

Université de Montréal

**Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans
le bioblanchiment de la pâte à papier**

par

Dominic Rochefort

Département de chimie

Faculté des arts et des sciences

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en **chimie**

Octobre, 2001

© Dominic Rochefort, 2001



QD

3

US4

2002

v. 020

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée:

Étude des réactions enzymatiques et électrochimiques impliquées dans le
bioblanchiment de la pâte à papier

présentée par

Dominic Rochefort

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes:

Antonella Badia
Donal Leech
Karen Waldron
Michel Bertrand
Daniel Bélanger
Antonella Badia

président-rapporteur
directeur de recherche
co-directrice de recherche
membre du jury
examineur externe
représentante du doyen
de la F.E.S.

Thèse acceptée le:

28 / 05 / 02

Sommaire

Le procédé kraft est la méthode de fabrication de pâte à papier la plus répandue. Ce type de cuisson chimique donne une pâte de couleur brune foncée qui est due, entre autre, à la présence de lignine résiduelle. Afin d'obtenir une pâte blanche qui ne jaunit pas, les fibres de cellulose doivent être libérées des fragments de lignine, la colle naturelle du bois qui retient les fibres ensemble. Ces fragments sont difficilement dégradables et l'industrie a depuis longtemps eu recours à des agents chimiques fortement oxydants, comme le chlore (Cl_2) et le bioxyde de chlore (ClO_2), pour réaliser le blanchiment de la pâte. Des considérations énergétiques, environnementales et économiques ont ouvert la voie au développement de méthodes alternatives peu coûteuses, sans danger pour l'environnement et qui permettraient la fermeture du circuit, c'est-à-dire la recirculation de l'eau utilisée par l'usine.

Une des méthodes les plus prometteuses ayant capté l'intérêt de nombreux chercheurs est le bioblanchiment: l'utilisation d'enzymes ou d'agents naturels afin d'assister les agents de blanchiment. La laccase, une enzyme oxydase produite par plusieurs champignons dégradant le bois peut oxyder un substrat, comme la lignine, en effectuant la réduction de l'oxygène en eau. Cette délignification n'est cependant pas très efficace, notamment à cause de la taille de l'enzyme qui l'empêche de diffuser dans la structure interne des fibres de cellulose où se situe la lignine résiduelle. L'utilisation d'un médiateur, une petite molécule rédox, en conjonction avec la laccase permet d'accélérer le processus. Dans ce système, le médiateur est oxydé par la laccase puis diffuse, grâce à sa petite taille, dans les fibres pour oxyder la lignine inaccessible à l'enzyme. Le médiateur est ensuite réoxydé par la laccase, formant un cycle continue et résultant en la délignification de la pâte. L'application d'un tel système permettrait de diminuer les quantités de ClO_2 nécessaires pour atteindre le niveau de blancheur désiré. Cette application est toutefois limitée pour des raisons économiques puisque les coûts qui y sont reliés peuvent difficilement compétitionner avec ceux du blanchiment au ClO_2 .

Plusieurs efforts ont été réalisés depuis les dix dernières années afin d'augmenter les performances du système laccase-médiateur pour la délignification de la pâte, notamment en tentant de découvrir de nouveaux médiateurs plus efficaces. La principale réalisation de cette thèse a été de démontrer que des médiateurs dont la structure est basée sur des complexes de coordination, pouvaient être utilisés pour délignifier la pâte kraft.

Les premiers résultats obtenus ont permis de démontrer l'efficacité de ces complexes de coordination métal-ligand comme médiateur de la laccase pour le bioblanchiment de la pâte kraft. En utilisant l'électrolyse plutôt que l'enzyme, il a été possible d'évaluer l'effet de certaines conditions sur l'oxydation des composés modèles de la lignine, permettant de proposer quelques hypothèses sur les mécanismes complexes d'oxydation de la lignine par le médiateur. La vitesse d'échange d'électrons des réactions d'oxydation des composés modèles et de la pâte par le système laccase-médiateur a également été évaluée par voltampérométrie à onde cyclique. Finalement, les résultats des expériences réalisées tout au long de ce projet ont été utilisés afin de développer une nouvelle méthode de délignification de la pâte. Cette méthode d'électrodélignification utilise une électrode pour oxyder le médiateur qui sera ensuite mis en contact avec la pâte pour en oxyder la lignine. Une délignification jusqu'à 60 % a pu être atteinte en utilisant ce système, le rendant très intéressant pour le développement de technologies alternatives de blanchiment.

Mots clés

KRAFT, LIGNINE, DÉLIGNIFICATION, COMPOSÉ MODÈLE, ENZYME, LACCASE, MÉDIATEUR, ÉLECTROLYSE, OXYDATION, TRANSFERT D'ÉLECTRONS.

Abstract

The kraft pulping process is the most widely used method to produce paper pulp. This alkaline cooking of the wood results in a dark brown pulp because of the residual lignin, the glue that holds wood fibers together, and which has not been degraded during the process. To obtain a bright white pulp, residual lignin must be removed from the cellulose fibers. The lignin fragments are very resistant to degradation and strong oxidants, such as chlorine (Cl_2) and chlorine dioxide (ClO_2), have been used in the industry to achieve sufficient delignification. Environmental and economical concerns have created a need for new bleaching methods that would allow the recirculation of the bleaching plant wastewater.

The use of lignolytic enzymes such as laccase is a good alternative to traditional bleaching methods. Laccase is an oxidase, commonly found in wood-rotting fungi, which can oxidize a substrate via the four-electron reduction of dioxygen to water. Laccase alone is not very efficient for pulp delignification, mostly because of the size of the enzyme which restrains its diffusion in the fiber wall to reach the residual lignin. The efficiency of the process can be increased with the use of a mediator which is a small redox molecule that can diffuse in the fiber and carry electrons from the lignin back to the enzyme. The mediator, oxidized by the laccase, can oxidize the lignin, forming a continuous cycle to achieve delignification. Such a system could be used to reduce the amount of ClO_2 necessary to bleach pulp.

A lot of work has been done in the last decade in order to enhance the efficiency of the laccase-mediator system for pulp bleaching. Most of these efforts have been made to discover new and efficient mediators. It is clearly demonstrated in this thesis that coordination complexes can be used to efficiently oxidize and delignify kraft pulp. The discovery of this new class of mediator for pulp delignification, based on transition metals complexes, is undoubtedly the main achievement of this work.

The very first results obtained with these new mediators and laccase have proven that they are very efficient for the oxidation of both lignin and its model compounds. The use of electrolysis, instead of laccase, for the mediated oxidation of the model compounds under several conditions, allowed to study the effect of the conditions, such as oxygen, on the efficiency of the system. Some hypothesis were also formulated for the formation of oxidation products that were observed. The electron exchange rates for the oxydation reactions between laccase, mediator and lignin were studied with cyclic voltammetry. Finally, the results obtained along this project were used to develop new method for pulp delignification. This electrodelignification system uses an electrode to oxidize the meditor prior to its reaction with pulp. A delignification of 60 % was obtained with this new system, making it very interesting for the development of chlorine-free bleaching technologies.

Keywords

KRAFT, LIGNIN, DELIGNIFICATION, MODEL COMPOUND, ENZYME, LACCASE, MEDIATOR, ELECTROLYSIS, OXIDATION, ELECTRON TRANSFER.

Tables des matières

SOMMAIRE.....	i
ABSTRACT.....	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xxi
1. INTRODUCTION	1
1.1. HISTORIQUE	1
1.2. LA FABRICATION DE LA PÂTE	4
1.2.1. <i>Structure et composition du bois</i>	4
1.2.2. <i>Le procédé de mise en pâte kraft</i>	7
1.2.3. <i>Les propriétés de la pâte</i>	9
1.2.4. <i>Le blanchiment</i>	12
1.3. BIOBLANCHIMENT.....	17
1.3.1. <i>La laccase</i>	19
1.3.2. <i>Le système laccase-médiateur</i>	21
1.3.3. <i>Les médiateurs</i>	23
1.4. PRÉSENTATION DU PROJET DE RECHERCHE.....	26
2. PARTIE EXPÉRIMENTALE	28
2.1. SYNTHÈSE DES MÉDIATEURS	28
2.1.1. $K_4Mo(CN)_8 \cdot 2H_2O$	28
2.1.2. $K_4W(CN)_8 \cdot 2H_2O$	29
2.1.3. <i>N-hydroxy-N-phénylacétamide (NHA)</i>	30
2.1.4. $[Fe(2,2'-bipyridine)_3](ClO_4)_2$	30
2.1.5. $[Fe(4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine)_3](ClO_4)_2$	30
2.1.6. $[Os(2,2'-bipyridine)_2Cl_2]Cl \cdot 2H_2O$	31
2.2. PRÉPARATION ET PURIFICATION DE LACCASE.....	31

2.3. CARACTÉRISATION DE LA LACCASE	33
2.3.1. <i>Concentration</i>	33
2.3.2. <i>Activité</i>	33
2.4. PRÉPARATION DES SOLUTIONS TAMPONS	34
2.5. COMPOSÉS MODÈLES DE LA LIGNINE	35
2.6. ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES COMPOSÉS MODÈLES	36
2.7. TRAITEMENT DE LA PÂTE	37
2.7.1. <i>Échantillons de pâte</i>	37
2.7.2. <i>Procédure</i>	37
2.7.3. <i>Extraction</i>	38
2.7.4. <i>Les formettes</i>	38
2.8. VOLTAMPÉROMÉTRIE À ONDE CYCLIQUE (VOC)	39
2.8.1. <i>Principes de base et appareillage</i>	40
3. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	44
3.1. PROPRIÉTÉS ET EFFICACITÉ DES NOUVEAUX MÉDIATEURS	44
3.1.1. <i>Les complexes de coordination</i>	47
3.1.2. <i>Délignification enzymatique de la pâte</i>	52
3.2. ÉTUDE DES COMPOSÉS MODÈLES DE LA LIGNINE	68
3.2.1. <i>Procédure d'étude de l'oxydation des CML</i>	71
3.2.2. <i>Réactions d'oxydation des CML</i>	78
3.2.3. <i>Oxydation du dimère IV</i>	84
3.2.4. <i>Oxydation du dimère I</i>	92
3.2.5. <i>Oxydation de l'alcool vératrylique</i>	99
3.3. ÉTUDE DU TRANSFERT D'ÉLECTRONS	104
3.3.1. <i>Utilisation de la VOC pour l'étude des transferts d'électrons</i>	107
3.3.2. <i>Réaction d'oxydation laccase-médiateur</i>	113
3.3.3. <i>Réaction d'oxydation des CML par les médiateurs</i>	120
3.3.4. <i>Réaction d'oxydation de la pâte par les médiateurs</i>	123
3.4. DÉLIGNIFICATION ÉLECTROCHIMIQUE.....	133
3.4.1. <i>Développement du système d'électrodélignification</i>	136
3.4.2. <i>Électrodélignification avec $K_4Mo(CN)_8$</i>	140

3.4.3. <i>Électrodélicnification avec d'autres médiateurs</i>	153
4. CONCLUSION	155
4.1. NOUVEAUX MÉDIATEURS	155
4.2. RÉACTIONS D'OXYDATION	157
4.3. ÉLECTRODÉLIGNIFICATION	161
4.4. TRAVAUX FUTURS	164
5. RÉFÉRENCES	167

Liste des tableaux

Tableau I.	Distribution approximative des composés du bois	6
Tableau II.	Concentrations approximatives des principaux composés des liqueurs du procédé kraft [2].	9
Tableau III.	Liste des principaux médiateurs de la laccase utilisés pour les études sur le bioblanchiment de la pâte.	25
Tableau IV.	Liste des complexes de transition utilisés comme médiateurs. Tous les complexes sont présentés sous leur forme réduite (M^{n+}) et le potentiel donné dans la troisième colonne correspond au processus rédox $M^{n+} \rightleftharpoons M^{(n+1)+}$	46
Tableau V.	Décomposition de l'octacyanomolybdate en fonction du temps, du pH et de l'exposition à la lumière. Les valeurs indiquent le % de $K_4Mo(CN)_8$ présent dans les solutions en se basant sur la concentration initiale de médiateur (100% = 1 mM).....	63
Tableau VI.	Impact de la délignification par le système laccase-octacyanomolybdate (1%) dans une séquence de blanchiment au bioxyde de chlore.	67
Tableau VII.	Oxydation du dimère I (concentration initiale de 2 mM) par un traitement enzymatique (laccase 0.5 U mL^{-1}) et électrolytique ($E = 900 \text{ mV vs Ag/AgCl}$) en utilisant soit le HBT soit l'ABTS comme médiateur (0.5 mM).....	93
Tableau VIII.	Quantité de VA ayant été oxydée (concentration initiale de 2 mM) par un traitement d'oxydation de 20 heures avec des médiateurs (0.5 mM) ayant un potentiel normal apparent élevé.	100
Tableau IX.	Constantes de vitesse de second ordre (k_{cat} , $M^{-1}s^{-1}$) des réactions d'oxydation des composés modèles de la lignine par différents médiateurs (tampon citrate 100 mM, pH 4.5).....	121
Tableau X.	Comparaison entre l'oxydation enzymatique et électrochimique du $K_4Mo(CN)_8$ (1 %) pour la délignification de la pâte kraft ($kappa = 19.9$) à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ durant une période de 2 heures sous diverses conditions.	140

Tableau XI. Effet du dosage du médiateur et des traitements de contrôle sur l'efficacité de délignification de la pâte (tampon phosphate 100 mM à pH 8, 60 °C, 2 heures). Les traitements ont été suivis d'une extraction renforcée Ep.....	141
Tableau XII. Propriétés de la pâte kraft ayant subi des traitements d'électrodélignification de différentes durées dans les conditions décrites à la Figure 59.	142

Liste des figures

- Figure 1.** Récompense de £1000 pour la découverte d'une alternative peu coûteuse et abondante au coton et au lin comme matière première dans la fabrication du papier [6]. 3
- Figure 2.** Structure de la cellulose montrant les unités monomériques de glucose adoptant la conformation "chaise"..... 4
- Figure 3.** Structure proposée de la lignine de conifère. Les unités #4 et #5 représentent respectivement un groupement non-phénolique et un groupement phénolique [2]. 5
- Figure 4.** Schéma (a) et coupe transversale (b) d'une fibre de bois. Les différentes section sont le lumen (L), les parois primaire (P) et secondaire (S) et la lamelle mitoyenne (M) [2, 8]. 7
- Figure 5.** Représentation du circuit de mise en pâte kraft ainsi que des principales réactions chimiques qui s'y produisent. Les composés soulignés sont les principaux agents de délignification. Adaptation de [2]. 11
- Figure 6.** Réaction du chlore avec un fragment représentatif de la lignine. Les quinones ainsi formées peuvent se coupler et former des dioxines. 13
- Figure 7.** Action blanchissante d'un champignon (basidiomycète) sur le bois (a) et sur la pâte (b). La fiole de droite en (b) représente une incubation de 24 heures avec le champignon *Trametes versicolor* et un échantillon de pâte kraft tandis que la fiole de gauche montre la pâte avant le traitement..... 18
- Figure 8.** Structure générale du site actif des enzymes de type cuivre bleu. La structure réelle du site actif de la laccase de *T.versicolor* peut différer quelque peu de celle-ci au niveau des acides aminés entourant le site mais le squelette de base d'atomes de cuivre est le même. Adaptation de [33]. 19
- Figure 9.** Schéma d'une section de la paroi secondaire d'une fibre de pâte kraft non-blanchie. Le médiateur, dans ce cas-ci l'ABTS, peut diffuser entre les fibrilles de cellulose pour oxyder les groupements de lignine résiduelle (en rouge). Tirée de [27]. 22

- Figure 10.** Oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur. Les flèches pleines représentent le cycle d'oxydoréduction qui se répétera tant qu'il y aura de l'oxygène et de la lignine dans le milieu. Les électrons voyagent ainsi de la lignine jusqu'à H₂O. 22
- Figure 11.** Suivi de l'activité sur deux mois (a) et comparaison de l'activité avec la concentration (b) d'une solution de laccase II de *T.versicolor* en fonction du temps d'entreposage. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 3 mesures. 35
- Figure 12.** Montage utilisé pour les expériences de voltampérométrie à onde cyclique. Les graphiques représentent une rampe cyclique de la variation du potentiel appliqué entre les électrodes de travail T et de référence R (gauche) et un exemple de voltampérogramme (droite). Adaptation de [77]. 41
- Figure 13.** Structure des ligands utilisés pour former les complexes de coordination servant de médiateurs. Les paires d'électrons montrées sur les structures représentent le ou les point(s) d'attache du ligand au métal. 48
- Figure 14.** Schéma représentant le transfert d'un électron de l'orbitale HOMO (oxydation) de l'espèce réductrice vers l'orbitale LUMO (réduction) de l'espèce oxydante [86]. Il est à noter que la valeur du potentiel rédox varie dans le sens opposé à l'échelle d'énergie. 50
- Figure 15.** Diagramme d'énergie d'une réaction d'oxydoréduction. 52
- Figure 16.** Délignification enzymatique de pâte de feuillus (Kappa initial de 12.6) en utilisant différents médiateurs (1% sur masse de pâte anhydre) suivi d'une extraction alcaline (E). Le contrôle représente un traitement de la pâte sans laccase ni médiateur. 54
- Figure 17.** Délignification enzymatique de la pâte kraft de conifère (K_{initial} = 15.6) avec des complexes de coordination (0.25% sur pâte anhydre), extraction alcaline renforcée au peroxyde (Ep). Le contrôle représente un traitement sans médiateur. Il est à noter que l'augmentation du % de délignification du contrôle par rapport à celui de la Figure 16 est due à l'extraction renforcée au peroxyde. 55

- Figure 18.** Effet de la quantité de $K_4Mo(CN)_8$ utilisée sur l'efficacité du système laccase-médiateur (laccase 10U/g). Le contrôle représente un essai réalisé sans laccase avec 1% de $K_4Mo(CN)_8$ alors que la valeur 0% représente le même essai avec laccase sans médiateur. Noter la faible perte de viscosité entre 0 et 0.5% de $K_4Mo(CN)_8$ démontrant la sélectivité du médiateur pour la lignine. 56
- Figure 19.** Délignification de la pâte kraft (SWKP-O₂ $K_{initial} = 14.7$) en utilisant différents médiateurs brevetés (1% sur pâte) avec une laccase disponible commercialement (*Trametes villosa*, Novo 51002, 5 U/g). 57
- Figure 20.** Recyclage du $K_4Mo(CN)_8$ pour traiter différents échantillons de pâte (SWKP-O₂ $K_{initial} = 14.7$). Le contrôle représente un traitement sans laccase ni médiateur. 59
- Figure 21.** Ajouts de fractions de KCN 0.4696 mM à la solution d'octacyanomolybdate exposée durant 5 jours à 25°C à lumière, pH = 7. La flèche démontre la corrélation entre le titrage sans ajout et l'interception de la droite sur l'axe y. 61
- Figure 22.** Quantités de cyanure produites lors de la décomposition du $K_4Mo(CN)_8$ après 5 jours d'entreposage sous diverses conditions. 64
- Figure 23.** Schéma d'une séquence de blanchiment au bioxyde de chlore (D) d'une usine de pâte kraft. L'étape de laccase-médiateur (L) pourrait avoir lieu dans une tour de traitement à l'oxygène. Le symbole (W) représente les étapes de lavage de la pâte. Les flèches solides représentent le trajet emprunté par la pâte. 66
- Figure 24.** Section de la structure de la lignine telle que présentée à la Figure 3. Les encadrés montrent les liaisons typiques β -O-4 et β -1 qui sont représentées par les dimères I et IV, respectivement. 69
- Figure 25.** Structure des composés modèles de la lignine et type de liaison représentée par les dimères. Le dimère I représente une liaison β -O-4 car le lien éther relie le carbone en position β de l'unité phénylpropane et la position 4 du phényle de l'unité voisine dans la lignine. Le C β du dimère IV quant à lui est directement relié à l'unité voisine (β -1). 70

- Figure 26.** Diagramme décrivant la méthode suivie pour préparer les solutions pour l'oxydation des composés modèles (2 mM) avec ou sans médiateur (0.5 mM) en présence ou non de laccase (0.5 U mL^{-1}). La même méthode a été utilisée pour l'oxydation électrochimique. 72
- Figure 27.** Mécanisme d'oxydation des composés modèles de la lignine par le système laccase-médiateur (a) et par l'électrolyse du médiateur (b). 73
- Figure 28.** Cellule d'électrolyse. Adaptation de [176]. 75
- Figure 29.** Chromatogramme (extrait à $\lambda = 280 \text{ nm}$) et spectre UV-Visible (en encadré) des composés modèles de la lignine. Le spectre a été enregistré au temps de rétention du pic le plus important du chromatogramme (voir le chiffre en encadré). 76
- Figure 30.** Chromatogramme (extrait à $\lambda = 280 \text{ nm}$) et spectre UV-Visible (en encadré) des principaux produits d'oxydation des composés modèles de la lignine. Le spectre a été enregistré au temps de rétention du pic le plus important du chromatogramme (voir le chiffre en encadré). 77
- Figure 31.** Produits formés lors de l'oxydation des trois composés modèles de la lignine qui ont été utilisés lors de ce projet. 83
- Figure 32.** Oxydation du dimère IV par différents médiateurs oxydés par la laccase ou par électrolyse ($E = 615 \text{ mV vs Ag/AgCl}$). Le pourcentage d'oxydation représente la fraction de la quantité initiale de DIV ayant été oxydée. Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé sur la moyenne de quatre expériences. 84
- Figure 33.** Voltampérogrammes cycliques enregistrés à 5 mV/s des composés modèles de la lignine (2 mM) dans le tampon citrate 100 mM à pH 4.5. Les vagues d'oxydation démontrées ici ne donnent qu'une approximation du potentiel d'oxydation des CML puisqu'il s'agit d'une réaction hétérogène irréversible. Le véritable potentiel d'oxydation est inférieur à celui donné par le pic des VOC. 87
- Figure 34.** Effet de la concentration du médiateur sur l'efficacité de l'oxydation par la laccase du dimère IV (traitement durant 20 heures, pH 4.5). Les chiffres représentent le ratio $[\text{DIV oxydé}]/[\text{médiateur}]$ 88

- Figure 35.** Oxydation électrochimique (750 mV vs Ag/AgCl) du dimère IV par le médiateur $K_4Mo(CN)_8$ en conditions aérobiques et anaérobiques. Le chiffre au-dessus des barres du dimère IV oxydé représente le % d'oxydation du dimère (concentration initiale de 2 mM). Les contrôles représentent un traitement sans médiateur..... 90
- Figure 36.** Chemin réactionnel expliquant la formation des produits d'oxydation benzaldéhyde et véraldéhyde à partir du dimère IV en présence d'oxygène [118]..... 91
- Figure 37.** Effet de l'extraction alcaline (NaOH 0.1 M, à 75°C durant 90 minutes) sur le dimère VIII. Les pics à 3.5 et 4 minutes sont respectivement le HBT et le benzotriazole, un produit de décomposition du HBT. 96
- Figure 38.** Structure des deux diastéréomères du dimère I. Les carbones α et β sont asymétriques..... 97
- Figure 39.** Impact de l'oxygène sur la stéréosélectivité de l'oxydation électrochimique (900 mV vs Ag/AgCl) du dimère I (2 mM) par le HBT (0.5 mM). L'oxydation par la laccase doit impérativement être effectuée en présence d'oxygène..... 98
- Figure 40.** Formes du médiateur HBT lorsqu'il est oxydé en présence d'oxygène. 98
- Figure 41.** Voltampérogrammes démontrant l'effet catalytique de l'enzyme laccase sur l'oxydation du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ (MoCN). Le courant catalytique est remarquable sur le voltampérogramme de gauche enregistré à une vitesse de balayage de 2 mVs^{-1} mais absent sur celui de droite parce que la vitesse (50 mVs^{-1}) est trop grande par rapport à l'oxydation enzymatique. 109
- Figure 42.** Représentation du cycle d'oxydation du médiateur par la laccase en présence d'oxygène. Les électrons sont captés par l'électrode créant un courant dit catalytique..... 110
- Figure 43.** Calcul des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre. En (a) se trouve le graphique, résultant des travaux de Nicholson et Shain [148] permettant de relier le ratio des courants à k_f/a . La pente du graphique en (b) permet le calcul de k_f pour l'oxydation du $K_4Mo(CN)_8$ (0.2mM) par la laccase (5 U mL^{-1}), tampon citrate 100mM à pH 3.0. 112

- Figure 44.** Variation du potentiel normal apparent de trois médiateurs en fonction du pH. Les E^0 ont été déterminés par voltampérométrie à onde cyclique (10 mVs^{-1}) en utilisant l'équation 10. Les solutions tampon: citrate pour pH 3.5 à 5.5, phosphate pour les autres. 115
- Figure 45.** Effet du pH sur la cinétique d'oxydation des médiateurs $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ et ABTS, 0.2 mM, par la laccase II de *T.v.* (5 UmL^{-1}). Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois mesures..... 116
- Figure 46.** Effet du potentiel normal apparent du médiateur sur la constante de vitesse d'oxydation par la laccase. Les expériences ont été réalisées à 25°C dans un tampon citrate 100 mM, pH 4.5 avec $5 \text{ unités}\cdot\text{mL}^{-1}$ de laccase et 0.2 mM de médiateur. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur trois expériences indépendantes..... 119
- Figure 47.** Voltampérogrammes ($v = 2 \text{ mVs}^{-1}$) des médiateurs ABTS et HBT (0.2 mM) seuls et en présence du dimère IV (2 mM), démontrant l'augmentation catalytique du courant d'oxydation..... 123
- Figure 48.** Diagramme illustrant le principe permettant la mesure du courant catalytique d'oxydation de la pâte par le médiateur. 124
- Figure 49.** Voltampérogrammes enregistrés à 250 mVs^{-1} du médiateur $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ 0.2mM lors des expériences réalisées avec les électrodes de pâte blanchie ($K=0$) et non-blanchie ($K=19.9$). Expérience réalisée dans le tampon phosphate 100 mM à pH 8..... 127
- Figure 50.** Variation linéaire des courants anodique et cathodique des voltampérogrammes du $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ (0.2 mM) avec l'électrode de pâte blanchie, selon l'équation de Randles-Sevcik. Les courants (axe y) sont donnés en valeur absolue. 128
- Figure 51.** Voltampérogramme à plusieurs cycles consécutifs enregistrés à 100 mVs^{-1} avec le médiateur $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ (0.2 mM) et la pâte kraft non-blanchie en tampon citrate 100 mM à pH 4.5. 129
- Figure 52.** Constantes de vitesse de pseudo-premier ordre (k_f, s^{-1}) pour l'oxydation de la lignine de la pâte kraft par divers médiateurs (tampon phosphate à pH 8.0). 130
- Figure 53.** Effet du pH sur la vitesse de transfert d'électrons lors de l'oxydation de la pâte par le médiateur $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ (0.5 mM). 131

- Figure 54.** Représentation simplifiée du mécanisme d'oxydation de la lignine résiduelle de la pâte par le système d'électrodélicnification. 134
- Figure 55.** Schéma de deux montages pour l'électrodélicnification. Contrairement à la cellule en (a), la pâte n'est pas en contact avec les électrodes dans le montage (b). La solution de médiateur en (b) est pompée en continue. L'électrode de travail (T) est en carbone vitreux réticulé (30 pores par pouce), la référence (R) est Ag/AgCl et l'électrode auxiliaire (A) est un fil de platine torsadé isolé de la solution par un pont salin d'agar. 137
- Figure 56.** Montage pour l'électrodélicnification. La cellule de gauche (Pulp) contient la pâte alors que l'électrolyse s'effectue dans la cellule de droite (BE Cell). Ces deux cellules sont immergées dans un bain thermostatique (non montré) et la longueur supplémentaire de tuyau enroulée autour des cellules sert à compenser pour la perte de température due à la pompe qui est à l'extérieure du bain. 138
- Figure 57.** Vue en détail de la cellule d'électrolyse. Les électrodes sont en carbone vitreux réticulé (CVR) d'une porosité de 30 pores par pouce. La membrane à dialyse sert à isoler l'électrode auxiliaire pour éviter la réduction du médiateur. 139
- Figure 58.** Schéma du montage d'électrodélicnification. La cellule de gauche contient le bloc de pâte alors que celle de droite est celle utilisée pour oxyder le médiateur. L'oxydation se fait à l'électrode de travail. La solution de médiateur oxydé est pompée à travers la pâte où le médiateur est réduit en oxydant la lignine. La solution réduite retourne à la cellule d'électrolyse pour y être réoxydée. 139
- Figure 59.** Traitements d'électrodélicnification (750 mV vs Ag/AgCl) de différentes durées ($K_4Mo(CN)_8$ 1%, tampon citrate 0.1 M à pH 5, 60 °C) et comparaison des résultats avec la délicnification enzymatique (durée de 2 heures). Les traitements ont été suivis d'une extraction Ep. Le contrôle est un traitement avec médiateur sans potentiel appliqué et les barres d'erreur représentent l'écart type sur trois expériences. 142
- Figure 60.** Représentation de la distribution spatiale de l'indice kappa à travers le bloc de pâte contenu dans la cellule d'électrodélicnification pour un traitement de 2 heures (a) et de 45 heures (b). Voir les conditions à la Figure 59. 144

- Figure 61.** Variation de l'efficacité de l'électrodélicnification, suivie par E_p , par le $K_4Mo(CN)_8$ (1 %) en fonction du pH de la solution tampon lors de traitements de 2 heures à 60 °C. Le potentiel appliqué est de 750 mV vs Ag/AgCl. Les cercles représentent les expériences de contrôle dans les mêmes conditions mais sans médiateur. L'écart type calculé sur la moyenne de trois expériences est représenté par la barre d'erreur..... 145
- Figure 62.** Voltampérogrammes cycliques enregistrés à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ du $K_4Mo(CN)_8$ (0.5 mM) en solution tampon de différents pH. 145
- Figure 63.** Efficacité de la délicnification par oxydation électrochimique à 750 mV vs Ag/AgCl du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ (1 % sur pâte), à 60 °C et pH 5. La charge passée durant les traitements et les contrôles sans médiateur est aussi démontrée. 149
- Figure 64.** Graphiques de la charge totale pour les traitements de 2, 17 et 45 heures (a, b et c) d'électrodélicnification avec le $K_4Mo(CN)_8$ à 1 % et les contrôles sans le médiateur. Les conditions utilisées sont identiques à celles décrites à la Figure 59..... 150
- Figure 65.** Le spectre UV-Visible de la solution recueillie après un traitement d'électrodélicnification de 45 h à 60 °C, pH 5, diluée 10 fois et celui du traitement contrôle sans médiateur sans dilution. 151
- Figure 66.** Corrélation entre la diminution de l'indice kappa et la charge corrigée (de laquelle la charge due au signal de fond a été soustraite). Les conditions sont pH 5, 60 °C et 750 mV vs Ag/AgCl. La durée du traitement est variable. 152
- Figure 67.** Efficacité de délicnification des complexes de fer-bipyridine et du $K_4Mo(CN)_8$ (0.1 % sur pâte) par oxydation enzymatique (laccase $10 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$) et électrochimique (1000 mV vs Ag/AgCl)..... 154

Liste des sigles et abréviations

Abbréviation / symbole	Signification
λ	Longueur d'onde
ϵ	Coefficient d'absorptivité molaire
v	Vitesse de balayage
$^{\circ}\text{C}$	Degré Celcius
ΔE^0	Différence des potentiels normaux apparents
ΔE_p	Différence des potentiels entre les pics d'oxydation et de réduction du voltammogramme
A	Ampère
A_s	Aire de la surface de l'électrode
ABTS	Acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique)
A.C.	Après Jésus-Christ
BM	Bouillon mycologique
bpy	2,2'-bipyridine
BTB	1,3-dioxyde de benzotriazole
BTO	1-oxyde de benzotriazole
CML	Composé modèle de la lignine
Cu_{T1}	Site de cuivre du type 1
CVR	Carbone vitreux réticulé
D	Coefficient de diffusion
DI	Dimère I
DIV	Dimère IV
dmbpy	4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine
DVIII	Dimère VIII
E	Potentiel appliqué à l'électrode de travail
E^0	Potentiel normal apparent
$E_{1/2}$	Potentiel de demi-vague
E_p	Étape d'extraction alcaline renforcée au peroxyde d'hydrogène

$E_{p,a}$	Potentiel du pic d'oxydation
$E_{p,c}$	Potentiel du pic de réduction
EPR	Résonance paramagnétique électronique
<i>et coll.</i>	et collaborateurs
F	Constante de Faraday
HBT	1-Hydroxybenzotriazole
HNNS	Acide 4-hydroxy-3-nitroso-1-naphtalènesulfonique
HOMO	"Highest Occupied Molecular Orbital"
HWKP	Pâte kraft de bois de feuillu (dur)
i_d	Courant de diffusion
$i_{d,a}$	Courant anodique de diffusion (oxydation)
$i_{d,c}$	Courant cathodique de diffusion (réduction)
i_k	Courant catalytique
IS	Mécanisme de transfert d'électron "Inner Sphere"
K	Indice kappa
k_{cat}	Constante de vitesse du second ordre
k_f	Constante de vitesse de pseudo-premier ordre
kPa	kilopascal
Lc	Laccase
LUMO	"Lowest Unoccupied Molecular Orbital"
M	Concentration molaire
Méd	Médiateur
mL	millilitre
MM	Masse molaire
mV	millivolt
n	Nombre d'électron(s) échangé(s)
NHA	N-hydroxyacétanilide
nm	nanomètre
NNDS	Acide 1-nitroso-2-naphtol-3,6-disulfonique
OM	Orbitale moléculaire
<i>o</i> -phen	1,10-phénantroline

OS	Mécanisme de transfert d'électron "Outer Sphere"
Q	Charge
SWKP	Pâte kraft de bois de conifère (mou)
SWKP-O ₂	Pâte kraft de bois de conifère délignifiée à l'oxygène
T2/T3	Site de cuivre de types 2 et 3
TCDD	Tétrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxines
TCDF	Tétrachlorodibenzofurannes
Tv	Trametes versicolor
U	Unité d'activité de l'enzyme
V	Volt
VA	Alcool vératrylique
VAC	Acide violurique
VOC	Voltampérométrie à onde cyclique
vs Ag/AgCl	Potentiel mesuré par rapport à l'électrode au chlorure d'argent
vs ÉNH	Potentiel mesuré par rapport à l'électrode normal d'hydrogène

Remerciements

Je tiens à commencer en remerciant mes superviseurs, Robert et Dónal. Merci Robert pour ta présence et ton enseignement, à plusieurs niveaux, car j'ai appris bien plus que de la science avec toi. Nos discussions spontanées autour du café de 15 heures vont me manquer. Merci Dónal pour tout ce que tu m'as permis de réaliser dans ton groupe de recherche et de ton soutien constant, même d'outre-mer. Merci pour ton accueil et ton amitié qui ont fait de mon séjour en Irlande un des plus beaux moments que j'ai vécu.

Merci à tout le groupe des biotechnologies de Paprican, Frank, Carl, Loredana, Michelle, Sylvie, Ian, Mike, Fred, Janique et Mary-Ann; je n'aurais pas pu tomber sur un meilleur groupe. J'ai vraiment apprécié ces années passées avec vous. Un salut aux anciens étudiants Francis et Josh pour les moments de plaisir, entrecoupés de travail, que nous avons eu ensemble.

Merci aux membres de l'ordre des ex-Leech, Francis, Éric, Marjie, Francis et Pascal, avec qui j'espère perpétuer la tradition des rencontres annuelles.

Merci à mes collègues de chimie, avec qui toute cette histoire a débutée: Marc-André, Luc, Myriam, Sophie, Marc, Caroline, Angela, Bernard, Stéphanie et Jessica. Merci aussi à Lyne, toujours là pour veiller sur ses étudiants.

Merci à tous mes amis pour vos encouragements et surtout votre amitié. Un merci particulier à Sébastien pour ton support quasi quotidien. Vous pouvez enfin me croire, ma thèse est finie!

Merci à ma famille et particulièrement à ma mère et à ma soeur qui m'ont toujours encouragé, ce que j'apprécie beaucoup.

Merci à ma toute nouvelle épouse, Myriam, pour m'avoir soutenu avec amour tout au long de mes excentricités académiques.

Finalement, je tiens à remercier les organismes ayant financé ce projet, le FCAR (Fonds pour la formation de Chercheurs et d'Aide à la recherche), le CRSNG (Conseil de Recherche en Sciences Naturelles et en Génie) et le PENCE (Protein Engineering Network Centers of Excellence).

*... rien de plus ne peut être tenté
que d'établir le commencement et la direction d'une route
infiniment longue.
Prétendre à n'importe quel achèvement,
systématique et définitif,
serait à tout le moins une illusion personnelle.
La perfection ne peut être obtenue ici
par le chercheur individuel
dans la seule hypothèse, subjective,
qu'il communique tout ce qu'il a été capable de voir.*

Georg Simmel,
préface de *L'herbe du diable* et
La petite fumée par Carlos Castadena

Pour mon père

1. Introduction

1.1. Historique

L'histoire de la fabrication du papier débuta vers l'an 105 A.C. lorsque Ts'ai Lun présenta officiellement son invention à l'Empereur de la Chine [1]. Bien que Ts'ai Lun eut fabriqué le papier à partir de tissus désagrégés plutôt qu'avec des fibres de bois tel qu'il est fabriqué maintenant, il venait d'établir le principe de base de la fabrication du papier. Ce principe consiste en l'utilisation de fibres enchevêtrées pour former une feuille mince et solide et c'est le même qui a permis, aujourd'hui, de fabriquer le papier sur lequel ce texte est imprimé.

Le perfectionnement du procédé s'amorça avec la découverte d'autres matières premières que le textile employé pour fabriquer le premier papier. L'écorce broyée provenant d'arbres ou de plantes comme le mûrier, le chanvre et le bambou fût rapidement utilisée, surtout en orient. Au fur et à mesure que l'invention se répandit dans le monde, Japon (620 A.C.), Arabie Saoudite (800 A.C.), nord de l'Afrique (1000 A.C.) et Europe de l'ouest (1200 à 1500 A.C.), les matières premières utilisées comme source de fibres à papier se diversifiaient afin d'exploiter les ressources locales. Ainsi, à titre d'exemple, si les pays arabes privilégiaient le lin et l'Inde la jute, le papier en Europe était fabriqué à partir de coton [1]. C'est également le coton qui s'implanta comme matière première en Amérique dans les années 1700 à 1900 de notre ère. La méthode de mise en pâte consistait alors à désintégrer la matière première en fibres en la faisant bouillir dans de l'eau contenant des extraits de cendre de bois, ce qui rend l'eau très alcaline [2]. Ce principe de désintégration par une solution alcaline composée de carbonates, de chaux et d'hydroxyde de sodium est le précurseur des méthodes chimiques modernes de mise en pâte.

Le coton, grâce à la qualité de ses fibres, fut ainsi utilisé pour la fabrication du papier jusqu'au milieu du 19^e siècle. L'augmentation de la demande, causée en partie par l'augmentation de la popularité des livres et des journaux, commença à

poser un problème d'approvisionnement en coton et en lin vers la fin du 18^e siècle. Ainsi commence la quête pour une nouvelle source de fibres à papier, source devant être très abondante et, bien sûr, peu coûteuse. L'utilisation du bois comme matière première fut envisagée dès le début du 18^e siècle par René Antoine Ferchault de Réaumur qui, observant la technique des guêpes pour construire leur nid de papier en mastiquant des fibres de bois, suggéra qu'il serait possible d'en faire autant mais à grande échelle [1]. Les procédés chimiques des méthodes de délignification étant encore méconnus à cette époque, il faudra attendre encore plus de cent ans avant que son idée ne soit mise en application avec succès.

En l'an 1800, un Anglais du nom de Matthias Koops déposa une série de trois brevets sur la délignification par traitement alcalin de plusieurs sources potentielles de fibre à papier [3] dont les plus intéressantes étaient la paille et le bois. Mais puisque la fibre de paille donne un papier de pauvre qualité et que le bois était trop difficile à délignifier avec les méthodes de l'époque, le coton et le lin continuèrent à être utilisés pour fabriquer le papier. Cependant, avec le besoin toujours grandissant de papier et l'avènement des premières usines papetières à grande production (autour de 1805) survint inévitablement une importante pénurie de coton, comme le témoigne la Figure 1. Ce fut enfin en 1853 que le bois entra pour de bon dans la fabrication du papier, grâce au procédé alcalin développé par Burgess et Watt [4]. Leur méthode proposait des séquences de traitement alcalin du bois en alternance avec des étapes de lavage et de traitement au chlore. Ce type de procédé séquentiel est encore utilisé de nos jours dans les usines de mise en pâte.

C'est toutefois à un Allemand du nom de Dahl que l'on doit le procédé kraft. Dahl déposa un brevet en 1884 pour un nouveau procédé de délignification du bois qui utilise un mélange d'hydroxyde et de sulfure de sodium [5]. Il démontra lors de ses expériences que le sulfure accélère la délignification, diminuant ainsi le temps d'exposition des fibres de bois à la solution alcaline de mise en pâte. Ceci est un avantage majeur car la solution alcaline tend à dégrader la cellulose des fibres, causant une diminution de la qualité de la pâte. Le papier produit par cette technique

est composé de fibres plus longues et plus solides, ce qui augmente sa robustesse. D'ailleurs le nom donné au procédé, kraft, signifie en allemand et en suédois le mot force.

**1000 POUNDS
REWARD.**

The Proprietors of a leading Metropolitan Journal OFFER the above
REWARD to any person who shall first succeed in

INVENTING OR DISCOVERING
the means of using a

CHEAP SUBSTITUTE
FOR THE

COTTON & LINEN MATERIALS
NOW USED BY

PAPER-MAKERS,

Subject to the following conditions:

1. The material must be practically unlimited in quantity, and be capable of being converted into pulp of a quality equal to that which is at present used in manufacturing the best description of newspaper, and at a cost, ceteris paribus, not less than ten per cent. lower.
2. It must be tested, approved, and adopted by three eminent manufacturers of paper (two of them to be named by the advertiser), whose certificate shall entitle the inventor to the payment of the reward.
3. This offer will be in force only for a period of 12 months from the 26th of May, 1854.

Apply by Letter to A. B., Messrs. SMITH & SONS, 136, STRAND.

Figure 1. Récompense de £1000 pour la découverte d'une alternative peu coûteuse et abondante au coton et au lin comme matière première dans la fabrication du papier [6].

Le procédé kraft devint alors de plus en plus répandu à travers le monde, sa grande popularité provenant en partie du fait qu'il peut s'appliquer à presque n'importe quelle essence de bois et qu'il permet la délignification de certains bois que le procédé alcalin ne permettait pas. L'industrie du papier de pâte kraft prit finalement un essor considérable après la seconde guerre mondiale grâce à l'effet combiné de la reprise économique et de l'émergence des méthodes de blanchiment comme le bioxyde de chlore. Le procédé kraft, qui sera décrit en détail dans la section suivante, s'est ainsi établi comme étant la méthode de mise en pâte la plus répandue et continue à dominer le marché mondial avec près de 110 millions de

tonnes de pâte produites en 1998, ce qui représente près de 70% de toute la pâte produite à travers le monde [7].

1.2. La fabrication de la pâte

1.2.1. Structure et composition du bois

Les nombreuses espèces d'arbres peuvent être regroupées dans deux catégories distinctes: les gymnospermes et les angiospermes. Les conifères, également nommés résineux, appartiennent à la première famille alors que les feuillus font partie de la seconde [8].

De façon générale, le bois est composé de cellulose, d'hémicelluloses, de lignine et d'extractifs, dans des proportions variables qui dépendent, entre autres, de l'espèce et de la localisation des arbres. La cellulose est un polymère linéaire composé d'unités de glucose (voir Figure 2). La cellulose, qui compose la majeure partie des fibres de bois, se retrouve sous forme cristalline et peut comporter environ 10 000 unités de base de glucose [8]. C'est la cellulose qui confère aux fibres leurs propriétés de solidité et de blancheur et c'est pour cette raison que les procédés de mise en pâte doivent être très sélectifs et ne pas la dégrader. Les hémicelluloses sont des polysaccharides ramifiés semblables à la cellulose qui se retrouvent en grande partie dans les fibres du bois. Ils composent environ 25 % du bois et 10 % de la pâte kraft.

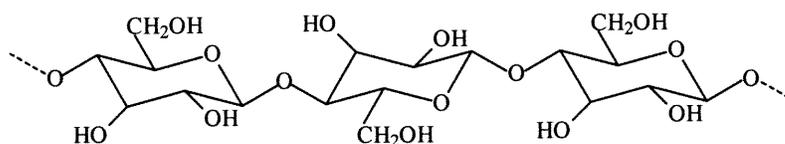


Figure 2. Structure de la cellulose montrant les unités monomériques de glucose adoptant la conformation "chaise".

La lignine, elle, a pour rôle de retenir ensemble les fibres, à la manière d'une colle, afin de donner de la rigidité au bois. Ce composé extrêmement complexe est

un polymère tridimensionnel irrégulier formé à partir de groupements phénylpropane (voir Figure 3). Ces groupements phénylpropanes peuvent être répartis dans deux catégories, selon qu'ils contiennent un groupement phényle ou non. La structure de la lignine peut varier d'une espèce de bois à une autre ce qui rend sa caractérisation encore plus difficile. Toutefois, une structure proposée par Adler en 1977 est acceptée comme étant représentative de la lignine de conifère [9].

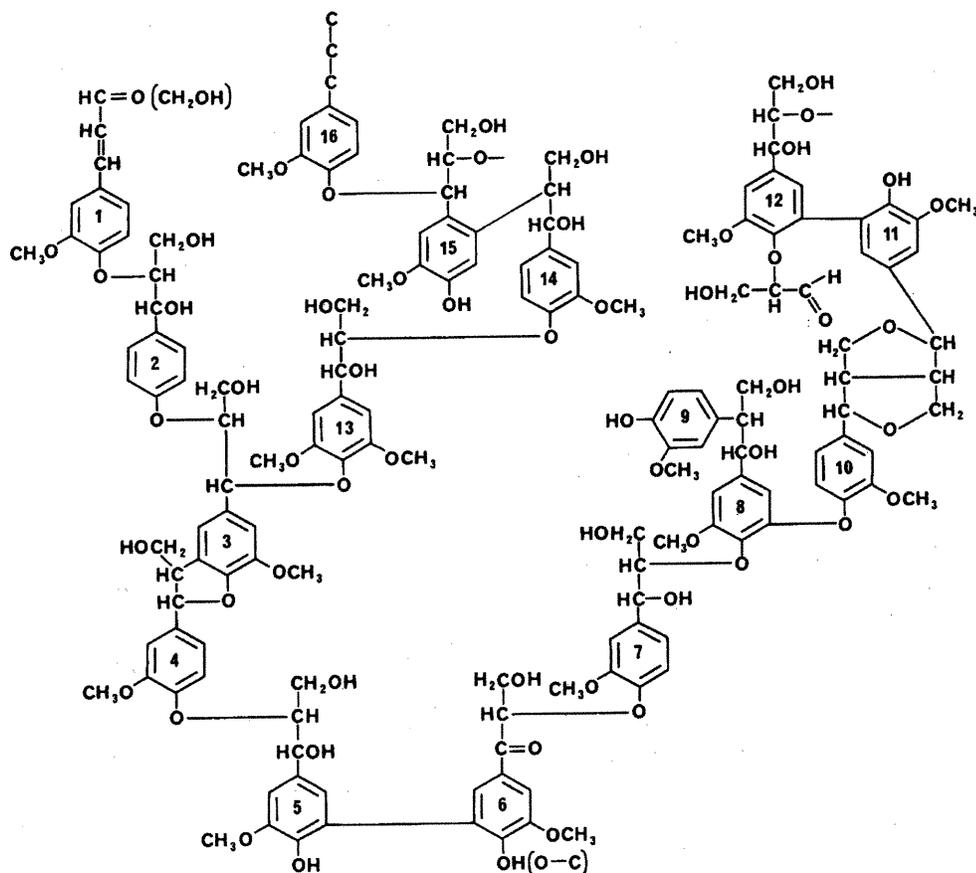


Figure 3. Structure proposée de la lignine de conifère. Les unités #4 et #5 représentent respectivement un groupement non-phénolique et un groupement phénolique [2].

Il est important de mentionner ici que pour arriver à fabriquer du papier, il faut absolument dégrader cette lignine afin de libérer les fibres du bois. La dépolymérisation de la lignine, aussi nommé délignification, est le principal sujet de la présente recherche. Les réactions chimiques menant à la délignification seront présentées dans le prochain chapitre.

Finalement, les extractifs représentent un foule de composés de plus faible masse molaire comme certains acides gras, acides résiniques et terpènes. Les extractifs sont aisément retirés du bois durant le procédé de cuisson et certains comme la térébenthine sont collectés pour être utilisés à d'autres fins. Les proportions des quatre principaux composés du bois, démontrées au Tableau I, sont pratiquement les mêmes d'une espèce de bois à une autre.

Tableau I. Distribution approximative des composés du bois

Composé	Feuillus (%)	Conifères (%)
Cellulose	42 – 49	41 - 46
Hémicelluloses	23 – 34	25 - 32
Lignine	20 – 26	26 - 31
Extractifs	3 – 8	10 -25

Lorsque le bois aura été transformé en pâte, le contenu de lignine aura diminué jusqu'en dessous de 5 % alors que la teneur en cellulose sera en moyenne supérieure à 70 % de la masse de la pâte kraft [10]. La particularité d'un bon procédé de mise en pâte est de retirer sélectivement la lignine, laissant la cellulose intacte.

Au niveau structurel, le bois est composés de cellules filiformes qui sont orientées à la verticale dans le tronc de l'arbre. À la fin du cycle de leur vie, chacune de ces cellules formera un tube creux et rigide: une fibre. Les fibres de bois sont elles-même composées de trois sections principales: le lumen, cavité servant au transport des liquides, la paroi primaire et la paroi secondaire (Figure 4a). Les fibres sont retenues ensemble par la lamelle mitoyenne (Figure 4b) qui agit comme un ciment pour donner au bois sa dureté et sa solidité. Cette section est presque entièrement composée de lignine et, tel que mentionné précédemment, sa dégradation entraîne la libération des fibres, formant ainsi ce qui s'appelle la pâte, qui sera par la suite utilisée pour fabriquer le papier.

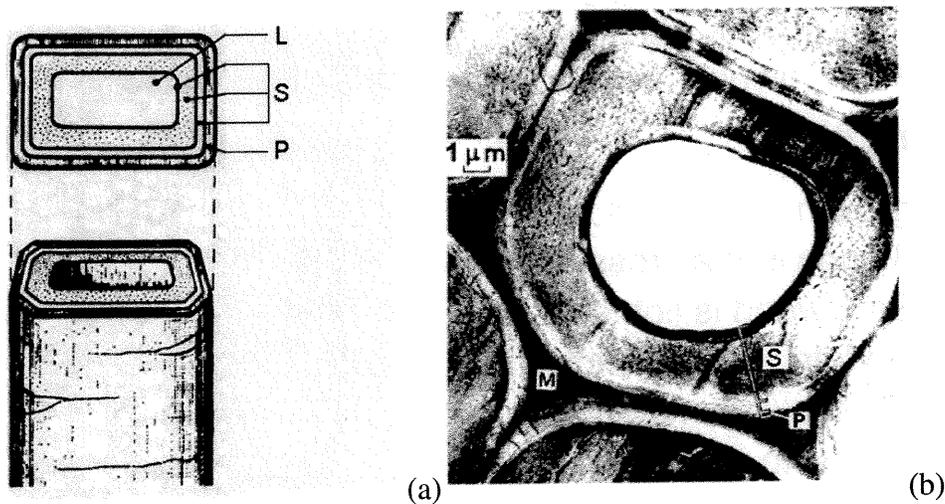


Figure 4. Schéma (a) et coupe transversale (b) d'une fibre de bois. Les différentes sections sont le lumen (L), les parois primaire (P) et secondaire (S) et la lamelle mitoyenne (M) [2, 8].

1.2.2. Le procédé de mise en pâte kraft

Il existe plusieurs procédés pour produire de la pâte à papier. Le bois peut être traité de façon mécanique, chimique ou par une combinaison des deux. Les pâtes mécaniques, formées par déchiquetage du bois, sont surtout utilisées pour les papiers de basse qualité à usage de courte durée comme le papier journal. La pâte chimique est utilisée pour les papiers fins et pour les cartons car le traitement chimique permet de retirer plus de lignine et d'avoir des fibres de meilleure qualité. Des différents procédés chimiques, le procédé kraft est le plus utilisé et il sera principalement concerné par cette étude.

Lors de la mise en pâte kraft, le bois, préalablement réduit en copeaux, est soumis à l'action d'une solution d'hydroxyde et de sulfure de sodium à haute température et à haute pression. Cette solution alcaline nommée liqueur blanche est mélangée aux copeaux dans un réacteur, le lessiveur, où se produit alors la cuisson

du bois, c'est-à-dire la dégradation de la lignine. Les réactifs contenus dans la liqueur blanche (voir Tableau II) ont pour effet de briser les liaisons chimiques entre les unités phénylpropane qui forment le squelette de la lignine. La liqueur blanche étant très alcaline (pH variant entre 13.5 et 14) les fragments de la lignine sont solubilisés puis retirés du circuit de cuisson dans la liqueur noire. Cette liqueur est composée des produits chimiques provenant de la liqueur blanche qui n'ont pas été consommés durant la cuisson ainsi que des substances organiques et inorganiques retirées du bois. La plupart des fragments de la lignine s'y retrouvent sous forme de sels d'acides organiques dont les groupements aromatiques et les liaisons conjuguées, en absorbant la lumière, sont responsables de la couleur foncée de la liqueur noire.

Un des avantages du procédé kraft est qu'il s'effectue en circuit fermé. En effet, les réactifs de la liqueur blanche (NaOH et Na₂S) sont continuellement régénérés à partir des résidus de la cuisson du bois et ceci, par une série d'opérations assez simples. Cette fermeture du circuit diminue l'eau nécessaire à la mise en pâte, les coûts de production liés aux produits chimiques, et minimise les rejets dans l'environnement. La première étape de ce circuit de récupération est la combustion de la liqueur noire. Ceci permet à la fois de détruire les composés organiques extraits du bois, puisqu'ils y sont brûlés (produisant chaleur et CO₂) et de régénérer le Na₂S. Les résidus de la combustion, riches en sels inorganiques, sont alors solubilisés dans l'eau, formant un troisième type de liqueur, la liqueur verte. Le sulfure de fer présent dans cette liqueur est responsable de sa couleur verdâtre. L'autre agent principal de la mise en pâte, le NaOH, est régénéré lors de l'étape suivante, la caustification. Lors de cette étape, le carbonate de sodium contenu en grande quantité dans la liqueur verte (voir Tableau II) réagit avec de l'eau en présence de CaO pour former l'hydroxyde de sodium et du CaCO₃. La liqueur verte est ainsi transformée en liqueur blanche qui est retournée au lessiveur pour cuire à nouveaux des copeaux de bois. Un schéma des différentes étapes de ce circuit ainsi que les principales réactions chimiques qui y ont lieu sont présentés à la Figure 5. Il est également intéressant de noter que même le CaO est régénéré à partir du CaCO₃ dans une étape supplémentaire (non-démontrée) du circuit de récupération ($\text{CaCO}_3 + \text{chaleur} = \text{CaO} + \text{CO}_2$) [2].

Tableau II. Concentrations approximatives des principaux composés des liqueurs du procédé kraft [2].

Composés	Liqueur blanche (M)	Liqueur noire (M)	Liqueur verte (M)
NaOH	1.0	0.015	0.16
Na ₂ S	0.2	0.022	0.19
Na ₂ CO ₃	0.1	0.03	0.41

1.2.3. Les propriétés de la pâte

Les propriétés de la pâte sont rigoureusement mesurées durant la production afin de régler les paramètres du procédé et de s'assurer que le produit répondra aux critères du marché. Puisque certaines de ces propriétés seront utilisées pour évaluer les performances des méthodes de délignification développées tout au long de ce projet de recherche, il s'avère nécessaire d'en voir les détails.

1.2.3.1. L'indice Kappa

L'indice Kappa (K) est l'indicateur de la quantité de lignine résiduelle dans la pâte. Il s'agit d'un titrage en retour basé sur l'oxydation de la lignine par le permanganate de potassium. Une fraction du KMnO₄ ajouté réagit avec la lignine et la fraction qui reste est réduite par ajout d'iodure de potassium. L'iode ainsi formé est titré par le thiosulfate tel que décrit dans les procédures d'iodométrie[11]. Ce titrage permet de trouver l'indice K qui, par définition, correspond au volume en millilitre d'une solution de KMnO₄ de 0.1 N qui est consommé par un gramme de pâte anhydre [12]. Ainsi, une diminution de K équivaut à une délignification et plus l'indice est bas, moins il reste de lignine dans la pâte. Une unité de l'indice Kappa correspond à environ 0.15 % de lignine par unité de masse de pâte kraft. Typiquement, l'indice Kappa d'une pâte de bois mou ayant été traitée à l'oxygène se

situe entre 20 et 25 [2]. Pour ce qui est de la pâte blanchie destinée à la fabrication de papier fin, l'indice de Kappa devrait idéalement être de zéro, signifiant une délignification complète. Cette valeur n'est en réalité jamais obtenue et il peut rester des traces de lignine dans la pâte. De façon pratique, lorsque la délignification est pratiquement complète, c'est la blancheur de la pâte qui devient le paramètre servant à évaluer l'efficacité des étapes de blanchiment.

1.2.3.2. L'indice de blancheur

Cette propriété est la fraction, exprimée en pourcentage, de la lumière ($\lambda = 457 \text{ nm}$) réfléchiée par une feuille de pâte ou de papier [13]. Plus le papier est blanc, plus le pourcentage est élevé. A titre indicatif, le papier d'usage courant possède un indice de blancheur d'environ 90%.

1.2.3.3. La viscosité

Tel que mentionné précédemment, la délignification se doit d'être sélective et ne dégrader que la lignine, laissant les fibres de cellulose intactes. Si les chaînes de glucose formant la cellulose sont fractionnées, les fibres perdront de leur qualités physiques et le papier sera moins solide. L'évaluation de la qualité des fibres s'effectue en mesurant la viscosité d'une solution de cupriéthylènediamine 0.5 M dans laquelle est dissout 0.5 % de pâte [14]. La cellulose forme un complexe polyanionique avec le cuivre, permettant la solubilisation des chaînes de cellulose [15]. Si les fibres ont été dégradées, les chaînes de cellulose seront plus courtes que celles des fibres intactes et la viscosité de la solution sera plus faible. La perte de viscosité due à un traitement de délignification doit être minimale.

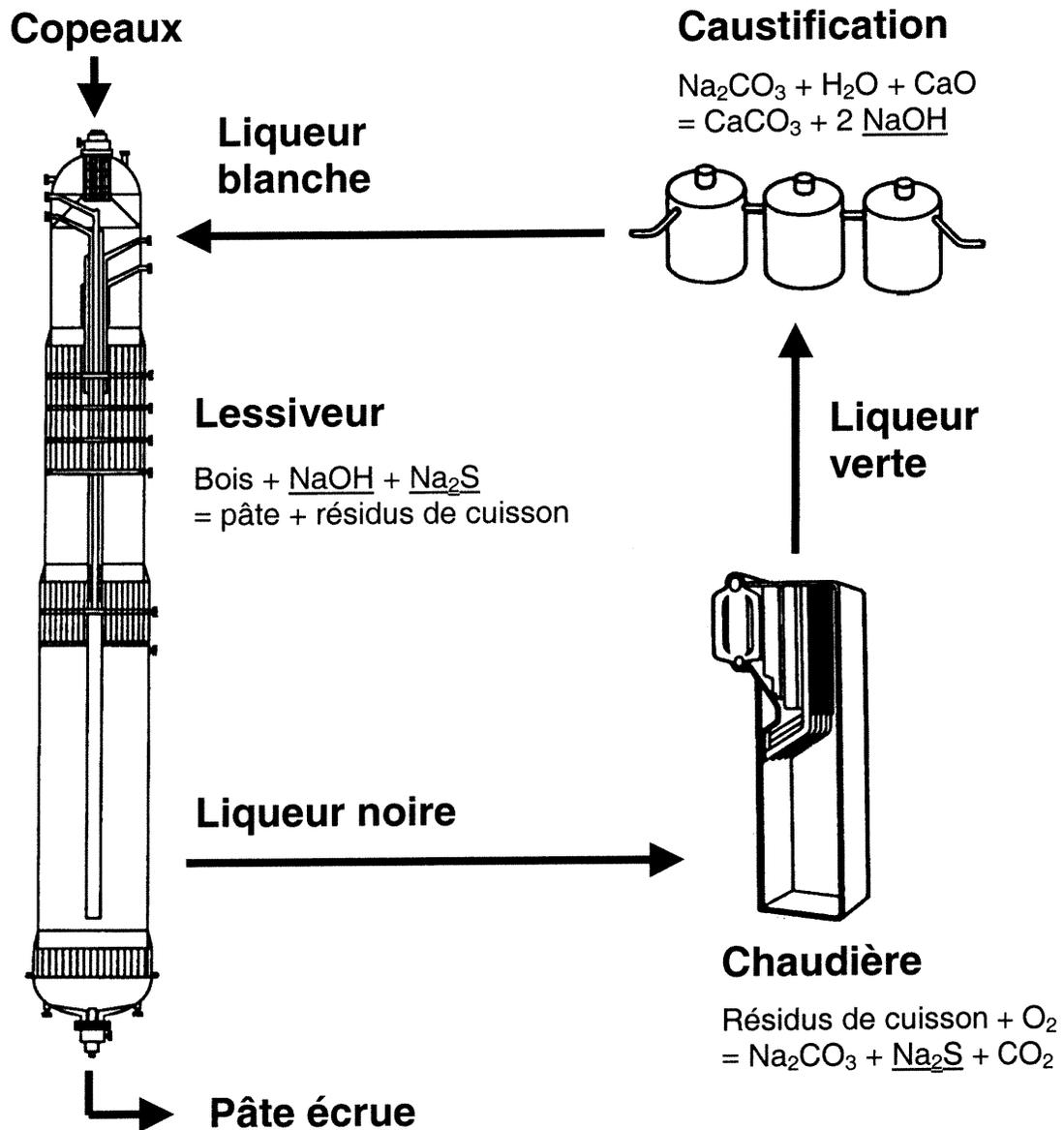


Figure 5. Repr\^esentation du circuit de mise en p\^ate kraft ainsi que des principales r\^eactions chimiques qui s'y produisent. Les compos\^es soulign\^es sont les principaux agents de d\^elignification. Adaptation de [2].

1.2.4. Le blanchiment

La pâte kraft doit être blanchie d'abord pour retirer la lignine résiduelle (environ 5% n'ayant pas été retirée lors de la cuisson), mais également parce que les réactions chimiques s'opérant lors de la cuisson forment des groupements fortement absorbants, comme les quinones, qui donnent une couleur foncée à la pâte. En fait la pâte de cuisson kraft est plus foncée que le bois utilisé pour la fabriquer. Les agents de blanchiment sont classés en deux catégories selon que leur action sur la pâte a pour but de retirer la lignine résiduelle (action de délignification) ou de dégrader les groupements chromophores responsables de la couleur foncée de la pâte (action de blanchiment)

Le blanchiment de la pâte s'effectue en plusieurs étapes successives d'oxydation en alternance avec des étapes d'extraction. L'oxydation de la pâte entraîne la dégradation des groupements de la lignine résiduelle et des groupements chromophores en utilisant des agents fortement oxydants dont les principaux sont présentés plus bas. Les étapes d'extraction consistent en un traitement alcalin à l'hydroxyde de sodium parfois en présence d'oxygène ou de peroxyde. Les extractions ont pour but de solubiliser et de retirer les groupements qui ont été oxydés lors de l'étape précédente.

1.2.4.1. Chlore (C)

Le chlore moléculaire est utilisé pour la délignification depuis le début du 20^e siècle. Il est plus avantageux que la plupart des autres technologies grâce à ses faibles coûts de production et d'utilisation, en plus d'être facile à utiliser. Le chlore est également très sélectif, ce qui lui permet de réagir avec la lignine sans dégrader les fibres de cellulose qui doivent demeurer intactes pour avoir une bonne qualité de pâte. Bref, la délignification au chlore est de loin celle qui offre le meilleur rendement au meilleur coût. Par contre, son utilisation est responsable de la

production de composés toxiques comme les tétrachlorodibenzo-*p*-dioxines (TCDD) et tétrachlorodibenzofurannes (TCDF) par réaction du chlore avec certains groupements de la lignine [16].

L'utilisation du chlore pour blanchir le papier a été freinée de façon importante depuis la fin des années 80, réduisant ainsi de plus de 99% les quantités de dioxines et de furannes présentes dans les effluents d'usine [17].

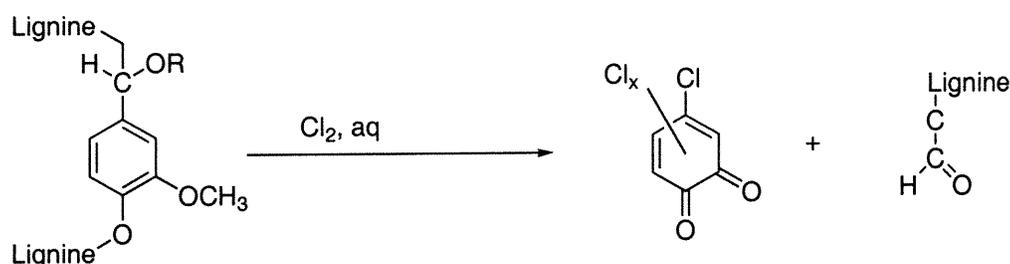


Figure 6. Réaction du chlore avec un fragment représentatif de la lignine. Les quinones ainsi formées peuvent se coupler et former des dioxines.

1.2.4.2. Bioxyde de chlore (D)

Le ClO_2 est apparu en industrie de blanchiment des pâtes plus tard que le chlore, soit vers le milieu du 20^e siècle. Il était alors utilisé vers la fin des stades de blanchiment pour augmenter la blancheur de la pâte. C'est le bioxyde de chlore qui remplaça le chlore à la fin des années 80 et il est encore aujourd'hui l'agent de blanchiment principal. Les réactions chimiques menant à la délignification par le ClO_2 sont très complexes et impliquent la formation de radicaux libres. En résumé, le ClO_2 est très efficace, facilement produit sur place et ne cause pas de perte significative de viscosité de la pâte [18]. Par contre, en oxydant la lignine, il peut y avoir formation de plusieurs composés indésirables comme le Cl_2 et le HOCl , qui vont, eux, former des complexes organochlorés toxiques [19]. Un bon contrôle des conditions de blanchiment au ClO_2 permet toutefois de réduire la formation de ces

composés et les quantités en toxines dans les effluents d'usine se retrouvent sous les normes gouvernementales actuelles.

1.2.4.3. Oxygène (O)

L'utilisation d'oxygène pour la délignification est, depuis quelques années, appelée à remplacer le chlore (sous toutes ses formes) pour des raisons à la fois techniques, économiques et écologiques. En effet, l' O_2 est assez simple d'utilisation, peu coûteux grâce à sa grande disponibilité et, contrairement aux produits chlorés, il s'intègre dans le système de récupération de l'usine, c'est-à-dire que les rejets du procédé sont intégrés au cycle de récupération de la liqueur noire (Figure 5) plutôt que d'être rejetés dans l'environnement. L'oxygène possède cependant quelques désavantages. Lorsque la délignification est avancée (>50 %), l' O_2 devient moins sélectif à la lignine et attaque la cellulose des fibres, diminuant la qualité de la pâte [20]. Ces désavantages sont compensés en utilisant un protecteur, les sels de magnésium, qui vont empêcher l'attaque des fibres par l'oxygène. L' O_2 n'est pas un agent de blanchiment mais bien un agent de délignification. Par contre, son utilisation dans les premiers stades de délignification va diminuer le besoin de blanchir la pâte (donc diminution des quantités nécessaires d'agent de blanchiment). L'oxygène dissous en milieu aqueux donne lieu à plusieurs types de radicaux comme le radical hydroxyle ($OH\bullet$) et l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$). L' O_2 est tout d'abord activé par des conditions alcalines puis il se réduit en H_2O en quatre étapes, oxydant en même temps les substrats, dont la lignine. L'utilisation de l'oxygène produit peu d'impact sur l'environnement car les sous-produits sont peu nocifs: CO_2 , acides organiques faibles et traces de méthanol [20].

1.2.4.4. Ozone (Z)

L'ozone est un oxydant très puissant qui peut réagir avec la plupart des matériaux organiques. Il est donc moins sélectif que les autres agents décrits plus

haut et son usage sera donc plus restreint. L'O₃ est de plus assez difficile à synthétiser et il n'est pas très soluble dans l'eau. Son coût est plus élevé et il offre une moins bonne qualité de pâte que le chlore. Le principal avantage de l'ozone c'est que, grâce à son très fort caractère électrophile, il peut réagir avec des fragments de lignine qui n'ont pas été affectés par les autres types de procédés. L'O₃ peut effectuer deux types de réactions dans la lignine. Tout d'abord, il peut attaquer les groupements chromophores (donc blanchir) en réagissant avec les doubles liaisons conjuguées à des cycles aromatiques comme le styrène par exemple. Ensuite, l'ozone peut insérer un atome d'oxygène dans les liens C-H des alcools, aldéhydes et éthers, résultant en la fragmentation de la lignine [21].

1.2.4.5. Peroxyde d'hydrogène (P)

Au début utilisé pour le blanchiment des pâtes mécaniques, le H₂O₂ est maintenant aussi utilisé pour la délignification. Il réagit surtout avec les structures colorées de la lignine (carbonyles conjugués et quinones). En effet, si à basse température (50-70°C), le peroxyde d'hydrogène peut détruire les quinones qui donnent de la couleur au papier non-blanchi, il peut également dépolymériser la lignine à haute température (> 80°C). C'est l'anion HOO⁻ (un très bon nucléophile) produit en milieu alcalin de la façon suivante:



qui est actif pour éliminer les groupements chromophores. Il y a cependant d'autres produits de décomposition qui sont aussi actifs (OH• et O₂⁻•) lors des réactions avec la pâte [22]. Le H₂O₂ est surtout utilisé avec le NaOH pendant les étapes d'extraction pour faciliter la dégradation des fragments de lignine.

1.2.4.6. Les séquences de blanchiment

Le blanchiment de la pâte s'effectue en plusieurs étapes successives. Chacune de ces étapes utilise un des agents de blanchiment décrits plus tôt. Les étapes, désignées par une lettre, sont entrecoupées par un lavage de la pâte à l'eau chaude. Par exemple, une séquence typique de blanchiment d'une pâte kraft serait symbolisée par D(EO)DED et signifierait une étape de bioxyde de chlore suivie d'une extraction (NaOH) avec oxygène puis bioxyde, extraction et bioxyde. La pâte ainsi traitée est suffisamment blanchie pour rencontrer les exigences du marché et sera formée en feuilles de papier par une série de procédés dont la description dépasse le cadre de ce projet.

1.2.4.7. Une méthode alternative?

La recherche de nouvelles méthodes de blanchiment ne s'est toutefois pas arrêtée avec l'arrivée du bioxyde de chlore. L'industrie des pâtes et papiers pourrait bénéficier d'une méthode alternative pour plusieurs raisons. Tout d'abord parce qu'il y a toujours des émissions de produits organochlorés dans l'environnement, même si ces quantités sont beaucoup plus faibles qu'en utilisant le chlore. Deuxièmement, à cause de la corrosion due au chlore, il est impossible de recycler les eaux usées du blanchiment (fermeture du circuit). Finalement, certaines usines à haute capacité voient leur production limitée par les quantités de ClO_2 qu'ils peuvent produire. Ainsi, une méthode alternative qui serait non toxique, qui permettrait la fermeture du circuit ou qui entraînerait une diminution du ClO_2 nécessaire au blanchiment serait très prometteuse.

L'utilisation d'enzymes comme agent de blanchiment a gagné de plus en plus d'intérêt depuis les 10 dernières années. Les enzymes sont biodégradables, peuvent être produites à grande échelle à un faible coût et n'impliquent pas de modifications majeures à l'infrastructure des usines de pâte. La substitution d'une partie du ClO_2

par une étape de blanchiment enzymatique pourrait donc s'avérer bénéfique autant pour l'industrie que pour l'environnement.

1.3. Bioblanchiment

Le bioblanchiment repose sur l'utilisation d'outils biologiques qui vont de façon naturelle dégrader la lignine contenue dans le bois. Ces agents que l'on retrouve dans la nature sont bien souvent spécifiques à un type de substrat (comme la lignine) laissant le reste (cellulose) intact. Cette propriété est extrêmement avantageuse pour développer une méthode de délignification. Le principal obstacle à l'utilisation industrielle de ces agents biologiques c'est qu'ils ne réagissent que très lentement, ce qui est peu approprié au rythme très rapide de production des usines modernes. L'application en industrie d'un tel système dépend donc de la découverte d'un moyen d'augmenter la performance des agents de bioblanchiment.

Cette recherche date de plusieurs décennies, soit depuis qu'il a été démontré que certains champignons étaient capables de dégrader la lignine [23]. Ces champignons, les basidiomycètes, se retrouvent sur les arbres morts et sont responsables de la dégradation naturelle du bois (voir Figure 7a). Les premiers résultats de bioblanchiment de la pâte, réalisés dans les années 70 [24], ont démontré la capacité de ces organismes à délignifier la pâte. Bien que selon cette recherche, environ 60 % de la lignine peut ainsi être retirée de la pâte, il faut jusqu'à sept jours aux champignons pour effectuer le travail, ce qui a pour effet de causer une perte de viscosité, conséquence de la dégradation des fibres. Certains champignons de la famille de basidiomycètes se sont démarqués comme étant particulièrement efficaces pour le blanchiment de la pâte. *Trametes versicolor*, un de ces champignons, a été utilisé par notre groupe de recherche depuis le début des années 90 pour faciliter le blanchiment de la pâte [25, 26]. En effet, puisque le champignon n'est pas assez efficace pour blanchir la pâte à lui seul, l'application en industrie de cette technologie a pour but de diminuer les quantités d'agents de blanchiment (comme le

ClO_2) nécessaires pour obtenir le degré de blancheur désiré. Son action blanchissante est démontrée à la Figure 7b.

Pour effectuer la dégradation du bois et de la lignine, les champignons sécrètent plusieurs enzymes dont le rôle exacte dépend de leur nature. Les enzymes de *Trametes versicolor* (*Tv*) que l'on reconnaît jouer un rôle lors de la délignification sont les laccases, les lignine peroxydases, les manganèse peroxydases et les cellobioses déshydrogénases [27]. De ces enzymes, la laccase est particulièrement intéressante pour oxyder la lignine grâce à ses propriétés oxydantes et ce projet ne concernera que l'utilisation de celle-ci pour le bioblanchiment de la pâte.

La première enzyme à avoir été introduite pour le bioblanchiment de la pâte fut la xylanase, en 1986 [28]. Cette enzyme agit sur les hémicelluloses dans la fibre de façon à faciliter le blanchiment chimique. Ceci s'effectue en rendant les fragments de lignine plus solubles et donc plus faciles à retirer, diminuant la quantité d'agents chimiques nécessaires au blanchiment [29].

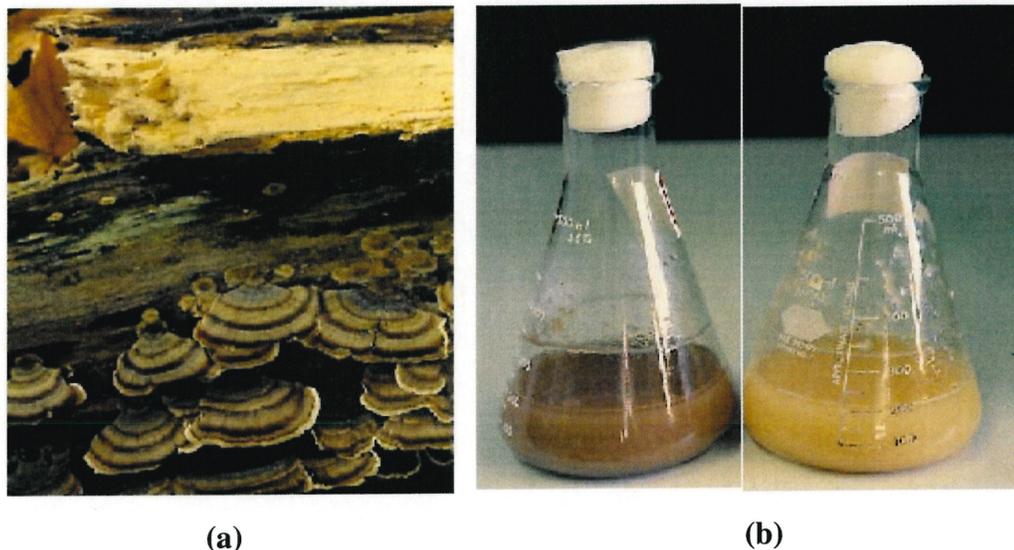


Figure 7. Action blanchissante d'un champignon (basidiomycète) sur le bois (a) et sur la pâte (b). La fiole de droite en (b) représente une incubation de 24 heures avec le champignon *Trametes versicolor* et un échantillon de pâte kraft tandis que la fiole de gauche montre la pâte avant le traitement.

1.3.1. La laccase

La première publication relatant la découverte de la laccase date de 1883 et décrit comment cette enzyme est responsable de la coagulation de la laque produite par certains arbres [30]. L'enzyme laccase est une oxydase qui se retrouve fréquemment chez les plantes et les champignons mais également chez certaines bactéries et insectes [31]. Son site actif, tel que présenté à la Figure 8, est composé de quatre atomes de cuivre et lui permet d'effectuer l'oxydation d'un substrat tout en réduisant l'oxygène en eau par un mécanisme impliquant quatre électrons. Cette réaction peut s'expliquer en trois étapes: l'oxydation du substrat par le cuivre de Type 1, le transfert interne d'électron entre le Cu_{T1} et le site T2/T3 puis la réduction de l'oxygène en eau [31, 32].

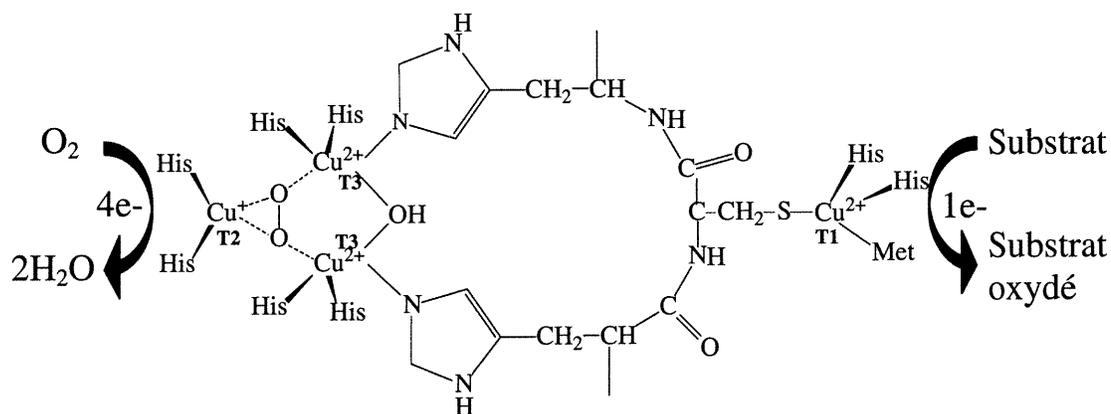


Figure 8. Structure générale du site actif des enzymes de type cuivre bleu. La structure réelle du site actif de la laccase de *T. versicolor* peut différer quelque peu de celle-ci au niveau des acides aminés entourant le site mais le squelette de base d'atomes de cuivre est le même. La forme représentée contient l'oxygène lié au site T2/T3. Adaptation de [33].

Ces atomes de cuivre sont classés en trois catégories, T1, T2 et T3 selon les caractéristiques de leur spectre de résonance paramagnétique électronique (EPR) respectif [34]. Les différents types ont également différentes fonctions pour la réduction de l'oxygène (types T2 et T3) ou pour l'oxydation du substrat (type T1). Le cuivre de type T1 possède une bande d'absorption à 620 nm (le coefficient

d'absorptivité molaire (ϵ) équivaut à $4900 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ [35]) ce qui donne à l'enzyme en solution une couleur bleue d'où la désignation d'enzyme de type cuivre bleu. Cette désignation englobe toute une gamme d'enzymes qui ont une structure et des propriétés semblables. La laccase fait partie de cette classe d'enzymes.

Bien que l'on retrouve la laccase dans plusieurs plantes, elle est beaucoup plus abondante dans les champignons et plus particulièrement dans les basidiomycètes, les champignons responsables de la dégradation du bois [36]. Sa présence en grande quantités dans ce type de champignon a tât fait de suggérer son implication dans la biodégradation de la lignine. La laccase est paradoxalement impliquée dans la biosynthèse de la lignine où elle joue un rôle d'initiatrice de certaines réactions de polymérisation par oxydation des composés phénoliques [31]. Finalement, la laccase a maintenant de nombreuses applications autres que le bioblanchiment, notamment au niveau de la dégradation des composés comme les hydrocarbures polycycliques et certains colorants synthétiques [37-42]. La sélectivité des réactions enzymatiques, plus grande que celle des réactions chimiques peut également être mise à profit pour la synthèse [43]. La réaction de réduction de l'oxygène par la laccase pourrait également être mise à profit pour la fabrication de cathode pour des piles à combustible [44, 45] ou même utilisée pour détecter la présence de poisons respiratoires [46-48], puisque ceux-ci sont généralement des inhibiteurs de l'enzyme.

Trametes versicolor sécrète plusieurs laccases nommées isozymes I et II selon leur ordre d'élution sur une colonne échangeuse d'ions (voir la Partie Expérimentale). Les deux isozymes donnent sensiblement les mêmes résultats de délignification de la pâte [49], mais puisque la laccase II de *Tv* est produite en plus grande quantité, c'est elle qui sera utilisée pour cette recherche. La laccase de *Tv* est particulièrement intéressante pour la délignification puisque le potentiel d'oxydation de son site actif Cu_{TI} est parmi les plus élevés des différentes provenances de laccase. Il sera démontré à plusieurs reprises que le potentiel de l'enzyme doit être le plus élevé possible pour favoriser le bioblanchiment.

Les substrats naturels de la laccase sont les phénols, ce qui suggère que l'enzyme pourrait dépolymériser la lignine en oxydant les groupements phénoliques qui y sont présents (voir Figure 3). La laccase a cependant un effet très limité sur la dégradation de la lignine, ce qui s'explique en partie par le fait qu'environ le tiers de la lignine est composée de sous-unités phénoliques [50]. Le reste, étant composé de sous-unités non-phénoliques, est beaucoup plus difficile à oxyder et le polymère ne peut être complètement fragmenté en oxydant seulement les groupements phénoliques. La laccase ne peut oxyder les groupements non-phénoliques dont le potentiel d'oxydation est supérieur à 1V vs Ag/AgCl [51]. L'inefficacité de la laccase seule peut s'expliquer également par le fait que l'enzyme, une grosse molécule (MM = 70 000 [49]), doit pouvoir se rendre à la lignine résiduelle pour pouvoir l'oxyder. Après un traitement de mise en pâte kraft, la majorité de la lignine résiduelle se situe entre les parois des fibres, ce qui correspond à un espace d'environ 5 nm [27]. L'enzyme est par conséquent trop grosse pour pouvoir diffuser rapidement dans les fibres et effectuer une délignification de façon efficace (voir Figure 9). Ces deux limites fondamentales à l'action de la laccase peuvent être repoussées en introduisant un nouvel élément dans le système; le médiateur.

1.3.2. Le système laccase-médiateur

Un médiateur est défini comme une petite molécule rédox qui agit comme transporteur d'électrons entre la lignine et l'enzyme. Le principe à la base de ce système est que la laccase, par la réduction de l'oxygène, oxyde le médiateur qui lui, pouvant diffuser dans les fibres, oxydera la lignine. Puisque le médiateur se réduit en oxydant la lignine de la pâte, il peut être réoxydé par l'enzyme pour recommencer un nouveau cycle. Ces cycles d'oxydations et de réductions successives mèneront finalement à la délignification de la pâte. Le schéma de la figure 10 démontre les différentes étapes d'oxydoréduction du système laccase-médiateur.

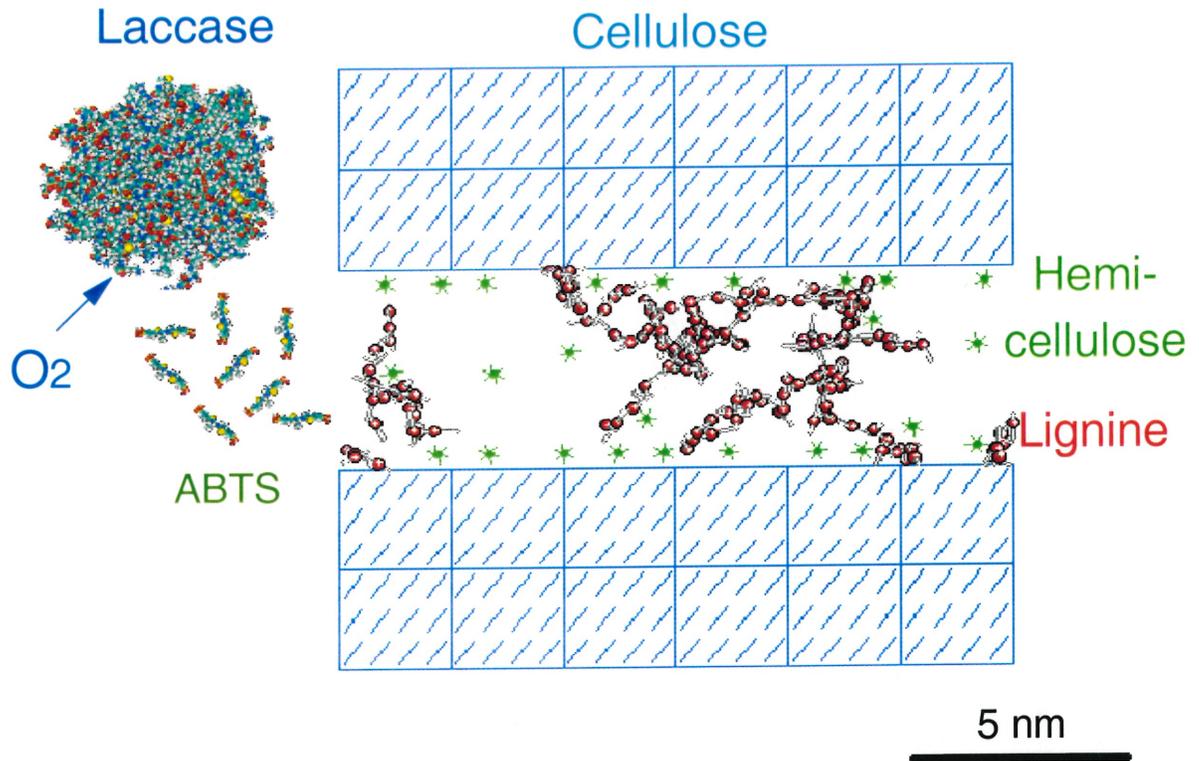


Figure 9. Schéma d'une section de la paroi secondaire d'une fibre de pâte kraft non-blanchie. Le médiateur, dans ce cas-ci l'ABTS, peut diffuser entre les fibrilles de cellulose pour oxyder les groupements de lignine résiduelle (en rouge). Tirée de [27].

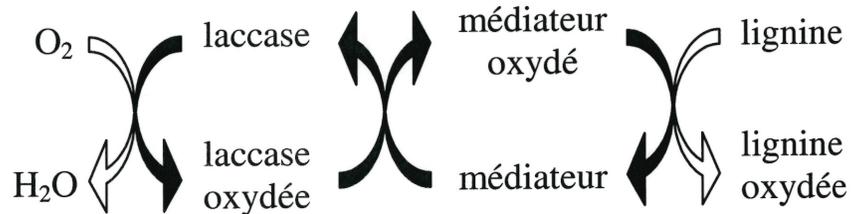


Figure 10. Oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur. Les flèches pleines représentent le cycle d'oxydoréduction qui se répétera tant qu'il y aura de l'oxygène et de la lignine dans le milieu. Les électrons voyagent ainsi de la lignine jusqu'à H₂O.

Le premier médiateur à avoir été utilisé pour un tel système est l'acide 2,2'-azinobis-(3-éthylbenzthiazoline-6-sulfonique) (ABTS) [52]. Sa structure ainsi que celle d'autres médiateurs, est présentée au Tableau III. L'article de Bourbonnais et Paice [52] rapporte non seulement la possibilité d'utiliser la laccase avec l'ABTS comme agent de délignification mais plus important encore, que le système enzyme-médiateur permet d'élargir le champ d'action de la laccase aux groupements non-phénoliques de la lignine. Les essais réalisés par la suite démontrèrent que la laccase et l'ABTS pouvaient en effet délignifier la pâte de cuisson kraft [53] et qu'en optimisant les paramètres du traitement enzymatique, il était possible d'atteindre jusqu'à 50 % de délignification [54]. Cependant, l'ABTS ne peut être considéré pour une éventuelle application en usine, principalement à cause de son coût trop élevé et de sa toxicité.

1.3.3. Les médiateurs

Le médiateur est l'élément clé du système de blanchiment enzymatique de la pâte. De nombreuses recherches ont été réalisées dans le but de découvrir de nouveaux médiateurs qui pourraient offrir la même performance que l'ABTS mais sans les inconvénients. Il va sans dire que, considérant l'importance de l'industrie papetière à travers le monde, de nombreux brevets ont été déposés pour des nouveaux médiateurs potentiellement applicables en industrie au cours des dix dernières années. Ces médiateurs, leur structure et leur potentiel rédox sont présentés au Tableau III.

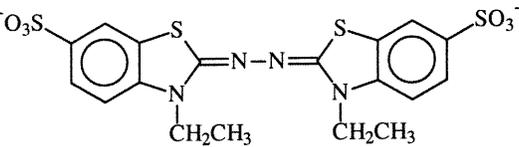
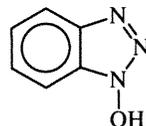
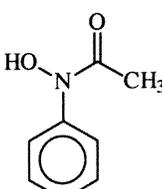
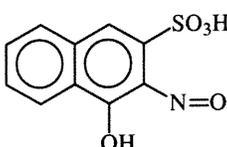
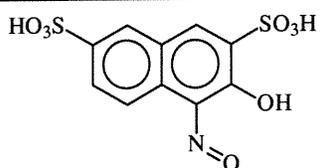
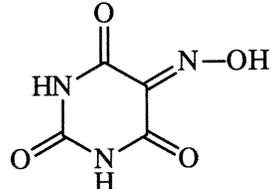
Une molécule doit posséder certaines caractéristiques essentielles pour être considérée comme un médiateur efficace du système laccase-médiateur. Tout d'abord, le médiateur doit être un substrat de la laccase, c'est-à-dire qu'il doit pouvoir être oxydé par l'enzyme. Comme le démontre certaines études, notamment celle de Xu [55] et celle-ci (section 3.3.), le principal paramètre régissant l'oxydation est la différence de potentiel normal apparent (E^0) entre la laccase et le médiateur.

En effet, en étudiant certains paramètres thermodynamiques comme l'énergie libre de Gibbs [56], l'oxydation sera favorisée si le potentiel rédox de l'agent oxydant (laccase) est plus positif que celui de l'espèce qui est oxydée (médiateur). Le potentiel de la laccase de *Trametes versicolor* (du site actif de cuivre T1) est d'environ 575 mV par rapport à l'électrode de chlorure d'argent (vs Ag/Ag/Cl) [34].

Ensuite, le médiateur doit avoir un potentiel normal apparent compatible avec celui de la lignine: si le médiateur possède un potentiel qui est trop négatif, il sera facilement oxydé par l'enzyme mais la réaction d'oxydation de la lignine sera thermodynamiquement défavorisée et le système sera inefficace. Puisque les groupements non-phénoliques de la lignine (ceux qui ne peuvent pas être directement oxydés par la laccase) ont des E^0 d'environ 1000 mV et plus vs Ag/AgCl, le compromis à réaliser est d'utiliser un médiateur qui possède un potentiel situé entre 575 (laccase) et 1000 mV (lignine) vs Ag/AgCl.

Le médiateur doit être stable dans les deux états d'oxydation afin que le cycle tel que présenté à la figure 10 ne soit interrompu parce que le médiateur s'est décomposé ou modifié après un certain temps de réaction. Dans un même ordre d'idées, le médiateur ne doit pas s'adsorber sur la pâte, pour s'assurer qu'il puisse diffuser librement entre l'enzyme et la lignine résiduelle et effectuer un transport efficace des électrons. Le médiateur oxydé doit également être le plus spécifique possible envers la lignine pour éviter la perte de viscosité due à une dégradation de la cellulose des fibres. Finalement, pour considérer son application en industrie, un bon médiateur devrait être recyclable, peu coûteux à produire en grandes quantités et, cela va de soi, être non-toxique pour l'environnement.

Tableau III. Liste des principaux médiateurs de la laccase utilisés pour les études sur le bioblanchiment de la pâte.

Nom Abbréviation Référence	Structure	Potentiel normal apparent (V vs Ag/AgCl) ¹
Acide 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonique) ABTS Bourbonnais et Paice 1992 [53]		0.47 ; 0.90
1-hydroxybenzotriazole HBT Call 1994 [57]		<u>0.85</u>
N-hydroxyacétanilide NHA Call 1997 [58]		<u>0.63</u> ; <u>0.81</u>
Acide 4-hydroxy-3-nitroso-1-naphthalenesulfonique HNNS Zing <i>et coll.</i> 1996 [59]		<u>0.71</u> ; <u>0.90</u>
Acide 1-nitroso-2-naphtol-3,6-disulfonique NNDS Zing <i>et coll.</i> 1996 [59]		0.62
Acide violurique VAC Call 1997 [58]		0.71

¹Ag/AgCl: Électrode de chlorure d'argent (E = +0.197 vs Électrode normale d'hydrogène). Les valeurs soulignées représentent une oxydation irréversible [60].

Les médiateurs connus de la laccase qui sont présentés au Tableau III sont composés d'un squelette organique qui comporte souvent une fonction N-hydroxyle (N-OH) par laquelle s'amorce la réaction d'oxydation par la laccase et de dégradation de la lignine (ces mécanismes seront discutés dans le chapitre 3). La formation de radicaux libres qui en résulte pose parfois des problèmes de stabilité du médiateur ou d'inactivation de l'enzyme, tel que suggéré dans le cas du HBT et de l'acide violurique [61, 62]. D'autres médiateurs peuvent être soit toxiques, comme l'ABTS, s'adsorber sur la pâte, ou encore être trop coûteux. L'application du système laccase-médiateur pour le blanchiment de la pâte passe donc par la découverte de nouveaux médiateurs, ce qui est un des principaux buts de ce projet de recherche.

1.4. Présentation du projet de recherche

L'objectif premier de ce projet est d'étudier la délignification de la pâte kraft par le système laccase-médiateur décrit à la section 1.3.3.. Les deux principales réalisations de cette thèse qui sont la découverte d'une nouvelle classe de médiateurs pour la délignification et le développement d'un nouveau système de délignification basée sur l'oxydation électrochimique de la pâte.

La première étape de ce projet fut d'étudier les propriétés d'une nouvelle classe de médiateurs formée de complexes de coordination basés sur un centre de métal de transition. Une recherche bibliographique a tout d'abord été réalisée afin d'effectuer un criblage des complexes qui auraient les qualités nécessaires pour faire un bon médiateur pour le blanchiment enzymatique de la pâte. Les médiateurs ainsi sélectionnés ont été utilisés pour réaliser des essais de délignification sur la pâte, évaluer leur efficacité et choisir ceux qui sont les plus prometteurs. Cette étude préliminaire est présentée au chapitre 3.1.

L'étude des mécanismes d'oxydation de la lignine par le système laccase-médiateur est présentée au chapitre 3.2. Bien que les traitements sur la pâte puissent servir à évaluer facilement l'efficacité d'un médiateur pour la délignification, il est relativement difficile d'en tirer des informations sur les mécanismes et les réactions chimiques qui s'y produisent. L'étude de ces mécanismes est donc grandement facilitée par l'utilisation de composés ayant une structure plus simple que celle de la lignine, mais dont les liaisons s'apparentent à certaines liaisons typiques de la lignine. L'analyse de l'oxydation de ces composés modèles par les médiateurs peut donc servir à étudier les mécanismes menant à la délignification ainsi qu'à étudier l'effet des différentes conditions (pH, température, présence ou absence d'oxygène) sur cette délignification.

Une étude électrochimique des réactions d'oxydation des médiateurs et de la lignine est présentée au chapitre 3.3. L'utilisation de techniques électrochimiques comme la voltampérométrie à onde cyclique (VOC) a permis de mesurer, entre autres, les constantes de vitesse d'oxydation des médiateurs par la laccase ainsi que celles de l'oxydation de la lignine et des composés modèles de la lignine par le médiateur. Ces constantes servent d'outil afin de comparer la vitesse des échanges d'électrons des différents médiateurs et de déterminer l'impact des propriétés des médiateurs sur l'efficacité du système. Une importante réalisation de ces expérimentations est la mise sur pied d'une nouvelle technique permettant l'étude des transferts d'électrons directement sur des échantillons de pâte.

Les résultats des chapitres précédents ont mené au développement d'une nouvelle méthode de délignification de la pâte qui a recours à un médiateur oxydé électrochimiquement plutôt que par la laccase. Cette nouvelle méthode est présentée au chapitre 3.4. Ce système a permis d'obtenir une délignification de l'ordre de 60 %, un résultat sans précédent pour un traitement avec un médiateur de la classe des complexes de coordination. Le système d'électrodélignification est également intéressant au niveau de la recherche puisqu'il permet d'évaluer l'impact des conditions directement sur la pâte.

2. Partie expérimentale

Ce chapitre traite de la préparation des solutions utilisées tout au long du projet de recherche, de la synthèse des médiateurs et des composés modèles de la lignine ainsi que de la préparation et la purification de la laccase. Les méthodes utilisées pour les traitements enzymatiques de la pâte ainsi que celles pour analyser les réactions des composés modèles de la lignine seront présentées. Une section dédiée à la description des principes et de l'instrumentation de la voltampérométrie à onde cyclique est également incluse dans ce chapitre.

2.1. Synthèse des médiateurs

Les médiateurs ne pouvant pas être obtenus sur le marché ont été synthétisés selon les procédures tirées de la littérature. Puisque dans certains cas des modifications ont été apportées dans le but d'améliorer le protocole, les principales synthèses sont présentées ici en détail. Sauf indication contraire, tous les réactifs ont été obtenus chez Aldrich.

2.1.1. $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

L'octacyanomolybdate(IV) de potassium dihydraté a été préparé à plusieurs reprises et selon deux méthodes différentes. La première synthèse a été réalisée selon la méthode de Furman et Miller [63]. Dans cette méthode, le produit de départ Mo(VI) (sous forme de MoO_3), est d'abord réduit en Mo(V) en milieu acide puis le complexe octacyanique est formé en milieu alcalin. L'état d'oxydation souhaité du complexe, soit Mo(IV), est obtenu lors de cette étape de complexation par la disproportionation du Mo(V) en parts égales de Mo(IV) et Mo(VI). Cette disproportionation limite le rendement de la synthèse à 50 % puisque que seulement la moitié du Mo(V) est réduit en Mo(IV) [64]. La méthode de Van de Poel et

Neumann peut être utilisée pour éviter ce problème et augmenter le rendement lors de la production de $K_4Mo(CN)_8$. Cette méthode effectuée en une seule étape la réduction du Mo(VI) et la formation du complexe en utilisant l'hydrate d'hydrazine. La disproportionation est ainsi évitée et les auteurs rapportent un rendement de 86 %, basé sur la quantité de molybdène utilisée au départ [64].

Le produit de chaque synthèse a été purifié à trois reprises en chauffant une solution aqueuse du complexe et de charbon activé. Le produit purifié est ensuite précipité dans le méthanol puis recueilli sur un filtre. Cette procédure permet d'obtenir un produit de très haute pureté, déterminée par titrage oxydimétrique en utilisant le Ce(IV) comme titrant et l'*o*-phénanthroline ferreuse comme indicateur. Le rendement moyen obtenu est de 75 %.

Dans le but de synthétiser le médiateur au plus bas prix possible, une procédure alternative utilisant le cyanure de sodium comme réactif a été envisagée. Le cyanure de potassium tel qu'utilisé dans les méthodes de la littérature est environ 1.7 fois plus dispendieux que le NaCN (selon les prix du catalogue de Aldrich Chemical Co. 2000-2001). La procédure élaborée a été de substituer le NaCN au KCN dans la méthode de synthèse de Van de Poel. Les résultats obtenus ne sont toutefois pas concluants car la précipitation du produit s'est avérée impossible, même en abaissant la température de la solution. De plus l'analyse de la solution réactionnelle a démontré qu'il n'y avait que très peu de complexe formé, ce qui suggère que le cyanure de sodium ne doit pas être utilisé dans la synthèse du $K_4Mo(CN)_8$.

2.1.2. $K_4W(CN)_8 \cdot 2H_2O$

La préparation de l'octacyanotungstate(IV) de potassium dihydraté est réalisée par réduction en milieu acide de l'acide tungstique(VI), H_2WO_4 , en utilisant des feuilles d'étain [65]. Bien que plusieurs essais aient été réalisés en suivant cette

méthode, le rendement obtenu n'a jamais été supérieur à 3 %, ce qui est loin du rendement de 29 à 50 % rapporté par l'auteur. Afin de produire plus de $K_4W(CN)_8$, la synthèse du $K_4Mo(CN)_8$ de Van de Poel a été utilisée mais en remplaçant le MoO_3 par le WO_3 comme produit de départ. Cette synthèse a bien fonctionné mais la technique de purification utilisée pour le $K_4Mo(CN)_8$ ne semble pas appropriée pour purifier le $K_4W(CN)_8$ car il y a énormément de produit perdu lors de la précipitation. Le rendement obtenu par cette méthode a été de 9 %.

2.1.3. N-hydroxy-N-phénylacétamide (NHA)

Le NHA a été préparé selon la méthode de Oxley *et coll.* [66] soit par l'hydrogénation du nitrobenzène avec l'hydrate d'hydrazine sur un catalyseur de rhodium, suivi d'une acétylation de l'azote par CH_3COCl . Le produit ainsi obtenu est de très haute pureté (déterminée par le spectre RMN).

2.1.4. $[Fe(2,2'\text{-bipyridine})_3](ClO_4)_2$

La préparation du $[Fe(bpy)_3](ClO_4)_2$ consistait à dissoudre une quantité du ligand 2,2'-bipyridine dans de l'eau en chauffant puis à y ajouter une solution contenant un excès de sulfate de fer et de perchlorate de sodium. La complexation est très rapide et le produit est précipité par refroidissement de la solution réactionnelle, puis séché au four à 95 °C. Le rendement obtenu est très élevé (93 %, basé sur la quantité de ligand) et le produit est pur. Cette méthode a été développée par Burstall et Nyholm [67].

2.1.5. $[Fe(4,4'\text{-diméthyl-2,2'\text{-bipyridine})_3](ClO_4)_2$

La procédure suivie pour préparer ce produit est celle de la synthèse du $[Fe(bpy)_3](ClO_4)_2$ mais en utilisant le diméthylbipyridine plutôt que la bipyridine

comme ligand. Le rendement obtenu par cette synthèse (66 %) est plus faible que celui de la synthèse précédente ce qui s'explique probablement par le fait que le ligand 4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine est moins soluble que la bipyridine non-substituée.

2.1.6. $[\text{Os}(\text{2,2}'\text{-bipyridine})_2\text{Cl}_2]\text{Cl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

La synthèse de ce complexe consiste à chauffer durant une heure sous reflux le composé de départ K_2OsCl_6 avec deux équivalents de ligand 2,2'-bipyridine dans une solution de DMF [68]. Le produit obtenu est récupéré par évaporation sous vide du solvant avec un rendement de 91 %.

2.2. Préparation et purification de laccase

La laccase de *Trametes versicolor* a été produite selon la procédure décrite par Bourbonnais *et coll.* [49] en utilisant la souche 52J du champignon *Tv* qui a été isolée à Paprican [69]. Afin d'amorcer la préparation avec une culture fraîche de champignon, des petits morceaux d'une ancienne culture ont été placés sur des plats de pétri contenant un milieu nutritif (Bouillon Mycologique (BM)) en gel d'agar. Ce milieu nutritif standard pour la culture de champignon est composé de soytone, de glucose et de quelques métaux (Fe, Cu, Zn, Mn, Co, Ni et Mo) à l'état de trace. Après cinq jours d'incubation à 30°C il y avait suffisamment de champignon sur les pétris pour commencer la culture liquide. La première étape de cette culture est de préparer des inoculum en inoculant quatre flacons contenant le milieu nutritif (BM) en solution, avec des morceaux de champignon découpés des cultures fraîches. Cette étape, qui prend environ trois jours après l'inoculation, permet au champignon de se multiplier rendant la culture à grande échelle (étape suivante) plus facile en diminuant les risques de contamination.

Les inoculum liquides sont ensuite transférés dans une tourie contenant 16 litres d'une solution de culture dont la composition favorise la production de laccase par *Tv*. Ce milieu développé par Fåhraeus et Reinhammar [70] contient du glucose et certains métaux comme BM mais aussi quelques acides aminés qui stimulent la croissance du champignon. Lorsque le champignon s'est suffisamment multiplié (trois jours après l'inoculation), 0.2 mM de 2,5-diméthylaniline est ajouté dans la tourie pour induire la production de laccase. Cette molécule étant toxique pour le champignon, il réagit en produisant plus de laccase comme moyen de défense afin de dégrader le poison. Au bout de cinq jours, l'activité de la laccase atteint un plateau à 2.2 U/mL (voir la définition de l'unité U dans la section suivante) ce qui signale la fin de la production de l'enzyme.

La biomasse (champignon et autres solides) est filtrée sur un coton à fromage et le liquide recueilli est concentré par ultrafiltration sur une membrane Pellicon. Ce système permet de concentrer un grand volume de solution d'enzyme en éliminant les composés de faible masse molaire qui passent à travers la membrane. La solution de laccase est ensuite concentrée à nouveau en utilisant un système Amicon équipé d'une membrane YM10 qui retient les molécules ayant une masse molaire supérieure à 10 000 g/mole. Après cette étape l'activité de la solution concentrée de laccase était de 36 U/mL.

Par la suite, la laccase a été purifiée en passant la solution sur une colonne échangeuse d'anions DEAE-Bio-Gel de la compagnie Bio-Rad Laboratories. L'élution, réalisée par un gradient linéaire de concentration d'une solution tampon de phosphate à pH 7.0 de 20 à 200 mM, permet de séparer les deux isozymes laccase I et laccase II. La laccase II (la seconde a être éluée en utilisant ces conditions) est collectée à la sortie de la colonne, concentrée à nouveau sur Amicon YM10, diluée avec de l'eau distillée et concentrée à nouveau pour retirer le phosphate de la solution d'enzyme. Cette solution finale (activité d'environ 1 100 U/mL) est divisée en 16 fractions de 1 mL qui sont congelées dans un bain éthanol-glace sèche puis entreposées au congélateur à -80 °C.

2.3. Caractérisation de la laccase

La caractérisation dont il sera ici question concerne seulement la concentration de l'enzyme et son activité, la structure, les caractéristiques et les séquences d'acides aminés des laccases de *Trametes versicolor* ayant déjà fait l'objet d'études approfondies (voir [49] et les références qui y sont citées).

2.3.1. Concentration

La concentration de laccase est mesurée par l'absorption à 620 nm par l'atome de cuivre du type T1 (Figure 8). La concentration molaire de la solution d'enzyme est calculée selon la loi de Beer-Lambert ($\epsilon_{620} = 4\,900 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [35]). Puisque la mesure n'est basée que sur l'absorbance du Cu_{T1} , la concentration ainsi mesurée n'est pas nécessairement représentative du nombre de molécules de laccase qui sont actives. Il est possible, à titre d'exemple, qu'une molécule de laccase soit inactive mais que l'atome de cuivre T1 de son site actif présente toujours sa bande d'absorption à 620 nm, contribuant faussement à la concentration de la solution. Une mesure plus représentative serait celle de la concentration active de la solution, c'est-à-dire la concentration de laccase contribuant à l'oxydation d'un substrat.

2.3.2. Activité

L'activité de la laccase est déterminée par l'oxydation du médiateur ABTS. Le spectre UV-Visible de la forme oxydée de l'ABTS, le cation radical ($\text{ABTS}^{+\bullet}$)¹, possède un maximum d'absorption à 420 nm ce qui permet une mesure

¹ La notion de cation radical pour l'ABTS ne représente pas nécessairement sa vraie structure en solution, bien qu'elle soit très répandue dans la littérature. En effet, dans une solution de pH supérieur à 3, l'ABTS sera déprotoné tel qu'il est démontré au Tableau III et sa notation correcte serait ABTS^{2-} [71]. La forme oxydée radicalaire véritable dans une telle solution est donc $\text{ABTS}^{\bullet-}$ ou anion radical.

spectrophotométrique de la concentration d'ABTS oxydé [71]. Les solutions utilisées pour la mesure de l'activité sont composées de 0.5 mM d'ABTS (Boehringer Mannheim GmbH, Allemagne) en tampon acétate 0.1 M de pH 4.5 dans une cuvette en polystyrène de trajet optique 1 cm (Bio-Rad Laboratories). La solution d'enzyme à mesurer est diluée au besoin pour obtenir une lecture d'absorbance dans un temps convenable et un volume de 10 μL de cette solution est ajouté à la cuvette. L'augmentation de l'absorbance à 420 nm ($\epsilon_{420} = 3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) [49] de la solution est mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible Cary 100 de la compagnie Varian puis est portée en graphique en fonction du temps (logiciel Cary Win UV version 01.00(6)). La pente de ce graphique donne le taux d'oxydation de l'ABTS en ABTS^{+} et l'activité de la laccase est définie en unités par millilitre (U/mL) où 1 unité (U) équivaut à 1 micromole d'ABTS oxydé par minute.

Les solutions décongelées de laccase sont entreposées au réfrigérateur (4°C). Dans ces conditions, l'enzyme demeure stable pour près de deux mois tel que démontré à la Figure 11a, ce qui a également été observé antérieurement [47]. Le graphique de la Figure 11b démontre bien que l'absorbance ne varie pas dans le même sens que l'activité, illustrant le fait qu'il ne s'agit pas d'une mesure de la concentration active.

2.4. Préparation des solutions tampons

Les différentes solutions tampons ont été préparées en mélangeant une solution d'un acide (ou base) faible avec une solution de concentration identique de sa base (ou de son acide) conjugué(e) jusqu'à obtention du pH désiré. Le couple acide/base a été choisi en fonction du pH désiré de la solution tampon de façon à ne pas dépasser les limites de la zone tampon qui sont à +1 et à -1 unités de pH du pK_a de l'acide faible (théorie d'Henderson-Hasselbach [11]). Les solutions ont été préparées régulièrement et toujours utilisées dans les sept jours suivant leur préparation.

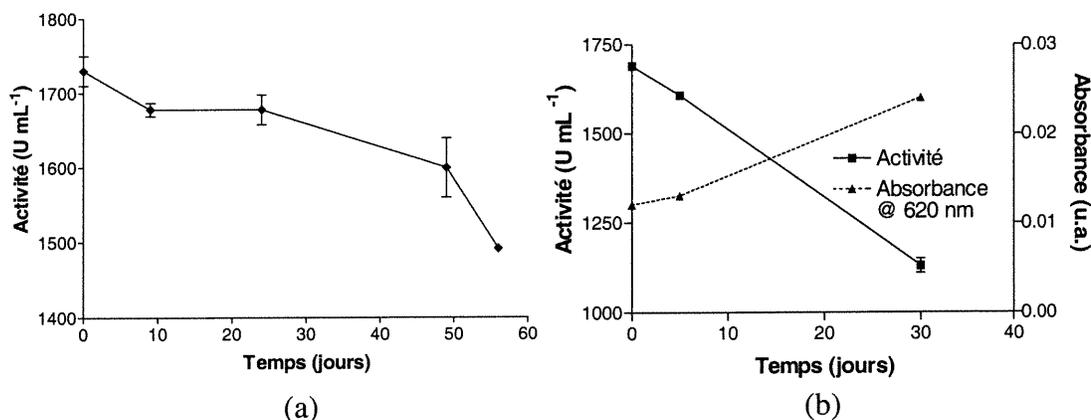


Figure 11. Suivi de l'activité sur deux mois (a) et comparaison de l'activité avec la concentration (b) d'une solution de laccase II de *T.versicolor* en fonction du temps d'entreposage. Les barres d'erreur représentent l'écart type de 3 mesures.

2.5. Composés modèles de la lignine

Les composés modèles sont des molécules dont la structure s'apparente à certains groupements fonctionnels de la lignine. Ces composés sont soit sous forme de dimère ou de monomère selon que leur structure possède un ou deux phényles (unité monomérique de la lignine) dans leur structure. Les dimères les plus utilisés lors de ce projet de recherche sont le dimère I (**DI**), le dimère IV (**DIV**) et le dimère VIII (**DVIII**). Le dimère I [1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(2-méthoxyphénoxy)-propane-1,3-diol] et le dimère IV [1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-phényléthanol] ont été préparés par N.G. Lewis (Institute of Biological Chemistry, Washington State University). Le dimère VIII, [1-(3,4-diméthoxyphényl)-2-(2-méthoxyphénoxy)-3-hydroxy-1-propanone] a été fourni par T. Fukuzumi (Tokyo University of Agriculture). Le monomère alcool vératrylique (**VA**) a été obtenu chez Aldrich. Les structures des composés modèles sont présentées à la Figure 25 au chapitre 3.2.

2.6. Analyse chromatographique des composés modèles

Les solutions des composés modèles de la lignine ainsi que celles de leurs produits d'oxydation ont été analysées en utilisant un système de chromatographie liquide à haute performance de Waters modèle 600E. Les échantillons ont d'abord été acidifiés à pH 2.5 avec de l'acide chlorhydrique puis filtrés à l'aide d'une seringue et d'un filtre 0.45 μm pour retirer d'éventuelles impuretés et protéger la colonne, avant d'être placés dans un échantillonneur automatique (Waters 717). La séparation des produits s'est effectuée sur une colonne de phase stationnaire C_{18} modèle μ -Bondapak 3.9 x 300 mm également de chez Waters. La phase mobile est composée de méthanol (de grade spectrophotométrique) et d'une solution d'acide *o*-phosphorique à 0.1 % dans l'eau distillée. La solution aqueuse est également passée à travers un filtre Millipore de 0.45 μm avant d'être mise sous pression réduite pour en retirer l'air dissous. L'élution est effectuée par une programmation de gradient en mode linéaire qui varie de 95:5 à 40:60 (% solution aqueuse de H_3PO_4 : % méthanol) en 15 minutes. La détection des produits est réalisée par un détecteur à réseau de photodiodes (Waters 996) qui permet d'enregistrer un spectre (220 à 500 nm, la fenêtre des longueurs d'onde où s'effectue le maximum d'absorption par les composés étudiés) de la solution passant au détecteur. Le chromatogramme utilisé pour la détermination de l'aire et du temps de rétention des pics est celui obtenu à 280 nm, car l'absorbance des composés modèles, qui comportent tous au moins une unité structurale aromatique, est très forte à cette longueur d'onde.

Le système chromatographique est interfacé à un ordinateur, ce qui a permis de contrôler l'instrument, d'effectuer l'acquisition des données et d'analyser les chromatogrammes à l'aide du logiciel Millennium³² de Waters, version 3.00.

2.7. Traitement de la pâte

2.7.1. Échantillons de pâte

Différents types de pâte provenant sans exception d'une cuisson kraft ont été utilisés au cours de ce projet. Toutes les pâtes soumises aux traitements enzymatiques ont un indice de Kappa initial se situant en 15 et 20, indices que l'on retrouve normalement chez une pâte kraft de feuillus ou de résineux délignifié à l'oxygène, au début des séquences de blanchiment. Les notations suivantes seront utilisées pour indiquer la nature des échantillons: **SWKP** (pâte kraft de conifère) et **HWKP** (pâte kraft de bois feuillu). Un indice O₂ ajouté à la notation (ex. **SWKP-O₂**) signifie que la pâte a subi un traitement de délignification à l'oxygène avant le blanchiment, comme c'est le cas dans plusieurs usines.

2.7.2. Procédure

Les traitements enzymatiques de délignification de la pâte ont été réalisés en utilisant 10 U de laccase par gramme de pâte anhydre et une quantité variable de médiateur se situant entre 0.1 et 1 % (masse de médiateur / masse de pâte anhydre). Le médiateur et la laccase sont d'abord solubilisés dans une solution tampon puis cette solution est incorporée à la pâte à l'aide d'un mélangeur Hobart. Le volume de la solution tampon est ajusté de façon à ce que la pâte ait une consistance finale de 10 % ce qui représente les conditions utilisées en usine. La consistance de la pâte est le pourcentage de la pâte anhydre dans l'échantillon. Par exemple un échantillon de pâte ayant une consistance de 30 % contient 3 grammes de pâte pour chaque 10 grammes d'échantillon. Pour effectuer le traitement à 10 % de consistance, il faudra prendre 30 grammes de cet échantillon et y ajouter 70 mL de solution afin d'obtenir un échantillon ayant une masse finale de 100 grammes contenant 10 grammes de pâte.

Le mélange réactionnel est ensuite placé dans une cellule étanche dans laquelle est appliquée une pression de 140 kPa d'oxygène afin de favoriser la réaction d'oxydation de l'enzyme. La cellule est elle-même placée dans un bain thermostatique réglé à 60°C pour une durée de deux heures, encore une fois afin de représenter les conditions utilisées lors du blanchiment en usine.

La pâte est ensuite lavée avec 1 litre d'eau déionisée à 75 °C, filtrée sur un Buchner (filtre Whatman #4, 150 mm) puis lavée à nouveau avec 1 litre d'eau à la température ambiante.

2.7.3. Extraction

L'extraction est un traitement alcalin à haute température pour solubiliser et retirer les fragments de la lignine dépolymérisée lors du traitement de la pâte. L'échantillon, qui contient toujours 10 grammes de pâte anhydre, est pesé pour en connaître la consistance. La solution d'extraction peut contenir soit seulement du NaOH (2 % sur masse de pâte anhydre) s'il s'agit d'une extraction alcaline normale (symbolisée par E, voir section 1.2.4.6.) ou bien du NaOH avec 0.5 % de peroxyde d'hydrogène si c'est une extraction alcaline renforcée au peroxyde (symbolisée par Ep). La pâte est mélangée à la quantité de solution nécessaire pour obtenir une consistance de 10 % et est placée dans une cellule non-pressurisée à 75 °C pour 90 minutes. Le lavage de la pâte est réalisé tel qu'expliqué plus haut.

2.7.4. Les formettes

L'échantillon de pâte doit être formé de façon standard avant de pouvoir effectuer les analyses de l'indice de Kappa, de viscosité et de blancheur (voir section 1.2.3). Pour ce faire, la pâte est mise en suspension dans l'eau puis réduite en fibres par un désintégrateur. L'eau est ensuite drainée, formant une feuille de pâte d'une épaisseur uniforme nommée formette.

Les échantillons de pâte ont tous été traités en suivant ces étapes afin de s'assurer de la reproductibilité des mesures et de pouvoir évaluer de façon précise la performance des divers traitements qui sont présentés dans le chapitre suivant.

2.8. Voltampérométrie à onde cyclique (VOC)

La voltampérométrie à onde cyclique est, comme la polarographie, une technique basée sur l'étude des transferts d'électrons entre une espèce électroactive en solution, c'est-à-dire qui peut s'oxyder et/ou se réduire, et une électrode. Cet échange hétérogène d'électron(s) peut être utilisé pour caractériser la solution d'analyte au niveau de sa concentration, mais la VOC est particulièrement puissante pour l'étude des paramètres thermodynamiques et cinétiques des échanges d'électrons. Ceci a permis à cette méthode de connaître un essor important depuis le milieu des années 60, essor accentué par le développement de plusieurs techniques visant l'étude de la cinétique d'échange d'électrons autant homogène (en solution) qu'hétérogène (à la surface de l'électrode) [72-75]. La stabilité, la réversibilité et le potentiel normal apparent d'analytes (électroactifs) peuvent être mesurés, évalués ou calculés facilement à partir des voltampérogrammes obtenus lors de ces expériences. Au delà de ces possibilités, la VOC, contrairement à la polarographie, permet également d'étudier facilement des échanges homogènes, c'est-à-dire des réactions ayant lieu dans la solution entre deux ou plusieurs espèces, qui ne sont pas nécessairement toutes électroactives. Ces réactions sont dites couplées, étant donné qu'il s'agit d'une réaction chimique en solution couplée à une réaction électrochimique à l'électrode. C'est le cas pour la laccase qui, ayant son site actif isolé par son squelette protéinique, ne peut que difficilement échanger des électrons avec une électrode [76]. Le médiateur peut, dans ce cas, effectuer le transfert d'électrons entre l'enzyme et l'électrode et les voltampérogrammes peuvent être analysés pour obtenir des informations sur les propriétés oxydantes de l'enzyme. La VOC est donc une méthode de choix pour l'étude des réactions d'oxydoréduction du

système laccase-médiateur-lignine puisque des transferts d'électrons y sont impliqués.

2.8.1. Principes de base et appareillage

La voltampérométrie à onde cyclique est une méthode électrochimique utilisant un balayage de potentiel afin de créer un courant par l'oxydation ou la réduction d'une espèce électroactive à la surface de l'électrode à laquelle le potentiel est appliqué. Le principe consiste à faire varier le niveau d'énergie de l'électrode de travail de façon graduelle d'un potentiel initial à un potentiel final. La VOC requiert, la plupart du temps, un montage à trois électrodes tel que celui présenté à la Figure 12. Les électrodes, plongées dans une cellule de 5 mL, sont reliées à un potentiostat dont le rôle est d'appliquer la rampe de potentiel (le signal transmis par l'instrument) entre l'électrode de travail (T) de carbone vitreux et l'électrode de référence (R), Ag/AgCl. Le potentiostat mesure également le courant (entre T et l'auxiliaire, A, un fil de platine) produit par l'oxydation ou la réduction des espèces en solution. Ce courant, qui est le signal capté par l'instrument, est porté en graphique en fonction du potentiel appliqué. Ce graphique, présenté à droite sur la Figure 12, est le voltampérogramme.

La vitesse de balayage du potentiel, symbolisée par v , en $V \cdot s^{-1}$, est représentée par la pente du graphique de gauche de la Figure 12. La vitesse de balayage a une grande incidence sur l'intensité des courants du voltampérogramme et parfois même sur la forme de la courbe. Le sens du balayage est inversé au potentiel de retour (E_{retour}) ce qui permet d'évaluer la réversibilité du système, c'est-à-dire si les molécules oxydées peuvent être réduites par la suite.

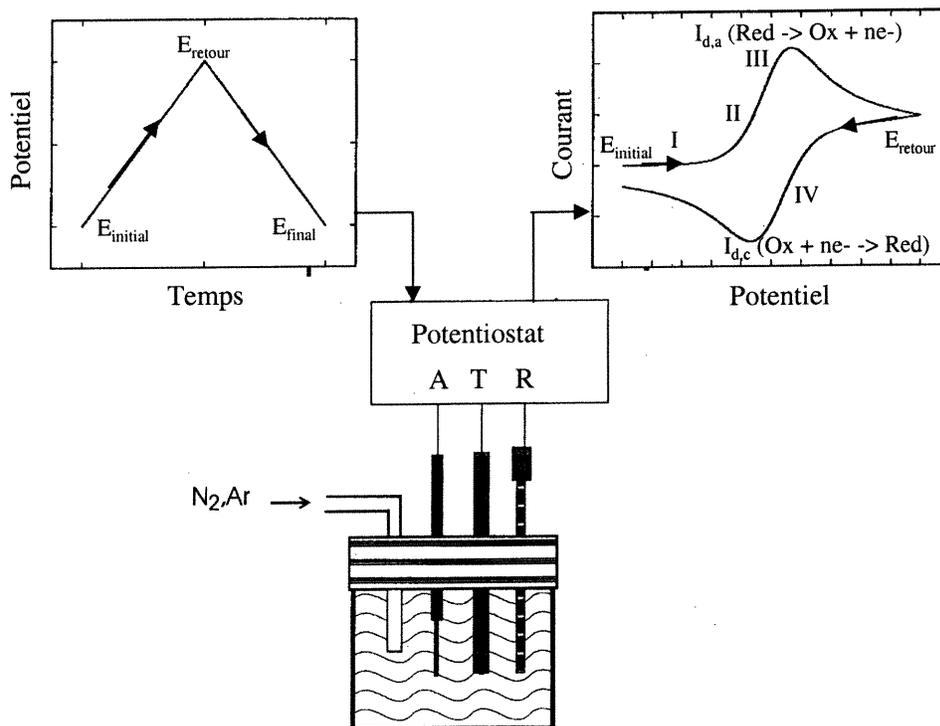


Figure 12. Montage utilisé pour les expériences de voltampérométrie à onde cyclique. Les graphiques représentent une rampe cyclique de la variation du potentiel appliqué entre les électrodes de travail T et de référence R (gauche) et un exemple de voltampérogramme (droite). Adaptation de [77].

Au début du voltampérogramme (section I, Figure 12), le potentiel est trop faible, trop peu positif pour que les électrons de l'espèce électroactive soient capables de se transférer à l'électrode (dans le cas d'une oxydation) et le courant mesuré n'est ainsi dû qu'au signal de fond. Un courant commence à circuler entre l'électrode de travail et l'auxiliaire (section II) lorsque le potentiel est suffisamment élevé pour qu'il y ait oxydation. Ce transfert d'électron(s) de l'espèce vers l'électrode est alors mesuré en ampères par le potentiostat. Plus le potentiel augmente, plus le courant d'oxydation augmente puisqu'il y a de plus en plus de molécules d'analyte qui peuvent transférer leur(s) électron(s) à l'électrode. Contrairement à l'électrolyse de masse décrite à la section 3.2.1.2. où le but est d'oxyder quantitativement tout le médiateur se trouvant dans la cellule, les phénomènes d'oxydation et de réduction en

voltampérométrie à onde cyclique ne prennent place que tout près de la surface de l'électrode de travail, impliquant une faible quantité d'analyte. Ainsi, après un certain temps, il n'y aura pratiquement que des espèces oxydées à cette surface, le restant de la solution contenant toujours l'espèce réduite. Une telle répartition de deux espèces (réduite et oxydée) est fortement défavorisée et puisqu'un système stable doit être le plus désordonné possible, ce système aura tendance à répartir uniformément les différentes espèces le composant. Pour diminuer l'énergie entropique accumulée par ce gradient de concentrations, il y aura donc diffusion des molécules réduites de la solution vers la surface de l'électrode. Le potentiel appliqué à celle-ci étant suffisamment élevé, ces molécules seront aussitôt oxydées, dès leur arrivée près de l'électrode, créant un courant d'oxydation qui dépend de la vitesse à laquelle les molécules diffusent. La hauteur du pic d'oxydation (section III) est donc fonction de la diffusion de l'espèce, d'où le nom de courant de diffusion (courant contrôlé par la diffusion). L'intensité de ce courant dépend également d'autres paramètres qui sont décrits par l'équation de Randles-Sevcik dont la formule suivante est applicable aux systèmes réversibles à 25°C lorsque le courant i_d est mesuré à sa valeur maximale [78].

$$i_d = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A_s D^{1/2} C v^{1/2} \quad (2)$$

Cette équation démontre que le courant de diffusion (en ampères) est une fonction du nombre d'électrons échangés lors de l'oxydation ou de la réduction (n), de l'aire de la surface de l'électrode de travail (A_s , cm^2), du coefficient de diffusion (D , en cm^2s^{-1}), de la concentration C de l'analyte en $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-3}$ et de v , la vitesse de balayage (Vs^{-1}). Pour que l'équation 2 soit valable, le courant doit impérativement être uniquement contrôlé par la diffusion. Afin d'éviter que d'autres modes de transfert de masse comme la migration (transfert par attractions électrostatiques) et la convection (transfert par agitation) influencent le courant, un électrolyte de support est ajouté et la solution demeure au repos durant l'enregistrement des voltampérogrammes.

Finalement, lorsque le potentiel atteint sa valeur de retour, le sens du balayage est inversé pour retourner au potentiel initial. Si l'échange d'électrons avec l'analyte est réversible, une courbe similaire à celle de l'oxydation (premier segment) mais résultant de la réduction de l'espèce sera enregistrée (second segment). Pour un système parfaitement réversible, les hauteurs des deux pics seront équivalentes puisqu'il y aura autant de molécules qui seront réduites après avoir été oxydées. Le courant de diffusion résultant de l'oxydation est le courant anodique ($i_{d,a}$) et correspond au pic se trouvant aux valeurs les plus positives sur l'échelle de potentiel. Le courant cathodique ($i_{d,c}$) résulte de la réduction et le pic cathodique est toujours celui au potentiel le plus négatif (comparé avec l'anodique) sur les voltampérogrammes. L'assignation d'une polarité aux courants cathodique et anodique est purement arbitraire et la convention utilisée pour ce texte est d'associer un signe négatif avec le courant anodique (oxydation) et positif avec le courant cathodique (réduction).

Les potentiels auxquels se retrouvent le pic d'oxydation ($E_{p,a}$) et de réduction ($E_{p,c}$) sont, respectivement, plus élevé et plus bas que le potentiel normal apparent du couple rédox, ce qui est relié au phénomène de diffusion décrit plus haut. Le E^0 du couple rédox est situé exactement entre les potentiels des deux pics (équation 3) qui, eux, sont séparés par $\Delta E_p = 0.058/n$ volts, dans le cas d'une espèce électrochimiquement réversible où n électrons sont échangés [78].

$$E^0 = \frac{E_{p,c} + E_{p,a}}{2} \quad (3)$$

3. Résultats et discussion

Ce chapitre décrit les expériences réalisées au cours de ce projet et propose des conclusions à partir des résultats obtenus. Afin de bien mettre en évidence chaque grande ligne directrice ayant gouverné ce projet et de regrouper les expériences similaires, ce chapitre est divisé en quatre sections.

3.1. Propriétés et efficacité des nouveaux médiateurs

Certains composés inorganiques sont utilisés depuis longtemps pour l'étude des réactions enzymatiques. Les complexes de coordination sont généralement de bon échangeurs d'électrons et sont stables à plusieurs états d'oxydation. Ces propriétés en font des substrats particulièrement intéressants pour les oxydases comme la laccase. Ces composés pourraient ainsi s'avérer de bons médiateurs pour le système de blanchiment enzymatique.

La première étape de ce projet a été de parcourir la littérature et quelques banques de données afin de trouver des complexes de coordination ayant les caractéristiques nécessaires pour faire un bon médiateur. Puisque les premiers critères de sélection des complexes étaient basés sur le potentiel normal apparent et la réversibilité d'échange d'électrons, la principale banque de données à avoir été utilisée est un recueil de propriétés électrochimiques de composés inorganiques [79]. Bien que ces volumes ne couvrent qu'une petite partie des complexes métal-ligand connus, ils ont néanmoins permis d'évaluer les caractéristiques électrochimiques des métaux de transition, ce qui est un bon point de départ pour développer de nouveaux médiateurs. Ainsi, les trois éléments de la famille 8 du tableau périodique, le fer, le ruthénium et l'osmium sont ceux dont les complexes, notamment avec les ligands bipyridines et cyanures, ont les propriétés les plus intéressantes, principalement au niveau du potentiel d'oxydoréduction. La plupart des autres métaux forment des composés ayant des potentiels trop bas pour être capable d'oxyder la lignine. Ils ne

sont toutefois pas à éliminer pour autant car il faut tenir compte du fait qu'il n'y a pas que la nature de l'atome central du complexe qui détermine son potentiel; les ligands ont également une grande influence à ce niveau.

De façon générale, plus un ligand est un bon donneur d'électron (ou une base forte de Lewis), plus le potentiel du complexe sera élevé [80]. Ainsi, les ligands les plus fréquemment rencontrés dans la structure des complexes utilisés pour cette étude sont les bipyridines, les 1,10-phénantrolines et le cyanure (une liste des médiateurs est présentée au Tableau IV). Ce phénomène, qui sera expliqué en détail dans la prochaine section, est un avantage marqué de l'utilisation de complexes de coordination par rapport aux médiateurs organiques présentés au Tableau III. Bien qu'il soit difficile de modifier la structure des molécules organiques afin d'obtenir le potentiel désiré, il suffit de varier les substituants ou la nature d'un ou de plusieurs ligands sur un complexe de coordination pour en modifier le potentiel. Puisqu'un des paramètres majeurs régissant l'oxydation enzymatique d'un médiateur et de la pâte est le potentiel rédox, cette caractéristique justifie à elle seule la recherche sur cette nouvelle classe de médiateurs.

Finalement, un nouveau médiateur a été découvert en cherchant la littérature pour y trouver des utilisations de complexes métalliques avec la laccase. Ce médiateur, l'octacyanomolybdate(IV) de potassium ($K_4Mo(CN)_8$) a été utilisé par Fee et Malmström en 1968 pour déterminer le potentiel rédox du cuivre de type T1 des laccases [81]. Bien que l'étude de cet article a permis d'établir que le médiateur est un bon substrat de l'enzyme, il ne contient aucune donnée permettant d'évaluer ses performances en tant qu'agent oxydant de la lignine. Les résultats des traitements de pâte, qui seront présentés à la section suivante, ont très rapidement démontré que ce médiateur est particulièrement efficace pour oxyder la lignine. Ses performances sont similaires à celles de certains médiateurs organiques connus mais les avantages qui découlent de l'utilisation du $K_4Mo(CN)_8$ sont marqués, notamment en terme de possibilité de recyclage du médiateur. L'application potentielle de ce complexe comme médiateur a même permis de déposer un brevet pour l'utilisation des

composés de coordination pour l'oxydation enzymatique non seulement de la pâte mais également de certains colorants textiles [82].

Avant de discuter des résultats obtenus en utilisant cette nouvelle classe de médiateurs pour délignifier la pâte kraft, il convient de décrire plus en profondeur les caractéristiques et la chimie de cette famille de composés.

Tableau IV. Liste des complexes de transition utilisés comme médiateurs. Tous les complexes sont présentés sous leur forme réduite (M^{n+}) et le potentiel donné dans la troisième colonne correspond au processus rédox $M^{n+} \rightleftharpoons M^{(n+1)+}$.

Nom Abréviation	Formule	Potentiel normal apparent (V vs Ag/AgCl)
Octacyanomolybdate(IV) de potassium MoCN	$K_4Mo(CN)_8 \cdot 2H_2O$	0.55
Octacyanotungstate(IV) de potassium WCN	$K_4W(CN)_8 \cdot 2H_2O$	0.29
Ferrocyanure FeCN	$K_4Fe(CN)_6$	0.20
<i>tris</i> -(1,10-phénanthroline) de fer(II) FePHEN	$[Fe(II)(1,10-phénanthroline)_3](ClO_4)_2$	0.90
<i>tris</i> -(2,2'-bipyridine) de fer(II) FeBPY	$[Fe(II)(2,2'-bipyridine)_3](ClO_4)_2$	0.86
<i>tris</i> -(4,4'-diméthyl-2,2'- bipyridine) de fer(II) FeDMBPY	$[Fe(II)(4,4'-diméthyl-2,2'-bipyridine)_3](ClO_4)_2$	0.69
hexacyanoruthénate(II) de potassium RuCN	$K_4Ru(CN)_6$	0.68
<i>bis</i> -(2,2'-bipyridine)- dichloroosmate(II) OsBPY	$[Os(II)(2,2'-bipyridine)_2Cl_2]$	-0.02
Ferrocyphe FeCPHN	$[Fe(II)(CN)_2(1,10-phénanthroline)_2]$	0.59

3.1.1. Les complexes de coordination

Cette désignation représente une très vaste catégorie de composés chimiques formés d'un atome métallique, généralement un cation (comme Mo^{4+} , Fe^{2+} et Ru^{2+}) entouré de molécules organiques, les ligands (comme CN^- et 2,2'-bipyridine)

3.1.1.1. Ligands et structure

En formant les complexes de coordination, les ligands vont donner une ou plusieurs paires d'électrons afin de créer le ou les liens les unissant au métal. Les ligands sont des bases de Lewis généralement neutres ou anioniques que l'on peut regrouper selon le nombre de paires d'électrons disponibles pour former des liens. Tel que démontré à la Figure 13, les ligands des médiateurs utilisés dans cette étude sont soit monodentates (un lien formé par ligand) ou bidentates (deux liens formés par ligand). Le cyanure représente la première classe alors que la bipyridine et l'*o*-phénantroline se trouvent dans la seconde.

Le nombre de ligands et de liens qu'un métal peut recevoir et former dépend de sa configuration électronique. De façon générale, les orbitales moléculaires (voir les détails plus loin) d'un tel complexe doivent contenir 18 électrons pour une plus grande stabilité. Le nombre d'électrons provenant de l'orbitale *d* du métal est déterminé par son état d'oxydation et la quantité d'électrons nécessaire à l'obtention du nombre 18 dépend des ligands. Ainsi, un complexe de molybdate(IV) (2 électrons dans l'orbitale *d*) et de cyanure (2 électrons par molécule) aura huit ligands cyanure autour du métal. Le nombre de liens créés autour de l'atome central, qui est représenté par le nombre de coordination, détermine la structure géométrique du complexe. Avec ses huit liaisons, l'octacyanomolybdate(IV) forme un dodécaèdre alors que le complexe tris-2,2'-bipyridine fer(II) forme plutôt un octaèdre puisque chacun de ses trois ligands contribue pour deux liaisons (total de six liens). Les

médiateurs qui seront présentés tout au long de cette thèse possèdent l'une ou l'autre de ces deux géométries.

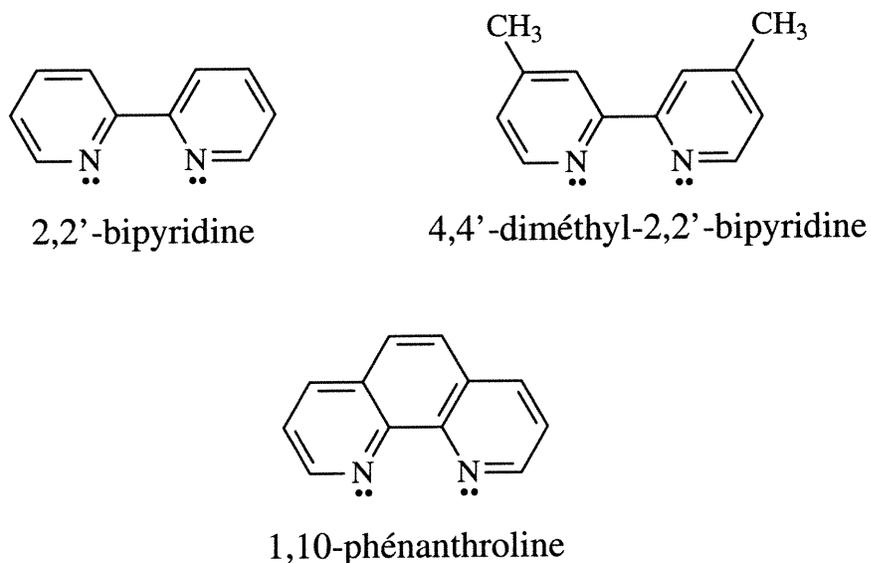


Figure 13. Structure des ligands utilisés pour former les complexes de coordination servant de médiateurs. Les paires d'électrons montrées sur les structures représentent le ou les point(s) d'attache du ligand au métal.

3.1.1.2. Potentiel d'oxydoréduction

La formation de complexes de coordination implique la combinaison d'orbitale d du métal et d'orbitale σ du ligand pour former de nouvelles orbitales, les orbitales moléculaire (OM). Les détails de la formation de ces OM sont décrits entre autre par la théorie du champ des ligands dont l'explication dépasse le cadre de ce texte [83]. Il est toutefois important de savoir que les niveaux d'énergie des orbitales moléculaire vont dépendre du champ créé par les ligands autour du métal. L'étude des OM des complexes de coordination est donc intéressante pour ce point car ce sont les niveaux d'énergie de ces orbitales qui déterminent le potentiel d'oxydoréduction du complexe. Le niveau d'énergie des orbitales moléculaires est donc influencé par le niveau d'énergie de l'orbitale d du métal et par la basicité de

Lewis du ligand, c'est-à-dire sa capacité à donner des électrons. Plus le ligand possède un fort caractère d'électrodonation, plus le potentiel rédox sera élevé.

Le potentiel rédox d'un complexe peut donc être ajusté en utilisant certains ligands plus ou moins électrodonneurs. Les travaux de Lever concernant l'effet des ligands sur le potentiel des complexes de coordination ont même permis d'effectuer une factorisation de cet effet [84]. Selon cette factorisation, les ligands ont un paramètre électrochimique, $E_L(L)$, qui leur est attribué et qui est fonction de leur caractère de base de Lewis. Le potentiel d'un complexe peut être calculé selon l'équation 4:

$$E_{1/2}[M^{n+1} / M^{n+}] = S_M \times \sum E_L(L) + I_M \quad (4)$$

où les paramètres S_M et I_M , dont les valeurs sont disponibles dans la littérature, sont reliés aux états de spin du couple rédox M^{n+1} / M^{n+} [80, 85]. La factorisation du potentiel rédox peut s'avérer très utile lorsque l'on désire obtenir un composé dont le potentiel doit se situer dans une plage étroite et bien définie, comme c'est le cas pour un médiateur efficace de la laccase pour délignifier la pâte (voir section 1.3.4. en introduction).

Il faut toutefois réaliser que l'oxydation et la réduction des complexes de coordination ne dépendent pas que des paramètres thermodynamiques du système et que la cinétique d'échange d'électrons doit également être abordée pour avoir un portrait plus complet des mécanismes gouvernant la délignification enzymatique de la pâte.

3.1.1.3. Transfert d'électrons

Lors d'une réaction d'oxydoréduction, un ou plusieurs électrons sont transférés d'une espèce à une autre par le biais de leurs orbitales moléculaires. Tel que démontré à la Figure 14, le transfert s'effectue à partir de l'HOMO de l'espèce réductrice (celle qui sera oxydée) vers l'orbitale LUMO de l'espèce oxydante (celle

qui sera réduite). La plupart des transferts d'électrons des composés de coordination se font au niveau de l'atome de métal situé au centre du complexe car c'est sur le métal et non sur les ligands que se retrouvent les HOMO et LUMO du complexe [80]. Le couple rédox des médiateurs est représenté d'une façon générale par l'équation suivante :



où M et L représentent respectivement le métal et les ligands (au nombre de x) du complexe. L'oxydation d'un complexe implique la plus haute orbitale moléculaire en énergie à être occupée, l'HOMO (Highest Occupied Molecular Orbital), de laquelle un électron est retiré alors que la réduction consiste à ajouter un électron sur l'orbitale inoccupée LUMO (Lowest Unoccupied Molecular Orbital) [80].

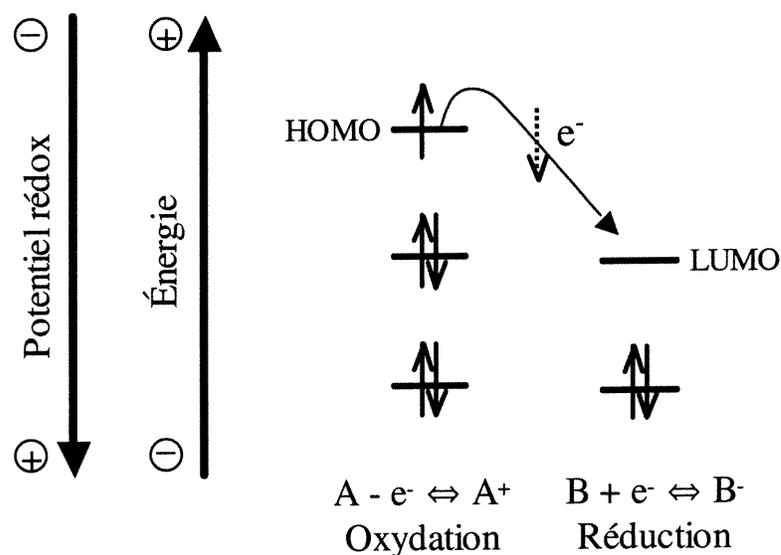
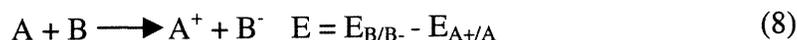


Figure 14. Schéma représentant le transfert d'un électron de l'orbitale HOMO (oxydation) de l'espèce réductrice vers l'orbitale LUMO (réduction) de l'espèce oxydante [86]. Il est à noter que la valeur du potentiel rédox varie dans le sens opposé à l'échelle d'énergie.

La Figure 15 vient expliquer pourquoi la réaction d'oxydoréduction de deux composés est favorisée lorsque la différence de potentiel est élevée entre les deux espèces, tel qu'il l'a été suggéré en introduction. Supposons les réactions suivantes:



L'équation (8) est la somme des réactions de l'oxydation de A en A⁺ et de la réduction de B en B⁻. Le potentiel rédox pour la réaction globale (E) est la différence entre les deux potentiels (6) et (7). Plus cette différence est élevée et positive, plus l'énergie libre de Gibbs sera négative (voir l'équation sur la Figure 15) ce qui favorise la réaction d'oxydoréduction.

Le diagramme d'énergie de la Figure 15 contient également une représentation de l'état de transition d'une réaction et de son impact sur cette réaction. Plus la réaction nécessite de l'énergie (ΔG^\ddagger) pour former le complexe activé, plus elle sera défavorisée cinétiquement.

Il y a deux modes de transfert d'électrons entre des complexes de coordination, "outer-sphere" (OS) et "inner-sphere" (IS). Le premier de ces mécanismes est le plus commun et celui qui requiert le moins d'énergie pour atteindre l'état de transition. Lors du transfert OS, les sphères de coordination des deux complexes s'approchent jusqu'à ce que l'électron puisse "sauter" directement de l'HOMO du réducteur vers la LUMO de l'oxydant. Ce transfert est donc relativement rapide puisqu'il ne nécessite aucun réarrangement des orbitales moléculaires. L'échange d'électrons impliquant la modification de la structure des complexes est le mécanisme IS, lors duquel un ligand va former un pont entre les deux atomes afin que l'électron puisse être transféré. La formation d'un tel état de transition nécessite beaucoup d'énergie ce qui fait que la réaction est plus lente [87].

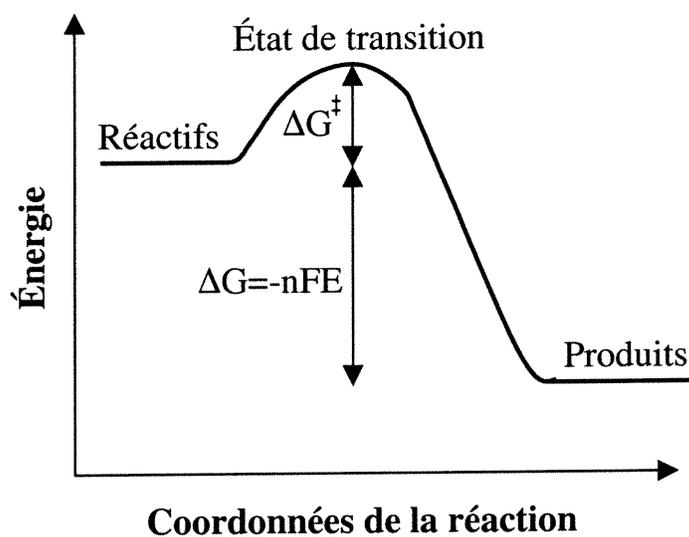


Figure 15. Diagramme d'énergie d'une réaction d'oxydoréduction.

3.1.2. Délignification enzymatique de la pâte

Pour que la délignification enzymatique soit vraiment efficace, le médiateur doit agir comme un catalyseur et pouvoir transférer de façon réversible les électrons de la lignine vers l'enzyme [88]. Le médiateur doit donc se retrouver dans son état initial après avoir complété un cycle complet, tel que présenté à la Figure 10. La délignification de la pâte en utilisant la laccase et différents médiateurs a été utilisée comme première évaluation de l'efficacité des médiateurs. L'octacyanomolybdate

s'étant révélé comme très efficace, ce complexe a fait l'objet d'une évaluation plus poussée dont les détails seront présentés plus loin. Les résultats présentés dans cette section sont sous forme de pourcentage de délignification, qui est calculé à partir des indices de Kappa avant et après le traitement de la pâte, selon l'équation suivante:

$$\% \text{ délignification} = \frac{K_{\text{initial}} - K_{\text{après traitement}}}{K_{\text{initial}}} \times 100 \quad (9)$$

Différents types de pâtes ont été utilisés lors des expériences de délignification afin de déterminer si le système laccase-médiateur pouvait être appliqué à tous les types de bois. Les détails de la provenance des échantillons sont donnés dans les titres des figures correspondantes.

3.1.2.1. Évaluation des nouveaux médiateurs

Les résultats des premiers traitements enzymatiques de la pâte en utilisant un complexe de coordination comme médiateur sont présentés à la Figure 16. Presque tous les complexes utilisés sont basés sur un atome de fer puisque la recherche préliminaire de la littérature suggère que ces composés pourraient faire de bons médiateurs. Le fer est un des éléments les plus intéressants pour une telle application grâce à sa grande disponibilité, à son faible coût et au fait qu'il est peu toxique. C'est par contre l'octacyanomolybdate qui s'est révélé comme étant le plus efficace pour délignifier la pâte. Ses performances sont en effet équivalentes à celles de l'ABTS et du HBT dans des conditions similaires.

L'étude des résultats du graphique de la Figure 16 démontre bien que les complexes du fer ne sont pas aussi efficaces que l'ABTS et le HBT malgré le fait que le potentiel normal apparent des complexes $[\text{Fe}(\text{bpy})_3](\text{ClO}_4)_2$, $[\text{Fe}(\text{dmbpy})_3](\text{ClO}_4)_2$ et $[\text{Fe}(\text{o-phen})_3](\text{ClO}_4)_2$, respectivement 0.86, 0.69 et 0.90 V vs Ag/AgCl, soit semblable au potentiel d'oxydation du HBT (0.84 V) qui, lui, donne une bonne

délicignification. Ceci suggère que le potentiel rédox du médiateur ne soit pas le seul paramètre régissant l'oxydation de la lignine et que dans le cas des complexes du fer, le faible taux d'échange des électrons soit avec l'enzyme, la pâte, ou dans les deux cas, semble limiter l'oxydation de la lignine. La cinétique d'échange d'électrons entre l'enzyme, le médiateur et la pâte sera étudiée dans une section ultérieure afin de compléter l'étude des réactions impliquées dans la délicignification.

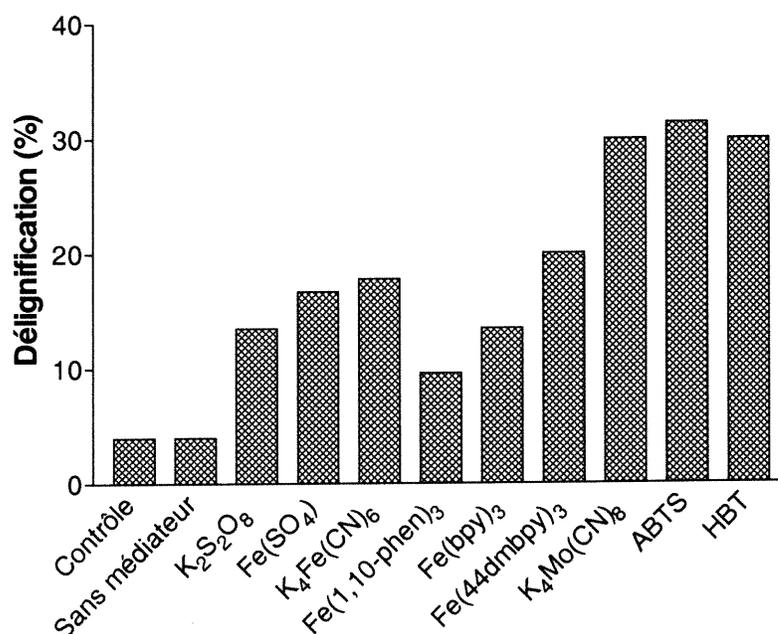


Figure 16. Délicignification enzymatique de pâte de feuillus (Kappa initial de 12.6) en utilisant différents médiateurs (1% sur masse de pâte anhydre) suivi d'une extraction alcaline (E). Le contrôle représente un traitement de la pâte sans laccase ni médiateur.

Des résultats semblables à ceux présentés à la Figure 16 ont également été obtenus en utilisant de la pâte de conifère (Figure 17). Le $K_4Mo(CN)_8$ est encore le plus efficace pour la délicignification. Lors de cette expérience, le $K_4W(CN)_8$, un médiateur de nature et de propriétés semblables au $K_4Mo(CN)_8$ a été utilisé. La délicignification en utilisant le tungstate est moins efficace qu'avec le molybdate, probablement à cause du potentiel normal apparent plus faible du $K_4W(CN)_8$ (0.29 V contre 0.55 V pour $K_4Mo(CN)_8$). Selon ce qui a été expliqué en introduction, la

laccase oxyderait facilement le $K_4W(CN)_8$ mais le potentiel du médiateur n'est pas assez élevé pour lui permettre d'oxyder la lignine efficacement. Cette hypothèse a été vérifiée par la suite en effectuant la mesure des constantes de vitesse de transfert d'électrons dont les résultats sont, une fois de plus, présentés plus loin.

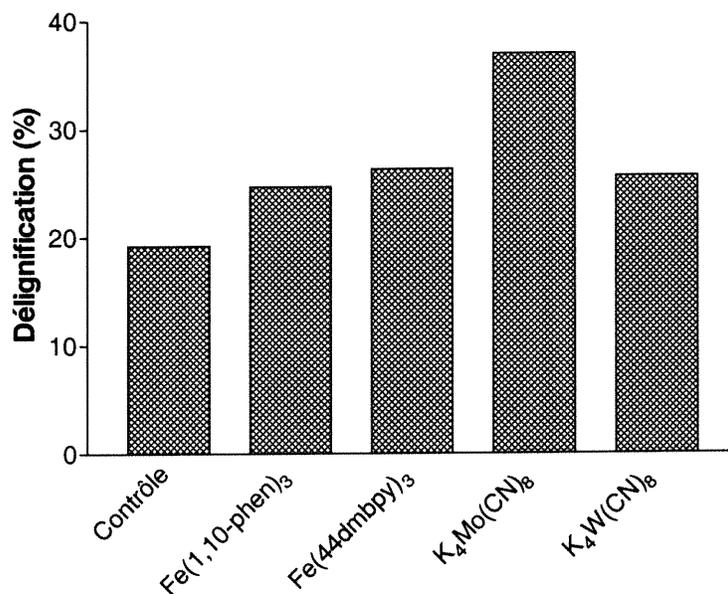


Figure 17. Délignification enzymatique de la pâte kraft de conifère ($K_{initial} = 15.6$) avec des complexes de coordination (0.25% sur pâte anhydre), extraction alcaline renforcée au peroxyde (Ep). Le contrôle représente un traitement sans médiateur. Il est à noter que l'augmentation du % de délignification du contrôle par rapport à celui de la Figure 16 est due à l'extraction renforcée au peroxyde.

3.1.2.2. Le cas de l'octacyanomolybdate

Dès les premiers essais de délignification en utilisant des complexes de coordination comme médiateurs, l'octacyanomolybdate s'est démarqué des autres. Ce composé a donc fait l'objet de nombreuses expériences visant à démontrer son efficacité et à en permettre l'application en industrie. Le médiateur a d'abord été utilisé à faible dosage sur la pâte (< 1%) afin d'évaluer son activité catalytique et d'établir la concentration minimale qui peut être utilisée pour minimiser les coûts relatifs au médiateur. Ces résultats, présentés à la Figure 18, démontrent que le

$K_4Mo(CN)_8$ demeure efficace même à faible dosage (0.1%) et que la perte de viscosité de la pâte n'est pas très importante lorsque le médiateur est utilisé à moins de 1%, prouvant que la méthode n'affecte pas la qualité des fibres.

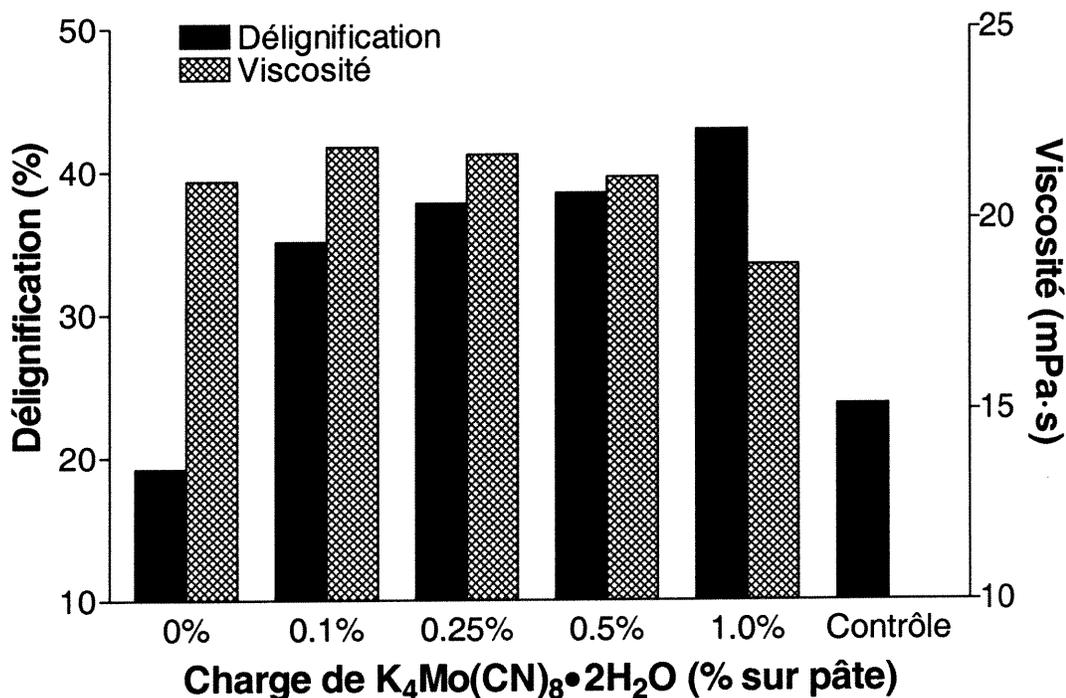


Figure 18. Effet de la quantité de $K_4Mo(CN)_8$ utilisée sur l'efficacité du système laccase-médiateur (laccase 10U/g). Le contrôle représente un essai réalisé sans laccase avec 1% de $K_4Mo(CN)_8$ alors que la valeur 0% représente le même essai avec laccase sans médiateur. Noter la faible perte de viscosité entre 0 et 0.5% de $K_4Mo(CN)_8$ démontrant la sélectivité du médiateur pour la lignine.

Toujours dans le but de promouvoir l'application du système laccase-médiateur en industrie, l'octacyanomolybdate a été utilisé avec des laccases disponibles sur le marché en grande quantité. L'oxydation de la pâte semble être plus efficace avec d'autres médiateurs, comme le NHA et l'acide violurique, qu'avec le $K_4Mo(CN)_8$ (Figure 19). Ces deux médiateurs, brevetés par Wacker-Chemie [58] offrent d'excellents résultats de délicignification. Leur réaction avec la lignine est très rapide et la majorité de la délicignification est obtenue après 30 minutes alors qu'il en

faut 120 à l'octacyanomolybdate pour en faire autant. Cette rapidité est due au fait que ces médiateurs organiques forment des radicaux lorsqu'ils sont oxydés par la laccase. Les radicaux sont des espèces instables qui sont donc très réactives. Cette forte réactivité peut cependant s'avérer comme un point faible puisque dans certains cas, les radicaux peuvent se décomposer ou dégrader l'enzyme. À l'opposé, les complexes de coordination sont beaucoup moins réactifs, signifiant qu'ils nécessitent plus de temps pour réagir avec la pâte mais aussi qu'ils sont plus stables. La grande stabilité des composés de coordination a permis d'envisager la possibilité de réutiliser le médiateur, ce qui serait très bénéfique en terme de diminution des coûts associés au médiateur et de réduction des produits chimiques rejetés dans l'environnement.

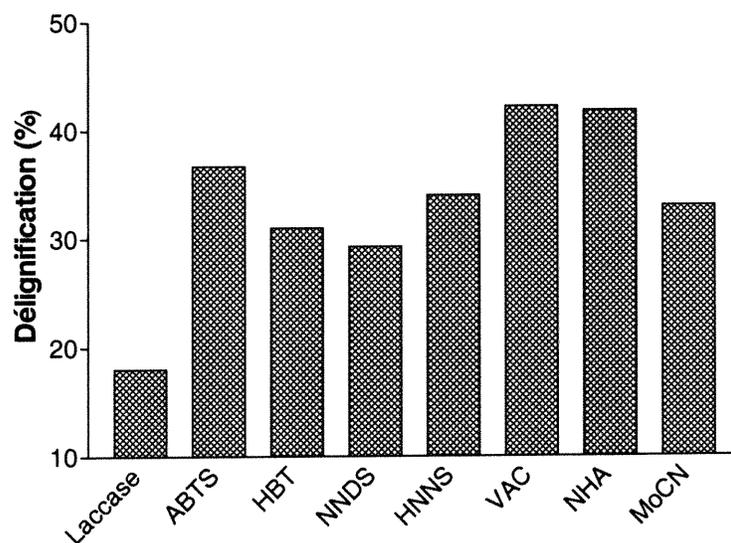


Figure 19. Délignification de la pâte kraft (SWKP-O₂ K_{initial} = 14.7) en utilisant différents médiateurs brevetés (1% sur pâte) avec une laccase disponible commercialement (*Trametes villosa*, Novo 51002, 5 U/g).

3.1.2.2.1. Recyclage

Afin de démontrer que l'octacyanomolybdate est stable sous ses deux formes, oxydée et réduite, dans les conditions utilisées pour la délignification de la pâte,

plusieurs cycles de traitement de la pâte ont été réalisés en utilisant la même solution de médiateur. Le premier cycle est effectué avec une solution fraîche de $K_4Mo(CN)_8$, à un dosage de 0.1 % sur pâte avec 10 U/g de laccase. Le traitement est effectué dans les conditions habituelles et à la fin la pâte est pressée pour recueillir le liquide qui est réutilisé sur un second échantillon de pâte pour un deuxième cycle et ainsi de suite. À chaque nouveau cycle, de l'eau et de la laccase sont ajoutées à la solution afin de compenser la perte de l'eau qui reste dans la pâte et la diminution de l'activité d'enzyme suite au traitement. Sept cycles ont été réalisés de cette façon sans pouvoir remarquer de diminution significative de la délignification (Figure 20). L'octacyanomolybdate est donc extrêmement stable dans les conditions utilisées en usine lors de la délignification, ce qui est un avantage majeur puisqu'un système de recyclage du médiateur pourrait être envisagé en vue d'une éventuelle mise en application.

3.1.2.2.2. Toxicité et récupération

Bien que le système de mise en pâte kraft permette la fermeture du circuit, c'est-à-dire la réutilisation de l'eau et des produits chimiques nécessaire à la cuisson du bois, les rejets du circuit de blanchiment doivent être éliminés à cause de la présence du chlore qui est la cause de nombreux problèmes de corrosion. Les effluents sont traités par des agents biologiques avant d'être rejetés dans les cours d'eau. La toxicité d'un médiateur voué à l'application en usine est donc critique et doit être évaluée pour s'assurer que les rejets ne sont pas nocifs ni pour l'environnement ni pour la faune microbienne responsable de la détoxification des effluents.

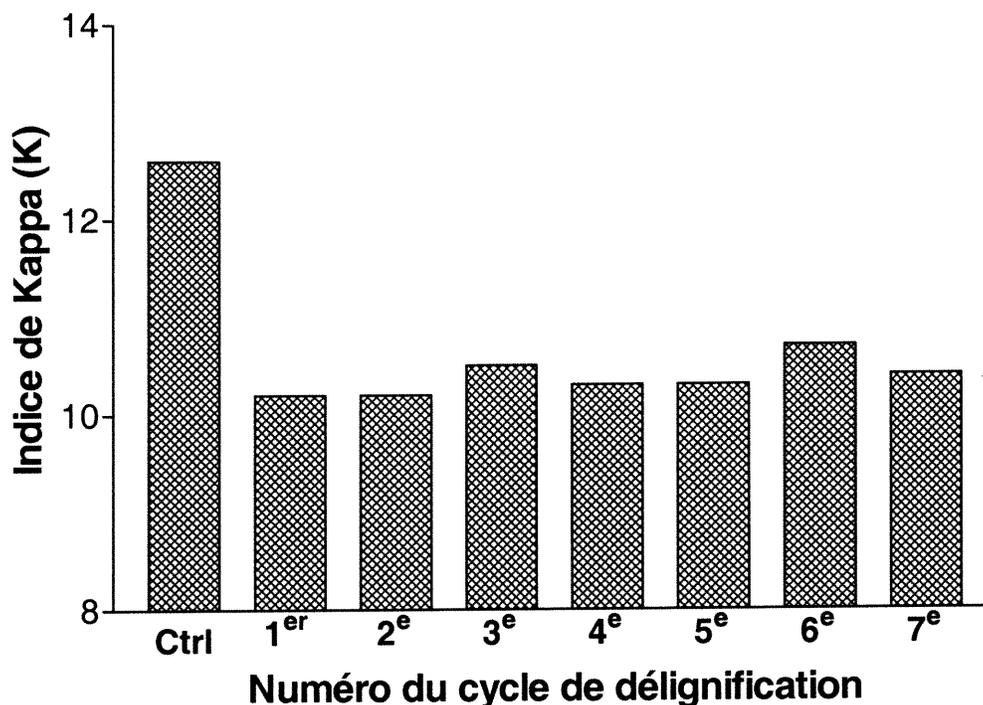
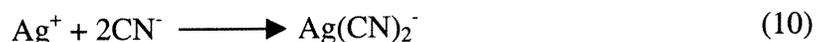


Figure 20. Recyclage du $K_4Mo(CN)_8$ pour traiter différents échantillons de pâte (SWKP-O₂ $K_{initial} = 14.7$). Le contrôle représente un traitement sans laccase ni médiateur.

Des essais réalisés à Paprican ont démontré que le $K_4Mo(CN)_8$ est toxique et que le système de traitement des effluents ne pouvait pas en diminuer la toxicité. La libération de cyanure liée à la décomposition du complexe a été envisagée comme cause de sa toxicité. La littérature rapporte en effet cette possibilité lorsque des solutions de $K_4Mo(CN)_8$ sont exposées à la lumière [63]. L'effet de la température et du pH des solutions sur la libération de cyanure doit également être évalué. Des solutions d'octacyanomolybdate dont le pH vari de 1 à 13 ont été préparées puis exposées à la lumière à 25 et 75°C durant 5 jours. Des échantillons ont été prélevés régulièrement afin de mesurer la concentration résiduelle de $K_4Mo(CN)_8$ et la présence de cyanure en solution. La concentration en octacyanomolybdate a été évaluée par voltampérométrie à onde cyclique en comparant la hauteur du pic d'oxydation du médiateur des solutions exposées avec celui de la solution initiale. La

formation de cyanure est suivie en effectuant le titrage du CN^- par le nitrate d'argent en solution basique (équation 10), ce qui permet d'éviter la précipitation de l'argent avec les ions chlorures contenus dans les tampons. Le point équivalent est détecté par le changement de couleur de l'indicateur *p*-diméthylaminobenzalrhodamine, tel que décrit dans la méthode titrimétrique tirée de l'ouvrage de Eaton *et coll.* [89].



La méthode a été validée par la technique des ajouts dosés avec une solution de KCN pour vérifier la linéarité du signal en fonction de l'augmentation de la concentration en CN^- . La Figure 21 montre aussi que l'intersection de la droite avec l'abscisse correspond aux résultats du titrage de l'échantillon sans ajout, prouvant que l'espèce titrée est bien le cyanure. L'ajout de NaCl aux échantillons n'a aucun effet sur le volume équivalent, démontrant que les ions chlorures provenant des tampons ne créent aucune interférence (résultats non-démontrés). Les résultats du Tableau V démontrent que la concentration en octacyanomolybdate diminue en fonction du temps et que cette diminution est accélérée en augmentant la température et l'exposition à la lumière. Les solutions aux pH extrêmes semblent également accélérer la décomposition du complexe.

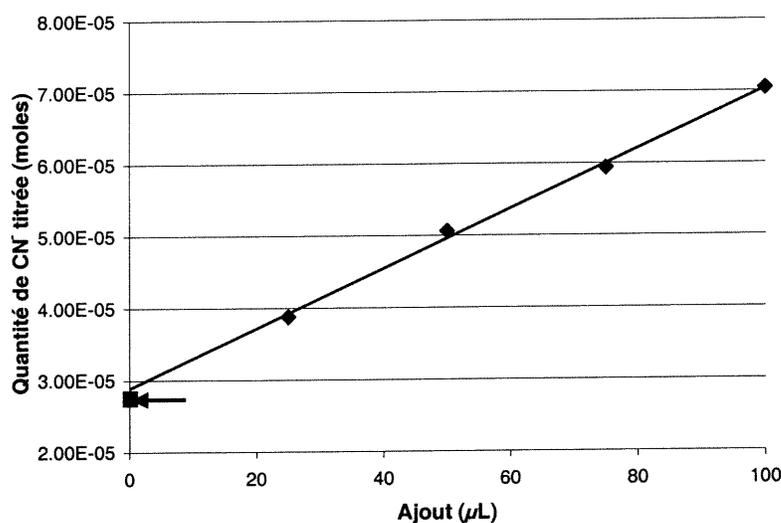
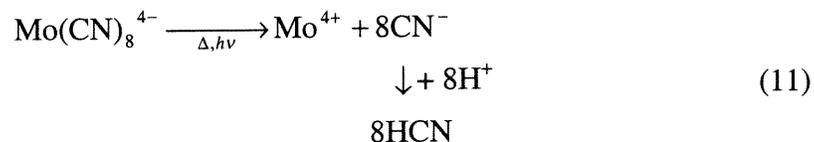


Figure 21. Ajouts de fractions de KCN 0.4696 mM à la solution d'octacyanomolybdate exposée durant 5 jours à 25°C à lumière, pH = 7. La flèche démontre la corrélation entre le titrage sans ajout (■) et l'interception de la droite sur l'axe y.

Les résultats du Tableau V et de la Figure 22 démontrent également qu'aux pH alcalins le médiateur est plutôt stable et que la décomposition dans de telles solution dépend surtout de la lumière et non de la température (comparer les graphiques b et d de la Figure 22). Ceci est un point positif puisque les liqueurs de cuisson du procédé kraft sont basiques (la liqueur noire a un pH d'environ 13.5) et à haute température, mais elles ne sont pas exposées à la lumière de façon prolongée. En se basant sur les résultats de cette expérience, la décomposition du $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ dans le circuit sera peu importante dans ces liqueurs. L'effet d'un pH acide sur la décomposition du médiateur est beaucoup plus important puisqu'à la température ambiante, le quart du $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ est détruit après seulement une journée. À 75°C, lorsque la température se situe plus près celle des liqueurs de cuisson en usine, la décomposition est complète en moins d'une journée. La décomposition à pH acide est d'autant plus néfaste qu'il y a formation de HCN puisque les ligands CN^- se détachent du complexe et que le pKa du HCN est de 9.3. Ainsi, à pH de un, la proportion $[\text{HCN}]/[\text{CN}^-]$ est de l'ordre de cent millions. Le HCN étant volatil, il n'est

pas impossible que l'évaporation puisse favoriser la décomposition du médiateur en déplaçant l'équilibre (équation 11).



Les graphiques de la Figure 22 démontrent que la décomposition du complexe s'accompagne, tel que suggéré, de la formation de cyanure. Les valeurs théoriques de la concentration de CN^- présentées sur ces graphiques représentent la quantité de cyanure libéré calculée selon la quantité de complexe s'étant décomposée (présentée au Tableau V). Ainsi, un échantillon dont le $\text{K}_4\text{Mo(CN)}_8$ (1 mM) s'est totalement décomposé devrait théoriquement contenir 8 mM si la totalité du médiateur est décomposé en formant du CN^- . La corrélation entre ces valeurs théoriques et les concentrations mesurées par titrage suggère que le complexe soumis à ces conditions se décompose en libérant du cyanure. Ceci n'est pas souhaitable pour une éventuelle application en usine et la seconde partie de cette section évalue la possibilité d'éliminer le médiateur afin d'éviter des problèmes liés à sa décomposition.

Tableau V. Décomposition de l'octacyanomolybdate en fonction du temps, du pH et de l'exposition à la lumière. Les valeurs indiquent le % de $K_4Mo(CN)_8$ présent dans les solutions en se basant sur la concentration initiale de médiateur (100% = 1 mM).

Jour \ pH	1	4	7	10	13
Échantillon à 25°C exposé à la lumière					
1	72%	88%	113%	96%	77%
2	32%	82%	104%	73%	8%
5	0%	77%	84%	58%	0%
Échantillon à 25°C à la noirceur					
1	103%	104%	117%	103%	109%
2	96%	101%	113%	106%	110%
5	95%	98%	115%	104%	86%
Échantillon à 75°C exposé à la lumière					
1	0%	70%	117%	100%	102%
2	0%	64%	132%	110%	105%
5	0%	39%	148%	68%	38%
Échantillon à 75°C à la noirceur					
1	0%	71%	94%	100%	107%
2	0%	64%	129%	108%	115%
5	0%	39%	133%	110%	120%

Note: Les valeurs supérieures à 100% sont probablement dues à l'évaporation d'une partie des solutions puisque ce phénomène est surtout survenu pour les solutions entreposées à 75°C.

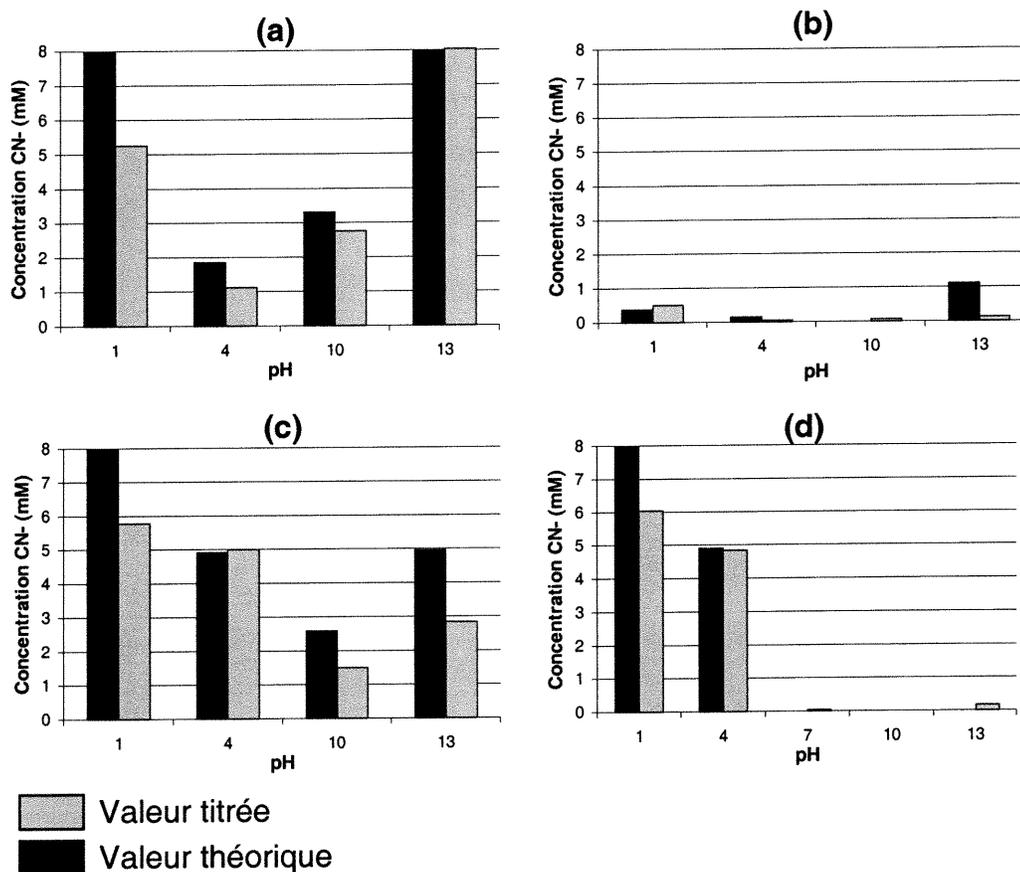


Figure 22. Quantités de cyanure produites lors de la décomposition du $K_4Mo(CN)_8$ après 5 jours d'entreposage sous diverses conditions: (a) 25°C et lumière, (b) 25°C et noirceur, (c) 75°C et lumière et (d) 75°C et noirceur.

L'élimination du médiateur a été envisagée comme façon d'éliminer le $K_4Mo(CN)_8$ des effluents afin d'éviter les complications découlant de sa nature toxique. Cette idée vient du fait qu'entre chaque étape de blanchiment, la pâte est lavée (voir Figure 23 dans la section suivante) et que l'effluent résultant de ce lavage pourrait être envoyé avec la liqueur noire dans la chaudière pour y être brûlé (voir la Figure 5 en introduction). Le médiateur serait donc détruit en passant dans la chaudière, éliminant les problèmes de cyanure. Par contre, le molybdène lui ne sera pas détruit et il devient important de savoir ce qu'il en adviendra. La chimie des milieux à haute température est très complexe et une foule de composés peuvent se former dans une chaudière de récupération opérant à environ 900°C [2]. Le but de

cette expérience n'est pas de déterminer sous quelle forme se retrouvera le molybdène mais plutôt de savoir s'il sera éliminé avec les déchets de combustion ou s'il risque de s'accumuler dans le système. Ceci dépend de la solubilité du molybdène après l'étape de combustion dans la chaudière car, tel qu'expliqué dans la section 1.2.2., de l'eau est ajoutée aux résidus de combustion pour produire la liqueur verte. Ce qui est soluble est réintroduit dans le cycle des liqueurs de cuisson alors que les matières insolubles sont retirées et jetées. Dans le cas où le molybdène se retrouverait avec les résidus insolubles, il deviendrait facile de le retirer du système. La méthodologie utilisée pour établir ce qui advient du métal a été dissoudre de l'octacyanomolybdate de potassium dans des échantillons de liqueur noire pour ensuite les brûler dans un four à 900°C durant 60 minutes. De l'eau déionisée est ajoutée aux échantillons refroidis et les solutions sont agitées durant 15 minutes avant d'être filtrées pour retirer les résidus de combustion non-solubles. Le blanc a été réalisé avec un échantillon de liqueur noire sans $K_4Mo(CN)_8$. Les solutions sont ensuite analysées par spectrophotométrie d'absorption atomique à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer modèle 703 (flamme acétylène/ N_2O) en utilisant une lampe au molybdène (Perkin-Elmer Intensitron, $\lambda = 317$ nm) pour déterminer la présence ou l'absence de molybdène. L'étalonnage externe a été réalisé en utilisant des solutions standard de Mo (BDH Chemicals) de 0.5 à 10 mg/L. La matrice, qui possède une forte teneur en ions, n'interfère pas avec les mesures à la longueur d'onde mentionnée.

Les résultats suggèrent que si l'expérience décrite représente bien le fonctionnement du système de récupération, le molybdène se dissout dans la liqueur verte et qu'il ne serait pas totalement éliminé. Les solutions analysées ont révélé contenir de grandes quantités de molybdène (soit 70 ± 20 % de la quantité de molybdène ajouté à la liqueur). Ceci est un inconvénient puisque si le Mo n'est pas éliminé, il s'accumulera dans le circuit de mise en pâte. Cependant, si le médiateur est solubilisé dans l'eau distillée plutôt que dans la liqueur noire avant d'être brûlé, aucune trace de molybdène n'est détecté durant l'analyse. Il faut également mentionner que la méthode utilisée pour la combustion de quelques millilitres de

liqueur noire n'est probablement pas représentative de ce qui se produit dans une chaudière contenant quelques tonnes de solides en combustion. Aucune étude n'a été réalisée pour déterminer si le Mo peut causer des problèmes lorsqu'il se retrouve dans les liqueurs de cuisson.

3.1.2.3. Séquences de blanchiment

Afin d'évaluer l'impact d'une étape laccase-médiateur dans une séquence de blanchiment au bioxyde de chlore, des échantillons de pâte ont été traités de façon à reproduire les conditions utilisées dans les usines kraft. La Figure 23 représente une séquence de blanchiment ainsi que l'endroit où l'enzyme et le médiateur pourraient être ajoutés. Un des avantages de l'utilisation du système laccase-médiateur est que son application pourrait s'effectuer dans une tour de traitement à l'oxygène qui est déjà installée dans le circuit, ce qui évite d'avoir à en modifier l'infrastructure.

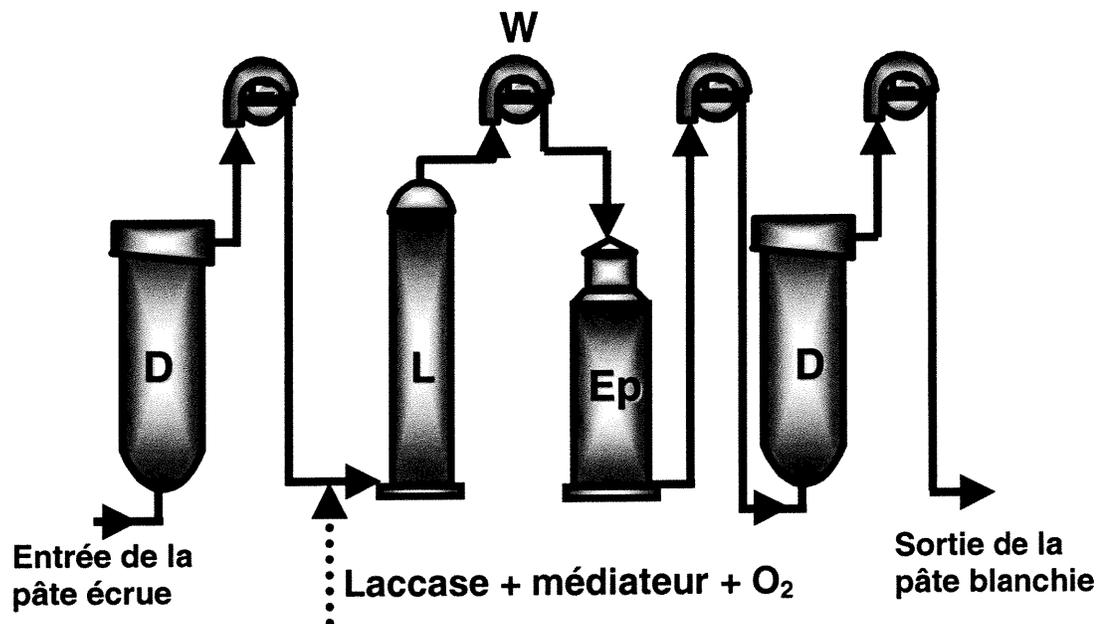


Figure 23. Schéma d'une séquence de blanchiment au bioxyde de chlore (D) d'une usine de pâte kraft. L'étape de laccase-médiateur (L) pourrait avoir lieu dans une tour de traitement à l'oxygène. Le symbole (W) représente les étapes de lavage de la pâte. Les flèches solides représentent le trajet emprunté par la pâte.

Les résultats présentés au Tableau VI démontrent clairement les bénéfices relatifs à l'utilisation d'une étape laccase-médiateur dans une séquence de blanchiment. Le gain en blancheur dû à la délignification enzymatique pourrait signifier une diminution des quantités de ClO_2 nécessaires pour obtenir le degré de blancheur désiré pour fabriquer le papier. Des expériences réalisées à Paprican ont démontré qu'il est possible de réduire la charge de ClO_2 de 30 % en utilisant cette technologie auxiliaire. Il faut toutefois mentionner qu'à ce jour aucun médiateur connu de la laccase ne peut être obtenu à un coût suffisamment bas pour que le système laccase-médiateur puisse faire compétition, d'un point de vue économique, à un traitement équivalent au bioxyde de chlore.

Tableau VI. Impact de la délignification par le système laccase-octacyanomolybdate (1%) dans une séquence de blanchiment au bioxyde de chlore.

Séquence	Indice K après Ep	Indice de blancheur après la séquence (%)
D(Ep)D	3.85	82.8
DL(Ep)D	2.75	86.9
DO₂(Ep)D¹	3.30	85.6

¹ Cette séquence représente un contrôle avec le médiateur sans enzyme.

En résumé, bien que les médiateurs basés sur des complexes de coordination ne semblent pas aussi réactifs que les médiateurs organiques, leur stabilité et la possibilité de les recycler sont des avantages considérables qui justifient la recherche sur leur implication dans la délignification enzymatique. Cependant, la connaissance des mécanismes impliqués lors de la délignification est jusqu'ici assez sommaire et elle se doit d'être approfondie afin de comprendre le rôle du médiateur et d'optimiser le système afin de le rendre intéressant pour l'industrie.

3.2. Étude des composés modèles de la lignine

Les mécanismes des réactions menant à la délignification de la pâte ne sont pas bien connus, principalement à cause de la structure complexe et irrégulière de la lignine. Bien qu'il soit facile de déterminer si un traitement de délignification est efficace, c'est-à-dire si beaucoup de lignine a été retirée, il est plus difficile de déterminer quels groupements ont été oxydés et quelles liaisons ont été clivées pour mener à cette délignification. L'expérimentation sur des échantillons réels est aussi rendue plus difficile parce que la pâte et la lignine sont très peu solubles.

L'utilisation de composés modèles de la lignine (CML) peut permettre de surmonter ces limites et de faciliter l'étude des réactions d'oxydation impliquées dans la délignification de la pâte. Les CML sont de petites molécules dont la structure s'apparente à certains groupements que l'on retrouve dans la lignine (voir Figure 24). Les avantages découlant de l'utilisation de ces composés par rapport à l'expérimentation directement sur la pâte sont nombreux. En plus d'être solubles, facile à obtenir et d'avoir une structure connue et bien définie, les produits d'oxydation des CML sont facilement identifiables. D'une manière générale, le but d'utiliser ces CML est d'établir si un système de délignification (comme le système laccase-médiateur) est efficace et quels sont les chemins réactionnels favorisés pour obtenir la délignification. En assumant que ces composés sont représentatifs des groupements de la lignine, un système oxydant certains liens des CML devrait être capable d'oxyder les mêmes liens dans la lignine. Il est toutefois fort probable que la vitesse à laquelle ces liens sont oxydés sera différente des CML à la pâte. Les composés modèles sont de petites molécules en solution alors que les groupements se retrouvant dans la pâte sont contenus dans une structure tridimensionnelle rigide. L'accès à ces groupements dans la lignine est donc probablement limité par encombrement stérique. Ainsi, il va de soi qu'une expérimentation basée uniquement sur l'oxydation des CML est incomplète et doit être appuyée par des essais sur des échantillons réels. Il s'agit toutefois d'un bon point de départ pour l'émission d'hypothèse portant sur les mécanismes menant à la délignification de la pâte.

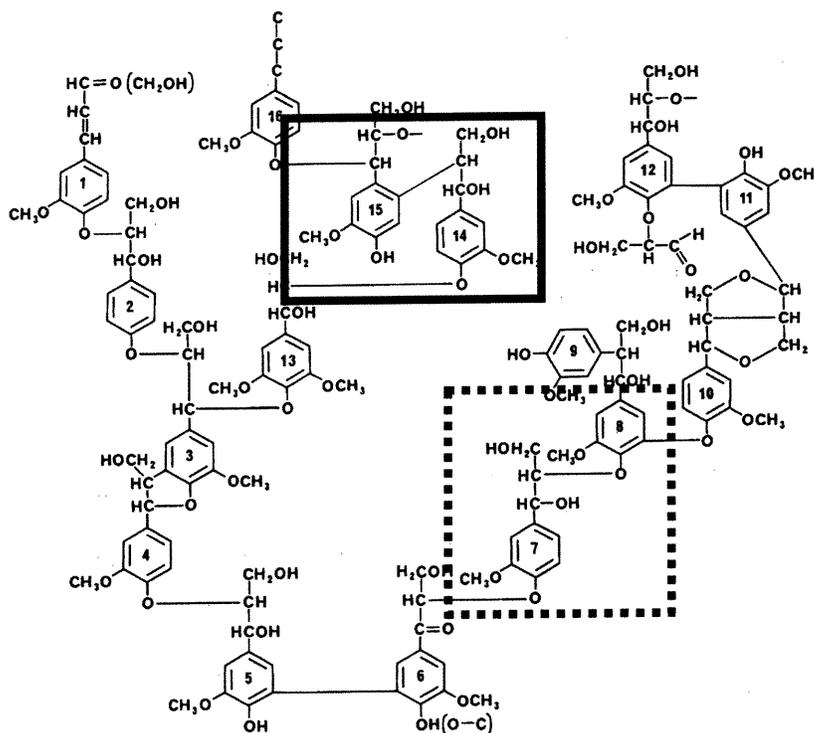


Figure 24. Section de la structure de la lignine telle que présentée à la Figure 3. Les encadrés montrent les liaisons typiques β -O-4 (.....) et β -1 (—) qui sont représentées par les dimères I et IV, respectivement.

La première classe de CML sont des molécules composées de deux cycles aromatiques (phényles) reliés entre eux via une chaîne de trois atomes de carbone, représentant ainsi l'unité phénylpropane qui est à la base du squelette de la lignine. Ces composés modèles, dont les structures sont présentées à la Figure 25, sont nommés dimères. D'autres CML, les monomères, ne comportent qu'un seul groupement phényle, comme l'alcool vératrylique (VA).

Les composés modèles sont également utiles pour représenter certaines liaisons typiques de la lignine contenue dans la pâte. Les dimères I et IV représentent respectivement les liaisons de type β -O-4 et β -1 entre des unités non-phénoliques de

la lignine. La nomenclature de ces liens est expliquée à la Figure 25. La liaison de type β -O-4 étant la liaison la plus commune dans la structure de la lignine, soit près de la moitié des liaisons [90], les composés modèles possédant ce type de lien (dimère I) sont particulièrement intéressants pour l'étude des réactions de délignification. De plus, puisque la majorité des groupements aromatiques de la lignine sont non-phénoliques, les CML utilisés pour cette étude sont sans exception non-phénoliques.

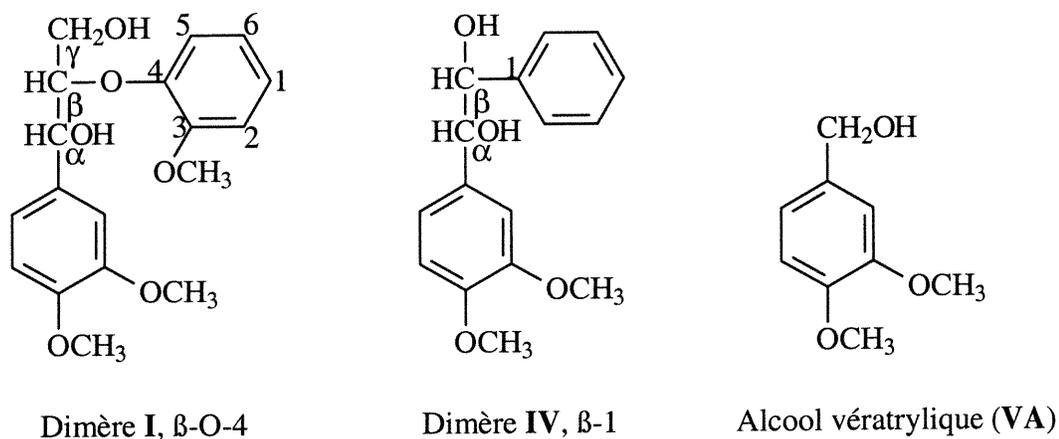


Figure 25. Structure des composés modèles de la lignine et type de liaison représentée par les dimères. Le dimère I représente une liaison β -O-4 car le lien éther relie le carbone en position β de l'unité phénylpropane et la position 4 du phényle de l'unité voisine dans la lignine. Le C β du dimère IV quant à lui est directement relié à l'unité voisine (β -1).

Le but de cette section est d'étudier les réactions d'oxydation des CML par le système laccase-médiateur afin de déterminer l'efficacité des médiateurs et de tenter d'apporter quelque contribution à l'ensemble des mécanismes possibles menant à la délignification. Les résultats présentés au cours de ce chapitre démontreront que le mécanisme d'oxydation le plus probable est celui où le médiateur joue le rôle de transporteur d'électrons. Cependant, d'autres mécanismes sont également possibles, selon la nature du médiateur utilisé. Un effort sera également réalisé pour tenter de définir les conditions les plus favorables aux mécanismes d'oxydation menant au

clivage des CML, ce qui est souhaitable afin d'obtenir une dépolymérisation efficace de la lignine.

3.2.1. Procédure d'étude de l'oxydation des CML

La procédure d'étude des CML consiste, d'une façon générale, à soumettre les composés aux conditions de délignification qui seraient utilisées lors d'un traitement de la pâte. Les produits de la réaction peuvent ensuite être analysés quantitativement et qualitativement afin d'évaluer respectivement soit l'efficacité du système soit les mécanismes menant à l'oxydation des composés. Sauf indication contraire, les expériences d'oxydation des CML ont été conduites en utilisant une concentration de 2 mM de composé modèle et 0.5 mM du médiateur en solution tampon (citrate ou acétate) de 50 mM à pH 5, pour un volume total de 5 à 50 mL pour les traitements enzymatiques et électrochimiques, respectivement. Les réactions ont été effectuées à température ambiante pour 24 heures. Pour terminer la réaction enzymatique, les solutions ont ensuite été placées dans un bain thermostatique à 100°C durant deux minutes, ce qui inactive la laccase. Cette dénaturation thermique n'a été effectuée que pour les traitements enzymatiques. Un contrôle a été effectué pour s'assurer qu'il n'y avait pas suffisamment de perte de la solution par évaporation pour modifier la concentration des solutés. Les échantillons sont ensuite acidifiés, filtrés et injectés dans le système chromatographique (voir section 2.6.).

Afin de s'assurer de la validité des résultats et que la dégradation des CML est bien due à l'action du médiateur oxydé, chaque expérience a comporté plusieurs échantillons de contrôle. Le diagramme de la Figure 26 explique la logique suivie pour diviser les échantillons avant leur traitement. Les contrôles ont également servi à vérifier la concentration initiale de composé modèle.

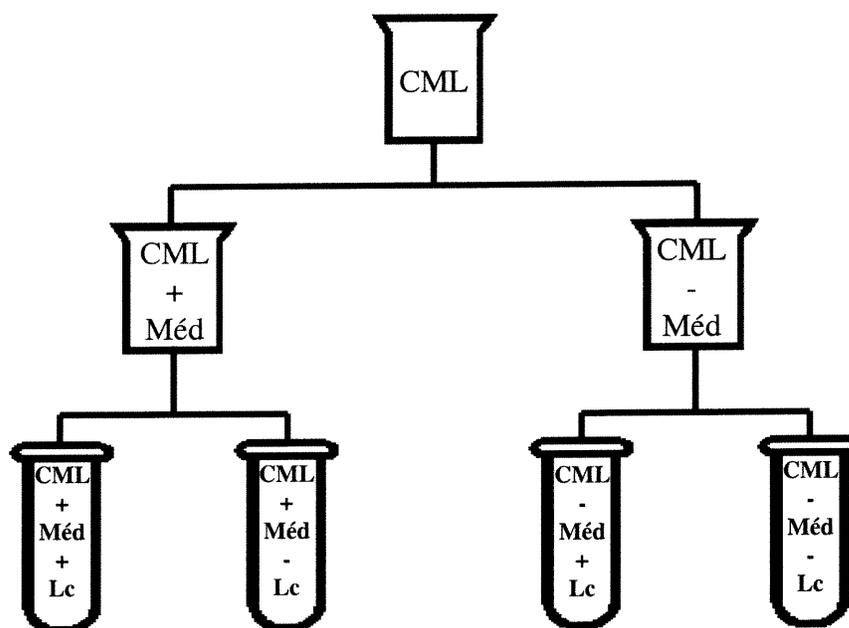


Figure 26. Diagramme décrivant la méthode suivie pour préparer les solutions pour l'oxydation des composés modèles (2 mM) avec ou sans médiateur (0.5 mM) en présence ou non de laccase (0.5 U mL⁻¹). La même méthode a été utilisée pour l'oxydation électrochimique.

3.2.1.1. Traitement enzymatique

La laccase II de *Trametes versicolor* (0.5 U•mL⁻¹) a été utilisée pour effectuer, via le médiateur, l'oxydation enzymatique des composés modèles de la lignine. La Figure 27a présente le mécanisme simplifié de l'oxydation des CML par le système laccase-médiateur.

Les composés modèles dimères n'étant pas solubles en milieu aqueux, les solutions mères de ces composés (200 mM) ont dû être préparées dans l'éthanol 95 %. La concentration en dimère pour les traitements étant de 2 mM, la teneur en éthanol ne représente que 1 % du volume des solutions réactionnelles. Des essais sur la diminution de l'activité de la laccase due à la présence de solvant organique ont démontré qu'à une teneur de 1 % l'enzyme conserve 95 % de son activité initiale.

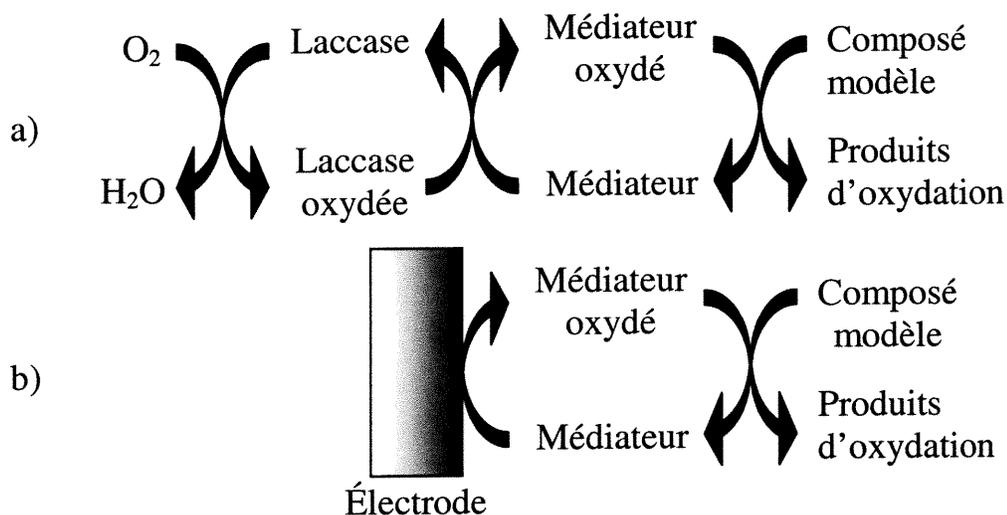


Figure 27. Mécanisme d'oxydation des composés modèles de la lignine par le système laccase-mé debateur (a) et par l'électrolyse du médiateur (b).

3.2.1.2. Traitement électrochimique

Selon le schéma de la Figure 27a, le rôle de la laccase est d'oxyder le médiateur via la réduction de l'oxygène en eau. Plusieurs autres mécanismes de délignification par ce système ont toutefois été suggérés (voir section 3.2.2.). Afin d'évaluer le rôle de la laccase, une électrode a été utilisée lors de certaines expériences pour oxyder le médiateur. L'électrode effectue le même travail que le site de cuivre TI de la laccase qui est responsable de l'oxydation du substrat. Le médiateur ainsi oxydé devrait réagir par la suite avec le composé modèle en solution tel que suggéré par le schéma de la Figure 27b. En comparant les résultats obtenus par les deux méthodes d'oxydation (enzymatique et électrochimique), il est possible de vérifier le rôle d'accepteur d'électrons de la laccase, d'évaluer si la méthode électrochimique peut être utilisée pour l'oxydation de la lignine et d'étudier l'effet de certaines conditions sur l'efficacité et les mécanismes d'oxydation des CML. L'effet de l'oxygène sur l'oxydation des CML sera particulièrement intéressant à étudier car

ceci est impossible à réaliser avec la laccase puisque cette dernière requiert la présence d'oxygène pour amorcer les réactions d'oxydation. Puisqu'il s'agit d'étudier des réactions impliquant des transferts d'électrons, le recours aux méthodes électrochimiques a permis d'effectuer les traitements à différents potentiels pour accélérer le taux d'oxydation du médiateur. De plus, l'oxydation électrochimique permet de varier considérablement les conditions de la réaction tel que le pH, la température, l'oxygène dissous, etc.

Le montage utilisé pour ces expériences d'électrolyse est présenté à la Figure 28. Cette cellule (Bioanalytical Systems, Inc.) est composée de trois électrodes, soient de travail (T), de référence (R) et l'auxiliaire (A). L'électrode de travail est faite de carbone vitreux réticulé offrant une très grande surface de contact avec la solution dans laquelle elle est immergée, ce qui favorise le taux d'oxydation en augmentant les contacts entre l'espèce électroactive (médiateur) et l'électrode. La référence est une électrode de Ag/AgCl dont le rôle est de fournir un potentiel constant (192 mV par rapport à l'électrode normale d'hydrogène). Le potentiostat, auquel sont reliées les trois électrodes, applique un potentiel constant entre les électrodes T et R lors de l'électrolyse, produisant ainsi un courant causé par l'oxydation du médiateur. L'électrode auxiliaire, un fil de platine, est isolée de la cellule principale pour éviter la réduction du médiateur. Cette électrode sert à fermer le circuit pour éviter que le courant ne circule par l'électrode de référence, ce qui entraînerait une modification du potentiel appliqué dans la cellule. Le potentiel appliqué à l'électrode de travail doit être plus élevé que le potentiel rédox du médiateur pour s'assurer que l'oxydation du médiateur ne limitera pas la réaction d'oxydation des composés modèles. Le potentiel apparent à l'électrode de travail est généralement plus faible que celui appliqué par le potentiostat entre T et R à cause de la chute ohmique; la résistance au passage d'un courant dans la solution électrolytique. L'impact de la chute ohmique peut être diminué en augmentant le potentiel appliqué et en utilisant des solutions tampons suffisamment concentrées en électrolyte pour abaisser la résistance de la solution électrolytique.

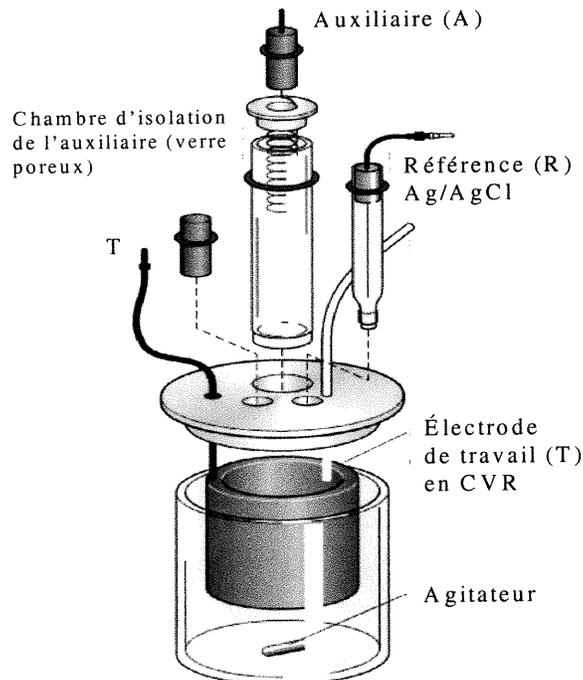


Figure 28. Cellule d'électrolyse. Adaptation de [176].

3.2.1.3. Identification des produits d'oxydation

L'avantage majeur de l'utilisation des composés modèles provient du fait que les produits d'oxydation sont, la plupart du temps, connus et qu'ils peuvent être facilement identifiés, les produits de départ (les CML) étant des molécules relativement simples. La chromatographie liquide à haute performance a été utilisée pour effectuer l'analyse des solutions réactionnelles (voir les détails à la section 2.6.). En premier lieu, les produits sont identifiés par leur temps de rétention déterminé en injectant des solutions étalons des composés modèles et des principaux produits d'oxydation (voir Figures 29 et 30). L'identité des produits de la réaction a aussi été vérifiée par comparaison du spectre UV-Visible (220 à 500 nm) avec celui des solutions étalons. Finalement, la concentration de chacun de ces produits a été calculée à partir de l'équation de la pente des courbes étalons obtenues par étalonnage externe.

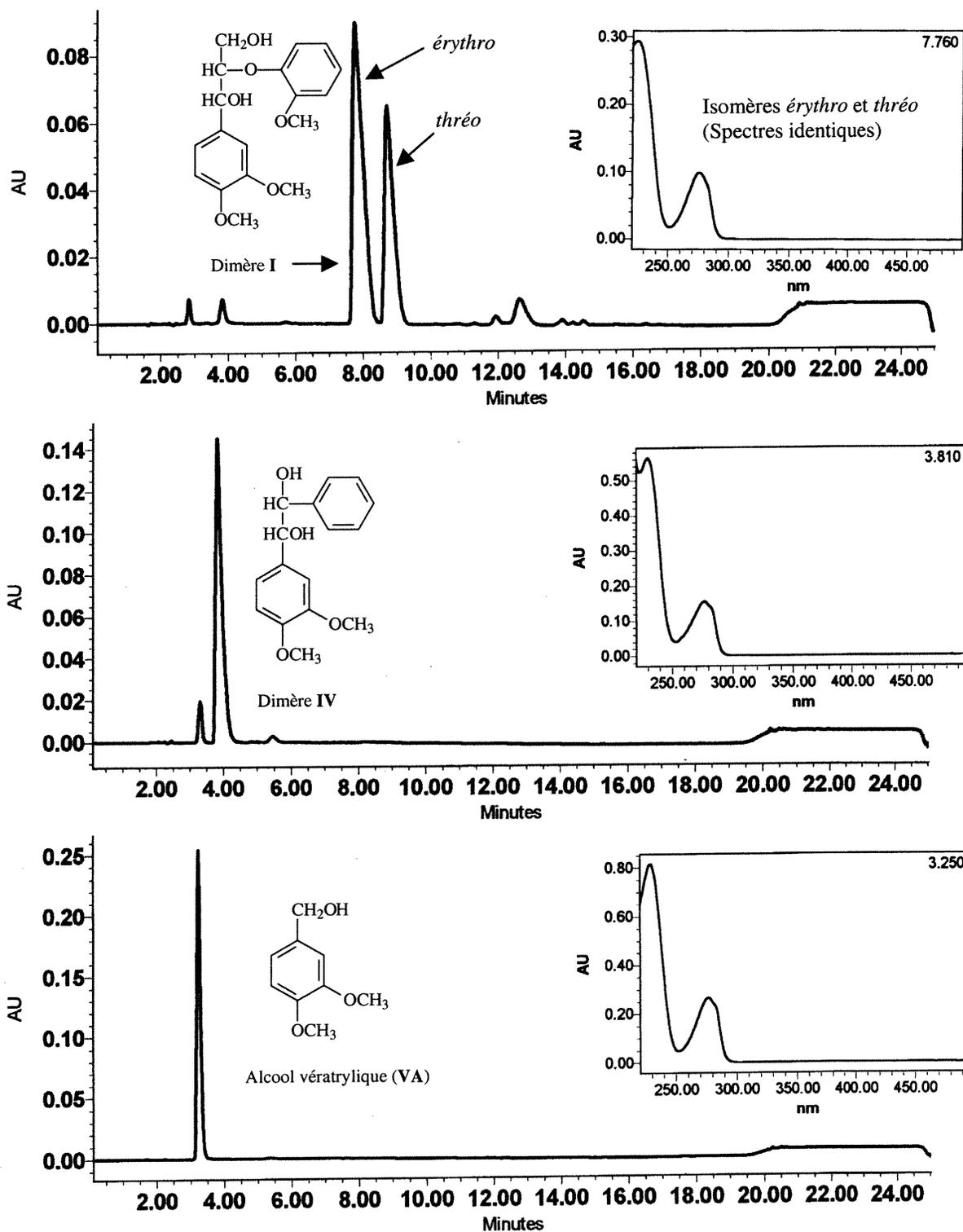


Figure 29. Chromatogramme (extrait à $\lambda = 280$ nm) et spectre UV-Visible (en encadré) des composés modèles de la lignine. Le spectre a été enregistré au temps de rétention du pic le plus important du chromatogramme (voir le chiffre en encadré).

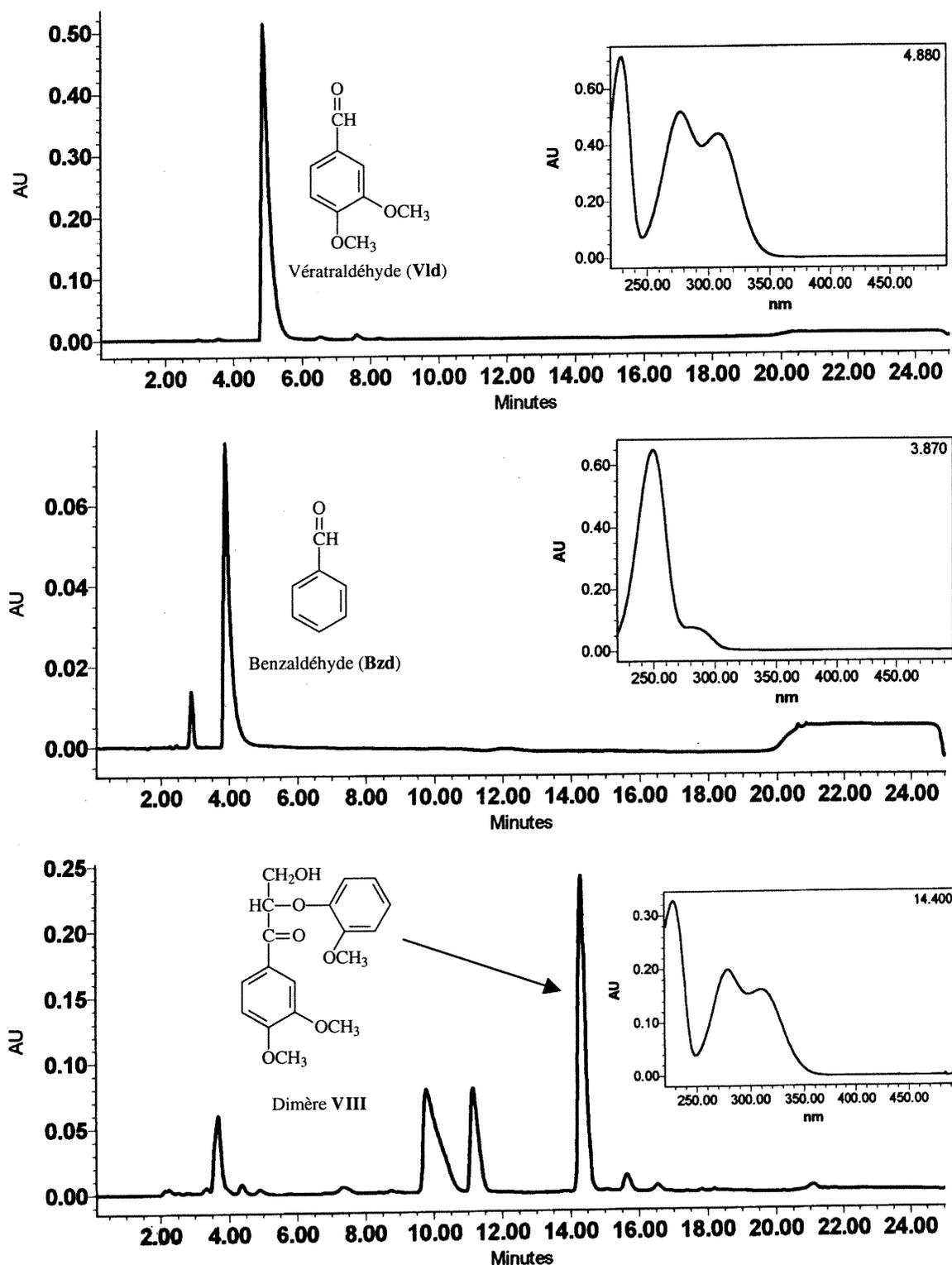


Figure 30. Chromatogramme (extrait à $\lambda = 280$ nm) et spectre UV-Visible (en encadré) des principaux produits d'oxydation des composés modèles de la lignine. Le spectre a été enregistré au temps de rétention du pic le plus important du chromatogramme (voir le chiffre en encadré).

L'utilisation de composés modèles de la lignine est largement répandue dans la littérature à toutes les différentes étapes de la fabrication de la pâte, afin de surmonter les difficultés inhérentes à la complexité de la lignine. A titre d'exemple, les CML ont été utilisés pour étudier les réactions de la lignine et des composés de la liqueur blanche lors de la mise en pâte [91, 92], et les réactions du blanchiment au dioxyde de chlore [93], au peroxyde d'hydrogène [94, 95] et de la délignification à l'oxygène [90, 96].

La section suivante de ce chapitre présente les différents mécanismes d'oxydation des composés modèles de la lignine qui ont été répertoriés dans la littérature. Ces hypothèses seront par la suite utilisées comme point de départ pour discuter des résultats obtenus lors des expériences réalisées tout au long de ce projet de recherche.

3.2.2. Réactions d'oxydation des CML

Plusieurs hypothèses ont été avancées au fil des années pour décrire le ou les chemins menant à l'oxydation des composés modèles de la lignine par le système laccase-médiateur. Avant de revoir les mécanismes s'appliquant aux composés modèles utilisés, il est important de noter que le rôle exact du médiateur dans les réactions d'oxydation de la lignine n'est pas non plus tout à fait établi. La première partie de cette section porte sur les différents rôles possiblement joués par le médiateur.

3.2.2.1. Rôle du médiateur

Le rôle tenu par le médiateur dans l'oxydation enzymatique des composés modèles de la lignine a fait l'objet de plusieurs hypothèses par différents groupes de recherche [62]. La première hypothèse soutient que le médiateur agit comme un transporteur d'électrons, de la lignine (ou du composé modèle) vers la laccase qui

utilisera ces électrons pour la réduction de l'oxygène en eau. Le médiateur qui est réduit lors de l'oxydation du CML est continuellement réoxydé par l'enzyme, agissant ainsi comme un catalyseur. Ce mécanisme, décrit à la section 1.3.3. de ce texte, est appuyé par de nombreux articles dont notamment ceux de Bourbonnais *et coll.* [52, 88, 97], Call et Mücke [98] et Freudenreich *et coll.* [99]. Il a également été proposé que les espèces actives générées lors de l'oxydation du médiateur par la laccase pourraient plutôt amorcer les réactions des CML en retirant un atome d'hydrogène du carbone en position α [100]. Une autre hypothèse, basée sur les articles de Potthast *et coll.* [43] et de Balakshin *et coll.* [101, 102], suggère que le médiateur agit comme un activateur de la laccase qui, dans son état activé, est capable d'oxyder les composés non-phénoliques, ce que l'on sait être impossible sans médiateur. Finalement, le système laccase-médiateur pourrait produire des formes activées de l'oxygène (telles que HO^\bullet et $\text{O}_2^{\bullet-}$) qui elles sont reconnues comme étant des agents efficaces de délignification [20]. Le radical hydroxyle a été démontré comme étant capable d'oxyder les groupements non-phénoliques de la lignine, résultant soit en la scission du lien $\text{C}\alpha\text{-C}\beta$ (lorsque le cation radical est formé sur le cycle aromatique) soit en cétonisation en $\text{C}\alpha$ (lorsqu'il y a eu abstraction d'un proton en $\text{C}\alpha$) [103]. Puisque certains complexes de coordination comme le ferrocyanure ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$) [104-106] peuvent, lorsque oxydés, activer la délignification à l'oxygène à pH alcalin, il se peut que les médiateurs dont la structure est basée sur des métaux de transition agissent de la même façon pour délignifier la pâte enzymatiquement.

3.2.2.2. Mécanismes d'oxydation

Bien que les CML soient de petites molécules relativement simples, les mécanismes impliqués lors de leur oxydation sont complexes et ne sont pas totalement élucidés. Il convient maintenant de revoir les mécanismes d'oxydation tirés de la littérature s'appliquant aux composés modèles utilisés lors de ce projet.

Premièrement, l'oxydation peut se produire en retirant un électron d'un des cycles aromatiques des composés modèles, formant un cation radical sur le phényle. Il a été démontré que la lignine peroxydase (LiP), une enzyme sécrétée par plusieurs basidiomycètes responsables de la dégradation du bois, effectue ce type d'oxydation des composés modèles du type β -O-4 [107]. Cette oxydation est favorisée lorsque les groupements phényles sont enrichis en électrons par des substituants comme les méthoxyles que l'on retrouve sur les dimères. Divers réarrangements peuvent ensuite avoir lieu à partir du cation radical, résultant en la formation de divers produits d'oxydation: le clivage du lien $C\alpha$ - $C\beta$, le clivage du lien β -éther ou l'oxydation de l'alcool en position $C\alpha$ (ce qui forme la cétone correspondante) [108]. Si le cation radical est formé sur le cycle relié par le lien éther (cycle B), le lien β -éther sera clivé tandis que si l'électron est retiré du cycle A, il y aura clivage du lien $C\alpha$ - $C\beta$ ou oxydation en $C\alpha$. Les mécanismes de la LiP pourraient être les mêmes lorsque les CML sont oxydés par la laccase et un médiateur puisque, dans plusieurs cas, les produits de la réaction des CML sont les mêmes d'un système à l'autre.

Ceci n'est toutefois pas vrai pour la totalité de la littérature sur le sujet puisque dans plusieurs cas les produits trouvés varient d'un auteur à un autre. Kawai *et coll.* [109-111] ont rapporté plusieurs types de clivage ($C\alpha$ - $C\beta$, β -éther et ouverture des cycles aromatiques) alors que les articles de Bourbonnais *et coll.* [52, 112] et de Li *et coll.* [61, 62] ne font mention que d'un seul mécanisme d'oxydation menant à la formation de la cétone en position $C\alpha$ (le dimère VIII). Entre les deux, Srebotnik et Hammel [113] ont trouvé, en utilisant toujours la laccase et le HBT, à la fois du dimère VIII (en majorité) et des produits de clivage $C\alpha$ - $C\beta$ et du lien aryl-éther.

Muheim *et coll.* [100] ont comparé l'action oxydante de la LiP et du système laccase-médiateur (ABTS) sur différents composés modèles de la lignine, démontrant que l'intermédiaire de ces réactions ne pouvait pas être un cation radical sur les phényles puisque ce système n'oxyde pas les diméthoxybenzènes. Toujours selon ces auteurs, l'oxydation des CML s'effectuerait plutôt par l'abstraction d'un

atome d'hydrogène du $C\alpha$, résultant en la formation d'un radical à cette position. Ceci pourrait expliquer pourquoi, dans certains cas, aucun produit de clivage n'est observé lors de l'oxydation des composés modèles β -O-4, comme c'est le cas du dimère I en utilisant la laccase en présence du HBT ou de l'ABTS [52, 61, 99]. Finalement, les études de Kawai [110] et Srebotnik [113] ont montré que le dimère peut être partiellement clivé suite à la formation d'un cation radical sur le cycle B.

Pour ce qui est du dimère IV (liaison β -1), dans la majorité des cas, l'oxydation résulte en un clivage du lien $C\alpha$ - $C\beta$ pour former du vétraldéhyde et du benzaldéhyde en proportions égales dans des quantités identiques à celle du dimère IV qui a été oxydé (voir Figure 31). La formation du produit oxydé du dimère IV (cétone $C\alpha$) a cependant pu être observée dans certains cas lorsque le HBT est utilisé comme médiateur [113, 114] alors qu'en utilisant l'ABTS, il n'y a que les produits de clivage qui sont observés [52].

L'initialisation des réactions d'oxydation du dimère IV pourrait s'effectuer par formation d'un cation radical sur le cycle A (le diméthoxybenzène) ou par le mécanisme d'abstraction d'un proton. Contrairement au dimère I, le clivage est principalement observé lors de ces réactions et la scission du lien $C\alpha$ - $C\beta$ n'a pas été démontrée comme étant un résultat possible du mécanisme d'abstraction du proton en $C\alpha$ [100]. Par contre, puisque la formation de la cétone $C\alpha$ est aussi possible (qui, elle, peut subvenir par ce mécanisme), il se peut qu'il y ait plusieurs mécanismes impliqués et qu'un chemin réactionnel soit favorisé par rapport à d'autres selon les conditions utilisées.

L'alcool vératrylique (VA), représentant une fonction $C\alpha$ -OH de la lignine, forme le vétraldéhyde lorsqu'il est oxydé par la laccase en présence d'un médiateur comme HBT et ABTS. Le VA est le composé modèle le plus utilisé pour l'étude des réactions d'oxydation de la lignine. Encore une fois, les idées sur les mécanismes menant à l'oxydation du CML sont partagées entre le retrait d'un électron sur le phényle et la formation d'un radical benzyle par abstraction du proton. En utilisant

l'approche du calcul des énergies des orbitales moléculaires, Elder [115] a proposé un mécanisme basé sur la formation d'un cation radical sur le cycle aromatique suivi par la déprotonation du C α par une molécule d'eau, formant ainsi le radical benzyle. La réaction subséquente avec l'oxygène résulte en la formation du vératraldéhyde. Il a toutefois été démontré (cette thèse) que l'oxydation électrochimique du VA en absence d'oxygène produisait le vératraldéhyde.

Malgré toutes ces données, il n'est toujours pas possible de s'arrêter sur un mécanisme qui justifierait la formation de tous les différents produits d'oxydation de composés modèles non-phénoliques ayant été obtenus par les divers auteurs. Serait-il possible que l'oxydation par le système laccase médiateur ne forme qu'un composé intermédiaire unique qui lui pourrait subir différents réarrangements menant à autant de produits? Dans ce cas, les conditions utilisées seraient-elles responsables de la disparité des produits obtenus? Bref, il reste encore plusieurs hypothèses à explorer pour élucider les mécanismes d'oxydation des CML. Les résultats présentés dans la section suivante font partie d'une étude préliminaire qui a pour but d'évaluer la capacité des nouveaux médiateurs basés sur des complexes de coordination à oxider certains composés modèles de la lignine.

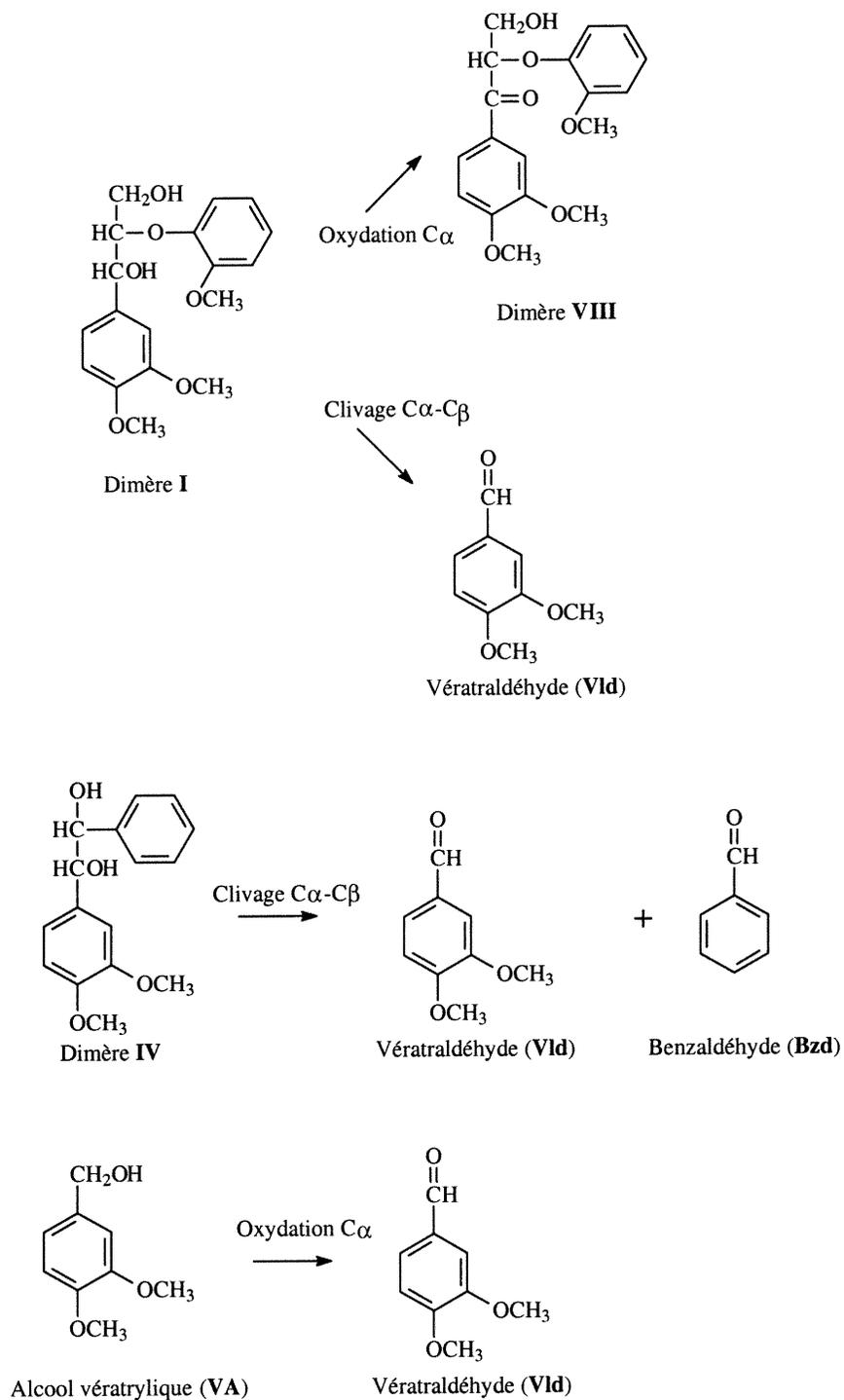


Figure 31. Produits formés lors de l'oxydation des trois composés modèles de la lignine qui ont été utilisés lors de ce projet.

3.2.3. Oxydation du dimère IV

La première expérience réalisée avec le dimère IV (DIV) fut de comparer les méthodes d'oxydation enzymatique et électrochimique en utilisant différents médiateurs. Un potentiel de 615 mV vs Ag/AgCl a été appliqué à l'électrode afin d'imiter l'action oxydante de l'enzyme. Ce potentiel est toutefois légèrement plus élevé que celui du site de cuivre T1 de la laccase de *Tv* pour tenir compte de la chute ohmique (décrite plus tôt) et du fait que l'oxygène dissous agit comme force motrice favorisant l'oxydation enzymatique du médiateur.

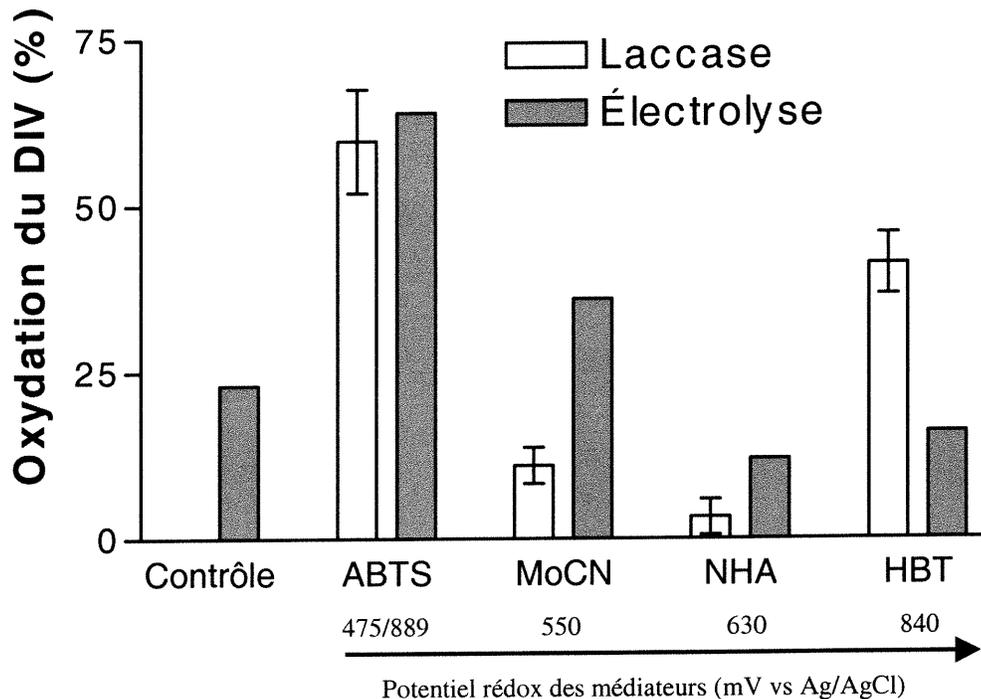


Figure 32. Oxydation du dimère IV par différents médiateurs oxydés par la laccase ou par électrolyse ($E = 615$ mV vs Ag/AgCl). Le pourcentage d'oxydation représente la fraction de la quantité initiale de DIV ayant été oxydée. Les barres d'erreur représentent l'écart type calculé sur la moyenne de quatre expériences.

Ce graphique démontre qu'il n'y a que l'ABTS et le $K_4Mo(CN)_8$ qui semblent agir de façon catalytique pour oxyder le DIV lors des expériences d'électrolyse.

Puisque l'efficacité d'oxydation du DIV par les autres médiateurs est équivalente à celle du contrôle réalisé sans médiateur (mais en appliquant le potentiel), l'oxydation du composé modèle s'effectue directement à l'électrode, ce qui ne donne aucune information sur le rôle du médiateur.

L'oxydation électrolytique du DIV semble être moins efficace lorsque le médiateur possède un E^0 élevé. En fait, la différence majeure entre les médiateurs NHA et HBT par rapport à ABTS et $K_4(\text{MoCN})_8$ est la réversibilité à l'électrode. Les deux premiers n'étant pas électrochimiquement réversibles, le taux d'oxydation de ces médiateurs est plus lent que celui de ABTS et de $K_4(\text{MoCN})_8$. La réaction d'oxydation du HBT est cependant plus rapide par la laccase, probablement grâce à des interactions favorables existant entre le médiateur et le site actif de l'enzyme. Ces interactions ne semblent pas exister, ou du moins être aussi favorables, pour les composés tels que $K_4(\text{MoCN})_8$. La faible stabilité de l'état oxydé de HBT et de NHA pourrait également expliquer le faible taux d'oxydation obtenu avec ces médiateurs.

Le potentiel appliqué à l'électrode pourrait être augmenté afin de favoriser l'oxydation du médiateur et d'augmenter le taux d'oxydation du dimère. La valeur supérieure du potentiel utilisable est cependant limitée par le potentiel d'oxydation du composé modèle afin de limiter l'oxydation du CML directement à l'électrode. À titre d'exemple, en appliquant 900 mV vs Ag/AgCl lors de l'oxydation du dimère IV, un résultat de 100% d'oxydation a été obtenu pour le traitement sans médiateur. Le composé modèle s'oxydant complètement à l'électrode, cette expérience n'est plus représentative du rôle joué par le médiateur lors de la délignification par le système laccase-médiateur. En appliquant un potentiel supérieur de 50 mV à celui de chaque médiateur (voir les E^0 des médiateurs dans les Tableaux III et IV, pages 25 et 42), tous les médiateurs ayant un potentiel rédox de plus de 700 mV vs Ag/AgCl ont donné une conversion complète du dimère IV en ses produits de clivage. Les contrôles sans médiateur en appliquant 615, 725 et 950 mV vs Ag/AgCl ont donné des quantités croissantes de composé oxydé, limitant une fois de plus l'application de ce dimère IV puisqu'il est impossible de savoir si le dimère a été oxydé par l'action

du médiateur ou directement à la surface de l'électrode. L'oxydation directe de DIV à la surface de l'électrode s'explique par son potentiel d'oxydation qui est relativement peu élevé par rapport aux autres CML non-phénoliques (voir Figure 33). Cependant, le potentiel normal apparent du médiateur ne semble pas avoir la même importance lorsque la laccase est utilisée comme agent d'oxydation. Aucune corrélation n'est observée entre le E^0 du médiateur et l'efficacité de l'oxydation du DIV. Les médiateurs de nature organique semblent être plus efficaces. Le cas du NHA est particulier et il reste à déterminer si sa faible efficacité est causée par le faible taux d'oxydation du médiateur par l'enzyme ou s'il s'agit du NHA qui ne réagit pas avec le composé modèle. La réactivité de l'ABTS envers le dimère IV surpasse celle de tous les autres médiateurs, bien que le cation radical formé lors de son oxydation par la laccase soit très peu efficace pour oxyder ce dimère [52]. L'explication de ce phénomène provient du fait que l'ABTS^{•+} effectue une réaction de disproportionation (Équation 12). Ce phénomène est la réaction entre deux molécules d'ABTS oxydé (cation radical) pour donner l'espèce réduite et le dication :



Cette réaction produit le dication ABTS²⁺ qui lui est très réactif et est responsable de l'oxydation, très efficace, du dimère IV [88].

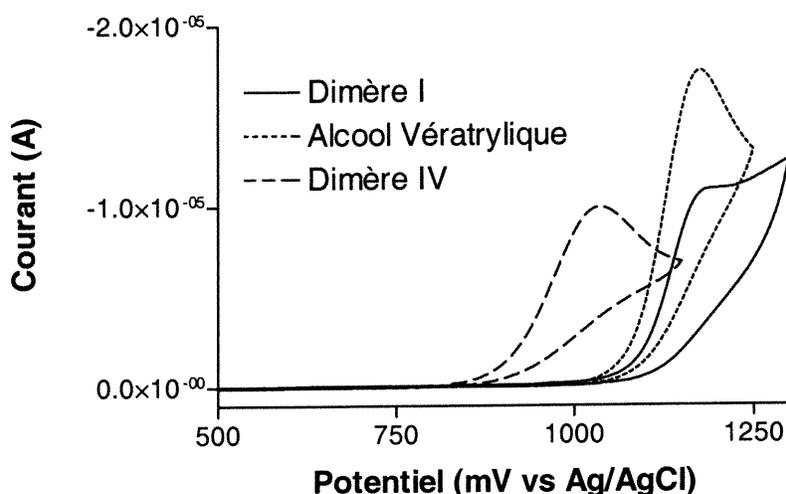


Figure 33. Voltampérogrammes cycliques enregistrés à 5 mV/s des composés modèles de la lignine (2 mM) dans le tampon citrate 100 mM à pH 4.5. Les vagues d'oxydation démontrées ici ne donnent qu'une approximation du potentiel d'oxydation des CML puisqu'il s'agit d'une réaction hétérogène irréversible. Le véritable potentiel d'oxydation est inférieur à celui donné par le pic des VOC.

Les liaisons de type β -1 dans la lignine de pâte kraft semblent être facilement oxydées lors des traitements par le système laccase-médiateur et puisque le clivage en résulte, il s'agit peut être d'un mécanisme important pour la délignification.

Le graphique de la Figure 34 présente l'effet de la concentration en médiateur sur l'efficacité de l'oxydation enzymatique (laccase) du dimère IV. Ces valeurs peuvent être utilisées pour étudier l'effet catalytique des médiateurs. Cet effet est clairement démontré pour l'ABTS en comparant la quantité de composé modèle oxydé avec la quantité de médiateur utilisé (voir les chiffres sur le graphique). L'effet catalytique de l'ABTS est maximal à des concentrations avoisinant 0.1 mM, où la concentration de DIV oxydé est environ 10 fois supérieure à la concentration d'ABTS. Le $K_4Mo(CN)_8$ par contre ne semble pas démontrer d'effet catalytique significatif puisque ce ratio, donné par la pente de la courbe, atteint un maximum de 1.4. Le premier point remarqué sur ce graphique est la grande efficacité d'oxydation du dimère IV par l'ABTS en comparaison avec les autres médiateurs. Le temps de réaction étant le même pour tous les essais, il faut 1mM de $K_4Mo(CN)_8$ ($MoCN$)

pour obtenir un résultat de 0.60 mM de DIV oxydé, alors qu'un tel résultat est obtenu avec 0.1 mM d'ABTS. Ce type d'information est très importante lors du développement d'un système de délignification puisque les quantités de médiateur doivent être maintenues au minimum. Par exemple, sur la courbe associée à l'ABTS, le gain en concentration de dimère IV oxydé lorsque la concentration d'ABTS passe de 0.5 à 1.0 mM est très faible (environ 0.2 mM), la quantité d'ABTS ayant pourtant été doublée.

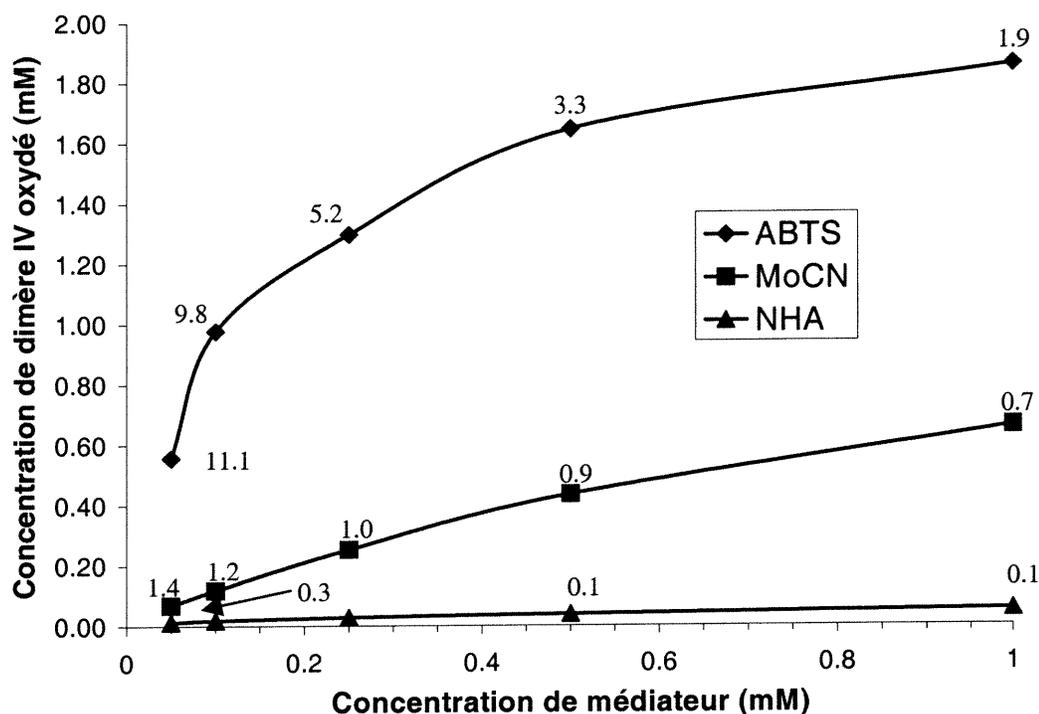


Figure 34. Effet de la concentration du médiateur sur l'efficacité de l'oxydation par la laccase du dimère IV (traitement durant 20 heures, pH 4.5). Les chiffres représentent le ratio $[DIV \text{ oxydé}]/[\text{médiateur}]$.

Le plafonnement très marqué de la courbe de l'ABTS est probablement dû au fait que la réaction est pratiquement complète puisque la quantité initiale de dimère IV était de 2mM. Ceci démontre la réactivité élevée de l'ABTS envers le CML. Un effet de plafonnement similaire a été rapporté avec le médiateur HBT pour la même réaction d'oxydation d'un composé modèle [62]. Dans ce cas, l'inactivation de la laccase par le radical HBT ainsi que la formation d'un produit de dégradation du médiateur oxydé, le benzotriazole, qui est non réactif vis-à-vis des composés

modèles ont été tenus responsables du plafonnement. Ceci ne peut expliquer le comportement de la courbe de l'ABTS puisque ce médiateur forme, en étant oxydé, un cation radical stable [116] et qu'il n'est pas reconnu comme étant responsable de la désactivation de la laccase [117].

3.2.3.1. Effet de l'oxygène

L'oxygène dissous dans les solutions n'a peut être pas qu'un effet limitant la cinétique d'oxydation des CML par les médiateurs. Son implication dans la réaction du $K_4Mo(CN)_8$ et du dimère IV a été étudié en utilisant l'électrolyse en conditions anaérobiques. Pour ce faire, les solutions (50 mL) ont été barbotées avec de l'azote durant une heure puis pour toute la durée du traitement. Les résultats de ce traitement sur la quantité de DIV ayant été oxydée et sur les produits formés sont présentés à la Figure 35.

L'oxydation du DIV par le $K_4Mo(CN)_8$ en absence d'oxygène semble former moins de benzaldéhyde que le traitement en conditions aérobiques. La quantité de véralaldéhyde formée correspond toutefois à celle du dimère ayant été oxydée, démontrant qu'il y a eu clivage quantitatif du composé modèle. Le mécanisme semble ainsi être quelque peu différent en absence d'oxygène au niveau de la nature des produits d'oxydation, même si le clivage $C\alpha-C\beta$ est toujours observé et ce, dans les mêmes proportions. Cette diminution de la quantité de benzaldéhyde formée peut s'expliquer par le schéma de la Figure 36. En retirant l'oxygène, la formation du radical II à partir du radical I est impossible. Le radical I pourrait donc emprunter d'autres voies et se dégrader en plusieurs fragments qui n'ont pas été détecté par l'analyse chromatographique dans les conditions utilisées. L'ouverture du cycle par exemple pourrait donner des produits non-aromatiques qui absorbent peu dans la fenêtre de 220 à 500 nm. Un fait intéressant à remarquer est que la quantité de dimère IV oxydé n'est pas diminuée par l'absence d'oxygène et que le dimère est clivé lors de la réaction. La faible quantité de benzaldéhyde détectée a pu être causée

par de l'oxygène demeurant en solution ou encore par une autre réaction de dégradation du radical I, avec H₂O par exemple.

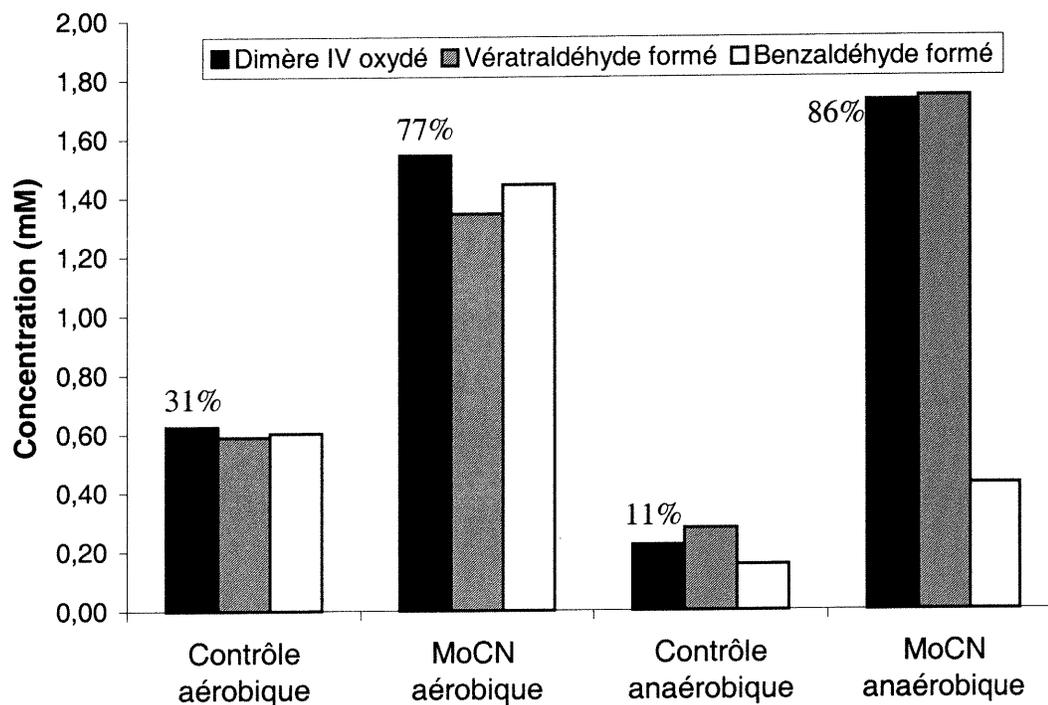


Figure 35. Oxydation électrochimique (750 mV vs Ag/AgCl) du dimère IV par le médiateur K₄Mo(CN)₈ en conditions aérobie et anaérobie. Le chiffre au-dessus des barres du dimère IV oxydé représente le % d'oxydation du dimère (concentration initiale de 2 mM). Les contrôles représentent un traitement sans médiateur.

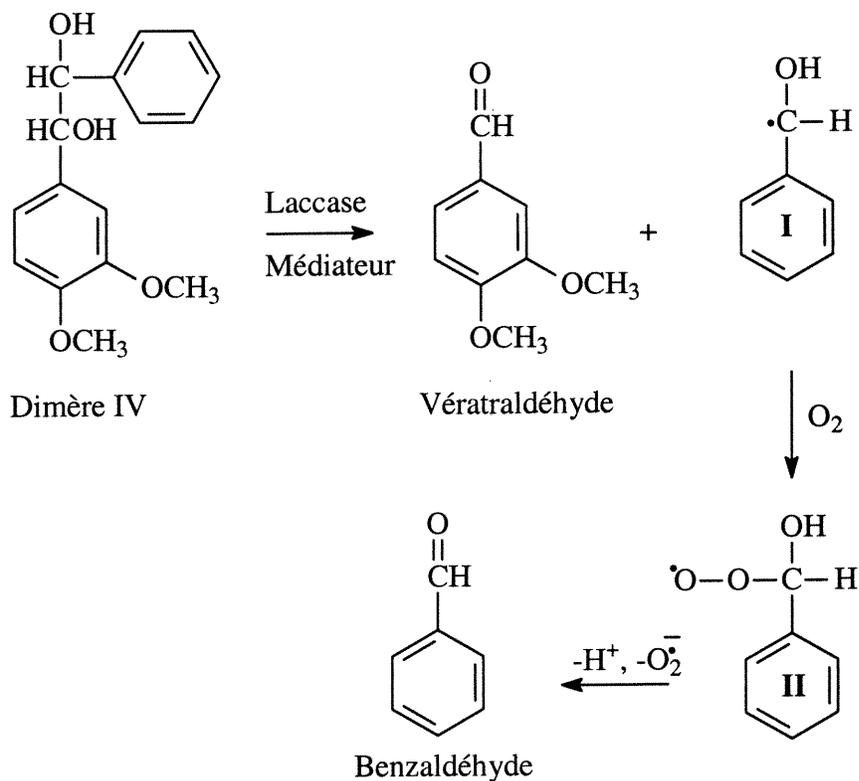


Figure 36. Chemin réactionnel expliquant la formation des produits d'oxydation benzaldéhyde et vératraldéhyde à partir du dimère IV en présence d'oxygène [118].

Une autre information intéressante peut être tirée du graphique de la Figure 35 en comparant ces résultats d'électrolyse avec ceux obtenus à la Figure 32. Pour des temps de réaction identiques, le pourcentage de dimère IV oxydé lors du contrôle sans médiateur augmente de 24 à 31 % lorsque le potentiel appliqué passe de 615 à 750 mV vs Ag/AgCl. En présence du médiateur $K_4Mo(CN)_8$, cette quantité passe de 37 à 77 %, une augmentation nettement supérieure à celle du contrôle. L'augmentation de la quantité de DIV oxydé ne peut donc être attribuée qu'à l'oxydation du dimère à l'électrode, ce qui démontre le rôle d'agent oxydant joué par le médiateur.

Il semblerait donc que le mécanisme d'oxydation du dimère IV le plus plausible serait une première oxydation par transfert d'électron vers le médiateur, suivi par une réaction avec l'oxygène pour former les deux produits de clivage

vératraldéhyde et benzaldéhyde. En absence d'oxygène, il se peut que la seconde oxydation ait lieu avec le médiateur ou par le biais d'une réaction avec l'eau.

3.2.4. Oxydation du dimère I

L'utilisation du dimère I comme composé modèle de la lignine est très répandue puisque les liaisons β -O-4, représentées par ce dimère, sont les plus abondantes. Ce dimère est plus difficile à oxyder que le dimère IV grâce à son potentiel d'oxydation plus élevé (voir Figure 33). Il est également beaucoup plus difficile à oxyder par les médiateurs et la plupart d'entre eux n'ont donné aucune oxydation significative à la suite d'un traitement de 24 heures en utilisant la laccase ou l'électrolyse. Les médiateurs les plus efficaces (ABTS et HBT) seront donc utilisés pour étudier l'oxydation de ce dimère.

Le HBT, lors des traitements enzymatiques, est plus efficace que l'ABTS puisqu'un peu plus du double de dimère I a été oxydé en utilisant le premier médiateur. Ceci est en accord avec les résultats d'expériences semblables publiés précédemment [112, 119]. Cet ordre se trouve toutefois inversé lorsque l'électrolyse est utilisée comme moyen d'oxyder les médiateurs. Les potentiels apparents des deux médiateurs HBT et ABTS sont peut-être mis en cause. Bien que le système laccase-HBT donne de meilleurs résultats qu'avec l'ABTS, il a été démontré, en évaluant le taux de consommation de l'oxygène par l'enzyme (une représentation du taux d'oxydation du substrat) que le HBT est oxydé beaucoup plus lentement que l'ABTS. L'ABTS en effet possède un E^0 inférieur au potentiel d'oxydation de la laccase ce qui favorise grandement son oxydation. Le HBT doit donc être plus réactif envers le dimère I que l'ABTS pour expliquer la plus grande quantité de dimère ayant été oxydé. En appliquant un potentiel de 900 mV vs Ag/AgCl, la grande majorité de l'ABTS est oxydé en dication ($ABTS^{2+}$) alors que la laccase ne forme que le cation radical. La forme dicationique est responsable de l'oxydation du dimère I puisqu'elle

est plus réactive alors que le cation radical n'oxyde pas ce CML, d'où la différence au niveau de la quantité de dimère I oxydé.

Au niveau des produits d'oxydation du DI, une différence majeure est survenue entre les méthodes électrochimique et enzymatique d'oxydation du médiateur. Aucun produit de clivage n'a été observé lorsque la laccase a été utilisée et la quantité de DVIII formé correspond à la quantité de DI oxydé (Tableau VII). Cependant, du vératraldéhyde est produit par l'oxydation électrochimique, signifiant qu'une fraction de DI a subi le clivage du lien C α -C β , suggérant une différence au niveau des mécanismes impliqués. L'identité du vératraldéhyde a été confirmée par comparaison du temps de rétention et du spectre UV-Visible du pic chromatographique avec celui de l'étalon. Plusieurs autres pics ont été observés sur les chromatogrammes des solutions d'électrolyse du DI. Ces pics correspondent probablement à plusieurs produits d'oxydation se retrouvant en quantités très petites par rapport au DVIII et au VId mais qui, tous ensemble, pourraient expliquer l'écart entre la quantité de DI oxydé et les quantités de DVIII et de VId formées. Ces produits secondaires n'ont pas été identifiés et la discussion suivante n'est basée que sur les deux principaux produits d'oxydation. Le contrôle électrochimique sans médiateur dans les mêmes conditions a également donné deux produits d'oxydation, bien qu'il n'y ait que très peu de dimère I ayant été oxydé.

Tableau VII. Oxydation du dimère I (concentration initiale de 2 mM) par un traitement enzymatique (laccase 0.5 U mL⁻¹) et électrolytique (E = 900 mV vs Ag/AgCl) en utilisant soit le HBT soit l'ABTS comme médiateur (0.5 mM).

Oxydation / médiateur	Dimère I oxydé (mM)	Dimère VIII formé (mM)	Vératraldéhyde formé (mM)
Laccase / contrôle ¹	0.00	n.d. ²	n.d.
Laccase / HBT	0.95	0.89	n.d.
Laccase / ABTS	0.39	0.42	n.d.
Électrolyse / contrôle	0.28	0.12	0.07
Électrolyse / HBT	0.85	0.30	0.16
Électrolyse / ABTS	1.68	0.20	0.65

¹ Le contrôle représente un traitement sans médiateur.

² n.d. signifie non détecté

L'oxydation du DI par les médiateurs pourrait se produire en deux étapes distinctes où un électron est retiré du dimère à chacune de ces étapes. Le fait que la réaction d'oxydation des CML implique un transfert de deux électrons a été rapporté par Bourbonnais *et coll.* [88] et par Majcherczyk *et coll.* [117]. Après avoir été oxydé par le médiateur, il est possible que le dimère I subisse une seconde oxydation directement à l'électrode. Cette oxydation électrochimique s'effectue peut être sur une partie différente de la structure du dimère que l'oxydation par le médiateur, résultant en la formation de divers produits d'oxydation, soit le clivage C α -C β plutôt que la cétonisation. Ceci est fortement plausible puisque les mêmes produits sont formés, en quantités moindres, lors du contrôle sans médiateur donc directement à la surface de l'électrode. Le médiateur ne semble pas être responsable de la réaction de clivage C α -C β puisqu'il n'y a que le dimère VIII qui est produit lors du traitement enzymatique. Le médiateur agirait donc comme un agent d'oxydation spécifique à une partie de la structure du dimère contrairement à l'électrode qui, elle est beaucoup moins sélective et doit engendrer plusieurs mécanismes différents menant à autant de produits d'oxydation.

3.2.4.1. Extraction alcaline

Il a été mentionné à la section 1.2.4. que les étapes de blanchiment doivent être suivies d'une extraction alcaline afin de solubiliser les groupements oxydés de la laccase. Un traitement alcalin a donc été effectué sur une solution de dimère I après son oxydation enzymatique en présence de HBT. Tel que démontré par les chromatogrammes de la Figure 37, le dimère VIII (résultat de l'oxydation du DI) subit une transformation suite à l'ajout de NaOH. La diminution de l'aire du pic du DVIII est de plus accompagnée de l'apparition de deux nouveaux pics, correspondants aux produits de l'hydrolyse alcaline de DVIII. Cette expérience a déjà été rapportée par Freudenreich [99] avec le même composé modèle. Les auteurs avaient alors rapporté un seul produit d'hydrolyse qui correspond à la formation d'un alcène au carbone γ . Il est cependant établi que l'ion hydroxyle puisse effectuer le

clivage en C α de certains composés modèles. Ceci pourrait être vérifié en isolant et en identifiant les deux produits correspondants aux pics du chromatogramme, ce qui n'a pu être réalisé faute de temps.

Le fait que le dimère I ne soit pas affecté par l'extraction (l'aire des pics demeure inchangée) suggère que l'efficacité de cette dernière soit très limitée si la pâte n'a pas subi de traitement de délignification. Le traitement enzymatique de la pâte kraft avec un médiateur oxyde donc la lignine qui, elle, est ensuite plus réactive envers la base utilisée pour l'étape d'extraction.

Finalement, l'oxygène n'a pas d'effet ni sur la nature ou la quantité des produits formés lors d'une extraction alcaline puisque le chromatogramme (non-montré) d'une solution dont l'extraction a été effectuée sous atmosphère d'azote est parfaitement superposable à celui en conditions aérobiques.

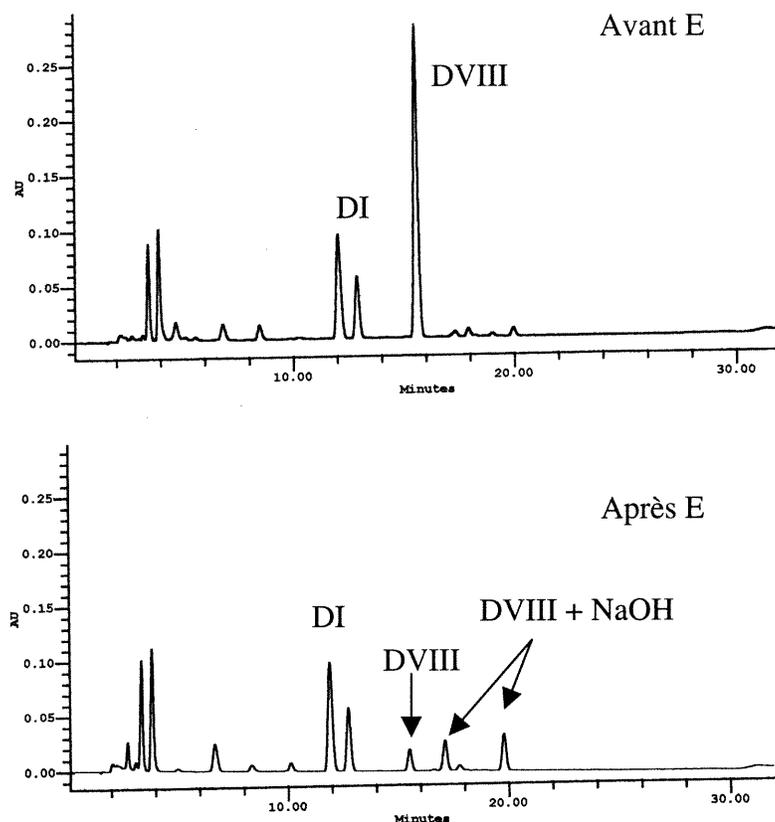


Figure 37. Effet de l'extraction alcaline (NaOH 0.1 M, à 75°C durant 90 minutes) sur le dimère VIII. Les pics à 3.5 et 4 minutes sont respectivement le HBT et le benzotriazole, un produit de décomposition du HBT.

3.2.4.2. Stéréosélectivité et effet de l'oxygène

Le chromatogramme du dimère I présente deux pics correspondant à ses deux diastéréomères, *érythro* et *thréo* (voir Figure 38), qui se retrouvent en quantités égales puisque la synthèse [120] de ce composé modèle produit un mélange racémique. Les isomères découlent de la présence de deux carbones asymétriques (α et β) sur le dimère. L'isomère *érythro* est le premier à être élué et l'ordre d'éluion des deux isomères a été confirmée par comparaison avec les travaux de Omori *et coll.* [121]. La lignine de conifère (épinette) contient également des quantités équivalentes de liaisons β -O-4 *thréo* et *érythro* [122]. Ces diastéréomères ont des différentes

réactivités face aux traitements de délignification et il est intéressant de remarquer que la sélectivité envers un isomère varie d'un type de traitement à un autre. Ainsi, la délignification au chlorate de sodium dégrade uniformément les deux isomères [123] alors qu'un traitement enzymatique avec la lignine peroxydase [124] ou à l'acide nitrique [125] oxydera préférentiellement l'isomère *thréo*.

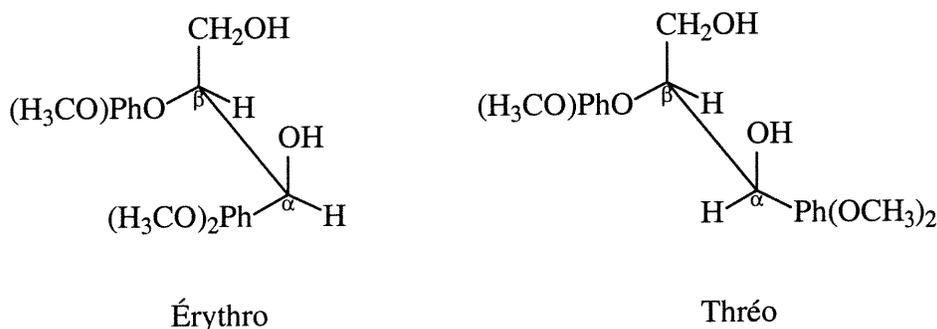


Figure 38. Structure des deux diastéréomères du dimère I. Les carbones α et β sont asymétriques.

En ce qui concerne les résultats obtenus lors de ce projet, l'oxydation enzymatique utilisant le HBT comme médiateur ne démontre pas de stéréosélectivité significative lorsqu'elle est réalisée en conditions aérobiques puisque l'aire des deux pics subissent pratiquement la même diminution (voir Figure 39). L'électrolyse pour sa part démontre une certaine, mais faible, sélectivité envers le *thréo* puisque la diminution du pic de cet isomère est plus importante que celle du pic de l'*érythro*. Toutefois si l'oxygène est retiré lors de l'oxydation électrochimique, la réaction en utilisant le HBT devient spécifique à l'isomère *thréo*. Cette stéréospécificité ne survient pas lorsque l'ABTS est utilisé comme médiateur, suggérant que l'oxygène ne soit pas directement impliqué dans les mécanismes d'oxydation du dimère I par le système laccase-médiateur. La différence des résultats obtenus en conditions anaérobiques provient plutôt d'un effet de l'oxygène sur le médiateur lui-même. En effet, selon Aurich et Weiss [126], le HBT oxydé en présence d'oxygène forme le

benzotriazolyl-1,3-dioxyde (BTD, Figure 40). En retirant l'oxygène la formation de ce dioxyde est prévenue et la forme oxydée du HBT sera le benzotriazolyl-1-oxyde (BTO). Il semble donc que le BTO ne puisse réagir qu'avec la forme *thréo* du dimère I.

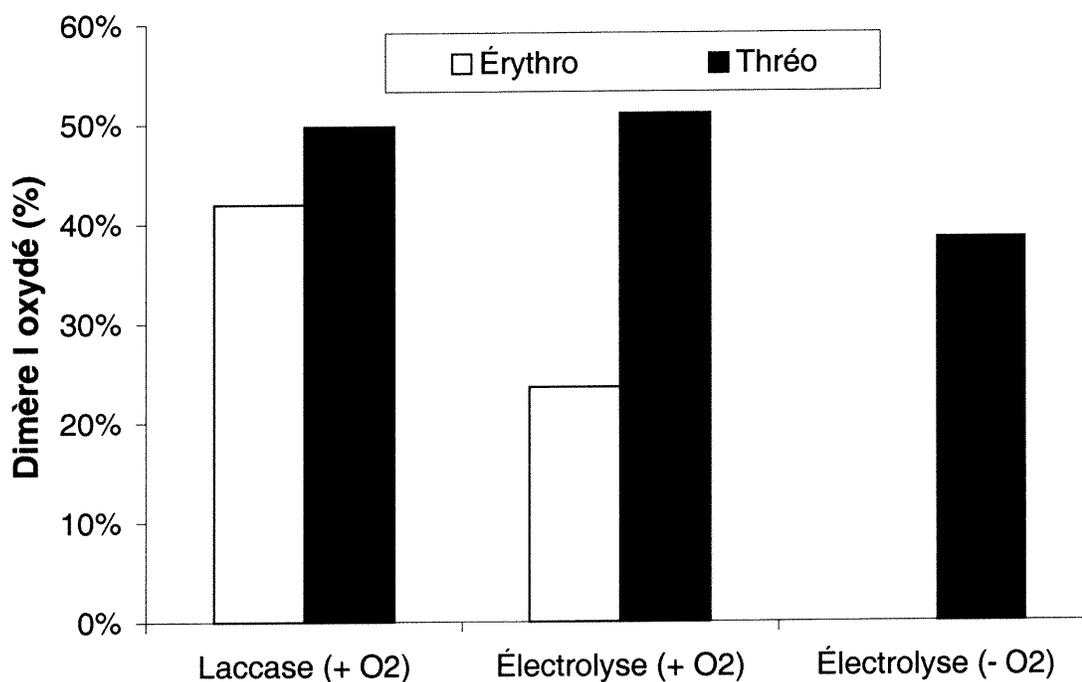


Figure 39. Impact de l'oxygène sur la stéréosélectivité de l'oxydation électrochimique (900 mV vs Ag/AgCl) du dimère I (2 mM) par le HBT (0.5 mM). L'oxydation par la laccase doit impérativement être effectuée en présence d'oxygène.

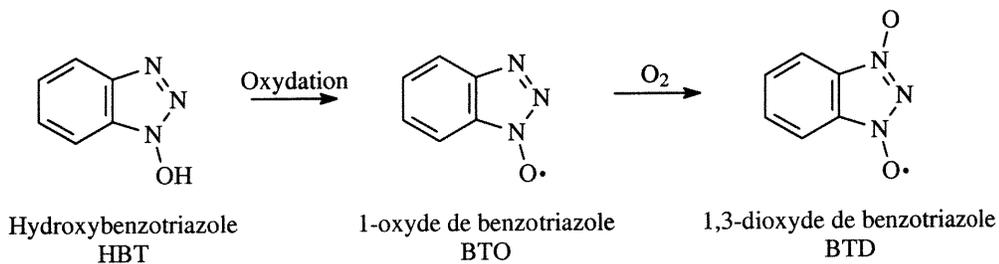


Figure 40. Formes du médiateur HBT lorsqu'il est oxydé en présence d'oxygène.

Cette stéréospécificité amène un nouvel élément de preuve pour l'élucidation des mécanismes d'oxydation des composés modèles. Si, sous certaines conditions, il y a des différences dans la réactivité des deux isomères *thréo* et *érythro*, c'est qu'il doit y avoir une réaction avec la chaîne interphénylpropane. Les différentes conformations que les isomères peuvent adopter démontrent que le diastéromère *thréo* adopte une forme plus étendue que l'*érythro* [127]. Cette conformation étendue cause une plus grande exposition des carbones de la chaîne interphénylpropane. La conformation repliée qui est préférablement adoptée par l'*érythro*, rend la chaîne interphénylpropane inaccessible, expliquant pourquoi l'*érythro* n'est pas oxydé. De plus, ceci suggère que le transfert d'électrons menant à l'oxydation des composés modèles s'effectue au niveau de la chaîne interphénylpropane. En effet, si ce transfert devait avoir lieu au niveau des cycles aromatiques, il ne devrait pas y avoir de grande différence dans la réactivité des isomères car les phényles sont toujours accessibles à l'agent oxydant puisqu'ils sont peu encombrés.

L'oxydation du dimère I s'effectuerait donc par deux transferts successifs de un électron, à partir de la chaîne interphénylpropane ($C\alpha$). Contrairement au dimère IV, l'oxygène ne semble pas affecter directement la réaction d'oxydation du dimère I. La réaction est légèrement stéréosélective envers l'isomère *thréo*.

3.2.5. Oxydation de l'alcool vératrylique

Ce composé modèle monomérique (une seule unité aromatique) représente une fonction alcool en $C\alpha$ et forme, lorsqu'il est oxydé, le véatraldéhyde. Le VA possède un potentiel d'oxydation similaire à celui du dimère I et il n'y a que les médiateurs très efficaces dans l'oxydation des CML comme le HBT et l'ABTS, qui, en utilisant laccase, peuvent oxyder le VA. D'autres médiateurs, comme les complexes de fer-bipyridine et l'hexacyanoruthénate devraient également être en mesure d'oxyder le VA puisqu'ils possèdent un potentiel normal apparent élevé. Ils

sont toutefois inefficaces lorsqu'ils sont utilisés avec la laccase (voir Tableau VIII). Lorsque l'électrolyse a été utilisée comme moyen d'oxyder le $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$, la totalité du VA a subi une oxydation, suggérant une bonne efficacité de ce médiateur pour la délignification. Son mauvais fonctionnement avec la laccase est probablement causé par son faible taux d'oxydation par l'enzyme. La quantité de $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$ ayant été oxydé par la laccase après une période de 24 heures est trop faible pour provoquer une oxydation significative du composé modèle. Ceci est dû à la faible interaction existant entre $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$ et le site actif de l'enzyme.

Bien que le $[\text{Fe}(\text{dmbpy})_3](\text{ClO}_4)_2$ ait un E^0 similaire à celui du $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$, son effet sur le VA est beaucoup plus limité. Le potentiel normal apparent du médiateur n'est donc pas le seul critère déterminant l'efficacité d'un médiateur. Le E^0 impose des limites aux réactions de transfert d'électrons impliquant le médiateur (voir section 1.3.3.) ce qui permet d'éliminer rapidement les composés dont le potentiel ne se situe pas dans la plage de potentiels souhaitée. Les composés possédant un E^0 dans cette plage peuvent, pour d'autres raisons, être inefficaces. C'est le cas pour le $[\text{Fe}(\text{dmbpy})_3](\text{ClO}_4)_2$. Ce type de complexe du fer n'est oxydé que très lentement par la laccase, limitant la réaction avec les CML et la lignine. L'oxydation électrochimique de ce composé permet toutefois d'établir si le transfert d'électron avec les CML est aussi défavorisée.

Tableau VIII. Quantité de VA ayant été oxydée (concentration initiale de 2 mM) par un traitement d'oxydation de 20 heures avec des médiateurs (0.5 mM) ayant un potentiel normal apparent élevé.

Médiateur (E^0 , mV) ¹	Oxydation enzymatique Laccase 0.5 U•mL ⁻¹ (mM)	Oxydation électrochimique E = 900 mV vs Ag/AgCl (mM)
HBT (850) ²	1.10	0.99
FeDMBY (689)	0.01	0.31
$\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$ (684)	0.01	1.98

¹ Les contrôles sans médiateur n'ont donné aucune oxydation du VA.

² Potentiel de la vague d'oxydation (système irréversible).

Le HBT, contrairement aux autres médiateurs du Tableau VIII est capable d'oxyder le VA lors d'un traitement enzymatique. Puisqu'en absence d'enzyme le HBT ne produit aucune oxydation du composé modèle, il doit être efficacement oxydé par la laccase contrairement à $[\text{Fe}(\text{dmbpy})_3](\text{ClO}_4)_2$ et $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$. L'oxydation du HBT est probablement accéléré par une interaction favorable du médiateur avec le site actif de l'enzyme, ce qui n'est pas le cas pour les complexes de métaux de transition. Il est cependant difficile de comparer les médiateurs du point de vue de leur potentiel car le HBT s'oxyde irréversiblement. Le potentiel montré au Tableau VIII est le potentiel du sommet de la vague d'oxydation du voltampérogramme enregistré à l'électrode de carbone vitreux. Le potentiel E^0 du HBT, une valeur thermodynamique n'est donc pas connue.

Lors de l'oxydation électrochimique, il y a deux fois moins de VA qui a été oxydé en utilisant le HBT que le $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$. Le HBT n'est pas stable sous sa forme oxydée et il est connu pour former des produits de dégradation comme le benzotriazole, qui est inerte envers l'alcool vératrylique [88]. La grande stabilité de l'état oxydé des complexes comme le $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$ s'avère ainsi un avantage important. La réaction avec la forme oxydée radicalaire du HBT est probablement plus rapide que le transfert d'électrons des complexes de coordination, mais se termine plus vite, faute de médiateur.

Une dernière expérience a été effectuée avec l'alcool vératrylique dans le but de démontrer que l'espèce active du système laccase-médiateur est le médiateur. Le $\text{K}_4\text{Ru}(\text{CN})_6$ a été utilisé puisqu'il peut oxyder efficacement le VA et que sa forme oxydée est stable. Une expérience semblable a déjà été réalisée par Bourbonnais et Paice [52] au cours de laquelle une solution d'ABTS a été soumise à l'oxydation par la laccase, filtrée sur une membrane afin de retirer l'enzyme, puis mise en contact avec le VA. Cette expérience n'avait donné aucune oxydation du VA, puisque le cation radical, formé par la laccase, est inefficace pour oxyder ce CML. Par contre, si l'ABTS est oxydé par électrolyse à un potentiel suffisamment élevé pour produire le dication (900 mV vs Ag/AgCl), 38% de VA est oxydé (après 20 heures) [88]. Dans

le cas présent, une solution de $K_4Ru(CN)_6$ a été oxydée par électrolyse, retirée de la cellule d'oxydation puis mise en contact avec l'alcool vératrylique. Le médiateur oxydé demeure stable quelques jours, à en juger par la persistance de la couleur de la solution. En proportions égales de médiateur et de VA, aucune oxydation du composé modèle n'a été observée. Cependant, en augmentant le ratio des concentrations à 50 pour 1 ($K_4Ru(CN)_6/VA$), 27 % du CML a été oxydé après 20 heures. Le médiateur dans son état réduit n'a donné aucune oxydation du VA et cela, même en utilisant le ratio de 50 pour 1. C'est donc le médiateur, une fois oxydé, qui effectue l'oxydation des composés modèles, autant dans le cas des médiateurs organiques que des complexes de coordination.

Comment expliquer le fait qu'en utilisant le médiateur à une concentration identique à celle du VA, aucune oxydation n'est observée? Le transfert d'électrons d'une espèce possédant un potentiel normal apparent élevé (composé modèle) vers une espèce avec un E^0 (médiateur) plus bas est une réaction thermodynamiquement défavorisée, qui ne sera pas spontanée. Pour que cette réaction se produise, il faut appliquer une force qui poussera l'équilibre vers la formation des produits, c'est-à-dire l'oxydation du composé modèle par le médiateur. Le taux d'oxydation du VA par $K_4Ru(CN)_6$, à des concentrations identiques et en absence d'un moyen de forcer la réaction, est trop lent pour pouvoir observer une oxydation significative. En utilisant 50 fois plus de médiateur que de VA, la réaction d'oxydation se trouve forcée et le taux est suffisamment élevé pour détecter une diminution de la quantité d'alcool vératrylique. D'une même façon, une concentration minimale de médiateur (0.5 mM) peut oxyder le VA (2 mM) si un moyen d'oxyder le médiateur de façon soutenue est utilisé. Ce rôle peut être tenu par la laccase, en présence continue d'une quantité suffisante d'oxygène, ou par une électrode à laquelle un potentiel est appliqué. Le médiateur sous forme oxydé est donc l'agent qui oxyde les composés modèles mais pour que le taux d'oxydation des CML soit significatif, il doit être utilisé en conjonction avec un moyen de l'oxyder de façon continue. Cette observation doit s'étendre à l'oxydation de la pâte et l'oxydation continue du médiateur se doit

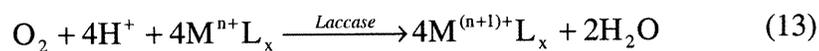
d'être à la base de tout système de délignification. Ceci sera donc pris en compte dans le développement du système d'électrodélignification de la section 3.4..

En conclusion de ce chapitre, il convient de mentionner que certains médiateurs se sont démarqués par leur efficacité à oxyder les composés modèles de la lignine. Le médiateur $K_4Mo(CN)_8$ est efficace avec le dimère IV lorsqu'il est oxydé électrochimiquement. Le $Ru(CN)_6$, également oxydé électrochimiquement, est capable d'oxyder l'alcool vératrylique. Il reste toutefois à étudier les raisons qui font que certaines réactions ne fonctionnent pas. L'étude de la vitesse de transfert d'électrons, présentée au chapitre suivant, pourra fournir plus d'informations sur les réactions du système laccase-médiateur.

3.3. Étude du transfert d'électrons

La notion d'échange (ou transfert) d'électrons a été abordée à quelques reprises jusqu'à maintenant sans toutefois avoir été expliquée en profondeur. Les résultats des expériences décrites dans les sections 3.1. et 3.2. peuvent difficilement être interprétés pour évaluer la vitesse de transfert d'électrons des réactions menant à l'oxydation de la pâte ou des composés modèles de la lignine. En effet, les traitements ont été effectués sur des périodes de plusieurs heures (20 heures par exemple pour l'étude des CML) afin de s'assurer d'une quantité suffisante de produits d'oxydation pour l'analyse. Le pourcentage de délignification obtenu lors des traitements de la pâte ainsi que le pourcentage d'oxydation des CML sont des résultats difficilement utilisables pour l'évaluation de la vitesse de transfert des électrons. Si la réaction d'oxydation est très rapide, il se peut que le résultat obtenu ait été atteint dans les premières heures ou dans les premières minutes de la réaction. Puisque dans ces expériences il n'a été tenu compte que de la valeur finale de délignification ou du pourcentage d'oxydation mesurée après 2 et 20 heures (respectivement), il est difficile d'en extraire des informations utiles pour l'évaluation de la vitesse de transfert d'électrons.

Le système laccase-médiateur utilisé pour effectuer les traitements est complexe puisqu'il comporte en tout quatre éléments différents, l'oxygène, la laccase, le médiateur et la lignine (ou CML). L'oxydation de la lignine s'effectue donc par une série de réactions de transferts d'électrons, rendant impossible l'évaluation de la cinétique de chacune de ces réactions à partir d'un seul résultat de délignification. Un mécanisme simplifié de ces réactions est présenté par les équations 13 et 14.



L'équation 13 est la représentation la plus simple de la réaction d'oxydation du médiateur par la laccase. Dans le cas présent, il s'agit d'un composé de coordination formé de l'ion métallique M^{n+} et du ligand L (au nombre de x). Le rôle de catalyseur de la laccase apparaît clairement dans cette réaction chimique. L'enzyme se retrouve à son point de départ après avoir oxydé quatre équivalents de substrat pour la réduction d'un équivalent d'oxygène. L' O_2 est ainsi le véritable agent oxydant dans cette réaction. Le mécanisme de transfert d'électrons ayant lieu entre l'oxygène, la laccase et le médiateur est en fait un cycle à neuf étapes dont l'équation 13 ne représente que l'équation globale. Le lecteur intéressé pourra trouver un schéma détaillé dans l'article de Solomon *et coll.*[34]. Il est également difficile de détailler l'équation 14 puisque les groupements des composés modèles impliqués dans l'oxydation ne sont pas établis avec certitude. L'oxydation de la lignine est d'autant plus complexe qu'il y a plusieurs groupements oxydables et que la structure même de la lignine varie de façon significative d'une espèce de bois à une autre [128].

Cette complexité limite l'étude de l'effet des conditions utilisées puisque si, par exemple, un changement de pH provoque une diminution de l'efficacité du système, il est difficile de statuer si c'est la réaction entre la laccase et le médiateur ou celle entre le médiateur et la lignine qui est défavorisée. Bref, pour aller plus loin que la vue d'ensemble donnée par les traitements de la pâte et des composés modèles, une étude détaillée de chacun des échanges d'électrons du système laccase-médiateur-lignine est souhaitable.

La littérature comporte plusieurs articles portant sur la mesure de la vitesse d'oxydation de certains composés modèles de la lignine par les médiateurs. L'oxydation d'une fonction $C\alpha-OH$ en $C\alpha=O$ (voir Figure 25 à la section 3.2.) sur des composés apparentés à la structure de la lignine par l'octacyanomolybdate(V) ($K_4Mo(CN)_8$) a été étudiée bien avant que ce composé ait été démontré comme étant un bon médiateur pour la délignification [129]. Ces méthodes ne sont toutefois que très rarement basées sur l'électrochimie, bien qu'il s'agisse de transfert d'électrons. La

polarographie a été utilisée depuis très longtemps (plus de 30 ans) pour caractériser la structure de la lignine [130-132]. Puisque le potentiel des vagues de réduction des groupements polarographiquement actifs de la lignine varie avec la nature et l'emplacement des substituants selon des modèles bien établis [133], il est possible d'en déduire certaines structures. La polarographie est toujours utilisée aujourd'hui pour l'étude des liaisons chimiques de la lignine [134] et des composés modèles de la lignine [134-136]. Cette technique étant difficilement utilisable pour mesurer des paramètres cinétiques de transfert d'électrons, la voltampérométrie à onde cyclique a pris de plus en plus de place dans l'étude des réactions médiateur-CML, permettant une analyse plus complète de ces réactions [88, 136, 137].

Les réactions de transfert d'électrons impliquant directement la pâte sont beaucoup plus difficiles à étudier, pour les raisons mentionnées à l'introduction de la section 3.2.. Tong *et coll.* [138] ont suggéré une méthode semblable à celle utilisée pour la mesure de l'indice kappa basée sur la quantité de permanganate de potassium consommé pour calculer le nombre d'électrons nécessaire à l'oxydation de la pâte. L'étude de la vitesse de transfert d'électrons des réactions d'oxydation de la pâte peut aussi être abordée en terme de variation de l'indice kappa en fonction du temps. Ceci a été démontré pour la délignification à l'oxygène [139, 140] ainsi que par le système laccase-médiateur [141]. Le taux de consommation de l'oxygène par la laccase a également été utilisé pour l'étude de la cinétique des réactions d'oxydation de la pâte [142], des composés modèles [102] et des médiateurs [49]. Finalement, l'oxydation catalytique d'un substrat par la laccase peut être étudiée par des méthodes spectrophotométriques (suivi de l'oxydation du substrat par changement dans son spectre d'absorption) [42, 143, 144] et par des méthodes électrochimiques [32, 145, 146].

Les paramètres qui seront utilisés ici pour évaluer la vitesse des transferts d'électrons entre les éléments du système laccase-médiateur sont les constantes de vitesse de pseudo-premier et de second ordre. Ces constantes ont été mesurées par voltampérométrie à onde cyclique. Puisque la concentration active de laccase n'est

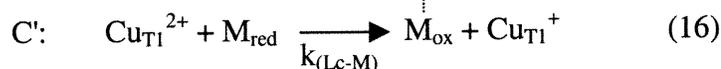
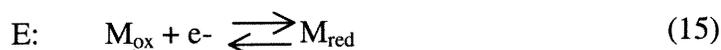
pas accessible, il est impossible de calculer la constante de vitesse pour la réaction de second ordre de l'équation 16. Par contre, en utilisant un excès d'oxygène, une activité fixe de laccase ainsi qu'une concentration constante de médiateur, il est possible de calculer la constante de vitesse pour la réaction de pseudo-premier ordre. Ces valeurs sont peu représentatives des véritables paramètres cinétiques des réactions, mais elles permettent toutefois de comparer de façon valable les vitesses de transfert d'électrons des différents médiateurs.

Les k_f , constantes de vitesse de pseudo-premier ordre, représentent la vitesse de la réaction d'oxydation présentée à l'équation 13. Dû à la complexité du système étudié la mesure de ces constantes n'a pas pour but d'obtenir des valeurs absolues de cinétique de transfert d'électron mais plutôt de se munir d'un outil. Les k_f ont été choisis comme outil parce qu'elles sont facilement mesurables en utilisant la voltampérométrie à onde cyclique et que le système d'oxydation, basé sur des transferts d'électrons, se prête parfaitement à leur mesure. En comparant la variation des k_f en fonction des différentes conditions, l'impact de ces conditions sur la vitesse du transfert d'électrons (donc l'efficacité) du système sera évalué.

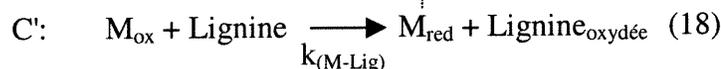
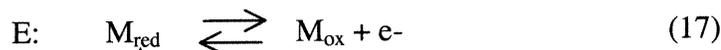
3.3.1. Utilisation de la VOC pour l'étude des transferts d'électrons

Il n'a été question dans la présentation de la voltampérométrie à onde cyclique (section 2.8.) que du cas où il n'y a qu'une seule espèce en solution. Lorsqu'une deuxième espèce est ajoutée et qu'elle est susceptible de réagir avec l'espèce électroactive, la forme du voltampérogramme s'en trouve fortement altérée (voir Figure 41). Ce type de réaction est classifiée comme réaction chimique homogène couplée à une réaction à l'électrode. La lettre C représente la réaction chimique homogène (en solution) alors que la lettre E signifie le transfert d'électrons se produisant à la surface de l'électrode, qui est hétérogène. Plusieurs types de réactions couplées peuvent se produire à partir d'un transfert d'électron(s). Les trois différentes expériences qui ont été réalisées lors de ce projet et qui seront présentées

dans cette section entrent dans la catégorie catalytique puisque le médiateur, étant électrochimiquement et chimiquement réversible, est régénéré sous sa forme initiale suite à ces réactions. Ce type de système a été décrit en détails par Andrieux et Savéant [147]. La réaction catalytique est symbolisée par EC' et les mécanismes appliqués pour décrire le système laccase-médiateur-lignine, sont démontrés par les équations 15 à 18 [86]. Deux types de réactions impliquant le médiateur sont nécessaires pour avoir une représentation du système complet. Il y a d'abord la réaction d'oxydation du médiateur (M) par la laccase (site cuivre T1) (section 3.3.2.):



et ensuite la réaction d'oxydation par le médiateur (M) de la lignine (section 3.3.4.) ou des composés modèles de la lignine (section 3.3.3.):



La vitesse à laquelle les réactions 16 et 18 se produisent est représentée par leur constante de vitesse de pseudo-premier ordre, k_f , respective ($k_{f(\text{LC-M})}$ et $k_{f(\text{M-Lig})}$), valeurs qui seront utilisées pour comparer l'efficacité des différents systèmes étudiés. Bien que ces réactions impliquent deux réactifs, les k_f mesurées sont des constantes de vitesse dites de pseudo-premier ordre, puisqu'un des deux réactifs a été ajouté en quantité excessive (donc constante) par rapport à l'autre. La concentration de ce réactif demeurant à toutes fins pratiques constante tout au long de la réaction, elle n'est pas impliquée dans l'équation de vitesse ce qui revient à une équation du premier ordre, d'où la désignation pseudo-premier ordre. Dans le cas présent, la

lignine et la laccase sont respectivement en excès par rapport à la quantité de médiateur présent et les constantes k_f seront calculées selon la méthode qui est décrite plus loin. Cette méthode se base sur la mesure par voltampérométrie à onde cyclique d'un courant catalytique résultant de la régénération de la forme initiale du médiateur, qui est symbolisée par la flèche en traits pointillés des équations 15 à 18. Ceci nous ramène donc à la description d'un voltampérogramme résultant de réactions homogènes couplées à un transfert d'électrons, tel que celui présenté à la Figure 41.

3.3.1.1. Mesure de la constante de pseudo-premier ordre

La Figure 41 comporte à la fois le voltampérogramme enregistré avec une solution du médiateur octacyanomolybdate ($K_4Mo(CN)_8$) seul et celui enregistré après avoir ajouté 5 unités de laccase (Lc) à la solution. La forme de la courbe en pointillée est typique d'une réaction de type EC' [148]. Deux phénomènes sont à remarquer sur la courbe en présence de laccase: l'augmentation du courant de réduction (cathodique) et la disparition du pic attribué au courant d'oxydation (anodique).

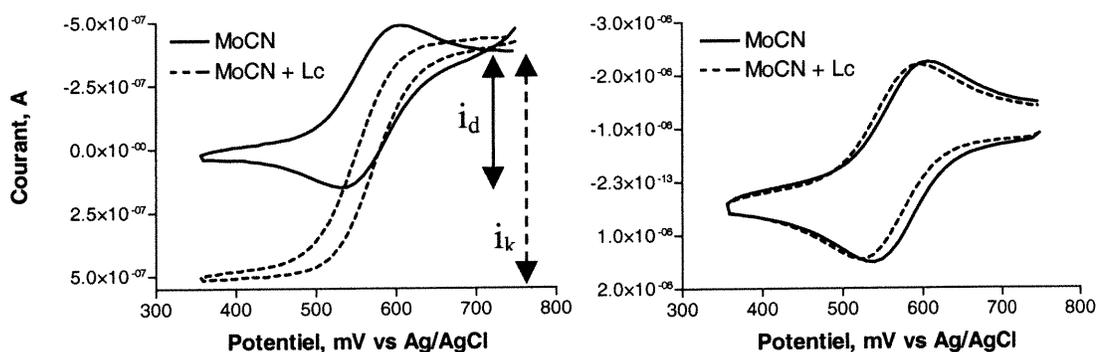


Figure 41. Voltampérogrammes démontrant l'effet catalytique de l'enzyme laccase sur l'oxydation du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ (MoCN). Le courant catalytique est remarquable sur le voltampérogramme de gauche enregistré à une vitesse de balayage de 2 mVs^{-1} mais absent sur celui de droite parce que la vitesse (50 mVs^{-1}) est trop grande par rapport à l'oxydation enzymatique.

Ces deux phénomènes sont le résultat de l'oxydation du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ par la laccase. En effet, si le transfert d'électrons s'effectuant du médiateur à l'enzyme est suffisamment rapide, l'oxydation se fera par l'enzyme et non par l'électrode, causant la disparition du pic anodique sur le voltampérogramme. De la même manière, puisque l'enzyme est toujours disponible (tant qu'il y aura de l'oxygène) pour oxyder le médiateur, dès que ce dernier est réduit à la surface de l'électrode, le médiateur est aussitôt réoxydé par la laccase puis réduit à nouveau à l'électrode. Si la vitesse de balayage est trop élevée (voir Figure 41b), l'enzyme n'a pas assez de temps pour oxyder le médiateur avant que le potentiel soit retourné à des valeurs suffisamment élevées et l'oxydation se produit à l'électrode. Le voltampérogramme est alors identique à celui enregistré sans enzyme. Pour un balayage à une vitesse donnée, plus la cinétique d'oxydation enzymatique du médiateur est rapide, plus il y aura de réoxydation du médiateur, causant une plus grande augmentation du courant de réduction. Ceci peut également être expliqué en termes des cycles du schéma présenté à la Figure 42. Plus la laccase oxyde rapidement le médiateur, plus il y aura de cycles de complétés et plus d'électrons auront été transférés de l'oxygène vers l'électrode. Le courant de réduction du médiateur sera donc plus élevé. Cet effet est catalytique puisque plusieurs cycles doivent être complétés pour avoir une augmentation du courant telle que celle de la Figure 41a. Le courant du voltampérogramme se nomme donc courant catalytique (i_k) alors que s'il n'y a pas d'effet catalytique (médiateur seul), le courant est le courant de diffusion (i_d) tel que décrit à la section expérimentale.

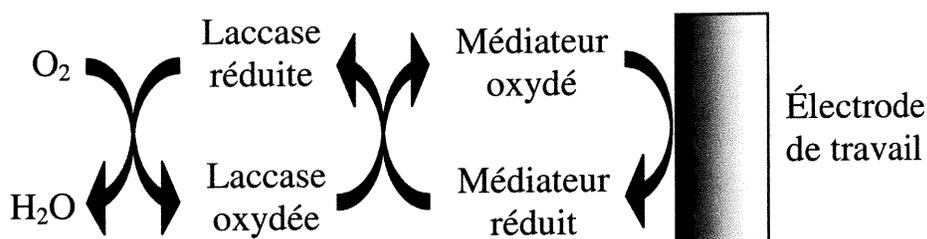


Figure 42. Représentation du cycle d'oxydation du médiateur par la laccase en présence d'oxygène. Les électrons sont captés par l'électrode créant un courant dit catalytique.

Le courant catalytique i_k , mesuré à une v donnée, sera donc plus grand pour un système dont la cinétique est plus rapide. Le ratio des courants i_k/i_d peut donc être relié à la constante de vitesse de la réaction d'oxydation. La méthode pour déterminer ces constantes de vitesse pour le système enzyme-substrat a été développée par Cass *et coll.* [74] pour la glucose oxydase en présence du ferrocène comme médiateur. Cette méthode découle des recherches de Nicholson et Shain [148] sur les principes fondamentaux de la voltampérométrie à onde cyclique. Cet article [148] démontre entre autre comment le ratio du courant catalytique sur le courant de diffusion est relié au paramètre k_f/a (voir Figure 43a).

La méthode consiste donc à mesurer le courant de diffusion i_d du médiateur en utilisant une solution dans laquelle il se trouve seul. Le courant de diffusion est mesuré à différentes vitesses de balayage (v). Une quantité connue et précise de laccase est ensuite ajoutée à la solution de médiateur. Le courant catalytique i_k est mesuré par voltampérométrie à onde cyclique à chacune des vitesses de balayage utilisées pour mesurer i_d . Le ratio i_k/i_d est ensuite calculé pour chaque vitesse de balayage. La valeur de k_f/a pour les ratios i_k/i_d de chaque vitesse est tirée du graphique de la Figure 43a. La relation existant entre le ratio i_k/i_d et k_f/a a été établie pour plusieurs systèmes catalytiques par Nicholson et Shain [148]. Pour un système EC', catégorie dans laquelle se situe notre système, cette relation est donnée par le graphique de la Figure 43a. La valeur du facteur a est relié à v (en $V s^{-1}$) par l'équation suivante:

$$a = nFv / RT \quad (19)$$

où n est le nombre d'électrons échangés lors de la réaction catalytique, F , la constante de Faraday, R est la constante des gaz parfaits et T la température sur l'échelle de Kelvin. En portant en graphique les valeurs de k_f/a en fonction de l'inverse de la vitesse de balayage à laquelle elles ont été mesurées, il est possible d'extraire la constante k_f à partir de la pente (m) de ce graphique en utilisant l'équation 20. Un exemple d'un tel graphique est présenté à la Figure 43b. Dans ce cas, la pente

équivalent à $3.03 \times 10^{-3} \text{ V s}^{-1}$ ce qui, une fois entré dans l'équation 20, donne une valeur de $k_f(\text{Lc-M})$ de 0.12 s^{-1} .

$$k_f = mnF / RT \quad (20)$$

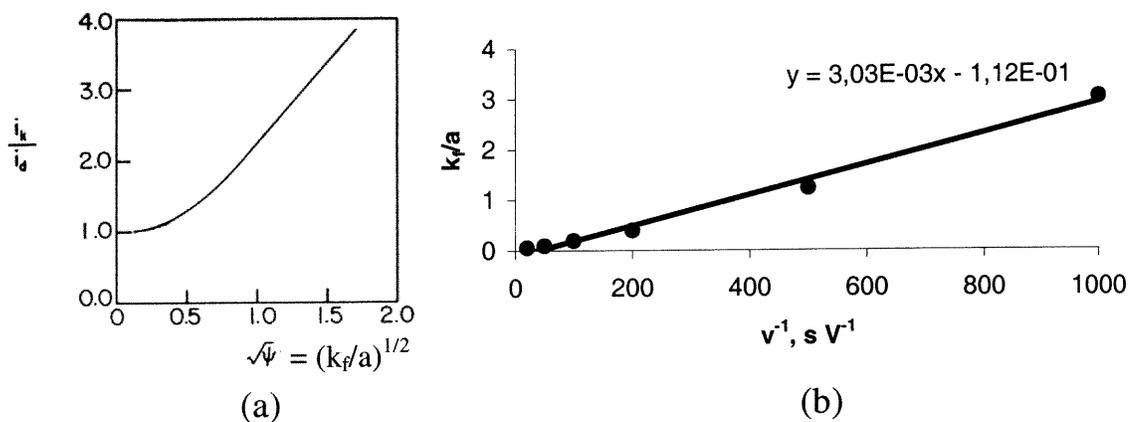


Figure 43. Calcul des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre. En (a) se trouve le graphique, résultant des travaux de Nicholson et Shain [148] permettant de relier le ratio des courants à k_f/a . La pente du graphique en (b) permet le calcul de k_f pour l'oxydation du $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ (0.2mM) par la laccase (5 μmL^{-1}), tampon citrate 100mM à pH 3.0.

3.3.1.2. Mesure de la constante de second ordre

Il est possible de déterminer la constante catalytique de second ordre, k_{cat} [74] à partir de k_f .

$$k_{\text{cat}} = k_f / [\text{Lc, Lig ou CML}] \quad (21)$$

La méthode suivie pour l'évaluation des k_{cat} consiste à mesurer les k_f à différentes concentrations molaires de laccase, lignine ou composé modèle, selon le type de réaction étudiée. Les valeurs de k_f sont ensuite portées en graphique en fonction de la concentration du réactif à laquelle elles ont été mesurées. La pente de ce graphique équivaut à la constante de vitesse de second ordre pour la réaction.

Puisque la concentration des deux réactifs est nécessaire au calcul de la constante de second ordre, il ne sera possible d'utiliser cette constante que pour la réaction médiateur-composé modèle. En effet, il a été expliqué à la section 2.3.1. que la concentration molaire active de la laccase ne pouvait être connue avec certitude.

Il a également été démontré que la lignine possède une structure polymérique complexe et irrégulière, ce qui ne permet pas d'évaluer une concentration (molaire) précise des groupements oxydables de la pâte. Il n'y a donc que pour la réaction d'oxydation des composés modèles de la lignine que des valeurs de k_{cat} pourront être calculées.

3.3.2. Réaction d'oxydation laccase-médiateur

Un avantage marqué de l'utilisation de la voltampérométrie à onde cyclique pour effectuer les mesures de la vitesse de transfert d'électrons des réactions laccase-médiateur est la simplicité de la méthode. Les voltampérogrammes à différentes vitesses de balayage ($v = 1, 2, 5, 10, 20$ et 50 mVs^{-1}) sont d'abord enregistrés dans les solutions tampon contenant 0.2 mM de médiateur (volume total de 5 mL). À des vitesses plus grandes que celles-ci, le courant catalytique est bien souvent négligeable et aucune modification du voltampérogramme n'est notable (voir Figure 41). Une quantité précise et constante de laccase (5 U mL^{-1}) est ajoutée puis le balayage est repris à chacune des vitesses mentionnées. Le balayage débute à un potentiel initial élevé puis le potentiel est diminué lentement. Ceci est réalisé pour faciliter l'évaluation du courant catalytique de réduction en évitant d'avoir un courant

initial non-nul puisqu'en ajoutant l'enzyme le médiateur se trouve à être oxydé. Les ratios i_k/i_d sont calculés pour chaque vitesse de balayage puis le k_f est calculé selon la méthode décrite à la section 3.3.1.1..

3.3.2.1. Effet du pH

Le pH de la solution peut affecter tous les éléments du système laccase-médiateur, de la réaction de l'oxygène avec le site T2/T3 à celle du substrat avec le site T1. Les propriétés thermodynamiques comme E^0 et la réversibilité des réactions d'oxydation du médiateur peuvent dans certains cas être modifiées en changeant le pH. Le potentiel normal apparent de certains médiateurs de type N-OH comme le NHA et l'acide violurique diminue en augmentant le pH [55]. Cette diminution peut atteindre jusqu'à 200 mV de pH 4 à pH 10, ce qui causera des différences importantes au niveau de la réactivité de ce médiateur puisque plus la valeur de ΔE^0 (entre la laccase et le médiateur) est grande, plus l'oxydation est favorisée. Il n'y a pas que les médiateurs avec une fonction pouvant échanger un proton qui possèdent un E^0 variant avec le pH. Le graphique de la Figure 44 démontre que si les potentiels normaux apparents de $K_4Mo(CN)_8$ et de l'ABTS sont pratiquement indépendants des changements de pH, celui du $Fe(CN)_6^{3-/4-}$ subit une forte diminution en augmentant le pH. Ce comportement s'explique par le fait que certaines formes protonées du ferrocyanure comme $H_2Fe(CN)_6^{2-}$ existent à bas pH [149]. Le potentiel de ce genre de complexe est plus élevé que le ferrocyanure non-protoné, ce qui cause l'augmentation du E^0 avec une diminution de pH [150]. Les conditions utilisées peuvent donc avoir une grande importance sur les propriétés des médiateurs. Ainsi, même si le E^0 du $K_4Mo(CN)_8$ est peu sensible au pH, il sera démontré au chapitre 3.4. que sa réversibilité diminue aux pH élevés.

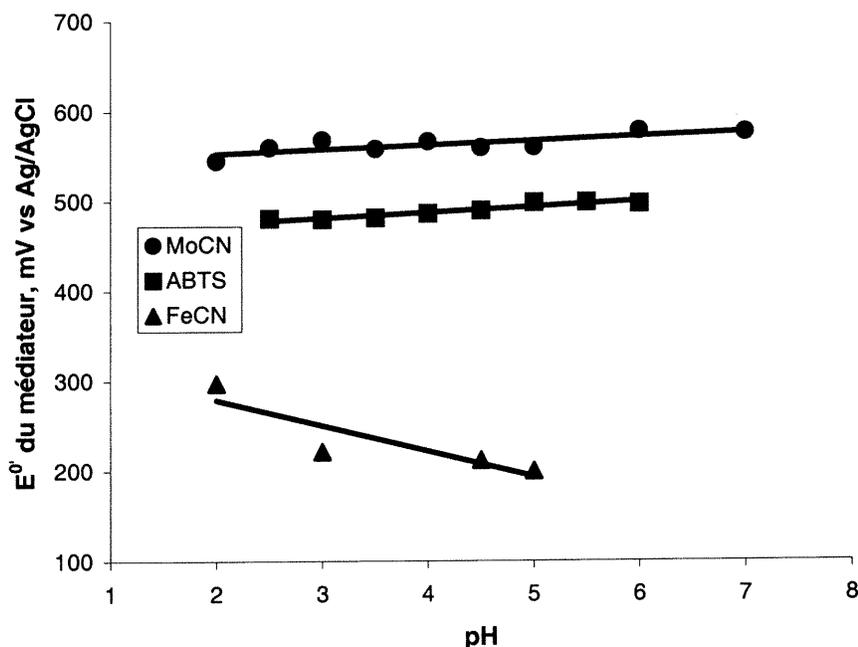


Figure 44. Variation du potentiel normal apparent de trois médiateurs en fonction du pH. Les E^0 ont été déterminés par voltampérométrie à onde cyclique (10 mVs^{-1}) en utilisant l'équation 10. Les solutions tampon: citrate pour pH 3.5 à 5.5, phosphate pour les autres.

Le potentiel du site T1 de la laccase n'est pas affecté de façon significative par le pH [151, 152]. Une augmentation du pH signifie cependant un accroissement de la concentration en ions OH^- dans la solution et l'ion hydroxyle étant un inhibiteur du site actif T2/T3 (où se produit la réduction de l'oxygène en eau) [36], l'activité de l'enzyme décroît avec une augmentation de pH. Ainsi, le profil de la variation de l'oxydation d'un substrat en fonction du pH est une combinaison de l'inhibition par OH^- ainsi que du changement de ΔE^0 , tel que proposé par Xu [151]. L'oxydation des médiateurs dont le E^0 est indépendant du pH ne devrait alors qu'être régie par l'inhibition OH^- , résultant en une diminution linéaire du $k_{f(\text{Lc-M})}$ avec l'augmentation du pH [153-155]. Ceci ne semble pas être le cas pour aucun des médiateurs étudiés, peu importe si le pH cause une modification de leur E^0 ou non (voir Figure 45).

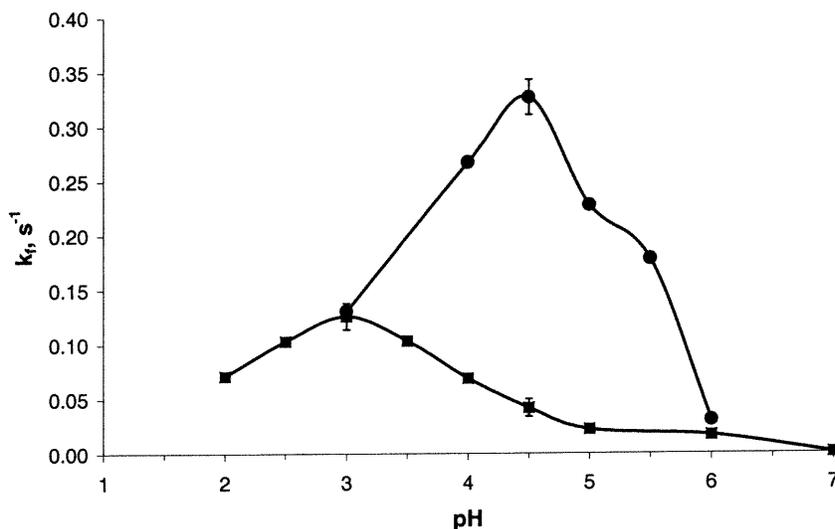


Figure 45. Effet du pH sur la cinétique d'oxydation des médiateurs $K_4Mo(CN)_8$ (■) et ABTS (●), 0.2 mM, par la laccase II de *T.v.* (5 U mL^{-1}). Les barres d'erreur représentent l'écart type de trois mesures.

Bien qu'aucune variation linéaire des k_f en fonction du pH ne soit observée, aucun pH optimal commun n'a pu être déterminé. Les pH maximaux pour l'oxydation des médiateurs sont même très différents. Les E^0 respectifs du $K_4Mo(CN)_8$ et de l'ABTS étant constants sur la plage de pH étudiée et l'inhibition par OH^- n'impliquent pas le médiateur, l'explication doit se trouver ailleurs. La charge de l'ABTS, contrairement à celle du $K_4Mo(CN)_8$, change avec le pH dû à la présence des groupements sulfoniques sur la structure de l'ABTS [71]. La forme protonée (donc de charge neutre) de l'ABTS semble effectuer de moins bonnes interactions que la forme déprotonée, existant à pH supérieur à 3.5. La plupart des médiateurs de la laccase ayant été utilisés lors de ce projet étant chargés négativement (voir Figure 46), il se peut que les interactions soit favorisées pour des substrats avec une telle charge. Un coup d'oeil à la structure du site T1 (Figure 8) révèle que les acides aminés à proximité du cuivre T1, histidine et méthionine, sont chargés positivement à pH acide. Les histidines sont même chargées positivement à

pH neutre [156] de même que le cuivre T1 lorsqu'il est oxydé. L'environnement du cuivre où s'effectue l'oxydation est donc plutôt positif, ce qui pourrait favoriser l'interaction avec des substrats possédant une charge négative.

Selon Xu *et coll.* [153] les différentes laccases ont de différents pH optimaux pour leur réaction d'oxydation d'un médiateur (selon le ΔE^0 et l'inhibition OH⁻). De plus, il existe également d'importantes différences au niveau des profils des courbes de pH. La structure de l'enzyme dans la région du site actif doit sûrement avoir une incidence sur l'interaction laccase-substrat. Les molécules de nature organique semblent mieux réagir avec la laccase de *Trametes versicolor* que les complexes de coordination et les pH où le taux d'oxydation est maximal sont également différents. Ceci suggère davantage l'existence d'une différence dans les mécanismes d'oxydation par la laccase des différentes classes de médiateur.

Pour toutes ces raisons, il apparaît clair qu'il est erroné de parler de pH optimal de la laccase et qu'il serait plus juste d'utiliser la notion de pH maximal d'une réaction laccase-médiateur bien précise. La détermination d'un pH optimal à utiliser pour la délignification est encore plus complexe puisqu'un troisième élément, la pâte, entre alors en jeu. Il faut d'abord étudier le système médiateur-lignine avant de pouvoir définir l'impact du pH sur le système en entier (voir la section 3.3.4.).

3.3.2.2. Effet du potentiel du médiateur

L'impact du potentiel normal apparent du médiateur sur le taux de son oxydation par la laccase a été introduit à la section 1.3.3. en exposant les différentes caractéristiques d'un médiateur efficace. Le taux d'oxydation d'un substrat par la laccase est, selon la littérature [55, 151, 157], fortement influencé par la valeur de ΔE^0 , la différence entre les potentiels normaux apparents de l'enzyme et du médiateur.

Le graphique de la Figure 46 présente la variation des $k_{f(Lc-M)}$ de la réaction d'oxydation des différents médiateurs en fonction du potentiel normal apparent du médiateur. Bien que les points soient quelque peu dispersés, la tendance générale des k_f de diminuer lorsque le E^0 du médiateur augmente est clairement visible. Lorsque la valeur de E^0 se situe très près du potentiel de la laccase, les valeurs de $k_{f(Lc-M)}$ sont très faibles puisque la réaction de transfert d'électrons est alors thermodynamiquement défavorisée.

La faible réversibilité de certains médiateurs comme le HBT, le NHA et le HNNS explique pourquoi ils n'ont pas été inclus dans l'étude. Le médiateur doit en effet pouvoir échanger des électrons de manière réversible pour qu'un courant catalytique soit mesurable. Les médiateurs $K_4Ru(CN)_6$, $[Fe(bpy)_3](ClO_4)_2$ et $[Fe(o-phen)_3](ClO_4)_2$ ne sont pas non plus sur le graphique de la Figure 46, mais cette fois-ci parce qu'il ne sont pas oxydés suffisamment rapidement par la laccase pour pouvoir observer un quelconque courant catalytique. Les $k_{f(Lc-M)}$ de leur réaction d'oxydation par la laccase II de T_v se situent sous la limite mesurable.

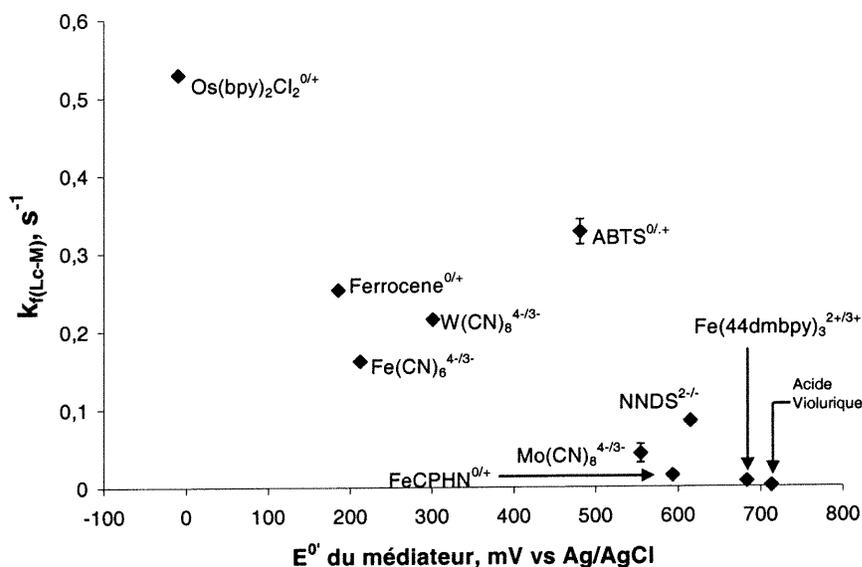


Figure 46. Effet du potentiel normal apparent du médiateur sur la constante de vitesse d'oxydation par la laccase. Les expériences ont été réalisées à 25°C dans un tampon citrate 100 mM, pH 4.5 avec 5 unités•mL⁻¹ de laccase et 0.2 mM de médiateur. Les barres d'erreur représentent l'écart type sur trois expériences indépendantes.

Un autre fait à remarquer est que le k_f pour la réaction avec l'ABTS est nettement supérieur à la tendance générale. Ceci peut être causé par deux facteurs, le premier étant que les expériences ont été réalisées dans des solutions de pH 4.5, ce qui est le pH où l'oxydation de l'ABTS par la laccase est la plus rapide mais ce qui n'est pas le cas pour les autres médiateurs. Il est alors possible que la différence entre les pH optimaux pour l'oxydation de chaque médiateur puisse être à l'origine de la faible cohésion des valeurs autour d'une même ligne. Il est également possible que l'ABTS, de par sa structure, effectue des interactions favorables avec le site actif de la laccase. Ces interactions pourraient accélérer l'oxydation du substrat, amenuisant ainsi l'impact du E^0 sur le k_f . De plus, le cas de l'ABTS est particulier puisque ce médiateur possède deux vagues d'oxydation et qu'il peut y avoir de la disproportionation (voir équation 12, section 3.2.3). La disproportionation est donc

un autre mécanisme de réduction de l'ABTS, ce qui pourrait résulter en un courant de réduction plus grand qui n'est pas totalement causé par la réaction de l'enzyme.

À la lumière de toutes ces informations, il apparaît clairement que le paramètre ayant la plus grande incidence sur la cinétique d'échange d'électrons du système laccase-médiateur est le potentiel normal apparent, rejoignant certaines conclusions tirées de la littérature [51, 55, 157]. La valeur de ΔE^0 n'est toutefois pas nécessairement le seul facteur modulant le taux d'oxydation d'un substrat car les interactions du médiateur avec certains éléments de structure du site actif de la laccase pourraient avoir une certaine influence favorable ou défavorable sur la réaction. L'encombrement stérique de la fonction N-OH sur certains médiateurs, par exemple, peut ralentir le taux d'oxydation de ces derniers [158].

3.3.3. Réaction d'oxydation des CML par les médiateurs

La mesure de la vitesse des transferts d'électrons de la réaction d'oxydation des composés modèles de la lignine (dimères I et IV et alcool vératrylique, voir la section 3.2. pour les structures) s'effectue sensiblement de la même manière que celle utilisée pour la réaction laccase-médiateur. La différence est que la réaction hétérogène mesurée à l'électrode est l'oxydation plutôt que la réduction, puisque le médiateur est réduit lorsqu'il oxyde le composé modèle. Si ce processus est suffisamment rapide par rapport à la vitesse de balayage, il y aura réoxydation du médiateur par l'électrode et ce, au fur et à mesure qu'il y aura oxydation du CML. Ceci résulte donc en une augmentation du courant d'oxydation (courant anodique) qui est par conséquent le courant catalytique. Le balayage doit donc préférentiellement s'effectuer d'un potentiel inférieur au potentiel normal apparent du médiateur vers un potentiel plus élevé.

Contrairement à la réaction laccase-médiateur, les deux concentrations (médiateur et CML) sont accessibles, ce qui a permis le calcul de la constante de seconde ordre, en utilisant la méthode décrite à la section 3.3.1.2..

Tableau IX. Constantes de vitesse de second ordre (k_{cat} , $M^{-1}s^{-1}$) des réactions d'oxydation des composés modèles de la lignine par différents médiateurs (tampon citrate 100 mM, pH 4.5).

Médiateur \ CML	Dimère IV	Dimère I	Alcool vératrylique
ABTS ^{0/+}	n.d. ¹	n.d.	n.d. ^{1,2}
ABTS ^{*+/++}	138	2.8	170 ²
HBT	16.5	4.3	2.5 ²
K ₄ Mo(CN) ₈	n.d.	n.d.	n.d.
K ₄ Ru(CN) ₆	n.d.	n.m. ³	n.d.

¹ n.d. = non détectable, aucun courant catalytique n'a été observé

² Valeur tirée de [88]

³ n.m. = non mesurée

La discussion des résultats du Tableau IX peut s'effectuer à la fois sur une base cinétique et thermodynamique. L'ABTS peut oxyder les composés modèles suffisamment rapidement pour permettre la mesure des k_{cat} , mais seulement lorsqu'il est oxydé à sa forme dicationique. Le premier pic d'oxydation (voir Figure 47) demeure inchangé lors de l'ajout du CML parce que le cation radical ne peut effectuer l'oxydation, les CML ayant des potentiels d'oxydation trop élevés (voir voltampérogrammes à la Figure 33), ce qui défavorise la réaction. Aucune augmentation catalytique du courant anodique n'a pu être observée pour l'oxydation du K₄Mo(CN)₈ en présence d'un composé modèle. Il a cependant été démontré au chapitre précédent que le K₄Mo(CN)₈ peut, lorsque oxydé par la laccase ou par électrolyse, oxyder le dimère IV. Ceci signifie que la réaction d'oxydation, bien que possible, est trop lente pour pouvoir être suivie par voltampérométrie à onde cyclique. Le DI et le VA ne sont toutefois pas oxydés par ce médiateur, même après un traitement de vingt heures, probablement à cause de l'importance de l'écart entre leurs E^0 respectifs.

En plus de fournir les valeurs des courants qui sont nécessaires au calcul des constantes de vitesse, les voltampérogrammes des réactions EC' donnent plusieurs renseignements sur le système. Les voltampérogrammes de la Figure 47 démontrent clairement l'effet catalytique des médiateurs HBT et ABTS (dication). Le tracé du dimère IV sans médiateur ne donne presque pas de courant, prouvant que l'augmentation du courant anodique du médiateur n'est pas dû à l'addition des courants des deux espèces enregistrés individuellement. La superposition de la vague située à 500 mV des tracés des voltampérogrammes de l'ABTS et de l'ABTS en présence de DIV démontre en revanche qu'il n'y a pas d'oxydation du DIV par le cation radical.

L'hexacyanoruthénate ($K_4Ru(CN)_6$) aurait dû être en mesure d'oxyder les CML, du moins le dimère IV, si la réaction d'oxydation ne dépendait que du potentiel normal apparent. Le E^0 du $K_4Ru(CN)_6$ est en effet très similaire à celui du HBT qui, lui, réagit assez rapidement avec les CML. Ceci démontre que si la différence des potentiels entre les espèces réactives peut avoir un impact sur la vitesse de la réaction d'oxydation des CML, d'autres paramètres peuvent avoir davantage d'influence. Il est intéressant de remarquer que les médiateurs basés sur des complexes de coordination et dont les réactions n'impliquent que des transferts d'électrons semblent être moins réactifs, à E^0 équivalent, que leurs homologues organiques qui eux peuvent former des radicaux. Le $K_4Ru(CN)_6$ demeure néanmoins un médiateur efficace puisqu'il est capable d'oxyder les CML comme l'alcool vératrylique aussi bien que le HBT si le temps alloué à la réaction est suffisamment grand (voir section 3.2.5.).

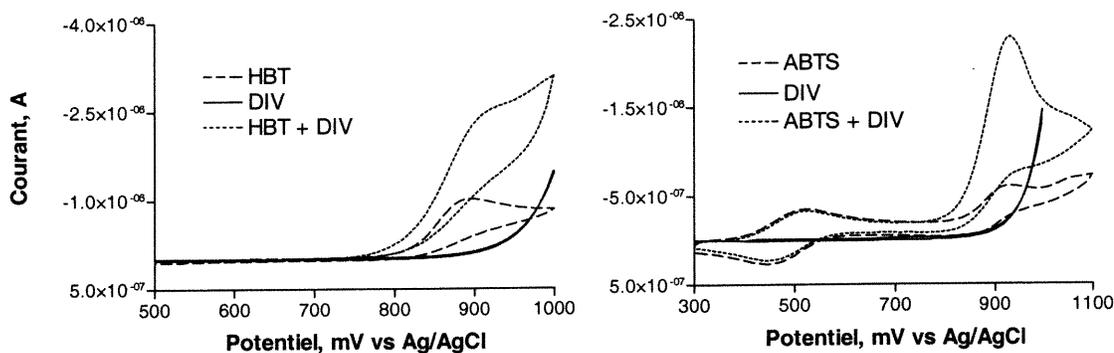


Figure 47. Voltampérogrammes ($v = 2 \text{ mVs}^{-1}$) des médiateurs ABTS et HBT (0.2 mM) seuls et en présence du dimère IV (2 mM), démontrant l'augmentation catalytique du courant d'oxydation.

3.3.4. Réaction d'oxydation de la pâte par les médiateurs

La méthode présentée dans cette section a été mise sur pied par Bourbonnais et Paice [159, 160] dans le but de développer une nouvelle méthode de détermination de la quantité de lignine présente dans la pâte (indice kappa). L'application de cette technique pourrait permettre l'automatisation de l'analyse de l'indice kappa pour remplacer la méthode de titrage manuelle présentement en usage. La plupart des méthodes automatisées qui se retrouvent sur le marché sont basées sur des mesures optiques plutôt qu'électrochimiques [161, 162]. Le principe de base de cette méthode est similaire à celui qui a permis la mesure des courants catalytiques pour la réaction médiateur-CML à la section précédente. Les CML sont alors remplacés par les groupements oxydables de la lignine dans la pâte kraft (voir Figure 48).

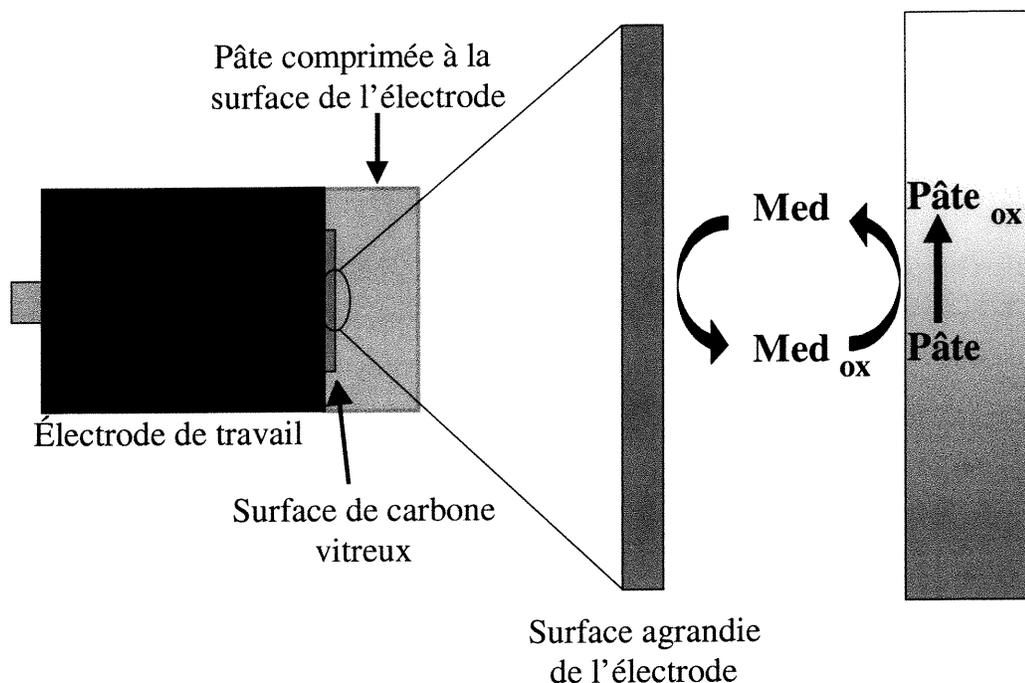


Figure 48. Diagramme illustrant le principe permettant la mesure du courant catalytique d'oxydation de la pâte par le médiateur.

La procédure de préparation de l'électrode consiste à réaliser une suspension de 10 mg de pâte (SWKP-O₂, K = 19.9) dans un millilitre de solution tampon contenant le médiateur à une concentration de 0.2 mM. Cette suspension de 1% est ensuite agitée puis centrifugée. La pâte est ensuite retirée puis comprimée sur la surface de l'électrode en appuyant cette dernière sur une surface plane. Le compactage de la pâte est important pour que les groupements oxydables de la lignine se retrouvent à la portée du médiateur, délimitée par sa diffusion. Le médiateur, une fois oxydé, pourra ainsi diffuser dans la fibre, oxyder la lignine (en se réduisant) puis retourner à l'électrode pour y être réoxydé et ainsi de suite. Les électrons provenant de l'oxydation de la lignine sont transférés de cette façon à l'électrode, générant un courant catalytique d'oxydation proportionnel à la vitesse de la réaction de la pâte par le médiateur et à la quantité de groupements oxydables présents dans la pâte, reliée à l'indice kappa. Une relation linéaire peut donc être établie entre le courant catalytique et l'indice kappa en utilisant le même médiateur et des pâtes à différents stades du procédé de blanchiment, à condition d'utiliser la même vitesse de balayage. Cette relation linéaire a été établie pour des pâtes

provenant de sources semblables et utilisée par Bourbonnais et Paice [159] pour la détermination électrochimique de l'indice kappa.

D'un autre côté, si une seule et même pâte est utilisée, il est possible, en variant la vitesse de balayage, de déterminer des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre pour la réaction d'oxydation de la pâte par les médiateurs. La constante de second ordre n'est toutefois pas accessible puisqu'il est difficile d'obtenir une valeur précise de la concentration molaire des groupements oxydables dans la lignine. En utilisant toujours la même pâte, les k_f seront mesurés, ce qui est un excellent outil pour comparer l'efficacité des différents médiateurs ainsi que d'évaluer l'effet de certaines conditions sur les transferts d'électrons.

La mesure des courants catalytiques n'implique que de très petits courants et la quantité de lignine oxydée lors des expériences est négligeable par rapport à l'ensemble de celle contenue dans l'échantillon de 10 mg. L'oxydation à plus grande échelle de la pâte par un médiateur oxydé électrochimiquement sera utilisée à la section 3.4. afin d'obtenir une délignification notable de la pâte kraft.

3.3.4.1. Évaluation de la méthode

La première expérience réalisée avec cette méthode fut de vérifier la relation des courants mesurés avec les différents paramètres de la voltampérométrie à onde cyclique. Pour ce faire, de la pâte blanchie (indice $K \approx 0$)² a été utilisée pour enregistrer des voltampérogrammes de référence, à différentes vitesses de balayage. Un exemple de voltampérogramme enregistré avec la pâte blanchie est présenté à la

² La pâte kraft blanchie se retrouvant sur le marché possède un indice de blancheur d'environ 90%. Une quantité minime de lignine est donc toujours présente dans la pâte après le blanchiment, mais cette quantité étant sous la limite de détection de la méthode, elle ne peut être connue de façon précise. L'indice kappa se voit attribuer la valeur symbolique de zéro, bien que ceci ne puisse pas être réellement obtenu.

Figure 49. Comme le démontre le graphique de la Figure 50, le courant de diffusion du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ varie de façon linéaire avec la racine carrée de la vitesse de balayage, tel que prédit par l'équation de Randles-Sevcik pour les systèmes électrochimiques contrôlés par la diffusion (équation 2). La constante de diffusion du médiateur avec l'électrode en présence de pâte, qui est calculée à partir de la pente de la droite des courants anodiques de ce graphique, est cependant plus petite que celle en solution libre, soit $1.9 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, par rapport à celle qui a été déterminée lors de ce projet $(5.7 \pm 0.3) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ et celle provenant de la littérature $(5.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ [163]. Cette diminution du coefficient D du médiateur est vraisemblablement causée par la présence des fibres compactée à la surface de l'électrode, gênant la diffusion du médiateur. Il est toutefois possible que le courant de diffusion soit diminué à cause d'une baisse de la concentration du médiateur due à la présence des fibres.

La réversibilité du médiateur est affectée dans ces conditions puisque le courant cathodique est plus faible que le courant anodique. Ceci signifie qu'une fraction des molécules de $K_4Mo(CN)_8$ qui sont oxydées ne seront pas réduites. Cet effet n'est pas causé par la présence de la pâte car un comportement similaire a été remarqué en solution libre, dans des conditions identiques. Le pH de la solution est en cause car la tendance du pic de réduction à être diminué par rapport au pic d'oxydation a été remarquée pour le $K_4Mo(CN)_8$ dans toutes les solutions alcalines. La constante de diffusion est toujours calculée à partir des courants anodiques puisqu'en solution libre (sans pâte) à pH 8, la diffusion mesurée à partir des courants anodiques est la même qu'à pH de 4.5. La réversibilité n'est pas compromise à pH 4.5, ce qui suggère qu'il s'agisse d'un effet relié au pH plutôt qu'à la pâte. Il est intéressant de remarquer que les voltampérogrammes enregistrés avec de la pâte blanchie (voir Figure 49) démontrent une séparation d'environ 55 mV entre les pics d'oxydation et de réduction, ce qui normalement témoigne d'une réaction électrochimiquement réversible. Il semble donc qu'il y a une baisse de la disponibilité des ions $Mo^{5+}(CN)_8^-$ à être réduits, lorsque le pH de la solution est élevé. Il semble peu probable que cela provienne de la décomposition du complexe

puisque les résultats de la section 3.1.2.2.2. ont démontré qu'il faut plusieurs jours à pH de 7 pour commencer à noter une diminution de la concentration en $K_4Mo(CN)_8$. Il s'agit toutefois d'une hypothèse à ne pas écarter car il a été rapporté que le complexe est moins stable dans son état oxydé [64]. Les expériences sur la stabilité du médiateur ont été réalisées avec l'octacyanomolybdate dans son état réduit.

Lorsque la pâte kraft non-blanchie est utilisée, la réaction hétérogène du médiateur n'est plus électrochimiquement réversible puisque le médiateur réagit avec la pâte. Pour cause, le médiateur est réduit suite à sa réaction avec la lignine, ce qui élimine la réduction électrochimique et le courant (cathodique) qui l'accompagne. Le courant d'oxydation augmente proportionnellement à la vitesse de la réaction de transfert d'électrons de la lignine vers le médiateur. Une telle augmentation est facilement mesurable sur les voltampérogrammes tels que celui présenté en Figure 49.

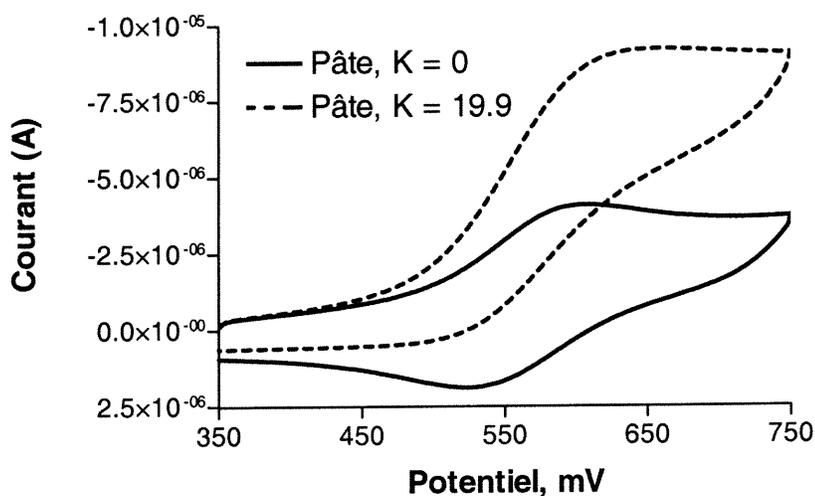


Figure 49. Voltampérogrammes enregistrés à 250 mVs^{-1} du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ 0.2mM lors des expériences réalisées avec les électrodes de pâte blanche ($K=0$) et non-blanchie ($K=19.9$). Expérience réalisée dans le tampon phosphate 100 mM à pH 8.

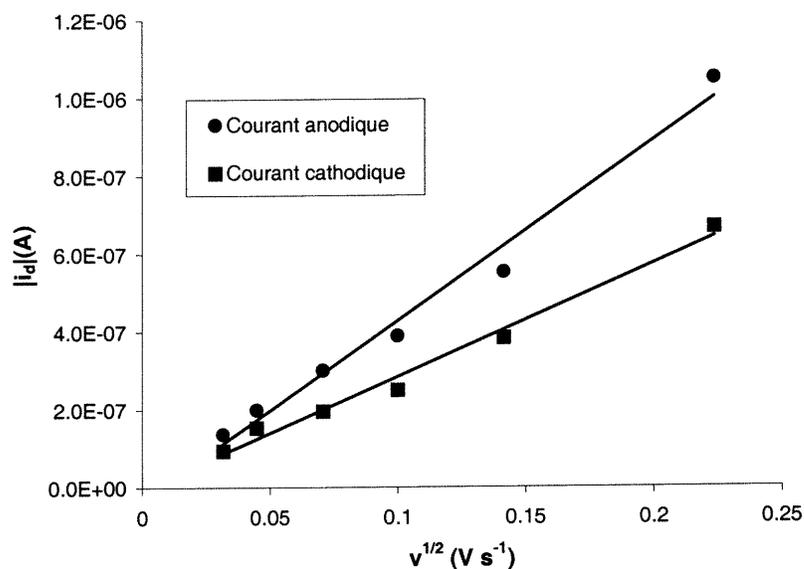


Figure 50. Variation linéaire des courants anodique et cathodique des voltampérogrammes du $K_4Mo(CN)_8$ (0.2 mM) avec l'électrode de pâte blanche, selon l'équation de Randles-Sevcik. Les courants (axe y) sont donnés en valeur absolue.

Les courants de diffusion i_d permettant de calculer les ratios i_k/i_d puis les k_f , sont mesurés en utilisant la pâte blanche pour tenir compte du fait que la diffusion du médiateur est différente de celle en solution libre.

Une autre façon de vérifier que le médiateur oxyde bel et bien la lignine est d'effectuer plusieurs cycles sur le même échantillon de pâte. Au fur et à mesure, le courant catalytique diminue et le voltampérogramme redevient, ultimement, superposable à celui enregistré sur la pâte blanche (voir Figure 51). La lignine contenue dans la pâte a donc été irréversiblement oxydée. Il ne s'agit bien sûr que d'une petite fraction de l'échantillon de 10 mg, soit celle qui est à la surface de l'électrode.

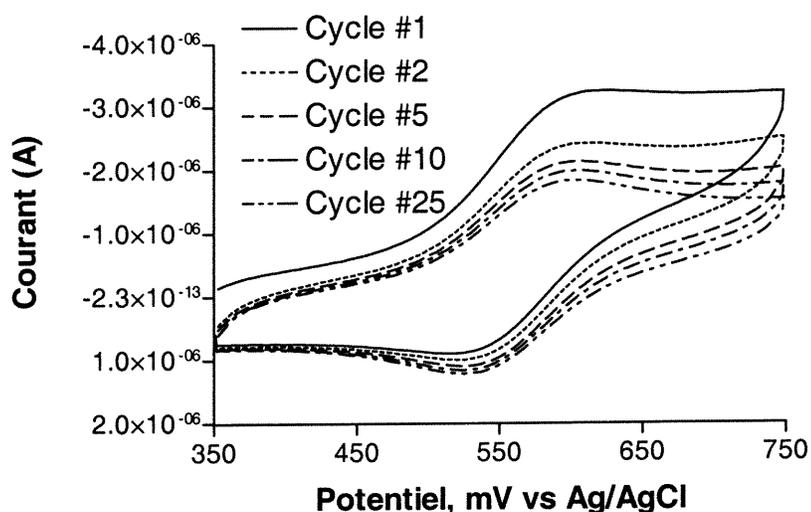


Figure 51. Voltampérométrie à plusieurs cycles consécutifs enregistrés à 100 mVs^{-1} avec le médiateur $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$ (0.2 mM) et la pâte kraft non-blanchie en tampon citrate 100 mM à pH 4.5.

3.3.4.2. Évaluation des différents médiateurs

La constante de vitesse du transfert d'électrons de la réaction d'oxydation de la pâte par les médiateurs a été évaluée pour plusieurs médiateurs, notamment pour tenter d'établir une relation avec le potentiel normal apparent de ces derniers. La tendance obtenue, présentée sur le graphique de la Figure 52, n'est pas aussi évidente que celle de la réaction laccase-médiateur et les points sont moins bien regroupés autour d'une ligne. L'incidence du E^0 est néanmoins non-négligeable par son effet limitant sur la réaction: les médiateurs ayant un potentiel peu élevé ne pourront oxyder efficacement la lignine dans un laps de temps raisonnable. Au niveau des médiateurs ayant un E^0 suffisamment élevé, d'autres paramètres peuvent entrer en jeu et diminuer l'efficacité des échanges d'électrons. De la même manière que les radicaux oxydent plus rapidement les composés modèles, l'ABTS semble beaucoup plus réactif envers la pâte, démontré par son k_f supérieur à celui des autres médiateurs. Comme dans le cas de l'oxydation des médiateurs par la laccase, il est probable que les résultats varient avec le pH.

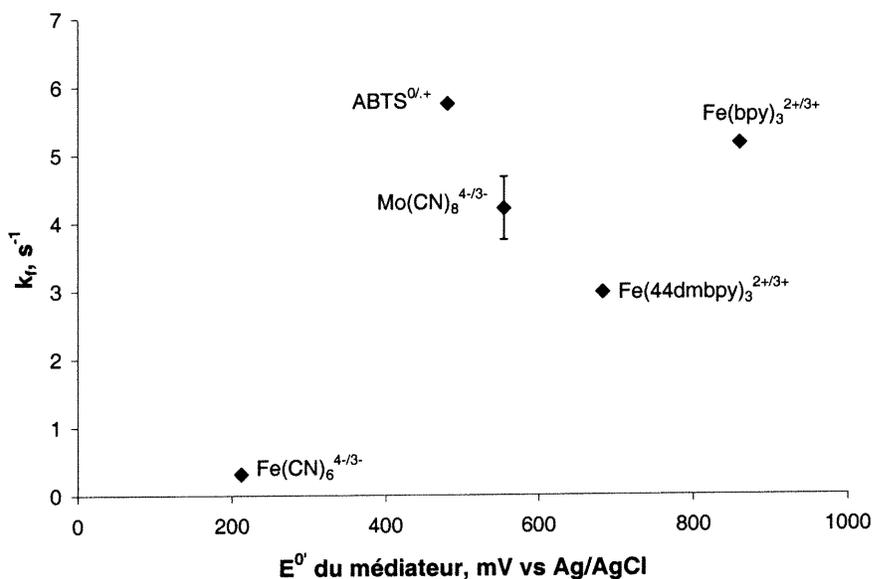


Figure 52. Constantes de vitesse de pseudo-premier ordre (k_f , s^{-1}) pour l'oxydation de la lignine de la pâte kraft par divers médiateurs (tampon phosphate à pH 8.0).

3.3.4.3. Effet du pH

Tout comme pour la réaction laccase-médiateur, le pH peut, lors de l'oxydation de la pâte par le médiateur, influencer soit le potentiel normal apparent du médiateur ou certaines propriétés de la lignine. Les médiateurs dont le E^0 diminue en augmentant le pH seront peu efficaces en solutions alcalines pour oxyder la lignine qui possède un potentiel d'oxydation élevé. La lignine, de son côté, est plus réactive en milieu alcalin puisque les groupements carboxyliques sont ionisés et donc plus facilement solubilisables. Les propriétés des médiateurs sont toutefois changées dans la plupart des cas à haut pH, peu importe que leur E^0 en soit dépendant ou pas. Les voltampérogrammes des médiateurs dans des solutions très alcalines sont déformés, suggérant d'importantes modifications au niveau de la stabilité et de la réversibilité. La détermination d'un pH optimal reposera cette fois encore sur un compromis entre ces différents facteurs.

La courbe de la Figure 53, avec son profil en forme de cloche, démontre que la réaction d'oxydation de la lignine est plus rapide sur une plage de pH allant de 8 à 10. Les propriétés telles que le E^0 et la réversibilité de l'octacyanomolybdate étant pratiquement constantes de pH 4.5 à 9, l'augmentation des valeurs de k_f est vraisemblablement due à la pâte qui devient plus facilement oxydable. À pH élevé, la perte d'efficacité provient de la diminution de la réversibilité du $K_4Mo(CN)_8$. Ce phénomène, voltampérogrammes à l'appui, sera décrit plus en détails à la section 3.4.2.1..

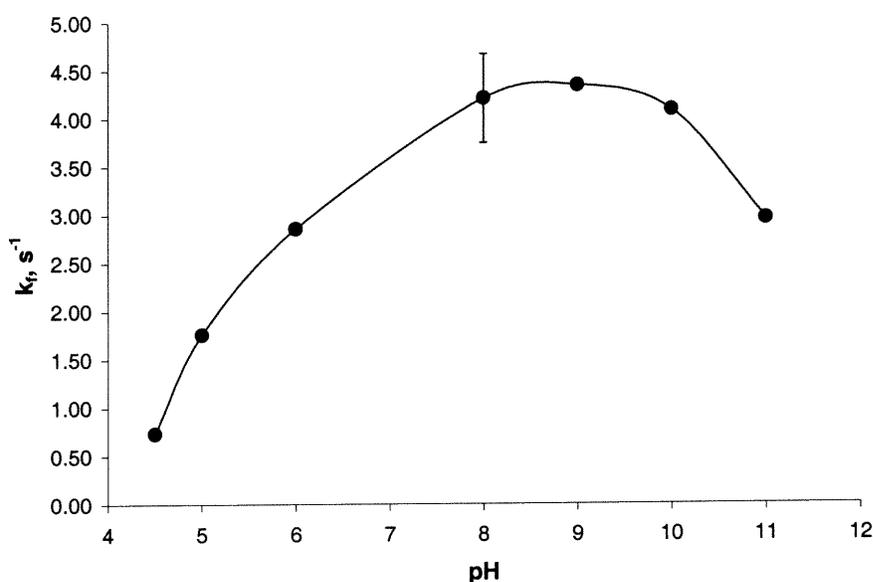


Figure 53. Effet du pH sur la vitesse de transfert d'électrons lors de l'oxydation de la pâte par le médiateur $K_4Mo(CN)_8$ (0.5 mM).

Le potentiel normal apparent du médiateur a un effet important sur les constantes de vitesse k_f pour l'oxydation de la pâte. Puisque le E^0 de certains médiateurs varie avec le pH, le k_f de ces derniers est plus grandement affecté par les variations de pH que le $K_4Mo(CN)_8$ par exemple. De même, il est possible que les médiateurs dont la forme oxydée comporte un radical réagissent différemment avec la pâte et que le profil de leur courbes de pH soient différentes de celle du $K_4Mo(CN)_8$. Ces hypothèses restent toujours à être vérifiées.

La mesure de la vitesse des réactions d'oxydation de la pâte s'avère être utile pour évaluer et comparer l'efficacité des médiateurs sous différentes conditions. La principale innovation découlant de l'utilisation de cette technique est qu'elle permet l'étude spécifique de la réaction médiateur-lignine sans avoir recours à la laccase. Cette approche, la génération de la forme oxydée (active) du médiateur par une électrode plutôt que par la laccase, pourrait être intéressante pour oxyder la pâte à plus grande échelle. Cette nouvelle méthode, nommée délignification électrochimique, constitue une alternative de plus aux méthodes traditionnelles de blanchiment de la pâte.

3.4. Délignification électrochimique

Tel que démontré dans les sections précédentes, la laccase en présence d'un médiateur rédox peut délignifier efficacement la pâte kraft, ce qui pourrait se traduire par une diminution des quantités de ClO_2 nécessaires lors du procédé industriel de blanchiment. Cependant, due à la nature de l'enzyme, l'oxydation du médiateur par la laccase peut s'avérer comme l'étape limitante du système. Tout d'abord, les enzymes sont très sensibles aux conditions sous lesquelles elles sont soumises comme le pH et la température, en plus d'être inactivées par la présence de certains composés inhibiteurs comme les ions halogénures (Cl^- , F^- , I^- , Br^-) et les poisons respiratoires comme CN^- , N_3^- et CO [36, 47, 48]. Une perte notable de l'activité enzymatique a également été observée à la suite d'un traitement de délignification de deux heures [112]. Cette inactivation de la laccase est plus ou moins sévère selon la nature du médiateur utilisé. Certains médiateurs dont la forme oxydée comporte un radical comme l'acide violurique et le 1-hydroxybenzotriazole peuvent désactiver la laccase puisqu'ils oxydent certains acides aminés formant la structure de l'enzyme [61, 62]. La laccase nécessite également la présence d'oxygène pour effectuer l'oxydation du médiateur (Figure 10), de sorte qu'il est impossible d'étudier la délignification en conditions anaérobiques. Il est toutefois important d'établir l'implication de l'O_2 dans le mécanisme d'oxydation de la lignine afin d'élucider le rôle véritable du médiateur. Finalement, la laccase limite la gamme des médiateurs utilisables à ceux qui sont des substrats de l'enzyme, c'est-à-dire ceux que la laccase est en mesure d'oxyder. Il a été démontré plus tôt dans le texte que ces médiateurs doivent avoir un potentiel normal apparent près ou inférieur à celui du site de cuivre T1 de l'enzyme pour que le taux d'oxydation soit efficace. Il a également été expliqué que la réaction d'un médiateur possédant un potentiel rédox élevé est thermodynamiquement favorable pour l'oxydation de la lignine (voir section 1.3.3.), bien que de tels médiateurs ne soient pas oxydés efficacement par la laccase. Toutes ces considérations démontrent qu'il y aurait un avantage marqué, tant au niveau de la recherche que de l'application, à développer une méthode alternative à la laccase pour oxyder le médiateur.

En se basant sur les expériences utilisant l'électrolyse du médiateur pour oxyder les composés modèles de la lignine ([88] et section 3.2.3.), il serait envisageable d'utiliser un système similaire de génération électrochimique de la forme oxydée du médiateur pour oxyder la pâte. Un tel système d'électrodélicignification, dont le principe est présenté à la Figure 54, permettrait à la fois de contourner les problèmes inhérents à l'utilisation de la laccase et de comparer les études des CML avec les résultats d'expériences effectuées sur de vrais échantillons.

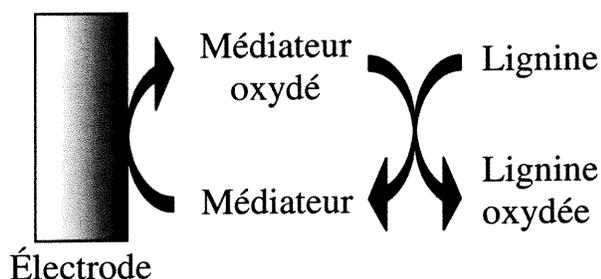
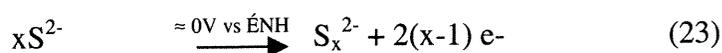
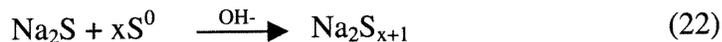


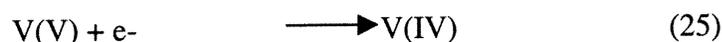
Figure 54. Représentation simplifiée du mécanisme d'oxydation de la lignine résiduelle de la pâte par le système d'électrodélicignification.

Les technologies électrolytiques dans le domaine des pâtes et papiers est un sujet bien documenté car elles possèdent des applications dans toutes les étapes de la fabrication du papier. La plupart des agents de blanchiment traditionnels comme le chlore, l'hypochlorite, le dioxyde de chlore et l'hydroxyde de sodium sont synthétisés par des procédés électrochimiques. Ces procédés ont gagné beaucoup d'intérêt au cours des dernières années puisqu'il s'agit d'une technologie propre et peu coûteuse.

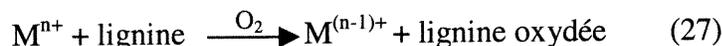
Le rendement de la cuisson du bois en pâte peut être augmenté par l'action de certains composés comme les polysulfures qui vont favoriser les réactions des produits de cuisson avec la lignine [2]. Les polysulfures, qui sont normalement générés en ajoutant du soufre à la liqueur blanche (équation 22), peuvent être synthétisés par oxydation électrochimique (équation 23)[164].



Toutefois, la plupart des systèmes d'électrolyse sont orientés vers la génération in situ de réactifs de blanchiment de la pâte qui sont connus et déjà utilisés [105, 165-168], dans le but de diminuer les coûts qui sont reliés à leur production. Le ClO_2 peut être généré par réaction du chlorate avec le vanadium(IV) qui est par la suite réduit électrochimiquement [164, 169].



La délignification à l'oxygène peut être rendue plus efficace lorsqu'un médiateur rédox comme le ferrocyanure est oxydé par une électrode [164]. Le médiateur (M) agit en synergie avec l'oxygène pour augmenter l'efficacité de l'oxydation de la lignine [105].



Les réactions venant d'être présentées ont comme caractéristique de former un cycle d'oxydoréduction, c'est-à-dire que les agents intermédiaires sont continuellement régénérés; ils agissent comme catalyseurs. L'oxydation directe de la pâte et des composés modèles de la lignine dans une cellule d'électrolyse (milieu alcalin) a également été étudiée [170] mais les résultats sont limités par le fait que la lignine présente à l'intérieur des fibres se trouve isolée de l'électrode [164]. L'utilisation de techniques semblables pour imiter l'action de la laccase sur un médiateur par une électrode pour la délignification a récemment été rapportée par Padtberg *et coll.* [171].

La présente section porte sur le développement d'une nouvelle méthode dite d'électrodélicignification, qui utilise l'électrolyse pour générer la forme active (oxydée) du médiateur. L'effet de diverses conditions sur l'oxydation de la lignine résiduelle de la pâte kraft par le médiateur octacyanomolybdate ainsi que l'efficacité de nouveaux médiateurs de complexes de coordinations seront également présentés.

3.4.1. Développement du système d'électrodélicignification

La Figure 55 présente le schéma des deux premiers montages pour l'électrodélicignification. Il s'agit de cellules à un compartiment dans lequel se retrouvent la pâte, la solution de médiateur et les électrodes. Dans les deux cas, l'électrode auxiliaire (A) est isolée par un pont salin d'agar-KCl afin d'éviter la réduction du médiateur. L'électrodélicignification avec le montage #1 (Figure 55a) n'a donné que 12.9 % de délicignification, ce qui équivaut à l'action de l'extraction alcaline, probablement à cause de la passivation par la pâte de l'électrode de carbone vitreux réticulé. En effet, les fibres pénètrent dans les pores de l'électrode de CVR, ce qui en diminue grandement la surface en contact avec la solution. Afin d'assurer une agitation efficace du milieu, la consistance de la pâte doit être d'au maximum 1 %. Cette valeur est sélectionnée à cause du caractère très insoluble de la pâte; une consistance de 10 % telle qu'utilisée pour les traitements enzymatiques, forme une suspension trop dense pour permettre l'agitation. Le montage #2 (Figure 55b), développé pour éviter la passivation de l'électrode ne s'est pas avéré plus efficace que le premier (10.5% de délicignification). Le circuit des solutions de médiateur n'est pas linéaire, c'est-à-dire que le médiateur oxydé ne passe pas nécessairement à travers la pâte avant d'être retourné à l'électrode et que le médiateur réduit n'est pas nécessairement entré en contact avec l'électrode pour s'oxyder avant d'être pompé vers la pâte. Le troisième montage a été développé dans le but de contrer cette limite et de maximiser l'oxydation de la solution de médiateur.

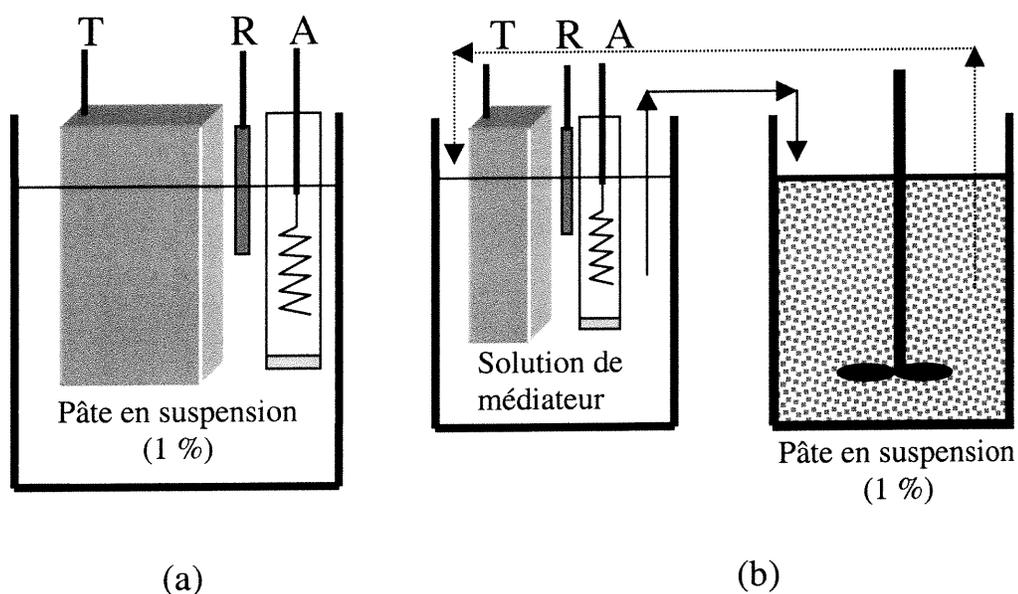


Figure 55. Schéma de deux montages pour l'électrodélicnification. Contrairement à la cellule en (a), la pâte n'est pas en contact avec les électrodes dans le montage (b). La solution de médiateur en (b) (— réduit et oxydé) est pompée en continue. L'électrode de travail (T) est en carbone vitreux réticulé (30 pores par pouce), la référence (R) est Ag/AgCl et l'électrode auxiliaire (A) est un fil de platine torsadé isolé de la solution par un pont salin d'agar.

Ce troisième montage d'électrodélicnification à deux compartiments est présenté à la Figure 56. La pâte est comprimée dans la cellule de gauche à l'aide d'un piston développant une pression de 690 kPa, créant un bloc de pâte qui est uniforme. Cette uniformité est très importante afin de s'assurer d'une bonne distribution de la solution de médiateur à travers le bloc lors du pompage. La cellule de droite est celle d'électrolyse, où le médiateur est oxydé par une électrode de travail en carbone vitreux réticulé (T). Cette électrode couvre la totalité de la surface du fond de la cellule (voir Figure 57), obligeant la solution à passer au travers de l'électrode pour maximiser le taux d'oxydation du médiateur. L'oxydation du médiateur s'effectue en appliquant un potentiel entre l'électrode de travail et la référence à l'aide d'un potentiostat modèle 100-B (Bioanalytical Systems Inc.) en mode électrolyse. Le potentiostat enregistre également le courant circulant entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire permettant l'étude de la charge passée

dans la solution de médiateur durant l'expérience (voir les détails à la section 3.4.2.3.). La solution ainsi oxydée est pompée vers la cellule contenant la pâte. Le médiateur oxydé réagit alors avec la pâte en oxydant la lignine, ce qui entraîne sa réduction (voir Figure 58). La solution sortant de la cellule de pâte, qui contient le médiateur dans son état réduit suite à sa réaction avec la lignine, est ensuite dirigée vers la cellule d'électrolyse, complétant un cycle. Ce processus s'opère de façon continue.

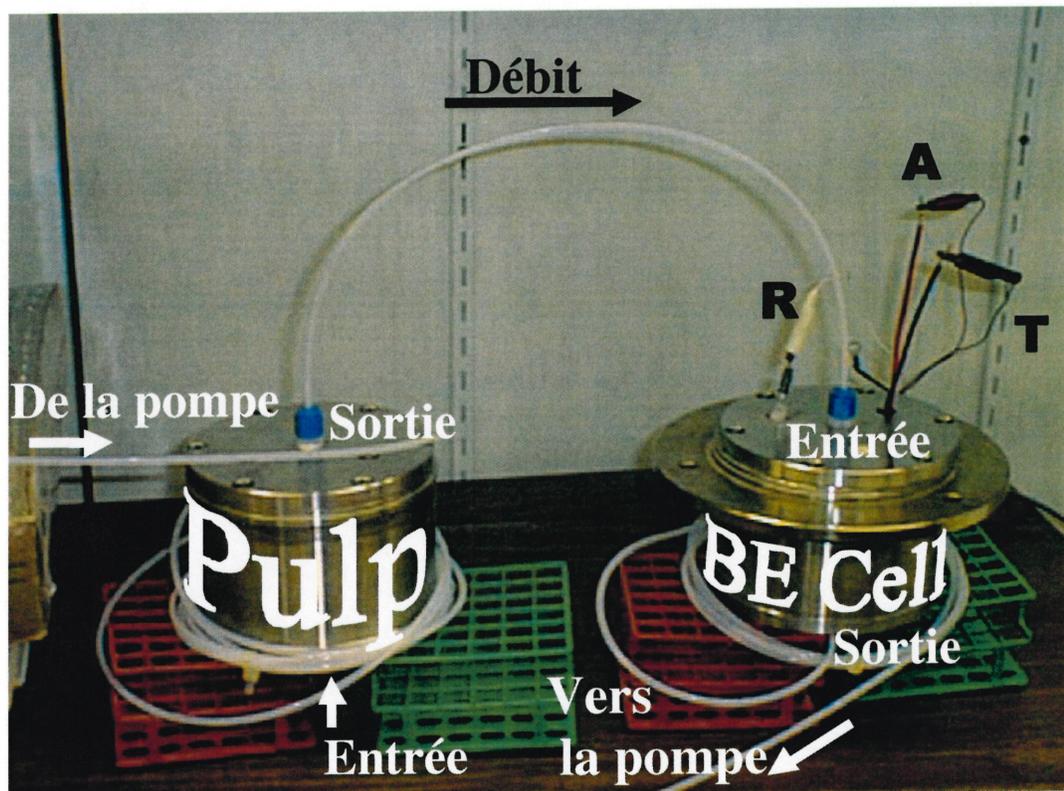


Figure 56. Montage pour l'électrodélicnification. La cellule de gauche (Pulp) contient la pâte alors que l'électrolyse s'effectue dans la cellule de droite (BE Cell). Ces deux cellules sont immergées dans un bain thermostatique (non montré) et la longueur supplémentaire de tuyau enroulée autour des cellules sert à compenser pour la perte de température due à la pompe qui est à l'extérieur du bain.

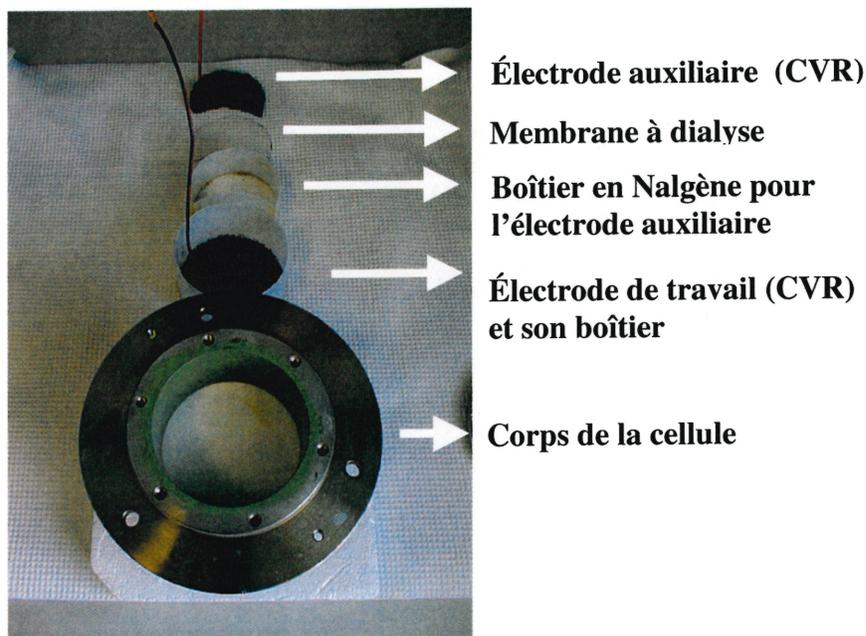


Figure 57. Vue en détail de la cellule d'électrolyse. Les électrodes sont en carbone vitreux réticulé (CVR) d'une porosité de 30 pores par pouce. La membrane à dialyse sert à isoler l'électrode auxiliaire pour éviter la réduction du médiateur.

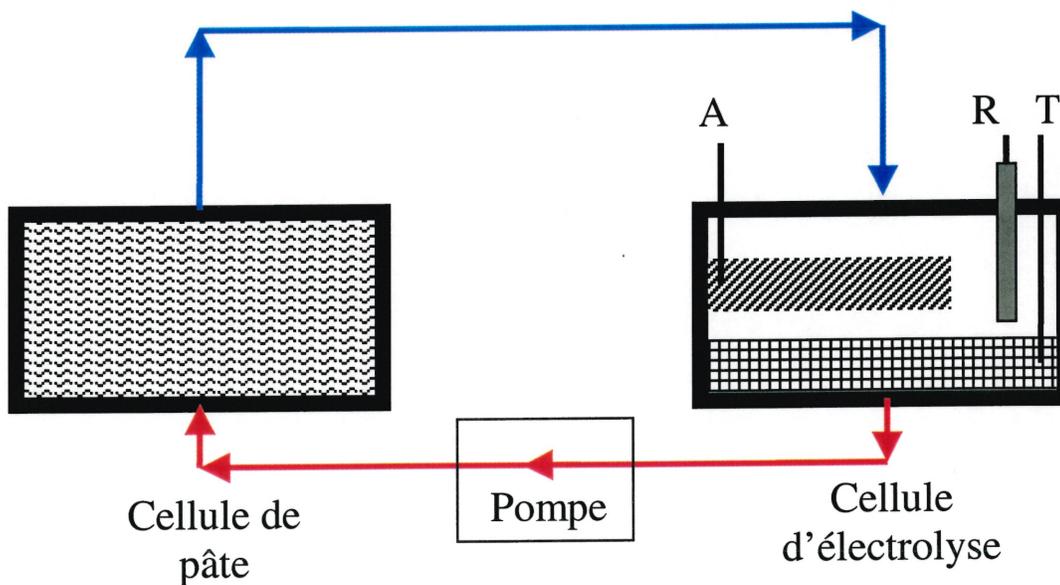


Figure 58. Schéma du montage d'électrodélicnification. La cellule de gauche contient le bloc de pâte (▨) alors que celle de droite est celle utilisée pour oxyder le médiateur. L'oxydation se fait à l'électrode de travail (▧). La solution de médiateur oxydé (→) est pompée à travers la pâte où le médiateur est réduit en oxydant la lignine. La solution réduite (→) retourne à la cellule d'électrolyse pour y être réoxydée.

3.4.2. Électrodélicnification avec $K_4Mo(CN)_8$

La première expérience réalisée avec cette nouvelle technique fut de comparer les performances de l'électrodélicnification avec celles de la délicnification enzymatique. Le Tableau X démontre que la délicnification est meilleure en oxydant le médiateur $K_4Mo(CN)_8$ à 750 et 1000 mV vs Ag/AgCl que par la laccase. La différence est plus importante à pH 8 qu'à pH 5 car l'enzyme ne présente presque plus d'activité dans des solutions de pH supérieur à 6. L'activité résiduelle après le traitement de 2 heures à pH 8 n'est que de 1 %, contre près de 80 % à pH 5. Hampp *et coll.* ont également démontré l'efficacité d'un tel système en utilisant le médiateur acide violurique [172].

Tableau X. Comparaison entre l'oxydation enzymatique et électrochimique du $K_4Mo(CN)_8$ (1 %) pour la délicnification de la pâte kraft ($\kappa = 19.9$) à 60 °C durant une période de 2 heures sous diverses conditions.

Méthode d'oxydation du médiateur	Délicnification à pH 5 (%) ³	Délicnification à pH 8 (%)
Contrôle ¹	16.6	16.6
Laccase, 10U/g pâte	27 ± 3	18
Électrode 750 mV ²	30 ± 2	32.1
Électrode 1000 mV	37.0	33.2

¹ Le contrôle est une pâte non traitée ayant seulement subi une extraction Ep.

² Les potentiels sont exprimés vs Ag/AgCl.

³ L'écart type a été calculé à partir de trois expériences.

Les résultats du Tableau XI ont pour but de démontrer que la délicnification est bien due à l'action du médiateur oxydé. Ces valeurs démontrent que la solution tampon (phosphate 100 mM, pH 8) sans médiateur ne donne aucune délicnification significative par rapport au contrôle (extraction Ep seulement), et cela, même si un potentiel de 1000 mV est appliqué à l'électrode de travail. Ceci a permis de vérifier que les composés de faible masse molaire qui sont contenus dans la pâte et qui peuvent être solubilisés dans la solution tampon à 60°C ne semblent pas agir comme médiateur ou d'agent de délicnification. Un résultat similaire est obtenu lorsque le médiateur $K_4Mo(CN)_8$ est appliqué sur la pâte (dosages de 1 et 0.1 %) sans avoir été

préalablement oxydé à l'électrode (aucun potentiel appliqué). Ces contrôles démontrent que l'agent actif du système d'électrodélicnification, tel que présenté à la Figure 54, est bien le médiateur et qu'il doit être oxydé pour effectuer la délicnification de la pâte, confirmant le mécanisme proposé.

Tableau XI. Effet du dosage du médiateur et des traitements de contrôle sur l'efficacité de délicnification de la pâte (tampon phosphate 100 mM à pH 8, 60 °C, 2 heures). Les traitements ont été suivis d'une extraction renforcée Ep.

Condition	Potentiel appliqué (V vs Ag/AgCl)	Délicnification (%)
Contrôle (sans médiateur)	1.0	17.6
$K_4Mo(CN)_8$ 1 %	Aucun potentiel	18.6
$K_4Mo(CN)_8$ 1 %	1.0	32.1
$K_4Mo(CN)_8$ 0.1 %	1.0	22.1

Contrairement à la délicnification enzymatique où l'activité de l'agent oxydant décroît tout au long d'un traitement [112], l'électrode fournit un pouvoir d'oxydation constant. Ceci a permis d'effectuer des traitements sur de très longues périodes de temps. Étant donné la stabilité du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ tel que démontré dans la section 3.1.2.2.1. et la référence [97], il a été choisi pour effectuer ces traitements de longue durée. Le Tableau XII démontre qu'il reste en effet 41 % de la quantité initiale de $K_4Mo(CN)_8$ après 45 heures d'électrodélicnification, tel que mesuré par voltampérométrie à onde cyclique en utilisant l'équation de Randles-Sevcik (équation 2, section 2.8.1.) qui relie la hauteur des pics des vagues d'oxydation et de réduction à la concentration de l'espèce électroactive. La Figure 59 présente les résultats de ces traitements de différentes durées. Il est à remarquer que la délicnification a pu atteindre jusqu'à 60 % après un traitement de 45 heures. Bien que le temps nécessaire pour atteindre cette délicnification soit plutôt long (en comparaison avec le temps de résidence de la pâte dans les usines modernes), il n'en demeure pas moins qu'il s'agit d'une méthode très prometteuse.

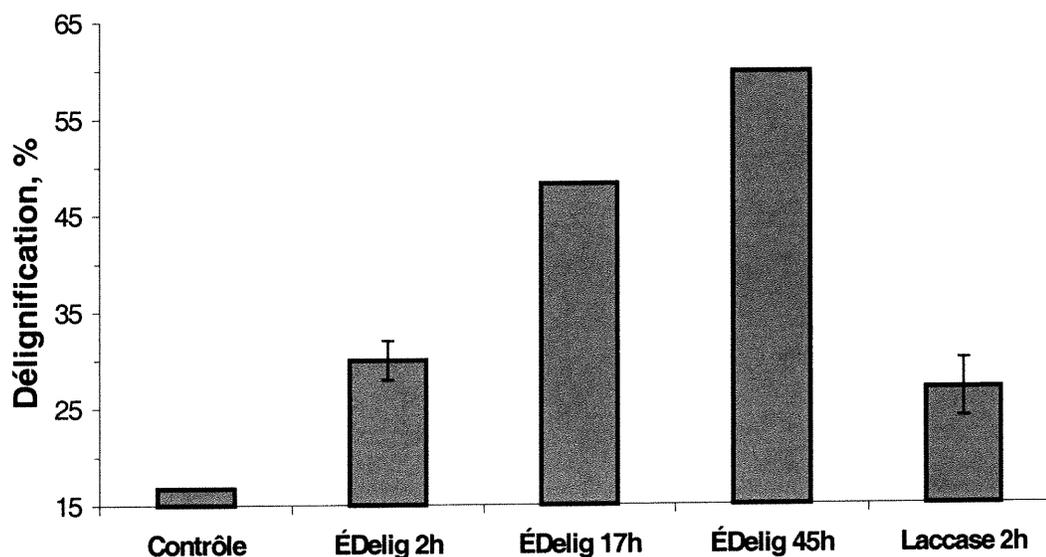


Figure 59. Traitements d'électrodélicnification (750 mV vs Ag/AgCl) de différentes durées ($K_4Mo(CN)_8$ 1%, tampon citrate 0.1 M à pH 5, 60 °C) et comparaison des résultats avec la délicnification enzymatique (durée de 2 heures). Les traitements ont été suivis d'une extraction Ep. Le contrôle est un traitement avec médiateur sans potentiel appliqué et les barres d'erreur représentent l'écart type sur trois expériences.

Tableau XII. Propriétés de la pâte kraft ayant subit des traitements d'électrodélicnification de différentes durées dans les conditions décrites à la Figure 59.

Durée du traitement (heures)	Délicnification (%)	Indice de blancheur (%)	Viscosité (mPa•s)	Médiateur résiduel (% de la [] initiale)
Contrôle ¹	16.8	34.9	14.3	73
2	31.2	44.6	n.m. ²	79
17	48.2	51.5	n.m.	58
45	59.8	53.7	13.5	41

¹ Le contrôle représente la pâte non traitée avec une extraction Ep.

² n.m. = non mesuré

La viscosité a été mesurée pour le contrôle ainsi que pour le traitement de 45 heures (Tableau XII), révélant une diminution mineure de 6 %. Ceci démontre la sélectivité du médiateur pour la lignine, laissant la cellulose des fibres intacte. Cette caractéristique est souhaitable afin de préserver la qualité de la pâte.

Lors des traitements enzymatiques, les réactifs (laccase et médiateur) ont été soigneusement mélangés à l'échantillon de pâte (10 g) pour s'assurer de la répartition uniforme du médiateur à travers la pâte avant le début du traitement. Par contre, dans le système d'électrodélicnification (Figure 58), la solution de médiateur oxydé est continuellement pompée à travers le bloc de pâte de 30 g. Ceci peut causer, selon les conditions, une variation de l'indice kappa d'une section à une autre de la pâte. Cette distribution de l'efficacité de délicnification provient du fait que la solution de médiateur oxydé sortant de la cellule d'électrolyse entre en contact avec le bloc de pâte par la section inférieure. Le médiateur, qui oxyde la pâte assez rapidement (section 3.3.4.), est réduit lors de cette oxydation dès son entrée dans la cellule contenant la pâte, ce qui le rend non réactif (puisque'il est réduit) lors qu'il parvient à la section supérieure. Ceci explique pourquoi la partie inférieure du bloc de pâte est plus délicnifiée que la partie supérieure, pour les traitements de courte durée (voir Figure 60a). L'indice kappa d'une section transversale du bloc équivaut à la moyenne des deux sections inférieure et supérieure et la pâte a été échantillonnée de cette façon pour tous les traitements afin d'obtenir une meilleure représentation de l'effet du médiateur sur l'ensemble de l'échantillon de 30 grammes de pâte. Lorsque le temps d'électrodélicnification est prolongé jusqu'à 45 heures, l'indice kappa est uniforme à travers le bloc (Figure 60b). Ceci suggère que la délicnification maximale qui est possible d'atteindre en utilisant le $K_4Mo(CN)_8$ dans les conditions décrites a été atteinte. En effet, pour être en mesure de réagir avec la partie supérieure du bloc, le médiateur ne doit plus réagir avec la partie inférieure, ce qui signifie que tous les groupements oxydables par le $K_4Mo(CN)_8$ ont été effectivement oxydés. La réaction ne peut s'être terminée faute de médiateur puisque l'analyse de la solution démontre qu'il en restait toujours 41 % après une période de 45 heures.

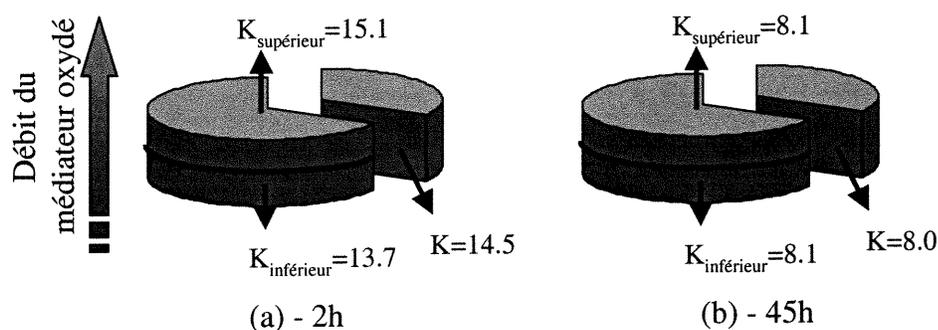


Figure 60. Représentation de la distribution spatiale de l'indice kappa à travers le bloc de pâte contenu dans la cellule d'électrodéblignification pour un traitement de 2 heures (a) et de 45 heures (b). Voir les conditions à la Figure 59.

3.4.2.1. Effet du pH

L'effet du pH sur la réaction de l'octacyanomolybdate sur la lignine a déjà été discuté en détail à la section 3.3.4.3.. Le but des études de pH lors de l'électrodéblignification est donc de vérifier s'il y a corrélation avec les résultats obtenus précédemment ce qui permettrait de renforcer les hypothèses alors émises. La courbe de déblignification en fonction du pH présentée à la Figure 61 s'apparente grandement à celle de la Figure 53, démontrant que la réaction d'oxydation de la lignine de la pâte kraft par le $K_4Mo(CN)_8$ atteint un maximum d'efficacité entre les pH 5 et 8. Tout comme la discussion de la section 3.3.4.3. le mentionnait, une perte d'efficacité est observable aux extrémités de l'échelle de pH. La légère diminution du potentiel rédox du médiateur à bas pH défavorise thermodynamiquement la réaction de transfert d'électrons entre la lignine et le médiateur. À pH élevé, le voltampérogramme du $K_4Mo(CN)_8$ démontre une augmentation de la différence entre le potentiel des pics d'oxydation et de réduction. Ceci signifie que les échanges d'électrons du $K_4Mo(CN)_8$ deviennent moins réversibles à haut pH, donc une cinétique plus lente. Ces changements démontrés à la Figure 62, bien que mineurs, peuvent avoir une incidence non-négligeable sur l'efficacité globale du traitement, d'où l'importance d'évaluer l'effet du pH.

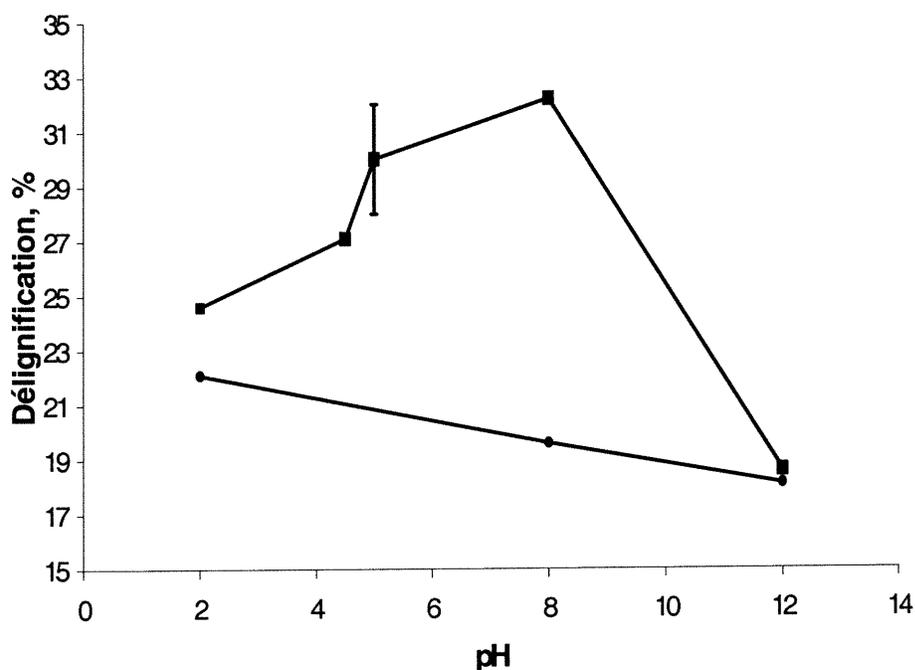


Figure 61. Variation de l'efficacité de l'électrodéflignification, suivie par E_p , par le $K_4Mo(CN)_8$ (1 %) en fonction du pH de la solution tampon lors de traitements de 2 heures à 60 °C (■). Le potentiel appliqué est de 750 mV vs Ag/AgCl. Les cercles représentent les expériences de contrôle dans les mêmes conditions mais sans médiateur. L'écart type calculé sur la moyenne de trois expériences est représenté par la barre d'erreur.

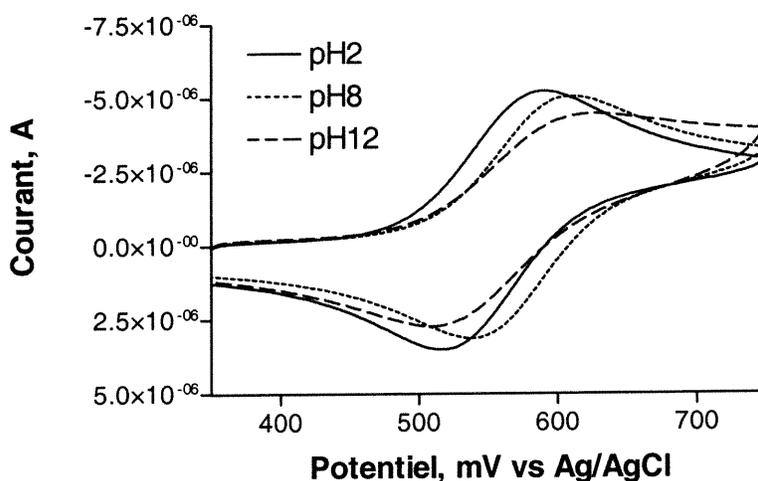


Figure 62. Voltampérogrammes cycliques enregistrés à $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ du $K_4Mo(CN)_8$ (0.5 mM) en solution tampon de différents pH.

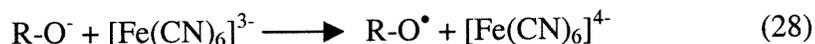
D'un autre côté, la réactivité de la lignine varie également en fonction du pH, affectant l'efficacité de la délignification. Cet aspect n'avait pu être étudié en utilisant la mesure de la cinétique d'échange d'électrons entre le médiateur et la pâte. Cette variation de la réactivité s'observe sur la Figure 61 où sont inclus les résultats de délignification obtenus lors des contrôles à différents pH en appliquant un potentiel sans médiateur. Normalement la pâte est plus apte à réagir à pH légèrement alcalin (pH près de 10) qu'à pH acide puisqu'en milieu basique les fonctions acides ou alcool sont ionisées, rendant les fragments de lignine plus facilement solubilisables, ce qui facilite sa dégradation. Cet effet n'est cependant pas observé sur ce graphique. Le fait que le pourcentage de délignification soit plus élevé à bas pH est probablement dû à la présence d'acides hexènuriques. Ces acides sont formés dans la pâte lors du procédé kraft et contribuent à l'indice kappa, c'est-à-dire qu'ils consomment du permanganate, faussant la mesure du pourcentage de délignification. Les acides hexènuriques peuvent être retirés de la pâte par un lavage acide [173] ce qui fait que la délignification semble meilleure à bas pH. La présence dans la pâte de certains ions métalliques, comme le fer et le manganèse, provenant du bois, peut aussi contribuer au profil de pH de la Figure 61. En effet, ces métaux sont reconnus comme étant des désactivateurs du peroxyde d'hydrogène utilisé durant l'extraction renforcée [22], ce qui rend cette dernière moins efficace. Un moyen d'éviter la décomposition du H_2O_2 est d'extraire ces ions de la pâte par un lavage acide. La pâte ayant été en contact avec un milieu acide (pH 2) contient peu de ces métaux qui se retrouvent solubilisés à bas pH, ce qui expliquerait la tendance de la courbe des contrôles. Le traitement de délignification n'est donc probablement pas meilleur à pH 2 mais l'extraction, qui n'est pas affectée par les métaux, y est plus efficace et les acides hexènuriques sont retirés.

3.4.2.2. Effet de l'oxygène

Afin d'étudier le rôle de l'oxygène dans la délignification par le médiateur $K_4Mo(CN)_8$, des essais ont été réalisés sous conditions anaérobiques pour comparer les résultats avec ceux obtenus lors des expériences en présence d' O_2 . L'oxygène a

été retiré du système d'électrodélicnification en faisant barboter de l'azote dans la cellule d'électrolyse durant une heure en maintenant une circulation de la solution de médiateur (60 °C). Une pression d'azote a aussi été maintenue sur la solution de la cellule d'électrolyse tout au long des traitements pour éviter la redissolution d'O₂ provenant de l'atmosphère. De cette façon, 91 % de l'oxygène dissous a pu être retiré, tel que mesuré par une sonde à O₂ (YSI 5905) calibrée à 60 °C (console modèle YSI 54A). L'extraction a été effectuée en conditions normales, c'est-à-dire que la pâte a été remise en contact de l'oxygène présent dans l'air dès sa sortie de la cellule. Les résultats de la section 3.2.4.1. avec les composés modèles suggèrent que l'oxygène n'a pas d'effet sur les réactions lors de l'extraction alcaline, ce qui évite d'avoir à faire l'extraction sous atmosphère inerte. Ceci est vrai du moins pour les groupements non-phénoliques de type β-O-4, qui sont majoritaires dans la pâte kraft. Les traitements anaérobiques ont donné une délicnification de 27.9 ± 0.4 %, démontrant que l'oxygène n'a pas non plus d'effet significatif sur la délicnification. Ce résultat du traitement anaérobique se situe à l'intérieur de l'intervalle de confiance des résultats présentés au Tableau X. Ceci vient supporter l'hypothèse selon laquelle le médiateur agit comme un transporteur d'électrons entre la lignine et l'électrode et non pas comme un activateur de l'oxygène.

Certains complexes de coordination comme le ferricyanure sont capables d'accélérer la réaction de délicnification à l'oxygène en agissant comme initiateur des réactions radicalaires menant à l'oxydation de la lignine [167]. Pour ce faire, le ferricyanure capte un électron de la fonction ionisée des groupements phénoliques [174]:



De plus, il a été démontré que certaines espèces actives de l'oxygène comme le radical hydroxyle peuvent oxyder les groupements non-phénoliques de la lignine [170], réalisant ainsi une délicnification. Cette hypothèse avait déjà été présentée à la section 3.2.1. lors de la présentation des mécanismes pouvant être utilisés par les

médiateurs pour oxyder la lignine. Puisque les résultats avec et sans oxygène sont sensiblement les mêmes, les médiateurs tels que l'octacyanomolybdate ne semblent pas utiliser l'oxygène et le mécanisme d'oxydation du médiateur le plus probable est celui impliquant le transport d'électrons entre la lignine et l'agent oxydant (laccase ou électrode).

3.4.2.3. Étude de la charge

Selon la Loi de Faraday (équation 29), la quantité molaire d'une espèce (N) qui est oxydée par un courant à une électrode peut être calculée à partir de la charge (Q) qui est passée dans la solution.

$$Q = nFN \quad (29)$$

Le nombre de moles d'électrons nécessaire à l'oxydation d'une mole de cette espèce est représenté par n alors que F est la constante de Faraday (96486 C•mole⁻¹). Le but de l'étude de la charge est d'évaluer s'il existe une corrélation entre la charge consommée lors des traitements de délignification et l'efficacité de cette délignification. Une telle corrélation démontrerait le caractère catalytique du médiateur, c'est-à-dire sa capacité à être continuellement régénéré à l'électrode pour réagir à nouveau avec la lignine. La relation entre la quantité d'électrons ayant été retirés de la lignine pourrait également être utilisée pour prouver le rôle du médiateur ainsi que pour évaluer la quantité de groupements oxydables de la lignine.

La Figure 63 démontre une certaine corrélation entre le pourcentage de délignification de la pâte et la charge totale passée dans la solution de K₄Mo(CN)₈ (1 %) pour les traitements de courte durée. Après le traitement de 17 heures, la divergence entre les deux courbes indique qu'il n'y a plus de corrélation entre la charge et la délignification. Deux explications peuvent être avancées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, il a été démontré qu'après 45 heures de traitement, la délignification maximale possible est atteinte, ce qui cause un plafonnement de la

courbe des valeurs de délignification. La charge, par contre, augmente continuellement, dû au fait que la solution tampon est conductrice. Ceci crée un signal de base qui augmente de façon linéaire tel qu'observé sur les graphiques de charge en fonction du temps présentés à la Figure 63. Les charges dues au signal de base ont été mesurées dans les mêmes conditions que les traitements (en appliquant un potentiel de 750 mV vs Ag/AgCl) mais sans médiateur. Aucune délignification n'a été observée lors de ces contrôles.

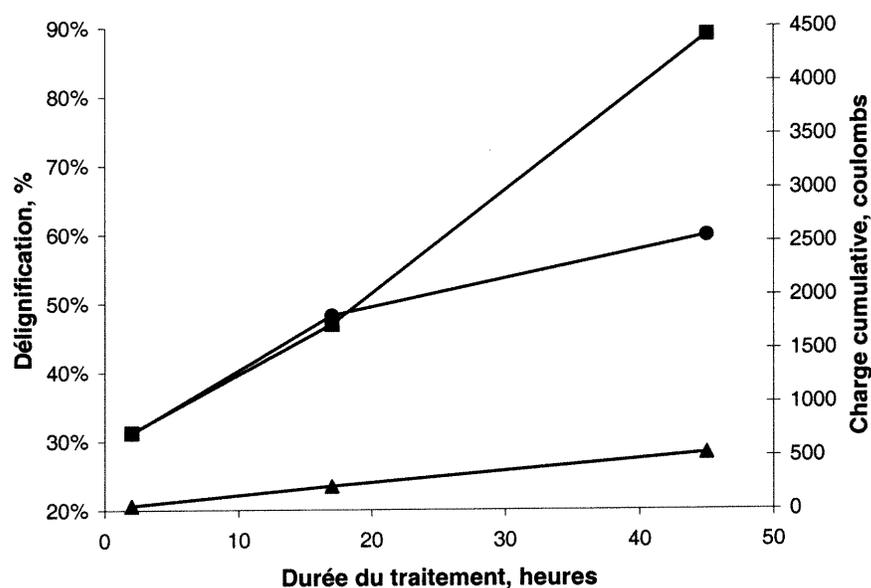


Figure 63. Efficacité de la délignification (●) par oxydation électrochimique à 750 mV vs Ag/AgCl du médiateur $K_4Mo(CN)_8$ (1 % sur pâte), à 60 °C et pH 5. La charge passée durant les traitements (■) et les contrôles sans médiateur (▲) est aussi démontrée.

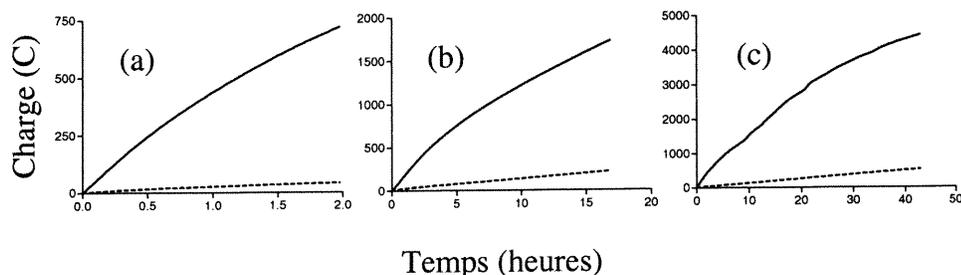


Figure 64. Graphiques de la charge totale pour les traitements de 2, 17 et 45 heures (a, b et c) d'électrodélicnification avec le $K_4Mo(CN)_8$ à 1 % (—) et les contrôles sans le médiateur (.....). Les conditions utilisées sont identiques à celles décrites à la Figure 59.

La seconde explication provient du fait que lorsqu'il y a délicnification, la lignine est fragmentée en composés de faible masse molaire qui peuvent être solubilisés. Ceci s'accompagne d'une coloration de la solution réactionnelle due à la présence de composés aromatiques qui doivent nécessairement provenir de la pâte. Les spectres de la Figure 65 démontrent la présence de ces composés dans les solutions recueillies après la délicnification, la bande à 250 nm étant représentative de l'absorption de la lumière par des systèmes aromatiques. Il est raisonnable de croire que ces composés peuvent également contribuer à la charge associée au signal de fond.

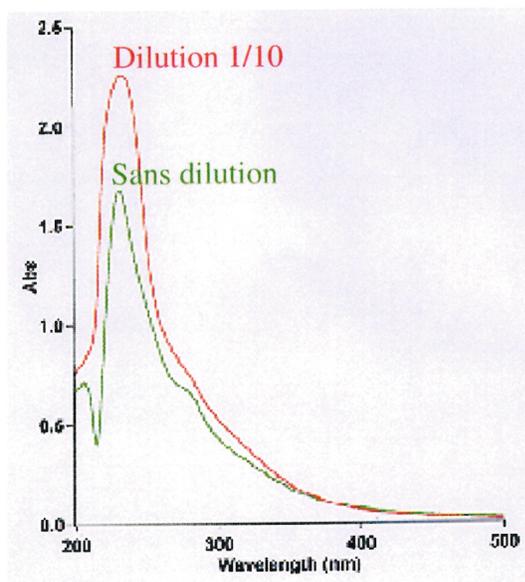


Figure 65. Le spectre UV-Visible de la solution recueillie après un traitement d'électrodélicnification de 45 h à 60 °C, pH 5, diluée 10 fois (—) et celui du traitement contrôle sans médiateur sans dilution (—).

Pour bien illustrer la relation entre la charge et la délicnification, il est nécessaire de soustraire le signal de fond de la charge totale mesurée lors de ces expériences de délicnification. Ces valeurs de charge corrigée ont été portées en graphique en fonction de la diminution de l'indice kappa, représentant la quantité de groupements oxydables contenus dans la pâte (Figure 66). Ce graphique démontre qu'il existe une relation linéaire entre l'indice kappa et la charge corrigée, représentative du taux d'oxydation du médiateur, ce qui montre qu'il y a bien un lien entre la quantité d'électrons transférés à l'électrode et la quantité de groupements oxydés dans la lignine. Les valeurs des charges du graphique de la Figure 66 sont au moins 10 fois plus élevées que la charge nécessaire pour effectuer l'oxydation de tout le médiateur utilisé lors de cette expérience (58.3 coulombs), tel que calculé par l'équation 29 (1 % de $K_4Mo(CN)_8$ sur 30 g de pâte = $6.04 \cdot 10^{-4}$ moles). Le médiateur semble donc être oxydé de nombreuses fois, effectuant plusieurs cycles d'oxydoréduction, tel que suggéré à la Figure 54. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle le médiateur doit agir en véritable agent catalytique afin de réaliser la délicnification de la pâte [88], ce qui est le cas pour l'octacyanomolybdate.

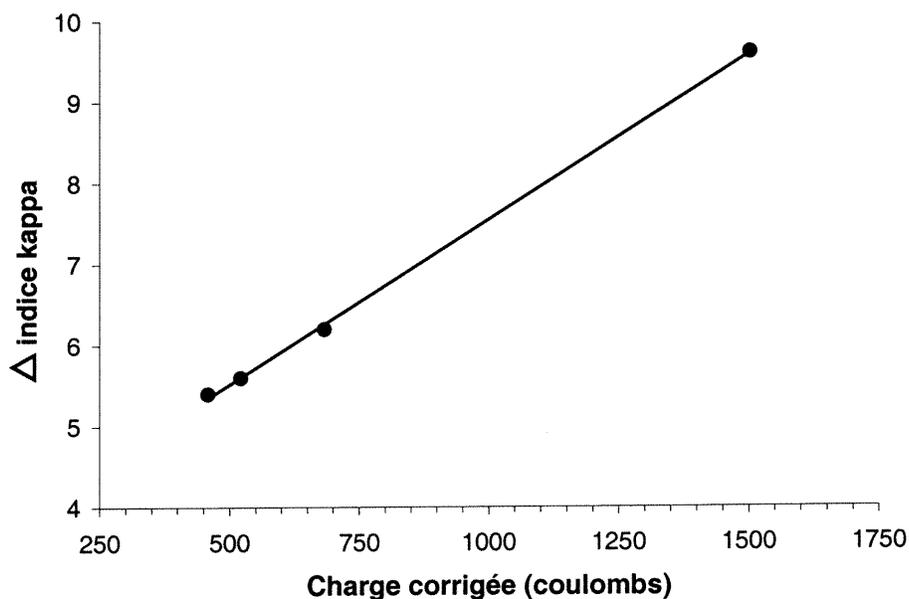


Figure 66. Corrélation entre la diminution de l'indice kappa et la charge corrigée (de laquelle la charge due au signal de fond a été soustraite). Les conditions sont pH 5, 60 °C et 750 mV vs Ag/AgCl. La durée du traitement est variable.

Le fait que la droite du graphique de la Figure 66 ne passe pas par l'origine est dû à l'étape d'extraction alcaline. Cette extraction renforcée au peroxyde d'hydrogène contribue à une diminution de l'indice kappa de 4 unités en moyenne, ce qui correspond à l'interception de la droite sur l'ordonnée ($x = 0$; $y = 3.9$). La pente de ce graphique donne la diminution de l'indice kappa par unité de coulomb ayant été consommé. En sachant qu'une unité de kappa correspond à environ 0.15% de lignine dans la pâte (30 g) et que la masse molaire moyenne d'une unité de base C₆-C₃ de lignine s'estime à 200 g mole⁻¹, il est possible de calculer le nombre d'électrons ayant été retirés par chaque unité de lignine. En utilisant l'équation 29, il a été trouvé que 11.3 électrons/unité C₆-C₃ sont captés à l'électrode, par le biais du médiateur, lors du traitement d'électrodélicnification. À titre de comparaison, 9.0 électrons sont retirés de chaque unité de lignine par un traitement de délicnification à l'oxygène [138].

3.4.3. Électrodélicignification avec d'autres médiateurs

La technique d'électrodélicignification a été utilisée pour évaluer l'efficacité de certains médiateurs qui, ayant un haut potentiel normal apparent, sont probablement de bons agents oxydant de la lignine. Leur efficacité n'a pu être évaluée en utilisant la laccase puisque leur taux d'oxydation par l'enzyme semble être beaucoup trop lent pour pouvoir réaliser une délicignification significative (voir les sections 3.2.5. et 3.3.2.). L'efficacité des médiateurs $[\text{Fe}(2,2'\text{-bipyridine})_3]^{2+}$ et $[\text{Fe}(4,4'\text{-diméthyl-2,2'\text{-bipyridine})_3]^{2+}$ est présentée à la Figure 67 en utilisant soit l'enzyme ou l'électrolyse à 1000 mV vs Ag/AgCl comme moyen d'oxyder les médiateurs. Ces essais ont été réalisés avec un dosage de 0.1 % de médiateur dans le but d'éviter une perte de blancheur de la pâte par les complexes de fer qui sont peu solubles et fortement colorés. Puisque les bipyridines sont des ligands neutres, les complexes de $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ sont chargés positivement en solution et les constituants de la pâte étant chargés négativement, il risque en effet d'y avoir de fortes interactions électrostatiques. L'adsorption de ces composés est aussi favorisée par la nature hydrophobique de leurs ligands. Le $\text{K}_4\text{Mo}(\text{CN})_8$, chargé négativement grâce aux ligands CN^- , ne s'adsorbe pas sur la pâte. Les essais à 0.1 % ont également permis de démontrer qu'il y avait un effet non négligeable de délicignification même à ce faible dosage, point important afin de réduire les coûts associés au médiateur en vue d'une application potentielle du procédé.

Les résultats démontrent que les complexes $[\text{Fe}(\text{bpy})_3](\text{ClO}_4)_2$ et $[\text{Fe}(\text{dmbpy})_3](\text{ClO}_4)_2$ peuvent délicignifier la pâte kraft lorsqu'ils sont oxydés électrochimiquement. Leur efficacité est même légèrement supérieure à celle de l'octacyanomolybdate dans des conditions similaires. Ces résultats sont importants puisqu'il s'agit de la première fois que ces complexes sont utilisés pour oxyder la pâte mais encore plus car ils ont permis de confirmer les résultats des expériences de la section 3.3.4., établissant un lien entre les mesures de cinétique et l'efficacité des traitements sur des échantillons de pâte.

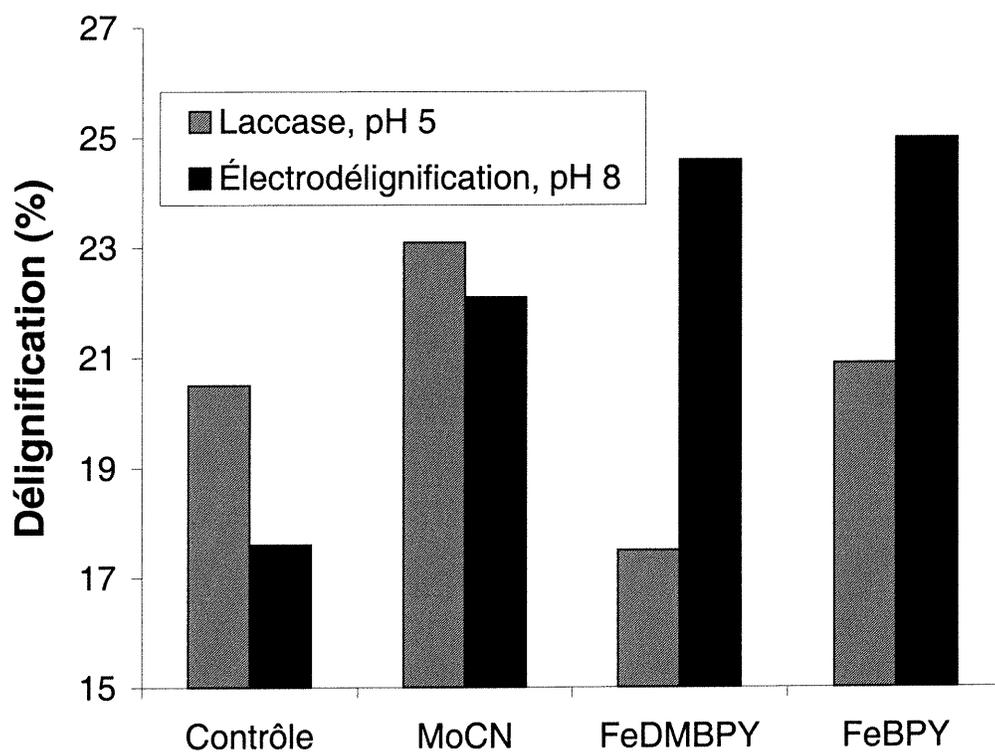


Figure 67. Efficacité de délignification des complexes de fer-bipyridine et du $K_4Mo(CN)_8$ (0.1 % sur pâte) par oxydation enzymatique (laccase $10 U \cdot g^{-1}$) et électrochimique (1000 mV vs Ag/AgCl).

4. Conclusion

Les réactions de transfert d'électrons impliquées dans la délignification de la pâte kraft par le système laccase-médiateur ont été étudiées, principalement grâce à des méthodes électrochimiques comme la voltampérométrie à onde cyclique et l'électrolyse. Ces études ont amené de nouveaux éléments pour la clarification des mécanismes menant à la dégradation par oxydation de la lignine. Les avantages reliés à l'utilisation de l'électrochimie pour l'étude des réactions du système laccase-médiateur ont été clairement démontrés. Les résultats obtenus lors de l'étude de ces réactions ont été appliqués afin de développer l'électrodélignification, un nouveau procédé de délignification sans chlore. Ce procédé se base sur l'utilisation de médiateurs stables pour oxyder la lignine de façon électrochimique.

4.1. Nouveaux médiateurs

Une réalisation majeure de ce projet a été de démontrer que les complexes de coordination métal-ligand sont des agents efficaces de délignification lorsque utilisés en conjonction avec la laccase. Avant cette découverte, les médiateurs étaient uniquement des composés de nature organique comprenant des éléments de structure aromatique ou des systèmes conjugués. La plupart de ces médiateurs contiennent également une fonction hydroxyle sur un atome d'azote (N-OH), par où s'effectuent les transferts d'électrons. La particularité de ces médiateurs est la formation d'un radical lorsqu'ils sont oxydés, les rendant très réactifs. Les complexes de coordination sont strictement des échangeurs d'électrons, lesquels sont transférés à partir de l'atome métallique au centre du complexe. Les ligands ont toutefois une importance cruciale puisqu'ils déterminent le potentiel normal apparent du complexe, en plus d'avoir une incidence sur la solubilité du médiateur. Puisque leur état oxydé ne forme pas de radical, les médiateurs de composés de coordination sont moins réactifs que leurs homologues organiques. La stabilité de leur état oxydé est cependant beaucoup plus grande, évitant les problèmes reliés à la formation d'un

radical comme la dégradation du médiateur et l'inactivation de l'enzyme. Leur stabilité s'avère être un atout majeur lors de leur utilisation pour l'électrodélicnification.

L'octacyanomolybdate ($K_4Mo(CN)_8$) remplit les caractéristiques souhaitables chez un médiateur efficace: il est stable, électrochimiquement et chimiquement réversible et est un bon substrat de la laccase. Son potentiel normal apparent est également suffisamment élevé pour pouvoir oxyder la lignine. Lorsqu'il est utilisé sur la pâte avec la laccase, la délicnification obtenue avec $K_4Mo(CN)_8$ est similaire à celle avec l'ABTS et le HBT, deux médiateurs efficaces. Le $K_4Mo(CN)_8$ a pu être utilisé à de faibles dosages, jusqu'à 0.1 % sur la pâte, tout en donnant des résultats (35 %) semblables à ceux obtenus avec cinq fois plus de médiateur (38 %). Autre caractéristique importante, le $K_4Mo(CN)_8$ est très sélectif envers la lignine, c'est-à-dire qu'il ne dégrade pas la cellulose des fibres, chose à éviter pour obtenir un papier de bonne qualité. Le médiateur demeure toutefois quelque peu coûteux à produire, bien que le coût réel n'ait pu qu'être estimé à partir de la synthèse réalisée à l'échelle du laboratoire, le $K_4Mo(CN)_8$ n'étant pas disponible commercialement. L'octacyanomolybdate est également toxique pour la faune aquatique et cela même après avoir subi un traitement avec les effluents d'usine. Ces derniers points négatifs freinent donc l'application du $K_4Mo(CN)_8$ à grande échelle comme agent de blanchiment. Les problèmes liés au coût et à la toxicité pourraient être évités en envisageant le recyclage du médiateur. La grande stabilité du $K_4Mo(CN)_8$ a permis d'effectuer jusqu'à sept traitements sur des échantillons de pâte sans perte notable d'efficacité. Il a également été démontré que la quantité de médiateur se décomposant dans les conditions utilisées pour les traitements enzymatiques (pH 5, température 60°C, à l'abri de la lumière) n'est que d'environ 25 % après plus de 24 heures d'exposition. La décomposition du $K_4Mo(CN)_8$ est très importante à pH très acide et à haute température, ce qui résulte en la formation de quantités équivalentes de cyanure. Il faut toutefois mentionner que, en se basant sur les résultats obtenus en laboratoire, la décomposition serait plutôt faible dans les conditions existant dans le

circuit de mise en pâte kraft. La formation de HCN serait également limitée par l'alcalinité des liqueurs de cuisson.

La possibilité de détruire le médiateur dans le circuit de récupération des liqueurs de cuisson pour éviter les problèmes de toxicité a aussi été envisagée, mais les résultats suggèrent qu'il pourrait y avoir une accumulation du molybdène dans le système. Il n'a cependant pas été évalué si cette accumulation pourrait avoir un impact sur le système de mise en pâte.

4.2. Réactions d'oxydation

Les mécanismes menant à l'oxydation du médiateur par la laccase, à l'oxydation des composés modèles de la lignine par les médiateurs et à la délignification par les médiateurs ont été étudiés pour déterminer l'impact des conditions sur l'efficacité du système et pour évaluer la performance des différents médiateurs. Ce dernier point est particulièrement important afin de cibler les structures ou les éléments de structure qui font d'une molécule un médiateur efficace. Ces informations pourront être utilisées afin de développer un médiateur sur mesure pour la délignification enzymatique ou électrochimique de la pâte kraft.

La mesure des constantes de vitesse de pseudo-premier ordre, $k_{f(Lc-M)}$, pour l'oxydation des médiateurs par la laccase a clairement démontré que le paramètre ayant le plus d'influence sur la vitesse de la réaction est ΔE^0 , l'écart entre les potentiels normaux apparents de l'enzyme et du médiateur. La relation entre k_f et le E^0 du médiateur est linéaire sur la plage de potentiels des médiateurs utilisés (de -10 à +750 mV vs Ag/AgCl) et diminue avec l'augmentation du potentiel. Ceci est causé par le fait que la réaction de transfert d'électrons est thermodynamiquement défavorisée lorsque le ΔE^0 est faible puisque ce paramètre agit comme une force motrice pour déplacer les électrons du médiateur vers l'enzyme. D'autres paramètres peuvent toutefois fortement influencer l'oxydation du médiateur par l'enzyme.

Certains médiateurs organiques peuvent effectuer des interactions favorables avec le site actif de la laccase, diminuant l'effet du E^0 sur la vitesse d'oxydation. Le HBT par exemple est efficacement oxydé par la laccase. Ceci suggère que la structure du site actif entourant le Cu_{T1} agit de façon à faciliter le transfert d'électrons par interactions favorables avec le substrat. Ces interactions pourraient être favorisées pour certains types de substrats comme les médiateurs de type N-OH, ce qui expliquerait la différence entre les taux d'oxydation de ces médiateurs et des complexes de coordination. La présence continue d'oxygène dans la solution en quantités importantes pourrait aussi contribuer à l'effet catalytique de la laccase poussant l'équilibre vers la formation des produits d'oxydation.

Le pH est aussi un facteur important lors de l'oxydation d'un substrat par la laccase. Le pH influence le k_f de plusieurs façons: en faisant varier le potentiel normal apparent du médiateur, en inhibant la réduction de l'oxygène en eau par la laccase et, dans le cas de l'ABTS, en modifiant la charge du médiateur. Le E^0 des médiateurs possédant une fonction N-OH augmente de façon considérable en abaissant le pH. Ainsi, l'oxydation du médiateur par la laccase sera défavorisée alors que l'oxydation de la lignine par le médiateur sera thermodynamiquement favorisée. Cet effet a également été remarqué pour l'hexacyanoferrate ($K_4Fe(CN)_6$), puisque le complexe protoné existe à bas pH et que son E^0 est plus élevé. À l'opposé, une augmentation du pH diminue le taux de réduction de l' O_2 en H_2O puisque les ions OH^- sont des inhibiteurs de la laccase. Finalement, le site actif de l'enzyme étant chargé positivement, les médiateurs chargés négativement effectueront de meilleures interactions, facilitant leur oxydation. Le profil des courbes de k_f en fonction du pH est donc un résultat de la combinaison de ces effets, ce qui explique les écarts importants de pH maximal (Lc-ABTS $pH_{max} = 4.5$; Lc- $K_4Mo(CN)_8$ $pH_{max} = 3.0$) pour les réactions. Il est donc important de retenir qu'il n'y a pas de pH optimal pour l'enzyme, mais plutôt un pH maximal pour une réaction spécifique de la laccase avec un médiateur.

L'étude de l'oxydation des composés modèles de la lignine, soit par la laccase ou en utilisant une électrode pour oxyder le médiateur a permis d'acquérir des informations utiles sur les transferts d'électrons impliqués dans ces réactions. Le E^0 du médiateur est également un facteur déterminant dans ces réactions puisqu'il influence, en partie, l'oxydation du médiateur et l'oxydation du CML. Ainsi, même si la laccase est capable d'oxyder le $K_4Mo(CN)_8$, ce dernier n'a donné aucune oxydation des composés modèles VA et DI qui sont difficilement dégradés à cause de leur potentiel d'oxydation élevé. L'utilisation de médiateurs ayant un E^0 élevé et qui pourraient oxyder ces CML est limitée par l'oxydation du médiateur par la laccase. L'électrolyse en appliquant un potentiel élevé à l'électrode s'est avéré être un moyen d'utiliser des médiateurs comme le $[Fe(bpy)_3](ClO_4)_2$ et le $K_4Ru(CN)_6$ pour oxyder les CML difficilement oxydables. Ces médiateurs ne sont pas oxydables par la laccase justement à cause de leur E^0 élevé.

L'utilisation de l'électrolyse a permis d'évaluer l'implication de l'oxygène dans l'oxydation des CML, chose impossible à réaliser en utilisant la laccase puisque cette dernière nécessite l'oxygène pour effectuer l'oxydation du médiateur. L' O_2 ne semble pas intervenir dans toutes les réactions puisque les traitements avec le dimère I et l'alcool vératrylique effectués sous conditions anaérobiques n'ont pas donné de différence autant au niveau de la nature des produits formés que de la quantité formée. Dans le cas du dimère IV (liaison β -1), l'oxygène est clairement impliqué dans la formation du benzaldéhyde, un des deux produits de clivage du dimère IV. Ainsi en retirant l' O_2 , il y a beaucoup moins de benzaldéhyde de formé. La quantité de dimère IV oxydé ne change toutefois pas, de même que la quantité de vératraldéhyde formé.

Une différence au niveau de la réactivité du HBT sur le dimère I a également été observée. En absence d'oxygène, le HBT démontre une stéréospécificité envers un des deux diastéréomères du dimère I. Cette spécificité peut cependant s'expliquer par le fait que le médiateur forme un dioxyde en présence d'oxygène et que le monoxyde, présent sous conditions anaérobiques, est incapable d'oxyder les deux

isomères. La différence est donc due au médiateur et non à une différence de la réactivité du dimère I en présence d'oxygène. Ceci a été confirmé en utilisant l'ABTS sans O_2 , où aucune stéréospécificité n'a pu être observée. Ainsi il serait plausible de conclure que si l'oxygène peut jouer un rôle dans l'oxydation des composés modèles de la lignine par les médiateurs, il n'est pas nécessaire à leur oxydation et que les réactions s'effectuent peut être selon d'autres mécanismes en absence d'oxygène. La stéréospécificité de la réaction HBT-dimère I a également permis d'appuyer l'hypothèse selon laquelle l'oxydation du dimère s'effectue sur la chaîne interphénylpropane puisque, contrairement aux cycles situés aux extrémités du dimère, l'accessibilité de la chaîne est différente d'un diastéréomère à l'autre.

Au niveau des réactions d'échange d'électrons entre les médiateurs et les CML, peu de résultats ont pu être obtenus. Le potentiel du médiateur semble avoir une moins grande importance par rapport aux traitements électrolytiques d'une durée de plusieurs heures. La réaction du $K_4Ru(CN)_6$ avec les trois CML par exemple semble inexistante puisque k_{cat} , la constante de vitesse de second ordre, est nulle. Si le $K_4Ru(CN)_6$ est continuellement oxydé par l'électrode (traitement de 20 heures), l'oxydation du VA est cependant complète. Il faut donc conclure que le transfert d'électrons du CML vers le médiateur existe bien mais qu'il est trop lent pour pouvoir être mesuré par voltampérométrie à onde cyclique.

Il a également été prouvé que c'est bel et bien le médiateur qui oxyde les CML. Pour arriver à cette conclusion, une solution de $K_4Ru(CN)_6$ a été complètement oxydée électrochimiquement puis retirée de la cellule d'électrolyse. Une quantité de composé modèle VA a ensuite été ajoutée de façon à obtenir un ratio de concentration de 50 molécules de $K_4Ru(CN)_6$ pour 1 molécule de VA. De cette façon, le tiers du VA a été oxydé, démontrant que le $K_4Ru(CN)_6$ est responsable de cette oxydation. À un ratio de 1 pour 1, aucune oxydation de VA n'est observée, démontrant qu'il s'avère essentiel d'oxyder continuellement le médiateur pour effectuer l'oxydation catalytique des CML.

L'étude de l'oxydation des composés modèles de la lignine ne pourrait être complète sans comparaison avec l'oxydation de la pâte. Les constantes de vitesse de pseudo-premier ordre, $k_{f(M-Lig)}$, ont été mesurées pour l'oxydation de la pâte par divers médiateurs. Encore une fois, le E^0 du médiateur semble jouer un rôle important dans la vitesse de la réaction d'oxydation. L'ABTS réagit cependant plus rapidement que tous les autres médiateurs utilisés, ceci probablement dû au fait que la forme oxydée implique un cation radical et que la réaction de disproportionnement résulte en la formation du dication très réactif. Le profil de $k_{f(M-Lig)}$ en fonction du pH a également été déterminé en utilisant le $K_4Mo(CN)_8$. Le pH optimal de la réaction semble être un compromis entre la réactivité de la pâte, qui augmente avec une élévation du pH, et les propriétés du médiateur. Bien que le E^0 du $K_4Mo(CN)_8$ soit pratiquement indépendant du pH, sa réversibilité diminue aux pH très alcalins. Le résultat est une courbe de pH très évasée dont le sommet se situe entre 8 et 10. Il a été démontré que les complexes de fer $[Fe(bpy)_3](ClO_4)_2$ et $[Fe(dmbpy)_3](ClO_4)_2$ peuvent être utilisés pour oxyder la pâte et que la vitesse de transfert des électrons de ces médiateurs est semblable à celle du $K_4Mo(CN)_8$. Malheureusement, ces médiateurs ne sont pas oxydés assez rapidement par la laccase pour effectuer une délignification et il fallait trouver une autre façon d'en tirer profit.

4.3. Électrodélignification

Une nouvelle méthode de délignification a été développée dans le but de palier aux limites imposées par l'enzyme au niveau de la sensibilité aux conditions et surtout aux médiateurs utilisables. L'électrodélignification a notamment démontré qu'en oxydant le médiateur $K_4Mo(CN)_8$ à une électrode avant de le faire réagir sur la pâte, il est possible d'obtenir une délignification similaire à celle obtenue avec la laccase pour un temps de réaction identique. Puisque l'activité oxydante de l'électrode ne diminue pas avec le temps, contrairement à celle de l'enzyme, il a été possible de pousser la délignification de la pâte jusqu'à 60 % (après 45 heures de traitement), ce qui semble être le maximum atteignable par ce système. Ce résultat

est important puisqu'il démontre que la pâte ne peut être totalement oxydée par le $K_4Mo(CN)_8$, une fraction de la lignine devant demeurer inaccessible ou trop difficilement oxydable. La perte de viscosité attribuable à ce traitement intensif est minime (6 %), ce qui démontre la spécificité du médiateur pour la lignine, laissant les fibres de cellulose intactes.

L'effet de certains paramètres a également été évalué. L'oxygène, une fois de plus, ne semble pas être nécessaire à l'oxydation de la pâte par le médiateur puisque le pourcentage de délignification n'est pas affecté par le retrait de l' O_2 . La courbe de la délignification en fonction du pH présente un profil similaire à celui obtenu lors de la mesure des paramètres cinétiques. La diminution de l'efficacité à bas pH est cependant moins prononcée dans le cas de l'électrodélignification mais ceci est attribué à l'étape d'extraction. Cette nouvelle méthode a permis de démontrer l'efficacité des complexes de fer pour la délignification de la pâte. Il apparaît désormais clairement que si ces complexes ne fonctionnent pas dans le système de délignification enzymatique, c'est uniquement parce qu'ils ne sont pas oxydés suffisamment rapidement par la laccase et ce, vraisemblablement à cause de leur E^0 élevé.

Un autre avantage de l'électrodélignification est la possibilité de mesurer la charge nécessaire pour obtenir la délignification de la pâte. Ces résultats ont démontré que la quantité de médiateur $K_4Mo(CN)_8$ utilisée pour traiter la pâte a été oxydée plus de dix fois, démontrant la nécessité du caractère catalytique des réactions d'oxydation par le médiateur.

En terminant, tous ces résultats doivent être considérés comme une tentative d'évaluer quelles sont les caractéristiques les plus importantes chez un médiateur afin de rendre le système le plus efficace que possible. Il est cependant difficile d'établir pourquoi certains médiateurs fonctionnent bien alors que d'autres sont peu efficaces. Tout comme les médiateurs de nature organique possédant une fonction N-OH sont de bons médiateurs pour la délignification de la pâte, il se peut que certaines

structures ou certains ligands favorisent ou défavorisent les réactions de transfert d'électrons. Les complexes de cyanure, du moins ceux avec le ruthénium et le molybdène, semblent être efficaces alors que les complexes de fer-bipyridines n'ont donné aucun résultat positif concernant l'oxydation des CML. La nature de l'atome métallique central peut y être pour quelque chose, de même que les ligands qui sont imposants comme les bipyridines peuvent ralentir le transfert d'électrons avec le centre métallique. Le fer serait par contre un métal de choix pour le développement d'un nouveau médiateur du système de délignification enzymatique ou d'électrodélignification puisqu'il est très abondant, peu coûteux et non-toxique.

En comparant les conclusions obtenues avec les diverses méthodes utilisées lors de ce projet, certains points sont discordants et nécessitent une attention particulière. Bien que les composés modèles de la lignine sont supposés représenter les groupements de la lignine, le système laccase- $K_4Mo(CN)_8$, incapable d'oxyder le dimère I (β -O-4, le type de lien le plus abondant) peut oxyder la pâte. Ceci ne signifie pas que l'utilisation des CML n'est pas une bonne façon de représenter la lignine. Une explication plausible serait que la dépolymérisation de la lignine ne nécessite pas obligatoirement le clivage de tous les liens. La délignification pourrait s'effectuer par la scission de certains liens, plus facilement oxydables, résultant en la solubilisation des fragments de lignine. La délignification par les médiateurs n'oxydant pas les CML serait ainsi possible mais limitée. De façon contraire, des médiateurs qui oxydent plusieurs types de CML seraient plus susceptibles d'être efficaces lors de la délignification puisqu'ils rencontreraient dans la lignine plus de types de liens accessibles à l'oxydation.

Pour ce qui est du potentiel normal apparent du médiateur, il est un facteur déterminant sur les réactions impliquées dans la délignification par le système laccase-médiateur, malgré que d'autres paramètres viennent toutefois influencer les réactions de transfert d'électrons.

Ce projet a donc permis de démontrer l'efficacité des médiateurs basés sur des complexes de coordination, dont les propriétés de stabilité sont très avantageuses pour la délignification par le système laccase-médiateur. Un autre avantage de cette classe de composés est qu'il est facile, en variant la nature des ligands, d'en modifier les propriétés comme le potentiel, qui a été démontré comme étant un paramètre très important. Bien que l'application dans l'industrie papetière du système laccase-médiateur ne soit chose envisageable à court terme, le développement de nouveaux médiateurs, notamment basés sur des complexes de fer, pourrait en accélérer la venue. Une grande partie de la recherche présentée dans cette thèse avait pour but de mieux comprendre et de mieux prédire les mécanismes d'oxydation du système laccase-médiateur-lignine. Les résultats obtenus pourraient s'avérer d'une grande utilité notamment pour perfectionner le procédé de bioblanchiment, pour la mise au point de capteurs appliqués au procédé kraft ainsi que pour développer des méthodes d'analyse pour l'étude électrochimique du système laccase-médiateur-lignine. L'électrodélignification s'avère très intéressante grâce au niveau de délignification qui est possible d'atteindre avec cette technique assez simple, bien qu'il subsiste quelques points à améliorer.

4.4. Travaux futurs

Les travaux qui pourraient être réalisés à la suite de ce projet peuvent être divisés en trois catégories. La première de ces catégories regroupe les expériences à compléter afin d'améliorer la compréhension du système laccase-médiateur et des réactions de transfert d'électrons qui y ont lieu.

Il y a peu à dire à propos des expériences sur l'oxydation des composés modèles de la lignine puisqu'il s'agit davantage d'une méthode d'évaluation de l'efficacité d'un système d'oxydation que d'un moyen d'élucider les mécanismes d'oxydation de façon précise. La mesure des constantes de vitesse pourrait toutefois être poussée plus loin en calculant les énergies de réorganisation selon la théorie de

Marcus. Les constantes de second ordre k_{cat} doivent cependant être calculées pour les réactions enzyme-médiateur afin de pouvoir évaluer si le système obéit à cette théorie. Ce qui limite cette étude est le fait que la concentration active de la laccase est nécessaire au calcul de valeurs précises de la constante de vitesse de second ordre k_{cat} , ce qui n'a pu être réalisé. Une des méthodes qui pourrait être essayée afin de mesurer cette concentration active serait d'évaluer l'oxydation d'un substrat en absence d'oxygène ou en bloquant le site T2/T3, siège de la réaction de réduction de l'oxygène en eau. La quantité de substrat ayant été oxydé serait ainsi directement reliée à la concentration de laccase active.

La seconde catégorie concerne les travaux de recherche sur la nouvelle classe de médiateurs de la laccase. La première voie à explorer serait celle des complexes de coordination à partir d'un atome central de molybdène. Les résultats obtenus avec le $K_4Mo(CN)_8$ suggèrent fortement que le molybdène est un bon échangeur d'électrons. Puisqu'il est de plus en plus coûteux et peu toxique [177], d'autres complexes basés sur ce métal pourraient certainement faire de bons médiateurs. Les expériences de la section 3.1.2.2.2. ayant clairement démontré que ce sont les ligands CN^- qui sont la cause du caractère toxique du $K_4Mo(CN)_8$, un médiateur non toxique pourrait être obtenu en utilisant des ligands également non toxiques. Ces ligands auraient avantage à être chargés négativement afin d'obtenir une charge globale du complexe qui soit négative, ce qui semble favoriser l'interaction avec le site actif de la laccase.

Finalement, je crois personnellement que les efforts réalisés pour poursuivre ces travaux devraient être orientés vers le système d'électrodélicnification. Il a en effet été démontré qu'une délicnification de 60 % peut être atteinte en utilisant ce système, ce qui pourrait représenter une diminution importante de la quantité de ClO_2 nécessaire au blanchiment de la pâte kraft. Ce taux de délicnification ayant été atteint en 45 heures, des efforts devront être apportés afin d'en augmenter l'efficacité et d'obtenir une délicnification aussi importante en un temps plus court, afin de rendre le système attrayant pour l'industrie.

L'efficacité du système d'électrodélicignification pourrait être augmentée notamment en utilisant d'autres médiateurs. D'après les résultats obtenus, un médiateur stable possédant un potentiel rédox autour de 1 à 1.2 V vs Ag/AgCl devrait pouvoir effectuer une délicignification efficace. L'atome métallique devrait être choisi pour sa capacité à effectuer des transferts rapides d'électrons. Les ligands devraient être de petite taille et être choisis de façon à obtenir un complexe chargé négativement afin de minimiser la perte de médiateur par adsorption sur la pâte. L'augmentation de l'efficacité en utilisant un médiateur à haut E^0 repose sur le fait qu'en utilisant l'électrolyse il est possible d'appliquer un potentiel plus élevé à l'électrode de travail, augmentant la vitesse d'oxydation du médiateur. Dans le cas présent, le potentiel maximal pouvant être appliqué était limité par le matériau utilisé pour la fabrication de l'électrode. En utilisant un treillis métallique (comme de l'acier inoxydable par exemple [175]) à grande surface de contact, le potentiel appliqué pourrait être bien plus élevé. Enfin, si l'oxydation du médiateur à l'électrode est très rapide, le débit de la solution pourrait aussi être augmenté afin d'accélérer le processus en général. Bref, il y a encore bien des paramètres qui pourraient être ajustés afin de permettre l'application de cette technique, mais cette application repose avant tout sur le développement d'un médiateur possédant les caractéristiques nommées plus haut.

5. Références

1. D. Hunter, Papermaking. The history and technique of an ancient craft., Dover Publications, Inc., New York, p.48-63; 313-316 (1978).
2. T. M. Grace et E. W. Malcom, éditeurs, Alkaline Pulping, 3^e édition, Pulp and Paper Manufacture, Vol. 5, McGraw-Hill, p.4-7; 117; 15-17; 473-476; (1989).
3. M. Koops, British Patent No 2433, Angleterre (1800).
4. H. Burgess et C. Watt, British Patent No 1942, Angleterre (1853).
5. C. F. Dahl, U.S. Patent No 296935, États-Unis (1884).
6. G. Carruthers, Paper in the making, The Garden City Press Cooperative, Toronto, p.135 (1947).
7. Pulp and Paper Products Council, Wood Pulp Data, (2000).
8. E. Sjöström, Wood chemistry: fundamentals and applications, 2^e édition, Academic Press, San Diego, p.1-20 (1993).
9. E. Adler, *Wood Science and Technology* 11:169-218 (1977).
10. J. Gullichsen et C.-J. Fogelholm, éditeurs, Chemical Pulping, Papermaking Science and Technology, Vol. 6A, Fapet Oy, Helsinki, p. 38, 19-73 (1999).
11. G. D. Christian, Analytical Chemistry, John Wiley & Sons, New York, p. 189-196; 363-365 (1994).
12. TAPPI Standard T236 cm-85, Kappa number of Pulp (1984).
13. J.-E. Levlin et L. Söderhjelm, éditeurs, Pulp and Paper Testing, Papermaking Science and Technology, Vol. 17, Fapet Oy, Helsinki, p. 173-174 (1999).
14. PAPTAC Standard G.24P, Cupriethylenediamine viscosity of pulp (1988).
15. F. L. Straus et R. M. Levy, *Paper Trade Journal* 114:33-37 (1942).
16. R. Hise dans Pulp bleaching: principles and practice (C. W. Dence et D. W. Reeve, éditeurs), TAPPI Press, Atlanta, p. 243-257 (1996).
17. Association Canadienne des Pâtes et Papiers, Tables de statistiques de l'ACPP, (1999).
18. D. W. Reeve dans Pulp bleaching: principles and practice (C. W. Dence et D. W. Reeve, éditeurs), TAPPI Press, Atlanta, p. 263-289 (1996).

19. J. J. Kolar, B. O. Lindgren et B. Patterson, *Wood Science and Technology* 17:117 (1983).
20. T. J. McDonough dans Pulp bleaching: principles and practice (C. W. Dence et D. W. Reeve, éditeurs), TAPPI Press, Atlanta, p. 215-237 (1996).
21. B. v. Lierop, A. Skothos et N. Liebergott dans Pulp bleaching: principles and practice (C. W. Dence et D. W. Reeve, éditeurs), TAPPI Press, Atlanta, p. 323-341 (1996).
22. J. R. Anderson et B. Amini dans Pulp bleaching: principles and practice (C. W. Dence et D. W. Reeve, éditeurs), TAPPI Press, Atlanta, p. 413-438 (1996).
23. T. K. Kirk et A. Kelman, *Phytopathology* 55:739 (1965).
24. T. K. Kirk et H. H. Yang, *Biotechnology Letters* 1:347-352 (1979).
25. I. D. Reid, M. G. Paice, C. Ho et L. Jurasek, *TAPPI Journal* 73:149-153 (1990).
26. M. G. Paice, L. Jurasek, C. Ho, R. Bourbonnais et F. Archibald, *TAPPI Journal* 72:217-221 (1989).
27. F. S. Archibald, R. Bourbonnais, L. Jurasek, M. G. Paice et I. D. Reid, *Journal of Biotechnology* 53:215-236 (1997).
28. L. Viikari, M. Ranua, A. Kantelinen, J. Sundquist et M. Linko de Third International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry, STFI, Stockholm, 1986, p. 67-69.
29. R. L. Farrell, L. Viikari et D. Senior dans Pulp bleaching: principles and practice (C. W. Dence et D. W. Reeve, éditeurs), TAPPI Press, Atlanta, p. 363-376 (1996).
30. H. Yoshida, *Journal of the Chemical Society* 43:472-486 (1883).
31. L. Gianfreda, F. Xu et J.-M. Bollag, *Bioremediation Journal* 3:1-25 (1999).
32. M. H. Thuesen, O. Farver, B. Reinhammar et J. Ulstrup, *Acta Chemica Scandinavia* 52:555-562 (1998).
33. A. Messerschmidt, *Biochemical Society Transactions* 20:364-368 (1992).
34. E. I. Solomon, U. M. Sundaram et T. E. Machonkin, *Chemical Reviews* 96:2577 (1996).

35. D. M. Dooley, J. Rawlings, J. H. Dawson, P. J. Stephens, L.-E. Andréasson, B. G. Malmström et H. B. Gray, *Journal of the American Chemical Society* 101:5038-5046 (1979).
36. B. Reinhammar dans Copper Proteins and Copper Enzymes, Vol. 3 (R. Lontie, éditeur), CRC Press Inc., Boca Raton, p. 2,4 (1984).
37. E. Abadulla, T. Tzanov, S. Costa, K.-H. Robra, A. Cavaco-Paulo et G. M. Gübitz, *Applied and Environmental Microbiology* 66:3357-3362 (2000).
38. C. Johannes et A. Majcherczyk, *Applied & Environmental Microbiology* 66:524-528 (2000).
39. A. Majcherczyk et C. Johannes, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1474:157-162 (2000).
40. M. A. Pickard, R. Roman, R. Tinoco et R. Vazquez-Duhalt, *Applied & Environmental Microbiology* 65:3805-3809 (1999).
41. P. Reyes, M. A. Pickard et R. Vazquez-Duhalt, *Biotechnology Letters* 21:875-880 (1999).
42. Y. Wong et J. Yu, *Water Research* 33:3512-3520 (1999).
43. A. Potthast, T. Rosenau, C.-L. Chen et J. S. Gratzl, *Journal of Organic Chemistry* 60:4320-4321 (1995).
44. G. T. R. Palmore et H. H. Kim, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 464:110-117 (1999).
45. S. Tsujimura, B. Tatsumi, J. Ogawa, S. Shimizu, K. Kano et T. Ikeda, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 496:69-75 (2001).
46. D. Leech et K. O. Feerick, *Electroanalysis* 12:1339-1342 (2000).
47. F. Trudeau, F. Daigle et D. Leech, *Analytical Chemistry* 69:882-886 (1997).
48. F. Daigle, F. Trudeau, G. Robinson, M. R. Smyth et D. Leech, *Biosensors & Bioelectronics* 13:417-425 (1998).
49. R. Bourbonnais, M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier et M. Yaguchi, *Applied and Environmental Microbiology* 61:1876-1880 (1995).
50. J. Marton dans Lignins: Occurrence, Formation Structure and Reactions (K. V. Sarkanen et C. H. Ludwig, éditeurs), p. 673-675 (1971).

51. P. J. Kersten, B. Kalyanaraman, K. E. Hammel, B. Reinhammar et T. K. Kirk, *Biochemical Journal* 268:474-480 (1990).
52. R. Bourbonnais et M. G. Paice, *FEBS Letters* 267:99-102 (1990).
53. R. Bourbonnais et M. G. Paice, *Applied Microbiology and Biotechnology* 36:823-827 (1992).
54. R. Bourbonnais et M. G. Paice, *TAPPI Journal* 76:199-204 (1996).
55. F. Xu, J. J. Kulys, K. Duke, K. Li, K. Krikstopaitis, H.-J. W. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte et P. Schneider, *Applied and Environmental Microbiology* 66:2052-2056 (2000).
56. P. W. Atkins, *Physical Chemistry*, 5^e édition, W.H. Freeman and Company, New York, p. 147-154; 333-342 (1994).
57. H. P. Call, PCT World patent application No WO 94/29510, Allemagne (1994).
58. H. P. Call, PCT World patent application No WO 97/36041, Allemagne (1997).
59. R. Zing, I. J. Fletcher, B. Freiermuth et K. Huber, PCT World patent application No WO 97/06244 (1997).
60. R. Bourbonnais, D. Rochefort, M. G. Paice, S. Renaud et D. Leech dans *Oxidative Delignification Chemistry. Fundamentals and Catalysis*, Vol. 785, ACS, p. 391-399 (2001).
61. K. C. Li, F. Xu et K. E. L. Eriksson, *Applied and Environmental Microbiology* 65:2654-2660 (1999).
62. K. C. Li, R. F. Helm et K. E. L. Eriksson, *Biotechnology and Applied Biochemistry* 27:239-243 (1998).
63. N. H. Furman et C. O. Miller, *Inorganic Syntheses* 3:160-163 (1950).
64. J. VanDePoel et H. M. Neumann, *Inorganic Syntheses* 11:53-56 (1968).
65. E. A. Heintz, *Inorganic Syntheses* 7:142-146 (1963).
66. P. W. Oxley, B. M. Adger, M. J. Sasse et M. A. Forth, *Organic Syntheses* 67:187-191 (1989).
67. F. H. Burstall et R. S. Nyholm, *Journal of the Chemical Society*:3570-3579 (1952).

68. P. A. Lay, A. M. Sargeson et H. Taube, *Inorganic Syntheses* 24:291-299 (1986).
69. K. Addleman et F. S. Archibald, *Applied and Environmental Microbiology* 59:266-273 (1993).
70. G. Fahraeus et B. Reinhammar, *Acta Chemica Scandinavia* 21:2367-2378 (1967).
71. S. L. Scott, W.-J. Chen, A. Bakac et J. H. Espenson, *Journal of Physical Chemistry* 97:6710-6714 (1993).
72. C. P. Andrieux, P. Hapiot et J.-M. Savéant, *Chemical Reviews* 90:723-738 (1990).
73. R. S. Nicholson, *Analytical Chemistry* 37:1351-1355 (1965).
74. A. E. G. Cass, G. Davis, G. D. Francis, H. A. O. Hill, W. J. Aston, I. J. Higgins, E. V. Plotkin, L. D. L. Scott et A. P. F. Turner, *Analytical Chemistry* 56:667-671 (1984).
75. J. Heinze, *Angewandte Chemie* 23:831-918 (1984).
76. R. Santucci, A. Picciau, L. Campanella et M. Brunori, *Current Topics in Electrochemistry* 3:313-328 (1994).
77. D. K. Gosser, Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms, VCH Publishers, Inc., New York, p.28 (1993).
78. P. T. Kissinger et W. R. Heineman, éditeurs, Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry, 2^e édition, Marcel Dekker Inc., New York, p.81, (1996).
79. L. Meites et P. Zuman, Handbook series in inorganic electrochemistry, Vol. 1-8, CRC Press, Boca Raton, (1983).
80. A. B. P. Lever et E. S. Dodsworth dans Inorganic electronic structure and spectroscopy, Vol. II: Applications and case studies (E. I. Solomon et A. B. P. Lever, éditeurs), John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 228-289 (1999).
81. J. A. Fee et B. G. Malmström, *Biochimica et Biophysica Acta* 153:299-302 (1968).
82. R. Bourbonnais, D. Rochefort, M. Paice, S. Renaud et D. Leech, PCT World Patent Application No WO 99/54545, Canada (1999).

83. F. A. Cotton, G. Wilkinson et P. L. Gaus, Basic inorganic chemistry, 3^e édition, John Wiley & Sons, Inc., New York, p. 165-173; 503-519 (1995).
84. A. B. P. Lever, *Inorganic Chemistry* 29:1271 (1990).
85. S. S. Fielder, M. C. Osborne, A. B. P. Lever et W. J. Pietro, *Journal of the American Chemical Society* 117:6990-6993 (1995).
86. A. J. Bard et L. R. Faulkner, Electrochemical methods, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1980).
87. H. Taube, Electron Transfer Reactions of Complex Ions in Solution, Academic Press, New York, p.28-45 (1970).
88. R. Bourbonnais, D. Leech et M. G. Paice, *Biochimica et Biophysica Acta* 1379:381-390 (1998).
89. A. D. Eaton, L. S. Clesceri et A. E. Greenberg, éditeurs, Standard methods for the examination of water and wastewater, 19^e édition, American Public Health Association, Washington, Méthode 4500-CN D. p.4-24 (1995).
90. R. A. Northey dans Oxidative Delignification Chemistry. Fundamentals and Catalysis, Vol. 785 (D. S. Argyropoulos, éditeur), Oxford University Press, Washington, p. 44-72 (2001).
91. J. Gierer, B. Lenz et N.-H. Wallin, *Acta Chemica Scandinavia* 18:1469-1476 (1964).
92. B. O. Lindgren, *Acta Chemica Scandinavia* 4:1365-1374 (1950).
93. Y. Ni, X. Shen et A. R. P. Vanheiningen, *Journal of Wood Chemistry & Technology* 14:243-262 (1994).
94. Y. Sun, M. Fenster, A. Yu, R. M. Berry et D. Argyropoulos, *Canadian Journal of Chemistry* 77:667-675 (1999).
95. J. F. Kadla et H.-m. Chang dans Oxidative Delignification Chemistry. Fundamentals and Catalysis, Vol. 785 (D. S. Argyropoulos, éditeur), Oxford University Press, Washington, p. 108-129 (2001).
96. T. Yokoyama, Y. Matsumoto, M. Yasumoto et G. Meshitsuka, *Journal of Pulp & Paper Science* 22:J 151-J 154 (1996).
97. R. Bourbonnais, D. Rochefort, M. Paice, S. Renaud et D. Leech, *TAPPI Journal* 83:68 (2000).

98. H. P. Call et I. Mucke, *Journal of Biotechnology* 53:163-202 (1997).
99. J. Freudenreich, M. Amann, E. Fritz-Langhals et J. Stohrer de International Pulp Bleaching Conference, Helsinki, Finland, 1998, p. 71-76.
100. A. Muheim, A. Fiechter, P. J. Harvey et H. E. Shoemaker, *Holzforschung* 46:121-126 (1992).
101. M. Y. Balakshin, C. L. Chen, J. S. Gratzl, A. G. Kirkman et H. Jakob, *Holzforschung* 54:165-170 (2000).
102. M. Y. Balakshin, C. L. Chen, J. S. Gratzl, A. G. Kirkman et H. Jakob, *Holzforschung* 54:171-175 (2000).
103. J. Gierer, *Holzforschung* 51:34-46 (1997).
104. R. Agnemo de 9th International Symposium on Wood and Pulp Chemistry, 1997, p. D2-1 - D2-3.
105. Y.-S. Perng, C. W. Oloman et B. R. James, *TAPPI Journal* 76:139-147 (1993).
106. Y.-S. Perng, C. W. Oloman, P. A. Watson et B. R. James, *TAPPI Journal* 77:119-125 (1994).
107. P. J. Kersten, M. Tien, B. Kalyanaraman et T. K. Kirk, *Journal of Biological Chemistry* 260:2609-2612 (1985).
108. H. E. Schoemaker, P. J. Harvey, R. M. Bowen et J. M. Palmer, *FEBS Letters* 183:7-12 (1985).
109. S. Kawai, M. Asukai, N. Ohya, K. Okita, T. Ito et H. Ohashi, *FEMS Microbiology Letters* 170:51-57 (1999).
110. S. Kawai, M. Nakagawa et H. Ohashi, *FEBS Letters* 446:355-358 (1999).
111. S. Kawai, M. Nakagawa et H. Ohashi de Symposium on Recent Advances in Lignin Biodegradation and Biosynthesis, Helsinki, Finland, 2001, p. 44-45.
112. R. Bourbonnais, M. G. Paice, B. Freiermuth, E. Bodie et S. Borneman, *Applied and Environmental Microbiology* 63:4627-4632 (1997).
113. E. Srebotnik et K. E. Hammel, *Journal of Biotechnology* 81:179-188 (2000).
114. A. Muheim, M. S. A. Leisola et H. E. Schoemaker, *Journal of Biotechnology* 13:159-167 (1990).
115. T. Elder, *Holzforschung* 51:47-56 (1997).

116. B. S. Wolfenden et R. L. Willson, *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*:805-812 (1982).
117. A. Majcherczyk, C. Johannes et A. Hüttermann, *Applied Microbiology and Biotechnology* 51:267-276 (1999).
118. H. E. Schoemaker, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas* 109:255-272 (1990).
119. H. Xu, Y. Z. Lai, D. Slomczynski, J. P. Nakas et S. W. Tanenbaum, *Biotechnology Letters* 19:957-960 (1997).
120. F. Nakatsubo dans Methods in Enzymology, Vol. 161, Academic Press, p. 57-61 (1988).
121. S. Omori, M. Aoyama et A. Sakakibara, *Holzforschung* 52:391-397 (1998).
122. M. Hauteville, K. Lundquist et S. v. Unge, *Acta Chemica Scandinavia B* 40:31-35 (1986).
123. T. Sugimoto, Y. Matsumoto et G. Meshitsuka de 11th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. II, Nice, France, 2001, p. 161-164.
124. L. Jonsson, O. Karlsson, K. Lundquist et P. O. Nyman, *FEBS Letters* 276:48-48 (1990).
125. H. Ohi, E. Todoroki et M. Kishino de 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. Oral Presentations, Montreal, Canada, 1997, p. B1-1.
126. H. G. Aurich et W. Weiss, *Chem. Ber.* 106:2408-2414 (1973).
127. S. Descombes, K. Mazeau, D. Robert, F. R. Taravel et J. P. Utile de 11th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. III, Nice, France, 2001, p. 581.
128. K. V. Sarkanen et H. L. Hergert dans Lignins: Occurrence, Formation Structure and Reactions (K. V. Sarkanen et C. H. Ludwig, éditeurs), p. 43-94 (1971).
129. R. A. El-Zaru et H. A. Hodali, *Dirasat* 15:108-119 (1988).
130. F. Peter, J. Polcin et W. H. Rapson, *Pulp and Paper Magazine of Canada* 74:89-96 (1973).

131. J. Polcin, F. Peter et W. H. Rapson, *Transactions of the Technical Section* 2:7-13 (1976).
132. J. J. Lindberg, K. Penttinen et F. Sundholm, *Paperi ja Puu-Paper and Timber* 11:823-828 (1969).
133. P. Zuman, Substituent Effects in Organic Polarography, Plenum Press, New York, p.384 (1967).
134. E. Evstigneyev, H. Maiyoroova et A. Platonov de The 8th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. II, Poster Presentations, Helsinki, Finland, 1995, p. 6.
135. E. Evstigneyev, H. Maiyoroova et A. Platonov, *Journal of Wood Chemistry and Technology* 19:379-407 (1999).
136. D. Limosin, G. Pierre et G. Cauquis, *Holzforshung* 39:91-98 (1985).
137. D. R. Dimmel, *Journal of Wood Chemistry and Technology* 5:1-14 (1985).
138. G. Tong, T. Yokoyama, Y. Matsumoto et G. Meshitsuka, *Journal of Wood Science* 46:32-39 (2000).
139. L. Olm et A. Teder, *TAPPI Journal* 62:43-46 (1979).
140. C. L. Hsu et J. S. Hsieh, *AIChE Journal* 34:116-122 (1988).
141. M. Balakshin, C.-L. Chen, J. S. Gratzl, A. G. Kirkman et H. Jakob de Fifth European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, Aveiro, Portugal, 1998, p. 585-588.
142. M. Balakshin, C.-L. Chen, J. S. Gratzl, A. G. Kirkman et H. Jakob, *Holzforshung* 54:390-396 (2000).
143. S. Wherland, R. A. Holwerda, R. C. Rosenberg et H. B. Gray, *Journal of the American Chemical Society* 97:5260-5262 (1975).
144. T. Sakurai, *Biochemistry* 31:9844-9847 (1992).
145. R. Santucci, T. Ferri, L. Morpurgo, I. Savini et L. Avigliano, *Biochemical Journal* 332:611-615 (1998).
146. C.-W. Lee, H. B. Gray, F. C. Anson et B. G. Malmström, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 172:289-300 (1984).
147. C. P. Andrieux et J.-M. Savéant, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 205:43-58 (1986).

148. R. S. Nicholson et I. Shain, *Analytical Chemistry* 36:706-723 (1964).
149. J. Jordan et G. J. Ewing, *Inorganic Chemistry* 1:587-591 (1962).
150. H. H. Willard et G. D. Manalo, *Analytical Chemistry* 19:462-463 (1947).
151. F. Xu, *Journal of Biological Chemistry* 272:924-928 (1997).
152. F. Xu, R. M. Berka, J. A. Wahleithner, B. A. Nelson, J. R. Shuster, S. H. Brown, A. E. Palmer et E. I. Solomon, *Biochemical Journal* 334:63-70 (1998).
153. F. Xu, W. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, U. M. Sundaram et E. I. Solomon, *Biochimica et Biophysica Acta* 1292:303-311 (1996).
154. R. C. Rosenberg, S. Wherland, R. A. Holwerda et H. B. Gray, *Journal of the American Chemical Society* 98:6364-6369 (1976).
155. P. Hoffmann et K. Esser, *Archives of Microbiology* 112:111-114 (1977).
156. S. Ege, Organic Chemistry: Structure and Reactivity, D.C. Heath and Company, Lexington, p.1199-1205 (1994).
157. F. Xu, *Biochemistry* 35:7608-7614 (1996).
158. F. Xu, H.-J. Deussen, K. Li et T. Elder de 8th International Conference on Biotechnology in the Pulp and Paper Industry (P. Vahala et R. Lantto, éditeurs.), Helsinki, Finland, 2001, p. 32-33.
159. R. Bourbonnais et M. G. Paice de 11th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Vol. I, Nice, France, 2001, p. 371-374.
160. R. Bourbonnais et M. G. Paice, PCT World Patent Application No WO 01/48307, Canada (2001).
161. E. Kubulnieks, S.-O. Lundqvist et T. Pettersson, *TAPPI Journal* 70:38-42 (1987).
162. R. J. VanFleet et M. Whalley de TAPPI Pulping Conference, Vol. 3, Montreal, Canada, 1998, p. 1509-1512.
163. N. Oyama, T. Ohsaka, N. Yamamoto, J. Matsui et O. Hatozaki, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 265:297-304 (1989).
164. C. Oloman, Electrochemical Processing for the Pulp & Paper Industry, The Electrochemical Consultancy, England, (1996).
165. H.-L. Hu et C. Oloman, *J. Pulp Pap. Sci.* 23:J232-J237 (1997).

166. Q. Hu, M. M. Sain et C. Daneault, *Paperi ja Puu-Paper and Timber* 81:63-69 (1999).
167. Y.-S. Perng et C. W. Oloman, *TAPPI Journal* 77:115-126 (1994).
168. S. Varennes, C. Daneault et M. Levesque, *Appita* 47:45-49 (1994).
169. S. Bhattacharjee, US Patent No 4,702,807, US (1987).
170. E. M. Belgsir, A. P. Bettencourt, A. M. Carvalho et P. Parpot, *Portugaliae Electrochimica Acta* 15:413-416 (1997).
171. C. Padtberg, H.-C. Kim, M. Mickel, S. Bartling et N. Hampp, *TAPPI Journal* 84:68 (2001).
172. N. Hampp, H.-C. Kim et M. Mickel de 221st ACS National Meeting, San Diego, CA, 2001.
173. Z.-H. Jiang, B. vanLierop, R. Berry et G. Sacciadis, Removal of hexenuronic acid groups in kraft pulps by acid hydrolysis. Part I: Modelling the acid hydrolysis conditions, *Paprican Pulp and Paper Report* #1381 (1998).
174. M. P. Godsay, M. N. Hull et V. M. Yasnovsky de TAPPI Pulping Conference, Vol. 3, TAPPI Press, Atlanta, 1998, p. 731-739.
175. H. C. Kim, M. Mickel, S. Bartling et N. Hampp, *Electrochimica Acta* 47:799-805 (2001).
176. <http://www.bioanalytical.com/ec/bulk.html>
177. http://www.imoa.org.uk/moly/index_moly.htm