HAL
open science

Production d'alcool furfurylique par voie blanche

Aurélie Bichot, Marion Clerc

To cite this version:

Aurélie Bichot, Marion Clerc. Production d'alcool furfurylique par voie blanche. Sciences de l'ingénieur [physics]. 2016. hal-01825300

HAL Id: hal-01825300

https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01825300

Submitted on 28 Jun 2018

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

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

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

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

Projet de fin d'étude
2015-2016

PRODUCTION D'ALCOOL FURFURYLIQUE PAR VOIE BLANCHE

BICHOT Aurélie
CLERC Marion

Enseignant responsable : M. BESSERER Arnaud

Table des matières

Table des matières 1
Table des illustrations 2
Remerciements 4
Introduction 5
I. Préparation à la production de xylose 7
A) Les enzymes de dégradation des xylanes 8
B) Les champignons producteurs d'enzymes 8
i. Cultures de champignons 9
ii. Activité enzymatique 9
C) La détermination de K_m et V_m 10
D) La détermination de la durée optimale de culture des champignons 14
II. Production de xylose à partir de biomasse 15
A) La méthode HPLC 15
i. Réalisation d'une courbe d'étalonnage 15
ii. Détermination des concentrations en xylose inconnues 16
B) L'influence de la granulométrie initiale de la sciure de hêtre 18
i. Réalisation d'une courbe d'étalonnage des xylanes 19
ii. Détermination de la granulométrie optimale 19
iii. Vérification de la crédibilité des résultats 23
III. Synthèse de furfural à partir de xylose 26
A) Les différentes possibilités de production de furfural 26
B) La mise en place de la méthode choisie 27
i. Préparation du charbon d'épicéa 27
ii. Réalisation de la synthèse du furfural 28
C) Quantification du produit obtenu 30
IV. Synthèse d'alcool furfurylique 32
Conclusion 33
Bibliographie 34
Articles scientifiques 34
Documents en ligne 35
Annexe 36
Résumé 39

Table des illustrations

Figure 1 : Voies de synthèse possibles à partir des xylanes 6
Figure 2 : Voie de synthèse choisie 6
Figure 3 : Structure des xylanes 7
Figure 4: Structure hypothétique de xylanes avec les sites de coupure par les différentes xylanases (Q. K. Beg, 2001) 8
Figure 5: Comparaison des activités enzymatiques pour les champignons étudiés (Gt = *Gloephyllum trabeum*, Pp = *Poria placenta*, Cv = *Coriolus versicolor*, Cp = *Coniophora puteana)* 10
Figure 6: Concentrations en xylopyranoside utilisées pour déterminer Vm et Km 11
Figure 7: Résultats du 25/11 et du 5/12 en fonction de la concentration en substrat 11
Figure 8: La catalyse enzymatique 11
Figure 9: Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat 12
Figure 10: Cinétique de Michaelis Menten 12
Figure 11: Inverse de la vitesse de réaction en fonction de l'inverse de la concentration en substrat 13
Figure 12: Détermination des paramètres Vm et Km 13
Figure 13: Puits présentant la majorité d'absorption (fond bleu turquoise) 14
Figure 14 : Pics de xylose pour l'étalonnage (en bleu xylose à 1%, en vert xylose à 0,1%, en violet xylose à 0,01%) 15
Figure 15: Courbe étalonnage pour déterminer une concentration inconnue en xylose 16
Figure 16 : Pics de xylose obtenus après expérience (en vert 25 novembre, en bleu 5 décembre et en violet 10 décembre) 17
Figure 17 : Essais à blanc (en violet xylanes dissous dans du tampon acétate, en bleu tampon acétate) 17
Figure 18 : Méthode de calcul pour le rendement en xylose 18
Figure 19 : Courbe d'étalonnage des Xylanes 19
Figure 20: Résultats du premier essai (en violet granulométrie 425, en bleu granulométrie 850) 20
Figure 21 : Résultats obtenus pour une granulométrie de 850 21
Figure 22 : Résultats de l'essai de 4h 21
Figure 23 : Résultats des xylanes des essais de 8 et 17h 22
Figure 24 : Résultats pour le xylose des essais de 8 et 17h 22
Figure 25 : Résultats de l'expérience sur les xylanes et le xylose (en bleu xylose à 1%, en violet xylose à 0,1%, en vert xylose à 0 ,01%) 23
Figure 26 : Résultats HPLC au bout d'une 1h pour les enzymes pures 24
Figure 27 : Résultats de l'essai avec des enzymes pures 24
Figure 28 : Furfural 26
Figure 29 : Quelques composés pouvant être issus du furfural (Aude-Claire Doiseau, 2014) 26
Figure 30 : Réacteur de pyrolyse (gauche) et charbon d'épicéa obtenu (droite) 28
Figure 31 : Réacteur de synthèse du furfural 29
Figure 32 : Pic représentatif de furfural 30
Figure 33: Résultats de la synthèse du furfural 31

Figure 34: Réaction de synthèse de l'alcool furfurylique 32
Figure 35 : Fiche alcool furfurylique INRS 32
Figure 36 : Récapitulatif de la synthèse d'alcool furfurylique 33

Remerciements

Nous tenons à remercier Monsieur Arnaud Besserer pour l'initiative de ce projet ainsi que pour son aide durant toute l'année et sa patience. Nous remercions Monsieur Pierre Girod, Monsieur Eric Masson et Monsieur Emmanuel Fredon pour le temps qu'ils ont passé à nous montrer comment réaliser certaines manipulations. Nous remercions aussi Marie-Laure Antoine et Christelle Perrin pour leurs explications sur le matériel que nous ne connaissions pas.
Enfin, merci au projet Furalor de nous avoir permis de travailler sur ce sujet passionnant.

Introduction

Le bois est une ressource renouvelable de plus en plus demandée pour diverses utilisations en construction notamment, mais aussi en chimie pour les nombreuses propriétés des molécules qui le composent.

Afin de valoriser les essences locales de la région Lorraine, le traitement du bois à l'alcool furfurylique est envisagé, en particulier sur une ressource surproduite dans la région et peu valorisée : le hêtre. Celui-ci est non durable naturellement (classe de durabilité 5) et peu stable dimensionnellement. Néanmoins le hêtre est facilement imprégnable, c'est-à-dire qu'il est facilement possible de remplir les vides cellulaires et les parois cellulaires par des agents chimiques qui ne réagissent pas forcément avec le bois. Ainsi, l'imprégnation du hêtre avec de l'alcool furfurylique permettrait de passer à une classe de durabilité 1 et de diminuer le gonflement du bois : 10% au lieu de 15% pour une imprégnation à 40%, ou encore 8% pour une imprégnation de 70%.
Actuellement, le premier producteur d'alcool furfurylique est la Chine. Cependant, cette production se fait par des voies chimiques très polluantes. Il est donc nécessaire de trouver une alternative en passant par des voies blanches. De cette manière, la France bénéficierait de deux avantages :

- La production locale d'alcool furfurylique qui évite les coûts d'importation de ce produit.
- La production non polluante d'alcool furfurylique qui permet de valoriser des essences jusqu'alors non utilisées : utilisation de coproduits du hêtre pour en faire de l'alcool furfurylique et utilisation de celui-ci pour donner de nouvelles utilisations au hêtre.

En Chine, ce sont des épis des maïs qui sont utilisés pour la synthèse du furfural dans les provinces du nord du pays (Shandong, Henan, Shanxi, Hebei). Ces épis sont d'abord coupés en petits copeaux de quelques millimètres (3 mm). Puis, ils sont dégradés par de l'acide sulfurique faiblement concentré (0,2%) afin de convertir les xylanes en xylose. Le but est de limiter au maximum la dégradation de la cellulose durant cette étape car elle peut être utilisée pour la synthèse d'éthanol. Une fois les xyloses séparés, ils sont placés dans des réacteurs à lits fixes résistants à l'acide pour la réaction de synthèse de furfural qui se fait à haute température (250°C). Le raffinage se fait en continu grâce à une distillation à la vapeur. Différents catalyseurs (très concentrés 10%) peuvent être utilisés durant cette étape, principalement des acides minéraux (acide citrique, acide sulfurique), du chlorure de zinc ou de l'hydroxyde de sodium. Par la suite, le furfural est déshydraté pour former de l'alcool furfurylique.

Actuellement, la Chine produit 300 000 tonnes de furfural par an dont 160 000 tonnes pour l'exportation. Malgré une taxe de 352 dollars par tonne à l'arrivée dans l'Union Européenne, le prix Chinois reste compétitif. Les chiffres sont relativement les mêmes en ce qui concerne l'alcool furfurylique : 260 000 tonnes sont produites chaque année en Chine et 160 000 tonnes sont exportées dans le monde. Les principaux pays importateurs sont les pays développés comme les Etats Unis et l'Europe qui trouvent de nouvelles utilisations à ce produit : fabrication de résines résistantes (alternative aux résines phénol formaldéhyde), utilisation en tant que solvant, imprégnation pour sa couleur foncée qui ressemble aux couleurs des bois exotiques (Wengé).

Ainsi, au cœur des Vosges, le projet Furalor vise à développer une filière locale de production de bois de hêtre de haute durabilité à partir de déchets de bois feuillus. Il s'agit d'une solution pertinente dans le cadre d'une volonté de développement durable aussi bien au niveau environnemental que sociétal.

Au travers de notre Projet de Fin d'Etudes (PFE), nous allons donc essayer de trouver des solutions pour convertir des pentoses issus du hêtre en alcool furfurylique principalement par voie enzymatique. Le schéma ci-dessous (cf. Figure 1) montre de façon simple les différentes utilisations possibles des xylanes du hêtre. Les cercles verts sur le schéma représentent la voie de synthèse qui nous intéresse.

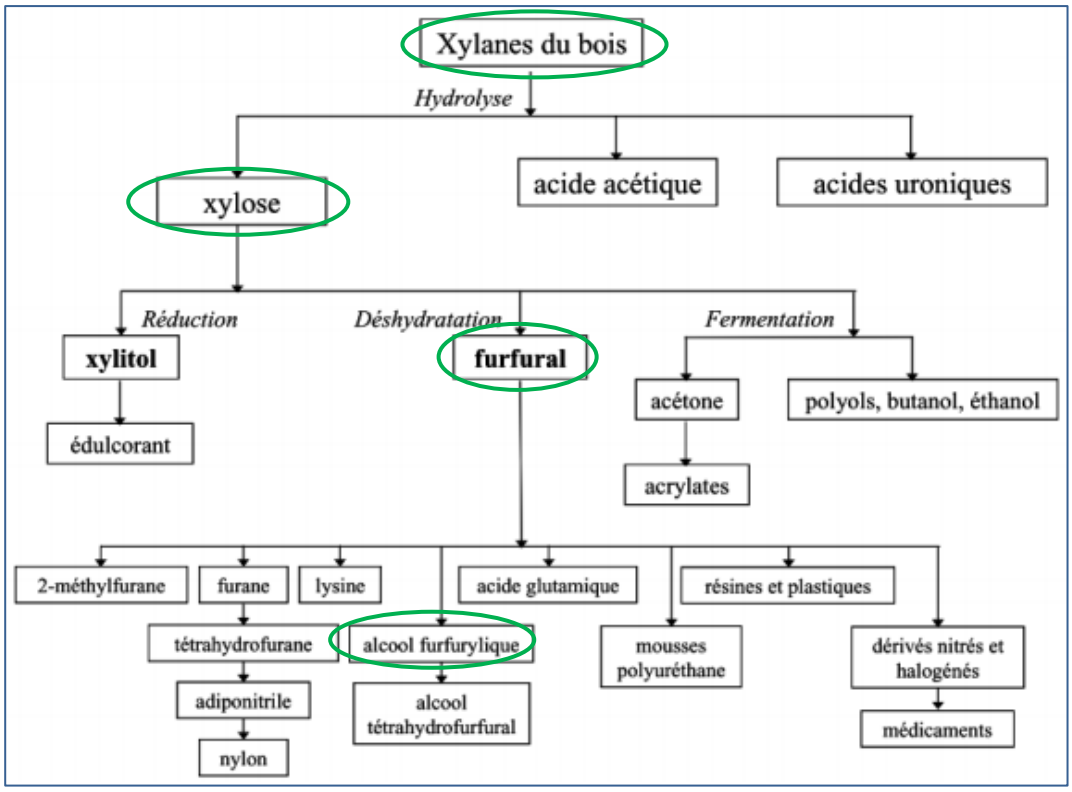


Figure 1 : Voies de synthèse possibles à partir des xylanes

La Figure 2 résume sous forme plus simple, le chemin que nous avons suivi pour synthétiser l'alcool furfurylique à partir du hêtre.

Hémicelluloses du hêtre (xylanes) ⇔ Xylose ⇔ Furfural ⇔ Alcool furfurylique

Figure 2 : Voie de synthèse choisie

I. Préparation à la production de xylose

Dans les Vosges, 42% du territoire est recouvert par la forêt soit 1008 km^2. Les principales espèces présentes sont les résineux : sapins, épicéas, et pins sylvestres (68%). Le hêtre quant à lui est la première espèce feuillue représentée (16%). Aujourd'hui, le but de cette région, est de réussir à gérer une forêt au niveau local, c'est-à-dire exploiter la ressource dans la même vallée que celle où la coupe a eu lieu. Il s'agit de favoriser les filières courtes comme l'Autriche le fait déjà. Les utilisations des résineux sont vastes et variées, notamment en construction. Le hêtre au contraire est moins employé et principalement en intérieur : ameublement, parqueterie, boissellerie. En effet il n'est que très peu durable en extérieur. L'alcool furfurylique, imprégné dans le hêtre permettrait de le rendre durable pour une utilisation en extérieur (charpente).

Le bois est constitué de 50% de cellulose, 25% d'hémicelluloses, 20% de lignine et 5% d'extractibles. Les hémicelluloses sont des polysaccharides qui assurent la liaison mécanique entre la cellulose et la lignine du bois. Chez le hêtre, les hémicelluloses sont à 80% des glucuronoxylanes c'est-à-dire des xylanes reliés à des acides glucuroniques. Les xylanes sont des polymères de xylose (cf. Figure 3). C'est le xylose qu'il est intéressant d'isoler car il est à la base de la synthèse de nombreux composés.

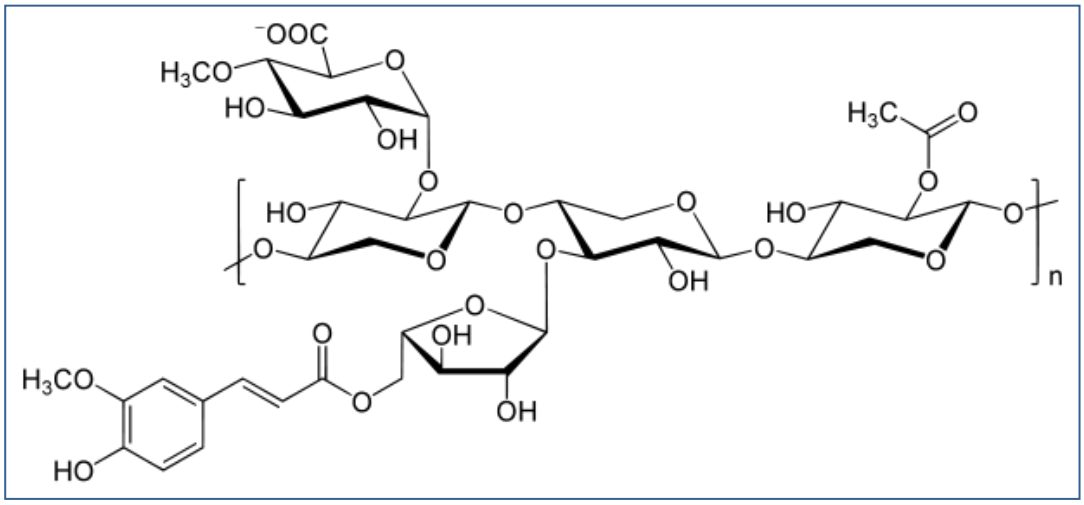


Figure 3 : Structure des xylanes

La dégradation des hémicelluloses du bois dans le but de récupérer le xylose peut être effectuée de diverses manières. Actuellement, les industries hydrolysent les hémicelluloses à l'aide de produits chimiques et de conditions très fortes c'est-à-dire qui demandent beaucoup d'énergie.

Nous souhaitons dans ce projet trouver une voie naturelle de dégradation des hémicelluloses. Les champignons de dégradation du bois sont capables de digérer les hémicelluloses grâce à des protéines spécialisées : des enzymes. Ce sont donc ces enzymes qui vont être utilisées.

A) Les enzymes de dégradation des xylanes

Dans cette première étape, nous souhaitons dégrader les xylanes en xylose par des enzymes. Les chaînes d'hémicelluloses sont ainsi dépolymérisées afin de libérer les monomères de xylose. Or ceux-ci sont liés entre eux par des liaisons variées : il existe plusieurs enzymes capables d'hydrolyser les xylanes. Chaque enzyme est spécifique d'un type de liaison. Ainsi, les principales enzymes à considérer sont les endo-xylanases et les β-xylosidases car ce sont elles qui fragmentent les chaînes principales de xylose (cf. Figure 4).

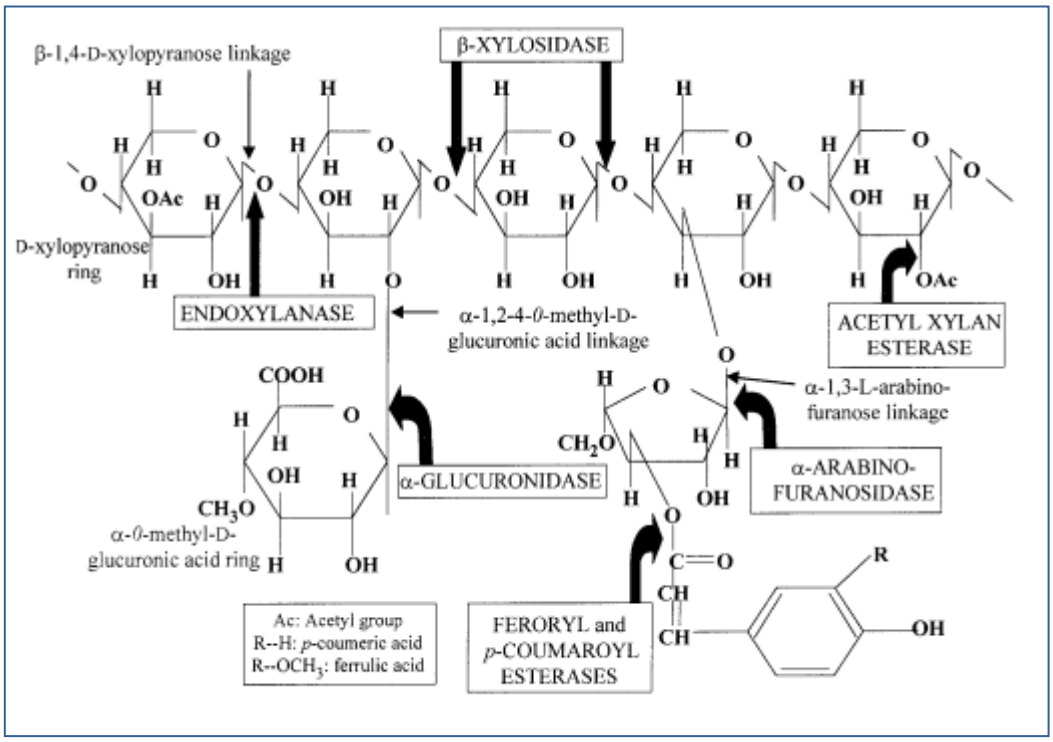


Figure 4: Structure hypothétique de xylanes avec les sites de coupure par les différentes xylanases (Q. K. Beg, 2001)

B) Les champignons producteurs d'enzymes

Les champignons qui dégradent le bois produisent des xylanases. Même si nous ne savons pas exactement quelles sont les xylanases synthétisées, il est important de déterminer avec certitude quel champignon est le plus efficace dans la dégradation des xylanes. Pour cela, nous testons quatre champignons différents : *Gloephyllum trabeum* (pourriture brune), *Coniophora puteana* (pourriture brune), *Poria placenta* (pourriture brune) et *Coriolus versicolor* (pourriture blanche). Avant de commencer les expériences de quantification d'activité enzymatique, on s'attend à une activité moindre de *Coriolus versicolor* qui est une pourriture blanche et s'attaque donc principalement à la lignine.

i. Cultures de champignons

Le développement des champignons se fait dans un milieu de culture solide bien particulier. Il est nécessaire de fournir aux champignons de l'eau et des nutriments (du malt). De plus, la production d'enzymes est constitutive mais aussi fortement induite par la présence de bois à dégrader. Pour obtenir le maximum d'enzymes, il est donc préférable de provoquer leur synthèse en plaçant dans le milieu de culture du bois à dégrader. Ce bois se présente sous forme de farine de hêtre.
Pour faciliter la manipulation, l'agar est utilisé afin de gélifier le milieu et permettre de poser le champignon sur une matière solide. De plus, la préparation des boîtes de pétri se fait en milieu stérile à côté d'un bec bunsen afin d'éviter la prolifération d'organismes non souhaités. Un morceau de 1 cm² de champignon est déposé au centre de chaque boîte de pétri.
Pour chacun des 4 champignons, 15 boîtes de pétri sont ensemencées. Il est nécessaire d'attendre une à deux semaines pour voir un développement des champignons.

Pour plus de détails, consulter le protocole 1 de l'Annexe.

ii. Activité enzymatique

Une fois que les champignons sont bien développés, la production d'enzymes peut être mesurée. Pour cela, il est indispensable de les purifier. Dans un premier temps, les enzymes sont concentrées par deux passages dans la centrifugeuse et une saturation au sulfate d'ammonium. Dans un second temps, les enzymes sont purifiées par chromatographie d'exclusion de taille.

Pour plus de détails, consulter le protocole 2 de l'Annexe.

Nous obtenons ainsi à la fin de cette étape les enzymes concentrées des 4 champignons considérés. Pour tester lequel est le plus efficace, nous faisons réagir les enzymes avec un substrat précis : le pNP-β-xylopyranoside à 5 mM. Ce substrat est composé de chaînes de xyloses et peut donc être hydrolysé par les xylanases des champignons.
La réaction se traduit par une couleur jaune du milieu réactionnel. C'est l'absorbance due à cette couleur qui est analysée par le lecteur de plaque. Ainsi plus le mélange est coloré, plus la réaction a eu lieu et plus l'absorbance est importante.

Pour plus de détails, consulter le protocole 3 de l'Annexe.

La loi de BEER LAMBERT nous permet de calculer la concentration en enzymes dans le milieu réactionnel (avec l = 0,8 cm et ε = 18 600 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

$$C = \frac{A}{* \mathrm{l}}$$

Ensuite il est important de calculer l'activité enzymatique, c'est-à-dire la vitesse de transformation du xylose en mole par litre de mélange et par minute. Pour cela on utilise la formule suivante avec t, le temps de réaction, soit ici 30 minutes.

$$Activit\ \ enzymatique = \frac{C}{t}$$

Il est possible par la suite d'exprimer la vitesse seulement en fonction du temps et non plus en fonction du volume en utilisant la formule suivante :

$$v = \frac{activit\ \ enzymatique \times volume\ m\ \ lange\ r\ \ actionnel}{volume\ enzymes}$$

Avec, dans les cas considérés :

- volume du mélange réactionnel = 300 µL
- volume enzymes = 50 µL

Le tableau (cf. Figure 5) suivant résume les résultats obtenus pour les 4 champignons étudiés :

		Gt	Pp	Cv	Cp
Surnagent	Absorbance (A)	0.34	0.009	0.14	0.14
	C (10^{-7} mol/L)	228	6.05	94.1	94.1
	Activité enzymatique (10^{-8} mol/L/min)	**76.2**	2.02	31.4	31.4
	v (10^{-7} mol/min)	45.7	1.21	18.8	18.8
Culot	Absorbance (A)	0.57	0.37	0.65	0.49
	C (10^{-5} mol/L)	3.83	2.49	4.37	3.29
	Activité enzymatique (10^{-7} mol/L/min)	12.8	8.29	14.6	11
	v (10^{-6} mol/min)	7.66	4.97	8.74	6.59

Figure 5: Comparaison des activités enzymatiques pour les champignons étudiés (Gt = *Gloephyllum trabeum*, Pp = *Poria placenta*, Cv = *Coriolus versicolor*, Cp = *Coniophora puteana)*

Le champignon le plus efficace est *Gloephyllum trabeum* (Gt). Il sera alors le seul utilisé pour la suite des expériences. Contrairement à ce qui pouvait être attendu, des enzymes sont aussi présentes dans les culots. Il faudrait donc trouver un moyen de récupérer ces enzymes.

C) La détermination de K_m et V_m

Maintenant que le champignon de dégradation des xylanes est choisi, il est important de caractériser précisément son activité enzymatique. Pour cela, nous avons besoin de suffisamment d'enzymes pour réaliser des réactions à plusieurs concentrations en substrat et ainsi déterminer les constantes K_m (constante de Michaelis) et V_m (vitesse maximale de réaction). Ces constantes reflètent respectivement l'affinité de l'enzyme pour son substrat et sa vitesse maximale de fonctionnement.

Néanmoins, les enzymes étant présentes en très faible quantité, nous faisons des cultures liquides de Gt afin de savoir si l'on obtient plus d'enzymes de cette manière.

Pour plus de détails, consulter le protocole 4 de l'Annexe.

Nous réalisons trois erlenmeyers différents dont les champignons sont issus de boîtes de pétri différentes. Toutes les semaines, 2 mL de liquide dans lequel les enzymes sont sécrétées, sont prélevés afin de déterminer l'activité β-xylosidase. Le protocole de purification enzymatique est relativement semblable à celui utilisé pour la culture solide. Nous n'utilisons que les prélèvements de deux erlenmeyers pour conserver ceux du troisième erlenmeyer en sécurité. Durant toutes les manipulations, les enzymes sont conservées au congélateur d'une séance à l'autre.

Pour plus de détails, consulter le protocole 5 de l'Annexe.

Pour déterminer V_m et K_m, il faut ensuite réaliser le protocole 3 d'activité enzymatique en changeant les concentrations du substrat. Nous choisissons de réaliser l'expérience pour les concentrations en xylopyranoside suivantes (cf. Figure 6) :

Concentrations en substrat xylopyranoside utilisées (mmol/L)				
5	2,5	0,5	0,25	0,05

Figure 6: Concentrations en xylopyranoside utilisées pour déterminer Vm et Km

Nous obtenons les résultats suivants après la lecture de plaque pour les deux dates considérées : le 25 novembre 2015 et le 5 décembre 2015 (cf. Figure 7).

	S (mol/L)	**0.005**	**0.0025**	**0.0005**	**0.00025**	**0.00005**
	1/S (L/mol)	**200**	**400**	**2000**	**4000**	**20000**
25-nov-15	Absorbance (A)	0.139	0.146	0.102	0.094	0.088
	C (10^{-6} mol/L)	9.34	9.81	6.85	6.32	5.91
	V (10^{-7} mol/L.min)	2.52	2.65	1.85	1.71	1.60
	v (10^{-7} mol/min)	1.51	15.9	11.1	10.2	9.59
	1/v (10^5 min/mol)	**6.60**	**6.28**	**9.00**	**9.76**	**10.4**
05-déc-15	Absorbance (A)	0.137	0.108	0.091	0.076	0.084
	C (10^{-6} mol/L)	9.21	7.26	6.12	5.11	5.65
	V (10^{-7} mol/L.min)	2.49	1.96	1.65	1.38	1.53
	v (10^{-7} mol/min)	14.9	11.8	9.92	8.28	9.15
	1/v (10^5 min/mol)	**6.70**	**8.50**	**10.1**	**12.1**	**10.9**

Figure 7: Résultats du 25/11 et du 5/12 en fonction de la concentration en substrat

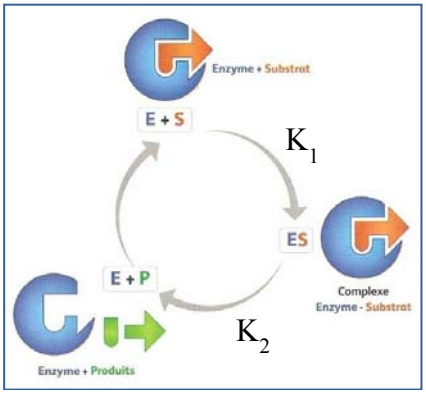


Figure 8: La catalyse enzymatique

On suppose que les enzymes xylanases suivent le modèle de Michaelis Menten (cf. Figure 8) :

- L'enzyme se complexe de façon réversible avec son substrat pour former un complexe Enzyme-Substrat [ES] de constante d'équilibre K_1
- A partir du complexe [ES], le produit de la réaction est synthétisé selon la constante K_2 et l'enzyme est régénérée.

Selon ce modèle la vitesse de la réaction en fonction de la concentration en substrat s'écrit :

$$v = \frac{Vmax \times S}{S + Km}$$

Avec les données obtenues, il est alors possible de tracer l'évolution de la vitesse v de la réaction en fonction de la concentration en substrat S (cf. Figure 9).

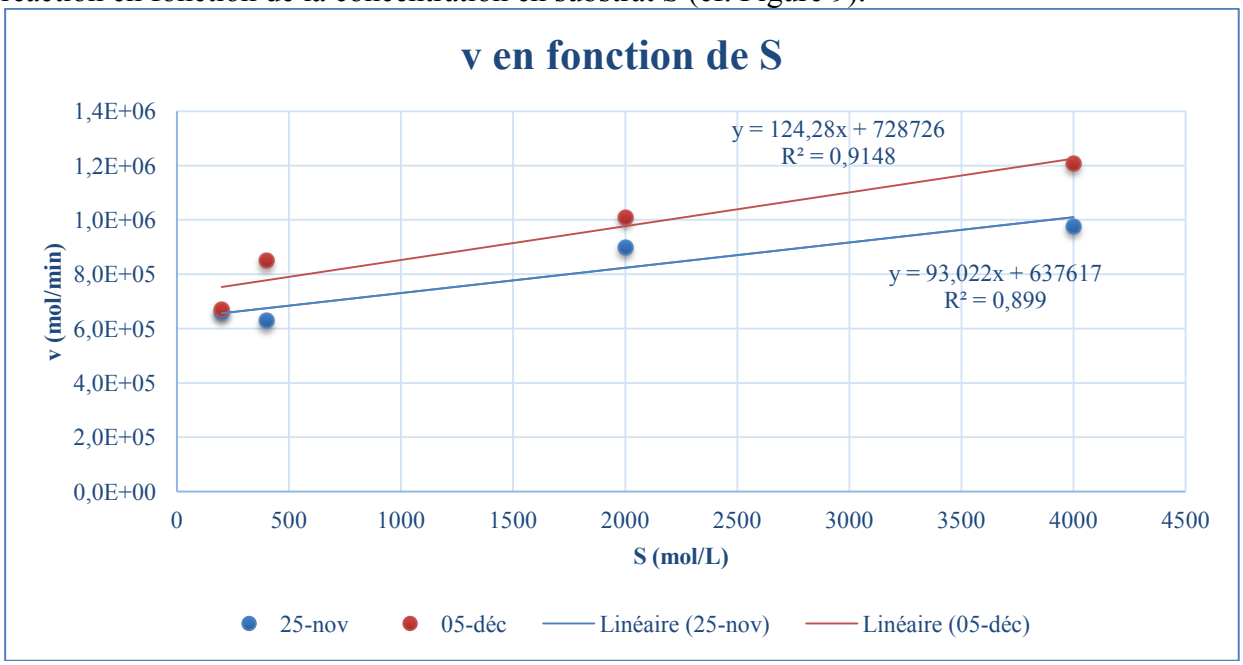


Figure 9: Vitesse de réaction en fonction de la concentration en substrat

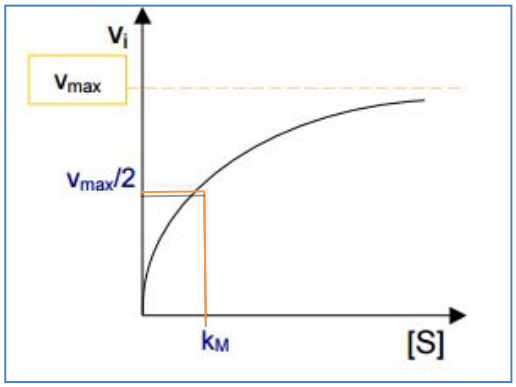


Figure 10: Cinétique de Michaelis Menten

D'après ces résultats, on n'obtient pas l'hyperbole attendue (cf. Figure 10). En effet, les concentrations en substrats sont très faibles. La figure 9 ne montre que la partie initiale de la courbe qui peut être assimilée à une droite. Il nous est alors impossible de déterminer K_m. En effet, si nous avions vu l'hyperbole caractéristique nous aurions pu en déduire K_m avec :

$$v = \frac{v_{max}}{2} \; quand \; [S] = \mathrm{Km}$$

Pour déterminer avec certitude V_m et K_m, il est alors indispensable de passer les résultats à l'inverse. L'équation de réaction devient alors :

$$\frac{1}{v} = \frac{Km}{Vm} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{Vm}$$

Quand on trace la courbe de l'inverse de la vitesse en fonction de l'inverse de la concentration en substrat en substrat (cf.

Figure 11), on trouve :

- $1/V_m$ à l'intersection entre l'axe des ordonnées et la droite
- $-1/K_m$ à l'intersection entre l'axe des abscisses et la droite

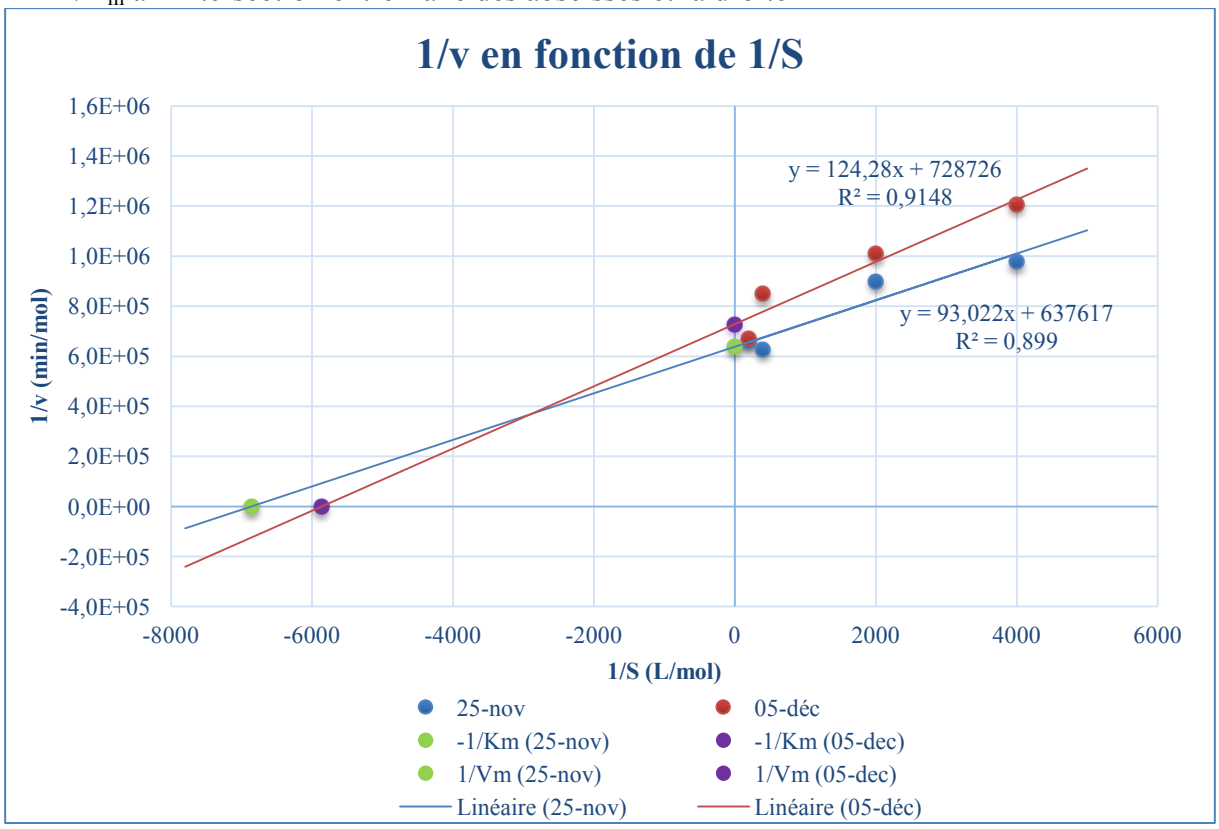


Figure 11: Inverse de la vitesse de réaction en fonction de l'inverse de la concentration en substrat

Sur le graphique précédent (représentation de Lineweaver burk), il est donc possible de déterminer avec précision les deux paramètres $1/V_m$ et - $1/K_m$. On obtient finalement les paramètres de l'enzyme considérée (cf. Figure 12) :

	25-nov	05-dec
1/Vm (min/mol)	637617	728726
Vm (mol/min)	**1.6E-06**	**1.4E-06**
-1/Km (L/mol)	-6854	-5864
Km (mol/L)	**1.5E-04**	**1.7E-04**

Figure 12: Détermination des paramètres Vm et Km

Ces paramètres sont conformes à ceux que l'on peut trouver dans la bibliographie : en effet, la base de données BRENDA (http://www.brenda-enzymes.info/) nous donne un K_m pour les xylanases qui peut varier entre 10^{-5} et 10^{-2} mol/L.

D) La détermination de la durée optimale de culture des champignons

Nous récoltons du liquide de réaction dans les erlenmeyers une fois par semaine durant trois semaines, à la suite de la mise en culture. Nous voulons savoir au bout de combien de temps, les enzymes produites par les champignons sont les plus efficaces. Avec les enzymes récupérées, grâce au protocole 3 d'activité enzymatique, il est possible de connaître pour chacun des puits de la plaque, la vitesse de la réaction (cf. Figure 13).

		Puits 5	Puits 6	Puits 7	Puits 8	Puits 9	Puits 10	Puits 11
25/11/2015 (t+1 semaine)	Absorbance	0.088	**0.117**	**0.160**	**0.170**	**0.129**	**0.149**	0.114
	C (10^{-6} mol/L)	5.9	7.9	1.1	1.1	8.7	1.0	7.7
	Activité enzymatique (10^{-7} mol/L/min)	2.0	2.6	3.6	3.8	2.9	3.3	2.6
	v (10^{-6} mol/min)	1.2	1.6	2.2	**2.3**	1.7	2.0	1.5
05/12/2015 (t+2 semaines)	Absorbance	0.103	**0.120**	**0.136**	**0.159**	**0.113**	**0.123**	0.111
	C (10^{-6} mol/L)	6.9	8.1	9.1	1.1	7.6	8.3	7.5
	Activité enzymatique (10^{-7} mol/L/min)	2.3	2.7	3.0	3.6	2.5	2.8	2.5
	v (10^{-6} mol/min)	1.4	1.6	1.8	2.1	1.5	1.7	1.5
10/12/2015 (t+3 semaines)	Absorbance	0.073	**0.079**	**0.099**	**0.102**	**0.100**	**0.093**	0.092
	C (10^{-6} mol/L)	4.9	5.3	6.7	6.9	6.7	6.3	6.2
	Activité enzymatique (10^{-7} mol/L/min)	1.6	1.8	2.2	2.3	2.2	2.1	2.1
	v (10^{-6} mol/min)	0.98	1.1	1.3	1.4	1.3	1.3	1.2

Figure 13: Puits présentant la majorité d'absorption (fond bleu turquoise)

D'après la Figure 13 on voit très clairement que l'activité enzymatique est importante après une semaine d'incubation (2,3E-06 mol/min) puis diminue durant les deux semaines suivantes. Il faut donc purifier les enzymes au bout d'une semaine. Dans la suite, ce résultat sera vérifié à l'aide de l'HPLC.

II. Production de xylose à partir de biomasse

Nous savons maintenant quel champignon employer pour produire des enzymes. Celles-ci sont ensuite utilisées pour dégrader les xylanes en xylose. Nous connaissons aussi les paramètres de ces enzymes, c'est-à-dire le V_m et le K_m. Ces paramètres sont importants pour savoir quelle quantité de xylose est produite en un temps donné.
Ce xylose doit pouvoir être quantifié de manière précise. Pour cela nous choisissons d'avoir recours à la méthode HPLC (chromatographie en phase liquide à haute performance).

A) La méthode HPLC

La chromatographie permet la séparation ou la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification. Les composés à séparer (solutés) sont mis en solution dans un solvant. Ce mélange est introduit dans la phase mobile liquide (éluant). Suivant la nature des molécules, elles interagissent plus ou moins avec la phase stationnaire dans la colonne chromatographique. La pompe permet à la solution d'atteindre la colonne. En sortie de colonne, grâce à un détecteur, les différents solutés sont caractérisés par un pic.

La méthode HPLC permet donc de connaître avec certitude la quantité de xylose qui a été synthétisée. On utilise comme éluant de l'eau extrêmement pure à un débit de 0,8 $mL.min^{-1}$. La température de colonne est de 80°C. La sensibilité est réglée sur 64.

i. Réalisation d'une courbe d'étalonnage

Nous voulons savoir quelle quantité de xylose est formée lors d'une réaction catalysée par les enzymes isolées précédemment. Une courbe d'étalonnage est réalisée grâce à des injections de xylose (20 µL) en différentes concentrations. Nous effectuons la manipulation pour 3 concentrations en xylose. La machine ne semble pas capable de détecter le xylose à une concentration inférieure à $6{,}6.10E^{-04}$ mol/L. Ce dernier se visualise par l'apparition d'un pic sur le tracé à un temps de 12 min environ (cf. Figure 14).

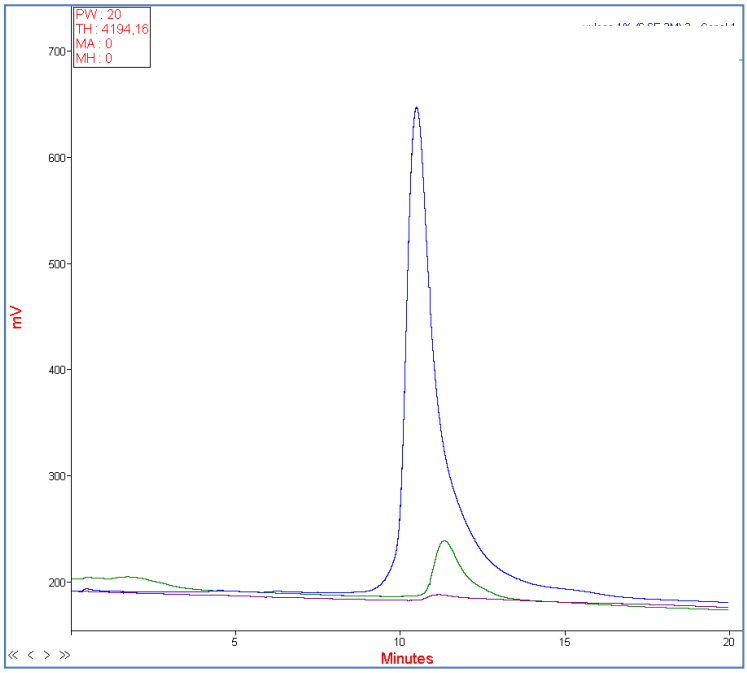


Figure 14 : Pics de xylose pour l'étalonnage (en bleu xylose à 1%, en vert xylose à 0,1%, en violet xylose à 0,01%)

Le logiciel de traitement des résultats permet de donner la surface du pic de xylose. Il est alors possible d'établir la courbe d'étalonnage suivante (cf. Figure 15) qui représente la surface du pic en fonction de la concentration en xylose :

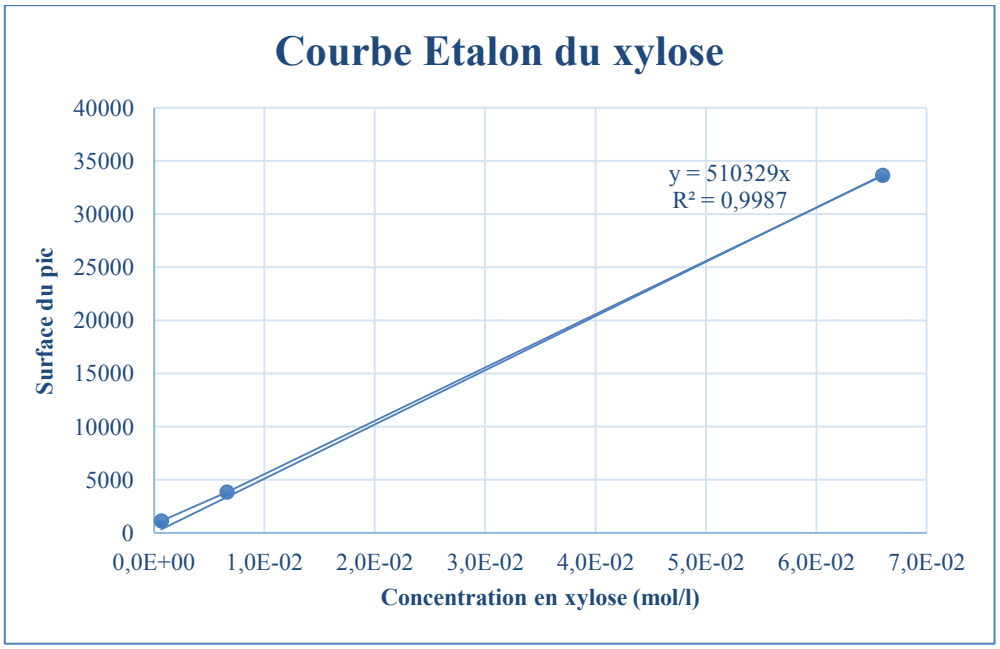


Figure 15: Courbe étalonnage pour déterminer une concentration inconnue en xylose

La courbe obtenue nous permettra par la suite de connaître la quantité de xylose inconnue synthétisée par une réaction.

ii. Détermination des concentrations en xylose inconnues

Nous réalisons alors des réactions avec les enzymes du 25 novembre, du 5 et du 10 décembre sur le xylopyranoside à 5 mM. Nous souhaitons nous assurer que la réaction produise au moins $6{,}6.10^{-4}$ mol.L^{-1} de xylose afin qu'il soit détecté à l'HPLC.
Nous considérons que l'on a $2{,}3.10^{-6}$ moles de xylose formé par minute (cf. Figure 13). Il faut donc attendre 100 min (1h 40 min) pour multiplier par 100 cette valeur et atteindre le seuil de détection. Par précaution, nous attendons 2 heures.

- Nous pesons 6 mg de xylane : $m = n \times M = 4.10^{-5} \times 148.114 = 6\,mg$
  Nous cherchons à réaliser une solution de 400 µL à 0,1 M car cela nous assure le fonctionnement optimal des enzymes ($K_{m\ xylosidase} = 10^{-2}$ M) :

$$n = \frac{0{,}1 \times 400 \times 10 - 6}{1} = 4.10^{-5} mol$$

- Nous plaçons cette masse dans un Eppendorf et nous complétons avec 400 µL d'extrait concentré d'enzymes.
- Nous répétons cette opération pour les enzymes de chaque date.
- Nous attendons 2 heures : une concentration en xylose inconnue se trouve alors dans le milieu réactionnel.
- Nous réalisons l'HPLC

Les résultats des HPLC sont visualisés sur la Figure 16. Chaque courbe correspond à une expérience réalisée avec des extraits d'enzymes issues d'une des trois dates.

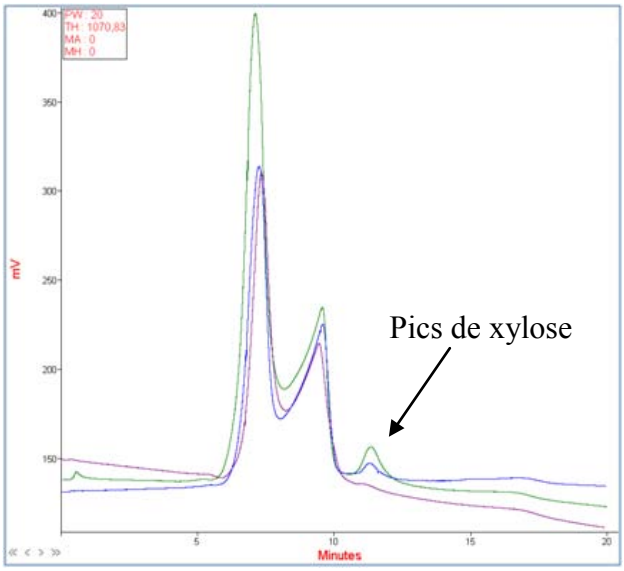


Figure 16 : Pics de xylose obtenus après expérience (en vert 25 novembre, en bleu 5 décembre et en violet 10 décembre)

Nous obtenons des pics de xylose aux alentours de 10 minutes ce qui prouve que les enzymes agissent sur les xylanes. Le pic le plus grand est celui du 25 novembre : l'activité enzymatique est maximale après une semaine de culture de champignon. Ceci est conforme aux résultats trouvés au paragraphe précédent.

Cependant nous constatons aussi la présence de deux autres pics : le premier vers 7 minutes et le deuxième vers 9 minutes. Il pourrait s'agir respectivement de xylanes qui n'ont pas réagi et du tampon acétate. Pour vérifier ces hypothèses, nous réalisons des essais témoins avec les xylanes et le tampon acétate (cf. Figure 17). Nous retrouvons exactement les mêmes pics que ceux présents sur la figure 16. Nos hypothèses sont donc confirmées :

- Des xylanes sont toujours présents dans le mélange en fin de réaction : cela est souhaité afin que la réaction se fasse en excès de substrat.
- Le pic de tampon acétate s'explique par la complexation du tampon avec la colonne à pH acide (dans le cas présent, pH = 5), pour former un sucre qui apparait sur le tracé. A pH neutre ou basique, ce complexe ne se forme pas : il n'y aurait donc pas de pic de tampon acétate sur le tracé.

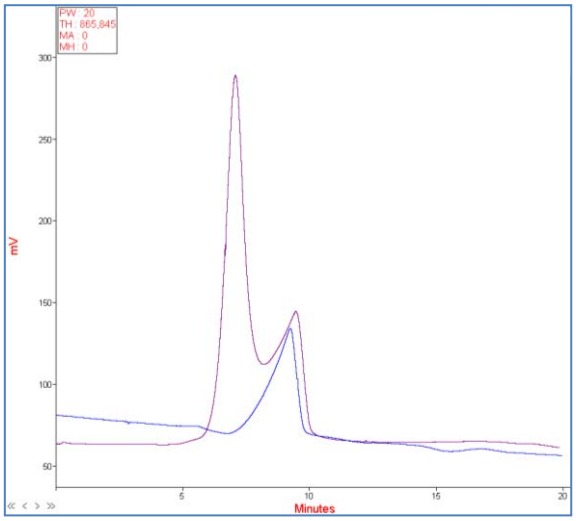


Figure 17 : Essais à blanc (en violet xylanes dissous dans du tampon acétate, en bleu tampon acétate)

Nous souhaitons maintenant connaître les rendements en xylose de ces manipulations. Nous connaissons l'aire du pic de xylose. Avec l'équation de la courbe étalon, nous retrouvons la concentration en xylose dans le mélange réactionnel après deux heures de réaction.

$$C = \frac{S_{pic}}{510329}$$

Nous pouvons remonter à la masse de xylose formée dans les 400 µL de solution et ainsi obtenir le rendement matière de cette étape en sachant que la masse initiale de xylanes insérée est de 6 mg (cf. Figure 18).

$$mxylose = C * M * V$$

$$\eta = \frac{mxylose * 100}{mxylanes}$$

Avec :

- V = 400 µL
- M = 150 g/mol

	Surface du pic	Concentration en xylose (mol/l)	Masse de xylose (mg)	Rendement matière
25-nov	823,28	0,0016	0,097	1,62 %

Figure 18 : Méthode de calcul pour le rendement en xylose

Nous obtenons un rendement matière de 1,62% au 25 novembre ce qui est très faible mais confirme tout de même la possibilité d'utiliser cette technique pour former du xylose et le quantifier par HPLC. Il faut sûrement utiliser davantage d'enzymes pour obtenir un meilleur rendement et/ou laisser les enzymes agir plus longtemps. L'optimisation du rendement est davantage développée dans la partie suivante.

B) L'influence de la granulométrie initiale de la sciure de hêtre

Le but global du projet est de démarrer le processus à partir de biomasse n'ayant subi aucune modification chimique et donc une utilisation minimale d'énergie. Dans ce sens, nous commençons la synthèse avec du hêtre brut. Nous utilisons différentes granulométries de sciures de hêtre pour savoir avec laquelle nous obtenons la meilleure conversion de la biomasse en xylose. A l'aide d'un tamiseur, nous obtenons ainsi les granulométries suivantes :

- Supérieures à 850 µm (appelées 850 par la suite)
- Comprises entre 850 µm et 425 µm (appelées 425)
- Inférieures à 425 µm (appelées fines)

Le protocole général consiste à faire réagir les enzymes extraites précédemment sur les différentes sciures. Nous utilisons la courbe étalon du xylose pour connaître la concentration en xylose formé. Nous souhaitons aussi savoir si ce xylose correspond à la disparition des xylanes.

i. Réalisation d'une courbe d'étalonnage des xylanes

Afin de connaître le taux de conversion des xylanes nous réalisons une courbe étalon de ceux-ci. La méthode est la même que celle utilisée pour réaliser la courbe étalon du xylose : nous injectons 3 solutions à des concentrations différentes en xylanes dans l'HPLC. Les courbes obtenues nous permettent de tracer la droite d'étalonnage suivante (cf. Figure 19) :

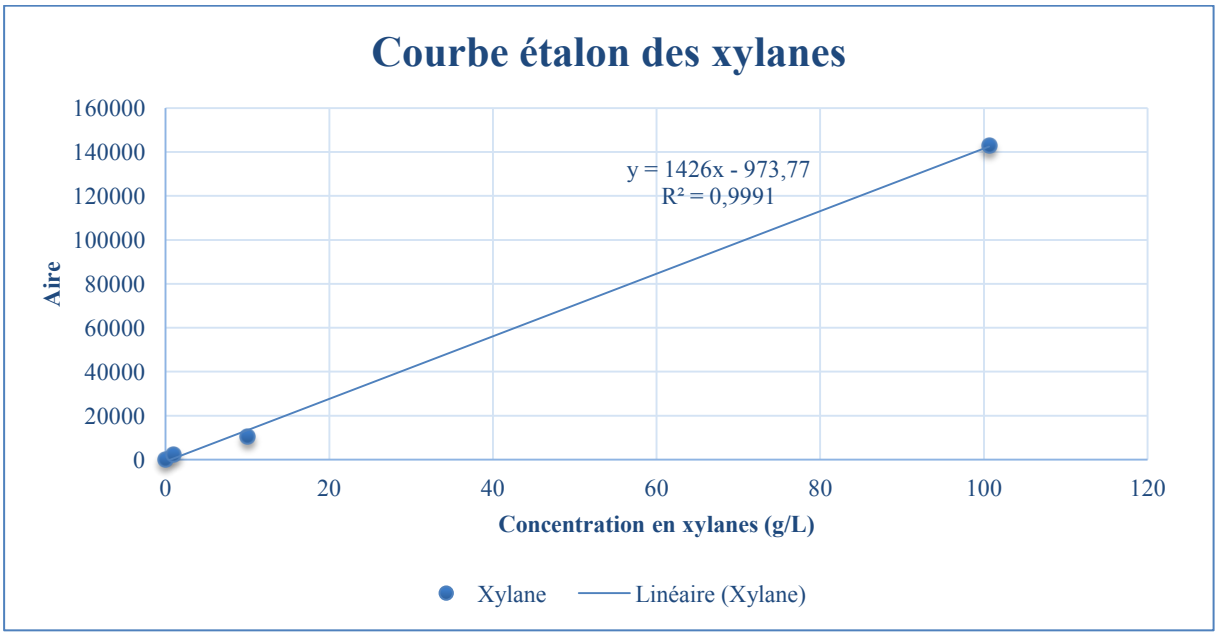


Figure 19 : Courbe d'étalonnage des Xylanes

Au début de chaque réaction nous injectons 20 µl de milieu réactionnel dans l'HPLC pour déterminer la concentration initiale en xylanes. A la fin de la réaction, nous refaisons la même manipulation pour connaître la diminution de la concentration en xylanes dans le milieu.

ii. Détermination de la granulométrie optimale

Pour connaître la quantité de xylose synthétisée, nous préparons un mélange sciures - enzymes dans des proportions qui nous assurent la présence de xylose sur la courbe HPLC (concentration en xylose de $6{,}6.10^{-4}$ mol.L^{-1} minimum).

a) Essai n°1

Cet essai doit nous permettre d'avoir une première idée de la synthèse de xylose à partir de biomasse. En effet, dans les sciures que nous mettons en contact avec les enzymes, il y a les hémicelluloses que nous souhaitons dégrader mais aussi la cellulose et la lignine. Nous ignorons comment les enzymes vont attaquer la matière.

Pour plus de détails, consulter le protocole 6 de l'Annexe.

D'après la Figure 20, nous n'obtenons absolument pas le résultat attendu : aucun pic de xylose n'est présent à 10 minutes. Ce résultat n'est pas satisfaisant. De plus, les autres pics (17 minutes et 5 minutes) ne représentent ni les xylanes ni le tampon acétate mais sûrement d'autres molécules du mélange. Les enzymes n'ont pas réussi à dégrader entièrement la biomasse : elles ont été inhibées par les extractibles libérés dans la solution.

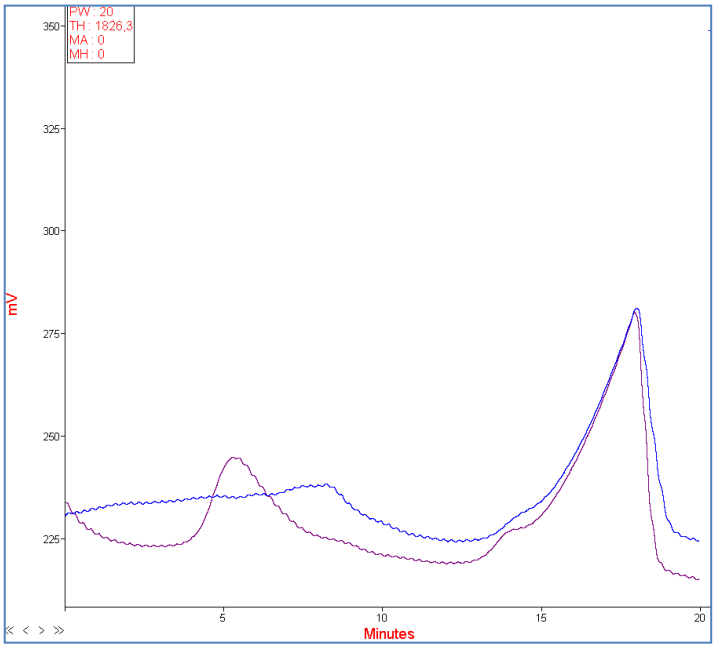


Figure 20: Résultats du premier essai (en violet granulométrie 425, en bleu granulométrie 850)

La solution envisagée est alors de réduire la masse initiale de biomasse afin de limiter l'inhibition par les extractibles.

b) Essai n°2

Nous choisissons de diminuer de moitié la masse initiale de bois dans le milieu réactionnel afin que les enzymes soit davantage en excès.

Pour plus de détails, consulter le protocole 7 de l'Annexe.

Nous obtenons des résultats similaires pour les trois granulométries testées : sur la courbe des résultats (cf. Figure 21), le pic de xylose est visible à 11 minutes. Les pics de xylanes et de tampon sont aussi visibles respectivement à 7 et 9 minutes. Les résultats sont donc conformes à nos attentes : les enzymes sont capables d'atteindre les hémicelluloses et de les dégrader en xylose.

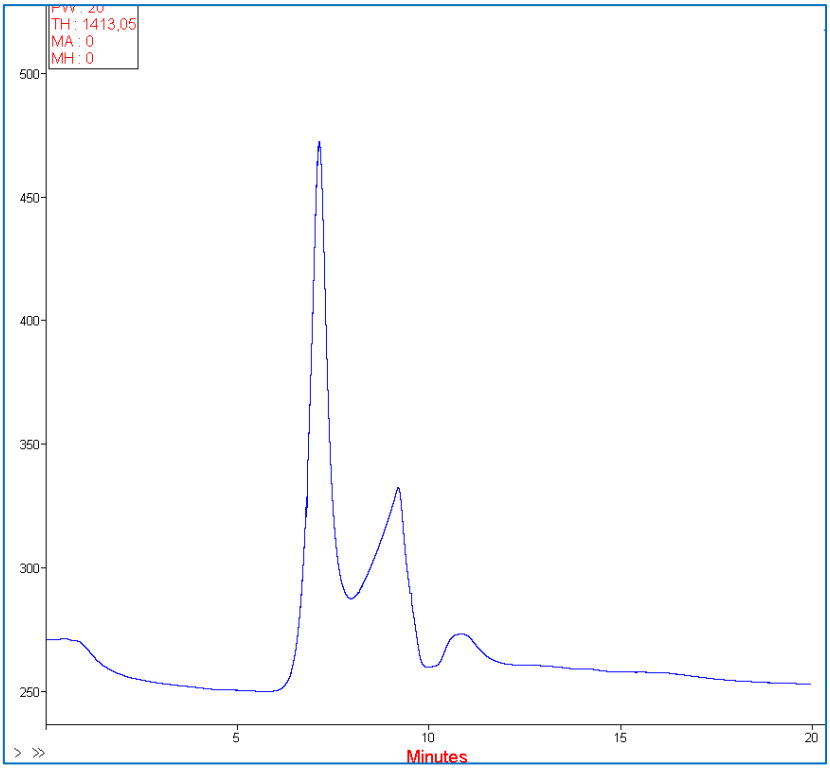


Figure 21 : Résultats obtenus pour une granulométrie de 850 µm

Les surfaces des pics de xylose nous permettent à partir de la courbe étalon de déterminer les concentrations en xylose pour chaque granulométrie. Nous procédons de la même manière pour les xylanes. Nous calculons deux types de rendements :

- Un rendement massique en prenant en compte la masse de xylose finale obtenue par rapport à la masse de xylanes initialement introduites.
- Un rendement molaire qui prend en compte la masse molaire des xylanes (148,114 g/mol) et celle du xylose (150,13 g/mol).

Conversion molaire des xylanes : $\eta = \frac{(n_{xylanes\ final} - n_{xylanes\ initial}) \times 100}{n_{xylanes\ initial}}$

Rendement massique en xylose : $\eta = \frac{C_{xylose} \times 100}{C_{xylanes\ initial}}$ avec les concentrations exprimées en g/L.

Rendement molaire en xylose : $\eta = \frac{C_{xylose} \times M_{xylanes} \times 100}{C_{xylanes\ initial} \times M_{xylose}}$

Temps (h)	Granulométrie (µm)	Aire xylanes	Conversion molaire des xylanes (%)	Aire xylose	Rendement massique(%)	Rendement molaire (%)
4	Fines	7534,56	20,45	460,11	1,80	1,78
	425	2442,30	68,06	463,27	1,82	1,79
	850	6408,15	30,98	660,8	**2,59**	2,56

Figure 22 : Résultats de l'essai de 4h

D'après la Figure 22, les rendements sont très faibles et ne dépassent pas 2,59 %. Ceci peut s'expliquer par la présence de nombreuses enzymes dans la solution qui, en plus de synthétiser le xylose, le dégradent en d'autres produits. Une partie des xylanes n'a pas été convertie : le taux de conversion des xylanes ne correspond pas au rendement en xylose. D'autres produits ont été synthétisés.

c) Essais n°3 et 4

Afin d'augmenter les rendements, nous laissons le mélange incuber plus longtemps : dans un premier temps 8h, puis 17h.

Pour plus de détails, consulter le protocole 8 de l'Annexe.

Les courbes HPLC sont semblables à la Figure 21 : il y a bien synthèse de xylose et toujours une forte concentration de xylanes dans le milieu à la fin de la réaction.

Temps (h)	Granulométrie (µm)	Aire xylanes	Concentration (mol/L)	Xylanes finales (10^{-6} mol)	Xylanes initiales (10^{-5} mol)	Xylose théorique rendement 100% (10^{-3} g)	Conversion molaire xylanes (%)
8	Fines	1381,16	0,011	4,46	2,03	3,04	**77,98**
	425	7382,31	0,040	15,8	2,03	3,04	21,87
	850	8028,29	0,043	17,1	2,03	3,04	15,83
17	Fines	2490,21	0,016	6,57	2,03	3,04	67,61
	425	5316,9	0,030	11,9	2,03	3,04	41,18
	850	4378,31	0,025	10,1	2,03	3,04	49,96

Figure 23 : Résultats des xylanes des essais de 8 et 17h

Le tableau (cf. Figure 23) montre que la quantité de xylanes diminue au cours de la réaction (d'une concentration de 10^{-5} à 10^{-6} mol/L en moyenne). Le meilleur taux de conversion (77,98 %) est celui des fines pour une durée de 8h : il correspond au meilleur rendement de xylose ce qui est cohérent (cf. Figure 24).

Temps (h)	Granulométrie (µm)	Aire xylose	Concentration (mol/L)	Concentration (g/L)	Rendement massique(%)	Rendement molaire (%)
8	Fines	851,66	0,002	0,25	**3,34**	3,29
	425	645	0,001	0,19	2,53	2,49
	850	529,33	0,001	0,16	2,08	2,05
17	Fines	430,67	0,001	0,13	1,69	1,67
	425	827	0,002	0,24	3,24	3,20
	850	685,04	0,001	0,20	2,69	2,65

Figure 24 : Résultats pour le xylose des essais de 8 et 17h

Les rendements calculés pour le xylose (cf. Figure 24) ne sont toujours pas très élevés, le meilleur étant de 3,34 %. Le principal problème de cette expérience est sa durée. En effet, les enzymes que nous utilisons ne sont actives que durant quelques heures à 35°C. En laissant la réaction se faire 8 ou 17 heures, les enzymes ne sont plus efficaces au bout d'un certain

temps que nous ne connaissons pas exactement. Il faudrait réaliser des tests de durée de vie des enzymes qui sont beaucoup trop longs.

Finalement, l'analyse de ces résultats permet de conclure qu'il vaut mieux réaliser la réaction avec les particules fines de bois pendant 8 heures pour obtenir le meilleur rendement.

iii. Vérification de la crédibilité des résultats

Etant donné nos résultats peu satisfaisants, nous souhaitons nous assurer que divers problèmes ne viennent pas les fausser comme : la difficulté de l'HPLC à fournir des courbes exactes pour de faibles quantités en xylose, l'interaction entre les xylanes et le xylose, la dégradation du xylose par d'autres enzymes…

a) Essai HPLC en présence de xylanes et xylose

Dans cette partie, nous souhaitons vérifier qu'il n'y a pas d'interaction entre le xylose et les xylanes dans le milieu réactionnel. Pour cela, nous réalisons des essais avec toujours la même concentration en xylanes et des concentrations croissantes en xylose. Si les pics de xylose sont croissants, cela signifie qu'il n'y a pas d'interaction entre les deux composés. Cela prouverait que les rendements précédents sont justes et que les aires données par l'HPLC sont correctes.

Pour plus de détails, consulter le protocole 9 de l'Annexe.

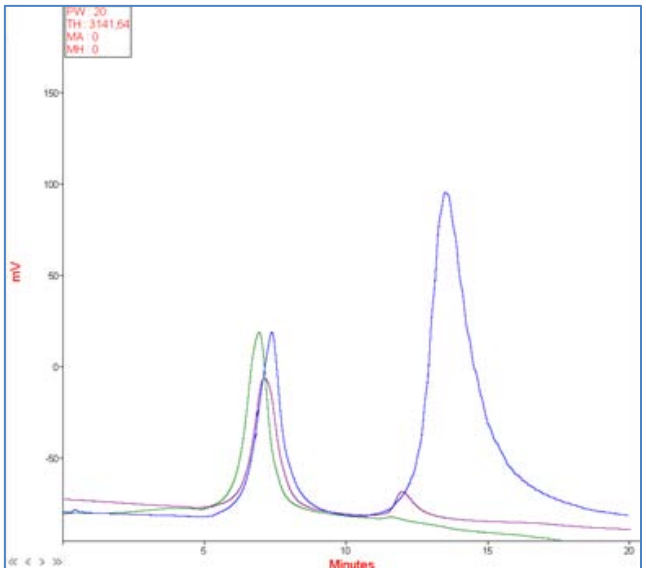


Figure 25 : Résultats de l'expérience sur les xylanes et le xylose (en bleu xylose à 1%, en violet xylose à 0,1%, en vert xylose à 0 ,01%)

Dans un premier temps, nous remarquons sur la Figure 25 que les trois pics de xylanes apparaissent au même moment (à 7 minutes). Ils ont presque tous la même aire, ce qui correspond bien à une injection de xylanes à concentration constante.

Dans un deuxième temps, nous pouvons visualiser les pics de xylose aux environs de 11 minutes. Ils croissent en accord avec l'augmentation de la concentration en xylose.
Nos résultats sont donc justes : il n'y a pas de facteur de correction à leur appliquer.

b) Essai HPLC sur des sciures en présence d'enzymes pures

Dans cette partie, nous souhaitons savoir si les enzymes issues des cultures liquides de champignons convertissent le xylose en un ou plusieurs produits. Pour cela, nous faisons réagir des β-xylosidases du commerce avec des xylanes pour voir si le rendement en xylose est plus important que celui obtenu avec les enzymes que nous avons purifiées.

Pour plus de détails, consulter le protocole 10 de l'Annexe.

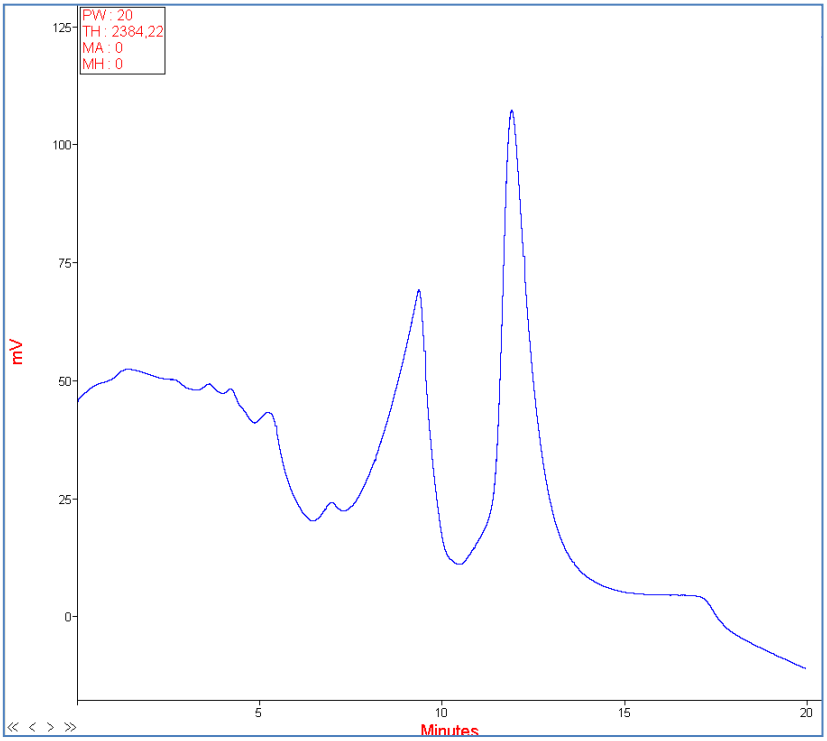


Figure 26 : Résultats HPLC au bout d'une 1h pour les enzymes pures

D'après la Figure 26, nous constatons l'absence du pic de xylanes, ce qui prouve qu'ils ont été entièrement convertis. De plus, le pic de xylose aux alentours de 11 minutes est beaucoup plus important (5796,39) que ceux que nous obtenons avec les enzymes que nous avons purifiées (cf. Figure 24).

Surface du pic xylose	Concentration en xylose (mol/L)	Masse de xylose (mg)	Masse xylanes initiale (mg)	Rendement matière (%)
5796,39	0,01	0,68	3,00	22,74

Figure 27 : Résultats de l'essai avec des enzymes pures

D'après la Figure 27, le rendement obtenu est bien meilleur que précédemment : 22,74 %. Ceci prouve la présence d'enzymes qui, après avoir permis la synthèse de xylose, l'ont converti en d'autres produits. Ces enzymes « parasites » nous empêchent donc d'atteindre des rendements plus élevés.
Dans le cas présent, nous attendions un rendement important étant donné la disparition presque complète du pic de xylanes. Néanmoins, il n'est que de 22,74% ce qui n'est pas très élevé. Peut-être avons-nous mal interprété la Figure 26 : la ligne de base pour les calculs d'aires est difficile à visualiser : il est probable que des xylanes soient présents dans le milieu réactionnel à la fin. De plus, le pic du tampon acétate à 8 minutes est relativement large, il est donc possible que d'autres sucres soient présents à cet endroit: ils seraient issus de la dégradation des xylanes.

Afin d'améliorer le rendement de 3,34 %, il faudrait purifier les enzymes que nous avons isolées pour conserver uniquement les β-xylosidases. Il serait aussi envisageable de piéger le xylose dès sa formation dans le milieu réactionnel pour éviter sa dégradation par d'autres enzymes.
Nous utilisons par la suite du xylose commercial pour optimiser notre temps. Ainsi, nous ne faisons pas l'extraction du xylose nous-même.

III. Synthèse de furfural à partir de xylose

A) Les différentes possibilités de production de furfural

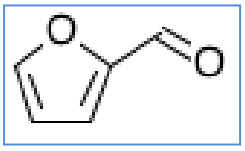


Figure 28 : Furfural

Le furfural est un composé aldéhyde qui possède un cycle furane (cf. Figure 28). A l'état pur, le furfural est un liquide huileux à l'odeur forte. Il est incolore mais jaunit rapidement au contact de l'air jusqu'à devenir de couleur marron. Le furfural est détectable aux Ultra-Violet. C'est cette propriété que nous allons utiliser pour en connaitre le rendement de synthèse.

Parmi les différents documents que nous avons consultés, différents moyens sont utilisés pour la synthèse de furfural à partir de xylose. Il s'agit d'une réaction de déshydratation catalysée par des acides. Le furfural est un produit largement recherché car il est à la base de la synthèse de nombreux autres composés furaniques à forte valeur ajoutée : furane, Hydroxyméthylfurfural, 2-methylfurane et l'alcool furfurylique entre autres (cf. Figure 29).

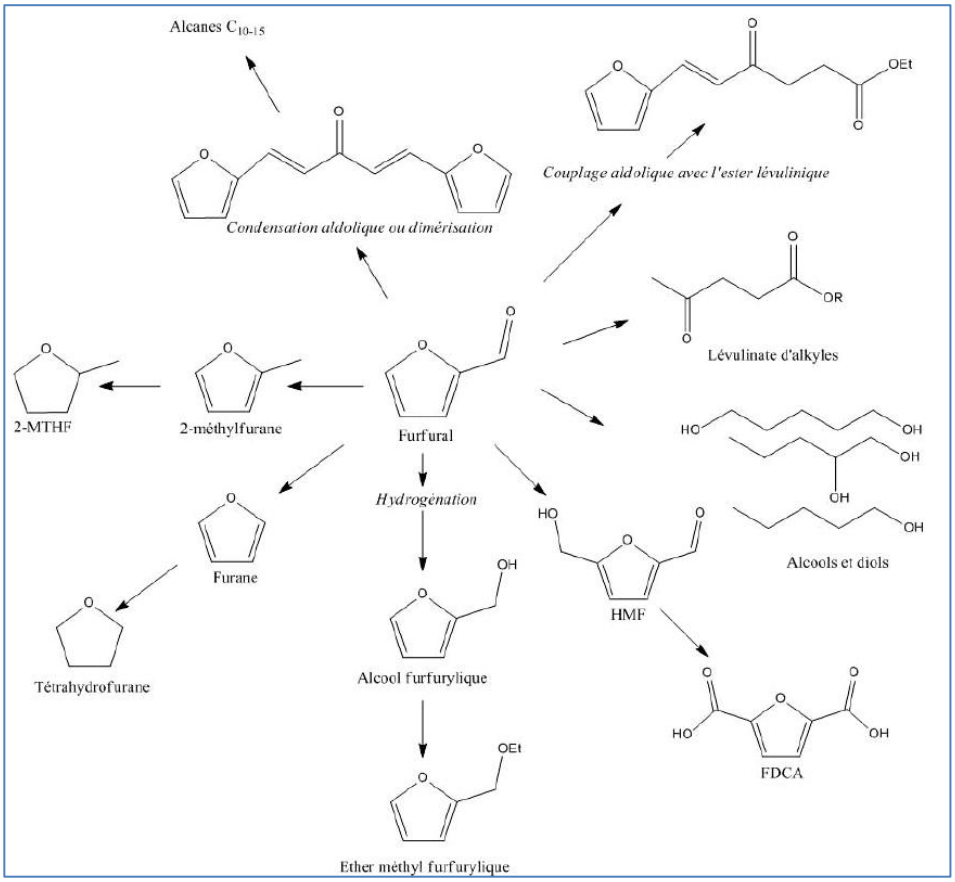


Figure 29 : Quelques composés pouvant être issus du furfural (Aude-Claire Doiseau, 2014)

Actuellement, la synthèse du furfural est réalisée principalement dans des réacteurs fermés ou continus. Les températures de réaction varient entre 150°C et 200°C avec des temps de réaction très variables (de 45 minutes à 5 heures). Les catalyseurs mis en jeu sont toujours des acides qui peuvent être ceux formés lors de la réaction ou d'autres insérés en début de réaction : H_2SO_4 (majoritairement) ou H_3PO_4. Les rendements en furfural peuvent

ainsi varier entre 45 et 75% selon le procédé choisi. Ainsi la méthode de Quaker Oats, permet d'atteindre un rendement de 45%, à une température modérée (153°C) et pour un temps de séjour de 5h. Dans ce cas, la concentration en acide sulfurique ne dépasse pas 10%.

Dans sa thèse soutenue en 2014 (Déshydratation catalytique du xylose en furfural, Aude Claire Doiseau, 2014), Aude-Claire Doiseau teste différents moyens de déshydrater le xylose en furfural dans deux types de réacteurs (fermé et continu). Nous nous intéressons principalement aux expériences menées en réacteur fermé car nous pouvons en utiliser un à l'ENSTIB. Les catalyseurs possibles sont des acides minéraux (acide sulfurique, acide chlorhydrique, acide nitrique ou acide phosphorique), des acides organiques (acide acétique et acide formique), des sels inorganiques et des liquides ioniques ($FeCl_3$, $CaCl_2$, $MgCl_2$, KCl). Parmi toutes les méthodes envisagées, nous choisissons d'utiliser l'acide acétique à 20% comme catalyseur pour plusieurs raisons :

- Il peut être formé par des champignons.
- Il est également un sous-produit de l'hydrolyse des pentoses.
- Il a un faible impact environnemental.

Dans la suite, nous utilisons de l'acide acétique du commerce mais il serait intéressant de produire cet acide à partir de la biomasse utilisée. La synthèse globale serait alors totalement intégrée.
Nous suivons alors le protocole décrit dans la thèse pour produire du furfural dans les meilleures conditions. La synthèse se fait à 150°C pendant 6h dans une solution d'acide acétique à 20% et en présence de charbon d'épicéa.

B) La mise en place de la méthode choisie

Pour réaliser la synthèse du furfural, nous avons besoin de charbon d'épicéa. Nous choisissons de le préparer à l'école en réalisant la pyrolyse du bois.

i. Préparation du charbon d'épicéa

Nous préparons le charbon de bois dans les conditions les plus semblables possibles à celles décrites dans la thèse d'Aude-Claire Doiseau. Néanmoins, le matériel de l'école ne nous permet pas de respecter entièrement les conditions de montée en température : le réacteur atteint les 400°C en 45 min au lieu d'1h15 (cf. Figure 30).

Pour plus de détails, consulter le protocole 11 de l'Annexe.

Le rendement de l'opération est de :

$$\eta = \frac{m\ charbon}{m\ sciure} \times 100 = \frac{0.4092}{1.5} \times 100 = \mathbf{27,28\%}$$

Ce rendement est conforme à la valeur attendue (entre 25 et 40% pour une pyrolyse à basse température).

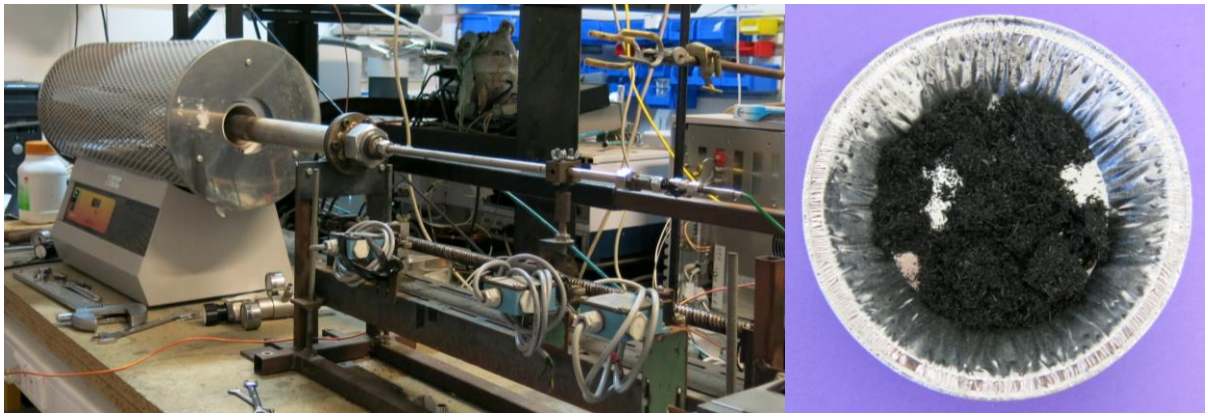


Figure 30 : Réacteur de pyrolyse (gauche) et charbon d'épicéa obtenu (droite)

ii. Réalisation de la synthèse du furfural

Une fois le charbon obtenu, nous pouvons l'utiliser comme catalyseur de la réaction de synthèse du furfural. Pour cela, il est important de travailler sous hotte pour réaliser le solvant car l'acide acétique est très volatile et sent extrêmement mauvais. De plus, la réaction se fait le plus possible dans un milieu ventilé afin de prévenir les risques de contamination : en effet nous espérons synthétiser du furfural qui est inoffensif. Néanmoins, en cas de production simultanée d'alcool furfurylique, il ne faut pas risquer une intoxication. Nous mettons au point différents protocoles afin d'obtenir un rendement en furfural le plus élevé possible et pallier les différents problèmes rencontrés.

a) Protocole n°1

Le protocole 12 de l'Annexe détaille l'installation de synthèse en Etuve ventilée. Nous travaillons en erlenmeyer fermé puis en erlenmeyer ouvert. Cette expérience permet de mettre deux points en évidence :

- Il ne faut pas travailler avec un erlenmeyer fermé car avec la pression le récipient explose.
- En travaillant avec un erlenmeyer ouvert, une grande partie de la solution s'évapore. En effet la température d'ébullition du furfural est de 162°C à pression atmosphérique et nous n'obtenons dans ce cas qu'un rendement de 0,22%.

Ceci nous assure néanmoins la possibilité de former du furfural avec cette technique et ce catalyseur.

b) Protocole n°2

Nous tentons ensuite de réaliser la synthèse du furfural dans un ballon tricol sur une plaque chauffante (protocole 13 de l'Annexe). Le matériel de l'école ne permet pas d'atteindre 180°C : en effet à 100°C l'évaporation de l'eau puis sa condensation dans le réfrigérant empêche le système de dépasser cette température. Toute l'énergie fournie est utilisée pour l'évaporation de l'eau. Nous continuons néanmoins l'expérience à 100°C pendant 6 heures. Le rendement est encore faible : 0,42%. Il faut trouver une autre solution pour l'améliorer.

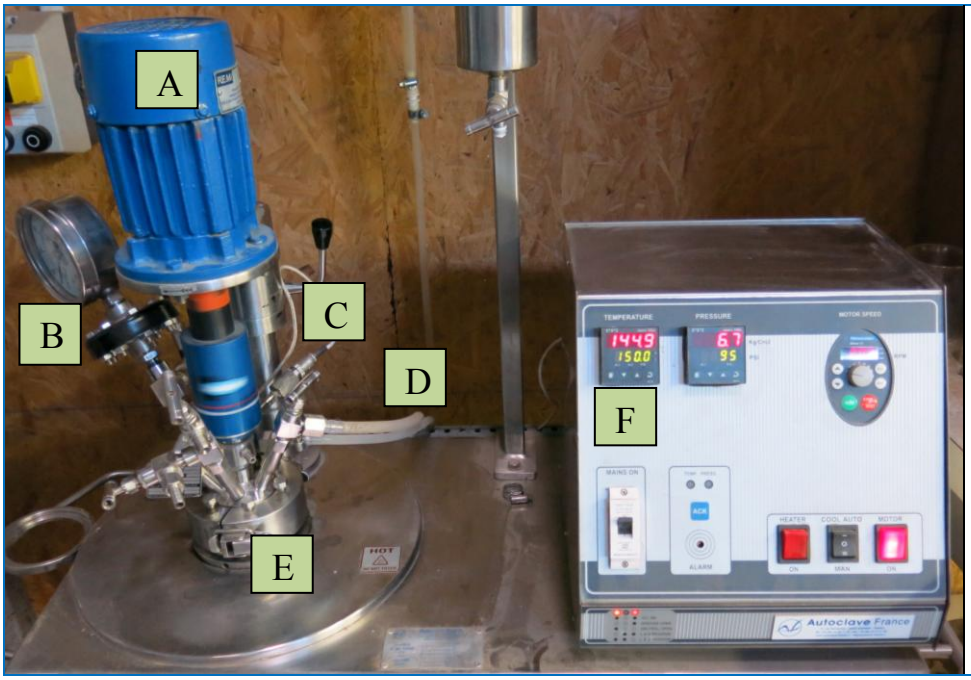
Afin de pouvoir comparer les résultats, nous réalisons la même expérience sur deux témoins :

- Témoin 1 : 30 mg de charbon et 0,6 g de xylose dans 60 mL d'eau.
- Témoin 2 : 0,6 g de xylose dans 60 mL d'acide acétique à 20%.

Ces témoins mettent en évidence l'importance de l'acide acétique. En revanche le charbon censé catalyser la réaction n'a pas cet effet à 100°C, c'est pourquoi nous réalisons une troisième expérience pour vérifier la nécessité du charbon dans la production de furfural.

c) Protocole 3

Cette troisième expérience se fait dans un réacteur fermé présent à l'ENSTIB (cf. Figure 31). Ce réacteur autorise donc les essais à haute température et sous pression. L'intérêt d'un tel réacteur est son étanchéité ce qui permet de ne pas perdre de produit.



Légende

A : Moteur

B : Capteur de pression

C : Capteur de température

D : Système de refroidissement

E : Cuve de réaction

F : Visualisation de la température

Figure 31 : Réacteur de synthèse du furfural

Nous réalisons tout d'abord un premier essai pour connaître la machine en n'utilisant que du xylose et de l'acide acétique : il s'agit donc du témoin 2. Le lendemain nous suivons le protocole 14 de l'Annexe et réalisons réellement l'essai.

Le produit final obtenu dans ce cas est de couleur très foncée. Soit le furfural est extrêmement concentré, soit le réacteur est encore souillé par les réactions précédentes. En effet, le circuit de refroidissement du système se présente sous forme de serpentin très difficile à nettoyer. Dans ces cas précis, il nous faudra diluer la solution lors de l'analyse des résultats.

C) Quantification du produit obtenu

Une fois le temps de réaction précédent écoulé (6h), nous laissons refroidir puis nous vérifions la présence de furfural. Pour cela nous utilisons une HPLC déjà étalonnée qui permet de visualiser directement si le furfural est présent. En effet, bien qu'incolore ou très faiblement jaune dans le visible au moment de sa synthèse, le furfural absorbe dans les Ultra-violet. Si le furfural est bien présent en fin de réaction, un pic est obtenu (cf. Figure 32).

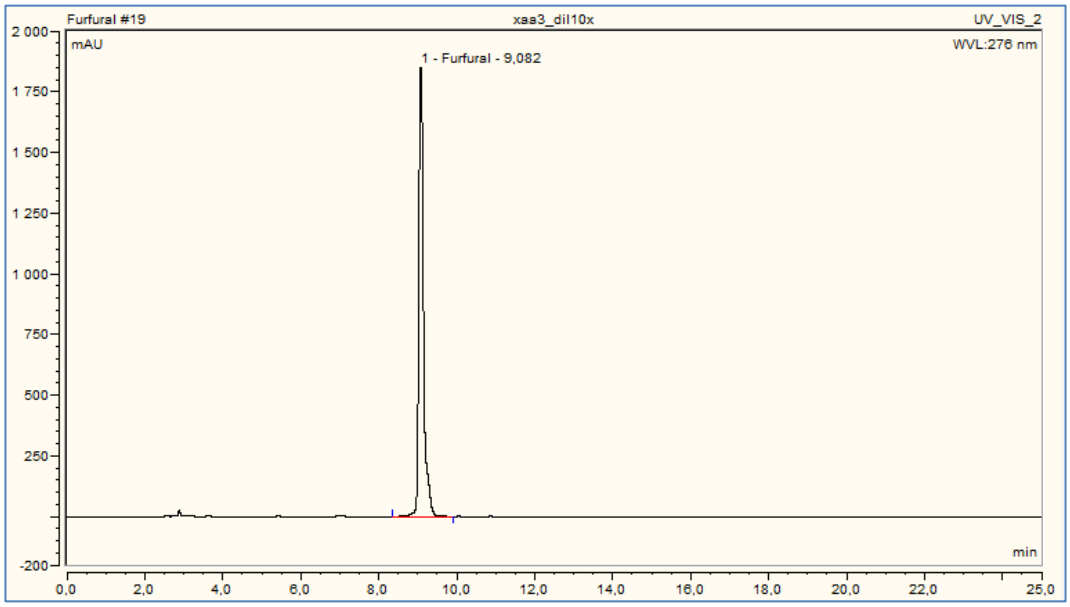


Figure 32 : Pic représentatif de furfural

Comme dans le cas de l'HPLC utilisée pour le xylose, plus la surface du pic est importante, plus la concentration en furfural dans le milieu est élevée.
Cet appareil donne directement la concentration en furfural du milieu réactionnel final. Le rendement de production du furfural par rapport à la quantité initiale de xylose peut alors être calculé pour chacun des trois protocoles présentés ci-dessus (cf. Figure 33).

Masse de furfural produite : $m = C_{furfural} \times Volume_{injection}$

Le volume d'injection est de 10 µL pour chaque essai.

Moles de furfural : $n = \frac{m}{M}$ avec la masse molaire du furfural = 96,09 g/mol.

Rendement massique en furfural : $\eta = \frac{m_{furfural} \times 100}{m_{xylose\ initial}}$ avec $m_{xylose\ initial}$ = 0,1 mg

Rendement molaire en furfural : $\eta = \frac{m_{furfural} \times 100 \times M_{xylose}}{m_{xylose\ initial} \times M_{furfural}}$

		Concentration furfural (g/L)	Furfural produit (10^{-7} g)	Furfural (10^{-9} mol)	Xylose initial (10^{-7} g)	Rendement matière (%)	Rendement molaire (%)
Protocole 1 - 180°C	Essai étuve ventilée	0,0216	2,16	2,25	6,67	0,22	0,34
Protocole 2 - 100°C	Témoin xylose charbon	0	0	0	6,67	0,00	0,00
	Témoin xylose acide	0,0546	5,46	5,68	6,67	0,55	0,85
	Essai tricol	0,0418	4,18	4,35	6,67	0,42	0,65
Protocole 3 - 150°C	Témoin xylose acide	1,894	189	197	6,67	**18,94**	29,57
	Essai charbon	3,68	368	383	6,67	**36,80**	57,45

Figure 33: Résultats de la synthèse du furfural

La Figure 33 montre l'évolution des rendements obtenus pour les différents protocoles réalisés. L'essai en étuve ventilée ne permet d'atteindre qu'un rendement de 0,22% ce qui est extrêmement faible : il n'est donc pas judicieux d'utiliser cette méthode.
Le deuxième protocole en ballon tricol ne donne pas de meilleurs rendements. Néanmoins les essais sur les témoins mettent en évidence l'importance de l'acide acétique : en absence de ce catalyseur, aucune molécule de furfural n'est produite. Au contraire en présence d'acide et en absence de charbon le rendement est de 0,55% ce qui est même supérieur à l'essai avec le charbon. Celui-ci ne semble pas avoir d'influence à 100°C.
Le dernier protocole donne de bien meilleurs rendements : le témoin xylose-acide acétique atteint 19% et l'essai avec le charbon 37%. Ces rendements sont largement supérieurs à ceux obtenus avec les autres méthodes : le réacteur fermé est donc la solution adéquate. Par ailleurs, cet essai prouve l'importance du charbon d'épicéa. Il a un véritable impact sur la production du furfural et permet de doubler le rendement : de 19% à 37%.
Il est donc possible d'obtenir du furfural en réacteur fermé avec un bon rendement. Il serait intéressant de refaire les mêmes expériences en séparant le furfural lors de sa production grâce à une distillation.

IV. Synthèse d'alcool furfurylique

Le furfural peut maintenant être utilisé pour la synthèse d'alcool furfurylique. La base de données KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) nous permet de visualiser les chaînes de réactions possibles pour atteindre l'alcool furfurylique. La Figure 34 représente ainsi la réaction de synthèse de l'alcool furfurylique : elle se fait en milieu acide, en présence du cofacteur NADH. L'enzyme 1.1.1.1 (alcohol dehydrogenase) catalyse cette réaction de déshydratation. C'est cette enzyme qu'il serait judicieux d'utiliser pour synthétiser l'alcool furfurylique.

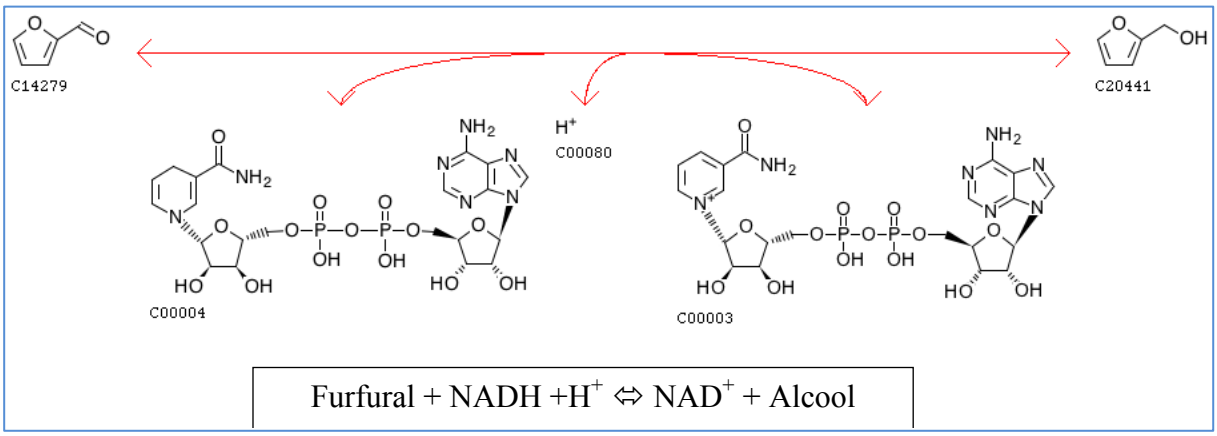


Figure 34: Réaction de synthèse de l'alcool furfurylique

Cependant d'autres méthodes pourraient être utilisées : d'après l'article de Yota Tsuge paru en octobre 2015, l'alcool furfurylique est un produit de dégradation du furfural dans de nombreuses cellules. En effet, le furfural est une molécule très dangereuse pour les cellules car il inhibe certaines voies de synthèse comme la croissance cellulaire ou la fermentation. Ainsi, cet article met en évidence, chez *Corynebacterium glutamicum*, le gène responsable de la synthèse des protéines qui interviennent dans la dégradation du furfural. Il s'agit du gène cgl0331, appelé aussi fudC (pour protéine de détoxification du furfural chez *C. glutamicum*).

Nous n'avons malheureusement pas eu le temps de réaliser cette dernière étape de notre PFE. Néanmoins, si nous avions pu la faire, certaines précautions auraient été nécessaires. En effet d'après l'INRS (Institut National de Recherche et de Sécurité), ce produit présente de nombreux risques : cancérigène, toxique, irritation des yeux et des voies respiratoires (cf. Figure 35). Lors de la synthèse, nous manipulons sous hotte, équipées de blouses, de lunettes et de gants adaptés.

Figure 35 : Fiche alcool furfurylique INRS

Conclusion

Le travail que nous avons effectué, démontre la possibilité de synthétiser du furfural à partir de biomasse en utilisant des voies blanches. Cependant, le processus mis en place nécessite de nombreuses améliorations afin d'accroître son rendement. La première étape en particulier doit être optimisée car elle constitue le goulot d'étranglement du procédé. La figure ci-dessous (cf. Figure 36) permet une visualisation plus industrielle du processus. A partir d'une tonne de sciures de hêtre, seulement 12 kg de furfural sont obtenus.

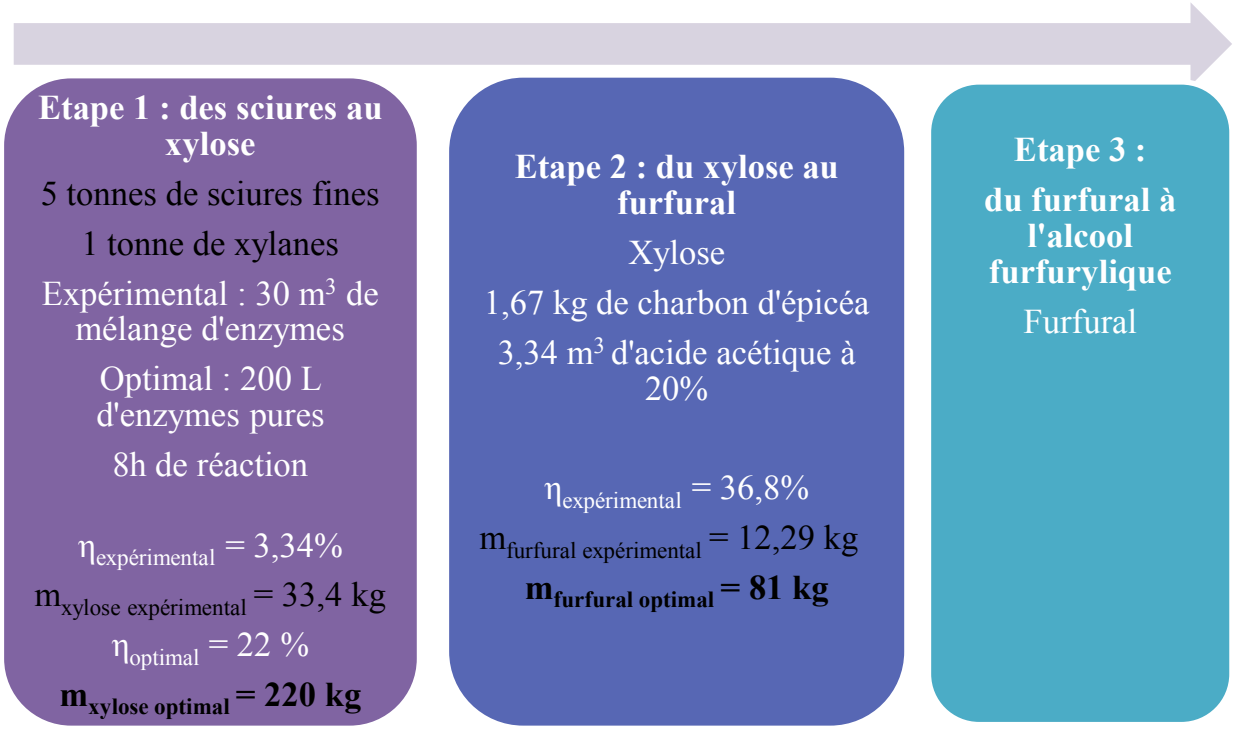


Figure 36 : Récapitulatif de la synthèse d'alcool furfurylique

Les principales voies d'amélioration pour une industrialisation de la synthèse sont les suivantes :

- Extraction spécifique des β-xylosidases dans l'extrait d'enzymes issues des cultures liquides de champignons.
- Procédé de séparation du xylose dans le mélange sciures-enzymes.
- Production d'acide acétique par voie blanche (champignons).
- Distillation pour séparer le furfural de l'acide acétique.

De plus, afin de clore le procédé par voie blanche, il reste à réaliser la dernière étape en utilisant l'enzyme alcohol dehydrogenase. Il faut vérifier que le rendement de cette étape est suffisamment élevé pour que le processus soit rentable et réalisable.

Etant donné le caractère novateur de ce projet, nous sommes satisfaites des résultats que nous avons obtenus. Il serait judicieux de répéter les expériences afin de les valider par une approche statistique pour pouvoir avancer de manière plus concrète dans le développement d'un procédé industriel.

Ce projet nous a permis de découvrir de nouveaux outils scientifiques très puissants. Nous avons travaillé sur un sujet qui nous tient à cœur puisqu'il correspond à nos valeurs en faveur de l'environnement.

Bibliographie

Articles scientifiques

- Projet Furalor : Elaboration de bois composite à partir de hêtre par polymérisation *in situ* de monomères issus de déchets de bois, 2013
- Synthesis of Furfural from Xylose and Xylan, Joseph B. Binder, ChemSusChem 2010
- Valorisation des xylanes du bois : vers la synthèse de copolymères amphiphiles bio-sourcés, Maud Chemin, 2015
- Synthesis of Furfuryl Alcohol and Furoic Acid, Charles E. Carraher, Jr., Journal of Chemical Education, 1978
- Properties of Furfurylated Wood, STIG LANDE, Scandinavian Journal of Forest Research, 2004
- Chemistry and Ecotoxicology of Furfurylated Wood, STIG LANDE, Scandinavian Journal of Forest Research, 2004
- Furfural: Hemicellulose/xylosederived biochemical, Ajit Singh Mamman, Biofuels, Bioprod. Bioref., 2008
- Déshydratation catalytique du xylose en furfural, Aude Claire Doiseau, 2014
- Xylanases from fungi : properties and industrial applications, M. L. T. M. Polizeli, Springer-Verlag, 2005
- Microbial xylanases and their industrial applications: a review, Q. K. Beg, Springer-Verlag, 2001
- Discovery and characterization of a 5-(hydroxymethyl) furfural oxidase from Methylovorus sp. Strain MP688, Willem P. Dijkman, Applied and environmental microbiology, 2014
- Production of xylose-containing fermentation media by enzymatic post-hydrolysis of oligomers produced by corn cob autohydrolysis, M.J. Vazquez, World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001
- Formation of degradation compounds from lignocellulosic biomass in the biorefinery: sugar reaction mechanisms, Helena Rasmussen, Carbohydrate research 385, 2014.
- FudC, a protein primarily responsible for furfural detoxification in *Corynebacterium glutamicum*, Yota Tsuge, Springer-Verlag, 2015

Documents en ligne

- Site Brenda (the comprehensive enzyme information system) : http://www.brenda-enzymes.info/
- Site KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) : http://www.genome.jp/kegg/
- Fiche toxicologique alcool furfurylique, INRS, 2010
- Propriétés, défauts et usages du hêtre, guide 5 du CDAF (centre de développement agroforestier de chimay)
- Fiche technique Megazyme pour le dosage du D-Xylose

Annexe

Protocole 1 : Réalisation de cultures solides de champignons

- Dans une bouteille de 1L, placer :
  - 9 g de sciure de hêtre
  - 18 g de malt
  - 18 g d'agar
- Compléter à 900 mL avec de l'eau distillée.
- Placer la bouteille fermée à l'autoclave durant 15 min à 105°C.
- Attendre le refroidissement de l'autoclave pour couler, près du bec bunsen, le milieu de culture dans les boîtes de pétri.
- Une fois que la matière est solide, placer 1 cm^2 de champignon sur le gel.
- Appliquer du parafilm autour de toutes les boîtes et les placer à l'étuve (22°C / HR 70%) pour le développement du champignon.

Protocole 2 : Purification des enzymes de champignons en culture solide

- Broyer les champignons dans une solution tampon d'acétate 50 mM pH 5. Après 10 minutes de centrifugation à vitesse moyenne, récolter le surnagent et le saturer à 80% avec du sulfate d'ammonium (516 $g.L^{-1}$).
- Centrifuger une nouvelle fois à vitesse maximale durant 15 minutes dans des Eppendorf.
- Récupérer les culots dans lesquels se trouvent les enzymes et les suspendre à nouveau, ensemble, dans du tampon.
- Réaliser une colonne de purification : 1 g de résine avec 5 mL de solution tampon acétate 50 mM pH 5.
- Placer l'extrait concentré d'enzymes sur la colonne. Quand il est intégralement absorbé par la colonne, recouvrir celle-ci de 5 mL de tampon pour permettre aux enzymes de descendre dans la colonne.

Protocole 3 : Activité enzymatique

- Placer 50 µL de chaque fraction (récupérée lors de la purification) dans un puits de la plaque de 96 puits.
- Ajouter 150 µL de substrat (pNP-β-xylopyranoside à 5 mM).
- Attendre 30 minutes.
- Ajouter 100 µL de soude pour stopper la réaction.
- Faire la lecture des résultats sur le lecteur de plaque.

Protocole 4 : Réalisation de cultures liquides de Gt

- Dans un erlenmeyer de 500 mL, placer :
  - 0,62 g de sciure de hêtre
  - 1,2 g de malt
- Compléter avec 60 mL avec de l'eau distillée.
- Ajouter 4 cm² de cultures solides de champignons.
- Placer l'erlenmeyer fermé avec du coton cardé et du papier aluminium à l'autoclave durant 15 min à 105°C.
- Attendre le refroidissement de l'autoclave pour mettre 3 cm² de Gt dans le liquide.
- Placer à l'étuve (30°C) pour le développement du champignon.

Protocole 5 : Purification des enzymes de champignons en culture liquide

- Regrouper les prélèvements de deux erlenmeyers par semaine. On obtient 4 ml de prélèvement par semaine.
- Ajouter 2 g de sulfate d'ammonium. Bien agiter au vortex pour dissoudre le sulfate.
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 15 min.
- Récupérer les culots dans 400 µL de solution tampon.

Protocole 6 : Essai granulométrique initial

- Peser 30 mg de sciures de hêtre aux trois différentes granulométries.
- Les placer chacun dans un Eppendorf différent.
- Ajouter 400 µL d'enzymes concentrées.
- Attendre 4h.

Protocole 7 : Essai granulométrique de 4h

- Peser 15 mg de sciures de hêtre aux trois différentes granulométries.
- Les placer chacun dans un Eppendorf différent.
- Ajouter 400 µL d'enzymes concentrées.
- Attendre 4h.

Protocole 8 : Essais granulométriques de longues durées

- Peser 15 mg de sciures de hêtre aux trois différentes granulométries.
- Les placer chacun dans un Eppendorf différent.
- Ajouter 400 µL d'enzymes concentrées.
- Attendre 8h.
- Reproduire l'expérience en attendant 17h.

Protocole 9 : Essai xylanes-xylose

- Prélever 500 µL d'une solution en xylane à 1%.
- Les placer dans un Eppendorf.
- Ajouter 500 µL d'une solution en xylose à 1%.
- Analyser à l'HPLC.
- Répéter l'opération pour des concentrations en xylose de : 0,1 et 0,01%.

Protocole 10 : Essai sciures avec enzymes pures

- Placer 15 mg de fines dans un Eppendorf.
- Ajouter 3 µL d'enzymes β-xylosidase du commerce (enzymes pures à 0,9 unités/µL).
- Compléter avec 400 µL de tampon acétate.
- Attendre 1h.
- Analyser à l'HPLC.

Protocole 11 : Préparation du charbon d'épicéa

- Peser 1,5 g de sciures d'épicéas. Les placer dans la cuillère du réacteur de pyrolyse.
- Insérer la cuillère dans le four. Laisser chauffer 5 heures à 400°C avec une montée en température de 5°C/min.
- Récupérer le charbon d'épicéa une fois le four refroidi.

Protocole 12 : Essai en étuve ventilée

- Peser 0,6 g de xylose et 30 mg de charbon d'épicéa.
- Les placer dans un erlenmeyer de 100 mL.
- Compléter avec 60 mL d'une solution d'acide acétique à 20%.
- Placer à l'étuve à 180°C pendant 6h.

Protocole 13 : Essai sur plaque chauffante

- Peser 0,6 g de xylose et 30 mg de charbon d'épicéa.
- Les placer dans un ballon tricol
- Compléter avec 60 mL d'une solution d'acide acétique à 20%.
- Chauffer le ballon sous hotte à 180°C pendant 6h.

Protocole 14 : Essai dans réacteur fermé

- Peser 1,8 g de xylose et 90 mg de charbon d'épicéa.
- Les placer dans un bocal fermé.
- Compléter avec 180 mL d'une solution d'acide acétique à 20%.
- Verser le tout dans le réacteur.
- Fermer le système.
- Lancer le moteur (200 tours/min) et le système de chauffage (150°C).
- Laisser réagir pendant 6h.

Résumé

Le projet Furalor vise à valoriser les essences locales de la région Lorraine. Le traitement du bois de hêtre à l'alcool furfurylique permettrait d'augmenter sa classe de durabilité et de diminuer ses variations dimensionnelles. La production actuelle de ce produit est très polluante, il est donc nécessaire de trouver une alternative en passant par des voies blanches.
Dans le cadre de ce projet, plusieurs pistes sont envisagées : utilisation de champignons pour produire des enzymes capables de dégrader les hémicelluloses du hêtre en xylose, synthèse de furfural par des voies moins énergivores et moins chimiques, utilisation d'enzymes capables de convertir le furfural en alcool furfurylique. Par ailleurs, nous nous intéresserons particulièrement aux rendements étant donné qu'il s'agit d'un projet susceptible d'être industrialisé.