



AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact : ddoc-memoires-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

**Rapport de Projet de Fin d'Etudes
- Promo 2017 -**

**Synthèse d'alcool furfurylique par voie
blanche**

**Justine MAYEUR, Lise MOULIN
2016 / 2017**

**Enseignants responsables : Arnaud BESSERER, Emmanuel
FREDON**

REMERCIEMENTS

Nous tenons tout d'abord à remercier Messieurs BESSERER et FREDON de nous avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet enrichissant, de nous avoir accompagnées et conseillées au long de ces 5 mois . Nous remercions les acteurs du projet FURALOR d'avoir soumis ce sujet tourné vers l'avenir et novateur. Merci également à Monsieur MASSON, Christelle et Marie-Laure pour leur disponibilité et leur aide. Nos remerciements vont également à Monsieur GIRODS pour le temps qu'il nous a accordé lors de la réalisation de charbon. Aurélie BICHOT et Marion CLERC sont également vivement remerciées pour nous avoir donné envie de travailler sur ce beau projet. Enfin, nous tenions à remercier Maxence et tous ceux qui nous ont offert leur aide.

SOMMAIRE

Remerciements.....	2
Introduction.....	4
I. Lyse des hémicelluloses en xylose.....	6
A. Introduction	6
B. Matériel et méthodes	8
1. <i>Choix de la souche</i>	8
2. <i>Mesure de l'activité enzymatique</i>	8
3. <i>Mise en culture liquide de T. reesei</i>	10
4. <i>Etude la consommation du lactose</i>	11
5. <i>Etude de la production de xylose</i>	11
C. Résultats et Discussion	11
1. <i>Développement des cultures</i>	11
2. <i>Mesure du xylose</i>	15
II. Déshydratation du xylose en furfural	23
A. Introduction	23
B. Matériel et méthodes	24
1. <i>Charbon</i>	24
2. <i>Réacteur</i>	24
C. Résultats et discussion.....	24
III. Réduction du furfural en alcool furfurylique	26
A. Introduction	26
B. Matériel et méthodes	27
1. <i>Choix de la souche</i>	27
2. <i>Mise en culture des levures</i>	28
3. <i>Milieu liquide YPD</i>	28
4. <i>Suivi de la croissance</i>	28
5. <i>Mesure de l'activité enzymatique</i>	28
6. <i>Conditions de culture des levures</i>	28
C. Résultats et discussion.....	28
1. <i>Croissance des levures</i>	28
2. <i>Activité enzymatique</i>	29
IV. Vers une production à plus grande échelle : bilan et objectifs	32
A. Mise en place d'un procédé en continu	32
1. <i>Introduction</i>	32
2. <i>Matériels et méthodes</i>	32
3. <i>Résultats et discussions</i>	33
B. Rendement global.....	34
CONCLUSION	36
BIBLIOGRAPHIE	37
ANNEXES	I
Annexe I : la catalyse enzymatique.....	I
Annexe II : chromatographie HPLC.....	II
Annexe III: calcul de Vm et Km	IV
PROTOCOLES	VIII
RESUME	II

INTRODUCTION

Le département des Vosges est le 3^{ème} département le plus boisé de France (53% du territoire), après les Landes (65%) et le Var (63%). Si l'on s'intéresse plus précisément au pays d'Epinal, cœur des Vosges, le taux de boisement atteint 42%, majoritairement du hêtre. Actuellement, il est principalement utilisé dans l'ameublement, mais on cherche à développer l'emploi de cette essence dans la construction, malgré ses propriétés mécaniques médiocres et sa faible résistance aux attaques extérieures.

La marque collective « Terre de hêtre » vise à développer, valoriser et diversifier l'utilisation du hêtre dans le cadre d'une dynamisation de l'économie locale. De nombreux acteurs de la filière bois s'investissent dans ce projet, de la gestion forestière à la menuiserie en passant par la recherche et la première transformation.

Afin d'améliorer les propriétés mécaniques et la durabilité de cette essence, le LERMAB et la région Lorraine ont lancé le projet Furalor qui vise à l'élaboration de bois composite à partir de hêtre par polymérisation *in situ* de monomères issus de déchets de bois. Il s'inscrit dans une logique de développement durable en favorisant la transformation du bois à proximité de son lieu de récolte tout en étant respectueux de l'environnement.

Le hêtre composite souhaité est obtenu par furfurylation : c'est l'imprégnation et la polymérisation d'alcool furfurylique dans le bois par catalyse acide. Une fois traité, le bois est moins sensible aux variations d'humidité, sa stabilité dimensionnelle est accrue : il peut être utilisé en classe de service 3 à 4. De plus, sa classe de durabilité passe de 4 à 1 : le hêtre est plus résistant aux pourritures et aux insectes. Cette méthode ne provoque pas de baisse de la résistance mécanique, contrairement aux autres méthodes de modification chimiques que sont le traitement thermique et l'acétylation. Le leader mondial du marché du bois furfurylé est Kebony, entreprise suédoise, première industrie à commercialiser du bois traité de cette manière en 1960. Ce procédé est réalisé en plusieurs étapes que l'on retrouve en figure 1.

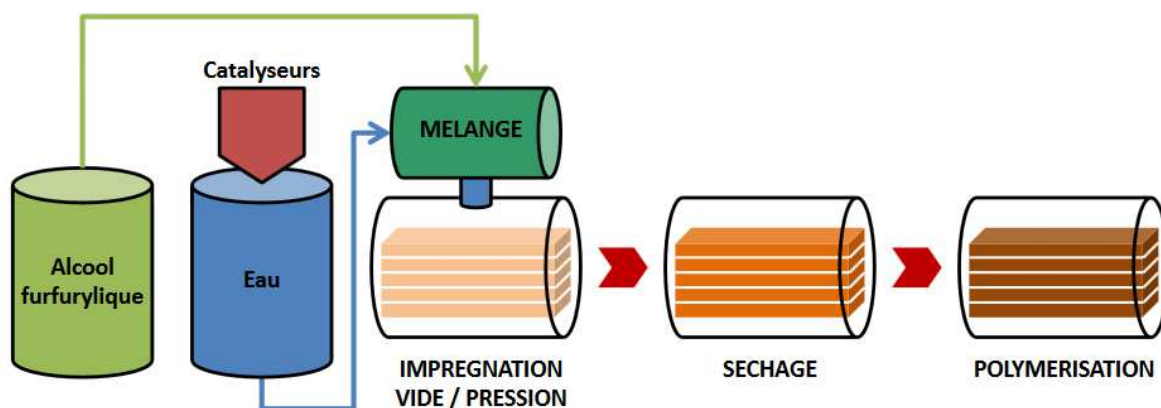


Figure 1 : Procédé de fabrication du bois furfurylé (Source : Eric Masson)

L'alcool furfurylique est issu de la déshydratation et de l'hydrogénation du xylose (monomère de l'hémicellulose présente dans les parois végétales). Le marché de ce produit génère 232 millions de dollars par an. Le plus gros producteur mondial est Hongye Chemical, situé en Chine, qui exporte plus de la moitié du volume

consommé annuellement. Son utilisation n'est cependant pas limitée au traitement du bois. En effet, il est employé en fonderie pour l'agglomération du sable siliceux, mais également en composant de résines et de solvants. Le procédé de fabrication nécessite des produits chimiques polluants et dangereux tels que l'acide sulfurique ou les oxydes de Chrome.

Pour s'inscrire dans la démarche de développement durable du projet Furalor, notre projet de fin d'étude consiste à développer un procédé de synthèse d'alcool furfurylique par voie blanche à partir de sciure de hêtre. Cette méthode consiste à réaliser des réactions chimiques par voie enzymatique (expliquée en Annexe I), ces enzymes étant produites par des organismes tels que des champignons ou des levures. L'utilisation des sous-produits de la première transformation en scierie permet de valoriser l'ensemble de la biomasse. De plus, le traitement par voie blanche est peu énergétique et limite l'emploi de produits néfastes à l'environnement. La production d'alcool furfurylique se divise en 3 étapes distinctes schématisées en figure 2 :

- l'obtention de xylose à partir de sciure de hêtre par déconstruction des hémicelluloses
- la déshydratation du xylose en furfural
- l'hydrogénation de ce dernier pour obtenir l'alcool furfurylique

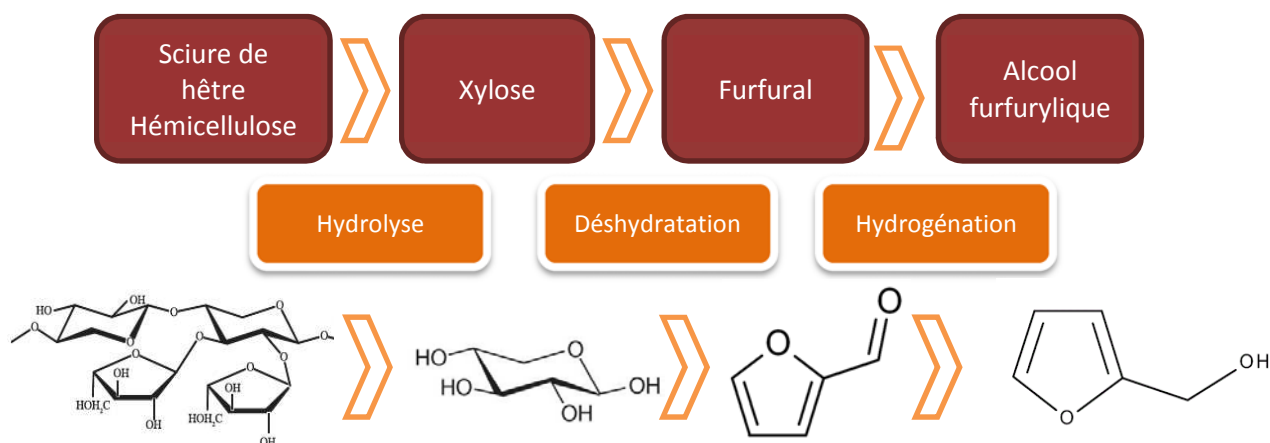


Figure 2 : Les différentes étapes de la synthèse d'alcool furfurylique

I. LYSE DES HEMICELULOSES EN XYLOSE

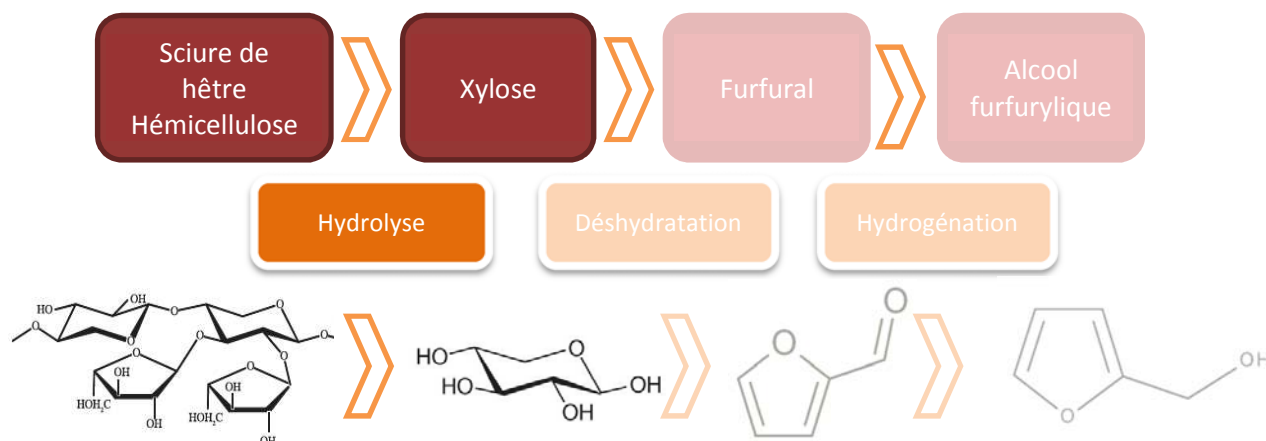


Figure 3 : Première étape : hydrolyse des hémicelluloses

A. INTRODUCTION

Cette étape est la première étape de la production et commence avec de la sciure de hêtre. Dans le cadre de cette étude, un seul composé du bois est valorisé : l'hémicellulose. La lignine et la cellulose ne sont pas utilisées mais pourraient faire l'objet d'une valorisation en parallèle. Industriellement, le xylose est obtenu par traitement acide de bagasse de canne à sucre et d'épis de maïs.

Le hêtre est composé d'environ 27,9% d'hémicelluloses sur masse sèche (+/- 6,8%) [Godin, 2010], constituées de xylanes. Ceux du hêtre sont constitués principalement de polymère de xylose, composé que l'on souhaite obtenir. D'autres molécules viennent s'intercaler avec le xylose ou sont en ramification tel que l'acide méthylglucuronique en haut à gauche de la figure 4.

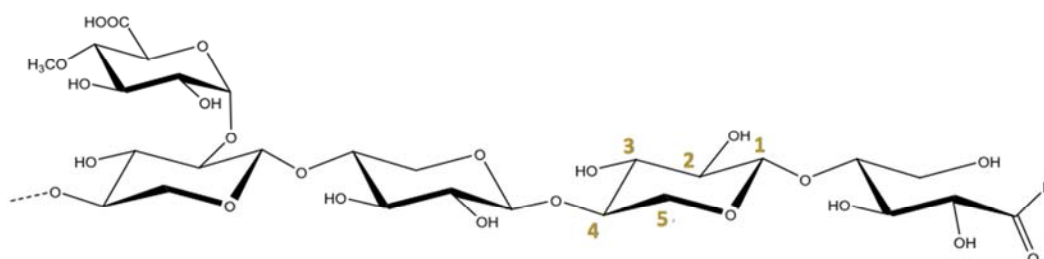


Figure 4 : Structure d'un 4-O-méthylglucuronoxylane présent chez le hêtre [Chemin, 2014]

Il y a environ dix unités de xylose pour une unité d'acide glucuronique. D'après une étude de Maud Chemin [2014], après un suivi par chromatographie liquide il y aurait 74,6% de xylose et 12% d'acide glucuronique. Notre objectif est ici de récupérer les xyloses de ces chaînes, liés entre eux par des liaisons β -1-4.

Tous les composés du bois sont liés entre eux par des liaisons fortes ou faibles de type hydrogène. De nombreux procédés existent pour rendre accessibles les hémicelluloses du bois et rompre la liaison avec la lignine. L'explosion de vapeur par

exemple permet cette séparation mais est un procédé très énergivore. L'objectif est de dégrader les hémicelluloses sans prétraitement particulier, et d'obtenir le xylose par l'utilisation de micro-organismes afin de suivre un procédé par voie blanche.

Les champignons produisent des enzymes au cours de leur croissance (la catalyse enzymatique est expliquée en annexe I). L'objectif est de trouver un organisme capable de produire les enzymes nécessaires à la dégradation des xylanes. Deux types d'enzymes particulières doivent être produites :

- les xylanases : ces enzymes (il en existe 4 différentes chez *T.reesei*) catalysent la coupure des grandes chaînes de xylose grâce à un grand site actif. Elles forment des oligomères (des chaînes formées de quelques unités) et interviennent en premier.

- les β -xylosidases. Ces enzymes coupent les liaisons β -1-4 des oligomères pour former des unités de xylose. Leur site actif réduit ne leur permet pas la coupure rapide et efficace de grandes chaînes.

[Matsuzawa, 2016]

Après l'action de ces deux enzymes, des sucres simples sont obtenus. D'autres enzymes permettent de rompre les liaisons mais ne seront pas nécessaires. Par exemple, l' α -glucuronosidase hydrolyse les liaisons entre le xylose et l'acide glucuronique, mais ne présente pas d'intérêt dans notre cas. (figure 5)

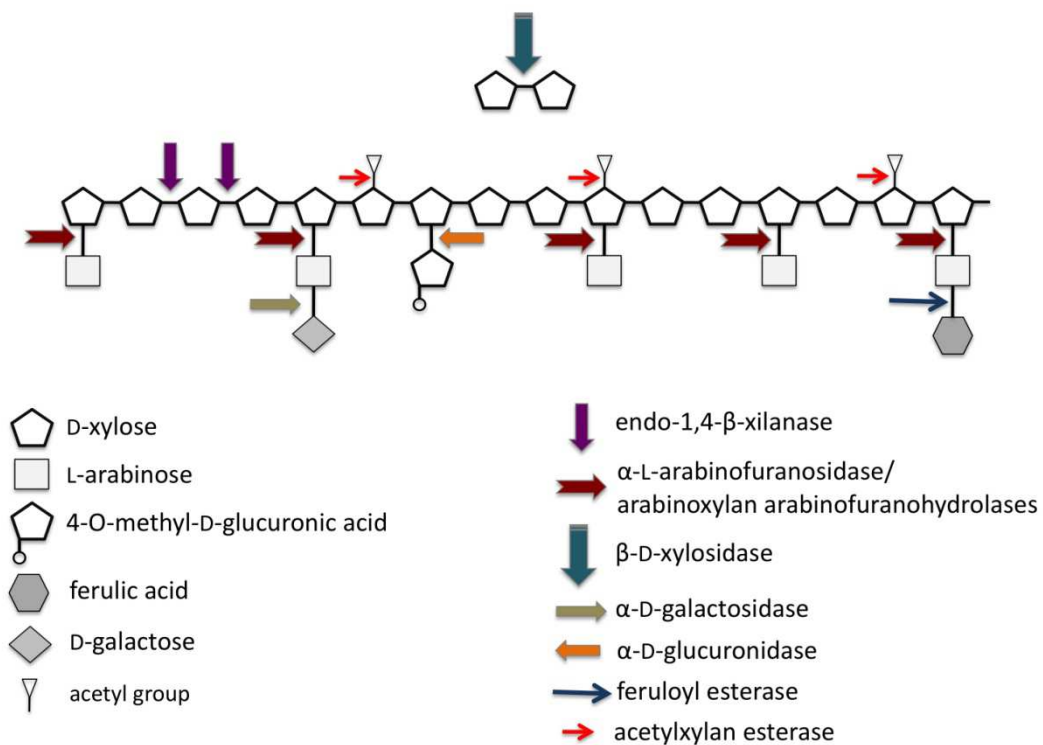


Figure 5 : Enzymes responsables de la dégradation des xylanes
[Wagner de Souza, 2013]

B. MATERIEL ET METHODES

1. Choix de la souche

La première étape consistait à reprendre les expériences effectuées par Marion et Aurélie. Le champignon utilisé était *Gloeophyllum trabeum*. Il avait été montré qu'il fonctionnait pour la conversion des hémicelluloses, mais sa croissance est plutôt longue. C'est pourquoi il a été envisagé de travailler avec des souches de *Trichoderma reesei*. Ce champignon permet de travailler à la fois en milieu liquide et solide. La souche se conserve donc en milieu malt-agar par un repiquage sur des boîtes de pétri (Protocole n°1).

Haltrich et al. comparent les différents champignons producteurs de xylanase et l'influence des milieux. En effet, suivant le contenu du milieu de culture la production peut être induite plus ou moins facilement. Cela permet d'optimiser l'induction de xylanase avec *Trichoderma reesei*. Il faut donc préférer l'induction au lactose, avec un milieu plus riche. Dans cette publication, il est également expliqué que l'oxygénation est importante. N'ayant pas de bioréacteur, l'expérience a été réalisée avec une agitation permanente à l'aide d'un barreau aimanté dans le milieu de culture, à 28°C. [Haltrich et al., 1996]

Après plusieurs analyses et essais, il a été décidé d'utiliser le milieu Mandels (milieu décrit dans le protocole n°4). L'étude faite par Mandels décrit l'importance du ratio entre la source de carbone et d'azote, ce qui permet de déterminer la quantité exacte de lactose à mettre dans le milieu pour obtenir la meilleure production de l'enzyme.

2. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité d'une enzyme est la vitesse à laquelle sont dégradés les substrats, mesurée en Unité enzymatique, qui correspondent à des μmol de substrat transformé/min. Afin de tester une enzyme, il faut la mettre en présence d'un substrat qu'elle est capable d'assimiler. Ces derniers sont choisis pour avoir une coloration particulière après réaction, ce qui permet la mesure par spectrophotométrie.

a) L'activité β -xylosidase

Pour l'enzyme β -xylosidase le substrat utilisé est le Para Nitro Phényl - xylopyranoside. La figure 6 illustre ce substrat. Ces deux unités sont liées entre elles par une liaison β -1-4, rompue en présence de l'enzyme.

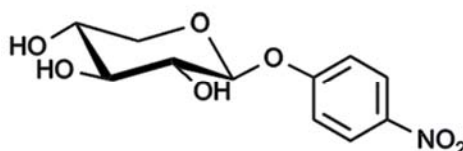


Figure 6 : PNP-xylopyranoside [source : megazyme]

Lorsque l'enzyme est présente dans le milieu les deux unités sont séparées. La réaction est arrêtée par de la soude diluée à 1%. La soude vient réagir avec l'unité de para-nitrophénol et forme un composé jaune. La quantité de substrat digéré est déterminée par une mesure de l'absorbance à 405 nm, ce qui permet le calcul de l'activité enzymatique. (Protocole n°2)

Pour commencer, un contrôle de l'activité du substrat est réalisé en le faisant réagir avec l'enzyme β -xylosidase commerciale, qui est censée rompre la liaison du PNP-xylopyranoside. L'absorbance obtenue doit être élevée si le substrat fonctionne correctement. (Partie 1 du protocole n°2)

Après réaction, l'absorbance est supérieure à 4 (donc saturée), le substrat fonctionne correctement et peut servir au suivi de l'activité enzymatique. La solution de ce substrat à 5mM est conservée au congélateur, afin d'éviter toute dégradation.

b) **L'activité xylanase**

Le même procédé est utilisé pour le contrôle de l'activité xylanase. Le substrat utilisé est le Remazol Brilliant Blue Xylan (RBBX), qui est un dérivé de 4-O-méthyl-D-glucurono-D-xylan. La xylanase en action forme des fragments de RBBX de faible poids moléculaire solubles dans l'éthanol qui restent en suspension après centrifugation. Le RBBX non digéré présente un fort poids moléculaire et se retrouve dans le culot après centrifugation (figure 7). La figure 8 montre le précipité formé après ajout d'éthanol et centrifugation, ainsi que les différences de surnageant selon l'activité enzymatique.



Figure 7 : Mesure de l'activité xylanase

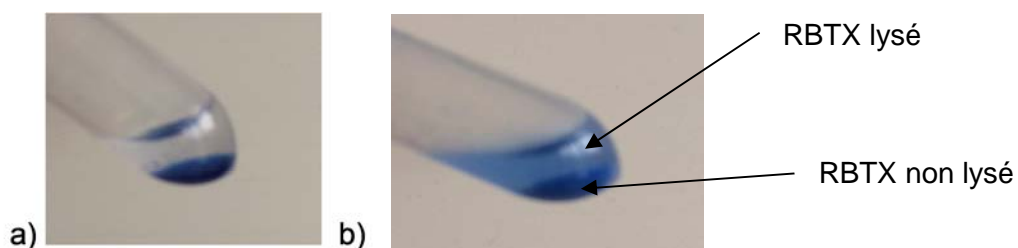


Figure 8 : Test de l'activité xylanase, eppendorf après centrifugation

(a) surnageant transparent : pas d'activité, b) surnageant bleu : activité xylanase)

Le surnageant est ensuite analysé par mesure de l'absorbance à 595nm. (Protocole n°3). Par cette mesure la quantité de fragments présents dans le milieu est déterminée, ce qui permet de déduire l'activité des xylanases du milieu [Biely, 1985].

c) Caractérisation de l'activité enzymatique : Mesure de K_m et V_m

L'objectif des mesures qui suivent est de caractériser l'enzyme à travers deux constantes :

- V_m , la constante de vitesse maximale
- K_m , la constante de Michaëlis, qui correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale V_m . Elle définit l'affinité de l'enzyme pour son substrat. Plus K_m est faible plus l'enzyme se fixera facilement sur son substrat.

Le calcul de ces constantes est expliqué en annexe III.

Pour ces mesures, des solutions de substrat à différentes concentrations sont réalisées, et l'activité enzymatique est mesurée par spectrophotométrie pour chacun de ses substrats et à différents temps.

Habituellement, cette quantification est réalisée à partir d'enzymes concentrées au sulfate d'ammonium. Cependant cette méthode ne donne pas de résultats satisfaisants ici, car la dissolution du sulfate d'ammonium dans le milieu de culture est difficile à obtenir. C'est pourquoi la caractérisation de l'enzyme a été effectuée avec un prélèvement direct du milieu de culture. Les temps de réaction sont donc plus longs afin de voir une réelle différence d'activité enzymatique. Cinq concentrations ont été testées: 5mM ; 2,5mM ; 1mM ; 0,5mM ; 0,25mM ; 0,025mM.

c) Le dosage des protéines

Au cours du temps, nous avons pu nous rendre compte de la variabilité des prélèvements pour mesurer l'activité enzymatique. En effet la présence d'hyphes augmente considérablement le taux d'enzymes puisqu'elles sont produites à ce niveau. Le dosage des protéines permet de confirmer la forte présence d'enzyme ou non, puisqu'il nous indique le taux de protéines présentes. Ce dosage a été effectué à l'aide du kit "Pierce BCA Protein Assay".

3. Mise en culture liquide de *T. reesei*

Afin de suivre plus facilement l'activité des cultures, il est décidé de travailler en milieu liquide qui permet de prélever du milieu de culture tout au long de la croissance. Seule la conservation de la souche se fait en milieu solide.

Quatre milieux de cultures ont été réalisés, afin d'analyser l'induction au lactose et la présence ou non de sciure. Les quatre milieux sont décrits dans le tableau 1. Pour pouvoir comparer les résultats, une quantité à peu près semblable de spores a été inoculée selon le protocole n°4. Des techniques existent pour avoir précisément le même nombre de spores, mais il est difficile de réaliser cette inoculation en limitant le risque de contamination. En effet, la cellule de Malassez permet de compter le nombre de spores par mL, mais nécessite de nombreux nettoyages du milieu de culture, ce qui augmente le risque de contamination. C'est pourquoi il est décidé ici d'inoculer à partir de la culture solide.

Milieu Mandels	Lactose	sciure
1	56mg	0
2	56mg	0
3	56mg	2g
4	0	2g

Tableau 1 : Milieux de cultures liquides de T.reesei

Le premier milieu est celui qui a eu le temps de croissance le plus long car il a été inoculé deux semaines plus tôt. Des prélèvements réguliers à l'aide de cônes stériles ont été effectués et congelés (le froid stoppe l'action des enzymes sans dégrader les enzymes ni les produits) afin de pouvoir suivre par la suite la croissance du champignon via sa production d'enzyme. L'activité de l'enzyme a été mesurée selon les protocoles 2 et 3.

4. Etude la consommation du lactose

Au moment de la mise en culture des champignons, 56mg de lactose ont été ajoutés au milieu via un filtre de 0,45µm, afin de ne pas contaminer le milieu. Comme vu précédemment, le lactose permettrait d'induire la production de xylanase. C'est pourquoi il est intéressant de suivre sa présence ou non dans le milieu de culture au cours de la croissance.

Deux méthodes ont été employées pour observer la présence de lactose dans le milieu au cours du temps : La méthode Somogy qui mesure la quantité de sucres réducteurs dans le milieu et le dosage par chromatographie liquide HPLC et lecture au refractomètre (expliqué en annexe II).

5. Etude de la production de xylose

La mesure de la quantité de xylose et de xylane se fait par chromatographie liquide HPLC avec une colonne à exclusion d'ion (voir annexe II) à une température de 80°C et un débit de 0,8ml/min. Le xylose sort à un temps de 11 min⁵⁴, et le xylane à 7 min.

C. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Développement des cultures

a) Etude préliminaire

Lors de la première culture de Trichoderma Reesei, le milieu devenait trouble. Nous attendions la sporulation (remarquable par un développement de particules vertes) pour réaliser les tests enzymatiques. Cependant, contrairement à la culture liquide malt, aucune couche de spores verte foncée ne s'est créée en surface. L'activité enzymatique a été mesurée au bout de 10 jours. N'ayant pas encore le substrat pour tester l'activité xylanase, cette activité n'a pas été analysée à ce moment-là. Lors du prélèvement au treizième jour, on observe une forte baisse de l'activité enzymatique corrélée à l'absence de lactose dans le milieu. Un ajout de

lactose est donc effectué pour relancer l'induction de lactose (3ème partie du protocole n°4). Après quatre heures nous pouvons percevoir un pic de production d'enzyme mais très court. Ceci peut s'expliquer par l'absence d'élément pour lesquels l'enzyme est utilisée (hémicelluloses). En effet le champignon induit la production d'enzyme, mais s'il n'y a aucun xylane à digérer cette production est sans doute régulée.

b) **Induction de la production enzymatique**

Il est décidé de suivre les trois nouvelles cultures dès le début de la croissance du champignon. Au cours des prélèvements, une grande variabilité de l'activité enzymatique est remarquée en fonction des prélèvements. En effet la présence d'hyphes augmente considérablement le taux d'enzymes puisqu'elles sont produites à ce niveau. Le dosage des protéines permettrait donc de confirmer la forte présence d'enzyme ou non, puisqu'il indique le taux de protéines présentes. Malheureusement le dosage des protéines n'a pas permis de conclure car les résultats étaient en grande partie aberrants. Il aurait fallu plus de temps pour pouvoir refaire la manipulation et interpréter ces résultats. Afin de diminuer la variabilité liée aux prélèvements des hyphes, le protocole de mesure de l'activité enzymatique est modifié et une étape de centrifugation des échantillons est ajoutée. Après cette étape, un petit amas d'hyphes est observé. Les résultats obtenus par la suite sont beaucoup plus homogènes.

La figure 9 montre qu'après environ 4 jours, l'activité enzymatique augmente. L'activité enzymatique semble par la suite atteindre un palier maximum. Les valeurs moyennes de ce palier sont répertoriées dans le tableau 2, elles sont calculées à partir des valeurs supérieures à 150 heures. La courbe représentant le milieu Mandels avec de la sciure continue d'augmenter, mais la moyenne est tout de même réalisée afin de pouvoir comparer avec les autres milieux.

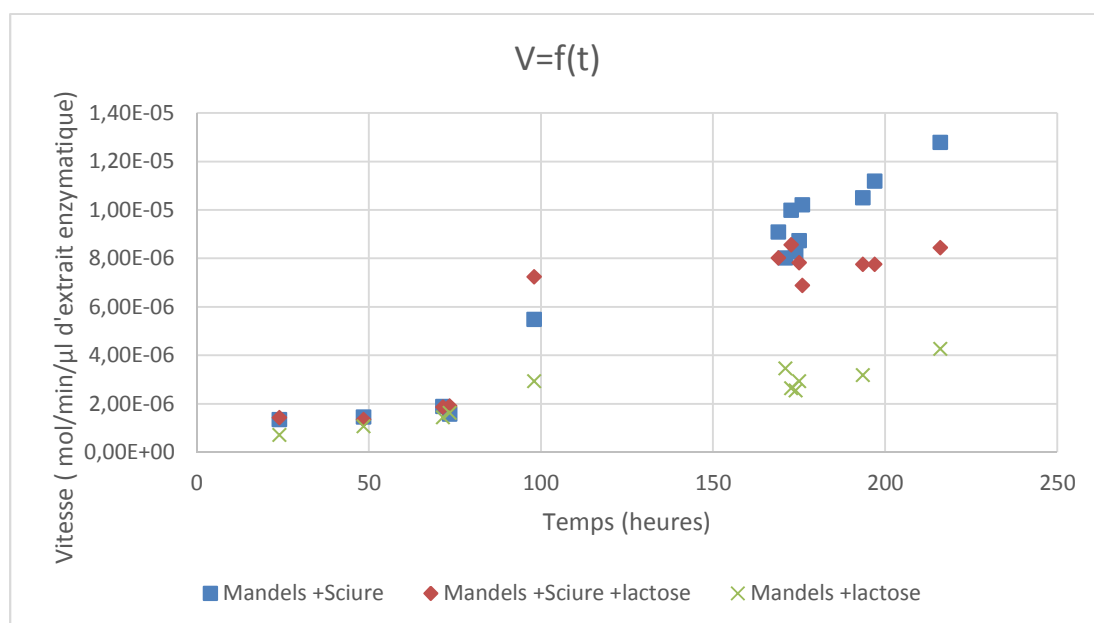


Figure 9 : Suivi de la croissance du champignon à travers l'activité enzymatique

Milieu	Sciure	Sciure +lactose	lactose
Moyenne	9,86E-06	7,89E-06	3,17E-06
Ecart-type	1,52E-06	5,52E-07	6,30E-07
Intervalle de confiance	9,96E-07	4,09E-07	5,04E-07

Tableau 2 : Valeurs des paliers de croissance (en mol/min/ μ l)

Pour une vitesse moyenne de $9,86 \cdot 10^{-6}$ mol/min/ μ L, si l'on ne prend pas en compte l'accessibilité des xylanes, cela signifie qu'un millilitre d'extrait enzymatique peut convertir 5g de sciure soit environ 1g de xylanes en un peu moins d'une minute.

D'après les courbes, le lactose ne semble pas être nécessaire en présence de sciure. En effet il permet une induction plus rapide de la production mais il n'augmente pas la vitesse maximale atteinte par les enzymes. Un dosage selon la méthode Somogy a été effectué. Il permet de doser les sucres réducteurs ce qui permet d'effectuer un suivi de la quantité de lactose présente dans le milieu. Cependant, tous les sucres réducteurs sont confondus, c'est pourquoi nous ne pouvons l'utiliser qu'en absence de sciure (car les autres sucres présents dans le bois tels que la cellulose présentent des extrémités réductrices). Les extrémités réductrices des xylanes seraient confondues avec celles du lactose et du xylose produit. Le lactose disparaît complètement au bout d'une semaine.

56mg de lactose sont injectés dans le milieu pour observer l'induction des enzymes par ce dernier. Sur le graphique qui suit (figure n°10), une augmentation de la vitesse enzymatique en fonction du temps est observée. L'ajout de lactose a été fait au temps 0.

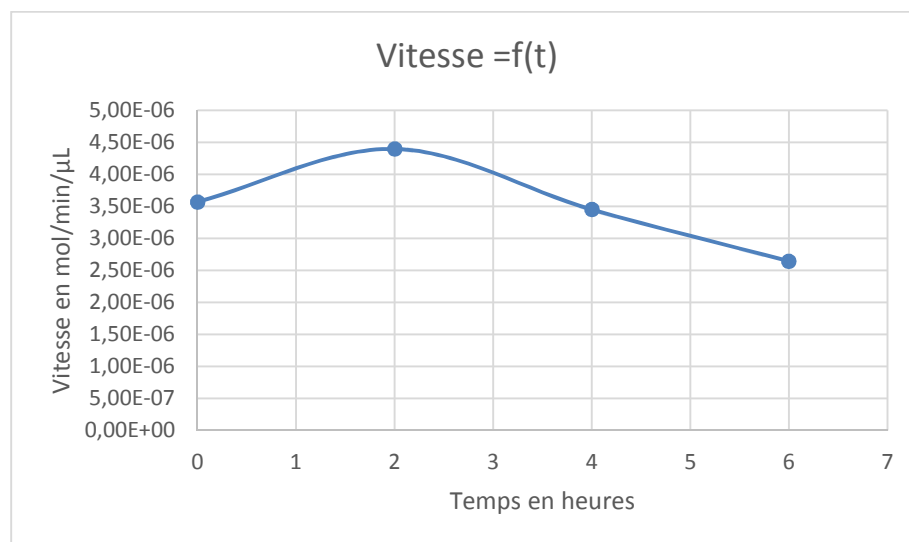


Figure 10 : Evolution de la vitesse enzymatique après une induction au lactose

L'effet de l'ajout de lactose est visible après 2h, il correspond à une induction des enzymes. Cependant, l'effet est très court puisqu'au bout de 4h l'activité enzymatique diminue déjà.

Le test d'induction au lactose a été effectué une deuxième fois afin de confirmer ces résultats. Ce dernier a été effectué dans un milieu contenant initialement du

lactose et de la sciure (les autres milieux ayant subi de nombreux prélèvements, ils ne permettaient plus de réaliser cette expérience). Les résultats sont regroupés dans le graphique ci-dessous (figure n°11). On observe une faible influence de l'ajout de lactose. 56mg de lactose ont été injectés au temps 0, mais aucun réel pic ne se forme après deux heures.

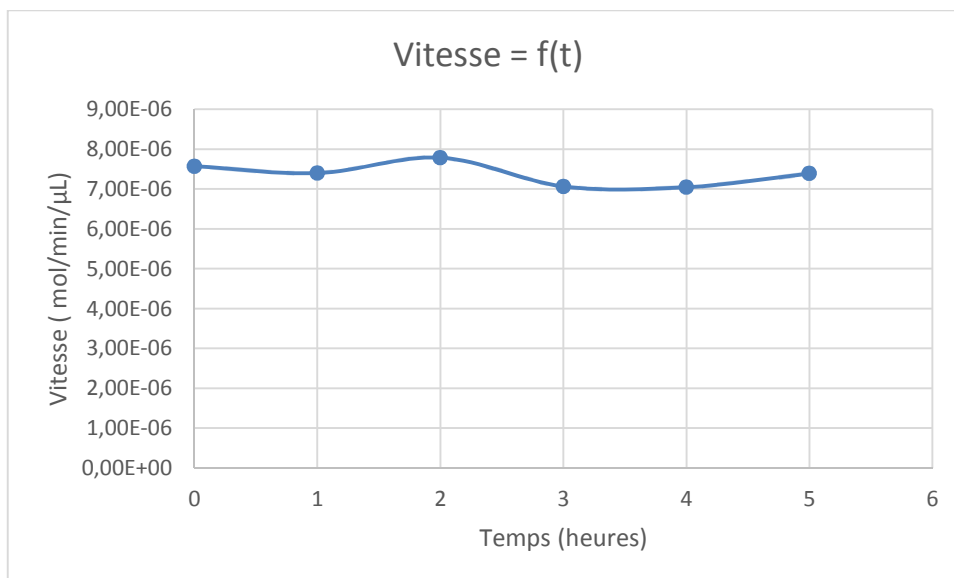


Figure 11 : Suivi de l'activité enzymatique après une induction au lactose

Pour conclure, l'induction des enzymes au lactose ne semble pas être nécessaire. La sciure semble quant à elle induire la production des enzymes. Il faudrait par la suite faire l'expérience d'une induction au xylose ou au xylobiose. Cette induction a été étudiée et l'induction au xylobiose semble mieux fonctionner que celle au xylose.[Kristufek, 1995]

c) **Durée de vie des cultures**

Les cultures semblent avoir une durée de vie limitée : en effet, un milieu inoculé le 3 janvier ne présente plus d'activité enzymatique au 30 janvier. Il serait intéressant de pouvoir étudier l'état du champignon afin d'affiner l'analyse du cycle de vie de *T.reesei*.

d) **Activité xylanase**

Pour ce qui est du calcul de l'activité xylanase, quel que soit le moment du prélèvement l'activité mesurée est nulle, puisqu'elle est équivalente au témoin négatif. (Mesurée selon le protocole n°3). Le champignon ne semble pas produire cette enzyme. C'est à dire que seule les liaisons β -1-4 des oligomères seraient coupées. Cependant, la présence seule de β -xylosidase peut permettre de créer des monomères de xylose, puisque cette enzyme peut séparer les unités de xylose entre elles. Sa vitesse est extrêmement lente lorsque les chaînes de xylose sont grandes car son site actif est réduit. Cette enzyme fonctionne de manière optimale pour le xylobiose (2 unités de xylose liées en β -1-4) .[Matsuzawa, 2016]

L'absence de xylanase est difficilement explicable, et cela ne correspond pas aux différentes publications étudiées où l'induction de xylanase et de β -xylosidase étaient simultanées.

e) *Etude des optima de production d'enzymes*

Il existe un optimum de température ainsi qu'un optimum de pH pour l'activité enzymatique. L'étude se consacre à l'optimum de température pour l'activité β -xylosidase (Figure n°12).

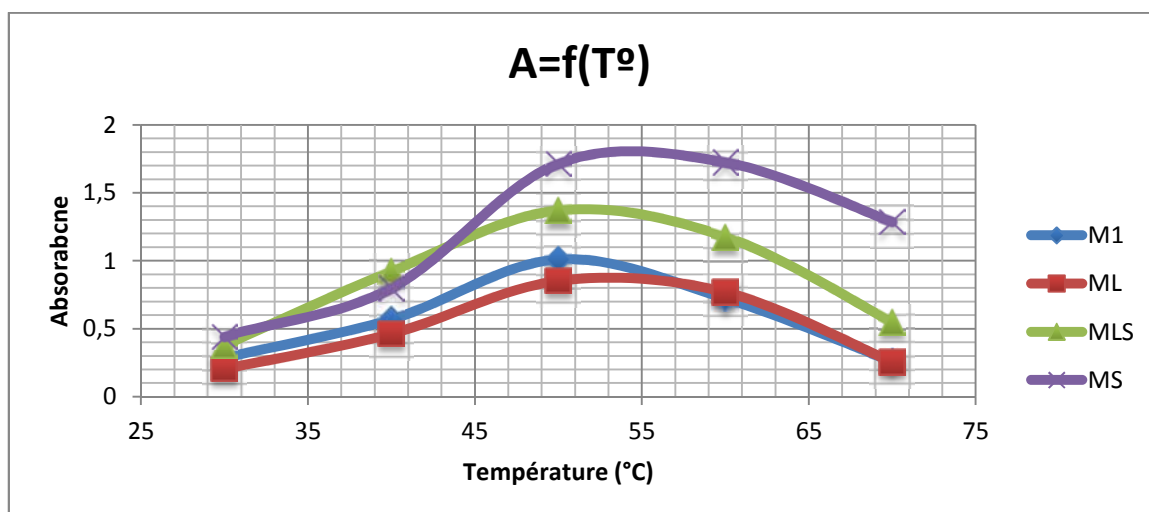


Figure 12 : Mesure de l'optimum de température pour la β -xylosidase

Le maximum semble être obtenu pour une température comprise entre 50 et 60°C. Cela est confirmé dans la littérature, avec un optimum de 60°C [Poutanen, 1988]. Cependant la stabilité de l'enzyme semble diminuer après 55°C.

En ce qui concerne le pH, l'optimum pour la β -xylosidase semble être compris entre 3 et 4 et la stabilité maximale est obtenue pour un pH entre 4 et 5. [Poutanen, 1988]

f) *Mesure de K_m et V_m*

La vitesse maximale obtenue pour la β -xylosidase est de $2 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{min}^{-1}$. C'est à dire que l'enzyme peut convertir $2,84 \cdot 10^{-4} \text{ g} \cdot \text{min}^{-1}$ de xylanes, soit $1,36 \cdot 10^{-3}$ grammes de sciure en une minute.

Pour ce qui est de la constante d'affinité, la valeur obtenue est de $1,96 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. L'analyse de la publication de Poutanen sur la caractérisation de la β -xylosidase chez *T.reesei* montre la différence avec notre valeur. La constante définie dans cette publication est de 0,08mM, soit un écart de 10^{-2} . L'enzyme étudiée ici a donc beaucoup moins d'affinité pour le substrat que celle qui devrait être produite. De plus, la constante d'inhibition est notée à 2,4mM. La valeur de K_m obtenue est très proche de la constante d'inhibition. L'enzyme fonctionne sûrement moins vite que ce qui devrait être obtenu. [Poutanen, 1988]

2. *Mesure du xylose*

a) *Réalisation d'étalons*

Après plusieurs jours de développement du milieu de culture et après avoir confirmé la présence de β -xylosidase, il est intéressant de tester la présence de xylose dans les milieux contenant de la sciure initialement. Cette mesure a été faite par HPLC. Cette méthode est expliquée dans l'annexe II.

Tout d'abord, la droite étalon du xylose est réalisée pour pouvoir quantifier les échantillons analysés par la suite.

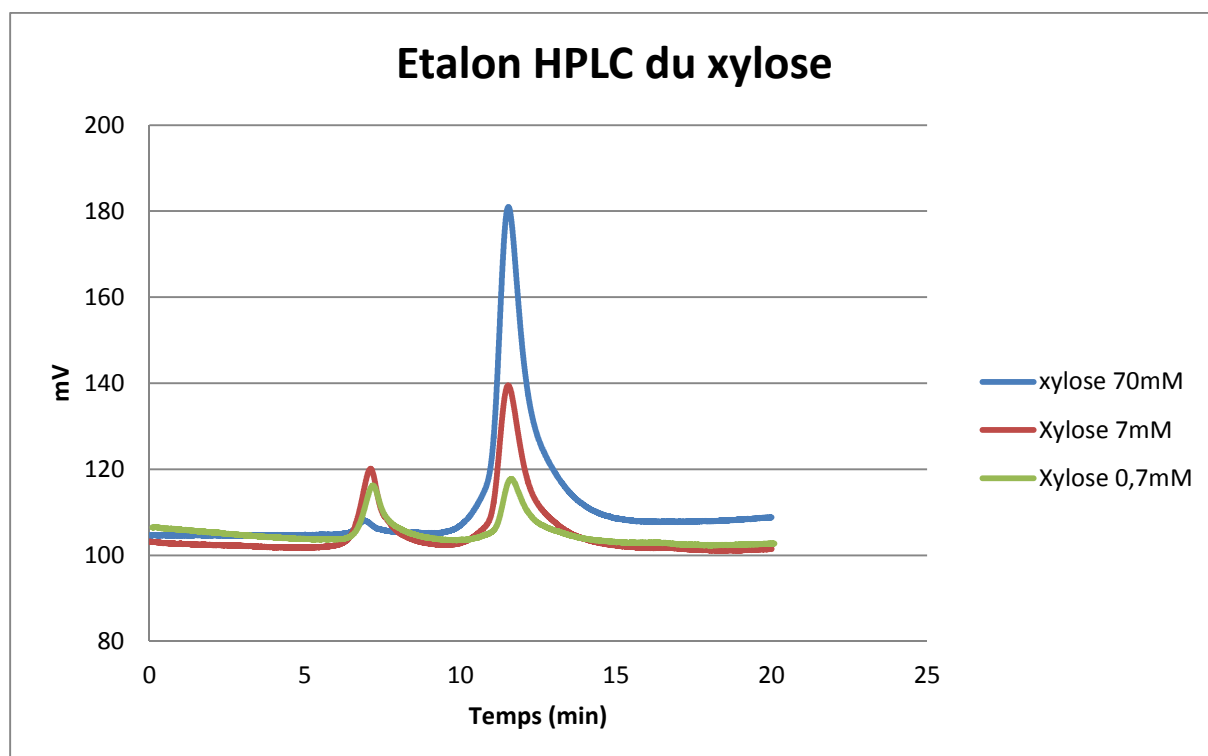


Figure 13 : Etalon HPLC du xylose

L'aire sous la courbe est ainsi associée à la concentration ce qui permet de retrouver ensuite la concentration à partir de l'aire des pics formés visible sur la figure n°13. La courbe étalon est donc visible en figure 14. Le premier pic visible sur cette courbe correspond aux éléments présents dans le milieu, déterminé en passant sur la colonne le milieu Mandels indépendamment des autres composés. Le temps de rétention du xylose est de 11.54 min.

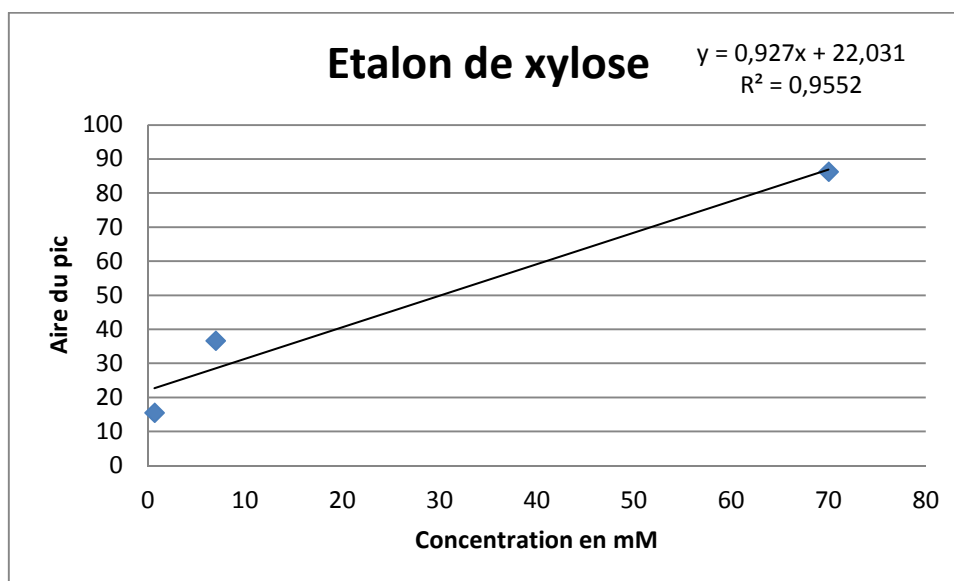


Figure 14 : Droite étalon du xylose

Afin de savoir où se trouve le pic de xylane, le milieu Mandels a été complété avec du xylane dilué dans de l'eau distillée. Le chromatogramme correspondant est visible en figure 15.

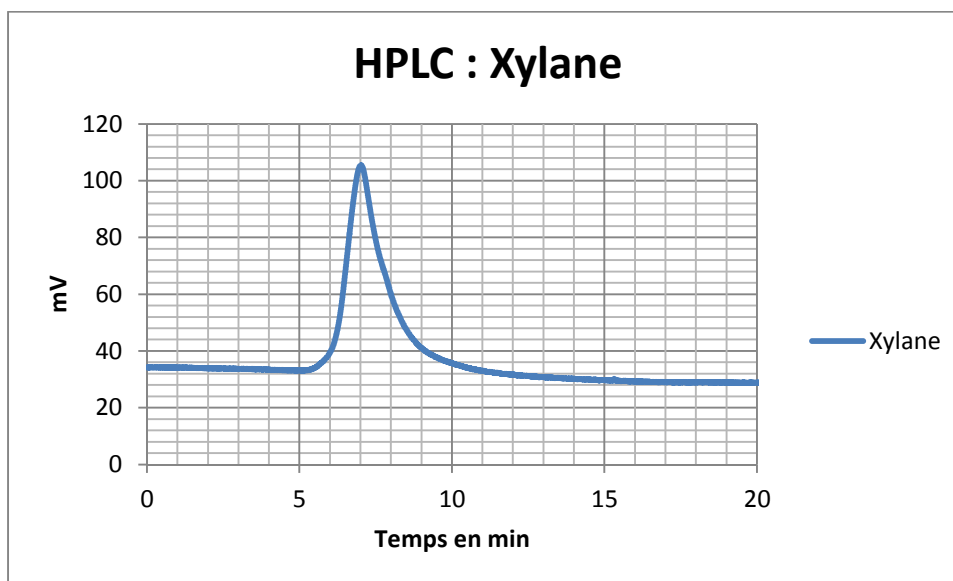


Figure 15 : courbe de sortie du xylane

Le temps de rétention du xylane est de 7min.

b) **Etude du milieu Mandels + sciure**

La courbe ci-dessous (figure 16) présente le chromatogramme obtenu en passant le milieu Mandels dans lequel a poussé le champignon en présence de sciure à l'HPLC.

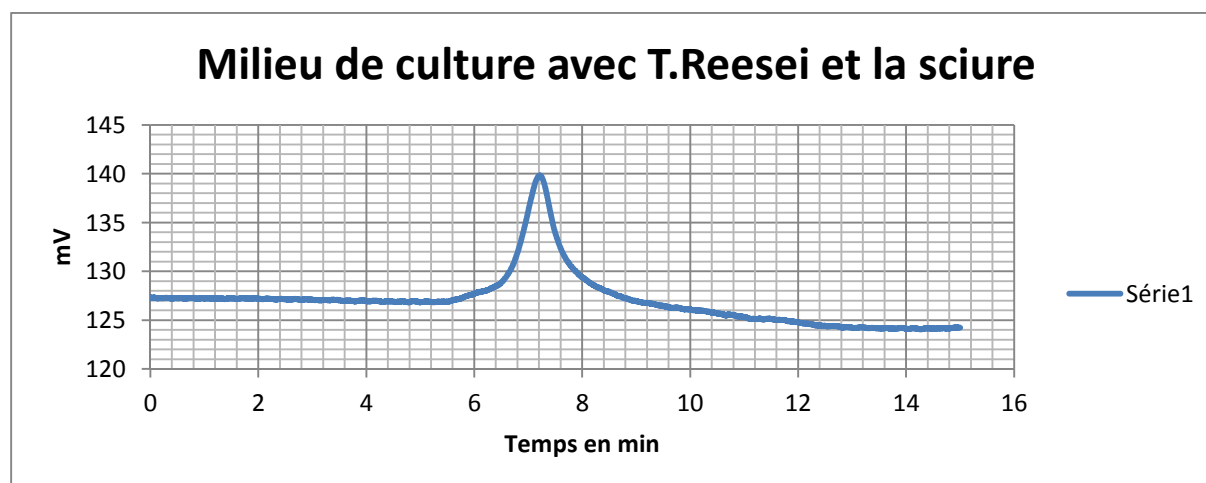


Figure 16 : Chromatogramme du milieu de culture Mandels + sciure

Le pic visible a un temps de rétention à environ 7,2min. Il peut être associé à du xylane. Cependant l'absence de pic vers 11min montre l'absence de xylose. Les hémicelluloses n'ont pas été digérées par les enzymes.

La quantité de xylane étant faible, un autre mécanisme a pu avoir lieu : le champignon produit les enzymes, qui coupent le xylane mais dans leur propre intérêt de consommer le xylose. Il y aurait donc consommation du xylose dès son apparition.

c) *Etude de l'extrait enzymatique*

Afin de tester le fonctionnement des enzymes, il faut pouvoir les isoler du champignon qui consomme ensuite sûrement le xylose produit par d'autres mécanismes. Pour cela le milieu de culture est filtré sur du papier de cellulose. La solution récupérée correspond à l'extrait enzymatique.

Cet extrait a été mis en présence de sciure de bois passée préalablement à l'autoclave. Le mélange a été agité à l'aide d'un barreau magnétique sur une plaque chauffante à 35°C. Plusieurs prélèvements ont été faits pour suivre l'apparition de xylose dans la solution. A partir d'une heure un pic correspondant à un temps de rétention de 11min est visible. Après une nuit sous agitation c'est-à-dire après 18h en présence de l'extrait enzymatique la quantité de produit a augmenté. En effet le pic visible sur la figure n°17 suivant montre bien l'augmentation.

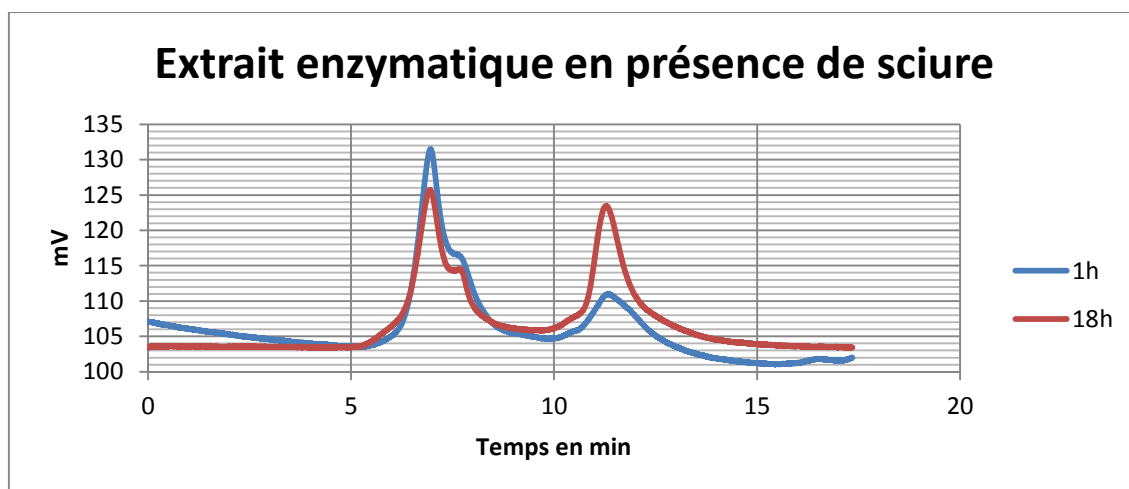


Figure 17 : Courbe HPLC de l'extrait enzymatique en présence de sciure

Ce pic peut être assimilé à un pic de xylose mais lorsque l'on met en comparaison la courbe obtenue avec celle de xylose, la différence est légère mais significative (Figure 18). Le temps de rétention du xylose étant de 11,54min il est en effet légèrement décalé.

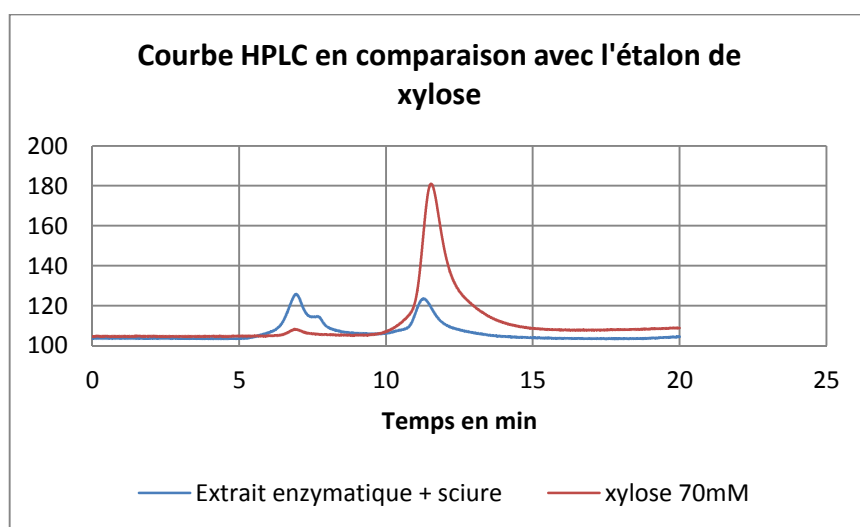


Figure 18 : Comparaison étalon xylose et pic obtenu

Le pic de xylane sort plus tôt que celui de xylose : les molécules les plus grosses sont moins retenues par la colonne. Ce pic étant tout de même très proche de xylose, ils peuvent s'apparenter à des oligomères de xylose. Aucun monomère de xylose n'a été produit.

d) ***Impact de la stérilisation***

Afin de rendre la sciure stérile, nous avons passé le milieu avec la sciure à l'autoclave. Cette étape peut s'apparenter à un prétraitement, puisque cela fonctionne sous pression et à haute température. Les hémicelluloses se sont sûrement retrouvées en partie en solution. C'est pourquoi, une étude HPLC a été effectuée pour savoir si il y avait déjà d'autres composés que des chaînes de xylose en solution. Le pic présent à 11 minutes est déjà présent. Il y avait donc déjà des oligomères en solution après l'autoclave : elle s'apparente à un prétraitement des hémicelluloses. Une analyse au moyen infrarouge pourrait permettre de confirmer la présence d'hémicelluloses dans le milieu.

Pour voir la production d'oligomères par l'enzyme et non celle produite par le passage à l'autoclave, un rapport a été calculé entre la somme des aires du xylanes, et celles des oligomères. Les résultats obtenus sont visibles dans le tableau 3 qui suit. L'enzyme produit des oligomères très lentement. Il y a donc une difficulté de l'enzyme à travailler, soit par rapport aux substrats soit par rapport à ces conditions de fonctionnement. L'air passe de 2 à 7 en 17 heures. Malheureusement la quantité précise de ces oligomères ne peut être quantifiée, car le xylobiose ou d'autres oligomères de xylose ne sont disponibles pour réaliser des étalons et pouvoir confirmer ces hypothèses.

	Somme des aires	Coefficient de correction	Aire du pic d'oligomères
Bois autoclavé	19,45		
Bois +enzyme 1h	24,88	1,28	2,71
Bois +enzyme 18h	25,98	1,34	7,30

tableau 3 : Correction de l'effet de l'autoclave sur la présence d'oligomères

La sciure passée à l'autoclave a été observée au Microscope électronique à balayage pour voir l'effet de ce prétraitement.

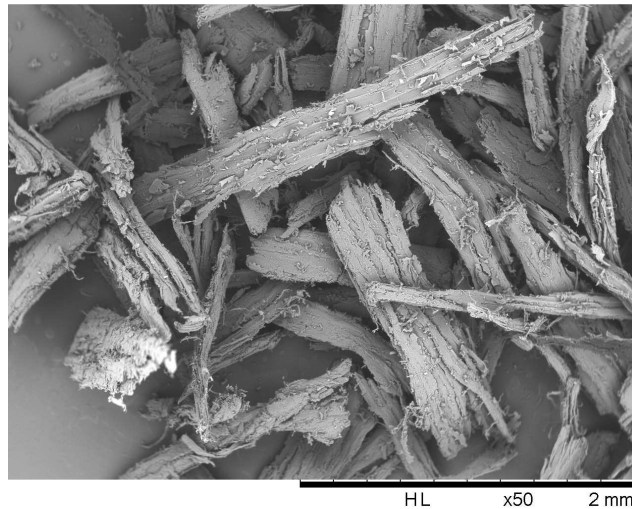


Figure 19 : Sciure avant passage à l'autoclave

Sur cette photo réalisée au microscope électronique à balayage avant le passage de la sciure à l'autoclave, on observe que les particules de sciure sont déjà abimées par le broyage (Figure 19). Cependant les fragments ne sont que partiellement défibrés.



Figure 20 : Sciure après un passage à l'autoclave

Sur cette deuxième photo, réalisée cette fois ci après le passage de la sciure à l'autoclave, on observe que les particules sont plus défibrées (Figure 20). En effet, on observe des fibres grossières en surface qui semblent se désolidariser du reste de la particule. De plus à un grossissement plus important, on observe que les parois sont fortement abimées. Des fibres unitaires ne sont pas visibles : un prétraitement plus drastique serait alors nécessaire.

e) **Accessibilité du substrat**

Lorsque l'extrait enzymatique se retrouve en présence de la sciure, il y a peut-être un problème d'accessibilité des xylanes. Pour pouvoir qualifier cet effet, l'extrait enzymatique a été mis en présence de xylanes commerciales. Si la conversion en xylose est beaucoup plus importante, l'hypothèse de l'accessibilité sera donc confirmée.

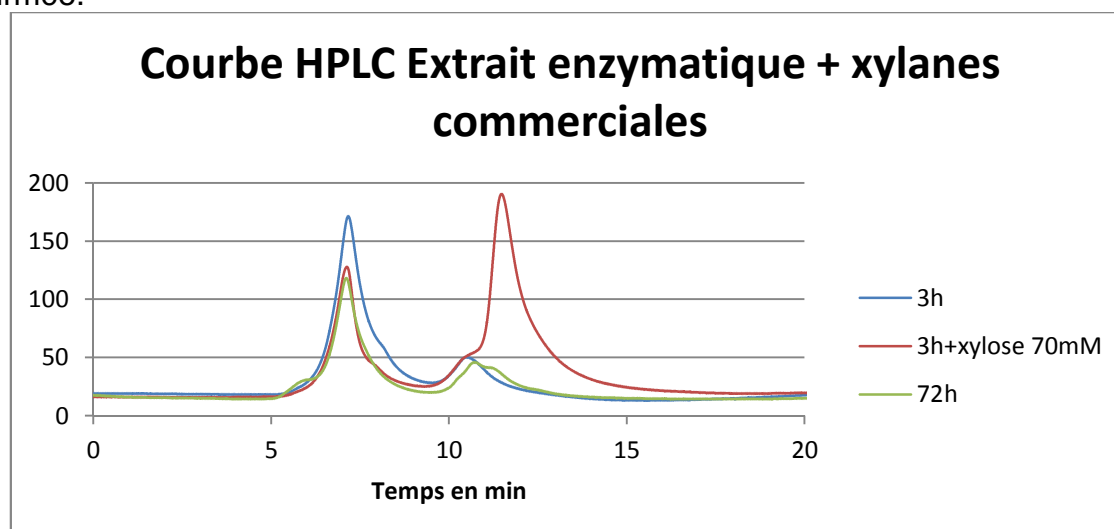


Figure 21 : Etude de l'extrait enzymatique en présence de xylanes commerciales

A partir de trois heures sous agitation et à 35 °C, un composé différent du xylane se forme. C'est le deuxième pic visible sur la figure 21. Afin de pouvoir confirmer que cela correspond à du xylose, celui-ci a été rajouté dans le prélèvement obtenu. Malheureusement le pic est légèrement décalé. Cela correspond sûrement à des oligomères de xylose comme précédemment mais ne peut pas correspondre à des monomères de xylose. A partir de 72 heures, un deuxième épaulement apparaît. Il ne correspond toujours pas au xylose, mais probablement à des oligomères plus petits. Toutes ces caractéristiques sont visibles sur la figure n°21.

Un contrôle positif a été réalisé en regardant l'action de la β -xylosidase commerciale sur du xylane commercial. Dans ce cas après 3h sous agitation et chauffage (dans les mêmes conditions de dilution) aucun pic n'est visible. Le xylane n'est pas du tout consommé. Cela confirme donc que la β -xylosidase n'est pas capable de digérer toute seule les chaînes de xylane, du moins si rapidement.

Ayant obtenu précédemment en faible quantité des oligomères de xylose, la présence de xylanase peut être remise en cause. Après un peu de recherche bibliographique, l'importance de la fixation de l'enzyme sur son substrat a été remarquée. Lors de l'utilisation de xylane commercial, la poudre n'a pas été totalement dissoute dans l'eau. En effet après centrifugation une pâte blanche restait au niveau du culot. La difficulté de l'enzyme à se fixer sur un substrat non soluble est remarquée [Matsuzawa, 2016].

Cela permet donc d'expliquer l'inefficacité de l'enzyme. De plus lors du test avec de la xylanase le substrat utilisé est du RBBX (remazol brillant blue xylan) qui n'est pas non plus soluble dans l'eau. Le milieu enzymatique contient peut-être des xylanases, mais ces dernières sont incapables de se fixer sur le substrat.

Le protocole n°3 sur l'activité xylanase a pu être affiné grâce à la publication de Bailey. Un chauffage du substrat RBBX à 80°C permet en effet une meilleure dissolution. [Bailey et al., 1992] Cependant après un essai sur les cultures aucune activité n'est visible.

Il faudrait donc tester à l'aide de différents protocoles l'activité xylanase, ce qui permettrait de voir quelles xylanases sont présentes dans le milieu ou bien de confirmer leur absence. Les xylanases formées par *T.reesei* sont de quatre types. Il serait aussi intéressant de pouvoir dissocier la présence de ces quatre enzymes.

Le travail de Matsuzawa a permis de montrer que les xylanases produites par *T. Reesei* ne pouvait pas se fixer sur un élément non solubilisé. Il sera pour *T.reesei* impossible de dégrader la sciure mise dans le milieu de culture. Cependant *A. niger* semble produire des xylanases capables de se fixer sur les xylandes. Son activité xylanase est effectivement testée sur de la sciure de bouleau [Tenkanen, 1992]. La solution serait donc de voir la compatibilité entre ces deux champignons. Une souche permettrait ainsi de produire de la β -xylosidase tandis que l'autre produirait les xylanases.

II. DESHYDRATATION DU XYLOSE EN FURFURAL

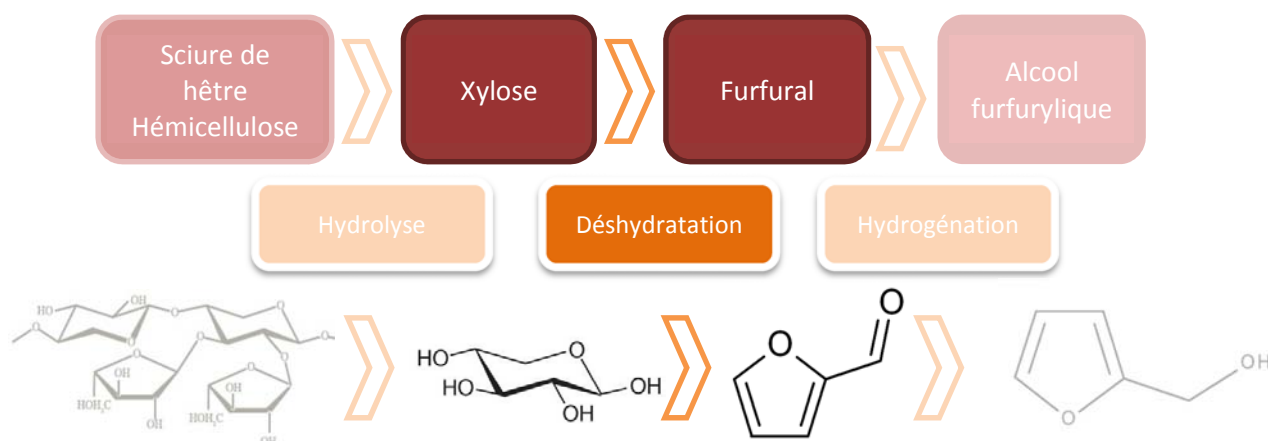


Figure 22 : Deuxième étape : déshydratation du xylose

A. INTRODUCTION

Le furfural est une molécule aromatique (Figure n°23) utilisée en tant que solvant pour les composés aromatiques, mais également pour la production de résines phénoliques. C'est également le précurseur de nombreux composés furaniques et d'alcools. La production mondiale s'élève à environ 300 000 tonnes annuelles, dont 80% produits en Chine à partir de rafles de maïs et 72% consommés dans ce même pays. Le prix est très fluctuant, il s'élevait à 1800 \$ la tonne en 2011.

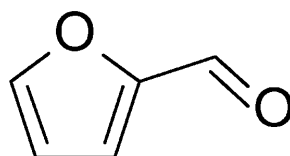


Figure 23 : Molécule de furfural

La production mondiale de furfural se fait par traitement acide de la biomasse hémicellulosique. Le premier procédé, encore utilisé aujourd'hui, est le procédé Quaker Oats, qui se fait en réacteur continu ou fermé à une température modérée de 153°C avec de l'acide sulfurique à 3%. Cependant, de nombreux procédés sont maintenant utilisés. Le mécanisme de déshydratation n'est pas encore correctement établi, car c'est une réaction complexe [Doiseau,2014].

Dans le but de réaliser l'ensemble du projet par voie enzymatique, il aurait été intéressant de trouver des enzymes capables de déshydrater le xylose en furfural. Cependant, le furfural étant nocif pour tous les êtres vivants, aucun organisme ne semble réaliser cette étape.

Le choix s'oriente vers une déshydratation en milieu acide catalysé par l'acide acétique et du charbon de bois dans des conditions douces : une température

modérée de 150°C et une durée de réaction de 5h [Bichot et Clerc, 2016]. Le choix de l'acide acétique présente plusieurs avantages :

- Il est peut être synthétisé par des êtres vivants
- Il a un faible impact environnemental

L'optimisation du procédé consiste dans la modification de la durée, de l'acide organique utilisé et du charbon utilisé. De l'acide phosphorique sera également utilisé car c'est un acide faible facilement assimilable par les levures.

B. MATERIEL ET METHODES

1. Charbon

Deux charbons différents ont été réalisés : hêtre et épicéa. Cette étape est réalisée dans un réacteur à pyrolyse disponible au sein de l'école. La réaction de pyrolyse se déroule à haute température (400°C) pendant 5h en atmosphère inerte (l'oxygène déclenche la combustion du produit). Cette étape est expliquée dans le protocole n°5.

2. Réacteur

La réaction se fait dans un réacteur fermé à température et agitation réglable. La montée en pression dépend de la température souhaitée.

Les différentes expériences réalisées sont récapitulées en tableau n°4.

Numéro	Durée	charbon	acide
1	5h	épicéa	acétique
2	6h	épicéa	acétique
3	8h	épicéa	acétique
4	5h	hêtre	acétique
5	5h	épicéa	phosphorique

Tableau 4 : Conditions d'expérience de la conversion de xylose en furfural

Tous les essais ont été réalisés à une température de 150°C et à une agitation de 200 tours/minutes. (Protocole n°6)

C. RESULTATS ET DISCUSSION

Les résultats obtenus sont récapitulés dans le tableau n°5.

Numéro	Durée	charbon	acide	[furfural]f [mol/L]	rendement
1	5h	épicéa	acétique	2,65E-02	40%
2	6h	épicéa	acétique	3,17E-02	48%
3	8h	épicéa	acétique	1,83E-02	28%
4	5h	hêtre	acétique	3,07E-02	46%
5	5h	épicéa	phosphorique	0	0%

Tableau 5 : Conditions d'expérience de la déshydratation du xylose

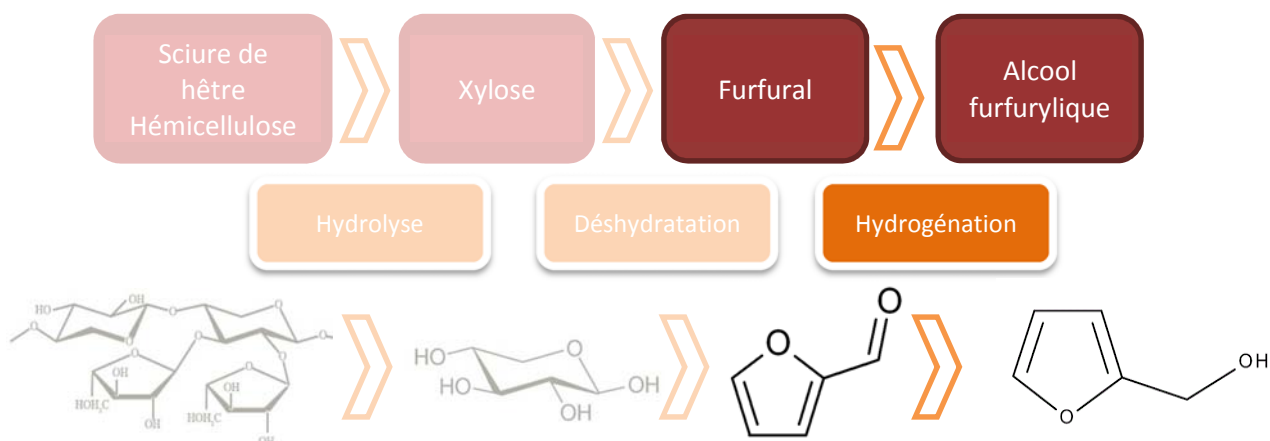
L'expérience 1 est celle réalisée à partir des données fournies. Un rendement raisonnable de 40% est obtenu. On observe que lorsque l'on augmente la durée de réaction d'une heure, le rendement augmente de 8%. Cependant, une durée en réacteur trop longue (expérience 3) semble affecter grandement le rendement.

Dans une logique d'utilisation complète de la biomasse disponible, un essai avec un charbon de hêtre est réalisé dans les mêmes conditions que le charbon d'épicéa et le rendement est supérieur : l'acidité du bois initial ne semble pas être le paramètre influent (l'épicéa est plus acide que le hêtre).

L'acide acétique inhibe la fermentation alcoolique des levures utilisées dans l'étape suivante [Yoshiyama, 2015]. L'utilisation d'un acide inorganique tel que l'acide phosphorique semble intéressante. Cependant, on observe que cet acide ne catalyse pas la réaction.

La réalisation de cet étape selon les conditions 4 semble donc la plus appropriée : on utilise uniquement du hêtre et le temps de 5h limite la consommation d'énergie. Par manque de temps, une optimisation plus précise du temps de réaction n'est pas réalisée, mais il serait intéressant de réaliser l'essai n°4 sur différentes durée afin de pouvoir comparé le temps de réaction et le rendement.

III. REDUCTION DU FURFURAL EN ALCOOL FURFURYLIQUE



A. INTRODUCTION

La dernière étape de ce projet consiste à convertir le furfural en alcool furfurylique. Rappelons qu'industriellement, cette réaction est souvent fortement énergivore et utilise des produits issus de la chimie lourde.

La conversion d'un aldéhyde (le furfural) pour en faire un alcool (l'alcool furfurylique) est commune dans la biosphère : en effet, cette réaction intervient dans le mécanisme de fermentation alcoolique, expliqué en figure n°24. Le pyruvate est issu de glucose.

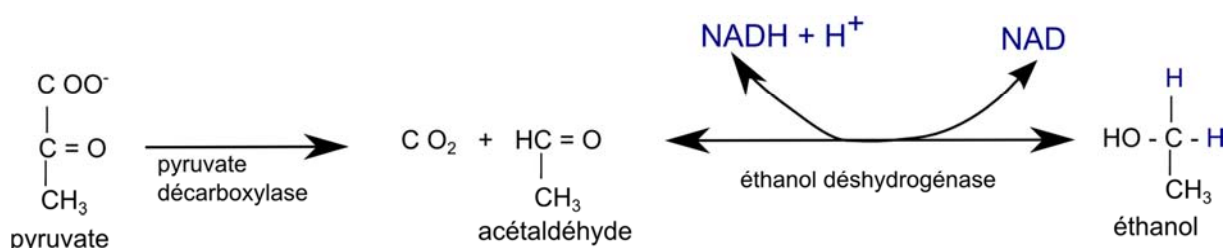


Figure 24 : Mécanisme de fermentation alcoolique (source : bougepourtaplanete.fr)

On observe que la transformation de l'acétaldéhyde en éthanol est catalysée par l'éthanol déshydrogénase, également appelée alcool déshydrogénase. Cette enzyme est une oxydoréductase, elle catalyse une réaction d'oxydoréduction, c'est-à-dire un échange d'électron entre deux molécules. Le choix est fait de travailler avec cette enzyme.

Dans notre cas précis, le mécanisme est expliqué en figure n°25.

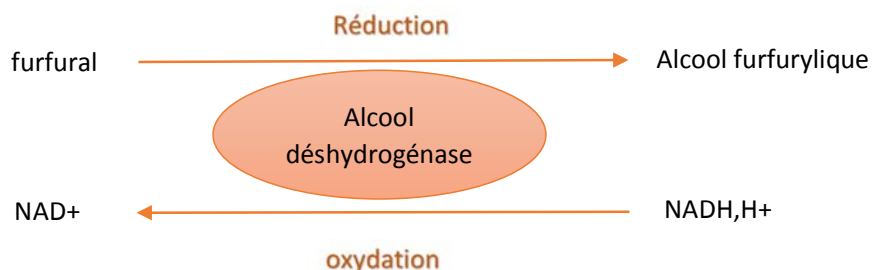


Figure 25 : Mécanisme de la synthèse

Cette réaction nécessite la présence du NADH,H^+ , coenzyme très utile dans le métabolisme des êtres vivants.

En utilisant un organisme capable de synthétiser directement cette enzyme, la production en continu de cette enzyme est possible, ce qui limite les coûts d'achat de l'enzyme commerciale.

B. MATERIEL ET METHODES

1. Choix de la souche

L'alcool déshydrogénase est présente chez de nombreux êtres vivants qui réalisent la fermentation alcoolique. Cependant, il faut que la souche soit résistante au furfural, inhibiteur compétitif (il se fixe sur le site actif de l'enzyme à la place du substrat) de cette fermentation. Grâce à sa structure proche de celle de l'acétaldéhyde, il se fixe sur le site spécifique de l'enzyme et inhibe la réaction initiale. Les souches utilisées doivent être en capacité de se développer en milieu furfural, et de le transformer en alcool furfurylique moins nocif pour leur organisme. Il est ici préféré l'utilisation de souches non modifiées.

Des bactéries telles que *E.coli* (bactérie intestinale) [Boopathy, 1993] mais aussi des levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* (levure de boulanger) [Lewis Liu, 2005] semblent correspondre. Ces deux organismes présentent des taux de conversion du furfural intéressants, de l'ordre de 95% pour *E.coli* [Boopathy, 1993] et jusqu'à 100% pour *S.cerevisiae* [Lewis Liu, 2005]. *S.cerevisiae* est sélectionnée car elle présente plusieurs avantages :

- Il est facile de s'en procurer, elle est non nocive et très abordable
- les levures se développent bien en milieu solide comme en milieu liquide
- leur croissance est très rapide (temps de génération : 90 minutes), c'est-à-dire que toutes les 90 minutes la colonie est doublée
- la croissance se fait dans des conditions basiques : 28°C et 70% d'humidité

De plus, on montre que l'alcool furfurylique produit n'est pas transformé à son tour par la levure [Mandalika, 2014].

2. Mise en culture des levures

L'objectif de cette étape est d'obtenir des cultures de levures viables, faciles à conserver et à réutiliser. La levure utilisée se présente sous forme d'un cube solide. Nous procédons dans un premier temps à une mise en culture (protocole n°9) sur un milieu solide YP (Extrait de levure/peptone) [Mandalika,2014] réalisé selon le protocole n°7.

Une fois ce milieu développé, nous procédons à un repiquage des colonies (protocole n°10), dans le but d'obtenir des colonies de taille équivalente, et isolées de tout autre organisme.

3. Milieu liquide YPD

Un milieu liquide est réalisé à partir des travaux de Mandalika (protocole n°8). Ce milieu permet un développement rapide et mesurable facilement des levures. Les levures sont inoculées en milieu stérile (protocole n°11).

4. Suivi de la croissance

Un suivi régulier de la croissance des levures est réalisé par mesure de la densité optique à 600nm au spectrophotomètre. Le suivi est fait toutes les 90 min ou toutes les 2h. 1 unité de DO correspond à 3×10^7 cellules/mL.

5. Mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique est calculée à partir du dosage de l'alcool furfurylique et du furfural par chromatographie liquide HPLC (Voir annexe II). La colonne utilisée est une C18. Le suivi est fait toutes les 90 minutes ou toutes les 2h.

6. Conditions de culture des levures

La croissance des levures et la conversion du furfural en alcool furfurylique sont testées dans différents milieux présentés dans le tableau n°6.

N° milieu	Descriptif
1	milieu YPD
2	Milieu YPD + (5,10,15)g.L-1 furfural
3	Milieu YPD + 7g.L-1 furfural
4	Milieu furfural + acide acétique + charbon

Tableau 6 : Milieux de culture de *S.cerevisiae*

Toutes les expériences sont réalisées dans une étuve à 28°C, 70% d'humidité relative avec agitation continue.

C. RESULTATS ET DISCUSSION

1. Croissance des levures

La première expérience consiste à observer la croissance des levures dans un milieu enrichi en furfural (figure n°26).

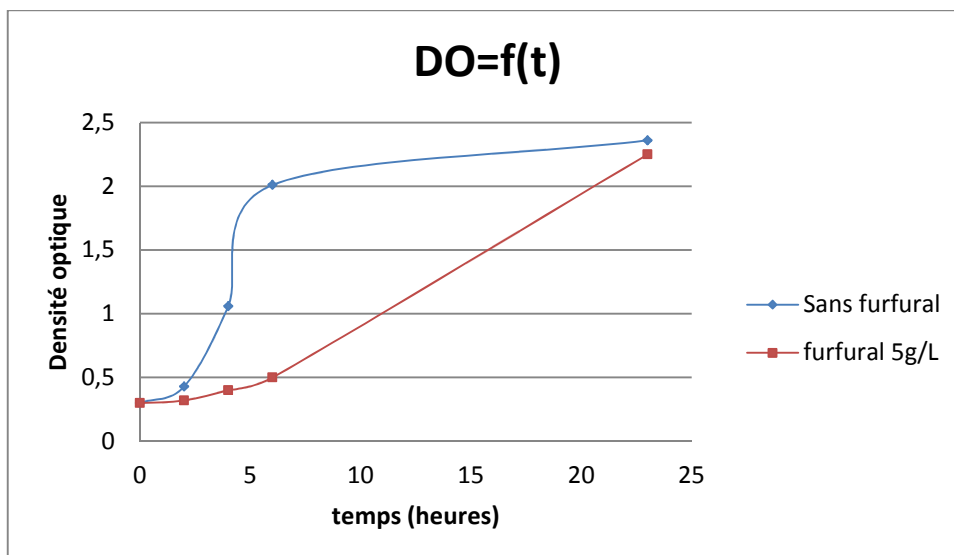


Figure 26 : croissance des levures en fonction du temps

La courbe de croissance sans furfural se présente en 3 parties : une première phase de latence pendant 1h, puis une phase de croissance linéaire pendant 4h et enfin une nouvelle phase de latence. La densité optique après 8h s'élève à 2,2 (saturation du spectrophotomètre), ce qui correspond à $6,6 \times 10^7$ levures dans le milieu. Le milieu de culture est donc adapté à la croissance de ces levures, et ces résultats confirment le développement rapide des levures en milieu liquide.

En ce qui concerne la croissance dans le milieu enrichi en furfural (5g.L^{-1} , 52 mM), une phase de latence plus longue est remarquée, mais une croissance similaire après cette phase (le profil de la courbe est différent car le suivi ne peut se faire régulièrement entre $t+8$ et $t+23$). Ces premiers résultats sont encourageants : les levures savent s'adapter au furfural et maintenir une croissance plutôt rapide. Villa et al. (1992) montrent également que le furfural à une concentration de 6g.L^{-1} ajouté toutes les 6h jusqu'à une concentration finale de 30g.L^{-1} n'inhibe pas la croissance de *S.cerevisiae*, ce qui confirme ces premiers résultats.

Les mêmes expériences ont été réalisées dans un milieu à 7g.L^{-1} (72 mM) et donne des résultats similaires avec un temps de latence rallongé.

Cependant, dans le cas présent, un milieu à 10g.L^{-1} (104 mM) de furfural, les levures ne se développent pas. Il faut donc privilégier un apport régulier mais à plus petite dose de furfural.

2. Activité enzymatique

Les levures résistent et se développent dans un milieu contenant du furfural. Il reste maintenant à savoir si elles le convertissent en alcool furfurylique.

Une première manipulation a été réalisée sans suivi, à partir d'un milieu à 5g.L^{-1} de furfural. Les résultats sont récapitulés dans le tableau n°7 ci-dessous

expérience	rendement	taux de conversion
1	112%	99%
2	55%	100%

Tableau 7 : Rendement et taux de conversion (furfural 5g.L^{-1})

Le taux de conversion représente la quantité de furfural restante sur la quantité de furfural initiale, alors que le rendement quantifie la quantité d'alcool furfurylique produite par rapport à la quantité de furfural initiale. Le rendement de 112% peut sembler surprenant. Cependant, il est envisageable que *S.cerevisiae* synthétise de l'alcool furfurylique dans d'autres voies métaboliques.

La grande différence de rendement est difficilement explicable ici. L'hypothèse la plus probable est dans la quantité de furfural injectée, il est possible qu'elle n'ait pas été de 5g.L^{-1} effective (le calcul du rendement se fait avec la quantité théorique de furfural injecté). Le furfural est en effet filtré pour être stérilisé. Une quantité non négligeable peut alors être passée en volume mort. Pour valider cette hypothèse, il aurait fallu avoir une mesure initiale de la quantité de furfural dans le milieu, ce qui n'a pas été réalisée ici.

Z.Lewis Liu et Al. [2005] présentent également des résultats comparables avec un taux de conversion du furfural de 100% avec un rendement de 66% environ sans justifier cet écart.

Dans un second temps, un suivi plus précis de la conversion a été réalisé dans différentes conditions. Le milieu 3 contenant déjà des levures ayant converti du furfural a été réutilisé : 7g.L^{-1} de furfural ont été à nouveau réinjectés et la production d'alcool furfurylique et la consommation de furfural ont été suivis ce qui permet d'éviter le temps d'adaptation des levures au milieu enrichi en furfural. Les résultats sont présentés en figure n°27.

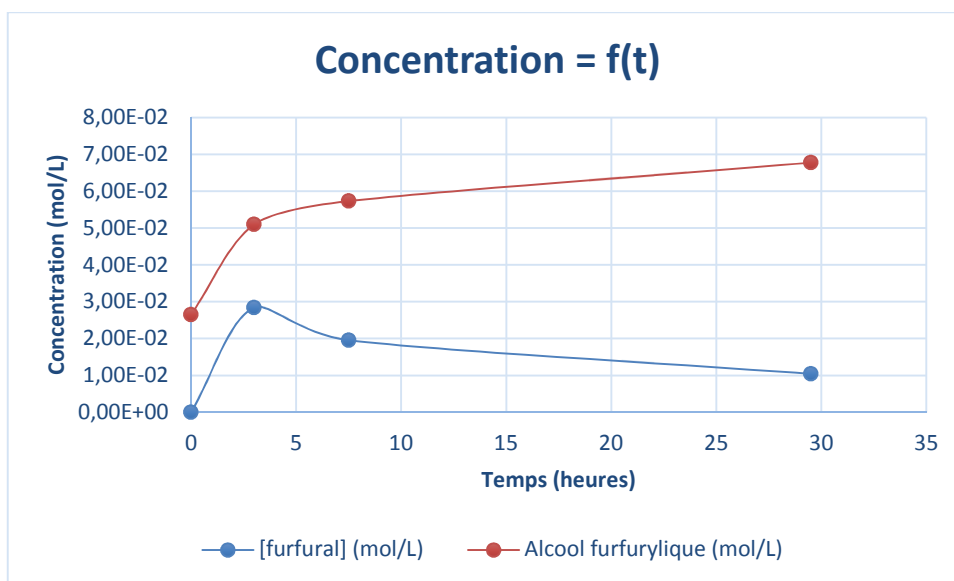


Figure 27 : Concentration en fonction du temps (milieu 7g.L^{-1})

La mesure à $t=0$ correspond à la mesure préliminaire qui nous donne la quantité de furfural et d'alcool furfurylique initialement présents dans le milieu (puisque une première conversion y a déjà eu lieu). On observe que tout le furfural a été transformé lors de cette première conversion, et que $3 \cdot 10^{-2}$ mol/L d'alcool furfurylique ont été produites. Une première mesure au bout de 3h montre que la conversion du furfural en alcool furfurylique est rapide (on a déjà produit la moitié de l'alcool furfurylique).

Les résultats de cette manipulation sont récapitulés dans le tableau n°8.

Rendement	Taux de conversion
57%	86%

Tableau 8 : Résultats de production (milieu 7g.L⁻¹)

Un bon taux de conversion est à nouveau obtenu, mais le rendement est assez faible. Afin d'analyser ce résultat, il faudrait effectuer un dosage plus global des produits obtenus pour vérifier les hypothèses suivantes : l'alcool furfurylique ou le furfural pourrait être convertis notamment en acide furoïque par *S.cerevisiae*.

Pour conclure, la conversion du furfural en alcool furfurylique présente un rendement moyen au cours de nos expériences de 84%. Une étude plus fine de la quantité de furfural supportée par les levures ainsi qu'une étude cinétique de l'alcool déshydrogénase seraient intéressantes pour permettre une production en continu. De plus, une production directement à partir des produits obtenus lors de l'étape de déshydratation du xylose est étudiée en 4^{ème} partie de ce rapport.

IV. VERS UNE PRODUCTION A PLUS GRANDE ECHELLE : BILAN ET OBJECTIFS

A. MISE EN PLACE D'UN PROCEDE EN CONTINU

1. Introduction

Dans un objectif d'industrialisation, il est nécessaire d'étudier la faisabilité d'un procédé en continu, c'est-à-dire la possibilité de réutiliser directement les produits obtenus à l'étape précédente sans purification. La première étape n'ayant pas abouti, seule l'étape de réduction du furfural en alcool furfurylique est étudiée ici.

Les produits obtenus dans le réacteur après déshydratation du xylose en furfural sont :

- du xylose résiduel (le rendement n'est pas de 100%),
- du furfural
- de l'acide acétique
- du charbon de bois

La purification du furfural se fait majoritairement par distillation, ce qui nécessite un apport de chaleur et une consommation d'énergie non négligeable (il faut ici évaporer environ 170 mL de produit par batch). Il serait donc intéressant de pouvoir incorporer les levures directement dans ce milieu pour limiter la consommation énergétique du procédé.

L'acide acétique est un acide faible. Dissocié dans l'eau, il libère des protons et des anions qui provoquent l'augmentation du pH intracellulaire des levures. Cette augmentation inhibe la capacité de fermentation des levures [Yoshiyama, Y., et al. 2015]. Il est donc nécessaire de vérifier la consommation de furfural par cette levure en présence d'acide acétique. Les autres composés ne semblent pas poser problème.

2. Matériels et méthodes

Des essais de conversion du furfural en milieu contenant de l'acide acétique ont ainsi été réalisés à partir des solutions obtenues en deuxième étape. Ces expériences ont été réalisées dans les mêmes conditions qu'en partie III : avec une agitation en continu, dans une étuve à 28°C, 75% HR.

Les différents essais sont récapitulés dans le tableau n°9.

Expérience	Milieu
1	90 mL d'essai 3 réacteur, 10 mL levures issues d'un milieu contenant 5g/L de furfural
2	75 mL d'essai 3 réacteur, 25 mL milieu YPD, 10 mL levures diluées 20x issues d'un milieu contenant 5g/L de furfural
3	100 mL milieu YPD, 50mM furfural, 10 mL levures diluées 20x issues d'un milieu contenant 5g/L de furfural
Témoin	100 mL milieu YPD, 10 mL levures diluées 20x issues d'un milieu contenant 5g/L de furfural

Tableau 9 : Expériences de conversion du furfural en milieu acide acétique

3. Résultats et discussions

La première expérience donne un rendement de 89% avec un taux de conversion du furfural de 96%. Ces très bons résultats semblent contredire la publication de Yoshiyama, Y., et al.

Un suivi du taux de furfural et d'alcool furfurylique a été réalisé au cours du temps. Les résultats sont présentés en figure n°28.

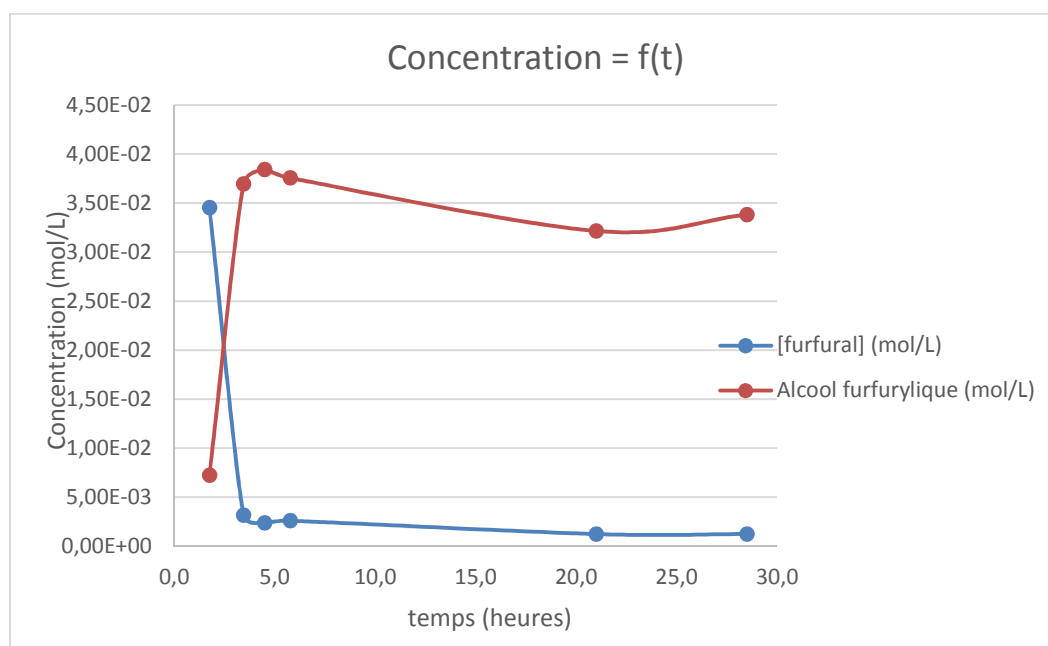


Figure 28 : Concentration en furfural et alcool furfurylique au cours du temps

La conversion du furfural en alcool furfurylique est rapide : en 5h, la quasi-totalité du furfural a disparu. Cette rapidité de conversion peut justifier une résistance apparente à l'acide acétique : la réaction de défense des levures à l'acide acétique est contrôlée par le gène HAA1 (80% des gènes induits sont régulés par HAA1 [Yoshiyama et al. 2015]). Il est possible que l'induction de ce gène soit plus lente que la consommation du furfural.

L'expérience 2 a été réalisée dans les mêmes conditions mais à partir d'enzymes diluées pour mieux suivre la consommation de furfural. Cependant la consommation du furfural n'est pas visible. Les enzymes en faible concentration ne semblent pas parvenir à consommer le furfural avant que la réaction de défense et

donc d'inhibition de la fermentation ne soit déclenchée. Pour valider cette hypothèse, de nouvelles expériences sont réalisées à partir de ces enzymes diluées :

L'expérience 3 permet d'étudier la consommation de furfural par les enzymes diluées dans un milieu ne contenant pas d'acide acétique. L'expérience témoin permet de vérifier que les levures diluées sont toujours en état de présenter une croissance correcte (figure n°29).

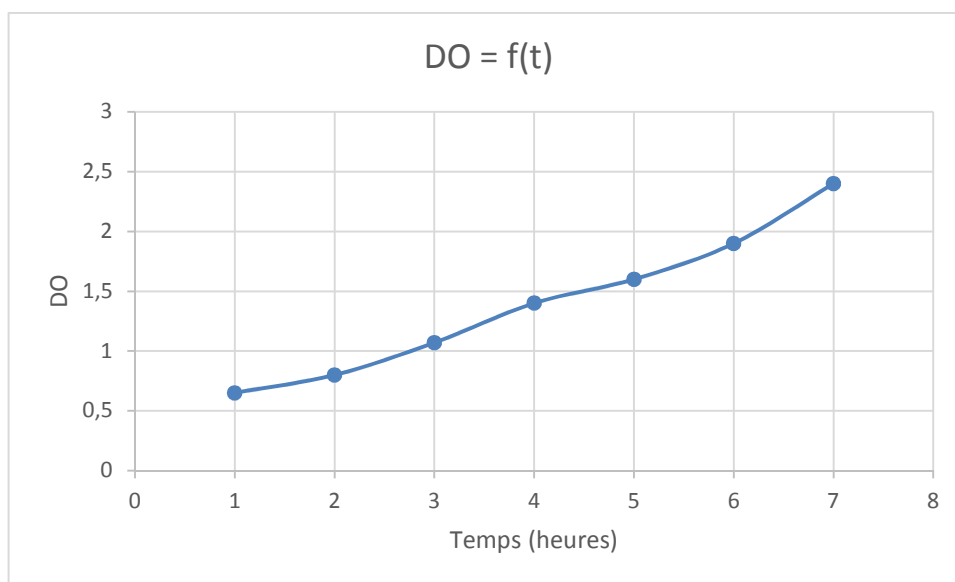


Figure 29 : croissance des levures (Témoin)

Le témoin présente une augmentation de la densité optique en fonction du temps : les levures sont toujours actives. De plus, l'expérience n°3 donne un rendement de 20% après 8h : la conversion du furfural est plus lente mais même diluées, les levures parviennent à le convertir. Ces résultats confirment l'hypothèse selon laquelle les levures diluées ne parviennent pas à le convertir avant que le mécanisme d'inhibition de la fermentation par l'acide acétique ne soit enclenché.

Pour conclure, la conversion du furfural peut se faire sans purification, dans le milieu contenant de l'acide acétique. Cependant, il semble nécessaire d'apporter une concentration de levures importante au milieu pour que la conversion s'effectue avant l'inhibition. De plus, les levures sont dégradées par l'acide acétique : il sera donc impossible de les réutiliser, ce qui engendrera nécessairement un surcoût.

B. RENDEMENT GLOBAL

Un rendement global du procédé a été estimé à partir des rendements obtenus lors de nos manipulations.

Calculons tout d'abord la masse d'alcool furfurylique nécessaire à la furfurylation d' 1m^3 de hêtre. On considère que la stabilité et la durabilité du hêtre sont réellement améliorées pour un gain de masse de 40%.

Pour une masse volumique moyenne du hêtre de 680 kg/m^3 , il faut ainsi :

$0,4 \times 680 = 272\text{ kg d'alcool furfurylique}$ pour traiter 1m^3 de bois.

Les calculs de la masse de sciure nécessaire sont récapitulés en tableau 10 ci-dessous

Masse de furfural nécessaire pour 1m ³ hêtre	2,72E+05	g
Quantité de matière d'alcool furfurylique	2,78E+03	mol
Rendement molaire de réduction	89%	
Quantité de matière de furfural nécessaire	3,12E+03	mol
Rendement molaire de déshydratation	45%	
Quantité de matière de xylose nécessaire	6,93E+03	mol
Masse de xylose correspondante	1,04E+06	g
masse d'hémicellulose nécessaire	1,41E+06	g
masse de sciure de hêtre nécessaire	5,04E+06	g

Tableau 10 : Calcul de la masse de sciure de hêtre nécessaire

Les données utilisées pour calculer cette quantité sont récapitulées dans le tableau n°11. Les hypothèses sont les suivantes : 100% du xylose issu des hémicelluloses est récupéré, est la sciure est sèche à l'achat.

M(alcool furfurylique)	98 g/mol
M(furfural)	96 g/mol
M(xylose)	150 g/mol
% massique d'hémicelluloses dans le hêtre	27,80 %
% massique de xylose dans les hémicelluloses	74,00 %

Tableau 11 : données nécessaires au calcul

Il faut ainsi **5 040kg de sciure** pour traiter 1m³ de bois.

Rendement massique global = 5%

Si l'on s'intéresse rapidement aux coûts, la tonne de sciure est actuellement vendue aux alentours de 25€ la tonne . L'achat de sciure nécessaire au traitement d'un mètre cube de bois reviendrait ainsi à 126€. Il faut rajouter à ce coût l'achat d'acide acétique, des éléments nutritifs de *T.reesei*

Le cours de l'alcool furfurylique est variable, on peut l'estimer autour de 1500€ la tonne. L'achat d'alcool furfurylique originaire de Chine pour le traitement d'un mètre cube de bois coûterait 408€.

CONCLUSION

Ce projet a permis de synthétiser de l'alcool furfurylique par voie blanche. La déshydratation du xylose en furfural présente un rendement satisfaisant. Cependant, cette phase reste relativement énergivore. De plus, les levures *S.cerevisiae* permettent une conversion du furfural en alcool furfurylique rapide et peu coûteuse et semblent aisément adaptables à un procédé en continu, ce qui faciliterait l'industrialisation.

La déconstruction des hémicelluloses par *T.reesei* serait à combiner avec l'action d'un champignon dont les xylanases sont actives sur la biomasse afin de parvenir à obtenir des monomères de xylose. Un prétraitement pourrait également être envisagé pour faciliter l'accès des enzymes aux hémicelluloses.

Sans considérer la phase d'obtention du xylose, le rendement global du procédé est de 40%. Avant une industrialisation, il sera nécessaire d'étudier la rentabilité d'un tel projet. En effet, une étape de purification du xylose semble inévitable et les procédés de purification sont souvent coûteux.

Pour limiter l'achat de produits manufacturés, il serait également intéressant d'étudier la synthèse d'acide acétique nécessaire à la déshydratation du xylose. Cet acide est un coproduit de nombreuses synthèses métaboliques.

Le hêtre est une ressource qu'il est nécessaire de valoriser car elle présente de nouveaux atouts et pourrait devenir le symbole de la redynamisation de l'économie locale vosgienne, notamment à travers du projet Furalor et de la marque collective Terre de hêtre.

BIBLIOGRAPHIE

- Bailey, Michael J., Peter Biely, and Kaisa Poutanen. 1992. "Interlaboratory Testing of Methods for Assay of Xylanase Activity." *Journal of Biotechnology* 23 (3): 257–70.
- Bergez-Lacoste, Manon. 2013. "Conception de Biosolvants À Partir de La Molécule Plateforme Furfural, En Laboratoires Virtuel et Réel." École Doctorale Sciences de la Matière (Toulouse);
- Bichot, Clerc. 2016 "Synthèse d'alcool furfurylique par voie blanche." Enstib (Epinal)
- Biely, Peter, Dana Mislovičová, and Rudolf Toman. 1988. "Remazol Brilliant Blue-Xylan: A Soluble Chromogenic Substrate for Xylanases." In , edited by BT - Methods in Enzymology, 160:536–41. Biomass Part A: Cellulose and Hemicellulose. Academic Press.
- Boopathy, R., H. Bokang, and L. Daniels. 1993. "Biotransformation of Furfural and 5-Hydroxymethyl Furfural by Enteric Bacteria." *Journal of Industrial Microbiology* 11 (3): 147–150.
- Chemin, Maud. 2014. *Valorisation Des Xylanes Du Bois : Vers La Synthèse de Copolymères Amphiphiles Bio-Sourcés*. Bordeaux.
- Diaz De Villegas, M. E., P. Villa, M. Guerra, E. Rodriguez, D. Redondo, and A. Martinez. 1992. "Conversion of Furfural into Furfuryl Alcohol by *Saccharomyces Cerevisiae* 354." *Acta Biotechnologica* 12 (4): 351–354.
- Doiseau, Aude-Claire. 2014. "Déshydratation Catalytique Du Xylose En Furfural." Lyon 1.
- Gutiérrez, Tony, Marian L. Buszko, Lonnie O. Ingram, and James F. Preston. 2002. "Reduction of Furfural to Furfuryl Alcohol by Ethanologenic Strains of Bacteria and Its Effect on Ethanol Production from Xylose." In *Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 327–340. Springer.
- Haapala, Reetta, Susan Linko, Elke Parkkinen, and Pirkko Suominen. 1994. "Production of Endo-1,4- β -Glucanase and Xylanase by *Trichoderma Reesei* Immobilized on Polyurethane Foam." *Biotechnology Techniques* 8 (6): 401–6.
- Haltrich, Dietmar, Bernd Nidetzky, Klaus D. Kulbe, Walter Steiner, and Silvia Župančič. 1996. "Production of Fungal Xylanases." *Bioresource Technology* 58 (2): 137–61.
- Kristufek, D., S. Zeilinger, and C. P. Kubicek. 2016. "Regulation of β -Xylosidase Formation by Xylose in *Trichoderma Reesei*." *Applied Microbiology and Biotechnology* 42 (5): 713–17.
- Liu, Z. Lewis, Patricia J. Slininger, and Steve W. Gorsich. 2005. "Enhanced Biotransformation of Furfural and Hydroxymethylfurfural by Newly Developed Ethanologenic Yeast Strains." In *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, 451–460. Springer.
- Mandalika, Anurag, Li Qin, Trey K. Sato, and Troy Runge. 2014. "Integrated Biorefinery Model Based on Production of Furans Using Open-Ended High Yield Processes." *Green Chem.* 16 (5): 2480–89
- Matsuzawa, Tomohiko, Satoshi Kaneko, and Katsuro Yaoi. 2016. "Improvement of Thermostability and Activity of *Trichoderma Reesei* Endo-Xylanase Xyn III on Insoluble Substrates." *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (18): 8043–51.
- Poutanen, Kaisa, and Jürgen Puls. 1988. "Characteristics of *Trichoderma Reesei* β -Xylosidase and Its Use in the Hydrolysis of Solubilized Xylans." *Applied Microbiology and Biotechnology* 28 (4–5): 425–32.
- Rass, Hicham Ait. 2014. "Transformation Chimique Du Furfural En Acide 2, 5-Furane Dicarboxylique Par Catalyse Hétérogène." Université Claude Bernard-Lyon I.
- Souza, Wagner Rodrigo de. 2013. "Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass."

- Tenkanen, Maija, Jürgen Puls, and Kaisa Poutanen. 1992. "Two Major Xylanases of *Trichoderma Reesei*." *Enzyme and Microbial Technology* 14 (7): 566–74.
- Villa, G. P., R. Bartoli, R. Lopez, M. Guerra, M. Enrique, M. Penas, E. Rodriguez, D. Redondo, I. Jglesias, and M. Diaz. 1992. "Microbial Transformation of Furfural to Furfuryl Alcohol by *Saccharomyces Cerevisiae*." *Acta Biotechnologica* 12 (6): 509–512.
- Xiong, H., O. Turunen, O. Pastinen, M. Leisola, and N. von Weymarn. 2004. "Improved Xylanase Production by *Trichoderma Reesei* Grown on L-Arabinose and Lactose or D-Glucose Mixtures." *Applied Microbiology and Biotechnology* 64 (3): 353–58.
- Yoshiyama, Yoko, Koichi Tanaka, Kohei Yoshiyama, Makoto Hibi, Jun Ogawa, and Jun Shima. 2015. "Trehalose Accumulation Enhances Tolerance of *Saccharomyces Cerevisiae* to Acetic Acid." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 119 (2): 172–75.

ANNEXES

ANNEXE I : LA CATALYSE ENZYMATIQUE

Les enzymes sont des protéines synthétisées par les êtres vivants. Elles possèdent une structure tridimensionnelle qui leur confère leur spécificité. Dans les conditions physico-chimique compatibles avec la vie (pH, température), aucune des réactions chimique de synthèse ou de dégradation des molécules du vivant ne peut se produire à une vitesse significative. Chacune de ces réaction nécessite une enzyme, qui fonctionne comme catalyseur de ces réactions, c'est-à-dire qu'elles augmentent significativement la vitesse de réaction et qu'elles ne sont pas consommées. La vitesse est multipliée par 10^8 à 10^{11} .

Les enzymes abaissent de manière marquée l'énergie d'activation d'une réaction par une interaction forte mais transitoire de son site actif avec le substrat qui stabilise ce dernier dans un état particulier plus instable : l'état de transition (Figure A). Le substrat est déformé et interagît avec l'enzyme avant de devenir le produit. L'ensemble de ces réactions s'effectue dans un repli de la protéine : le site actif.

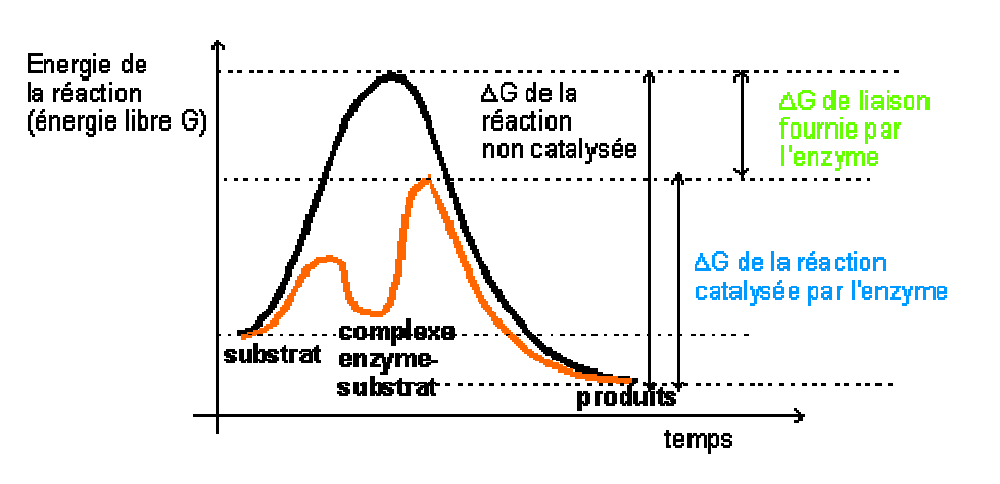


Figure A : énergie libre en fonction du temps pour réaction catalysée et non catalysée (source : pst.chez-alice.fr)

Les enzymes ne sont pas modifiées lors de la réaction chimique, et ne modifient pas l'équilibre des réactions qu'elles catalysent. Elles sont généralement spécifiques d'un substrat et ne réalisent qu'un seul type de réaction chimique.

Les catalyses enzymatiques nécessitent parfois la présence d'un cofacteur. Il peut être :

- Un ion métallique (ions Fe^{2+} , Mg^{2+})
- Une vitamine B ou C
- Un groupement prothétique : une molécule organique non protéique qui se fixe de manière covalente à l'enzyme (FAD)

- Un co-substrat : une molécule organique non protéique qui se fixe de manière réversible à l'enzyme (NADH)

Les enzymes peuvent présenter différents types de cinétique. Nous nous intéressons ici uniquement aux enzymes michaéliennes, c'est-à-dire qui suivent une cinétique de type :



La cinétique de ces enzymes peut être caractérisée par deux valeurs :

- V_m , la vitesse maximale de réaction
- K_m , la constante de Michaëlis, qui correspond à la concentration de substrat pour laquelle la vitesse de réaction enzymatique est égale à la moitié de la vitesse maximale V_m .

Le calcul de ces valeurs est expliqué en annexe III.

ANNEXE II : CHROMATIGRAPHIE HPLC

L'HPLC (chromatographie liquide à haute performance) est une méthode de quantification et d'analyse des composés d'une solution.

Cette technique permet la séparation des différents composés dans une colonne de chromatographie. La colonne est composée d'une phase stationnaire sur laquelle on fait circuler une phase mobile contenant notre échantillon et le solvant. Les composants de la phase mobile ont plus ou moins d'affinité avec la phase stationnaire et mettent ainsi plus ou moins de temps à traverser la colonne. L'analyse en sortie de colonne permet donc d'identifier et de quantifier les composés les uns après les autres.

Un solvant circule en continu et sous pression dans la colonne HPLC à l'aide d'une pompe réglable afin de proposer un débit spécifique en fonction du composé. Il entraîne l'échantillon dans la phase mobile. Le solvant utilisé sera principalement de l'eau. Un gradient de solvant (on injecte une concentration de plus en plus importante de solvant) peut être utilisé pour éjecter toutes les molécules restantes dans la colonne, un acide par exemple.

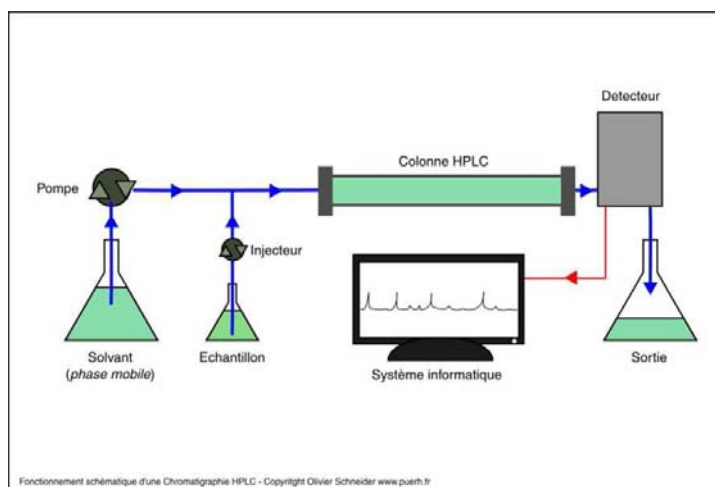


Figure B : Schéma de fonctionnement de l'HPLC (Source : Oliver Schneider, puerh.com)

En fonction des composés que l'on souhaite analyser, différentes colonnes existent. Voici les trois différentes colonnes utilisées lors de nos analyses :

- Colonne Shodex Sugars : Elle sépare selon la méthode d'échange d'ions. La colonne est chargée positivement ou négativement. Les ions en solution seront plus ou moins retenus par la phase stationnaire. Elle sera donc utilisée pour les sucres composant les hémicelluloses.

- Colonne C18. La phase stationnaire est composée d'un gel de silice. La séparation se fait selon la polarité. Cette colonne est dite à phase inverse car la phase stationnaire est peu polaire. On utilise ainsi un solvant polaire (le plus souvent de l'eau). Les composés polaires sortiront donc les plus rapidement de la colonne alors que les composés peu polaires seront retenus plus longtemps.

- Colonne ultrasélective Pinnacle Biphényl. Dans ce cas la phase stationnaire est très sélective, unique et de type biphényl.

Ces deux dernières colonnes ont servies pour l'alcool furfurylique et le furfural.

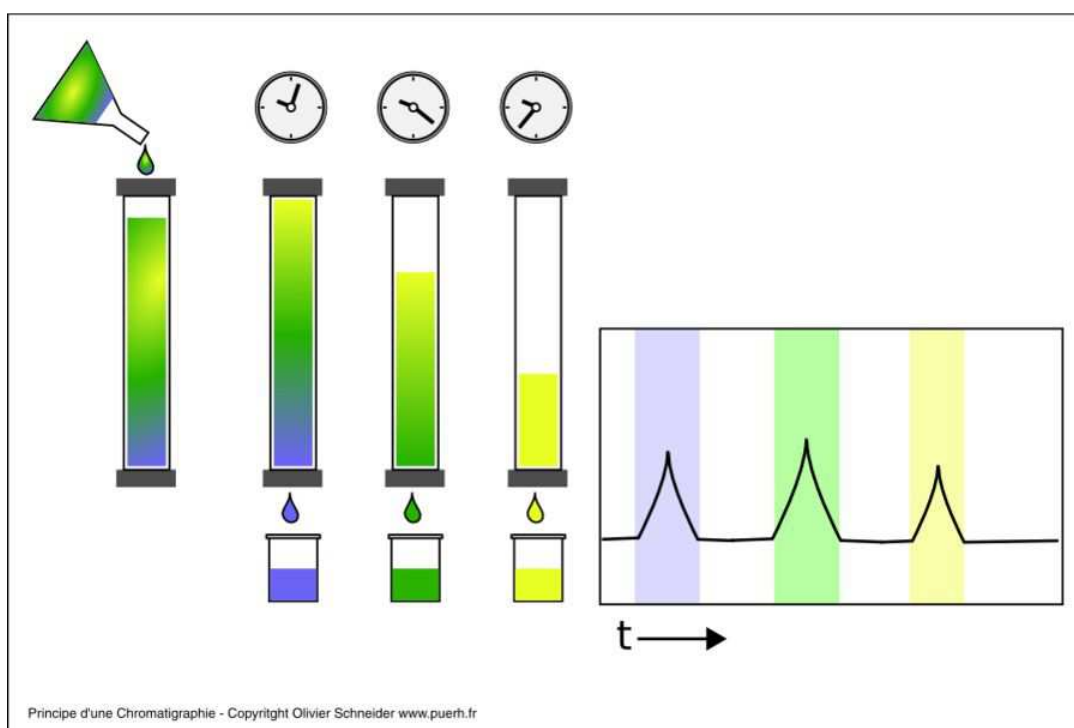


Figure C : Schéma d'explication de l'analyse en sortie de colonne. (Source : Oliver Schneider, puerh.com)

Une fois les composés séparés (figure C), il faut les analyser. Différentes méthodes existent :

Pour la colonne séparant les sucres, un réfractomètre a été placé en sortie. Un réfractomètre permet d'identifier un composé en fonction de l'angle avec lequel il réfléchit la lumière.

Pour les deux autres colonnes, une analyse des spectres UV par spectrophotométrie permet d'obtenir le chromatogramme. La spectrophotométrie consiste à étudier l'absorbance de la lumière du composé : chaque composé

absorbe la lumière à une longueur d'onde précise, ce qui permet de l'identifier. La quantité de lumière absorbée permet de quantifier la quantité de produit.

Sur le chromatogramme final, différents pics correspondant à chaque composé sont obtenus (figure C). Plus le débit sera lent, plus les composés seront séparés entre eux.

Chaque composé a un temps de sortie précis, appelé temps de rétention. Il est spécifique à la colonne utilisée. Par exemple le xylose sort à 11min54 sur la colonne employée, alors que le xylane sort plus tôt : on peut ainsi les distinguer et les quantifier indépendamment. Pour l'analyse du furfural et de l'alcool furfurylique, les temps de rétention sont très proches mais ces deux composés ne sont pas visibles à la même longueur d'onde. En effet l'alcool furfurylique s'analyse à 220nm tandis que le furfural est visible pour une longueur d'onde de 270nm. Leur quantification est ainsi possible même s'ils sont tous les deux présents en solution.

ANNEXE III: CALCUL DE VM ET KM

Dans le cadre d'une cinétique michaëlienne, on peut exprimer :

$$v = \frac{d[P]}{dt}$$

En traçant $[P] = f(t)$, la dérivée de la courbe à un instant t donne la valeur de la vitesse de réaction à cet instant.

Traçons $[P] = f(t)$ pour différentes concentrations de substrat (figure D).

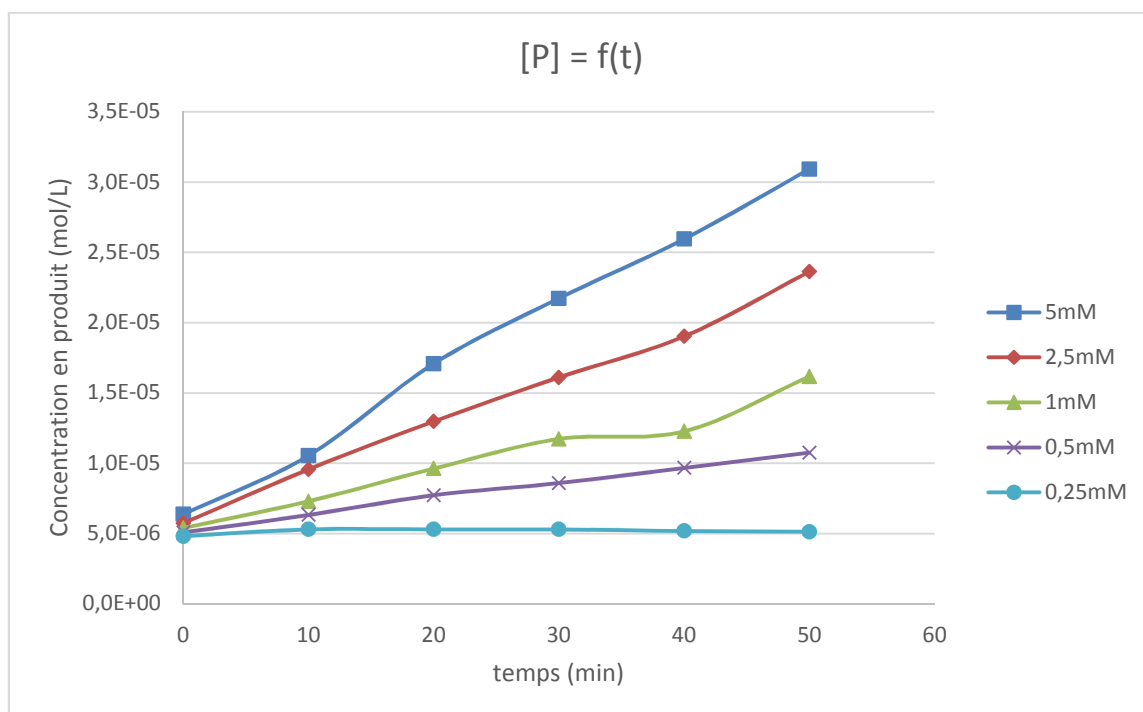


Figure D : $[P]=f(t)$

On détermine graphiquement la tangente à l'origine afin d'obtenir la vitesse initiale (pente de la courbe) (figure E)

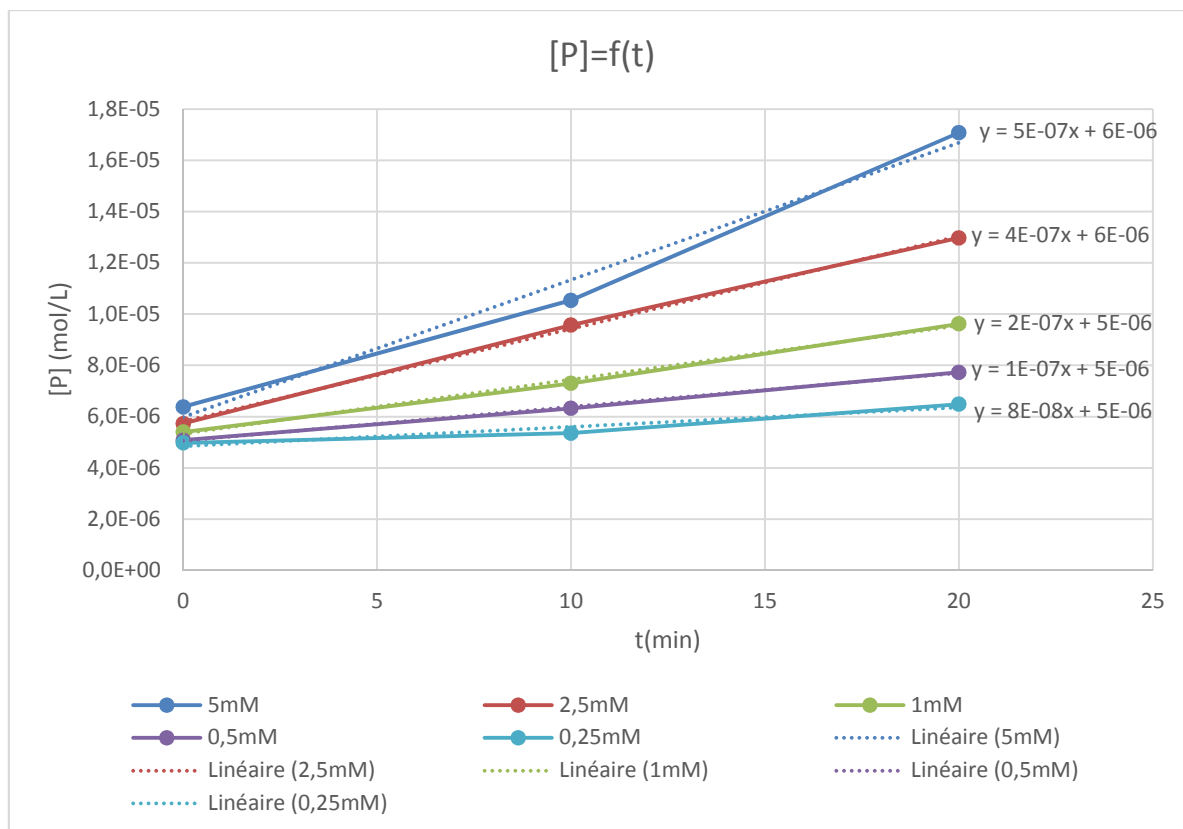


Figure E : Calcul des vitesses initiales

On a ainsi les vitesses initiales en fonction de la concentration en substrat (Tableau A)

Csubstrat (mol/L)	V0 (mol/min)
2,50E-04	8,00E-08
5,00E-04	1,00E-07
1,00E-03	2,00E-07
2,50E-03	4,00E-07
5,00E-03	5,00E-07

Tableau A : V0 en fonction de la concentration en substrat

On trace ensuite la courbe $V=f([S])$ (figure F). La courbe logarithmique confirme la cinétique michaélienne de l'enzyme. A partir de ces courbes

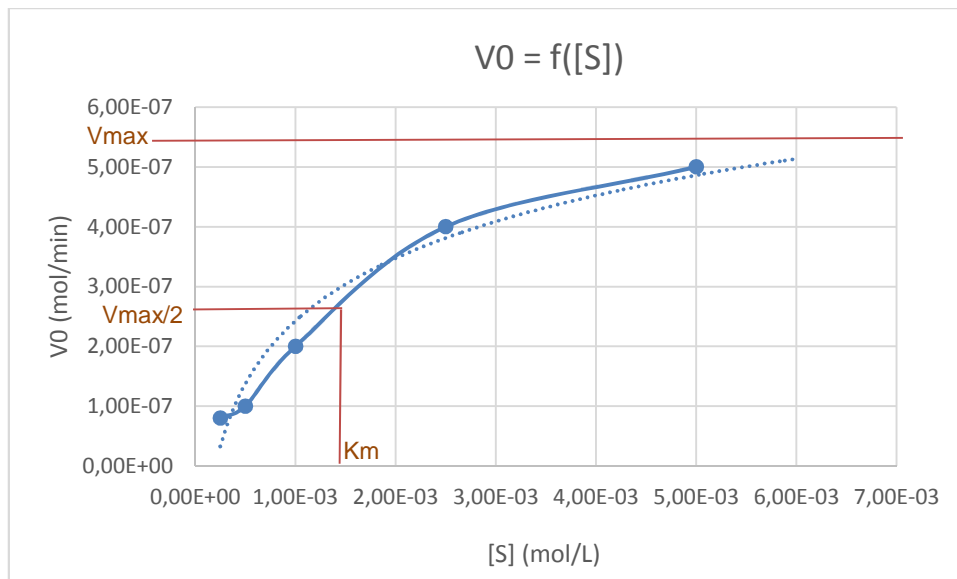


Figure F : Etude de la cinétique Michaëlienne

Cette méthode de calcul de V_m et K_m reste imprécise.

D'après La formule de Michëlis-Menten, on a :

$$V_i = V_m \frac{[S]}{[S] + K_m}$$

Si l'on inverse, on a

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m + [S]}{V_m [S]}$$

$$\frac{1}{V_i} = \frac{K_m}{V_m} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_m}$$

On reconnait une équation de type $y=aX+b$ avec

$$X = \frac{1}{[S]}, y = \frac{1}{V_i}, a = \frac{K_m}{V_m}, b = \frac{1}{V_m}$$

On remarque également que pour $y=0$,

$$X = \frac{-1}{K_m}$$

En traçant $1/V = f(1/[S])$, on peut ainsi obtenir V_m et K_m (méthode de Lineweaver et Burck). (Figure G)

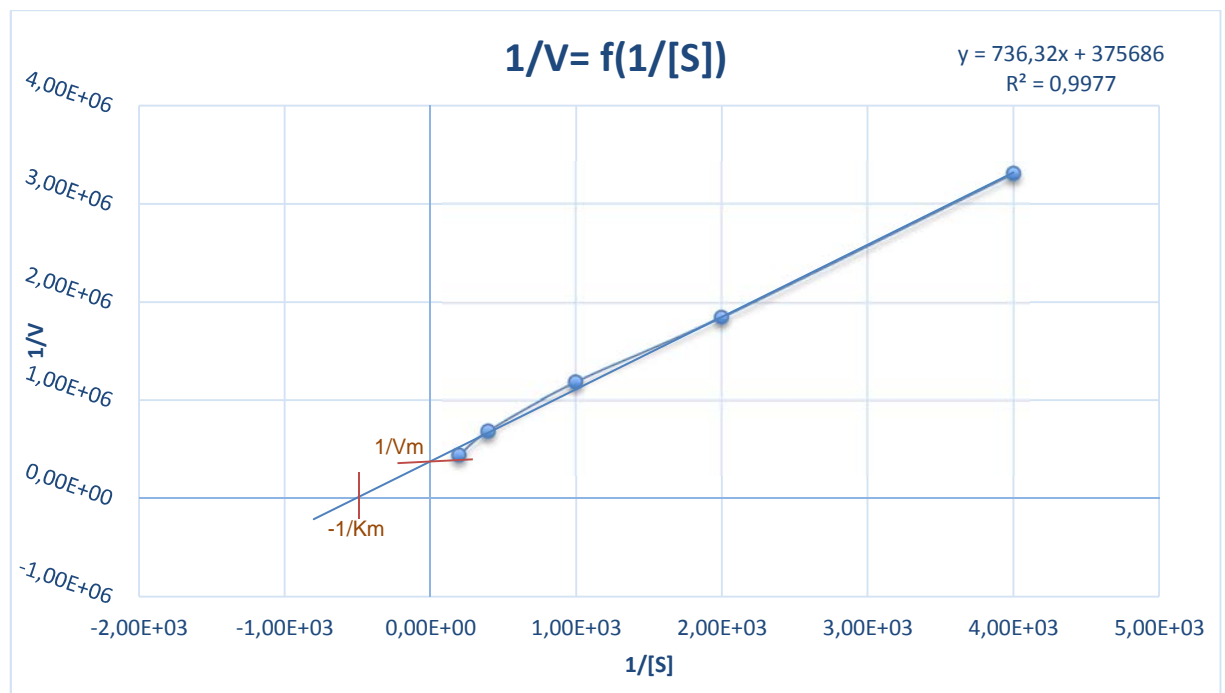


Figure G : $1/V=f(1/[S])$, détermination de K_m et V_m

Finalement, on obtient

$$V_m = 2.10^{-6} \text{ mol. min}^{-1}$$

$$K_m = 1,96.10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$$

PROCOLES

Protocole n°1 : Repiquer un champignon sur cultures solides

Travailler en milieu stérile, c'est-à-dire dans l'environnement d'un bec benzène.
Couler dans des boîtes de pétri un milieu malt/agar à 20%, et laisser refroidir jusqu'à ce que le milieu soit solide. Tremper le scalpel dans de l'alcool et passer le à la flamme jusqu'à évaporation complète de l'alcool.
Ouvrez une boîte de pétri du champignon voulu et découpez un carré de 1cm².
Reposez ce carré dans une nouvelle boîte de pétri sur le milieu malt/agar.
Refermer correctement la boîte avec du parafilm.

Protocole n°2 : mesure de l'activité xylosidase

Test du substrat pour effectuer les mesures d'activité

Préparer une solution de PNP- xylopyranoside à 5mM et diluer la ensuite pour avoir une solution à 2.5mM. Le mélange se fait dans du tampon acétate à pH 5.
Prendre une plaque de spectrophotométrie et ajouter dans un puits 150µL de la solution de PNP à 2.5mM.
Prélever 2µL de β -xylosidase et les ajouter dans le puits.
Mettre à chauffer la plaque à 35°C.
Au bout de 20min, stopper la réaction avec de la soude à 0.1mM.
Mesurer ensuite l'absorbance au spectrophotomètre à 405nm.

Mesure de l'activité β -xylosidase dans le milieu de culture

Prélever dans un eppendorf en milieu stérile 1ml du milieu de culture liquide.
Pour cela rincer à l'éthanol une pipette en verre de 25ml et passer l'extérieur à la flamme.
Mettre ensuite dans un des puits de la plaque du spectrophotomètre 75µL de la solution substrat validée au préalable de PNP-glucopyranoside à 2,5mM.
Ajouter 75µl du milieu de culture. Faire chauffer la plaque à 35°C pendant 20min.
Stopper la réaction avec 150µl de soude à 0,1mM.
Mesurer l'absorbance à 405nm.

Protocole n°3 : Mesure de l'activité xylanase

Préparer une solution de RBB (Remazol Brilliant Blue-xylan) avec 5.75mg de RBB dans 1ml de tampon acétate pH 5.5 à 50mM
Chauffer la solution de RBB à 80°C.
Effectuer le mélange réactionnel avec 25 µL d'enzyme (milieu de culture ou xylanase commerciale) et 500 µL de RBB à 30°C
Laisser le mélange réactionnel 20min à 30°C.
Ajouter 1ml d'éthanol à 96% et vortexer.
Centrifuger ensuite à 2000G pendant 2min.
Prélever 300 µL du surnageant, et les mettre dans le puits d'une plaque du spectrophotomètre puis lire l'absorbance à 595nm.

Protocole n°4 : Repiquer un champignon sur le milieu Mandels en culture liquide
--

Préparation du milieu Mandels

Mélanger les éléments suivants :

0,3g d'urée
2g de KH_2PO_4
1,4g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
0,3g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
0,75g de peptone de soja
0,5g d'extrait de levure
0,4g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
1,6mg $\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,4mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
2mg $\text{CoCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Compléter jusqu'à 1L avec de l'eau distillée.
Cette solution est ensuite utilisée au dixième.

Milieu de culture pour inoculer le champignon

Verser dans un erlenmeyer 10mL du milieu Mandels ainsi que 90mL d'eau distillée et rajouter 56mg de lactose .

Mettre l'erlenmeyer à l'autoclave, avec du coton et du papier aluminium pour former le bouchon.

Après stérilisation le champignon peut être inoculé.

Tremper le scalpel dans de l'éthanol et passer le à la flamme jusqu'à évaporation complète de l'alcool.

Ouvrir une boîte de pétri du champignon voulu dans l'environnement du bec benzène et découper un carré de 1cm^2 .

Laissez tomber le carré dans le milieu de culture.

Refermer l'erlenmeyer avec le coton cardé et de l'aluminium.

Placer l'erlenmeyer dans une étuve à 28°C et 70% d'humidité relative.

Ajout de lactose pendant la croissance du champignon

Pour pouvoir ajouter du lactose en milieu il faut préalablement autoclaver de l'eau distillée.

Ajouter à quelques ml d'eau 56mg de lactose.

Placer le mélange dans une pipette stérile, et passer le mélange à travers un filtre de $45\mu\text{m}$.

Protocole n°5 : Réalisation de charbon de bois

Préchauffer le four à une température de 400°C et enclancher l'atmosphère inerte
Prélever une quantité de sciure de bois d'environ 5g.
L'insérer dans la cuillère du réacteur et le fermer hermétiquement.
Laisser 5h à cette température.
Eteindre le four et le flux de gaz inerte.
Prélever le charbon obtenu.

Protocole n°6 : Déshydratation du xylose en réacteur fermé

Prélever 180mL d'acide acétique.
Peser 1,8g de xylose et 90mg de charbon.
Placer l'ensemble dans le réacteur.
Fermer hermétiquement le réacteur.
Laisser la durée souhaitée à 150°C, agitation 200 tours/min.

Protocole n°7 : Réalisation d'un milieu solide YP

Peser :
20g de Bacto-peptone
10g d'extrait de levure
Mélanger l'ensemble dans une bouteille et compléter avec 1L d'eau distillée.
Stériliser à l'autoclave.
Peser :
20g d'agar
20g de glucose
Mélanger l'ensemble dans une bouteille et compléter avec 800 mL d'eau distillée.
Stériliser à l'autoclave.
A la sortie de l'autoclave, mélanger en conditions stériles pour obtenir un mélange à 1/5^{ème} de solution Bacto-peptone/Extrait de levure en ajoutant 200mL de ce mélange à la solution de glucose. Couler en boîte de pétri et laisser refroidir.

Protocole n°8 : Réalisation d'un milieu liquide YPD

Peser 20g de glucose. Diluer dans 800mL d'eau distillée et stériliser à l'autoclave.
Peser 50g d'extrait de levure et 100g de bacto-peptone. Diluer dans 1L d'eau distillée et stériliser à l'autoclave.
Une fois stérilisés, ajouter en milieu stérile 200 mL du milieu extrait de levure/bacto-peptone au milieu de glucose.

Protocole n°9 : Réalisation d'une culture solide de levures

Ces manipulations se font en milieu stérile.
Délayer 500 mg de levure de boulanger fraîche dans un peu d'eau distillée.
Une fois la levure en suspension, préparer un rateau à l'aide d'une pipette pasteur.
Prélever 1mL du milieu de culture et le déposer sur le milieu YPD solide.
Étaler à l'aide du rateau sur toute la surface
Fermer à l'aide de parafilm et conserver à 28°C, 70 % d'humidité relative.

Protocole n°10 : Repiquage d'une colonie de levures

Ces manipulations se font en milieu stérile.
Stériliser une ose : la tremper dans l'éthanol puis chauffer à rouge à la flamme.
Prélever une colonie de levures sur le milieu solide YPD préparé en protocole n°5.
L'étaler sur un nouveau milieu solide en trait sur une longueur d'environ 1 cm.
Recommencer une dizaine de fois par boîte.
Filmer à l'aide de parafilm.
Conserver à 28°C, 70% d'humidité relative.
Cette manipulation permet d'obtenir des cultures de taille environ similaires.

Protocole n°11 : Inoculer des levures en milieu liquide

Ces manipulations se font en milieu stérile.
Stériliser une ose : la tremper dans l'éthanol puis chauffer à rouge à la flamme.
A l'aide de l'ose, prélever une colonie de levures. Tremper l'ose dans le milieu liquide et agiter délicatement pour que la colonie se suspende dans le milieu liquide.
Conserver à 28°C, 70% humidité relative.

RESUME

Le hêtre est une ressource grandement disponible dans le département des Vosges, qui cherche à la valoriser. Le projet Furalor explore le potentiel de la voie blanche comme alternative peu polluante au procédé d'hydrogénation catalytique utilisé conventionnellement dans l'industrie pour la production d'alcool furfurylique. Ce projet développe 3 axes : la production de xylose par une enzyme synthétisée par *T.reesei*, la déshydratation du xylose en furfural par catalyse à l'acide acétique et au charbon de bois et la conversion de furfural en alcool furfurylique par *S.cerevisiae*.

Mots clés: Alcool furfurylique, furfural, *S.cerevisiae*, *T.reesei*, furalor, hêtre, catalyse acide, charbon

ABSTRACT

Beech is a very available resource in the Vosges, France. The furalor project explores the potential of the microbial method as an environmentally-benign alternative to the conventional catalytic hydrogenation process for producing furfuryl alcohol used extensively in industry. This project develops 3 axes : xylose production catalysed by an enzyme synthesized by *T.reesei*, the deshydration of xylose into furfural by acid catalysis with acetic acid and wood coal and the furfural conversion into furfurylic alcohol by *S.cerevisiae*.

Keywords: furfuryl alcohol, furfural, *S.cerevisiae*, *T.reesei*, furalor, beech, acid catalysis, coal