètes.

L'étude des mécanismes de résistance de ces champignons aux composés aromatiques toxiques générés par la dépolymérisation des lignines natives est également un sujet de recherche actuel (Fernández-González *et al.*, 2018). De nombreuses études démontrent que la détoxification du milieu est assurée par une première étape d'internalisation de ces fragments au sein des micro-organismes. Il existe ensuite différentes enzymes intracellulaires capables de neutraliser les molécules aromatiques toxiques, dont les plus connues et étudiées sont les glutathion-S-transférases (GST) (Meux *et al.*, 2012; Perrot, 2018; Schwartz *et al.*, 2018). Ainsi, le processus de délignification et de minéralisation des lignines *in-vivo* implique à la fois des enzymes lignolytiques extracellulaires et des enzymes de détoxification intracellulaires.



rôle dans la dépolymérisation des lignines semble multiple. Le radical  $AV^{+}$  est impliqué dans la protection des LiP contre leur inactivation en présence d'un excès d' $H_2O_2$ , comme illustré sur la Figure 20. Il permet alors de régénérer l'état initial des enzymes (LiP(III)  $\rightarrow$  LiP) en se stabilisant sous forme de vétraldéhyde (VAD). Des études ont également démontré que ce cation radicalaire peut oxyder des substrats secondaires qui ne seraient normalement pas directement oxydés par les LiP (Christian *et al.*, 2005; Harvey *et al.*, 1986). En ce sens, le  $AV^{+}$  pourrait jouer un rôle de médiateur dans les mécanismes de dépolymérisation catalysés par les LiP (Goodwin *et al.*, 1995; ten Have and Teunissen, 2001). Les médiateurs sont des petites molécules non protéiques pouvant être oxydées par les enzymes lignolytiques et qui présentent des formes oxydées stables, capables de diffuser et d'oxyder à leur tour d'autres molécules organiques. En présence de médiateurs, les enzymes lignolytiques possèdent une activité catalytique plus importante grâce au haut potentiel redox, à la petite taille et à la grande mobilité de ces derniers qui peuvent atteindre des substrats inaccessibles aux enzymes.

Les LiP se différencient des autres peroxydases par leur sensibilité au peroxyde d'hydrogène en excès, mentionnée précédemment, ainsi que par la valeur de leur pH optimum inhabituellement basse, proche de pH 3 (Wong, 2009). Elles ont également le potentiel redox le plus élevé (LiP(I) :  $E^0 \sim 1,2$  V à pH = 3) et une faible spécificité de substrat, ce qui leur permet d'oxyder une large gamme de composés organiques (Dashtban *et al.*, 2010). Grâce à ce haut potentiel, les LiP peuvent à la fois oxyder les unités phénoliques et non phénoliques des lignines. Ce sont d'ailleurs les seules enzymes lignolytiques capables d'oxyder directement les unités non phénoliques des lignines sans l'intervention de médiateurs selon le mécanisme illustré en Figure 21.

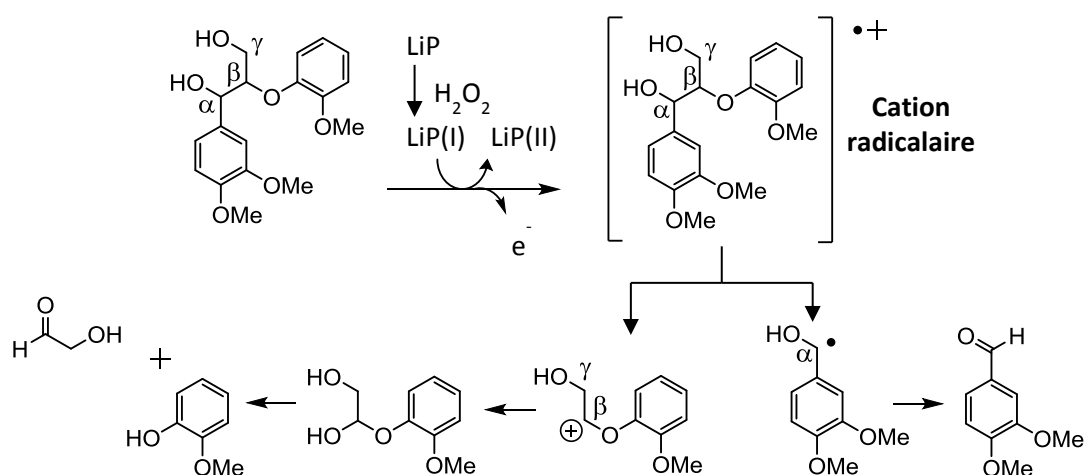


Figure 21 : mécanisme d'oxydation d'un dimère modèle de lignine non phénolique de type  $\beta$ -O-4 catalysé par des LiP (Wong, 2009).

Lors de la dégradation oxydante des lignines par les LiP, seule la première étape de formation du cation radicalaire est catalysée par ces enzymes, que ce soit au niveau des unités phénoliques ou non phénoliques de lignine. La position et la réactivité de ces radicaux dépendent alors de la nature des substituants présents sur les cycles aromatiques. Par la suite, les réactions menant à leur stabilisation (rupture des liaisons inter-unité, ouverture de cycle aromatique, déméthylation, oxydation ou couplage radicalaire) sont non enzymatiques et dépendent des conditions de bioconversion (ten Have and Teunissen, 2001; Wong, 2009). *In-vivo*, la compartimentation des lignines et de leurs produits de dégradation limite fortement les réactions de couplage ou de polymérisation qui sont malheureusement très souvent observées *in-vitro*.

#### 2.1.2.2. Les Manganèse-peroxydases (MnP)

Les manganèse-peroxydases, ou MnP (EC 1.11.1.13), sont également des glycoprotéines à hème ferrique, de structure globale proche de celle des LiP et produites sous différentes isoformes. La première MnP extracellulaire à avoir été extraite et caractérisée est l'une des isoenzymes produit par *P. chrysosporium* présentant une masse moléculaire de 46 kDa et un point isoélectrique proche de pH 4,5 (Cullen and Kersten, 2004).

La dépolymérisation oxydante des lignines natives par les MnP est dépendante de la présence d' $H_2O_2$  et de manganèse ( $Mn^{2+}$ ). Ce dernier intervient dans le cycle catalytique des MnP, présenté en Figure 22, et est indispensable à leur fonctionnement. Il s'agit ainsi de leur cofacteur métallique pour lequel un site de liaison spécifique est présent à la surface des MnP. Le cycle catalytique des MnP est très similaire à celui des LiP, à la différence près que les MnP n'utilisent que les ions  $Mn^{2+}$  comme réducteurs pour retourner à leur état d'oxydation d'origine une fois sous forme MnP(II). La réduction de la forme MnP(I) à la forme MnP(II), en revanche, peut-être réalisée à la fois par les ions  $Mn^{2+}$  et des composés phénoliques.

En suivant ce cycle catalytique, les MnP sont capables d'oxyder les unités phénoliques des lignines, directement par MnP(I) ou via l'intermédiaire de  $Mn^{3+}$ . Toutefois, l'ion  $Mn^{3+}$  ne peut diffuser jusqu'aux lignines qu'à condition d'être stabilisé lorsqu'il se dissocie de la surface de l'enzyme. Il est ainsi complexé par des acides organiques tels que l'acide oxalique ou l'acide malonique qui sont sécrétés en quantité significative dans le microenvironnement des champignons. L'oxydation des unités phénoliques de lignine par le complexe  $Mn^{3+}$ /acide organique mène à la production de radicaux phénoxydes qui se stabilisent par la suite en suivant des réactions non enzymatiques, comme pour les LiP (ten Have and Teunissen, 2001).



peuvent permettre de régénérer de la forme active des MnP par des réactions d'oxydoréduction. Ils peuvent aussi prévenir son inactivation en réagissant avec les molécules d' $\text{H}_2\text{O}_2$  comme le ferait une catalase (Wong, 2009).

La production de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  nécessaire au fonctionnement des LiP et des MnP est assuré *in-vivo* par des enzymes auxiliaires extracellulaires. Ces enzymes comprennent entre autre les glyoxal-oxydases (EC 1.2.3.5) et les oxydases d'alcools aryliques (EC 1.1.3.7). La production simultanée de ces enzymes avec celle des peroxydases a été observée à de nombreuses reprises lors de l'étude du sécrétome de divers champignons de pourriture blanche (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Cette observation souligne l'implication de ces enzymes auxiliaires dans les mécanismes de délignification catalysés par ces micro-organismes. La coopération entre les enzymes productrices de peroxyde d'hydrogène et les peroxydases permet de contrôler la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  toxique dans l'environnement proche du mycélium et d'éviter ainsi la suroxydation et l'inactivation de ces dernières (Daou *et al.*, 2016).

Avant de passer à la prochaine famille d'enzyme, les laccases, il est intéressant de mentionner qu'il existe encore une classe de peroxydases lignolytiques, appelées peroxydases versatiles (EC 1.11.1.16). Ces peroxydases présentent une activité hybride entre celle des LiP et des MnP. Elles sont à la fois capables d'oxyder le  $\text{Mn}^{2+}$  en  $\text{Mn}^{3+}$ , comme les MnP, et également d'oxyder des substrats phénoliques et non-phénoliques typiques des LiP en l'absence de manganèse. D'un point de vue moléculaire, la structure de ces enzymes est plus proche de celle des LiP que de celle des MnP. Elles se différencient toutefois des LiP par la présence d'un site de liaison du  $\text{Mn}^{2+}$  proche de leur hème (Wong, 2009).

### 2.1.2.3. *Les laccases*

Les laccases (EC 1.10.3.2) sont des enzymes très répandues dans le monde du vivant. De nombreux organismes, dont des plantes, des bactéries, des champignons et des insectes, sont capables de produire et de sécréter des laccases. Selon leur origine, elles présentent alors des caractéristiques et des propriétés distinctes et peuvent jouer des rôles parfois antagonistes. En effet, les laccases végétales (dont la plus connue : celle de *Rhus vernicifera*) catalysent la biosynthèse des lignines natives alors que les laccases fongiques (des basidiomycètes notamment) participent à la délignification du bois (Giardina *et al.*, 2010). Les paragraphes suivants se concentrent sur la description des laccases fongiques et de leur rôle dans la délignification naturelle du bois.



La majorité des laccases fongiques sont des protéines globulaires, monomériques et généralement glycosylées, d'environ 60-70 kDa et qui possèdent un point isoélectrique proche de pH 4 (Giardina *et al.*, 2010). Ces enzymes sont produites sous différentes isoformes qui peuvent être à la fois intra et extracellulaire chez un même micro-organisme. Les laccases fongiques les plus étudiées sont celles produites par le champignon de pourriture blanche *Trametes versicolor* (Wong, 2009).

Les laccases sont très peu spécifiques au niveau de leur substrat et catalysent l'oxydation de nombreux composés aromatiques en même temps que la réduction du dioxygène ( $O_2$ ) en molécule d'eau ( $H_2O$ ). Leur site actif est composé de quatre atomes de cuivre repartis sur trois positions différentes (T1, T2 et T3), comme illustré en Figure 23. Dans un premier temps, les laccases catalysent quatre réactions successives d'oxydation de molécules de substrat, par transfert d'un électron à chaque fois. L'atome de cuivre en position T1 gouverne le potentiel redox de ces enzymes ( $E^0 \sim 0,42-0,79$  V) (Roth and Spiess, 2015). Il est le premier accepteur d'électron lors de l'oxydation des substrats puis il transfère les électrons aux trois autres atomes de cuivre du site actif. Une fois sous forme réduite, les laccases retournent à leur état d'oxydation d'origine ( $Cu^{2+}$ ) en réduisant une molécule de dioxygène en eau suivant deux réactions successives, qui impliquent chacune le transfert de deux électrons. Au cours d'un cycle catalytique les laccases mènent donc à la production de quatre composés aromatiques radicalaires par molécule d' $O_2$  consommée.

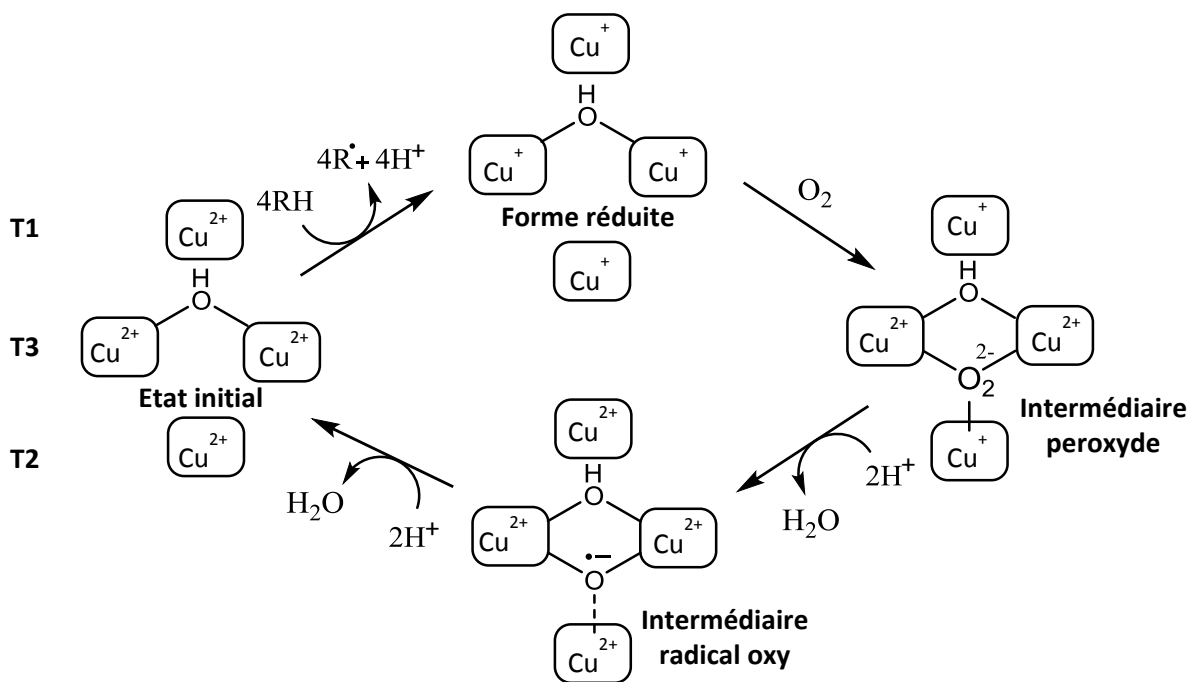


Figure 23 : cycle catalytique des laccases en présence de dioxygène (Wong, 2009).

Les laccases sont capables d'oxyder directement les unités phénoliques de lignine par transfert d'un électron provenant de leurs fonctions hydroxyles phénoliques, ce qui entraîne l'élimination de leur atome d'hydrogène et génère des radicaux phénoxyles (ten Have and Teunissen, 2001). Ces espèces radicalaires se stabilisent la plupart du temps *in-vitro* par des réactions de couplage, donc par polymérisation, mais elles peuvent également engendrer la rupture de liaisons inter-unités, la formation de quinone, ainsi que des réactions de déméthylation, d'oxydation des fonctions  $\alpha$ -hydroxyles ou encore de perte d'aromaticité en fonction des conditions de bioconversion (Liu *et al.*, 2019b; Wong, 2009).

Le potentiel redox des laccases fongiques ne leur permet pas d'oxyder directement les unités non phénoliques de lignine. Pourtant, certains champignons de pourriture blanche, comme *Pycnoporus cinnabarinus*, sont capables de décomposer entièrement les lignines natives, qui contiennent près de 80 % d'unités non phénoliques, sans produire de peroxydases (Eggert *et al.*, 1997). Il a donc été suggéré que les laccases, tout comme les MnP, sont capables d'oxyder les unités non phénoliques de lignine par l'intermédiaire de médiateurs d'oxydation. *In-vivo*, certains métabolites fongiques, tel que l'acide 3-hydroxyanthranilique, ainsi que les monomères issus de l'oxydation des unités phénoliques de lignine peuvent jouer ce rôle de médiateur (Cañas and Camarero, 2010; Eggert *et al.*, 1996). En laboratoire, il existe également plusieurs médiateurs synthétiques qui peuvent être associés à la laccase afin de dépolymériser des lignines. Parmi eux, il est possible de citer l'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), le 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) et l'acide violurique (VA), dont les structures sont dessinées en Figure 24 (Roth and Spiess, 2015).

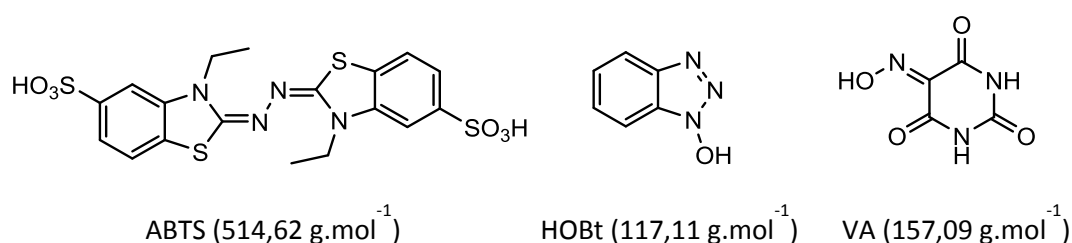


Figure 24 : structures et masses moléculaires de trois médiateurs synthétiques de laccase.

Ces systèmes laccase/médiateur (LMS) produisent alors des radicaux stables, diffusibles et possédant un potentiel redox élevé, capables d'oxyder les unités non phénoliques de lignine. Cette oxydation peut alors entraîner la rupture de liaisons inter-unités ainsi que des réactions d'oxydation, ou de perte d'aromaticité, en fonction des conditions de bioconversion et de la substitution des cycles aromatiques (Wong, 2009).

## 2.2. DEPOLYMERISATION DES LIGNINES TECHNIQUES EN LABORATOIRE

En s'inspirant des voies métaboliques naturelles, ou en les appliquant directement, de nombreux groupes de recherche tentent de développer des procédés industrialisables de dépolymérisation de lignines techniques, à la fois écoresponsables et durables. Les différentes approches, actuellement considérées à l'échelle du laboratoire pour y arriver, sont abordées dans les prochains paragraphes de cette revue bibliographique. Un point est également fait sur les techniques de production des catalyseurs impliqués dans ces procédés. Enfin, la stratégie retenue dans le cadre de cette thèse, pour la dépolymérisation de la LTM, est détaillée.

### 2.2.1. Les différentes approches

Différentes approches peuvent être envisagées au laboratoire pour catalyser la dépolymérisation enzymatique de lignines techniques. La première consiste à utiliser un micro-organisme lignolytique complet, c'est-à-dire à le cultiver directement en présence de la lignine à dépolymériser. En utilisant des champignons de la pourriture blanche, il est toutefois difficile de contrôler le degré de dépolymérisation des lignines et d'éviter l'internalisation des fragments aromatiques, suivie de leur perte d'aromaticité et de leur minéralisation complète (Liu *et al.*, 2019b). Néanmoins, cette approche est intéressante dans le cadre de l'utilisation de bactéries lignolytiques. Ces dernières peuvent être génétiquement modifiées afin d'orienter leur métabolisme, notamment intracellulaire, vers les produits de dégradation souhaités (Bugg and Rahmanpour, 2015; Sainsbury *et al.*, 2013).

Une autre approche consiste à isoler les enzymes lignolytiques pour les utiliser en tant que catalyseurs *in-vitro*. Cette méthode permet de s'affranchir des problèmes de métabolisation des fragments de lignine et de simplifier la récupération des produits de dépolymérisation. Les enzymes lignolytiques peuvent alors être utilisées sous la forme de complexes multienzymatiques bruts, correspondant à l'ensemble du sécrétome microbien, ou bien sous forme purifiée (Longe *et al.*, 2018). Cette approche offre ainsi une grande flexibilité dans la conception de procédés biotechnologiques, permettant d'exploiter le potentiel d'une seule ou de plusieurs enzymes, et de façon simultanée ou séquentielle. Les paragraphes qui suivent illustrent ce propos en détaillant quelques exemples de dépolymérisations enzymatiques *in-vitro* de lignines modèles ou techniques.

Avec leur large spectre de substrats et leur utilisation du dioxygène de l'air comme accepteur d'électron, les laccases sont des enzymes attractives pour le développement de procédés industriels. De nombreuses études, utilisant des molécules modèles de lignine ainsi que des lignines techniques, ont permis de démontrer la capacité des laccases à induire la rupture des principales liaisons inter-unités des lignines (Roth and Spiess, 2015; Xie *et al.*, 2017). Toutefois cette activité n'est possible qu'en présence de médiateurs qui permettent de surmonter la barrière redox de ce type de réaction. Ces études soulignent également l'importance du rôle des médiateurs dans les mécanismes d'oxydation médiés par la laccase afin d'éviter les réactions de polymérisation. *In-vitro*, une réduction de 73 % de la masse moléculaire en nombre d'une lignine organosolv a pu être observée, lors d'une étude récente utilisant un système laccase/ABTS (Longe *et al.*, 2018).

D'autres études portent sur l'utilisation des LiP, capables d'oxyder l'ensemble des unités structurales des lignines sans ajout de médiateurs. Toutefois, il existe un mécanisme de rétro-inhibition du cycle catalytique des LiP qui entraîne leur inactivation *in-vitro*. Cette inhibition est induite par interaction des fonctions phénoliques libres des lignines, et de leurs dérivés de dégradation, avec le site de liaison de l'alcool vératric à la surface des enzymes (Pham *et al.*, 2014). *In-vivo*, le champignon modèle *P.chrysosporium* est capable de produire des enzymes de la famille des O-Méthyltransférases, qui maintiennent l'activité des LiP par méthylation des fonctions phénoliques générées lors de la délignification (Thanh Mai Pham and Kim, 2016). En reprenant ce principe, un procédé en deux étapes, illustré en Figure 25A, a démontré sa capacité à augmenter l'activité d'oxydation des LiP vis-à-vis de l'alcool vératric *in-vitro* (Pham and Kim, 2014). Toutefois, son efficacité pour la dépolymérisation efficace de lignines modèles ou techniques reste encore à démontrer.

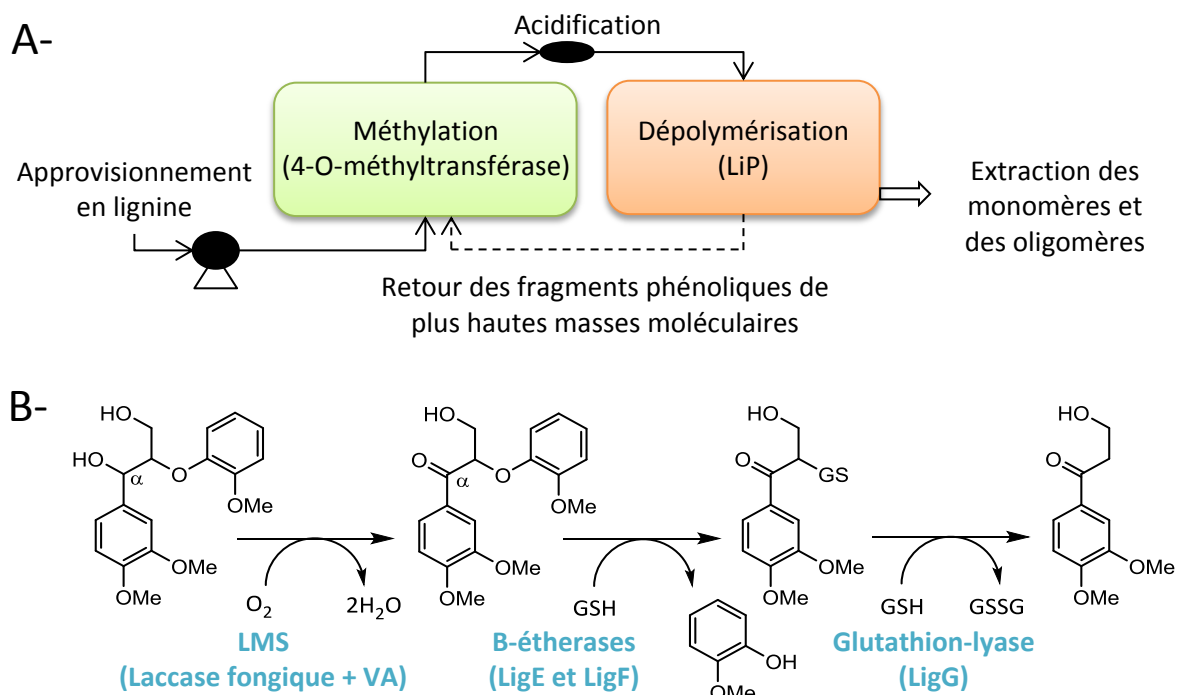


Figure 25 : procédés multienzymatiques de dépolymérisation de lignine impliquant (A) des *O*-Méthyltransférases et des LiP (Pham and Kim, 2014) ou (B) un système LMS, des  $\beta$ -étherases et une glutathion-lyase (Picart et al., 2017).

Une autre approche en plusieurs étapes, publiée dans la littérature, associe cette fois des enzymes fongiques extracellulaires et des enzymes bactériennes intracellulaires (Picart *et al.*, 2017). Les réactions catalysées par ce procédé multienzymatique sont illustrées en Figure 25B. Ce mécanisme de dépolymérisation est inspiré de la voie métabolique des  $\beta$ -étherases. Toutefois, l'utilisation de la laccase fongique pour catalyser l'oxydation des fonctions  $\alpha$ -hydroxydes des lignines remplace celle des déshydrogénases bactériennes qui catalysent cette réaction *in-vivo*. Cette modification permet de supprimer la dépendance du procédé d'oxydation au cofacteur  $\text{NAD}^+$  (très coûteux). Les  $\beta$ -étherases et la glutathion-lyase catalysent ensuite la dépolymérisation sélective des liaisons  $\beta$ -O-4 des lignines oxydées. Le mécanisme impliqué par ces deux enzymes est non radicalaire et hautement spécifique, ce qui permet de s'affranchir du phénomène de repolymérisation observé avec les enzymes fongiques (Gall *et al.*, 2017). Ainsi, ce procédé tire profit des stratégies développées par les deux types de micro-organismes lignolytiques. Une première preuve d'efficacité de ce procédé a été apportée en catalysant la dépolymérisation d'une lignine technique de type organosolv (Picart *et al.*, 2017).

Plus récemment, une étude a rapporté la première caractérisation d'une  $\beta$ -étherase d'origine fongique (*Dictomitus squalens*). La capacité de cette enzyme à rompre sélectivement les liaisons de type  $\beta$ -O-4 a été démontrée vis-à-vis d'un dimère modèle et d'un polymère synthétique de lignine (Marinović *et al.*, 2018). Les  $\beta$ -étherases, qui font partie de la très grande famille des glutathion-S-transférases (GST), joueraient donc également un rôle dans le métabolisme des basidiomycètes lors de la dégradation des fragments de lignine. Leur présence dans le génome de nombreux champignons de la pourriture blanche était soupçonnée depuis quelques années (Mathieu *et al.*, 2013).

### **2.2.2. La production des enzymes lignolytiques au laboratoire**

Afin de catalyser la dépolymérisation enzymatique de lignines *in-vitro*, les enzymes lignolytiques peuvent être produites en laboratoire selon deux modes de culture : la fermentation en milieu liquide où le micro-organisme est agité et submergé ; et la fermentation en milieu solide (FMS) où le microorganisme pousse en condition statique, sur support et à l'interface solide-air. De nombreuses études comparatives ont démontré que la FMS permet d'obtenir de meilleurs rendements de production dans le cas des enzymes lignolytiques, jusqu'à plus de 100 fois supérieurs à la fermentation en milieu liquide (Palma *et al.*, 2016; Rodríguez Couto and Sanromán, 2005). D'après ces mêmes études, ce résultat s'expliquerait par la configuration de la FMS qui permet de reproduire des conditions de croissance très proches des conditions naturelles des microorganismes lignolytiques. La plus forte concentration du substrat en milieu solide serait également un avantage considérable par rapport à la fermentation en milieu liquide. Ainsi, bien que les premières études de production d'enzymes lignolytiques en fermenteur aient été menées en milieu liquide, la majorité des recherches actuelles s'orientent vers la FMS (Rodríguez Couto and Sanromán, 2005).

En plus de sa bonne productivité, la FMS présente également plusieurs avantages pour son développement industriel. Tout d'abord, pour une production équivalente en enzyme, les réacteurs de FMS sont beaucoup moins volumineux que les fermenteurs en milieu liquide. Ils n'impliquent également que de très faibles volumes d'eau ce qui permet de réduire l'impact environnemental du procédé et les problèmes d'effluents à traiter (Duchiron and Copinet, 2011). Les FMS sont aussi moins sensibles à la contamination que les cultures en milieu liquide du fait de leur faible activité en eau. Toutes ces caractéristiques font de la FMS un procédé de fermentation industriel financièrement très intéressant (Soccol *et al.*, 2017).

Un autre avantage de la FMS est la possibilité de recycler des déchets organiques solides, tels que des résidus agroalimentaires, en les utilisant comme milieux nutritifs pour la croissance des microorganismes. De nombreuses études rapportent la production d'enzymes lignolytiques (laccases et peroxydases) par FMS de biomasses résiduelles telles que la bagasse, les pailles de blé, les racines de canola, les peaux de bananes ou les résidus de bois (Osma *et al.*, 2007; Rodríguez Couto and Sanromán, 2005). Traditionnellement, la production d'enzymes à l'échelle industrielle présente un coût relativement élevé, dont 40 à 60 % peut être imputé au coût des matières premières. En utilisant des résidus agroalimentaires, cette approche permet à la fois de réduire le coût de production de la FMS et d'améliorer l'impact environnemental et financier de la gestion de ces déchets organiques (Gassara *et al.*, 2011).

Bien entendu, la FMS présente aussi certains freins à son développement industriel, notamment, une plus grande difficulté de contrôle des conditions de fermentation (pH, température, composition en nutriments, etc...) et des contraintes de transfert de masse et de chaleur. La maîtrise de ces aspects est impérative à la conception de bioréacteurs performants lors de la montée en échelle des procédés de FMS (Thomas *et al.*, 2013). Elle reste toutefois une technique de choix et économique pour la fermentation des microorganismes mycéliens, comme les champignons de pourriture blanche, qui supportent mal les contraintes de cisaillement associées aux fermentations en milieu liquide. Elle permet également de s'affranchir de la contrainte d'oxygénation des cultures, le mycélium étant directement en contact avec l'oxygène de l'air sur support solide (Duchiron and Copinet, 2011).

### ***2.2.3. La dépolymérisation oxydante de la LTM***

L'approche retenue pour la dépolymérisation oxydante de la LTM implique l'utilisation d'enzymes lignolytiques fongiques *in-vitro*.

Dans un premier temps, l'efficacité d'un cocktail multienzymatique brut, provenant de cultures de *P. chrysosporium*, a été évaluée lors de différents essais en batch. Puisque le rôle exact de chaque famille d'enzyme n'a pas été élucidé, cette approche permet de conserver les synergies naturelles entre les différentes enzymes lignolytiques, ainsi que les enzymes auxiliaires et les métabolites fongiques nécessaires à leur fonctionnement. Ce cocktail enzymatique a été produit au laboratoire par FMS de *P. chrysosporium* au contact de la LTM. En utilisant la LTM comme support de fermentation, cela permet d'orienter le métabolisme de *P. chrysosporium* vers la production des enzymes lignolytiques adaptées à ce substrat.

Dans un deuxième temps, une laccase commerciale a également été testée *in-vitro* pour la dépolymérisation de la LTM. Différentes associations laccase/médiateur ont été évaluées en s'inspirant de récents résultats publiés dans la littérature (Longe *et al.*, 2018). Les conditions opératoires employées avec chacun de ces catalyseurs enzymatiques ont été reproduites à l'identique afin de pouvoir comparer les résultats obtenus.

En plus de ces différents essais en batch, les travaux de cette thèse ont également porté sur le développement d'un procédé biotechnologique semi-continu. En effet, bien que les enzymes lignolytiques sécrétées par les champignons de pourriture blanche participent à la minéralisation complète des lignines *in-vivo*, leurs performances *in-vitro* sont très souvent limitées par les phénomènes de repolymérisation des fragments radicalaires qu'elles génèrent. *In-vivo*, ces réactions sont, en grande partie, limitées par la compartimentation des lignines et de leurs dérivés de faibles masses moléculaires, qui sont internalisés dans le cytoplasme microbien où se trouvent les enzymes de détoxification. Il a donc été décidé d'explorer l'utilisation de la filtration membranaire pour reproduire cette compartimentation *in-vitro*. En catalysant la bioconversion de la LTM en bioréacteur membranaire, la membrane de filtration joue un rôle de barrière physique qui sépare la lignine de ses produits de dépolymérisation en permettant leur extraction *in-situ*.

La dernière partie de cette revue bibliographique reprend les grands principes des procédés de filtration membranaire et replace cette stratégie dans le contexte actuel de l'utilisation des membranes en bioraffinerie.

### **3. PROCÉDES MEMBRANAIRES ET BIORAFFINERIES**

#### **3.1. LES NOTIONS DE BASE DES PROCÉDES MEMBRANAIRES**

Les procédés membranaires sont des procédés de séparation qui permettent de fractionner des composés, en solution ou en phase gazeuse, en fonction de leurs masses moléculaires. Ils reposent sur l'application d'une force motrice de filtration et sur l'utilisation d'une membrane semi-perméable et sélective, caractérisée par un seuil de coupure. Le seuil de coupure est défini comme la masse moléculaire du soluté le plus petit retenu par la membrane à 90 %. Différentes forces motrices peuvent-être utilisées comme des gradients de pression, de concentration ou de potentiel électrique. Les procédés membranaires à gradient de pression sont subdivisés en quatre domaines en fonction du seuil de coupure de la membrane utilisée : la microfiltration (MF), l'ultrafiltration (UF), la nanofiltration (NF) et l'osmose inverse (OI)



(Bacchin, 2005). La Figure 26 illustre la diversité d'application des procédés membranaires et donne quelques exemples de composés pouvant être séparés en fonction des domaines de filtration. La suite de cette revue bibliographique détaille les principes de fonctionnement et d'optimisation des procédés membranaires à gradient de pression (MF, NF, UF, OI).

Taille des particules ( $\mu\text{m}$ )	$10^{-3}$	$10^{-2}$	0,1	1	10	$10^2$
Masses moléculaires (Da)	200 1000	10 000 20 000	100 000	500 000		
Domaines de filtration	Pervaporation		Microfiltration			
	Osiose inverse		Ultrafiltration			
	Nanofiltration			Filtration conventionnelle		
Exemples de particules	Sels minéraux Ions Sucres	Protéines Virus		Bactéries	Levures	Cheveux Sable
Méthodes d'observation	Microscopie électronique			Microscopie optique		Œil nu

Figure 26 : domaines d'application des procédés de filtration membranaire en fonction de la taille des particules retenues (Bacchin, 2005).

### 3.1.1. Principe et modes de fonctionnement des procédés à gradient de pression

Une pression, appelée pression transmembranaire (PTM) est appliquée au fluide à traiter afin de forcer les molécules possédant une masse moléculaire inférieure au seuil de coupure à traverser la membrane. Le fluide se partage alors en deux fractions : celle traversant la membrane, appelée perméat, et celle qui ne la traverse pas, dénommée rétentat. Le volume de fluide qui traverse la membrane par unité de surface et de temps correspond au flux de perméation ( $J$  en  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$  ou  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Avec la perméabilité à l'eau, qui est la capacité de la membrane à se laisser traverser par de l'eau osmosée ou permutée ( $L_p$  en  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{Pa}^{-1}$  ou  $\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{bar}^{-1}$ ), ces deux paramètres permettent de caractériser la productivité d'un procédé membranaire. L'efficacité de la séparation membranaire se mesure, quant à elle, grâce aux taux de rétention (TR) des différents composés initialement présents dans le fluide. Ces taux permettent d'évaluer la sélectivité de la membrane utilisée (Aimar *et al.*, 2016).

Un procédé membranaire performant est un procédé qui présente une productivité élevée, pour minimiser les coûts de fonctionnement, tout en séparant les composés de manière efficace. Ainsi, le flux de perméation et la sélectivité sont à la base de l'optimisation des procédés membranaires (Aimar *et al.*, 2010). Les équations permettant de calculer les paramètres de fonctionnement qui viennent d'être présentés sont données dans le Tableau 5.

Tableau 5 : principaux paramètres de fonctionnement de la filtration membranaire.

Paramètre	Signification	Equation
Pression transmembranaire (PTM)	<b>Force motrice de l'opération</b> définie par la moyenne des pressions d'alimentation (Pa) et de rétentat (Pr) à laquelle est soustraite la pression du perméat (Pp)	$PTM = \frac{Pa+Pr}{2} - Pp \text{ (bar)}$
Flux de perméation (J)	<b>Productivité du procédé</b> défini par le débit de perméation (Qp) divisé par la surface de la membrane (S)	$J = \frac{Qp \text{ (L. h}^{-1}\text{)}}{S \text{ (m}^2\text{)}}$
Perméabilité à l'eau (Lp)	<b>Cas de la filtration d'eau pure</b> Paramètre intrinsèque de la membrane décrivant sa résistance hydraulique (Rm)	$Lp = \frac{1}{Rm \text{ (Pa. s. m}^{-1}\text{)}} = \frac{J}{PTM}$ D'où $J = Lp \times PTM \text{ (eau pure)}$
Taux de rétention (TR)	<b>Sélectivité du procédé</b> TR = 1 signifie que le composé est parfaitement retenu par la membrane, TR = 0 le composé n'est pas du tout retenu (Concentration dans le perméat Cp = concentration dans le rétentat Cr)	$TR = 1 - \frac{Cp}{Cr}$

Les procédés membranaires à gradient de pression sont des procédés de filtration tangentielle, c'est-à-dire que le fluide à traiter circule parallèlement à la membrane de filtration. Ce sens d'écoulement permet de réduire l'accumulation de composés à la surface de la membrane par balayage. Plus la vitesse de circulation tangentielle, ou vitesse de recirculation (en m.s<sup>-1</sup>), est élevée, moins le procédé présente de résistance au transfert de matière (Al-Rudainy *et al.*, 2019). La filtration tangentielle permet ainsi de maintenir une bonne productivité sur le long terme, moyennant des coûts d'investissement (pompe supplémentaire) et de fonctionnement (énergie de circulation) plus importants qu'en filtration conventionnelle (Aimar *et al.*, 2016).

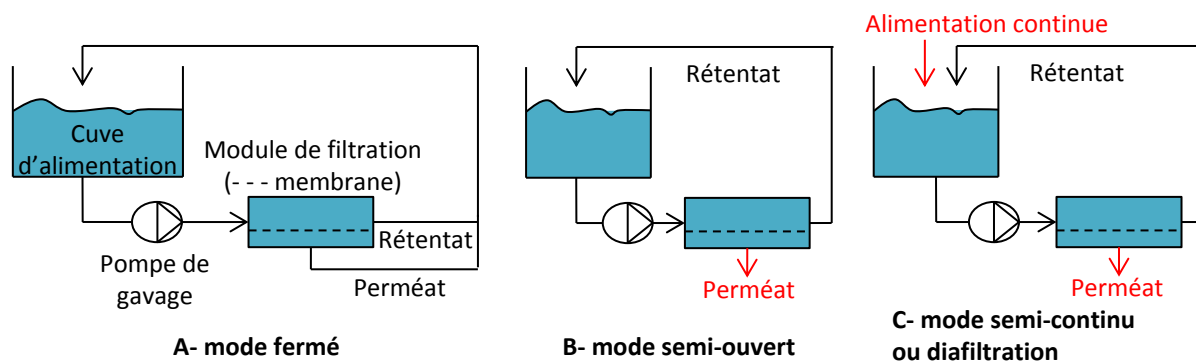


Figure 27 : les différents modes de fonctionnement en filtration tangentielle.

En filtration tangentielle, il est possible d'opérer selon différents modes représentés en Figure 27. En mode fermé le perméat et le rétentat sont intégralement renvoyés dans la cuve d'alimentation afin de maintenir une concentration en solutés constante. Ce mode est utilisé lors de l'optimisation des paramètres de filtration tels que la PTM et la vitesse de recirculation. Dans le mode semi-ouvert, le rétentat est en recirculation tandis que le perméat est soutiré. Ce fonctionnement permet de réduire progressivement le volume du rétentat afin de concentrer les composés retenus par la membrane. Il est alors possible de définir le facteur de réduction volumique (FRV) qui correspond au rapport du volume d'alimentation initial sur le volume de rétentat en fin de filtration. En mode semi-continu, le volume de la cuve d'alimentation est maintenu constant par une arrivée continue de fluide à traiter. Le débit d'alimentation est alors équivalent à celui du perméat soutiré. Ce mode permet de traiter des volumes de fluide plus importants et de s'approcher du fonctionnement d'un procédé à plus large échelle. Si la source d'alimentation continue est remplacée par une solution comme de l'eau pure ou une solution tampon, ce mode de filtration est alors appelé diafiltration. Ce procédé s'apparente à une méthode d'extraction et permet de remplacer le perméat soutiré par une solution de composition connue. Les composés d'intérêt sont souvent ceux retenus par la membrane qui sont alors purifiés et conditionnés dans un milieu défini (Aimar, 2006).

### 3.1.2. Accumulation de matière et perte de productivité

En fonctionnement, les procédés de filtration membranaire subissent une baisse de productivité, c'est-à-dire que le flux de perméation diminue à PTM constante ou qu'il est nécessaire d'augmenter la PTM pour maintenir un flux de perméation constant. Deux grands phénomènes peuvent contribuer à cette baisse de productivité qui sont la polarisation de concentration et le colmatage.

La polarisation de concentration résulte de l'accumulation de matière à la surface de la membrane sous forme solubilisée ou dispersée. La matière accumulée est dans le même état que dans la solution mais à une concentration bien plus importante. Un gradient de concentration se crée alors de part et d'autre de la membrane et le flux de perméation est réduit par l'apparition d'une contre-pression osmotique. Cet effet est surtout important en OI ou en NF où les pressions osmotiques jouent un rôle prépondérant. Toutefois, en abaissant la PTM, la matière accumulée à la membrane peut retourner en solution par diffusion. Il s'agit donc d'un phénomène réversible (Aimar *et al.*, 2010).

Le colmatage peut être défini comme l'ensemble des phénomènes qui interviennent dans la modification des propriétés filtrantes d'une membrane, perméabilité et sélectivité ; exceptés le compactage et la modification chimique du matériau. Le colmatage résulte d'un dépôt de matière à la surface ou dans la structure poreuse de la membrane qui engendre une résistance supplémentaire à l'écoulement du fluide et diminue la productivité du procédé. Il est possible de distinguer différents types de colmatage : le blocage des pores de la membrane, la formation d'un précipité, d'un gel ou d'un gâteau de filtration à la surface de la membrane ainsi que l'adsorption de composés présentant une affinité pour le matériau membranaire. Parmi ces différents phénomènes, certains peuvent être éliminés par le biais d'un rétrolavage à l'eau ou d'un lavage chimique de la membrane. En revanche, d'autres peuvent s'avérer irréversibles (Aimar *et al.*, 2016).

Les principales conditions opératoires pouvant être optimisées afin de limiter la perte de productivité d'un procédé membranaire sont la PTM et la vitesse de recirculation du rétentat. D'autres paramètres comme le pH ou la force ionique du fluide à traiter sont aussi importants lorsque des phénomènes de charge à la surface de la membrane entrent en jeu dans les mécanismes de colmatage (Courbalay, 2018). Par conséquent, le choix de la membrane de filtration est également primordial puisqu'il affecte à la fois la sélectivité et la productivité du procédé, en conditionnant les phénomènes d'adsorptions chimiques et électrostatiques.

### ***3.1.3. Choix de la membrane de filtration***

Par définition, la membrane est une barrière permselective qui réduit le transfert d'un soluté par rapport à un autre. Dans le cas de la filtration membranaire, elle possède une structure poreuse pour les procédés de MF et d'UF, intermédiaire (entre dense et poreuse) pour la NF et dense pour l'OI (Bacchin, 2005). Il est possible de distinguer deux grandes

familles de membranes en fonction de leur nature chimique. D'une part, les membranes organiques, constituées de polymères comme, par exemple, le polyéthersulfone (PES) ou les dérivés de cellulose, et d'autre part les membranes céramiques, constituées d'oxydes métalliques ( $ZrO_2$ ,  $TiO_2$ , etc.). Ces membranes peuvent être produites sous une configuration plane ou cylindrique et assemblées sous forme de modules de filtration plans, spirales, tubulaires ou sous forme de fibres creuses. Il existe ainsi une multitude de membranes de filtration qui se différencient par leurs natures chimiques, leurs configurations, leurs modes de fabrication et leurs mécanismes de transfert de matière (Remigy and Desclaux, 2007).

En fonction de leurs caractéristiques, ces membranes présentent différentes propriétés de résistance physique, chimique et thermique qu'il convient de prendre en compte lors du développement d'un procédé membranaire. Les membranes organiques, par exemple, présente un faible coût de production, possèdent une grande sélectivité et sont disponibles avec une large gamme de seuil de coupure. Toutefois ces membranes ont une faible résistance aux températures élevées ( $> 100\text{ }^\circ\text{C}$ ), aux conditions oxydantes, à la présence de solvant ainsi qu'aux pH extrêmes. Les membranes céramiques ont l'avantage de présenter de très bonnes résistances chimique et thermique. Elles peuvent supporter des températures supérieures à  $300\text{ }^\circ\text{C}$  ainsi que la présence d'acides, de bases, d'oxydants et de solvants. En revanche, leur coût de production est en moyenne dix fois plus élevé que celui des membranes organiques et leurs domaines d'utilisation se limitent à la MF et à l'UF (Remigy and Desclaux, 2007). Ainsi, le choix de la membrane de filtration doit se faire en fonction de sa sélectivité vis-à-vis des molécules à séparer mais également en fonction de sa nature et de sa résistance, qui doivent être en adéquation avec les caractéristiques physico-chimiques du fluide à traiter (pH, température, caractère oxydant ...) et enfin en fonction de son coût, par rapport à l'application du procédé (Bacchin, 2005).

### **3.2. LES PROCÉDES MEMBRANAIRES EN BIORAFFINERIE**

Grâce à la grande diversité des membranes, en termes de nature chimique et de configuration, les procédés membranaires présentent une grande flexibilité au niveau de leur conception et de leurs applications. La mise en parallèle des modules de filtration permet d'augmenter la surface de filtration et d'obtenir un dimensionnement industriel permettant le traitement de volumes de fluide importants, pouvant aller jusqu'à plusieurs centaines de mètres cubes par heure (Bourdon and Baudot, 2006). Les procédés membranaires présentent alors plusieurs avantages économiques et environnementaux en tant que procédés de

séparation industriels. D'une part, leur mise en œuvre n'implique l'utilisation que de très peu de produits chimiques, ces derniers étant principalement employés pour l'entretien des membranes. Et d'autre part, leur fonctionnement ne requière qu'une faible consommation énergétique ce qui les rend particulièrement adaptés au traitement de fluides faiblement concentrés en composés à retenir ou fractionner (Figoli *et al.*, 2016). Pour toutes ces raisons, ils sont déjà largement utilisés, à l'échelle industrielle, dans les domaines du traitement de l'eau, de l'électrochimie, de l'agroalimentaire et des biotechnologies pharmaceutiques (Gésan-Guiziou, 2007). Ils font également l'objet de nombreuses recherches actuelles visant leur intégration au sein des procédés de bioraffinerie en développement. Les paragraphes à venir présentent donc les opportunités de développement des procédés membranaires dans le cadre des bioraffineries énergétiques et de l'industrie papetière, puis plus particulièrement dans le cadre de la dépolymérisation de lignines techniques.

### 3.2.1. Procédés membranaires et bioraffineries énergétiques

Dans le cadre des bioraffineries énergétiques, les procédés membranaires peuvent être utilisés suite au prétraitement de la biomasse lignocellulosique, au cours de son processus de transformation en énergie ou en post-production pour la purification des produits de réaction (Abels *et al.*, 2013; Curcio *et al.*, 2016). Des exemples de leurs utilisations dans le cadre de la production de bioéthanol sont illustrés en figure 28.

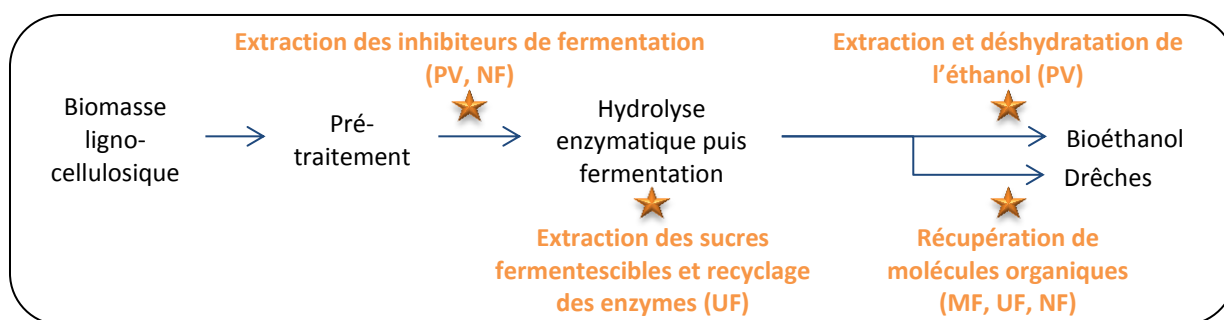


Figure 28 : les différentes utilisations des procédés membranaires dans le cadre de la production de bioéthanol ; PV : pervaporation.

Comme évoqué au paragraphe 1.2.1, le prétraitement de la biomasse lignocellulosique entraîne la production de molécules toxiques vis-à-vis des enzymes hydrolytiques et des microorganismes fermenteurs, tels des monomères phénoliques, des dérivés furaniques ou encore des acides organiques provenant de la dégradation des lignines et des hémicelluloses. La nanofiltration ainsi que la pervaporation, procédé membranaire à gradient de

concentration, peuvent être utilisées à la suite du fractionnement de la biomasse lignocellulosique afin d'extraire ces composés inhibiteurs du flux d'alimentation de la fermentation. Les études publiées à ce sujet rapportent l'extraction efficace de furfural, d'HMF, d'acide vanillique, d'acide acétique ou encore d'acide formique par le biais de ces procédés (Qian *et al.*, 2016). Lors de l'hydrolyse enzymatique de la cellulose en sucres fermentescibles, il est également possible de faire appel à l'ultrafiltration pour développer des bioréacteurs membranaires permettant l'extraction continue des molécules de glucose et de cellobiose produites. Le développement de ces réacteurs constitue une solution technique contre les phénomènes de rétrocontrôle négatif induits par ces composés sur l'activité des enzymes hydrolytiques. L'ultrafiltration peut aussi être utilisée en fin d'hydrolyse afin de séparer les enzymes du résidu lignocellulosique restant et de les recycler (Abels *et al.*, 2013).

Suite à la fermentation, l'utilisation de la pervaporation pour l'extraction de l'éthanol à partir du milieu de fermentation est un procédé déjà établi sur le plan industriel. En parallèle, cette méthode est également étudiée à l'échelle du laboratoire pour la purification de l'éthanol par déshydratation (Meireles *et al.*, 2016). Des études soulignent également l'intérêt des procédés membranaires pour le traitement des sous-produits de fermentation, aussi appelés drêches, afin de récupérer des acides organiques, des protéines ou des sucres pouvant être valorisés. En fonction des produits à fractionner ces procédés peuvent aller de la micro à la nanofiltration (Reis *et al.*, 2017).

Outre la production de bioéthanol, il existe également d'autres voies de valorisation énergétique de la biomasse lignocellulosique, comme la production d'hydrogène par fermentation microbienne. Les procédés membranaires représentent également des techniques séparatives de choix dans le cadre de ces bioraffineries. Ils sont notamment utilisés pour le développement de bioréacteurs membranaires permettant l'extraction continue de l'hydrogène dissout dans le milieu de culture (Renaudie, 2019).

### **3.2.2. Procédés membranaires dans l'industrie papetière**

#### **3.2.2.1. Récupération des lignines et des hémicelluloses**

Dans le cadre des industries papetières, les procédés membranaires sont principalement étudiés pour la récupération des coproduits organiques, à partir des effluents industriels, en vue de leur valorisation. Les travaux portent majoritairement sur la récupération des hémicelluloses à partir des eaux de procédés thermomécaniques et des lignines à partir des liqueurs de cuissons chimiques (Jönsson, 2016).

Depuis près de quarante ans, l'ultrafiltration est utilisée à l'échelle industrielle pour la récupération des lignosulfonates à partir des liqueurs de cuisson du procédé bisulfite. Depuis quelques années, la filtration membranaire est également très étudiée pour la récupération des lignines kraft à partir de la liqueur noire. Différents points de prélèvement et différentes combinaisons de procédés d'UF et de NF ont été comparés dans la littérature (Jönsson, 2016). Bien que le procédé LignoBoost™ actuellement employé mène à la production d'une lignine de haute pureté, la filtration membranaire permettrait de générer des fractions de lignines de masses moléculaires peu dispersées présentant une meilleure solubilité et une plus faible viscosité. De plus, la filtration membranaire permettrait d'éviter l'addition de produits chimiques dans la liqueur noire (Humpert *et al.*, 2016).

Comme présenté au paragraphe 1.3.6, l'intérêt économique et la performance des procédés membranaires pour la récupération des hémicelluloses et des lignines à partir des effluents thermomécaniques ont été démontrés (Persson *et al.*, 2007; Villain-Gambier *et al.*, 2020). Cette application des procédés membranaires a d'ailleurs été utilisée pour la production du lot référent de LTM dans le cadre de cette thèse. La mise en place de tels procédés au sein des papeteries thermomécaniques ne demande aucun aménagement particulier puisque les unités de filtrations sont indépendantes du procédé principal de production de la pâte à papier. Ils permettent, de plus, de diminuer l'impact environnemental des papeteries en permettant la recirculation de l'eau filtrée pour la production de la pâte à papier. Leur développement en est actuellement au stade de démonstration à l'échelle pilote en vue d'une très prochaine intégration à l'échelle industrielle (Jönsson, 2016).

#### 3.2.2.2. *Dépolymérisation de lignines techniques*

En ce qui concerne plus particulièrement l'utilisation de procédés membranaires pour la dépolymérisation de lignines, très peu d'études ont été publiées. Il est toutefois possible de distinguer différentes pistes de recherche à ce sujet. D'une part, les procédés membranaires peuvent être développés pour la production d'enzymes lignolytiques. Des travaux de thèse ont, par exemple, rapporté le développement d'un bioréacteur à fibres creuses au sein duquel un gradient de concentration en nutriment permet la croissance du champignon *P. chrysosporium* ainsi que la production de peroxydases (Solomon and Petersen, 2002). D'autre part, ils peuvent aussi être employés, suite aux différents mécanismes de dépolymérisation, pour fractionner les mélanges complexes de produits aromatiques générés. Différentes membranes de nanofiltration peuvent être employées selon les caractéristiques physico-chimiques du milieu de dépolymérisation (Dubreuil *et al.*, 2017; R. Silverman *et al.*, 2019).



De rares exemples de développement de réacteurs membranaires pour catalyser la dépolymérisation de lignines techniques ou de molécules modèles de lignine existent également dans la littérature. Deux études ont été identifiées lors de cette revue bibliographique. La première concerne le développement d'un réacteur membranaire afin de catalyser la dépolymérisation électrochimique d'une lignine Kraft (Stiefel *et al.*, 2015). Comme cela a été évoqué au paragraphe 1.3.3.3, les procédés de dépolymérisation catalysés par électrochimie font partie des axes de recherche récents qui permettent de s'affranchir de l'utilisation de produits chimiques et d'opérer dans des conditions douces, à pression et température ambiante. En revanche, la principale limite à leur utilisation est liée à la suroxydation des monomères aromatiques qui se transforment alors en acides organiques et en dioxyde de carbone. La nanofiltration a été employée dans cette étude afin d'extraire les monomères aromatiques du milieu de réaction et de prévenir leur suroxydation. Une dépolymérisation de la lignine Kraft a été observée grâce à ce procédé. Toutefois, la caractérisation et la quantification des produits de dépolymérisation n'ont pas été rapportées et les résultats obtenus en réacteur membranaires n'ont pas été comparés à l'oxydation électrochimique de la lignine en batch. Il s'agit donc d'une piste intéressante mais qui demande à être approfondie d'avantage.

La deuxième étude rapporte le développement d'un bioréacteur membranaire multienzymatique et son application à la dépolymérisation d'un dimère modèle de lignine (Sarma *et al.*, 2018). Trois enzymes, une glucose oxydase, une peroxydase et une laccase, ont été immobilisées par couche successives à la surface d'une membrane de microfiltration. Une conversion à plus de 90 % du dimère aromatique a été atteinte grâce à ce procédé. Cependant, une très grande diversité de produits d'oxydation a été observée comprenant des trimères, des dimères et seulement 67 % de monomères. Une meilleure sélectivité a été obtenue lors de l'utilisation de la laccase seule avec 99 % de monomères bien que le taux de conversion n'ait été que de 73 %. Il serait tout de même intéressant d'évaluer le potentiel de ce procédé pour la conversion d'une lignine technique.

### **3.3. DEPOLYMERISATION DE LA LTM EN BIOREACTEUR MEMBRANAIRE**

Dans ces travaux de thèse, la filtration membranaire est étudiée comme moyen de séparation physique de la LTM et de ses produits de dépolymérisation radicalaires afin de lutter contre les réactions de condensation, classiquement observée lors des procédés de dépolymérisation. Ce concept de compartimentation a déjà été mentionné dans la littérature

(Roth and Spiess, 2015). En revanche, il n'a jamais été démontré, ni appliqué à la dépolymérisation enzymatique de lignines techniques. En ce sens, l'étude de la dépolymérisation de la LTM en réacteur membranaire est une approche originale qui permettra de démontrer ou de réfuter ce concept.

Pour réaliser cette étude, une cellule d'ultrafiltration Amicon® a été utilisée comme modèle simple de réacteur à l'échelle du laboratoire. Avant de catalyser la dépolymérisation de la LTM, de premiers essais ont été conduits afin de définir les paramètres de fonctionnement du réacteur membranaire permettant d'assurer une productivité élevée tout en préservant les performances catalytiques de la laccase commerciale. La compatibilité de différents matériaux membranaires avec la LTM a été étudiée ainsi que l'impact de différentes vitesses d'agitation sur l'activité enzymatique de la laccase. Finalement, la dépolymérisation enzymatique de la LTM a été réalisée au sein du réacteur membranaire avec un approvisionnement semi-continu en solution tampon selon un mode de fonctionnement en diafiltration. Ce choix d'alimentation a permis de maintenir la concentration enzymatique constante tout au long du procédé de bioconversion. L'ensemble des résultats générés concernant le bioréacteur membranaire sont présentés dans le dernier chapitre de ce manuscrit.

## 4. REFERENCES

- Abels, C., Carstensen, F., and Wessling, M. (2013). Membrane processes in biorefinery applications. *Journal of Membrane Science* 444, 285–317.
- Agarwal, B., Ahluwalia, V., Pandey, A., Sangwan, R.S., and Elumalai, S. (2017). Sustainable Production of Chemicals and Energy Fuel Precursors from Lignocellulosic Fractions. In *Biofuels: Technology, Challenges and Prospects*, A.K. Agarwal, R.A. Agarwal, T. Gupta, and B.R. Gurjar, eds. (Singapore: Springer), pp. 7–33.
- Aimar, P. (2006). Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Mise en œuvre et performances. *Techniques de l'ingénieur*, 18.
- Aimar, P., Bacchin, P., and Maurel, A. (2010). Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : perméabilité et sélectivité. *Techniques de l'ingénieur*, 25.
- Aimar, P., Bacchin, P., and Maurel, A. (2016). Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Aspects théoriques : mécanismes de transfert. *Techniques de l'ingénieur*, 29.
- Almada, C.C. (2015). Étude sur la dépolymérisation catalytique de la lignine en milieu oxydant: vers la production d'aromatiques biosourcés.
- Al-Rudainy, B., Galbe, M., Lipnizki, F., and Wallberg, O. (2019). Galactoglucomannan Recovery with Hydrophilic and Hydrophobic Membranes: Process Performance and Cost Estimations. *Membranes* 9, 99.
- Bacchin, P. (2005). Principes de base des Technologies à Membranes. 2ème école d'été Franco-Maghrébine "Sciences et Technologies à Membranes", Monastir, Tunisie 9.
- Bao, W., Fukushima, Y., Jensen, K.A., Moen, M.A., and Hammel, K.E. (1994). Oxidative degradation of non-phenolic lignin during lipid peroxidation by fungal manganese peroxidase. *FEBS Letters* 354, 297–300.
- Behling, R., Valange, S., and Chatel, G. (2016). Heterogeneous catalytic oxidation for lignin valorization into valuable chemicals: what results? What limitations? What trends? *Green Chemistry* 18, 1839–1854.
- Bhardwaj, N.K., Goyal, S.K., Gupta, A., Upadhyaya, J.S., and Ray, A.K. (2005). Soda and Soda-anthraquinone Pulping of Rice Straw. *Appita: Technology, Innovation, Manufacturing, Environment* 58, 180.
- Bichat, H., and Mathis, P. (2013). *La biomasse, énergie d'avenir ?* (Editions Quae).
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54, 519–546.
- Bourdon, S., and Baudot, A. (2006). Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Applications diverses. *Techniques de l'ingénieur*, 14.
- Brandt-Talbot, A., Gschwend, F.J.V., Fennell, P.S., Lammens, T.M., Tan, B., Weale, J., and Hallett, J.P. (2017). An economically viable ionic liquid for the fractionation of lignocellulosic biomass. *Green Chem.* 19, 3078–3102.

- Braun, J.L., Holtman, K.M., and Kadla, J.F. (2005). Lignin-based carbon fibers: Oxidative thermostabilization of kraft lignin. *Carbon* 43, 385–394.
- Bugg, T.D., and Rahmanpour, R. (2015). Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. *Current Opinion in Chemical Biology* 29, 10–17.
- Caillol, S. (2018). La vanilline : intermédiaire clé de la lignine à la synthèse de polymères biosourcés. *Techniques de l'ingénieur*, 24.
- Camarero, S., Martínez, M.J., and Martínez, A.T. (1997). Lignin-degrading enzymes produced by *Pleurotus* species during solid state fermentation of wheat straw. In *Advances in Solid State Fermentation*, (Springer, Dordrecht), pp. 335–345.
- Cañas, A.I., and Camarero, S. (2010). Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694–705.
- Candelier, K., Thevenon, M.-F., Petrisans, A., Dumarcay, S., Gerardin, P., and Petrisans, M. (2016). Control of wood thermal treatment and its effects on decay resistance: a review. *Annals of Forest Science* 73, 571–583.
- Cao, L., Yu, I.K.M., Liu, Y., Ruan, X., Tsang, D.C.W., Hunt, A.J., Ok, Y.S., Song, H., and Zhang, S. (2018). Lignin valorization for the production of renewable chemicals: State-of-the-art review and future prospects. *Bioresource Technology* 269, 465–475.
- Castro, E., Nieves, I.U., Mullinnix, M.T., Sagues, W.J., Hoffman, R.W., Fernández-Sandoval, M.T., Tian, Z., Rockwood, D.L., Tamang, B., and Ingram, L.O. (2014). Optimization of dilute-phosphoric-acid steam pretreatment of *Eucalyptus benthamii* for biofuel production. *Applied Energy* 125, 76–83.
- Chakar, F.S., and Ragauskas, A.J. (2004). Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products* 20, 131–141.
- Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H., and Vyas, B.R.M. (2005). Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Enzyme and Microbial Technology* 36, 327–332.
- Chung, H., and Washburn, N.R. (2012). Improved Lignin Polyurethane Properties with Lewis Acid Treatment. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 4, 2840–2846.
- Chung, Y.-L., Olsson, J.V., Li, R.J., Frank, C.W., Waymouth, R.M., Billington, S.L., and Sattely, E.S. (2013). A Renewable Lignin–Lactide Copolymer and Application in Biobased Composites. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 1, 1231–1238.
- Clark, J.H., Budarin, V., Deswarte, F.E.I., Hardy, J.J.E., Kerton, F.M., Hunt, A.J., Luque, R., Macquarrie, D.J., Milkowski, K., Rodriguez, A., *et al.* (2006). Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future. *Green Chem.* 8, 853.
- Coletta, V.C., Rezende, C.A., da Conceição, F.R., Polikarpov, I., and Guimarães, F.E.G. (2013). Mapping the lignin distribution in pretreated sugarcane bagasse by confocal and fluorescence lifetime imaging microscopy. *Biotechnology for Biofuels* 6, 43.
- Condassamy, O. (2016). Valorisation d'une lignine alcaline industrielle : vers le développement de nouveaux synthons et oligomeres bio-sources issus de la lignine. LCPO Université de Bordeaux.

Constant, S., Wienk, H.L.J., Frissen, A.E., Peinder, P. de, Boelens, R., van Es, D.S., Grisel, R.J.H., Weckhuysen, B.M., Huijgen, W.J.J., Gosselink, R.J.A., *et al.* (2016). New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. *Green Chemistry* *18*, 2651–2665.

COPACEL (2019). Bilan 2018 et perspectives 2019 de l'industrie papetière française. 35.

Courbalay, M. (2018). Récupération et valorisation de biomolécules d'effluents de papeterie par procédés membranaires. Université de Strasbourg.

Crouvisier-Urien, K., Farias, F.R. da S., Arunatat, S., Griffin, D., Gerometta, M., Rocca-Smith, J.R., Weber, G., Sok, N., and Karbowski, T. (2019). Functionalization of chitosan with lignin to produce active materials by waste valorization. *Green Chem.* *21*, 4633–4641.

Cullen, D., and Kersten, P.J. (2004). Enzymology and Molecular Biology of Lignin Degradation. In *Biochemistry and Molecular Biology*, R. Brambl, and G.A. Marzluf, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 249–273.

Curcio, S., De Luca, G., Saha, K., and Chakraborty, S. (2016). 1 - Advance membrane separation processes for biorefineries. In *Membrane Technologies for Biorefining*, A. Figoli, A. Cassano, and A. Basile, eds. (Woodhead Publishing), pp. 3–28.

Dabral, S., Engel, J., Mottweiler, J., Spoehrle, S.S.M., Lahive, C.W., and Bolm, C. (2018). Mechanistic studies of base-catalysed lignin depolymerisation in dimethyl carbonate. *Green Chem.* *20*, 170–182.

Dai, J., Styles, G.N., Patti, A.F., and Saito, K. (2018). CuSO<sub>4</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Catalyzed Lignin Depolymerization under the Irradiation of Microwaves. *ACS Omega* *3*, 10433–10441.

Daou, M., Piumi, F., Cullen, D., Record, E., and Faulds, C.B. (2016). Heterologous Production and Characterization of Two Glyoxal Oxidases from *Pycnoporus cinnabarinus*. *Applied and Environmental Microbiology* *82*, 4867–4875.

Dashtban, M., Schraft, H., Syed, T.A., and Qin, W. (2010). Fungal biodegradation and enzymatic modification of lignin. *Int J Biochem Mol Biol* *1*, 36–50.

De Bhowmick, G., Sarmah, A.K., and Sen, R. (2018). Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology* *247*, 1144–1154.

De Cherisey, H. (2015). Etat de l'art sur la production de molécules chimiques issues du bois en France (rapport ADEME).

Deuss, P.J., Lancefield, C.S., Narani, A., Vries, J.G. de, Westwood, N.J., and Barta, K. (2017). Phenolic acetals from lignins of varying compositions via iron(III) triflate catalysed depolymerisation. *Green Chem.* *19*, 2774–2782.

Domenek, S., Louaifi, A., Guinault, A., and Baumberger, S. (2013). Potential of Lignins as Antioxidant Additive in Active Biodegradable Packaging Materials. *J Polym Environ* *21*, 692–701.

Dong, C., Meng, X., Yeung, C.S., Tse, H.-Y., Ragauskas, A.J., and Leu, S.-Y. (2019). Diol pretreatment to fractionate a reactive lignin in lignocellulosic biomass biorefineries. *Green Chem.* *21*, 2788–2800.

- Dong, X., Dong, M., Lu, Y., Turley, A., Jin, T., and Wu, C. (2011). Antimicrobial and antioxidant activities of lignin from residue of corn stover to ethanol production. *Industrial Crops and Products* 34, 1629–1634.
- Donmez Cavdar, A., Kalaycioglu, H., and Hiziroglu, S. (2008). Some of the properties of oriented strandboard manufactured using kraft lignin phenolic resin. *Journal of Materials Processing Technology* 202, 559–563.
- Dubreuil, M.F.S., Servaes, K., Ormerod, D., Van Houtven, D., Porto-Carrero, W., Vandezande, P., Vanermen, G., and Buekenhoudt, A. (2017). Selective membrane separation technology for biomass valorization towards bio-aromatics. *Separation and Purification Technology* 178, 56–65.
- Duchiron, F., and Copinet, E. (2011). Fermentation en milieu solide (FMS). *Techniques de l'ingénieur*, 18.
- Eggert, C., Temp, U., Dean, J.F.D., and Eriksson, K.-E.L. (1996). A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS Letters* 391, 144–148.
- Eggert, C., Temp, U., and Eriksson, K.-E.L. (1997). Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*. *FEBS Letters* 407, 89–92.
- Elgharbawy, A.A., Alam, M.Z., Moniruzzaman, M., and Goto, M. (2016). Ionic liquid pretreatment as emerging approaches for enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Biochemical Engineering Journal* 109, 252–267.
- Faison, B.D., and Kirk, T.K. (1985). Factors Involved in the Regulation of a Ligninase Activity in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 299–304.
- Fengel, D., and Wegener, G. (2011). *Wood: chemistry, ultrastructure, reactions* (Edition Walter de Gruyter).
- Fernández-González, A.J., Valette, N., Kohler, A., Dumarçay, S., Sormani, R., Gelhaye, E., and Morel-Rouhier, M. (2018). Oak extractive-induced stress reveals the involvement of new enzymes in the early detoxification response of *Phanerochaete chrysosporium*: *Early fungal responses to oak extractives*. *Environ Microbiol* 20, 3890–3901.
- Figoli, A., Marino, T., and Galiano, F. (2016). 2 - Polymeric membranes in biorefinery. In *Membrane Technologies for Biorefining*, A. Figoli, A. Cassano, and A. Basile, eds. (Woodhead Publishing), pp. 29–59.
- Gall, D.L., Kontur, W.S., Lan, W., Kim, H., Li, Y., Ralph, J., Donohue, T.J., and Noguera, D.R. (2017). *In Vitro* Enzymatic Depolymerization of Lignin with Release of Syringyl, Guaiacyl, and Tricin Units. *Appl Environ Microbiol* 84, e02076-17.
- Galliano, H., Gas, G., Seris, J.L., and Boudet, A.M. (1991). Lignin degradation by *Rigidoporus lignosus* involves synergistic action of two oxidizing enzymes: Mn peroxidase and laccase. *Enzyme and Microbial Technology* 13, 478–482.
- Gandini, A., Belgacem, M.N., Guo, Z.-X., and Montanari, S. (2002). Lignins as Macromonomers for Polyesters and Polyurethanes. In *Chemical Modification, Properties, and Usage of Lignin*, T.Q. Hu, ed. (Edition Springer US), pp. 57–80.

- García-Aparicio, P., Ballesteros, I., González, A., Oliva, J.M., Ballesteros, M., and Negro, J. (2006). Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 129, 11.
- Gassara, F., Brar, S.K., Tyagi, R.D., John, R.P., Verma, M., and Valero, J.R. (2011). Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnol Bioproc E* 16, 343–351.
- Gellerstedt, G., Sjöholm, E., and Brodin, I. (2010). The Wood-Based Biorefinery: A Source of Carbon Fiber? *TOASJ* 4, 119–124.
- George, A., Tran, K., Morgan, T.J., Benke, P.I., Berruoco, C., Lorente, E., Wu, B.C., Keasling, J.D., Simmons, B.A., and Holmes, B.M. (2011). The effect of ionic liquid cation and anion combinations on the macromolecular structure of lignins. *Green Chem.* 13, 3375–3385.
- Gérardin, P. (2019). Les composés chimiques extractibles du bois. 4<sup>ème</sup> rencontres publiques du projet ExtraFor\_Est, AgroParisTech, Nancy.
- Gésan-Guiziu, G. (2007). Filtration membranaire (OI, NF, UF, MFT) - Applications en agroalimentaire. *Techniques de l'ingénieur*, 22.
- Ghandi, K. (2014). A Review of Ionic Liquids, Their Limits and Applications. *GSC* 04, 44–53.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., and Sannia, G. (2010). Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 369–385.
- Giummarella, N., and Lawoko, M. (2017). Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5, 5156–5165.
- Giummarella, N., Zhang, L., Henriksson, G., and Lawoko, M. (2016). Structural features of mildly fractionated lignin carbohydrate complexes (LCC) from spruce. *RSC Advances* 6, 42120–42131.
- Giummarella, N., Pu, Y., Ragauskas, A.J., and Lawoko, M. (2019). A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem.* 21, 1573–1595.
- Goodwin, D.C., Aust, S.D., and Grover, T.A. (1995). Evidence for Veratryl Alcohol as a Redox Mediator in Lignin Peroxidase-Catalyzed Oxidation. *Biochemistry* 34, 5060–5065.
- Gosselink, R.J.A. (2011). Lignin as a renewable aromatic resource for the chemical industry. PhD thesis. Wageningen University.
- Harvey, P.J., Schoemaker, H.E., and Palmer, J.M. (1986). Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 195, 242–246.
- ten Have, R., and Teunissen, P.J.M. (2001). Oxidative Mechanisms Involved in Lignin Degradation by White-Rot Fungi. *Chem. Rev.* 101, 3397–3414.
- Hernández-Ortega, A., Ferreira, P., and Martínez, A.T. (2012). Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation. *Appl Microbiol Biotechnol* 93, 1395–1410.
- Higuchi, T. (1989). Mechanisms of Lignin Degradation by Lignin Peroxidase and Laccase of White-Rot Fungi. In *Plant Cell Wall Polymers*, N.G. Lewis, and M.G. Paice, eds. (Washington, DC: American Chemical Society), pp. 482–502.

- Honglu, X., and Tiejun, S. (2006). Wood liquefaction by ionic liquids. *Holzforschung* 60, 509–512.
- Hu, J., Zhang, Q., and Lee, D.-J. (2018). Kraft lignin biorefinery: A perspective. *Bioresource Technology* 247, 1181–1183.
- Humpert, D., Ebrahimi, M., and Czermak, P. (2016). Membrane Technology for the Recovery of Lignin: A Review. *Membranes* 6, 42.
- Isikgor, F.H., and Becer, C.R. (2015). Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* 6, 4497–4559.
- Joffres, B., Laurenti, D., Charon, N., Daudin, A., Quignard, A., and Geantet, C. (2013). Thermochemical Conversion of Lignin for Fuels and Chemicals: A Review. *Oil Gas Sci. Technol. – Rev. IFP Energies Nouvelles* 68, 753–763.
- Jönsson, A.-S. (2016). 5 - Membranes for lignin and hemicellulose recovery in pulp mills. In *Membrane Technologies for Biorefining*, A. Figoli, A. Cassano, and A. Basile, eds. (Woodhead Publishing), pp. 105–133.
- Kapich, A.N., Steffen, K.T., Hofrichter, M., and Hatakka, A. (2005). Involvement of lipid peroxidation in the degradation of a non-phenolic lignin model compound by manganese peroxidase of the litter-decomposing fungus *Stropharia coronilla*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330, 371–377.
- Kapu, N.S., and Trajano, H.L. (2014). Review of hemicellulose hydrolysis in softwoods and bamboo. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8, 857–870.
- Katahira, R., Mittal, A., McKinney, K., Ciesielski, P.N., Donohoe, B.S., Black, S.K., Johnson, D.K., Bidy, M.J., and Beckham, G.T. (2014). Evaluation of Clean Fractionation Pretreatment for the Production of Renewable Fuels and Chemicals from Corn Stover. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 2, 1364–1376.
- Kebbi-Benkeder, Z., Manso, R., Gérardin, P., Dumarçay, S., Chopard, B., and Colin, F. (2017). Knot extractives: a model for analysing the eco-physiological factors that control the within and between-tree variability. *Trees* 31, 1619–1633.
- Kim, K.H., Dutta, T., Walter, E.D., Isern, N.G., Cort, J.R., Simmons, B.A., and Singh, S. (2017). Chemoselective Methylation of Phenolic Hydroxyl Group Prevents Quinone Methide Formation and Repolymerization During Lignin Depolymerization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 5, 3913–3919.
- Konnerth, H., Zhang, J., Ma, D., Prechtel, M.H.G., and Yan, N. (2015). Base promoted hydrogenolysis of lignin model compounds and organosolv lignin over metal catalysts in water. *Chemical Engineering Science* 123, 155–163.
- Korotkova, E., Pranovich, A., Wärnå, J., Salmi, T., Murzin, D.Yu., and Willför, S. (2015). Lignin isolation from spruce wood with low concentration aqueous alkali at high temperature and pressure: influence of hot-water pre-extraction. *Green Chem.* 17, 5058–5068.
- Krawczyk, H., Oinonen, P., and Jönsson, A.-S. (2013). Combined membrane filtration and enzymatic treatment for recovery of high molecular mass hemicelluloses from chemithermomechanical pulp process water. *Chemical Engineering Journal* 225, 292–299.
- Lange, H., Decina, S., and Crestini, C. (2013). Oxidative upgrade of lignin – Recent routes reviewed. *European Polymer Journal* 49, 1151–1173.



- Lavoine, N., Desloges, I., Dufresne, A., and Bras, J. (2012). Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers* *90*, 735–764.
- Lee, S.H., Doherty, T.V., Linhardt, R.J., and Dordick, J.S. (2009). Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering* *102*, 1368–1376.
- Lei, Z., Wang, S., Fu, H., Gao, W., Wang, B., Zeng, J., and Xu, J. (2019). Thermal pyrolysis characteristics and kinetics of hemicellulose isolated from *Camellia Oleifera* Shell. *Bioresource Technology* *282*, 228–235.
- Li, N., Li, Y., Yoo, C.G., Yang, X., Lin, X., Ralph, J., and Pan, X. (2018). An uncondensed lignin depolymerized in the solid state and isolated from lignocellulosic biomass: a mechanistic study. *Green Chem.* *20*, 4224–4235.
- Liu, E., Li, M., Das, L., Pu, Y., Frazier, T., Zhao, B., Crocker, M., Ragauskas, A.J., and Shi, J. (2018). Understanding Lignin Fractionation and Characterization from Engineered Switchgrass Treated by an Aqueous Ionic Liquid. *ACS Sustainable Chem. Eng.* *6*, 6612–6623.
- Liu, X., Duan, X., Wei, W., Wang, S., and Ni, B.-J. (2019a). Photocatalytic conversion of lignocellulosic biomass to valuable products. *Green Chem.* *21*, 4266–4289.
- Liu, Z.-H., Le, R.K., Kosa, M., Yang, B., Yuan, J., and Ragauskas, A.J. (2019b). Identifying and creating pathways to improve biological lignin valorization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* *105*, 349–362.
- Longe, L., Couvreur, J., Leriche Grandchamp, M., Garnier, G., Allais, F., and Saito, K. (2018). Importance of mediators for lignin degradation by fungal laccase. *ACS Sustainable Chem. Eng.* *6*, 10097–10107.
- Lora, J.H., and Glasser, W.G. (2002). Recent Industrial Applications of Lignin: A Sustainable Alternative to Nonrenewable Materials. *Journal of Polymers and the Environment* *10*, 39–48.
- Lourencon, T.V., Greca, L.G., Tarasov, D., Borrega, M., Tamminen, T., Rojas, O.J., and Balakshin, M.Y. (2020). Lignin-First Integrated Hydrothermal Treatment (HTT) and Synthesis of Low-Cost Biorefinery Particles. *ACS Sustainable Chem. Eng.* *8*, 1230–1239.
- M. Rowell, R. (2012). *Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites* (CRC press).
- Marinović, M., Nousiainen, P., Dilokpimol, A., Kontro, J., Moore, R., Sipilä, J., de Vries, R.P., Mäkelä, M.R., and Hildén, K. (2018). Selective Cleavage of Lignin  $\beta$ -O-4 Aryl Ether Bond by  $\beta$ -Esterase of the White-Rot Fungus *Dichomitus squalens*. *ACS Sustainable Chem. Eng.* *6*, 2878–2882.
- Martinez, D., Larrondo, L.F., Putnam, N., Gelpke, M.D.S., Huang, K., Chapman, J., Helfenbein, K.G., Ramaiya, P., Detter, J.C., Larimer, F., *et al.* (2004). Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain *RP78*. *Nature Biotechnology* *22*, 695.
- Mathieu, Y., Gelhaye, E., Dumarçay, S., Gérardin, P., Harvengt, L., and Buée, M. (2013). Selection and validation of enzymatic activities as functional markers in wood biotechnology and fungal ecology. *Journal of Microbiological Methods* *92*, 157–163.
- Matsakas, L., Raghavendran, V., Yakimenko, O., Persson, G., Olsson, E., Rova, U., Olsson, L., and Christakopoulos, P. (2019). Lignin-first biomass fractionation using a hybrid organosolv – Steam

explosion pretreatment technology improves the saccharification and fermentability of spruce biomass. *Bioresource Technology* 273, 521–528.

McCall, E.R., and Jurgens, J.F. (1951). Chemical Composition of Cotton. *Textile Research Journal* 21, 19–21.

Meireles, I.T., Brazinha, C., Coelho, I.M., and Crespo, J.G. (2016). 10 - Membranes for ethanol dehydration. In *Membrane Technologies for Biorefining*, A. Figoli, A. Cassano, and A. Basile, eds. (Woodhead Publishing), pp. 241–262.

Meux, E., Prosper, P., Masai, E., Mulliert, G., Dumarçay, S., Morel, M., Didierjean, C., Gelhaye, E., and Favier, F. (2012). Sphingobium sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class. *FEBS Letters* 586, 3944–3950.

Mongkhonsiri, G., Gani, R., Malakul, P., and Assabumrungrat, S. (2018). Integration of the biorefinery concept for the development of sustainable processes for pulp and paper industry. *Computers & Chemical Engineering* 119, 70–84.

Morot-Gaudry, J.-F. (2016). *Les végétaux, un nouveau pétrole ?* (Editions Quae).

Mousavioun, P., and Doherty, W.O.S. (2010). Chemical and thermal properties of fractionated bagasse soda lignin. *Industrial Crops and Products* 31, 52–58.

Narron, R.H., Kim, H., Chang, H., Jameel, H., and Park, S. (2016). Biomass pretreatments capable of enabling lignin valorization in a biorefinery process. *Current Opinion in Biotechnology* 38, 39–46.

Ogier, J.C., Leygue, J.P., Ballerini, D., Pourquoi, J., and Rigal, L. (1999). Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique. *Oil & Gas Science and Technology - Rev. IFP* 54, 67–94.

Oinonen, P., Areskogh, D., and Henriksson, G. (2013). Enzyme catalyzed cross-linking of spruce galactoglucomannan improves its applicability in barrier films. *Carbohydrate Polymers* 95, 690–696.

Opedal, M.T., Stenius, P., and Johansson, L. (2011). Mechanical Pulp: REVIEW: Colloidal stability and removal of extractives from process water in thermomechanical pulping. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 26, 248–257.

Osma, J.F., Toca Herrera, J.L., and Rodríguez Couto, S. (2007). Banana skin: A novel waste for laccase production by *Trametes pubescens* under solid-state conditions. Application to synthetic dye decolouration. *Dyes and Pigments* 75, 32–37.

Palma, C., Lloret, L., Sepúlveda, L., and Contreras, E. (2016). Production of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii* by solid-state fermentation using agricultural residues and evaluation of its catalytic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46, 200–207.

Perrot, T. (2018). *Diversité fonctionnelle des systèmes de détoxification chez les champignons lignolytiques*. Université de Lorraine.

Persson, T., and Jönsson, A.-S. (2017). Characterization of hemicelluloses in process streams in thermomechanical and chemi-thermomechanical pulp mills. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 37, 184–190.

- Persson, T., Nordin, A.-K., Zacchi, G., and Jönsson, A.-S. (2007). Economic evaluation of isolation of hemicelluloses from process streams from thermomechanical pulping of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 136, 741–752.
- Petit-Conil, M. (1999). *Procédés papetiers - Fabrication des pâtes*. Techniques de l'ingénieur, 17.
- Pham, L.T.M., and Kim, Y.H. (2014). Accelerated degradation of lignin by lignin peroxidase isozyme H8 (LiPH8) from *Phanerochaete chrysosporium* with engineered 4-O-methyltransferase from *Clarkia breweri*. *Enzyme and Microbial Technology* 66, 74–79.
- Pham, L.T.M., Eom, M.-H., and Kim, Y.H. (2014). Inactivating effect of phenolic unit structures on the biodegradation of lignin by lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme and Microbial Technology* 61–62, 48–54.
- Picart, P., Liu, H., Grande, P.M., Anders, N., Zhu, L., Klankermayer, J., Leitner, W., Domínguez de María, P., Schwaneberg, U., and Schallmey, A. (2017). Multi-step biocatalytic depolymerization of lignin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 6277–6287.
- Plank, J. (2004). Applications of biopolymers and other biotechnological products in building materials. *Appl Microbiol Biotechnol* 66, 1–9.
- Ponnusamy, V.K., Nguyen, D.D., Dharmaraja, J., Shobana, S., Banu, J.R., Saratale, R.G., Chang, S.W., and Kumar, G. (2019). A review on lignin structure, pretreatments, fermentation reactions and biorefinery potential. *Bioresource Technology* 271, 462–472.
- Posada, J.A., and Osseweijer, P. (2016). Chapter 26 - Socioeconomic and Environmental Considerations for Sustainable Supply and Fractionation of Lignocellulosic Biomass in a Biorefinery Context. In *Biomass Fractionation Technologies for a Lignocellulosic Feedstock Based Biorefinery*, S.I. Mussatto, ed. (Amsterdam: Elsevier), pp. 611–631.
- Pranovich, A.V., Reunanen, M., Sjöholm, R., and Holmbom, B. (2005). Dissolved Lignin and Other Aromatic Substances in Thermomechanical Pulp Waters. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 25, 109–132.
- Pu, Y., Jiang, N., and Ragauskas, A.J. (2007). Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin. *Journal of Wood Chemistry and Technology* 27, 23–33.
- Qian, X., Malmali, M., and Wickramasinghe, S.R. (2016). 9 - Membranes for the removal of fermentation inhibitors from biofuel production. In *Membrane Technologies for Biorefining*, A. Figoli, A. Cassano, and A. Basile, eds. (Woodhead Publishing), pp. 219–240.
- Quang Lê, H., Ma, Y., Borrega, M., and Sixta, H. (2016). Wood biorefinery based on  $\gamma$ -valerolactone/water fractionation. *Green Chemistry* 18, 5466–5476.
- Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F., Davison, B.H., Dixon, R.A., Gilna, P., Keller, M., *et al.* (2014). Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science* 344, 1246843–1246843.
- Rakotoveloa, A. (2017). Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phenoliques. LCPO Université de Bordeaux.
- Reis, C.E.R., Rajendran, A., and Hu, B. (2017). New technologies in value addition to the thin stillage from corn-to-ethanol process. *Rev Environ Sci Biotechnol* 16, 175–206.

Remigy, J.-C., and Desclaux, S. (2007). Filtration membranaire (OI, NF, UF) - Présentation des membranes et modules. *Techniques de l'ingénieur*, 27.

Renaudie, M. (2019). Intensification de la production d'hydrogène par fermentation obscure en bioréacteur membranaire : valorisation énergétique de biomasses. Université de Strasbourg.

Renders, T., Bosch, S.V. den, Koelewijn, S.-F., Schutyser, W., and Sels, B.F. (2017). Lignin-first biomass fractionation: the advent of active stabilisation strategies. *Energy Environ. Sci.* 10, 1551–1557.

Renders, T., Cooreman, E., Bosch, S.V. den, Schutyser, W., Koelewijn, S.-F., Vangeel, T., Deneyer, A., Bossche, G.V. den, Courtin, C.M., and Sels, B.F. (2018). Catalytic lignocellulose biorefining in n-butanol/water: a one-pot approach toward phenolics, polyols, and cellulose. *Green Chem.* 20, 4607–4619.

Rocha, G.J.M., Gonçalves, A.R., Nakanishi, S.C., Nascimento, V.M., and Silva, V.F.N. (2015). Pilot scale steam explosion and diluted sulfuric acid pretreatments: Comparative study aiming the sugarcane bagasse saccharification. *Industrial Crops and Products* 74, 810–816.

Rodríguez Couto, S., and Sanromán, M.A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22, 211–219.

Roth, S., and Spiess, A.C. (2015). Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 2285–2313.

R. Silverman, J., M. Danby, A., and Subramaniam, B. (2019). Intensified ozonolysis of lignins in a spray reactor: insights into product yields and lignin structure. *Reaction Chemistry & Engineering* 4, 1421–1430.

Sainsbury, P.D., Hardiman, E.M., Ahmad, M., Otani, H., Seghezzi, N., Eltis, L.D., and Bugg, T.D.H. (2013). Breaking Down Lignin to High-Value Chemicals: The Conversion of Lignocellulose to Vanillin in a Gene Deletion Mutant of *Rhodococcus jostii* RHA1. *ACS Chemical Biology* 8, 2151–2156.

Sarma, R., Islam, Md., Running, M., and Bhattacharyya, D. (2018). Multienzyme Immobilized Polymeric Membrane Reactor for the Transformation of a Lignin Model Compound. *Polymers* 10, 463.

Sathitsuksanoh, N., Holtman, K.M., Yelle, D.J., Morgan, T., Stavila, V., Pelton, J., Blanch, H., Simmons, B.A., and George, A. (2014). Lignin fate and characterization during ionic liquid biomass pretreatment for renewable chemicals and fuels production. *Green Chem.* 16, 1236–1247.

Scheel, T., Höfer, M., Ludwig, S., and Hölker, U. (2000). Differential expression of manganese peroxidase and laccase in white-rot fungi in the presence of manganese or aromatic compounds. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 686–691.

Schmidt, M., Schwartzberg, A.M., Perera, P.N., Weber-Bargioni, A., Carroll, A., Sarkar, P., Bosneaga, E., Urban, J.J., Song, J., Balakshin, M.Y., *et al.* (2009). Label-free in situ imaging of lignification in the cell wall of low lignin transgenic *Populus trichocarpa*. *Planta* 230, 589–597.

Schoemaker, H.E., and Leisola, M.S.A. (1990). Degradation of lignin by *Phanerochaete chrysosporium*. *Journal of Biotechnology* 13, 101–109.

- Schröder, T., Lauen, L.-P., Sowlati, T., and Geldermann, J. (2019). Strategic planning of a multi-product wood-biorefinery production system. *Journal of Cleaner Production* *211*, 1502–1516.
- Schwartz, M., Perrot, T., Aubert, E., Dumarçay, S., Favier, F., Gérardin, P., Morel-Rouhier, M., Mulliert, G., Saiag, F., Didierjean, C., *et al.* (2018). Molecular recognition of wood polyphenols by phase II detoxification enzymes of the white rot *Trametes versicolor*. *Sci Rep* *8*, 1–11.
- Sen, S., Patil, S., and Argyropoulos, D.S. (2015). Thermal properties of lignin in copolymers, blends, and composites: a review. *Green Chem.* *17*, 4862–4887.
- Sheldon, R. (2001). Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Commun.* 2399–2407.
- Shuai, L., Amiri, M.T., Questell-Santiago, Y.M., Héroguel, F., Li, Y., Kim, H., Meilan, R., Chapple, C., Ralph, J., and Luterbacher, J.S. (2016). Formaldehyde stabilization facilitates lignin monomer production during biomass depolymerization. *Science* *354*, 329–333.
- Sjostrom, J. (1990). Fractionation and characterization of organic substances dissolved in water during groundwood pulping of spruce. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* *5*, 9–15.
- Socol, C.R., Costa, E.S.F. da, Letti, L.A.J., Karp, S.G., Woiciechowski, A.L., and Vandenberghe, L.P. de S. (2017). Recent developments and innovations in solid state fermentation. *Biotechnology Research and Innovation* *1*, 52–71.
- Solomon, M.S., and Petersen, F.W. (2002). Membrane bioreactor production of lignin and manganese peroxidase. *Membrane Technology* *2002*, 6–8.
- Songulashvili, G., Elisashvili, V., Wasser, S.P., Nevo, E., and Hadar, Y. (2007). Basidiomycetes laccase and manganese peroxidase activity in submerged fermentation of food industry wastes. *Enzyme and Microbial Technology* *41*, 57–61.
- Stiefel, S., Lölsberg, J., Kipshagen, L., Möller-Gulland, R., and Wessling, M. (2015). Controlled depolymerization of lignin in an electrochemical membrane reactor. *Electrochemistry Communications* *61*, 49–52.
- Sun, Z., Fridrich, B., de Santi, A., Elangovan, S., and Barta, K. (2018). Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform Chemicals. *Chemical Reviews* *118*, 614–678.
- Sundholm, J. (1999). *Mechanical Pulping* (Jyväskylä, Finland: Finnish Paper Engineers' Association and TAPPI).
- Tan, S.S.Y., MacFarlane, D.R., Upfal, J., Edey, L.A., Doherty, W.O.S., Patti, A.F., Pringle, J.M., and Scott, J.L. (2009). Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. *Green Chem.* *11*, 339.
- Thanh Mai Pham, L., and Kim, Y.H. (2016). Discovery and characterization of new O-methyltransferase from the genome of the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* for enhanced lignin degradation. *Enzyme and Microbial Technology* *82*, 66–73.
- Thomas, L., Larroche, C., and Pandey, A. (2013). Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* *81*, 146–161.
- Thuvander, J., and Jönsson, A.-S. (2016). Extraction of galactoglucomannan from thermomechanical pulp mill process water by microfiltration and ultrafiltration—Influence of microfiltration membrane pore size on ultrafiltration performance. *Chemical Engineering Research and Design* *105*, 171–176.

- Tomani, P. (2010). The lignoboost process. *Cellulose Chemistry and Technology* 44, 53–58.
- Treasure, T., Gonzalez, R., Jameel, H., Phillips, R.B., Park, S., and Kelley, S. (2014). Integrated conversion, financial, and risk modeling of cellulosic ethanol from woody and non-woody biomass via dilute acid pre-treatment. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8, 755–769.
- Trouy-Triboulot, M.-C., and Triboulot, P. (2012). Matériau bois - Structure et caractéristiques. *Techniques de l'ingénieur*, 26.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., and Vinardell, M.P. (2008). Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresource Technology* 99, 6683–6687.
- Upton, B.M., and Kasko, A.M. (2016). Strategies for the Conversion of Lignin to High-Value Polymeric Materials: Review and Perspective. *Chem. Rev.* 116, 2275–2306.
- Valoppi, F., Lahtinen, M.H., Bhattarai, M., Kirjoranta, S.J., Juntti, V.K., Peltonen, L.J., Kilpeläinen, P.O., and Mikkonen, K.S. (2019). Centrifugal fractionation of softwood extracts improves the biorefinery workflow and yields functional emulsifiers. *Green Chem.* 21, 4691–4705.
- Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., and Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant physiology* 153, 895–905.
- Villain-Gambier, M., Courbalay, M., Klem, A., Dumarcay, S., and Trebouet, D. (2020). Recovery of lignin and lignans enriched fractions from thermomechanical pulp mill process water through membrane separation technology: Pilot-plant study and techno-economic assessment. *Journal of Cleaner Production* 249, 119345.
- Vinardell, M.P., Ugartondo, V., and Mitjans, M. (2008). Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crops and Products* 27, 220–223.
- Wang, G., and Chen, H. (2013). Fractionation and characterization of lignin from steam-exploded corn stalk by sequential dissolution in ethanol–water solvent. *Separation and Purification Technology* 120, 402–409.
- Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A., and Yang, B. (2019). From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresource Technology* 271, 449–461.
- Willför, S., Sjöholm, R., Laine, C., Roslund, M., Hemming, J., and Holmbom, B. (2003). Characterisation of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp. *Carbohydrate Polymers* 52, 175–187.
- Wong, D.W.S. (2009). Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174–209.
- Xie, S., Sun, Q., Pu, Y., Lin, F., Sun, S., Wang, X., Ragauskas, A.J., and Yuan, J.S. (2017). Advanced Chemical Design for Efficient Lignin Bioconversion. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 5, 2215–2223.
- Yiin, C.L., Quitain, A.T., Yusup, S., Uemura, Y., Sasaki, M., and Kida, T. (2018). Sustainable green pretreatment approach to biomass-to-energy conversion using natural hydro-low-transition-temperature mixtures. *Bioresource Technology* 261, 361–369.
- Zeng, Y., Zhao, S., Yang, S., and Ding, S.-Y. (2014). Lignin plays a negative role in the biochemical process for producing lignocellulosic biofuels. *Current Opinion in Biotechnology* 27, 38–45.

Zhang, Q., Zhang, G., Xu, J., Gao, C., and Wu, Y. (2015). Recent advances on lignin-derived polyurethane polymers. *Reviews on Advanced Materials Science* 40, 146–154.

Zhou, H., Xu, J.Y., Fu, Y., Zhang, H., Yuan, Z., Qin, M., and Wang, Z. (2019). Rapid flow-through fractionation of biomass to preserve labile aryl ether bonds in native lignin. *Green Chem.* 21, 4625–4632.

Zhu, N., Liu, J., Yang, J., Lin, Y., Yang, Y., Ji, L., Li, M., and Yuan, H. (2016). Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels* 9.

# Chapitre 2





## CHAPITRE 2 / PRODUCTION ET CARACTERISATION

### ANALYTIQUE DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE

#### 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DU CHAPITRE 2

Dans le cadre de la valorisation de la LTM produite par la papèterie Norske Skog à Golbey (NSG), le premier objectif de cette thèse a été de produire un lot référent de lignine utilisable pour l'ensemble des travaux de recherche. Pour ce faire, un procédé de filtration membranaire en cascade, précédemment développé et optimisé à l'échelle du laboratoire, a été éprouvé pour la première fois à l'échelle pilote en approvisionnement semi-continu pour le traitement de 3 m<sup>3</sup> d'effluent. Ce procédé permet de séparer et de concentrer les différents constituants du bois dissouts dans les eaux de procédé de cette usine thermomécanique en générant d'une part des fractions liquides de biomolécules à valoriser (dont la LTM) et d'autre part de l'eau de qualité industrielle réutilisable par le papetier.

Dans un premier temps, après avoir présenté la composition initiale de l'effluent papetier, ce chapitre détaille la cascade d'opérations unitaires employée lors de cette montée en échelle ainsi que les rendements massiques et identifications associés à chaque fraction. Par la suite, un travail détaillé de caractérisation analytique a été mené sur la LTM dans le but d'évaluer son potentiel de valorisation. Les résultats de cette caractérisation, qui ont été publiés, sont présentés en deuxième partie de ce chapitre.

#### 2. PRODUCTION DU LOT REFERENT DE LIGNINE THERMOMECHANIQUE

##### 2.1. COMPOSITION DU FILTRAT CLAIR

L'usine française du papetier norvégien Norske Skog, leader européen dans la production de papier journal, est implantée dans les Vosges à Golbey. Leur principale source de biomasse provient de l'exploitation responsable de la filière bois du Grand Est dont ils récupèrent les plaquettes de scieries et les rondins d'éclaircies pour la production de leur pâte thermomécanique. La matière première utilisée dans leur procédé est composée uniquement de bois de résineux et plus précisément d'un mélange de sapin, d'épicéa et de douglas (à une teneur maximale limitée à 10 % pour ce dernier).

Le procédé de production de la pâte thermomécanique n'ayant pas pour vocation de séparer les différentes fibres du bois pour en isoler la cellulose, le rendement matière des papèteries thermomécaniques est particulièrement élevé par rapport aux autres procédés papetiers. Environ 95 % de la matière « bois » entrante est incorporée à la pâte à papier (Persson *et al.*, 2007). Les principales pertes de matières, ou coproduits organiques générés, se retrouvent sous forme dissoute ou dispersée dans les vapeurs et les eaux de procédés. Une étude antérieure menée sur le site de NSG a permis d'identifier le filtrat clair comme effluent liquide de choix pour la valorisation de ces coproduits organiques par procédé membranaire (Courbalay, 2018). Comme illustré sur la Figure 29, le filtrat clair correspond à l'eau de procédé éliminée au niveau du filtre à disque lors de l'épaississement de la pâte à papier.

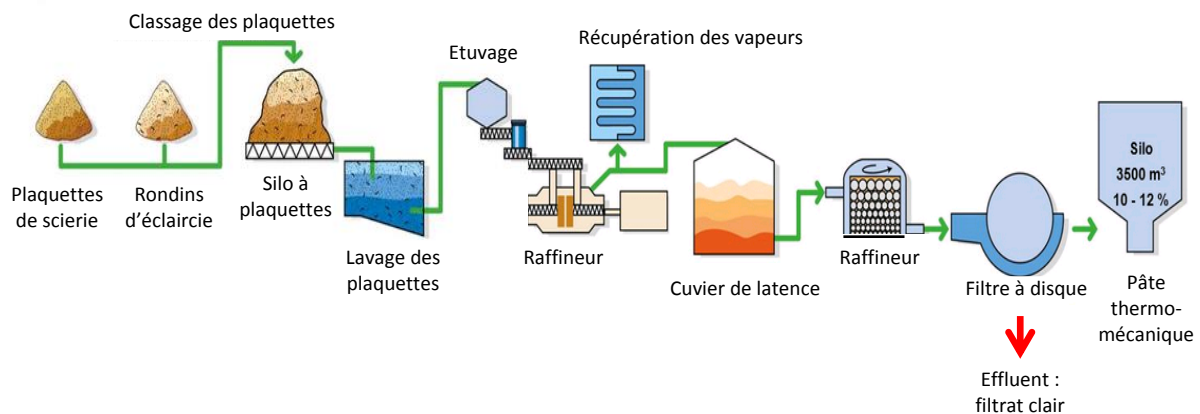


Figure 29 : schéma du procédé de production de la pâte thermomécanique avec point de prélèvement du filtrat clair (documentation interne de NSG revisitée).

La composition moyenne du filtrat clair de NSG, suivie sur près de 3 ans, est indiquée dans le Tableau 6 (Courbalay, 2018). Deux autres compositions d'eaux de procédés thermomécaniques rapportées dans la littérature y sont également listées (Krawczyk and Jönsson, 2011; Persson *et al.*, 2010). Les eaux de procédés A et B proviennent de papèteries suédoises qui utilisent également du bois de résineux pour la production de leur pâte à papier, à la différence près que leur approvisionnement en biomasse ne se compose que d'épicéa.

Tableau 6 : composition des filtrats clairs de NSG et de deux eaux de procédés suédoises.

\* (Courbalay, 2018) \*\* (Persson et al., 2010) \*\*\* (Krawczyk and Jönsson, 2011)

	Filtrat clair de NSG*	Eau de procédé	
		A**	Eau de procédé B***
Unité	g/L	g/L	g/L
<b>Matière sèche</b>	3,78	5,1	5,6
<b>Matière minérale</b>	0,65	1,76	1,96
<b>Hémicelluloses</b>	1,17	1,15	1,33
<b>Polyphénols</b>	0,71	0,73	0,86
<b>Autres</b>	1,25	1,46	1,45

D'après ces données, et bien que le prétraitement mécanique du bois ne soit pas sélectif sur les fibres, seule une partie des hémicelluloses et de la lignine ainsi que des extractibles se retrouvent dans les eaux de procédé. La totalité de la cellulose est incorporée à la pâte à papier et les hémicelluloses représentent en masse le constituant le plus abondant des filtrats clairs. La différence majeure entre ces eaux de procédé est leur teneur en matière minérale. L'eau industrielle est responsable en grande partie de cette matière toutefois des minéraux provenant du blanchiment de la pâte à papier peuvent également y contribuer lorsque l'eau du procédé est en partie recirculée, ce qui semble être le cas dans les procédés A et B. Les dosages de polyphénols correspondent à la teneur en polyphénols totaux des effluents (absorbance à 280 nm). Cette teneur comprend la quantification de la lignine mais également celle d'extractibles phénoliques tels que les lignanes ou les acides phénoliques. La catégorie « autre » regroupe notamment la contribution en masse des extractibles lipophiles également présents dans les effluents tels que les acides gras, les terpénoïdes ou les acides résiniques majoritairement présents sous forme de matières en suspension, également appelées substances colloïdales.

La distribution de masses moléculaires des composés organiques solubilisés dans les eaux de procédé thermomécanique ne dépasse pas les 100 kDa avec une masse moléculaire moyenne de 20 kDa pour les hémicelluloses et de 1 à 10 kDa pour la lignine (Thuvander and Jönsson, 2016). Les particules hydrophobes en suspension présentent, elles, une taille moyenne comprise entre 0,2 et 2  $\mu\text{m}$  (Stack *et al.*, 2014).

La composition globale des eaux de procédé thermomécanique dépend de trois facteurs : la qualité de l'eau industrielle, la matière première utilisée ainsi que les paramètres du procédé. Malgré la distance géographique et les spécificités propres de chaque usine en termes de procédé et d'approvisionnement, les quantités d'hémicelluloses, de polyphénols et d'extractibles extraites dans les effluents thermomécaniques apparaissent particulièrement stables. Cette observation permet de supposer que l'ensemble des résultats de cette thèse pourrait être transposable à toute usine thermomécanique transformant du bois de résineux.

## 2.2. OPERATIONS DE FILTRATION MEMBRANAIRE

Le procédé de filtration membranaire utilisé pour le fractionnement du filtrat clair de NSG a été précédemment développée et optimisée dans le cadre des travaux de thèse de Matthieu COURBALAY au sein du laboratoire (Courbalay, 2018). Ce procédé est présenté en Figure 30.

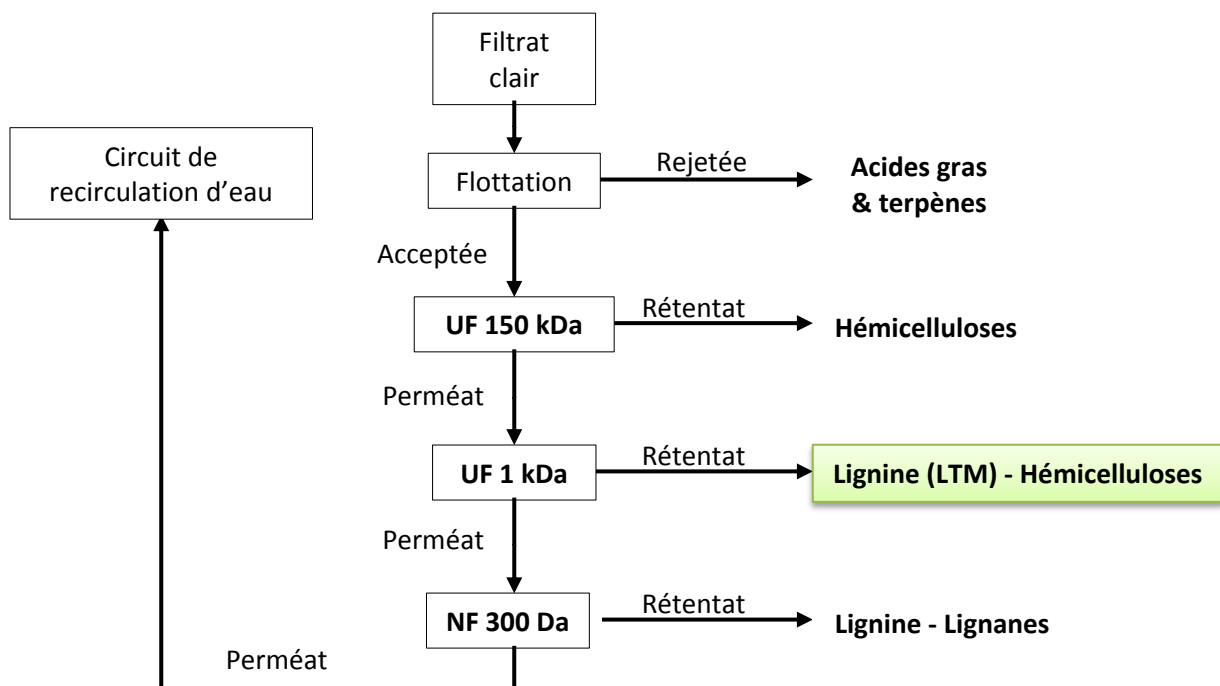


Figure 30 : procédé de filtration utilisé pour le fractionnement du filtrat clair de NSG ; UF : ultrafiltration ; NF : nanofiltration.

La première étape de flottation permet d'éliminer une partie des matières en suspension ainsi que la grande majorité des extractibles lipophiles présents dans le filtrat clair (Courbalay, 2018). Il s'agit d'une étape de clarification essentielle afin de rendre l'eau de procédé apte à la filtration membranaire. En effet, il a été démontré dans la littérature que les

composés lipophiles sont les principaux responsables du colmatage des membranes lors de la filtration d'effluents papetiers, que les membranes soient hydrophobes ou hydrophiles (Puro *et al.*, 2002, 2011). Cet encrassement des membranes a pour effet immédiat de réduire drastiquement les performances des procédés membranaires.

L'ultrafiltration à 150 kDa permet une clarification plus aboutie en retenant la totalité des matières en suspension restante. Il a également été démontré qu'une grande partie des hémicelluloses présentes dans le filtrat clair est retenue par cette membrane, jusqu'à 75 % lors d'une réduction volumique de 87 % (Courbalay, 2018). Bien qu'ayant, d'après la littérature, une masse moléculaire inférieure au seuil de coupure de 150 kDa, la rétention des hémicelluloses dans cette fraction s'expliquerait par la formation d'agrégats de très haut poids moléculaire observés en chromatographie d'exclusion stérique au sein du rétentat 150 kDa (Courbalay, 2018). En effet, des études sur les matières en suspension des eaux de procédés papetiers démontrent que les hémicelluloses sont capables de s'adsorber à la surface de ces dernières, expliquant ainsi ce phénomène de rétention (Stack *et al.*, 2014).

Une fois les extractibles lipophiles, la matière en suspension et une partie des hémicelluloses retirés du filtrat clair, restent en mélange la LTM, les extractibles hydrosolubles tels que les lignanes ou les acides phénoliques, ainsi que les hémicelluloses résiduelles. L'ultrafiltration à 1 kDa permet de retenir et de concentrer une grande majorité de la LTM (68 % pour une réduction volumique de 88 %) ainsi que la totalité des hémicelluloses restantes. La nanofiltration à 300 Da retient quant à elle les fragments de lignine restants ainsi que la quasi-totalité des extractibles phénoliques (Courbalay, 2018).

Ce procédé de filtration, développé dans le cadre du projet REVA COPPA, génère au total quatre fractions de biomolécules ainsi que de l'eau nanofiltrée. Il est très intéressant de noter que l'eau régénérée en fin de procédé présente des paramètres physico-chimiques proches de l'eau industrielle utilisée par le papetier (Courbalay, 2018). Ce procédé membranaire permettrait donc la recirculation d'une eau qui jusque-là était perdue en station d'épuration. En ce qui concerne les biomolécules, le projet REVA COPPA a été initialement développé pour la valorisation des composés phénoliques présents dans les eaux de procédé. Ce sujet de thèse s'inscrit d'ailleurs dans la continuité de cet objectif, permettant un travail de recherche exploratoire sur les voies de valorisation du rétentat de la membrane 1 kDa enrichi en LTM. Cependant à terme, dans le contexte de bioraffinerie, il serait idéal d'arriver à la valorisation de l'ensemble des fractions générées par ce procédé.

### 2.3. PRODUCTION DU LOT REFERENT

Le laboratoire est équipé d'une unité pilote de filtration membranaire permettant de fonctionner en batch sur des volumes de plusieurs dizaines de litres avec une capacité maximum de la cuve d'alimentation de 70 L. Afin d'obtenir suffisamment de matière pour les trois années de cette thèse, un système de fonctionnement semi-continu a été utilisé avec ce pilote pour permettre de réaliser une montée en échelle. Ainsi, à partir de 3 m<sup>3</sup> de filtrat clair prélevés sur le site de NSG, environ 1,35 m<sup>3</sup> ont pu être filtrés au laboratoire selon le procédé précédemment décrit. Les paramètres de filtration utilisés lors de cette production sont résumés dans le Tableau 7.

Tableau 7 : membranes et paramètres de filtrations utilisés lors de la montée en échelle.

Caractéristiques membranaires	Seuil de coupure	150 kDa	1 kDa	300 Da
	Domaine de filtration	Ultrafiltration (UF)	Ultrafiltration (UF)	Nanofiltration (NF)
	Référence	Orelis environnement Kleansep™ BW		GE Power & Water/DL2540F30
	Configuration	Tubulaire		Spiralée
	Matériau	Céramique (TiO <sub>2</sub> -ZrO <sub>2</sub> )		Polyamide
	Surface	61 canaux soit 0,45 m <sup>2</sup>		2,6 m <sup>2</sup>
Paramètres de filtration	pH	pH natif 6,2	pH 4	pH 4
	Pression transmembranaire (bar)	2,5	6,4	6,0
	Température (°C)	60	60	48
	Vitesse de recirculation (m.s <sup>-1</sup> )	5	5	1

Tous ces paramètres ont été préalablement optimisés lors de filtrations en fonctionnement fermé afin de limiter les phénomènes de colmatage (Courbalay, 2018).

Le suivi massique de la matière au cours du fractionnement est donné en Figure 31. La première étape de flottation a été réalisée au Centre Technique du Papier (CTP) à Grenoble dans une cuve permettant de traiter les 3 m<sup>3</sup> d'effluent en un seul batch. Aucun essai préliminaire n'a été réalisé sur cet équipement industriel en amont de la production. Les paramètres de flottation préalablement définis à l'aide d'une cuve de flottation de 35 L sur le site de NSG n'ont pas pu être directement transposés à cette échelle, ce qui explique la perte de matière très importante observée. Il existe donc une grande marge d'optimisation à cette étape afin d'augmenter le rendement de production de l'ensemble du procédé.

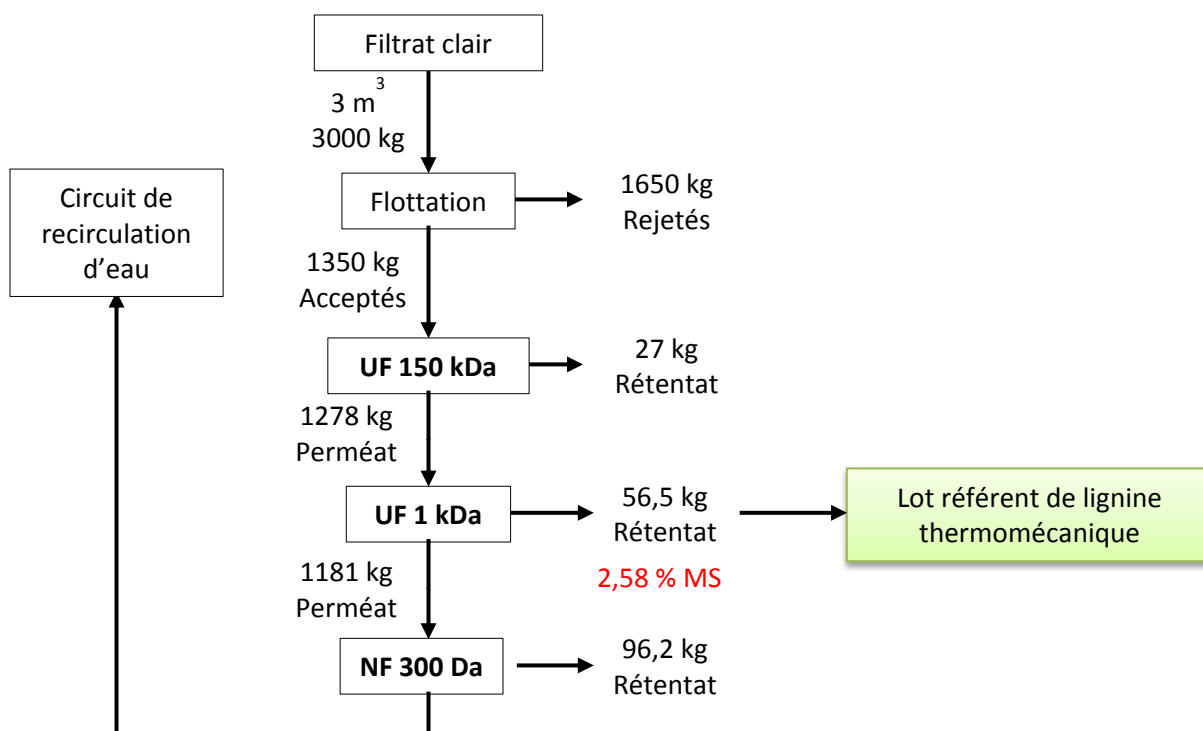


Figure 31 : Suivi massique des fractions liquides produites lors du fractionnement du filtrat clair de NSG ; MS : matière sèche.

En ce qui concerne la fraction d'intérêt enrichie en LTM, 56,5 kg de rétentat 1 kDa présentant une teneur en matière sèche de 2,58 % ont été produits. Ce lot référent représente ainsi un stock d'environ 1,5 kg de matière sèche pour les travaux de cette thèse. Dans un souci de conservation longue et de stockage, la moitié du rétentat 1 kDa a été concentrée par évaporation simple effet puis séchée par atomisation. L'autre moitié a été conservée sous forme liquide, aliquotée et congelée à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Le chapitre suivant est dédié à la présentation des procédés de transformation utilisés en aval de la production de la LTM ainsi qu'à l'étude de leur impact sur sa structure. Avant cela, la deuxième partie de ce chapitre présente les résultats de caractérisation analytique générés sur un échantillon de rétentat 1 kDa lyophilisé.

### 3. CARACTERISATION DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE

#### 3.1. STRATEGIE DE CARACTERISATION

Sur le plan analytique, la complexité intrinsèque des lignines ainsi que leurs interactions, covalentes ou non, avec les autres polymères du bois rendent leur caractérisation particulièrement difficile. Pour obtenir une caractérisation fine de lignine technique, indiquant



par exemple sa composition en monomères, sa masse moléculaire, ses fonctionnalités ou encore ses types de liaisons inter-unités, il est nécessaire de combiner différentes méthodes analytiques incluant entre autres des protocoles de digestion chimique, de chromatographie et d'analyse spectroscopique (Lupoi *et al.*, 2015).

Dans cette partie analytique, la caractérisation quantitative et structurale de la LTM a été menée de sorte à obtenir l'étude la plus exhaustive possible afin de combler le manque d'information disponible dans la littérature. Un premier ensemble de méthodes analytiques jouant sur les différences de solubilité des polymères pariétaux du bois en milieu acide concentré ou en milieu aqueux à chaud a été appliqué au rétentat 1 kDa afin de déterminer précisément les proportions d'hémicelluloses et de lignine au sein de la fraction. Par la suite, un protocole d'analyse en chromatographie d'exclusion stérique en milieu aqueux basique a été mis en œuvre au laboratoire afin de caractériser la distribution de masses moléculaires de ces macromolécules. Enfin, la caractérisation structurale de la lignine thermomécanique contenue dans le rétentat 1 kDa a été réalisée par des méthodes spectrales de résonance magnétique nucléaire (RMN). Actuellement, les différents protocoles de RMN font partie des techniques analytiques incontournables dans le domaine de la caractérisation des lignines (Constant *et al.*, 2016). Ces techniques permettent d'obtenir des informations essentielles sur leurs groupements fonctionnels (RMN du  $^{31}\text{P}$ ), leurs liaisons inter-unités ou encore leur état de condensation (RMN  $^{13}\text{C}$ ). Dans le cas d'extraits de biomasse lignocellulosique comprenant plusieurs polymères en mélange, comme le rétentat 1 kDa, l'analyse RMN en deux dimensions (2D-HSQC), qui corrèle les spectres  $^{13}\text{C}$  et  $^1\text{H}$  de l'échantillon, permet la séparation spatiale des signaux générés par les différentes chaînes polymériques et la visualisation de leurs éventuelles interactions covalentes (Giummarella *et al.*, 2019). L'ensemble des résultats analytiques générés sur le rétentat 1 kDa et la LTM ont été regroupés et publiés dans un article intitulé « Unveiling TMP process water potential as an industrial sourcing of valuable Lignin-Carbohydrate Complexes toward zero-waste biorefineries ».

### **3.2. RESULTATS**

# Unveiling TMP Process Water Potential As an Industrial Sourcing of Valuable Lignin–Carbohydrate Complexes toward Zero-Waste Biorefineries

Virginie Steinmetz,<sup>†,‡,§</sup> Maud Villain-Gambier,<sup>\*,†</sup> Armand Klem,<sup>§</sup> François Gambier,<sup>‡</sup> Stéphane Dumarçay,<sup>‡</sup> and Dominique Trebouët<sup>†</sup>

<sup>†</sup>Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM), Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR CNRS 7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France

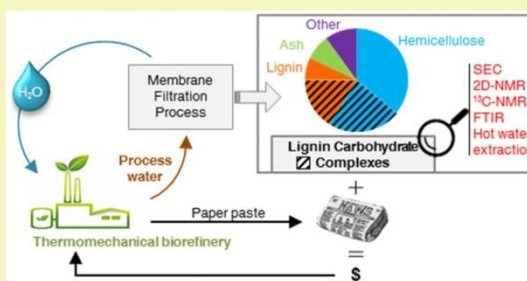
<sup>‡</sup>Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, EA 4370 USC INRA, Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy, France

<sup>§</sup>Norske Skog Golbey, Route Jean-Charles Pellerin, BP 109, 88194 Golbey, France

## Supporting Information

**ABSTRACT:** The development of zero-waste biorefineries is a promising yet challenging pathway toward a sustainable bioeconomy. Deep insights on the composition of biorefineries side streams along with the development of green technologies are mandatory to achieve such a goal. In this Article, a sustainable pilot-scale membrane process was used to recover valuable organic matter dissolved in the main side stream of a thermomechanical pulping (TMP) plant. A great number of analytical tools were combined to get an extensive characterization of the generated fraction, including inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES), high-performance ion chromatography coupled with pulse amperometric detection (HPIC-PAD), Fourier transform infrared (FTIR), size-exclusion chromatography (SEC), and <sup>13</sup>C and 2D heteronuclear single quantum correlation (HSQC) NMR. The results revealed the presence of a considerable amount of native lignin–carbohydrate complexes (LCCs) in the fraction representing 40% of the dry weight. The LCCs are composed of partially acetylated galactoglucomannans (GGMs) covalently linked to low condensed and β-O-4-rich lignin through phenyl glycosidic bonds (25.5 bonds/100 aromatic rings (ar)) and characterized by a relatively low molecular weight around 7 kDa. Such complexes present an interesting potential for valorization with unique properties resulting from the combination of their aromatic and sugar moieties. Different applications are discussed in regards to the generated data in this work as an industrial sourcing of LCC is reported.

**KEYWORDS:** Lignin–carbohydrate complexes, Lignin, Galactoglucomannans, Membrane filtration, Biorefineries, SEC, 2D-NMR, Thermomechanical process



## INTRODUCTION

The development of a new bioeconomy implies the sustainable and optimized exploitation of bioresources through environmentally safe processes. In this context, efforts are made on the optimization of biorefineries fluxes for the reduction of their carbon footprint. Thus, finding applications for all biomass constituents, including industrial coproducts, appears as a major concern. Thermomechanical pulping (TMP) is a high-yield process retaining >90% of the wood biomass in the end product.<sup>1</sup> The organic loss is dissolved and diluted in the process water representing the main side stream of TMP plants. Accumulation of dissolved and colloidal wood substances in the process water upon recirculation is known to cause impairments to the paper quality.<sup>2</sup> Instead of discarding this side stream to wastewater-treatment plants, as

is currently the case, its valorization for renewable materials or active biomolecules production can result in significant improvement of TMP plants profitability while greatly reducing the amount of generated wastes.<sup>3</sup> Although the concentration of wood constituents in the process water is low (in the range of 1 g·L<sup>-1</sup>), their potential for valorization is considerable as the flow rate of process water in TMP is of several hundred cubic meters per hour.

Membrane filtration processes have proved their suitability as an energy-efficient separation technique for the recovery of substances at really low concentration.<sup>4–8</sup> Membrane filtration

Received: January 10, 2019

Revised: February 8, 2019

Published: February 21, 2019

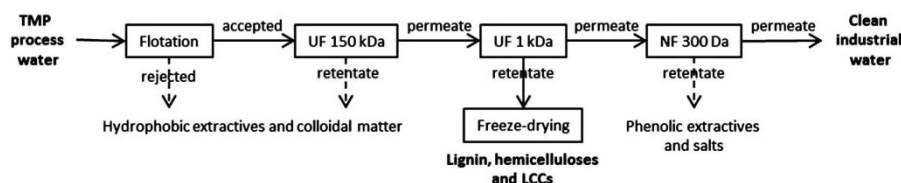


Figure 1. Schematic illustration of the overall process of TMP water treatment.

is a clean and sustainable technology where the separation process is carried out solely on the basis of physical parameters, excluding the use of chemicals or additives. This results in an end product of high quality and makes it easier to comply with the many stringent requirements from both consumers and public authorities. Another advantage of membrane filtration is that the recovered water can be reused in the mill to work on closed loop. Hence, this technology represents an opportunity to improve TMP plants' environmental impact. By reducing the fresh water consumption and wastewater-treatment cost, economic benefits also emerge from this process in addition to the new income from side-stream valorization.

The TMP process water has been extensively studied, and its global composition is well-documented.<sup>6,9–11</sup> The main constituents recoverable for valorization include hemicelluloses, lignin, fatty acids, and phenolic extractives. The molecular weight (MW) distribution reported in TMP water process does not exceed 100 kDa with a molecular weight around 20 kDa for hemicelluloses and 1–10 kDa for lignin.<sup>12</sup> Ultrafiltration using membrane cutoff of 1 and 5 kDa has demonstrated its suitability to recover those macromolecules after a first clarification step, such as microfiltration.<sup>6,7,12</sup> For a long time, lignin and hemicelluloses have been considered as two different and separated macromolecules. The interest was focused on hemicelluloses recovery supported by the fact that it is the major constituent dissolved in process water. However, during the recovery and purification of hemicelluloses, systematic residual amounts of lignin were found in the fractions.<sup>6,7,12</sup> In the same way, multiple selective extraction steps with low yields were required to remove the sugar contaminants while trying to isolate lignin.<sup>10</sup> It is now well-acknowledged that the physical separation of hemicelluloses and lignin is limited by the presence of covalent linkages between these two molecules.<sup>13,14</sup> Only some part of the hemicelluloses and lignin can be recovered as pure fractions from the TMP process water, underlining the presence of a third class of macromolecule called lignin carbohydrate complex (LCC).

LCCs are composite macromolecules studied in comparison to lignin and hemicelluloses, but they have been attracting more attention these past few years. The current knowledge on LCCs structures was mainly generated from studies on mild wood extraction, such as milled wood or Björkman extraction, to broaden the understanding of the wood fibers structural organization *in situ*.<sup>15–18</sup> The other part of the knowledge comes from studies on industrial pulp aiming to characterize the lignin–carbohydrate linkages (LCLs) remaining after wood pretreatment in order to improve the delignification process.<sup>13,19</sup> Some recent publications also focus on LCCs specific properties for industrial valorization as a renewable resource. It was reported that their mechanical properties confer on them a great potential for applications such as barrier-film formation for sustainable food packaging or

biocompatible hydrogel production as cells carrier in biomedicine.<sup>20,21</sup> Biological properties have also been published such as antiherpes and anti-HIV for pharmaceutical applications or antiscavenging and anti-UV activities for cosmetic applications.<sup>22–24</sup> Those works highlight the great potential of LCCs valorization with unique applications resulting from the combination of lignin and hemicelluloses properties. However, until now, no commercialization of LCCs has been reported.

A sustainable and economic sourcing of LCC is critical to ensure their industrial development. Revealing their recovery potential from residual feedstock, such as biorefinery effluents, seems to be the most promising path. In 2017, Naron et al. pointed out the presence of LCCs in the autohydrolysates of hardwood and nonwood biomass and brought deep characterization insights.<sup>25</sup> The same year, Al-Rudainy et al. proposed a process for LCCs recovery from spent sulphite liquor.<sup>26</sup> Even if the presence of LCCs in TMP process water has been acknowledged for years while working on hemicelluloses valorization, only indirect evidence is found in the literature. LCCs have never been quantified in TMP process water, and no analytical data are available on their lignin part and LCLs involved. On the basis of a strong belief in the benefits that would bring a better understanding of LCC structural composition and recovery potential from TMP process water, this work combines a scalable and sustainable membrane process with advanced analytical tools, such as 2D NMR, for their isolation and characterization. An approach for LCCs quantification is also proposed. Possible valorization pathways are discussed in regard to the generated analytical data.

## EXPERIMENTAL SECTION

**Materials.** The TMP process water used for this study came from Norske Skog Golbey industry (NSG), France. Spruce and fir are used as primary raw materials in the pulp mill. The dissolved wood constituents were recovered from 3 m<sup>3</sup> of process water using pilot-scale flotation and filtration units (Figure 1). The overall process was designed based on previous published data to recover the dissolved constituents ranging from 1 to 100 kDa.<sup>6,7</sup> Flotation is required prior to membrane filtration in order to remove hydrophobic extractives and colloidal matters and prevent membrane fouling. This step was completed at Centre Technique du Papier (CTP, Grenoble, France). The accepted fraction went through further clarification by ultrafiltration (UF) on a 150 kDa membrane, and the organic matter of interest was then recovered in the retentate after ultrafiltration on a 1 kDa membrane. A last nanofiltration (NF) step on a 300 Da membrane was employed to regenerate high-quality-grade industrial water that can be reinjected in the biorefinery process. The 1 kDa retentate fraction was freeze-dried for preservation and characterization purposes, reaching 1.5 kg of dry matter. Freeze-drying was used for analytical purpose as it was considered as the most neutral drying process to avoid LCCs denaturation or degradation. For industrial scale-up, evapo-concentration and atomization will be preferred and optimized. Detailed information on the membranes and

operating conditions used in the process is given in the Supporting Information (Table S1).

As the internal analytical standard, milled wood lignin (MWL) was extracted from a sample of NSG wood feedstock. Wood chips were ground to pass through a 0.5 mm sieve in a vibrating disc mill and Soxhlet-extracted twice with 2:1 (v/v) toluene/ethanol for 18 h. The extractive-free sample was dried overnight at 103 °C and ground again in a rotary ball-mill for 16 h at 320 rpm using two steel balls of 40 mm. The ball-milled powder was extracted twice with 96:4 (v/v) 1,4-dioxane/water for 24 h in the dark at 450 rpm, and the MWL was recovered according to the method outlined by Brosse et al. and Holtman et al.<sup>27,28</sup>

**Elemental Analyses.** The C, H, N, and O elemental composition was determined with an elemental analyzer (FLASH 2000 Thermofischer). Anions (Cl-, F-, and Br-) were quantified by ionic chromatography (Dionex ICS-2000, AS19 Dionex column) after an overnight extraction in hot water assisted by ultrasonication and followed by filtration. The inorganic elemental composition was measured using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-AES) (Variant 720 ES). The lignin was digested using HNO<sub>3</sub>/HCl in a microwaves reactor (Anton Paar Multiwave Eco).

**Organic Composition.** Global organic composition of the freeze-dried powder was determined after acid hydrolysis following the NREL procedure with minor modifications. To sum up, 1.5 mL of 72% sulfuric acid was added to 0.175 g of powder (previously dried at 103 °C overnight) in 50 mL pressure tubes. The tubes were incubated for 60 min at 30 °C in a water bath, and samples were stirred every 10 min. Water (42 mL) was introduced to dilute the acid solutions to 4%, and the tubes were placed in an autoclave for 1 h of hydrolysis at 121 °C. The acid-insoluble residues were gravimetrically determined after filtration through a glass fiber filter. The hydrolysates were analyzed to quantify the acid-soluble lignin (ASL) by UV-vis absorption spectroscopy at 205 nm, and the monomeric reducing sugars were analyzed by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC-PAD). A set of sugar recovery standards was prepared and used to correct the losses in quantification due to the degradation of monomeric sugars during the dilute acid hydrolysis. An extinction coefficient of 110 L·g<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup> was used for ASL calculations. The acid-insoluble lignin (AIL) content was defined as the amount of ash-free Klason lignin (ash corresponding to the total mineral matter quantified by HPIC and ICP). All measurements were carried out at least in triplicate.

**NMR Experiments.** For all NMR analyses, ~100 mg of samples were dissolved in 0.5 mL of dimethylsulfoxide (DMSO-*d*<sub>6</sub>). Spectra were recorded on a Bruker AVANCE III 400 MHz spectrometer equipped with a BBFO probe 5 mm at 25 °C. For quantitative <sup>13</sup>C NMR, an inverse gated decoupling sequence was used with a relaxation delay of 12 s and 13K scans were acquired. 2D-HSQC NMR spectra were acquired with the following parameters: 128 transients, 16 dummy scans, relaxation delay of 1.9 s, 1024 data points in F2 (<sup>1</sup>H) dimension, and 256 data points in F1 (<sup>13</sup>C). A coupling constant <sup>1</sup>J<sub>C-H</sub> of 145 Hz was used. The 2D data set was processed with MestreNova using a 90° shifted square sine-bell apodization window. The data matrices were zero filled to 1024 points in both dimensions, and baseline and phase corrections were applied in both dimensions. The central solvent (DMSO) peak was used as an internal chemical shift reference point ( $\delta_C/\delta_H$  40.1/2.51).

**Size-Exclusion Chromatography.** The molar mass distribution of the lignin was determined using an aqueous SEC method on a Prominent Shimadzu HPLC equipped with a guard column Phenomenex Polysep GFC-P (7.8 × 35 mm) and two analytical columns Phenomenex Polysep P4000 (7.8 × 300 mm) and P3000 (7.8 × 300 mm). A solution of sodium hydroxide (NaOH) at 10 mM was used as the mobile phase. Samples were dissolved in the same solution at ~1 mg·mL<sup>-1</sup> and filtered through 0.45 μm PTFE membrane filters. Twenty μL of sample solutions were injected. The separation was performed at 30 °C and 0.35 mL·min<sup>-1</sup> NaOH flow rate. An ultraviolet spectroscopy detector (UV) at 280 nm (Shimadzu SPD-20A) and a refractive index detector (RID, Shimadzu RID-20A) were used for detection. A calibration curve was obtained using a KIT

of 8 pullulan standards (Agilent PL2090-0101) with molar mass ranging from 667 to 344 000 Da. Measurements were carried out in triplicate.

**Hot Water Partition.** One gram of freeze-dried powder was extracted in 10 mL of deionized water at 80 °C for 4 h. After filtration, on a pretared glass fiber filter, the solid residue was dried overnight at 103 °C, gravimetrically quantified, analyzed by SEC and FTIR methods while the supernatant was filled up to 50 mL, and analyzed by spectrophotometry at 205 nm and SEC method. The schematic distribution of lignin, hemicelluloses, and LCCs is presented in Figure 2. Measurements were done in triplicate.

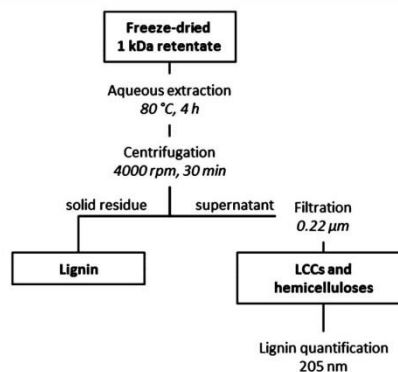


Figure 2. Distribution of lignin, hemicelluloses, and LCCs upon water partition.

**FTIR Spectroscopy.** FTIR spectra were acquired by attenuated total reflectance (ATR) through a diamond cell on a Nicolet 6700. All spectra were recorded at a spectral resolution of 4 cm<sup>-1</sup>, and 16 scans were taken per sample in the range of 4000–650 cm<sup>-1</sup>. Omnic software was used for acquisition, while Spectrum (PerkinElmer) version 10.5.1 was employed for data processing.

## RESULTS AND DISCUSSION

**TMP Fraction Composition.** A series of clarification and filtration steps was successfully applied at a pilot scale for the treatment of 3 m<sup>3</sup> of TMP process water, allowing the recovery of dissolved wood constituents on one hand and the regeneration of clean industrial water on the other. The composition of the dry matter isolated and concentrated in the 1 kDa retentate is detailed in Table 1. The retentate is mainly composed of sugars and aromatic derivatives accounting for 59 and 23% of the dry matter, respectively. A non-negligible amount of ash (7.7%) is also retained in the fraction. Elemental analysis showed that sulfur, calcium, sodium, potassium, and magnesium are the main inorganic constituents in descending order (Table S2). As suggested by this composition, the industrial water used in the TMP process is suspected to be the main source of inorganic matter. Although free ash should pass through the 1 kDa membrane, the retention observed is in the range of what is commonly found in TMP ultrafiltration fractions.<sup>5,6</sup> Apart from sugars, aromatics, and ash, the presence of lipophilic substances was confirmed by pyrolysis gas chromatography (Figure S1). The TMP fraction is also expected to contain some organic acids. These components were not quantified but are accounted for in “others” (Table 1).

Considering the relative abundance of sugars monomers, mannose units represent 62% of the total polysaccharides content followed by glucose and galactose units representing

**Table 1.** Global Composition of the Dry Weight Recovered in the 1 kDa Retentate

		dry wt %	1 kDa retentate	SD		
inorganics	ash		7.7	±0.2		
organics	sugars	fucose	nd	nd		
		rhamnose	0.06	±0.04		
		arabinose	1.00	±0.1		
		galactose	7.52	±0.44		
		glucose	11.77	±0.65		
		xylose	0.37	±0.04		
		mannose	36.33	±1.17		
		galacturonic acid	1.70	±0.52		
		glucuronic acid	0.28	±0.10		
		sum	59.0	±2.6		
		aromatics	acid insoluble lignin		15.7	±0.6
				acid soluble lignin	7.5	±0.2
				sum	23.2	±0.8
		others		10.1	±3.6	

respectively, 20 and 13%. Only really small amounts of arabinose and xylose were detected. This distribution indicates that almost exclusively galactoglucomannans (GGMs) are recovered in the 1 kDa retentate with a Man/Glc/Gal ratio of 3.1:1:0.6. Such a composition was expected because GGM is the main hemicellulose encountered in softwood and the most sensitive to hydrolysis. Harder TMP conditions, e.g., higher temperature, are required for the extraction of arabinoglucuronoxylans, the second main hemicelluloses in softwood.<sup>29</sup> Their absence is an indication of the mildness of the process. Those results are in line with other previous works on TMP process water using Norway spruce as feedstock.<sup>5,6,9,12</sup>

The composition detailed in Table 1 gives valuable but still incomplete information on the organic matter isolated by ultrafiltration. While considering the presence of LCCs as a third class of macromolecules, in addition to lignin and hemicelluloses, deeper characterization of this fraction is needed to define the repartition of sugars and aromatics between lignin, GGM, and LCCs.

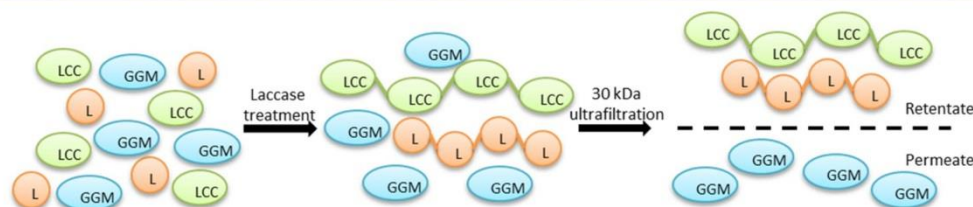
**Lignin, GGM, and LCCs Repartition.** The amount of GGM in the 1 kDa retentate was estimated using the data generated by Oinonen et al. because both the origin and global composition of their retentate are really close to the one in this work (Table S3).<sup>5</sup> In their experiments, a laccase treatment was used to polymerize the relatively low-molecular-weight (LMW) LCCs (~15 kDa) into higher-molecular-weight (HMW) polymers (~60 kDa), and these latter were then recovered by ultrafiltration on a 30 kDa membrane. A schematic representation of their process is given in Figure

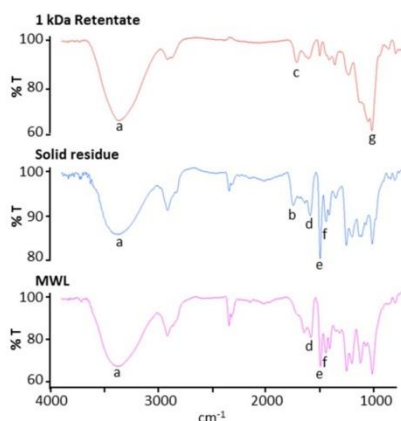
3. As a result, the GGMs, which were not affected by the laccase treatment, were physically separated from the LCCs, allowing their quantification in the permeate fraction. According to their mass repartition and sugar analyses, 60% of the total sugars quantified in their 1 kDa retentate were part of GGM and thus recovered in the permeate, while the other 40% were involved in LCCs and quantified in the retentate. By transposing their quantification, it is possible to estimate that the GGM content in the present work accounts for 35% of the dry matter in the retentate.

Because laccase treatment allows the polymerization of LCCs through their phenolic moieties, not only LCCs but also the lignin was condensed as HMW polymers in the work of Oinonen et al. (Figure 3). In fact, it is accurate to say that all hemicelluloses involved in HMW polymers are covalently linked to lignin but not that all HMW lignins are covalently linked to hemicelluloses. Therefore, estimation of lignin content is not possible using this method.

To quantify the lignin in our fraction, an aqueous extraction of the freeze-dried 1 kDa retentate was conducted for 4 h at 80 °C. Those conditions were selected as they allow the solubilization of GGM while lignin is known to be insoluble in water.<sup>30</sup> It was also previously demonstrated in the literature that LCCs can be recovered from wood hot water extract.<sup>15</sup> Thus, assuming that LCCs solubility would be driven by their carbohydrate moiety, the GGM and LCCs were expected to be dissolved in the supernatant while lignin was expected to be left alone in the solid residue, allowing its quantification.

The FTIR spectrum of the solid residue after hot water extraction is presented in Figure 4 and compared to the 1 kDa retentate and MWL as references. The signals were assigned based on the literature.<sup>21,31,32</sup> The absence of sugars in the solid residue is clearly demonstrated with the marked reduction of the broad OH bands at 3390 and 1027 cm<sup>-1</sup> as well as the disappearance of the specific hemicelluloses signal at 1728 cm<sup>-1</sup>. The spectrum of the solid residue perfectly matches the one of MWL. The specific signals of aromatic skeletal vibration are well-defined at 1600, 1510, and 1454 cm<sup>-1</sup>. Only one significant difference was pointed out with the presence of an additional peak in the solid residue spectrum at 1758 cm<sup>-1</sup>. This peak was assigned to the carbonyl groups of phenyl esters.<sup>33,34</sup> As this signal was not present in the initial retentate, the explanation proposed is that esterification reactions occurred during the extraction between lignin phenolic end groups and acetyl groups coming from partial deacetylation of GGM. Taken together, these observations confirmed that only lignin was left in the residue after hot water extraction and that LCCs were solubilized in the supernatant. Quantification of the lignin content by this method is then accurate.

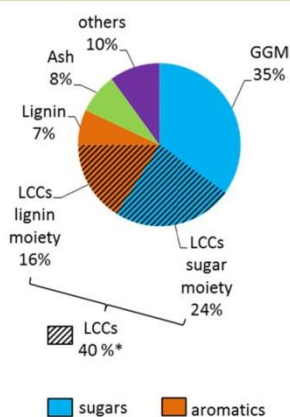
**Figure 3.** Schematic representation of the isolation process of GGM from the 1 kDa retentate detailed in ref 5; L, lignin; GGM, galactoglucomannan; LCC, lignin-carbohydrate complex.



**Figure 4.** FTIR spectra of the 1 kDa retentate (up), the solid residue after hot water extraction (middle), and the MWL (down). Signal assignment: a, hydroxyl groups ( $3390\text{ cm}^{-1}$ ); b, carbonyl groups of phenyl esters ( $1758\text{ cm}^{-1}$ ); c, carbonyl groups of hemicellulose acetyl moieties ( $1728\text{ cm}^{-1}$ ); d, e, f, aromatic skeletal vibration ( $1600$ ,  $1510$ , and  $1454\text{ cm}^{-1}$ ); g, primary alcohols ( $1027\text{ cm}^{-1}$ ).

After hot water extraction, 31% of the total aromatic content was recovered in the solid residue and assigned to lignin while 69% was solubilized in the supernatant and attributed to LCCs. Thus, regarding the composition of the 1 kDa retentate, lignin accounts for 7% of the total dry matter among the 23% of aromatics. Another interesting conclusion of this experiment is also that LCCs are likely to present the same properties as GGM in terms of solubility. This information is of primary importance while considering further industrial development and formulation of LCCs.

The LCC content was calculated as the sum of the remaining sugars and aromatics in the fraction. Summarizing those results, the repartition of the organic matter between GGM, lignin, and LCCs is represented in Figure 5. Forty percent of the dry matter recovered in the 1 kDa retentate corresponds to LCCs. Presented this way, the potential of TMP process water as an industrial sourcing of LCCs is

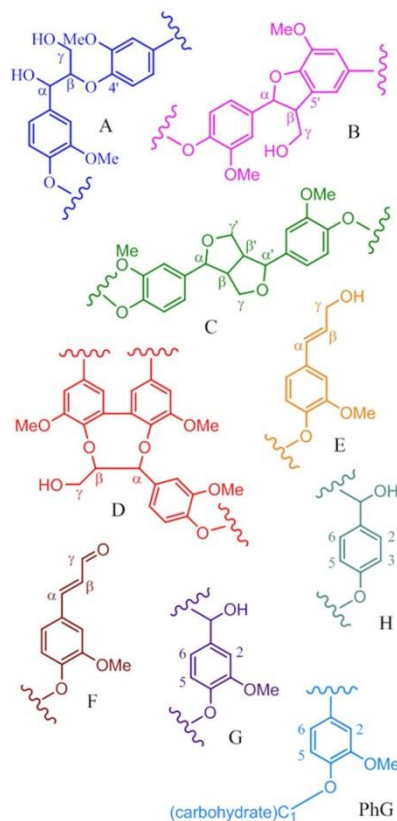


**Figure 5.** Dry matter composition of the 1 kDa retentate with the contribution of GGM, lignin, and LCCs. \*Partly estimated on the basis of published data.<sup>5</sup>

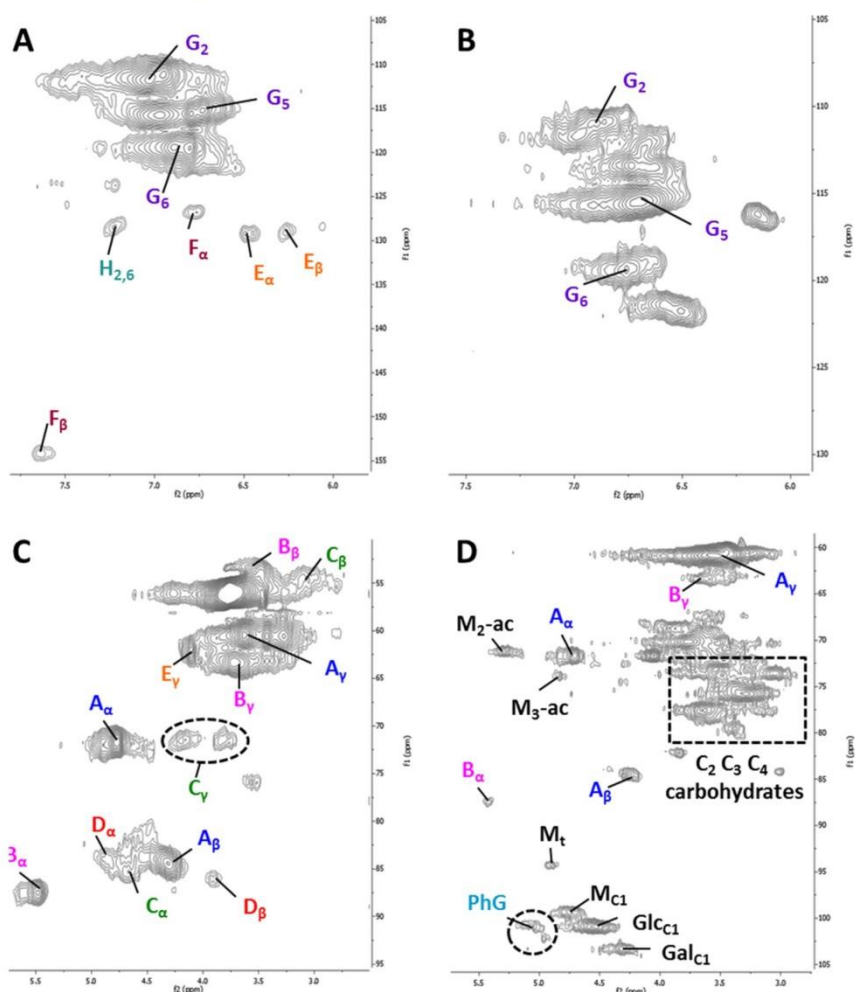
highlighted, opening new economical markets for those biorefineries.

Better knowledge of their structure would lead to better understanding of the mechanisms involved in their reactivity and suitable valorization pathways. In that sense, the second part of this work focuses on LCC structural characterization. The polysaccharidic part involved in LCCs is quite well-defined as several research studies were conducted on the hemicelluloses recovered from TMP process water.<sup>9,30,35,36</sup> However, the same statement does not apply to their aromatic part. In an attempt to bring new data, accurate and advanced methods such as 2D-NMR were employed to get new insights on the lignin part involved in LCCs and the lignin-carbohydrate linkages.

**LCCs Structural Characterization by NMR.** The 2D-HSQC NMR was employed to identify the LCLs and lignin interunit linkages (LILs) in LCCs. The structures depicted through this method are presented in Figure 6. Assignments of the cross-peak signals were made according to reputable publications (Table S4).<sup>15,16,37,38</sup> Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR was combined to 2D-HSQC study for the quantification of the different lignin and LCC linkages, giving further information



**Figure 6.** Main lignin and LCC structures identified and quantified by NMR spectroscopy: (A)  $\beta$ -O-4' aryl ether, (B)  $\beta$ -5' phenylcoumaran, (C)  $\beta$ - $\beta'$  resinol, and (D) dibenzodioxocin (DBDO) lignin interunit linkages; (E) cinnamyl alcohol and (F) cinnamaldehyde-type lignin structures; (G) guaiacyl and (H) *p*-hydroxyphenyl lignin units; phenyl glycoside (PhG) LCC linkage.



**Figure 7.** 2D-HSQC aromatic (A and B) and aliphatic (C and D) regions from the spectra of MWL (left) and 1 kDa retentate (right). Sugars from hemicelluloses are depicted in the anomeric region of the 1 kDa retentate; M = mannose, Glc = glucose, and Gal = galactose; t subscript indicates the terminal reducing end; ac subscript stands for acetylated carbon.

on the lignin condensation state. Currently, milled wood extraction is considered as the mildest wood extraction protocol at a lab scale. Therefore, Björkman MWL and LCCs are considered as the most native structures isolated from wood and used as references reflecting the wood composition in situ. Thus, MWL was extracted from the wood feedstock used in the TMP plant and serves as the internal standard in this work.

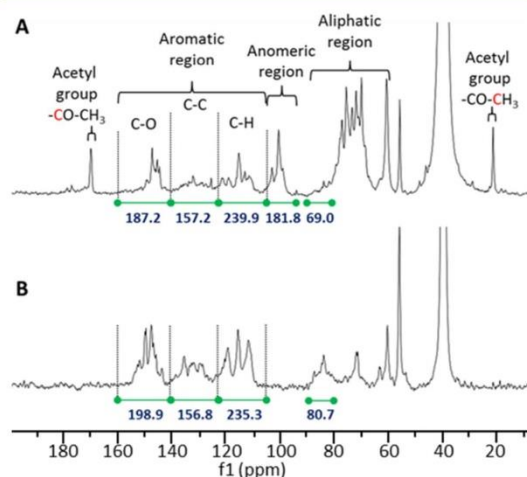
The 2D-HSQC NMR spectra of MWL and 1 kDa retentate are displayed in Figure 7. As expected for softwood lignin, only G and H unit signals are detected in the aromatic region ( $\delta_C/\delta_H$  105–155/6–8) of the MWL spectrum (Figure 7A). Specific signals from oxidized end-structures of lignin are also present, probably resulting from the fragmentation of aryl ether linkages during the milling.<sup>15</sup> The majority of the signals in the aliphatic region ( $\delta_C/\delta_H$  50–105/2.5–6.5) are attributed to LILs (Figure 7C). Aryl ether, phenylcoumaran, resinol, and dibenzodioxocin linkage signals are discernible on the

spectrum. No carbohydrate or LCL signals are depicted, indicating the high purity of this standard (Figure 7C).

In comparison, the TMP process allowed only the extraction of a very specific fraction of softwood lignin exclusively composed of G units (Figure 7B) mainly linked through labile  $\beta$ -O-4 aryl ether bonds (Figure 7D). Weak signals resulting from the  $C_\alpha$ - $H_\alpha$  and  $C_\beta$ - $H_\beta$  of phenylcoumaran linkages are also detected, but resinol and dibenzodioxocin signals are totally absent in the spectrum. In agreement with the compositional analysis of the 1 kDa retentate, the anomeric carbon signals from hemicelluloses detected in the aliphatic region are attributed to mannose, glucose, and galactose units. The two cross-peak signals at  $\delta_C/\delta_H$  71.2/5.26 and 73.9/4.83 ppm indicate that the hydroxyl groups on carbon 2 and 3 of mannose units are partially acetylated. The presence of acetyl groups has been reported in the literature on native GGM and is also evidence of the mildness of the TMP process. Among the three main LCLs currently observed in softwood (benzyl

ether, gamma ester, and phenyl glycoside), only phenyl glycosidic bond signals are detected. Working on the fractionation of softwood extract, Giummarella et al. reported that benzyl ether linkages were mainly involved in xylan-rich LCCs while phenyl glycosidic bonds were associated to GGM–lignin complexes.<sup>15</sup> As our fraction is purely composed of GGM and only phenyl glycosidic bonds are detected by 2D-HSQC NMR, our results are in line with their observation, supporting this preferential distribution in softwood.

Quantitative <sup>13</sup>C NMR spectra of the 1 kDa retentate and the MWL are shown in Figure 8. The main differences



**Figure 8.** <sup>13</sup>C NMR spectra of the freeze-dried 1 kDa retentate (A) and the MWL (B) with integration values (in blue) of different types of signal regions (in green); C–O, oxygenated carbons; C–C, condensed carbons; and C–H, protonated carbons.

between the two spectra arise from the presence of hemicelluloses in the retentate. The signals at 21 and 170 ppm are attributed to the acetyl groups attached to the C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> of GGM, while the important difference in the aliphatic region is due to the GGM carbons themselves. Additional peaks are also detected between 94 and 105 ppm corresponding to the anomeric carbons of GGM. For quantification of the lignin and LCC linkages, the aromatic regions (105–160 ppm) were integrated and normalized to 600, resulting in the integral values of the other regions in the spectra being expressed per 100 aromatic rings. Those integrals

were used as the internal standard to convert the relative signals elucidated by 2D-HSQC into <sup>13</sup>C-based number per aromatic rings (no./100ar), as previously reported in the literature.<sup>17,25,38</sup> The anomeric region (94–105 ppm) was used as internal standard for phenyl glycoside quantification, while a cluster at 80–90 ppm was used for LILs. Calculations were done using the following eqs 1 and 2:

$$\frac{\text{PhG}}{100\text{ar}} = 600 \times \frac{2D_{\text{PhG}}}{2D_{(105-94;5.5-4)}} \times \frac{13C_{(105-94)}}{13C_{(160-105)}} \quad (1)$$

$$\frac{\text{LIL}}{100\text{ar}} = 600 \times \frac{2D_{\text{LIL}}}{2D_{(90-80;6-2.5)}} \times \frac{13C_{(90-80)}}{13C_{(160-105)}} \quad (2)$$

For LILs, the integral values of the signals associated to C<sub>α</sub>–H<sub>α</sub> in 2D-HSQC NMR were used in the equation to avoid possible interferences or overlapping.<sup>25,37</sup> The quantification results are summarized in Table 2 and compared to published data.

The quantitative analysis of the interunit linkages in MWL is in agreement with those reported for spruce MWL in the literature.<sup>15,17,38</sup> The total amount of LCLs per 100 aromatic rings quantified in the retentate is significantly higher than other reported data on LCCs isolated from different feedstocks (25 LCLs/100ar against 10–15 LCLs/100ar, respectively).<sup>16,25</sup> As only mannan-rich LCCs were isolated in the fraction, this result seems to highlight a specific high-branching frequency between lignin and GGM. Recently, the fourth main industrial sourcing of lignin from biorefineries side streams were deeply characterized by Constant et al. and reported as highly condensed lignins with low β-O-4 linkages content.<sup>37</sup> In comparison, the aryl ether content of the lignin recovered in the 1 kDa retentate is significantly higher and equivalent to the MWL content.

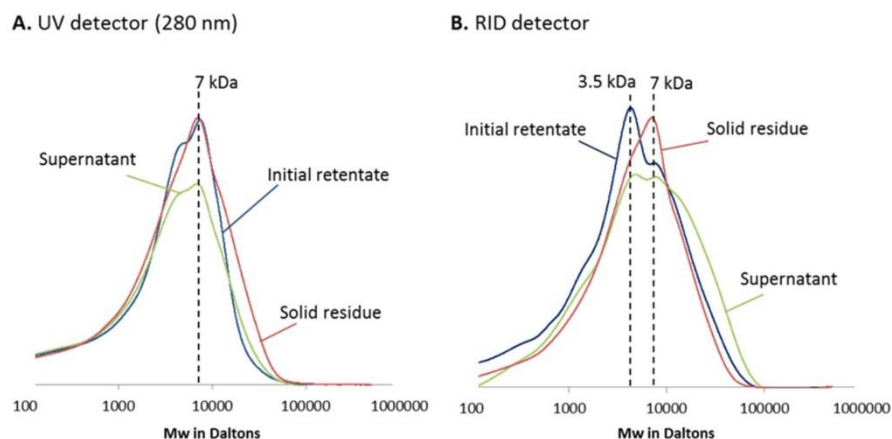
The mildness of the TMP process was already underlined by the presence of acetyl groups on the hemicelluloses as in native structures, and this result reinforces the statement by pointing out that the TMP process allows the solubilization of wood constituents while preserving their labile structures at least as well as milled wood extraction. In this sense, the wood constituents dissolved in the process water can be considered as native structures, and their characterization provides valuable knowledge to build up on the comprehension of the complex wood fibers organization in situ. Even if the TMP process has always been considered and referred to as a mild process in the literature, it is the first time that quantitative evidence is generated with a direct comparison to milled wood extraction. The valorization of the TMP side stream provides

**Table 2.** Quantification of the Lignin Interunit and Lignin–Carbohydrate Linkages (no./100ar)<sup>at</sup>

	1 kDa retentate		MWL (spruce)			LCCs			technical lignins <sup>37</sup>		
	this work	this work	literature <sup>15,17,38</sup>	soft wood <sup>16</sup>	nonwood <sup>25</sup>	hardwood <sup>25</sup>	indulin kraft	soda P1000	Alcell	organo-solv spruce	
β-O-4' (A)	36.6	37.9	36–48	22.4	13.4	33.6	6.1	3.4	5.3	0	
β-5' (B)	4.1	13.7	9–14.6	5.1	0.7	1.5	0.3	0	0.8	3.3	
β–β' (C)	nd	7.3	3–3.7	1.7	0.3	2.8	1.0	0.7	2.8	0.2	
DBDO (D)	nd	3.2				8.4	nd				
PhG	25.5	nd	0–4.1	6.8	3.8	0.6					
BE	nd	nd		4.3	0.5	2.0					
γE	nd	nd		4.5	5.2	7.6					
total LCLs	25.5			15.6	9.5	10.2					

<sup>a</sup>nd, not detected; PhG, phenyl glycoside; BE, benzyl ether; γE, gamma ester; LCLs, lignin–carbohydrate linkages.





**Figure 9.** SEC chromatograms of the 1 kDa retentate and the supernatant and solid residue from hot water solid–liquid extraction.

an industrial sourcing of wood model compounds that can be useful for fundamental research domains such as phytochemistry.

Information about the lignin condensation degree can also be deduced from the quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR study as previously reported.<sup>27</sup> The aromatic region of the spectra was divided into three clusters according to the literature and 2D-HSQC spectra (Table S5). The condensation degree is calculated as the ratio of the condensed aromatic integral value on the protonated aromatic one (Figure 8). The lignin isolated in the 1 kDa retentate presents the same condensation degree as the internal MWL standard, testifying about its low condensation state (0.66 and 0.67, respectively). In other words, a low level of carbon–carbon branching on the aromatic rings is reported in addition to the high aryl ether content observed.

Taken together, the data generated on the TMP lignin indicate its great potential for aromatic platform molecules production by depolymerization. However, the high sugar and ash contents of the 1 kDa fraction may act as catalyst poisons for a great number of chemical processes. As 69% of this lignin is covalently linked to the hemicelluloses, further purification will be limited by really low recovery yields. On the other hand, the presence of covalent linkages between GGM and lignin greatly improves the lignin water solubility and offers the possibility to design homogeneous catalysis processes in aqueous media, limiting the use of solvent. As the lignin solubility is one of the main impediments limiting its biological depolymerization, LCCs may represent a more suitable candidate for biocatalysis. While considering biological depolymerization, the LCC fraction can also be directly used as fermentation medium thanks to its high carbohydrate content reducing the overall cost of the process.

**Molar Mass Distribution.** Size-exclusion chromatograms of the initial 1 kDa retentate and the supernatant and solid residue from hot water partition are presented in Figure 9. As can be seen at 280 nm, the lignin recovered in the solid residue presents an apparent molecular weight (aMW) of 7 kDa with a narrow weight distribution. LCCs recovered in the supernatant also present a maximum peak at 7 kDa but are characterized by a slightly broader distribution with a shoulder around 4 kDa (Figure 9A). The sum of the supernatant and solid residue chromatograms perfectly fits the one of the initial retentate, indicating that no modification of the macromolecules aMW

was driven by the extraction. The main signal detected by the RID detector in the initial retentate corresponds to an aMW of 3.5 kDa (Figure 9B). This additional peak, which is not detected by the UV detector, is attributed to the GGM. Structural modification of those polysaccharides must occur during the hot water extraction as the 3.5 kDa peak disappears in the supernatant. The sum of the supernatant and solid residue chromatograms differs from the initial retentate. This observation supports our previous hypothesis on partial deacetylation and denaturation of GGM. Hot water extraction is thus a suitable method for lignin quantification, but structural changes of the initial macromolecules, both for lignin and hemicelluloses, should be considered while applying this protocol for separation and purification purposes.

The membrane filtration process allowed the recovery of a specific fraction of macromolecules with a quite narrow range of aMW. This fact underlines the suitability of such a process for the concentration and purification of the biomolecules along filtration. The aMW observed for lignin and GGM are in the lower range of existing values but are consistent with the literature.<sup>5,11,12,39</sup> Their low molecular weights might be a limiting factor while considering biomaterial application. However, the advantage of LCCs is that their polymerization into HMW biopolymers can be enzymatically catalyzed by laccases thanks to their aromatic units, as described previously.<sup>5,21</sup> This green process, in agreement with the bioeconomy philosophy, opens interesting LCC valorization pathways as renewable film-forming macromolecules.

**Concluding Discussion.** This work generated valuable knowledge on all macromolecules that can be recovered from TMP biorefineries side stream for valorization. A summary of the generated data is given in Table 3.

An original approach was taken considering the presence of LCCs as a new type of macromolecule, independent from GGM and lignin. In this sense, this work differs from the actual literature on TMP process water valorization. LCCs application for renewable material production in replacement to petroleum-based products will directly depend on their molecular mass, internal linkages, and functionalization. A deep LCCs characterization is reported in this Article, including their chemical composition, molecular mass, chemical structure such as lignin carbohydrate and lignin interunit bonds, and the condensation state of their lignin moieties.

**Table 3. Summary of the Compositional and Structural Characteristics of the Three Macromolecules Recovered from TMP Process Water**

	GGM	LCCs	lignin
% in TMP process water	35%	40% <sup>a</sup>	7%
water solubility	soluble in hot water	soluble in hot water	none
structural characteristics	Man/Glc/Gal 3.1:1:0.6  partial acetylation of mannose in C <sub>2</sub> and C <sub>3</sub>	GGM and lignin linked through phenyl glycosidic bonds	G units mainly linked through $\beta$ -O-4 linkages  low condensation degree
apparent molecular weight	3.5 kDa	4–7 kDa	7 kDa

<sup>a</sup>Partly estimated on the basis of published data.<sup>5</sup>

Additional information about their functionalization and phenolic content could be interesting to better understand their reactivity and grafting potential. Different approaches have been reported, using either ionic liquid or enzymatic treatment, to allow their analysis by <sup>31</sup>P NMR despite their lack of solubility in classical solvent.<sup>13,39</sup>

Indirect methods were previously reported in the literature to decipher the presence of LCCs in TMP process water, and their characterization was achieved in this work using 2D HSQC and <sup>13</sup>C NMR. A quantitative analysis of the different LCC linkages provides tangible proofs of the mildness of the thermomechanical pulping. In this sense, the TMP process water represents an industrial feedstock of native wood structures. Those compounds can be recovered in substantial amounts compared to lab-scale extractions and by means of clean separation processes, such as membrane filtration, instead of using toxic solvent like dioxane. The native state of the macromolecules recoverable from the TMP process water renders their utilization appealing even if they are really diluted in the side stream at the beginning and if TMP plants only represent a small part of the biorefinery market. Indeed, ongoing research currently utilizes various pretreatment methods to minimize LCCs as they represent a hindrance to efficient delignification. Their recovery from residual feedstock tends to be limited by such pretreatments, making TMP process water a really interesting source of unique macromolecules compared to other biorefineries.

In this work, the membrane filtration process employed allowed the recovery of a fraction enriched in one specific type of LCCs only composed of GGM linked to lignin through phenyl glycosidic bonds. Further purification steps could be considered to separate the GGM, lignin, and LCCs coconcentrated in the fraction, leading to the production of high-quality model compounds. A simple and clean hot water extraction was successfully applied for the isolation of lignin in this work, but small structural modifications were pointed out and need to be taken into account. The use of polymeric adsorbent resins with high specificity toward aromatics is also often reported in the literature.<sup>10,40</sup> However, it is important to consider the environmental impact of such processes in their development by using, as much as possible, clean solvents for desorption and efficient resin-regeneration methods. On the other hand, the global recovered fraction can find direct application such as for the production of aromatic platform molecules by fungal depolymerization or the production of

interesting chemicals derived from the sugars by fermentation.<sup>41</sup>

The analytical data set, generated on this fraction produced at a pilot scale, demonstrates the interest of valorizing TMP process water while considering the optimization of TMP plant fluxes, profitability, and environmental footprint. The results generated are expected to be close while operating at industrial scale thanks to the great scalability of the process. Direct implementation of industrial filtration units on site may be considered, and the installation sizing can be adapted in order to fit the biorefinery fluxes and targeted market needs. A considerable advantage of the membrane process also relies on the fact that not only does the LCC fraction present interesting added values but the other fractions generated by the process are profitable too. In that sense, the process cost will be amortized over all fractions, and applications with lower added values such as biomaterial production can thus be considered.<sup>42</sup>

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### ■ Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acssuschemeng.9b00181.

Supplemental experimental details on the membrane filtration process, elemental analysis and Pyro-GC-MS data of the 1 kDa retentate, and 2D-HSQC and <sup>13</sup>C NMR signal assignments (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### ■ Corresponding Author

\*E-mail: [maud.villain@unistra.fr](mailto:maud.villain@unistra.fr). Tel.: +33(0)368852748.

### ■ ORCID

Virginie Steinmetz: 0000-0001-5561-4921

### ■ Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

The NMR platform team from the Institut Jean Barriol, and in particular Sophie Poinignon, is gratefully acknowledged for its technical support and contribution on the lignin characterization work.

## ■ REFERENCES

- (1) Sundholm, J. *Mechanical Pulping, Gummers Printing*; Paper-making Science and Technology Series; Finnish Paper Engineers' Association and TAPPI: Jyväskylä, Finland, 1999.
- (2) Zasadowski, D.; Strand, A.; Sundberg, A.; Edlund, H.; Norgren, M. Selective Purification of Bleached Spruce TMP Process Water by Induced Air Flotation (IAF). *Holzforschung* **2014**, *68* (2), 157–165.
- (3) Persson, T.; Nordin, A.-K.; Zacchi, G.; Jönsson, A.-S. Economic Evaluation of Isolation of Hemicelluloses from Process Streams from Thermomechanical Pulping of Spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *136*, 741–752.
- (4) Krawczyk, H.; Oinonen, P.; Jönsson, A.-S. Combined Membrane Filtration and Enzymatic Treatment for Recovery of High Molecular Mass Hemicelluloses from Chemithermomechanical Pulp Process Water. *Chem. Eng. J.* **2013**, *225*, 292–299.
- (5) Oinonen, P.; Areskog, D.; Henriksson, G. Enzyme Catalyzed Cross-Linking of Spruce Galactoglucomannan Improves Its Applicability in Barrier Films. *Carbohydr. Polym.* **2013**, *95* (2), 690–696.

- (6) Persson, T.; Krawczyk, H.; Nordin, A.-K.; Jönsson, A.-S. Fractionation of Process Water in Thermomechanical Pulp Mills. *Bioresour. Technol.* **2010**, *101* (11), 3884–3892.
- (7) Persson, T.; Jönsson, A.-S. Isolation of Hemicelluloses by Ultrafiltration of Thermomechanical Pulp Mill Process Water—Influence of Operating Conditions. *Chem. Eng. Res. Des.* **2010**, *88* (12), 1548–1554.
- (8) Puro, L.; Kallioinen, M.; Mänttari, M.; Natarajan, G.; Cameron, D. C.; Nyström, M. Performance of RC and PES Ultrafiltration Membranes in Filtration of Pulp Mill Process Waters. *Desalination* **2010**, *264* (3), 249–255.
- (9) Willför, S.; Sjöholm, R.; Laine, C.; Roslund, M.; Hemming, J.; Holmbom, B. Characterisation of Water-Soluble Galactoglucomannans from Norway Spruce Wood and Thermomechanical Pulp. *Carbohydr. Polym.* **2003**, *52* (2), 175–187.
- (10) Pranovich, A. V.; Reunanen, M.; Sjöholm, R.; Holmbom, B. Dissolved Lignin and Other Aromatic Substances in Thermomechanical Pulp Waters. *J. Wood Chem. Technol.* **2005**, *25* (3), 109–132.
- (11) Krawczyk, H.; Jönsson, A.-S. Separation of Dispersed Substances and Galactoglucomannan in Thermomechanical Pulp Process Water by Microfiltration. *Sep. Purif. Technol.* **2011**, *79* (1), 43–49.
- (12) Thuvander, J.; Jönsson, A.-S. Extraction of Galactoglucomannan from Thermomechanical Pulp Mill Process Water by Microfiltration and Ultrafiltration—Influence of Microfiltration Membrane Pore Size on Ultrafiltration Performance. *Chem. Eng. Res. Des.* **2016**, *105*, 171–176.
- (13) Lawoko, M. Unveiling the Structure and Ultrastructure of Lignin Carbohydrate Complexes in Softwoods. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *62*, 705–713.
- (14) Lawoko, M.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. Characterisation of Lignin-Carbohydrate Complexes (LCCs) of Spruce Wood (*Picea Abies* L.). Isolated with Two Methods. *Holzforchung* **2006**, *60* (2), 156–161.
- (15) Giummarella, N.; Zhang, L.; Henriksson, G.; Lawoko, M. Structural Features of Mildly Fractionated Lignin Carbohydrate Complexes (LCC) from Spruce. *RSC Adv.* **2016**, *6* (48), 42120–42131.
- (16) Balakshin, M.; Capanema, E.; Gracz, H.; Chang, H.; Jameel, H. Quantification of Lignin-Carbohydrate Linkages with High-Resolution NMR Spectroscopy. *Planta* **2011**, *233* (6), 1097–1110.
- (17) Yuan, T.-Q.; Sun, S.-N.; Xu, F.; Sun, R.-C. Characterization of Lignin Structures and Lignin-Carbohydrate Complex (LCC) Linkages by Quantitative <sup>13</sup>C and 2D HSQC NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (19), 10604–10614.
- (18) You, T.-T.; Zhang, L.-M.; Zhou, S.-K.; Xu, F. Structural Elucidation of Lignin-Carbohydrate Complex (LCC) Preparations and Lignin from *Arundo Donax* Linn. *Ind. Crops Prod.* **2015**, *71*, 65–74.
- (19) Lawoko, M.; Henriksson, G.; Gellerstedt, G. Structural Differences between the Lignin-Carbohydrate Complexes Present in Wood and in Chemical Pulps. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (6), 3467–3473.
- (20) Zhao, H.; Li, J.; Wang, P.; Zeng, S.; Xie, Y. Lignin-Carbohydrate Complexes Based Spherical Biocarriers: Preparation, Characterization, and Biocompatibility. <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2017/4915185/> (accessed Nov 13, 2018); DOI: 10.1155/2017/4915185.
- (21) Oinonen, P.; Krawczyk, H.; Ek, M.; Henriksson, G.; Moriana, R. Bioinspired Composites from Cross-Linked Galactoglucomannan and Microfibrillated Cellulose: Thermal, Mechanical and Oxygen Barrier Properties. *Carbohydr. Polym.* **2016**, *136*, 146–153.
- (22) Sakagami, H.; Kushida, T.; Oizumi, T.; Nakashima, H.; Makino, T. Distribution of Lignin-Carbohydrate Complex in Plant Kingdom and Its Functionality as Alternative Medicine. *Pharmacol. Ther.* **2010**, *128* (1), 91–105.
- (23) Zhang, Y.; But, P. P.-H.; Ooi, V. E.-C.; Xu, H.-X.; Delaney, G. D.; Lee, S. H. S.; Lee, S. F. Chemical Properties, Mode of Action, and in Vivo Anti-Herpes Activities of a Lignin-Carbohydrate Complex from *Prunella Vulgaris*. *Antiviral Res.* **2007**, *75* (3), 242–249.
- (24) Sakagami, H.; Sheng, H.; Okudaira, N.; Yasui, T.; Wakabayashi, H.; Jia, J.; Natori, T.; Suguro-Kitajima, M.; Oizumi, H.; Oizumi, T. Prominent Anti-UV Activity and Possible Cosmetic Potential of Lignin-Carbohydrate Complex. *In Vivo* **2016**, *30* (4), 331–339.
- (25) Narron, R. H.; Chang, H.; Jameel, H.; Park, S. Soluble Lignin Recovered from Biorefinery Pretreatment Hydrolyzate Characterized by Lignin-Carbohydrate Complexes. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5* (11), 10763–10771.
- (26) Al-Rudainy, B.; Galbe, M.; Wallberg, O. Influence of Prefiltration on Membrane Performance during Isolation of Lignin-Carbohydrate Complexes from Spent Sulfite Liquor. *Sep. Purif. Technol.* **2017**, *187*, 380–388.
- (27) Brosse, N.; El Hage, R.; Chaouch, M.; Pétrissans, M.; Dumarçay, S.; Gérardin, P. Investigation of the Chemical Modifications of Beech Wood Lignin during Heat Treatment. *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95* (9), 1721–1726.
- (28) Holtman, K. M.; Chang, H.; Jameel, H.; Kadla, J. F. Quantitative <sup>13</sup>C NMR Characterization of Milled Wood Lignins Isolated by Different Milling Techniques. *J. Wood Chem. Technol.* **2006**, *26* (1), 21–34.
- (29) Ross, N. W.; Johnson, K. G.; Braun, C.; MacKenzie, C. R.; Schneider, H. Enzymic Hydrolysis of Water-Soluble Lignin-Carbohydrate Complexes from *Populus Deltoides*: Effects of, Combinations of P-Mannanases, Xylanase, and Acetyl Xylan Esterase. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 90–95.
- (30) Willför, S.; Sundberg, K.; Tenkanen, M.; Holmbom, B. Spruce-Derived Mannans – A Potential Raw Material for Hydrocolloids and Novel Advanced Natural Materials. *Carbohydr. Polym.* **2008**, *72* (2), 197–210.
- (31) Naron, D. R.; Collard, F.-X.; Tyhoda, L.; Görgens, J. F. Characterisation of Lignins from Different Sources by Appropriate Analytical Methods: Introducing Thermogravimetric Analysis-Thermal Desorption-Gas Chromatography–Mass Spectroscopy. *Ind. Crops Prod.* **2017**, *101*, 61–74.
- (32) Pandey, K. K.; Pitman, A. FTIR Studies of the Changes in Wood Chemistry Following Decay by Brown-Rot and White-Rot Fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **2003**, *52* (3), 151–160.
- (33) Dehne, L.; Vila Babarro, C.; Saake, B.; Schwarz, K. U. Influence of Lignin Source and Esterification on Properties of Lignin-Polyethylene Blends. *Ind. Crops Prod.* **2016**, *86*, 320–328.
- (34) Ding, R.; Wu, H.; Thunga, M.; Bowler, N.; Kessler, M. R. Processing and Characterization of Low-Cost Electrospun Carbon Fibers from Organosolv Lignin/Polyacrylonitrile Blends. *Carbon* **2016**, *100*, 126–136.
- (35) Laine, C.; Tamminen, T.; Hortling, B. Carbohydrate Structures in Residual Lignin-Carbohydrate Complexes of Spruce and Pine Pulp. *Holzforchung* **2004**, *58* (6), 611–621.
- (36) Persson, T.; Jönsson, A.-S. Characterization of Hemicelluloses in Process Streams in Thermomechanical and Chemi-Thermomechanical Pulp Mills. *J. Wood Chem. Technol.* **2017**, *37* (3), 184–190.
- (37) Constant, S.; Wienk, H. L. J.; Frissen, A. E.; Peinder, P. de; Boelens, R.; van Es, D. S.; Grisel, R. J. H.; Weckhuysen, B. M.; Huijgen, W. J. J.; Gosselink, R. J. A.; et al. New Insights into the Structure and Composition of Technical Lignins: A Comparative Characterisation Study. *Green Chem.* **2016**, *18* (9), 2651–2665.
- (38) Giummarella, N.; Lawoko, M. Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2017**, *5* (6), 5156–5165.
- (39) Oinonen, P.; Zhang, L.; Lawoko, M.; Henriksson, G. On the Formation of Lignin Polysaccharide Networks in Norway Spruce. *Phytochemistry* **2015**, *111*, 177–184.
- (40) Westerberg, N.; Sunner, H.; Helander, M.; Henriksson, G.; Lawoko, M.; Rasmuson, A. Separation of galactoglucomannans, lignin, and lignin-carbohydrate complexes from hot-water-extracted norway spruce by cross-flow filtration and adsorption chromatography. *BioResources* **2012**, *7* (4), 4501–4516.

- (41) Saratale, G. D.; Jung, M.-Y.; Oh, M.-K. Reutilization of Green Liquor Chemicals for Pretreatment of Whole Rice Waste Biomass and Its Application to 2,3-Butanediol Production. *Bioresour. Technol.* **2016**, *205*, 90–96.
- (42) Ho, H. C.; Goswami, M.; Chen, J.; Keum, J. K.; Naskar, A. K. Amending the Structure of Renewable Carbon from Biorefinery Waste-Streams for Energy Storage Applications. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 8355–8367.

Supporting information

Unveiling TMP process water potential as an industrial  
sourcing of valuable Lignin-Carbohydrate Complexes towards  
zero-waste biorefineries

*Virginie STEINMETZ<sup>[a,b]</sup>, Maud VILLAIN-GAMBIER<sup>\*[a]</sup>, Armand KLEM<sup>[c]</sup>, François  
GAMBIER<sup>[b]</sup>, Stéphane DUMARCAY<sup>[b]</sup>, Dominique TREBOUET<sup>[a]</sup>*

**6 pages, 1 Figure, 5 Tables**

[a] Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM),  
Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR CNRS 7178,  
25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France

[b] Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, EA 4370 USC INRA,  
Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy, France

[c] Norske Skog Golbey, Route Jean-Charles Pellerin, BP 109, 88194 Golbey, France

\* Corresponding author email: [maud.villain@unistra.fr](mailto:maud.villain@unistra.fr), tel: +33(0)368852748

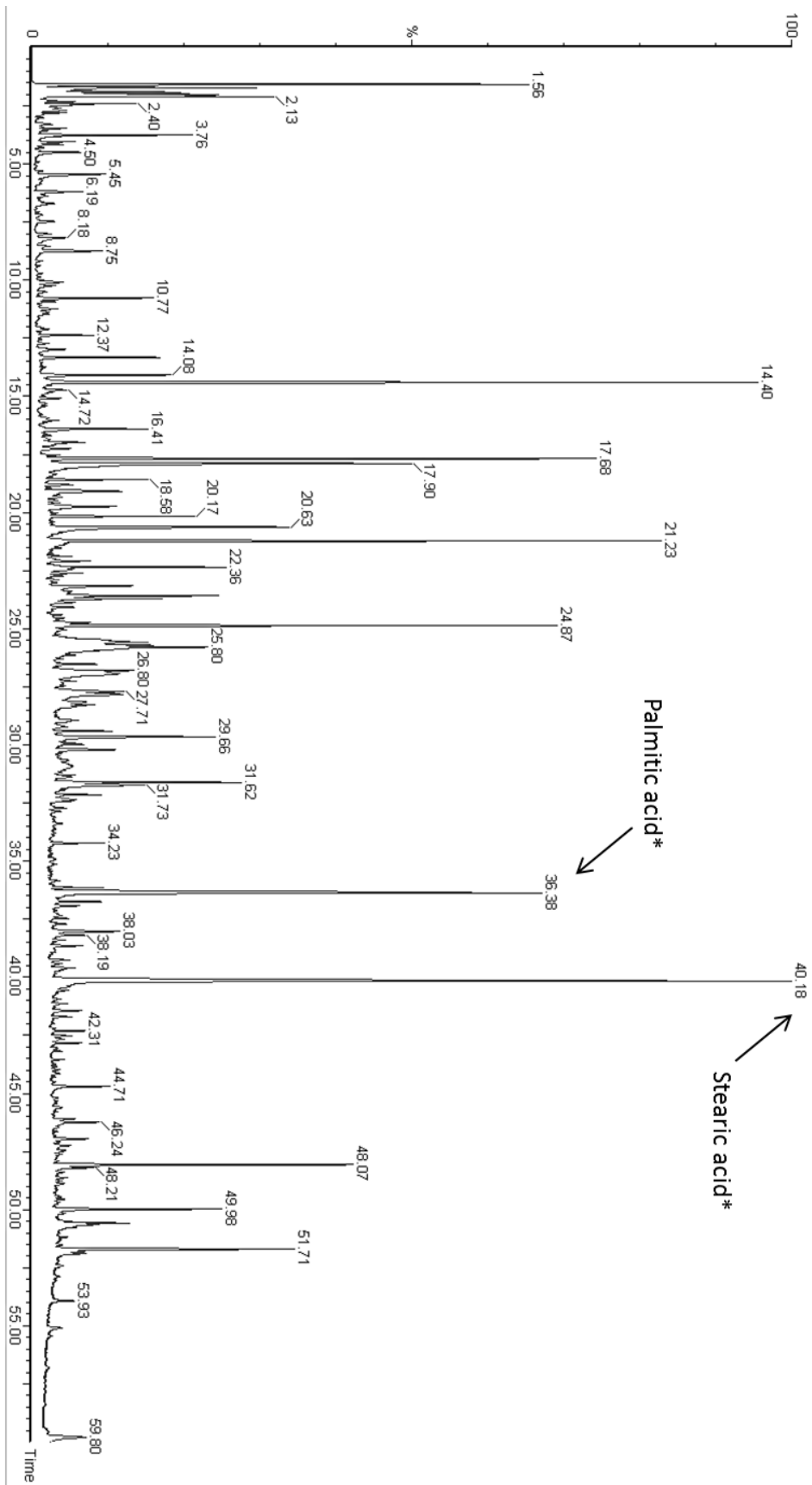
**Table S1** Sum up of the membrane filtration process parameters.

Cut-off	150 kDa	1 kDa	300 Da
Filtration domain	Microfiltration (MF)	Ultrafiltration (UF)	Nanofiltration (NF)
Reference	Orelis environnement Kleansep™ BW		GE Power & Water/DL2540F30
Module type	Tubular		Spiral
Material	Ceramic (TiO <sub>2</sub> -ZrO <sub>2</sub> )		Polyamide
Surface	61 canals / 0.45 m <sup>2</sup>		2.6 m <sup>2</sup>
Filtration pH	Native pH 6.2	pH 4	pH 4
Transmembrane pressure (bar)	2.5	6.4	6.0
Temperature (°C)	60	60	48
Recirculation flow (m.s-1)	5	5	1

**Table S2** Elemental analysis of the 1 kDa retentate.

	Element	1 kDa retentate
<b>Elemental composition in wt%, d.b.<sup>a</sup></b>	C	44.2
	H	5.6
	N	<0.3
	O	42.5
	sum	92.3
<b>Elemental composition from IC in mg/kg, d.b.</b>	F	2221.4 ± 50.3
	Cl	1667.4 ± 5.3
	Br	96.3 ± 3.2
<b>Elemental composition from ICP in mg/kg, d.b.</b>	Al	< 35
	B	4 ± 1
	Ba	87 ± 1
	Ca	20963 ± 749
	Cu	12.1 ± 0.2
	K	4839 ± 79
	Mg	2080 ± 32
	Mn	583 ± 12
	Na	13369 ± 214
	Ni	9 ± 1
	P	749 ± 10
	S	29198 ± 749
	Si	718 ± 19
	Sr	80 ± 1
	Ti	< 2
	V	< 2
	Zn	43 ± 1
	Zr	1.6 ± 0.1
	sum	76719 ± 1928
Sum wt%, d.b.	7.7 ± 0.2	
<b>Sum (wt%, d.b.)</b>	<b>99.9</b>	

<sup>a</sup>d.b.: based on dry weight.



**Figure S1** Pyrolysis gas chromatogram of the 1 kDa retentate. \*Identification of the compounds using the NIST database

**Table S3** Global composition of the 1 kDa retentates from this work and from Oinonen *et al.*.

	This work 1 kDa retentate	Oinonen, 2013 1 kDa retentate
Lignin	23	15
Ash	8	8
Sugars	59	52
<i>Man</i>	62	63
<i>Glc</i>	20	17
<i>Gal</i>	13	14
<i>Ara</i>	2	4
<i>Xyl</i>	1	2
Others	10	25

Lignin was quantified following the NREL protocol in this work while a spectroscopic method was used in Oinonen *et al.* paper explaining the difference in lignin content.

Calculation for GGM estimation were done as follow:

In Oinonen *et al.* paper:

- After polymerisation by laccase and ultrafiltration at 30 kDa, 52 % of the 1 kDa retentate dry weight are recovered in the retentate while 48 % are in the permeate
- The GGM correspond to the polysaccharide content of the permeate
- The permeate contains 64 % of sugars
- The 1 kDa retentate thus contains:  $64 \times 48 / 100 = 31$  % of GGM corresponding to 60 % of the total polysaccharide content ( $31 / 52 \times 100$ )

In this work:

- The 1 kDa retentate contains 59 % of total polysaccharide content
- The GGM content can be estimated at  $60 \times 59 / 100 = 35$  %



**Table S4** 2D-HSQC NMR cross peak signals assignment.

label	$\delta_C/\delta_H$ (ppm)		assignment
	1 kDa retentate	MWL	
B $_{\beta}$	nd	54.1/3.48	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of phenylcoumaran structures
C $_{\beta}$	nd	54.7/3.12	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of resinol structures
OMe	56.0/3.71	56.1/3.77	C-H of methoxyls
A $_{\gamma}$	60.8/3.55	60.5/3.63	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of $\beta$ -O-4 structures C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of p-hydroxycinnamyl alcohol end groups
E $_{\gamma}$		62.2/4.11	
B $_{\gamma}$	63.4/3.62	63.3/3.72	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of phenylcoumaran structures
$\gamma$ -E $_{\gamma}$	nd	nd	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of gamma ester bond
C $_{\gamma}$	nd	71.3-71.5/3.80-4.16	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of resinol structures
A $_{\alpha}$	71.6/4.73	71.7/4.77	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of $\beta$ -O-4 structures
$\gamma$ -E $_{\alpha}$	nd	nd	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of benzyl ester bond C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of benzyl ether (primary alcohol) bond
BE $_{\alpha}$	nd	nd	
A $_{\beta}$ (G/H)	83.9-84.4/4.42-4.23	84.5/4.31	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of $\beta$ -O-4 structures linked to G and H units
D $_{\alpha}$	nd	83.9/4.86	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of dibenzodioxocin
C $_{\alpha}$	nd	85.4/4.70	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of resinols structures
D $_{\beta}$	nd	86.0/3.92	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of dibenzodioxocin
B $_{\alpha}$	87.5/5.44	87.5/5.48	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of phenylcoumaran structures
PhG $_1$		nd	C $_1$ of phenyl glucoside
PhG $_2$	100.9-102.2/5.03-4.96	nd	C $_2$ of phenyl glucoside
PhG $_3$		nd	C $_3$ of phenyl glucoside
G $_2$	111.0/6.89	111.1/6.95	C $_2$ -H $_2$ of guaiacyl units
G $_5$	115.5/6.71	115.2/6.73	C $_5$ -H $_5$ of guaiacyl units
G $_6$	119.4/6.76	119.3/6.80	C $_6$ -H $_6$ of guaiacyl units
F $_{\beta}$	nd	126.8/6.76	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of cinnamaldehyde end groups
H $_{2,6}$	nd	128.5/7.22	C $_{2,6}$ -H $_{2,6}$ of p-hydroxyphenyl units C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of p-hydroxycinnamyl alcohol end groups
E $_{\beta}$	nd	129.9/6.26	
E $_{\alpha}$	nd	129.2/6.45	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of p-hydroxycinnamyl alcohol end groups
F $_{\alpha}$	nd	154.1/7.63	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of cinnamaldehyde end groups
M $_2$ -ac	71.2/5.26	nd	C $_2$ of acetylated mannose
M $_3$ -ac	73.9/4.83	nd	C $_3$ of acetylated mannose
M $_t$	94.2/4.90	nd	C of mannan terminal reducing end
M $_{C1}$	99.5/4.73	nd	C $_1$ of mannan units
Glc $_{C1}$	100.9/4.53	nd	C $_1$ of glucan units
Gal $_{C1}$	103.3/4.32	nd	C $_1$ of galactan units

**Table S5**  $^{13}\text{C}$  NMR signals assignment and integral values.

$\delta$ (ppm)	assignment	Integral values /100 Ar	
		1 kDa retentate	MWL
170	O $\text{C}$ OCH $_3$ aliphatic ester	51.3	/
154-140	oxygenated aromatics (Ar-O)	187.2	198.9
140-123	condensed aromatics (Ar-C)	157.2	156.8
123-105	protonated aromatics (Ar-H)	239.9	235.3
105-98	C-1 anomeric carbon	181.8	/
90-80	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ aliphatic region	69.0	80.7
90-58	Total aliphatic region	1228.6	240.0
56	O-Me	69.9	92.7
21	O $\text{C}$ OCH $_3$ aliphatic ester	49.9	/
	condensation degree (Ar-C / Ar-H)	0.66	0.67

## 4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE 2

Le procédé de filtration membranaire développé au sein du laboratoire a été appliqué avec succès à la filtration semi-continue de plus d'1 m<sup>3</sup> de filtrat clair en provenance de NSG. Cette montée en échelle a permis la production d'un lot référent de LTM servant de substrat pour l'ensemble de cette thèse. Cette étape de production à grande échelle permet de s'affranchir de la variabilité potentielle de l'effluent papetier et de simplifier les futures interprétations en s'assurant que l'ensemble des résultats expérimentaux présentés dans ce manuscrit soient directement comparables. Une bonne connaissance de la composition de ce substrat est donc essentielle à la poursuite des travaux.

Une caractérisation à 90 % de la matière sèche contenue dans le rétentat 1 kDa a été réalisée. Deux polymères pariétaux du bois constituent majoritairement cette fraction : les galactoglucomannanes, hémicelluloses les plus présentes en masse dans le bois de résineux, ainsi que la lignine. La lignine dissoute dans le filtrat clair par le procédé thermomécanique est caractérisée par une faible masse moléculaire. Sa distribution massique, très peu dispersée, présente un profil bimodal dont les deux pics maximum correspondent à des masses apparentes d'environ 4 et 7 kDa. Cette donnée analytique confirme la nécessité d'un seuil de coupure de 1 kDa pour la récupération de la LTM à partir de l'effluent papetier.

La LTM représente 23 % de la matière sèche du rétentat 1 kDa. Une extraction aqueuse à chaud du rétentat, initialement mise au point pour la quantification de la LTM, a permis de mettre en évidence la présence d'interactions fortes entre cette lignine et les galactoglucomannanes. L'analyse en RMN à deux dimensions a confirmé et précisé ce résultat en définissant les interactions lignine-hémicelluloses comme des liaisons covalentes de type phényl-glucoside. Ainsi, sur l'ensemble de la LTM présente dans le rétentat, 69 % se présentent sous la forme de complexes de lignine et d'hydrates de carbone (LCCs) avec une fréquence de branchement de 25,5 liaisons covalentes pour 100 cycles aromatiques. La LTM se caractérise également par une structure très riche en liaisons inter-unités labiles de type  $\beta$ -O-4 représentant environ 37 liaisons intramoléculaires pour 100 cycles aromatiques. Cette teneur particulièrement élevée fait de la LTM la lignine la moins condensée parmi toutes celles disponibles à l'échelle industrielle.

Cette caractérisation de la LTM a fait ressortir sa singularité par rapport aux autres lignines techniques actuellement étudiées ou sur le marché. En effet, elle se distingue par sa structure dite « native » comprenant un grand taux de liaisons inter-unités labiles ainsi que par la préservation de ses liaisons covalentes naturelles avec les hémicelluloses. Cette structure souligne le caractère « doux » et peu dénaturant de l'extraction thermomécanique par rapport aux autres prétraitements de bioraffineries. L'aspect unique de cette lignine en fait une cible de choix dans la stratégie de valorisation des effluents thermomécaniques.

Plusieurs voies de valorisation sont envisageables pour la LTM. Tout d'abord son occurrence très majoritaire sous forme de LCCs lui confère des propriétés physiques et biologiques valorisables directement pour le développement de produits cosmétiques, de détergents ou encore de biomatériaux (Zhang *et al.*, 2019; Uraki *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2019; Oinonen *et al.*, 2016). Cette possibilité de valorisation directe de la LTM est actuellement en cours d'étude auprès de partenaires industriels. Ensuite, les liaisons  $\beta$ -O-4 étant les plus énergétiquement favorables à l'hydrolyse, la LTM présente un fort potentiel pour une valorisation par dépolymérisation. Sa structure native proche de celle du substrat naturel des enzymes lignolytiques en fait un substrat de choix pour la production de composés phénoliques de faibles masses moléculaires par bioconversion enzymatique. Enfin, l'absence de contaminants chimiques liés au procédé papetier permet d'éviter la présence d'éventuels inhibiteurs de ces catalyseurs biologiques. Cette deuxième voie de valorisation a donc été retenue pour la suite des études de cette thèse. La caractérisation fine de la LTM a permis de fonder le choix de ces voies de valorisations sur une étude argumentée.

## 5. REFERENCES

- Constant, S., Wienk, H.L.J., Frissen, A.E., Peinder, P. de, Boelens, R., van Es, D.S., Grisel, R.J.H., Weckhuysen, B.M., Huijgen, W.J.J., Gosselink, R.J.A., *et al.* (2016). New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study. *Green Chem.* *18*, 2651–2665.
- Courbalay, M. (2018). Récupération et valorisation de biomolécules d’effluents de papeterie par procédés membranaires. Université de Strasbourg.
- Giummarella, N., Pu, Y., Ragauskas, A.J., and Lawoko, M. (2019). A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds. *Green Chem.* *21*, 1573–1595.
- Krawczyk, H., and Jönsson, A.-S. (2011). Separation of dispersed substances and galactoglucomannan in thermomechanical pulp process water by microfiltration. *Sep. Purif. Technol.* *79*, 43–49.
- Lupoi, J.S., Singh, S., Parthasarathi, R., Simmons, B.A., and Henry, R.J. (2015). Recent innovations in analytical methods for the qualitative and quantitative assessment of lignin. *Renew. Sustain. Energy Rev.* *49*, 871–906.
- Oinonen, P., Krawczyk, H., Ek, M., Henriksson, G., and Moriana, R. (2016). Bioinspired composites from cross-linked galactoglucomannan and microfibrillated cellulose: Thermal, mechanical and oxygen barrier properties. *Carbohydr. Polym.* *136*, 146–153.
- Persson, T., Nordin, A.-K., Zacchi, G., and Jönsson, A.-S. (2007). Economic evaluation of isolation of hemicelluloses from process streams from thermomechanical pulping of spruce. *Appl. Biochem. Biotechnol.* *136*, 741–752.
- Persson, T., Krawczyk, H., Nordin, A.-K., and Jönsson, A.-S. (2010). Fractionation of process water in thermomechanical pulp mills. *Bioresour. Technol.* *101*, 3884–3892.
- Puro, L., Tanninen, J., and Nyström, M. (2002). Analyses of organic foulants in membranes fouled by pulp and paper mill effluent using solid-liquid extraction. *Desalination* *143*, 1–9.
- Puro, L., Kallioinen, M., Mänttari, M., and Nyström, M. (2011). Evaluation of behavior and fouling potential of wood extractives in ultrafiltration of pulp and paper mill process water. *J. Membr. Sci.* *368*, 150–158.
- Stack, K., Lee, R., Richardson, D., Lewis, T., and Garnier, G. (2014). Complex formation and stability of colloidal wood resin pitch suspensions with hemicellulose polymers. *Colloids Surf. Physicochem. Eng. Asp.* *441*, 101–108.
- Thuvander, J., and Jönsson, A.-S. (2016). Extraction of galactoglucomannan from thermomechanical pulp mill process water by microfiltration and ultrafiltration—Influence of microfiltration membrane pore size on ultrafiltration performance. *Chem. Eng. Res. Des.* *105*, 171–176.
- Uraki, Y., Usukura, Y., Kishimoto, T., and Ubukata, M. (2006). Amphiphilicity of a lignin-carbohydrate complex. *Holzforschung* *60*.

Zhang, Y., Wang, S., Xu, W., Cheng, F., Pranovich, A., Smeds, A., Willför, S., and Xu, C. (2019). Valorization of Lignin–Carbohydrate Complexes from Hydrolysates of Norway Spruce: Efficient Separation, Structural Characterization, and Antioxidant Activity. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7, 1447–1456.

Zhao, H., Wei, X., Xie, Y., and Feng, Q. (2019). Preparation of nanocellulose and lignin-carbohydrate complex composite biological carriers and culture of heart coronary artery endothelial cells. *Int. J. Biol. Macromol.* 137, 1161–1168.



# Chapitre 3





# CHAPITRE 3 / ETUDE DE L'IMPACT STRUCTURAL DE PROCEDES DE TRANSFORMATION SUR LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE

## 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DU CHAPITRE 3

La structure native de la LTM, présentée en chapitre 2, lui permet de se différencier des autres lignines techniques et lui confère des propriétés physiques et biologiques d'intérêt industriel. Sa valorisation directe par incorporation dans des produits finis des secteurs de la détergence, des cosmétiques ou encore de la phytopréservation est ainsi étudiée en parallèle de cette thèse via l'envoi d'échantillons à différents partenaires. Pour permettre de tels échanges tout en assurant la stabilité de la LTM, et afin de faciliter son transport et son stockage, plusieurs procédés de transformation post-production, ou « downstream processes » en anglais, ont été appliqués au rétentat 1 kDa.

Lors de telles transformations, il est indispensable de vérifier que les procédés appliqués ne dénaturent pas la structure des molécules à valoriser. En effet, ces derniers peuvent avoir des impacts structuraux non négligeables notamment lorsqu'ils impliquent une exposition des produits à la chaleur. Les lignines ainsi que les hémicelluloses ont une stabilité thermique relativement faible en milieu aqueux. Dans le cas des lignines plus particulièrement, les principales modifications structurales apportées par une exposition à de fortes températures sont une réduction du nombre de liaisons labiles intramoléculaires ( $\beta$ -O-4), une augmentation du nombre de liaisons condensées (C-C) ainsi qu'une déméthylation et désoxygénation de son squelette aromatique (Kim *et al.*, 2014; Rousset *et al.*, 2009). Ce type de dégradations commence à apparaître lorsque les températures avoisinent les 200-250 °C lors de procédés thermiques à sec tels que la pyrolyse ou la torréfaction de poudres de lignine (Ma *et al.*, 2019). En revanche, lorsque les lignines sont en milieux aqueux (comme dans le rétentat), leur dégradation thermique peut être observée à partir de températures beaucoup plus faibles. En effet, Giummarella *et al.* ont rapporté une diminution de 25 % de la proportion de liaisons  $\beta$ -O-4 au sein d'une lignine de résineux lors d'un traitement hydrothermique de bois à 160°C pendant 2h (Giummarella and Lawoko, 2017).

Ces modifications structurales, qui impactent directement les fonctionnalités, la masse moléculaire et la structure interne des lignines, conduisent également à des modifications de leurs propriétés physiques et biologiques. Bien que ces dernières puissent être bénéfiques pour certaines applications, il est impératif, dans le cadre de la valorisation de la LTM, de préserver sa structure native unique. C'est dans cet objectif qu'ont été sélectionnés et optimisés les différents procédés appliqués au rétentat 1 kDa. Le choix de ces procédés a également pris en compte leurs critères de performance et de coût afin qu'ils soient acceptables dans le cadre du développement d'une bioraffinerie, comme discuté en première partie de ce chapitre. Des échantillons, prélevés en sortie de chaque procédé, ont ensuite permis d'évaluer leur impact sur la structure de la LTM. La deuxième partie de ce chapitre présente l'ensemble des résultats analytiques générés à cet effet.

## **2. STERILISATION, CONCENTRATION ET DESHYDRATATION DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE**

### **2.1. STRATEGIE DE TRANSFORMATION DE LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE**

Le rétentat 1 kDa, de par sa composition riche en polysaccharides, présente une sensibilité accrue à la contamination microbienne sous sa forme liquide. Dans une optique de conservation sur le long terme et de réduction des frais de stockage et de transport, les procédés post-production de déshydratation ou de séchage sont particulièrement recommandés à l'échelle industrielle pour la conservation des produits naturels tels que les denrées alimentaires ou les dérivés de biomasses (Shishir and Chen, 2017). Il a de ce fait été décidé de conditionner la moitié du lot référent de rétentat sous forme de poudre déshydratée pour envois aux partenaires. L'autre moitié du rétentat a été aliquotée et stockée sous forme liquide à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en attendant d'être directement utilisée pour les essais de bioconversion présentés aux chapitres 4 et 5 du manuscrit.

La caractérisation de la LTM, détaillée au chapitre 2, a été réalisée sur un prélèvement de rétentat 1 kDa lyophilisé. La lyophilisation, méthode de déshydratation par sublimation, est considérée comme une technique de séchage neutre en raison de l'absence d'exposition du produit à la chaleur. Toutefois, bien que la lyophilisation permette d'étudier la structure native de la lignine TMP, cette méthode de séchage n'est pas envisageable sur le plan industriel du fait de sa consommation énergétique trop élevée. En effet, son mode de fonctionnement en batch sur des temps de séchage particulièrement longs rend cette technique trop onéreuse.

L'atomisation est une méthode de séchage beaucoup plus courante dans le tissu industriel. Comparativement à la lyophilisation, il s'agit d'une technique rapide, continue et de ce fait moins énergivore, qui présente également pour avantages de n'exposer les produits à la chaleur que sur une très courte durée et de pouvoir contrôler les caractéristiques physiques des particules sèches générées (Maltesen and van de Weert, 2008). Pour réduire le coût toutefois encore élevé de cette méthode de séchage, il est possible de la combiner à une première étape de concentration par évaporation simple effet (Bonazzi and Bimbenet, 2003). Cette technique de déshydratation est économique, grâce à sa faible consommation énergétique, et bénéfique pour l'environnement, grâce à son circuit de récupération de l'eau évaporée. L'évaporation peut, de plus, être conduite sous pression réduite permettant ainsi d'abaisser la température d'ébullition de l'eau et donc la température globale du procédé. La combinaison de ces deux procédés a donc été utilisée pour le séchage de la moitié du lot référent de LTM.

Une des aliquotes de rétentat liquide congelé a également été utilisée afin d'étudier l'impact de la stérilisation par autoclave sur la structure de la LTM en prévision des essais de bioconversion. Cette étape de stérilisation peut être facilement évitée lors de futures productions industrielles en s'assurant de travailler en conditions aseptiques au moment de la récupération et du conditionnement du rétentat. Toutefois, ces conditions n'ayant pas été appliquées lors de la montée en échelle présentée au chapitre 2, il est important de s'assurer de la stérilité du substrat de bioconversion dans le cadre de cette thèse.

La Figure 32 résume l'ensemble des procédés post-production appliqués au rétentat 1 kDa. Des prélèvements ont été effectués après chaque transformation, comme indiqués par les numéros rouges allant de 1 à 4. Un ensemble de méthodes analytiques a été utilisé pour la caractérisation de ces prélèvements comprenant la plupart des méthodes utilisées au chapitre 2, pour la caractérisation de la LTM, avec en plus une étude du profil de fragmentation des échantillons par pyrolyse. Cette technique analytique, rapide et très économique en matière, permet d'obtenir des informations structurales complémentaires sur la composition de la lignine (Wang *et al.*, 2015). L'ensemble des résultats de cette étude ont été publiés sous la forme d'un article intitulé « Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valorization after recovery from industrial process water ».

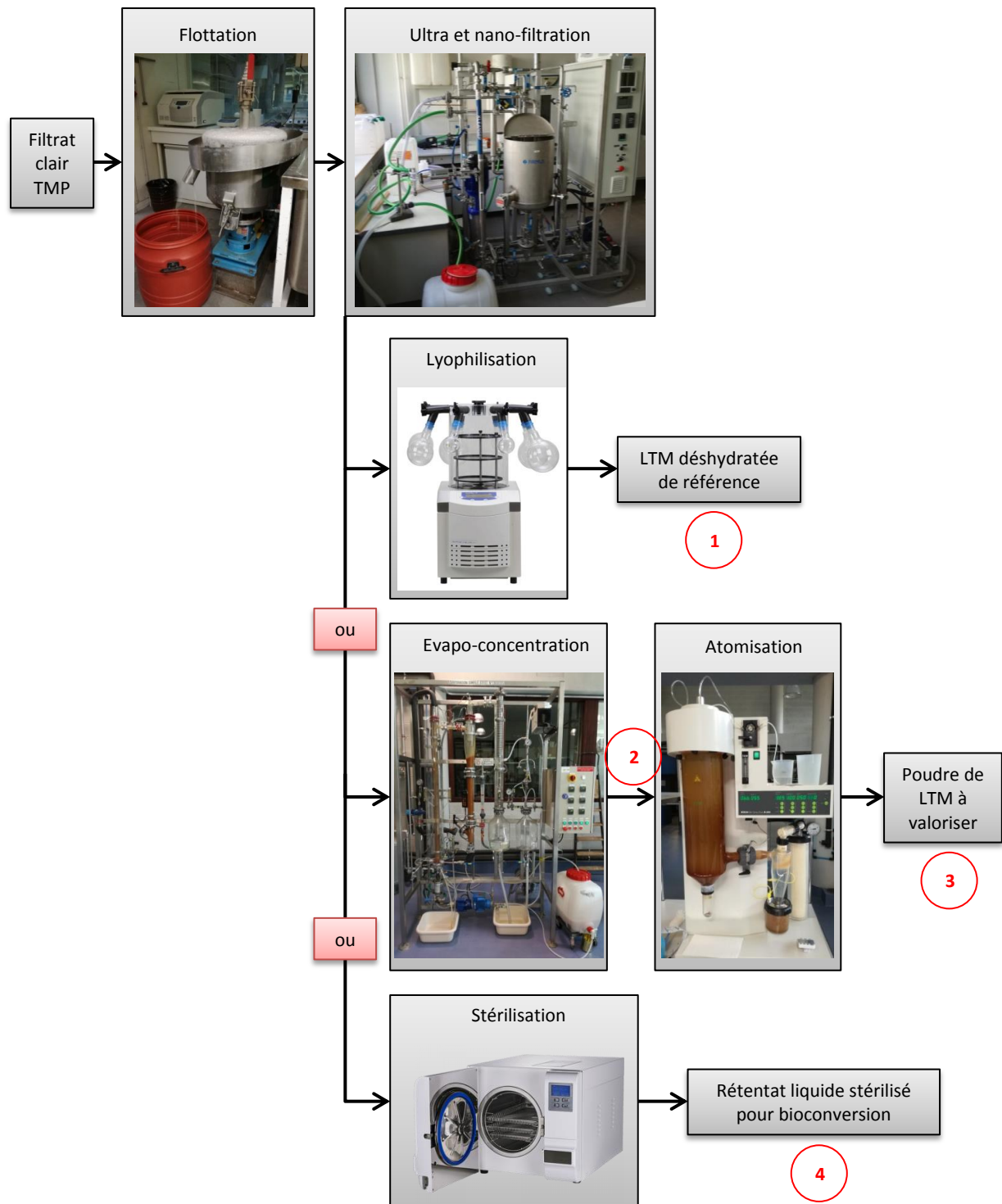


Figure 32 : opérations unitaires de production et de transformation post-production de la LTM. Les numéros rouges correspondent aux points d'échantillonnage : 1- rétentat lyophilisé ; 2- rétentat concentré ; 3- rétentat atomisé et 4- rétentat liquide autoclavé.

## 2.2. RESULTATS



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Biological Macromolecules

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ijbiomac>

## Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valorization after recovery from industrial process water

Virginie Steinmetz<sup>a,b</sup>, Maud Villain-Gambier<sup>a,\*</sup>, Armand Klem<sup>c</sup>, Isabelle Ziegler<sup>b</sup>, Stéphane Dumarçay<sup>b</sup>, Dominique Trebouet<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM), Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR CNRS 7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France

<sup>b</sup> Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, EA 4370 USC INRA 1445, Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy, France

<sup>c</sup> Norske Skog Golbey, Route Jean-Charles Pellerin, BP 109, 88194 Golbey, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 30 October 2019

Received in revised form 29 November 2019

Accepted 30 November 2019

Available online xxxxx

#### Keywords:

Lignin Carbohydrate Complexes

Thermal treatment

Characterization

### ABSTRACT

Firstly studied and pointed out because of their major role in wood recalcitrance to delignification, LCCs are gradually raising interest about their own valorization thanks to their various interesting properties. Considering their future industrial production, this work is focused on evaluating the impact of different downstream processes (DSP) on their structure including moist heat sterilization, simple effect evaporation and spray-drying. LCCs were recovered from the mill water of a thermomechanical plant by successive membrane filtration steps. Samples were taken after the different DSP and compared to a freeze-dried control. Global and structural characterizations given by elemental analysis, acid hydrolysis, pyrolysis coupled to gas-chromatography, SEC, <sup>13</sup>C and 2D-HSQC NMR showed that the LCCs structure is well preserved during all of these DSP. This paper demonstrates the feasibility of producing high quality industrial LCC grade for commercialization in integrated biorefineries.

© 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Lignin Carbohydrate Complexes (LCCs) have been attracting increasing attention these recent years in the field of lignocellulosic biorefineries. LCCs are released during the first pretreatment step targeting the deconstruction of the biomass for its individual components valorization. They originate from the fragmentation of hemicelluloses and lignin which are covalently linked under their native state in wood [1]. LCCs were firstly studied in the pulp industry because of their major role in the recalcitrance of wood biomass to delignification [2,3]. A lot of work was done on their characterization to better understand the structures preventing the total separation of wood fibers and also because they act as inhibitors during the enzymatic hemicellulosic sugar hydrolysis for biofuel production [4–7]. Nowadays,

their composite nature including aromatic and sugar moieties appears to be an opportunity for new bio-based products development and LCCs tend to be considered as high added-value coproducts. In the same way that lignin can be valorized for the development of sustainable materials useful for batteries or pharmaceuticals formulation, LCCs can also find various interesting applications [8–10]. For instance, the production of gas barrier films through enzymatic LCCs polymerization was reported by Oinonen et al. [11] providing a new biomaterial for food packaging with high oxygen barrier property. LCCs amphiphilic structure also confers them surfactant properties and potential applications as biological carriers [12,13]. Their biological properties were as well described in various papers including their antioxidants and anti UV efficacies for cosmetic development and their pharmacological activities for human medicine [14–17].

For industrial purposes, it has been demonstrated that LCCs could be recovered from various residual feedstocks of lignocellulosic biomass. Narron et al. [6] and, more recently, Huang et al. [18] deciphered their presence in the hydrolyzates of hardwood and nonwood biomasses. In both paper, they successfully achieved their recovery by means of a selective adsorption on a polymeric resin reaching 85 to 90% of recovery yield. LCCs were also recovered from the autohydrolyzate and hot

\* Corresponding author at: IPhC-RePSeM, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France.

E-mail addresses: [virginie.steinmetz@etu.unistra.fr](mailto:virginie.steinmetz@etu.unistra.fr) (V. Steinmetz), [maud.villain@unistra.fr](mailto:maud.villain@unistra.fr) (M. Villain-Gambier), [armand.klem@norskeskog.com](mailto:armand.klem@norskeskog.com) (A. Klem), [isabelle.ziegler@univ-lorraine.fr](mailto:isabelle.ziegler@univ-lorraine.fr) (I. Ziegler), [stephane.dumarçay@univ-lorraine.fr](mailto:stephane.dumarçay@univ-lorraine.fr) (S. Dumarçay), [dominique.trebouet@unistra.fr](mailto:dominique.trebouet@unistra.fr) (D. Trebouet).

water extract of Norway spruce, a softwood specie, combining membrane filtration and adsorption based processes [15,19]. As depicted by those examples, an increasing interest for LCCs recovery from biorefinery pretreatment liquors can clearly be noted at this time. Additionally, membrane filtration processes have also been successfully applied for the recovery of LCCs from the liquid effluents of the pulp and paper industry. Al Rudainy et al. [20] isolated high molecular weight LCCs from sodium based spent sulfite liquor using a 50 kDa polysulfone membrane and an additional diafiltration step. Ultrafiltration of the process water discarded from thermomechanical treatment (TMP) also demonstrated to lead to an interesting sourcing of LCCs characterized by their well-preserved native structure [21,22].

While LCCs potential for industrial applications is most of the time assessed right after their isolation at lab scale, further downstream processes (DSP) will have to be taken into consideration before their incorporation into final industrial products. Due to their high sugar content, LCCs are particularly sensitive to microbial contamination and need to be well preserved if kept as aqueous solution. For long term storage, stability and cost effective transportation, dehydration or drying processes are recommended at industrial scale for the preservation of natural products such as food or biomass derivatives [23]. Such DSP often suggest heat exposure of the product whereas hemicelluloses and lignin structures present poor thermal stability. Applied to hemicelluloses, heat treatments lead to numerous parallel reactions including deacetylation, dehydration, depolymerization, monomer degradation into furfural derivatives and carbonization [24]. Heat denaturated lignin is characterized by a reduced number of aryl ether linkages, an increased number of condensed (carbon-carbon) interunit bonds and a demethylated and deoxygenated backbone [25–27]. These chemical degradations often start to take place while the temperature reaches 200 to 250 °C in dry processes but also happen at lower temperatures in aqueous media. Giummarella et al. [4] observed structural modifications of LCCs during hydrothermal treatment of softwood for 2 h at 160 °C, including 25% of diminution in the  $\beta$ -O-4 content.

DSP selection and optimization thus appear to be critical in order to preserve the LCCs properties for their valorization. Furthermore, they have to be selected among the various industrial options based on their cost and environmental impact for their integration in biorefineries. Freeze drying can be hardly integrated into biorefineries due to its expensive cost, high energetic consumption and extended process time in batch mode. In comparison, spray drying is a continuous and fast process presenting various advantageous such as a short heat exposure of the products and a good control of the final particles characteristics [28]. In the end, the spray dried products present facilitated handling and formulation. To reduce the cost of the drying process, a previous dehydration step can be conducted by evaporation before spray-drying [29]. This economic process is low energy consuming and allows the recycling of the evaporated water. The evaporation can also be performed under reduced pressure decreasing the water boiling point and thus the severity of heat treatment during the process.

In this work, several analytical methods were used to assess the impact of such processes on LCCs recovered from the process water of a TMP plant. These methods include 2D NMR spectroscopy, size exclusion chromatography and analytic pyrolysis coupled to gas chromatography among the most performant technologies for LCCs characterization [30,31]. The LCCs were subjected to either moist heat sterilization for their short term preservation in liquid state or simple effect evaporation followed by spray-drying for their long term storage under a solid dried state. The understanding and control of those DSP impact on LCCs structure is important for the research and development of future final products. The general purpose of this paper is to provide new insights on LCCs stability for their valorization and commercialization in integrated biorefineries.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials

The TMP process water used for this study came from Norske Skog Golbey industry France. Spruce and fir were used as primary raw materials in the pulp mill. The dissolved LCCs were recovered from 3 m<sup>3</sup> of process water using pilot scale flotation and filtration units (Fig. 1A) as previously reported [21]. The LCC rich fraction was recovered after ultrafiltration on the 1 kDa membrane.

### 2.2. Downstream processes (DSP)

The Fig. 1B illustrates the different treatments applied to the LCC rich fraction (1 kDa retentate) and the origin of the different samples characterized in this work. Moist heat sterilization was performed as follow: 750 mL of 1 kDa retentate were placed in a glass resistant bottle with semi closed cap and sterilized for 20 min at 121 °C under pressure. The autoclaved retentate was thus freeze dried for analysis. Evapo-concentration and spray drying were performed as follow: the 1 kDa retentate was continuously concentrated under reduced pressure (500 to 700 mbar) on a simple effect evaporator (EUV/1000) from Pignat. The concentration was stopped when the retentate reached a dry matter content of approx. 5%. Under those conditions the retentate maximum temperature was maintained at around 85–90 °C during all the process. The evapo-concentrated retentate (EC) was then kept at 65 °C for spray drying on a Büchi B-290 mini spray dryer. The inert loop was enabled with pressurized air as atomizing gas with a flow rate of 570 L.h<sup>-1</sup>. A 2-fluid nozzle with 0.7 mm cap was employed for atomization. The aspirator was set to 100% (35 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup>), the inlet temperature to 190 °C and the feed flow to 0.9 L.h<sup>-1</sup>. A sample of EC was taken prior to spray drying and freeze dried for analytical purposes.

### 2.3. Global composition

The global organic composition of the four samples was determined after acid hydrolysis following the protocol described elsewhere [21]. The experiments were performed in triplicates and results are expressed as mean values with standard deviations. The weight percentages of nitrogen, carbon, hydrogen and oxygen of the freeze dried and spray dried samples were determined using an elemental analyser (FLASH 2000 Thermofischer). The analyses were performed in duplicate.

### 2.4. Pyrolysis coupled to gas chromatography/mass spectrometry (Py-GC/MS)

Pyrolysis of the four samples (approx. 0.5 mg per quartz tube) were performed with a CDS 5150 Pyroprobe connected to a Clarus 580 GC system equipped with a DB-5MS capillary column (Agilent J&W, 30 m × 250  $\mu$ m i.d., 0.25  $\mu$ m film thickness) and a Clarus 500 mass detector (EI+ at 70 eV). The pyrolysis was performed at 650 °C during 15 s. After pyrolysis, the products were flushed into the GC with helium as a carrier gas at 1 mL.min<sup>-1</sup>. The temperature profile of the GC for products separation was as follow: the GC column was initially maintained at 50 °C for 5 min, then ramped up to 280 °C at a rate of 5 °C.min<sup>-1</sup>, and finally held at 280 °C for 9 min. The compounds were identified using the NIST 2011 mass spectral library and the literature [15,30,32]. The pyrograms were integrated by regions corresponding to the carbohydrate, lignin and extractive pyrolytic products. Wood sawdust and MWL prepared from the same wood feedstock as NSG were used as standard to define the different regions. The total ion current (TIC) areas of each region were expressed as relative percentages by normalizing the sum of the integrated areas to 100%. The lignin derivative regions were further treated by individually integrating the identified phenolic peaks to determine the lignin thermal fragmentation patterns

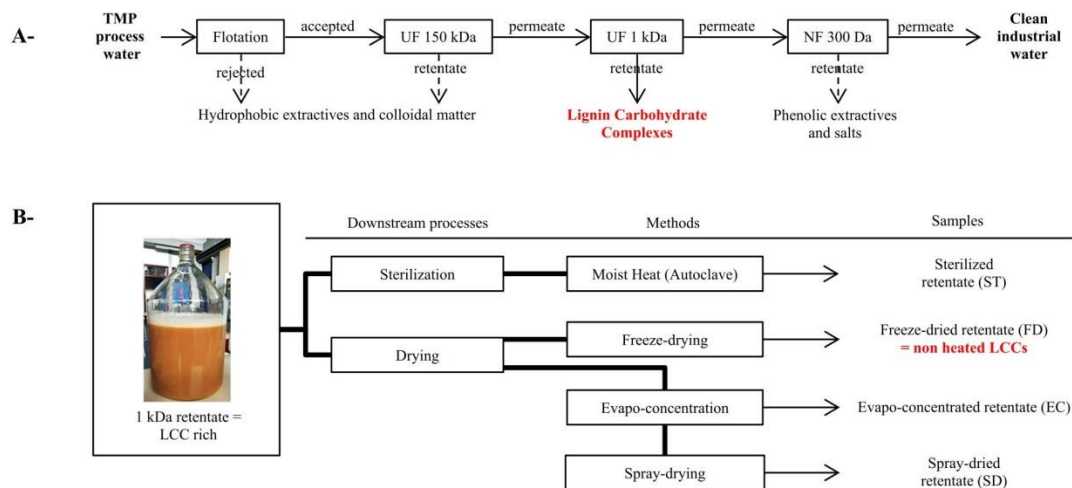


Fig. 1. Schematic illustration of (A) the overall process of TMP water treatment and (B) the LCCs downstream treatments and sampling.

and G/H ratios of each sample. The experiments were performed in triplicates and results are expressed as mean values with standard deviations.

### 2.5. NMR experiments

For all NMR analyses about 100 mg of samples were dissolved in 0.5 mL of DMSO- $d_6$ . Spectra were recorded on a Bruker AVANCE III 300 MHz spectrometer equipped with a BBO probe 5 mm at 25 °C. For quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR, an inverse gated decoupling sequence was used with a relaxation delay of 12 s and 13 K scans were acquired. 2D-HSQC NMR spectra were acquired with the following parameters: 128 transients, 16 dummy scans, relaxation delay of 1.9 s, 1024 data points in F2 ( $^1\text{H}$ ) dimension and 256 data points in F1 ( $^{13}\text{C}$ ). A coupling constant  $1J_{\text{C-H}}$  of 145 Hz was used. The 2D data set was processed with MestreNova using a  $90^\circ$  shifted square sine-bell apodization window. The data matrices were zero filled to 1024 points in both dimensions, baseline and phase corrections were applied in both dimensions. The central solvent (DMSO) peak was used as an internal chemical shift reference point ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  40.4/2.51).

### 2.6. Size exclusion chromatography (SEC)

The molar mass distribution of the lignin was determined using an aqueous SEC method on a Prominent Shimadzu HPLC equipped with a guard column Phenomenex Polysep GFC-P ( $7.8 \times 35$  mm) and two analytical columns Phenomenex Polysep P4000 ( $7.8 \times 300$  mm) and P3000 ( $7.8 \times 300$  mm). The chromatographic conditions and sample preparation used were as previously reported [21]. Measurements were carried out in triplicate.

## 3. Results and discussion

### 3.1. DSP results

In this study, the freeze dried retentate (FD) represents the non-degraded or denatured LCCs sample as this DSP does not require heat exposure. Its complete analytical characterization has already been published [21]. Moist heat sterilization was selected as physical treatment for the short term preservation of the LCCs liquid fraction in order to avoid the use of chemical preservatives. Even if this DSP can be easily avoided at industrial scale by working under aseptic conditions, it was considered interesting to present these results as they

give complementary information about the resistance of LCCs to heat exposure under pressurized atmosphere.

The use of evapo-concentration followed by spray drying was selected for the long term storage of the LCCs fraction and allowed the production of a fine powder. The 1 kDa retentate was concentrated from 2.5 to 5% of dry weight by evapo-concentration. The maximum EC concentration was set at 5% as aggregation phenomena were observed while reaching higher concentrations. The viscosity of the EC was reduced from  $20 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  (at 20 °C) to  $8 \text{ mPa}\cdot\text{s}^{-1}$  by maintaining its temperature at 65 °C prior to atomization. This condition was mandatory to ensure a good feeding rate and avoid nozzle clogging.

The maximum temperature reached during these different DSP was 190 °C in the pulverization chamber of the spray-dryer. The working temperature of simple effect evaporation and moist heat sterilization were maintained between 85 and 121 °C.

Table 1

LCCs rich fraction composition after different downstream processes: FD freeze dried; EC evapo-concentrated; SD spray dried; ST sterilized; AIR acid insoluble residue including ashes; ASL acid soluble lignin. Values are given as mean of triplicates and standard deviations indicated in brackets.

	FD	EC	SD	ST
<b>Sugars</b>				
Fuc	nd	nd	nd	nd
Rha	0.06 (0.04)	0.06 (0.05)	0.06 (0.00)	0.05 (0.02)
Ara	1.07 (0.07)	0.98 (0.14)	1.16 (0.07)	0.99 (0.07)
Gal	7.20 (0.50)	7.74 (0.87)	7.43 (0.18)	7.38 (0.40)
Glc	11.64 (0.66)	10.93 (0.04)	11.88 (0.13)	11.05 (0.56)
Xyl	0.38 (0.04)	0.37 (0.05)	0.46 (0.02)	0.34 (0.06)
Man	34.67 (0.96)	34.38 (1.53)	36.14 (0.24)	34.79 (1.70)
GalA	1.68 (0.51)	2.03 (0.42)	1.35 (0.06)	1.34 (0.10)
GlcA	0.28 (0.10)	0.26 (0.05)	0.21 (0.00)	0.26 (0.04)
Sum	57.0 (2.9)	56.8 (3.1)	58.7 (0.7)	56.2 (3.0)
<b>Aromatics</b>				
AIR	23.1 (0.1)	19.9 (0.3)	18.2 (0.6)	21.3 (0.6)
ASL	7.3 (0.2)	6.4 (0.4)	8.5 (0.2)	6.9 (0.2)
Sum	30.4 (0.3)	26.3 (0.7)	26.7 (0.8)	28.2 (0.8)
<b>Others</b>				
	12.6 (3.2)	16.9 (3.8)	14.6 (1.5)	15.6 (3.8)
<b>Elemental analysis</b>				
Nitrogen	<0,3		<0,3	
Carbon	47,89 (3,52)		47,88 (0,06)	
Hydrogen	6,07 (0,41)		6,18 (0,06)	
Oxygen	46,04		45,94	

Please cite this article as: V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, et al., Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valoriza..., <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>



### 3.2. Global composition

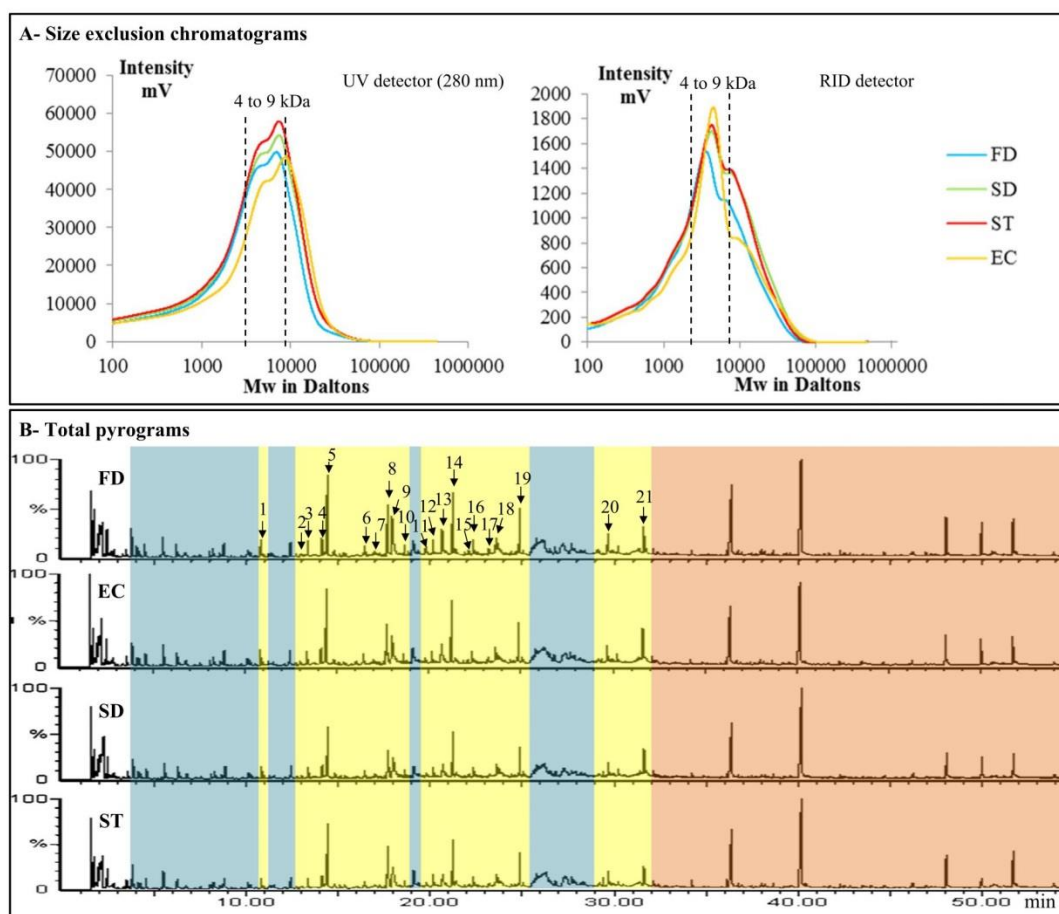
The chemical compositions of the four samples are given in Table 1 and expressed as relative percentages of the dry matter. All samples present almost exactly the same dry weight composition with carbohydrates accounting for approx. 57%, lignin and ashes together for 27% and non-characterized matter, regrouped under "others" name, reaching around 15%. Considering the relative abundance of sugars monomers, mannose units represent 61 to 62% of the total polysaccharides content in the different samples followed by glucose and galactose units representing 19 to 20 and 13 to 14% respectively. These results indicate that there is no change in the global composition of the LCC rich fraction at a molecular level regardless of the DSP applied. The carbohydrate moiety of LCCs is well preserved and composed of galactoglucomannans (GGM) with a Man:Glc:Gal ratio of 3:1:0.6.

The elemental compositions of the freeze dried and spray dried samples are also presented in Table 1. Their comparison shows that the elemental distribution of the LCC rich fraction is also preserved during the concentration and drying processes. It is interesting to note that the data generated for the spray dried sample (both in global and elemental analyses) are highly reproducible compared to the other samples. This fact is probably explained by the fineness and homogeneity of the powder produced by this process. The oxygen content being stable throughout the processes, the functionalization of LCCs in the fraction is

supposedly not affected by the process as well. Indeed, if occurring, thermal degradation reactions such as sugar dehydration or lignin condensation would have led to an oxygen content decrease. This observation supports the previous results in indicating that the DSP used in this work are efficiently preserving the LCCs. To consolidate this information, the evolution of the most thermal sensitive structures in LCCs, i.e. glycosidic bonds and acetyl groups in hemicelluloses, ether linkages in lignin and phenyl glycoside bonds, was monitored by chromatographic and spectroscopic methods.

### 3.3. Size exclusion chromatography

The apparent molecular weight (aMW) of LCCs in the four samples was monitored by SEC as featured in Fig. 2A. Any polymerization or depolymerization reactions occurring during the DSP would be detected by this method and result in an evolution of the molecular weight distribution of the samples. As can be seen at 280 nm and with the RID detector, the chromatograms of the four samples present the same molecular weight distributions. A really slight and progressive shift of the chromatograms to the right is observable but attributed to the employed method (as it was also observed for the internal reference peak of isopropanol). The LCCs of all samples are characterized by an apparent molecular weight ranging from 4 to 9 kDa. This result indicates that no polymerization or depolymerization reactions were driven by the



**Fig. 2.** SEC chromatograms (A) and total pyrograms (B) of the four samples: FD freeze dried; EC evapo-concentrated; SD spray dried and ST sterilized. In Fig. 2B, the integrated regions accounting for carbohydrate derived signals are indicated in bleu, lignin derived signals in yellow and extractives derived signals in orange. Numbers indicate the identified peaks integrated in Table 2. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Please cite this article as: V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, et al., Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valoriza..., <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>

different DSP. Analytical pyrolysis and NMR experiments have been conducted to evaluate other possible internal rearrangements or small structural losses.

### 3.4. Pyrolysis experiments

The total pyrograms of the four samples are shown in Fig. 2B. Carbohydrate pyrolytic products, including numerous furfural derivatives, are mainly encountered at the beginning of the pyrograms from 3 to 13 min. In addition, the 5-hydroxymethylfurfural (HMF) elutes at around 19.1 min for all samples while the typical anhydrosugars formed during pyrolysis of polysaccharides appear as broad and overlapping peaks in the range of 25 to 30 min. Phenolic pyrolytic products are mainly concentrated in the region from 10 to 32 min, sometimes interspersed by carbohydrate signals. The presence of extractives in all samples is pointed out at the end of the pyrograms with signals identified as saturated fatty acids, terpenes and lignans. The identification of these constituents completes the previous global analysis giving a deeper understanding of the "other" category composition. It is worth noting that these extractives remain in the different fractions despite the flotation and membrane filtration processes and regardless of the DSP applied. The persistence of fatty acids in technical lignins, even after organosolv and alkaline pretreatments, has also been observed by Constant et al. [33].

Among the carbohydrate signals of all samples, characteristic products from the pyrolysis of hexose containing hemicelluloses have been identified such as furfural, furfuryl alcohol, 2-(5H)-furanone and 5-methylfurfural as well as an important signal corresponding to HMF. The production of HMF along pyrolysis of hemicelluloses has indeed been reported by Werner et al. [34] with the highest amounts associated to galacto and glucomannans pyrolysis. These observations are consistent with the monomeric sugar quantifications in Table 1.

The relative abundances of carbohydrate, lignin and extractive pyrolytic products are reported in Table 2. The relative distributions of the four samples are identical with around 36% of the signal associated to carbohydrates, 44% to lignin and 20% to extractives. This distribution is different from the one obtained by acid hydrolysis of the samples in part 3.2. The high pyrolytic temperature, which is higher to the carbonization temperature of hemicelluloses, explains that carbohydrates are underestimated in pyrolytic analyses compared to other widespread chemical methods [24]. However, there is still a good correlation between the pyrolysis and chemical results as both methods show a stable composition of the fraction throughout all the different DSP. The development of a standardized py-GC/MS protocol for the global analysis of lignocellulosic biomass could be an interesting fast, easy handling and economic alternative to current chemical methods.

Meanwhile, py-GC/MS is already a useful tool for lignin structure analysis [30,33,35,36]. As can be seen in Table 2, there is no noticeable change in the G/H ratio of the four samples regardless of the DSP. Around 20 phenolic components identified in the lignin region were also integrated as individual peaks and expressed as relative area percentages of the total aromatic region. The lignin thermal fragmentation pattern observed is identical for the four samples compared. For all samples, the major aromatic components identified are catechol > guaiacol > p-vinylguaiacol > p-methylguaiacol  $\approx$  p-methylcatechol  $\approx$  coniferaldehyde. As no ferulic acids enter in the composition of the LCC rich fraction (no such signals detected in 2D NMR spectra), the high amount of p-vinylguaiacol in this work solely arises from lignin degradation. The high amount of C type components (catechol derivatives) can be explained by the high pyrolysis temperature of 650 °C responsible of guaiacol demethylation, particularly occurring at temperature ranging from 600 to 700 °C [30]. In this sense, the major aromatic components constituting the lignin present in the four samples are: guaiacol representing around 31% of the total phenolic signal (as the sum of guaiacol and catechol relative abundances), p-methylguaiacol accounting for ca. 17% (p-methylguaiacol and p-

methylcatechol) and p-vinylguaiacol yielding around 10%. This composition tends to indicate a high aryl ether content in the samples as guaiacol has been reported as a pyrolytic product directly arising from  $\beta$ -O-4 cleavage [30].

### 3.5. NMR experiments

The 2D HSQC NMR was employed to identify and compare the lignin carbohydrate and lignin interunit linkages (LCLs and LILs respectively) composing the LCCs of the four samples. The structures depicted through this method are presented in Fig. 3. Assignments of the cross peak signals were made according to reputable publications [33,37–39]. Quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR was combined to 2D HSQC study for the quantification of the different linkages giving further information on the lignin condensation state. The acetylation pattern of the hemicellulosic moiety in LCCs was also studied through these techniques as deacetylation has been reported during thermal treatment of hemicelluloses [4,40].

The aliphatic regions ( $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  50–105/2.5–6.5) of the 2D HSQC NMR spectra of the four samples are displayed in Fig. 3. For all samples, the majority of the LILs signals is attributed to  $\beta$ -O-4 aryl ether bonds while weak signals result from the  $\text{C}_{\alpha}\text{-H}_{\alpha}$  and  $\text{C}_{\beta}\text{-H}_{\beta}$  of phenylcoumaran linkages. This observation comforts the py-GC/MS hypothesis emitted on the basis of the lignin fragmentation pattern in part 3.4. In agreement with the global analyses presented in Table 1, the anomeric carbon signals from hemicelluloses detected in the aliphatic region are attributed to mannose, glucose and galactose units. The two cross peak signals at  $\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$  71.3/5.28 and 73.9/4.85 ppm, which are omnipresent in the spectra, indicate that the hydroxyl groups on carbon 2 and 3 of mannose units are partially

**Table 2**

Relative abundances of carbohydrate, lignin and extractive derivatives arising from the py-GC/MS analyses of the four LCC rich samples: FD freeze dried; EC evapo-concentrated; SD spray dried; ST sterilized.

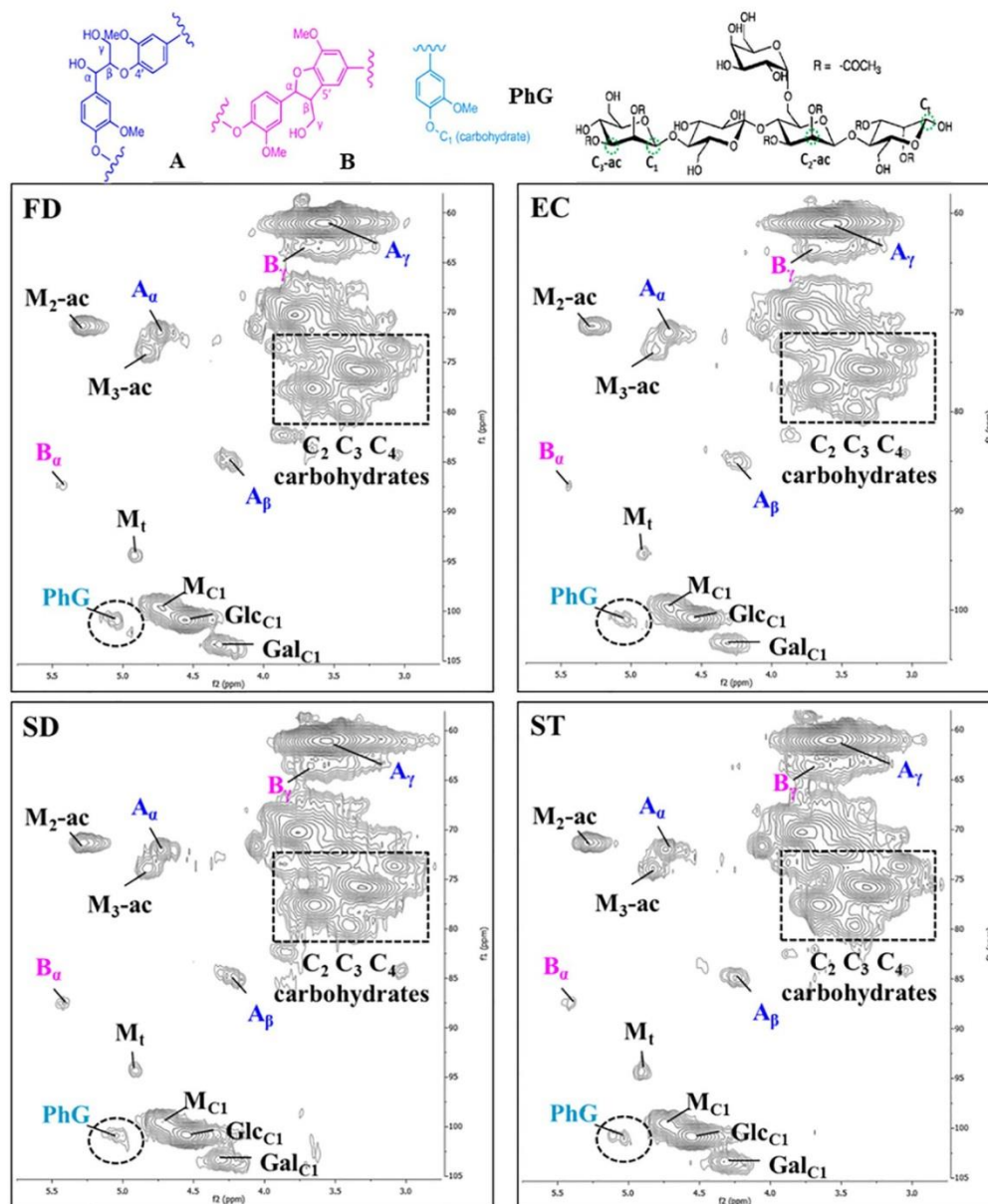
	FD	EC	SD	ST
Carbohydrate derivatives				
total	34,3 (1,9)	36,0 (1,7)	36,6 (1,8)	37,7 (0,2)
HMF	1,3 (0,2)	1,7 (0,1)	1,2 (0,2)	1,9 (0,2)
Extractives				
total	20,0 (1,0)	20,0 (3,4)	21,0 (2,4)	19,5 (1,1)
fatty acid	14,2 (1,6)	15,2 (3,6)	15,7 (2,8)	14,1 (1,8)
others (lignans, terpenes)	5,7 (0,6)	4,8 (0,2)	5,3 (0,3)	5,4 (1,4)
Lignin derivatives				
total	45,7 (0,9)	44,1 (1,8)	44,7 (3,0)	42,8 (1,0)
G derivatives	90,7	89,9	89,6	89,8
H derivatives	9,3	10,1	10,4	10,2
G/H ratio	91:9	90:10	90:10	90:10
1. phenol	3,3 (0,3)	3,7 (0,4)	4,0 (0,2)	3,3 (0,2)
2. o-formylphenol	0,5 (0,1)	0,7 (0,1)	0,6 (0,04)	0,6 (0,1)
3. o-cresol	2,4 (0,2)	2,5 (0,1)	2,7 (0,5)	2,3 (0,7)
4. p-cresol	4,3 (0,3)	4,6 (0,6)	4,7 (0,3)	4,9 (0,7)
5. guaiacol	14,0 (1,9)	13,0 (2,1)	14,5 (0,9)	13,0 (3,5)
6. m-xilenol	1,6 (0,2)	1,7 (0,1)	1,9 (0,3)	1,6 (0,5)
7. p-ethylphenol and				
2,3-dihydroxybenzaldehyde	1,3 (0,2)	1,5 (0,2)	1,4 (0,04)	1,7 (0,2)
8. p-methylguaiacol	8,0 (1,9)	7,9 (1,7)	8,2 (2,3)	9,7 (3,4)
9. catechol	17,8 (3,3)	18,5 (2,2)	16,8 (2,8)	18,0 (3,6)
10. coumaran	1,4 (0,2)	1,3 (0,2)	1,1 (0,2)	1,2 (0,3)
11. m-methylcatechol	1,6 (0,4)	1,2 (0,4)	1,3 (0,4)	1,3 (0,3)
12. p-ethylguaiacol	2,1 (0,2)	1,8 (0,2)	1,9 (0,1)	2,1 (0,5)
13. p-methylcatechol	9,0 (2,4)	8,9 (1,9)	7,0 (2,4)	7,4 (3,3)
14. p-vinylguaiacol	10,2 (1,4)	10,2 (1,2)	10,1 (1,3)	10,2 (1,4)
15. p-allylphenol	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,4 (0,1)	0,3 (0,1)
16. eugenol	2,3 (0,1)	1,8 (0,2)	1,8 (0,4)	1,8 (0,2)
17. p-ethylcatechol	1,9 (0,9)	1,2 (0,4)	1,6 (1,2)	1,1 (0,8)
18. vanillin	3,1 (0,4)	3,3 (0,2)	3,0 (0,6)	3,2 (0,2)
19. isoeugenol	6,3 (0,8)	6,0 (1,3)	6,5 (0,5)	6,2 (1,1)
20. homovanillic acid	4,8 (0,5)	4,4 (0,1)	4,4 (0,8)	5,5 (0,7)
21. coniferaldehyde	6,9 (0,1)	8,7 (0,7)	9,2 (1,6)	7,7 (0,7)

Please cite this article as: V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, et al., Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valorization, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>

acetylated in all samples. This acetylation pattern is current in native hemicelluloses of softwood and its preservation throughout the extraction and downstream processes is an evidence of the mildness of the overall process [41]. Concerning the LCLs, only phenyl glycosidic bond signals are detected in the aliphatic region of all spectra. In general, no additional signals appeared in the spectra of the LCC rich fraction after the different DSP when compared with the freeze-dried sample. If occurring, alteration of the LCCs structure by the DSP would have led to the appearance of new signals such as Hibbert's ketones structures arising from aryl ether bond cleavage or mannose acetylated carbon 6 arising from *trans*-acetylation as described in the literature [4,33].

Quantitative data were extracted from the spectra to reinforce these observations made by visual comparison. For quantification of LILs and LCLs, the quantitative  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of each sample was used to convert their relative signals elucidated by 2D-HSQC into  $^{13}\text{C}$  based number per aromatic rings ( $n^\circ/100\text{ar}$ ) as previously reported in the literature [4,6,21,42]. To do so, the aromatic region (105–160 ppm) of each  $^{13}\text{C}$  spectrum was integrated and normalized to 600 and calculations were done using the following Eqs. (1) and (2):

$$\frac{\text{PhG}}{100\text{ar}} = 600 * \frac{2D_{\text{PhG}}}{2D_{(105-94,5.5-4)}} * \frac{13C_{(105-94)}}{13C_{(160-105)}} \quad (1)$$



**Fig. 3.** Main structures identified and quantified by NMR spectroscopy: (A)  $\beta$ -O-4' aryl ether; (B)  $\beta$ -5' phenylcoumaran; (PhG) phenyl glycoside linkages and 2D-HSQC aliphatic regions of the four samples: FD freeze dried; EC evapo-concentrated; SD spray dried and ST sterilized; M = mannose; Glc = glucose and Gal = galactose; t subscript indicates the terminal reducing end; -ac subscript stands for acetylated carbon.

Please cite this article as: V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, et al., Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valoriza..., <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>

**Table 3**  
Quantification of the LILs, LCLs (n°/100ar) and acetylation pattern (mol% of Man) of the four samples.

	Previous data [21]	FD	EC	SD	ST
Hemicelluloses					
M <sub>2</sub> -acetylation degree	–	23.3	23.2	22.3	22.0
M <sub>3</sub> -acetylation degree	–	14.5	15.7	15.6	14.8
Lignin structure					
β-O-4' (A)	36.6	7.7	8.1	7.7	7.8
β-5' (B)	4.1	1.2	1.4	1.5	1.6
Condensation degree	0.66	0.70	0.54	0.66	0.60
LCCs linkages					
PhG	25.5	14.1	15.7	14.1	13.8

$$\frac{LIL}{100ar} = 600 * \frac{2D_{LIL}}{2D_{(90-80.6-2.5)}} * \frac{13C_{(90-80)}}{13C_{(160-105)}} \quad (2)$$

The acetylation patterns of the samples were semi-quantified on the basis of the 2D-HSQC signals and HPAEC sugar analysis results (Table 1) as described by Giummarella et al. [4]. The following Eq. (3) gives as an example the calculation of the mannose carbon 2 acetylation degree:

$$MC2-ac \text{ (mol\% of Man)} = \frac{2D(MC2-ac) \times 10^4}{Mmol\%(HPAEC) \times 2D(C1 \text{ anomeric})} \quad (3)$$

The acetylation degree of mannose carbon 2 (M<sub>C2-ac</sub>) is expressed as molar % of total mannose units (mol% of Man). 2D(M<sub>C2-ac</sub>) stands for the HSQC integral value of the mannose acetylated carbon 2 signal and 2D (C<sub>1 anomeric</sub>) is the HSQC integral value of the C1 anomeric signal cluster (105–94 ppm except PhG signal). The molar % of mannose unit on total carbohydrates quantified by HPAEC analysis (Mmol%(HPAEC)) is used to correct the relative signals from HSQC.

The quantification results are summarized in Table 3 and compared to previous published data on the freeze dried fraction [21]. The acetylation pattern of the hemicellulosic moiety of LCC is well preserved. Around 23% of the carbons 2 in mannose units are acetylated and 15% of the carbons 3. These quantifications are consistent with the data reported for native GGM in the literature where the M<sub>2</sub>-ac degree range from 20 to 36% and the M<sub>3</sub>-ac is comprised between 16 and 19% [4,41]. Concerning the LILs and LCLs, the values found in this work are markedly smaller than the ones previously published for the freeze dried sample. As the aim of the analysis was to generate comparative data (not absolute characterizations of the samples) less performing NMR equipment was used in this study (300 MHz against 400 MHz previously). The lowest resolution of the spectra is probably responsible for the underestimation of the structures. A control set of data was generated for the freeze dried and spray dried samples using a 400 MHz NMR spectrometer to be sure that this signal loss did not lead to a distorted view of the spectra. In both conditions (300 and 400 MHz), the different samples present really near LILs and LCLs contents between them as expected with the excellent stackability of the <sup>13</sup>C and 2D spectra. Even if the absolute values have to be taken with caution, this set of experiments demonstrates that the resolution of a 300 MHz spectrometer is enough to get representative NMR data for comparison studies.

Information about the lignin condensation degree can also be deduced from quantitative <sup>13</sup>C NMR analysis as previously reported [21,43]. The condensation degree is calculated as the ratio of the condensed aromatic carbon signals on the protonated aromatic ones. The condensation degree of the lignin moiety in LCCs remain perfectly stable at around 0.60 throughout all the DSP which means that no condensation reactions were triggered by the different processes. In other words, the carbon-carbon branching pattern of the aromatic rings in LCCs did not evolve during the DSP. The general conclusion drawn

from the relative and quantitative NRM experiments is that the thermally unstable ether bonds and functional groups were efficiently preserved during the DSP. The short time heat exposure of LCCs during spray drying is suitable to preserve their structure and the pressure applied during the other processes does not add up any negative effect such as favoring hemicelluloses deacetylation and autohydrolysis.

#### 4. Conclusions

LCCs molecular weight, internal linkages and functionalization were assessed before and after their subjection to three different DSP. The results demonstrated the suitability of these three DSP for the preservation of industrial LCCs fraction without altering their chemical structure and properties, under the specified conditions. Moist heat sterilization can be used for the short term preservation of liquid LCCs fractions whereas the combination of simple effect evaporation and spray-drying is recommended for their long term storage and stability. This work reports the feasibility of producing a fine LCCs powder, easy to handle and store, for its valorization in integrated biorefineries.

#### Author contributions

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### CRediT authorship contribution statement

**Virginie Steinmetz:** Conceptualization, Investigation, Writing - original draft. **Maud Villain-Gambier:** Investigation, Validation. **Armand Klem:** Resources. **Isabelle Ziegler:** Methodology. **Stéphane Dumarcay:** Investigation, Supervision, Validation. **Dominique Trebouet:** Investigation, Supervision, Validation.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgement

The NMR platform team from the Institut Jean Barriol, and in particular Mrs. Sophie Poinsignon, is gratefully acknowledged for its technical support and contribution.

#### Appendix A. Supplementary data

Peaks identification in Py-GC/MS, signals assignment in <sup>13</sup>C and 2D HSQC NMR, quantification results of 400 MHz NMR experiments as well as the aromatic region of the 2D HSQC spectra are available as supplementary material.

#### References

- [1] M. Lawoko, G. Henriksson, G. Gellerstedt, Characterisation of lignin-carbohydrate complexes (LCCs) of spruce wood (*Picea abies* L.) isolated with two methods, *Holzforschung* 60 (2006) 156–161, <https://doi.org/10.1515/HF.2006.025>.
- [2] M. Lawoko, R. Berggren, F. Berthold, G. Henriksson, G. Gellerstedt, Changes in the lignin-carbohydrate complex in softwood kraft pulp during kraft and oxygen delignification, *Holzforschung* 58 (2004) <https://doi.org/10.1515/HF.2004.114>.
- [3] M. Lawoko, Unveiling the structure and ultrastructure of lignin carbohydrate complexes in softwoods, *Int. J. Biol. Macromol.* 62 (2013) 705–713, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.022>.

Please cite this article as: V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, et al., Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valoriza..., <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>

- [4] N. Giummarella, M. Lawoko, Structural insights on recalcitrance during hydrothermal hemicellulose extraction from wood, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 5156–5165, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00511>.
- [5] T.-T. You, L.-M. Zhang, S.-K. Zhou, F. Xu, Structural elucidation of lignin-carbohydrate complex (LCC) preparations and lignin from *Arundo donax* Linn, *Ind. Crop. Prod.* 71 (2015) 65–74, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.03.070>.
- [6] R.H. Narron, H. Chang, H. Jameel, S. Park, Soluble lignin recovered from biorefinery pretreatment hydrolyzate characterized by lignin-carbohydrate complexes, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5 (2017) 10763–10771, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b02716>.
- [7] C. Huang, J. He, X. Li, D. Min, Q. Yong, Facilitating the enzymatic saccharification of pulped bamboo residues by degrading the remained xylan and lignin-carbohydrates complexes, *Bioresour. Technol.* 192 (2015) 471–477, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.008>.
- [8] A. Beaucamp, Y. Wang, M. Culebras, M.N. Collins, Carbon fibres from renewable resources: the role of the lignin molecular structure in its blendability with biobased poly(ethylene terephthalate), *Green Chem.* 21 (2019) 5063–5072, <https://doi.org/10.1039/C9GC02041A>.
- [9] M. Culebras, H. Geaney, A. Beaucamp, P. Upadhyaya, E. Dalton, K.M. Ryan, M.N. Collins, Bio-derived carbon nanofibres from lignin as high-performance li-ion anode materials, *ChemSusChem* 12 (2019) 4516–4521, <https://doi.org/10.1002/cssc.201901562>.
- [10] M. Pishnamazi, J. Iqbal, S. Shirazian, G.M. Walker, M.N. Collins, Effect of lignin on the release rate of acetylsalicylic acid tablets, *Int. J. Biol. Macromol.* 124 (2019) 354–359, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.136>.
- [11] P. Oinonen, H. Krawczyk, M. Ek, G. Henriksson, R. Moriana, Bioinspired composites from cross-linked galactoglucomannan and microfibrillated cellulose: thermal, mechanical and oxygen barrier properties, *Carbohydr. Polym.* 136 (2016) 146–153, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.09.038>.
- [12] Y. Uraki, Y. Usukura, T. Kishimoto, M. Ubukata, Amphiphilicity of a lignin-carbohydrate complex, *Holzforchung* 60 (2006) <https://doi.org/10.1515/HF.2006.111>.
- [13] H. Zhao, X. Wei, Y. Xie, Q. Feng, Preparation of nanocellulose and lignin-carbohydrate complex composite biological carriers and culture of heart coronary artery endothelial cells, *Int. J. Biol. Macromol.* 137 (2019) 1161–1168, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.062>.
- [14] H. Sakagami, H. Sheng, N. Okudaira, T. Yasui, H. Wakabayashi, J. Jia, T. Natori, M. Suguro-Kitajima, H. Ozumi, T. Ozumi, Prominent anti-UV activity and possible cosmetic potential of lignin-carbohydrate complex, *In Vivo* 30 (2016) 331–339.
- [15] Y. Zhang, S. Wang, W. Xu, F. Cheng, A. Pranovich, A. Smeds, S. Willför, C. Xu, Valorization of lignin-carbohydrate complexes from hydrolysates of Norway spruce: efficient separation, structural characterization, and antioxidant activity, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 1447–1456, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b05142>.
- [16] C. Huang, S. Tang, W. Zhang, Y. Tao, C. Lai, X. Li, Q. Yong, Unveiling the structural properties of lignin-carbohydrate complexes in bamboo residues and its functionality as antioxidants and immunostimulants, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 6 (2018) 12522–12531, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b03262>.
- [17] H. Niu, D. Song, H. Mu, W. Zhang, F. Sun, J. Duan, Investigation of three lignin complexes with antioxidant and immunological capacities from *Inonotus obliquus*, *Int. J. Biol. Macromol.* 86 (2016) 587–593, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.01.111>.
- [18] C. Huang, X. Wang, C. Liang, X. Jiang, G. Yang, J. Xu, Q. Yong, A sustainable process for procuring biologically active fractions of high-purity xylooligosaccharides and water-soluble lignin from Moso bamboo prehydrolyzate, *Biotechnol. Biofuels* 12 (2019) 189, <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1527-3>.
- [19] N. Westerberg, H. Sunner, M. Helander, G. Henriksson, M. Lawoko, A. Rasmuson, Separation of galactoglucomannans, lignin, and lignin-carbohydrate complexes from hot-water-extracted Norway spruce by cross-flow filtration and adsorption chromatography, *BioResources*. 7 (2012) 4501–4516, <https://doi.org/10.15376/biores.7.4.4501-4516>.
- [20] B. Al-Rudainy, M. Galbe, O. Wallberg, Influence of prefiltration on membrane performance during isolation of lignin-carbohydrate complexes from spent sulfite liquor, *Sep. Purif. Technol.* 187 (2017) 380–388, <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.031>.
- [21] V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, F. Gambier, S. Dumarçay, D. Trebouet, Unveiling TMP process water potential as an industrial sourcing of valuable lignin-carbohydrate complexes toward zero-waste biorefineries, *ACS Sustain. Chem. Eng.* 7 (2019) 6390–6400, <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00181>.
- [22] T. Persson, H. Krawczyk, A.-K. Nordin, A.-S. Jönsson, Fractionation of process water in thermomechanical pulp mills, *Bioresour. Technol.* 101 (2010) 3884–3892, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.12.142>.
- [23] M.R.I. Shishir, W. Chen, Trends of spray drying: a critical review on drying of fruit and vegetable juices, *Trends Food Sci. Technol.* 65 (2017) 49–67, <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.05.006>.
- [24] Z. Lei, S. Wang, H. Fu, W. Gao, B. Wang, J. Zeng, J. Xu, Thermal pyrolysis characteristics and kinetics of hemicellulose isolated from *Camellia Oleifera* Shell, *Bioresour. Technol.* 282 (2019) 228–235, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.131>.
- [25] J.-Y. Kim, H. Hwang, S. Oh, Y.-S. Kim, U.-J. Kim, J.W. Choi, Investigation of structural modification and thermal characteristics of lignin after heat treatment, *Int. J. Biol. Macromol.* 66 (2014) 57–65, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.02.013>.
- [26] P. Roussel, C. Lapiere, B. Pollet, W. Quirino, P. Perre, Effect of severe thermal treatment on spruce and beech wood lignins, *Ann. For. Sci.* 66 (2009) 110, <https://doi.org/10.1051/forest/2008078>.
- [27] Z. Ma, J. Wang, C. Li, Y. Yang, X. Liu, C. Zhao, D. Chen, New sight on the lignin torrefaction pretreatment: relevance between the evolution of chemical structure and the properties of torrefied gaseous, liquid, and solid products, *Bioresour. Technol.* 288 (2019), 121528, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.12.1528>.
- [28] M.J. Maltesen, M. van de Weert, Drying methods for protein pharmaceuticals, *Drug Discov. Today Technol.* 5 (2008) e81–e88, <https://doi.org/10.1016/j.ddtec.2008.11.001>.
- [29] C. Bonazzi, J.-J. Bimbenet, *Séchage des produits alimentaires*, 2003 17.
- [30] S. Wang, B. Ru, H. Lin, W. Sun, Z. Luo, Pyrolysis behaviors of four lignin polymers isolated from the same pine wood, *Bioresour. Technol.* 182 (2015) 120–127, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.01.127>.
- [31] N. Giummarella, Y. Pu, A.J. Ragauskas, M. Lawoko, A critical review on the analysis of lignin carbohydrate bonds, *Green Chem.* 21 (2019) 1573–1595, <https://doi.org/10.1039/C9GC03606C>.
- [32] H. Li, A.G. McDonald, Fractionation and characterization of industrial lignins, *Ind. Crop. Prod.* 62 (2014) 67–76, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.08.013>.
- [33] S. Constant, H.L.J. Wienk, A.E. Frissen, P. de Peinder, R. Boelens, D.S. van Es, R.J.H. Grisel, B.M. Weckhuysen, W.J.J. Huijgen, R.J.A. Gosselink, P.C.A. Bruijninx, New insights into the structure and composition of technical lignins: a comparative characterisation study, *Green Chem.* 18 (2016) 2651–2665, <https://doi.org/10.1039/C5GC03043A>.
- [34] K. Werner, L. Pommer, M. Broström, Thermal decomposition of hemicelluloses, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 110 (2014) 130–137, <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2014.08.013>.
- [35] J.C. del Río, M. Speranza, A. Gutiérrez, M.J. Martínez, A.T. Martínez, Lignin attack during eucalypt wood decay by selected basidiomycetes: a Py-GC/MS study, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 64 (2002) 421–431, [doi:https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(02\)00043-8](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(02)00043-8).
- [36] J.C. del Río, A. Gutiérrez, M.J. Martínez, A.T. Martínez, Py-GC/MS study of *Eucalyptus globulus* wood treated with different fungi, *J. Anal. Appl. Pyrolysis*. 58–59 (2001) 441–452, [doi:https://doi.org/10.1016/S0165-2370\(00\)00184-4](https://doi.org/10.1016/S0165-2370(00)00184-4).
- [37] N. Giummarella, L. Zhang, G. Henriksson, M. Lawoko, Structural features of mildly fractionated lignin carbohydrate complexes (LCC) from spruce, *RSC Adv.* 6 (2016) 42120–42131, <https://doi.org/10.1039/C6RA02399A>.
- [38] M. Balakshin, E. Capanema, H. Grac, H. Chang, H. Jameel, Quantification of lignin-carbohydrate linkages with high-resolution NMR spectroscopy, *Planta* 233 (2011) 1097–1110, <https://doi.org/10.1007/s00425-011-1359-2>.
- [39] G. Xu, Z. Shi, Y. Zhao, J. Deng, M. Dong, C. Liu, V. Murugadoss, X. Mai, Z. Guo, Structural characterization of lignin and its carbohydrate complexes isolated from bamboo (*Dendrocalamus sinicus*), *Int. J. Biol. Macromol.* 126 (2019) 376–384, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.234>.
- [40] M. González Martínez, T. Ohra-aho, T. Tamminen, D. da Silva Perez, M. Campargue, C. Dupont, Detailed structural elucidation of different lignocellulosic biomass types using optimized temperature and time profiles in fractionated Py-GC/MS, *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 140 (2019) 112–124, <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2019.02.011>.
- [41] S. Willför, R. Sjöholm, C. Laine, M. Roslund, J. Hemming, B. Holmbom, Characterisation of water-soluble galactoglucomannans from Norway spruce wood and thermomechanical pulp, *Carbohydr. Polym.* 52 (2003) 175–187, [https://doi.org/10.1016/S0144-8617\(02\)00288-6](https://doi.org/10.1016/S0144-8617(02)00288-6).
- [42] T.-Q. Yuan, S.-N. Sun, F. Xu, R.-C. Sun, Characterization of lignin structures and lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages by quantitative <sup>13</sup>C and <sup>2</sup>D HSQC NMR spectroscopy, *J. Agric. Food Chem.* 59 (2011) 10604–10614, <https://doi.org/10.1021/jf2031549>.
- [43] N. Brosse, R. El Hage, M. Chaouch, M. Pétrissans, S. Dumarçay, P. Gérardin, Investigation of the chemical modifications of beech wood lignin during heat treatment, *Polym. Degrad. Stab.* 95 (2010) 1721–1726, <https://doi.org/10.1016/j.polymdgradstab.2010.05.018>.

Please cite this article as: V. Steinmetz, M. Villain-Gambier, A. Klem, et al., Lignin Carbohydrate Complexes structure preserved throughout downstream processes for their valoriza..., <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.238>

## APPENDICES: SUPPLEMENTARY MATERIALS

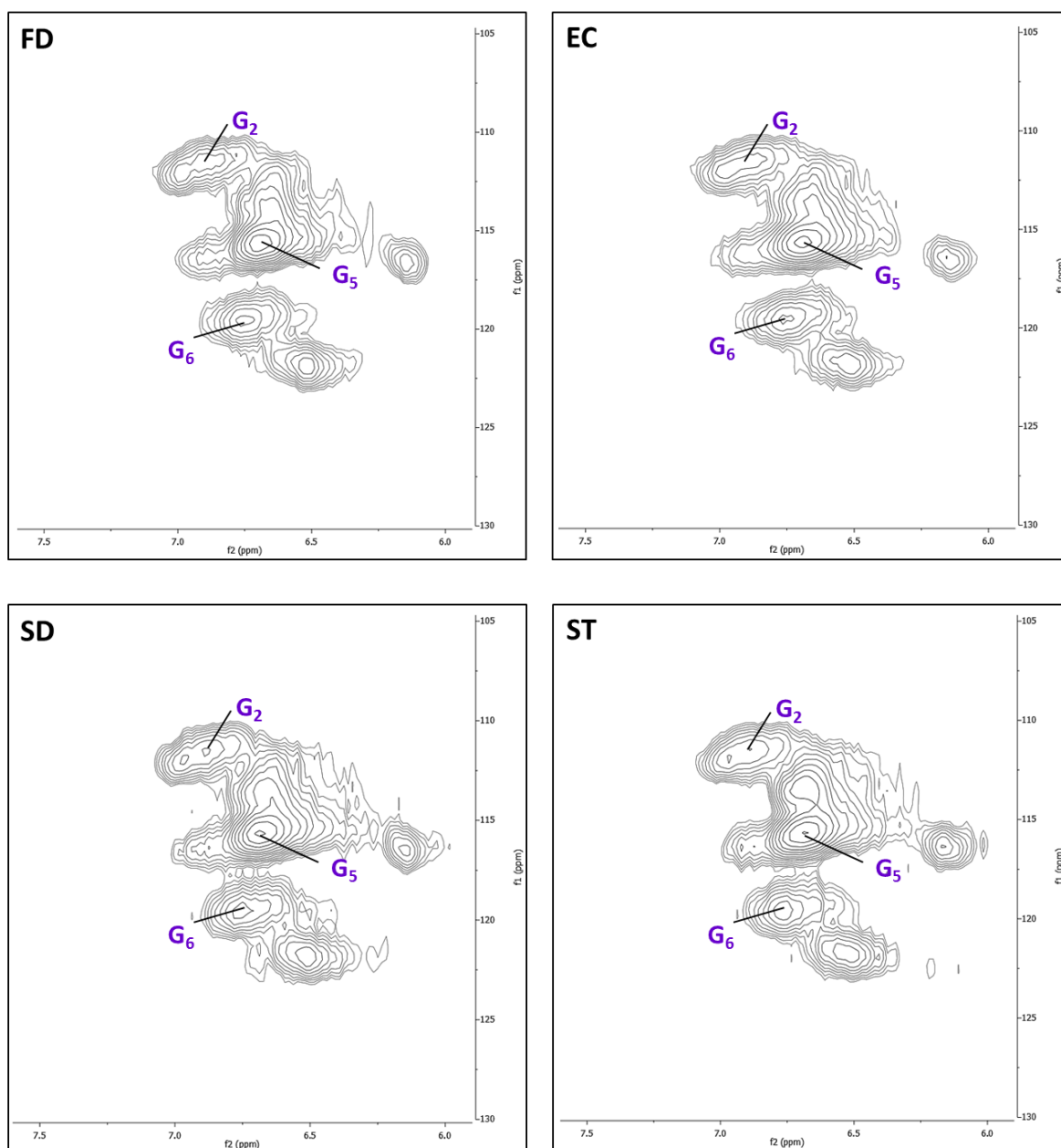
**Table S1.** Py-GC/MS peak identification and retention time.

Compound name	Identification	Retention time
furfural	sugar derivative	5,45
furfuryl alcohol	sugar derivative	6,19
2(5H)furanone	sugar derivative	8,18
1,2-cyclopentanedione	sugar derivative	8,75
furfural 5-methyl	sugar derivative	10,08
phenol	aromatic H	10,77
1,2-cyclopentanedione-3-methyl	sugar derivative	12,37
2-formylphenol	aromatic H	12,98
2-cresol	aromatic G	13,32
4-cresol	aromatic H	14,08
2-guaiacol	aromatic G	14,4
3-xyleneol	aromatic G	16,41
p-ethylphenol et 2,3-dihydroxybenzaldehyde	aromatic H	16,9-17,0
creosol (4-methyl guaiacol / homoguaiacol)	aromatic G	17,68
catechol	aromatic G	17,9
	aromatic G or sugar derivative	
coumaran	derivative	18,58
5-hydroxymethylfurfural (HMF)	sugar derivative	19,09
3-methylcatechol	Aromatic G	19,79
4-ethylguaiacol	aromatic G	20,17
4-methylcatechol (homocatechol)	aromatic G	20,63
4-vinylguaiacol	aromatic G	21,23
4-allylphenol	aromatic H	22,09
4-eugenol	aromatic G	22,36
4-ethylcatechol	aromatic G	23,16
vanillin	aromatic G	23,59
isoeugenol	aromatic G	24,87
anhydrosugars*	sugar derivative	25.3-29.6
homovanillic acid	aromatic G	29,66
coniferaldehyde	aromatic G	31,62
myristic acid C14	fatty acid	32,16
palmitic acid C16	fatty acid	36,38
stearic acid C18	fatty acid	40,18
resinic acid (dehydroabietic probably)	extractives	44,71
	Extractives or lignin degradation product	
dilignol derivative	degradation product	48,07
secoisolariciresinol (137/138-344)	extractives	51,71
lignan	extractives	53,97
matairesinol (137-358-207-281)	extractives	55,15
alpha-conidendrin	extractives	59,93

\*Anhydrosugars can't be clearly identified due to overlapping

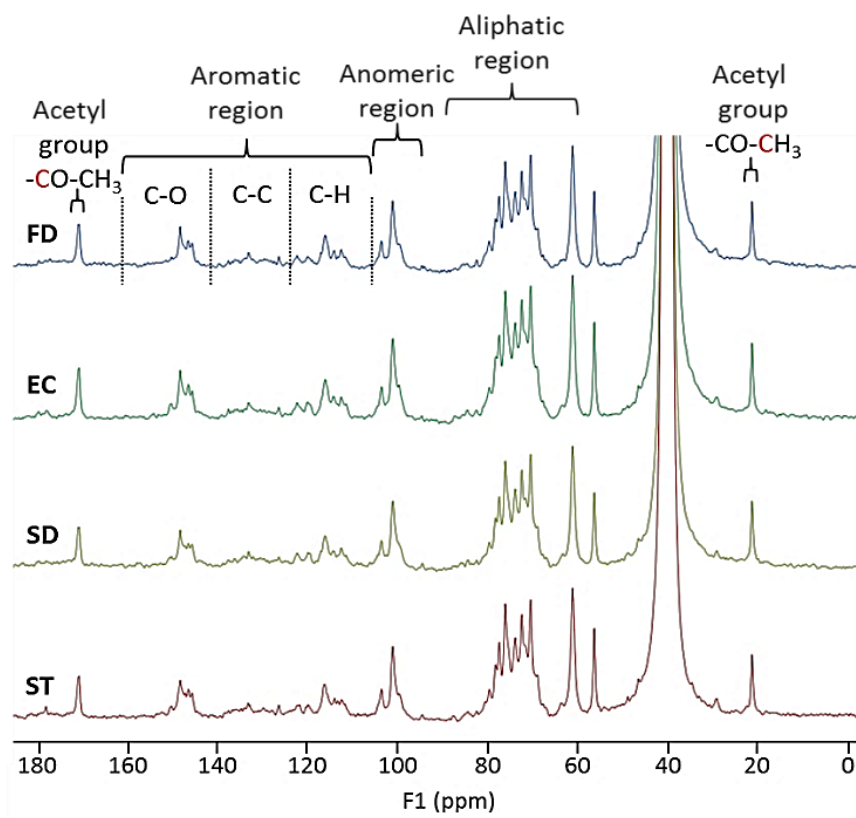
**Table S2** 2D-HSQC NMR cross peak signals assignment.

Label	$\delta_C/\delta_H$ (ppm)	Assignment
OMe	56.2/3.73	C-H of methoxyls
A $_{\gamma}$	61.1/3.57	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of $\beta$ -O-4 structures
B $_{\gamma}$	63.5/3.70	C $_{\gamma}$ -H $_{\gamma}$ of phenylcoumaran structures
A $_{\alpha}$	72.0/4.74	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of $\beta$ -O-4 structures
A $_{\beta(G/H)}$	84.9/4.22	C $_{\beta}$ -H $_{\beta}$ of $\beta$ -O-4 structures linked to G and H units
B $_{\alpha}$	87.3/5.43	C $_{\alpha}$ -H $_{\alpha}$ of phenylcoumaran structures
PhG $_1$	99.1-	C $_1$ of phenyl glucoside
PhG $_2$	102.2/5.16-	C $_2$ of phenyl glucoside
PhG $_3$	4.97	C $_3$ of phenyl glucoside
G $_2$	111.5/6.92	C $_2$ -H $_2$ of guaiacyl units
G $_5$	115.6/6.70	C $_5$ -H $_5$ of guaiacyl units
G $_6$	119.6/6.76	C $_6$ -H $_6$ of guaiacyl units
M $_2$ -ac	71.3/5.28	C $_2$ of acetylated mannose
M $_3$ -ac	73.9/4.85	C $_3$ of acetylated mannose
M $_t$	94.4/4.92	C of mannan terminal reducing end
M $_{C1}$	99.7/4.71	C $_1$ of mannan units
Glc $_{C1}$	100.9/4.56	C $_1$ of glucan units
Gal $_{C1}$	103.3/4.30	C $_1$ of galactan units



**Fig S1.** 2D-HSQC NMR aromatic regions ( $\delta_C/\delta_H$  105-155/6-8) of the four samples. Signals from carbons 2, 5 and 6 of G units are depicted in all spectra.





**Fig S2.**  $^{13}\text{C}$  NMR spectra of the four samples with delimited signal regions: C-O: oxygenated carbons, C-C: condensed carbons and C-H: protonated carbons.

**Table S3.**  $^{13}\text{C}$  NMR signals assignment and integral values.

300 MHz equipment

$\delta$ (ppm)	assignment	Integral values /100 Ar			
		<b>FD</b>	<b>EC</b>	<b>SD</b>	<b>ST</b>
170	O $\color{red}{\text{C}}$ OCH $\color{red}{\text{3}}$ aliphatic ester	72,5	66,6	53	57,2
154-140	Oxygenated aromatics (Ar-O)	203,8	205,1	184,5	196,8
140-123	Condensed aromatics (Ar-C)	150,9	136,2	158,6	148,2
123-105	Protonated aromatics (Ar-H)	214,2	250,8	239	248,3
105-94	C-1 anomeric carbon	209,0	249,1	208,2	218,7
90-80	C $\alpha$ -H $\alpha$ aliphatic region	30,1	34	31,4	29,9
90-58	Total aliphatic region	1195,9	1436,8	1201,8	1350,5
56	O-Me	75,1	91,6	72,7	96
21	O $\color{red}{\text{C}}$ O $\color{red}{\text{C}}$ H $\color{red}{\text{3}}$ aliphatic ester	68,5	74,5	66,5	66,6
	Condensation degree Ar-C/Ar-H	0,70	0,54	0,66	0,60

**Table S4.** Quantification of the LILs, LCLs (n°/100ar) and acetylation pattern (mol% of Man) of the freeze-dried and spray-dried samples using a 400 MHz NMR spectrometer.

	FD	SD
<b>Integral values</b>		
13C (90-80)	69,0	72,8
13C (105-94)	182,5	159,8
2D (90-80/6-2,5)	38386,3	41941,1
2D (105-94/5,5-4)	78472,5	79192,1
2D (B-O-4)alpha	18567,8	18540,0
2D (B-O-4)beta	7132,9	6936,0
2D (B-5)alpha	2910,6	2736,5
2D (PhG)	9981,8	9917,9
2D (C <sub>1</sub> anomeric)*	68490,7	69274,2
2D (M <sub>C2-ac</sub> )	9547,4	9424,3
2D (M <sub>C3-ac</sub> )	3778,9	3767,5
<b>HPAEC</b>		
Man mol%	60,68	61,35
	FD	SD
<b>Hemicelluloses</b>		
M <sub>2</sub> -acetylation degree	23.0	22.4
M <sub>3</sub> -acetylation degree	9.1	9.0
<b>Lignin structure</b>		
β-O-4' (A)	33.4	32.2
β-5' (B)	5.2	4.8
Condensation degree	0.66	0.75
<b>LCCs linkages</b>		
PhG	23.2	20.0

\*The 2D-HSQC integral value of C<sub>1</sub> anomeric cluster is calculated as:

$$2D(C_{1 \text{ anomeric}}) = 2D(105-94/5,5-4) - 2D(\text{PhG})$$

### 3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE 3

Les procédés de transformation étudiés dans ce chapitre ont été sélectionnés et optimisés afin de limiter l'exposition de la LTM à la chaleur. La température maximale atteinte au cours des différents procédés a été de 190 °C au sein de la chambre de pulvérisation de l'atomiseur. Les températures de fonctionnement de l'évaporateur simple effet et de l'autoclave ont été maintenues respectivement à 85 et 121 °C. Dans ces conditions, l'ensemble des procédés ont démontré leur capacité à transformer la LTM tout en préservant l'intégralité de ses structures thermosensibles.

La combinaison de l'évapo-concentration et de l'atomisation a permis la production d'une poudre de LTM très fine, facile à stocker et à manipuler comme présentée en Figure 33. Cette poudre a été envoyée à différents partenaires industriels pour l'évaluation de son potentiel de valorisation.



*Figure 33 : poudre de LTM produite en sortie d'atomisation.*

La stérilisation du rétentat à l'autoclave a également démontré son innocuité vis-à-vis de la structure native de la LTM. Aucune réaction de condensation, qui remplace les liaisons labiles de type  $\beta$ -O-4 par des liaisons condensées de type C-C, n'a été engendrée par ce procédé. La LTM peut ainsi être valorisée par bioconversion enzymatique comme présenté dans les chapitres qui suivent.

## 4. REFERENCES

- Bonazzi, C., and Bimbenet, J.-J. (2003). Séchage des produits alimentaires. *Techniques de l'ingénieur*, 17.
- Giummarella, N., and Lawoko, M. (2017). Structural Insights on Recalcitrance during Hydrothermal Hemicellulose Extraction from Wood. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 5, 5156–5165.
- Kim, J.-Y., Hwang, H., Oh, S., Kim, Y.-S., Kim, U.-J., and Choi, J.W. (2014). Investigation of structural modification and thermal characteristics of lignin after heat treatment. *Int. J. Biol. Macromol.* 66, 57–65.
- Ma, Z., Wang, J., Li, C., Yang, Y., Liu, X., Zhao, C., and Chen, D. (2019). New sight on the lignin torrefaction pretreatment: Relevance between the evolution of chemical structure and the properties of torrefied gaseous, liquid, and solid products. *Bioresour. Technol.* 288, 121528.
- Maltesen, M.J., and van de Weert, M. (2008). Drying methods for protein pharmaceuticals. *Drug Discov. Today Technol.* 5, 81–88.
- Rousset, P., Lapierre, C., Pollet, B., Quirino, W., and Perre, P. (2009). Effect of severe thermal treatment on spruce and beech wood lignins. *Ann. For. Sci.* 66, 110–110.
- Shishir, M.R.I., and Chen, W. (2017). Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. *Trends Food Sci. Technol.* 65, 49–67.
- Wang, S., Ru, B., Lin, H., Sun, W., and Luo, Z. (2015). Pyrolysis behaviors of four lignin polymers isolated from the same pine wood. *Bioresour. Technol.* 182, 120–127.

# Chapitre 4



## CHAPITRE 4 / BIOCONVERSION DE LA LIGNINE

### THERMOMECHANIQUE PAR UN COCKTAIL D'ENZYMES

### LIGNOLYTIQUES DE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM*

#### 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DU CHAPITRE 4

L'objectif de ce chapitre est d'explorer le potentiel de valorisation de la LTM pour la production de composés phénoliques de faibles masses moléculaires par dépolymérisation enzymatique. Afin de catalyser cette bioconversion, il a été décidé d'utiliser le rétentat 1 kDa comme substrat de fermentation pour la production d'un cocktail enzymatique adapté à la LTM. En effet, la teneur importante en saccharides du rétentat 1 kDa peut être positivement valorisée comme source de carbone pour la culture d'un micro-organisme lignolytique. Les enzymes alors produites au contact de la LTM peuvent être extraites et utilisées lors d'essais de dépolymérisation *in-vitro*. Ce choix de catalyseur présente deux avantages majeurs. Premièrement, l'utilisation d'un cocktail multienzymatique complexe permet de reproduire les conditions de dépolymérisation naturelle de la lignine. En effet, l'extraction de l'ensemble des enzymes extracellulaires du micro-organisme permet de conserver et d'exploiter toute la diversité de son métabolisme. Deuxièmement, la production au laboratoire de ce cocktail enzymatique à partir de LTM est un atout économique dans le cadre de cette thèse mais également dans l'hypothèse où ce procédé viendrait à être développé à plus grande échelle.

La fermentation de la LTM a été réalisée avec un champignon modèle de pourriture blanche dénommé *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*). Une souche de ce champignon (RP-78) a été généreusement mise à notre disposition par le laboratoire « Interactions Arbres Micro-organismes » (IAM – UMR 1136) de l'Université de Lorraine. Une première partie de ce chapitre est consacrée aux essais de production, d'extraction et de caractérisation des enzymes lignolytiques sécrétées par ce champignon au contact de la LTM en fermentation en milieu solide (FMS). Pour ce faire, de l'agar (2 % masse/volume) a été ajouté au rétentat 1 kDa qui, une fois solidifié dans des boîtes de Pétri, a servi de milieu nutritif pour la croissance de *P. chrysosporium* et la production des enzymes lignolytiques.



Par la suite, le cocktail enzymatique produit par FMS a été utilisé dans plusieurs séries d'essais de dépolymérisation de la LTM en milieu liquide. L'intérêt du passage en milieu liquide est de pouvoir envisager le couplage de la dépolymérisation enzymatique à un système d'extraction continue des produits de réaction par procédé membranaire. Mais avant cela, différentes conditions de bioconversion ont été étudiées en batch afin d'identifier celles permettant la meilleure activité du cocktail enzymatique. Les résultats de ces essais sont présentés en deuxième partie de ce chapitre.

## 2. PRODUCTION DU COCKTAIL ENZYMATIQUE PAR FMS

### 2.1. TESTS DE CROISSANCE ET DE CONTAMINATION

Une première série d'essais a été menée afin d'étudier la compatibilité du substrat de bioconversion (rétentat 1 kDa) et du catalyseur biologique (*P. chrysosporium*). Un test de croissance a été réalisé afin de déterminer si le rétentat 1 kDa pouvait être utilisé comme milieu nutritif permettant la croissance de *P. chrysosporium* ou s'il présentait une quelconque toxicité vis-à-vis de ce champignon. Pour ce test, différentes concentrations de rétentat 1 kDa ont été utilisées afin de préparer des boîtes de Pétri,ensemencées par la suite par des spores de *P. chrysosporium*. La teneur maximale en matière sèche (MS) qui a été étudiée est celle du rétentat en sortie du procédé membranaire, soit 2,58 %. Pour cette condition, une aliquote de rétentat produit au chapitre 2 a été directement décongelée, mélangée à de l'agar et coulée dans des boîtes de Pétri. D'autres boîtes ont également été préparées à partir du rétentat décongelé mais cette fois-ci dilué au 1/10 ou au 1/100 avec de l'eau osmosée avant d'être solidifié. La croissance de *P. chrysosporium* sur chacune de ces trois concentrations de rétentat a été étudiée en triplicat. Une fois ensemencées, toutes les boîtes ont été incubées dans une enceinte climatique réglée à 37 °C pendant 7 jours.

En parallèle de ce test de croissance, un test de contamination du rétentat décongelé a également été conduit en incubant des boîtes de gélose non inoculées dans les mêmes conditions que les boîtes ensemencées. Bien qu'il ait été démontré au chapitre précédent que la stérilisation du rétentat à l'autoclave n'entraîne pas de dégradation de la LTM, il est tout de même intéressant d'étudier la possibilité d'utilisation directe du rétentat (non autoclavé) afin de simplifier le procédé de fermentation. L'ensemble des conditions réalisées pour cette série d'essais est illustré en Figure 34.

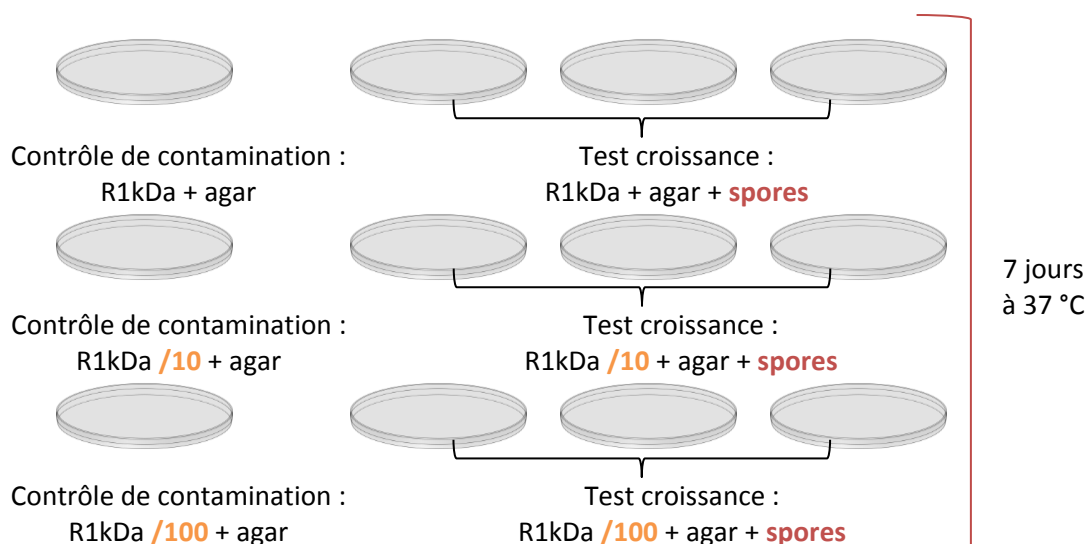


Figure 34 : conditions réalisées pour les tests de croissance et de contamination avec le rétentat 1 kDa (R1kDa) et les spores de *P. chrysosporium*.

La figure 35 regroupe les photographies des boîtes de Pétri prises après les 7 jours d'incubation dans l'enceinte climatique. Les triplicats réalisés pour le test de croissance étant parfaitement identiques, seule une photo de chaque condition y est présentée. L'observation des boîtes de Pétri inoculées avec les spores de *P. chrysosporium* permet de mettre en évidence que ce champignon a été capable de pousser sur toutes les boîtesensemencées, quelle que soit la concentration en rétentat 1 kDa. Le rétentat 1 kDa ne présente donc pas de toxicité vis-à-vis de ce champignon et peut être utilisé directement (à 2,58 % de MS) comme source de milieu nutritif pour sa croissance.

En comparant les boîtesensemencées avec les boîtes contrôles non inoculées, il est également possible de voir qu'aucun micro-organisme ne s'est développé de façon spontanée sur le rétentat 1 kDa, bien qu'il n'ait pas été préalablement autoclavé. Les boîtes non inoculées sont effectivement restées homogènes et translucides au contraire des boîtesensemencées rendues opaques par la croissance du mycélium. Cette deuxième observation souligne qu'il n'est pas nécessaire de stériliser le rétentat 1 kDa en amont de sa fermentation et permet ainsi de simplifier le procédé. Puisqu'aucune mesure de stérilité n'a été prise lors de la récupération du rétentat et de son conditionnement, ni même lors de la préparation des boîtes de Pétri, il est fort probable que cette absence de contamination provienne de la sélectivité naturelle de ce milieu nutritif. Sa composition riche en polyphénols ainsi que la complexité de ses sources de carbone (hémicelluloses et lignine) suffisent à empêcher la croissance de micro-organismes, autres que les champignons de pourriture blanche.

L'ensemble des résultats de cette expérience a donc permis de démontrer que le rétentat 1 kDa peut être utilisé sans stérilisation préalable comme milieu nutritif pour la croissance de *P. chrysosporium* sur support solide.

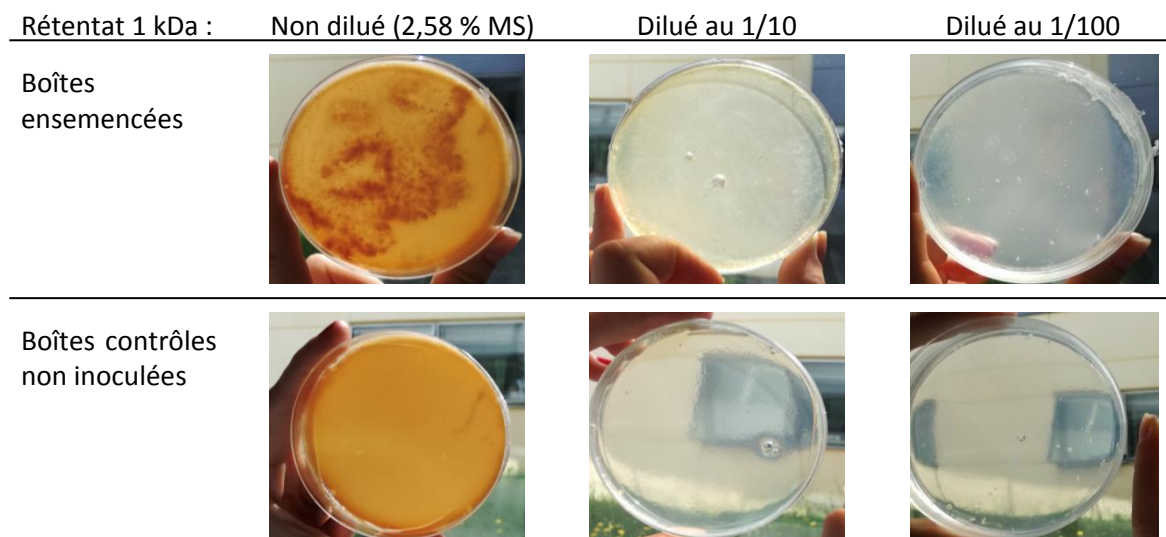


Figure 35 : photographies des boîtes de Pétri ensemencées et contrôles après 7 jours d'incubation dans une étuve à 37 °C.

A la suite du test de croissance, les boîtes de Pétri recouvertes de mycélium ont été utilisées afin d'éprouver les protocoles d'extraction et de dosages enzymatiques développés au laboratoire. Le dosage de l'activité lignolytique totale de ces boîtes n'a alors permis de mettre en évidence la production d'enzymes lignolytiques que pour les trois boîtes contenant le rétentat dilué au 1/10. Ces boîtes étaient également celles qui présentaient la plus grande surface recouverte de mycélium lors du test de croissance. Ainsi, pour la suite des travaux de FMS, le rétentat 1 kDa a été systématiquement dilué au 1/10 avant son utilisation.

## 2.2. PRODUCTION DES ENZYMES LIGNOLYTIQUES EN FMS : CINÉTIQUE, QUANTIFICATION ET CARACTÉRISATION

Une étude cinétique, quantitative et qualitative de la production d'enzymes lignolytiques par *P. chrysosporium* au contact de la LTM a été réalisée. Avant cela, une expérience simplifiée a été conduite sur une durée totale de 30 jours en s'inspirant de travaux publiés dans la littérature (Arora *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2016). Cette étude préliminaire a permis d'observer que la production d'enzymes lignolytiques par ce système fermentaire n'a lieu que lors des 7 premiers jours de fermentation. Par conséquent, l'étude détaillée de la FMS de *P. chrysosporium* sur le rétentat 1 kDa a été menée sur une semaine.

Des dizaines de boîtes de Pétri identiques contenant du rétentat 1 kDa dilué au dixième ont été préparées,ensemencées, puis placées dans une enceinte climatique à 37 °C. Le jour d'ensemencement des boîtes de Pétri a été défini comme le jour zéro de l'expérience. Par la suite, à des intervalles de temps réguliers, des lots de 3 boîtes de Pétri aléatoirement sélectionnées ont été prélevés, extraits et dosés au spectrophotomètre afin de déterminer leur activité lignolytique totale puis plus précisément leur activité liée aux manganèse-péroxydases (MnP), aux lignine-péroxydases (LiP) et aux laccases. Une boîte non inoculée a également été incubée afin de servir de contrôle de contamination pour la validation de l'expérience.

Le témoin de contamination a été contrôlé visuellement tous les jours et aucune croissance microbienne n'a été constatée durant toute la durée de l'expérience. Les résultats obtenus peuvent donc bien être directement reliés à l'activité de *P. chrysosporium* au contact du rétentat 1 kDa. Les résultats des dosages enzymatiques des jours 1 à 7 sont donnés en Figure 36. Les activités enzymatiques sont exprimées en U.g<sup>-1</sup> de matière sèche (MS), c'est-à-dire, rapportées à la quantité de MS de rétentat introduite par boîte de FMS. L'extraction des enzymes a été systématiquement faite avec du tampon phosphate-citrate à pH 4,5.

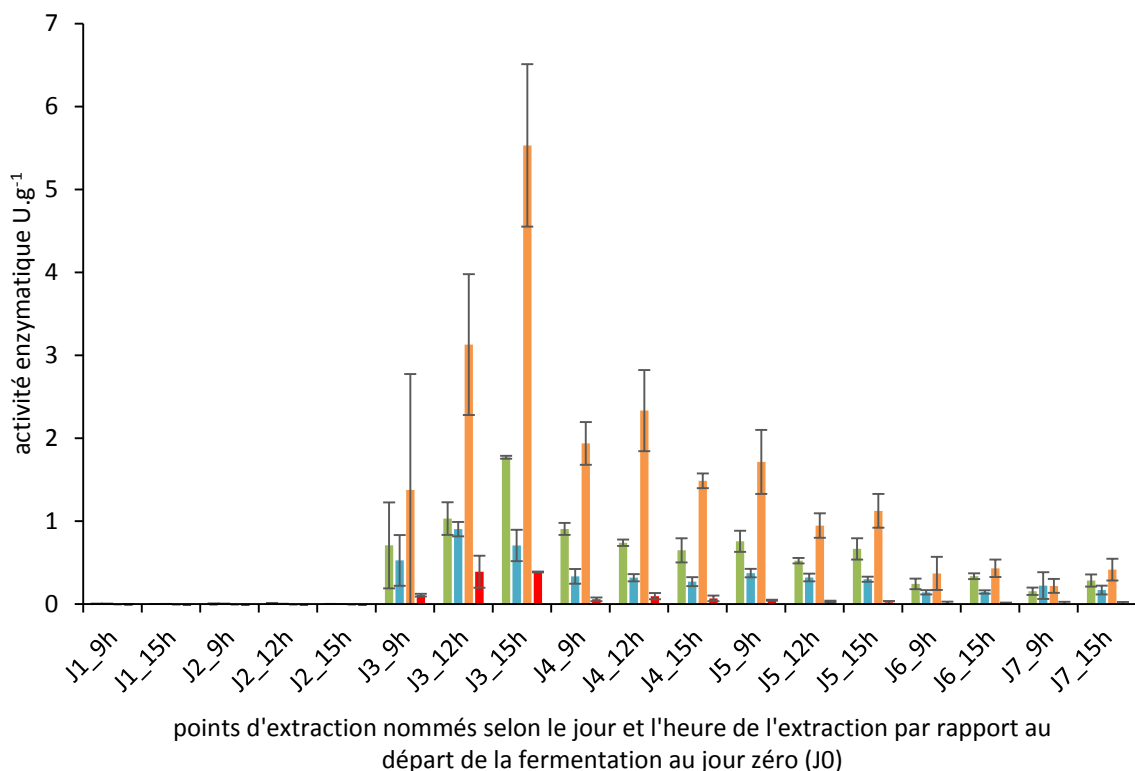


Figure 36 : cinétique de production des enzymes lignolytiques par *P. chrysosporium* au contact de la LTM : activité enzymatique totale (orange), MnP (vert), LiP (bleu) et laccase (rouge).

La phase de production des enzymes lignolytiques dans ce système fermentaire se concentre donc sur les 7 premiers jours de FMS avec un maximum d'activité enzymatique totale au jour 3 de l'expérience. Cette cinétique est relativement rapide comparée aux données tirées de la littérature qui rapportent des maximums de production d'enzymes lignolytiques aux alentours du 15<sup>ème</sup> jour ou plus de FMS avec des champignons de pourriture blanche sur des résidus agroalimentaires (Arora *et al.*, 2002; Palma *et al.*, 2016; Sarnthima *et al.*, 2009). La rapidité de cette phase de production est également soulignée au jour 3 par l'augmentation significative de l'activité enzymatique totale entre des prélèvements pris à seulement 3 heures d'intervalle (12h et 15h). Il existe donc un laps de temps optimal mais très réduit pour extraire les enzymes lignolytiques de la FMS afin d'obtenir le cocktail le plus concentré. Dans cette expérience, le pic d'activité totale maximale se situe dans la nuit entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour de fermentation.

La composition du cocktail enzymatique produit par *P. chrysosporium* au contact du rétentat 1 kDa est également intéressante à commenter. Auparavant, il est important de préciser que, dans les conditions de dosage mises en place au laboratoire (voir partie expérimentale paragraphes 3.1 à 3.4), toutes les activités enzymatiques présentées en Figure 36 ne peuvent pas être directement comparées puisque différents substrats ont été utilisés pour le calcul des activités. Toutefois, l'activité enzymatique totale et l'activité laccase qui ont été calculées à partir d'un même substrat (ABTS : acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)) et dans les mêmes conditions (pH, température) sont comparables entre elles. Et il en est de même pour les activités LiP et MnP dosées avec le DMP (2,6-diméthoxyphénol). Cette précision technique explique également pourquoi la somme des activités peroxydases et laccase n'est pas égale à l'activité enzymatique totale.

Il est alors possible d'observer que l'activité laccase ne représente qu'une très faible proportion de l'activité enzymatique totale du cocktail, quels que soient le jour et l'heure du prélèvement dosé. La différence d'activité résultante peut être attribuée aux activités peroxydases qui représentent alors 93 % de l'activité enzymatique totale au maximum de production observé (J3\_15h). En comparant les activités LiP et MnP, il est même possible de préciser que *P. chrysosporium* produit systématiquement plus de MnP que de LiP au contact du rétentat 1 kDa. Pour exemple, la composition relative du cocktail enzymatique au maximum de production (J3\_15h) est illustrée en Figure 37.

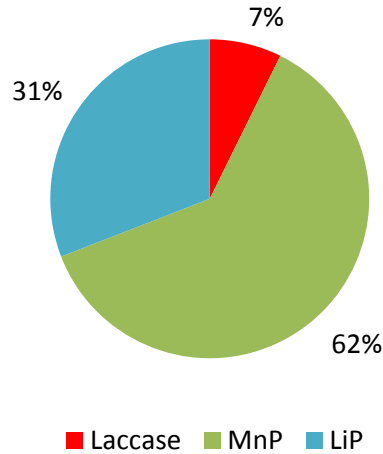


Figure 37 : composition relative du cocktail enzymatique au maximum de production (J3\_15h).

Comme évoqué au chapitre 1 du manuscrit (paragraphe 2.1.1), l'expression des gènes responsables de la production des enzymes lignolytiques est régulée par les conditions de culture du champignon. L'une des premières études rapportant la production de laccases par *P. chrysosporium* a mis en évidence l'importance de la source de carbone utilisée et démontré que les milieux à base de cellulose favorisent la sécrétion de ces enzymes (Srinivasan *et al.*, 1995). Le rétentat 1 kDa ne contenant pas de cellulose, cette observation pourrait expliquer en partie la faible production de laccases en FMS. Dans l'ensemble, les résultats de cette expérience s'alignent avec ceux de nombreuses études de la littérature rapportant une production majoritaire de MnP par *P. chrysosporium* au contact de biomasses lignocellulosiques en FMS (Arora *et al.*, 2002; Rodríguez Couto and Sanromán, 2005; Zhu *et al.*, 2016).

La quantité d'enzymes produite par ce système fermentaire, en revanche, est plutôt faible, voire très faible, comparativement aux données de la littérature. Bien qu'il soit délicat de comparer directement des valeurs de dosages enzymatiques (qui dépendent des conditions et du substrat utilisés), le Tableau 8 regroupe quelques résultats de production d'enzymes lignolytiques en FMS trouvés dans la littérature. Le champignon de pourriture blanche utilisé ainsi que la nature des substrats de FMS et de dosage y sont également mentionnés afin de garder ces résultats dans un minimum de contexte. De façon générale, ce tableau souligne la très grande variabilité de la production d'enzymes lignolytiques en FMS, de l'ordre de 1 à plusieurs centaines de U.g<sup>-1</sup> de matière sèche, en fonction du substrat, du champignon et des conditions opératoires utilisés.

Tableau 8 : exemples de production d'enzymes lignolytiques par des champignons de pourriture blanche en FMS ; lac = activité laccase, AV = alcool vératrique.

Référence :	Cette thèse	(Palma <i>et al.</i> , 2016)	(Gassara <i>et al.</i> , 2011)	(Boer <i>et al.</i> , 2004)
<b>Activité enzymatique</b>	Totale : 5,5 MnP : 1,8 LiP : 0,9 Lac : 0,4  U.g <sup>-1</sup>	Peroxydase versatile : 36	<u>Pomme :</u> MnP : 1287,5 LiP : 305 Lac : 789 <u>Drêches :</u> MnP : 792 LiP : 7,8 Lac : 841	MnP : 2600 LiP : < 10 Lac : <16
<b>Substrat du dosage</b>	Totale : ABTS MnP : DMP LiP : DMP Lac : ABTS	Perox : complexe Mn <sup>3+</sup> -tartrate	MnP : Mn <sup>3+</sup> LiP : AV Lac : ABTS	MnP : Mn <sup>3+</sup> - malonate LiP : AV Lac : ABTS
<b>Substrat de FMS</b>	Rétentat 1 kDa	Peaux de bananes	Marc de pommes séché ou drêches de brasserie	Rafles de maïs
<b>Espèce de pourriture blanche</b>	<i>Phanerocheate chryso sporium</i> RP78	<i>Pleurotus eryngii</i> IJFM 169	<i>Phanerocheate chryso sporium</i> ATCC24275	<i>Lentinula (Lentinus) edodes</i> CCB-42

La comparaison des résultats de cette expérience avec ceux de Gassara *et al.* qui utilisent également *P. chryso sporium* démontre la faible productivité du système fermentaire étudié dans le cadre de cette thèse. L'ordre de grandeur qui différencie les résultats de ces deux études ne peut, sans aucun doute, pas être attribué à une différence de protocole de dosage et relève d'une différence significative de production enzymatique. La faible production d'enzymes par *P. chryso sporium* au contact du rétentat 1 kDa s'explique très probablement par la très faible concentration en matière sèche et donc en substrat lignocellulosique du milieu de fermentation solide « artificiel » utilisé dans cette expérience. En effet, la solidification du rétentat 1 kDa dilué au 1/10 sous forme de géloses mène à la production d'un support solide beaucoup moins concentré et nutritif que les substrats solides utilisés dans les autres études de FMS.

En parallèle des dosages enzymatiques, une observation macroscopique des boîtes de fermentation a été réalisée en amont de chaque extraction (suivi photographique). La Figure 38 présente l'évolution macroscopique des boîtes de FMS sur les 7 jours d'expérimentation.

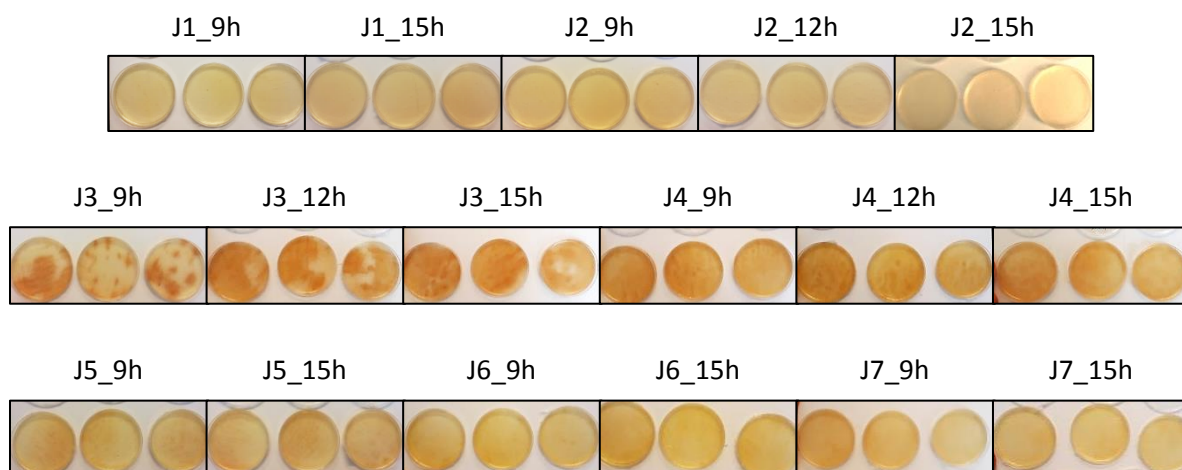


Figure 38 : photographies des triplicats biologiques de FMS prises avant chaque extraction de cocktail enzymatique sur les 7 jours d'expérimentation.

Cette observation a permis de mettre en évidence une coloration orangée des boîtes de Pétri corrélant parfaitement avec la production des enzymes lignolytiques. Des tâches orangées commencent à apparaître au jour 3 de la fermentation en même temps que sont produites les premières enzymes lignolytiques, puis elles se répandent progressivement à toute la surface des géloses pour les recouvrir entièrement lorsque la production d'enzymes est maximale (soit entre J3\_15h et J4\_9h). Ces photographies montrent également qu'il existe une variabilité entre les boîtes de FMS prélevées à un même temps t. Au troisième jour à 9h par exemple, la production des enzymes lignolytiques est déjà bien lancée pour la boîte la plus à gauche, dont la moitié de la surface de la gélose a déjà changé de couleur, alors que les deux autres boîtes ne sont qu'au début de leur virage et de leur production enzymatique. Cette variabilité explique les écarts types importants observés pour certains prélèvements lors des dosages enzymatiques. Il s'agit en effet de triplicats biologiques et non techniques.

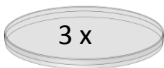



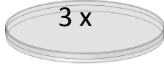
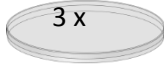
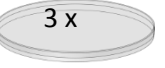
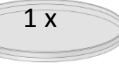
Finalement, cette étude a démontré qu'il est possible de produire un cocktail enzymatique, majoritairement composé de MnP et de LiP, par FMS de *P. chrysosporium* sur le rétentat 1 kDa dilué au 1/10. Afin de produire le cocktail enzymatique le plus concentré, il est important de maîtriser la cinétique de production de ces enzymes dont le pic maximal ne dure pas plus de quelques heures. L'observation macroscopique des boîtes de fermentation a permis de mettre en évidence une corrélation directe entre la production des enzymes lignolytiques et le changement de couleur du milieu nutritif. De ce fait, ce changement de couleur est un moyen très pratique de déterminer le moment le plus opportun pour l'extraction des boîtes de fermentation et la production du cocktail enzymatique.



### 2.3. EXPLORATION DES CONDITIONS DE FMS

Avant de passer aux essais de dépolymérisation en milieu liquide, des essais ont été réalisés afin d'explorer l'impact de certaines conditions opératoires de fermentation (concentration en spores de l'inoculum et pH des géloses nutritives) sur la production du cocktail enzymatique.

Tableau 9 : conditions opératoires de FMS étudiées pour la production du cocktail enzymatique par *P. chrysosporium*.

		Concentration de l'inoculum			
		$0,5 \cdot 10^5$ spores.mL <sup>-1</sup>	$2,5 \cdot 10^5$ spores.mL <sup>-1</sup>	$5,0 \cdot 10^5$ spores.mL <sup>-1</sup>	Non inocuées
pH du milieu	pH 4 (pH natif du rétentat)				
	pH 7				

Deux pH ainsi que trois concentrations en spores ont été étudiés comme présenté dans le Tableau 9. Les boîtes de FMS ainsi préparées ont été placées dans une enceinte climatique à 37 °C pendant 3 jours puis photographiées et extraites afin de doser leur activité enzymatique totale. Comme le montrent les photographies de la Figure 39, une contamination microbienne est survenue sur la boîte témoin des géloses à pH 7. Cette observation indique que la modification du pH du rétentat a également entraîné une modification de sa sélectivité. De ce fait, les résultats des FMS à pH 7 ne peuvent malheureusement pas être interprétés.

En ce qui concerne les boîtes à pH 4, la coloration des géloses varie en fonction de la quantité de spores utilisée pour un même temps d'incubation donné (3 jours). La coloration orangée commence à apparaître sur les boîtesensemencées avec  $0,5 \cdot 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> alors qu'elle s'est déjà propagée dans toute la gélose pour les boîtes à  $2,5$  et  $5,0 \cdot 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup>. Le changement de couleur des boîtes étant un indicateur visuel de la production d'enzymes lignolytiques, il semble donc que l'augmentation de la concentration de l'inoculum permet d'augmenter la quantité d'enzymes lignolytiques produites en FMS ou d'accélérer leur cinétique de production. Chaque boîte a donc par la suite été extraite et dosée afin de tenter de corréler la concentration de l'inoculum avec l'activité enzymatique totale du cocktail produit.

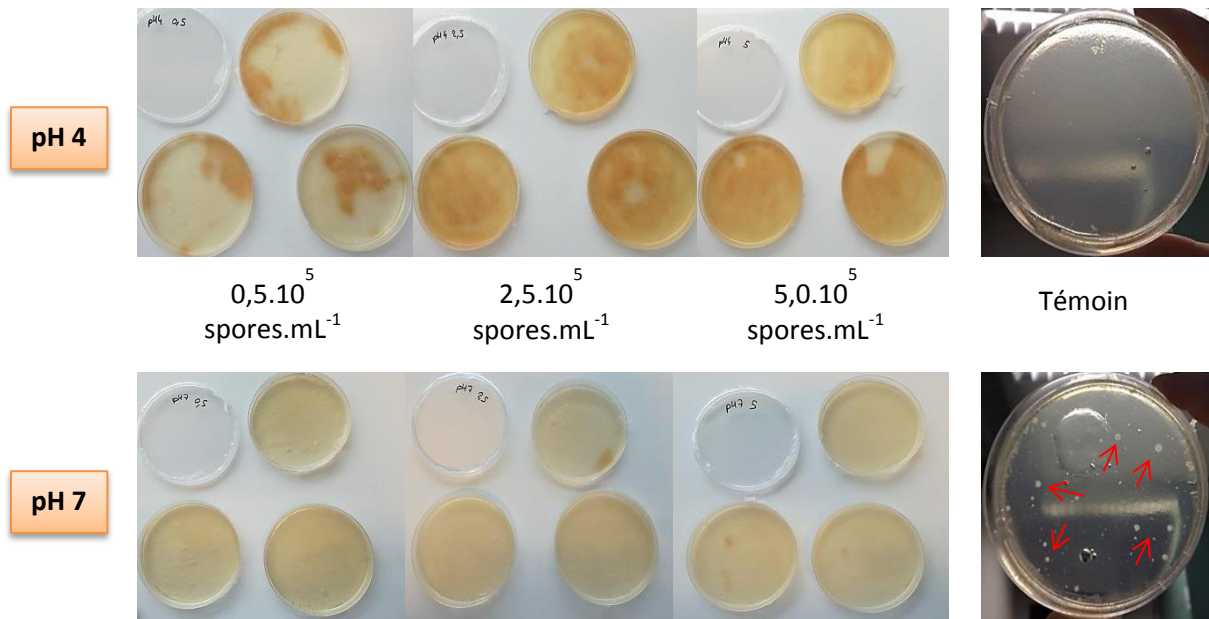


Figure 39 : photographies des boîtes de FMS à pH 4 et pH 7 après 3 jours d'incubation à 37 °C et de leur témoin de contamination.

Les résultats des dosages enzymatiques pour les boîtes à pH 4 sont présentés en vert sur la Figure 40. Cette quantification confirme que l'activité enzymatique totale du cocktail produit à partir d'un inoculum à  $2,5.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> est supérieure à celle obtenue avec un inoculum à  $0,5.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> à un même temps donné. En revanche, elle indique également que l'activité enzymatique du cocktail extrait des boîtes à  $5,0.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> est plus faible que celle du cocktail obtenu à partir des boîtes à  $2,5.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup>. Des précautions sont à prendre pour l'interprétation de ces résultats puisqu'il existe une limite à cette expérience qui ne permet pas, à elle seule, de déterminer si l'augmentation de l'activité enzymatique est due à une plus grande production d'enzymes lignolytiques ou à une accélération de leur cinétique de production. Dans le cas où la première explication serait la bonne, ces résultats indiqueraient qu'il existe une relation en forme de cloche entre la concentration de l'inoculum et la quantité d'enzymes lignolytiques produites. La concentration à  $2,5.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> serait alors optimale pour produire le cocktail le plus concentré en enzymes. Dans le cas de l'accélération de la cinétique, ces résultats s'expliqueraient par un simple décalage des boîtes en abscisse de la courbe cinétique de production des enzymes décrite au paragraphe 2.2 (Figure 36). La boîte à  $0,5.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> serait alors au début de sa phase de production (J3\_9h par exemple), la boîte à  $2,5.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> proche de son apogée (J3\_15h) et la boîte à  $5,0.10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> dans sa phase de déclin (J4\_15h).

Dans tous les cas, et quelle qu'en soit l'explication, l'augmentation de la concentration de l'inoculum de  $0,5$  à  $2,5 \cdot 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> a permis d'augmenter la quantité d'enzymes lignolytiques extraites pour un même temps de fermentation et donc d'améliorer la productivité de ce procédé. L'ensemencement des boîtes avec un inoculum à  $5,0 \cdot 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> permettrait peut-être encore d'améliorer cette productivité avec une extraction plus précoce du cocktail enzymatique. En revanche, cette hypothèse qui n'a pas été vérifiée. La concentration à  $2,5 \cdot 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> a été retenue pour la suite des expérimentations de dépolymérisation de la LTM en batch puis en bioréacteur.

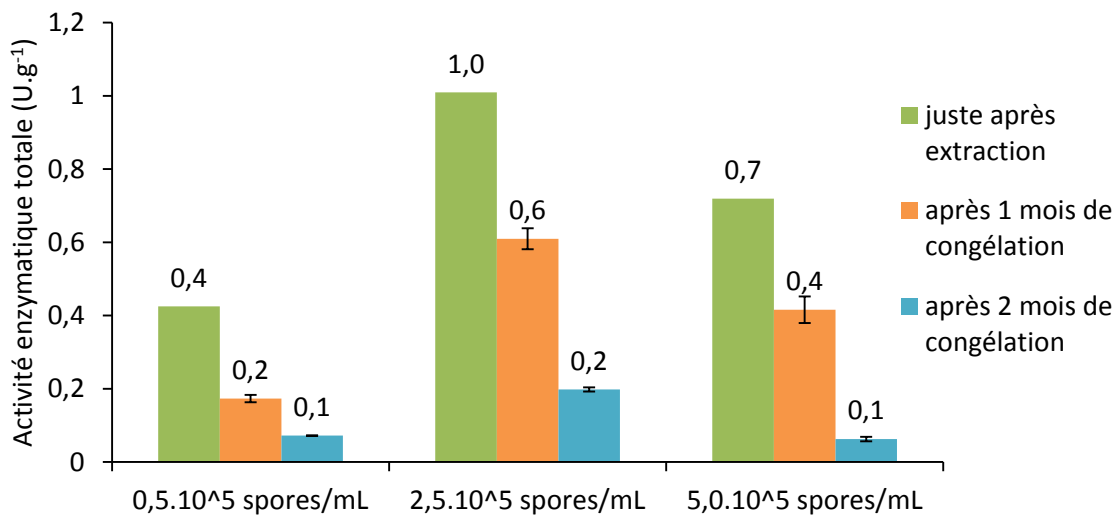


Figure 40 : évolution de l'activité enzymatique totale du cocktail produit par FMS en fonction de la concentration en spores de l'inoculum et du temps de congélation.<sup>1</sup>

Il est possible de noter que les activités enzymatiques totales obtenues lors de cette série de fermentation après 3 jours d'incubation sont beaucoup plus faibles que celle présentée au paragraphe 2.2 ( $5,5 \text{ U.g}^{-1}$  au jour 3). Cette grande différence s'explique en réalité par deux biais expérimentaux. D'une part, les protocoles de dosage n'ayant pas encore été standardisés, ces activités ont été mesurées à température ambiante soit à  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  alors que tous les autres essais de ce manuscrit ont été réalisés en conditions thermostatées à  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . D'autre part, une erreur a également été repérée dans la préparation du tampon servant à l'extraction du cocktail et aux dosages. Ces essais ne sont donc pas directement comparables aux autres productions enzymatiques, en revanche, les conclusions tirées à partir de la comparaison des activités enzymatiques au sein de cette même série restent parfaitement valides.

<sup>1</sup> Suite au manque de disponibilité du spectrophotomètre, les dosages enzymatiques n'ont pas pu être réalisés en triplicat le jour de l'extraction des cocktails, d'où l'absence de barres d'erreur.

Suite aux dosages, les trois extraits enzymatiques ont été congelés afin d'évaluer le potentiel de conservation des enzymes lignolytiques sur le long terme. L'activité enzymatique de chacun de ces extraits a de nouveau été dosée après 1 puis 2 mois de congélation. Les résultats de ces dosages sont donnés en orange et en bleu respectivement sur la Figure 40. Quelle que soit la concentration initiale du cocktail enzymatique, une diminution de l'activité totale est systématiquement observée après décongélation. Cette diminution s'accroît dans le temps et en moyenne 80 % de l'activité enzymatique des cocktails ont été perdus au bout de deux mois de congélation. Cela indique donc que la congélation du cocktail enzymatique n'est pas envisageable pour une conservation sur le long terme et qu'à relativement court terme (1 mois) elle ne permet pas non plus d'assurer une activité constante afin de répéter des expériences.

De ce fait, il a été préféré, pour tous les essais de dépolymérisation en milieu liquide, de produire un cocktail enzymatique de façon extemporanée avant chaque nouveau plan d'expérience. Pour ce faire, des FMS ont étéensemencées avec un inoculum à  $2,5 \cdot 10^5$  spores.mL<sup>-1</sup> et les boîtes extraites entre le 3<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour de fermentation en fonction de leur cinétique de coloration.

Les études présentées dans ce paragraphe 2.3 auraient pu être consolidées et complétées par exemple en réévaluant l'impact du pH sur la FMS après stérilisation du rétentat. Une étude cinétique de la production du cocktail dans les différentes conditions de fermentation aurait également permis de conclure sur le lien entre la concentration en spores de l'inoculum et la production enzymatique. Toutefois, l'optimisation de la production et de la conservation du cocktail n'étant pas une priorité dans ces travaux de thèse, il n'a pas été consacré plus de temps à ce sujet. Des travaux plus approfondis pourront être entrepris lorsque le cocktail enzymatique produit par *P. chrysosporium* au contact du rétentat 1 kDa aura fait ses preuves pour la dépolymérisation de la LTM en milieu liquide. La prochaine partie de ce chapitre se concentre donc sur cet objectif.

### 3. DEPOLYMERISATION DE LA LTM EN MILIEU LIQUIDE

#### 3.1. EXPLORATION DES CONDITIONS DE BIOCONVERSION EN BATCH

Dans un premier temps, des séries d'expériences ont été réalisées en batch afin d'étudier l'effet du cocktail enzymatique sur la LTM dans différentes conditions de bioconversion. Le cocktail enzymatique a été mélangé au rétentat 1 kDa liquide en milieu tamponné et des analyses par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) ont été réalisées sur des prélèvements réguliers afin d'observer l'évolution de la distribution de masses moléculaires de la LTM. Pour chaque condition étudiée, la réaction a été suivie sur 5 jours (120 h) avec des prélèvements à 30 min, 6 h, 24 h et 120 h afin de déterminer si la dépolymérisation de la lignine est un phénomène de l'ordre de quelques minutes, de quelques heures ou d'un à plusieurs jours. Le rétentat a été dilué dans les tubes de bioconversion avec du tampon à pH 4,5 de sorte à maintenir une concentration finale au 1/10. Toutes les conditions étudiées ont été réalisées en duplicat. Les tubes de bioconversion ont été incubés dans une enceinte climatique à 25 °C et sous agitation orbitale douce en s'appuyant sur des données de la littérature (Longe *et al.*, 2018; Picart *et al.*, 2017; Rakotovelo, 2017).

##### 3.1.1. Cocktail enzymatique seul et en présence de cofacteurs et médiateurs

Les premiers essais de dépolymérisation de la LTM en milieu liquide ont été réalisés en utilisant le cocktail enzymatique seul ou additionné de substrat, de cofacteur et de différents médiateurs. Les MnP et les LiP étant les principales enzymes produites par *P. chrysosporium*, l'effet de l'addition de peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$  = substrat des peroxydases) et de manganèse (Mn = cofacteur des MnP) sur l'activité du cocktail enzymatique a été évalué dans certains tubes. Deux médiateurs, l'ABTS et l'acide violurique (VA), ont également été étudiés pour orienter l'activité des laccases vers la dépolymérisation de la lignine. Le choix de ce cofacteur et de ces médiateurs ainsi que de leur concentration dans les tubes de bioconversion a été basé sur la publication des travaux de Longe *et al.* (2018). Les différentes conditions réalisées pour cette première série d'expériences (SE1) sont représentées ci-dessous en Figure 41.

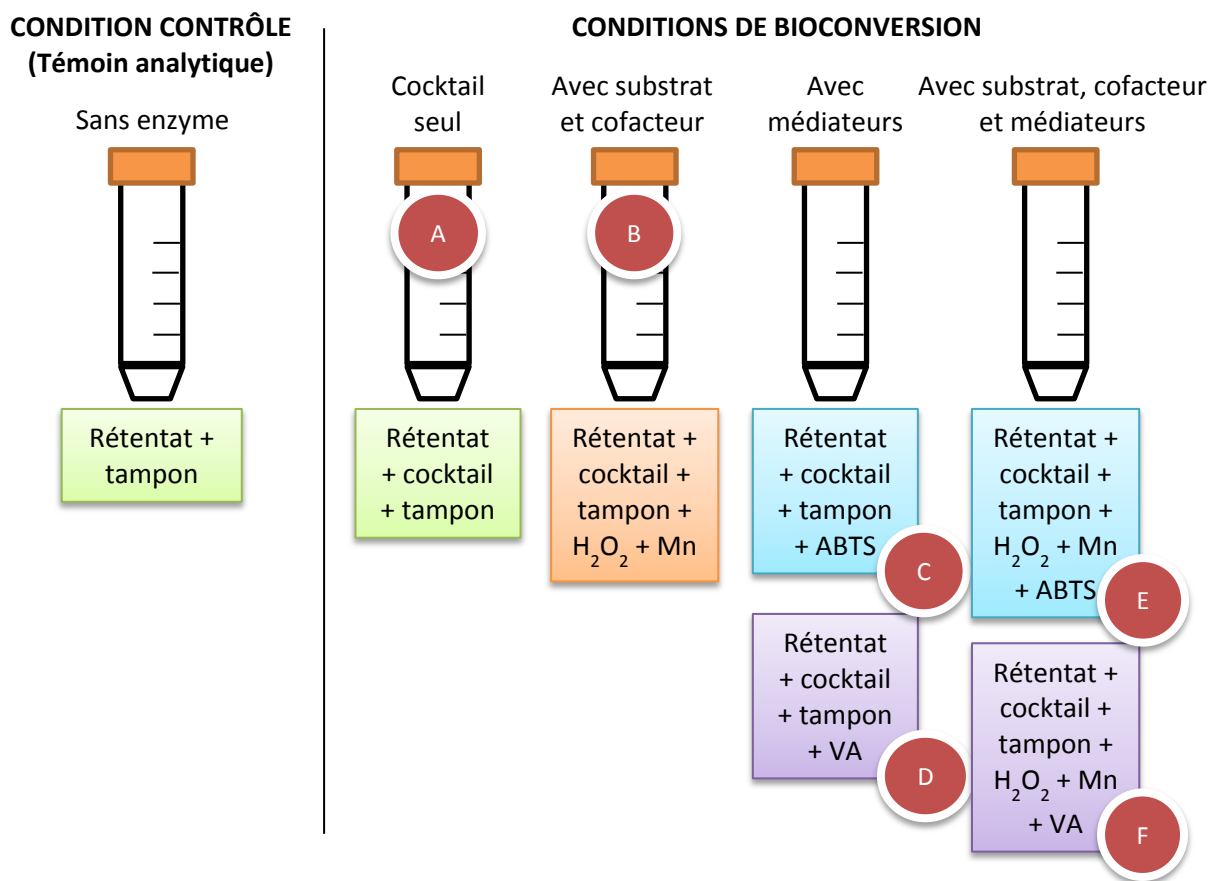


Figure 41 : témoin analytique et conditions de bioconversion étudiées dans le cadre de la première série d'expériences (SE1).

Les résultats des dosages enzymatiques du cocktail produit pour SE1 sont donnés dans le Tableau 10. Ce cocktail présente une activité enzymatique totale de 2,3 U.g<sup>-1</sup> avec une très faible activité laccase et une grande majorité de MnP comme attendu suite à l'étude cinétique de la FMS. L'activité totale est relativement faible comparativement à ce qu'il aurait été possible d'atteindre dans ce système fermentaire (soit au moins 5,5 U.g<sup>-1</sup>). Toutefois, ce résultat s'explique par une extraction trop précoce des boîtes de FMS qui n'en étaient qu'au début de leur changement de couleur. Pourtant, ces boîtes ont été extraites au bout de 4 jours de fermentation, la série d'expériences ne pouvant être plus retardée pour des raisons pratiques (le maximum de coloration aurait été atteint en fin de journée).

Un échantillon de ce cocktail a été placé dans l'enceinte climatique à côté des tubes de bioconversion afin de suivre l'évolution de son activité enzymatique sur les 5 jours de l'expérience. Les résultats de cette étude cinétique sont également donnés dans le Tableau 10. Ils permettent de démontrer que le cocktail enzymatique, dans les conditions de l'expérience, garde une activité constante sur toute la durée de la bioconversion.

Tableau 10 : activités enzymatiques du cocktail produit pour SE1.

	SE1 t = 0	SE1 t = 24 h	SE1 t = 120 h
<b>Activité enzymatique</b>			
<b>U.g<sup>-1</sup> de MS</b>			
Totale	2,3 ± 0,25	2,3 ± 0,20	2,4 ± 0,01
Laccase	0,1 ± 0,02		
LiP	0,3 ± 0,04		
MnP	1,0 ± 0,06		

Les résultats de SEC associés à ces conditions de bioconversion sont présentés en Figure 42. Tous les duplicats étant parfaitement identiques, une seule courbe a été tracée pour chaque heure de prélèvement afin de faciliter la lecture des résultats. Dans ces analyses, le signal enregistré par le détecteur UV à 280 nm est attribué à la LTM contenue dans le rétentat 1 kDa. Le témoin analytique, correspondant uniquement au rétentat 1 kDa dilué au 1/10, permet de décrire la distribution de masse initiale de la LTM avant les essais de bioconversion. Cette dernière est ainsi caractérisée par une distribution bimodale dont les masses moléculaires moyennes des deux pics majoritaires observés sont de 1 et 9 kDa (courbe noire sur chaque graphique).

Le graphique A présente les résultats obtenus lors de l'utilisation du cocktail enzymatique seul avec le rétentat 1 kDa. Il est possible d'y observer que tous les prélèvements effectués dans le temps pour cette condition de bioconversion sont caractérisés par des distributions de masses moléculaires parfaitement superposables entre-elles ainsi qu'avec celle du témoin. Il n'y a donc eu aucune modification de la LTM, en termes de masse, induite par le cocktail lignolytique seul.

Malheureusement, cette observation est également applicable à toutes les autres conditions étudiées dans cette série d'expérience. Les seules différences visibles entre tous les chromatogrammes sont dues à l'apparition des pics d'ABTS, sur les graphiques C et E, et de VA, sur les graphiques D et F, qui absorbent également en UV à 280 nm. En revanche, aucune évolution du signal associé à la LTM n'a été observée quelle que soit la condition étudiée. Le cocktail enzymatique n'a donc eu aucun effet sur la LTM, qu'il ait été employé seul ou additionné de substrat, de cofacteur et de médiateurs.

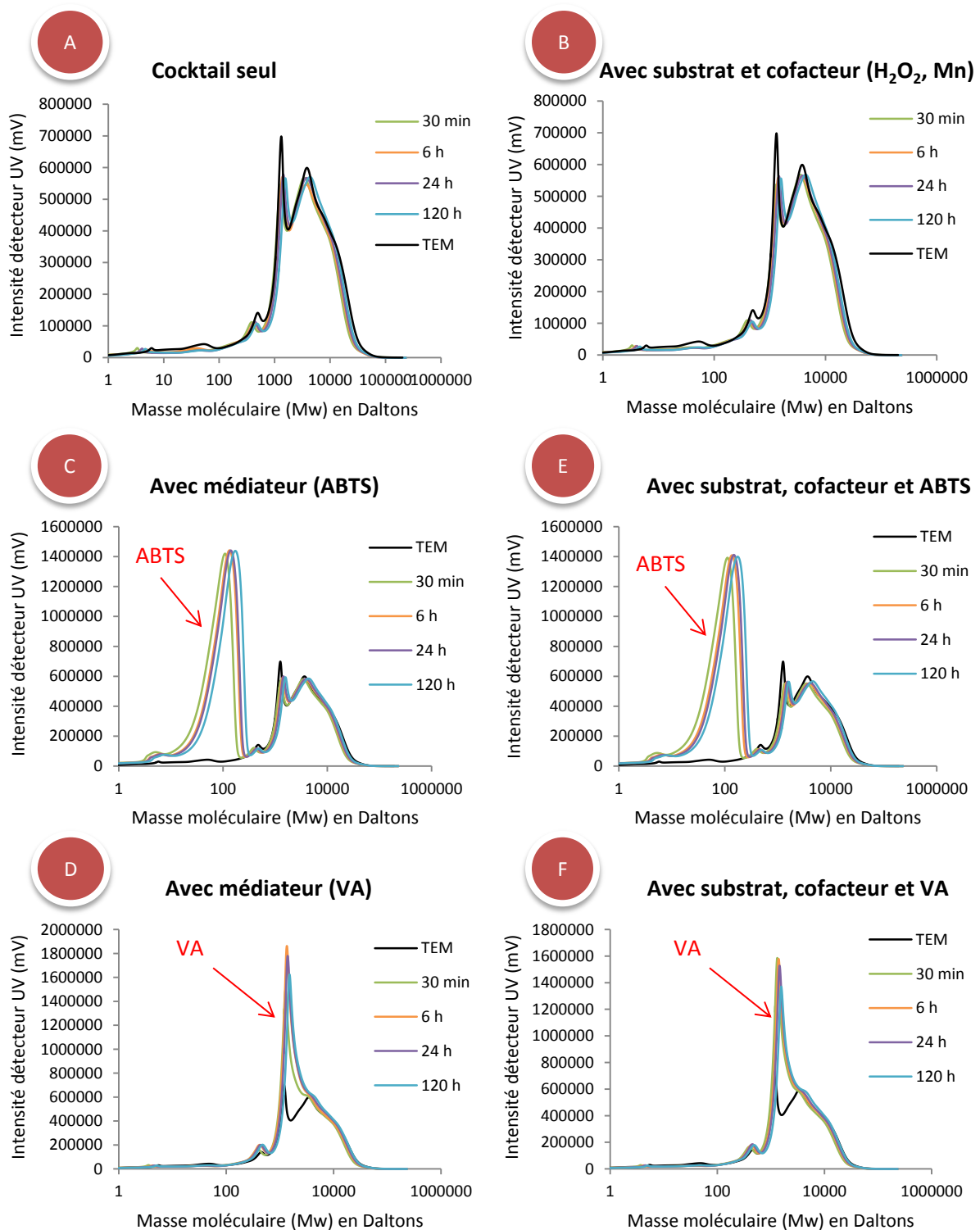


Figure 42 : résultats de SEC associés à la première série d'expériences (SE1) : effet du cocktail enzymatique sur la LTM et impact de l'addition de substrat (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), de cofacteur (Mn) et de médiateurs (ABTS, VA).



La très bonne reproductibilité des chromatogrammes de SEC souligne la fiabilité et la précision de cette analyse. En revanche, elle est surprenante puisqu'elle indique que les enzymes n'ont eu absolument aucune interaction avec la LTM, ni dépolymérisation, ni repolymérisation, comme s'il y avait eu un problème de contact enzymes-substrat. Il est vrai que la LTM en milieu liquide à pH 4,5 n'est pas soluble et forme une suspension. Ce manque de solubilité pouvant peut-être expliquer l'inactivité du cocktail dans ces conditions de bioconversion, une nouvelle série d'expériences a été conduite afin de vérifier cette hypothèse.

### 3.1.2. Amélioration de la solubilité de la LTM par addition de co-solvant

Pour tenter de résoudre le problème d'inactivité du cocktail précédemment observé, il a été décidé de reproduire certaines conditions de SE1 en y ajoutant 10 % d'isopropanol (IPA) en tant que co-solvant (Longe *et al.*, 2018). Cet ajout a pour but d'améliorer la solubilité de la LTM, l'addition de 10 % d'IPA dans une solution témoin de rétentat dilué au 1/10 dans du tampon ayant effectivement permis une diminution visible de la turbidité de la suspension.

Tableau 11 : activités enzymatiques du cocktail produit pour SE2.

	SE2 t = 0	SE2 t = 0 IPA	SE2 t = 24 h	SE2 t = 120 h
<b>Activité enzymatique</b>				
<b>U.g<sup>-1</sup> de MS</b>				
Totale	8,7 ± 0,29	7,7 ± 0,22	8,0 ± 0,25	6,8 ± 0,23
Laccase	0			
LiP	0,5 ± 0,03			
MnP	2,5 ± 0,15			

Un cocktail enzymatique a donc été de nouveau produit pour cette série d'expériences (SE2) et les résultats de ses dosages sont présentés dans le Tableau 11. Lors de cette FMS, il est important de souligner qu'aucune activité laccase n'a été détectée alors que l'activité enzymatique totale du cocktail est plutôt élevée pour ce système fermentaire (8,7 U.g<sup>-1</sup>). De ce fait, seules les conditions avec et sans substrat et cofacteur (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et Mn) ont été reproduites en présence ou non d'IPA pour ces nouveaux essais (Figure 43). Un dosage de l'activité enzymatique totale du cocktail a également été fait en présence de 10 % d'IPA. Cet essai montre que les enzymes lignolytiques restent fonctionnelles après l'ajout de ce co-solvant, bien que leur activité soit diminuée d'environ 11,5 % (7,7 U.g<sup>-1</sup>).

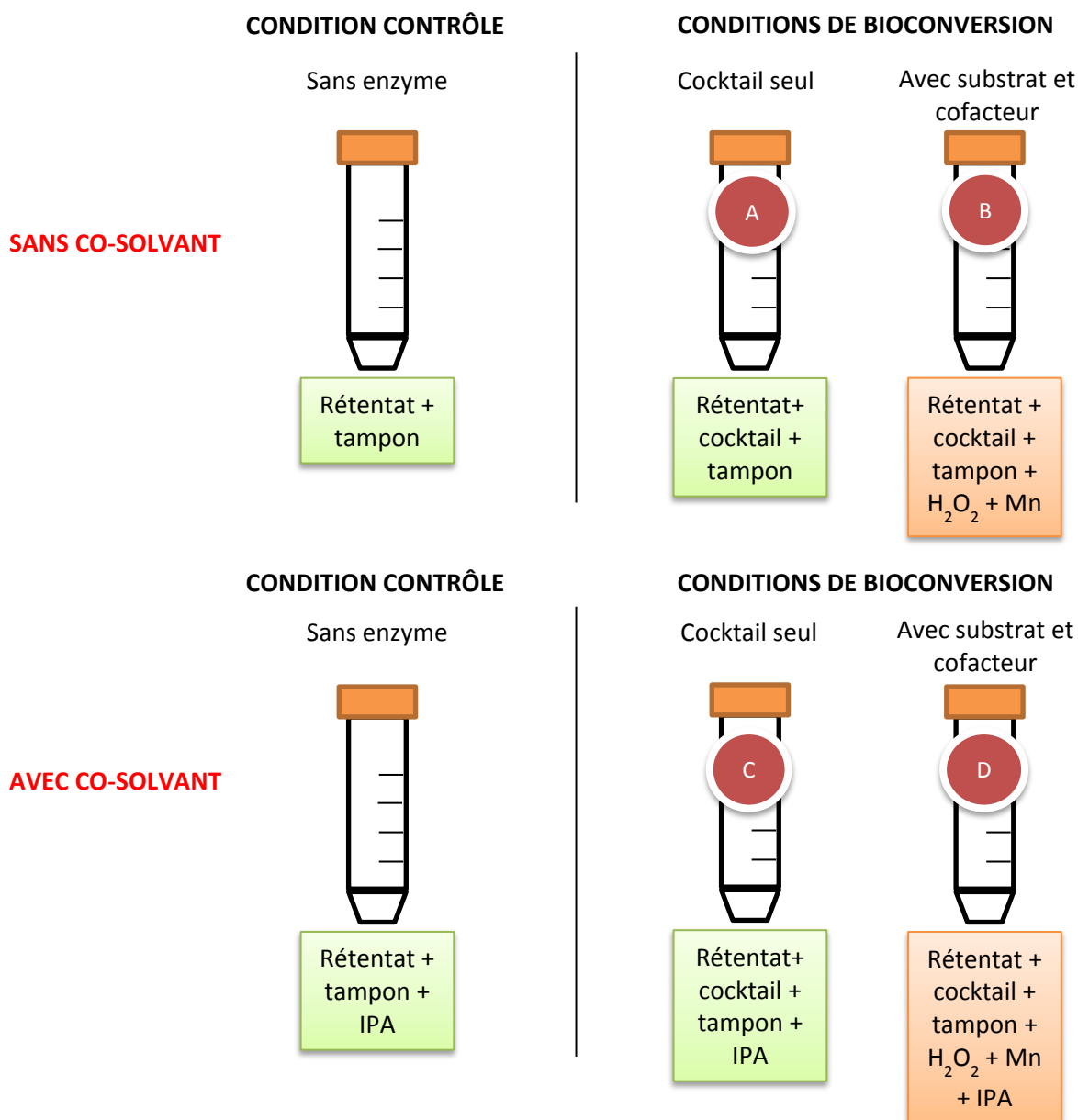


Figure 43 : témoins analytiques et conditions de bioconversion étudiées dans le cadre de la deuxième série d'expériences (SE2).

Pour cette série d'expériences, les tubes de bioconversion ont été incubés à 37 °C. Il a en effet été décidé de garder la même température que la FMS pour ces essais en milieu liquide, des températures d'environ 35°C ayant été rapportées dans la littérature comme optimales pour les peroxydases de *P. chrysosporium* (Coconi-Linares *et al.*, 2014; Couto *et al.*, 2006). Dans ces conditions, une diminution progressive de l'activité enzymatique totale a été observée sur les 120 h de l'expérience (Tableau 11). Malgré cela, l'activité lignolytique du cocktail est restée élevée jusqu'à la fin de l'expérience (6,8 U.g<sup>-1</sup> après 120 h à 37 °C).

Les résultats de SEC associés à ces conditions de bioconversion sont donnés en Figure 44. Une fois de plus, les duplicats étant parfaitement identiques, une seule courbe a été tracée pour chaque prélèvement afin de faciliter la lecture des résultats. Sur les 4 graphiques (A, B, C et D), les prélèvements de bioconversion présentent une réponse en UV légèrement supérieure à celle des témoins. Cette différence de réponse en intensité pourrait provenir de la présence de LTM dans le cocktail qui aurait été extraite des boîtes de FMS en même temps que les enzymes. En revanche, malheureusement, aucune différence de réponse liée à l'évolution du profil de distribution de masses moléculaires de la LTM n'a pu être observée dans les 4 conditions testées. Plus précisément, les 32 chromatogrammes obtenus lors de SE2 (en incluant les duplicats) sont parfaitement identiques et couvrent exactement la plage de masses initiale de la LTM. L'amélioration de la solubilité du substrat par addition de co-solvant n'a donc pas permis de remédier à l'inactivité du cocktail enzymatique sur la LTM en milieu liquide.

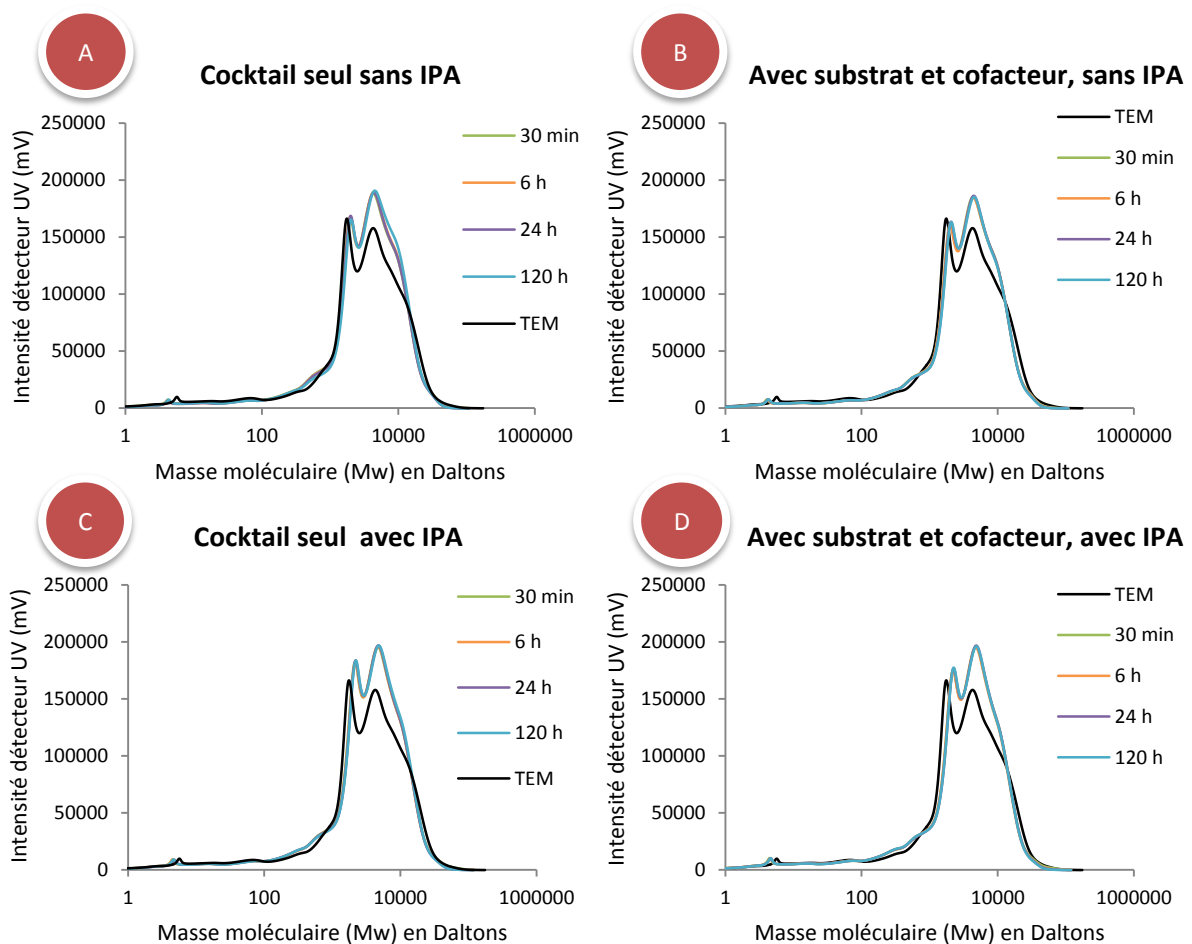


Figure 44 : résultats de SEC associés à la deuxième série d'expériences (SE2) : impact de l'addition co-solvant (10 % IPA) sur l'effet du cocktail enzymatique vis-à-vis de la LTM.

Une autre hypothèse visant à expliquer ce phénomène a alors été émise en remettant cette fois en question la stabilité des espèces radicalaires produites par les peroxydases dans les conditions expérimentales étudiées. En effet, comme expliqué au chapitre 1 de ce manuscrit (paragraphe 2.1.2.), la dépolymérisation de la lignine catalysée par des peroxydases passe par la production d'intermédiaires d'oxydation de type radicaux phényles ou ions  $Mn^{3+}$  qui diffusent ensuite pour attaquer la lignine. Hors, il a été rapporté dans la littérature que la présence d'acides organiques (malique, oxalique, tartrique, lactique, etc) dans le milieu est nécessaire à la stabilisation des ions  $Mn^{3+}$  en solution afin de prolonger leur demi-vie et de permettre leur activité d'oxydoréduction (Agathos, 2002; Hofrichter, 2002). Les MnP étant les enzymes majoritairement produites par *P. chrysosporium* au contact de la LTM, de nouveaux essais de dépolymérisation en milieu liquide ont été menés en présence d'acide oxalique afin de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse.

### 3.1.3. Modification de la composition du tampon

Un tampon oxalate à pH 4,5 a été préparé afin de remplacer le tampon phosphate-citrate pH 4,5 et de réitérer les essais de dépolymérisation de la LTM en présence de peroxyde d'hydrogène et de manganèse. Les conditions réalisées lors de cette troisième série d'expériences sont présentées en Figure 45.

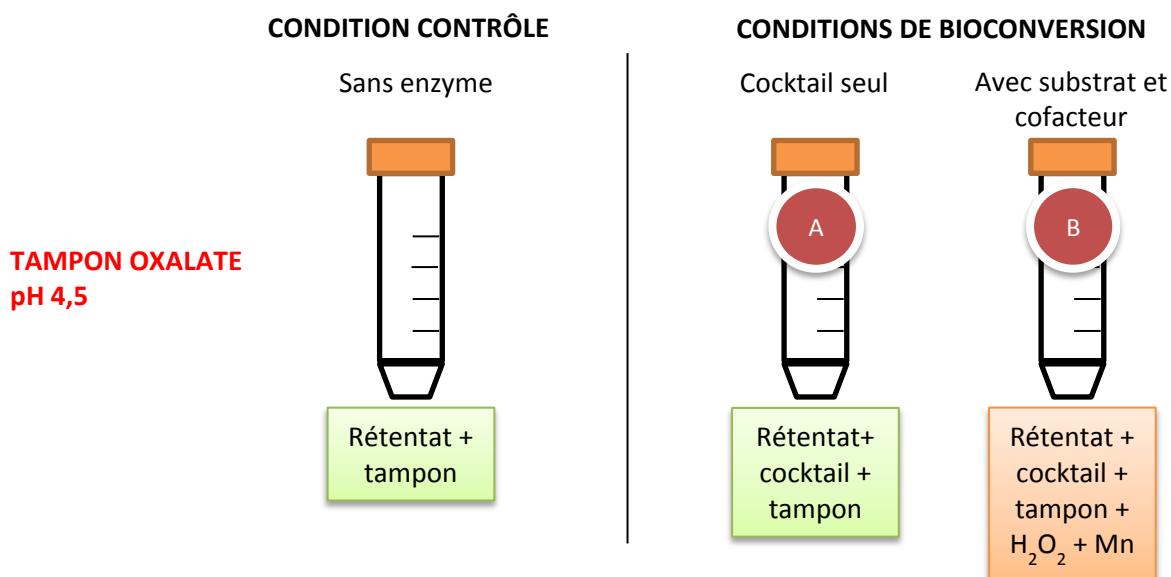


Figure 45 : témoins analytiques et conditions de bioconversion étudiées dans le cadre de la troisième série d'expériences (SE3).

Les résultats de SEC associés à ces conditions de bioconversion sont présentés en Figure 46. Cette fois encore, les duplicats étant parfaitement identiques, une seule courbe a été tracée pour chaque prélèvement afin de faciliter la lecture des résultats. Tout comme pour SE2, l'ensemble des prélèvements de bioconversion présentent une réponse plus intense en UV que le témoin analytique. Cette variation pourrait, une fois de plus, être liée à la présence de LTM dans le cocktail puisqu'il s'agit de la seule différence de composition entre les tubes de bioconversion et le témoin analytique.

Mis à part cette observation, tous les chromatogrammes obtenus dans ce plan d'expérience sont à nouveau parfaitement superposables entre eux et avec le témoin analytique en termes de distribution de masses moléculaires. L'addition d'acide oxalique n'a eu aucun effet sur la dépolymérisation de la LTM et le cocktail enzymatique produit par *P. chrysosporium* reste totalement inactif en milieu liquide dans les conditions testées.

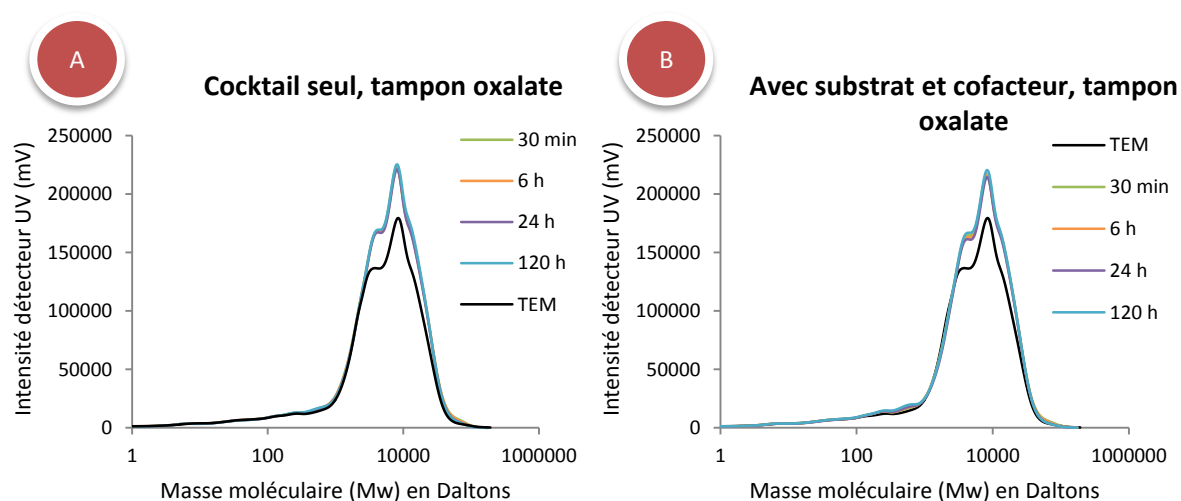


Figure 46 : résultats de SEC associés à la troisième série d'expériences (SE3) : effet du cocktail enzymatique sur la LTM en présence d'acide oxalique.

Il est intéressant de noter que pour cette série d'essais, le cocktail enzymatique produit par FMS présentait une activité enzymatique totale plutôt moyenne ( $3,0 \text{ U.g}^{-1}$ ), comme indiqué dans le tableau 12, mais surtout qu'il contenait à nouveau des laccases représentant environ 7 % de l'activité lignolytique totale ( $0,2 \text{ U.g}^{-1}$ ). Ainsi ni les peroxydases dans un tampon optimisé, ni les laccases n'ont eu d'effet sur la LTM en milieu liquide lors de cette série d'expérience.

Tableau 12 : activités enzymatiques du cocktail produit pour SE3.

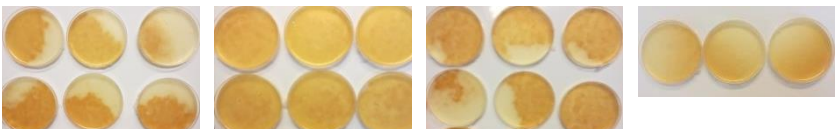
<b>SE3 t = 0 pH 4,5</b>		
<b>Activité enzymatique U.g<sup>-1</sup> de MS</b>	Totale	3,0 ± 0,30
	Laccase	0,2 ± 0,01
	LiP	0,1 ± 0,02
	MnP	0,3 ± 0,02

### **3.2. BILAN SUR LA DEPOLYMERISATION DE LA LTM EN MILIEU LIQUIDE AVEC LE COCKTAIL ENZYMATIQUE DE *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM***

Un cocktail enzymatique a été préparé avant chaque nouvelle série d'essais de dépolymérisation de la LTM en milieu liquide. Au cours de cette thèse, 4 cocktails ont été produits et dosés dans des conditions quasiment identiques. Le tableau 13 reprend les valeurs des activités enzymatiques obtenues pour chacun de ces cocktails.

Ce tableau récapitulatif permet de mettre en évidence la grande variabilité de la composition et de l'activité du cocktail enzymatique produit par FMS. En effet, une fois sur deux, le cocktail ne présente aucune activité laccase et son activité lignolytique totale peut aller du simple au double en fonction des lots de production. Deux paramètres de fermentation peuvent expliquer cette difficulté de reproductibilité. D'une part, chaque cocktail enzymatique résulte de l'extraction de plusieurs boîtes de FMS incubées en parallèle ce qui induit une forte variabilité biologique. Les boîtes de FMS photographiées lors de SE3 illustrent parfaitement ce propos. Sur 6 boîtes de fermentation, qui ont été produites etensemencées dans la même heure, une (en bas à gauche) commence à peine à changer de couleur tandis qu'une autre (en bas à droite) a déjà atteint son maximum de coloration. D'autre part, la cinétique de production enzymatique de *P. chrysosporium* au contact du rétentat 1 kDa est très rapide, de l'ordre de quelques heures. Ainsi la désynchronisation biologique des boîtes de FMS combinée à la courte durée de production des enzymes compliquent fortement le processus de standardisation de la FMS.

Tableau 13 : comparaison des différentes productions de cocktails enzymatiques par FMS.

	SE1 t = 0	SE2 t = 0	SE3 t = 0	SE4 t = 0	
	Totale	2,3 ± 0,25	8,7 ± 0,29	3,0 ± 0,30	3,5 ± 0,06
<b>Activité enzymatique U.g<sup>-1</sup> de MS</b>	Laccase	0,1 ± 0,02	0	0,2 ± 0,01	0
	LiP	0,3 ± 0,04	0,5 ± 0,03	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,06
	MnP	1,0 ± 0,06	2,5 ± 0,15	0,3 ± 0,02	1,3 ± 0,07
<b>Température de dosage</b>	TA (20 °C)	30 °C	30 °C	30 °C	
<b>pH tampon extraction</b>	4,5	4,5	4,5	4,5	
<b>Jour d'extraction FMS</b>	J4	J4	J4	J3	
<b>Exemples de boîtes FMS avant extraction</b>					

Le deuxième point important à aborder concerne l'inactivité des enzymes lignolytiques. En effet, malgré les différents essais réalisés et les tentatives d'optimisation du milieu de bioconversion de la LTM en milieu liquide, aucune activité du cocktail produit en FMS par *P. chrysosporium* n'a pu être mise en évidence. Certaines hypothèses visant à expliquer ce phénomène ont déjà été avancées dans ce chapitre et expérimentalement écartées. En revanche, d'autres paramètres peuvent encore être mis en cause et discutés.

Dans nos différents essais de bioconversion, les quantités d'enzymes introduites par tube rapportées à la masse de lignine présente en solution sont comparables à celles publiées par Longe *et al.* (2018) lors de leurs essais de dépolymérisation de lignines par un cocktail enzymatique maison de *Grammothele fuligo* et des enzymes commerciales (Tableau 14). Hors, ces ratios enzyme-substrat ont été suffisants pour leur permettre d'observer *in-vitro* une évolution de la masse moléculaire moyenne de leurs différentes lignines. Ainsi, les ratios enzyme-substrat utilisés dans nos expériences ne permettent pas non plus d'expliquer l'inactivité du cocktail enzymatique.

Tableau 14 : comparaison des conditions de bioconversion avec la littérature.

	Cette thèse	(Longe <i>et al.</i> , 2018)	
Activité enzymatique U.g <sup>-1</sup> lignine	Laccase	0,1-1	0,2-6
	LiP	0,4-2,8	0,6-1,2
	MnP	1,1-14,4	0,4-5
Volume réactionnel (mL)	20	5	

En revanche, le volume réactionnel des expériences de Longe *et al.* est 4 fois plus faible que celui de nos tubes de bioconversion. L'inactivité du cocktail pourrait alors être due à une trop grande dilution du système enzymes-substrat dans nos conditions. Malheureusement, les contraintes imposées par la production d'enzymes en FMS et par la faible concentration du rétentat 1 kDa (2,58 % de MS dont 23 % de lignine soit environ 12 mg de LTM par millilitre) n'ont pas permis d'envisager la réduction du volume réactionnel afin de vérifier cette hypothèse. Cette voie d'optimisation restera donc intéressante à étudier dans le cadre de recherches complémentaires sur la dépolymérisation de la LTM par ce cocktail enzymatique.

Enfin, pour conclure cette discussion sur l'efficacité du cocktail produit par *P. chrysosporium*, il est intéressant de mentionner qu'un effet de ces enzymes lignolytiques sur la LTM a pu être démontré à plusieurs reprises, dans le cadre de cette thèse, en milieu solide (annexe 1). Les peroxydases de *P. chrysosporium* sont donc bel et bien capables d'agir sur la LTM, même s'il n'a pas été possible de reproduire cet effet en milieu liquide. Les contraintes mécaniques liées à la dépolymérisation en milieu liquide (submersion, agitation, oxygénation) pourraient alors également expliquer l'inhibition des enzymes lignolytiques dans les tubes de bioconversion.



#### 4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE 4

Ce chapitre de résultats a permis de démontrer que le rétentat 1 kDa solidifié sous forme de gélose est un milieu nutritif adapté à la croissance de *P. chrysosporium* et suffisamment sélectif pour ne pas nécessiter de stérilisation préalable à son utilisation. Ce milieu permet également d'induire la production d'enzymes lignolytiques par ce champignon de pourriture blanche et plus particulièrement celle de manganèse-péroxydases. En revanche, la quantité d'enzymes produites, et donc pouvant être extraite de ce milieu de fermentation solide, s'est avérée très faible comparativement aux données de la littérature. Il ne s'agit donc pas d'un milieu optimisé pour la production à haut rendement d'enzymes lignolytiques.

Toutefois, les enzymes ainsi produites ont pu être utilisées dans le cadre de cette thèse pour catalyser des essais de dépolymérisation de la LTM en milieu liquide. Différentes conditions de bioconversion ont été explorées, malheureusement, aucune d'entre elle n'a permis de démontrer une quelconque activité du cocktail enzymatique de *P. chrysosporium* sur la LTM. Une grande variabilité de la production du cocktail enzymatique par FMS a également été soulignée bien que les conditions opératoires aient été standardisées. De ce fait, même si des conditions favorables à la dépolymérisation de la LTM venaient à être identifiées, il serait complexe d'assurer la reproductibilité de ces résultats. Ainsi, pour poursuivre les travaux de cette thèse, il a été décidé de s'orienter vers un catalyseur commercial dont la composition et l'activité constantes permettent d'assurer la reproductibilité des résultats générés. Puisque les peroxydases de *P. chrysosporium* n'ont présenté aucun effet sur la LTM en milieu liquide, une laccase fongique a été utilisée afin de comparer l'activité de ces deux familles d'enzymes. Les résultats de dépolymérisation de la LTM par cette laccase commerciale sont présentés au chapitre suivant.

## 5. REFERENCES

- Agathos, B.V.A., S. (2002). Implication of manganese (III), oxalate, and oxygen in the degradation of nitroaromatic compounds by manganese peroxidase (MnP). *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 345–351.
- Arora, D.S., Chander, M., and Gill, P.K. (2002). Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation* 50, 115–120.
- Boer, C.G., Obici, L., Souza, C.G.M. de, and Peralta, R.M. (2004). Decolorization of synthetic dyes by solid state cultures of *Lentinula (Lentinus) edodes* producing manganese peroxidase as the main ligninolytic enzyme. *Bioresource Technology* 94, 107–112.
- Coconi-Linares, N., Magaña-Ortíz, D., Guzmán-Ortiz, D.A., Fernández, F., Loske, A.M., and Gómez-Lim, M.A. (2014). High-yield production of manganese peroxidase, lignin peroxidase, and versatile peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 9283–9294.
- Couto, S.R., Moldes, D., and Sanromán, M.A. (2006). Optimum stability conditions of pH and temperature for ligninase and manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Application to in vitro decolorization of Poly R-478 by MnP. *World J Microbiol Biotechnol* 22, 607–612.
- Gassara, F., Brar, S.K., Tyagi, R.D., John, R.P., Verma, M., and Valero, J.R. (2011). Parameter optimization for production of ligninolytic enzymes using agro-industrial wastes by response surface method. *Biotechnol Bioproc E* 16, 343–351.
- Hofrichter, M. (2002). Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enzyme and Microbial Technology* 30, 454–466.
- Longe, L., Couvreur, J., Leriche Grandchamp, M., Garnier, G., Allais, F., and Saito, K. (2018). Importance of mediators for lignin degradation by fungal laccase. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 8, 10097-10107.
- Palma, C., Lloret, L., Sepúlveda, L., and Contreras, E. (2016). Production of versatile peroxidase from *Pleurotus eryngii* by solid-state fermentation using agricultural residues and evaluation of its catalytic properties. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 46, 200–207.
- Picart, P., Liu, H., Grande, P.M., Anders, N., Zhu, L., Klankermayer, J., Leitner, W., Domínguez de María, P., Schwaneberg, U., and Schallmey, A. (2017). Multi-step biocatalytic depolymerization of lignin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 6277–6287.
- Rakotoveloa, A. (2017). Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phenoliques. LCPO Université de Bordeaux.
- Rodríguez Couto, S., and Sanromán, M.A. (2005). Application of solid-state fermentation to ligninolytic enzyme production. *Biochemical Engineering Journal* 22, 211–219.

Sarnthima, R., Khammuang, S., and Svasti, J. (2009). Extracellular ligninolytic enzymes by *Lentinus polychrous* Lév. under solid-state fermentation of potential agro-industrial wastes and their effectiveness in decolorization of synthetic dyes. *Biotechnol Bioproc E* 14, 513–522.

Srinivasan, C., Dsouza, T.M., Boominathan, K., and Reddy, C.A. (1995). Demonstration of Laccase in the White Rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4274–4277.

Zhu, N., Liu, J., Yang, J., Lin, Y., Yang, Y., Ji, L., Li, M., and Yuan, H. (2016). Comparative analysis of the secretomes of *Schizophyllum commune* and other wood-decay basidiomycetes during solid-state fermentation reveals its unique lignocellulose-degrading enzyme system. *Biotechnology for Biofuels* 9.

# Chapitre 5



## CHAPITRE 5 / BIOCONVERSION DE LA LIGNINE

### THERMOMECHANIQUE PAR UNE LACCASE COMMERCIALE

#### D' *ASPERGILLUS SP.*

#### 1. CONTEXTE ET OBJECTIFS DU CHAPITRE 5

L'absence ou la très faible présence de laccases dans le cocktail enzymatique « maison », produit par fermentation solide de la LTM avec *P. chrysosporium*, a été mise en évidence au chapitre précédent par dosage spectrophotométrique. Puisque le rôle exact des différentes familles d'enzymes fongiques n'a toujours pas été élucidé, comme discuté au chapitre 1 (paragraphe 2.1.1.), des essais de bioconversion de la LTM en milieu liquide ont été effectués avec une laccase commerciale. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus avec les peroxydases de *P. chrysosporium* pour tenter d'apporter de nouvelles connaissances à ce sujet.

La laccase commerciale, utilisée dans ce chapitre, a été extraite d'une culture de champignons génétiquement modifiés du genre *Aspergillus*. L'activité de cette enzyme a, dans un premier temps, été étudiée sur un substrat modèle dans différentes conditions de bioconversion (pH, température, agitation) afin d'orienter le choix des paramètres opératoires lors de dépolymérisation de la LTM. Plusieurs essais ont ensuite été réalisés avec la laccase et la LTM en batch, comme au chapitre précédent, pour étudier l'impact de l'addition de médiateurs ou de co-solvant sur l'efficacité de la bioconversion. Enfin, les conditions de bioconversion les plus intéressantes en batch ont été reproduites en réacteur membranaire pour catalyser la dépolymérisation de la LTM et permettre l'extraction continue des fragments de lignine de faibles masses moléculaires. L'ensemble des résultats obtenus avec la laccase d'*Aspergillus sp.* est présenté dans ce chapitre.

## 2. DEPOLYMERISATION EN BATCH DE LA LTM

### 2.1. ETUDE DE L'ACTIVITE DE LA LACCASE D'ASPERGILLUS SP.

L'activité enzymatique de la laccase commerciale a été mesurée avec un substrat modèle (ABTS) à différents pH et différentes températures afin d'évaluer les plages de valeurs envisageables pour le choix des paramètres de bioconversion de la LTM.

L'évolution de l'activité enzymatique de la laccase en fonction du pH (3-8), mesurée à une température constante de 30 °C, est présentée en Figure 47A. L'ensemble des dosages a été réalisé en triplicat et les écart-types obtenus sont affichés pour chaque condition. Ces données montrent que la laccase d'*Aspergillus sp.* est active sur une grande plage de pH puisqu'une activité enzymatique a pu être détectée pour chaque valeur de pH étudiée. Toutefois, cette enzyme présente un pH optimum autour de 4 et son activité chute fortement au-dessus de pH 6. Il est donc plutôt recommandé d'utiliser cette enzyme à des valeurs de pH comprises entre 3 et 6.

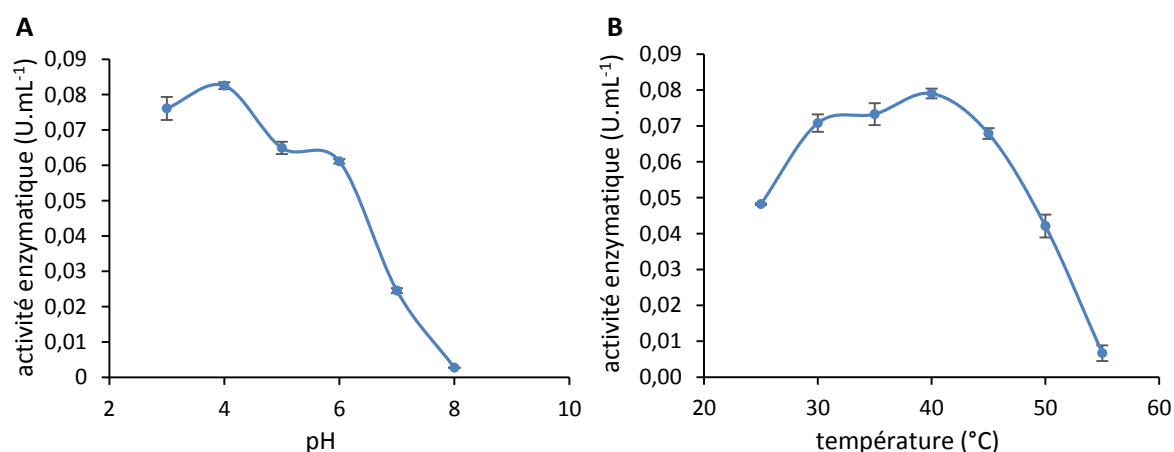


Figure 47 : évolution de l'activité enzymatique de la laccase d'*Aspergillus sp.* (A) à 30°C en fonction du pH puis (B) à pH 4 en fonction de la température.

L'évolution de l'activité enzymatique de la laccase en fonction de la température a donc ensuite été étudiée à pH 4. Les résultats obtenus pour des températures allant de 25 à 55 °C sont présentés en Figure 47B. La laccase commerciale est également active sur une large gamme de températures. La courbe obtenue présente une allure en forme de cloche légèrement aplatie avec une activité maximale maintenue sur un plateau allant de 30-45 °C. Il est toutefois recommandé d'éviter de travailler à des températures supérieures à 50 °C, température à partir de laquelle l'activité de la laccase est fortement diminuée.

## 2.2. EXPLORATION DES CONDITIONS DE BIOCONVERSION EN BATCH

Ces premiers essais de bioconversion en batch doivent permettre de déterminer les conditions opératoires dans lesquelles la laccase d'*Aspergillus sp.* présente une activité sur la LTM. Suite aux différentes réflexions menées au chapitre 4, l'addition de co-solvant pour l'amélioration de la solubilité de la LTM et l'addition de médiateurs (ABTS et VA) pour orienter l'activité laccase vers la dépolymérisation de la lignine ont été directement intégrées à cette série d'expériences avec la laccase d'*Aspergillus sp.* et le rétentat 1 kDa. Les différentes conditions opératoires étudiées sont résumées en Figure 48.

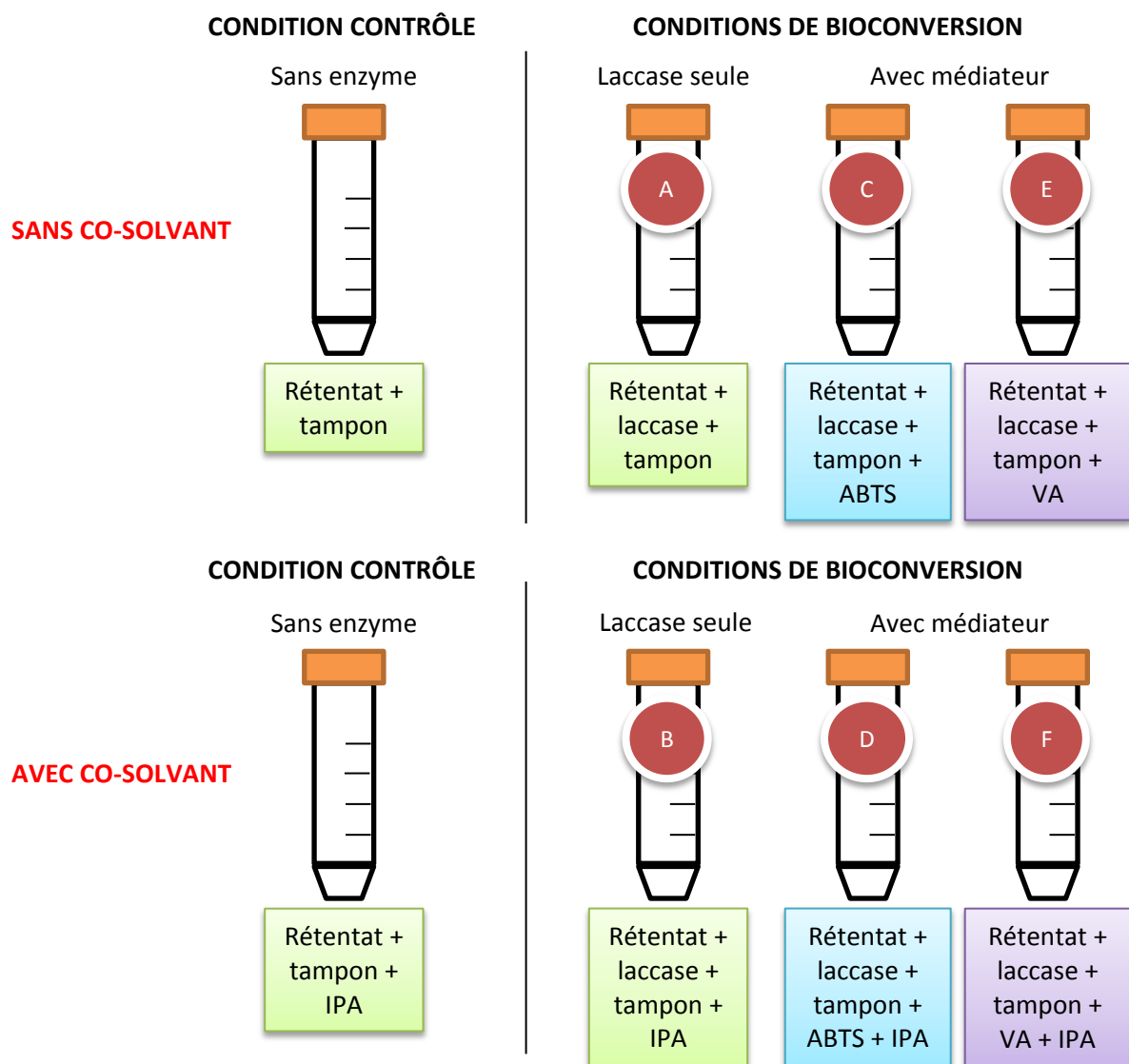


Figure 48 : témoins analytiques et conditions de bioconversion étudiées avec la laccase d'*Aspergillus sp.* et le rétentat 1 kDa.



Le choix des médiateurs (ABTS et VA), du co-solvant (IPA), du ratio enzyme-substrat ( $6 \text{ U.g}^{-1}$ ) et du ratio lignine-médiateur ( $1 : 1 \text{ en mol.L}^{-1}$ ) a été fait en suivant les données publiées par Longe *et al.* (2018). Les conditions d'agitation (200 rpm), de pH (4,5) et de température ( $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ) utilisées au chapitre précédent avec les enzymes de *P. chrysosporium* ont été conservées pour cette série d'expérience afin de pouvoir comparer les résultats. Ces paramètres sont compatibles avec les plages d'utilisation de la laccase commerciale (paragraphe 2.1) et les données de la littérature sur les laccases (Picart *et al.*, 2017; Rakotovelo, 2017). Tout comme au chapitre 4, des analyses en SEC ont été réalisées sur des prélèvements réguliers afin d'observer l'évolution de la LTM en termes de masse moléculaire. Pour chaque condition étudiée, la réaction a été suivie sur 5 jours (120 h) avec des prélèvements à 30 min, 6 h, 24 h et 120 h. Le rétentat a été dilué dans les tubes de bioconversion de sorte à maintenir une concentration finale au 1/10. Toutes les conditions étudiées ont été réalisées en duplicat.

Un dosage enzymatique de la solution de laccase utilisée pour cette série d'essais a été réalisé en présence de 10 % d'IPA. Aucun effet de l'addition de ce co-solvant sur l'activité enzymatique de la laccase n'a alors été observé ( $0,071 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,001$  sans IPA et  $0,074 \text{ U.mL}^{-1} \pm 0,001$  avec IPA). Les essais avec et sans IPA sont donc directement comparables.

Les résultats de SEC obtenus avec la laccase d'*Aspergillus sp.* sont présentés en Figure 49. Tous les duplicats étant parfaitement identiques, une seule courbe a été tracée pour chaque heure de prélèvement afin de faciliter la lecture des résultats. Comme expliqué au chapitre précédent, le signal enregistré par le détecteur UV à 280 nm est attribué à la LTM contenue dans le rétentat 1 kDa. Le témoin analytique permet ainsi de décrire la distribution de masse initiale de la LTM avant les essais de bioconversion. Cette dernière est à nouveau caractérisée par une distribution bimodale dont les masses moléculaires moyennes des deux pics majoritaires observés sont de 1 et 9 kDa (courbe noire sur chaque graphique).

De façon générale, il est possible d'observer sur ces 6 graphiques une déformation progressive du signal associé à la LTM vers la droite au cours de la bioconversion. Cette évolution correspond à une augmentation de sa masse moléculaire moyenne au cours du temps et donc à la production de molécules de lignines de plus hautes masses moléculaires que celles initialement présentes en solution. Cette première observation souligne que, quelles que soient les conditions de bioconversion étudiées pour cette série d'expériences, la laccase d'*Aspergillus sp.* a systématiquement mené à la condensation de la LTM.

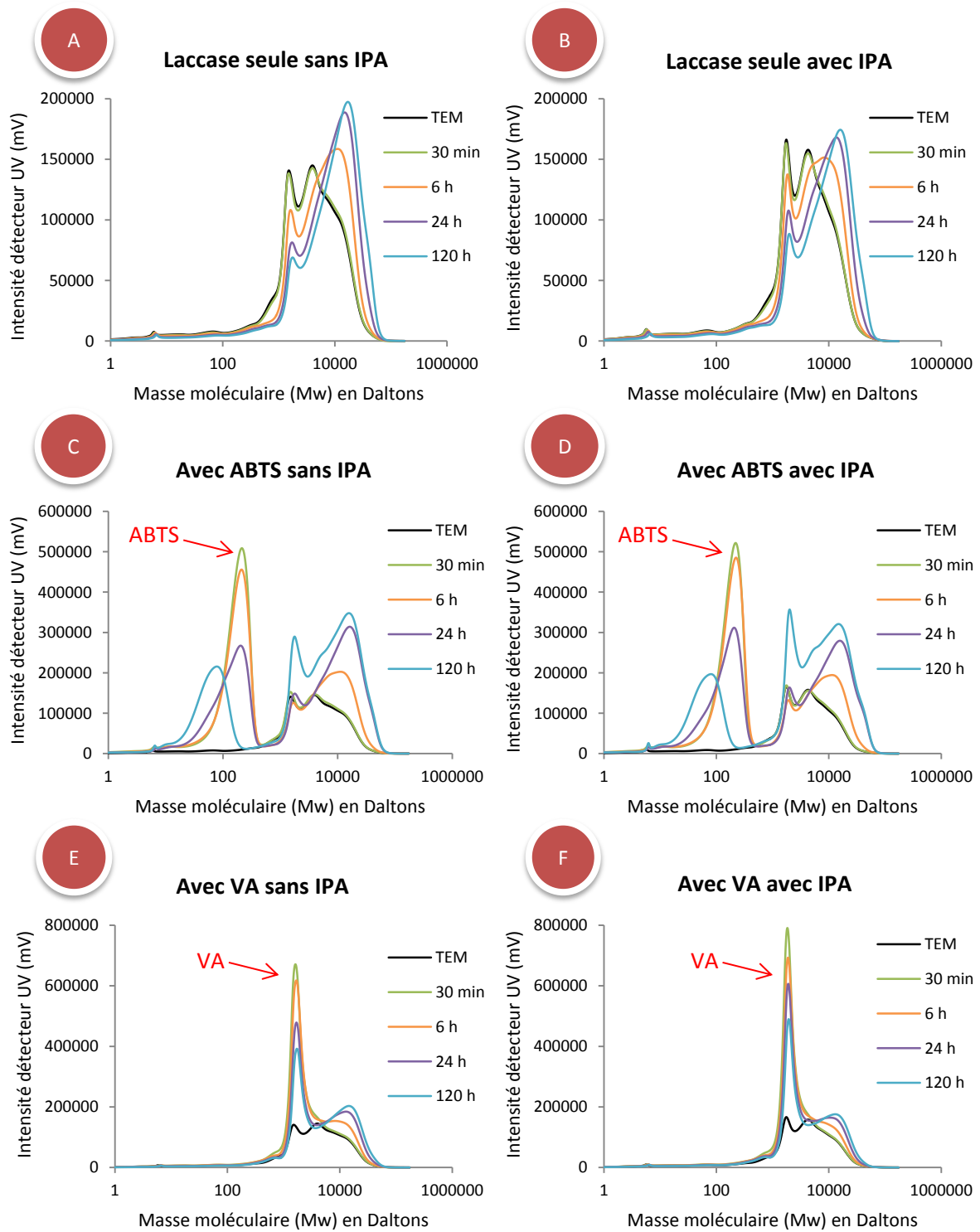


Figure 49 : résultats de SEC obtenus avec la laccase d'*Aspergillus sp.* : effet de la laccase seule, en présence de médiateurs ou avec un co-solvant sur la LTM.

De façon toute aussi générale, il est également possible de noter que tous les résultats obtenus avec et sans IPA (colonne de gauche vs colonne de droite) sont parfaitement identiques entre eux en termes d'évolution des distributions de masses moléculaires. L'amélioration de la solubilité du rétentat n'est donc pas nécessaire puisque la laccase présente la même efficacité sur la LTM avec et sans co-solvant. Dans la suite des interprétations, seuls les résultats sans IPA sont de ce fait commentés.

En comparant plus finement l'évolution du profil de la LTM entre le graphique A et le graphique C, c'est-à-dire en présence ou non d'ABTS, une différence peut être observée au niveau des mécanismes d'oxydation impliqués dans sa condensation. Lorsque la laccase est utilisée seule (graphique A), l'intensité de réponse des deux pics majoritaires de la LTM diminue progressivement et simultanément au profit de celle d'une troisième population de lignines de masses moléculaires plus élevées. Dans cette condition, la condensation de la LTM s'explique donc par la polymérisation des molécules de lignine entre elles (1 et 9 kDa) suite à leur oxydation par la laccase. Lorsque de l'ABTS est ajouté au milieu de bioconversion, ce dernier est préférentiellement oxydé par la laccase grâce à son très faible potentiel redox ( $E^0 = 0,69 \text{ V}$ ) (Hilgers *et al.*, 2018). L'ABTS oxydé joue ensuite le rôle de médiateur dans la condensation de la LTM. Ce processus s'accompagne d'un transfert d'intensité du pic d'ABTS, qui diminue progressivement, vers le signal de la LTM, qui augmente d'abord au niveau du pic à 9 kDa puis à partir de 24 h au niveau du pic à 1 kDa. Cette observation indique que l'ABTS est consommé par les réactions de polymérisation et qu'il se greffe probablement aux molécules de lignine condensées. L'addition covalente de molécules ou de fragments d'ABTS a effectivement déjà été rapportée dans la littérature lors de l'oxydation d'une molécule modèle de lignine par une laccase fongique (Hilgers *et al.*, 2018). Les structures des produits de réaction obtenus dans cette étude sont représentées en Figure 50. La production de fragments d'ABTS de plus petite taille moléculaire expliquerait également l'élargissement de son signal vers la gauche dans nos conditions de bioconversion. Ainsi, d'après le graphique C et les données de la littérature, la condensation de la LTM s'accompagnerait également de sa fonctionnalisation en présence d'ABTS.

Les mécanismes d'oxydation impliqués avec le VA sont plus difficiles à commenter, son signal se superposant à celui des lignines de faibles masses moléculaires (pic 1 kDa). Il est toutefois possible d'observer une diminution progressive de son signal, tout comme pour l'ABTS, qui indique sa consommation en tant qu'intermédiaire de réaction par la laccase et sa polymérisation très probable avec les molécules de lignine.

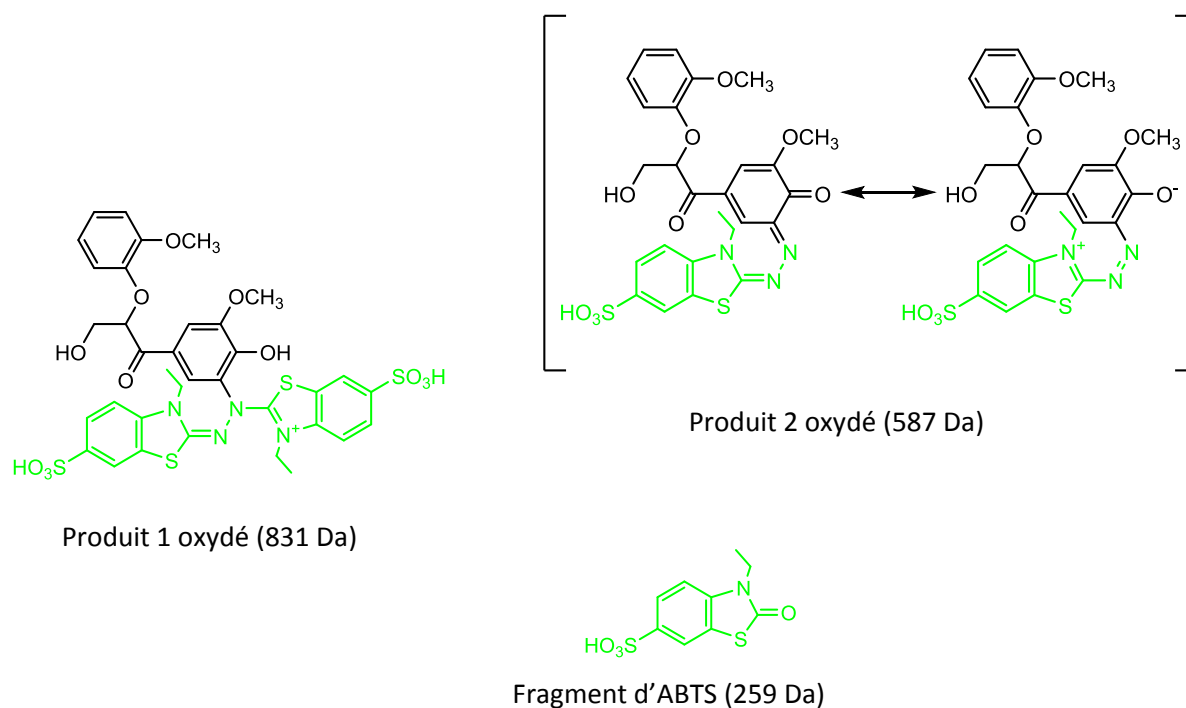


Figure 50 : structures des produits d'oxydation du  $\beta$ -guaiacyl éther de guaiacyl-glycérol (molécule modèle d'unité phénolique de lignine) par la laccase de *Trametes versicolor* en présence d'ABTS (Hilgers et al., 2018).

Le tableau 15 permet de chiffrer la condensation de la LTM visuellement observée avec la SEC. L'évolution des masses moléculaires moyennes des deux populations de lignines (1 et 9 kDa) initialement présentes dans le rétentat 1 kDa y est donnée en fonction du temps et des conditions de bioconversion.

Tableau 15 : évolution des masses moléculaires moyennes de la LTM en fonction du temps et des conditions de bioconversion.

condition	population	Masse moléculaire moyenne de la LTM en kDa				
		t = 0	t = 30 min	t = 6 h	t = 24 h	t = 120 h
A : laccase seule	pic 1 kDa	1,1	1,1	1,1	1,1	1,2
	pic 9 kDa	8,9	9,0	10,8	13,4	16,0
C : avec ABTS	pic 1 kDa	1,4	1,4	1,5	1,7	1,8
	pic 9 kDa	8,9	8,9	11,0	15,3	15,0
E : avec VA	Pic 1 kDa	(masquée par le signal de VA)				
	Pic 9 kDa	9,3	9,3	11,0	12,9	14,6

Quelle que soit la condition dans laquelle la laccase a été employée, la LTM présente une masse moléculaire moyenne d'environ 15 kDa pour sa population de lignines condensées au bout des 120 h de bioconversion. Ainsi, bien que les mécanismes d'oxydation soient différents avec ou sans médiateurs, la condensation de la LTM qui en résulte est quant à elle constante en terme de masse. Le fait que la laccase soit capable de condenser la LTM de la même façon en présence ou en l'absence de médiateur signifie qu'elle utilise probablement des molécules initialement présentes dans le milieu de bioconversion en tant qu'intermédiaires de réaction. Il a en effet été décrit au chapitre 2 du manuscrit que le rétentat 1 kDa contient des composés phénoliques de faibles masses moléculaires, dont des lignanes (visualisés en py-GC), qui pourraient servir de substrat enzymatique. Une analyse en CCM des prélèvements de bioconversion a alors été réalisée afin d'observer l'évolution de leur composition en petites molécules aromatiques au cours de l'expérience avec la laccase seule. Une photographie de la plaque de CCM révélée est présentée en Figure 51.

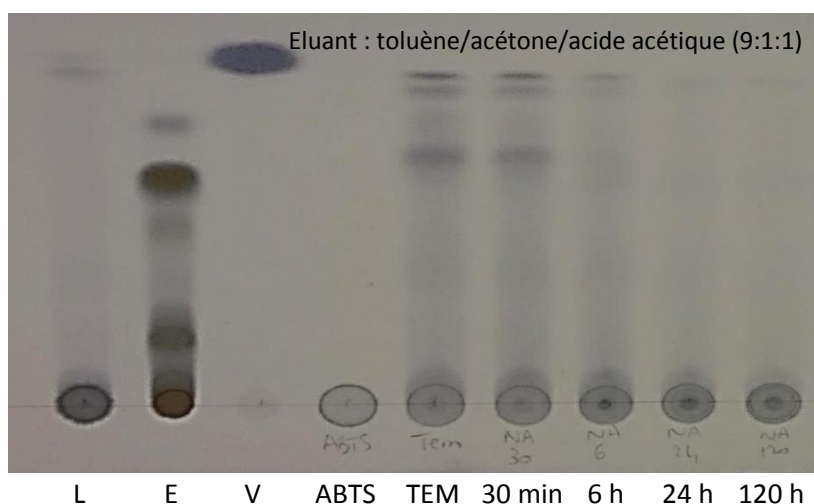


Figure 51 : CCM des échantillons prélevés lors de la bioconversion de la LTM avec la laccase seule (condition A) ; L = lignine Kraft, E = épicatéchine, V = vanilline.

Cette analyse permet de visualiser l'évolution de la composition en composés phénoliques de faibles masses moléculaires des prélèvements de bioconversion par comparaison de leurs profils de migration avec celui de l'extrait témoin (TEM). Aucune identification de composés, en revanche, n'a été réalisée par cette méthode, les standards déposés sur la plaque permettant simplement de s'assurer des bonnes conditions de migration lors de l'analyse. En effet, il est possible de constater grâce à ces standards que, dans les conditions de CCM utilisées, les polymères phénoliques de polarité élevée liée à la présence de nombreux groupements hydroxyles (comme la lignine Kraft) restent à la ligne de dépôt

tandis que les phénols de plus faibles masses moléculaires (oligomères) moins polaires sont entraînés par la phase mobile. De l'ABTS a également été déposé afin de démontrer qu'il n'est pas détectable dans les conditions de révélation employées et qu'il n'interfère pas avec les autres composés de faibles masses moléculaires.

Le profil de migration du témoin analytique, en accord avec les résultats du chapitre 2 du manuscrit, démontre à nouveau la présence de divers composés phénoliques de faibles masses moléculaires dans le rétentat 1 kDa. Le profil du prélèvement après 30 min de bioconversion est parfaitement identique à celui du témoin. En revanche, une fois que la condensation de la LTM a commencé, c'est-à-dire entre 30 min et 6 h après l'addition de la laccase, le signal des petites molécules aromatiques disparaît progressivement. Cette observation conforte l'hypothèse de leur utilisation par la laccase en tant qu'intermédiaires d'oxydoréduction et souligne également que ces composés sont consommés par les réactions de condensation et probablement polymérisés avec la LTM, tout comme pour les médiateurs.

### **2.3. CONCLUSIONS SUR LA DEPOLYMERISATION EN BATCH DE LA LTM**

La laccase commerciale utilisée pour ces essais en batch a démontré une activité vis-à-vis de la LTM en milieu liquide, contrairement au cocktail enzymatique de *P. chrysosporium*, alors que les conditions opératoires ont été reproduites à l'identique entre cette série d'expériences et SE1 (chapitre 4). Il y a donc une différence d'activité entre ces deux catalyseurs dans les mêmes conditions. Toutefois, l'effet de la laccase sur la LTM en milieu liquide est très proche de celui observé avec les peroxydases de *P. chrysosporium* en milieu solide (annexe 1). Dans les deux cas, ces enzymes ont mené à la condensation de la LTM en utilisant les petites molécules aromatiques initialement présentes dans le rétentat 1 kDa comme médiateurs d'oxydoréduction. Ces deux familles d'enzymes ont donc une capacité équivalente à oxyder la LTM mais dans des conditions opératoires différentes, les peroxydases étant limitées à leur utilisation sur support statique à l'interface solide-air.

Quelles que soient les conditions étudiées dans ce chapitre, il a été mis en évidence que la laccase d'*Aspergillus sp.* mène à une condensation de la LTM et donc à une augmentation de sa masse moléculaire moyenne. Il est surprenant de constater d'ailleurs que l'addition des médiateurs n'a pas permis de favoriser la dépolymérisation de la LTM comme cela avait été rapporté dans la littérature (Longe *et al.*, 2018). L'addition du co-solvant, permettant d'améliorer la solubilité du rétentat 1 kDa, n'a pas non plus démontré d'utilité lors

de ces essais. Une différence a tout de même été soulignée au niveau des mécanismes d'oxydation impliqués dans la condensation de la LTM qui semble très probablement s'accompagner d'une fonctionnalisation en présence de médiateurs. Une analyse en RMN des molécules de lignines générées dans ces conditions serait toutefois nécessaire afin de confirmer formellement cette interprétation.

La condensation de la LTM observée signifie que, dans les conditions mises en oeuvre, les réactions de couplage radicalaire sont favorisées pour la stabilisation des molécules de lignine oxydées, au détriment des réactions de rupture des liaisons inter-unité. Pour tenter de limiter ces réactions de couplage radicalaire et de fragmenter la LTM, un bioréacteur membranaire a été développé. Puisque ni les médiateurs, ni le co-solvant n'ont démontré d'intérêt par rapport à l'utilisation de la laccase seule, les conditions de bioconversion A ont été retenues afin de catalyser la dépolymérisation de la LTM dans ce réacteur. Ces conditions de bioconversion très simples, sans ajout de produits chimiques, permettent également de simplifier le procédé et de diminuer son coût et son impact environnemental en cas de développement à plus grande échelle.

### 3. DEPOLYMERISATION DE LA LTM EN REACTEUR MEMBRANAIRE

#### 3.1. INTRODUCTION

L'objectif du réacteur membranaire est de permettre l'extraction continue des fragments réactifs de lignine et leur séparation physique du milieu réactionnel dans le but de prévenir leur repolymérisation. Pour cette thèse, une cellule d'ultrafiltration Amicon® a été utilisée comme modèle simple de réacteur à l'échelle du laboratoire. Avant de catalyser la dépolymérisation de la LTM, des essais ont été menés afin d'étudier certains paramètres opératoires et leur impact sur l'activité de la laccase en réacteur. Ces paramètres comprennent le seuil de coupure et le matériau de la membrane ainsi que la vitesse d'agitation du réacteur. Par la suite, deux filtrations continues de la LTM ont été réalisées en reproduisant les conditions opératoires A des essais en batch (sans co-solvant, sans médiateur). Une de ces filtrations a été réalisée sans enzyme afin d'obtenir la répartition de référence des molécules de lignine entre les différentes fractions générées par le réacteur (perméats et rétentat). Puis un essai de dépolymérisation de la LTM en présence de laccase avec extraction *in-situ* des produits de réaction par filtration membranaire a finalement été conduit.

Puisque le système enzyme-substrat retenu pour ces essais en réacteur mène à la condensation de la LTM en batch, il représente un modèle d'étude parfait pour mettre en évidence l'intérêt ou non de la filtration membranaire contre l'occurrence des réactions de repolymérisation. L'ensemble des résultats obtenus avec le réacteur membranaire a été publié dans le journal *Bioresource Technology* sous la forme d'un article intitulé « *In-situ* extraction of depolymerization products by membrane filtration against lignin condensation » et présenté ci-dessous.

### 3.2. RESULTATS

#### **In-situ extraction of depolymerization products by membrane filtration against lignin condensation**

*Virginie STEINMETZ<sup>[a,b]</sup>, Maud VILLAIN-GAMBIER<sup>\*[a]</sup>, Armand KLEM<sup>[c]</sup>, Isabelle ZIEGLER<sup>[b]</sup>, Stéphane DUMARCAÏ<sup>[b]</sup>, Dominique TREBOUET<sup>[a]</sup>*

[a] Laboratoire de Reconnaissance et Procédés de Séparation Moléculaire (RePSeM), Université de Strasbourg, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien (IPHC), UMR CNRS 7178, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France

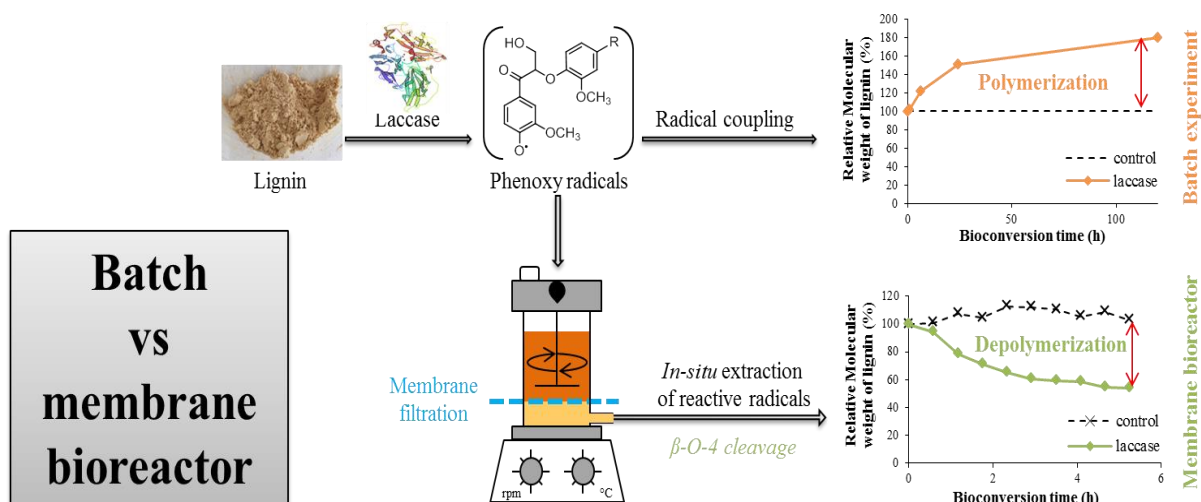
[b] Laboratoire d'Etudes et de Recherche sur le Matériau Bois, EA 4370 USC INRA, Boulevard des Aiguillettes, BP 70239, 54506 Vandoeuvre lès Nancy, France

[c] Norske Skog Golbey, Route Jean-Charles Pellerin, BP 109, 88194 Golbey, France

\* Corresponding author: Maud VILLAIN-GAMBIER at IPHC-RePSeM, 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France; tel: +33(0)368852748; email: [maud.villain@unistra.fr](mailto:maud.villain@unistra.fr),



## Graphical abstract



**Abstract:** Catalytic depolymerization of lignin is a challenging process due to competitive repolymerization reactions. In this paper, the oxidative depolymerization of lignin was catalyzed by a commercial laccase both in a batch experiment and in a membrane bioreactor using the same catalytic conditions. The membrane bioreactor was previously optimized to reach high permeation flux ( $25 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ) during lignin diafiltration. While the lignin was exclusively condensed in the batch experiment leading to high molecular weight macromolecules (from 9 to 16 kDa), its depolymerization was effective in the bioreactor producing fragments of less than 1 kDa thanks to the *in-situ* extraction of the reaction products. This paper demonstrates that the reactor configuration is playing an essential role in triggering or preventing lignin condensation. It also reports the first proof-of-concept demonstrating that *in-situ* membrane extraction of the reactive fragments of lignin from the bulk medium can be useful against detrimental repolymerization reactions.

**Keywords:** lignin depolymerization, membrane filtration, bioreactor, condensation, laccase.

## 1. Introduction

The development of a sustainable and renewable economic model is one of the most important challenges of our present society due to the limited stock of fossil resources, the increasing demand for fuels and chemicals and the harmful environmental impact of various current processes. For this very purpose, the lignocellulosic biomass, massively produced by the forestry and agricultural activities, can be used as a carbon neutral and non-edible renewable entry material (Sun *et al.*, 2018). The deconstruction of this biomass gives access to several chemical streams mainly arising from its main constituents: cellulose, hemicelluloses and lignins. Different studies underlined that the profitability of future lignocellulosic biorefineries relies in the complete valorization of these three constituents to overcome the cost associated to processing and pretreatments (Treasure *et al.*, 2014; Zakzeski *et al.*, 2010).

In the last decades, significant advances have been achieved in the development of sustainable processes targeting either the fractionation of the lignocellulosic biomass or the conversion of its constituents into valuable fuels and chemicals (De Bhowmick *et al.*, 2018; Yiin *et al.*, 2018; Yoo *et al.*, 2020). As the most abundant aromatic macromolecules on earth, lignins can be valorized for the production of dispersants, adhesives, resins, composite biomaterials or even carbon fibers in replacement to the petroleum-derived products currently on the market (Ragauskas *et al.*, 2014; Rajesh Banu *et al.*, 2019). Further upgrading of lignins into higher added-value chemicals can also be achieved by catalytic depolymerization leading to the production of aromatic platform molecules or functionalized ingredients for food, pharmaceuticals, cosmetics and other commodity products (Isikgor and Becer, 2015; Sun *et al.*, 2018). However, up to date and despite the extensive worldwide researches, such lignin valorizations remain extremely limited at industrial scale, mainly due to its heterogeneous structure and resistance to conversion treatments under mild conditions.

Various lab-scale protocols have been developed for the depolymerization of lignin including thermal (pyrolysis, micro-waves or photo-induced methods), chemical (oxidation, reduction, solvolysis) and biological (enzymatic) catalytic processes (Rahimi *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2019; Raikwar *et al.*, 2019; Picart *et al.*, 2017; Bugg and Rahmanpour, 2015). All these methods mainly target the cleavage of aryl ether bonds ( $\beta$ -O-4) which represent 55 to 60 % of the total interunit linkages in native lignin. However, in practice, technical lignins possess lower aryl ether content due to their fractionation processes and their depolymerization is further impaired by repolymerization reactions leading to low monomer yields (Shuai and Saha, 2017). The repolymerization of lignin decomposition products through C-C linkages is

also known as lignin condensation since the resulting lignin structure is highly recalcitrant to further degradation. Lignin condensation is one of the main impediments limiting the development of high-yield depolymerization processes (Wang *et al.*, 2019; Yu *et al.*, 2019).

Different mechanisms are responsible for repolymerization reactions depending on the catalytic process used. But, in every catalytic process, lignin depolymerization and condensation occur as two competing reactions. Achieving high-yield lignin depolymerization thus relies in finding the appropriate catalytic conditions favoring the depolymerization reactions against the repolymerization ones. The use of specific solvent or additives such as ethylene glycol and dimethyl carbonate have been reported to prevent lignin condensation by in-situ derivatization of the depolymerization products (Dabral *et al.*, 2018; Deuss *et al.*, 2017). The chemical functions involved in the formation of the reactive intermediates can also be trapped by capping agents. Shuai *et al.* reported the positive effect of protecting the  $\alpha$ -hydroxyls groups on lignin condensation by forming 1,3-dioxane structures with formaldehyde (Shuai *et al.*, 2016). Kim *et al.* succeeded in limiting char formation during thermal degradation of lignin by a selective methylation of the phenolic hydroxyl groups before depolymerisation (Kim *et al.*, 2017). In recent years, a strategy, which involved the use of pre-oxidation method to activate lignin  $\beta$ -O-4 linkages, has been employed to promote lignin depolymerization under mild conditions (Guo *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2017). Near theoretical yields of lignin monomers could be obtained by this method (Rahimi *et al.*, 2014). Another original approach was proposed by Li *et al.* who catalyzed the lignin depolymerization on solid state (Li *et al.*, 2018). This way, the mobility of the reactive intermediates was limited thus avoiding their direct interaction and linkage. This physical approach is interesting as it does not require further chemical addition or pre-oxidation step. However such process cannot be applied to technical lignin streams already isolated from the lignocellulosic biomass by conventional pretreatments.

In this work, a commercial laccase was used to catalyze the depolymerization of a lignin stream recovered from the process water of a thermomechanical pulping company. The enzymatic catalysis was selected as a sustainable way to depolymerize this lignin under mild conditions (Liu *et al.*, 2020). Laccases (EC 1.10.3.2) are multi-copper oxidases, of 50 to 110 kDa, known for their role both in the biosynthesis and biodegradation of lignin (Wong, 2009). They are able to perform hydrogen abstraction at the phenolic moieties in lignin leading to the formation of phenoxy radicals which are responsible for the cleavage of aryl ether linkages (Higuchi, 1989). However, these radicals can also undergo free radical coupling leading to lignin condensation in aqueous media (Longe *et al.*, 2018). To prevent the repolymerization

reactions without any solvent or chemical addition, an original approach was employed by developing a membrane bioreactor. In this reactor, the *in-situ* extraction of the lignin fragments by membrane filtration was used to shift the equilibriums in favor of lignin depolymerization. The extraction of the radicals from the bulk medium was also expected to prevent lignin condensation by physically isolating the reactive fragments to limit their repolymerization. The use of membrane filtration as a tool to mimic the natural compartmentalization of lignin and its decomposition products has already been mentioned in the literature and supposed to be helpful against lignin condensation (Roth and Spiess, 2015). However, this claim has never been demonstrated and applied to the enzymatic depolymerisation of a technical lignin. This paper thus provides the first proof-of-concept of the interest of membrane filtration in this field.

To be efficient, the bioreactor was conceived to maximize the transfer of the radical fragments throughout the membrane and reach high productivity, meaning high permeation flux. In membrane filtration, the productivity is directly and mainly linked to the transmembrane pressure (TMP): the highest the TMP, the highest the productivity. However, membrane fouling can be induced and exacerbated by high TMP (Chen *et al.*, 2011). To limit this phenomenon, different membrane materials and cross flow velocities were screened in this paper as these parameters were reported to play a critical role in membrane fouling (Puro *et al.*, 2010). The compatibility between the membrane and the commercial laccase was also studied. Finally, the lignin was treated by the enzyme both in batch and in the optimized membrane bioreactor to evaluate the impact of the *in-situ* membrane extraction on lignin depolymerization and condensation.

## **2. Material and methods**

### **2.1. Material and equipment**

The lignin used in this work has been recovered from the process water of a thermomechanical pulping company using a membrane filtration process as previously published (Steinmetz *et al.*, 2019). The commercial laccase from *Aspergillus sp.* has been purchased from Sigma Aldrich (Novozym, 51003). The 5 kDa polyethersulfone (PES) disc membranes came from Sartorius (SART14629-63-D) and the regenerated cellulose (RC) ones from Merck Millipore (PLCC07610). All membranes had a diameter of 76 mm and a surface area of 41.8 cm<sup>2</sup>. An ultrafiltration stirred cell of 400 mL was used as membrane bioreactor (Amicon 5124).

## 2.2. Membrane adsorption tests

Two types of membrane materials (PES and RC) were assessed for their compatibility with the lignin substrate. The deionized water flux of each membrane was measured before and after static adsorption of the lignin solution at 500 mg.L<sup>-1</sup> for 24 h at 25 °C. Membrane permeability to deionized water (DWP) was calculated as the slope of the linear curve correlating deionized water flux (L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>) to transmembrane pressure (TMP, bar). The permeability loss caused by adsorption phenomena was then calculated as:

$$\text{Permeability loss (\%)} = 100 - \frac{\text{DWP}_{\text{after}} \times 100}{\text{DWP}_{\text{before}}} \quad (1)$$

## 2.3. Laccase resistance to stirring

The ultrafiltration stirred cell was equipped with a 5 kDa RC membrane and filled with a laccase solution at 0.08 U.mL<sup>-1</sup>. The cell was assembled on top of a magnetic stirrer. After 1 h of equilibration in static mode, the stirring was set to 50 revolutions per minute (rpm) and the enzymatic solution left under agitation for 4 h. Samples of enzymatic solution were taken every hour for laccase activity measurements. The laccase activity was quantified by following the oxidation of ABTS at 420 nm for 3 min. One unit (1 U) of laccase was defined as the amount of enzyme that oxidizes one micromole (1 μmol) of ABTS per minute. In brief, 600 μL of laccase solution were transferred in a micro cuvette with 300 μL of phosphate citrate buffer pH 4.5 and 100 μL of 5 mM ABTS solution. An extinction coefficient of 36000 L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup> was used for calculations and each sample was assayed in triplicate. The overall protocol was repeated two times with a stirring speed increased at 100 and 200 rpm. A new solution of laccase at 0.08 U.mL<sup>-1</sup> was prepared for each experiment. The static stability of laccase was also evaluated during 4 h. The cross-flow velocity (CFV) associated to each stirring speed was calculated as previously described by Al Rudainy *et al* (Al-Rudainy *et al.*, 2017). The resulting estimated CVF corresponding to 50; 100 and 200 rpm are 0.5; 1 and 2 m.s<sup>-1</sup> respectively.

## 2.4. Laccase and RC membrane compatibility

The ultrafiltration stirred cell was equipped with a 5 kDa RC membrane and filled with deionized water to determine its initial DWP as mentioned before. The cell was then filled with a laccase solution at 0.08 U.mL<sup>-1</sup> and left at room temperature without agitation. After 36 h, the laccase solution was filtered through the 5 kDa RC membrane in concentration mode until reaching a volume reduction factor of 8. Permeate was continuously collected by

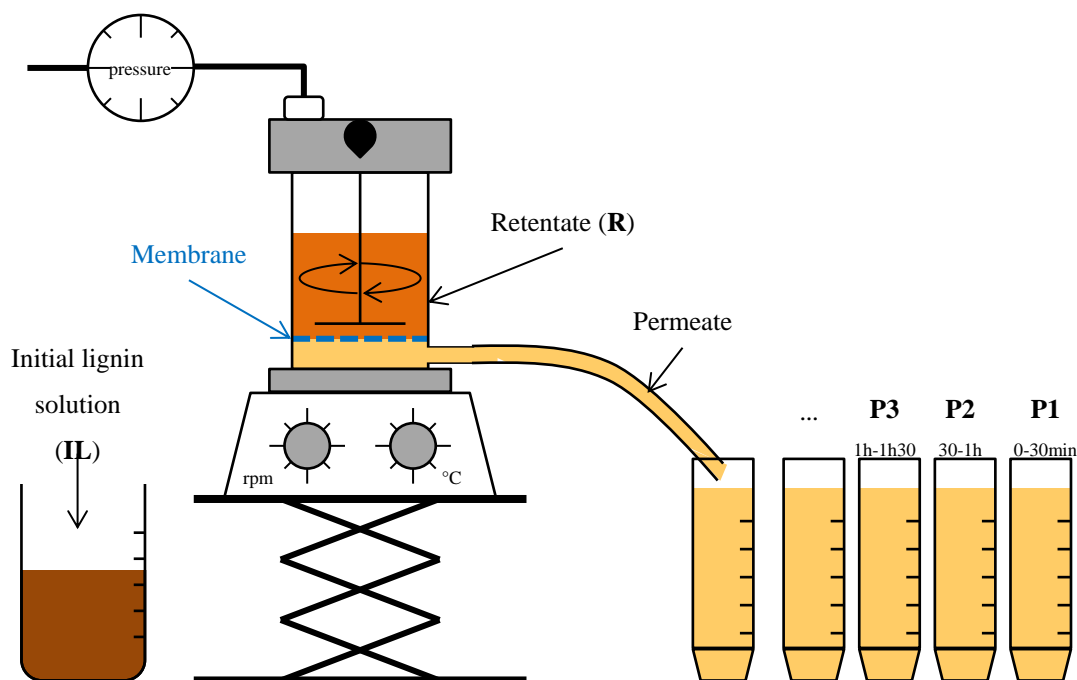
fractions of 20 mL and each fraction was assayed for its laccase activity by using the ABTS oxidation test. At the end of the filtration, the DWP of the membrane was again calculated and compared to its initial value.

### **2.5. Lignin depolymerization in batch experiment**

The lignin depolymerization in batch was carried out in duplicate. The working volumes were set to 20 mL and the experiments conducted in 50 mL centrifugal plastic tubes. Each tube contained 12 mg of lignin, 0.08 U of laccase (filtered at 0.2  $\mu\text{m}$ ) and 10 mL of phosphate citrate buffer pH 4.5. The tubes were filled up with deionized water and incubated at 25 °C on an orbital shaker set up at 200 rpm for 5 days. Samples were taken after 30 min, 3 h, 6 h, 24 h and 120 h. They were immediately neutralized to pH 12 by addition of 10 M sodium hydroxide solution (NaOH) and frozen until analysis.

### **2.6. Lignin depolymerization in membrane bioreactor**

The ultrafiltration stirred cell was equipped with a 5 kDa RC membrane and filled with 100 mL of working solution. This solution contained 60 mg of lignin dissolved in 90 mL of phosphate citrate buffer pH 4.5 and filled up with deionized water in the control condition or 60 mg of lignin and 0.4 U of laccase dissolved in 50 mL of phosphate citrate buffer pH 4.5 and 50 mL of deionized water in the biodegradation experiment. The cell was assembled on top of a magnetic hotplate stirrer and connected to a compressed air stream set up at 4 bars. The working solution was maintained at 28 °C and stirred at 100 rpm ( $\text{CFV} = 1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). The reactor was assimilated to a perfectly stirred reactor. The filtration was done on a diafiltration mode by maintaining the working volume at +/- 15 % of its initial value by regular addition of phosphate citrate buffer. The diafiltration was performed during 4 h 30 corresponding to 5 h 15 of laccase treatment due to the regular interruptions for refill. Permeate was continuously collected and the collection tubes were renewed every 30 min. The Figure 1 illustrates the bioreactor installation and specifies the assignments used in this paper for all the different fractions generated during the process. At the end of the filtration, the pH of all fractions was measured and the permeate flow was assessed by weighting the samples P1 to P9. The retentate was collected and precisely adjusted to 100 mL with buffer before analysis. The repartition of the initial lignin content between all the different fractions was followed by spectrophotometric measurement at 240 nm. An extinction coefficient of  $12 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$  was used for lignin quantification (Sluiter *et al.*, 2008). Samples of 1.5 mL of each fraction were neutralized to pH 12 by addition of 10 M NaOH and frozen until SEC analysis.



**Figure 1.** Schematic representation of the membrane bioreactor installation and the different fractions generated by the diafiltration process.

### 2.7. Size exclusion chromatography (SEC)

Molecular weight analyses were performed on a Prominent Shimadzu HPLC equipped with a guard column Phenomenex Polysep GFC-P (7.8 x 35 mm) and two analytical columns Phenomenex Polysep P3000 (7.8 x 300 mm) and P2000 (7.8 x 300 mm). An aqueous method was used with a solution of 10 mM NaOH as mobile phase. The samples were filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE membranes and 20  $\mu\text{L}$  were injected in the system. The separation was performed at 30  $^{\circ}\text{C}$  with a flow rate of 0.5  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$  during 45 min. An ultraviolet (UV) spectroscopy detector (Shimadzu SPD-20A) was used and set at 280 nm. Data were treated using LabSolutions software. SEC was employed to monitor the evolution of the lignin molecular weight ( $M_w$ ) and polydispersity index (PI) over time during the biocatalysis assays. The  $M_w$  in Daltons were extracted for each lignin population from the chromatograms and expressed as relative  $M_w$  in percent using the following equation:

$$\text{Relative } M_w (\%) = \frac{M_w(\text{Da})_t \times 100}{M_w(\text{Da})_i} \quad (2)$$

$M_w(\text{Da})_i$  corresponds to the initial value of lignin  $M_w$  in Daltons before the addition of the laccase.  $M_w(\text{Da})_t$  represents the lignin  $M_w$  in Daltons in the sample taken after  $t$  hours of biocatalysis. The PI of all samples was calculated for the entire weight distribution (single peak integration). By definition, PI reflects the diversity of  $M_w$  in the sample and increases with the width of the distribution.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Development of the membrane bioreactor

All the parameters of the bioreactor have been selected to maximize its productivity and ensure a high transfer rate of the reactive fragments of lignin through the membrane. The working solution volume was deliberately maintained low in order to minimize the hydraulic residence time of the reactive fragments to prevent their repolymerization. The TMP was set at 4 bars corresponding to the maximum pressure recommended by the cell constructor in diafiltration mode. To avoid membrane fouling in these conditions, the membrane material was selected after adsorption tests with the lignin substrate and the cross-flow velocity selected in regards to its impact on the laccase activity. The compatibility between the selected membrane and the commercial laccase was also checked by evaluating the laccase retention and permeation flux during filtration.

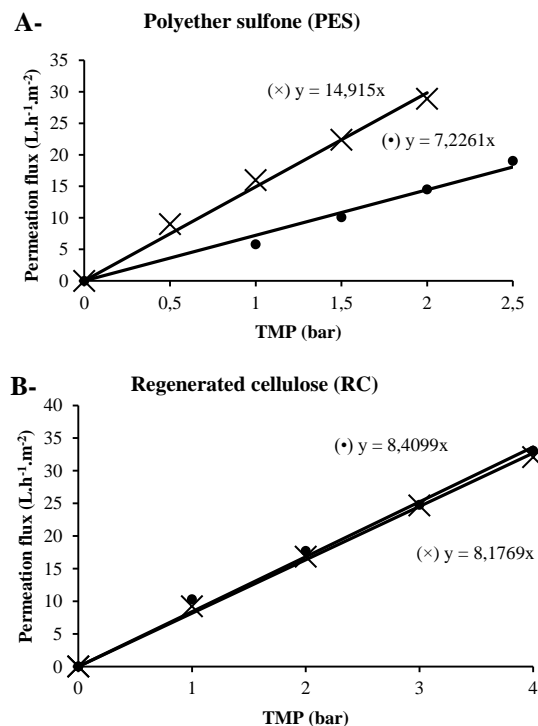
#### 3.2. Adsorption study

Fouling is a complex phenomenon inherent to membrane filtration processes. It arises from the accumulation and concentration of molecules at the surface of the membrane and results in a great loss of the process productivity. If the molecules to be filtered present an affinity for the membrane material, adsorption interactions may be the cause of an important membrane fouling. Several studies about lignin filtration reported that such interactions were causing pore blocking and non-reversible fouling on hydrophobic membranes and that hydrophilic membranes were mandatory in achieving high permeation flux (Al-Rudainy *et al.*, 2019; Puro *et al.*, 2010; Servaes *et al.*, 2017). In this work, two hydrophilic membranes (i.e. PES and RC) were studied for their compatibility with the lignin substrate. PES was selected as this material is recommended for high permeation flux in aqueous filtration and RC for its low adsorption property. The results of the adsorption tests conducted with these two membranes are presented in Fig. 2.

Adsorption interactions occurred between the lignin and the PES membrane as can be seen in Fig. 2A. The PES membrane lost 52 % of its DWP after the static adsorption step and a yellow coating layer appeared on the surface of the membrane. In contrast, the permeability of the RC membrane was not affected at all by the lignin (Fig. 2B). These results are really close to the ones obtained by Li *et al.* during their adsorption tests of kraft lignin on RC and PS membranes (Li *et al.*, 1996). The PES membrane displays the same behavior as reported for the PS membrane in their study. The present results are also in agreement with those of Puro *et al.* who compared the performances of RC and PES membranes for the filtration of



two process waters from a chemithermomechanical pulp mill (Puro *et al.*, 2010). In their experiments, the PES membrane presented higher fouling than the RC membrane. They explained this result by the difference in membrane hydrophilicity, which is higher for the RC membrane. Possibly, the aromatic structures of PES and PS membranes may also be incriminated for their specific interactions with lignin. Anyhow, these membranes are not suitable for lignin filtration and the adsorption interactions seem to be independent from the lignin origin. Based on these results, the RC membrane was selected for further development of the bioreactor.



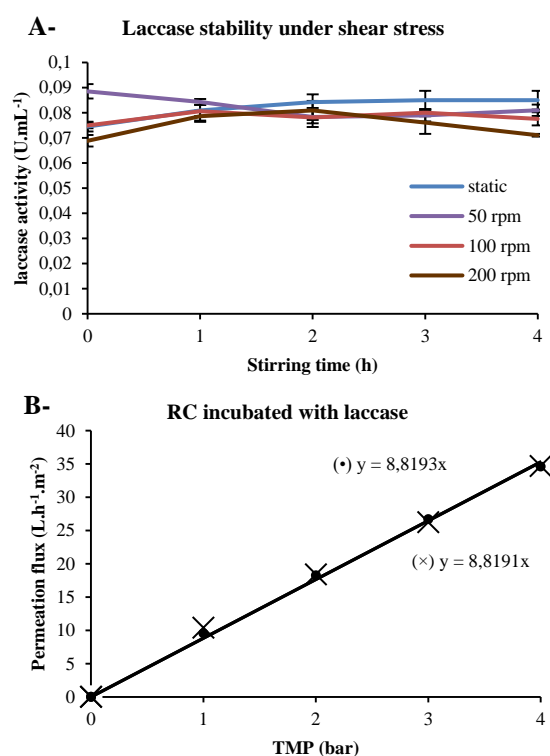
**Figure 2.** DWP of the (A-) PES membrane and (B-) RC membrane before (×) and after (•) their incubation in a lignin solution for 24 h.

### 3.3. Cross flow velocity and laccase stability

Other forms of fouling are due to the concentration polarization phenomenon or cake layers formation at the surface of the membrane. These layers are caused by the high concentration of molecules around the membrane and are responsible for a great part of productivity loss by provoking unproductive osmotic pressure, gel formation or even precipitation at the filtration area. While working under high TMP, the cross flow circulation generated by the stirring plays a critical role in preventing such phenomena by maintaining a physical perturbation on top of the membrane (Al-Rudainy *et al.*, 2019; Bhattacharjee and

Bhattacharya, 2006). This perturbation is even more important using a stirred cell as this type of reactor does not present any back pulse system and is equipped with flat membrane discs which are more prone to fouling than the membranes in tubular configurations. However, biological catalysts such as enzymes can be particularly sensitive to shear stress leading to their inactivation (Nguyen *et al.*, 2013). In this sense, the resistance of the commercial laccase to different stirring speeds was evaluated in the reactor. The results are presented in Fig. 3A.

The laccase activity remained stable whatever the stirring speed tested in this experiment. This result underlines a good resistance of this enzyme to physical shear stress and, as a consequence, the highest speed tested (i.e. 200 rpm) could be selected to minimize the membrane fouling without affecting the biocatalysis yield. However, it was observed during a preliminary diafiltration test that such high speed was not compatible with the bioreactor design as air started to pass through the membrane as soon as the permeation started to reduce the working solution volume. Instead of increasing the initial filling of the reactor, a stirring speed of 100 rpm was finally chosen for lignin depolymerization. It is still worth noting that highest cross flow velocity, at least up to  $2 \text{ m.s}^{-1}$ , can be considered if using this enzyme in other bioreactor configurations.



**Figure 3.** (A-) Impact of different stirring speeds on the laccase activity; (B-) DWP of the RC membrane before (×) and after (●) its incubation with the commercial laccase at  $0.08 \text{ U.mL}^{-1}$  for 36 h.

### **3.4. Laccase and RC membrane compatibility**

The effect of a laccase treatment on the RC membrane was evaluated by measuring its DWP after 36 h of incubation and filtration of the enzyme solution. The results, presented in Fig. 3B, indicate that the laccase did not lead to any degradation of the membrane as there was no evolution of its DWP after incubation. These results also point out that the permeation flux was not affected by possible adsorption of the enzymes on the membrane. Even if such interactions took place during the incubation phase or were forced by the high TMP during the filtration, no detrimental effects were associated to them. The permeate fractions collected during the filtration of the enzyme solution were assayed for their laccase activity but any activity was depicted in any tube. This result demonstrates the total retention of the laccase by the 5 kDa membrane, as expected with this low molecular weight cut-off.

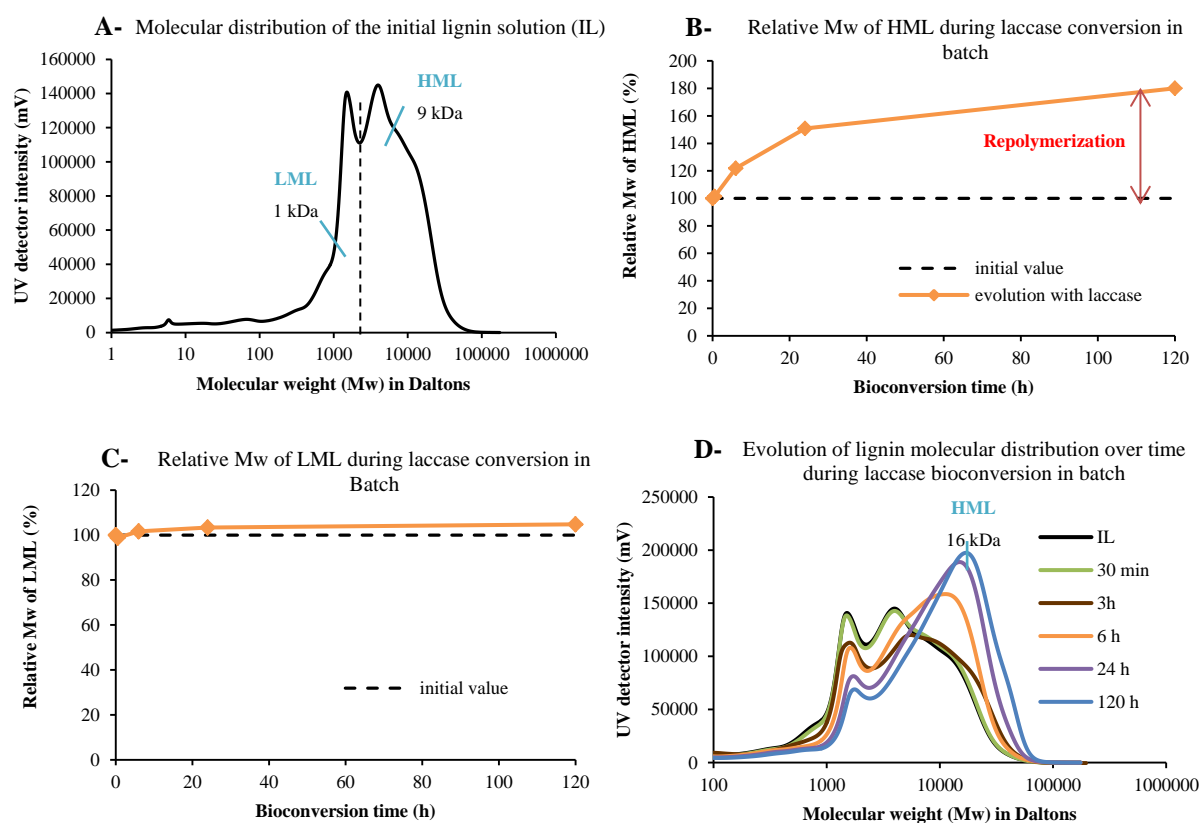
### **3.5. Lignin catalytic depolymerization by laccase**

The lignin recovered from the process water has been recently thoroughly characterized and reported as one of the most native lignin sourcing derived from the pulp and paper industry (Steinmetz *et al.*, 2019). This lignin presents a low condensation degree and high aryl ether content of 27  $\beta$ -O-4 linkages per 100 aromatic rings. Its structural composition, similar to Björkman milled wood lignin, thus presents a real advantage when addressing lignin depolymerization (Bouxin *et al.*, 2015). SEC was employed to monitor its depolymerization by the commercial laccase both in a batch experiment and in the previously developed bioreactor. The molecular weight distribution of the initial lignin solution (IL) is presented in Figure 4A. This distribution presents a bimodal shape with two lignin populations: one presenting a higher molecular weight (Mw) of 9 kDa, referred to as HML, and the other characterized by a lowest Mw of 1 kDa and referred to as LML.

#### **3.5.1. Lignin depolymerization in batch experiment**

The evolution of the relative Mw of these two populations during the laccase biocatalysis in batch are presented in Fig. 4B and 4C. On one hand, in Fig. 4B, a progressive increase of the relative Mw of HML was observed over the 5 days of this experiment from 100 to 180 % (9 to 16 kDa). Adsorption interactions between laccases and lignin have previously been reported in the literature and could be suspected to cause this Mw increase (Saarinen *et al.*, 2009). However, the average Mw of fungal laccases usually range between 60 and 70 kDa and thus, such interactions would have led to a much more important Mw increase, with molecules around 70-80 kDa at least (Giardina *et al.*, 2010). Therefore, the Mw

increase of the HML population is attributed to lignin condensation in this work. On the other hand, in Fig. 4C, the steadiness of the relative Mw of LML underlines that neither phenolic monomers nor lignin fragments with smaller Mw than 1 kDa were produced during this batch experiment. Ultimately, it can be concluded that the operating conditions employed in this batch experiment favored lignin condensation over lignin depolymerisation.



**Figure 4.** SEC results of lignin depolymerization in batch experiment: (A-) molecular weight distribution of the initial lignin solution (IL); evolution of the relative molecular weight of HML (B-) and LML (C-) over time; and (D-) evolution of the molecular weight distribution of lignin during laccase treatment.

As can be seen on Fig. 4D, the lignin condensation started quite early during the biocatalytic process. After only 6 hours of laccase treatment, the majority of the lignin molecules were already condensed into higher molecular weight structures as pointed out by the important shift and intensity of the HML population. The condensation reactions involved both the HML and LML populations as depicted by the continuous decrease of the LML signal intensity. In the literature, polymerization triggered by laccases has been reported to predominantly involve the free phenolic functions initially present in the structure of the technical lignins (Roth and Spiess, 2015). However, new free phenolic moieties are also

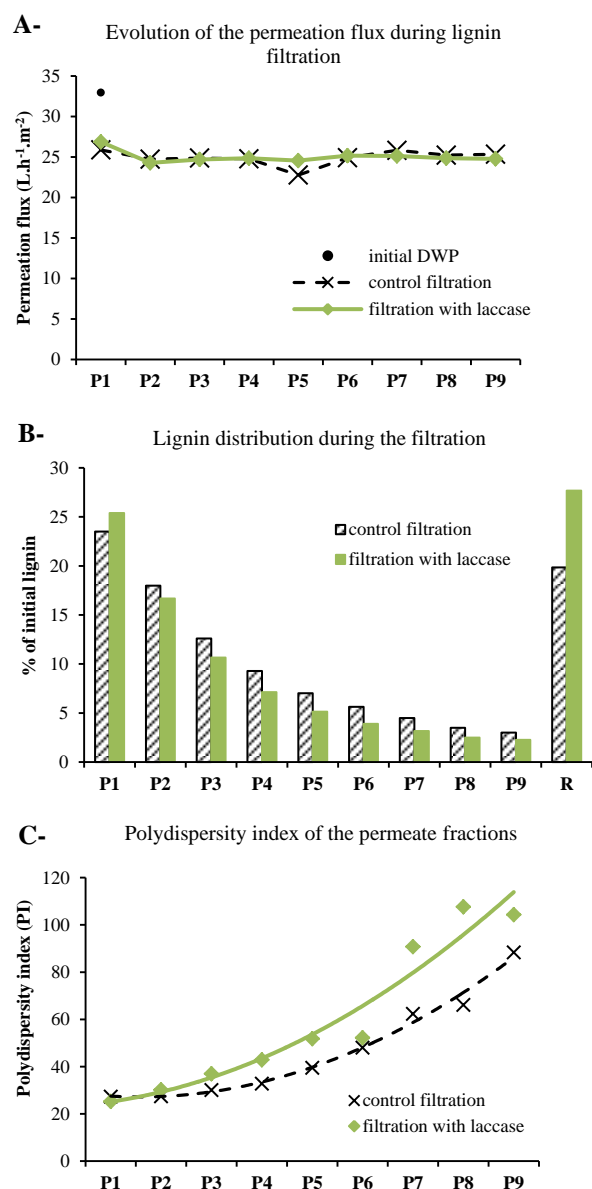
released during lignin depolymerization by laccases following aryl ether bond cleavages. Thus the polymerization activity of laccases can counter its depolymerization one by repolymerizing the lignin fragments. In this work, the free phenolic content of the technical lignin used has not been previously quantified. Nevertheless, its high aryl ether content suggests a low free phenolic content as in native lignin (Cañas and Camarero, 2010). Consequently, the main mechanism suspected to cause this lignin condensation is the repolymerization of the phenolic fragments. This experiment was thus reproduced in the previously developed bioreactor with an *in-situ* extraction of the low molecular weight phenolic compounds in an attempt to avoid their repolymerization.

### **3.5.2. Lignin depolymerization in membrane bioreactor**

The lignin depolymerization was repeated in the optimized bioreactor using the exact same catalytic conditions as in the batch experiment. A control set of data was also generated by filtering the initial lignin solution in the reactor without laccase. The process was conducted in a diafiltration mode in order to maintain a stable enzyme concentration in the bulk as in the batch experiment.

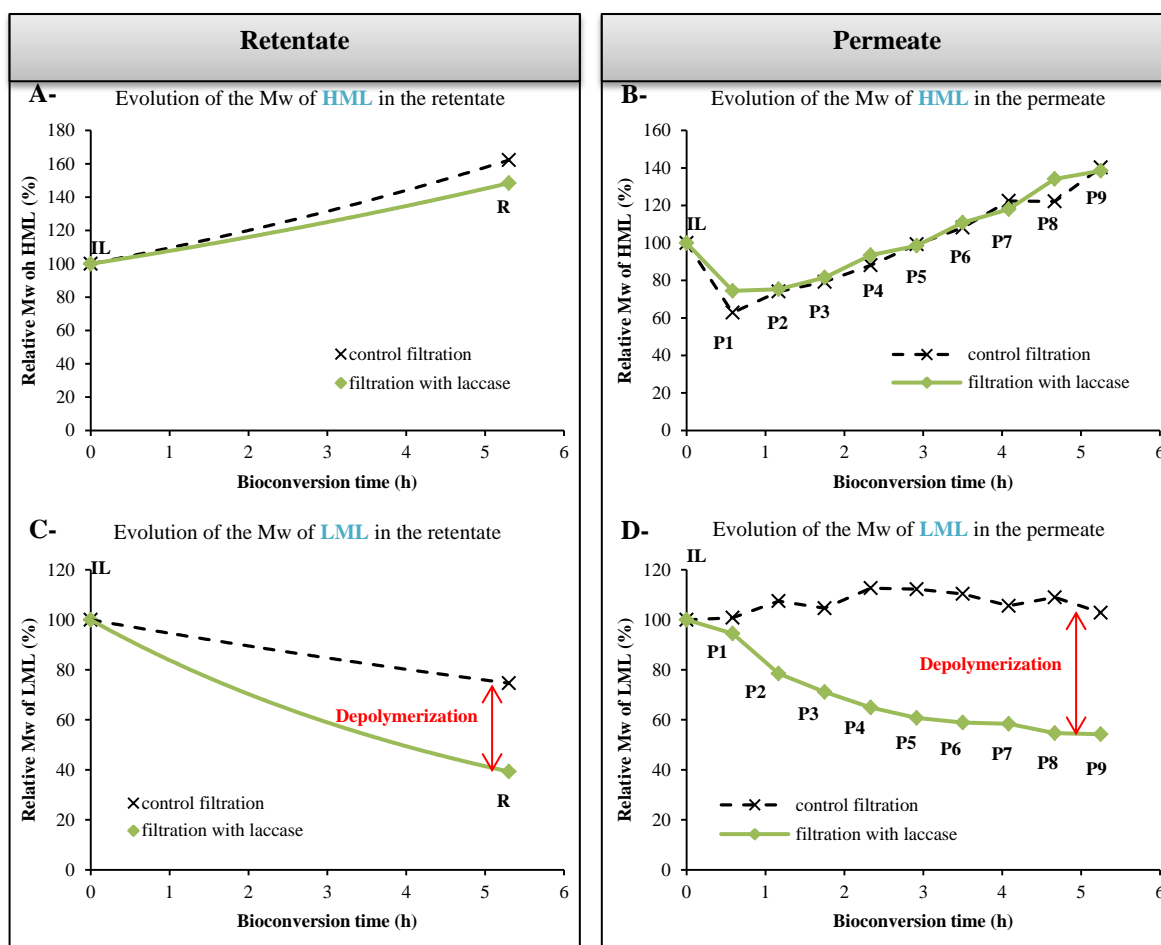
The figure 5A presents the hydraulic behaviour of the reactor during the control and biocatalysis assays. As expected, the productivity of the reactor decreased when replacing the deionized water by the lignin solution (from 33 to 25 L.h<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>). However, the permeation flux then remained perfectly stable both in the control and biocatalysis assays. In this sense, no membrane fouling was observed during the time of the experiment either due to the lignin filtration or to the presence and activity of the laccase.

Thanks to this great performance, the reactor could have been maintained for at least a few more hours. But, as can be noted in Fig. 5B, 80 % of the lignin were already filtered out of the reactor during the control assay after 4 h 30 of diafiltration so the experiment was stopped. This observation points out that the selectivity of the 5 kDa membrane does not allow a good retention of the initial substrate in the reactor. However, in this proof-of-concept study, high productivity was intentionally preferred over high selectivity to maximize the effect of the *in-situ* extraction. This figure also illustrates the constant dilution of the lignin in the permeate fractions due to the diafiltration mode. When comparing the control and laccase assays, a difference in lignin retention can be observed as 28 % of lignin remained in the retentate at the end of the experiment with laccase against 20 % for the control. This difference implies that the lignin was modified during the biocatalysis.



**Figure 5.** (A-) Evolution of the permeation flux, (B-) lignin distribution between the different fractions generated by the reactor and (C-) polydispersity index of the permeate fractions during the control filtration and the bioconversion assay with laccase.

The evolution of the polydispersity index (PI) of lignin in the permeate fractions comforts this result (Fig. 5C). The lignin presents higher PI indexes in the laccase experiment meaning that new molecular weights of lignin molecules were produced by the enzyme. The laccase activity on lignin can be depicted as fast as half an hour after the beginning of the biocatalysis. Whether those new molecules were associated to condensation or depolymerization reactions was determined by following the evolution of the highest and lowest molecular weight of lignin in all the different fractions generated by the process.



**Figure 6.** Evolution of the relative molecular weight of HML and LML populations in the retentate (A and C respectively) and the permeate fractions (B and D).

As can be seen in Fig. 6A and 6B, the relative Mw of the HML population was higher in the retentate and in the final permeates fractions (P7, P8, P9) than in the initial lignin solution (IL) while using the laccase. However, the same Mw increase was also observed during the control filtration without enzyme. Therefore, this evolution is attributed to the enrichment of these fractions in high molecular weight lignin molecules due to the filtration of the smallest one and cannot be associated to lignin condensation. The evolution of the relative Mw of HML with laccase perfectly fits with the control curve both in the retentate and permeates fractions, underlying that no condensation reactions occurred during the bioreactor experiment.

In this sense, the increase of polydispersity pointed out in Fig. 5C is associated to lignin depolymerization. Indeed, the evolution of the LML population significantly differs from the control condition while using the laccase (Fig. 6C and 6D). In the control condition the average MW of the LML population slightly decreased (25 %) in the retentate and remained stable in the permeate fractions. In comparison, the enzyme induced a higher

reduction of the Mw in the retentate (61 %) and also led to an important reduction of the Mw in the permeate fractions reaching 46 % in P9. As the reduction of the Mw was observed in all the permeate fractions (from P1 to P9), this result indicates that the lignin fragments were produced during all the 5 h 15 of biocatalysis. The average Mw of the LML population decreased from 1432 Da in IL to 777 Da in P9 and 563 Da in the retentate under the effect of the laccase.

By studying the evolution of the HML and LML populations during the control filtration, it is possible to get deeper information about the membrane selectivity. What is worth noting is the evolution of the highest Mw of lignin in the permeate (Fig. 6B). Initially, the first fraction (P1) presented a lower Mw than the IL. This result can be easily explained by the retention of the largest lignin molecules by the membrane. However, there was a progressive and constant enrichment in largest molecules in the permeate over time as underlined by the increase of the HML average Mw from P1 to P9. The membrane thus exhibited an interesting selectivity during the lignin filtration with a preferential filtration of the smallest molecules first and ultimately the filtration of the highest Mw molecules. As a consequence, the continuous production of small lignin fragments by laccase combined with this particular behaviour of the membrane must have delayed the filtration of some large lignin molecules during the laccase assay and explain the highest retention observed in Fig. 5B. An eventual steric hindrance caused by the proteins (enzymes) at the surface of the membrane may also be part of the explanation.

In the end, the oxidative depolymerization of lignin was effectively catalyzed by the commercial laccase in this bioreactor where the same catalytic conditions were used as in the batch experiment. This work underlines that, even if finding performant catalysts for lignin depolymerization is of high interest, process engineering aspects should also be considered at an early stage. Of course, this work only provides the first proof of membrane filtration interest in enzymatic lignin depolymerization. Further studies will now follow and they will focus on the monomer yields and characterization as well as on the robustness of the process with different lignin sourcing.



#### **4. Conclusions**

This paper demonstrates that *in-situ* membrane filtration of lignin depolymerization products allows avoiding the condensation reactions occurring in batch experiment during the enzymatic depolymerization of a technical lignin. The semi-continuous depolymerization process proposed in this paper is easy to implement, without any chemical addition and operates under really mild conditions (aqueous media at nearly room temperature). A new way of designing sustainable lignin depolymerization processes is thus reported. This work is highly timely in the area of lignin catabolism and the process should help enhance the knowledge of working with biological catalyst for the production of high value aromatic compounds.

#### **FUNDING**

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

#### **AUTHOR INFORMATION**

##### **Corresponding Author**

\* Corresponding author email: [maud.villain@unistra.fr](mailto:maud.villain@unistra.fr), tel: +33(0)368852748

Postal address: 25 rue Becquerel, 67087 Strasbourg Cedex 2, France.

##### **Author Contributions**

The manuscript was written through contributions of all authors. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

##### **Declaration of interests**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

##### **CRedit author statement**

**Virginie STEINMETZ:** conceptualization, investigation, writing - original draft and review

**Maud VILLAIN-GAMBIER:** investigation, validation **Armand KLEM:** resources **Isabelle**

**ZIEGLER:** investigation, methodology **Stéphane DUMARCAY:** investigation, supervision,

validation **Dominique TREBOUET:** investigation, supervision, validation

## REFERENCES

- Al-Rudainy, B., Galbe, M., Lipnizki, F., Wallberg, O., 2019. Galactoglucomannan Recovery with Hydrophilic and Hydrophobic Membranes: Process Performance and Cost Estimations. *Membranes* 9, 99. <https://doi.org/10.3390/membranes9080099>
- Al-Rudainy, B., Galbe, M., Wallberg, O., 2017. Influence of prefiltration on membrane performance during isolation of lignin-carbohydrate complexes from spent sulfite liquor. *Separation and Purification Technology* 187, 380–388. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2017.06.031>
- Bhattacharjee, C., Bhattacharya, P.K., 2006. Ultrafiltration of black liquor using rotating disk membrane module. *Separation and Purification Technology* 49, 281–290. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.10.011>
- Bouxin, F.P., McVeigh, A., Tran, F., Westwood, N.J., Jarvis, M.C., Jackson, S.D., 2015. Catalytic depolymerisation of isolated lignins to fine chemicals using a Pt/alumina catalyst: part 1—impact of the lignin structure. *Green Chem.* 17, 1235–1242. <https://doi.org/10.1039/C4GC01678E>
- Bugg, T.D., Rahmanpour, R., 2015. Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals. *Current Opinion in Chemical Biology* 29, 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.06.009>
- Cañas, A.I., Camarero, S., 2010. Laccases and their natural mediators: Biotechnological tools for sustainable eco-friendly processes. *Biotechnology Advances* 28, 694–705. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.05.002>
- Chen, J.P., Mou, H., Wang, L.K., Matsuura, T., Wei, Y., 2011. Membrane Separation: Basics and Applications, in: Wang, L.K., Chen, J.P., Hung, Y.-T., Shamas, N.K. (Eds.), *Membrane and Desalination Technologies, Handbook of Environmental Engineering*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 271–332. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-278-6\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-278-6_7)
- Dabral, S., Engel, J., Mottweiler, J., Spoehrle, S.S.M., Lahive, C.W., Bolm, C., 2018. Mechanistic studies of base-catalysed lignin depolymerisation in dimethyl carbonate. *Green Chem.* 20, 170–182. <https://doi.org/10.1039/C7GC03110F>
- De Bhowmick, G., Sarmah, A.K., Sen, R., 2018. Lignocellulosic biorefinery as a model for sustainable development of biofuels and value added products. *Bioresource Technology* 247, 1144–1154. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.163>

- Deuss, P.J., Lancefield, C.S., Narani, A., Vries, J.G. de, Westwood, N.J., Barta, K., 2017. Phenolic acetals from lignins of varying compositions via iron(III) triflate catalysed depolymerisation. *Green Chem.* 19, 2774–2782. <https://doi.org/10.1039/C7GC00195A>
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G., 2010. Laccases: a never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 67, 369–385. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0169-1>
- Guo, H., Miles-Barrett, D.M., Zhang, B., Wang, A., Zhang, T., Westwood, N.J., Li, C., 2019. Is oxidation–reduction a real robust strategy for lignin conversion? A comparative study on lignin and model compounds. *Green Chem.* 21, 803–811. <https://doi.org/10.1039/C8GC02670J>
- Higuchi, T., 1989. Mechanisms of Lignin Degradation by Lignin Peroxidase and Laccase of White-Rot Fungi, in: Lewis, N.G., Paice, M.G. (Eds.), *Plant Cell Wall Polymers*. American Chemical Society, Washington, DC, pp. 482–502. <https://doi.org/10.1021/bk-1989-0399.ch035>
- Isikgor, F.H., Becer, C.R., 2015. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry* 6, 4497–4559. <https://doi.org/10.1039/C5PY00263J>
- Kim, K.H., Dutta, T., Walter, E.D., Isern, N.G., Cort, J.R., Simmons, B.A., Singh, S., 2017. Chemoselective Methylation of Phenolic Hydroxyl Group Prevents Quinone Methide Formation and Repolymerization During Lignin Depolymerization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 5, 3913–3919. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.6b03102>
- Li, J., O'Hagan, T., MacLeod, J.M., 1996. Using ultrafiltration to analyze the molar mass distribution of kraft lignin at pH 13. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 74, 110–117. <https://doi.org/10.1002/cjce.5450740114>
- Li, N., Li, Y., Yoo, C.G., Yang, X., Lin, X., Ralph, J., Pan, X., 2018. An uncondensed lignin depolymerized in the solid state and isolated from lignocellulosic biomass: a mechanistic study. *Green Chem.* 20, 4224–4235. <https://doi.org/10.1039/C8GC00953H>
- Liu, X., Duan, X., Wei, W., Wang, S., Ni, B.-J., 2019. Photocatalytic conversion of lignocellulosic biomass to valuable products. *Green Chem.* 21, 4266–4289. <https://doi.org/10.1039/C9GC01728C>

- Liu, Y., Luo, G., Ngo, H.H., Guo, W., Zhang, S., 2020. Advances in thermostable laccase and its current application in lignin-first biorefinery: A review. *Bioresource Technology* 298, 122511. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.122511>
- Longe, L., Couvreur, J., Leriche Grandchamp, M., Garnier, G., Allais, F., Saito, K., 2018. Importance of Mediators for Lignin Degradation by Fungal Laccase. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 6, 10097–10107. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01426>
- Nguyen, L.N., Hai, F.I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F.D.L., Roddick, F., Price, W.E., Nghiem, L.D., 2013. Removal of trace organic contaminants by an MBR comprising a mixed culture of bacteria and white-rot fungi. *Bioresource Technology* 148, 234–241. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.08.142>
- Picart, P., Liu, H., Grande, P.M., Anders, N., Zhu, L., Klankermayer, J., Leitner, W., Domínguez de María, P., Schwaneberg, U., Schallmey, A., 2017. Multi-step biocatalytic depolymerization of lignin. *Applied Microbiology and Biotechnology* 101, 6277–6287. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8360-z>
- Puro, L., Kallioinen, M., Mänttari, M., Natarajan, G., C. Cameron, D., Nyström, M., 2010. Performance of RC and PES ultrafiltration membranes in filtration of pulp mill process waters. *Desalination* 264, 249–255. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2010.06.034>
- Ragauskas, A.J., Beckham, G.T., Biddy, M.J., Chandra, R., Chen, F., Davis, M.F., Davison, B.H., Dixon, R.A., Gilna, P., Keller, M., Langan, P., Naskar, A.K., Saddler, J.N., Tschaplinski, T.J., Tuskan, G.A., Wyman, C.E., 2014. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science* 344, 1246843–1246843. <https://doi.org/10.1126/science.1246843>
- Rahimi, A., Ulbrich, A., Coon, J.J., Stahl, S.S., 2014. Formic-acid-induced depolymerization of oxidized lignin to aromatics. *Nature* 515, 249–252. <https://doi.org/10.1038/nature13867>
- Raikwar, D., Majumdar, S., Shee, D., 2019. Thermocatalytic depolymerization of kraft lignin to guaiacols using HZSM-5 in alkaline water–THF co-solvent: a realistic approach. *Green Chem.* 21, 3864–3881. <https://doi.org/10.1039/C9GC00593E>
- Rajesh Banu, J., Kavitha, S., Yukesh Kannah, R., Poornima Devi, T., Gunasekaran, M., Kim, S.-H., Kumar, G., 2019. A review on biopolymer production via lignin valorization. *Bioresource Technology* 290, 121790. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121790>

- Roth, S., Spiess, A.C., 2015. Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 2285–2313. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1475-7>
- Saarinen, T., Orelma, H., Grönqvist, S., Andberg, M., Holappa, S., Laine, J., 2009. Adsorption of different laccases on cellulose and lignin surfaces. *BioResources* 4, 94–110.
- Servaes, K., Varhimo, A., Dubreuil, M., Bulut, M., Vandezande, P., Siika-aho, M., Sirviö, J., Kruus, K., Porto-Carrero, W., Bongers, B., 2017. Purification and concentration of lignin from the spent liquor of the alkaline oxidation of woody biomass through membrane separation technology. *Industrial Crops and Products, Challenges in Building a Sustainable Biobased Economy* 106, 86–96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.005>
- Shuai, L., Amiri, M.T., Questell-Santiago, Y.M., Héroguel, F., Li, Y., Kim, H., Meilan, R., Chapple, C., Ralph, J., Luterbacher, J.S., 2016. Formaldehyde stabilization facilitates lignin monomer production during biomass depolymerization. *Science* 354, 329–333. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7810>
- Shuai, L., Saha, B., 2017. Towards high-yield lignin monomer production. *Green Chemistry* 19, 3752–3758. <https://doi.org/10.1039/C7GC01676J>
- Sluiter, A., Hames, B., Ruiz, R., Scarlata, C., Sluiter, J., Templeton, D., Crocker, D., 2008. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass: Laboratory Analytical Procedure (LAP); NREL/TP-510-42618. NREL, Golden, CO, USA.
- Steinmetz, V., Villain-Gambier, M., Klem, A., Gambier, F., Dumarcay, S., Trebouet, D., 2019. Unveiling TMP Process Water Potential As an Industrial Sourcing of Valuable Lignin–Carbohydrate Complexes toward Zero-Waste Biorefineries. *ACS Sustainable Chem. Eng.* 7, 6390–6400. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.9b00181>
- Sun, Z., Fridrich, B., de Santi, A., Elangovan, S., Barta, K., 2018. Bright Side of Lignin Depolymerization: Toward New Platform Chemicals. *Chemical Reviews* 118, 614–678. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00588>
- Treasure, T., Gonzalez, R., Jameel, H., Phillips, R.B., Park, S., Kelley, S., 2014. Integrated conversion, financial, and risk modeling of cellulosic ethanol from woody and non-woody biomass via dilute acid pre-treatment. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining* 8, 755–769. <https://doi.org/10.1002/bbb.1494>

- Wang, H., Pu, Y., Ragauskas, A., Yang, B., 2019. From lignin to valuable products—strategies, challenges, and prospects. *Bioresource Technology* 271, 449–461. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.072>
- Wong, D.W.S., 2009. Structure and Action Mechanism of Ligninolytic Enzymes. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 157, 174–209. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8279-z>
- Yiin, C.L., Quitain, A.T., Yusup, S., Uemura, Y., Sasaki, M., Kida, T., 2018. Sustainable green pretreatment approach to biomass-to-energy conversion using natural hydro-low-transition-temperature mixtures. *Bioresource Technology* 261, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.04.039>
- Yoo, C.G., Meng, X., Pu, Y., Ragauskas, A.J., 2020. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review. *Bioresource Technology* 301, 122784. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.122784>
- Yu, X., Wei, Z., Lu, Z., Pei, H., Wang, H., 2019. Activation of lignin by selective oxidation: An emerging strategy for boosting lignin depolymerization to aromatics. *Bioresource Technology* 291, 121885. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121885>
- Zakzeski, J., Bruijninx, P.C.A., Jongerius, A.L., Weckhuysen, B.M., 2010. The Catalytic Valorization of Lignin for the Production of Renewable Chemicals. *Chemical Reviews* 110, 3552–3599. <https://doi.org/10.1021/cr900354u>
- Zhang, C., Li, H., Lu, J., Zhang, X., MacArthur, K.E., Heggen, M., Wang, F., 2017. Promoting Lignin Depolymerization and Restraining the Condensation via an Oxidation–Hydrogenation Strategy. *ACS Catalysis* 7, 3419–3429. <https://doi.org/10.1021/acscatal.7b00148>

## 4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE 5

La laccase commerciale d'*Aspergillus sp.* a présenté une activité vis-à-vis de la LTM menant soit à sa condensation soit à sa dépolymérisation en fonction des conditions opératoires utilisées. Il a en effet été démontré dans ce chapitre que la configuration du bioréacteur utilisé pour la bioconversion de la LTM (batch ou procédé semi-continu) joue un rôle crucial dans l'orientation des réactions radicalaires vers l'une ou l'autre de ces voies. Les résultats obtenus avec le réacteur membranaire constituent ainsi une première preuve de concept de l'intérêt de la filtration membranaire et de l'extraction *in-situ* des produits de réaction contre les réactions de repolymérisation, qui représentent l'un des freins majeurs et commun à tous les procédés de dépolymérisation de lignine.

Cette solution technique, qui relève du domaine du génie des procédés et ne nécessite aucun ajout de produit chimique dans le milieu réactionnel, est compatible avec les conditions douces de la dépolymérisation oxydante des lignines par voie enzymatique ou biologique. En revanche, elle présentera certainement des limites à son développement en complément de procédés de dépolymérisation en conditions plus drastiques tels que les procédés à très hautes températures ou très fortes concentrations en base ou en acide. La filtration continue des molécules de faibles masses moléculaires risque également de poser problème dans le cas de l'utilisation de catalyseurs de très faibles masses moléculaires, tels que les métaux, qui seront en permanence extraits du milieu de bioconversion. Un système d'immobilisation ou de recyclage performant de ces catalyseurs permettrait toutefois de pallier à ce problème.

Ainsi, la filtration membranaire ne représente pas une solution universelle contre les réactions de repolymérisation mais permet d'ouvrir de nouvelles pistes de recherche dans le cadre de la dépolymérisation biologique des lignines techniques et du développement de procédés écoresponsables.

## 5. PERSPECTIVES

Bien que le réacteur développé dans ce chapitre ait permis de démontrer un nouveau concept, il présente néanmoins certaines limites qu'il conviendra d'étudier dans le cadre de la poursuite du projet, pour une dépolymérisation efficace de la LTM et la production de monomères aromatiques.

Deux limites principales ont été observées lors de ces premiers essais concernant, d'une part la mauvaise rétention du substrat initial à l'intérieur du bioréacteur et, d'autre part la limite de dépolymérisation de la LTM menant majoritairement à des oligomères de masses moléculaires moyennes comprises entre 500 et 700 Da. L'amélioration du bioréacteur doit donc mener à une meilleure rétention de la LTM tout en favorisant sa dépolymérisation poussée en monomères (150-180 Da environ).

Une première solution simple, afin de pallier au problème de rétention, consisterait à diminuer le seuil de coupure de la membrane utilisée. Un seuil de coupure à 300 Da, par exemple, permettrait une rétention optimale de la LTM, au vue de sa distribution de masses moléculaires, tout en ne laissant sortir que les fragments monomériques de lignine (en très grande majorité). En revanche, une question peut alors se poser concernant l'impact de ce changement sur l'efficacité de la filtration contre les réactions de couplage radicalaire. En effet, la réduction du seuil de coupure membranaire sera accompagnée d'une diminution de la productivité du réacteur, en termes de flux de perméation, et cette diminution sera d'autant plus importante que le seuil de coupure sélectionné sera faible. Il a toutefois été supposé, dans la conception du bioréacteur, qu'une productivité importante est nécessaire afin de contrer la cinétique très rapide des réactions de condensation radicalaires. En suivant cette logique, l'allongement du temps de séjour hydraulique des fragments de lignine, entraîné par la perte de productivité, pourrait alors annuler ce bénéfice et à nouveau mener à la condensation de la LTM. Pour répondre à cette interrogation, il serait alors intéressant de conduire une étude comparative de l'impact de différentes membranes aux seuils de coupure décroissants sur la productivité du réacteur et la condensation de la LTM. Cette étude permettrait de définir le seuil de coupure membranaire le plus adapté à la rétention ainsi qu'à la dépolymérisation de la LTM. La meilleure rétention de la LTM pourrait peut-être aussi mener de façon indirecte à sa fragmentation plus poussée et à l'amélioration du rendement en monomères.

Une autre solution, plus complexe dans sa mise en œuvre, serait de conserver le seuil de coupure actuel mais d'ajouter une étape de filtration tangentielle du perméat produit sur une membrane de 300 Da, afin d'en extraire les monomères aromatiques et de permettre la recirculation des plus gros fragments de lignine vers le réacteur pour une nouvelle étape de dépolymérisation. Cette solution, illustrée en Figure 52, résout de façon indirecte le problème de rétention du substrat initial sans pour autant augmenter le temps de séjour hydraulique des fragments de lignine. De plus, les étapes de dépolymérisation répétées des molécules en recirculation pourraient permettre d'améliorer le rendement en monomères aromatiques.



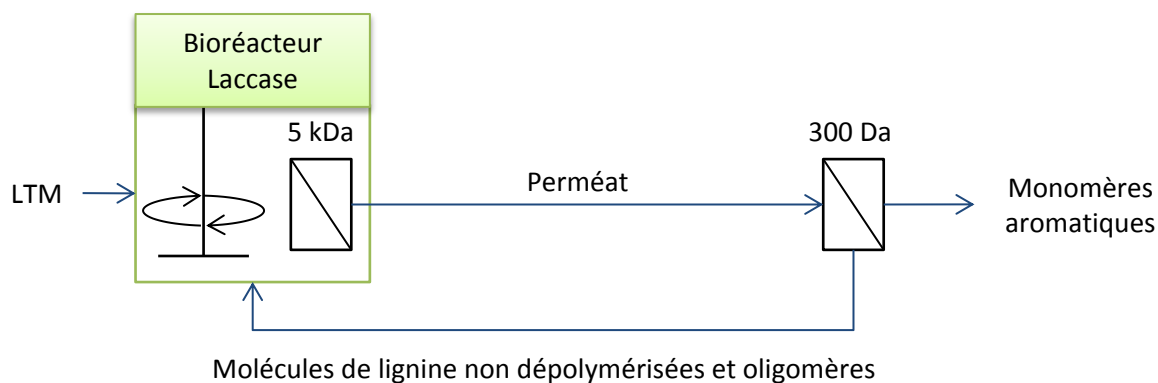


Figure 52 : proposition de montage pour la suite des essais de dépolymérisation de la LTM en réacteur membranaire.

Dans l'idéal, la combinaison des deux solutions précédemment proposées mènerait à un réacteur plus performant. En effet, la meilleure rétention des molécules initiales de lignine permettrait de diminuer les risques de colmatage de la membrane de 300 Da.

En parallèle de l'amélioration des performances du réacteur, de nouvelles méthodes analytiques devront aussi être développées afin de pouvoir caractériser les monomères et les oligomères de lignine générés lors des différents essais. La chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse, par exemple, pourrait convenir à cet effet.

Une fois la configuration du réacteur définie, une étude pourra également être menée sur l'impact de l'alimentation continue du réacteur avec de la LTM, en lieu et place du tampon phosphate-citrate utilisé jusque-là pour la simplification des analyses. Cette évolution permettrait d'obtenir un système de dépolymérisation continue de la LTM. En revanche, une trop forte concentration en lignine à l'intérieur du réacteur pourrait en contrepartie favoriser les réactions de condensation. Cette étude devra donc prendre en compte la vitesse et la concentration en lignine de l'alimentation.

Dans des perspectives plus lointaines, d'autres axes de recherche pourraient aussi être explorés comme la combinaison de notre approche par le procédé avec les stratégies de développement de catalyseurs améliorés (utilisation de laccases qui résistent à des conditions extrêmes de pH et de température par exemple). Cette orientation permettrait peut-être d'élargir le champ d'application du bioréacteur membranaire et il serait alors intéressant d'évaluer sa robustesse en utilisant différentes sources de lignines techniques.

## 6. REFERENCES

Hilgers, R., Vincken, J.-P., Gruppen, H., and Kabel, M.A. (2018). Laccase/Mediator Systems: Their Reactivity toward Phenolic Lignin Structures. *ACS Sustain. Chem. Eng.* *6*, 2037–2046.

Longe, L., Couvreur, J., Leriche Grandchamp, M., Garnier, G., Allais, F., and Saito, K. (2018). Importance of mediators for lignin degradation by fungal laccase. *ACS Sustain. Chem. Eng.* *8*, 10097-10107.

Picart, P., Liu, H., Grande, P.M., Anders, N., Zhu, L., Klankermayer, J., Leitner, W., Domínguez de María, P., Schwaneberg, U., and Schallmey, A. (2017). Multi-step biocatalytic depolymerization of lignin. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* *101*, 6277–6287.

Rakotovelo, A. (2017). Fragmentation enzymatique de la lignine pour l'obtention de synthons phenoliques. LCPO Université de Bordeaux.



# Conclusion générale



## CONCLUSION GENERALE

L'objectif des travaux présentés dans cette thèse a été de développer des procédés et de générer des données nécessaires à la valorisation de la lignine thermomécanique (LTM) dissoute dans les effluents de la papeterie Norske Skog de Golbey (88). Comme détaillé au chapitre 1, celle-ci se distingue des autres lignines techniques sur le marché par son procédé d'extraction de la biomasse lignocellulosique qui ne nécessite pas de produit chimique. Elle se différencie aussi par le manque d'informations à son sujet et par sa plus faible disponibilité industrielle. Toutefois, la réalité de cette source de lignine technique a été démontrée grâce au développement, et à l'évaluation techno-économique, d'un procédé membranaire permettant sa récupération à partir des eaux de procédé (Villain-Gambier *et al.*, 2020).

Les premières expériences conduites et rapportées au chapitre 2 ont permis de produire un lot référent de cette LTM sous la forme d'une fraction liquide (rétentat 1 kDa) et de la caractériser. Il en est ressorti que la LTM présente une structure native, c'est-à-dire qu'elle a conservé au cours de son procédé d'extraction la majeure partie de ses caractéristiques structurales *in-situ* (présentes au sein de la biomasse lignocellulosique) (Steinmetz *et al.*, 2019a). En effet, la LTM a préservé ses liaisons covalentes de type phényl-glucoside avec les galactoglucomannanes (25 pour 100 cycles aromatiques) et se présente majoritairement sous forme de complexes de lignine et d'hydrates de carbone (LCCs). Elle est également caractérisée par une faible condensation et de nombreuses liaisons inter-unité labiles de type  $\beta$ -O-4 (27 liaisons pour 100 cycles aromatiques). Toutefois, le procédé thermomécanique a entraîné un fractionnement important de sa structure puisqu'elle présente une masse moléculaire moyenne relativement faible, comprise entre 1 et 10 kDa.

D'après la littérature, cette structure singulière peut conférer à la LTM des propriétés intéressantes pour sa valorisation telles que des propriétés physico-chimiques de surface, grâce à sa structure amphiphile, ainsi que des propriétés biologiques antioxydantes, anti-UV ou encore antimicrobiennes (Oinonen *et al.*, 2016; Uraki *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2019). La caractérisation et la valorisation de ces propriétés sont actuellement étudiées avec des partenaires industriels par incorporation directe de la LTM dans divers produits de commodité des domaines de la cosmétique, de la phytoremédiation, de la détergence et pour le développement de biomatériaux innovants.

Afin de faciliter l'envoi d'échantillons aux partenaires et pour assurer la conservation de la LTM sur le long terme, la fraction liquide caractérisée au chapitre 2 a été en partie déshydratée sous forme de poudre grâce à la combinaison d'une étape d'évapo-concentration et d'une étape d'atomisation. Une étude analytique menée sur différents échantillons produits par ces procédés a permis de démontrer que la structure caractéristique de la LTM est préservée au cours de cette transformation (chapitre 3). La LTM peut même être stérilisée à l'autoclave, sans risque de dénaturer sa structure native, pour sa préservation à l'état liquide sur le court terme (Steinmetz *et al.*, 2019b). Ces informations générées sur la résistance de la LTM à divers procédés courants en post-production sont essentielles à son processus de valorisation car elles permettent de s'assurer que les propriétés détectées par les partenaires seront toujours applicables lors de sa production à l'échelle industrielle. Elles permettent également de souligner qu'il est possible de produire une forme stable, facilement stockable et transportable de LTM en vue de sa commercialisation.

En plus de sa valorisation directe, la richesse en liaisons labiles de la LTM en fait également un substrat de choix pour la production de monomères aromatiques pouvant servir de substituts aux dérivés pétrochimiques dans les domaines de la chimie fine et des biomatériaux. Cette deuxième voie de valorisation, qui passe par le développement d'un procédé de dépolymérisation de la LTM, a été étudiée dans la suite des travaux de cette thèse (chapitres 4 et 5). Deux catalyseurs enzymatiques ont été utilisés à cet effet : un cocktail multienzymatique, à activité manganèse-peroxydase majoritaire, extrait de fermentations de *P. chrysosporium* et une laccase commerciale, issue d'une culture d'*Aspergillus sp.* Toutefois, malgré plusieurs tentatives et modifications du milieu de bioconversion, seule la laccase commerciale d'*Aspergillus sp.* a démontré une activité vis-à-vis de la fraction liquide de LTM, dans les conditions réalisées. La suite des travaux de dépolymérisation de la LTM s'est donc concentrée sur l'utilisation de ce catalyseur.

Lors de l'oxydation de la LTM par la laccase d'*Aspergillus sp.* en batch, la production de molécules de lignine de masses moléculaires élevées (15 kDa en moyenne) a été observée. Il a alors été conclu que les conditions opératoires utilisées pour cet essai ont favorisé la stabilisation des produits d'oxydation radicalaires par polymérisation et entraîné la condensation de la LTM au lieu de sa dépolymérisation. Pour tenter d'y remédier, l'ajout de médiateurs d'oxydoréduction au milieu de bioconversion a été étudié, comme rapporté dans la littérature (Longe *et al.*, 2018). Malheureusement aucun effet bénéfique de ces médiateurs n'a pu être observé au cours de ces essais.

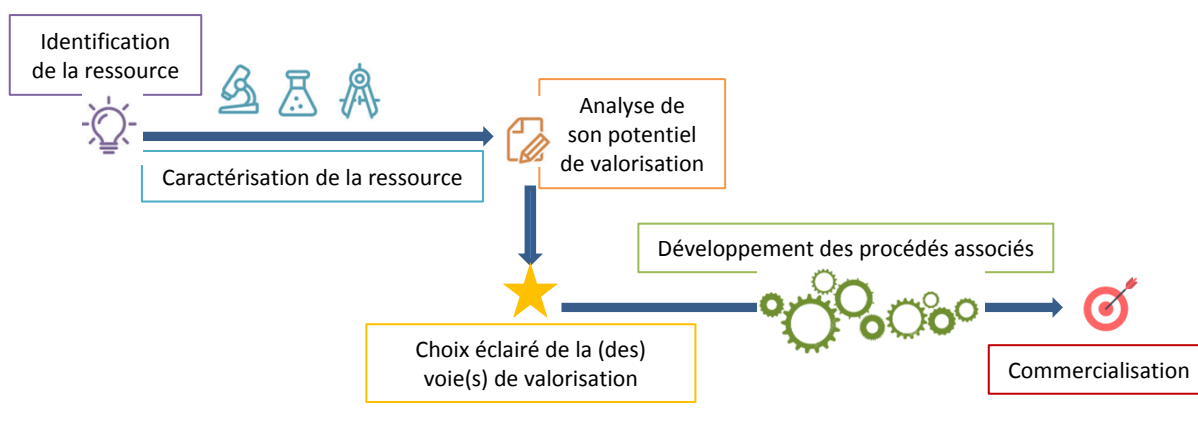
Une approche originale a alors été explorée en développant un bioréacteur membranaire fonctionnant en mode semi-continu et permettant l'extraction *in-situ* des fragments réactifs de lignine au cours de la bioconversion. Le principe de cette approche repose sur le déplacement de l'équilibre qui existe entre les réactions de condensation et de dépolymérisation. Elle permet également de reproduire la compartimentation de la lignine et de ses produits de dépolymérisation qui existe lors de la décomposition biologique des lignines *in-vivo*. En comparant l'effet de la laccase vis-à-vis de la LTM en batch et en réacteur, l'intérêt de la filtration membranaire contre les réactions de condensation a pu être démontré. Une dépolymérisation de la LTM a en effet été observée en réacteur, menant à la production d'oligomères de masses moléculaires moyennes comprises entre 500 et 700 Da.

Ces derniers résultats constituent une première preuve de concept et soulignent la pertinence du développement d'un procédé de dépolymérisation en bioréacteur membranaire. Le procédé proposé dans ces travaux est à la fois facile à mettre en œuvre, écoresponsable et économique. Il permet de travailler dans des conditions opératoires douces et sans ajout de produits chimiques. Ainsi, la possible labellisation « verte » des produits qui en résulteraient peut être envisagée, tout comme pour la LTM elle-même. Afin de poursuivre ce projet de recherche sur la dépolymérisation de la LTM, le premier défi à relever sera d'améliorer les performances du réacteur pour arriver à la production de monomères aromatiques avec un rendement pertinent. Par la suite, la caractérisation et l'évaluation des propriétés de ces monomères, purifiés ou en mélange, seront essentielles pour décider de l'intérêt industriel du procédé et de ses applications potentielles.

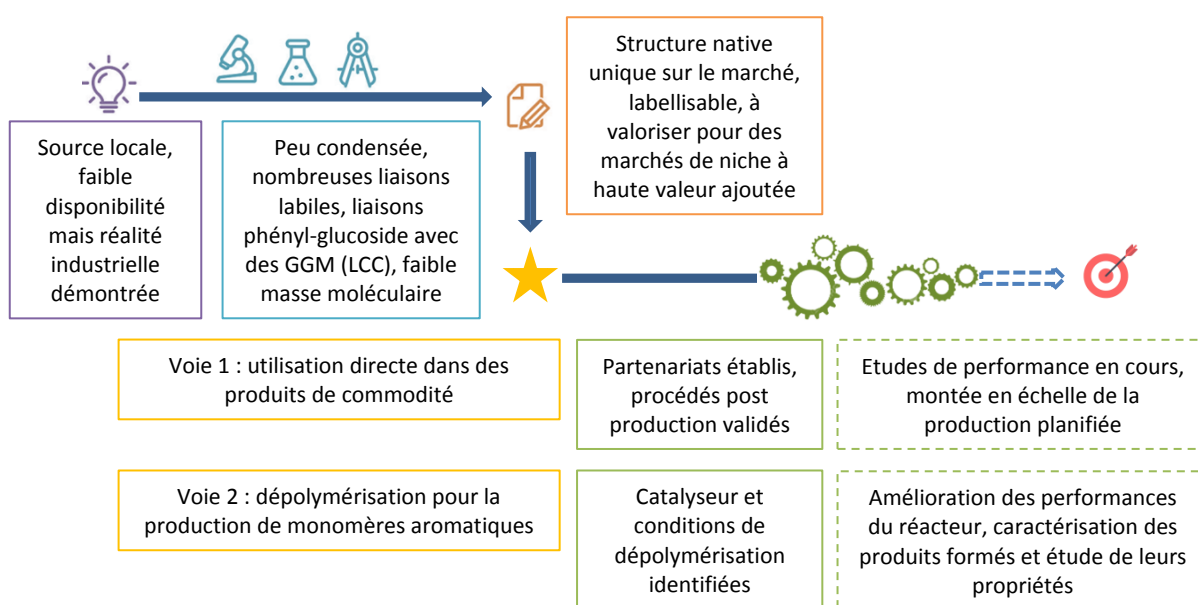
Finalement, l'ensemble des résultats générés dans le cadre de cette thèse a permis de poser les bases nécessaires à la valorisation de la LTM, notamment en apportant de précieuses informations structurales à son sujet ainsi qu'en identifiant un catalyseur et des conditions opératoires menant à sa dépolymérisation. La figure 53, qui schématise de façon générale le processus de valorisation d'une ressource résiduaire, permet aussi de visualiser l'état d'avancement du projet de valorisation de la LTM au moment de la rédaction de cette thèse. Aujourd'hui, les résultats générés ont permis de souligner la singularité de la LTM par rapport aux autres sources de lignines techniques actuellement sur le marché. Ils mettent ainsi en avant l'intérêt stratégique de sa valorisation par les papeteries thermomécaniques pour lutter contre la chute de la demande en papier. De façon plus générale, ce projet s'inscrit dans une démarche écoresponsable et durable pour participer à la transition économique du 21<sup>ème</sup> siècle et au développement des bioraffineries.



## A- Processus général de valorisation d'une ressource résiduaire



## B- Etat d'avancement de la valorisation de la LTM



- Encadré plein : réalisations
- - - - Encadré pointillé : perspectives

Figure 53 : schéma du processus général de valorisation d'une ressource résiduaire (A) et état d'avancement du projet de valorisation de la LTM (B).

# Partie expérimentale



# PARTIE EXPERIMENTALE

## SOMMAIRE

<b>1. Matériel et solutions .....</b>	<b>230</b>
1.1. Matériel .....	230
1.2. Préparation des solutions.....	231
1.2.1. Préparation du tampon phosphate-citrate pH 4,5.....	231
1.2.2. Préparation du tampon oxalate pH 4,5.....	231
1.2.3. Préparation du tampon succinique pH 4,5 .....	231
1.2.4. Préparation de la laccase pour les essais de bioconversion .....	231
<b>2. Protocoles de culture fongique et de bioconversion enzymatique .....</b>	<b>232</b>
2.1. Entretien de la souche <i>P. chrysosporium</i> .....	232
2.2. Production de spores .....	232
2.3. Tests de croissance et de contamination .....	232
2.4. Fermentation en milieu solide (FMS) .....	233
2.5. Extraction des enzymes produites en FMS .....	233
2.6. Bioconversion de la LTM en milieu liquide .....	233
2.7. Extraction de la LTM au cours de la FMS .....	234
<b>3. Protocoles analytiques.....</b>	<b>234</b>
3.1. Dosage spectrophotométrique de l'activité lignolytique totale.....	234
3.2. Dosage spectrophotométrique de l'activité laccase .....	235
3.3. Dosage spectrophotométrique de l'activité LiP .....	235
3.4. Dosage spectrophotométrique de l'activité MnP .....	236
3.5. Analyses par chromatographie sur couche mince (CCM) .....	236

# 1. MATERIEL ET SOLUTIONS

## 1.1. Matériel

Les listes ci-dessous indiquent les références et la provenance des principaux produits et matériels utilisés dans le cadre de cette thèse. L'ensemble des autres produits chimiques de base (acides, bases, sels, solvants, milieux de culture) ont été commandés parmi les références classiques de grands fournisseurs (VWR chemicals et Sigma Aldrich).

Produits : Laccase d'*Aspergillus sp.* (SAE0050, activité > 1000 U.g<sup>-1</sup>), acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS, A1888-1G), 2,6-diméthoxyphénol (DMP, D135550-25G), acide violurique (VA, 95120-10G), lignine Kraft (471003-100G), épicatechine et vanilline en provenance de Sigma Aldrich ; réactif de Folin-Ciocalteu de VWR chemicals (31360.264) ; kit de standards pullulanes d'Agilent Technologies (PL2090-0101).

Matériels : cellule Amicon® de 400 mL (modèle 8400 ou 5124) de Merck Millipore (Figure 54), membranes de 5 kDa en polyethersulfone (PES) de Sartorius (14629-63-D), membranes de 5 kDa en cellulose régénérée (Ultracel®) de Merck Millipore (PLCC07610), plaques de CCM gel de silice 60 F254 de Merck (1.05554.0001), filtre miracloth Calbiochem de 22-25 µm (475855-1 chez VWR).

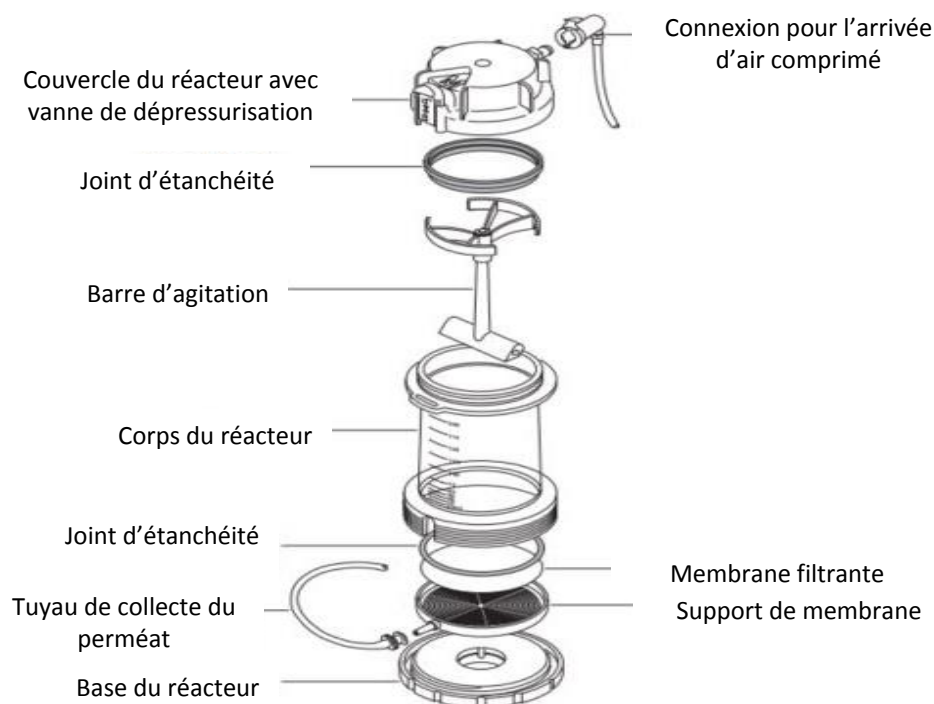


Figure 54 : schéma d'assemblage d'une cellule d'ultrafiltration Amicon®.

## **1.2. Préparation des solutions**

### *1.2.1. Préparation du tampon phosphate-citrate pH 4,5*

Le tampon phosphate-citrate a été préparé par mélange de solutions stocks de phosphate di-sodique et d'acide citrique à 0,5 M. Pour préparer les solutions stocks à 0,5 M, 35,5 g de phosphate di-sodique et 52,5 g d'acide citrique monohydraté ont été dilués chacun dans 500 mL d'eau osmosée. Le tampon a ensuite été obtenu en diluant 36 mL de solution de phosphate di-sodique 0,5 M et 22 mL d'acide citrique 0,5 M dans un volume d'eau final de 200 mL. Le pH a été vérifié à la fin de chaque nouvelle préparation.

### *1.2.2. Préparation du tampon oxalate pH 4,5*

Le tampon oxalate a été préparé par mélange de solutions stocks d'oxalate d'ammonium monohydraté et d'acide oxalique dihydraté à 50 mM. Pour préparer les solutions stocks à 50 mM, 3,6 g d'oxalate d'ammonium et 3,2 g d'acide oxalique ont été dilués chacun dans 500 mL d'eau osmosée. Le tampon a ensuite été obtenu en diluant 10 mL de solution d'acide oxalique dans 100 mL d'oxalate d'ammonium. Le pH a été vérifié à la fin de chaque nouvelle préparation.

### *1.2.3. Préparation du tampon succinique pH 4,5*

Le tampon succinique à 0,5 M a été préparé par dissolution de 5,9 g d'acide succinique dans 90 mL d'eau osmosée chauffée et sous agitation. Par la suite, 2,5 mL d'une solution de soude à 10 M ont été ajoutés pour amener le pH de la solution à pH 4,5 et le volume final de solution a été ajusté à 100 mL avec de l'eau osmosée. Le pH du tampon a été vérifié à la fin de chaque nouvelle préparation.

### *1.2.4. Préparation de la laccase pour les essais de bioconversion*

L'activité de la laccase d'*Aspergillus sp.*, dosée selon le protocole ABTS décrit au paragraphe (§) 3.2 de cette partie expérimentale, est de 800 U.mL<sup>-1</sup> à 30 °C. Cette solution stock enzymatique a été diluée en cascade au 1/10000 dans du tampon phosphate-citrate pH 4,5 avant chaque début d'expérimentation. L'activité enzymatique de la solution finale de laccase a été systématiquement dosée en triplicat afin de s'assurer de la bonne réalisation et de la reproductibilité des dilutions. Cette solution a ensuite été filtrée à 0,22 µm avant d'être ajoutée aux tubes de bioconversion ou dans le réacteur.

## **2. PROTOCOLES DE CULTURE FONGIQUE ET DE BIOCONVERSION ENZYMATIQUE**

### **2.1. Entretien de la souche *P. chrysosporium***

La souche de *P. chrysosporium* (RP-78), mise à notre disposition par le laboratoire Interactions Arbres/Micro-organismes (UMR 1136), a été maintenue sur du milieu malt-agar (extrait de malt 20 g.L<sup>-1</sup> et agar 20 g.L<sup>-1</sup>) à 4°C. Lors de chaque repiquage, de nouvelles boîtes de milieu malt-agar ont été préparées, des carrés de gélose recouverts de mycélium ont été découpés dans les boîtes de réserve puis déposés au centre des nouvelles boîtes de culture (1 carré d'environ 0,5 cm × 0,5 cm par nouvelle boîte). Les boîtes fraîchement inoculées ont ensuite été placées à 37 °C dans une enceinte climatique pendant 2 jours, le temps que le mycélium recouvre à nouveau la surface des géloses nutritives. Ces boîtes ont finalement été remises en réserve à 4 °C ou utilisées pour la production de spores.

### **2.2. Production de spores**

Des carrés de gélose recouverts de mycélium, provenant des boîtes de repiquage maintenues depuis 2 jours à 37 °C, ont été découpés et utilisés pour inoculer de nouvelles boîtes de pétri préparées avec du milieu de sporulation (10 g.L<sup>-1</sup> de glucose, 10 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de malt, 2 g.L<sup>-1</sup> de peptone, 2 g.L<sup>-1</sup> d'extrait de levure, 2 g.L<sup>-1</sup> de phosphate de potassium monobasique (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 1 g.L<sup>-1</sup> d'asparagine, 1 g.L<sup>-1</sup> de sulfate de magnésium heptahydraté (MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O), 1 mg.L<sup>-1</sup> de chlorhydrate de thiamine et 20 g.L<sup>-1</sup> d'agar). Les boîtes de sporulation ont été incubées à 37 °C pendant 4 jours. Les spores ont été extraites de ces boîtes en frottant délicatement la surface des mycéliums après y avoir ajouté quelques millilitres d'eau osmosée. Les suspensions de spores ont été filtrées sur des morceaux de filtre Miracloth autoclavés puis utilisées pour inoculer les milieux de fermentation en milieu solide et réaliser les tests de croissance et de contamination. La concentration de la suspension de spores a été déterminée par une mesure de turbidité à 600 nm (1 densité optique = 5.10<sup>6</sup> spores.mL<sup>-1</sup>).

### **2.3. Tests de croissance et de contamination**

Des solutions de rétentat 1 kDa non dilué, dilué au 1/10 et dilué au 1/100 (dans de l'eau osmosée) ont été supplémentées avec de l'agar à une concentration de 20 g.L<sup>-1</sup> puis coulées dans des boîtes de pétri (20 mL par boîte), sous un poste de sécurité microbiologique (chapitre 4 § 2.1). Pour chaque solution de rétentat, 4 boîtes de pétri ont été préparées dont 3 ont étéensemencées avec des spores de *P. chrysosporium* à une concentration de 0.5.10<sup>5</sup> spores.mL<sup>-1</sup>. Toutes les boîtes ont ensuite été placées dans une enceinte climatique à 37 °C pendant 7 jours. Des photographies de chacune des boîtes ont été prises à la suite de ces 7 jours d'incubation afin d'évaluer la croissance de *P. chrysosporium* sur les boîtes inoculées et l'état de contamination du rétentat sur les boîtes non ensemencées.

#### **2.4. Fermentation en milieu solide (FMS)**

Les fermentations en milieu solide ont été réalisées en solidifiant du rétentat 1 kDa, préalablement dilué au 1/10 dans de l'eau osmosée, avec de l'agar à 20 g.L<sup>-1</sup>. Les boîtes de fermentation, contenant chacune 20 mL de rétentat dilué et gélifié, ont été inoculées avec des spores de *P. chrysosporium* à une concentration de 2,5.10<sup>5</sup> spores.mL<sup>-1</sup> de gélose, sauf lors de l'exploration des conditions de FMS où certaines boîtes ont étéensemencées avec des concentrations en spores de 0,5.10<sup>5</sup> et 5.10<sup>5</sup> spores.mL<sup>-1</sup> de gélose (chapitre 4 § 2.3). Les boîtes ont ensuite été placées dans une enceinte climatique à 37 °C pendant 3 à 4 jours avant l'extraction des cocktails enzymatiques (chapitre 4 § 3.1) ou extraites 3 par 3 de façon régulière pendant 7 jours lors de l'étude cinétique de la production des enzymes (chapitre 4 § 2.2).

#### **2.5. Extraction des enzymes produites en FMS**

Afin d'extraire les enzymes lignolytiques, 7,5 mL de tampon phosphate-citrate ou de tampon oxalate à pH 4,5 ont été ajoutés aux boîtes de FMS. Les boîtes ont ensuite été scellées avec du Parafilm® et mises sur glace et sous agitation orbitale à 150 rpm pendant 1 h. Les surnagants ont été pipetés et filtrés à 0,22 µm puis conservés sur glace en attendant d'être dosés et ajoutés aux tubes de bioconversion, dans le cas des essais de dépolymérisation de la LTM en milieu liquide.

#### **2.6. Bioconversion de la LTM en milieu liquide**

Les essais de bioconversion de la LTM en milieu liquide (chapitre 4 § 3.1 et chapitre 5 § 2.2) ont été réalisés dans des tubes Falcon™ de 50 mL et en duplicat pour chaque condition. Dans chaque tube, 2 mL de rétentat 1 kDa ont été mis en contact avec 10 mL de cocktail enzymatique ou 1 mL de solution stock de laccase à 0,08 U.mL<sup>-1</sup>. Dans les tubes contenant des cofacteurs, 500 µL d'une solution de sulfate de manganèse (MnSO<sub>4</sub>) à 5 mM ainsi que 250 µL d'une solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,1 M ont été ajoutés. Les médiateurs quant à eux ont été introduits dans les tubes de sorte à obtenir un ratio lignine/médiateur de 1 :1 en mol.L<sup>-1</sup> d'unités phénoliques (MW = 334,37 g.mol<sup>-1</sup>)/ mol.L<sup>-1</sup> de médiateur (MW<sub>ABTS</sub> = 514,62 g.mol<sup>-1</sup> et MW<sub>VA</sub> = 175,1 g.mol<sup>-1</sup>). La masse de lignine introduite par tube a été calculée comme suit : 2 mL de rétentat à 2,58 % de MS contiennent 51,6 mg de solide dont 23 % ont été attribués à la LTM soit 12 mg de LTM par tube. Dans certains tubes, de l'isopropanol (IPA) a également été ajouté à une concentration volumique de 10 %. Le volume final de l'ensemble des tubes a été ajusté à 20 mL avec du tampon pH 4,5 et ces derniers ont été placés dans une enceinte climatique à 25 °C avec une agitation orbitale de 200 rpm pendant 5 jours. Des tubes



témoins ont été préparés contenant uniquement le rétentat 1 kDa et le tampon de réaction. Des prélèvements d'1,5 mL ont été faits dans chacun des tubes au bout de 30 min, 6 h, 24 h et 120 h de bioconversion en s'assurant préalablement de leur bonne homogénéisation. Ces prélèvements ont été instantanément neutralisés à pH 12 par micro-addition de soude très concentrée (19 à 26  $\mu\text{L}$  en fonction des tampons) afin d'arrêter les réactions enzymatiques et de solubiliser l'ensemble de la matière prélevée. Tous les échantillons ont été par la suite analysés en SEC et certains également en CCM comme décrit au paragraphe 3.5 de cette section expérimentale.

### ***2.7. Extraction de la LTM au cours de la FMS***

Afin d'étudier l'impact de la production des enzymes lignolytiques sur la LTM lors de la FMS (annexe 1), les géloses de fermentation ont été divisées en deux : une moitié a servi à l'extraction des enzymes lignolytiques pour leur quantification selon le protocole 2.5 (résultats présentés au chapitre 4 § 2.2) et l'autre moitié a été extraite comme suit afin de caractériser la LTM en SEC ainsi que les composés aromatiques de bas poids moléculaire en CCM. Les moitiés de gélose ont été introduites dans des tubes Falcon™ de 50 mL auxquels ont été ajoutés 5 mL d'une solution de soude à 10 mM (pH 12). Les tubes ont été homogénéisés au vortex pendant 1 min puis placés sous agitation orbitale à 150 rpm sur glace pendant 1 h. Après agitation, les surnageants ont été pipetés et filtrés sur coton pour éliminer les particules d'agar puis conservés au congélateur à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  en attendant les analyses.

## **3. PROTOCOLES ANALYTIQUES**

### ***3.1. Dosage spectrophotométrique de l'activité lignolytique totale***

L'activité lignolytique totale des cocktails enzymatiques a été mesurée par spectrophotométrie à 420 nm grâce à l'enregistrement sur 3 min de la cinétique d'oxydation de l'ABTS ( $\epsilon_{\text{ABTS oxydé}}(420\text{ nm}) = 36000\text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Une unité d'activité enzymatique (U) a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1  $\mu\text{mol}$  d'ABTS par minute. Les cuves de dosage ont été préparées en mélangeant 600  $\mu\text{L}$  de solution enzymatique à doser, 40  $\mu\text{L}$  de  $\text{MnSO}_4$  à 5 mM, 50  $\mu\text{L}$  d' $\text{H}_2\text{O}_2$  à 2 mM et 210  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate-citrate à pH 4,5. Les cuves ont ensuite été incubées 20 min à  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  puis 100  $\mu\text{L}$  de solution d'ABTS à 5 mM ont été ajoutés pour démarrer les cinétiques. Les cinétiques ont été enregistrées contre un blanc ne contenant pas d'ABTS. Les tangentes de chaque courbe ont été tracées sur la portion linéaire des cinétiques enzymatiques (entre 0 et 30 secondes) où la vitesse de réaction est maximale. Les activités enzymatiques totales des solutions dosées (en  $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) ont été calculées selon l'équation :

$AE \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{Vt \times Cd \times 10^3}{Vse \times \varepsilon \times l}$ $= \frac{1 \times Cd \times 10^3}{0,6 \times 36000 \times 1}$	<p>AE : activité enzymatique en U.mL<sup>-1</sup></p> <p>Vt : volume total de solution dans la cuve de dosage en mL</p> <p>Cd : coefficient directeur de la tangente à la courbe en min<sup>-1</sup></p> <p>Vse : volume de solution enzymatique à doser en mL</p> <p>ε : coefficient d'extinction molaire en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup></p> <p>l : longueur de la cuve traversée par le faisceau en cm<sup>-1</sup></p>
---	--

Pour obtenir les AE en U.g<sup>-1</sup> de MS, les AE en U.mL<sup>-1</sup> ont été multipliées par le volume de tampon utilisé pour l'extraction des boîtes de FMS (7,5 mL) puis divisées par 0,0516 g, masse qui correspond à la quantité de matière sèche contenue dans 20 mL de rétentat dilué au 1/10 (0,258 % de MS).

### 3.2. Dosage spectrophotométrique de l'activité laccase

Les activités laccase des cocktails enzymatiques et des dilutions de laccase commerciale ont également été mesurées par suivi spectrophotométrique de l'oxydation de l'ABTS à 420 nm durant 3 min ( $\varepsilon_{\text{ABTS oxydé (420 nm)}} = 36000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ). Les cuves de dosage ont été préparées en mélangeant 600 µL de solution enzymatique à doser et 300 µL de tampon phosphate-citrate à pH 4,5. Les cuves ont ensuite été incubées 20 min à 30 °C puis 100 µL de solution d'ABTS à 5 mM ont été ajoutés pour démarrer les cinétiques. Les cinétiques ont été enregistrées contre un blanc ne contenant pas d'ABTS. Les tangentes de chaque courbe ont été tracées sur la portion linéaire des cinétiques enzymatiques (entre 0 et 30 secondes) où la vitesse de réaction est maximale. Les activités laccase des solutions dosées ont été calculées de la même façon que l'activité enzymatique totale selon l'équation décrite au paragraphe 3.1.

### 3.3. Dosage spectrophotométrique de l'activité LiP

L'activité LiP des cocktails enzymatiques a été mesurée à 468 nm en suivant la cinétique d'oxydation du 2,6-diméthoxyphénol (DMP,  $\varepsilon_{\text{DMP oxydé (468 nm)}} = 49600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ) durant 3 min. Une unité d'activité enzymatique (U) a été définie comme la quantité d'enzyme nécessaire pour oxyder 1 µmol de DMP par minute. Les cuves de dosage ont été préparées en mélangeant 524 µL de solution enzymatique à doser, 256 µL de fluorure de potassium à 17,2 mM, et 1 mL de tampon phosphate-citrate à pH 4,5. Les cuves ont ensuite été incubées 20 min à 30 °C puis 20 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,1 M et 200 µL de solution de DMP à 18 mM ont été ajoutés pour démarrer les cinétiques. Les cinétiques ont été enregistrées contre un blanc ne contenant pas de DMP. Les tangentes de chaque courbe ont été tracées sur la portion linéaire des cinétiques enzymatiques (entre 0 et 30 secondes) où la vitesse de réaction est maximale. Les activités LiP des solutions dosées (en U.mL<sup>-1</sup>) ont été calculées selon l'équation :

$AE \left( \frac{U}{mL} \right) = \frac{Vt \times Cd \times 10^3}{Vse \times \varepsilon \times l}$ $= \frac{2 \times Cd \times 10^3}{0,524 \times 49600 \times 1}$	<p>AE : activité enzymatique en U.mL<sup>-1</sup></p> <p>Vt : volume total de solution dans la cuve de dosage en mL</p> <p>Cd : coefficient directeur de la tangente à la courbe en min<sup>-1</sup></p> <p>Vse : volume de solution enzymatique à doser en mL</p> <p>ε : coefficient d'extinction molaire en L.mol<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup></p> <p>l : longueur de la cuve traversée par le faisceau en cm<sup>-1</sup></p>
---	--

Les AE en U.g<sup>-1</sup> ont ensuite été calculées à partir des AE en U.mL<sup>-1</sup> de la même façon que présentée au paragraphe 3.1.

#### **3.4. Dosage spectrophotométrique de l'activité MnP**

L'activité MnP des cocktails enzymatiques a été mesurée de la même façon que l'activité LiP, en suivant l'oxydation du DMP à 468 nm durant 3 min. Les cuves de dosage ont été préparées en mélangeant 524 µL de solution enzymatique à doser, 256 µL de fluorure de potassium à 17,2 mM, 40 µL de MnSO<sub>4</sub> à 5 mM et 960 µL de tampon succinique à pH 4,5. Les cuves ont ensuite été incubées 20 min à 30 °C puis 20 µL d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,1 M et 200 µL de solution de DMP à 18 mM ont été ajoutés pour démarrer la cinétique. Les cinétiques ont été enregistrées contre un blanc ne contenant pas de DMP. Les tangentes de chaque courbe ont été tracées sur la portion linéaire des cinétiques enzymatiques (entre 0 et 30 secondes) où la vitesse de réaction est maximale. Les activités MnP des solutions dosées (en U.mL<sup>-1</sup> ainsi qu'en U.g<sup>-1</sup>) ont été calculées de la même façon que les activités LiP selon l'équation décrite au paragraphe 3.3.

#### **3.5. Analyses par chromatographie sur couche mince (CCM)**

Une méthode d'analyse en CCM a été mise au point afin de visualiser l'évolution de la composition en molécules phénoliques de faibles masses moléculaires de certains prélèvements de bioconversion (chapitre 5 § 2.2 et annexe 1). Des plaques de silice classiques ont été utilisées pour ces analyses. 10 µL de chaque échantillon à analyser ont été déposés sur ces plaques ainsi que 2 µL de solutions de lignine Kraft, d'épicatchine et de vanilline à 1 % massique servant de témoins de migration. Une phase mobile, composée de toluène, d'acétone et d'acide acétique en mélange (9 : 1 : 1 v/v) a été employée pour l'élution des plaques, dans une cuve de migration préalablement saturée en vapeurs de solvants. Suite à la migration, les plaques de silice ont révélées en deux étapes. Dans un premier temps une solution de carbonate de sodium à 20 % a été pulvérisée. Les plaques ont ensuite été séchées puis une solution de réactif de Folin Ciocalteu, diluée au tiers avec de l'eau osmosée, a été vaporisée afin de colorer les composés phénoliques.

# Annexe 1



## ANNEXE 1 / EFFET DES ENZYMES LIGNOLYTIQUES PRODUITES PAR *PHANEROCHAETE CHRYSOSPORIUM* SUR LA LIGNINE THERMOMECHANIQUE EN MILIEU SOLIDE

Au cours de cette thèse, plusieurs études ont été menées en parallèle des productions enzymatiques par FMS afin de caractériser l'impact des enzymes lignolytiques sur la LTM en milieu solide. En effet, il a été suspecté que le changement de couleur des boîtes de FMS était associé à une modification de la LTM. Des analyses en chromatographie sur couche mince (CCM) et en SEC ont ainsi été réalisées sur des extraits de gélose afin de le vérifier.

Au total, quatre études similaires ont été réalisées. L'ensemble de ces études ayant permis de tirer les mêmes conclusions, seuls les résultats de l'étude menée en parallèle de la caractérisation cinétique de la FMS (chapitre 4, paragraphe 2.2) sont détaillés pour exemple dans cette annexe. Pour rappel, la Figure 36 correspondant à la cinétique de production des enzymes lignolytiques lors de cette FMS est redonnée ci-dessous.

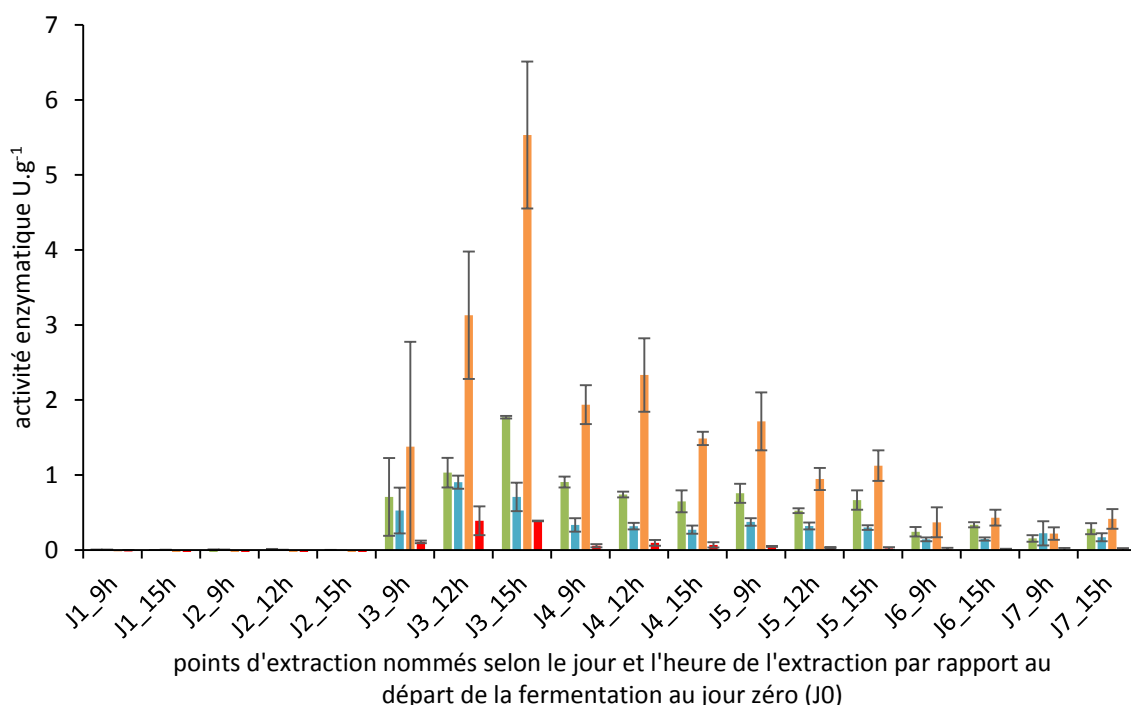


Figure 36 : cinétique de production des enzymes lignolytiques par *P. chrysosporium* au contact de la LTM : activité enzymatique totale (orange), MnP (vert), LiP (bleu) et laccase (rouge).

Les résultats de SEC obtenus par extraction des géluses de FMS sont présentés en Figure 55. Il est possible d'y observer que les chromatogrammes des échantillons prélevés les 2 premiers jours de fermentation sont parfaitement identiques entre eux et avec le témoin (boîte de FMS non inoculée) (Fig. 55A). En l'absence d'enzymes lignolytiques, il n'y a donc aucune évolution de la distribution de masse de la LTM. A partir du jour 3 à 9h, lorsque les enzymes ont commencées à être détectées dans le milieu, un élargissement et une déformation des chromatogrammes vers la droite ont été observés de façon progressive jusqu'à la fin du jour 3 (Fig. 55B). Cette évolution correspond à une augmentation de la masse moléculaire de la LTM, de 9 à 25 kDa pour son pic d'intensité maximale, et donc à sa condensation. Au jour 4 de fermentation, les chromatogrammes n'évoluent plus et sont à nouveau parfaitement superposables entre eux ainsi qu'avec ceux des jours suivants (5, 6 et 7) (Fig. 55C). Cette stabilité de la distribution de masses moléculaires de la LTM est observée en même temps que la diminution progressive de l'activité enzymatique dans le milieu.

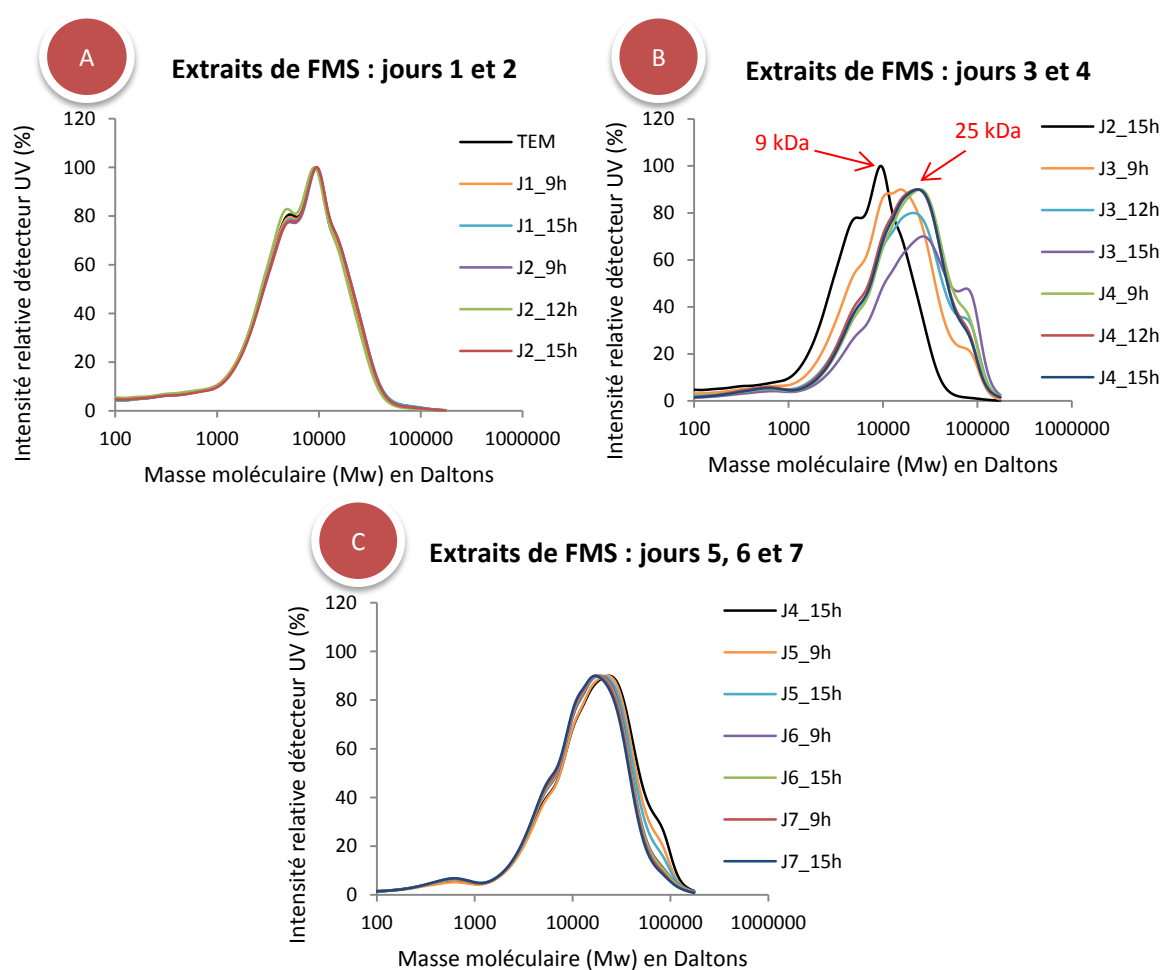


Figure 55 : résultats de SEC associés aux extraits de FMS du jour 1 au jour 7.

Les résultats de l'analyse par CCM des extraits de gélose sont présentés en Figure 56. Cette analyse permet de visualiser l'évolution de la composition en composés phénoliques de faibles masses moléculaires des extraits par comparaison de leurs profils de migration avec celui de l'extrait témoin. Aucune identification de composés, en revanche, n'a été réalisée par cette méthode, les standards déposés sur la plaque permettant simplement de s'assurer des bonnes conditions de migration lors de l'analyse. En effet, il est possible de constater grâce à ces standards que, dans les conditions de CCM utilisées, les polymères phénoliques de polarité élevée liée à la présence de nombreux groupements hydroxyles (comme la lignine Kraft) restent à la ligne de dépôt tandis que les phénols de plus faibles masses moléculaires (oligomères) moins polaires sont entraînés par la phase mobile.

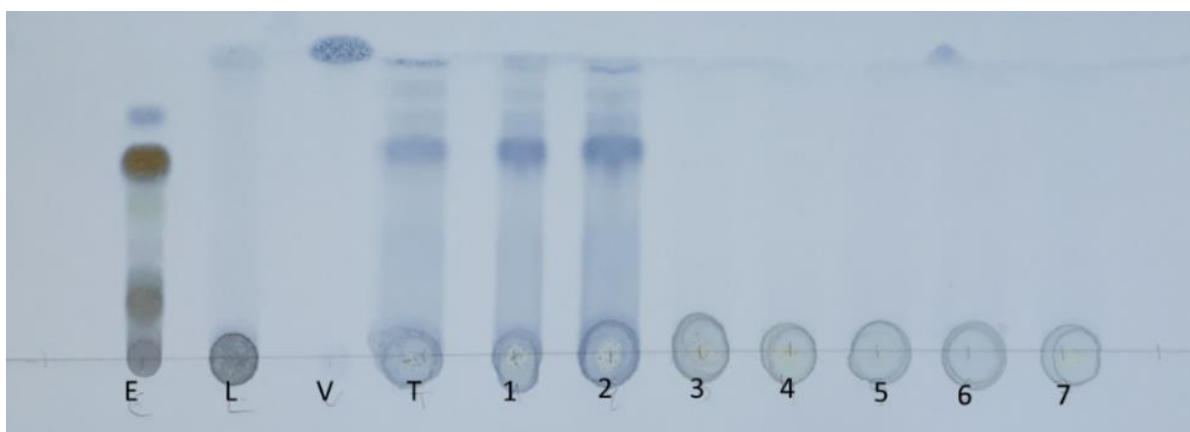


Figure 56 : CCM des extraits de FMS à 15 heures, du jour 1 au jour 7 (le numéro inscrit en légende sous les dépôts correspond au jour de fermentation). De la lignine Kraft (L), de la vanilline (V) et de l'épicatéchine (E) ont été déposées en tant que standards et un extrait de boîte de FMS non inoculée sert de témoin (T) de composition initiale des géloses.

Sur cette plaque de CCM, il est important de noter que la production des enzymes lignolytiques est aussi associée à la disparition des composés phénoliques de faibles masses moléculaires des extraits de FMS. L'explication la plus plausible à leur disparition est leur consommation par les enzymes lignolytiques en tant qu'intermédiaires d'oxydoréduction, entraînant par la suite leur polymérisation avec la LTM puisque les conditions de fermentation favorisent la stabilisation des radicaux phénoxyles par condensation et non pas par dépolymérisation. Cette observation met ainsi en évidence l'implication des composés phénoliques de faibles masses moléculaires dans le mécanisme de condensation de la LTM.



Finalemment, cette étude a permis de mettre en évidence une modification structurale de la LTM qui corrèle parfaitement avec la production des enzymes lignolytiques par *P. chrysosporium* en milieu solide. Malheureusement, la modification observée correspond à une condensation de la LTM et donc à une augmentation importante de sa masse moléculaire. L'analyse en CCM des composés phénoliques de faibles masses moléculaires a également permis de préciser que ces derniers sont impliqués dans les réactions de condensation de la LTM suite à leur oxydation par les enzymes lignolytiques. Toutefois, la FMS n'étant pas compatible avec le développement d'une extraction membranaire *in-situ* des produits de dépolymérisation, il a été décidé de ne pas poursuivre les travaux de cette thèse dans ces conditions catalytiques.



## Résumé

La lignine thermomécanique (LTM) est une lignine technique très peu caractérisée et inexploitée, dissoute dans les eaux de procédé de papeteries thermomécaniques. L'objectif général de cette thèse est de développer des connaissances et des procédés menant à sa valorisation industrielle. Les travaux rapportés concernent plus précisément la production d'un lot référent de LTM par filtration membranaire, puis sa caractérisation analytique et son conditionnement post-production. Ils incluent également le développement d'un procédé de dépolymérisation enzymatique de la LTM en bioréacteur membranaire. Les résultats générés démontrent qu'il est possible de produire une forme stable, facilement stockable et transportable de LTM en vue de sa commercialisation. Ils soulignent aussi la singularité structurale de cette lignine technique et mettent en avant l'intérêt stratégique de sa valorisation. Enfin, ils démontrent pour la première fois l'intérêt de la filtration membranaire dans le domaine de la dépolymérisation enzymatique de lignines techniques.

**Mots-clés :** Lignine, valorisation, caractérisation, dépolymérisation enzymatique, bioréacteur membranaire, bioraffineries

## Abstract

The lignin dissolved in the process water of thermomechanical pulping companies (LTM) is currently understudied and not considered as a technical sourcing. The main objective of this thesis is to develop the knowledge and processes required for its industrial valorisation. More precisely, this work reports the production of a referent batch of LTM by membrane filtration, followed by its analytical characterization and downstream processing. It also describes the development of an enzymatic depolymerisation process of LTM in a membrane bioreactor. The results demonstrate the feasibility of producing a stable, easy to store and handle form of LTM for its commercialisation. They also underline the structural uniqueness of this technical lignin and the strategic interest of its valorisation. Finally, they bring the first proof-of-concept demonstrating the interest of membrane filtration in the field of enzymatic depolymerisation of technical lignins.

**Keywords:** Lignin, valorisation, characterisation, enzymatic depolymerisation, membrane bioreactor, biorefineries