

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SYSTÈMES CATALYTIQUES POUR L'OXYDATION DE MOLÉCULES
ORGANIQUES-APPLICATION À L'ACIDE LACTIQUE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉE
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
MERIEM EL BAKTAOUI

AVRIL 2021

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.10-2015). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

J'exprime toute ma reconnaissance au professeur Abdelkrim AZZOUZ, mon directeur de recherche, pour m'avoir accueilli dans son équipe de recherche, pour m'avoir encadré tout au long de cette thèse. Je voudrais également lui exprimer mes remerciements pour avoir dirigé ce travail jusqu'à la dernière seconde. Qu'il soit aussi remercié pour sa gentillesse, sa disponibilité et pour les nombreux encouragements qu'il m'a prodigués et je n'oublie pas son soutien pédagogique. C'est à ses côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire, Je suis honoré d'être sous sa direction en tant que rapporteuse de cette thèse, il m'a beaucoup initié à la recherche opérationnelle et à la théorie de l'ordonnancement durant toute la période de recherche.

C'est un grand honneur pour moi que Monsieur le Professeur Ali NAZEMI de l'université du Québec à Montréal a accepté d'être évaluateur de ce travail et de le juger.

J'exprime ma gratitude à Monsieur le professeur Jacques LESAGE de l'université du Québec à Montréal pour l'honneur qui m'est accordé pour avoir jugé et évalué ce travail

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont honoré par leur évaluation du contenu de mon mémoire de maîtrise: Pr. Jacques LESAGE, Pr. Ali NAZEMI et Pr. Sylevain CANESI, qui a présidé ce jury. Leurs évaluations m'ont été d'un grand apport dans la correction finale pour améliorer la qualité du manuscrit.

Je tiens aussi à remercier Professeur René Roy, qui m'a accueilli pendant deux ans au sein de son laboratoire sans oublier son équipe Leila MOSAVIFAR, Lamyaa SALLAM, Ali RIZ et Abdullayev SHUAY pour leur aide et sympathie.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance aux Isabelle CLOUTIER et Isabelle RHEAULT pour l'expérience enrichissante et pleine d'intérêt qu'elles m'ont fait vivre durant ma recherche.

Je remercie également Madame la professeure Alexandra FURTOS-MATEI de l'université de Montréal pour son assistance technique.

Mes vifs remerciements s'adressent aussi au Dr Gwenaël CHAMOULAUD pour m'avoir formée sur les techniques d'analyses et caractérisations.

Je tiens à remercier chaleureusement mon mari d'avoir géré toutes mes absences avec une main experte et d'avoir pris soin de nos enfants. Il m'a toujours soutenu dans les moments de doute, de douleur et de stress.

Je tiens à remercier tous les membres de département de chimie, ainsi je n'oublie surtout pas mes collègues Amira KHELIL, Nadia BENNANI-DAOUADJI, Amina BENGHAFFOUR, FARZANEH Noori pour leur collaboration à la réalisation de ce travail.

DÉDICACE

À ma chère mère AMINA;
À la mémoire de mon Père AMROU;
À mon très cher mari IMAD;
À mes chers enfants RIYAD et OUALID;
À mes chers frères et sœurs;
À tous les membres de ma famille, et ma
belle-famille, petits et grands.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES SCHÉMAS	xii
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	xv
LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS	xviii
RÉSUMÉ	xx
ABSTRACT.....	xxi
INTRODUCTION	1
0.1 Mise en contexte	1
0.2 Problématique.....	1
0.3 Approche.....	3
0.4 Objectifs et moyens utilisés.....	4
CHAPITRE I ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	8
1.1 Les propriétés physico-chimie de l'acide lactique.....	8
1.1.1 Considérations générales sur l'acide lactique	8
1.1.2 Structure et propriétés	9
1.1.3 Effet inhibiteur de fermentation lactique	10
1.1.4 Tentatives de remédiation	11
1.2 Les matériaux argileux comme adsorbants et catalyseurs	13
1.2.1 Les Hydroxydes doubles lamellaires (HDL).....	13
1.2.2 La bentonite et ses dérivés smectiques.....	14
1.3 L'ozone et le processus d'ozonation.....	19

1.3.1	L'ozone	19
1.4	Considérations générales sur les méthodes d'analyses utilisées.....	22
1.4.1	Spectrophotométrie UV-Vis.....	22
1.4.2	Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)	23
1.4.3	Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse	24
1.4.4	Diffraction des rayons X	25
CHAPITRE II PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE		28
2.1	Préparation et purification des matériaux argileux	28
2.2	Caractérisation	30
2.3	Préparation des solutions	31
2.4	Tests d'ozonation.....	32
2.5	Analyse qualitative par spectrophotométrie UV-Vis.....	33
2.6	Analyse quantitative par HPLC-UV	33
2.7	Identification par LC-TOF-MS.....	35
2.8	Dosage d'ozone	36
2.8.1	Détermination de la concentration d'ozone par la méthode de titrage iodométrique	37
2.8.2	Détermination de la concentration d'ozone par la méthode de spectrophotométrie UV-Vis	38
CHAPITRE III ÉTUDE CINÉTIQUE DE DISSOLUTION DE L'OZONE DANS L'EAU.....		39
3.1	Spectrophotométrie UV-Vis de l'ozone dissous dans l'eau	39
3.2	Évolution dans le temps de la bande large à 220-230 nm	41
3.3	Évolution dans le temps de la bande 306 nm.	42
3.4	Effet de la dose d'ozone injectée sur le spectre d'une solution de KI.....	43
3.5	Détermination de la concentration d'ozone par titrage iodométrique.....	45
3.6	Cinétique de la dissolution de l'ozone dans l'eau.....	49
CHAPITRE IV CLAY-CATALYZED OZONATION OF LACTIC ACID LOADED- HYDROTALCITE IN AQUEOUS MEDIA-TO BETTER UNDERSTAND THE ROLE OF THE SURFACE INTERACTIONS.		57
ABSTRACT		59

4.1	Introduction.....	60
4.2	Experimental.....	65
4.2.1	Solution preparation and calibration	65
1..1	Catalysts preparation and characterization.....	65
4.2.3	Adsorption and ozonation experiments.....	66
4.2.4	Reaction mixture analysis	67
4.2.5	HPLC-ToF-MS identification of the ozonation derivatives.....	68
4.3	Results and discussion	68
4.3.1	UV-Vis calibration of LA concentration and band identification.....	68
4.3.2	HPLC- UV calibration of LA concentration.....	69
4.3.3	Catalyst effect on LA spectrum before ozonation.....	70
4.3.4	Non-catalytic ozonation	73
4.3.5	Effect of catalyst addition	74
4.3.6	pH evolution during ozonation.....	78
4.3.7	Ozonation with LDH-cationic clay mixtures	83
4.3.8	Product identification	85
4.3.9	Ozonation kinetics.....	89
4.4	Conclusion	92
4.5	Supporting information.....	94
4.5.1	Catalyst characterization by X-ray diffraction.....	94
4.5.2	LA calibration plots and molar absorption coefficients.....	96
4.5.3	HPLC- UV calibration of LA concentration.....	98
4.5.4	LA depletion during ozonation in the presence of various Ht-Cationic clay mixtures as assessed by HPLC-UV	99
4.5.5	Product identification by LC-ToF-MS.....	100
4.5.6	LA ozonation kinetics	101
	CONCLUSION GÉNÉRALE.....	103
	ANNEXE A TABLEAU 3.1 CONCENTRATION MOLAIRE (M) D'OZONE MESURÉE PAR IODOMÉTRIE	107
	ANNEXE B TABLEAU 3.2 COMPARAISON DES COEFFICIENTS D'EXTINCTIONS.....	109
	ANNEXE C CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN L'ABSENCE DE CATALYSEUR. .	110

ANNEXE D CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE D'HYDROTALCITE..	111
ANNEXE E CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE DE NAMT.	112
ANNEXE F CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE DE HMT-1H.	113
ANNEXE G CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE DE CAMT.....	114
APPENDICE A LA SOUMISSION D'ARTICLE DANS LE JOURNAL APPLIED SURFACE SCIENCE	115
BIBLIOGRAPHIE	119

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
2.1 La séparation d'argile après la centrifugation	29
2.2 Illustration de fonctionnement du générateur d'ozone.	36
3.1 Spectre UV-Vis de l'ozone dissous dans l'eau après ozonation durant 40 min avec le même débit d'air barboté à différentes concentrations d'ozone.....	40
3.2 Évolution de l'absorbance large à 220-230 nm de l'eau durant l'ozonation avec le même débit d'air barboté à différentes concentrations d'ozone.	42
3.3 Évolution de l'absorbance à 306 nm de l'eau durant ozonation avec le même débit d'air barboté à différentes concentrations d'ozone.....	43
3.4 Spectre UV-Vis de la solution KI après 5 min d'ozonation avec le même débit d'air.....	44
3.5 Évolution de l'absorbance de la solution de KI avec la concentration d'ozone dans l'air injecté après 5 min d'ozonation.....	45
3.6 Dépendance entre les concentrations d'ozone dissout dans l'eau déterminée par iodométrie et injecté avec l'air.	47
3.7 Courbe d'étalonnage de l'absorbance à 220 nm en fonction de la concentration en ozone déterminée par iodométrie.....	48
3.8 Corrélation entre la concentration de $[O_3]$ avant et après addition de KI. durant 5 min avec une concentration de 50%.	49
3.9 Cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau selon l'absorbance à 220 nm	52

3.10	Cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm.	53
4.1	UV-Vis spectrum of LA in the presence of different catalysts before ozonation in nanopure water (a) and close-up on the 242-342 nm region (b).	71
4.2	Residual LA amount (%) in aqueous media containing different clay materials before ozonation as assessed by HPLC-UV.	72
4.3	UV-Vis spectra of LA at different initial concentrations (mg. L ⁻¹) before (solid lines) and after 3min ozonation (dashed lines) in nanopure water (a) and close-up on the 240-340 nm region (b).	74
4.4	Evolution in time of the relative absorbance of the absorption bands of LA solution during the ozonation in the presence of the various catalysts.	75
4.5	Effect of the addition of catalyst on the residual LA during ozonation as assessed by HPLC-UV.	76
4.6	Effect of prolonged hydrotalcite impregnation in LA solution before ozonation on the catalytic activity.	78
4.7	Evolution of the pH of the reaction mixture during LA ozonation in presence of HMT catalysts (a) and ion-exchanged Mt samples (b) as compared to bentonite and hydrotalcite.	81
4.8	LC-ToF-MS chromatogram of ozonized LA solution in the presence of NaMt for 1 min. LC-ToF-MS in negative electrospray mode.	86
4.9	HPLC-UV chromatograms of LA solution after different ozonation times in the presence of HMT-24.	87
4.10	HPLC-UV chromatograms of LA solution after different ozonation times in the presence of bentonite.	87
4.11	Evolution of the amount of Int-1 during ozonation in the presence of different catalysts as assessed by HPLC-UV.	88

4.12	Plots for Zero (<i>a, b</i>), 1 st (<i>c,d</i>) and 2 nd order (<i>e,f</i>) kinetical models applied to LA ozonation in presence of different clay minerals (<i>a,c,e</i>) and of activated bentonite (<i>b,d,f</i>) based on HPLC-UV measurements.	90
4. S 1	XRD spectra of bentonite (a), NaMt (b) and hydrotalcite (c).	95
4. S 2	Effect of the exchangeable cation on the d ₀₀₁ basal spacing in bentonite and NaMt.	96
4. S 3	UV-VIS spectra of lactic acid (<i>a</i>) and corresponding calibration plot (<i>b</i>) at room temperature.	97
4. S 4	HPLC-UV diagram of lactic acid at different concentrations (mmol.L ⁻¹) as detected at 210 nm (<i>a</i>) and calibration curve of LA peak area (<i>b</i>)..	98
4. S 5	LA depletion in time during ozonation in the presence of different Ht: Cationic clay mixtures.	99
4. S 6	LC-ToF-MS diagram of the reaction mixture after 1 min ozonation in the presence of NaMt.	100
4. S 7	Identification of the main compounds detected by LC-ToF-MS.	100

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma	Page
0.1 Élimination de AL du bouillon de fermentation du lait et régénération de l'adsorbant par ozonation dans l'eau pure.	3
1.1 Structures isomériques de l'acide lactique	9
1.2 Représentation schématique de la structure de deux lamelles d'hydrotalcite de rapport molaire Mg/Al=2.	14
1.3 Représentation schématique de la structure d'une lamelle de bedeilite.....	15
1.4 Représentation schématique de la structure d'une lamelle de montmorillonite.	16
1.5 Interactions possibles entre un aluminosilicate et une molécule organique. ..	18
1.6 Principe de séparation de trois substances A, B et C à travers une colonne C18.	24
1.7 Principe de spectrométrie de masse	25
1.8 Principe de diffraction des rayons X.....	26
4.1 LA removal from fermentation broth and hydrotalcite regeneration by ozonation.	63
4.2 Possible interactions of LA molecules on cationic clay minerals.....	83

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Propriétés chimiques et physiques de AL	10
1.2 Différentes techniques d'élimination de l'acide lactique du bouillon de fermentation.....	11
1.3 Principales caractéristiques de l'ozone	19
1.4 Travaux récents sur la détermination de la concentration d'ozone	20
2.1 Concentrations massiques et molaires des solutions aqueuses de AL préparées.....	31
2.2 Les essais non concluants dans le développement de la méthode chromatographique.	34
2.3 Conditions standards d'analyse par LC-TOF-MS en mode gradient.....	35
3.1 Modèles cinétiques utilisés pour la détermination de la constante et l'ordre.	50
3.2 Constante de cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau selon l'absorbance à 220 nm convertie en concentration pour l'ordre Zéro.	54
3.3 Constante de cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau selon l'absorbance à 220 nm convertie en concentration pour l'ordre 1.....	54
3.4 Constante de cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau selon l'absorbance à 220 nm convertie en concentration pour l'ordre 2.....	55

3.5	Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm convertie en concentration pour l’ordre Zéro.	55
3.6	Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm convertie en concentration pour l’ordre 1.	56
3.7	Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm convertie en concentration pour l’ordre 2.	56
4.1	Main features of the investigated clay materials.	79
4.2	Comparison of the residual LA amount for ozonation with clay minerals and their mixtures.	85
4.3	Most probable reaction orders and rate constants for ozonation with different catalysts.	91
4.S 1	Molar absorption coefficient at different LA UV-Vis bands.	97
4.S 2	Rate constant for Zero-order model of LA ozonation kinetics as assessed HPLC-UV.	101
4.S 3	Rate constant for 1 st order model of LA ozonation kinetics as assessed HPLC-UV.	101
4.S 4	Rate constant for 2 nd order model of LA ozonation kinetics as assessed HPLC-UV.	102

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

ACN	Acétonitrile
ABL	Acid Base de Lewis
AEC	Capacité d'échange d'anions (anion exchange capacity)
AL	Acide lactique
APTD	Pression atmosphérique de décharge Townsend
C	Concentration
CaMt	Montmorillonite sodique échangés au calcium
CEC	Capacité d'échange cationique
CLHP (HPLC)	Chromatographie en phase liquide à haute performance
CO ₂	Dioxyde de carbone
d ₀₀₁	Distance inter-réticulaire
DBD	Décharge de barrière diélectrique filamentaire
DEPC	Pyrocarbonate d'éthyle (Diethyl pyrocarbonate)
DRX	Diffraction de rayons X
EDI	Électrodéionisation
FTIR	Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
HCl	Acide chlorhydrique

HDL	Hydroxydes doubles lamellaires
HMt	Montmorillonite activée à l'acide
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
H ₂ S ₂ O ₃	Acide thiosulfurique
Ht	Hydrotalcite
K	Constante de vitesse
KI	Iodure de potassium
KIO ₃	Iodate de potassium
KMt	Montmorillonite sodique échangés au potassium
ℓ	Épaisseur de la cellule
LAB	Lactic Acid Bacteria
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
LC-TOF-MS	Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse par temps de vol
MgMt	Montmorillonite sodique échangés au magnésium
Mt	Montmorillonite
N ₂	Diazote
NaMt	Montmorillonite sodifiée
Na ₂ S ₂ O ₃	Thiosulfate de sodium
NO	Oxyde nitrique
PVC	Récipient cylindrique en plastique

r^2	Coefficient de corrélation
RT	Température ambiante (room temperature)
TFA	Acide trifluoroacétique
TR	Temps de rétention
V	Volume
$\mathcal{E}$	Coefficient extinction (Molar absorption coefficient)
λ	Longueur d'onde (wavelength)
S	Supporting information

LISTE DES SYMBOLES ET DES UNITÉS

Å	Ångström
°C	Degré Celsius
CFU.mL ⁻¹	Unité formant colonie par millilitre
Cm	Centimètre
°F	Fahrenheit
G	Gramme
g.cm ⁻³	Gramme par centimètre cube
g.h ⁻¹	Gramme par heure
g.m ⁻³	Gramme par mètre cube
g.mol ⁻¹	Gramme par mole
K	Kelvin
kJ.mol ⁻¹	Kilojoule par mole
L	Litre
mg	Milligramme
mg.h ⁻¹	Milligramme par heure
mL	Millilitre
mm	Millimètre

mM	Milli molaire
mm Hg	Millimètre de mercure
mol	Mole
$\text{mol.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	Mole par gramme par centimètre
$\text{mol.L}^{-1}.\text{cm}^{-1}$	Mole par litre par centimètre
nm	Nanomètre
S	Second
V	Volte
μm	Micromètre

RÉSUMÉ

En fermentation du lait, les bactéries lactiques convertissent le lactose en acide lactique (AL). En production excessive, celui-ci exerce un effet inhibiteur sur la croissance bactérienne et ralentit la fermentation. L'objectif de ce travail consiste à démontrer que cet inconvénient peut être éliminé par une extraction progressive de AL du bouillon de fermentation par échange d'anion sur un polyanion inorganique non réactif avec le milieu tel l'hydrotalcite, suivie d'une régénération de l'adsorbant par ozonation à l'extérieur du milieu de fermentation. L'hydrotalcite agit d'abord comme adsorbant pour extraire AL du milieu de culture, et ensuite, une fois chargée de AL, comme catalyseur seul ou accompagnée de co-catalyseurs cationiques telle la bentonite, la montmorillonite et leur dérivés activées à l'acide ou échangés par des cations. La régénération sert à accélérer la fermentation sans l'apport de ferments lactiques qui coûtent assez cher. Les résultats obtenus par chromatographies liquides couplées à la spectroscopie UV-Vis et la spectrométrie de masse ont permis de réaliser une étude cinétique. Des corrélations avec des mesures de potentiel Zeta, de la taille des particules et du pH permettent aussi de conclure que les interactions acide-base de Lewis (LAB) et électrostatique entre la surface de l'hydrotalcite et des argiles cationiques influencent grandement l'activité catalytique dans l'ozonation de l'acide lactique. Ces interactions, à leur tour, dépendent fortement du pH du mélange réactionnel, qui détermine non seulement la dissociation de la molécule de AL, mais également la dispersion de l'argile dans le milieu aqueux et l'apparition d'interaction hydrophobe de du catalyseur avec Al non dissocié. Cette étude permis de comprendre que l'activité catalytique plus élevée de l'hydrotalcite avec des temps courts d'ozonation implique simultanément ces trois types d'interactions. Ceci ouvre des perspectives prometteuses pour l'utilisation d'hydroxydes doubles lamellaires comme adsorbants-catalyseur pour l'amélioration de la production des dérivés acido-lactiques et de probiotiques.

Mots clés : Acide lactique, Adsorption, Hydrotalcite, Régénération, Ozonation.

ABSTRACT

In milk fermentation, lactic acid bacteria convert lactose into lactic acid (LA). In excessive amount, LA exerts an inhibitory effect on bacteria growth and attenuates the fermentation. The objective of this work is to demonstrate that this drawback can be overcome by a progressive extraction of AL from the fermentation broth by anion exchange with an inorganic polyanion such as hydrotalcite (Ht), which is unreactive with the aqueous medium, followed by adsorbent regeneration by ozonation outside the fermentation medium. Ht acts first as an adsorbent to extract LA from the fermentation medium, then, once loaded with LA, as a catalyst in LA ozonation. Ht can be used alone or in the presence of cationic co-catalysts such as bentonite, montmorillonite and their acid-activated or cation-exchanged derivatives. Regeneration aims to accelerate the fermentation without additional lactic seeds which are quite costly. The results obtained by liquid chromatographies coupled with UV-Vis spectroscopy or mass spectrometry allowed achieving a kinetic study. Correlations between Zeta potential, particle size and pH measurements resulted in a significant finding that Lewis acid-base (LAB) and electrostatic interactions between the surface of Ht and cationic clays greatly influence the activity catalytic in LA ozonation. These interactions, in turn, strongly depend on the pH of the reaction mixture, which determines not only the dissociation of AL molecule, but also the clay dispersion in the aqueous medium and occurrence of a hydrophobic interaction of the catalyst with non-dissociated AL molecules. This opens promising prospects for the use of double lamellar hydroxides as adsorbent-catalyst for the improvement of the manufacture of lactic acid products and probiotics.

Keywords : Lactic acid, Adsorption, Hydrotalcite, Regeneration, Ozonation.

INTRODUCTION

0.1 Mise en contexte

Depuis fort longtemps, la consommation de produits laitiers n'a cessé d'augmenter, en raison de la croissance continue de la démographie. Les besoins inhérents à cette croissance ont conduit au développement progressif de la technologie de fermentation afin d'améliorer la qualité et la durée de la conservation des produits acido-lactiques (fromages, yogourts, kéfir et autres). Dans le processus de fermentation, l'utilisation de bactéries joue un rôle primordial dans la garantie des produits finis de haute qualité. Les bactéries lactiques sont connues pour leurs effets bénéfiques sur la fermentation du lait, l'augmentation de la durée de conservation des produits acido-lactiques et sur la santé humaine comme probiotiques. Lorsqu'il est valorisé comme réactif pour la fabrication de produits à valeur ajoutée, AL devient un composé important pouvant être produit par la fermentation ou la synthèse chimique, dans une grande variété d'applications industrielles et biotechnologiques [1, 2].

0.2 Problématique

AL manifesterait un effet négatif sur la croissance des bactéries lactiques (LAB) affectant l'efficacité de la production industrielle de produits laitiers acides. Cet inconvénient a été avantageusement utilisé par l'humain dans l'histoire dans la conservation des aliments [3]. Lors de la fermentation lactique, l'utilisation de bactéries lactiques vise à convertir le lactose en acide lactique (AL). Néanmoins, une production excessive de celui-ci s'est avérée avoir un impact négatif majeur sur la

croissance et le développement de ces bactéries [4-6]. AL exercerait un effet inhibiteur qui empêche cette croissance bactérienne et ralentirait la fermentation. L'augmentation de l'acide lactique dans les milieux de fermentation entraîne des changements au niveau cellulaire.

Pour cette raison, un défi important réside dans le développement de méthodes d'adsorption et de régénération de l'adsorbant, permettant de faire face à cette problématique. L'utilisation de produits chimiques ou l'extraction de AL du bouillon de fermentation avec des techniques spécifiques sont des solutions toujours en développement. La plupart des méthodes développées à ce jour se basent sur l'extraction de l'acide lactique par échange d'anion en utilisant des résines échangeuses d'anions [7]. Ce sont des polymères organiques très efficaces mais ils sont toujours susceptibles de se comporter à l'instar de toutes les matières plastiques comme des sources de micro-contaminants incompatibles avec les exigences des industries alimentaires.

Des résultats plus ou moins probants ont été rapportés [7-20], mais le contrôle de la concentration en AL pendant la fermentation du lait reste encore un défi à relever qui nécessite des processus et des matériaux qui n'ont pas d'impact négatif sur le processus de fermentation. Sauf l'adsorption de AL par échange d'anions, ce défi a à peine été relevé jusqu'à présent, car l'emploi de résine (polymères) échangeuses d'anions n'est pas très sécuritaire en industrie alimentaire. C'est pourquoi la présente recherche a été entreprise pour améliorer la production en ferments lactiques, qui coûtent assez cher, et en même temps régénérer sécuritairement l'adsorbant anionique utilisé sans générer de composés toxiques pour l'aliment ou nocif pour la culture bactérienne.

0.3 Approche

Pour surmonter cet impact négatif de AL, une voie judicieuse réside dans son élimination progressive du bouillon de fermentation par échange d'anion sur un polyanion inorganique non réactif avec le milieu, suivie d'une régénération de l'adsorbant par un puissant processus oxydatif qui ne produit que du bioxyde de carbone (CO_2) et de l'eau (Schéma 0.1).

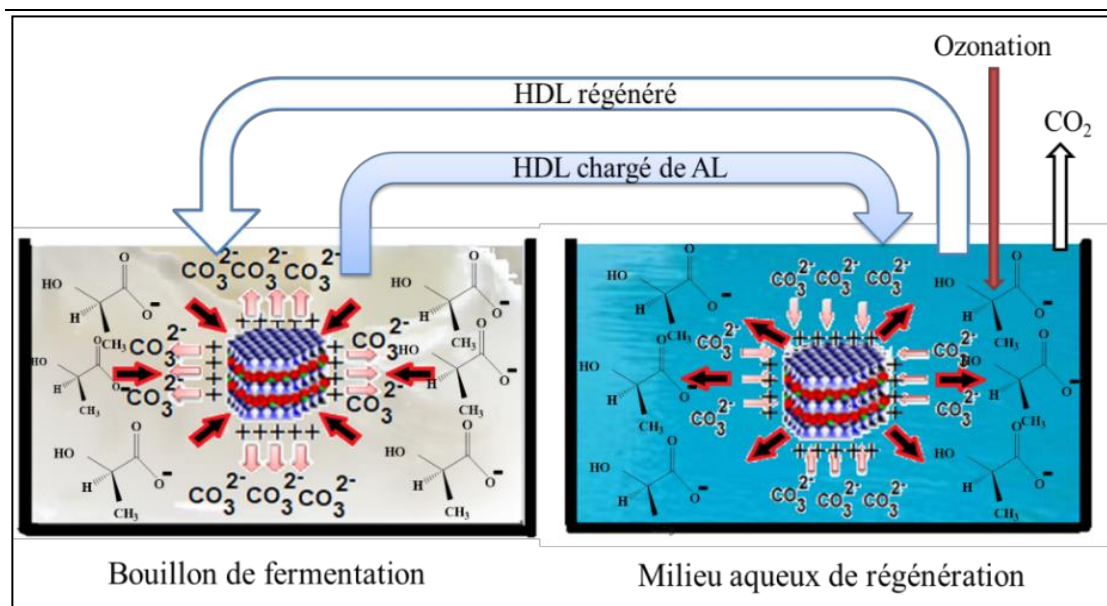


Schéma 0. 1 Élimination de AL du bouillon de fermentation du lait et régénération de l'adsorbant par ozonation dans l'eau pure.

Cette succession d'étapes impliquera l'utilisation d'argiles anioniques et cationiques ainsi que l'ozone comme agent oxydant pour la régénération. L'adsorption de AL sur des matériaux solides est une alternative intéressante. À cet effet, l'utilisation d'échangeurs d'anions de type polymères organiques comme les résines conventionnelles est limitée par les contraintes liées à des risques de contamination du milieu de culture par des composés organiques toxiques [7, 12]. À ce jour, tous les

adsorbants organiques peuvent réagir ou libérer des espèces réactives envers le bouillon de fermentation. Une alternative très intéressante impliquera l'utilisation d'adsorbants inorganiques inoffensifs et non réactifs tels les hydroxydes doubles en couches (HDL ou LDH en anglais), qui présentent une stabilité chimique suffisante dans la gamme de pH des bouillons de fermentation. Un représentant naturel de LDH est l'hydrotalcite (Ht), qui est assez disponible et à faible coût.

Les rôles de l'hydrotalcite chargée en AL comme adsorbant en milieu de culture d'abord, et ensuite comme catalyseur seul ou accompagné de co-catalyseurs à base de minéraux d'argile cationique dans le processus d'ozonation dans un autre milieu aqueux sera examiné dans cette recherche. Ces catalyseurs sont économiquement très accessibles, non toxiques et largement disponibles. Ils peuvent être utilisés comme catalyseurs supplémentaires pour améliorer l'efficacité du processus d'ozonation.

Cette approche consiste à explorer divers matériaux poreux (catalyseurs). La principale exigence pour sélectionner les adsorbants et/ou catalyseurs appropriés réside dans le respect des contraintes de la technologie alimentaire et dans leur stabilité chimique élevée et leur absence totale de toxicité. On s'attend à ce que l'échangeur d'anions étudié ici (hydrotalcite), une fois chargé de AL, agisse également comme catalyseur lorsqu'il est mis en contact avec l'ozone dans un milieu aqueux de régénération séparé. À notre connaissance, une telle approche n'a jamais été abordée jusqu'à présent.

0.4 Objectifs et moyens utilisés

L'objectif majeur de la présente recherche est le développement d'une méthode nouvelle pour améliorer la croissance des bactéries lactique durant le processus de fermentation. Cela permettra de raccourcir les temps de fermentation et de réduire la consommation en ferments lactiques qui coûtent assez cher. En se basent sur des études

antérieures sur la fixation de AL par les HDL qui se sont avérés des adsorbants performants [21-23], cette méthode comportera également la régénération par l’ozone de l’hydrotalcite préalablement utilisée dans l’extraction de AL du milieu de culture, et si possible, d’étudier son rôle catalytique dans sa propre régénération. Un autre objectif réside dans la démonstration que l’utilisation d’argiles cationiques supplémentaires pourrait accélérer le processus de régénération. Cette approche se base sur une longue et fructueuse recherche sur les propriétés catalytiques de ce type d’argile dans l’ozonation de diverses molécules organiques [24-28].

Pour atteindre les objectifs fixés, les étapes suivantes ont été parcourues et ont imposé leur empreinte sur le plan même du présent mémoire de maîtrise, à savoir :

- Préparation et purification des argiles ainsi que leur caractérisation ;
- Dosage de l’ozone par méthodes iodométrique et spectrale UV-Vis ;
- Cinétique de la dissolution de l’ozone dans l’eau ;
- Adsorption de l’acide lactique sur les différents matériaux argileux ;
- Interactions de surface entre les catalyseurs, l’eau et l’acide lactique ;
- Corrélation entre le pH, le potentiel Zeta, la taille des particules et la dispersivité ;
- Dégradation par l’ozone en absence et en présence de catalyseur ;
- Effet de la combinaison d’argiles anionique et cationique ;
- Cinétique d’ozonation de l’acide lactique et corrélation avec les interactions de surfaces

L’amélioration de cette approche visant à surmonter l’effet inhibiteur de AL sur la croissance des LAB, a nécessité une maîtrise des techniques analytiques permettant de suivre l’évolution de la quantité de AL durant l’ozonation. Pour ce faire, il a fallu résoudre le problème de la turbidité du mélange réactionnelle et adapter la polarité de la phase mobile pour une meilleure résolution. Les détails relatifs à cet aspect seront

traités dans la partie expérimentale. En support à cette approche, un passage en revue des principaux facteurs impliqués, c'est-à-dire AL, les argiles anionique et cationiques utilisés comme adsorbants et catalyseurs et enfin l'ozone comme agent d'oxydation s'avère nécessaire.

Tous ces aspects ont permis de structurer ce manuscrit en cinq chapitres, soit :

- 1- Une introduction générale avec une recherche bibliographique extensive sur l'acide lactique, l'ozone, les matériaux argileux et les techniques de caractérisation et d'analyse correspondantes. Ces matériaux argileux seront utilisés comme adsorbants (hydrotalcite, argile anionique) et catalyseurs (argiles anioniques et cationiques) dont les principes de fonctionnement seront étudiés en détail dans cette recherche axée sur l'ozone pour la décomposition de l'acide lactique.
- 2- Une partie expérimentale regroupant toutes les procédures expérimentales, les conditions opératoires et les équipements utilisés ;
- 3- Un chapitre dédié à l'étude de la dissolution de l'ozone en milieu aqueux
- 4- Un article soumis pour publication portant sur l'étude des interactions de surface des catalyseurs argileux sur leurs performances en ozonation de l'acide lactique ;
- 5- Une partie dédiée à un fichier d'information de support, récapitulant des données supplémentaires en support à l'article ;
- 6- Une conclusion générale.

Ce mémoire traitera les bases fondamentales nécessaires à la réalisation de cette recherche. Ainsi, les principaux aspects théoriques relatifs à la physico-chimie de l'acide lactique, de l'ozone et des matériaux argileux seront traités successivement, en mettant l'accent sur les données en lien direct avec la présente recherche.

CHAPITRE I

ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE

1.1 Les propriétés physico-chimie de l'acide lactique

1.1.1 Considérations générales sur l'acide lactique

Dans ce chapitre, une étude bibliographique sélective a été effectuée sur l'acide lactique, ses applications, et ses inconvénients dans le processus de fermentation lactique. AL a été découvert pour la première fois en 1780 par le chimiste suédois Dcheele l'ayant isolé du lait sous forme de sirop brun impur. Neuf ans plus tard, Lavoisier a désigné ce composé laitier comme «acide lactique», qui est devenu la terminologie actuelle [29]. AL est généralement obtenu par la fermentation bactérienne et peut être trouvé dans de nombreux aliments tels que la choucroute, le yogourt, le babeurre, le pain au levain, etc. Il peut également se trouver dans des produits et formulations pharmaceutiques et cosmétiques [30] et également dans les formulations pharmaceutiques pour le traitement de la xérosis cutanée [31]. AL est un intermédiaire métabolique important qui provient de la fermentation anaérobie ou pauvre en O_2 chez l'être humain et la plupart des organismes vivants [1, 29]. AL résulte d'une oxydation incomplète des métabolites [32], qui pourrait entraîner un impact négatif provoquant une acidose et une décalcification [30].

1.1.2 Structure et propriétés

AL ou l'acide 2-hydroxypropionique a une structure ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$) avec un atome de carbone asymétrique (Schéma 1.1). Il existe sous deux formes isomériques optiquement actives désignées par L(+)- acide lactique et D (-) -acide lactique [33].

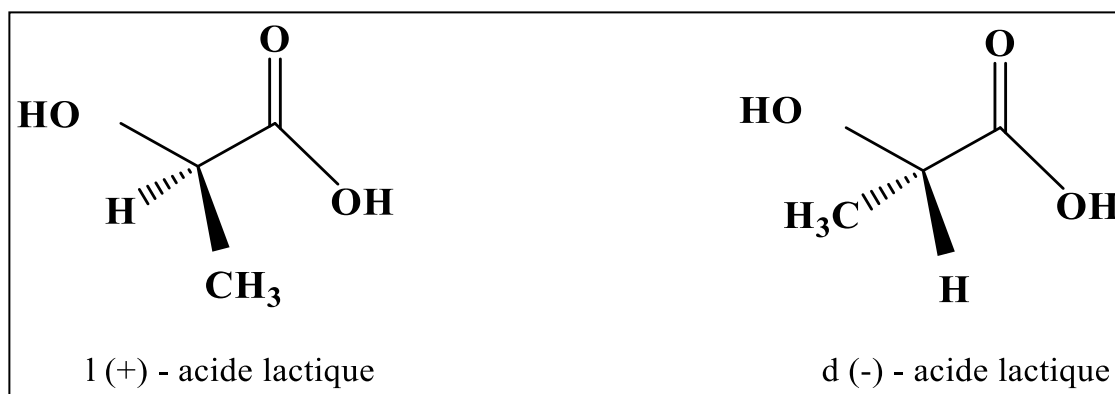


Schéma 1. 1 Structures isomériques de l'acide lactique.

Ses principales propriétés physiques et chimiques sont résumées dans le Tableau 1.1. De toutes ces propriétés, le pKa est sans conteste la plus importante dans notre recherche, car elle permet de suivre la dissociation de AL en solution en fonction du pH. Pendant l'ozonation avec ou sans catalyseurs, le pH varie continuellement à la suite de l'apparition de dérivés de plus en plus oxydés dont des acides. Lorsque le pH est inférieur au pKa, AL ne se dissocie pas dans la solution, alors que si le pH est supérieur au pKa, une dissociation aura lieu en solution. La molécule de AL et l'anion lactate vont interagir différemment avec des catalyseurs à surface chargée dont les propriétés sont également dépendantes du pH. L'objectif principal de ce travail est de corrélérer l'activité catalytique de différents catalyseurs argileux anionique et cationique dans un processus oxydatif produisant des espèces chimiques qui risque de modifier le pH.

Tableau 1. 1 Propriétés chimiques et physiques de AL

Propriétés chimiques et physiques		Réf.
Masse molaire(g.mol ⁻¹)	90.078	[34]
Acidité (pKa)	3.83.15.1	[35, 36]
Solubilité dans l'eau	Miscible	[37]
Point d'ébullition à 15 mm Hg (°C)	122	[38]
Point de fusion (°C)	18	[34]
Densité à 21°C (g/cm ³)	1,21	[39]

1.1.3 Effet inhibiteur de fermentation lactique

Dans la technologie laitière, les LAB présentent un intérêt particulier pour l'industrie alimentaire, en raison de son utilisation comme culture de départ. Elles y jouent un rôle prédominant dans la fermentation du lait et la coagulation conduisant à la formation de produits laitiers acides. Les LAB sont aussi fortement impliquées dans la fermentation d'autres aliments tels que la viande, les légumes, les champignons, la levure, les micro algues, etc. [4, 40]. Les LAB peuvent être utilisées comme ingrédient pro biotique dans divers produits, étant fortement recommandées par la fédération laitière internationale. Les concentrations recommandées pour les bactéries lactiques sont d'au moins 10^6 à 10^7 CFU /mL [40, 41]. L'utilisation des LAB dans les produits alimentaires assure la production de AL qui peut causer une baisse du pH, et par conséquent inhiber le développement de souches microbiennes pathogènes contribuant à prolonger la durée de conservation des produits [4, 42-44]. La fermentation par LAB métabolise les glucides et produit en principe de AL comme produit final [4]. La croissance des LAB peut être obtenue dans une gamme de pH de 3,5 à 10 et à une température de 5 à 45 °C [5], mais elle peut être inhibée par la formation progressive

de AL [4, 5]. Si les lactates dépassent un certain niveau, elles deviennent toxiques pour les bactéries lactiques, et cela n'est pas bénéfique pour la culture [6].

L'inhibition de AL se manifeste par une augmentation de la concentration en lactate et en AL non dissocié. Ce dernier, contrairement à l'anion lactate, peut diffuser facilement à travers la membrane de la bactérie, pour ensuite se dissocier à l'intérieur de la cellule. Cette dissociation conduit à une augmentation de l'acidité transmembranaire affectant l'énergie utilisée pour la croissance cellulaire [45-47]. La majorité des tentatives pour contrer cet effet consistent à maintenir et à éliminer AL non dissocié. La concentration du lactate dans la culture de fermentation (LAB) a un rôle essentiel dans la fermentation à un niveau précis.

1.1.4 Tentatives de remédiation

La question de l'impact négatif de AL sur la coagulation du lait a amené plusieurs scientifiques à développer des méthodes pour son élimination du bouillon de fermentation. Une abondante littérature a rapporté une grande variété de tentatives plus ou moins réussies pour résoudre ce problème. Certaines de ces tentatives ont été résumées dans le Tableau 1.2.

Tableau 1. 2 Différentes techniques d'élimination de l'acide lactique du bouillon de fermentation.

Techniques d'élimination de AL	Technique d'analyse	Avantages	Désavantage	Réf.
-Ultrafiltration -Électrodialyse	-Mesures de densité optique -HPLC-UV (210nm)	-Membranes recyclables -Ultrafiltration et électrodialyse améliorent la reproductibilité	-Couteuse -Augmentation de la biomasse -Accumulation des cellules morte	[8]
-Piégeage de AL par des cellules dans l'alginate de calcium	-Contrôleur pH	EDF est efficace et reproductible	-Accumulation des lactates	[9]

-Fermentation électrodialyse (EDF)	-Fermentation tamponnée par CaCO_3		
-Fermentation par extraction de AL	-Contrôleur de pH	-Coefficient de distribution élevé -Productivité élevée de AL non dissocié	-Coûteuse -Toxicité élevée causée par la quantité élevée du solvant dans le bouillon -Réextraction par des produits chimiques [10]
-Extraction de AL par résine échangeuse d'ions (Amberlite IRA-400)	-HPLC- Réfractomètre	-Inhibition efficace de la production de AL. -L'adsorption continue améliore reproductibilité	-Coûteuse -Utilisation des produits chimiques. -Accumulation des déchets [7]
-Électrodialyse en une étape	-pH mètre -HPLC Détecteur de conductivité	-Récupération efficace de AL	-Coûteuse -Production d'hydroxyde de sodium [11]
-Électrodialyse	-HPLC	-Récupération efficace des ions lactate -Moins de déchets	-Coûteuse [20]
-Adsorption sur résine échangeuse d'anions avec bioréacteur	-HPLC- détecteur d'indice de réfraction	-Résine réutilisable -Productivité élevée	-Utilisation des produits chimiques Accumulation des déchets -Coûteux [12]
-Extraction liquide-liquide après adsorption de AL	-HPLC-UV	-Adsorption efficace de AL par les billes de silice	-Coûteuse -Utilisation des produits chimiques [13]
-Extraction lors de la fermentation par électrodéionisation	-HPLC-UV Microscopie à fluorescence	-EDI est efficace, -Non coûteuse	-Fermentation longue [14]
-Fermentation avec du charbon actif comme adsorbant	-HPLC -UV à 254 (nm) -Biocapteur, BF-4S	-Le charbon actif et la cétone améliorent la fermentation	-Le pH affecte l'adsorption. -Ressources naturelles limitées -Non réutilisable -Régénération coûteuse [15]
-Extraction par solvant (fermentation Feed-batch)	HPLC-UV	-Facile à mettre -Réutilisation du back-extrait	-Extraction difficile -Toxique [16-19]

Un bref aperçu des données mentionnées ci-dessus (Tableau 1.2) indique que les techniques d'élimination ont été appliquées dans diverses technologies impliquant AL. Le principe de ces techniques est l'élimination de AL du milieu de fermentation afin d'améliorer l'efficacité de la fermentation lactique compte tenu de l'importance accordée aux LAB en tant que probiotiques. Certaines de ces techniques utilisent des produits chimiques, soit pour l'élimination de AL ou des lactates, soit pour sa réextraction. Le but du processus de réextraction est la récupération de AL pour la synthèse de produits à valeur ajoutée, comme pour la production de polymère biodégradable [48, 49].

1.2 Les matériaux argileux comme adsorbants et catalyseurs

1.2.1 Les Hydroxydes doubles lamellaires (HDL)

Les hydroxydes doubles lamellaires (HDL) sont des matériaux argileux anioniques de composition chimique générale $M^{2+}_{1-x}M^{3+}_x(OH)_2(A^{n-})_{x/n}.mH_2O$, où M^{2+} et M^{3+} représentent les ions métalliques divalents (par exemple, Mg, Ni, Zn, Cu, Mn) et trivalents (par exemple, Al, Fe, Cr).

A^{n-} est un anion et la valeur de x est compris entre 0,1 et 0,5. L'Hydrotalcite (Ht) est un représentant naturel avec le magnésium comme métal M^{2+} et l'aluminium comme métal M^{3+} . Ht a une formule chimique spécifique $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ avec une structure cristalline en couches [50]. Elle est largement utilisé comme catalyseurs et adsorbants dans divers procédés [51]. Tout en étant considérée comme une argile anionique, elle présente des propriétés physico-chimiques assez analogues à celles des minéraux argileux cationiques.

Les ions métalliques sont incorporés dans une couche d'hydroxyde de coordination octaédrique sur une lamelle d'argile, comme celle de la brucite minérale, tandis que les anions et l'eau d'hydratation sont portés par une surface chargée positivement. La charge positive nette de la surface est compensée par la charge négative nette de l'anion [12, 52] (Schéma 1.2).

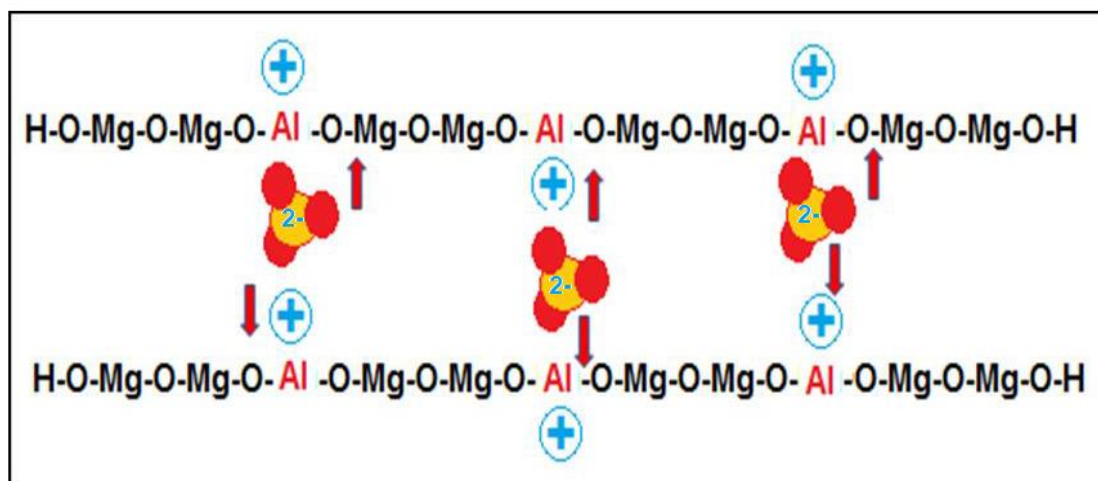


Schéma 1. 2 Représentation schématique de la structure de deux lamelles d'hydrotalcite de rapport molaire Mg/Al=2.

1.2.2 La bentonite et ses dérivés smectiques

La bentonite est un matériau argileux impur. C'est un mélange de minéraux argileux aluminosiliciques majoritaires et non argileux (diverses phases siliciques non poreuses et cendres volcaniques). Les aluminosilicates y induisent une charge négative de surface lui conférant un caractère hydrophile et une capacité d'échange cationique (CEC) [53, 54]. Les principaux constituants d'une bentonite sont la montmorillonite, un minéral argileux de type smectite et d'autres minéraux tels le feldspath, la biotite, le quartz, les pyroxènes et le zircon etc [24].

Les smectites ont une structure lamellaire où chaque feuillet est constitué de deux couches de tétraèdres de silice entourant une couche centrale octaédrique d'alumine incorporant isomorphiquement des cations bivalents de fer, magnésium et/ou autres [55, 56]. Ce sont ces cations qui confèrent des charges négatives et une capacité d'échange cationique (CEC) dans la couche octaédrique d'alumine [57-59].

La teneur en aluminium et en autres métaux est une caractéristique importante des smectites, car elle détermine leur capacité d'échange cation. Chaque atome d'aluminium incorporé isomorphiquement dans la couche tétraédrique d'une smectite est soumis à la configuration de la matrice hôte en y adaptant son état d'hybridation Sp^3 . Il en résulte une smectite dite "bedeilite". Ainsi, un atome Al possède trois électrons périphériques célibataires et peut avoir trois liaisons habituellement. Dans une structure tétraédrique, l'atome d'aluminium sera contraint à adopter la structure d'un tétraèdre (AlO_4) mais prendra obligatoirement une charge négative. Celle-ci sera compensée par un cation (généralement sodium Na^+ , potassium K^+ , calcium Ca^{2+} et/ou magnésium Mg^{2+}) (Schéma 1.3).

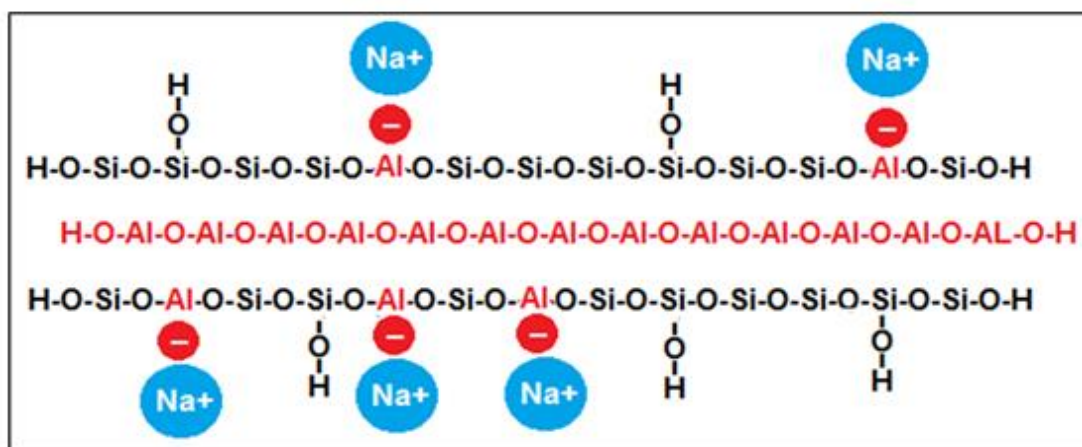


Schéma 1. 3 Représentation schématique de la structure d'une lamelle de bedeilite.

Le même principe s'applique à une montmorillonite, mais cette fois-ci ce sont des atomes bivalents qui remplaceront aléatoirement quelques atomes de Al dans la structure octaédrique d'alumine (Schéma 1.4). Le métal bivalent sera contraint par la structure hôte d'accepter une troisième liaison avec un troisième atome d'oxygène en un groupement MO_3^- . Il en résultera une charge négative qui sera compensée par des cations similaires à ceux de la bedeilite.

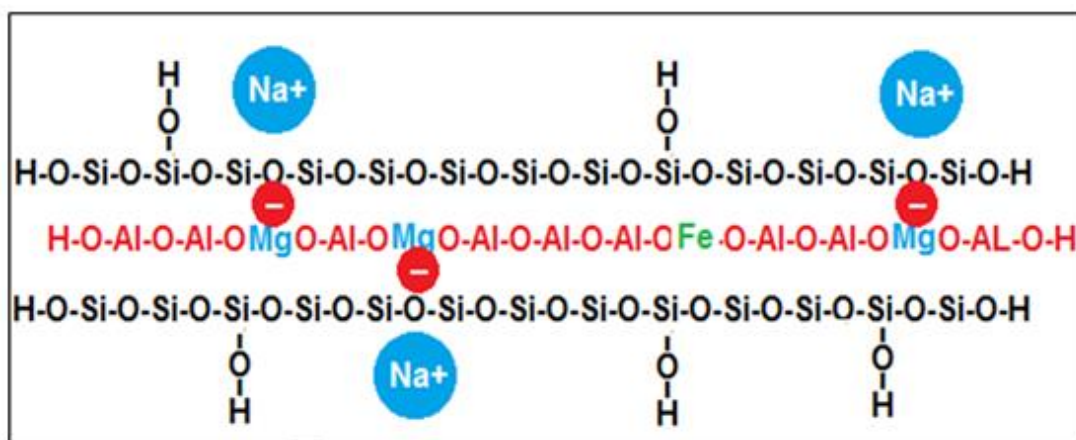


Schéma 1. 4 Représentation schématique de la structure d'une lamelle de montmorillonite.

Une attaque acide vise essentiellement à désaluminer (extraction de Al) et démétalliser à divers degrés la structure [59-62]. L'activation par l'acide permet d'augmenter le nombre de silanol et des groupements -Si-O-Si- hydrophobes [61]. Ceci confèrera différents rapports molaires Si/Al, Si/(Mg+Fe) aux matériaux argileux activés à l'acide, et par conséquent différentes propriétés acido-basique et réduira son caractère hydrophile et sa capacité d'échange cationique (CEC). Il en résulte des modifications spécifiques de la distribution des différents types d'interactions menant à différentes activités catalytiques selon la teneur en silicium [63].

La montmorillonite est usuellement obtenue par purification de la bentonite avec élimination des phases siliciques denses et traces de diverses cendres volcaniques par des dispersion-sédimentations répétitives dans l'eau. Cette purification est généralement facilitée en présence de NaCl, qui produit un échange d'ions simultané donnant naissance à une montmorillonite dite "sodifiée". La montmorillonite largement utilisée dans diverses applications en raison de son interaction avec les espèces organiques présentes dans l'eau, grâce à ses propriétés d'interaction acide-base de Lewis (ABL) [25], ainsi qu'à sa basicité et son caractère hydrophile. De telles propriétés permettent l'adsorption de substrats organiques par le biais de divers types d'interactions (électrostatique, organophile-hydrophobe et acide-base de Lewis) selon le pH du milieu [60]. La structure comporte également des groupements silanol en surface (in-plane) et sur les arêtes (out-of-plane) [61]. Ceux-ci subissent des phénomènes de protonation-déprotonation selon le pH du milieu. Ces phénomènes confèrent à la surface des charges négatives additionnelles et une CEC non-permanente qui augmentent à pH alcalin et disparaît à pH acide [62-64]. Ces charges contribuent également aux interactions électrostatiques impliquées dans l'adsorption des espèces organiques (Schéma 1.5).

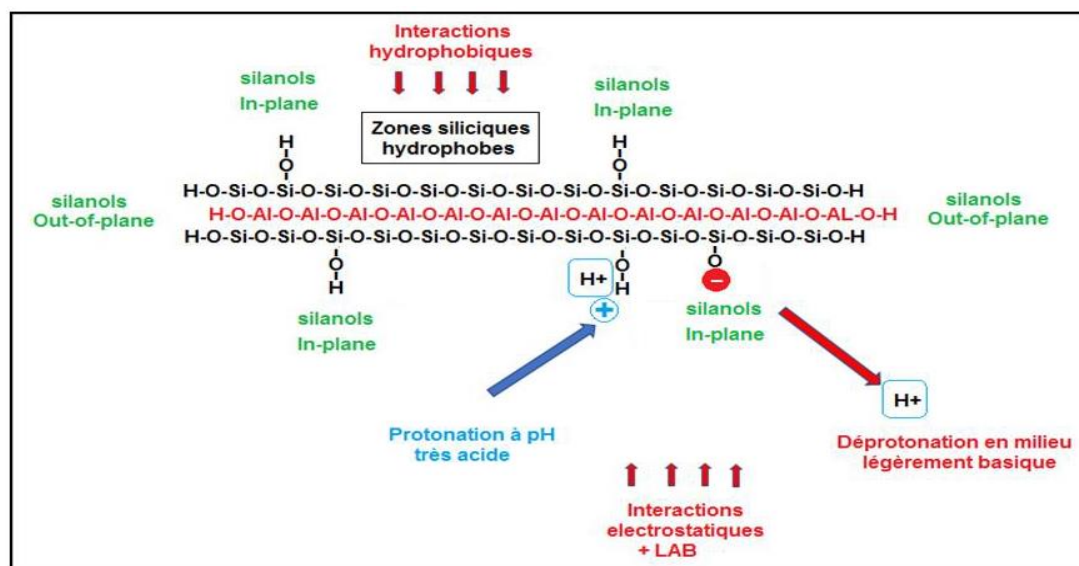


Schéma 1. 5 Interactions possibles entre un aluminosilicate et une molécule organique.

La montmorillonite sodifiée (NaMt) est une forme obtenue par échange d'ion total par des cations de sodium (Na^+) fournis par du sel de chlorure de sodium dissous dans l'eau. D'autres formes telles KMt, CaMt et MgMt peuvent être préparées selon la même procédure, mais utilisant les sels de potassium, calcium et magnésium correspondants.

Dans la bentonite, ses dérivés activés à l'acide, la montmorillonite sodique et ses homologues échangés au potassium, calcium et magnésium, la distribution des différents types d'interactions est primordiale en catalyse. L'élucidation de tous ces phénomènes de surfaces sont un défi important dans le processus d'oxydation tel que l'ozone en milieu aqueux, où le pH joue un rôle-clé

1.3 L'ozone et le processus d'ozonation

1.3.1 L'ozone

L'ozone est un gaz avec un puissant pouvoir oxydant le rendant bénéfique en tant qu'agent stérilisant avec des applications en décomposition de molécules organique [65, 66]. C'est une molécule d'oxygène triatomique très réactive et relativement instable [67, 68]. Elle est utilisée dans le traitement des eaux usées [69], la dégradation des polluants organiques [24, 70] ainsi que dans divers procédés d'oxydation, blanchiment, décoloration [25], désodorisation [71] et conservation d'aliments [72]. La formation de l'ozone se caractérise par sa courte durée de vie étant rapidement décomposé par des composés capables de s'oxyder [73], et dépend du pH, de la température, de la présence de sels et, bien-sûr de la concentration en O_3 dans le milieu de production [74]. Ses principales caractéristiques sont récapitulées dans le Tableau 1.3.

L'ozone est assez commode à utiliser, pouvant être produit par des dispositifs peu volumineux, transportables et donc moins encombrants. Il existe diverses techniques de production de l'ozone [68], mais les méthodes de décharge électrique, de rayonnement ultraviolet, d'électrolyse et de radiochimie sont actuellement les plus utilisées [75].

Tableau 1. 3 Principales caractéristiques de l'ozone

Propriétés chimiques et thermiques		Réf.
Masse molaire ($g \cdot mol^{-1}$)	48	[76]
Solubilité dans l'eau à ($0^{\circ}C$)	0.001% (non)	[76]
Point d'ébullition à 760 mm mm Hg	$-111,6^{\circ}C$	[77]
Point de fusion	$-192,2^{\circ}C$	[77]
Enthalpie (KJ/mol)	$-163 kJ \cdot mol^{-1}$	[34]
Densité à $-195^{\circ}C$ (g/cm^3)	1.614	[78]

L'ozone peut être dosé par une technique volumétrique et la méthode iodométrique. Il existe une abondante littérature traitant la détermination de l'ozone dans les milieux liquides (Tableau 1.4).

Tableau 1. 4 Travaux récents sur la détermination de la concentration d'ozone

Générateur d'ozone	Méthode	Conclusion	Réf.
Réacteur coaxial DBD (Air comme source de gaz)	Méthode iodométrique à 20 °c	La dissolution de l'ozone augmente l'efficacité du réacteur. Les impuretés diminuent la production de O ₃ .	[79]
OZONFIX 8G (Air comme source de gaz)	Méthode iodométrique (KI) UV-Vis (200-300nm) à 20°C	O ₃ oxyde O ₂ et N ₂ présents dans l'air La méthode iodométrique détermine les concentrations élevées de O ₃ . UV-Vis détecte NO (oxyde nitrique) et une faible concentration O ₃ .	[67]
(OZ0001-100, Chuen Electronics Co., Ltd) (O ₂ , air et plasma comme source de gaz)	UV-VIS (260nm), (210nm) à 20°C	L'ozonation de l'eau produit une forte concentration de H ₂ O ₂ et faible concentration de O ₂ . UV-Vis permet de suivre les mécanismes de réaction produites pendant l'ozonation de H ₂ O	[80]
Réacteur à plasma à décharge à barrière diélectrique (Air et Oxygène médical comme source de gaz)	Solution de KI à 20°C	Le débit d'alimentation, tension d'entrée et le gaz d'alimentation influencent sur la production de O ₃ . La production O ₃ est meilleure avec l'oxygène médical que l'air.	[81]
Pression atmosphérique de décharge Townsend (APTD) Décharge de barrière diélectrique filamenteuse (DBD) (N ₂ /O ₂ comme source de gaz)	FTIR UV-Vis (320 ppm) à 20°C	DBD : L'augmentation de O ₂ augmente La production de O ₃ APTD : L'augmentation de O ₂ diminue La production de O ₃ La teneur de O ₂ et N ₂ influence sur la production de O ₃	[82]

Générateur de décharge haute tension à plaques YOTA-60-01 (O ₂ comme source de gaz)	UV-Vis (200–310nm) à 201-297 K	La température et la nature de la solution influencent sur l'absorbance de O ₃ [83]
Fisher, Modèle: 502 (O ₂ comme source de gaz)	Hauteur de la colonne d'eau Heure du contact pH-mètre à 110 –150 °C	pH, la hauteur de la colonne et le temps de contact influencent sur la production de O ₃ [84]
Ozonateur basé sur la décharge capillaire (O ₂ comme source de gaz)	UV-Vis (588 nm) à 25 –70 °C	La décomposition et la solubilité de O ₃ dépendent de solution et la température. [85] La décomposition de O ₃ est faible dans les solutions acides

Une analyse approfondie des données regroupées dans le Tableau 1.4 montre que l'iodométrie et la spectrophotométrie UV-Vis sont les principales techniques d'évaluation de la concentration de l'ozone. Les principales bandes UV-Vis utilisées à cet effet se situent dans la gamme 200-300 nm. Le pH, la nature de solution et la température influencent le taux de décomposition et l'absorbance de l'O₃.

Les moyens pour réaliser l'approche adoptée dans cette recherche visent non seulement le dosage de l'ozone, mais également celui de l'acide lactique et de ses dérivés si possibles. Les interactions suspectées d'être impliquées dans le processus d'ozonation seront évaluées par des méthodes de mesures, du pH, du potentiel Zeta et de la taille des particules, en corrélation avec d'autres techniques pour la caractérisation des adsorbants et des catalyseurs argileux. Les principes de ces différentes techniques sont exposés d'une manière succincte dans ce qui suit.

1.4 Considérations générales sur les méthodes d'analyses utilisées

1.4.1 Spectrophotométrie UV-Vis

La spectroscopie-spectrophotométrie UV-Vis est une technique d'analyse à grande échelle pour l'identification et le dosage de composés chimiques lorsqu'ils sont isolés. Elle sert à mesurer les concentrations avec une haute résolution en se basant sur les tracés de courbes d'étalonnage préétablies entre l'absorbance et la concentration du composé identifié. La partie linéaire de ce genre de courbes est supposée se soumettre à la loi de Beer-Lambert où l'absorbance de la lumière est proportionnelle à la concentration de l'analyte en solution [86] selon la relation suivante :

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times \ell \times C$$

où A_{λ} représente l'absorbance (sans dimension), ℓ est l'épaisseur de la solution traversée en cm, C est la concentration molaire de l'analyte en mol. L^{-1} et ϵ_{λ} est le coefficient d'absorption molaire en mol. $L^{-1}.cm^{-1}$ à la longueur d'onde maximale.

L'objectif de s'appuyer sur cette technique est de suivre qualitativement l'évolution de la concentration de l'acide lactique dans le temps, tout en mettant en évidence l'apparition et/ou la disparition d'intermédiaires durant la réaction d'ozonation. Dans la plupart des cas, l'ozone absorbe dans la même région que la plupart des dérivés oxydés de l'acide lactique. Néanmoins, le simple fait de savoir que l'ozone est très réactif et que sa durée de vie est assez courte en présence d'acide lactique résiduel permet de considérer que son interférence peut être négligée lors de l'utilisation de la courbe d'étalonnage de l'acide lactique. Les déplacements des bandes par des effets bathochrome et hypsochrome suivies par des changements dans l'absorption peuvent être mis à profit pour fournir des informations structurales sur l'apparition des intermédiaires et leurs interactions en milieu aqueux.

1.4.2 Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

C'est une méthode de séparation dont le but est l'identification et la quantification de composés chimiques dissous [86]. La détection peut se réaliser par différentes méthodes, dont la spectrophotométrie UV est probablement la plus simple et la plus commode lorsque les bandes UV-Vis d'adsorption de l'acide lactique et l'intermédiaires sont connues.

Son principe se base sur l'injection de mélanges de substance dans un courant de phase mobile traversant une colonne à garnissage à base de grains dit 'poilus' qui consistent une des particules de matériaux inorganiques (quelques fois de zéolite) portant des greffes d'un polymère à 18 carbones (C18) (Schéma 1.6). Par exemple, l'injection de trois substances A, B et C sera entraînée par une phase mobile plus ou moins polaire à travers une colonne C18. Les substances seront séparées en sortant successivement l'une après l'autre selon leur polarité et leur taille, étant plus moins retenues par l'enchevêtrement des filaments C18 et les espaces intergranulaires du garnissage.

Dans cette recherche, l'évolution dans le temps de la concentration de l'acide lactique a été suivi par la variation de l'aire du pic HPLC-UV, qui est proportionnelle à sa quantité. L'utilisation d'une courbe d'étalonnage préétablie permettra d'évaluer la concentration de la substance à chaque instant. La dégradation de AL entraîne l'apparition de nouveaux pics correspondant à la formation d'intermédiaires. La description sera bien détaillée dans la partie expérimentale et discussion.

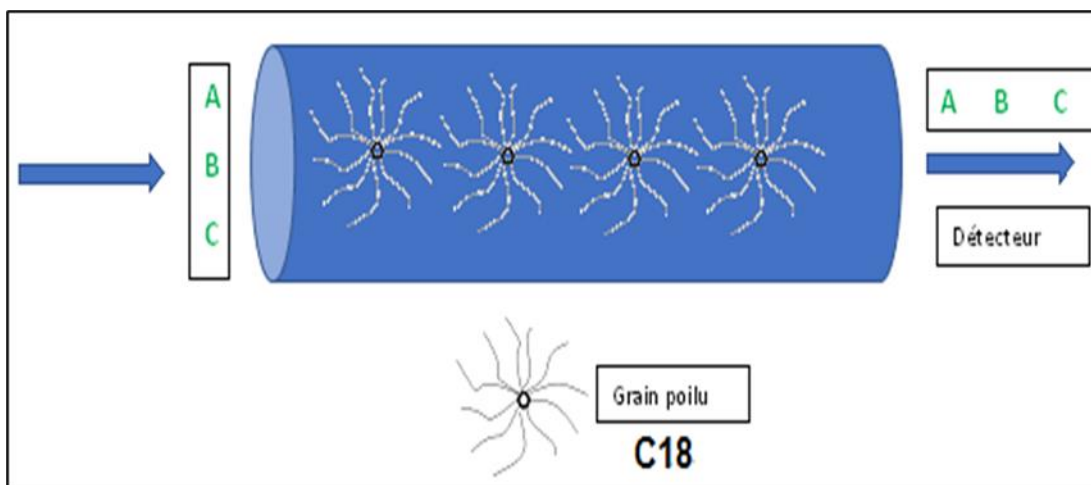


Schéma 1. 6 Principe de séparation de trois substances A, B et C à travers une colonne C18.

1.4.3 Chromatographie en phase liquide - spectrométrie de masse

La chromatographie en phase liquide (LC) couplée à la spectrométrie de masse par temps de vol (Time of Flight Mass Spectrometry, TOF-MS) est une technique de séparation sensible et sélective, qui sert à doser et à identifier les composés dans un mélange. Elle a un principe de séparation et un pouvoir de résolution similaires à ceux de la HPLC. Sa fiabilité réside essentiellement sur sa précision à identifier les masses moléculaires par le biais de rapport masse/charge (m/z) les plus probables à travers son détecteur à spectrographie de masse [87].

Son principe de détection se base sur la transformation d'un composé en ion par un bombardement de l'analyte par des électrons, des atomes, ou des photons selon la nature du composé à analyser ; Ces ions subissent à un champ électrique ou magnétique sous un vide poussé, entraînant une force sur les ions permettant de déterminer leur rapport masse/charge et leur nature. (Schéma 1.7). La description sera bien détaillée dans la partie expérimentale et discussion.

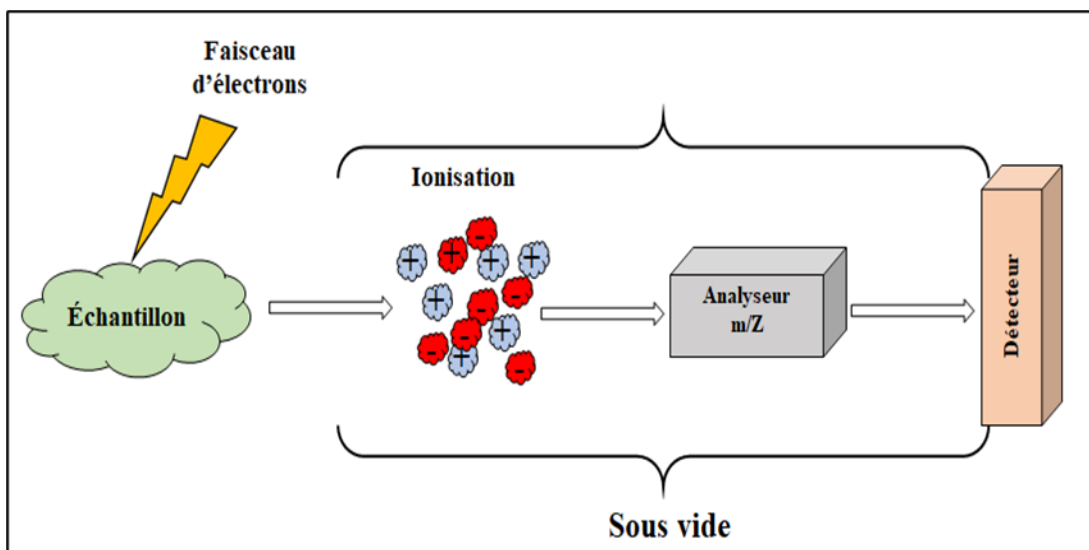


Schéma 1. 7 Principe de spectrométrie de masse

1.4.4 Diffraction des rayons X

La diffraction de rayons X (DRX) est une méthode de caractérisation des solides aussi bien monocristallins que dispersés sous forme de poudre. Elle permet de déterminer leur cristallinité, leur type de symétrie et la structure 3D de l'arrangement des atomes et les distances qui les séparent.

Le principe de la diffraction se base sur la "réflexion" sans perte d'énergie de deux photons X par deux atomes se trouvant sur deux plans parallèles selon la loi de Bragg [88] (Schéma 1.8).

Dans la présente étude, l'utilisation de cette technique a fourni des informations précises permettant de distinguer les modifications subies par chaque type de matériaux argileux étudié.

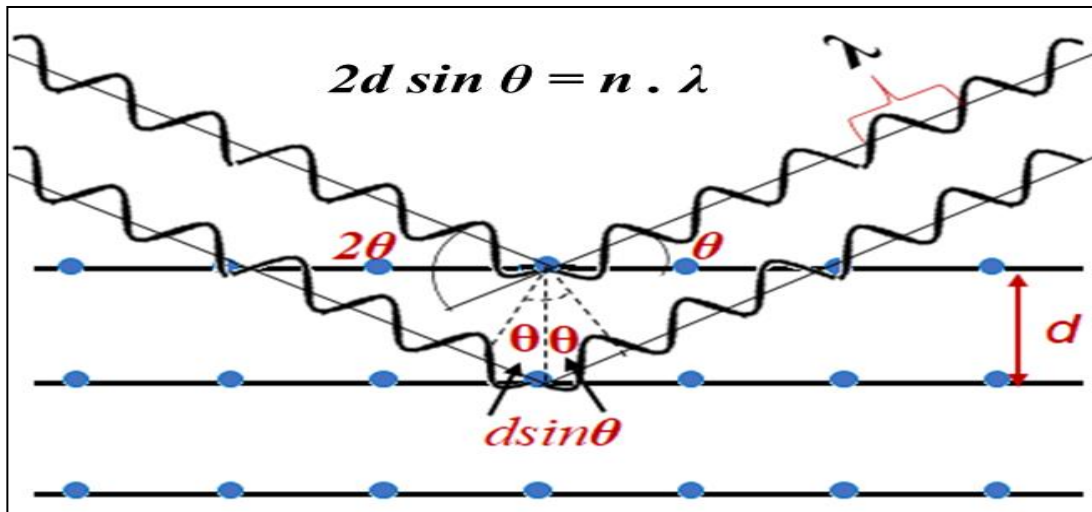


Schéma 1. 8 Principe de diffraction des rayons X

Où d désigne l'espacement inter planaire d_{hkl} (hkl : indice de Miller), θ est l'angle de Bragg dans lequel 2θ représente l'angle entre le faisceau incident et réfléchi, n est l'ordre d'interférence et λ est la longueur d'onde.

Cette base théorique a permis de réaliser l'approche mise en premier après avoir développé une technique efficace, permettant d'éliminer l'acide lactique du bouillon de fermentation. Cette technique implique de très faibles coûts étant donné que les matériaux utilisés sont naturels et largement disponibles et ne présentent aucun risque de toxicité. L'extraction de l'acide lactique du milieu de culture peut se réaliser par adsorption sur des matériaux argileux anioniques, connus pour être assez stables chimiquement, non toxiques et recyclables. Une fois chargés d'acide lactique, ces matériaux peuvent être régénérés ex-situ par décomposition totale de l'acide lactique en CO_2 et eau avant d'être réutilisés. L'utilisation de l'ozone comme agent de régénération est une voie judicieuse, sachant que ce gaz a déjà l'approbation des instances de certains pays pour son emploi en stérilisation des équipements en industries alimentaires. L'efficacité de l'ozone pourrait être améliorée par des catalyseurs argileux également tels l'adsorbant anionique lui-même et des smectites

telle la bentonite, la montmorillonite et leurs formes modifiées. Des travaux antérieurs avaient déjà démontré leurs performances. Ces travaux ont constitué la base de la présente recherche qui a permis d'évaluer et comprendre l'efficacité des adsorbants et catalyseurs argileux et le rôle de l'ozone comme agent oxydant pour l'extraction par adsorption de l'acide lactique et sa dégradation par l'ozone en dérivés inoffensifs.

CHAPITRE II

PARTIE EXPÉRIMENTALE GÉNÉRALE

Cette partie traite toutes les procédures expérimentales impliquées dans la réalisation de ce travail. Toutes les substances utilisées dans cette recherche ont été fournies par les firmes Sigma-Aldrich et Fluka, Ces substances sont l'acide lactique, les argiles, et aussi les produits organiques utilisés pour faire l'échange cationique pendant la purification, ainsi que les produits utilisés pour la réaction de l'ozone avec l'iodure de potassium (KI). Les solvants utilisés pour réaliser les essais de chromatographie liquide à haute performance étaient de grade HPLC. Les réactions ont été suivies par les techniques suivantes : Spectrophotométrie UV-Visible (UV-Vis), HPLC couplée à un détecteur UV (HPLC-UV), Spectrométrie de masse à temps de vol (LC-ToF-MS), Zeta potentiel, Tailles des particules et Diffraction de rayons X (DRX).

2.1 Préparation et purification des matériaux argileux

La montmorillonite échangée en Na^+ (NaMt) a été préparée par purification d'une bentonite brute (Sigma-Aldrich USA). À cet effet, 200g de bentonite brute ont été dispersés dans 2L d'eau distillée, puis 70g de NaCl ont été ajoutés, La suspension résultante a été agitée vigoureusement à 80°C pendant 7h jusqu'à homogénéisation. Ensuite, le mélange a été laissé reposer plusieurs jours, puis centrifugé à 12000 rpm afin d'obtenir trois phases bien séparées, une contenant seulement le surnageant d'une couleur claire, une phase solide avec une couche inférieure brunâtre d'impuretés

(cendres volcaniques et phases siliciques denses), et une troisième située entre les deux phases. Cette phase contient la suspension d'argile (Phase riche en montmorillonite) avec une couleur beaucoup plus claire (Figure 2.1).

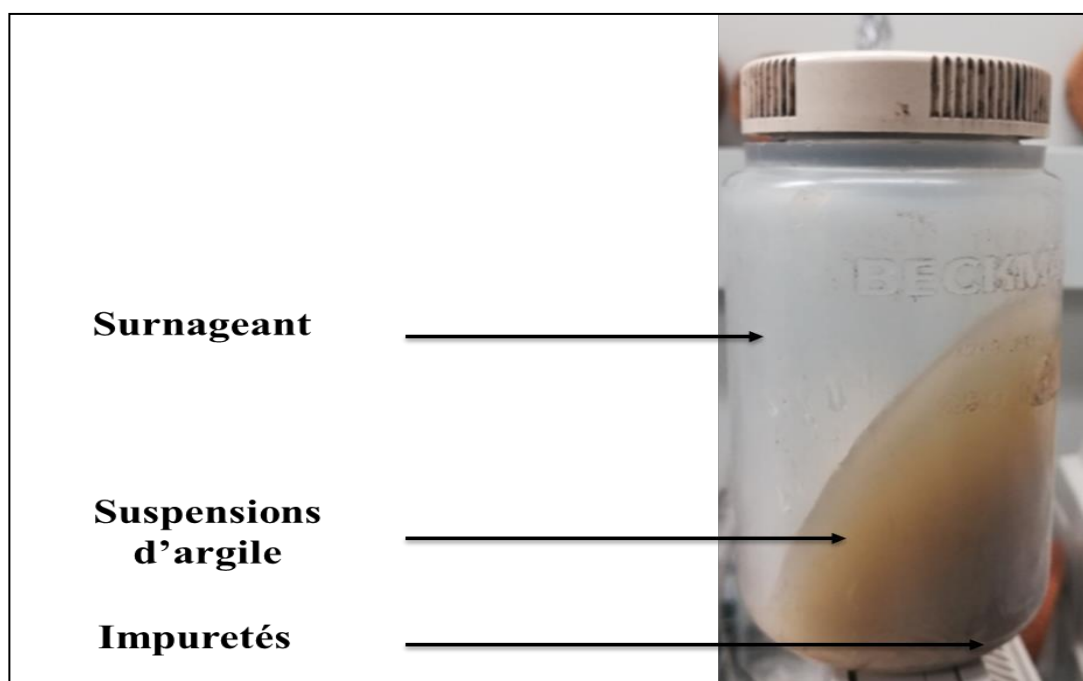
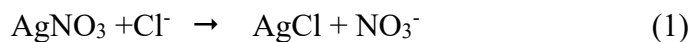


Figure 2. 1 La séparation d'argile après la centrifugation

Un lavage en série avec l'eau distillée a été effectué toutes les 48h à température ambiante, accompagné d'une agitation vigoureuse pendant 4 heures pour assurer l'homogénéisation et l'élimination de l'excès de sel utilisé dans l'échange anionique. Ce processus a permis d'éliminer les cendres volcaniques et l'excès de sel ainsi que les phases de silice denses, résultant en un matériau riche en montmorillonite avec une cristallinité élevée. Après deux semaines de lavage répétitifs à l'eau distillée sous agitation suivie de décantation, le test de chlore a été périodiquement effectué par l'utilisation de quelques gouttes de solution AgNO_3 (Sigma – Aldrich) de concentration 0,1N. La procédure prend fin lorsqu'il n'y a plus de précipité blanc d' AgCl , mettant en évidence l'absence de chlorure (Réaction 1).



La montmorillonite modifiée obtenue, désignée par NaMt, a été ensuite dialysée pendant une nuit dans des sacs de cellulose immergés dans l'eau distillée jusqu'à la disparition complète du chlorure. La pâte résultante a ensuite séché pendant une nuit à 80°C [89].

La montmorillonite échangée à l'ion calcium (CaMt) a été préparée en mélangeant 3g de NaMt avec 1g de CaCl₂ dissous dans 100 mL d'eau distillée, puis agitée pendant 6 heures à 80°C. Le mélange a été ensuite laissé décanter pendant 24h, ensuite filtré et finalement lavée à plusieurs reprises. Le test de chlorure a été effectué d'une manière similaire à celle utilisée pour NaMt. Le même protocole a été suivi pour KMt et MgMt après imprégnation dans une solution aqueuse de KCl et MgCl₂, respectivement. Des matériaux argileux supplémentaires, désignés par HMt, ont été préalablement préparés par activation acide de la même bentonite brute pendant différents temps de contact (1, 4, 8, 15 et 24 heures) dans un travail antérieur [90]. Les échantillons correspondants HMt-1, HMt-4, HMt-8, HMt-15 et HMt-24 ont été caractérisés par une désalumination ayant modifié le rapport molaire Si/Al et le remplacement des cations échangeables par des protons.

2.2 Caractérisation

Tous les minéraux argileux ont été caractérisés par diffraction des rayons X (D8 Advance Bruker, CuK α , $\lambda = 1,5418\text{\AA}$), à une tension de 40 kV. Les données ont été traitées par un système de traitement Bragg Brentano Geometry. Des mesures supplémentaires du pH, du potentiel Zêta et de la taille des particules dans l'eau pure et dans la solution d'acide lactique (AL) ont été effectués pour étudier les interactions du

catalyseur avec l'eau, les molécules d'acide lactique, l'ozone et d'autres particules de catalyseur.

À cet effet, la granulométrie a été évaluée au moyen d'un équipement Malvern-Zetasizer S90 Nanoseries et d'un logiciel de granulométrie 90-Plus, version 4.20. Le potentiel Zeta a été estimé avec un appareil Brookhaven (Zeta-Plus / BI-PALS). Les deux analyses ont été réalisées à température ambiante (TA) sur 40 mg de poudre d'argile préalablement dispersée dans 20 mL d'eau ou de solution AL.

2.3 Préparation des solutions

Les solutions ont été préparées avec de l'eau nanopure. L (+) -acide lactique liquide (Sigma-Aldrich) a été dissous dans l'eau nanopure à différentes concentrations (Tableau 2.1). Plusieurs tentatives ont été effectuées afin de choisir la meilleure concentration permettant de réaliser les expériences dans les domaines de détection et d'analyse désirés. Ces concentrations sont aussi utilisées comme des standards pour calibrer les appareils d'analyse pour comprendre leurs réponses à notre analyte.

Tableau 2. 1 Concentrations massiques et molaires des solutions aqueuses de AL préparées.

Solutions de AL	[AL] (g. L ⁻¹)	[AL] (mM)
1	1	11
2	2.5	27,75
3	3	33,3
4	4	44
5	5	55

Avant l'ozonation, les minéraux argileux ont été imprégnés en mélangeant 4 mg de minéraux argileux cationiques avec 20 mL de solution aqueuse de AL à une concentration de 2,5 g. L⁻¹ (27,75 mM) sous agitation manuelle pendant 3 min.

Contrairement à la bentonite, la montmorillonite et leurs homologues modifiés, l'hydrotalcite (Ht), comme tous les hydroxydes doubles lamellaires (LDH), est bien connue pour être assez hydrophobe et que leur exfoliation (délamination) est difficile à réaliser. Ht a été imprégnée selon le même mode opératoire mais avec 2 h d'agitation. Cette durée est considérée nécessaire à une délamination suffisante selon des tests préliminaires. L'échantillon a ensuite été centrifugé et filtré avec un filtre de 0,22 μm .

2.4 Tests d'ozonation

Des tentatives d'ozonation non catalytique ont été effectuées en utilisant divers échantillons de 20 mL de AL de concentration 2,5 g. L⁻¹ (27,75 mM) dans de l'eau nanopure à pH intrinsèque dans des récipients cylindriques en PVC (28 mm $\times$ 115 mm) à température ambiante (TA). Ces échantillons ont été exposés pendant des temps différents allant de 20s à 60 minutes en l'absence de catalyseurs à un débit massique constant de 600 mg.h⁻¹ de barbotage d'ozone produit à partir de l'air par un générateur d'ozone portable A2Z-AQUA-6 (A2Z Ozone Inc., ETATS-UNIS). Une procédure similaire a été utilisée pour l'ozonation catalytique en ajoutant aux mêmes échantillons de 20 mL de solution de AL une quantité constante de 4 mg de matériaux argileux secs sous agitation manuelle pendant 3min. À cet égard, Ht utilisée adsorbant-catalyseurs et la bentonite, NaMt, KMt, CaMt, MgMt et divers HMt comme catalyseurs et co-catalyseurs de Ht dans certains tests.

Après ozonation, les mélanges réactionnels ont été centrifugés, filtrés à travers un filtre de 0,22 μm et ensuite analysés par diverses techniques. À cet effet, la spectrophotométrie UV-Vis pour évaluation qualitative de l'avancement de la réaction d'ozonation, chromatographie HPLC-UV une estimation précise du rendement de conversion de AL et de formation de certains dérivés et finalement par LC-Tof- MS pour l'identification de certains intermédiaires ont été utilisées.

2.5 Analyse qualitative par spectrophotométrie UV-Vis

En général, toutes les réactions ont été suivies par spectrophotométrie UV-Vis à l'aide d'un appareil de type Brand Instrument Agilent-Cary 60 (Agilent Technologies, USA), avec l'utilisation de cellules à quartz de 1 cm. Le traitement des données a été effectué par un logiciel de contrôle. Le balayage a été réalisé entre 190 nm et 800 nm à température ambiante. Pour éviter une éventuelle influence de la lumière sur le processus d'ozonation, des précautions spéciales ont été imposées en réalisant les tests catalytiques sous la hotte en semi-obscurité et en chassant l'air des mélanges réactionnels obtenus avec une injection d'azote pur.

Les solutions soumis à une ozonation catalytique se sont manifestées par une turbidité excessive, qui persiste souvent même après décantation prolongée (24h). Une centrifugation a été effectuée à une vitesse de 4000 tr/min pendant 20 min à une température ambiante a permis de remédier cet inconvénient. La difficulté persistante à réduire la turbidité dans les mélanges contenant Ht a imposé des prélèvements avec une seringue à aiguille très fine, puis un filtrage à l'aide d'un papier filtre de 0.22 μm .

2.6 Analyse quantitative par HPLC-UV

Ce type d'analyse quantitative a fait appel à un chromatographe HPLC de type Alliance série 1260 couplé à un détecteur UV (WATERS-2487 à double canaux) Les données d'analyse ont été traitées par un logiciel d'acquisition STAR (Varian Analytical Instruments). La colonne utilisée est de type Agilent Eclipse plus C18 (3,5 μm , 4,6 x 250 mm). La longueur d'onde de détection était de 210 nm. Le débit était de 1 mL.min⁻¹ et un volume d'injection de 3 μL à température ambiante. Un gradient d'élution avec une seule phase (100% A), qui contient 1 L d'eau nanopure et 0.06 millilitre d'acide trifluoroacétique TFA. Le temps de séparation est de cinq minutes en mode isocratique.

Une méthode de séparation a été développée après une série de tentatives infructueuses (Tableau 2.2) dans lesquelles la séparation et la sensibilité étaient les paramètres contrôlés pendant l'analyse et tous les produits utilisés étaient de pureté chromatographique. La polarité de la phase mobile avait un effet négatif sur la séparation des composés. Des phases mobiles différentes ont été utilisées afin d'obtenir une bonne séparation avec un temps d'élution court.

Tableau 2. 2 Les essais non concluants dans le développement de la méthode chromatographique.

Phase mobile	Type de colonne	Mode d'élution*	λ (nm)	V (μ l)	Remarques
ACN et Eau nanopure	C18 (3.5 μ m, 4.6 $\times$ 100mm)	Gradient :5 -60 % de B	265	1-5	-Pic négatif -Sensibilité faible -Temps d'élution très court -Pic de AL superposé.
ACN et Eau nanopure	C18 (3.5 μ m, 4.6 $\times$ 100mm)	Gradient :5 -60 % B	220	3	-Absence de pic
ACN et Eau nanopure	C18 (3.5 μ m, 4.6 $\times$ 100mm)	Isocratique :3 0%A,70% B	195	1-5	-Absence de pic
Méthanol et Eau	C18 (3.5 μ m, 4.6 $\times$ 100mm)	Isocratique: 50% A,50% B	195, 220, 265	1-5	-Absence de pic
H ₂ S ₂ O ₃ et eau à pH=2.8	C18 (3.5 μ m, 4.6 $\times$ 100mm)	Isocratique : 100% A	195, 220, 265	1-5	-Absence de pic
Eau avec 0.1% d'acide formique	C18 (3,5 μ m, 4,6 x 250 mm).	Isocratique 100 % A	193, 210, 265	5	-Bonne séparation à 210 nm avec sensibilité faible. -À 265 nm :pic négatif -À 193 nm absence de pic -Saturation
Eau avec 0.1% d'acide formique	C18 (3,5 μ m, 4,6 x 250 mm).	Isocratique 100 % A	193, 210, 265	3	-Bonne séparation -Sensibilité faible

*Un débit de 1 mL. min⁻¹ a été adopté dans toutes ces tentatives.

La phase mobile A contient seulement de l'eau. La phase mobile B contient de l'acétonitrile (ACN), du méthanol et de l'acide thiosulfurique (H₂S₂O₃). Le développement de la méthode a pris en compte trois aspects importants, La sensibilité

de l'appareil, le temps d'élution et la qualité de séparation des composés. L'ozonation catalytique de AL a donné naissance à un produit intermédiaire, qui sort avant AL. Ce composé est beaucoup plus polaire que AL, et a nécessité une identification par LC-TOF-MS.

2.7 Identification par LC-TOF-MS

Les échantillons ont été dilués 1 : 1 avec de l'eau de qualité HPLC. Des injections de 0,5 μL ont ensuite été analysés par LC-ToF-MS sur un équipement Série 1260 couplé à un spectromètre de masse 6224 TOF, tous deux de Agilent Technologies (Santa Clara, CA). La colonne chromatographique était de type Gemini-NX C18, 50 x 2,00 mm, 3 μm de taille de particules (Phenomenex, Torrance, CA) maintenu à 30 °C. La source d'ionisation en mode de balayage d'ion négatif avec une configuration à double pulvérisation permettant un étalonnage interne et donc une très bonne précision de masse. Les spectres de masse ont été acquis dans l'intervalle de valeurs m/z 40-1400 avec un cycle d'acquisition de 0,89 s et une résolution supérieure à 10 000. La tension électro-spray a été fixée à 3,5 kV, le fragmenteur à 120 V et la température de la source à 300 °C. Les composés ont été séparés en mode gradient (Tableau 2.3).

Tableau 2. 3 Conditions standards d'analyse par LC-TOF-MS en mode gradient.

Phase mobile	Débit mL.min^{-1}	%A (Eau ultrapure+0.1% Acide formique)	%B (Méthanol)	Temps (min)
1	0.4	100	0	2
2	0.4	60	40	2-9.5
3	0.4	60	40	9.5-10
4	0.4	60	40	10-10.5
5	0.4	100	0	10.5-15

2.8 Dosage d'ozone

Dans ce travail deux types de générateurs d'ozone ont été employés. Le générateur d'ozone mobile (générateur d'ozone MP-8000) utilise la technologie de décharge Corona et un courant de 110 V (Figure 2.2). Il est équipé d'un compresseur d'air interne intégré et d'un ventilateur de refroidissement robuste. Dans le présent travail, une bouteille d'air comprimé a été utilisée en guise de source d'oxygène, pour éviter la restriction d'un arrêt au bout de 2 heures et palier à l'échauffement excessif du compresseur. Cet appareil dispose d'un moteur pour contrôler le temps d'ozonation et d'un bouton pour régler la concentration d'ozone de sortie qui est affichée en pourcentages. Un débit massique de 8 g.h^{-1} et une concentration de 45 g.m^{-3} d'ozone peuvent être produits.

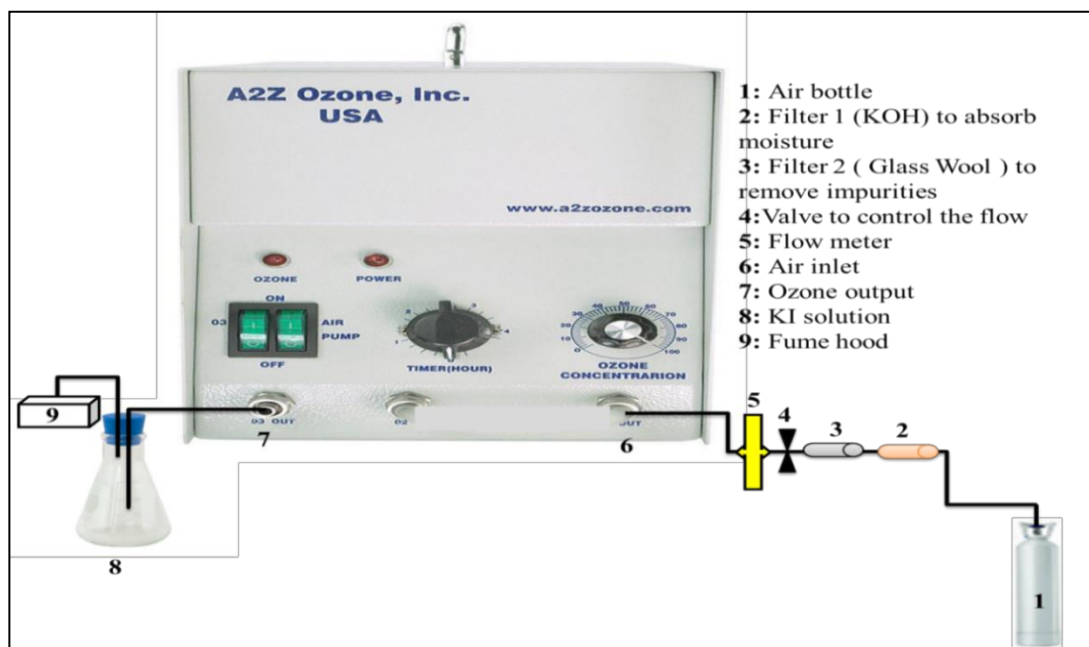


Figure 2. 2 Illustration de fonctionnement du générateur d'ozone.

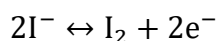
Lors de l'ozonation, les tubes utilisés sont fermés par un capuchon en néoprène, étant relié à deux tuyaux en PVC dont les extrémités sont reliées à deux tubes en verre de 15 cm. Ces tubes étaient reliés, l'un pour faire barboter l'ozone dans la solution de KI, et l'autre étant relié au bouchon vers la hotte, pour éliminer la pression de gaz qui sera générée lors de l'ozonation.

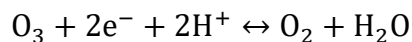
2.8.1 Détermination de la concentration d'ozone par la méthode de titrage iodométrique

La concentration d'ozone a été déterminée par titrage iodométrique. Le principe est basé sur l'oxydation de l'ion iodure [91]. Pour cela, 10 échantillons de solution d'iodure de potassium ont été préparées dans des erlenmeyers de 250 mL, chacun étant ozoné pendant cinq minutes à différentes concentrations d'ozone (10% -100%). Chaque solution a été préparée comme suit: 0,5 g d'iodure de potassium (KI) et 0,05 g d'iodate de potassium (KIO₃) ont été préparés dans 100 ml d'eau distillée (claire). Une fois dissous, chaque solution a été complétée à 200 mL avec de l'eau. La solution a été acidifiée avec 10 mL d'acide chlorhydrique concentré, HCl 1M (brun sombre), car la production d'iode semble être importante dans des conditions acides [92]. Après avoir ajouté 7,8 ml de thiosulfate de sodium 0,1 M (Na₂S₂O₃) (jaune foncé), la solution a été ozonée à différentes graduations de l'ozonateur pendant 5 min. À cet effet, KI, KIO₃, HCl et Na₂S₂O₃ ont tous été fournis par Sigma Aldrich.

Les échantillons ont été analysés par spectrophotométrie UV-Vis. Ensuite, 1 mL d'indicateur d'amidon a été ajouté à la solution (bleu) et ensuite titré avec 0,1 M de Na₂S₂O₃ jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune pâle. Les réactions redox ci-dessous et les équations correspondantes ont permis de calculer le nombre de moles puis le débit massique d'ozone.

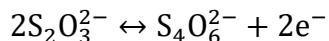
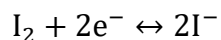
Les demi-réactions d'oxydoréduction, O₃ (g) / O₂ (g) et I₂ (aq) / I⁻ (aq) sont:



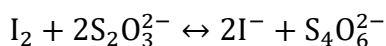


Où: $n(\text{O}_3) = n(\text{I}_2)$

- Lorsque la solution est dosée avec une solution de thiosulfate de sodium:



- La réaction totale est :



$$\text{D'où } n(\text{I}_2) = \frac{n(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{2}$$

- Le nombre de moles, $n(\text{O}_3)$ et le débit massique (MF), sont calculés à partir du volume de thiosulfate de sodium consommé, $V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})$:

$$n(\text{O}_3) = \frac{[\text{S}_2\text{O}_3^{2-}]V(\text{S}_2\text{O}_3^{2-})}{2}$$

$$\text{MF} = \frac{n(\text{O}_3) * M(\text{O}_3)}{\Delta t}$$

où: $M(\text{O}_3)$ est la masse moléculaire de l'ozone = 48 g.mol^{-1} .

2.8.2 Détermination de la concentration d'ozone par la méthode de spectrophotométrie UV-Vis

Pour cette méthode, 20 mL d'eau distillée ont été exposés dans des tubes à centrifuger de 50 ml à différents pourcentages d'ozone (0-100%) à différents temps (1, 2, 5, 10, 15, 20, 30, 40 et 60 minutes). Une analyse par spectrophotométrie UV-Vis a été ensuite réalisée pour chaque échantillon ozoné. Toutes les expériences ont été réalisées à une température ambiante.

CHAPITRE III

ÉTUDE CINÉTIQUE DE DISSOLUTION DE L'OZONE DANS L'EAU

L'ozone est un réactif-clé dans le processus d'ozonation de l'acide lactique, il se déclenche d'abord à l'interface des bulles de gaz et par la suite le milieu aqueux en raison de sa faible et lente solubilité. Ceci fait que dans plusieurs cas, l'ozonation initiale est dite "directe" impliquant l'ozone moléculaire non-dissout, précédant l'entrée en action de l'ozone dissout.

De ce fait la cinétique du processus d'ozonation est étroitement liée à celle de la dissolution de l'ozone dans le milieu réactionnel aqueux. La connaissance de la concentration d'ozone et de son évolution dans le temps s'avère donc être primordiale dans l'étude de ce processus. Deux méthodes ont été utilisées pour étudier la cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau. Auparavant, il a été jugé judicieux de comprendre le comportement spectral intrinsèque de l'ozone dans l'eau distillée pure

3.1 Spectrophotométrie UV-Vis de l'ozone dissous dans l'eau

La mesure de l'ozone dissous dans l'eau a été réalisée après ozonation durant 40 min avec le même débit d'air à différentes concentrations d'ozone dans le barbotage d'air. Les spectres UV-Vis obtenus révèlent la présence de 2 bandes principales à 220-230 nm et 306 nm (Figure 3.1). L'absorbance de l'ozone dans le visible est très faible, elle est proportionnelle à la concentration d'ozone. Ceci confirme encore une fois que la

pression de vapeur de l’ozone dans l’air est une force motrice qui favorise son absorption dans l’eau.

Cette seconde approche peut permettre l’établissement de deux courbes d’étalonnage pour les deux bandes spectrales de l’ozone. Cependant, les valeurs assez proches de l’absorbance pour les différentes concentrations permettent d’ores et déjà de prédire une plus faible précision comparativement à la méthode iodométrique. Les deux bandes observées à 220 et 230 et 306 nm évoluent différemment dans le temps d’ozonation aux différentes doses d’ozone injectées dans l’eau. Ceci pourrait être dû à différentes interactions possible entre l’eau et l’ozone.

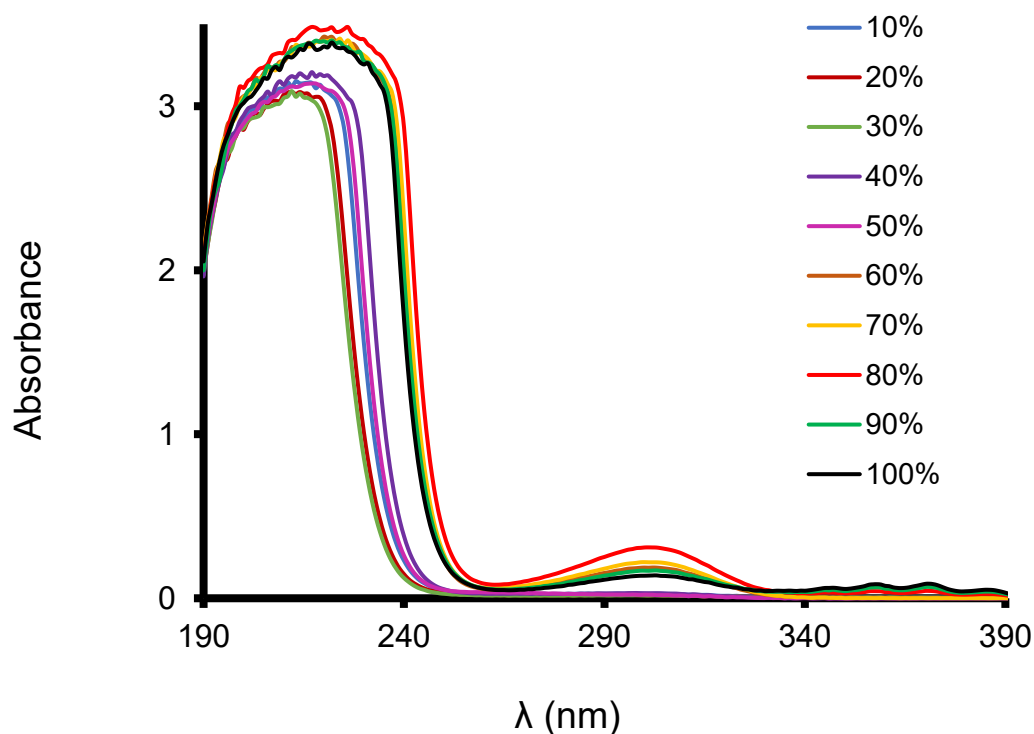


Figure 3. 1 Spectre UV-Vis de l'ozone dissous dans l'eau après ozonation durant 40 min avec le même débit d'air barboté à différentes concentrations d'ozone.

L'utilisation de l'air comme source d'ozone serait à l'origine de l'apparition de la seconde bande d'absorption à 306 nm. Elle sera probablement due à la formation d'oxygène et/ou d'oxyde d'azote résultant de l'oxydation de l'azote présent dans l'air atmosphérique. L'ozone est connu pour générer des espèces réactives de l'oxygène (ERO) et des espèces réactives de l'azote (ERN) [80].

3.2 Évolution dans le temps de la bande large à 220-230 nm

Un dosage périodique de l'ozone par cette méthode purement spectrophotométrique durant les 40 min d'ozonation de l'eau a permis de tracer l'évolution de la solution dans l'eau pure dans le temps sur la base de la bande large à 220-230 nm. Dans ce présent travail, le coefficient d'absorption molaire (Annexe 2) est très élevé. La dissolution de l'O₃ dans l'eau semble assez rapide au début du barbotage, et atteint un palier variable vers 10-20 min d'ozonation selon la dose d'ozone utilisée. (Figure 3.2). Les paliers d'absorbance obtenus correspondent à la solubilité de l'ozone dans l'eau sous différentes pressions partielles dans l'air après saturation de la solution en ozone.

L'évolution dans le temps de l'absorbance de l'eau ozonée montre une augmentation quasi-linéaire pour toutes les doses d'ozone injectées (Figure 3.3). La pente d'évolution varie d'une dose d'ozone injecté à l'autre, de sorte que les concentrations 70 et 80 % présentent les plus fortes pentes.

Ainsi, comme précédemment, il apparaît clairement que la dissolution de l'ozone dans l'eau telle que reflétée par la bande 306 nm est favorisée par la pression de vapeur saturante de l'ozone dans l'air barbotée. Une tentative pour corréler la solubilité de l'ozone dans l'eau en fonction de sa concentration dans l'air barboté a permis d'établir deux intervalles de temps dans lesquels l'ozone agit spectralement de manière

différente dans l'eau. Ici, l'ozone dissous dans l'eau peut se décomposer pour générer certains radicaux tels que O^{2-} and $\cdot OH$ qui agissent comme des oxydants puissants [93].

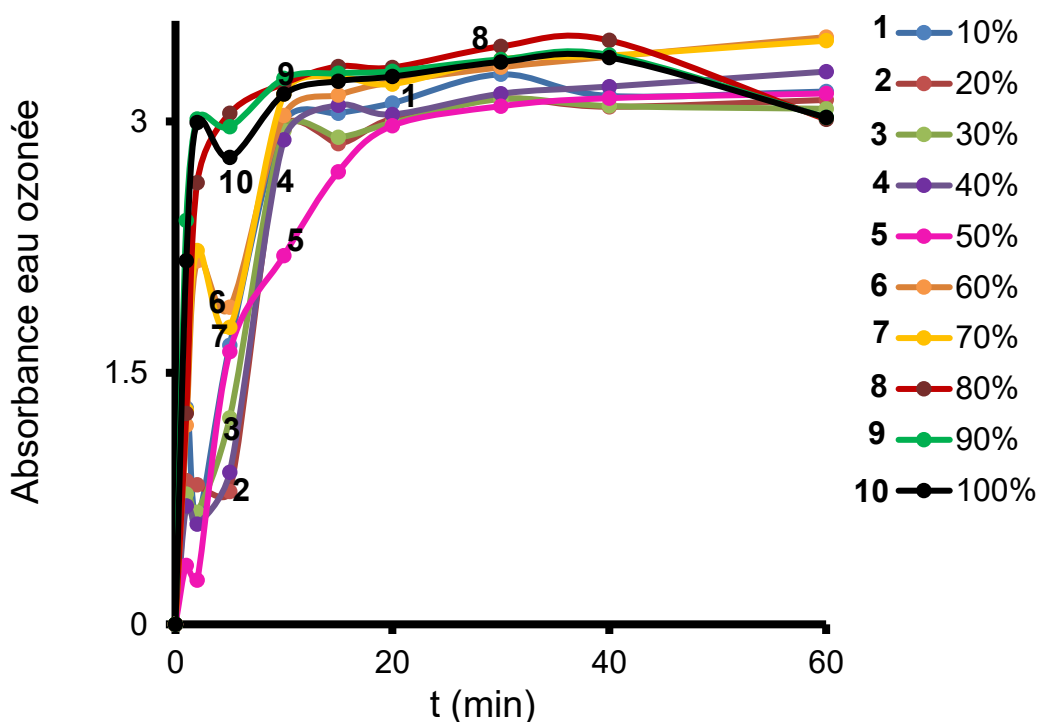


Figure 3.2 Évolution de l'absorbance large à 220-230 nm de l'eau durant l'ozonation avec le même débit d'air barboté à différentes concentrations d'ozone.

3.3 Évolution dans le temps de la bande 306 nm.

L'ozone est bien connu pour être très réactif, ce qui explique son instabilité et sa durée de demi-vie assez courte n'excédant pas quelques jours dans l'environnement [94]. Son instabilité peut s'accroître en réduisant d'une manière significative sa demi-vie. Cette dernière chute grandement jusqu'à quelques minutes voire quelques secondes en fonction de certains facteurs tels que l'humidité, la présence d'impuretés surtout organiques et bien-sûr la température. [82-85].

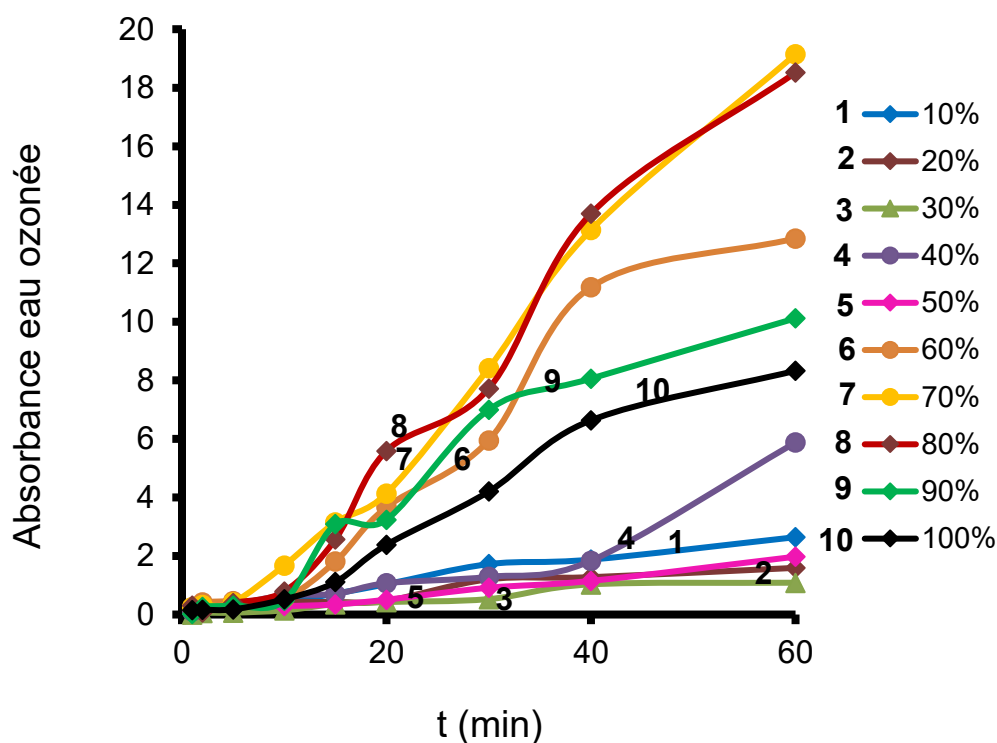


Figure 3. 3 Évolution de l'absorbance à 306 nm de l'eau durant ozonation avec le même débit d'air barboté à différentes concentrations d'ozone.

3.4 Effet de la dose d'ozone injectée sur le spectre d'une solution de KI

Une première tentative consiste à analyser les solutions de KI ozonées par spectrophotométrie UV-Vis. Les spectres obtenus ont montré que l'ozone absorbe dans une région assez large autour d'une valeur moyenne de 280 nm (Figure 3.4). Ceci est dû très probablement à l'oxydation de l'ion iodure en iode moléculaire (I_2). Un déplacement de bande vers les grandes longueurs d'onde dans la région 390-423 nm (Effet bathochrome) a été remarqué avec l'accroissement de la quantité du gaz d'ozone. L'augmentation de l'absorbance maximale avec la concentration d'ozone révèle une linéarité avec une pente plus abrupte dans le domaine de concentration en phase gazeuse 10—40 %. Une atténuation significative de cet effet est observée au-delà de

40% d'ozone injectée par barbotage d'air, cela indique un effet important de la phase gazeuse saturante (Figure 3.5).

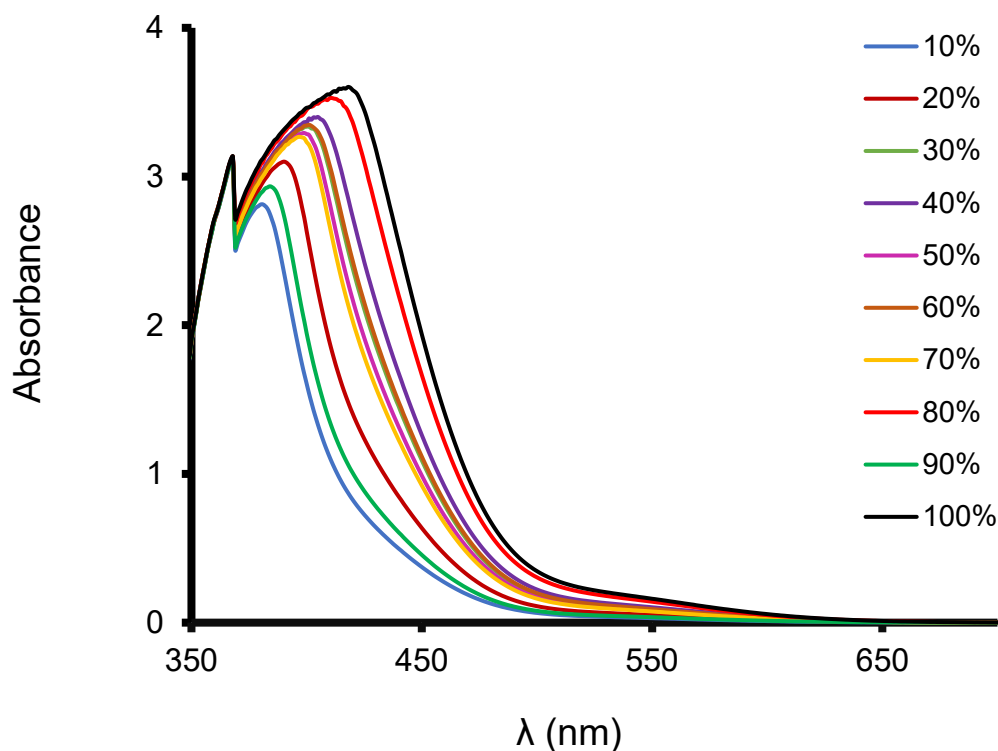


Figure 3. 4 Spectre UV-Vis de la solution KI après 5 min d'ozonation avec le même débit d'air à différentes concentrations d'ozone dans le barbotage d'air.

Ceci est probablement dû à la solubilité limitée de l'ozone dans l'eau qui génère un excès perdu sans dissolution. À l'approche d'un équilibre de saturation correspondant à la solubilité maximale de l'ozone dans l'eau, plus la dose d'ozone injecté est élevée, plus la perte est importante, et la bande tend à atteindre un palier. Cette absorbance croissante avec la dose d'ozone injectée est la preuve irréfutable de l'augmentation de la quantité d'ozone dissout dans la solution de KI. Une procédure complémentaire de titrage de l'ozone dissout comme la méthode iodométrique pourra rendre utile la mesure de l'absorbance d'une eau ou d'une solution de KI ozonées.

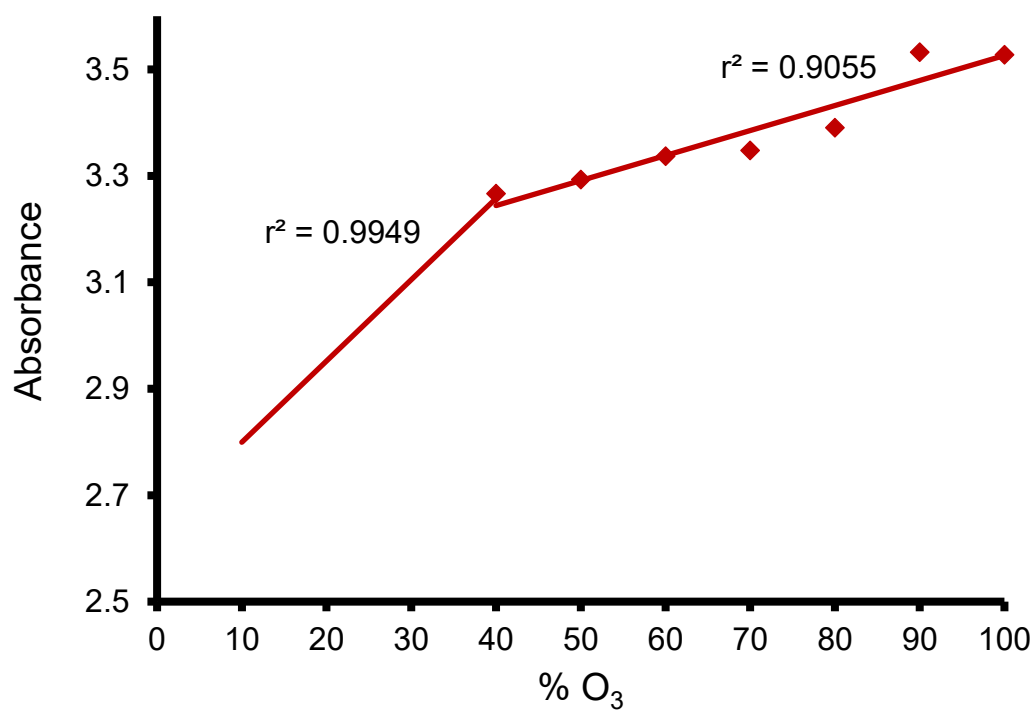


Figure 3. 5 Évolution de l'absorbance de la solution de KI avec la concentration d'ozone dans l'air injecté après 5 min d'ozonation.

3.5 Détermination de la concentration d'ozone par titrage iodométrique

Une procédure simple de dosage de l'ozone dans le milieu aqueux se base sur la réaction de l'ozone avec l'iodure de potassium (KI) et la dissolution de l'ozone dans l'eau distillée à pression et température ambiantes. La procédure expérimentale est décrite dans le chapitre II dédié à la partie expérimentale. Brièvement, 20 mL d'eau distillée introduits dans des tubes à centrifuger de 50 mL, ont été exposés à différents pourcentages d'ozone (0-100%) pendant 5 min. Ils sont ensuite analysés par spectrophotométrie UV-Vis dans une cellule de quartz 1 cm.). Pour la solution KI, 10 échantillons de la solution d'iodure de potassium (KI) ont été introduits dans diverses Erlenmeyers de 250 mL et ensuite ozoné chacun pendant cinq minutes avec le même

débit d'air à différentes quantités d'ozone (10% -100%). Chaque solution a été préparée avec 0,5 g de KI et 0,05 g d'iodate de potassium (KIO_3) dans 100 mL d'eau distillée et ensuite complétée à 200 mL avec de l'eau distillé puis acidifiée avec 10 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 1M. Après avoir ajouté 7,8 mL de thiosulfate de sodium 0,1 M ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (jaune foncé), la solution a été ozonée comme précédemment. Ensuite, 1 mL d'amidon a été ajouté et la solution devenue bleue a été titrée avec 0,1 M de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune pâle. Toutes les expériences ont été réalisées à une température ambiante.

L'analyse par iodométrie des solutions obtenues pour divers temps d'ozonation a permis de mettre en évidence une corrélation quasi-linéaire entre la teneur en ozone dissout et sa concentration dans l'air barboté (Figure 3.6). Cette corrélation est d'une grande utilité car elle permet de prévoir la quantité d'ozone disponible pour un processus d'ozonation sur la base de la graduation fixée sur le générateur d'ozone.

La méthode iodométrique est suffisamment précise, de sorte que la corrélation avec des mesures spectrophotométriques rapides est moins précises, ce qui pourrait être très utile. Ce genre de corrélation serait une forme de courbe de calibration, qui permettrait de convertir une absorbance en une concentration en ozone dissout (Figure 3.7).

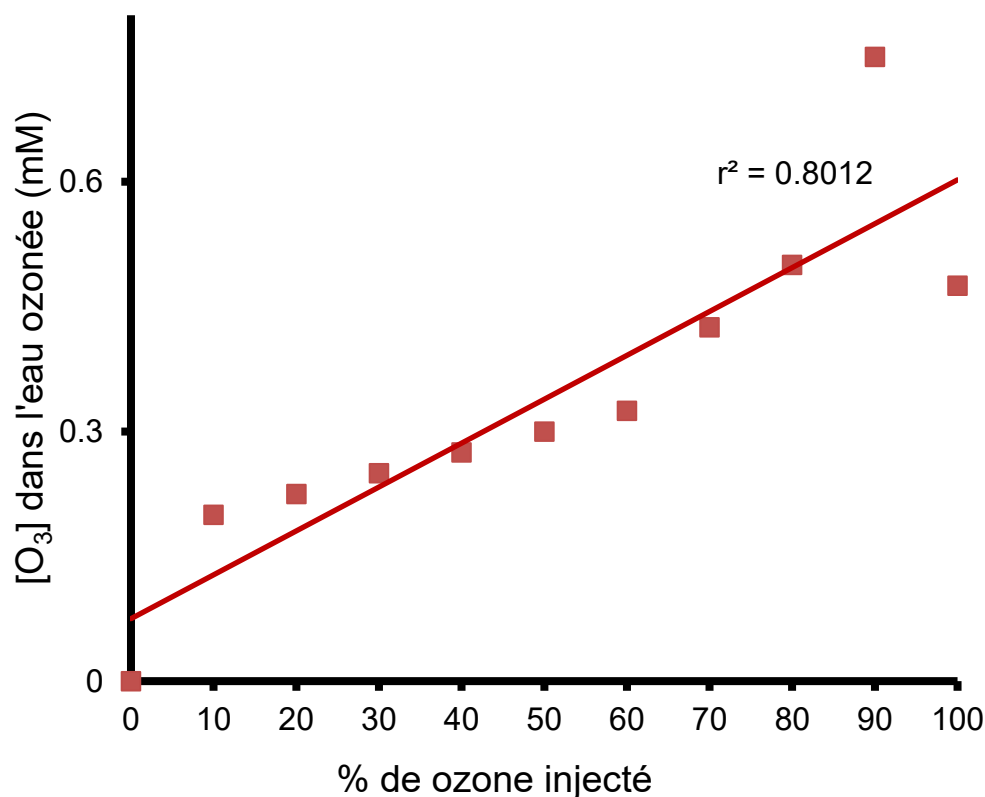


Figure 3. 6 Dépendance entre les concentrations d’ozone dissout dans l’eau déterminée par iodométrie et injecté avec l’air.

La tentative de tracer une courbe similaire pour la bande 306 nm a paradoxalement échoué, malgré la plus forte linéarité de l’absorbance a cette longueur d’onde avec la concentration en ozone telle qu’évaluée par iodométrie. Il en est résulté une grande dispersion de points probablement due à des variations continues de l’absorbance entre l’arrêt de l’ozonation et le début de l’analyse spectrophotométrique. Ce résultat pourrait mis à profit pour conclure que l’ozone étant très instable dans l’eau peut réagir à toute raie lumineuse ou toute impureté pouvant contaminer l’échantillon ozoné avant l’analyse spectrale. Ainsi donc, il serait recommandé de prendre des mesures drastiques pour analyser l’échantillon immédiatement son exposition à l’ozone, tout en le protégeant l’échantillon de gaz, de poussières et de la lumière

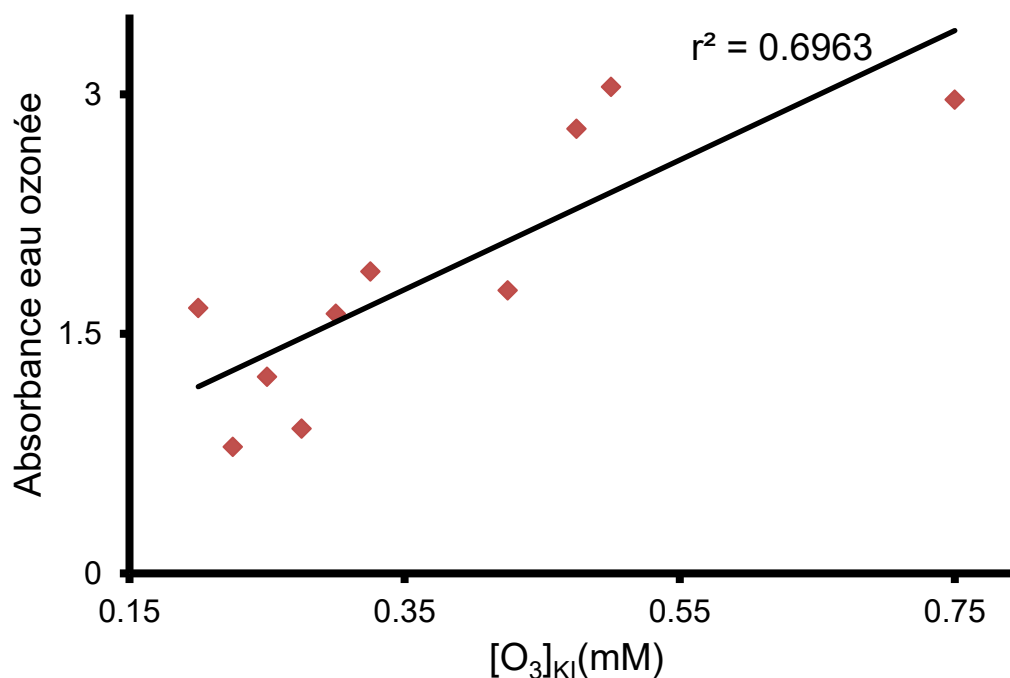


Figure 3. 7 Courbe d'étalonnage de l'absorbance à 220 nm en fonction de la concentration en ozone déterminée par iodométrie.

La détermination du coefficient d'extinction (Tableau 3.2 en annexe) a permis de convertir toutes les absorbances mesurées en concentration d'ozone dissout. Une autre corrélation intéressante est celle établie entre la concentration d'ozone déterminée par iodométrie dans l'eau et dans une solution de KI (Figure 3.8). Une linéarité de 0.81 et une pente de 0,14-0,15 est observée.

Cette corrélation est très importante, car elle permet de conclure que, au bout de 5 min de barbotage d'air à 50% en ozone, la quantité d'ozone dissout dans l'eau pure représente près de 14-15 % de celle de l'ozone dissout dans une solution de KI. Ce résultat démontre que l'addition de KI avant l'ozonation déplace l'équilibre vers une consommation accrue de l'ozone qui ne reflète pas la vraie solubilité de ce gaz dans

l'eau. Cette consommation d'ozone implique essentiellement l'oxydation de l'ion iodure en molécule biatomique d'iode.

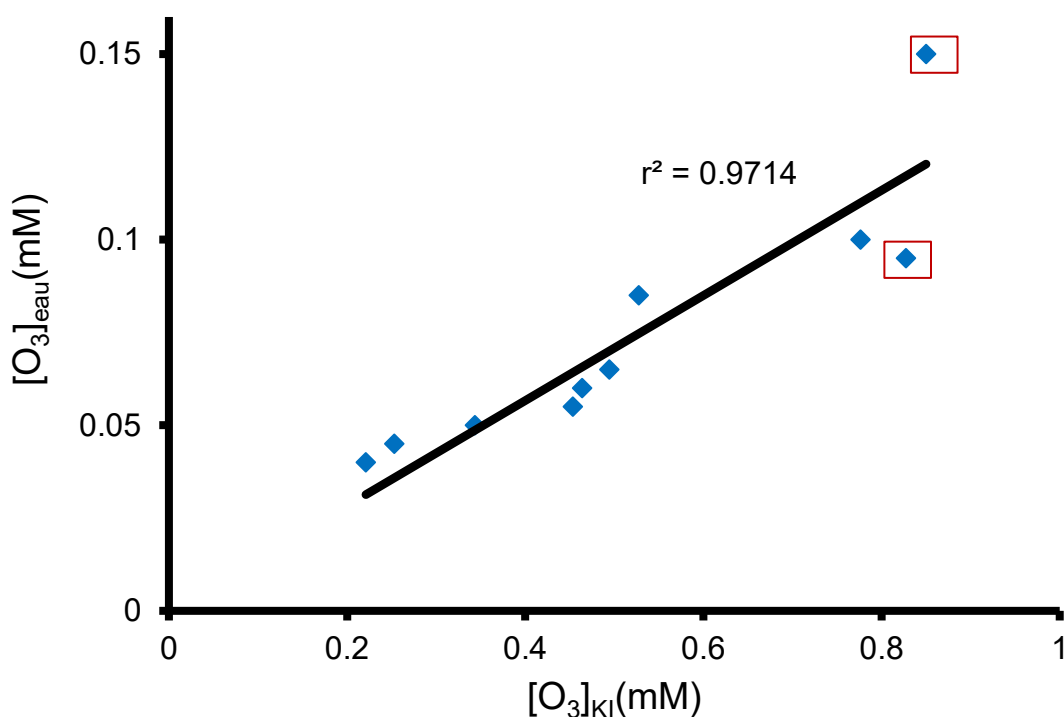


Figure 3. 8 Corrélation entre la concentration de $[O_3]$ avant et après addition de KI. durant 5 min avec une concentration de 50%.

3.6 Cinétique de la dissolution de l'ozone dans l'eau

Une tentative d'étude cinétique a permis d'étudier quelques aspects concernant le mécanisme de l'ozonation de l'eau distillée. La mesure de la concentration d'ozone au cours du temps a permis de déterminer la constante de vitesse de dissolution (k) pour différents modèles cinétiques (Tableau 3.1) et l'ordre (n) en tentant des essais successifs avec différentes valeurs de celui-ci [95]. L'équation cinétique de base est donnée par la relation exprimant le taux de variation dans le temps de l'ozone dans l'eau.

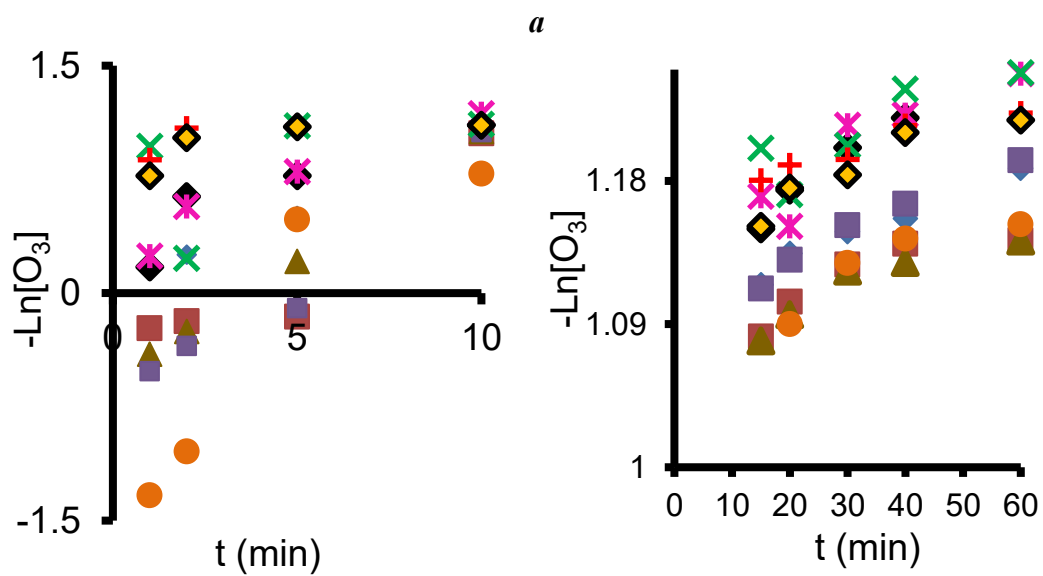
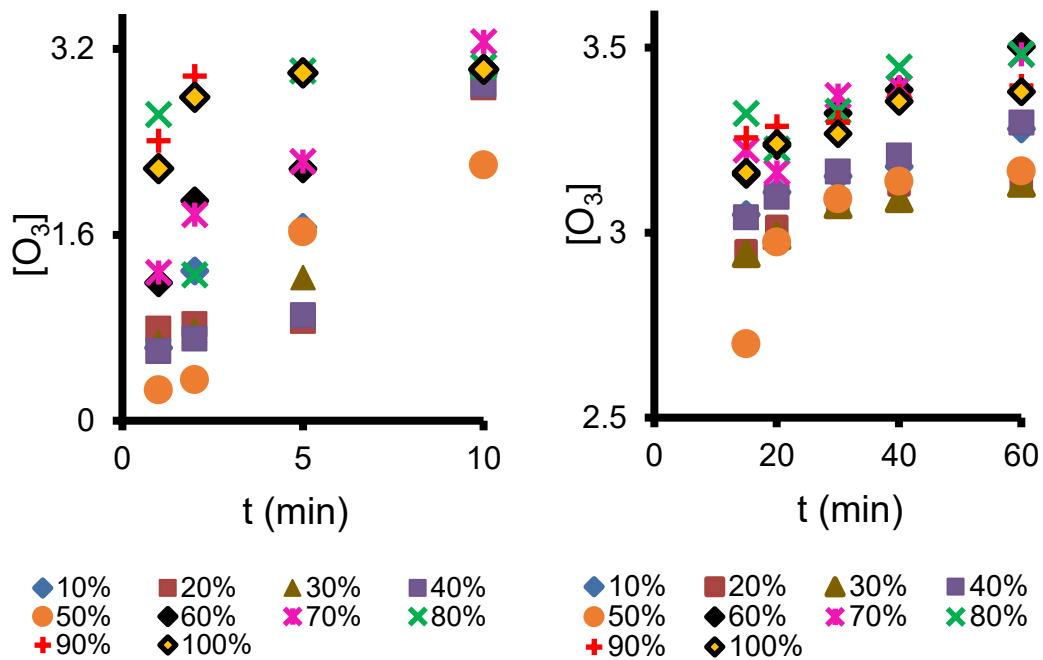
Tableau 3. 1 Modèles cinétiques utilisés pour la détermination de la constante et l'ordre.

Ordre de dissolution	Équation cinétique	Courbes linéarisées	Unité de k
0	$r_{O_3} = -\frac{d[O_3]}{dt} = k$	$[O_3]_0 - [O_3]_t = k \cdot t$	mol. L ⁻¹ . s ⁻¹
1	$r_{O_3} = -\frac{d[O_3]}{dt} = k \cdot [O_3]$	$\ln[O_3]_t - \ln[O_3]_0 = -k \cdot t$	s ⁻¹
2	$r_{O_3} = -\frac{d[O_3]}{dt} = k \cdot [O_3]^2$	$\frac{1}{[O_3]_t} - \frac{1}{[O_3]_0} = -k \cdot t$	L.mol ⁻¹ . s ⁻¹

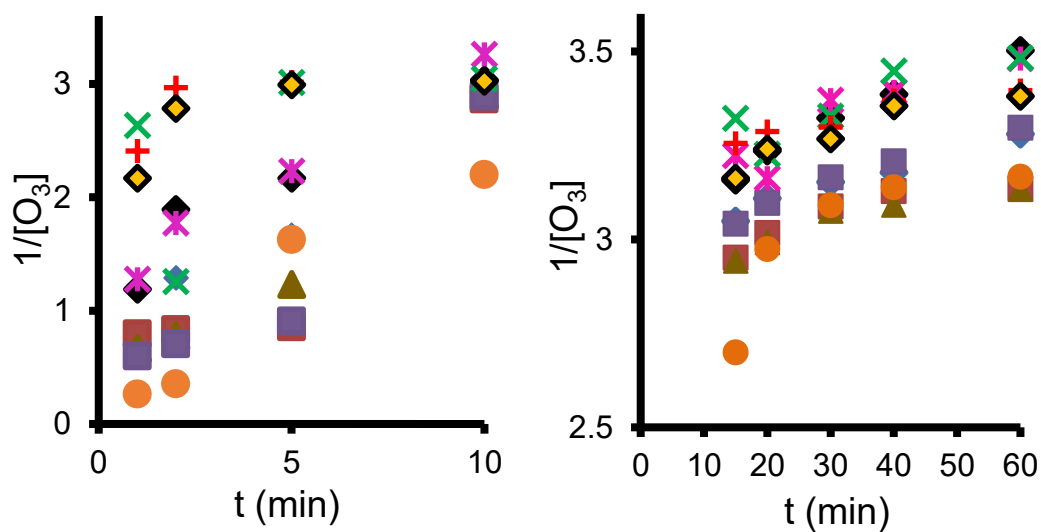
*Avec la concentration initiale d'ozone $[O_3]_0 = 0$, et $[O_3]_t$ la concentration de l'ozone à l'instant t.

Les trois courbes linéarisées ont été tracées sur la base de concentrations d'ozone obtenues par conversion des absorbances de l'ozone dans l'eau à deux longueurs d'onde (220 et 306 nm) en utilisant la courbe de calibration graphiques ci-dessous (Figure 3.9 et Figure 3.10). La linéarité est évaluée en fonction du facteur de corrélation R^2 de la régression linéaire le plus proche de l'unité parmi les valeurs récapitulées dans les Tableau 3.2-3.7. Pour plus de rigueur et sachant que la cinétique de dissolution pourrait évoluer dans le temps, les différents modèles ont été utilisés pour plusieurs intervalles de temps incluant les instants initiaux.

Statistiquement, le plus grand nombre de valeurs de r^2 supérieures à 0,95 a été obtenue pour le modèle de cinétique de dissolution de l'ordre ZERO tel qu'évalué sur la base de concentrations d'ozone dissout obtenues à partir de l'absorbance à 220 et 306 nm (Valeurs en gras dans les tableaux 3.2 et 3.5). Ce nombre de valeurs de r^2 supérieures 0,95 semble légèrement plus élevé pour la bande 306 nm, probablement à cause de sa plus forte intensité de l'absorbance en fonction de la concentration (Figure 3.3) comparée à celle de la bande 220 nm (Figure 3.2).

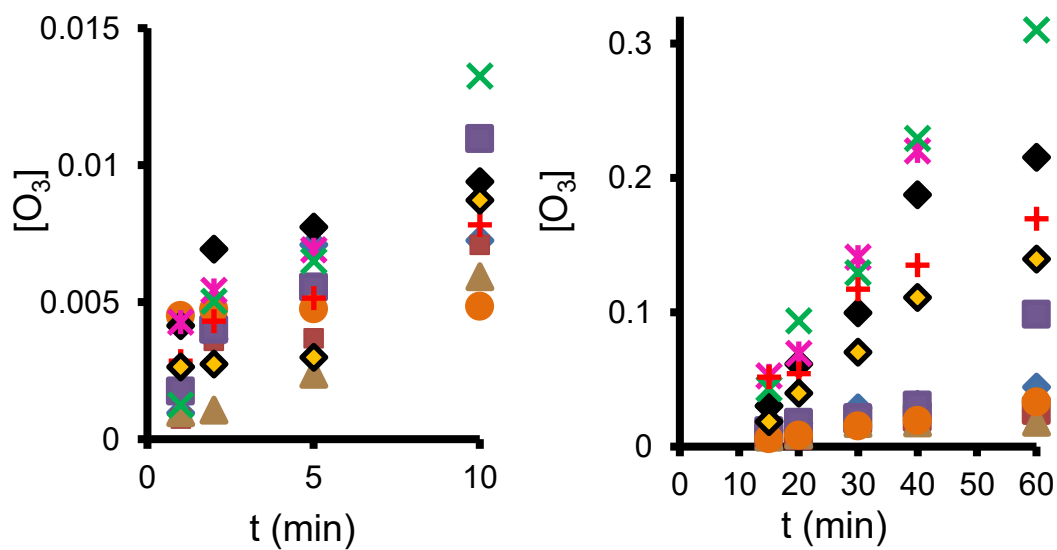


b



c

Figure 3.9 Cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau selon l'absorbance à 220 nm convertie en concentration pour les différents modèles cinétiques : *a*- Ordre 0, *b*- Ordre 1, *c*- Ordre 2.



a

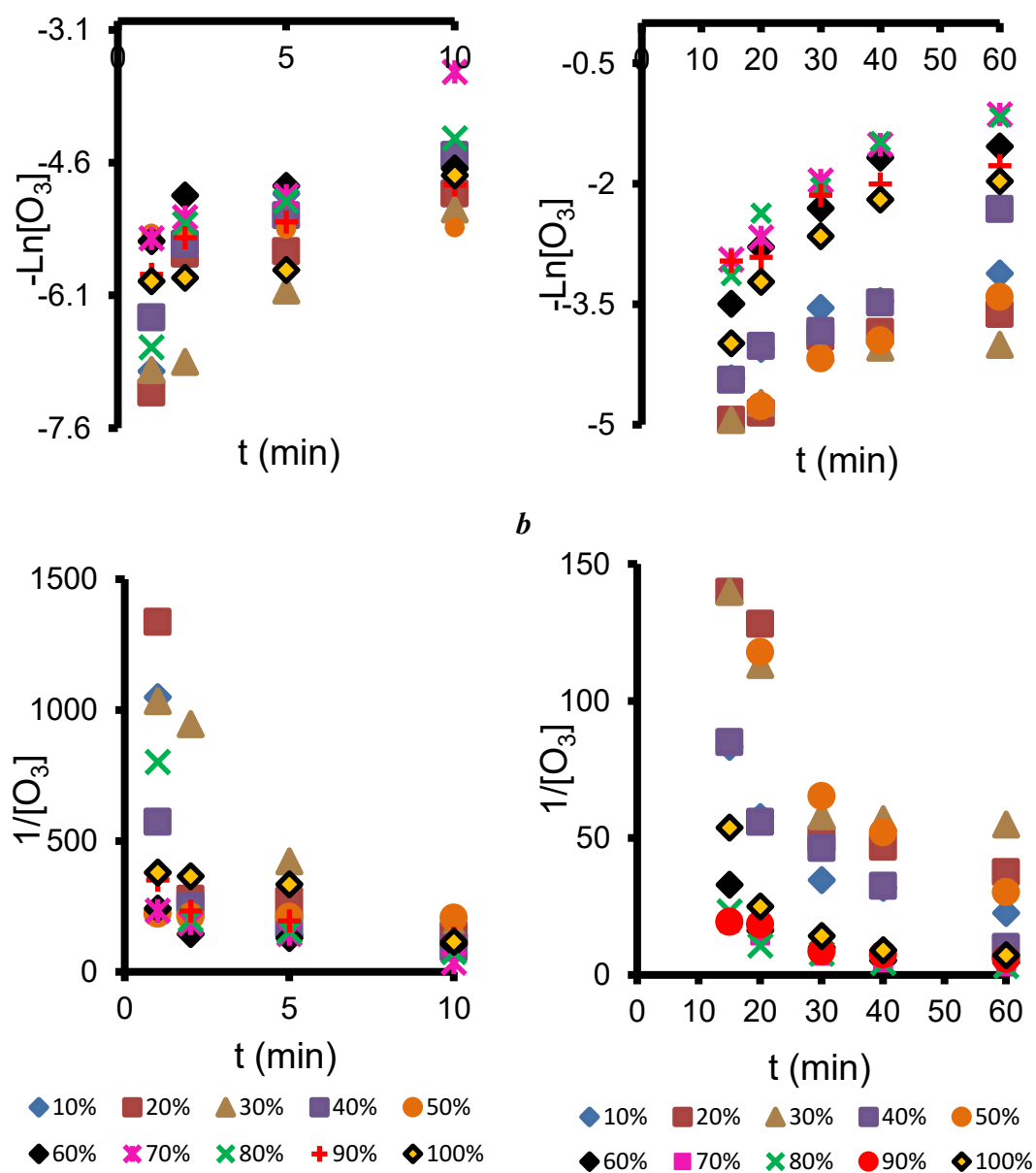


Figure 3. 10 Cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau selon l'absorbance à 306 nm convertie en concentration pour les différents modèles cinétiques : *a*- Ordre 0, *b*- Ordre 1, *c*- Ordre 2.

Ainsi, il apparaît clairement que la cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau ne dépend pas de sa concentration. Ceci serait dû d’un processus hétérogène se déroulant à l’interface de bulles avec le liquide-hôte. La grande dispersion des points dans les tentatives d’élaboration des courbes de calibration pourrait due de la réaction de l’eau avec l’eau générant des radicaux libres $\cdot\text{OH}$ [93]. Ceci est encore plus valable pour les temps d’ozonation élevés.

Tableau 3. 2 Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 220 nm convertie en concentration pour l’ordre Zéro.

Temps (min)	[1-10]		[15-60]	
	K (mmol· L ⁻¹ min ⁻¹)	r²	K (mmol· L ⁻¹ min ⁻¹)	r²
10%	0.242	0.9658	0.005	0.9688
20%	0.232	0.8407	0.004	0.7741
30%	0.251	0.9617	0.004	0.8593
40%	0.255	0.9031	0.005	0.9717
50%	0.227	0.9175	0.008	0.6439
60%	0.182	0.9216	0.007	0.9704
70%	0.207	0.9804	0.006	0.8333
80%	0.1205	0.3352	0.005	0.7549
90%	0.046	0.4016	0.003	0.9205
100%	0.073	0.5517	0.005	0.8736

Tableau 3. 3 Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 220 nm convertie en concentration pour l’ordre 1.

Temps (min)	[1-10]		[15-60]	
	K (min ⁻¹)	r²	K (min ⁻¹)	r²
10%	-0.15	0.8608	-0.0015	0.9661
20%	-0.14	0.8571	-0.0013	0.7696
30%	-0.45	0.42116	-0.002	0.9626
40%	-0.17	0.9613	-0.0017	0.9675
50%	-0.244	0.8383	-0.0029	0.6276
60%	-0.09	0.8317	-0.0022	0.9647
70%	-0.09	0.9319	-0.002	0.8242
80%	-0.07	0.4575	-0.0015	0.7678
90%	-0.017	0.3948	-0.0009	0.9193
100%	-0.03	0.5261	-0.0014	0.8692

Tableau 3. 4 Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 220 nm convertie en concentration pour l’ordre 2.

Temps (min)	[1-10]		[15-60]	
	K (L.mmol ⁻¹ .min ⁻¹)	r²	K (L.mmol ⁻¹ .min ⁻¹)	r²
10%	-392.29	0.6687	-1.69	0.963
20%	-359.98	0.8758	-1.489	0.7691
30%	-82753.06	0.335	-2.02	0.9599
40%	-508.02	0.9913	-1.94	0.9629
50%	-1285.20	0.7677	-3.51	0.6114
60%	-162.88	0.7136	-2.37	0.9588
70%	-164.09	0.8418	-2.15	0.815
80%	-128.98	0.4151	-1.59	0.7405
90%	-22.7	0.3883	-1.02	0.9182
100%	-38.43	0.5017	-1.54	0.8646

Tableau 3. 5 Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm convertie en concentration pour l’ordre Zéro.

Temps (min)	[1-10]		[15-60]	
	K (mmol · L ⁻¹ min ⁻¹)	r²	K (mmol · L ⁻¹ min ⁻¹)	r²
10%	0.0006	0.7138	0.0007	0.9623
20%	0.0006	0.8642	0.0004	0.8635
30%	0.0006	0.9725	0.0002	0.6949
40%	0.0009	0.9744	0.0018	0.8647
50%	2.7406E-05	0.6178	0.0006	0.9943
60%	0.0005	0.7943	0.0043	0.9202
70%	0.0026	0.8882	0.0062	0.991
80%	0.0012	0.9491	0.006	0.9729
90%	0.0005	0.9631	0.003	0.9185
100%	0.0007	0.8602	0.003	0.9558

Tableau 3. 6 Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm convertie en concentration pour l’ordre 1.

Temps (min)	[1-10]		[15-60]	
	K (min ⁻¹)	r ²	K (min ⁻¹)	r ²
10%	-0.18	0.5822	-0.027	0.8754
20%	-0.19	0.637	-0.03	0.7834
30%	-0.39	0.5051	-0.027	0.8649
40%	-0.17	0.8655	-0.044	0.9699
50%	-0.006	0.6099	-0.037	0.9424
60%	-0.07	0.692	-0.04	0.833
70%	-0.20	0.9536	-0.04	0.9234
80%	-0.18	0.5543	-0.04	0.8648
90%	-0.26	0.4959	-0.028	0.8883
100%	-0.13	0.8883	-0.04	0.8262

Tableau 3. 7 Constante de cinétique de dissolution de l’ozone dans l’eau selon l’absorbance à 306 nm convertie en concentration pour l’ordre 2.

Temps (min)	[1-10]		[15-60]	
	K (mmol· L ⁻¹ min ⁻¹)	r ²	K (mmol· L ⁻¹ min ⁻¹)	r ²
10%	-1205.36	0.4429	-19.9	0.7515
20%	-1526.33	0.4371	-39.16	0.7187
30%	-67988.49	0.3422	-43.26	0.8499
40%	-696.43	0.6409	-24.77	0.9075
50%	-20.86	0.6021	-47.8	0.7905
60%	-189.86	0.5935	-8.79	0.6505
70%	-345.66	0.9785	-5.68	0.797
80%	-754.76	0.2981	-6.053	0.6473
90%	-4120.44	0.358	-5.25	0.7635
100%	-493.32	0.9233	-14.14	0.6171

CHAPITRE IV

CLAY-CATALYZED OZONATION OF LACTIC ACID LOADED-HYDROTALCITE IN AQUEOUS MEDIA-TO BETTER UNDERSTAND THE ROLE OF THE SURFACE INTERACTIONS.

CONTRIBUTION DES AUTEURS

Auteur principale : Mme Meriem ELBAKTAOUI : Maitrise en chimie à Université de Québec à Montréal.

Elle a réalisé la recherche bibliographique, la préparation des protocoles, l'élaboration d'une technique HPLC-UV spécifique à l'acide lactique, la réalisation de toutes les expériences pour l'étude de la dissolution de l'ozone et de l'ozonation catalytique de l'acide lactique, l'étude de la performances catalytiques des argiles anionique et cationique et leur corrélation par les propriétés structurales et de surface, le traitement des données d'analyse et des résultats expérimentaux, la rédaction et la finalisation du manuscrit et de l'article soumis pour publication.

Directeur de projet: Pr Abdelkrim AZZOUZ : Professeur associé à Université de Québec à Montréal.

Il a proposé le concept de départ, supervisé toutes les activités scientifiques, fournissant des instructions de base concernant toutes les différentes parties de cette recherche et les explications sur les résultats obtenus. Il a en outre, corrigé le manuscrit et a participé à la rédaction et à la finalisation de l'article soumis pour publication.

Co-auteur 1: Nour El Houda HADJ-ABDELKADER : Professeur assistant à LEMFN, Department of Materials Engineering, University of Science and Technology, Oran, Algeria.

Elle a participé à la réalisation des expériences préliminaires.

Co-auteur 2: Mme Amina BENGHAFFOUR : Doctorat en chimie à Université de Québec à Montréal.

Elle a participé à la revérification des expériences préliminaires et aux mesures de certaines propriétés de surface des matériaux argileux.

Co-auteur 3: Mme Alisa-Vasilica ARUS : Professeur assistant à Catalysis and Microporous Materials Laboratory, Vasile-Alecsandri University of Bacau, Romania.

Elle a participé à la préparation des matériaux.

Co-auteur 4: Mme Nadia BENNANI-DAOUADJI : B. Sc à Université de Québec à Montréal.

Elle a participé à la vérification des expériences préliminaires et au lancement de l'utilisation du nouvel ozonateur.

Co-auteur 5: Fatiha BELKHADEM : Professeur de chimie à LEMFN, Department of Materials Engineering, University of Science and Technology, Oran, Algeria.

Elle a Participé à la conception d'expériences préliminaires sur les argiles anioniques.

Co-auteur 6 : René ROY : Professeur de chimie à Université de Québec à Montréal.

Il a Contribué aux analyses HPLC-UV et à la lecture du manuscrit final.

ABSTRACT

Hydrotalcite and smectite-type clay mineral showed catalytic activity in the ozonation of lactic acid (LA) in aqueous media simulating extracts from milk fermentation broth. The effect of LA physico-chemical behavior and interaction with the catalyst surface were investigated through measurements of the pH, Zeta potential and particle size. Clay minerals exhibited different catalytic activity according to their structure. LA-LA, LA-Catalyst and catalyst-catalyst interactions were found to be strongly depending on the pH of the reaction mixture, which in turn, appears to determine LA molecule dissociation and clay dispersion in the aqueous media. The catalytic activity of bentonite, montmorillonite and acid-activated counterparts appears to involve hydrophobic adsorption of non-dissociated LA molecules and at most LAB and electrostatic interactions on silica-rich areas on the solid surface in higher pH than the pKa, but proton capture from LA dissociation at higher pH. Hydrotalcite promotes rather hydrophobic interaction and anion-exchange. Hydrotalcite-smectite mixture was found to enhance clay dispersion and catalytic activity. This research allowed demonstrating that natural anionic and cation clay minerals can act as both adsorbent for LA extract from fermentation broths and catalyst for adsorbent regeneration. This has a great positive impact in reducing the seed production costs in dairy technologies.

Keywords: Lactic acid; Ozonation; Clay catalyst; Hydrotalcite; Montmorillonite.

4.1 Introduction

Lactic acid (LA) or 2-hydroxypropionic acid has a chemical formula ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{CO}_2\text{H}$) can be produced by lactose fermentation or chemical synthesis and has a wide variety of industrial and biotechnological applications [1, 2]. This compound was first isolated 1780 from fermented milk [29]. LA is usually obtained through bacterial fermentation, and can be found in foods such as acidic milk derivatives, sauerkraut, yogurt, buttermilk, sourdough bread, in pharmaceutical and cosmetic products and formulations [30], e.g. in treating skin xerosis [31]. LA is a major metabolic intermediate that originates from anaerobic or O_2 -poor broth fermentation in human body and most living organisms [1, 29].

LA is a major metabolic intermediate that originates from anaerobic or O_2 -poor broth fermentation in human body and most living organisms [32] and has a negative impact, resulting in acidosis and decalcification [30]. LA also exerts a negative effect on the growth of Lactic Acid Bacteria (LAB) thereby affecting the efficiency of industrial production of acidic dairy products. LAB plays a key-role in milk fermentation and clotting leading to acidic dairy product formation. LAB can be used as a probiotic ingredient in various products [40, 41]. LAB growth can be achieved in a pH range of 3.5 to 10.0 and at a temperature of 5 to 45 °C [5], but can be inhibited by the progressive formation of LA [4, 5]. Inhibition of LA is reflected by an increase in the concentrations of lactate anion and non-dissociated LA. Non-dissociated LA can easily diffuse through the membrane and dissociate inside the cell leading to an increase in transmembrane acidity, thereby modifying the energy used for cell growth and to maintain the internal pH [45-47].

Maintaining the lactate concentration in LAB fermentation broth and removal of non-dissociated LA can allow overcoming this drawback caused by excessive LA [6]. The

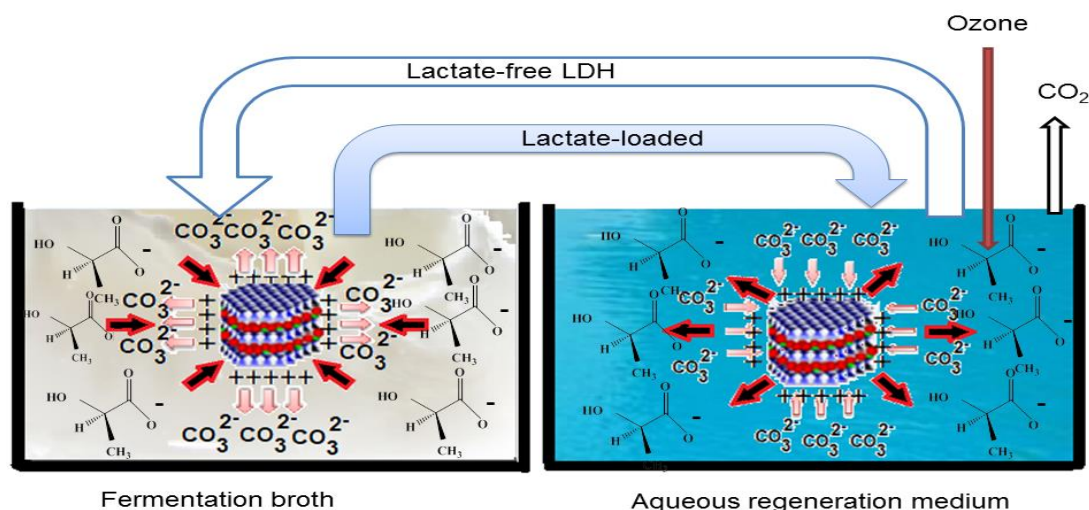
issue of LA negative impact on milk clotting has stimulated scientists for developing methods for LA removal from the fermentation broth. An ample literature has reported a wide variety of successful attempts for addressing this issue [7-20]. A quick overview of this literature indicates that various removal techniques have been applied in diverse technologies involving lactic acid. Some of these techniques involve chemicals and chemical LA conversion into a biodegradable polymer [48, 49]. LA concentration control during milk fermentation remains a challenge difficult to be addressed that requires processes and materials that do not negatively impact the very fermentation process. In this regard, except LA adsorption through anion-exchange [96, 97], this challenge has been barely tackled so far. That is why the present research was undertaken.

To overcome the negative impact of LA on LAB growth and to improve the production of both probiotics, a judicious route resides in its progressive removal from the fermentation broth. LA adsorption on solid materials is an interesting alternative for this purpose. The use of polymeric anion-exchangers like conventional resins is limited by food safety constraints since such adsorbents can react or release reactive species. A more judicious alternative would involve the use of harmless and non-reactive inorganic adsorbents such as layered double hydroxides (LDH). The latter display sufficient chemical stability within the pH range of fermentation broths. A more available and low cost LDH-like material is undoubtedly natural hydrotalcite (Ht), with chemical formula $\text{Mg}^{2+}_{1-x} \text{Al}^{3+}_x (\text{OH})_2 (\text{A}^{n-})_{x/n} \cdot m\text{H}_2\text{O}$ (A being the charge-compensating anion, usually carbonate) [50]. This anionic clay mineral is widely used as anion-exchangers, catalysts and adsorbents [51]. It exhibits some physicochemical properties like those of their cationic counterparts such as the interlayer occurrence of anions and water molecules. The positive charge of LDH surface is compensated by that of the anion [12, 52].

The limited anion exchange capacity (AEC) of Ht imposes its periodical regeneration when used as anion-exchanger for lactate capture in milk fermentation broth. A judicious strategy resides in Ht exposure to ozonation in a separate aqueous media (Scheme 4.1).

Once, extracted from the fermentation broth, LA-loaded LDH are expected to release LA in pure water. This phenomenon should be enhanced by anion exchange induced by the rise of carbonates anions upon ozone exposure even at the early steps of the oxidation process. The catalytic activity of Ht in ozonation processes, if any, has seldom been investigated [98, 99] unlike that of its cationic counterparts such bentonite, montmorillonite and acid activated derivatives [24, 89, 100-104]. These smectite-like materials are known to be low cost, non-toxic and widely available materials that have already been employed in some food, drug, and cosmetic product compositions. Such materials can be used as co-catalysts and are expected to produce significant improvement in the ozonation of Ht-hosted LA for improving the ozonation efficiency. To the best of our knowledge, such an approach has never been tackled so far.

Assessment of the catalytic activity of various porous materials (catalysts) that allow decomposing LA and other acids, if any, would be an interesting route to be explored. The main requirement for selecting suitable adsorbents and/or catalysts resides in fulfilling food technology constraints by exhibiting high chemical stability and total lack of toxicity.



Scheme 4. 1 LA removal from fermentation broth and hydrotalcite regeneration by ozonation.

LA ozonation has barely been investigated so far, and the use of clay minerals as catalysts has never been reported so far in the available literature. In the absence of solid catalysts, LA ozonation was found to be improved by addition of NaCl [98] and to obey zero-order kinetics [99]. Changes in process kinetics are expected in ozonation processes catalyzed by solid surfaces, as already reported for other organic substrates in the presence of clay catalyst [24, 89, 100-104]. The role of LA-loaded hydrotalcite as catalyst alone or accompanied by co-catalysts based on cationic clay minerals in the kinetics of the ozonation process will be examined in this research. The use of cationic clay minerals as co-catalysts in the presence of LA-loaded LDH will also be investigated for detecting a possible synergy.

Na⁺-Montmorillonite (NaMt) is a purified form of bentonite after ion exchange with NaCl solution and elimination of dense silica phases and other volcanic ashes. NaMt is one the most studied and used clay mineral [57, 58]. The clay surface bears permanent

negative charge on the aluminate group, temporary positive-negative charge induced on silanols by pH changes around the pK_a value and lattice oxygen atom that act as Lewis base. These features induce acid-base properties, hydrophilic character on the exchangeable sites, hydrophobic character on silica-rich areas devoid of silanols and higher dispersivity in water as compared to LDH. Their Lewis acid-base interactions are probably the most important phenomena occurring in aqueous media [25]. Their strength may compete with that of acid-base, electrostatic and organophilic-hydrophilic interactions that are strongly dependent on the pH of the aqueous media.

Each of all these interactions is expected to contribute preponderantly to LA adsorption on the clay surface according to the nature and modification procedure of the clay surface [60, 62-64]. Such interactions are expected to greatly contribute to ozonation in the presence of solid surfaces, as previously reported [89, 100-103, 105]. Even though LA was already found to adsorb on LDH [96], the interactions involved still remain to be elucidated.

The glaring lack in data related to LA interactions with clay catalysts in ozonation processes was the reason for undertaking this research. A key-factor that can modify the preponderance of a given interaction is undoubtedly the acid-activation, which produces decays in Al content, cation exchange capacity and amount of permanent negative charges [101, 106, 107]. This is expected to markedly modify the catalytic behavior of the clay surface. Deeper in this regard will be achieved by measurements of the Zeta potential and clay particle size.

4.2 Experimental

4.2.1 Solution preparation and calibration

Lactic acid (L (+) –LA, 88 % purity 88%, molecular weight 90.08 g.mol⁻¹) was supplied by Sigma Aldrich. LA solutions with various concentrations (1, 2.5, 3, 4 and 5 g. L⁻¹) were prepared with nanopure water. Calibration curves were obtained by both UV-Vis spectrophotometry and high-performance liquid chromatography coupled to UV detection (HPLC-UV). This was achieved by plotting the optical density (absorbance) of LA UV-Vis bands and LA peak area obtained by HPLC-UV versus LA concentration (Figure 4.S3, Figure 4.S4). LA solution, regarded as aqueous host matrices for LA release from LDH, will be used as an ozonation medium.

1..1 Catalysts preparation and characterization

Na⁺-exchanged montmorillonite (NaMt) was prepared through purification of a crude bentonite (Sigma-Aldrich USA). This process allowed removed volcanic ashes and dense silica phases, resulting in a smectite-rich material with high crystallinity (Figure 4. S1) and surface charge density, as this will be demonstrated later through Zeta potential measurements. For this purpose, 200 g of crude bentonite were dispersed in 2 L of distilled water, and then 70 g of NaCl were added. The resulting suspension was vigorously stirred at 80 °C for 7 h. After cooling overnight, the suspension was prone to centrifugation at 12000 rpm. The supernatant was eliminated, being replaced by similar amount of distilled water, and the clay suspension was then stirred for 4 hours. This washing step was repeated till total disappearance of chloride as monitored by alternate AgNO₃ tests. The resulting paste of NaMt was then dried overnight at 30-40 °C [89]. CaMt was prepared by introducing 3 g of NaMt and 1g of CaCl₂ dissolved in 100 mL of distilled water, and the suspension was stirred for 6 hours at 80 °C then settled for a day and further filtered and repeatedly washed, dialyzed, and dried as for NaMt. The same procedure was used for the preparation of KMt and MgMt, using the

corresponding metal salts. These cation-exchanged montmorillonites also showed high crystallinity as illustrated by sharp XRD lines but different interlayer basal spacing due to the different size of the incorporated cations (Figure 4. S2). Additional clay catalysts denoted as HMt were previously prepared by acid-activation of the same raw bentonite for different contact times (1, 4, 8, 15 and 24 hours) according to procedure fully described elsewhere [90]. The corresponding HMt-1, HMt-4, HMt-8, HMt-15, and HMt-24 samples are characterized by a replacement by the exchangeable cations by protons and by different Si/Al ratios.

For comparison, the starting crude bentonite and commercial hydrotalcite (Fluka) were also investigated herein. Hydrotalcite, denoted as Ht, was used to simulate lactate extraction from dairy fermentation broth by LDH [22, 23] with consecutive regeneration in pure water. All clay minerals were characterized by X-ray diffraction (D8 Advance Bruker, $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1.5418\text{\AA}$), at a 40 kV voltage. The data was treated by a Bragg Brentano Geometry processing system. Additional measurements of the pH, Zeta potential and particle size in pure water and LA solution were carried out for investigating catalyst interaction with water, lactic acid molecules and other catalyst particles. For this purpose, the particle size was assessed by means of a Malvern-Zetasizer S90 Nanoseries equipment and a 90-Plus particle sizer software, version 4.20. The Zeta potential was estimated with a Brookhaven device (Zeta-Plus/BI-PALS). Both analyses were achieved at room temperature (RT) on 40 mg clay powder previously dispersed in 20 mL of water or LA solution.

4.2.3 Adsorption and ozonation experiments

Prior to ozonation, the clay minerals were impregnated by mixing 4 mg of cationic clay minerals with 20 mL LA aqueous solution with a concentration of 2.5 g. L^{-1} (27,75 mM) under manual stirring for 3 min. Given that LDH are well known to be hydrophobic, and their delamination is difficult to be achieved, Ht was impregnated

according to same procedure but with 2 h stirring. The sample was then centrifuged and filtered with a 0.22 μm filter.

Attempts of non-catalytic ozonation were carried out using various 20 mL LA aliquots of 2.5g. L⁻¹ (27,75 mM) concentration in nanopure water at intrinsic pH in a cylindrical PVC vessel (28 mm×115 mm) at room temperature (RT). These samples were exposed during different times ranging from 20 s to 60 minutes in the absence of catalysts to a constant 600 mg h⁻¹ throughput of ozone bubbling produced from air by an A2Z-AQUA-6 portable ozone generator (A2Z Ozone Inc., USA). A similar procedure was used for catalytic ozonation by adding at the same aliquots a constant 4 mg of dry clay catalysts such as hydrotalcite as a probe LDH, bentonite, NaMt, KMt, CaMt, MgMt and various HMt) under manual stirring for 3 min. Here also, the hydrophobic character and hard delamination of Ht imposed a prolonged stirring of 2h before ozonation. After ozonation, the reaction mixtures were centrifuged, then filtered through a 0.22 μm filter and further analyzed.

4.2.4 Reaction mixture analysis

The final reaction mixtures were analyzed by two complementary methods. UV-Vis spectrophotometry was used for qualitative evaluation of the reaction evolution in time and detection of the chemical functions produced by ozonation. This was achieved with an Agilent-Cary 60 instrument (Agilent Technologies, USA) and 1 cm quartz in the wavelength range 190-800 nm at RT. The data were processed by an accessory computer.

Measurements through high performance liquid chromatography coupled to a UV-detector (HPLC-UV) allowed accurately assessing the evolution in time of the product distribution. For this purpose, an Alliance instrument and an Agilent Eclipse Plus C18 column (3.5 μm , 4.6 mm × 250 mm) were used. The device was coupled with a UV

detector (WATERS-2487 dual λ absorbance). The flow rate of the mobile phase (0,06 mL trifluoroacetic acid, TFA per 1 liter nanopure water) was set at a constant $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ value (isocratic mod) with a $3\mu\text{L}$ injected volume. The data were treated by a STAR acquisition software.

4.2.5 HPLC-ToF-MS identification of the ozonation derivatives

The samples were diluted 1:1 with HPLC grade water, and $0.5\mu\text{L}$ aliquots were analyzed by reversed phase liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (LC-ToF-MS). This was achieved by means of a 1260 Series LC System coupled to a 6224 TOF mass spectrometer, both from Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), and a Gemini-NX C18 column (50 mm x 2.00 mm, $3\mu\text{m}$ particle size, Phenomenex, Torrance, CA, USA) maintained at 30°C . The compounds were separated using 0.1% formic acid in both ultrapure water and methanol (solvent A and B, respectively) with a flow rate of $0.4\text{ mL}/\text{min}$ under the following gradient: 0-2.0 min, 0% B; 2.0-9.5 min, 0-40% B; 9.5-10 min, 40% B; 10.0-10.5 min, 40-0% B and 10.5-15 min, 0%B. The mass spectrometer was operated in negative electrospray mode with a dual spray configuration allowing internal calibration and high mass assessment accuracy. Mass spectra were acquired from m/z 40 to 1400 with an acquisition cycle of 0.89 s and a resolution greater than 10000. This required a setting of the electrospray voltage at 3.5 kV, fragmentor at 120 V and source temperature at 300°C .

4.3 Results and discussion

4.3.1 UV-Vis calibration of LA concentration and band identification

LA UV-Vis spectra performed for different concentrations (Figure 4. S3-a). This allowed plotting calibration curves for all the three absorption bands (Figure 4. S3-b). The most intense band (195-200 nm) corresponds to the $\pi\rightarrow\pi^*$ transition of the water

and alcohol. The lower intensity 210-215 nm band appears as a shoulder, and corresponds to $n \rightarrow \sigma^*$ transition, a specific feature of the carbonyl group in aqueous solution. A barely detectable band was observed at 265-290 nm and was assigned to a $n \rightarrow \pi^*$ transition of the carboxyl of LA. These three UV-Vis bands showed high linearity with a coefficient correlation close to unity (Figure 4. S3-b).

The plots of the calibration curves allowed determining the molar absorption coefficients for LA for the three bands as being of ca. 178, 79.3 and 42.2, respectively (Table 4. S1). It is worth mentioning that the strong absorption of LA at 195-200 nm with a molar extinction coefficient of 178 $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ is a common feature of early hydroxylated derivatives in the ozonation of many organic substrates [28, 89, 100-104]. Subsequently, this band cannot be used for assessing LA degradation yield, but rather for a qualitative evaluation of the ozonation process advancement.

4.3.2 HPLC- UV calibration of LA concentration

Additional HPLC-UV measurements using another UV-Vis band (210 nm) allowed overcoming this drawback. This band can be used for detecting not only LA but also most of its oxidized derivatives. LA peaks were perfectly symmetrical and well separated in all the aqueous solutions analyzed, appearing at a 3.53 min retention time with a $\pm 1\%$ standard deviation (Figure 4. S4-a). The total absence of other HPLC peaks clearly demonstrates the high purity of the starting LA aqueous solution. Highly linear increasing peak area versus increasing LA concentration gave a calibration slope of 0.0366 with a correlation coefficient of 0.9986. This result is of great importance, because it clearly demonstrates the possibility to unequivocally identify and quantify LA amount within a reasonable concentration range. The HPLC procedure turned out to be reproducible with a higher sensitivity and shorter elution time as compared to other methods [108, 109].

4.3.3 Catalyst effect on LA spectrum before ozonation

The UV-Vis spectrum of LA was found to undergo various changes according the clay material added in the absence of ozone (Figure 4.1). This provides clear evidence of the occurrence of specific LA-catalyst interactions. The most pronounced changes were noticed with NaMt and Ht, presumably due to the almost negligible acid character of NaMt and appreciable basicity of Ht.

This might promote LA adsorption via acid-base interaction and even cation exchange on NaMt and anion-exchange on Ht. This requires LA dissociation into lactate, inducing carbonate anion release in the solution that may modify the pH of the liquid media and Lactate anion interaction with the clay surface [96].

It is worth mentioning that an intensity increase was observed in the entire UV-Vis wavelength range investigated with Ht, NaMt, bentonite and HMt-1. This intensity increase with cationic clay materials must be due to Na^+ cation exchange between the clay surface and LA molecules enhancing LA dissociation and possible rise of aqueous sodium lactate. This phenomenon can be explained by the higher Na^+ content of NaMt, bentonite and HMt-1 as compared to the more acid-activated bentonites samples (HMt-4 to HMt-24). The latter are supposed to have less exchangeable sites as a result of progressive dealumination with prolonged acid-activation time and less Na^+ due to a pronounced ion-exchange by protons [90].

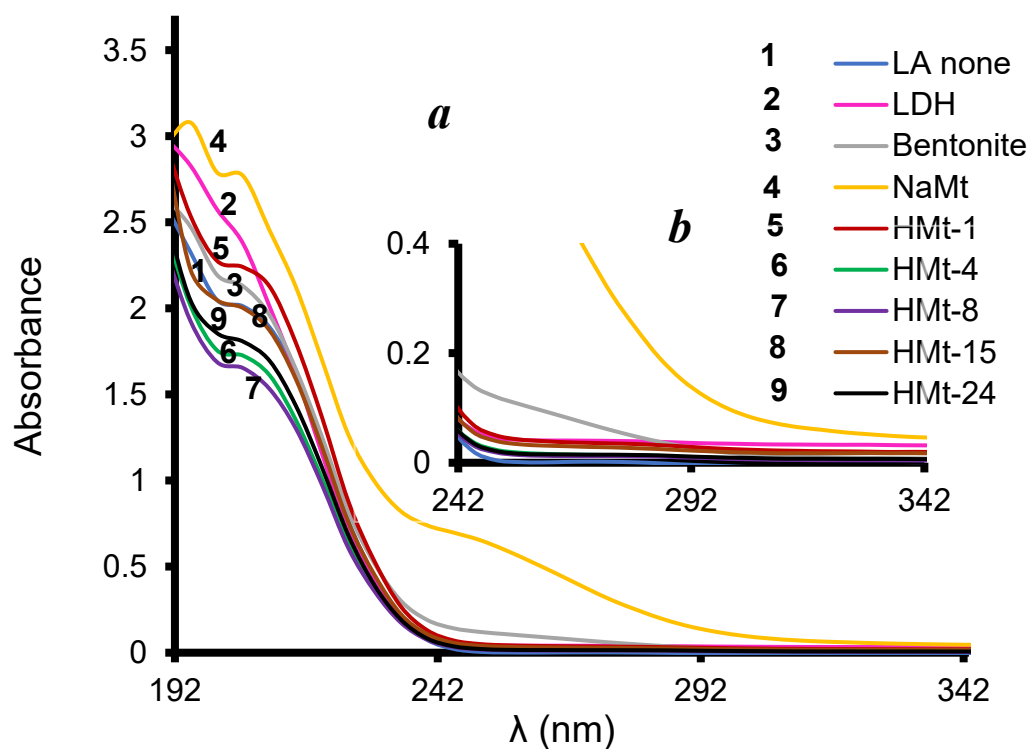


Figure 4. 1 UV-Vis spectrum of LA in the presence of different catalysts before ozonation in nanopure water (a) and close-up on the 242-342 nm region (b). $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$. $\text{pH} = \text{intrinsic value}$, quartz cell = 1 cm. ozone flow rate $600\text{ mg}\cdot\text{h}^{-1}$. Initial concentration $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (27.75 mM).

The absorbance decreases in the range 190-240 nm in the presence of more acid-activated bentonites (HMt-4 to HMt-24) accounts for a depletion of the number of $\pi \rightarrow \pi^*$ transition (195-200 nm) of $n \rightarrow \sigma^*$ transition (210-215 nm) band. This must be due to a pronounced equilibrium shift from lactate anion towards non-dissociated LA molecule as a result of pH decrease from 5.27 down to 3.82-4.48 (Table 4.1).

The presence of HMt-4, HMt-8, HMt-15, and HMt-24 is expected to favor LA-LA interaction such as dimerization, as reflected by the slight absorbance increase beyond

240 nm as for the other clay materials. However, the fact that all catalysts induced increases in the intensity in this region suggests that LA molecule should also interact with water but differently according to the pH, which is expected to vary during ozonation. This remains to be elucidated.

These LA-Clay interactions are assumed to lead to different LA adsorption levels according to the clay mineral, ranging from almost total removal on hydrotalcite to weak retention on more acidic material (HMT samples), as supported by additional HPLC-UV measurements (Figure 4.2).

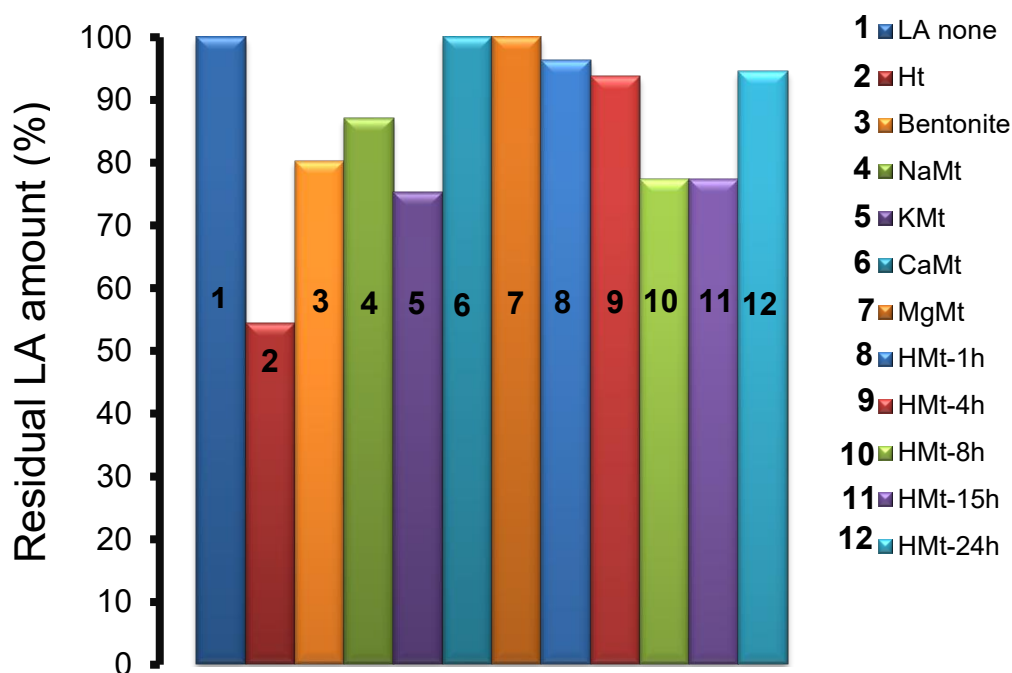


Figure 4. 2 Residual LA amount (%) in aqueous media containing different clay materials before ozonation as assessed by HPLC-UV. The clay impregnation was achieved by mixing 4 mg of cationic clay minerals with 20 mL LA aqueous solution with a concentration of 2.5 g.L^{-1} (27,75 mM) under manual stirring for 3 min. Ht was impregnated according to same procedure but with 2 h stirring. The sample was then centrifuged and filtered with a $0.22 \mu\text{m}$ filter.

Before ozonation, clay materials seem to play an important role as adsorbent, since Ht, KMt, Bentonite, NaMt, HMt-8 and HMt-15 showed affinity towards LA molecules as supported by the low residual LA amounts as compared to the other clay minerals. Based on the residual LA amount, these catalysts allowed affording appreciable LA removal yield by adsorption from the solution of almost 47 % with Ht, 26 % with KMt, 20 % with bentonite, 14 % with NaMt, 24% for both HMt-8 and HMt-15. Here, LA adsorption appears to be favored by anion-exchange on Ht and probably on bentonite which contains carbonates and by the surface basicity, more particularly on Ht, bentonite to a lesser alkali-exchanged montmorillonite (KMt and NaMt). HMt-1, HMt-4 and H-Mt-24 showed low affinity towards LA molecules reflected by residual LA amount of 3-5 %. CaMt and MgMt turned out to be almost totally non-interactive with LA molecules.

4.3.4 Non-catalytic ozonation

Preliminary rapid tests of 3 min ozonation for different initial concentrations of LA in the absence of catalyst revealed marked changes in the UV-Vis spectrum (Figure 4.3). As a common feature, all ozonized displayed higher UV-Vis intensity as compared to their starting counterparts. These bands are due to dissolved ozone and the rise of early LA intermediates that absorb in the same region, as already reported for other organic molecules [28, 89, 101-105]. A close-up on the low intensity band observed at 270 nm showed a similar tendency, except at an LA concentration of 4 mg. L⁻¹. The appearance of new bands attributed to the LA intermediates impedes accurate assessment of LA degradation yield, more during the early stage of the ozonation process. However, the mere appearance of such intermediates during ozonation provides evidence of the reactivity of LA towards ozone.

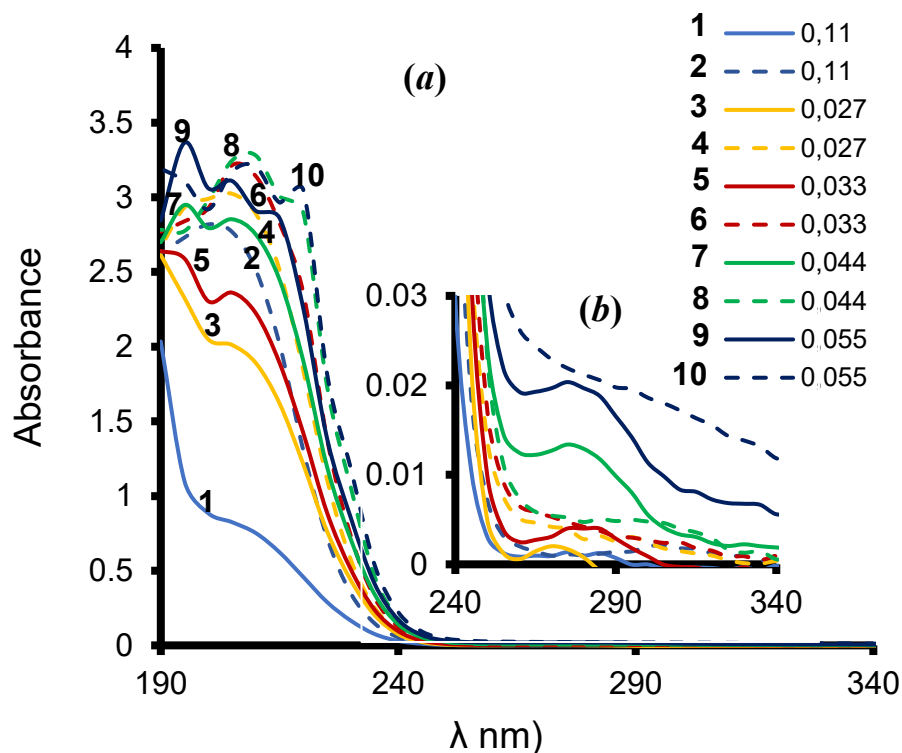


Figure 4. 3 UV-Vis spectra of LA at different initial concentrations (mg. L⁻¹) before (solid lines) and after 3min ozonation (dashed lines) in nanopure water *(a)* and close-up on the 240-340 nm region *(b)*. T = 20 °C. pH = 2.80, quartz cell = 1cm. ozone flow rate: 600 mg.h⁻¹. Prior to UV-Vis analysis, the sample was centrifuged and filtered with a 0.22 μ m filter.

4.3.5 Effect of catalyst addition

Clay catalyst addition induced even more pronounced changes in the UV-Vis band of the aqueous LA solution as compared to the non-catalytic ozonation. These changes were illustrated by more or less accentuated intensity increase in time of all the bands (Figure 4. 4). These results confirm once again that the UV-Vis bands of LA are shaded, and their intensity can only be assessed by HPLC measurements.

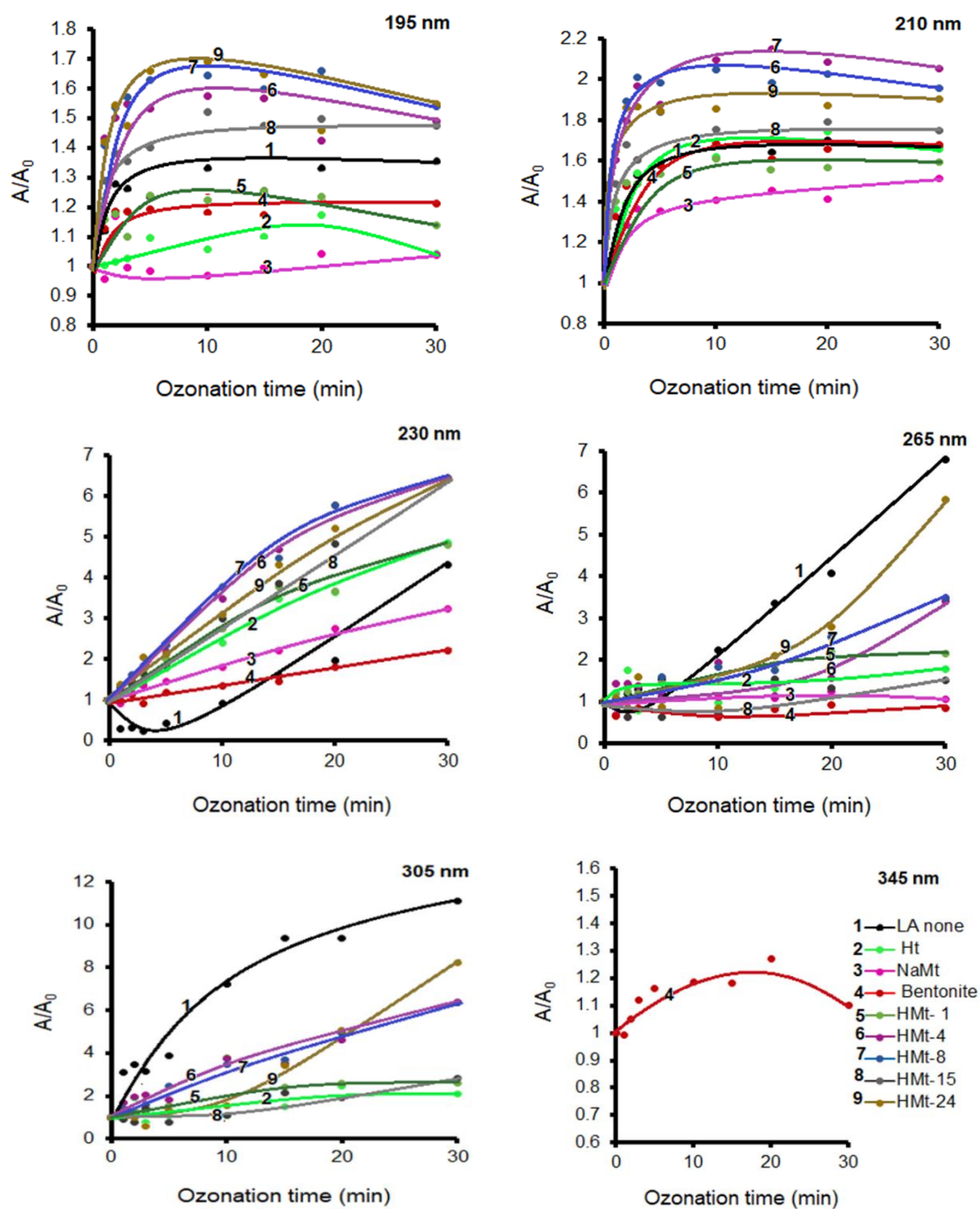


Figure 4. 4 Evolution in time of the relative absorbance of the absorption bands of LA solution during the ozonation in the presence of the various catalysts.

A first overview of the HPLC-UV data recorded during the early ozonation in the absence of catalyst revealed an accentuated depletion of LA during the first 5 min (Figure 4.5). LA depletion was more pronounced in the presence of catalysts, more particularly HMT samples, bentonite, and ion-exchanged counterparts.

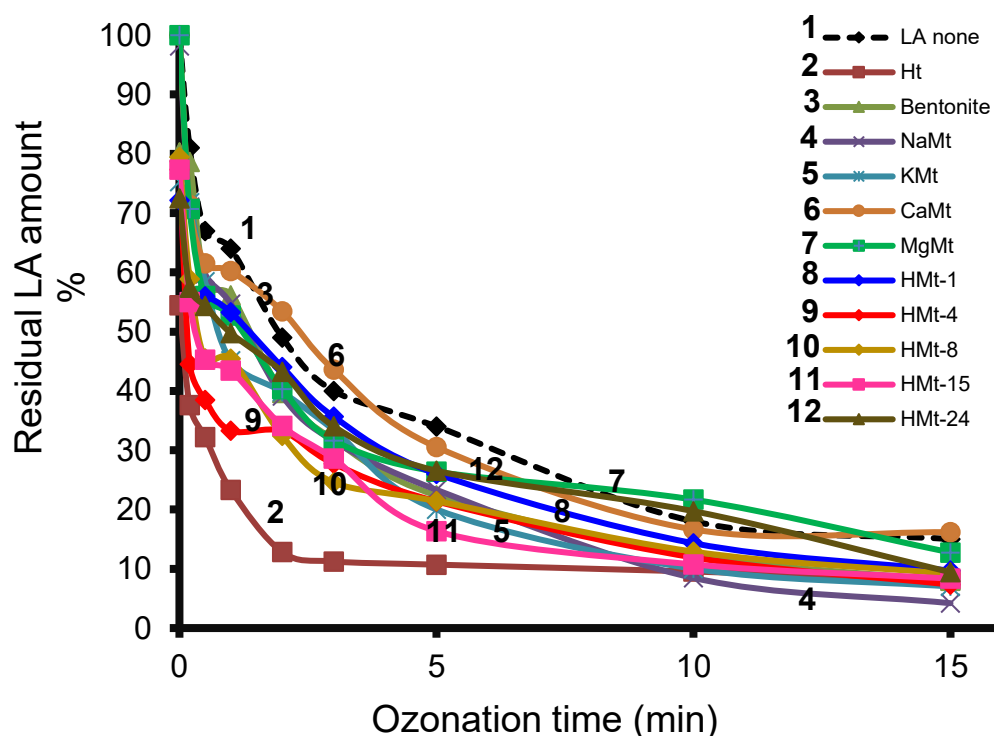


Figure 4. 5 Effect of the addition of catalyst on the residual LA during ozonation as assessed by HPLC-UV. After ozonation, the sample was centrifuged and filtered with a 0.22 μm filter.

At this early ozonation stage, the residual LA amount reached ca. 16 % in the presence of HMT-24h versus approximately 36 % in the absence of catalyst. As a common feature, all clay catalyst displayed higher activity affording lower residual LA amounts ranging between ca. 12 % for Ht and 30 % for CaMt as compared to ozone alone (36 %) after 5 min ozonation. This accounts for LA conversion yields of 84, 68 and 64, respectively. The same tendency was maintained for prolonged ozonation time beyond

5 min, but with a marked mitigation of the ozonation process. Based on the residual LA amount, the degradation yield reach ca. 97% for NaMt, 93 for KMt, 92% for bentonite and HMT-4, 91% for HMT-15, 90% for HMT-8, HMT-24, and HMT-1, 87% for MgMt, 84% for CaMt, 78% for Ht and 85% in the absence of catalyst after 15 min of ozonation. This provides clear evidence of the beneficial role of the addition of cationic clay mineral on the ozonation process.

The lowest residual LA amount (12 %) was obtained after only 2 min ozonation in the presence of hydrotalcite. This accounts for highest efficiency in LA removal in agreement with its highest affinity towards LA, suggests a beneficial effect of lactate adsorption via anion exchange and/or of molecular LA retention via hydrophobic interaction. This result was somehow unexpected given the low delamination capacity of LDH, which makes the interlayer insertion of chemical species difficult to achieve. Nevertheless, prolonged Ht impregnation by LA solution under continuous and vigorous stirring of 2 hours turned out to be a judicious procedure (Figure 4.6). Ht gave much lower LA residual amount upon ozonation of ca. 10 % after only 3 min ozonation as compared to 52-53% obtained under 3 min manual stirring for the same impregnation time.

This high difference was found to be progressively attenuated in time, most likely due to progressive Ht delamination and LA incorporation within the interlayer space. This clearly demonstrates that prolonged contact time and strong convection are essential requirements for overcoming the hard LDH delamination in catalytic processes.

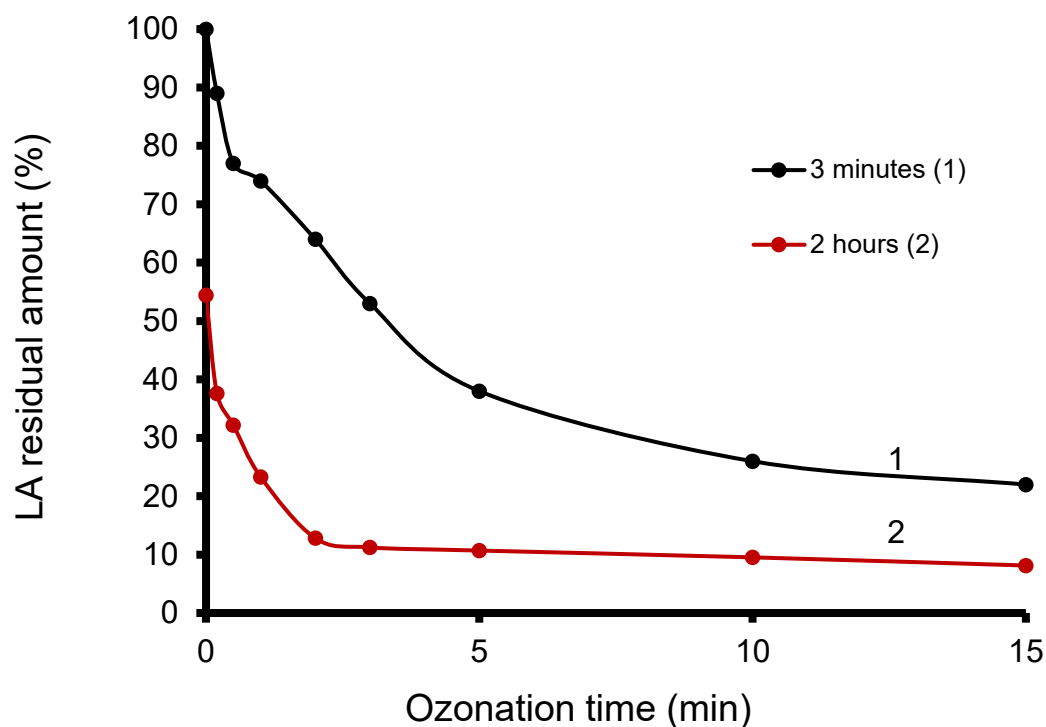


Figure 4. 6 Effect of prolonged hydrotalcite impregnation in LA solution before ozonation on the catalytic activity. 1- LA-impregnated Ht under manual stirring for 3-4 min; 2- LA-impregnated Ht under vigorous magnetic stirring for 2 hours. After ozonation, the mixtures were filtered with a 0.22 μm filter and then analyzed by HPLC-UV. All experiments were carried out at RT.

4.3.6 pH evolution during ozonation

The fact that all curve evolutions start from different values of the initial pH of the reaction mixture indicates the occurrence of a specific adsorption of LA molecules on each catalyst surface in the absence of O_3 . The highest initial pH was noticed for Ht due to its relatively high intrinsic basicity as compared to cationic clay minerals (Table 4.1). This pH dramatically decreased during the first minute of ozonation, probably due to fast LA ozonation into acidic species.

Table 4. 1 Main features of the investigated clay materials

Sample	Si/Al Mole ratio	pH ^a			Average particle size (μm)		Average Zeta potential (mv)		LA conversi on yield (%) ^e
		Water ^b	LA 0 min ^c	LA 1 min ^d	H ₂ O	LA	H ₂ O	LA	
Bentonite	2.50	6.23	2.80	2.84	1.78	0.78	-30.87	-25.73	52.64
NaMt	2.45	6.88	2.76	2.82	0.63	0.63	-25.07	-37.07	36.89
HMt-1	2.69	5.27	2.69	2.87	2.81	2.84	-18.72	-24.46	43.81
HMt-4	3.00	4.13	2.67	2.74	2.69	1.05	-24.93	-25.53	37.24
HMt-8	3.47	4.38	2.67	2.69	2.98	0.59	-27.10	-22.09	38.07
HMt-15	4.03	3.82	2.42	2.73	3.32	1.34	-34.43 -22.85 -40.2	07.00 -13.08	39.24
HMt-24	4.36	4.48	2.60	2.67	3.71	5.51	-21.48	-23.75	37.13
Ht	-	6.27	4.64	4.19	1.40	9.98	-09.33 -11.7 -20.02	17.81 14.64	35.97
MgMt	2.45	5.72	2.83	2.84	1.68	4.25	-07.3 -11.7	65.18 50.51 42.01	32.55
KMt	2.45	6.22	2.74	2.76	0.90	0.91	-32.77	-26.74	37.86
CaMt	2.45	6.07	2.74	2.74	1.27	1.12	-12.29	-20.21	40.15

^a The initial pH of lactic acid solution was of 2.90.

^b Average initial pH of the clay suspension in water at room temperature.

^c Average pH of the aqueous LA solution containing the dispersed catalysts before ozonation.

^d Average pH of the aqueous LA solution containing the dispersed catalysts after 1 min ozonation.

^e LA conversion yield as assessed by HPLC-UV at 220 nm after 1 min ozonation.

The pH of the reaction mixture evolved differently during ozonation depending on the absence/presence and type of catalyst. Except, HMt-15, all cationic clay minerals induced a slight but continuous pH decrease from due to the formation of acidic species. Diverse carboxylic acids may arise from LA ozonation such as pyruvic acid (pKa 2.45),

acetic acid (pK_a 4.75), oxalic acid (pK_{a1} 1.25 and pK_{a2} 4.3), formic acid (pK_a 3.74) and carbonic acid (pK_{a1} 6.35 and pK_{a2} 10.32). Their distribution may vary from a catalyst to another.

Ht produced a much more pronounced pH decrease once ozonation was triggered, presumably to a fast production of acidic species. However, this was followed by an apparently paradoxical pH increase after 2 min LA ozonation (Figure 4.7, curve 2), most likely due to a combination of a massive release of carbonates through anion exchange by lactate and progressive appearance of carbonic acid (pK_{a1} 6.35 and pK_{a2} 10.33) via the ozonation and consumption of LA (pK_a 3.8). Similar but much less accentuated phenomenon was observed for LA ozonation without catalyst (curve 1).

This pH increase should be correlated to enhanced ozonation process involving not only LA conversion into acidic species but also the oxidation of the latter into carbonic acid. This allows concluding that Ht and to a lesser extent ozone alone produced the highest efficiency in the oxidation of LA and ozonized derivatives. This apparently high catalytic activity of Ht contrasts with its highest particle size of 9.98 μm (Table 4.1) which is supposed to offer lowest accessible surface area.

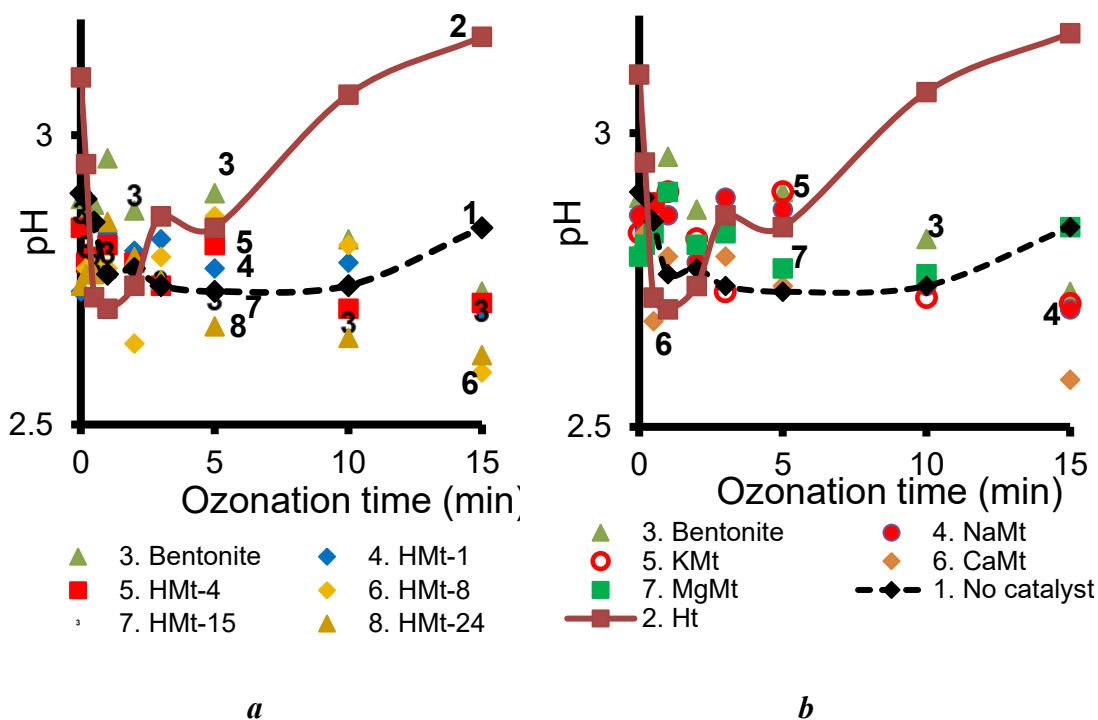
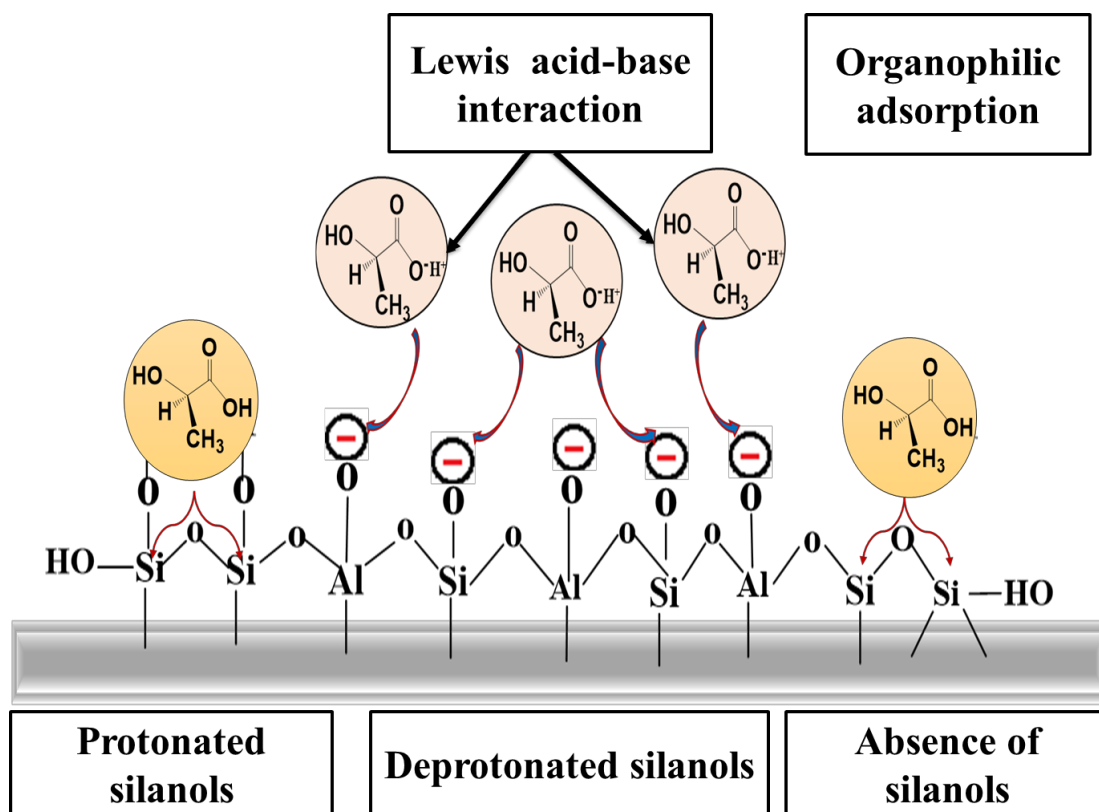


Figure 4. 7 Evolution of the pH of the reaction mixture during LA ozonation in presence of HMT catalysts (*a*) and ion-exchanged Mt samples (*b*) as compared to bentonite and hydrotalcite.

This large particle size of Ht suggests weak inter-particle repulsion forces, most likely due to low charge density on the surface in concordance with its lowest absolute value of the Zeta potential (+17.81 mV). This suggests that surface ozonation on Ht, if any, should have only a moderate contribution, and that direct process with both dissolved and gaseous molecular ozone prevails. This agrees somehow with the paradoxically high efficiency of ozone alone in LA decomposition. Another possible explanation resides in the adsorption of via strong hydrophobic and Lewis acid-base (LAB) interactions with Ht surface that compensate the low Ht dispersion in aqueous media.

Hydrophobic inter-particle interaction was also noticed for HMt-15, as supported by a relatively high particle size (5.51 μm) as compared to the other cationic clay minerals. This can be explained by its highest Si/Al mole ratio (4.36), as a result of an advanced dealumination [90]. Despite their negatively charged frameworks reflected by negative values of the Zeta potential, all cationic clay minerals should also promote organophilic adsorption of non-dissociated LA molecules on silanol free areas of the surface (Scheme 4.2). Hydrophobic interactions are expected to be more pronounced on HMt samples and with decreasing pH below the pKa value of LA (3.8), improving thereby their catalytic activity.

Here, the extent of the accessible catalytic surface should play a key-role in the ozonation process. This explains somehow the high catalytic activity of NaMt reflected by the lowest LA residual amount of 3% obtained after 15 min ozonation (Figure 4.5). This is most likely due to a highest clay dispersion in the aqueous media and increased accessible catalytic surface, as supported by its lowest particle size (0.63 μm) as compared to all catalysts (Table 4.1). Here, the Zeta potential of NaMt (-37.07 mV) is higher than that of the starting clay material (-25.73 mV) due to the elimination of dense silica phases through bentonite purification and than those the other clay catalysts. This is supposed to induce a stronger repulsion force between the catalyst particle, thereby improving the accessible surface for both adsorption and catalysis.



Scheme 4.2 Possible interactions of LA molecules on cationic clay minerals.

LAB and electrostatic interactions of LA molecules are also possible with both in-plane and out-of-plane silanols depending on the pH of the reaction mixture [25, 61]. This is agreement with our previous statement related to the intensity increase for the UV-Vis bands of LA when contacted with aqueous suspension of clay minerals (Figure 4.1).

4.3.7 Ozonation with LDH-cationic clay mixtures

The appreciable effectiveness of cationic clay minerals and hydrotalcite has stimulated research towards the effect of the addition of their mixture. For this purpose, various mixtures were prepared with different cationic clay mineral and different LDH contents. A quick overview of the ozonation data measured through HPLC-UV (Figure 4. S5)

showed no clear improvement as compared to the LA depletion in time obtained by ozonation in the presence of individual catalyst.

The strong discrepancy between the residual LA amounts obtained with HT-Cationic catalyst mixtures and Ht alone appears to be progressively attenuated in time up to total disappearance after 15 min ozonation for certain Ht-HMt-15 mixtures. The most plausible explanation resides in that all catalysts and their mixtures with Ht were previously impregnated in LA solution under short manual stirring of 3 minutes, and that Ht delamination could be improved in the presence of cation clay minerals. This statement is supported by the higher residual LA amount of approximately 22-23 % obtained with Ht alone previously contacted with LA under short 3 min stirring (Figure 4.6) as compared to those registered with all catalysts and their mixtures which did not exceed 19-20% after 15 min ozonation (Figure 4. S5).

Deeper insights in longer ozonation times revealed certain Ht-HMt mixtures gave lower residual LA amount ranging between 2.66 and 3.2 % as compared to Ht alone (3.31 %) after 3 min impregnation under manual stirring and 60 min ozonation (Table 4.2). Interestingly these mixtures were found to be more easily and rapidly separated from the ozonized reaction mixture upon centrifugation than Ht-containing media.

These observations are of great interest, because they suggest a possible delamination and consecutive reciprocal intercalation of Ht and HMt samples thereby improving the hydrophilic character and accessible catalytic surface. A possible explanation should consist in the slight hydrophobic character of acid-activated bentonite that simultaneously acts as an interface between hydrophobic LDH surface and, in the meantime, confers negative charge on the mixture.

Table 4. 2 Comparison of the residual LA amount for ozonation with clay minerals and their mixtures.

Ht content (%)	Bentonite	Residual LA amount after 60 min ozonation (%)								
		H Mt-1	H Mt-4	H Mt-8	H Mt-15	H Mt-24	Na Mt	KMt	Ca Mt	Mg Mt
100	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31	3.31
80	3.93	3.40	5.30	3.20	4.06	3.19	5.65	-	-	-
60	3.85	6.35	4.25	2.93	2.67	2.66	3.92	-	-	-
40	2	4.14	3.95	3.68	2.67	3.80	3.5	-	-	-
20	4.98	3.21	3.57	3.28	2.63	2.99	3.97	-	-	-
0	1.99	1.55	1.65	2.54	3.64	1.62	1.97	2.00	2.59	1.60

4.3.8 Product identification

LC-Tof-MS analysis of the reaction mixture after 1 min ozonation in the presence of NaMt revealed the presence of two major peaks attributed to residual LA and an LA intermediate at retention times of 11.9 and 4.3 minutes, respectively (Figure 4.8). Similar chromatograms were obtained with all reaction mixtures resulting from ozonation without and with each of the investigated catalysts.

The intense peak at a 4.3 min retention time was identified as corresponding to lactic acid with a m/z value of 89.0258-89.0266 amu (Figure 4. S6). The peak appearing at a 4.3 min retention time even in the early stage of ozonation seems to correspond to a mixture of at least five compounds such as $C_6H_{10}O_5$ ($m/z=157.02$ amu), $C_8H_{10}O$ ($m/z=201.05$ amu), $C_7H_8O_7$ ($m/z=203.02$ amu), $C_{10}H_8O_6$ ($m/z=223.022$) and $C_{12}H_7O_7$ ($m/z=263.02$ amu). Among these, only one was identified by LC-MS (Fig. S5-S7) with an m/z value of 161.0445 amu as being close to that of $C_6H_{10}O_5$ with a 162 g.mol^{-1} molecular weight (Figure 4. S7). This compound has many isomers, but lactoyllactic acid and lactic anhydride are the most probable potential candidates as LA derivatives [110]. In this case, it appears that ozonation may produce LA-LA and LA-derivative condensation processes that make the reaction mixture difficult to be analyzed.

Investigation is still in progress in this direction. The increase in time of this peak recorded by HPLC-UV (Figure 4.9 and Figure 4.10), denoted as intermediate 1 (Int-1), indicates that at least one of these compounds arises from LA ozonation. This increase took place with LA depletion and was more pronounced during the first three minutes of ozonation in the presence of all clay catalysts, and even faster with Ht (Figure 4.11).

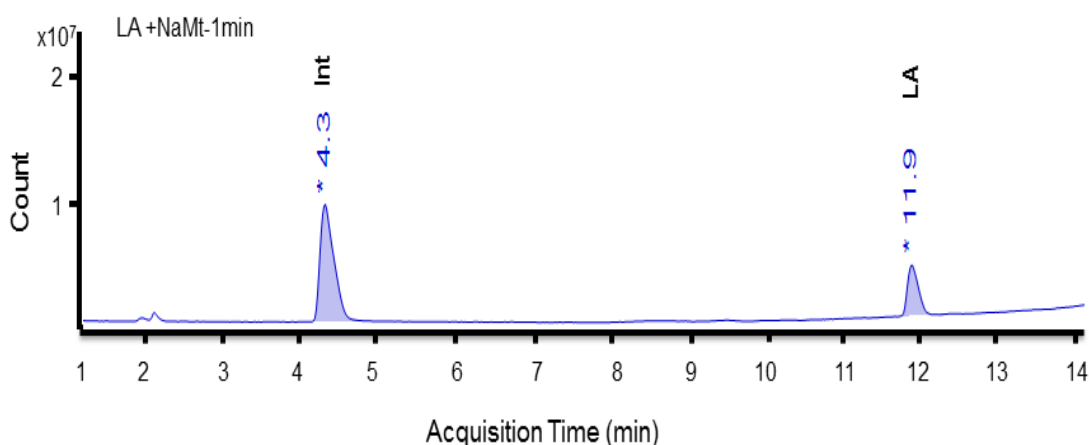


Figure 4. 8 LC-ToF-MS chromatogram of ozonized LA solution in the presence of NaMt for 1 min. LC-ToF-MS in negative electrospray mode.

A marked attenuation was observed at 5 min ozonation, most likely due to further the appearance of Int-1 decomposition process. Here, direct LA oxidation by molecular ozone, if any, is expected to generate acetaldehyde (CH_3CHO) and carbon dioxide [98, 111]. Acetaldehyde can both evaporate and oxidizes into acetic acid (CH_3COOH). Acetic acid may also react with residual LA molecules giving rise to $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$.

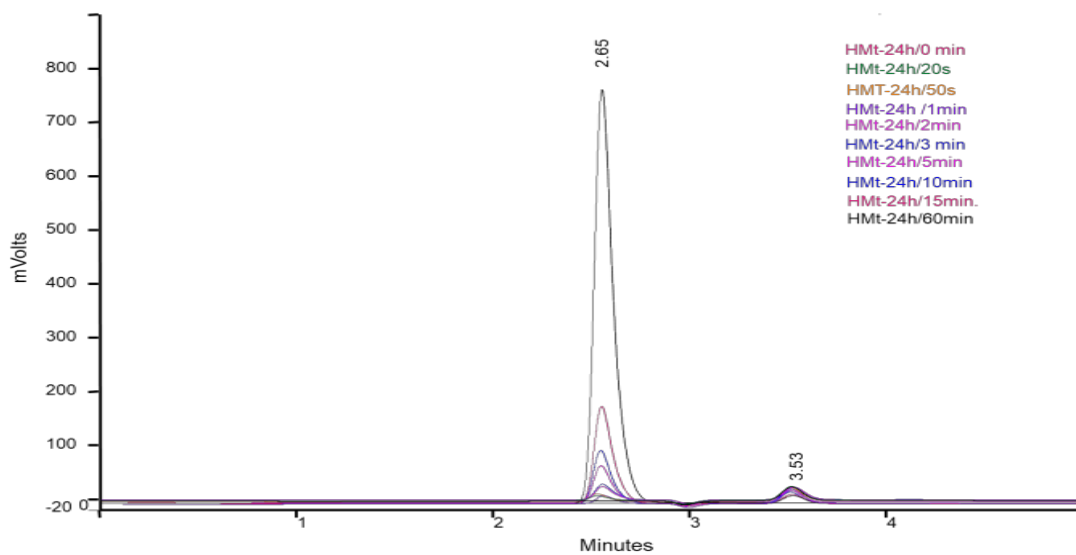


Figure 4. 9 HPLC-UV chromatograms of LA solution after different ozonation times in the presence of HMT-24.

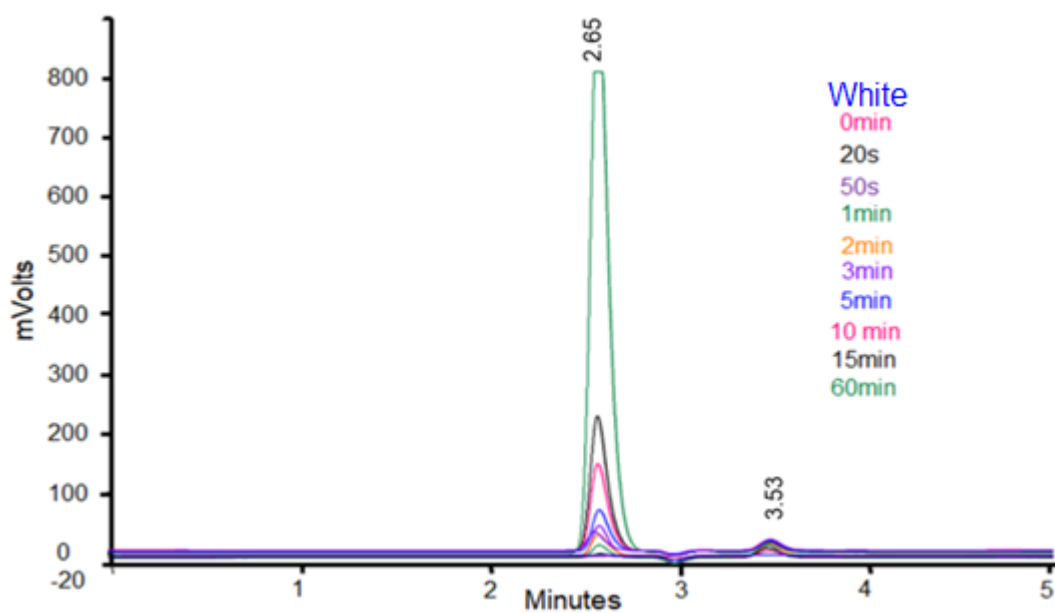


Figure 4. 10 HPLC-UV chromatograms of LA solution after different ozonation times in the presence of bentonite.

This reaction appears an early fast step during ozonation. Nevertheless, based on its well-known toxicity [112, 113], DEPC formation is less probable, given that LA also oxidizes in metabolisms [114]. LA oxidation should rather produce acetaldehyde and short-chain acetic, pyruvic, and oxalic acids [115-117]. Two very low intensity peaks were also detected at a retention time around 2 minutes for ozonized LA solution in the presence of NaMt and were attributed to other LA derivatives. Both peaks totally disappeared after few additional minutes and were not observed for some catalysts such as bentonite and HMt-24 and others.

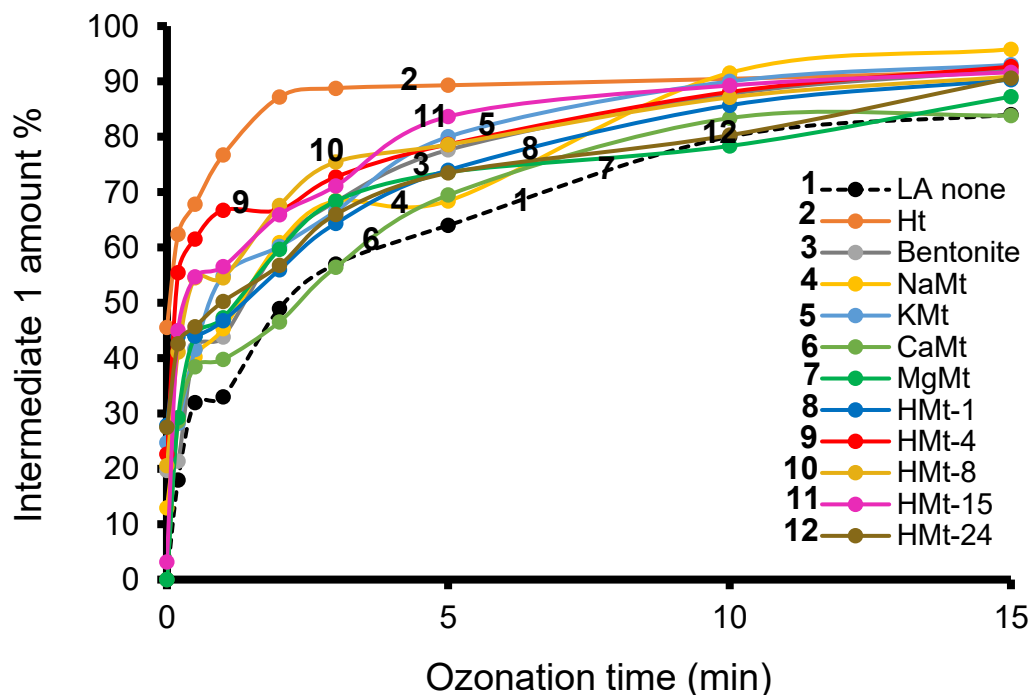
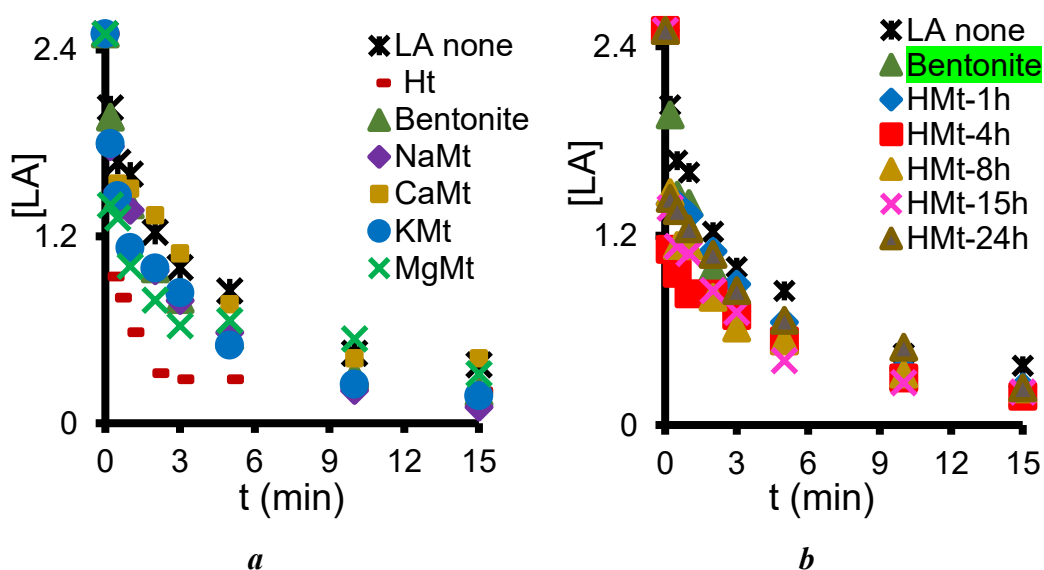


Figure 4. 11 Evolution of the amount of Int-1 during ozonation in the presence of different catalysts as assessed by HPLC-UV. After ozonation, the sample was centrifuged and filtered with a 0.22 μm filter.

4.3.9 Ozonation kinetics

HPLC-UV measurements of short ozonation times allowed approaching a preponderant LA ozonation reaction with minimal contribution of intermediate transformations. Plotting C_{LA} , $1/C_{LA}$, and $\ln (C_{LA}/C_{LA0})$ versus the reaction time, where C_{LA}/C_{LA0} is the relative LA concentration allowed applying the zero, 1st and 2nd order kinetics models (Figure 4.12).

The highest values of the correlation coefficient (R^2) close to unity among those summarized in Table 4. S4-S6 allowed establishing the most probable reaction order and rate constant with their corresponding range of ozonation time for each clay catalyst (Table 4.3). Specific kinetics were observed according to the clay catalysts in agreement with their specific interactions in LA solutions previously examined. A quick overview of these data showed that all catalysts conferred to ozonation a 2nd order kinetics but for different ozonation times. This indicates that ozonation strongly depends on the concentration of both LA and ozone.



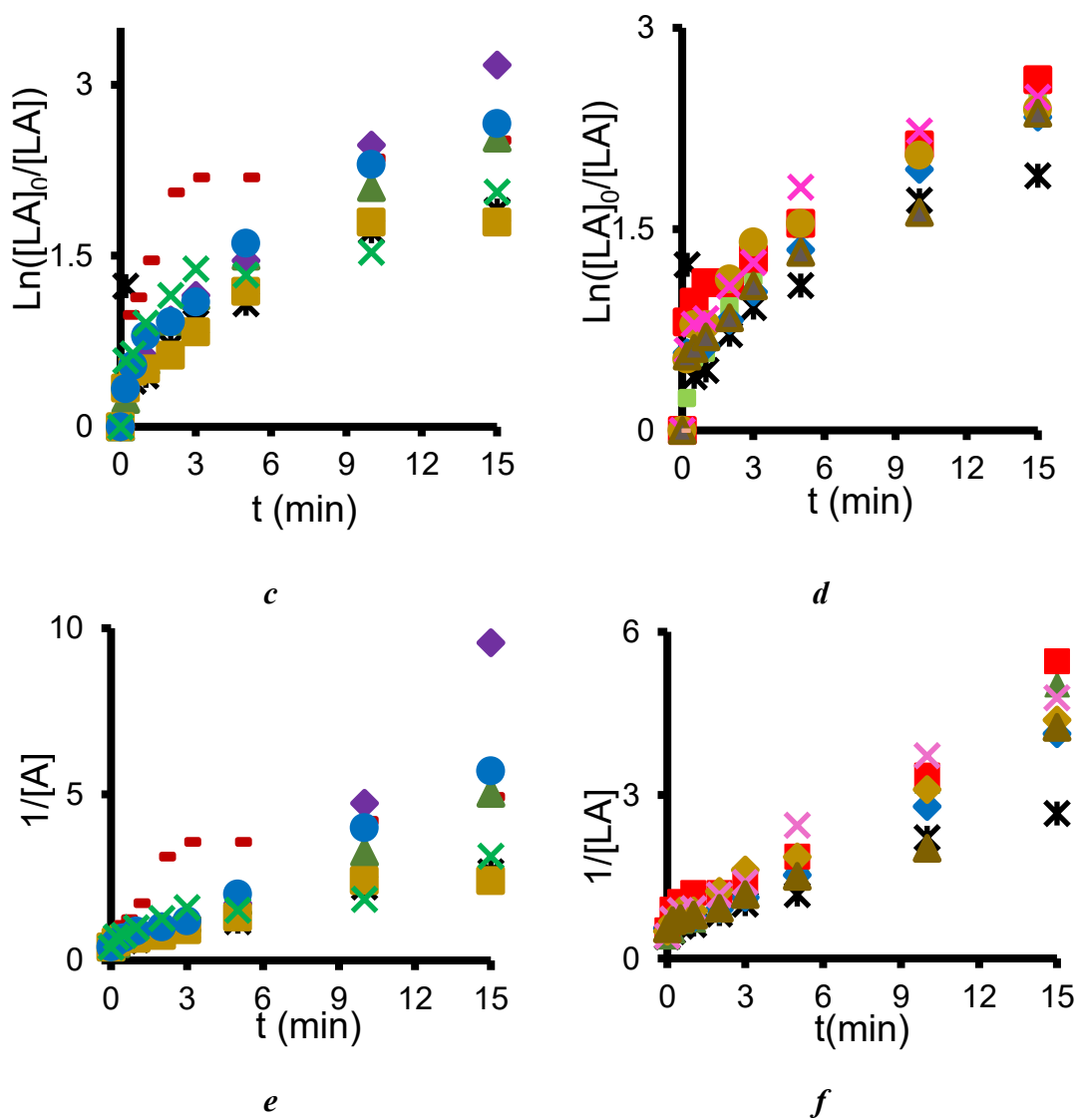


Figure 4.12 Plots for Zero (*a, b*), 1st (*c, d*) and 2nd order (*e, f*) kinetical models applied to LA ozonation in presence of different clay minerals (*a, c, e*) and of activated bentonite (*b, d, f*) based on HPLC-UV measurements.

This non-fractionary 2nd order indicates that the ozonation process is not controlled by LA diffusion and adsorption but rather by the very ozonation reaction. The specific kinetics for each catalyst provides evidence that this reaction occurs on the catalyst surface. Except Ht, MgMt and HMt-15, the 2nd order was maintained during the entire

ozonation time investigated. Marked decreases in the rate constant were observed after the first 5 minutes of ozonation in the presence of cation clay minerals.

Table 4. 3 Most probable reaction orders and rate constants for ozonation with different catalysts.

Catalyst	Time range (min)	Reaction order	r ²	Rate constant, K*
Ht	[0-3]	2	0.9613	1.039
	[5-15]	1	0.9999	0.136
Bentonite	[0-5]	2	0.9909	0.266
	[5-15]	2	0.9972	0.324
NaMt	[0-5]	2	0.9889	0.251
	[5-15]	2	0.9824	0.785
CaMt	[0-5]	2	0.9562	0.158
KMt	[0-5]	2	0.9672	0.288
	[5-15]	2	0.998	0.37
MgMt	[0-3]	2	0.9566	0.36
	[5-15]	1	0.9346	0.162
HMT-1	[0-5]	2	0.9448	0.195
	[5-15]	2	0.9997	0.26
HMT- 4	[5-15]	2	0.9905	0.36
HMT-8	[0-5]	2	0.9286	0.28
	[5-15]	2	0.9999	0.251
HMT-15	[0-5]	2	0.9513	0.355
	[5-15]	2	0.9971	0.234
HMT- 24	[0-5]	2	0.941	0.192
	[5-15]	1	0.9428	0.274

* The rate constant (K) is expressed in g.L⁻¹.min⁻¹ for the zero-order model, min⁻¹ for the 1st order model and L.g⁻¹.min⁻¹ for the 2nd order model.

This non-fractionary 2nd order indicates that the ozonation process is not controlled by LA diffusion and adsorption but rather by the very ozonation reaction. The specific kinetics for each catalyst provides evidence that this reaction occurs on the catalyst surface. Except Ht, MgMt and HMT-15, the 2nd order was maintained during the entire ozonation time investigated. Marked decreases in the rate constant were observed after the first 5 minutes of ozonation in the presence of cation clay minerals. This is

presumably due to pH decrease and change in the surface interaction as a result of the appearance of acidic species, in agreement with our previous statements. The most plausible explanation resides in that pH decrease is expected to lead to the increase in the amount of non-dissociated LA molecules. The latter are supposed to display hydrophobic character that impede their adsorption of hydrophilic bentonite, montmorillonite, and modified counterparts. Evidence in this regard was provided by the almost constant value of the rate constant (0.0960 versus 0.1040) in the presence of HMt-24. This accounts for a total absence of process mitigation and even a slight enhancement of LA ozonation on this highly dealuminated bentonite derivative (Table 4.1). Its relatively high Si/Al mole ratio of 4.36 should generate a pronounced hydrophobic surface as compared to the other counterparts, thereby favoring adsorption of non-dissociated LA with pH decrease.

The reaction change into 1st order kinetics must be due to a saturation of HMt-24 by LA molecule, making that the ozonation reaction depends only on the concentration of non-adsorbed ozone. On hydrophobic Ht, such hydrophobic interactions must be shaded by a massive release of lactate anion with subsequent association into LA molecule and/or intense catalytic activity of the clay surface that prevent saturation. This agrees with the constant 2nd order kinetics, and the marked decrease in time of the rate constant from 0.5198 down to 0.0323 L.g⁻¹.min⁻¹ must be due to rapid depletion of LA molecules.

4.4 Conclusion

The results obtained herein allow concluding that clay minerals display different catalytic activity in the ozonation of lactic acid in aqueous media according to the material structure. The surface interactions greatly influence the catalytic activity of hydrotalcite and cationic clay minerals in the ozonation of lactic acid. These

interactions, in turn, are strongly depending on the pH of the reaction mixture, which determine the not only the dissociation of lactic acid molecules but also the clay dispersion in the aqueous media. The extent of the accessible catalytic surface and particle size play key-roles in the ozonation process in the presence of cationic clay minerals. The catalytic activity of bentonite, montmorillonite and acid-activated counterparts appears to involve hydrophobic adsorption of non-dissociated molecules of lactic acid on silanol-free areas on the solid surface in higher pH than the pKa, but proton retention from lactic acid dissociation at higher pH. On hydrotalcite, hydrophobic interaction and anion-exchange were found to have much more importance contributions to the catalytic process. LAB and electrostatic interactions of LA molecules are also possible on both in-plane and out-of-plane silanols depending on the pH of the reaction mixture. Hydrotalcite-smectite combination seems to promote clay dispersion that improves the catalytic activity. This result is of great importance because it allows to apply double layered hydroxides in the extraction of lactic acid from dairy fermentation broths with consecutive regeneration by ozone in aqueous smectite suspension. This opens promising prospects for using harmless and recyclable natural materials in reducing the cost related to seed production in dairy technologies.

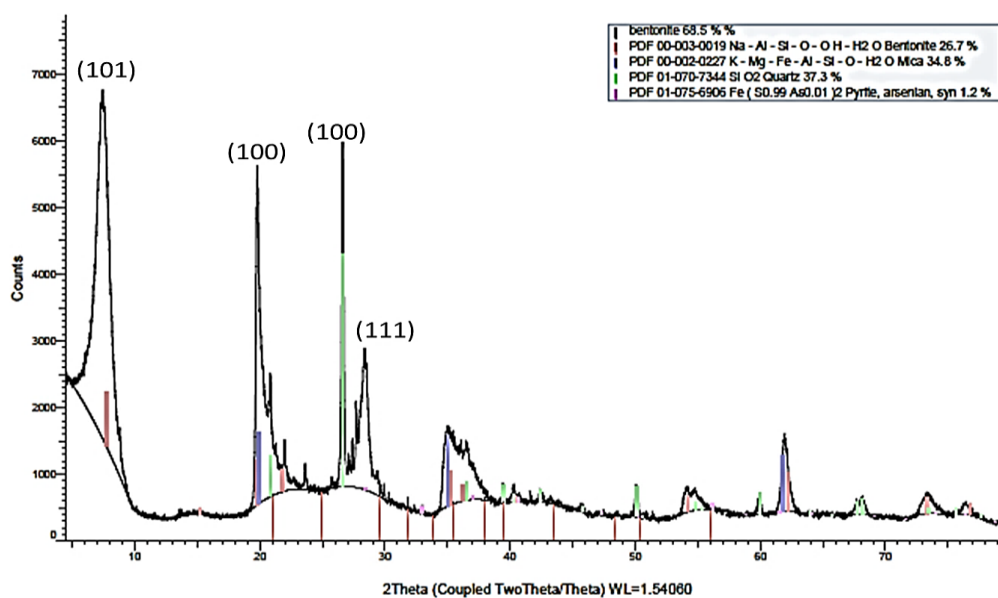
Acknowledgements

We are grateful to Ms. Dr. Alexandra Furtos-Matei (University of Montreal) and Ms. Isabelle Cloutier for their technical assistance.

4.5 Supporting information

4.5.1 Catalyst characterization by X-ray diffraction

X-ray diffractograms of the main clay materials used for this study (Figure 4.S1) showed sharp and intense lines, providing evidence of their high crystallinity. The main XRD lines of Na^+ -montmorillonite indicate that the clay is mainly composed of montmorillonite which is characterized by inter-reticular distances $d_{101} = 11.40\text{\AA}$ and $d_{100} = 4.45\text{\AA}$. In NaMt, the inter-reticular distances of the $d(101)$, $d(101)$ and $d(100)$ planes are of respectively 15.30, 4.45 and $4.2617\text{\AA}$. Bentonite purification into NaMt was found to remove high amounts of volcanic ashes, thereby improving the crystallinity. The interlayer distance of NaMt is higher than for bentonite.



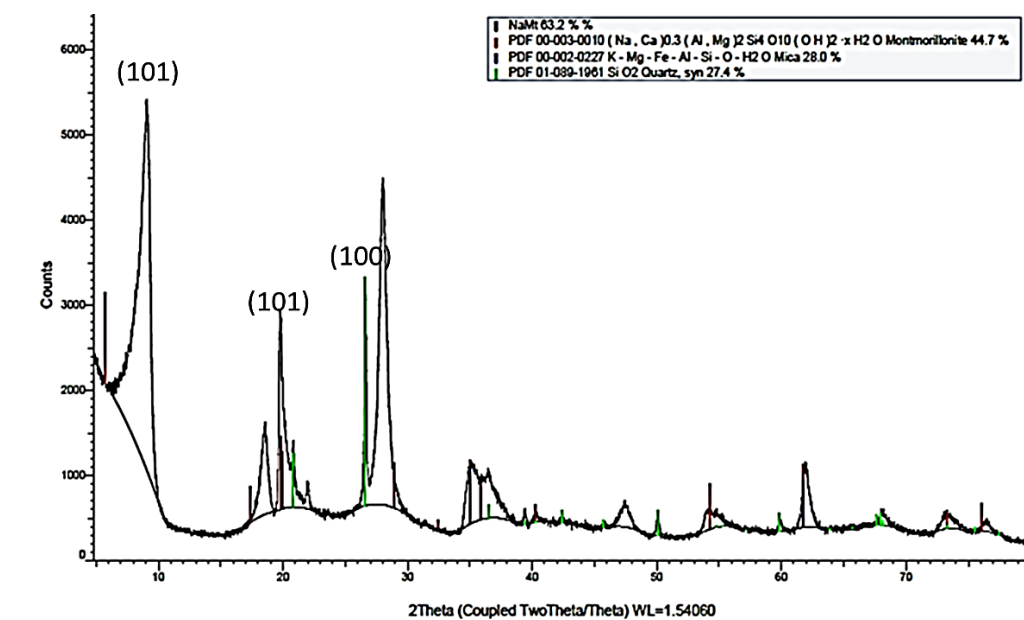
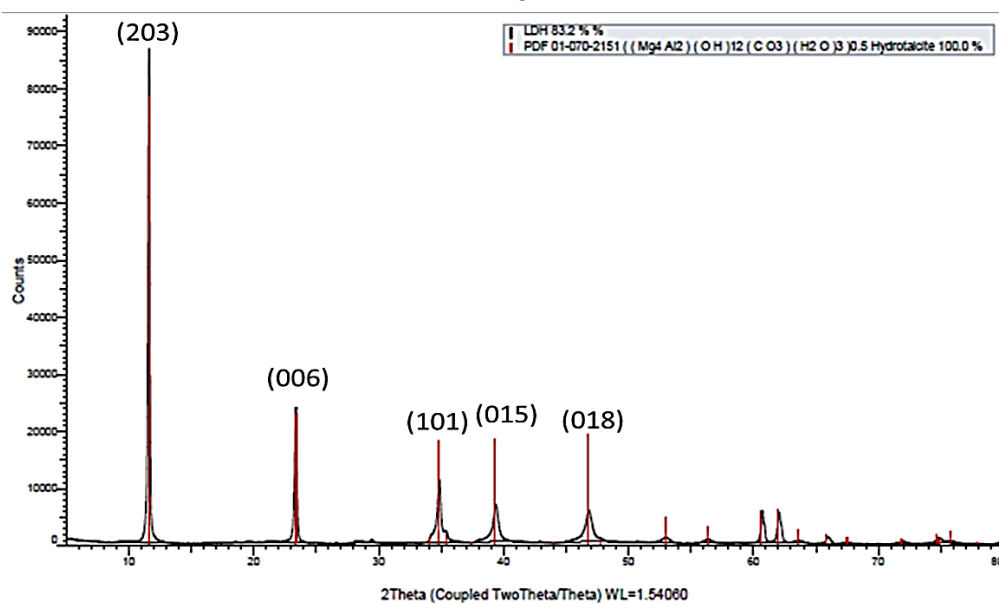
*b**c*

Figure 4. S 1 XRD spectra of bentonite (a), NaMt (b) and hydrotalcite (c).

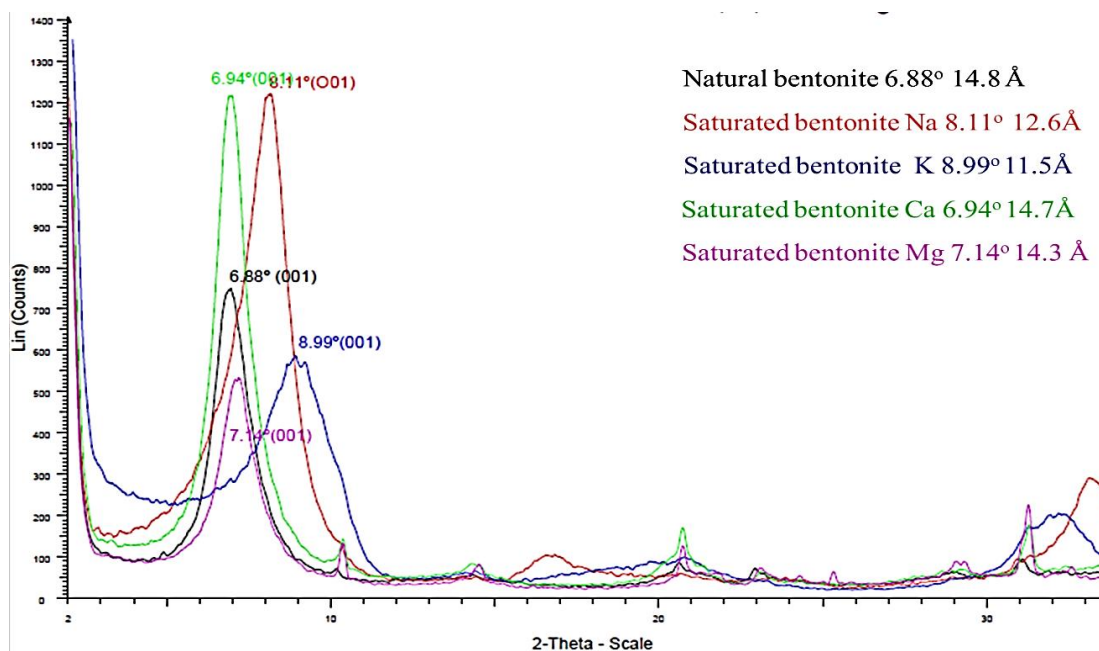


Figure 4. S 2 Effect of the exchangeable cation on the d_{001} basal spacing in bentonite and NaMt.

4.5.2 LA calibration plots and molar absorption coefficients

Lactic acid (L (+) –LA, 88 % purity 88%, molecular weight 90.08 g.mol^{-1}) was supplied by Sigma Aldrich. LA solutions with various concentrations (1, 2.5, 3, 4 and 5 g. L^{-1}) were prepared with nanopure water. Calibration curves were obtained by both UV-Vis spectrophotometry and high-performance liquid chromatography coupled to UV detection (HPLC-UV). This was achieved by plotting the optical density (absorbance) of LA UV-Vis bands and LA peak area obtained by HPLC-UV versus LA concentration (Figure 4. S1-a).

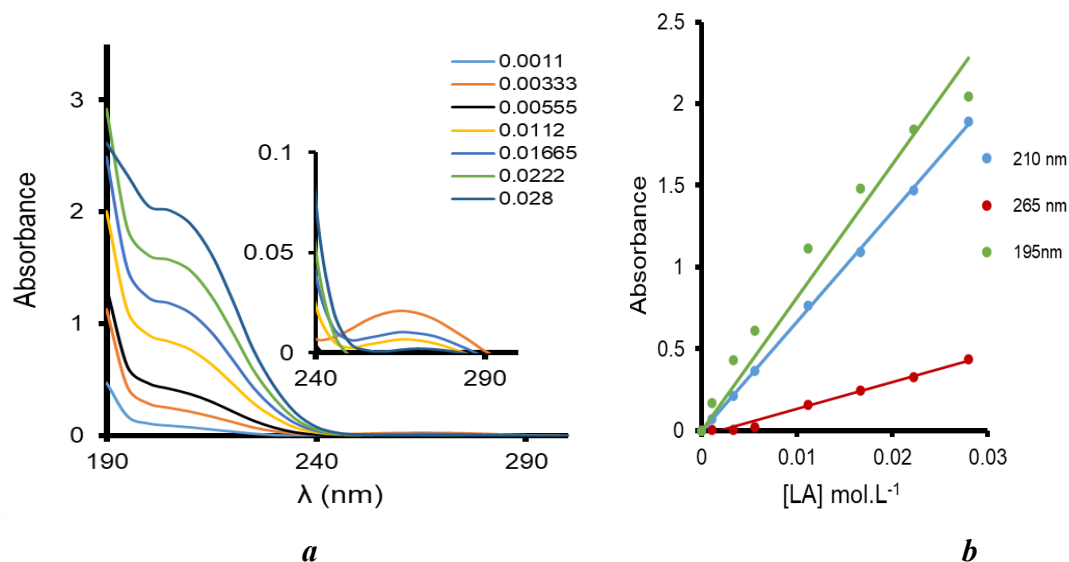


Figure 4. S 3 UV-VIS spectra of lactic acid (**a**) and corresponding calibration plot (**b**) at room temperature. Various LA solutions (0.001-.0.0277 mol. L⁻¹) were prepared by successive dilutions from a stock LA solution (0.0277 mol. L⁻¹). Quartz cell: 1 cm.

Table 4.S 1 Molar absorption coefficient at different LA UV-Vis bands.

Wavelength (nm)	Equation	r ²	Molar absorption coefficient ϵ (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
195	$y = 0.4667x + 0.0392$	0.9943	177.986612
210	$y = 0.7879x - 0.0124$	0.9909	79.2686026
265	$y = 0.4014x + 0.0150$	0.9702	42.2318293

4.5.3 HPLC- UV calibration of LA concentration

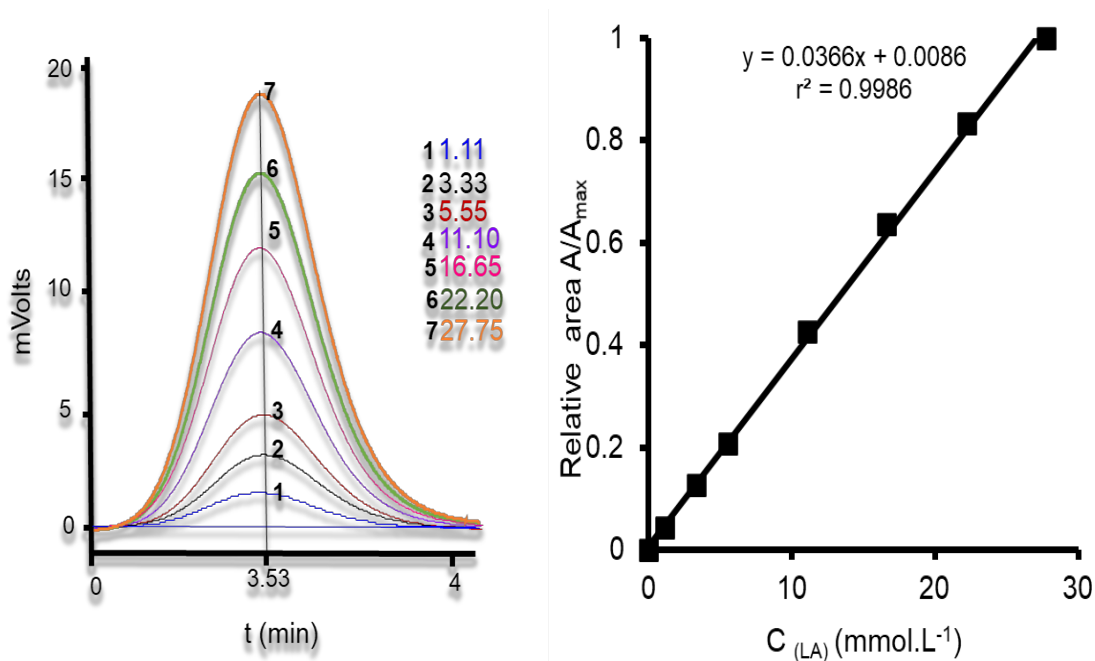


Figure 4. S 4 HPLC-UV diagram of lactic acid at different concentrations (mmol.L⁻¹) as detected at 210 nm (*a*) and calibration curve of LA peak area (*b*). LA retention time : 3,53 min ; C18 column under a 1mL.min⁻¹ throughput of an aqueous 0.06% solution of trifluoroacetic acid (TFA); T=20°C.

4.5.4 LA depletion during ozonation in the presence of various Ht-Cationic clay mixtures as assessed by HPLC-UV

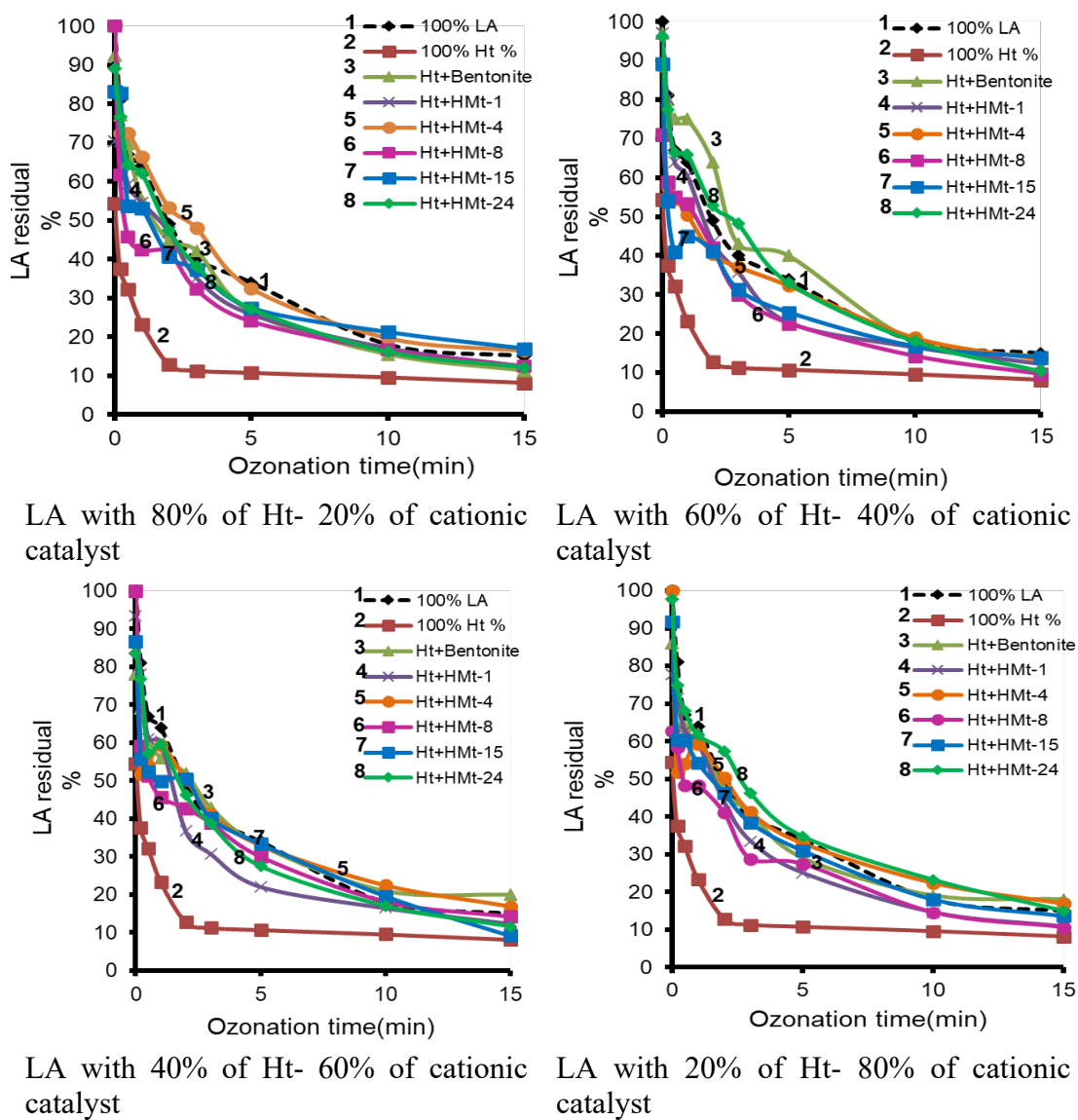


Figure 4. S 5 LA depletion in time during ozonation in the presence of different Ht: Cationic clay mixtures.

4.5.5 Product identification by LC-ToF-MS

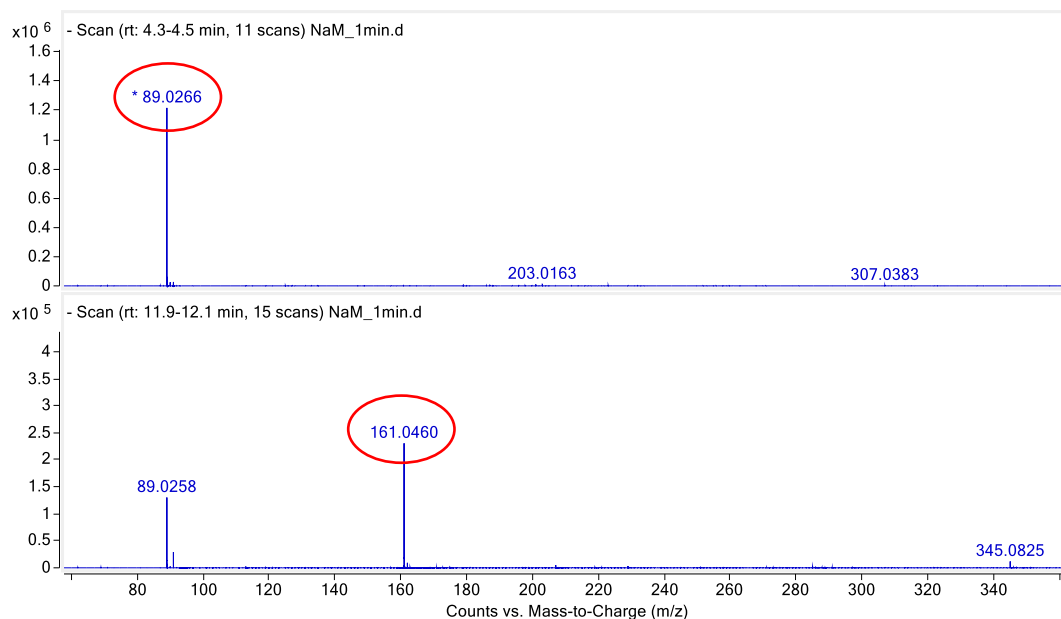


Figure 4. S 6 LC-ToF-MS diagram of the reaction mixture after 1 min ozonation in the presence of NaMt.

Formula Calculator

Allowed Species

Limits

Scoring

Mass and charge

Mass or m/z: 89.0266

Charge: -1

Charge carrier

Positive ions: H

Negative ions: H

MS ion electron state: even electron

Elements and limits

Element	Minimum	Maximum
C	0	52
H	0	80
O	0	20
N	0	2

Formula (M)	Ion Formula	m/z (Calc)	Diff (mDa)
C3 H6 O3	C3 H5 O3	89.0244	-2.18

Formula (M)

Ion Formula

m/z (Calc)

Diff (mDa)

C6 H10 O5

C6 H9 O5

161.0455

-0.45

C13 H6

C13 H5

161.0397

-6.33

Identification of $C_3H_6O_3$ (Lactic acid) by $m/z = 89.0266$

Identification of $C_6H_{10}O_5$ by $m/z = 161.045$

Figure 4. S 7 Identification of the main compounds detected by LC-ToF-MS.

4.5.6 LA ozonation kinetics

Table 4.S 2 Rate constant for Zero-order model of LA ozonation kinetics as assessed HPLC-UV.

Time range (min)	[0-3]		[0-5]		[5-15]	
	r ²	K	r ²	K	r ²	K
		(g· L ⁻¹ min ⁻¹)		(g· L ⁻¹ min ⁻¹)		(g· L ⁻¹ min ⁻¹)
None	0.8434	0.426	0.7879	0.278	0.865	0.0475
Ht	0.5026	0.503	0.4091	0.28	0.9969	0.01
Bentonite	0.7985	0.482	0.7666	0.328	0.9492	0.036
NaMt	0.7995	0.463	0.7469	0.312	0.9074	0.048
CaMt	0.668	0.341	0.7497	0.263	0.75	0.0347
KMt	0.6995	0.443	0.7216	0.313	0.9119	0.032
MgMt	0.6399	0.459	0.5277	0.262	0.9694	0.034
HMt-1	0.5644	0.359	0.6229	0.256	0.9407	0.041
HMt- 4	0.3929	0.362	0.3996	0.229	0.9611	0.035
HMt- 8	0.6339	0.4558	0.5825	0.282	0.9518	0.03
HMt- 15	0.5505	0.408	0.6018	0.287	0.9483	0.02
HMt- 24	0.5746	0.372	0.6031	0.254	0.9864	0.043

Table 4.S 3 Rate constant for 1st order model of LA ozonation kinetics as assessed HPLC-UV.

Time range (min)	[0-3]		[0-5]		[5-15]	
	r ²	K	r ²	K	r ²	K
		(min ⁻¹)		(min ⁻¹)		(min ⁻¹)
None	0.9292	0.2737	0.8944	0.2009	0.9071	0.0818
Ht	0.797	0.6122	0.6623	0.3605	0.9999	0.0323
Bentonite	0.9125	0.346	0.9202	0.2755	0.9914	0.1035
NaMt	0.9094	0.3379	0.9086	0.2624	0.9892	0.1718
CaMt	0.7828	0.213	0.8943	0.1952	0.75	0.0608
KMt	0.8247	0.3155	0.9045	0.2767	0.9668	0.1049
MgMt	0.8309	0.3808	0.6879	0.225	0.9346	0.0728
HMt-1	0.7167	0.2505	0.8261	0.2111	0.9854	0.0989
HMt- 4	0.5236	0.2835	0.6126	0.2106	0.9971	0.107
HMt- 8	0.8258	0.3785	0.7916	0.2601	0.9877	0.0853
HMt- 15	0.7295	0.3194	0.8591	0.2878	0.9791	0.0671
HMt- 24	0.7338	0.2651	0.807	0.209	0.9428	0.1037

Table 4.S 4 Rate constant for 2nd order model of LA ozonation kinetics as assessed HPLC-UV.

Time range (min)	[0-3]		[0-5]		[5-15]	
	r ²	K (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	r ²	K (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)	r ²	K (L.g ⁻¹ .min ⁻¹)
None	0.9765	0.0928	0.9631	0.076	0.9485	0.0678
Ht	0.9613	0.5198	0.08136	0.3237	0.9987	0.0383
Bentonite	0.9754	0.1354	0.9909	0.1332	0.9972	0.1622
NaMt	0.9785	0.1344	0.9889	0.1257	0.9824	0.3926
CaMt	0.8747	0.0698	0.9562	0.0792	0.75	0.0548
KMt	0.921	0.1216	0.9672	0.1441	0.998	0.1854
MgMt	0.9566	0.1793	0.7944	0.1092	0.8951	0.0812
HMt-1	0.8486	0.0945	0.9448	0.0974	0.9997	0.1298
HMt- 4	0.6812	0.127	0.8307	0.1148	0.9905	0.1792
HMt- 8	0.9458	0.1795	0.9286	0.1393	0.9999	0.1257
HMt- 15	0.8855	0.14	0.9513	0.1774	0.9971	0.1171
HMt- 24	0.8678	0.1027	0.941	0.096	0.8865	0.1372

Ordre Vitesse Concentration

0 $r = -\frac{d[A]}{dt} = k$ $[A] = [A]_o - k.t$

1 $r = -\frac{d[A]}{dt} = k.[A]$ $[A] = [A]_o . e^{-k.t}$

2 $r = -\frac{d[A]}{dt} = k.[A]^2$ $\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_o} + k.t$

α $r = -\frac{d[A]}{dt} = k.[A]^\alpha$ $\frac{1}{[A]^{\alpha-1}} = \frac{1}{[A]_o^{\alpha-1}} + k.(\alpha-1)t$

Ordre	Droite caractéristique
0	$[A] - [A]_o = f(t)$
1	$\ln[A] - \ln[A]_o = g(t)$
2	$\frac{1}{[A]} - \frac{1}{[A]_o} = g(t)$
α	$\frac{1}{[A]^{\alpha-1}} - \frac{1}{[A]_o^{\alpha-1}} = g(t)$

CONCLUSION GÉNÉRALE

La présente recherche a permis d'élucider plusieurs aspects liés aux deux étapes expérimentales essentielles qui ont abouti à la rédaction de ce mémoire. Ces deux étapes concernent la physicochimie de l'ozone dans les milieux aqueux et son action oxydative sur l'acide lactique. Les résultats obtenus dans la première partie de la recherche fournissent un approfondissement des connaissances concernant la dissolution de l'ozone dans les milieux aqueux. Ceci a aidé à cerner les principaux problèmes pouvant surgir dans son dosage par spectrophotométrie UV-Visible et iodométrie. La méthode spectrale s'est avérée très peu précise, mais sa combinaison avec l'iodométrie a abouti à des courbes de calibration qui ont permis d'étudier la cinétique de dissolution de l'ozone dans l'eau. La dispersion relativement élevée des points expérimentaux est due à des variations continues de l'absorbance entre l'arrêt de l'ozonation et le début de l'analyse spectrophotométrique. Ceci serait probablement dû à des réactions de l'ozone avec la lumière ou diverses impuretés. Par conséquent, il serait fortement recommandé de procéder rapidement à l'analyse de l'échantillon ozoné, à cause de l'instabilité élevée de l'ozone. La corrélation de l'absorbance UV de l'ozone avec l'analyse iodométrique est très importante, car elle permet de conclure qu'au début de l'ozonation avec de faibles doses d'ozone, la quantité d'ozone dissout dans l'eau pure représente près de 14-15 % de celle de l'ozone dissout dans une solution de KI. Ce résultat démontre que l'addition de KI avant l'ozonation déplace l'équilibre vers une consommation accrue de l'ozone qui ne reflète pas la vraie solubilité de ce gaz dans l'eau. Cette consommation d'ozone implique essentiellement l'oxydation de l'ion iodure en molécule biatomique d'iode.

La seconde étape de cette recherche visait l'oxydation catalytique de AL extrait du bouillon de fermentation, qui exerce un effet inhibiteur bien connu d'une production excessive d'acide lactique dans le bouillon de fermentation, ce qui empêcherait la croissance bactérienne et ralentirait la fermentation lactique des produits laitiers. Une exposition à l'ozone de cet extrait simulé a permis de conclure que l'acide lactique se décompose mieux et plus rapidement en présence d'hydrotalcite. Cette dernière, supposée avoir jouée préalablement le rôle d'adsorbant en milieu de fermentation, semble également agir comme catalyseur dans le processus d'ozonation de l'acide lactique. Ce résultat est d'une grande importance, car il fournit la preuve du concept que les adsorbants anioniques tels que les hydroxydes doubles lamellaires peuvent être régénérés par l'ozone.

La méthode spectrométrique s'est avérée très utile pour suivre qualitativement l'évolution de la réaction d'ozonation de l'acide lactique dans le temps à l'aide de ses trois longueurs d'onde à 195, 210 et 265nm. Les déplacements de ces bandes par des effets bathochrome et hypsochrome ont fourni des informations primordiales sur l'apparition de dérivés hydroxylés qui ont accru les interactions avec l'eau, essentiellement par la formation de ponts hydrogène. De ce fait, la bande 210 nm, utilisée pour la détection en chromatographie en phase liquide à haute performance couplée à spectrophotométrie UV-Vis a permis de déceler un dérivé majoritaire précoce plus polaire que l'acide lactique, qui disparaît après des temps d'ozonation de plus de 60 min. Ceci a été confirmé par la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse par temps de vol. Avant l'ozonation, à l'exception de CaMt et MgMt, tous les autres matériaux argileux anionique (Ht) et cationiques (bentonite, montmorillonites et leur dérivés) ont manifesté montrer une affinité plus ou moins prononcée envers la molécule d'acide lactique. L'adsorption de l'acide lactique semble favorisée par l'échange d'anions sur Ht et probablement sur la bentonite qui contient des carbonates ainsi que par la basicité de surface.

L'hydrotalcite a manifesté la plus grande efficacité dans l'élimination de l'acide lactique après seulement 2 min d'ozonation, en accord avec sa plus haute affinité. Ceci serait dû à la contribution de l'adsorption à l'acte catalytique, qui impliquerait un effet bénéfique de l'adsorption de l'ion lactate via l'échange d'anions et/ou de la rétention de AL moléculaire via une interaction hydrophobe. Une imprégnation préalable prolongée de Ht par la solution AL sous agitation continue et vigoureuse a permis de vaincre la difficile délamination du matériau. Le pH du milieu d'ozonation et le potentiel Zeta se sont avérés des facteurs essentiels dans les phénomènes de délamination et de diminution de la taille des grains de catalyseurs, qui ont favorisé l'adsorption de l'acide lactique et l'activité catalytique. Une tentative d'étude cinétique a permis de conclure que tous les catalyseurs induiraient une cinétique de second ordre mais pour des temps d'ozonation différents. Cela indique que l'ozonation dépend fortement de la concentration de AL et de l'ozone.

Les résultats obtenus dans la présente recherche permettent de conclure que les interactions de surface influencent grandement l'activité catalytique de l'hydrotalcite et des minéraux d'argile cationique dans l'ozonation de l'acide lactique. Ces interactions, à leur tour, dépendent fortement du pH du mélange réactionnel, qui détermine non seulement la dissociation des molécules d'acide lactique mais également la dispersion de l'argile dans le milieu aqueux. L'activité catalytique de la bentonite, de la montmorillonite et des homologues activés par l'acide semble impliquer une adsorption hydrophobe de molécules non dissociées d'acide lactique sur des zones sans silanol sur la surface solide à un pH plus élevé que le pKa, mais une rétention de protons provenant de la dissociation d'acide lactique à un pH plus élevé. Les interactions acide-base de Lewis (LAB) et électrostatique des molécules AL sont également possibles sur les silanol dits "dans-le-plan" et "hors-du-plan" en fonction du pH du mélange réactionnel.

Les mélanges d'argiles anionique et cationiques activées à l'acide ont montré de plus grandes efficacités que les matériaux individuels, grâce à l'intensification des interactions hydrophobiques qui favorisent la capture de la molécule de l'acide lactique non dissociée, surtout en bas pH. La combinaison hydrotalcite-smectite semble favoriser la dispersion de l'argile qui améliore l'activité catalytique. Ce résultat est d'une grande importance, car il permet d'envisager une application potentielle des hydroxydes doubles lamellaires dans l'extraction de l'acide lactique à partir de bouillons de fermentation laitière avec régénération consécutive par l'ozone en suspension aqueuse de smectite. Cela ouvre des perspectives prometteuses pour l'utilisation de matériaux naturels inoffensifs et recyclables pour réduire les coûts liés à la production de ferments dans les technologies laitières.

ANNEXE A

TABLEAU 3.1 CONCENTRATION MOLAIRE (M) D'OZONE MESURÉE
PAR IODOMÉTRIE

		Ozone dissous dans l'eau		Solution de KI ozoné
Longueur d'onde (nm)		220nm	306nm	397nm
Coefficient d'extinction molaire ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)		3586	16	9281
Concentration		mM		mM
Débit d'ozone (%)*	10	0.22	4.46E-05	0,2
	20	0.25	5.69E-05	0,4
	30	0.34	5.77E-05	0,45
	40	0.45	0.00017	0,5
	50	0.46	0.00030	0,6
	60	0.49	0.00032	0,65
	70	0.52	0.00033	0,85
	80	0.77	0.00034	0,95
	90	0.84	0.00046	1.5
	100	0.82	0.00079	1

20 mL d'eau distillée introduits dans des tubes à centrifuger de 50 mL, ont été exposés à différents pourcentages d'ozone (0-100%) pendant 5 min. Ils sont ensuite analysés par spectrophotométrie UV-Vis dans une cellule de quartz 1 cm.). Pour la solution KI, 10 échantillons de la solution d'iodure de potassium (KI) ont été introduits dans diverses Erlenmeyers de 250 mL et ensuite ozoné chacun pendant cinq minutes avec le même débit d'air à différentes quantités d'ozone (10% -100%). Chaque solution a été préparée avec 0,5 g de KI et 0,05 g d'iodate de potassium (KIO_3) dans 100 mL d'eau distillée et ensuite complétée à 200 mL avec de l'eau distillé puis acidifiée avec 10 mL d'acide chlorhydrique (HCl) 1M. Après avoir ajouté 7,8 mL de thiosulfate de sodium 0,1 M ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (jaune foncé), la solution a été ozonée comme précédemment. Ensuite, 1 mL d'amidon a été ajouté et la solution devenue bleue a été titrée avec 0,1 M de

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ jusqu'à l'apparition d'une couleur jaune pâle. Toutes les expériences ont été réalisées à une température ambiante.

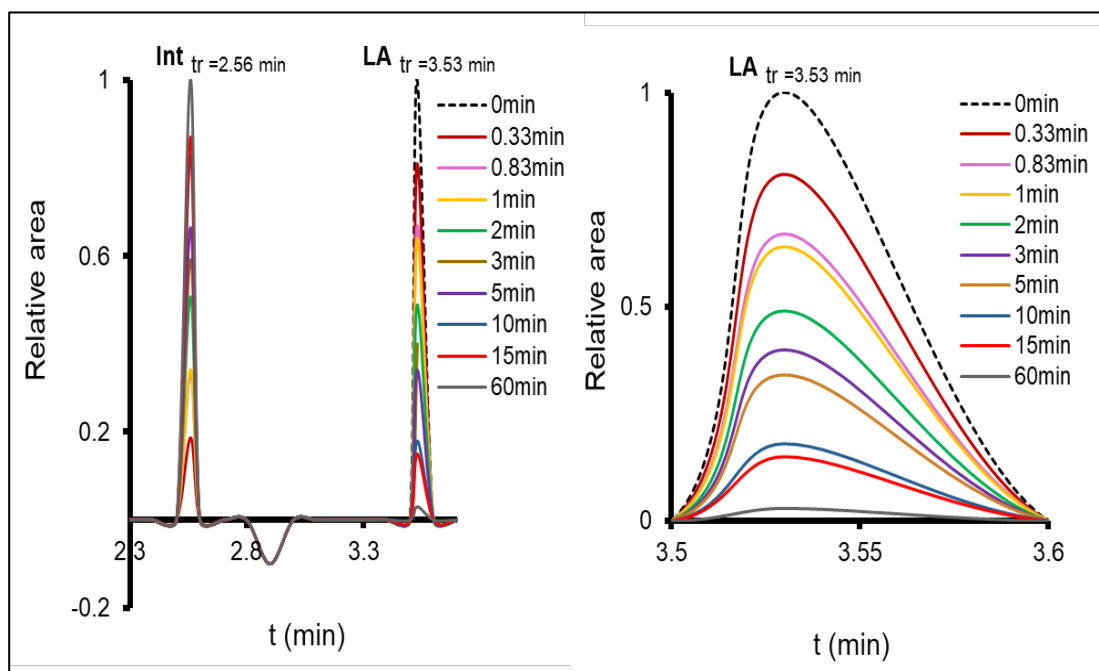
ANNEXE B

TABLEAU 3.2 COMPARAISON DES COEFFICIENTS D'EXTINCTIONS

Systèmes d'ozone	T (K)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon\lambda_{\max}$ (mol ⁻¹ L. cm ⁻¹)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon\lambda_{\max}$ (mol ⁻¹ L. cm ⁻¹)	Réf
O ₃ /CH ₃ OH	201	258	2900	592	5.3	[83]
O ₃ /CHCl ₃	243–213	258	2900	597	7.8	
O ₃ /heptane	243–201	258	2900	601	7.9	
O ₃ /hexane	243–201	258	2900	601	8.0	
O ₃ /isooctane	243–201	258	2900	601	8.1	
CCl ₄	293–245	258	2900	600	8.0	[118]
O ₃ /H ₂ O (5 mol L ⁻¹ HClO ₄)	223	258	2900	588	4.5	[119]
O ₃ /H ₂ O (5 mol L ⁻¹ H ₂ SO ₄)	203	258	2900	588	4.5	
O ₃ /H ₂ O (0.01 mol L ⁻¹ CH ₃ COOH)	293	260	3292	590	5.1	[120]
O ₃ /H ₂ O (0.01 mol L ⁻¹ HClO ₄)	293	258	3600	590	5.1	[121]
O ₃ /H ₂ O(0.15molL ⁻¹ CH ₃ COOH)	291–293	258	3600	590	5.1	
O ₃ gaz		254	3360	601	1.5	
O ₃ / O ₂ liquide	77	-	-	600	2.0	[122]
O ₃ / mélange fréon	-	-	-	600	3.1–3.14	
O ₃ gaz	-	-	-	605	1.32	
100% O ₃ gaz		254	2954	600	1.34	[123]
O ₃ /Gas, impureté d'O ₂ 0.005%,	193–293	253.8	2966.6	602	1.35	[124]
O ₃ / mélange de gaz	293–203	253.6	2999.3	603	1.38	[125]
O ₃ / mélange d'air	297.5	3007.5				[126]
O ₃ /eau distillé	293.15	220	3586	306	16	Ce travail
O ₃ / solution de KI	293.15	380- 423	9281			

ANNEXE C

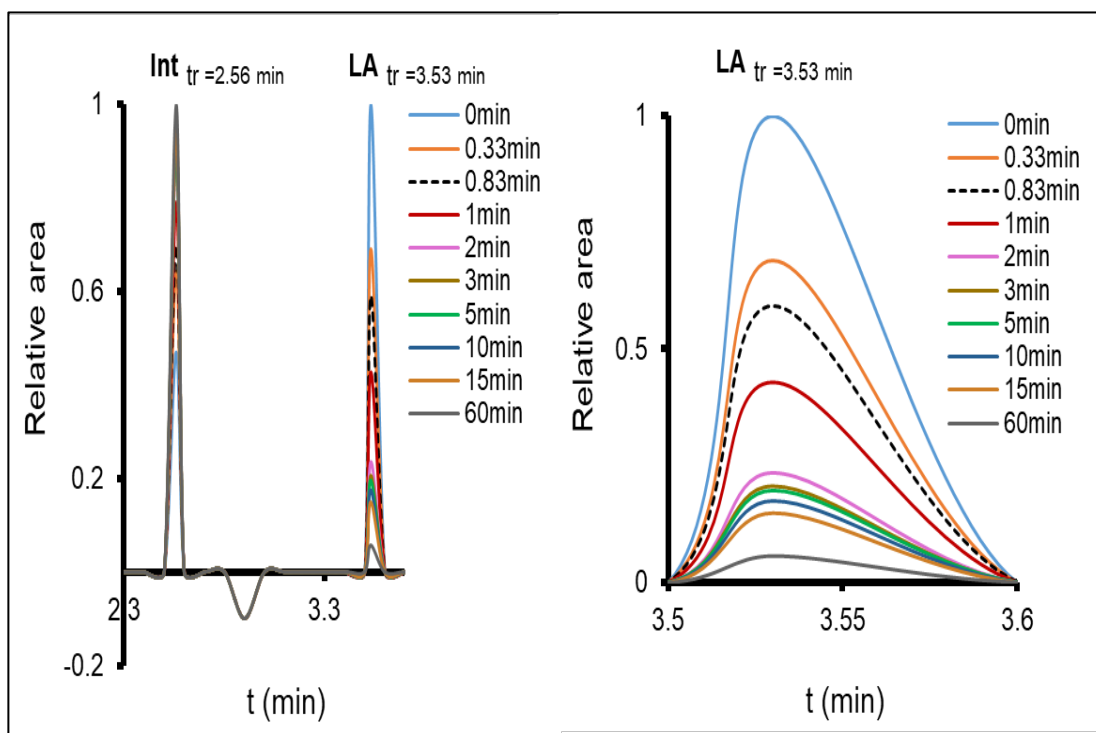
CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN L'ABSENCE DE CATALYSEUR.



9 échantillons contiennent 20 ml de AL (2.5 g. L^{-1}) en solution ont été ozonés à différents temps, à $T=20^\circ\text{C}$, $\text{pH}= 2.80$ et à pression ambiante. Avec un débit d'ozone: 600 mg.h^{-1} . Les analyses ont été effectuées par HPLC-UV avec une colonne Agilent Eclipse plus C18 ($3,5 \mu\text{m}$, $4,6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$). Le débit de la phase mobile (0,06 ml d'acide trifluoroacétique, TFA pour 1 litre d'eau nanopure) a été réglé à une valeur constante de 1 ml.min^{-1} (mode isocratique) avec un volume d'injection de $3 \mu\text{L}$ à 210 nm. Les données ont été traitées par un logiciel d'acquisition STAR.

ANNEXE D

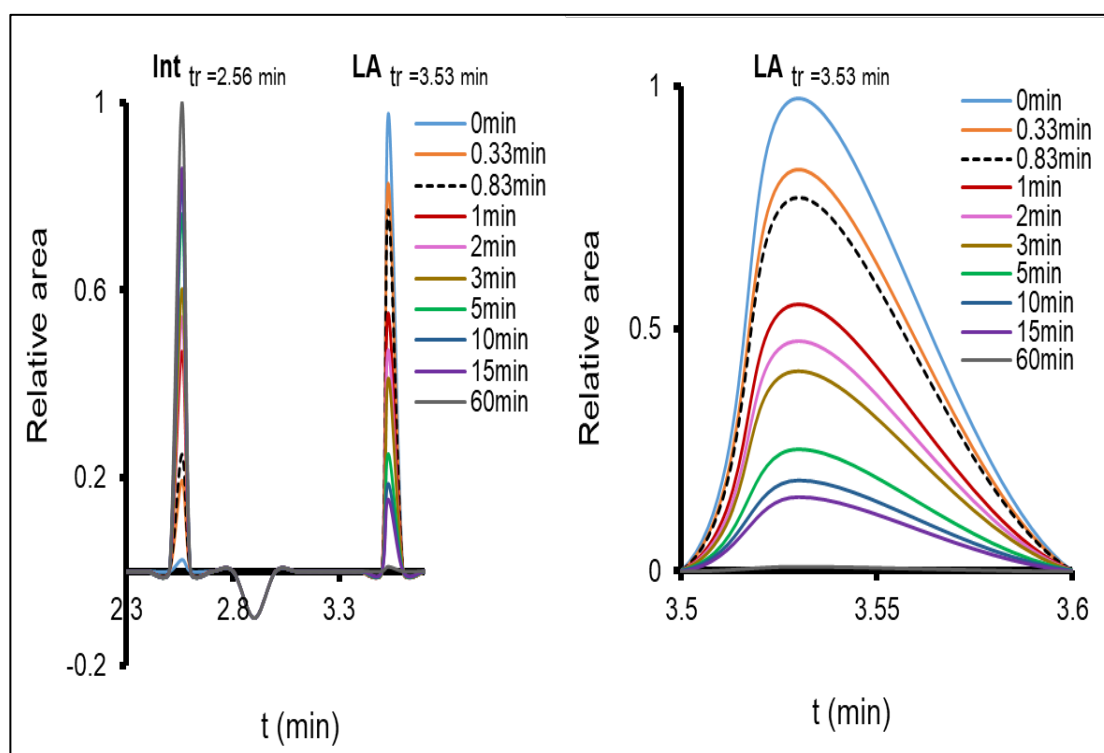
CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE D'HYDROTALCITE.



Le mélange réactionnel a été réalisé en mélangeant 4 mg de minéraux d'argile anionique (Ht) avec 20 ml de solution aqueuse d'acide lactique avec une concentration de $2,5 \text{ g. L}^{-1}$ ($27,75 \text{ mM}$) et $\text{pH}=2,80$. les échantillons ont été agités manuellement pendant 3 min, puis ozonés avec un débit d'ozone de 600mg.h^{-1} à différents temps. Les échantillons ont ensuite centrifugé et filtré avec un filtre de $0,22 \mu\text{m}$. Les mesures ont été effectuées par HPLC-UV à 210 nm .

ANNEXE E

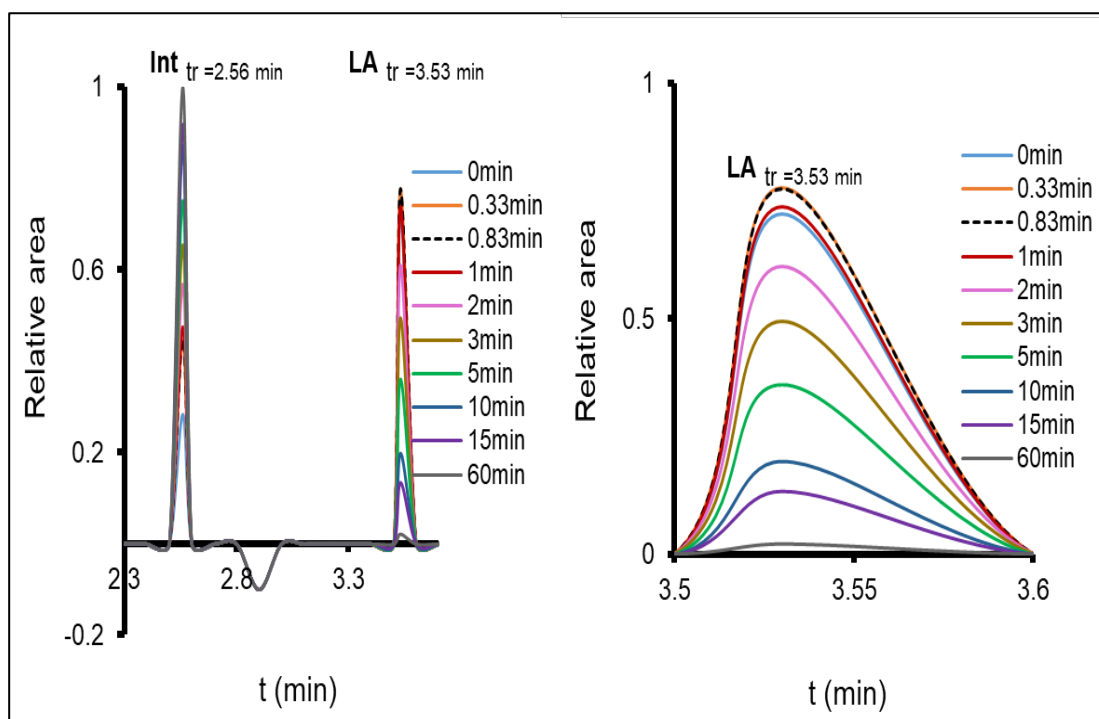
CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE DE NAMT.



Le mélange réactionnel a été réalisé en mélangeant 4 mg de minéraux d'argile cationique (NaMt) avec 20 ml de solution aqueuse d'acide lactique avec une concentration de $2,5 \text{ g. L}^{-1}$ (27,75 mM) et $\text{pH}=2.80$. les échantillons ont été agités manuellement pendant 3 min, puis ozonés avec un débit d'ozone de 600mg.h^{-1} à différents temps. Les échantillons ont ensuite centrifugé et filtré avec un filtre de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Les mesures ont été effectuées par HPLC-UV à 210 nm.

ANNEXE F

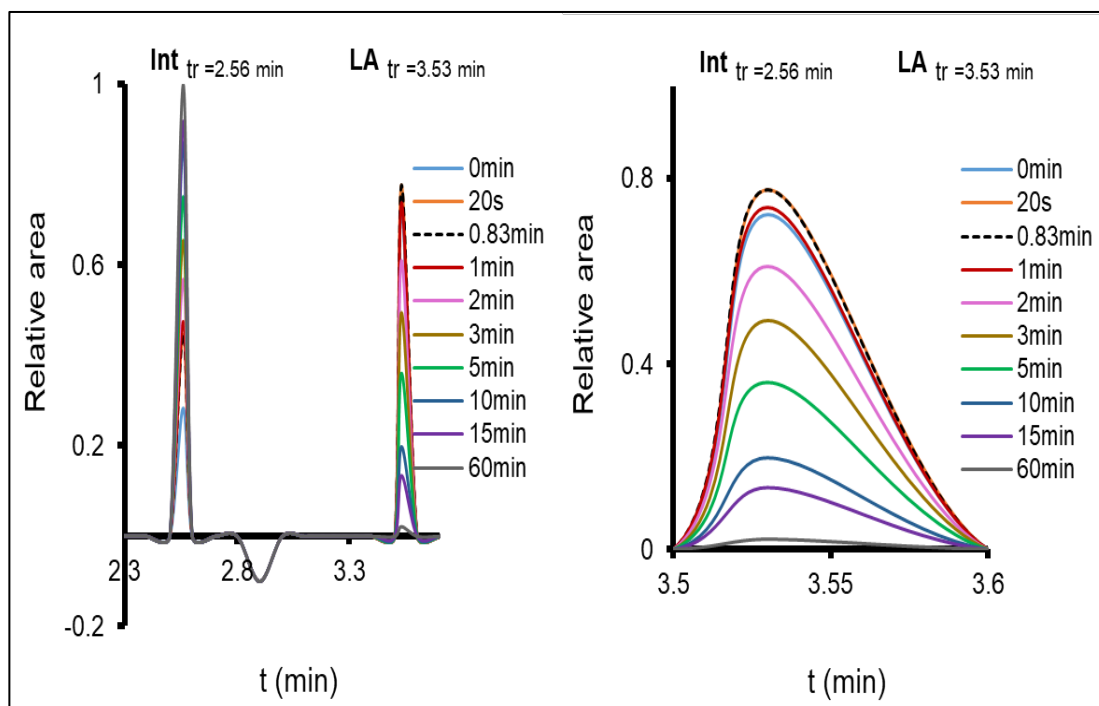
CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE DE HMT-1H.



Le mélange réactionnel a été réalisé en mélangeant 4 mg de bentonite activé à l'acide pendant 1h (HMT) avec 20 ml de solution aqueuse d'acide lactique avec une concentration de $2,5 \text{ g. L}^{-1}$ ($27,75 \text{ mM}$) et $\text{pH}=2.80$. les échantillons ont été agités manuellement pendant 3 min, puis ozonés avec un débit d'ozone de 600mg.h^{-1} à différents temps. Les échantillons ont ensuite centrifugé et filtré avec un filtre de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Les mesures ont été effectuées par HPLC-UV à 210 nm .

ANNEXE G

CHROMATOGRAMMES HPLC-UV DE LA SOLUTION AL APRÈS DIFFÉRENTS TEMPS D'OZONATION EN PRÉSENCE DE CAMT.



Le mélange réactionnel a été réalisé en mélangeant 4 mg de CaMt avec 20 ml de solution aqueuse d'acide Lactique avec une concentration de $2,5 \text{ g. L}^{-1}$ (27,75 mM) et $\text{pH}=2.80$. les échantillons ont été agités manuellement pendant 3 min, puis ozonés avec un débit d'ozone de 600mg.h^{-1} à différents temps. Les échantillons ont ensuite centrifugé et filtré avec un filtre de $0,22 \text{ }\mu\text{m}$. Les mesures ont été effectuées par HPLC-UV à 210 nm.

APPENDICE A

LA SOUMISSION D'ARTICLE DANS LE JOURNAL APPLIED SURFACE SCIENCE

Applied Surface Science Clay-catalyzed ozonation of lactic acid loaded-hydrotalcite in aqueous media-To better understand the role of the surface interactions. --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Lactic acid; Ozonation; Clay catalyst; Hydrotalcite; Montmorillonite
Corresponding Author:	Abdelkrim AZZOUZ, PhD University of Quebec at Montreal Montreal, Quebec CANADA
First Author:	Meriem El Baktaoui, Master
Order of Authors:	Meriem El Baktaoui, Master Nour El Houda Hadj-Abdelkader, Assistant-professor Amina Benghaffour, PhD student Alisa-Vasilica Anus, Professor Nadia Bennani-Daoudji, B.Sc. Fatiha Belkhadem, Professor René Rof, Professor Abdelkrim AZZOUZ, PhD
Abstract:	Hydrotalcite and smectite-type clay mineral showed catalytic activity in the ozonation of lactic acid (LA) in aqueous media simulating extracts from milk fermentation broth. The effect of LA physico-chemical behavior and interaction with the catalyst surface were investigated through measurements of the pH, Zeta potential and particle size. Clay minerals exhibited different catalytic activity according to their structure. LA-LA, LA-Catalyst and catalyst-catalyst interactions were found to be strongly depending on the pH of the reaction mixture, which in turn, appears to determine LA molecule dissociation and clay dispersion in the aqueous media. The catalytic activity of bentonite, montmorillonite and acid-activated counterparts appears to involve hydrophobic adsorption of non-dissociated LA molecules and at most LAB and electrostatic interactions on silica-rich areas on the solid surface in higher pH than the pKa, but proton capture from LA dissociation at higher pH. Hydrotalcite promotes rather hydrophobic interaction and anion-exchange. Hydrotalcite-smectite mixture was found to enhance clay dispersion and catalytic activity. This research allowed demonstrating that natural anionic and cation clay minerals can act as both adsorbent for LA extract from fermentation broths and catalyst for adsorbent regeneration. This has a great positive impact in reducing the seed production costs in dairy technologies.
Suggested Reviewers:	Apichat Boontawan Professor Associate, Suranaree University of Technology apichat@sut.ac.th Expertise in extractive fermentation and product inhibition. Kenji Sonomoto Professor, Kyushu University Faculty of Agriculture Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Sciences: Kyushu Daigaku Nogakubu Daigakuin Seibutsu Shigen Kenkyo Kagakufu sonomoto@agr.kyushu-u.ac.jp Expertise in biomass chemistry and lactic acid production by microbial fermentation process Grazina Juodeikiene, Dr. Habilitus Professor, Kaunas University of Technology: Kauno Technologijos Universitetas grazina.juodeikiene@ktu.lt Expertise in fermentation and food science.

Prof. Abdelkrim AZZOUZ, PhD
Department of Chemistry
Université du Québec à Montréal-UQAM
Case postale 8888, Succursale Centre-Ville
Faculté des Sciences
Montréal (Québec) H3C 3P8

<http://www.nanoqam.uqam.ca/intranet/professeur.php?id=31&language=fr>

Tel: (514) 987-3000 # 4119

Fax: (514) 987-4054

email: azzouz.a@uqam.ca

To the Editor-in-Chief of the
Journal: Applied Surface Science

Montréal, December 17th, 2020

Dear Madame, Dear Sir,

Please find herein, our submission entitled:

Clay-catalyzed ozonation of lactic acid loaded-hydrotalcite in aqueous media-To better understand the role of the surface interactions.

The present work has not been published before, and is not submitted for publication elsewhere. The results presented herein demonstrate that the surface of clay minerals display both adsorption and catalytic activity for lactic acid ozonation. This is an unprecedented strategy that involves: *i.* lactate capture through anion-exchange by a harmless and food-compatible hydrotalcite from aqueous solution simulating milk fermentation broth; *ii.* further adsorbent regeneration by ozone in the presence of clay catalysts outside the fermentation broth. The catalytic activity appears to strongly correlate to diverse surface interactions with lactic species. These interactions were deeply examined in this work.

The novelty of the present research resides in developing a route for reducing the inhibiting effect of excessive production of lactic acid during milk fermentation, which can open promising prospects for dairy technologies and others, and more particularly for probiotic production.

We are convinced that this work will meet a wide readership from both industry and academic areas not only in dairy technologies but also in food, pharmaceutical and cosmetic studies and manufacture. Hopefully, our manuscript will meet the journal requirements. We are looking for your decision in this regard.

Kindest regards.

A.A.

Highlights

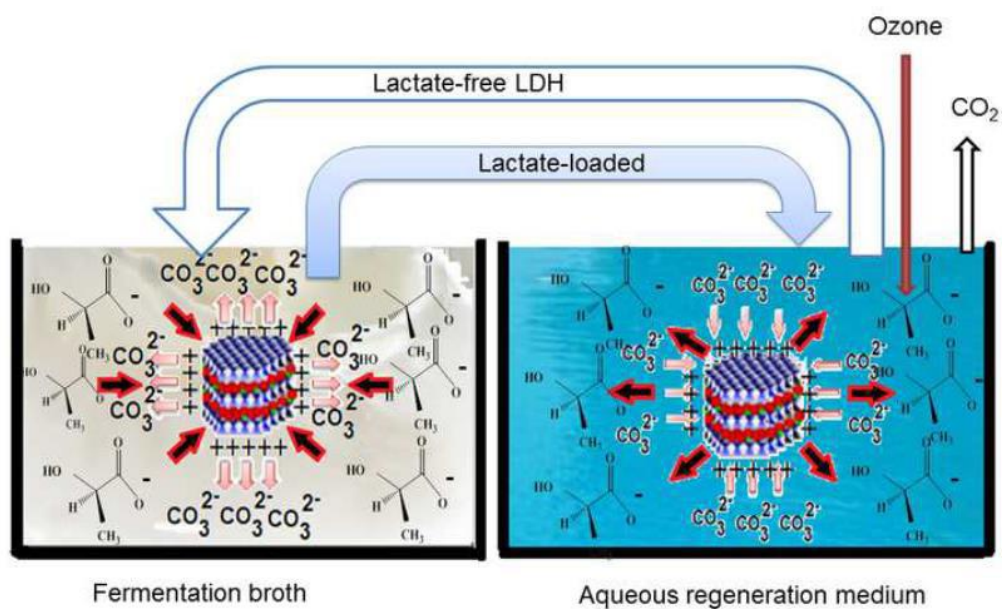
Hydrotalcite reduces of the inhibitory effect of lactic acid in fermentation broth.

Hydrotalcite act as effective adsorbent for lactic acid during milk fermentation.

Ozonation regenerates lactate-loaded hydrotalcite outside the fermentation broth.

Hydrotalcite and acid-activated bentonite show high catalytic activity in ozonation.

Clay minerals promote hydrophobic, Lewis acid-base and electrostatic interactions.



Clay-catalyzed ozonation of lactic acid loaded-hydrotalcite in aqueous media-To better understand the role of the surface interactions.

Meriem El Baktaoui^a, Nour El Houda Hadj-Abdelkader^b, Amina Benghaffour^a, Alisa-Vasilica Arus^c, Nadia Bennani-Daouadji^a, Fatiha Belkhadem^b, René Roy^a, Abdelkrim Azzouz^{a,d,*}

^a *Nanoqam, Department of Chemistry, University of Quebec at Montreal, H3C3P8, Canada.*

^b *LEMEN, Department of Materials Engineering, University of Science and Technology, El M'naouer, BP-1505, Oran, Algeria*

^c *Catalysis and Microporous Materials Laboratory, Vasile-Alecsandri University of Bacau, Romania.*

^d *Corresponding author: Pr. Abdelkrim AZZOUZ*

^d *École de Technologie Supérieure, Montréal, Québec, H3C 1K3, Canada*

E-mail : azzouz.a@uqam.ca; Tel: 1 514 987 3000 Ext. 4119, Fax: 1 514 987 4054

Abstract

Hydrotalcite and smectite-type clay mineral showed catalytic activity in the ozonation of lactic acid (LA) in aqueous media simulating extracts from milk fermentation broth. The effect of LA physico-chemical behavior and interaction with the catalyst surface were investigated through measurements of the pH, Zeta potential and particle size. Clay minerals exhibited different catalytic activity according to their structure. LA-LA, LA-Catalyst and catalyst-catalyst interactions were found to be strongly depending on the pH of the reaction mixture, which in turn, appears to determine LA molecule dissociation and clay dispersion in the aqueous media. The catalytic activity of bentonite, montmorillonite and acid-activated counterparts appears to involve hydrophobic adsorption of non-dissociated LA molecules and at most LAB and electrostatic interactions on silica-rich areas on the solid surface in higher pH than the pKa, but proton capture from LA dissociation at higher pH. Hydrotalcite promotes rather hydrophobic interaction and anion-exchange. Hydrotalcite-smectite mixture was found to enhance clay dispersion and catalytic activity. This research allowed demonstrating that natural anionic and cation clay minerals can act as both adsorbent for LA extract from fermentation broths and catalyst for adsorbent regeneration. This has a great positive impact in reducing the seed production costs in dairy technologies.

Keywords: *Lactic acid; Ozonation; Clay catalyst; Hydrotalcite; Montmorillonite.*

BIBLIOGRAPHIE

1. Datta, R. and M. Henry, *Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2006. **81**(7): p. 1119-1129.
2. Varadarajan, S. and D.J. Miller, *Catalytic Upgrading of Fermentation-Derived Organic Acids*. Biotechnology Progress, 1999. **15**(5): p. 845-854.
3. Schell, T.C., et al., *Effects of feeding aflatoxin-contaminated diets with and without clay to weanling and growing pigs on performance, liver function, and mineral metabolism*. J Anim Sci, 1993. **71**(5): p. 1209-18.
4. Abdel-Rahman, M.A., Y. Tashiro, and K. Sonomoto, *Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes*. Biotechnology advances, 2013. **31**(6): p. 877-902.
5. Aguirre-Ezkauriatza, E.J., et al., *Production of probiotic biomass (Lactobacillus casei) in goat milk whey: Comparison of batch, continuous and fed-batch cultures*. Bioresource Technology, 2010. **101**(8): p. 2837-2844.
6. Schiraldi, C., et al., *High cell density cultivation of probiotics and lactic acid production*. Biotechnology and bioengineering, 2003. **82**(2): p. 213-222.
7. Srivastava, A., P.K. Roychoudhury, and V. Sahai, *Extractive lactic acid fermentation using ion - exchange resin*. Biotechnology and bioengineering, 1992. **39**(6): p. 607-613.
8. Boyaval, P., C. Corre, and S. Terre, *Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electrodialysis*. Biotechnology Letters, 1987. **9**(3): p. 207-212.

9. Nomura, Y., M. Iwahara, and M. Hongo, *Lactic acid production by electrodialysis fermentation using immobilized growing cells*. Biotechnol Bioeng, 1987. **30**(6): p. 788-93.
10. Yabannavar, V.M. and D.I.C. Wang, *Extractive fermentation for lactic acid production*. Biotechnology and Bioengineering, 1991. **37**(11): p. 1095-1100.
11. Kim, Y.H. and S.-H. Moon, *Lactic acid recovery from fermentation broth using one-stage electrodialysis*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2001. **76**(2): p. 169-178.
12. Boonmee, M., et al., *Improved Lactic Acid Production by In Situ Removal of Lactic Acid During Fermentation and a Proposed Scheme for Its Recovery*. Arabian Journal for Science and Engineering, 2016. **41**(6): p. 2067-2075.
13. Krzyżaniak, A., et al., *Novel extractants for the recovery of fermentation derived lactic acid*. Separation and Purification Technology, 2013. **111**: p. 82-89.
14. Boontawan, P., S. Kanchanathawee, and A. Boontawan, *Extractive fermentation of l-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using electrodeionization (EDI) technique*. Biochemical Engineering Journal, 2011. **54**(3): p. 192-199.
15. Gao, M.-T., et al., *pH-Uncontrolled lactic acid fermentation with activated carbon as an adsorbent*. Enzyme and microbial technology, 2011. **48**(6-7): p. 526-530.
16. Chen, L., et al., *A novel process for recovery and refining of l-lactic acid from fermentation broth*. Bioresource Technology, 2012. **112**: p. 280-284.
17. Gao, M.-T., et al., *Extractive lactic acid fermentation with tri-n-decylamine as the extractant*. Enzyme and Microbial Technology, 2009. **44**(5): p. 350-354.
18. Othman, M., et al., *Extractive Fermentation of Lactic Acid in Lactic Acid Bacteria Cultivation: A Review*. Frontiers in Microbiology, 2017. **8**(2285).

19. Abdel-Rahman, M.A., Y. Tashiro, and K. Sonomoto, *Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits*. Journal of Biotechnology, 2011. **156**(4): p. 286-301.
20. Hábová, V., et al., *Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth*. Desalination, 2004. **162**: p. 361-372.
21. ARUS, A.V., et al., *Use of some clay matrices in biotechnology of acid dairy products*. Food and Environment Safety Journal, 2017. **9**(2).
22. Azzouz, A., et al., *Lactic Acid Retention by CO₃-Mg-Al Layered Double Hydroxides for Improved Milk Clotting - An approach through acidity measurements*. Revista de Chimie (Bucharest), 2016. **67**(7): p. 1348-1355.
23. Azzouz, A., et al., *Procedeu de cultivare a bacteriilor lactice (variante)*, in *Buletin oficial de proprietate industrială (BOPI)*, A.d.S.p.P. Intelectuală, Editor. 2006: Republic of Moldova.
24. Shahidi, D., R. Roy, and A. Azzouz, *Advances in catalytic oxidation of organic pollutants – Prospects for thorough mineralization by natural clay catalysts*. Applied Catalysis B: Environmental, 2015. **174-175**: p. 277-292.
25. Boudissa, F., et al., *Acid-treated clay catalysts for organic dye ozonation – Thorough mineralization through optimum catalyst basicity and hydrophilic character*. Journal of Hazardous Materials, 2019. **364**: p. 356-366.
26. Mirilă, D.-C., et al., *Organic Dye Ozonation Catalyzed by Chemically Modified Montmorillonite K10– Role of Surface Basicity and Hydrophilic Character*. Ozone: Science & Engineering, 2020: p. 1-14.
27. Larouk, S., et al., *Catalytic ozonation of Orange-G through highly interactive contributions of hematite and SBA-16 – To better understand azo-dye oxidation in nature*. Chemosphere, 2017. **168**: p. 1648-1657.
28. Ouargli, R., et al., *Intrinsic activity of SBA-like silica in the catalytic ozonation of organic pollutants*. Ozone: Science & Engineering, 2016. **38**(1): p. 48-61.

29. Ghaffar, T., et al., *Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on production to purification*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences, 2014. **7**(2): p. 222-229.
30. Juodeikiene, G., et al., *Green metrics for sustainability of biobased lactic acid from starch biomass vs chemical synthesis*. Catalysis Today, 2015. **239**: p. 11-16.
31. Rawlings, A.V., et al., *Effect of lactic acid isomers on keratinocyte ceramide synthesis, stratum corneum lipid levels and stratum corneum barrier function*. Archives of Dermatological Research, 1996. **288**(7): p. 383-390.
32. McHugh, J., et al., *New and Simple HPLC Method for the Determination of Lactic Acid Content in Ciprofloxacin Injection*. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2006. **29**(13): p. 1905-1916.
33. Bizzari, S. and A. Kishi, *Lactic Acid, its Salts and Esters. Chemical Economics Handbook*. Menlo Park, Calif., SRI Int, 2003.
34. Howard, P.H., *Handbook of physical properties of organic chemicals*. 1996: CRC press.
35. Wood, E., *Data for biochemical research by RMC Dawson, DC Elliott, WH Elliott and KM Jones, pp 580. Oxford Science Publications, OUP, Oxford, 1986.£ 35/\$59. ISBN 0 - 19 - 855358 - 7*. Biochemical Education, 1987. **15**(2): p. 97-97.
36. Silva, A.M., X. Kong, and R.C. Hider, *Determination of the pKa value of the hydroxyl group in the α -hydroxycarboxylates citrate, malate and lactate by ^{13}C NMR: implications for metal coordination in biological systems*. BioMetals, 2009. **22**(5): p. 771-778.
37. GESTIS, *GESTIS-database on hazardous substances: information system on hazardous substances of the German Social Accident Insurance*. 2015, Institut für Arbeitsschutz der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung (IFA).
38. Haynes, W.M., *CRC handbook of chemistry and physics*. 2014: CRC press.

39. Guard, U.-U.C., *Chemical Hazard Response Information System (CHRIS)-Hazardous Chemical Data. Commandant Instruction 16465.12 C.* 1999, Washington, DC: US Government Printing Office.
40. Luedeking, R. and E.L. Piret, *A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH.* Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering, 1959. **1**(4): p. 393-412.
41. Halim, M., et al., *Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat.* LWT - Food Science and Technology, 2017. **81**: p. 210-216.
42. Bu'Lock, J.D. and B. Kristiansen, *Basic biotechnology/edited by John Bu'Lock, Bjorn Kristiansen.* 1987: Academic press.
43. Glazer, A.N. and H. Nikaido, *Microbial biotechnology : fundamentals of applied microbiology.* 1995: New York (N.Y.) : Freeman.
44. Dougherty, D.P., et al., *Energy-based dynamic model for variable temperature batch fermentation by *Lactococcus lactis*.* Applied and environmental microbiology, 2002. **68**(5): p. 2468-2478.
45. *Food Technology and Biotechnology.* Food Technology and Biotechnology.
46. Broadbent, J.R., et al., *Physiological and Transcriptional Response of *Lactobacillus casei* ATCC 334 to Acid Stress.* Journal of Bacteriology, 2010. **192**(9): p. 2445.
47. Wee, Y., J. Kim, and H. Ryu, *Biotechnological production of lactic acid and its recent applications.* Food Technol. Biotechnol., 2006. **44**(2): p. 163-172.
48. Ilmén, M., et al., *Efficient Production of *Lactobacillus*-Lactic Acid from Xylose by *Pichia stipitis*.* Applied and Environmental Microbiology, 2007. **73**(1): p. 117.

49. Ilmén, M., et al., *Efficient production of L-lactic acid from xylose by Pichia stipitis*. Appl. Environ. Microbiol., 2007. **73**(1): p. 117-123.
50. 3 - *MECHANISMS OF UV STABILIZATION*, in *Handbook of UV Degradation and Stabilization (Second Edition)*, G. Wypych, Editor. 2015, ChemTec Publishing. p. 37-65.
51. Bejoy, N., *Hydrotalcite*. Resonance, 2001. **6**(2): p. 57-61.
52. Rackley, S.A., 7 - *Adsorption capture systems*, in *Carbon Capture and Storage (Second Edition)*, S.A. Rackley, Editor. 2017, Butterworth-Heinemann: Boston. p. 151-185.
53. Bailey, S.E., et al., *A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals*. Water research, 1999. **33**(11): p. 2469-2479.
54. Venaruzzo, J., et al., *Modified bentonitic clay minerals as adsorbents of CO, CO₂ and SO₂ gases*. Microporous and Mesoporous Materials, 2002. **56**(1): p. 73-80.
55. Nazarenko, S., et al., *Gas barrier of polystyrene montmorillonite clay nanocomposites: effect of mineral layer aggregation*. Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, 2007. **45**(13): p. 1733-1753.
56. Okamoto, M., *Biodegradable Polymer/Layered Silicate Nanocomposites: A Review*. Journal of Industrial and Engineering Chemistry, 2004. **10**(7): p. 1156-1181.
57. Pusch, R., *Bentonite clay: environmental properties and applications*. 2015: CRC Press.
58. Bergaya, F. and G. Lagaly, *Chapter 1 General Introduction: Clays, Clay Minerals, and Clay Science*, in *Developments in Clay Science*, F. Bergaya, B.K.G. Theng, and G. Lagaly, Editors. 2006, Elsevier. p. 1-18.
59. Durán, J.D.G., et al., *Rheological and Electrokinetic Properties of Sodium Montmorillonite Suspensions: I. Rheological Properties and Interparticle*

Energy of Interaction. Journal of Colloid and Interface Science, 2000. **229**(1): p. 107-117.

60. Bouberka, Z., et al., *Removal of Supranol Yellow 4GL by adsorption onto Cr-intercalated montmorillonite*. Journal of Hazardous Materials, 2006. **133**(1): p. 154-161.
61. Sulpizi, M., M.-P. Gaigeot, and M. Sprik, *The Silica–Water Interface: How the Silanols Determine the Surface Acidity and Modulate the Water Properties*. Journal of Chemical Theory and Computation, 2012. **8**(3): p. 1037-1047.
62. Almeida, C.A.P., et al., *Removal of methylene blue from colored effluents by adsorption on montmorillonite clay*. Journal of Colloid and Interface Science, 2009. **332**(1): p. 46-53.
63. Chandrasekhar, S. and P. Pramada, *Rice husk ash as an adsorbent for methylene blue—effect of ashing temperature*. Adsorption, 2006. **12**(1): p. 27.
64. Hamdaoui, O., *Batch study of liquid-phase adsorption of methylene blue using cedar sawdust and crushed brick*. Journal of hazardous materials, 2006. **135**(1-3): p. 264-273.
65. Baek, M.-H., C.O. Ijagbemi, and D.-S. Kim, *Spectroscopic studies on the oxidative decomposition of Malachite Green using ozone*. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2010. **45**(5): p. 630-636.
66. Chasanah, U., et al., *Evaluation of Titration Method on Determination of Ozone Concentration produced by Dielectric Barrier Discharge Plasma (DBDP) Technology*. Journal of Physics Conference Series, 2019. **1153**: p. 012086.
67. Dinca, M.-N., et al., *UV absorption spectra, Iodometric determination and pH variation in ozonated water using ozone generator*. 2018.
68. Rachmat Triandi, T., R. Dhesy Galuh, and W. Sri, *Ozone Determination: A Comparison of Quantitative Analysis Methods*. Journal of Pure and Applied Chemistry Research, 2012. **1**(1): p. 18-25.

69. Lucas, M.S., J.A. Peres, and G. Li Puma, *Treatment of winery wastewater by ozone-based advanced oxidation processes (O₃, O₃/UV and O₃/UV/H₂O₂) in a pilot-scale bubble column reactor and process economics*. Separation and Purification Technology, 2010. **72**(3): p. 235-241.
70. Jurado-Alameda, E., et al., *Ozone degradation of alkylbenzene sulfonate in aqueous solutions using a stirred tank reactor with recirculation*. Journal of Environmental Science and Health, Part A, 2012. **47**(14): p. 2205-2212.
71. Mokoena, M., et al., *Appraisal of ozone as biologically active molecule and experimental tool in biomedical sciences*. Medicinal Chemistry Research, 2011. **20**(9): p. 1687-1695.
72. Tjahjanto, R.T., G.R. Dhesy, and S. Wardhani, *Ozone determination: A comparison of quantitative analysis methods*. The Journal of Pure and Applied Chemistry Research, 2012. **1**(1): p. 18.
73. Robinson, T., et al., *Remediation of dyes in textile effluent: a critical review on current treatment technologies with a proposed alternative*. Bioresource Technology, 2001. **77**(3): p. 247-255.
74. Chu, W. and C.-W. Ma, *Quantitative prediction of direct and indirect dye ozonation kinetics*. Water Research, 2000. **34**(12): p. 3153-3160.
75. Smith, W., *Principles of ozone generation*. Watertec Engineering Pty Ltd., Australia, 2011: p. 1-17.
76. Barsan, M.E., *NIOSH pocket guide to chemical hazards*. 2007.
77. Environmental, U., *Protection Agency*. 1990. Quality assurance project plan for characterization sampling and treatment tests conducted for the Contaminated Soil and Debris (CSD) Program: Washington, DC, USEPA Office of Solid Waste, 1990.
78. Program, N.T., *Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health (NTP)*. 1992. National Toxicology Program Chemical Repository Database. Research Triangle Park, North Carolina: NTP via httn.canieochemicals.noaa.gov/chemical/20568.

79. Kuraica, M.M., et al., *Ozonized water generator based on coaxial dielectric-barrier-discharge in air*. Vacuum, 2004. **73**(3): p. 705-708.
80. Oh, J.-S., et al., *In-situ UV absorption spectroscopy for observing dissolved ozone in water*. Journal of Photopolymer Science and Technology, 2016. **29**(3): p. 427-432.
81. Nadhifa, S., R. Afriansyah, and S. Bismo, *Ozone generation process using parallel plates plasma reactor at room temperature*. MATEC Web of Conferences, 2018.
82. Osawa, N., et al., *Effect of nitrogen addition to ozone generation characteristics by diffuse and filamentary dielectric barrier discharges at atmospheric pressure*. The European Physical Journal Applied Physics, 2017. **78**(2): p. 20804.
83. Ershov, B.G. and N.M. Panich, *Spectrophotometric determination of ozone in solutions: Molar absorption coefficient in the visible region*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2019. **217**: p. 39-43.
84. Jaber, S.F., *Study on Absorption of Ozone in Water Using Perforated Sieve Tray Column*. Journal of Engineering, 2009. **15**(4): p. 4438-4446.
85. Ershov, B.G. and N.M. Panich, *The solubility and decomposition of ozone in solutions of sulfuric and perchloric acids in the temperature range from 25 to -70°C*. Doklady Physical Chemistry, 2015. **465**(1): p. 279-282.
86. Sommer, L., *Analytical absorption spectrophotometry in the visible and ultraviolet: the principles*. 2012: Elsevier.
87. Ferrer, I. and E.M. Thurman, *Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2003. **22**(10): p. 750-756.
88. Ermrich, M. and D. Opper, *XRD for the analyst*. Getting acquainted with the principles. Second. Panalytical, 2013.

89. Shahidi, D., R. Roy, and A. Azzouz, *Total removal of oxalic acid via synergistic parameter interaction in montmorillonite catalyzed ozonation*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014. **2**(1): p. 20-30.
90. Arus, V.A., et al., *Intrinsic affinity of acid-activated bentonite towards hydrogen and carbon dioxide*. international journal of hydrogen energy, 2018. **43**(16): p. 7964-7972.
91. Rakness, K., et al., *Guideline for measurement of ozone concentration in the process gas from an ozone generator*. 1996.
92. Reeser, D.I. and D.J. Donaldson, *Influence of water surface properties on the heterogeneous reaction between $O_3(g)$ and $I(aq)$* . Atmospheric Environment, 2011. **45**(34): p. 6116-6120.
93. Staehelin, J. and J. Hoigne, *Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions*. Environmental Science & Technology, 1985. **19**(12): p. 1206-1213.
94. McClurkin, J. and D. Maier, *Half-life time of ozone as a function of air conditions and movement*. Julius-Kühn-Archiv, 2010(425): p. 381.
95. Gurol, M.D. and P.C. Singer, *Kinetics of ozone decomposition: a dynamic approach*. Environmental science & technology, 1982. **16**(7): p. 377-383.
96. Azzouz, A., et al., *Lactic Acid Retention by CO_3 -Mg-Al Layered Double Hydroxides for Improved Milk Clotting An approach through acidity measurements*. REVISTA DE CHIMIE, 2016. **67**(7): p. 1348-1355.
97. Azzouz, A., et al., *Methods for cell growth and productivity improvement of lactic seeds (various proposal)*, in *BOPI, AGEPI*, Editor. 2006, Univeristy of Bacau (Romania)-State University of Chisinau ((Republic of Moldova): Republic of Moldova.
98. Walter, R.H. and R.M. Sherman, *Ozonation of Lactic Acid Fermentation Effluent*. Journal (Water Pollution Control Federation), 1974. **46**(7): p. 1800-1803.

99. Walter, R. and R. Sherman, *Kinetics of the lactate-ozone reaction in an open-loop system*. Journal (Water Pollution Control Federation), 1976: p. 748-752.
100. Azzouz, A., et al., *Ozonation of oxalic acid catalyzed by ion-exchanged montmorillonite in moderately acidic media*. Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis, 2010. **99**: p. 289-302.
101. Boudissa, F., et al., *Acid-treated clay catalysts for organic dye ozonation—Thorough mineralization through optimum catalyst basicity and hydrophilic character*. Journal of hazardous materials, 2019. **364**: p. 356-366.
102. Mirilă, D.-C., et al., *Organic Dye Ozonation Catalyzed by Chemically Modified Montmorillonite K10—Role of Surface Basicity and Hydrophilic Character*. Ozone: Science & Engineering, 2020: p. 1-14.
103. Shahidi, D., et al., *Total mineralization of sulfamethoxazole and aromatic pollutants through Fe²⁺-montmorillonite catalyzed ozonation*. J Hazard Mater, 2015. **298**: p. 338-50.
104. Larouk, S., et al., *Catalytic ozonation of Orange-G through highly interactive contributions of hematite and SBA-16—To better understand azo-dye oxidation in nature*. Chemosphere, 2017. **168**: p. 1648-1657.
105. Boudissa, F., et al., *Clay-catalyzed ozonation of endocrine-disrupting compounds in solvent-free media—to better understand soil catalytic capacity*. Dalton Transactions, 2020.
106. Tyagi, B., C.D. Chudasama, and R.V. Jasra, *Determination of structural modification in acid activated montmorillonite clay by FT-IR spectroscopy*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2006. **64**(2): p. 273-278.
107. Komadel, P., et al., *Acidity and catalytic activity of mildly acid-treated Mg-rich montmorillonite and hectorite*. Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions, 1997. **93**(23): p. 4207-4210.

108. Torii, T., et al., *Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability*. Ann Clin Biochem, 2010. **47**(Pt 5): p. 447-52.
109. Czauderna, M. and J. Kowalczyk, *Lactic acid can be easily and precisely determined by reversed-phase high performance liquid chromatography with *pre*-column derivatization*. Journal of Animal and Feed Sciences, 2008. **17**(2): p. 268-279.
110. Information, N.C.f.B., *National Center for Biotechnology Information (2020). PubChem Compound Summary for CID 54178311, Lactoyllactic acid*. Retrieved November 29, 2020 from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Lactoyllactic-acid>. 2020, National Center for Biotechnology Information.
111. Walter, R.H. and R.M. Sherman, *Kinetics of the Lactate-Ozone Reaction in an Open-Loop System*. Journal (Water Pollution Control Federation), 1976. **48**(4): p. 748-752.
112. Splittstoesser, D. and M. Wilkison, *Some factors affecting the activity of diethylpyrocarbonate as a sterilant*. Applied microbiology, 1973. **25**(6): p. 853-857.
113. Ehrenberg, L., I. Fedorcsak, and F. Solymosy, *Diethyl pyrocarbonate in nucleic acid research*, in *Progress in nucleic acid research and molecular biology*. 1976, Elsevier. p. 189-262.
114. Lowenstein, J., *Ammonia production in muscle and other tissues: the purine nucleotide cycle*. Physiological reviews, 1972. **52**(2): p. 382-414.
115. Pereira, C.S., V.M. Silva, and A.E. Rodrigues, *Ethyl lactate as a solvent: properties, applications and production processes—a review*. Green Chemistry, 2011. **13**(10): p. 2658-2671.
116. Matsuura, Y., A. Onda, and K. Yanagisawa, *Selective conversion of lactic acid into acrylic acid over hydroxyapatite catalysts*. Catalysis Communications, 2014. **48**: p. 5-10.

117. Chahal, S.P. and J.N. Starr, *Lactic acid*. Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry, 2000.
118. Panich, N.M. and B.G. Ershov, *Optical Properties and Solubility of Ozone in CCl₄ at Low Temperature*. Russian Journal of General Chemistry, 2018. **88**(6): p. 1071-1075.
119. Yoneda, N. and G.A. Olah, *Oxyfunctionalization of hydrocarbons. 7. Oxygenation of 2,2-dimethylpropane and 2,2,3,3-tetramethylbutane with ozone or hydrogen peroxide in superacid media*. Journal of the American Chemical Society, 1977. **99**(9): p. 3113-3119.
120. Hart, E.J., K. Sehested, and J. Holoman, *Molar absorptivities of ultraviolet and visible bands of ozone in aqueous solutions*. Analytical Chemistry, 1983. **55**(1): p. 46-49.
121. Taube, H., *Photochemical reactions of ozone in solution*. Transactions of the Faraday Society, 1957. **53**(0): p. 656-665.
122. Kirshenbaum, A. and A. Streng, *Molar extinction coefficients of liquid O₃F₂, O₂F₂, and O₃ in the visible range*. The Journal of Chemical Physics, 1961. **35**(4): p. 1440-1442.
123. Griggs, M., *Absorption Coefficients of Ozone in the Ultraviolet and Visible Regions*. Journal of Chemical Physics, 1968. **49**: p. 857.
124. Serdyuchenko, A., et al., *High spectral resolution ozone absorption cross-sections – Part 2: Temperature dependence*. Atmos. Meas. Tech., 2014. **7**(2): p. 625-636.
125. Bogumil, K., et al., *Measurements of molecular absorption spectra with the SCIAMACHY pre-flight model: instrument characterization and reference data for atmospheric remote-sensing in the 230–2380 nm region*. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 2003. **157**(2): p. 167-184.
126. Dufour, G., et al., *Concentration measurements of ozone in the 1200-300ppbv range: an intercomparison between the BNM ultraviolet standard and infrared*

methods. Spectrochimica acta. Part A, Molecular and biomolecular spectroscopy, 2004. **60**(14): p. 3345-3352.