

**Thèse de doctorat**

Mention : Ingénierie des Fonctions Biologiques

**Alexandra GIMBERNAT**

---

***Nouveau concept de catalyse hybride pour l'obtention du 5-HMF  
à partir du glucose***

---

Préparée à l'Institut Charles Viollette -ICV- EA7394

Equipe ProBioGEM : Procédés Biologiques, Génie Enzymatique et Microbien

*Soutenue le 8 décembre 2017, devant le jury composé de :*

Pr. Pascal Fongarland	Professeur des universités <i>Université Lyon 1</i>	Rapporteur
Pr. Thierry Maugard	Professeur des universités <i>Université de La Rochelle</i>	Rapporteur
Dr. Hélène Olivier- Bourbigou (HDR)	Chef du département de catalyse moléculaire <i>IFP Energies nouvelles</i>	Examinatrice
Dr. Damien Delcroix	Ingénieur de recherches <i>IFP Energies nouvelles</i>	Examineur
Pr. Rénato Froidevaux	Professeur des universités <i>Université Lille 1</i>	Directeur de thèse
Dr. Jean-Sébastien Girardon	Maître de conférences <i>Université Lille 1</i>	Encadrant
Pr. Pascal Dhulster	Professeur des universités <i>Université Lille 1</i>	Encadrant
Dr. Nicolas Lopes Ferreira	Chef de projet R&D <i>IFP Energies nouvelles</i>	Invité



*« Savoir que l'on sait ce que l'on sait, et savoir que l'on ne sait pas ce que l'on ne sait pas : voilà la véritable science. »*

*Confucius*

## Résumé

Les considérations environnementales actuelles encouragent la production d'intermédiaires chimiques bio-sourcés à travers des processus durables et plus respectueux de l'environnement nécessitant la conception de nouveaux systèmes catalytiques « sur mesure » recyclables. L'association de la catalyse biologique et de la catalyse chimique, appelée « catalyse hybride », fait partie de ces nouveaux concepts pouvant répondre aux défis émergents posés par la valorisation de la biomasse. C'est dans ce contexte d'émergence de la catalyse hybride que nous avons développé un procédé hybride innovant d'obtention de 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF), molécule plateforme clé pour l'obtention de monomères biosourcés, à partir du glucose. Les problèmes de compatibilités liées au couplage « one-pot » de l'enzyme d'isomérisation du glucose et du catalyseur chimique de déshydratation ont été résolus par la mise en œuvre d'une membrane liquide transportant le fructose. Les conditions réactionnelles optimales de chacune des 3 étapes du procédé (isomérisation du glucose, transport du fructose, déshydratation du fructose) ont été étudiées individuellement. Un premier procédé en « cascade » a alors été mis en place dans ces conditions, permettant de valider la faisabilité du procédé de production du 5-HMF. Un second procédé de catalyse hybride a ensuite été mis en place dans un réacteur innovant spécialement conçu. Ce procédé a permis de lever le verrou lié à la compatibilité des conditions des deux catalyseurs et de dépasser la limitation de rendement liée à l'équilibre thermodynamique de la réaction d'isomérisation.

---

**Mots clés :** catalyse hybride, catalyse enzymatique, catalyse acide, 5-hydroxyméthylfurfural, membrane liquide, glucose.

## Abstract

Current environmental considerations encourage the production of bio-sourced chemical intermediates through sustainable and environmentally friendly processes that require the design of new, custom-made, recyclable catalytic systems. The combination of biological catalysis and chemical catalysis, called "hybrid catalysis", is part of these new concepts that can meet the emerging challenges posed by the biomass valorization. In this context of hybrid catalysis emergence, we have developed an innovative hybrid process for obtaining 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), a key platform molecule for biosourced monomers obtained from glucose. Compatibility issues related to the "one-pot" coupling of the glucose isomerization enzyme and the chemical dehydration catalyst have been solved by the implementation of a liquid membrane carrying the fructose. Optimal reaction conditions of each of the 3 process steps (glucose isomerization, fructose transport, fructose dehydration) were studied individually. A first "cascade" process was then set up under these conditions, making it possible to validate the feasibility of the 5-HMF production process. A second hybrid catalysis process was then implemented in a specially designed innovative reactor. This process made it possible to remove the lock related to the compatibility of the operating conditions and to exceed the yield limitation related to the thermodynamic equilibrium of the isomerization reaction.

---

Key words : hybrid catalysis, enzymatic catalysis, acid catalysis, 5-hydroxymethylfurfural, liquid membrane, glucose.

## Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier le Pr. Thierry Maugard, le Pr Pascal Fongarland, le Dr. Hélène Olivier Bourbigou et le Dr. Damien Delcroix d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je souhaite remercier chaleureusement le Pr. Rénato Froidevaux et le Dr. Jean-Sébastien Girardon qui m'ont fait confiance tout au long de cette thèse, qui m'ont supporté et m'ont laissé une large marge de manœuvre afin de mener à bien ce projet. Merci pour votre sympathie, votre reconnaissance et vos encouragements.

Je remercie également le Pr. Pascal Dhulster pour avoir permis la mise en place de cette thèse. Je remercie le Dr. Damien Delcroix et le Dr. Nicolas Lopes Ferreira pour les discussions à propos de mes travaux et de la rédaction des publications et brevets.

Je remercie également M. Samuel Habib-Rosique pour ce qui concerne la rédaction des brevets. Je remercie mes collègues de bureau qui, pour la majorité, sont devenus des amis et ont été d'un support sans faille lors de ces 3 années. A Rémi, Juliette, Kalim et Mickaël qui m'ont chaleureusement accueilli, au labo comme à la ville. A Cyril, Maxime, Antoine, qui se sont rapidement et joyeusement intégré au groupe. A Sandy, Justine et Barbara, le trio féminin. A Rozenn, Benoit et Christophe du bureau voisin. A tous les autres thésards, Post-Doc et ATER. Merci pour ces moments de convivialité et de solidarité.

Je n'oublie pas de remercier mes stagiaires, Mélodie et Théo, qui m'ont permis d'avancer et d'aller plus loin dans ce travail. Je les félicite pour leur travail et leur souhaite le meilleur pour la suite de leur parcours professionnel.

Enfin je souhaite remercier tous les membres de l'Institut Charles Viollette, de l'UCCS et REALCAT avec qui j'ai pu interagir au cours de ce travail et qui m'ont aidé de quelque manière que ce soit à faire avancer ce projet.

Je souhaite remercier l'Université de Lille, l'IFPEN et REALCAT pour avoir financé mon doctorat.

D'une manière plus personnelle je souhaite remercier ma famille pour son soutien malgré l'éloignement géographique et tout particulièrement Corentin pour m'avoir remotivé et supporté dans les moments de doutes comme les moments de réussites.

## Nomenclature

### Abréviations :

Aliquat336® : chlorure de N-méthyl-N,N-dioctyl-1-octanaminium  
coT : cotransporteur  
D-Glc : D-glucose  
D-Fru : D-fructose  
DMC : carbonate de diméthyle  
DPBA : acide diphénylboronique  
FA : acide formique  
FDCA : l'acide furane-2,5-dicarboxylique  
GI : glucose isomérase  
H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : acide sulfurique  
HCl : acide chlorhydrique  
HFCS : « High Fructose Corn Syrup », sirop de maïs à haute teneur en fructose  
HMFCa : acide 5-hydroxyméthyl-2-furanecarboxylique  
HMPBA : acide ortho-hydroxyméthylphénylboronique  
IGI : « immobilized glucose isomerase », glucose isomérase immobilisée  
IL : liquide ionique  
LA : acide lévulinique  
MIBC : méthylisobutylcétone, 4-méthyl-2-pentanone  
N2P : acide naphthalène-2-boronique  
PBA : acide phénylboronique  
PET : polytéréphtalate d'éthylène  
T : transporteur  
TAME : méthyl-tert-amyl-éther  
Tris : Trizma® base  
2,3-DCPBA : acide 2,3-dichlorophénylboronique  
2,4-DCPBA : acide 2,4-dichlorophénylboronique  
2,5-DFP : 2,5-diformylfurane  
2,5-DHMF : 2,5-dihydroxyméthylfurane  
2,5-DMF : 2,5-diméthylfurane  
3,2-CarboPBA : acide 3-(2-carboxyéthyl)phénylboronique  
3,4-DCPBA : acide 3,4-dichlorophénylboronique  
3,5-DCPBA : acide 3,5-dichlorophénylboronique  
3,5-TFMPBA : acide 3,5-bis(trifluorométhyl)phénylboronique  
2-NNMPBA : acide 2(N,N-diméthylaminométhyl)phénylboronique  
2-T5PBA : acide 2-(tétrazol-5-yl)phénylboronique  
2-TFMPBA : acide 2-(trifluorométhyl)phénylboronique  
3-TFMPBA : acide 3-(trifluorométhyl)phénylboronique  
3-NPBA : acide 3-nitrophénylboronique  
4-B1nPBA : acide 4-bromo-1-naphthalèneboronique  
4-M21HPBA : acide 4-méthyl-2-(1H-pyrazol-1-yl)phénylboronique  
4-TBPBA : acide 4-tertbutylphénylboronique  
4-TFMeOPBA : acide 4-(trifluorométhoxy)phénylboronique  
4-TFMPBA : acide 4-(trifluorométhyl)phénylboronique  
5M2H : 5-méthyl-2-héxanone  
pp : point de pourcentage

Symboles :

$K_m$  : constante de Michaelis-Menten

$K_{eq}$  : constante d'équilibre

$V_{max}$  : vitesse maximale de réaction

$V$  : vitesse

$T$  : température

$A$  : absorbance

$V_{aq}$  : volume de la phase aqueuse

$V_{org}$  : volume de la phase organique

# Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>i</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>iii</b>
<b>Nomenclature</b> .....	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>vi</b>
<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I. GENERALITES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>7</b>
<b>I.1. Le 5-hydroxyméthylfurfural</b> .....	<b>8</b>
<i>I.1.1. Molécule plateforme, structure et applications</i> .....	8
<i>I.1.2. Synthèse</i> .....	11
<b>I.2. L'isomérisation du glucose en fructose</b> .....	<b>12</b>
<i>I.2.1. Les monosaccharides D-glucose et D-fructose</i> .....	12
<i>I.2.2. La réaction d'isomérisation</i> .....	13
<i>I.2.3. La glucose isomérase</i> .....	13
I.2.3.1. Obtention .....	14
I.2.3.2. Propriétés .....	16
I.2.3.3. Immobilisation.....	18
I.2.3.4. Applications industrielles .....	20
<b>I.3. La déshydratation du fructose en 5-HMF</b> .....	<b>21</b>
<i>I.3.1. Catalyse homogène en phase aqueuse</i> .....	23
<i>I.3.2. Catalyse hétérogène en phase aqueuse</i> .....	24
<i>I.3.3. Les résines échangeuses d'ions</i> .....	25
I.3.3.1. Les résines sulfoniques.....	25
I.3.3.2. Déshydratation du fructose.....	26
<i>I.3.4. Formation d'humines</i> .....	27
<i>I.3.5. Réhydratation du 5-HMF en phase aqueuse</i> .....	28
<b>I.4. Transport des monosaccharides à l'aide d'une membrane liquide</b> .....	<b>29</b>
<i>I.4.1. Acides boroniques, structure et réactivité</i> .....	29
<i>I.4.2. Complexation des monosaccharides</i> .....	30
<i>I.4.3. Transport des monosaccharides</i> .....	31
<i>I.4.4. Procédés de transport de monosaccharides</i> .....	34
<i>I.4.5. Procédés catalytiques de conversion du glucose et de transport du fructose</i> .....	36

<b>I.5. Les procédés chémoenzymatiques en cascade pour l'obtention du 5-HMF .....</b>	<b>37</b>
<b>I.6. Procédés hybrides .....</b>	<b>39</b>
<i>I.6.1. Définition de la « catalyse hybride » dans le cadre de l'étude.....</i>	39
<i>I.6.2. Mises en œuvre de la catalyse hybride avec des problèmes de compatibilité des catalyseurs : résolution du verrou de compatibilité.....</i>	40
I.6.2.1. Utilisation d'un microorganisme pour supporter et isoler l'enzyme .....	40
I.6.2.2. Encapsulation du catalyseur chimique .....	41
<i>I.6.3. Mise en œuvre de la catalyse hybride sans problème de compatibilité .....</i>	42
I.6.3.1. Utilisation d'un catalyseur unique dit « hybride » .....	42
I.6.3.2. Exemple d'utilisation de catalyseurs compatibles.....	43
<i>I.6.4. Procédé hybride, la catalyse enzymatique au service de la catalyse chimique, régénération des cofacteurs .....</i>	43
I.6.4.1. Système hybride permettant la régénération du NADH .....	44
I.6.4.2. Système hybride permettant la régénération du NAD <sup>+</sup> .....	44
<i>I.6.5. Mise en œuvre du concept de catalyse hybride pour l'obtention du 5-HMF .....</i>	45
<b>I.7. Description du procédé mis en œuvre dans ce travail .....</b>	<b>46</b>
<b>Chapitre II. Matériel et méthodes .....</b>	<b>48</b>
<b>II.1. Mise en place des méthodologies expérimentales .....</b>	<b>49</b>
<i>II.1.1. Méthodologie pour l'étude de l'isomérisation enzymatique du glucose .....</i>	50
II.1.1.1. Réactions en Eppendorf .....	50
II.1.1.2. Réactions en réacteur.....	51
<i>II.1.2. Méthodologie pour l'étude du transport du fructose en Eppendorf.....</i>	51
II.1.2.1. Extraction des monosaccharides .....	52
II.1.2.2. Relargage du fructose.....	54
<i>II.1.3. Déshydratation du fructose .....</i>	56
<b>II.2. Protocoles pour les expériences en réacteurs .....</b>	<b>57</b>
<i>II.2.1. Procédé en cascade.....</i>	58
II.2.1.1. Description du réacteur Radley <sup>TM</sup> utilisé .....	58
II.2.1.2. Méthodologies expérimentales des réactions en cascades .....	59
II.2.1.2.1. Isomérisation et extraction simultanées.....	59
II.2.1.2.2. Etude du déplacement de l'équilibre thermodynamique.....	60
II.2.1.2.3. Transfert et relargage du D-fructose.....	60
II.2.1.2.4. Déshydratation du D-fructose .....	61
<i>II.2.2. Procédé hybride, réacteur coaxial.....</i>	61
II.2.2.1. Description du réacteur utilisé .....	61
II.2.2.2. Méthodologies expérimentales.....	61
II.2.2.2.1. Expérience de catalyse hybride.....	61
II.2.2.2.2. Expérience de transport du fructose .....	62
<i>II.2.3. Catalyse hybride dans le réacteur en H.....</i>	62
II.2.3.1. Description du réacteur utilisé .....	62
II.2.3.2. Méthodologies expérimentales.....	63
II.2.3.2.1. Etudes colorimétriques .....	63
II.2.3.2.2. Expérience de transport de fructose.....	64

II.2.3.2.3. Catalyse hybride dans le réacteur en H, différence de température appliquée .....	66
II.2.3.2.4. Catalyse hybride dans le réacteur en H, dans les conditions optimisées .....	67
<b>II.3. Techniques analytiques.....</b>	<b>67</b>
<b>II.4. Calculs.....</b>	<b>68</b>
<b>Chapitre III. Etude des conditions réactionnelles de l'isomérisation enzymatique du glucose, du transport du fructose et de la déshydratation chimique vers l'obtention du 5-HMF.....</b>	<b>70</b>
<b>III.1. Isomérisation enzymatique .....</b>	<b>71</b>
III.1.1. Effet de la température et du pH .....	71
III.1.2. Effet du rapport massique IGI/glucose .....	73
III.1.3. Analyse du rendement d'isomérisation .....	76
<b>III.2. Transport du fructose au sein d'une membrane liquide organique .....</b>	<b>78</b>
III.2.1. Formation et extraction du complexe [D-fructose-acide boronique] .....	78
III.2.1.1. Effet du transporteur.....	79
III.2.1.1.1. Criblage de familles d'acides boroniques.....	80
III.2.1.1.2. Sélection de l'acide boronique le mieux adapté à l'extraction sélective du fructose.....	85
III.2.1.2. Effet de la phase organique.....	89
III.2.1.3. Effet du MIBC sur l'activité de la glucose isomérase .....	91
III.2.1.4. Développement de la membrane liquide.....	93
III.2.1.4.1. Effet du rapport molaire T/coT .....	93
III.2.1.4.2. Effet du rapport molaire D-fructose/3,4-DCPBA .....	95
III.2.1.4.3. Effet de la concentration des espèces .....	97
III.2.1.4.4. Effet de la température.....	98
III.2.1.5. Conclusion et discussion, conditions optimales de transport du fructose .....	99
III.2.2. Relargage, hydrolyse du complexe [D-fructose-3,4-DCPBA] .....	100
<b>III.3. Réaction de déshydratation .....</b>	<b>102</b>
III.3.1. Effet de la température.....	102
III.3.2. Effet du rapport massique résine/D-Fru .....	105
III.3.3. Effet du pH du milieu réactionnel .....	107
<b>III.4. Conclusion.....</b>	<b>109</b>
<b>Chapitre IV. Système en cascade, vers un système couplé .....</b>	<b>111</b>
<b>IV.1. Etude du système en mode « cascade » pour la production du 5-HMF .....</b>	<b>112</b>
IV.1.1. Présentation du système .....	112
IV.1.2. Première étape : isomérisation et extraction simultanées .....	112
IV.1.2.1. Mise en œuvre expérimentale et résultats .....	113
IV.1.2.2. Etude du déplacement de l'équilibre thermodynamique d'isomérisation .....	115
IV.1.3. Deuxième étape : transfert et relargage du D-fructose .....	120
IV.1.4. Troisième étape : déshydratation du D-fructose.....	121
IV.1.5. Rendements cumulés de l'approche en mode « cascade ».....	123

<b>IV.2. Etude d'un réacteur couplant toutes les étapes de formation du 5-HMF .....</b>	<b>124</b>
<i>IV.2.1. Design du réacteur coaxial .....</i>	<i>124</i>
<i>IV.2.2. Validation du concept de catalyse hybride pour la production du 5-HMF.....</i>	<i>126</i>
<i>IV.2.3. Limitation du système : l'agitation .....</i>	<i>128</i>
<b>IV.3. Conclusion.....</b>	<b>131</b>
<b>Chapitre V. Catalyse hybride dans le réacteur « en H » .....</b>	<b>133</b>
<b>V.1. Design du réacteur en H.....</b>	<b>134</b>
<b>V.2. Etude des échanges de matières entre les deux compartiments du réacteur .....</b>	<b>136</b>
<i>V.2.1. Le pont entre les deux compartiments : un élément crucial .....</i>	<i>136</i>
<i>V.2.2. Etude colorimétrique des phénomènes de circulation au niveau du pont .....</i>	<i>139</i>
V.2.2.1. Réacteur en H avec jonction thermostatée .....	139
V.2.2.2. Réacteur en H avec jonction courte non thermostatée .....	141
V.2.2.3. Insertion d'un système de contre-pales.....	142
<i>V.2.3. Validation en conditions réelles du système avec contre-pales.....</i>	<i>145</i>
<b>V.3. Optimisation du transport du fructose : pH et vitesse d'agitation.....</b>	<b>147</b>
<i>V.3.1. Le pH, l'élément moteur clé du système .....</i>	<i>147</i>
V.3.1.1. Etude de l'évolution des pH au cours du transport du fructose .....	147
V.3.1.2. Influence de la régulation du pH sur le transport du fructose .....	155
V.3.1.3. Différence de pH, moteur du transport unilatéral .....	157
<i>V.3.2. Influence de l'agitation sur le transport du fructose .....</i>	<i>158</i>
<i>V.3.3. Mise en évidence des cycles effectués par le couple T/coT.....</i>	<i>161</i>
V.3.3.1. Mise en évidence du turn-over du transporteur .....	161
V.3.3.2. Etude de l'influence de la quantité du couple T/coT sur la cinétique d'extraction .....	163
<i>V.3.4. Conclusion.....</i>	<i>165</i>
<b>V.4. Production du 5-HMF par catalyse hybride .....</b>	<b>166</b>
<i>V.4.1. Catalyse hybride dans le réacteur en H, effet de la température .....</i>	<i>167</i>
<i>V.4.2. Catalyse hybride dans le réacteur en H dans les conditions optimisées .....</i>	<i>168</i>
<i>V.4.3. Discussion .....</i>	<i>171</i>
<b>V.5. Conclusion.....</b>	<b>173</b>
<b>Conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>175</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>184</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>192</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>204</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>210</b>

**Production scientifique.....214**

# Introduction générale

---

## INTRODUCTION GENERALE

Le contexte environnemental et économique actuel engendre le besoin de se détacher de la dépendance aux énergies fossiles, provoquant le développement de nouvelles sources renouvelables de carburants et produits chimiques. La biomasse lignocellulosique présente un attrait tout particulier car c'est une source de carbone renouvelable, en comparaison au pétrole et au charbon, et elle est disponible en large quantité dans la nature.<sup>[1],[2]</sup> Par conséquent, valoriser cette biomasse en composés chimiques de plus haute valeur ajoutée devient un enjeu majeur pour le remplacement de produits d'origine fossile.

De cet attrait est né le concept de bioraffinerie. De façon analogue aux raffineries pétrolières qui permettent de transformer le pétrole dans le but d'obtenir des produits à forte valeur ajoutée tel que les plastiques, la bioraffinerie permet la production de molécules et carburants à partir de la biomasse.<sup>[3]</sup> La bioraffinerie permet l'accès à des molécules ayant ou non un équivalent fossile.<sup>[4]</sup> Un exemple majeur est l'acide furane-2,5-dicarboxylique (FDCA), décrit pour la synthèse des polyesters en tant qu'équivalent biosourcé de l'acide téréphtalique. Ce nouvel acide est intéressant industriellement car l'acide téréphtalique est obtenu par oxydation du p-xylène, qui est une molécule issue du pétrole. Aujourd'hui, le remplacement de cet acide d'origine fossile présente un intérêt industriel pour l'obtention industrielle de polyesters 100% biosourcés.<sup>[5]</sup>

Parmi les différents types de biomasse disponibles, la biomasse lignocellulosique, aussi appelée biomasse de seconde génération, est plébiscitée. En effet, la biomasse dite de première génération (maïs, huiles végétales...) est utilisée par l'industrie alimentaire et pour des considérations éthique et concurrentielle avec l'industrie agroalimentaire, son utilisation à des fins de développement durable s'en voit ralentie. La biomasse lignocellulosique est constituée en majorité de cellulose (30-55%), d'hémicellulose (24-50%) et de lignine (12-35%).<sup>[6]</sup> En faible quantité, des protéines, des cendres et d'autres composés sont présents. La composition de cette biomasse peut varier suivant son origine : plantes ligneuses, plantes herbacées, plantes aquatiques (Figure 1).

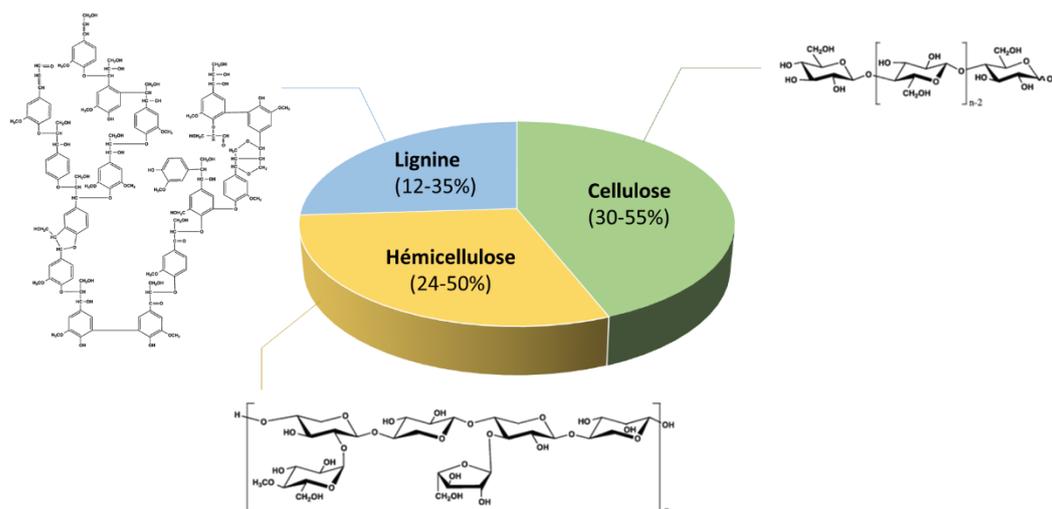


Figure 1. Répartition des constituants majeurs de la biomasse lignocellulosique.<sup>[7]</sup>

La cellulose, polysaccharide le plus présent dans la nature, est constituée d'une chaîne linéaire de molécules de D-glucose pouvant varier de 200 à 14000 entités reliées par des liaisons  $\beta$ -1,4-glycosidiques.<sup>[8]</sup> L'hémicellulose est le deuxième polysaccharide le plus répandu dans la nature. C'est un hétéropolysaccharide dont la composition en hexoses et pentoses varie selon la source végétale (principalement glucose, galactose, mannose, xylose et arabinose). Le D-glucose est donc le monomère majoritaire. Alors, la faisabilité économique d'utilisation de la biomasse à des fins industrielles dépend en grande partie de l'étape d'hydrolyse de la cellulose en glucose (et de l'hémicellulose en xylose) qui fait l'objet de nombreuses recherches.<sup>[9],[10],[11],[12],[13]</sup>

Une voie de valorisation de cette biomasse en synthons pour l'industrie chimique est la catalyse, qu'elle soit de nature chimique (homogène ou hétérogène) ou enzymatique. Chaque catalyse présente des avantages et inconvénients par rapport à l'autre (Figure 2). Ainsi, la catalyse enzymatique a l'avantage d'être sélective tout en présentant un panel de transformations encore limité. La catalyse chimique présente une sélectivité plus difficile à obtenir dans le cas de substrats polyfonctionnalisés comme c'est le cas pour la biomasse, pour un éventail de substrats plus large, causant des difficultés de séparation des différents produits. Cependant la catalyse chimique a l'avantage de montrer une forte productivité. Ces dernières années, l'idée de combiner catalyse enzymatique et catalyse chimique a émergé afin de tenter de répondre au challenge à la fois de la sélectivité et de la productivité (Figure 2).<sup>[14],[15],[16]</sup> Cette approche peut être nommée catalyse chimioenzymatique ou catalyse hybride.<sup>[17]</sup>

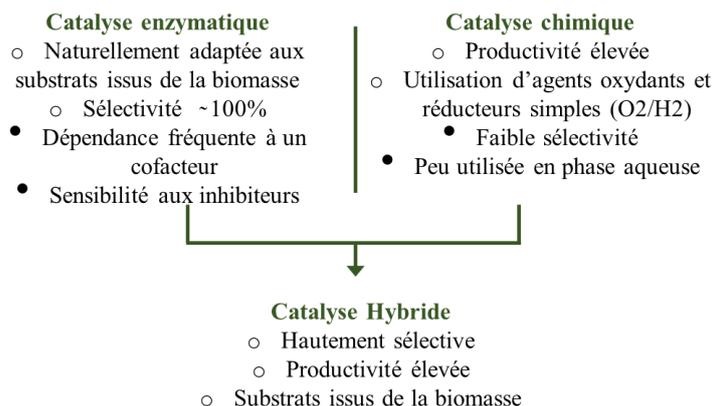


Figure 2. Avantages (○) et inconvénients (●) de la catalyse enzymatique et de la catalyse chimique.

Dans le domaine de la bioraffinerie, la conversion du glucose en 5-hydroxyméthylfurfural (5-HMF) attire l'attention. En tant que molécule plateforme, le 5-HMF donne accès à un éventail de synthons chimiques à haute valeur ajoutée comme par exemple le FDCA.<sup>[18]</sup> Malheureusement, le glucose n'est pas le substrat de prédilection pour une déshydratation performante pour former le 5-HMF comparé à son isomère, le fructose. En effet la forme fructofuranose permet une déshydratation en cycle furane avec une barrière énergétique plus faible. La transformation du glucose en 5-HMF passera donc idéalement par un intermédiaire réactionnel, le fructose.

La combinaison d'une étape de catalyse enzymatique et d'une étape de catalyse chimique pour la production du 5-HMF à partir du glucose est pertinente dans une démarche de démonstration de la faisabilité du concept de catalyse hybride. La transformation peut être réalisée en deux étapes, une première étape d'isomérisation enzymatique du glucose en fructose et une seconde étape de déshydratation chimique du fructose. En effet, la catalyse chimique appliquée à l'isomérisation du glucose a montré ses limites et n'est pas au même niveau de performance que la catalyse enzymatique industriellement implantée.<sup>[19]</sup>

Le premier verrou rencontré est la conversion du glucose limitée par l'équilibre thermodynamique atteint par la réaction d'isomérisation enzymatique du glucose.<sup>[20],[21],[22]</sup> Bien que cet équilibre soit adapté pour la production de HFCS (High Fructose Corn Syrup) impliquant un mélange glucose/fructose, la production de 5-HMF requiert une étape de déshydratation du fructose formé dont la limitation quantitative entraîne une limitation de rendement en 5-HMF.

Le second verrou est la combinaison de deux réactions aux conditions différentes (de pH et température). H. Huang *et al.* ont mis en évidence l'incompatibilité entre une glucose isomérase thermophile et un catalyseur acide de Bronsted dans un milieu aqueux.<sup>[23]</sup> Même si un

rendement en 5-HMF de 30% est obtenu, une perte totale d'activité de la glucose isomérase est observée après 1h à 90 °C et 24h à 130 °C, due au pH acide et à la température qui dénature de manière irréversible l'enzyme.

Ces verrous sont susceptibles d'être levés grâce à la mise en œuvre de procédés de catalyse hybride. En effet, le fonctionnement simultané des deux catalyseurs pourrait lever le verrou de l'équilibre thermodynamique de la réaction d'isomérisation. Tout l'art de ce travail réside dans la conception d'un procédé permettant le fonctionnement simultané de deux étapes catalytiques dans des conditions réactionnelles différentes.

Le présent manuscrit est constitué de cinq chapitres. Un premier chapitre dédié à l'étude bibliographique comporte une étude des trois étapes clés de la transformation : la réaction d'isomérisation enzymatique du glucose, la réaction de déshydratation chimique du fructose et le transport sélectif de monosaccharides (dont principalement le fructose). Afin d'aborder ce travail avec toutes les données nécessaires et faire un premier pas vers le concept de catalyse hybride, une étude exhaustive des systèmes catalytiques en cascade (donc ne répondant pas à la définition de systèmes hybrides) mettant en jeu une suite de réactions chimique et enzymatique pour la formation du 5-HMF à partir du glucose est réalisée. Ensuite, une étude bibliographique du domaine émergent de la catalyse hybride est réalisée.

Un second chapitre décrit les méthodes expérimentales utilisées pour ce travail.

Les chapitres trois à cinq sont dédiés aux résultats et discussions des trois étapes majeures de cette thèse. Premièrement l'étude des conditions réactionnelles optimales de chaque étape de la transformation. Le chapitre suivant présente les résultats concernant l'étude du procédé mis en œuvre en cascade et qui a abouti à une première configuration du procédé hybride. Le cinquième chapitre est dédié au développement du système hybride dans un réacteur spécialement conçu.

## Chapitre I. GENERALITES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Une première partie donne la définition d'une molécule plateforme, présente plus particulièrement le 5-hydroxyméthylfurfural et son intérêt industriel. Dans ce chapitre sont également présentées les trois étapes clés qui nous intéressent dans la réalisation du procédé hybride, à savoir l'isomérisation enzymatique du glucose en fructose, le transport du fructose dans une membrane liquide organique et la déshydratation chimique du fructose en 5-HMF. Les différents mécanismes et environnements réactionnels (solvants, catalyseurs, conditions physico-chimiques) sont présentés. Ensuite une vue d'ensemble des procédés de production de 5-HMF à partir du glucose, combinant isomérisation enzymatique et déshydratation chimique, dans une configuration en cascade est présentée, en tant que premier pas vers un procédé intégré. Une dernière partie placera la catalyse hybride dans son contexte en définissant ce terme et en présentant les premières synthèses hybrides réalisées, pour terminer par une présentation de synthèses hybrides appliquées spécifiquement à l'obtention du 5-HMF.

La définition des objectifs de cette thèse sera effectuée dans les dernières lignes de ce chapitre.

## I.1. Le 5-hydroxyméthylfurfural

## I.1.1. Molécule plateforme, structure et applications

Les molécules plateformes sont des molécules comportant plusieurs groupes fonctionnels qui ont le potentiel d'être transformées en nouvelles familles de molécules d'intérêts à plus haute valeur ajoutée et idéalement avec moins d'étapes qu'à partir d'un alcane.<sup>[24]</sup> Un certain nombre de molécules plateformes issues de la biomasse a été mis en lumière par l'US Department of Energy.<sup>[25]</sup> Cette liste de molécules d'intérêts a été établie dans le but de canaliser les efforts de recherche vers la production de ces molécules cibles avec pour objectif de développer la technologie nécessaire à leur production ou bien idéalement de structures qui ne sont pas encore dans la liste. Deux voies ont été investiguées, d'une part la transformation des sucres en ces molécules et d'autre part la conversion en de nouvelles molécules d'intérêts.

Une première liste de 30 candidats, regroupés en famille de composés a été établie grâce à un processus itératif basé sur les données chimiques, les données sur le marché, les propriétés et performances de la molécule ainsi que les expériences antérieures de l'industrie (Figure 3). Cette liste a été réduite à 12 après l'examen du marché potentiel pour ces molécules plateformes et leurs dérivés ainsi que la complexité technique (faisabilité) de la voie de synthèse.

Nombre de carbones	Top 30	Top 12	Nombre de carbones	Top « 10+4 »
1	Hydrogène*/ monoxyde de carbone (syngas)	-	2	Ethanol
3	Glycérol, acide 3-hydroxypropionique, acide lactique, acide malonique, acide propionique, sérine	Glycérol, acide 3-hydroxypropionique	3	Glycérol, acide 3-hydroxypropanoïque, 3-hydroxypropionaldéhyde, acide lactique
4	Acétone, acide aspartique, acide fumarique, hydroxy-3-butyrolactone, acide malique, acide succinique, thréonine	Acide aspartique, hydroxy-3-butyrolactone, 1,4-diacides (acide fumarique, acide malique, acide succinique)	4	Acide succinique
5	Arabinitol, furfural, acide glutamique, acide itaconique, acide lévulinique, proline, xylitol, acide xylonique	Acide glutamique, acide itaconique, acide lévulinique, xylitol/arabinitol	5	Furfural, acide lévulinique, isoprène, xylitol
6	Acide aconitique, acide citrique, acide 2,5-furane dicarboxylique, acide glucarique, lysine, lévoglucosan, sorbitol	Acide 2,5-furanedicarboxylique, acide glucarique, sorbitol	6	Acide 2,5-furane dicarboxylique, sorbitol, hydroxyméthylfurfural

2004 2010

Figure 3. Evolution de la liste des molécules dites « prioritaires » pour les recherches portant sur le thème de la bioraffinerie. (\*Hydrogène associé au monoxyde de carbone pour la formation du syngas).

Depuis la publication de ce rapport et de ce top 12 en 2004, de nombreuses études ont portées sur l'utilisation des carbohydrates comme matière de base pour la production de produits

chimiques. Basé sur un système de sélection similaire et prenant en compte les récentes avancées technologiques, une nouvelle liste a été proposée par Bozell *et al.* en 2010.<sup>[26]</sup> Les neuf critères d'évaluations sont listés en annexe 1.

On note sur cette liste l'apparition de composés de type furane tels que le 5-HMF (5-hydroxyméthylfurfural). En effet ils avaient été écartés en 2004 car le marché était encore statique, de plus le rendement n'était pas au rendez-vous à cause de sélectivités de transformation moyennes en 5-HMF. Cependant ce secteur s'est développé avec la meilleure maîtrise de la déshydratation des sucres C'est pourquoi ils font partie de la nouvelle liste établie en 2010. Le 5-hydroxyméthylfurfural fait partie des molécules de grand intérêt nouvellement proposées.

Le 5-hydroxyméthylfurfural ( $C_6H_6O_3$ ), également connu sous ses autres dénominations, 5-hydroxyméthyl-2-furaldéhyde, 5-hydroxyméthyl-2-furancarboxaldéhyde, est noté 5-HMF. Depuis la description de sa synthèse par déshydratation intramoléculaire de l'inuline en milieu acide par Dül et Kiermeyer, le 5-HMF a fait l'objet de plusieurs centaines de publications scientifiques.<sup>[27],[28]</sup> Cette richesse bibliographique s'explique par différents arguments. D'une part il peut être obtenu par dégradation chimique et/ou biologique de composés cellulosiques et hémicellulosiques provenant de la biomasse et d'autre part il offre la possibilité de générer des molécules d'intérêts. Le 5-HMF est un composé présentant un cycle furane, une fonction alcool et une fonction aldéhyde. En tant que molécule plateforme, le 5-HMF donne accès à différents produits qui ont des applications variées par différents types de réactions (Figure 4).

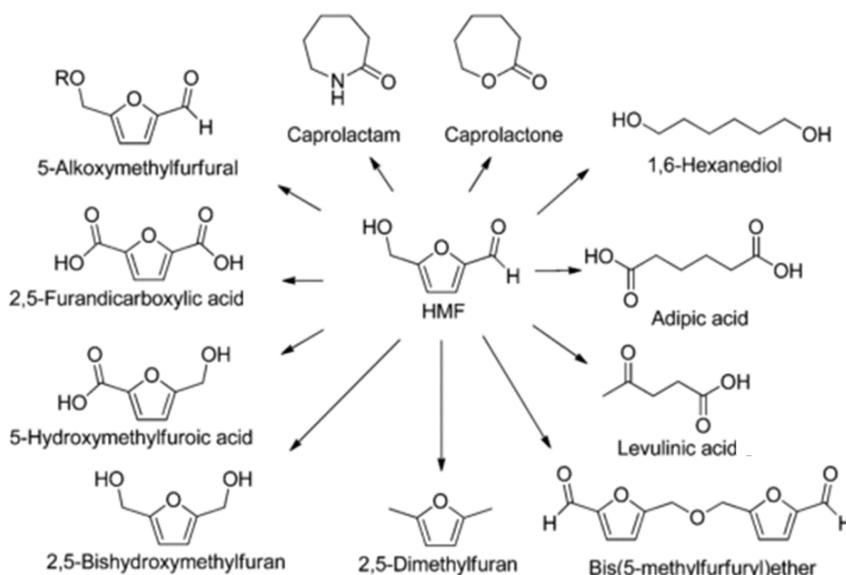


Figure 4. Le 5-HMF, une molécule plateforme.<sup>[18]</sup>

L'oxydation sélective de la fonction aldéhyde permet de former l'acide 5-hydroxyméthyl-2-furanocarboxylique (HMFCFA). L'oxydation sélective de la fonction alcool permet la formation du 2,5-diformylfurane (2,5-DFP).<sup>[29]</sup> L'oxydation des deux fonctions permet la synthèse de l'acide 2,5-furanedicarboxylique (FDCA). Actuellement de nombreuses recherches portent sur l'obtention de ce diacide. En effet, il peut être utilisé comme précurseur pour la synthèse de polyéthylène furanoate (le PEF peut être un substitut du polytéréphtalate d'éthylène (PET) ), polymère employé pour la fabrication de nombreux textiles et plastiques et obtenu par copolymérisation de l'acide téréphtalique (PTA), issu de l'oxydation du *p*-xylène provenant des coupes pétrolières, et de l'éthylène glycol, pétro- ou biosourcé.

La réduction sélective du groupement formyle du 5-HMF permet la synthèse du 2,5-dihydroxyméthylfurane (2,5-DHMF). Cette molécule est utilisée comme monomère pour la production de mousse polyuréthane. L'hydrodéoxygénation des groupements alcool et aldéhyde permet la synthèse du 2,5-diméthylfurane (2,5-DMF) qui a été plébiscité comme additif et bio-carburant.<sup>[30]</sup> Après réaction de Diels-Alder de ce dernier avec l'éthylène, le *p*-xylène est obtenu. L'oxydation du *p*-xylène permet la formation de PTA biosourcé.

La réhydratation du 5-HMF donne lieu à l'obtention de l'acide lévulinique qui est également une molécule plateforme ainsi qu'un précurseur de polyesters et polyamides de spécialité. C'est également un intermédiaire dans la synthèse de composés pharmaceutiques ainsi qu'un précurseur pour la production de produits chimiques et solvants tels que la  $\gamma$ -valérolactone.<sup>[31–34]</sup>

La valorisation des hexoses pour l'obtention de 5-HMF par voies catalytiques prend une place importante dans la littérature avec une croissance forte depuis le milieu des années 2000.<sup>[18]</sup>

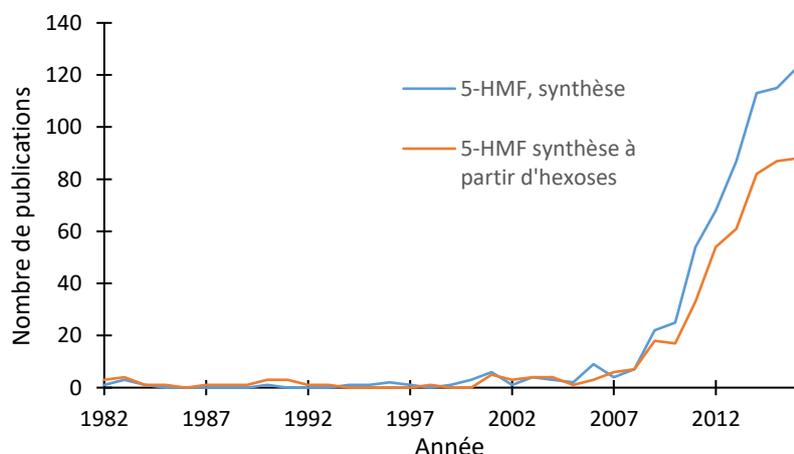


Figure 5. Nombre de publications sur la synthèse du 5-HMF et la synthèse du 5-HMF à partir d'hexoses telles que recensées par Scopus.

La Figure 5 illustre la part importante de publications à propos de la synthèse du 5-HMF à partir d'hexoses parmi les études de synthèse du 5-HMF.

### I.1.2. Synthèse

Le 5-HMF est produit par la triple déshydratation d'un hexose. En principe, cette réaction peut s'effectuer par un simple traitement thermique, cependant les rendements de conversion et de sélectivité en 5-HMF sont faibles (Hansen *et al.*).<sup>[35]</sup> Antal *et al.*, ont démontré que la synthèse la plus accessible repose sur une triple déshydratation d'un hexose réalisée à haute température et en présence d'un catalyseur acide.<sup>[36]</sup> Deux voies de synthèse du 5-HMF à partir du glucose sont possibles, soit par triple déshydratation directe du glucose (Figure 6, voie B) soit par triple déshydratation du fructose issu du glucose par une pré-étape d'isomérisation (Figure 6, voie A).<sup>[37],[29]</sup> A cause de la grande stabilité du glucose sous forme cyclique, des traitements thermiques drastiques et des faibles sélectivités en 5-HMF obtenues, le 5-HMF est préférentiellement obtenu à partir de la voie utilisant le fructose (voie A).<sup>[38],[39]</sup>

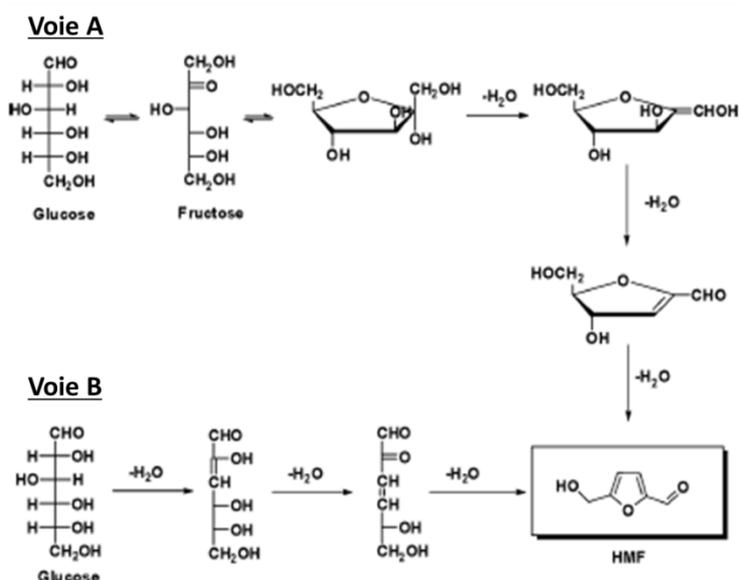


Figure 6. Schéma réactionnel d'obtention du 5-HMF par triple déshydratation à partir du glucose directement (voie B) à partir du glucose mais incluant une étape intermédiaire d'isomérisation en fructose (voie A).<sup>[29]</sup>

La valorisation des hexoses pour l'obtention de 5-HMF prenant une place importante dans la littérature,<sup>[18]</sup> la voie générale de déshydratation des hexoses et la production de coproduits fréquemment rencontrés au cours de cette réaction et représentée Figure 7. Dans un milieu aqueux, une double réhydratation du 5-HMF entraîne la formation d'acide lévulinique et d'acide formique.

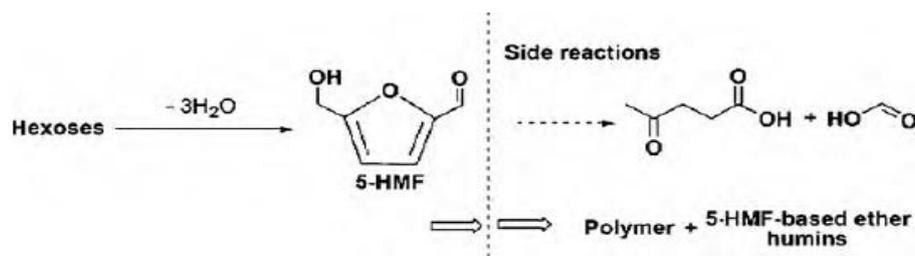


Figure 7. Formation du 5-HMF et réactions parasites rencontrées.

L'utilisation d'un milieu non aqueux limite la réhydratation du 5-HMF mais des réactions de polymérisation peuvent toujours se produire, formant ainsi des polymères colorés insolubles, les humines.

La première production industrielle de 5-HMF biosourcé a été réalisée en 2014 par la société AVABiochem à Muttenz en Suisse. Le 5-HMF est produit à partir de biomasse lignocellulosique (en majorité de la cellulose) avec une capacité de production initiale de 20 tonnes par an. Le procédé de production est basé sur une version modifiée du processus de carbonisation hydrothermale (transformation de la biomasse en charbon par voie catalytique à haute pression et température) dans lequel le 5-HMF semble être un sous-produit de réaction. La société Avantium se positionne elle sur la voie de transformation du fructose en 5-HMF vers le FDCA avec une possible intégration des étapes de déshydratation et d'oxydation.<sup>[40]</sup>

## I.2. L'isomérisation du glucose en fructose

### I.2.1. Les monosaccharides D-glucose et D-fructose

Le D-glucose est un aldose de formule moléculaire  $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$  possédant une masse molaire de 180,2 g/mol. Il peut adopter une configuration à chaîne ouverte ou cyclique : pyranose ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), furanose ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) et linéaire, où  $\alpha$  et  $\beta$  sont les deux formes anomères. Lorsque le D-glucose est en solution aqueuse, un équilibre s'établit entre les différents anomères donnant 1/3 d'anomère  $\alpha$  et 2/3 d'anomère  $\beta$ , appelé la mutarotation. En solution, 99% du glucose se trouvent sous la forme pyranose (64% de l'anomère  $\beta$  et 36% de l'anomère  $\alpha$ ).

Le D-fructose est un isomère du glucose avec une fonction cétone en position 2. C'est un cétose existant en solution sous 5 formes : pyranose ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), furanose ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) et linéaire, en proportions différentes de celles du glucose. Sa forme prédominante dans une solution aqueuse à 20°C est le  $\beta$ -D-fructopyranose à 70%. La forme  $\beta$ -D-fructofuranose est présente à 20%. L' $\alpha$ -D-

fructofuranose et l' $\alpha$ -D-fructopyranose forment les 10% restant.<sup>[41],[42],[43],[44]</sup> La proportion de la forme furanose (25% à 20°C) dans la phase aqueuse augmente avec la température.<sup>[42],[43]</sup> La forme furanose est la forme favorisant la déshydratation en 5-HMF, de par l'analogie des formes furanose/furane.

### I.2.2. La réaction d'isomérisation

La réaction d'isomérisation est une réaction réversible équilibrée thermodynamiquement, résultant d'un équilibre céto-énolique avec transfert de proton entre la forme aldose du glucose et cétose du fructose via une forme 1,2-ènediol. Cette transformation appliquée au glucose est représentée Figure 8.

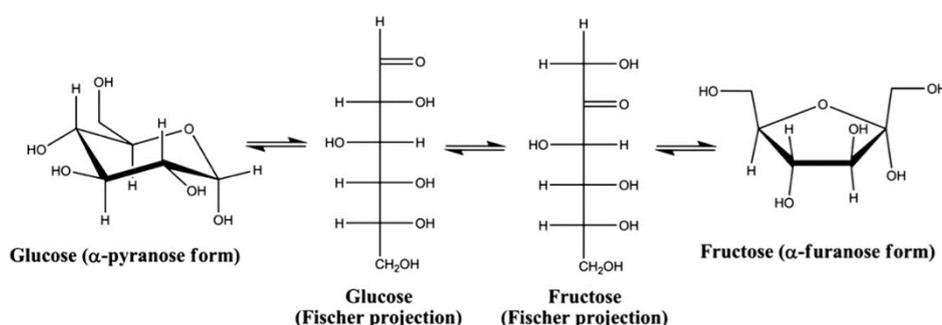


Figure 8. Représentation de la réaction d'isomérisation du glucose.<sup>[45]</sup>

Différents types d'isomérisation du glucose peuvent être utilisées : l'isomérisation par voie chimique et l'isomérisation par voie enzymatique. La voie chimique n'étant pas au même degré de performance (sélectivité, productivité) que la voie enzymatique, nous ne considérerons dans ce travail que l'isomérisation par voie enzymatique.

### I.2.3. La glucose isomérase

La première D-glucose isomérase a été découverte en 1957 par Marshal et Kooi et a été isolée de *Pseudomonas hydrophila*.<sup>[46]</sup> Bien qu'ayant comme substrat de préférence le xylose, le glucose démontre un  $K_m$  160 fois plus grand. L'utilisation du fructose en temps qu'édulcorant dans les boissons et produits alimentaires a rapidement hissé la glucose isomérase au rang d'enzyme industrielle. En effet, le fructose a un goût 160% plus sucré que le sucrose et un pouvoir sucrant plus important que celui du glucose (Figure 9). La D-xylose isomérase de classe EC 5.3.1.5 (D-xylose kétol isomérase) est communément nommée D-glucose isomérase (GI). Elle fait partie de la classe 5 des isomérases, de la sous-classe 3 des oxydases intramoléculaires,

du groupe 1 des interconversions aldoses et kétoles et du sous-groupe 5 des xyloles isomérases. La GI catalyse la réaction réversible d'isomérisation du D-glucose en D-fructose (Figure 9).

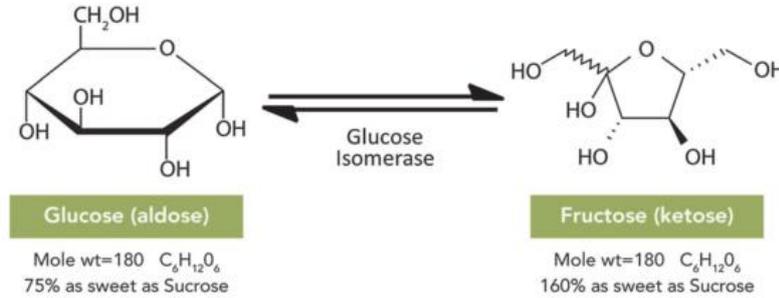


Figure 9. Isomérisation du D-glucose en D-fructose et leur pouvoir sucrant respectif.<sup>[47]</sup>

De par son enjeu industriel, un nombre conséquent de publications et de brevets retracent les transformations apportées tant au niveau biochimique que microbiologique.

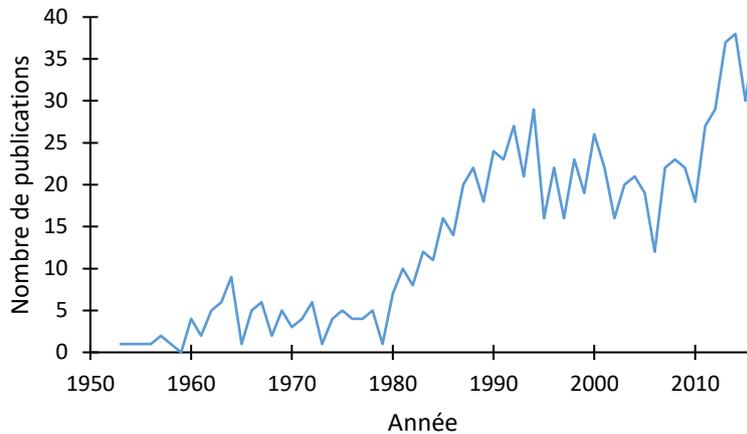


Figure 10. Evolution du nombre de publications portant sur le développement de xyloles isomérases au cours du temps telles que recensées par Scopus.

L'augmentation du nombre de publications sur le sujet dès les années 1980 démontre l'intérêt croissant sur le sujet.

### I.2.3.1. Obtention

Les recherches ont mis à jour un éventail de microorganismes capables de synthétiser la glucose isomérase (Figure 11). Découverte en 1957 chez *Pseudomonas hydrophila*, sa culture nécessite la présence de xylose et son utilisation requiert la présence d'arséniate dans le milieu d'isomérisation pour augmenter son rendement.<sup>[46]</sup> D'autres travaux ont permis d'isoler d'autres xyloles isomérases dont les activités ne requièrent pas l'utilisation de cofacteurs et coenzymes, tels que NAD<sup>+</sup> ou ATP.<sup>[48],[49]</sup>

Species
<i>Actinomyces olivocinereus</i> , <i>A. phaeochromogenes</i>
<i>Actinoplanes missouriensis</i>
<i>Aerobacter aerogenes</i> , <i>A. cloacae</i> , <i>A. levanicum</i>
<i>Arthrobacter</i> spp.
<i>Bacillus stearothermophilus</i> , <i>B. megabacterium</i> , <i>B. coagulans</i>
<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>Brevibacterium incertum</i> , <i>B. pentosaminoacidicum</i>
<i>Chainia</i> spp.
<i>Corynebacterium</i> spp.
<i>Cortobacterium helvolum</i>
<i>Escherichia freundii</i> , <i>E. intermedia</i> , <i>E. coli</i>
<i>Flavobacterium arborescens</i> , <i>F. devorans</i>
<i>Lactobacillus brevis</i> , <i>L. buchneri</i> , <i>L. fermenti</i> , <i>L. mannitopoeus</i> , <i>L. gayonii</i> , <i>L. fermenti</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. lycopersici</i> , <i>L. pentosus</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>Microbispora rosea</i>
<i>Microellobosporia flavea</i>
<i>Micromonospora coerulea</i>
<i>Mycobacterium</i> spp.
<i>Nocardia asteroides</i> , <i>N. corallia</i> , <i>N. dassonvillei</i>
<i>Paracolonobacterium aerogenoides</i>
<i>Pseudonocardia</i> spp.
<i>Pseudomonas hydrophila</i>
<i>Sarcina</i> spp.
<i>Staphylococcus bibila</i> , <i>S. flavovirens</i> , <i>S. echinatus</i>
<i>Streptococcus achromogenes</i> , <i>S. phaeochromogenes</i> , <i>S. fracliae</i> , <i>S. roseochromogenes</i> , <i>S. olivaceus</i> , <i>S. californicos</i> , <i>S. venuceus</i> , <i>S. virginial</i>
<i>Streptomyces olivochromogenes</i> , <i>S. venezaelie</i> , <i>S. wedmorensis</i> , <i>S. griseolus</i> , <i>S. glaucescens</i> , <i>S. bikiniensis</i> , <i>S. rubiginosus</i> , <i>S. achinatus</i> , <i>S. cinnamomensis</i> , <i>S. fradiae</i> , <i>S. albus</i> , <i>S. griseus</i> , <i>S. hivens</i> , <i>S. matensis</i> , <i>S. nivens</i> , <i>S. platensis</i>
<i>Streptosporangium album</i> , <i>S. oulgare</i>
<i>Thermopolyspora</i> spp.
<i>Thermus</i> spp.
<i>Xanthomonas</i> spp.
<i>Zymomonas mobilis</i>

Figure 11. Liste de microorganismes capables de produire la glucose isomérase.<sup>[50]</sup>

La glucose isomérase immobilisée appelée Sweetzyme® IT Extra et fabriquée par Novozyme est une glucose isomérase produite par *Streptomyces murinus*.<sup>[51],[52]</sup>

La production de glucose isomérase est principalement obtenue par voie microbienne. Des recherches ont porté sur l'optimisation des conditions de culture de bactéries en fermentation dans le but d'améliorer la productivité et de réduire les coûts de production. L'amélioration du rendement passe généralement par l'optimisation du milieu de fermentation, plus précisément sur la méthode d'induction utilisée, sur la nature de la source azotée, sur le contrôle du pH et de la température, et sur l'utilisation d'éventuels ions. Il convient de noter qu'il n'existe pas de milieux types pour la production de GI car il est dépendant de chaque souche. Initialement, les premières productions de GI nécessitaient la présence de xylose dans le milieu de fermentation pour induire la production. Cependant, le D-xylose présentant un coût élevé pour la production, son remplacement par de l'amidon, du glucose, du sorbitol ou encore du glycérol est aujourd'hui privilégié.<sup>[53]</sup> Actuellement, certaines souches natives ou mutantes sont capables d'utiliser le glucose en place du xylose (ex : *Actinoplanes*, *Bacillus coagulans*,

*Streptomyces murinus*...). La nature de la source d'azote est également importante. La source requise est différente pour chaque souche, généralement peptone, extrait de levures ou bien des sels d'ammonium. Le pH est généralement entre 7 et 8, tandis que la température varie, selon les souches, entre 30 et 60 °C.<sup>[50],[54],[55],[56]</sup> Il en est de même pour la durée de la fermentation comprise entre 6 et 48 heures. Des ions métalliques (cations divalents) sont requis durant la fermentation. Selon la souche utilisée il s'agit de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ .<sup>[50],[57],[58]</sup> Pour des raisons environnementales, les teneurs en  $\text{Co}^{2+}$  ont cherché à être réduites.

Trois exemples de cultures sont présentés dans le Tableau 1.

Microorganisme	<i>Actinoplanes missouriensis</i>	<i>Thermoanaerobacter B6A</i> et <i>Clostridium thermosulfurogenes 4B</i>	<i>Streptomyces flavogriseus</i>
Milieu de préculture	Gélose dextrosée à la pomme de terre	Tampon phosphate, extrait de levure, tryptone 1% xylose	-
Milieu de culture	Liqueur de maïs pH = 7 0,05 mM $\text{CuSO}_4$	Tampon phosphate, extrait de levure, tryptone 1% xylose pH = 5,5	1% paille d'hémicellulose, 2,5% liqueur de maïs, 0,1% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pH = 7
Température de culture - durée	30 °C 5 jours	60°C -	30 °C 36h
Extraction de l'enzyme	(1) Centrifugation, (2) Reprise dans tampon acétate de sodium 0,05M pH = 4,8 + 0,01M $\text{MgCl}_2$ (3) Sonication (4) Centrifugation (5) Reprise dans acétate de sodium 0,05M pH = 4,8 + 0,01M $\text{MgCl}_2$ (6) Centrifugation (7) Récupération du surnageant	(1) Centrifugation, (2) Reprise dans tampon Mops 50 mM pH = 7 + 10 mM $\text{MgSO}_4$ , 1 mM $\text{CoCl}_2$ (3) Sonication (4) Centrifugation (5) Récupération du surnageant	(1) Centrifugation (2) Reprise dans eau distillée (3) Centrifugation (4) Reprise dans tampon phosphate de sodium 0,05 M pH = 7+ 0,1% bromure de cétrimonium (5) Centrifugation (6) Récupération du surnageant
Source	(59)	(60)	(61)

Tableau 1. Exemples de conditions de culture microbienne et d'extraction pour la préparation de la glucose isomérase.

### I.2.3.2. Propriétés

L'enzyme utilisée au cours de la thèse est la glucose isomérase issue de *Streptomyces ruminus*. Sa structure avec une résolution de 2,6 Å a été déterminée par Rasmussen en 1994.<sup>[62]</sup> L'illustration de la structure est donnée Figure 12.

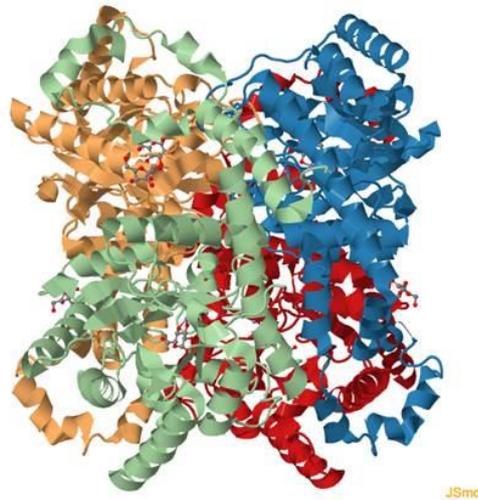


Figure 12. Structure de la glucose isomérase de *Streptomyces ruminus*.

La glucose isomérase est un tétramère. Chaque monomère est organisé selon un motif structural de type « tonneau ( $\beta/\alpha$ )<sub>8</sub> », consistant en l'alternance de huit hélices  $\alpha$  et huit feuillet  $\beta$  le long d'un segment polypeptidique. L'enzyme contient 338 acides aminés par monomère, donnant un poids moléculaire calculé de 42,7 kDa. La structure a été déterminée en présence de  $Mg^{2+}$  et deux positions pour  $Mg^{2+}$  ont été identifiées, du côté C-terminal et du côté N-terminal. Un autre domaine, du côté C terminal fait une boucle contenant plusieurs hélices  $\alpha$  enroulé autour du tonneau d'une autre molécule. Deux dimères identiques forment le tétramère. Le domaine N – terminal est composé des résidus 1 à 322 et le domaine C terminal des résidus 232 à 388. Le site actif est une séquence de Phe-His-Asp-Xaa-Asp-Xaa-Xaa-Pro-Xaa-Gly, dans laquelle le groupement histidine participe à la liaison avec le substrat mais pas au processus d'isomérisation.<sup>[63]</sup> La configuration de la poche catalytique dans laquelle se lie le glucose a été décrite chez la glucose isomérase produite par *Streptomyces Rubiginosus* qui présente plus de 90% de séquence identique avec *Streptomyces ruminus* et est représentée Figure 13.

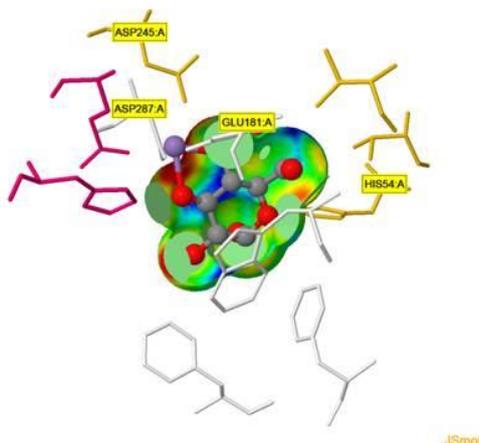


Figure 13. Représentation de la poche catalytique de la glucose isomérase produite par *Streptomyces rubiginosus*.

- Constantes, pH et température d'utilisation de la glucose isomérase

Pour une activité maximum, un cation divalent  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  ou  $Co^{2+}$  est introduit dans le milieu d'isomérisation. Plus précisément, deux ions divalents par molécule sont nécessaires pour maintenir l'activité biologique.<sup>[64]</sup> Le  $K_m$  pour le D-glucose est généralement supérieur à celui pour le D-xylose. Les valeurs sont comprises entre 0,086 M et 1,400 M.<sup>[65],[4],[5]</sup> La conversion est légèrement endothermique, avec un  $\Delta H=5kJ/mol$ , et avec une constante d'équilibre  $K_{eq} \sim 1$  à 25°C.<sup>[66],[65],[20],[67],[68]</sup> La position de l'équilibre d'isomérisation dépend de la température. En effet, plus la température augmente plus l'équilibre est déplacé en faveur de la production de fructose pour des températures étudiées allant de 25 à 80 °C selon la glucose isomérase utilisée.<sup>[69]</sup>

### I.2.3.3. Immobilisation

Les avantages et inconvénients liés à l'immobilisation d'une enzyme sont listés dans le Tableau 2.

Avantages	Inconvénients
Exploitable dans des systèmes continus et en batch Réutilisation possible sur plusieurs cycles Augmentation de la stabilité par rapport à la forme libre Modifications favorables du pH et de la température optimale Séquestrer l'enzyme de l'écoulement des produits Co-immobilisation possible avec d'autres enzymes	Perte d'activité enzymatique durant l'immobilisation Altération défavorable des propriétés cinétiques Coût des supports et agents fixant Coût du procédé d'immobilisation Limitation des transferts de masse et contraintes diffusionnelles

Tableau 2. Avantages et inconvénients de l'immobilisation des enzymes.<sup>[47]</sup>

Différentes méthodes d'immobilisation existent et ont été récemment listées dans la revue de Mohamad *et al.*<sup>[70]</sup>:

- L'adsorption physique sur un support inerte : elle consiste à assurer la rétention de l'enzyme à la surface d'un support insoluble, par des interactions faibles entre les groupes fonctionnels de l'enzyme et du support. L'interaction enzyme-support implique l'ensemble des liaisons non covalentes ou secondaires de bas niveau énergétique tel que les liaisons de Van der Waals, les liaisons hydrogènes, les liaisons ioniques et le transfert de charges.
- Le piégeage : les molécules d'enzyme sont retenues dans le réseau tridimensionnel d'un polymère insoluble dans l'eau ou emprisonnées dans des microcapsules délimitées par une membrane semi-perméable dont les pores sont suffisamment larges pour permettre le passage des molécules de substrat ou des produits de la réaction.
- La formation de liaisons covalentes avec un support : elle est réalisée par l'intermédiaire de liaisons irréversibles et covalentes entre les groupements fonctionnels de l'enzyme et les groupes réactifs du support qui ont été au préalable activés.
- Le « Cross-linking », la réticulation : formation de liaisons covalentes entre les enzymes avec l'utilisation d'un agent réticulant (généralement le glutaraldéhyde).

Dans le cas de la glucose isomérase immobilisée Sweetzyme<sup>®</sup>IT Extra, le procédé d'immobilisation mis en œuvre est l'immobilisation par réticulation.<sup>[71]</sup> Les différentes étapes du procédé sont présentées Figure 14. La glucose isomérase immobilisée est disponible depuis 1974.<sup>[50]</sup>

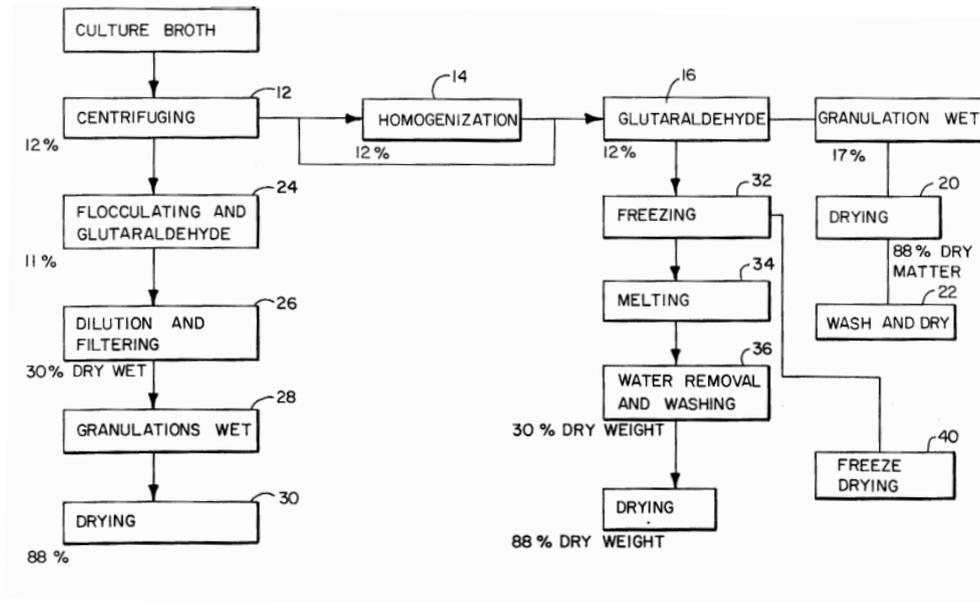


Figure 14. Procédé d'immobilisation de la glucose isomérase par Novo Industri.

Deux producteurs majeurs d'IGI sont aujourd'hui présents, Novozymes A/S (Sweetzyme) et Genencor (Gensweet)

#### I.2.3.4. Applications industrielles

La première isomérisation enzymatique du glucose à l'échelle industrielle (pour la production d'HFCS- sirop de sucre à haute concentration en fructose) a eu lieu en 1967 par Clinton Corn Brands aux Etats Unis.

##### - Production d'HFCS

L'isomérisation du glucose en fructose est d'importance commerciale pour la production de HFCS. En effet, l'utilisation d'IGI pour la production de HFCS représente le plus important procédé commercial impliquant une enzyme immobilisée en terme de vente d'enzymes et de volume de produit obtenu.<sup>[47]</sup> En 2013, 10 millions de tonnes de HFCS ont été produites par 500 tonnes d'IGI. Le principe est le suivant : le sirop de D-glucose dérivé du maïs est converti par l'IGI en un mélange d'environ 42% de D-fructose, 50% de D-glucose, 6% de maltose, 2% de maltotriose et des traces d'autres sucres. Une formule enrichie en D-fructose à 90% est ensuite obtenue par enrichissement avec une méthode chromatographique. Le mélange des deux formules donne une solution à 55% en fructose. Cette méthode de fabrication fait du fructose à 55% une formule économique à produire et utilisée par des grands groupes de boissons depuis 1984. Le HFCS de son côté est largement utilisé dans les produits alimentaires

bien que les récentes prises de conscience sur ses risques pour la santé aient fait reculer les ventes ces dernières années.<sup>[72]</sup>

- Production d'éthanol

La glucose isomérase est utilisée pour augmenter la conversion des sucres issus de la biomasse lignocellulosique en éthanol.<sup>[73],[74],[75]</sup> Lors de la dépolymérisation de l'hémicellulose des pentoses sont formés (dont le D-xylose) et ne sont pas fermentés en éthanol par les levures usuelles.<sup>[76]</sup> La GI catalyse alors l'isomérisation du xylose en xylulose.<sup>[75]</sup> Ce dernier, après fermentation avec les levures appropriées, produit de l'éthanol.<sup>[77]</sup>

La glucose isomérase est ainsi une enzyme largement étudiée et qui, sous sa forme immobilisée, trouve une utilisation industrielle intensive (production d'HFCS). Le choix d'utiliser une enzyme sous sa forme immobilisée repose alors ici sur la possibilité de protéger plus aisément cette enzyme d'un solvant organique au sein d'un milieu biphasique eau/solvant organique. Son utilisation en milieu aqueux à des températures comprises entre 60 et 90 °C (dans le cas de la Sweetzyme®IT Extra de Novozymes) la rend attractive dans le cadre de l'inclusion dans un procédé avec l'utilisation simultanée d'un catalyseur chimique pour la déshydratation du fructose dont les températures de fonctionnement sont généralement supérieures à 50°C. Le choix d'une enzyme par rapport à un catalyseur chimique pour réaliser l'isomérisation du fructose se base sur la sélectivité de la glucose isomérase qui reste supérieure à la sélectivité des catalyseurs chimiques.

### I.3. La déshydratation du fructose en 5-HMF

De nombreuses publications ont pour sujet la formation de 5-HMF à partir des hexoses, judicieusement recensées dans la revue de van Putten en 2013.<sup>[18]</sup> Dans le contexte de nos travaux, le relargage du fructose extrait de la phase aqueuse dans laquelle se déroule l'isomérisation du glucose se déroule dans une phase aqueuse dite « réceptrice ». Le principe de membrane liquide mis en place ici entre les deux phases aqueuses implique alors dans cette configuration la réalisation de la réaction de déshydratation dans cette deuxième phase aqueuse. Nous avons donc choisi de concentrer la recherche bibliographique sur la formation de 5-HMF à partir du fructose en phase aqueuse

La première déshydratation de sucres entraînant la production de 5-HMF a été réalisée par Düll et Kiermayer en 1895 (Figure 15).<sup>[27],[28]</sup>

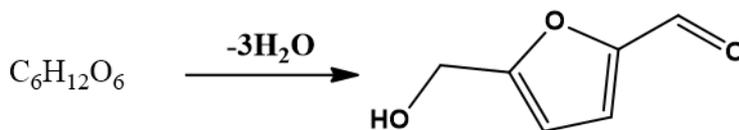
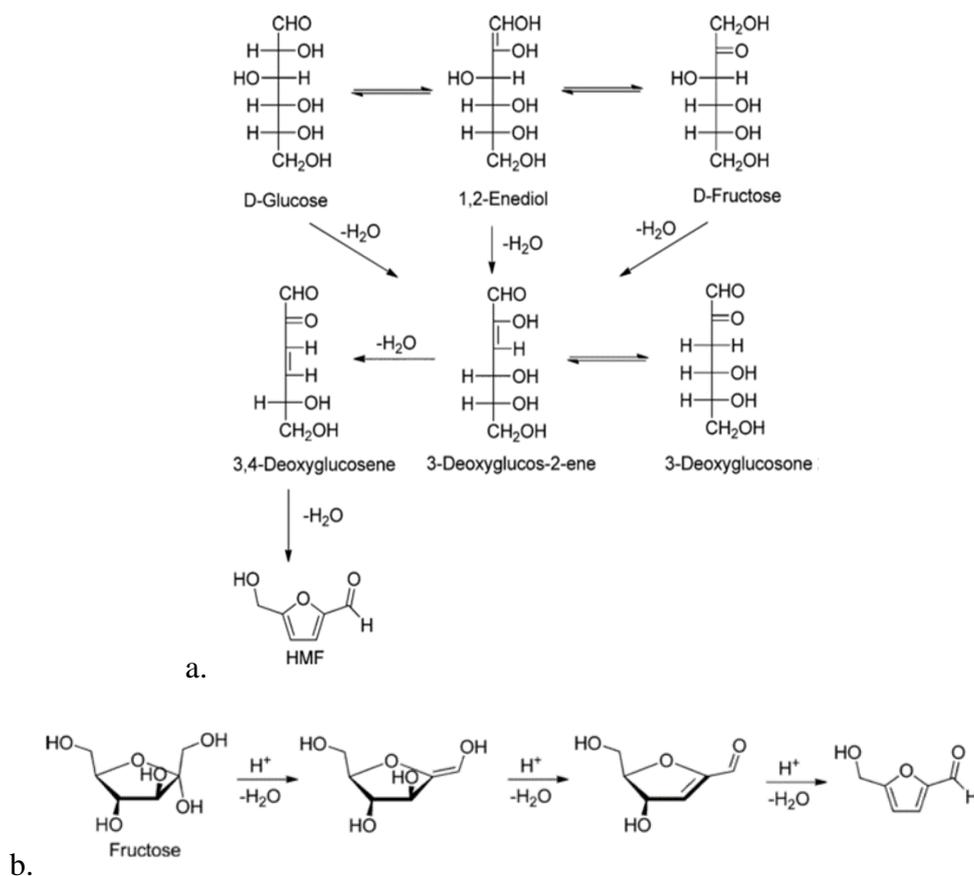


Figure 15. Déshydratation d'hexoses en 5-HMF.

La réaction catalysée par un catalyseur acide de Bronsted consiste en la perte de trois molécules d'eau. Depuis, le nombre croissant de publications sur le sujet démontre l'intérêt grandissant. Des revues majeures illustrent l'utilisation du 5-HMF et les méthodes de synthèse. Nous pouvons citer en 2001 celle de Lewkowski *et al.* en 2004 celle de Moreau *et al.*, plus récemment en 2013 par de Vries *et al.*<sup>[37],[78],[18]</sup> Comme mentionné dans l'introduction générale, la réaction étudiée dans ce travail est la réaction de déshydratation du fructose en 5-HMF, la forme fructofuranose permettant une déshydratation en cycle furane avec une barrière énergétique plus faible qu'à partir du glucose. Deux types de mécanisme pour la réaction ont été proposés. Il s'agit d'un mécanisme faisant appel à des intermédiaires acycliques et d'un mécanisme proposant des intermédiaires cycliques. Les deux schémas réactionnels proposés sont présentés Figure 16.

Figure 16. Schémas réactionnels proposés pour la réaction de déshydratation. (a) Mécanisme acyclique, (b) Mécanisme faisant appel à des intermédiaires cycliques.<sup>[18]</sup>

Ces mécanismes réactionnels ont été établis en milieu aqueux. Malgré le nombre significatif de publications sur la déshydratation du fructose en 5-HMF, aucun des deux mécanismes n'a été écarté. Une étude cinétique approfondie est nécessaire pour évaluer l'importance des deux mécanismes. Les formes cycliques dans l'eau sont en effet minoritaires mais la sélectivité de leur déshydratation est bonne, au contraire des formes linéaires qui sont majoritaires mais dont la déshydratation est poussive.

### I.3.1. Catalyse homogène en phase aqueuse

Un premier type de catalyse pour la réaction de déshydratation du fructose est la catalyse homogène en phase aqueuse. Il s'agit de catalyseurs acides sous forme liquide. Une liste de catalyseurs (non exhaustive) accompagnée de leur rendement et sélectivité pour la réaction de déshydratation du fructose est représentée Figure 17. Une première sélection des candidats a été faite afin de ne pas surcharger la figure et ainsi proposer les meilleurs catalyseurs en termes à la fois de rendement en 5-HMF et de sélectivité.

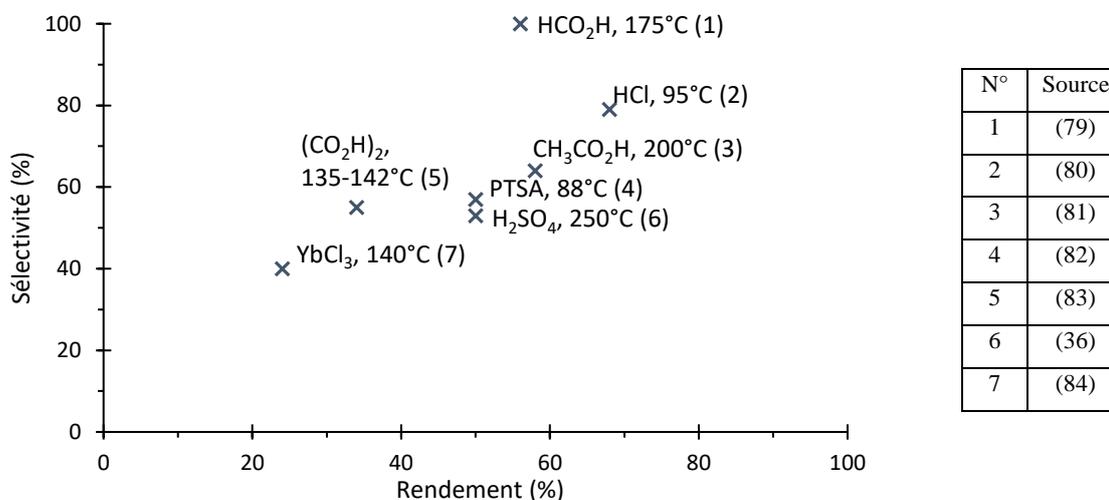


Figure 17. Sélectivité en fonction du rendement de déshydratation des réactions de déshydratation par catalyse homogène en phase aqueuse pour différents catalyseurs.

Les meilleurs couples sélectivité/rendement sont obtenus avec l'acide formique ( $\text{HCO}_2\text{H}$ ) et l'acide chlorhydrique. Bien que les catalyseurs homogènes permettent ici d'obtenir de meilleurs rendements à des températures plus basses que lors de l'utilisation de catalyseurs hétérogènes (Figure 18), la plupart des acides employés sont toxiques et corrosifs. La possibilité de mettre au point un procédé permettant le recyclage du catalyseur pousse à l'utilisation d'un catalyseur hétérogène.

## I.3.2. Catalyse hétérogène en phase aqueuse

Un second type de catalyse pour la réaction de déshydratation du fructose est la catalyse hétérogène en phase aqueuse. Il s'agit de catalyseurs acides sous forme solide. Les catalyseurs acides homogènes sont efficaces pour la déshydratation du fructose mais leur caractère corrosif et difficilement recyclable réduit le bénéfice d'utilisation. Les catalyseurs hétérogènes peuvent permettre un recyclage facilité et un procédé durable plus respectueux de l'environnement. Cependant de nombreuses voies combinent l'emploi du catalyseur hétérogène et d'un solvant organique (par exemple du toluène) afin d'extraire le produit pour qu'il ne subisse pas de dégradation, le rendement est alors augmenté mais peu conforme au développement d'un procédé vert. Un des objectifs de ce travail est de limiter l'utilisation de solvants organiques et de simplifier au maximum le système réactionnel tout en maintenant des performances attractives.

Une liste non exhaustive de catalyseurs accompagnée de leur rendement et sélectivité pour la réaction de déshydratation du fructose est représentée Figure 18. Une première sélection des candidats a été faite afin de ne pas surcharger la figure et ainsi comparer des catalyseurs en termes à la fois de rendement en 5-HMF et de sélectivité.

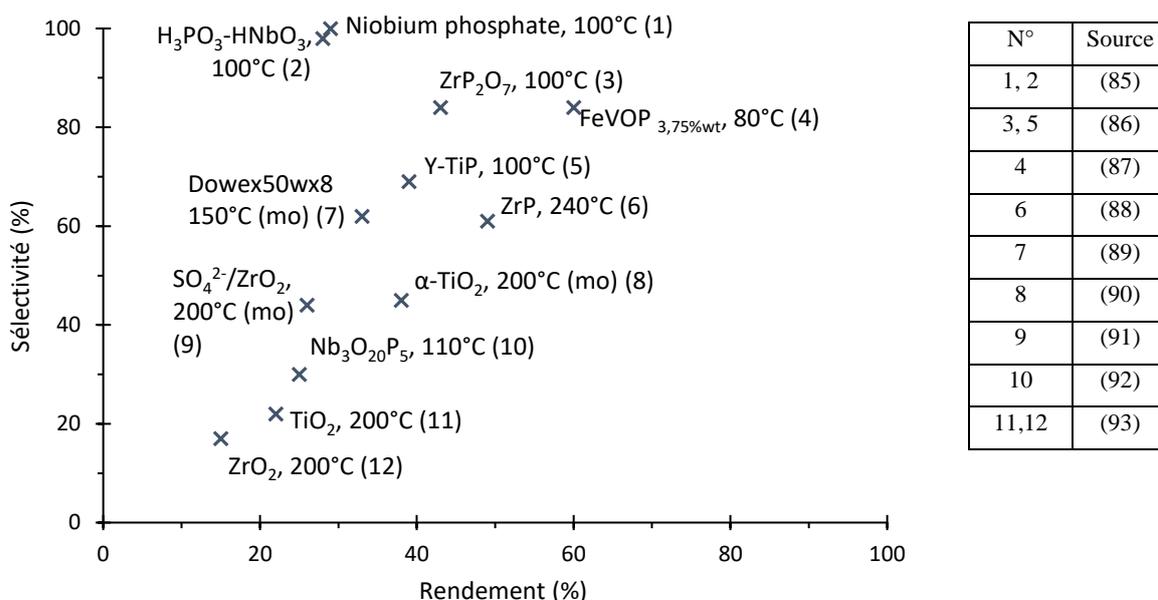


Figure 18. Sélectivité en fonction du rendement de déshydratation des réactions de déshydratation par catalyse hétérogène en phase aqueuse pour différents catalyseurs. (mo) : micro-ondes.

Les rendements de déshydratation sont compris entre 19% et 60% avec des sélectivités allant de 17 à 100%. La sélectivité de 100% est obtenue avec l'utilisation d'un catalyseur au phosphate de Niobium à 100°C sur 30 minutes. Le catalyseur est introduit à hauteur de 71wt% et le fructose 6wt%. Le rendement en 5-HMMF est alors de 29% avec une conversion du fructose de même valeur.<sup>[85]</sup> Dans cette même étude, une sélectivité de 98% pour un rendement de 28% en 5-HMF est obtenue par catalyse avec  $\text{H}_3\text{PO}_3\text{-HNbO}_3$  (acide niobique) à 100 °C après 30 minutes. Le catalyseur est ici introduit à hauteur de 63wt% et le fructose à 6wt%.<sup>[85]</sup>

La production du 5-HMF à partir du fructose dans un milieu purement aqueux en présence d'un catalyseur acide hétérogène présente un rendement limité, principalement à cause de la formation d'oligomères non valorisables et ce, quel que soit le catalyseur solide utilisé. Souza *et al*, ont montré qu'associer le milieu aqueux à un acide carboxylique (acide formique, acétique ou lactique) comme co-solvant permet d'augmenter le rendement en 5-HMF jusqu'à 64% (contre 28%). Une concentration entre 10 et 50wt% de cosolvant permet d'apporter au milieu l'acidité nécessaire pour convertir le fructose en 5-HMF en limitant sa dégradation en acides lévulinique et formique.<sup>[94]</sup>

### I.3.3. Les résines échangeuses d'ions

#### I.3.3.1. Les résines sulfoniques

Ces dernières années, les résines sulfoniques échangeuses d'ions de type Amberlyst et Dowex (résines commerciales) ont fait l'objet d'études pour la production de 5-HMF.

Les résines sulfoniques échangeuses d'ions sont formées d'un copolymère de styrène, divinylbenzène et d'acide sulfonique présent sur les cycles benzéniques du styrène (Figure 19).

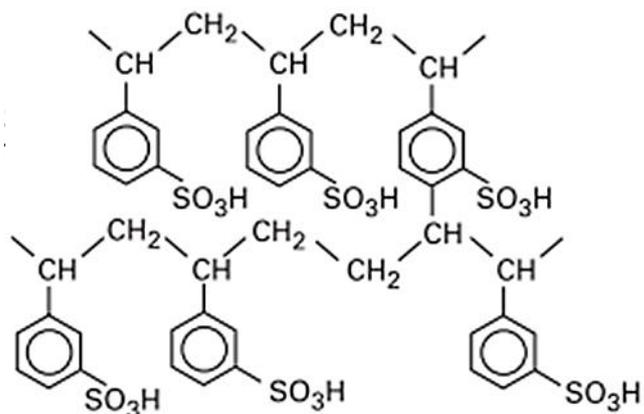


Figure 19. Structure de sulfonate de polystyrène réticulé.<sup>[95]</sup>

Deux types de résines existent : les résines de type gel (microporeuses) et les résines macroréticulées (macroporeuses).<sup>[96]</sup> Ces résines sont sphériques avec un diamètre entre 0,3 et 1,2 mm. Les résines de type gel sont des billes transparentes ovales dont la matrice a une structure homogène sans discontinuité. Lorsqu'elles sont sèches ces résines sont rétractées et les chaînes polymériques sont aussi proches que les forces atomiques (répulsion électromagnétique) le permettent ce qui rend les résines imperméables. Ainsi l'activité catalytique des sites au sein de la résine est faible.<sup>[96],[97]</sup> Les résines macroréticulées quant à elles, sont des billes opaques et présentent une certaine porosité. Les pores de ces résines sont formés lors de l'élimination du solvant dans lequel a lieu la copolymérisation.<sup>[98]</sup>

#### I.3.3.2. Déshydratation du fructose

Il a été notifié que lors de la synthèse du 5-HMF mais aussi de l'acide lévulinique, l'activité catalytique de la résine augmente lorsque le taux de réticulation diminue, à la fois pour les résines de type gel et les résines macroréticulées.<sup>[96]</sup>

La première synthèse du 5-HMF à partir du D-fructose a été reportée par Nakamura et Morikawa.<sup>[99]</sup> L'utilisation d'une résine macroréticulée, Dianion PK-216, dans le DMSO à 80°C a mené à un rendement en 5-HMF de 90% à conversion totale de fructose. D'autres résines et solvants ont été utilisés pour déshydrater le fructose et sont listés dans le Tableau 3.

Solvant	Catalyseur	T (K)	t (min)	Conversion (%)	Sélectivité (%)	Rendement (%)
H <sub>2</sub> O-DMSO	-	363	480	83	65	54
H <sub>2</sub> O-DMSO/MIBC	Dianion PK-16	363	240	87	84	73
H <sub>2</sub> O/THF	Amberlyst-15	393	120	98	49	48
H <sub>2</sub> O	Amberlyst-15	408	400	31	54	17
H <sub>2</sub> O-dioxane/DMSO	Amberlyst-15	383	3	98	90	88
H <sub>2</sub> O-DHMTF	Amberlyst-70	403	29	87	60	61
H <sub>2</sub> O-MTHF	-	403	60	84	60	50

Tableau 3. Déshydratation du fructose par des résines échangeuses d'ions.<sup>[97]</sup>

Dans le cadre de notre étude, seules les réactions de déshydratations en milieu aqueux sont étudiées. Ainsi, en milieu aqueux, la catalyse de la déshydratation du fructose (2wt%) par la Dowex<sup>®</sup> 50wx8 à 150°C assistée par micro-ondes durant 30 minutes donne lieu à un rendement en 5-HMF de 33% avec une sélectivité de 62%. Cependant, l'ajout de 70wt% d'acétone en tant que co-solvant permet un rendement de 73% avec une sélectivité de 81% après seulement 15 minutes de réaction.<sup>[89]</sup> Cette augmentation du rendement est attribuée à la diminution de la proportion d'eau présente au contact de la résine.

Le milieu purement aqueux a été retenu pour ce travail afin de promouvoir la réaction de déshydratation dans un milieu ne contenant après relargage du fructose que le fructose, le 5-HMF et ses éventuels produits de dégradation. De plus, privilégier un catalyseur hétérogène plutôt qu'homogène simplifiera encore le procédé en termes de séparation et recyclage du catalyseur.

#### I.3.4. Formation d'humines

De manière générale, la conversion catalytique acide des sucres contenus dans la biomasse lignocellulosique s'accompagne de la formation de matériel carboné appelé des

humines.<sup>[100]</sup> Les humines sont des polymères insolubles dans l'eau, riches de composés furaniques contenant des groupements fonctionnels.<sup>[101],[102]</sup> Elles sont formées par la condensation polymérique du fructose, du 5-HMF et des intermédiaires réactionnels.<sup>[100]</sup> Leur structure est dépendante des conditions de réactions et de la nature des réactifs.<sup>[103],[104],[105]</sup> Les humines adoptent une forme sphérique formée par un cœur hydrophobe et une enveloppe hydrophile.<sup>[103],[104]</sup> Ainsi, la présence de solides de ton sombre montre la formation de ces humines.<sup>[106]</sup>

La présence d'humine dans le milieu réactionnel lors de la déshydratation du fructose par une résine sulfonique peut causer sa désactivation. Le matériel se recouvre d'une fine couche d'oligomères à sa surface, diminuant son efficacité catalytique.<sup>[103],[104]</sup> Nous porterons donc une attention toute particulière à limiter la formation de ces composés.

### I.3.5. Réhydratation du 5-HMF en phase aqueuse

Après la réaction de déshydratation du fructose en 5-HMF, et si le 5-HMF n'est pas extrait du milieu réactionnel, il a été observé que la concentration en acide lévulinique du milieu augmente et le rendement en 5-HMF diminue.<sup>[107],[80]</sup> Conjointement à la formation d'acide lévulinique a lieu la formation d'acide formique selon le schéma réactionnel suivant proposé par Horvat en 1985 (Figure 20).<sup>[31],[108]</sup>

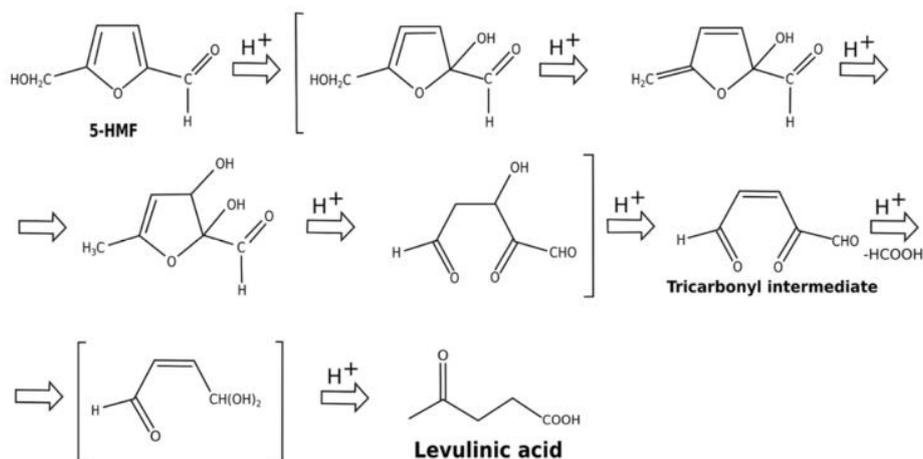


Figure 20. Schéma réactionnel de formation de l'acide lévulinique en milieu acide à partir du 5-HMF.<sup>[31]</sup>

La réalisation de la réaction sans formation d'acide lévulinique avec un catalyseur au Niobium (NBO) utilisé à des températures allant jusqu'à 100°C a été mise en lumière par Carniti.<sup>[109]</sup>

Ainsi, le rendement de la réaction de déshydratation du fructose en 5-HMF en milieu aqueux acide doit faire face à deux limites : d'une part la formation d'humines et d'autre part la réhydratation du 5-HMF en acide lévulinique et en acide formique (Figure 21).

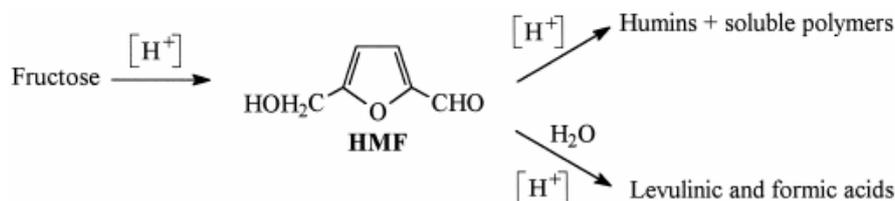


Figure 21. Schéma de la voie de formation des produits en milieu aqueux acide depuis le fructose.

L'utilisation dans ce projet de températures inférieures à  $90^\circ C$  pourrait permettre de limiter la formation d'humines et éventuellement la réhydratation.

Afin de transporter le fructose depuis le milieu d'isomérisation au milieu de déshydratation, un système de membrane liquide est mis en place.

#### I.4. Transport des monosaccharides à l'aide d'une membrane liquide

Le système de membrane liquide consiste en l'utilisation d'un solvant organique contenant un transporteur ayant pour rôle de former un complexe avec le sucre présent dans une première phase aqueuse, et un contre-ion dont le rôle est de former une paire d'ions avec le complexe afin de l'extraire dans la phase organique. Ce complexe est ensuite hydrolysé au contact d'une seconde phase aqueuse entraînant le relargage du fructose dans cette dernière.

##### I.4.1. Acides boroniques, structure et réactivité

Un acide boronique est un acide borique substitué par un groupe alkyl ou aryl. Il possède deux groupements hydroxyles (Figure 22).

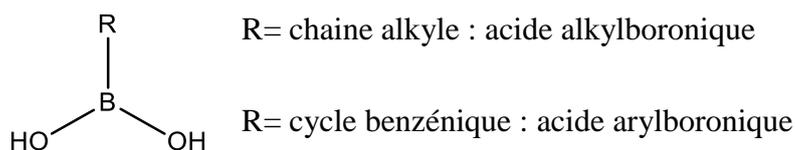


Figure 22. Structure des acides alkyl- et aryl- boroniques

Ces composés sont des acides de Lewis organiques lorsque R est un groupement carboné et leur réactivité et propriétés dépendent de la nature de ce groupement R. En phase aqueuse, Lorand

et Edwards ont démontré en 1959 que la forme neutre trivalente acide boronique est en équilibre avec la forme anionique tétraédrique borate (Figure 23) dont l'équilibre dépendra du pKa de l'acide boronique, donc de R, et du pH du milieu.<sup>[110]</sup>

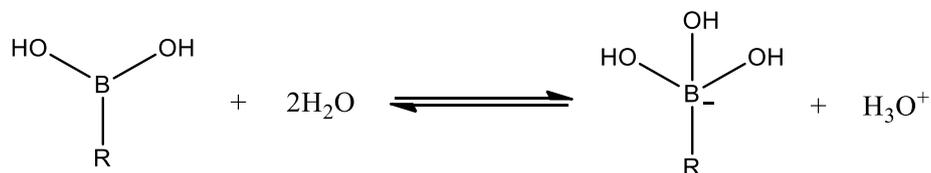


Figure 23. Equilibre d'ionisation des acides boroniques dans l'eau.

Les acides boroniques sont connus pour leur capacité à former un ester boronique avec les diols. Selon le pH du milieu, l'ester formé est neutre ou anionique (Figure 24).

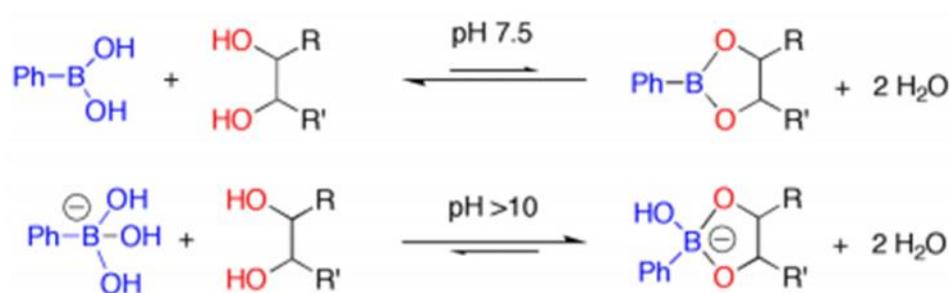


Figure 24. Formation de l'ester boronique à partir d'un diol et d'un acide phénylboronique à différents pH.<sup>[111]</sup>

Le pKa de l'acide phénylboronique dans l'eau étant de 8,8, il est sous la forme acide boronique à pH 7,5 proche de la neutralité, et l'ester correspondant est donc la forme trigonale ester boronique.

Lorsque le pH est supérieur au pKa, ici une valeur de 10, l'acide phénylboronique est sous la forme phénylborate (anionique tétraédrique). L'ester boronique étant systématiquement plus acide que l'acide boronique correspondant ( $\text{pKa}(\text{acide}) > \text{pKa}(\text{ester})$ ).<sup>[112]</sup>, alors la formation de l'ester sous forme borate sera forcément favorisée lorsque  $\text{pH} > \text{pKa}(\text{acide})$ .<sup>[113],[114]</sup>.

#### I.4.2. Complexation des monosaccharides

Le premier transport effectif de monosaccharide d'une phase aqueuse donneuse vers une phase aqueuse réceptrice en passant par une phase organique a été reporté en 1986 par Shinbo *et al* en utilisant un acide arylboronique (nommé pour cette utilisation : transporteur).<sup>[115]</sup> Des avancées dans la compréhension du mécanisme de complexation des

monosaccharides ont été apportées par Morin *et al.*<sup>[116],[114]</sup> avec la distinction entre deux mécanismes dépendant des pH et pKa de l'acide boronique:  $\text{pH} > \text{pKa}(\text{acide})$  et  $\text{pH} < \text{pKa}(\text{acide})$ , impliquant la forme respectivement tétraédrique et trigonale du transporteur (Figure 25).

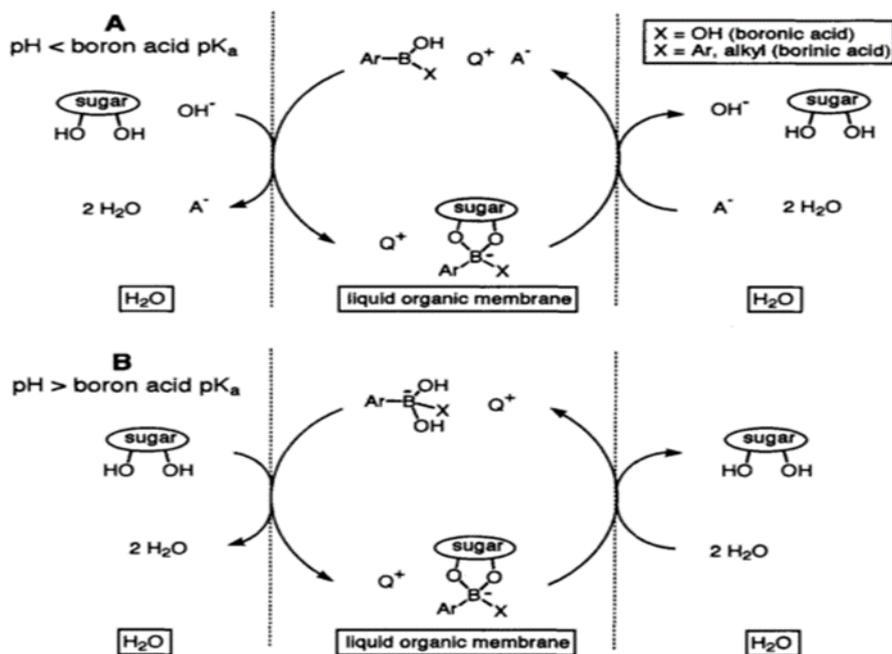


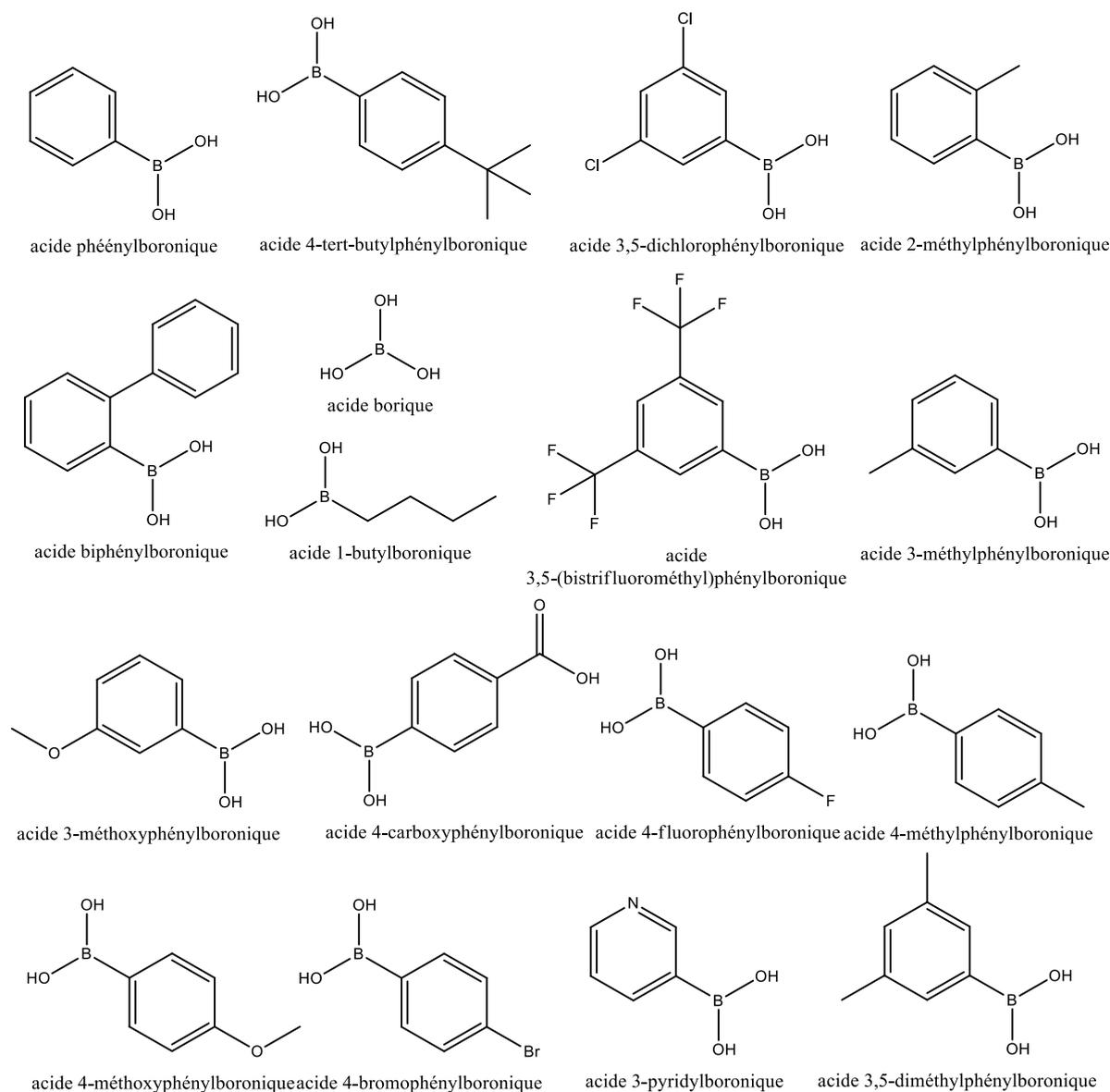
Figure 25. Deux mécanismes possibles pour le transport de monosaccharide par complexation avec un acide arylboronique. A :  $\text{pH} < \text{pKa}$ . B :  $\text{pH} > \text{pKa}$ .<sup>[116]</sup>

Deux mécanismes sont en concurrence, le mécanisme où l'acide boronique est sous sa forme acide trigonal et le mécanisme où l'acide boronique est sous sa forme borate tétraédrique. Pour une meilleure réactivité, la conformation tétraédrique est préférée. En effet, un atome de bore présentant une géométrie  $\text{sp}^3$  (borate) facilite la formation d'un complexe stable par rapport à la géométrie  $\text{sp}^2$  (boronique).<sup>[113]</sup> C'est pourquoi l'utilisation d'un pH supérieur au pKa de l'acide boronique provoque la formation d'un complexe plus stable que dans le cas inverse.

Les acides boroniques utilisés pour la complexation de monosaccharides sont principalement des acides arylboroniques car la gamme de pH dans laquelle ils peuvent réaliser le transport, gamme imposée par leur pKa, est compatible avec l'utilisation d'une enzyme.

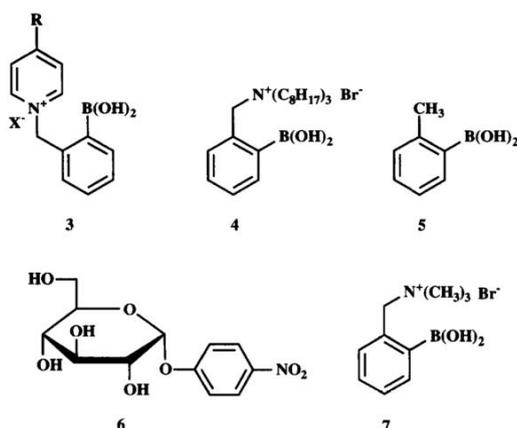
#### I.4.3. Transport des monosaccharides

Dans le cadre du transport de monosaccharides au travers d'une membrane hydrophobe, la complexation des monosaccharides différents acides boroniques est étudiée.<sup>[117]</sup> Les candidats sont les suivants :



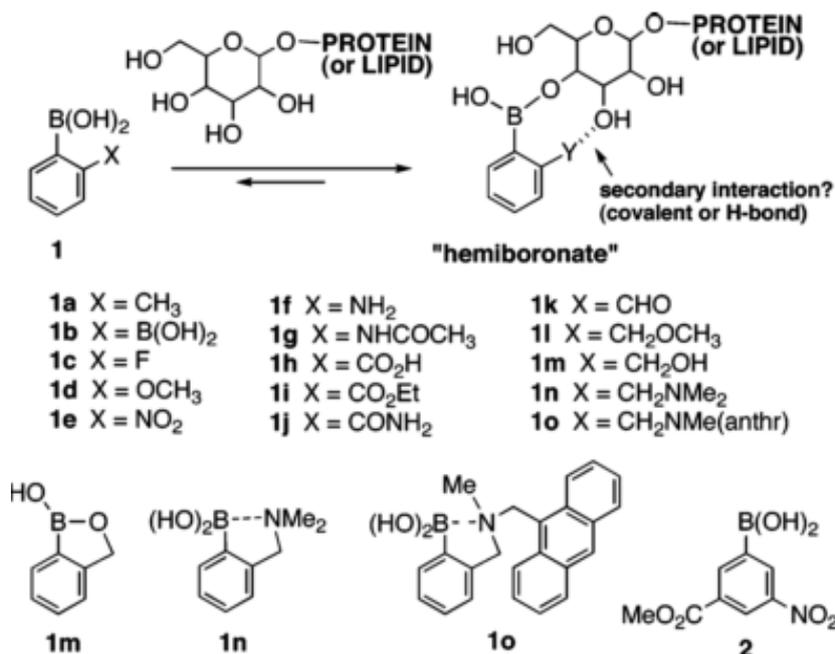
Ces acides boroniques sont les plus communément utilisés pour le transport des monosaccharides. Le transport du monosaccharide nécessite également la présence d'un contre-ion, qui est généralement un ammonium quaternaire de type trioctylmétylammonium (TOMA-Cl) ou Aliquat336®. Ce contre ion a pour rôle de former une paire d'ions avec le complexe formé par l'acide boronique et le monosaccharide et ainsi provoquer son passage dans la phase organique.

Ainsi, l'idée de former un acide boronique avec un groupement trioctylmétylammonium a donné naissance à la formation de nouveaux acides boroniques tels que ceux présentés Figure 26.<sup>[118]</sup>


 Figure 26. Exemples d'acides boroniques.<sup>[118]</sup>

Du fait de la configuration souhaitée de l'acide boronique en solution, un pKa inférieur au pH est donc requis. Ainsi l'utilisation d'acides boroniques de pKa relativement faibles est privilégiée.

Des acides boroniques capables de réaliser la réaction de complexation dans un milieu de pH quasi neutre sont recensés par Hall *et al.*<sup>[119]</sup> Ce sont des acides ortho-hydroxyméthyl phénylboroniques. Les structures sont présentées Figure 27.


 Figure 27. Structures des acides arylboroniques ortho- et méta- substitués.<sup>[119]</sup>

Les complexes sont formés, suivant l'exemple de la complexation du glucose et fructose proposée par Karpa *et al.*, à partir des formes furanose et pyranose.<sup>[120]</sup> La structure des complexes formés est présenté Figure 28.

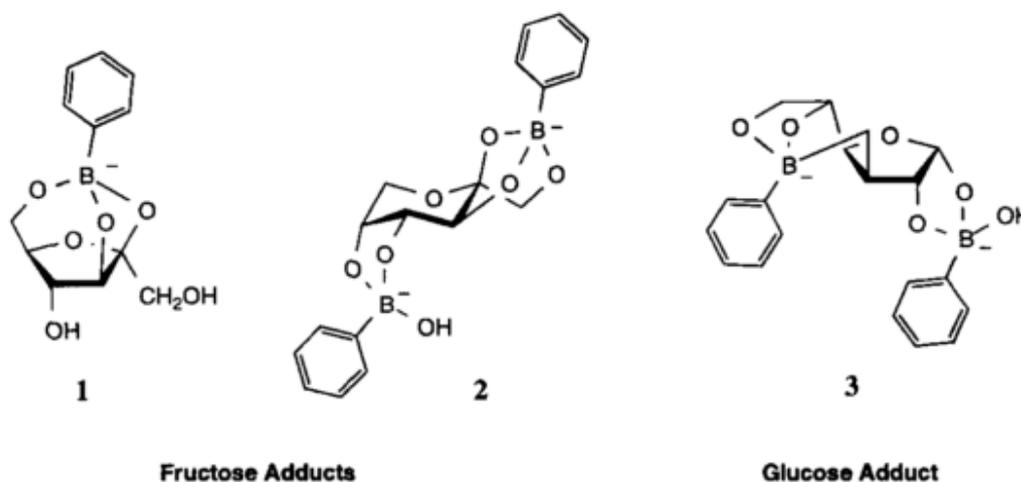


Figure 28. Structures des complexes fructoboroniques et glucoboronique à partir des formes furanose et pyranose.<sup>[120]</sup>

La sélectivité de ce transport a été reportée comme suit : sorbitol > fructose > glucose.<sup>[117]</sup> Paugam *et al.* ont mis en évidence la séparation du fructose d'un mélange glucose-fructose, menant à une phase aqueuse réceptrice contenant plus de 80% de sucre.<sup>[121]</sup>

#### I.4.4. Procédés de transport de monosaccharides

La première publication sur le transport de monosaccharides (fructose, glucose, mannose, galactose) date de 1986 par Sugiura *et al.*<sup>[115]</sup> Il est réalisé dans un procédé dont la configuration est présentée Figure 29.

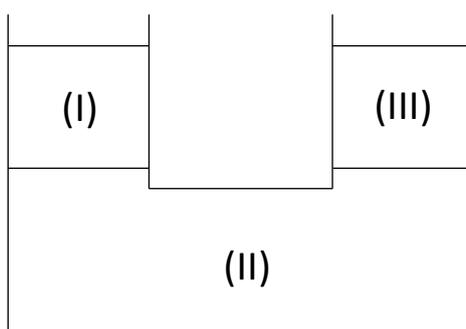


Figure 29. Configuration du procédé de transport des monosaccharides

La phase aqueuse I dite « donneuse » est composée de 50 mL de tampon carbonate de sodium de concentration 100 mM à pH = 10 et 100 mM de saccharide. La phase aqueuse III dite « réceptrice » est composée de 50 mL tampon glycine-HCl de concentration 100 mM à pH = 3.

La phase organique II est composée de 100 mL de dichlorométhane, 1 à 5 mM d'acide phénylboronique (PBA, pKa 8,8) et 1 à 10 mM de chlorure de trioctylméthylammonium (TOMA-Cl). L'étude de l'influence du pH de la phase I sur la vitesse de transport du fructose dans la phase III mène à la conclusion qu'à un pH inférieur à 8,5 la vitesse de transport est nulle puis augmente pour les pH allant jusqu'à 10,5 jusqu'à la vitesse maximum d'environ  $9 \times 10^7$  mol/h. En conclusion, le transport n'est initié qu'une fois le pH approchant la valeur du pKa du PBA et sa vitesse augmente largement une fois le pKa dépassé. L'augmentation de la concentration en TOMA-Cl dans la phase II de 0 à 10 mM entraîne une augmentation de la vitesse de transport jusqu'à  $15 \times 10^7$  mol/h. L'augmentation de la concentration en PBA de 0 à 5 mM entraîne une augmentation de la vitesse entre 0 et 1 mM de PBA puis une diminution jusqu'à la valeur nulle à 5 mM.

En 1997, Karpa *et al.*<sup>[120]</sup> ont prouvé l'habilité de l'acide phénylboronique (transporteur) à former un complexe chargé négativement avec le fructose et celle de l'Aliquat336<sup>®</sup> (contre ion=cotransporteur) à former une paire d'ions avec le complexe puis transporter ce dernier vers la phase organique ; confirmant ainsi l'intérêt d'une voie impliquant la conformation tétraédrique par rapport à la conformation trigonale. L'utilisation de couples acide boronique/Aliquat336<sup>®</sup> pour le transport du fructose et du glucose depuis un milieu basique a été étudiée. La comparaison des rendements d'extraction du fructose et glucose est faite avec le PBA et l'acide diphenylboronique (DPBA). Le rendement maximal est obtenu avec le couple DPBA/Aliquat336 (10 mM/10mM) à pH 8 réalisé par un tampon phosphate à 100 mM, pour une concentration initiale en sucre de 6 mM.

La question du paramètre limitant du transport a été posée par Smith *et al.* avec l'étude du transport de glycoside (*p*-nitrophényl- $\beta$ ,D-glucopyranoside, *p*-nitrophényl- $\beta$ ,D-galactopyranoside, *p*-nitrophényl- $\beta$ ,D-mannopyranoside).<sup>[116]</sup> Selon cette étude, le paramètre limitant la vitesse de transport des monosaccharides est la diffusion des solutés dans la couche non agitée de solvant à proximité de l'interphase phase organique/phase aqueuse. Un système avec une émulsion a alors été testé pour optimiser l'étape d'extraction du fructose avec différents acides boroniques substitués et l'Aliquat336<sup>®</sup>. Un ratio en fructose/BTMPBA(acide 3,5-bis(trifluorométhyl)phénylboronique)/Aliquat336<sup>®</sup> de 0,1/1/4 (concentration molaire) mène à 50% d'extraction après 35 minutes à 22°C.<sup>[122]</sup>

Le transport du fructose vers une phase réceptrice non aqueuse composée d'un liquide ionique a aussi été étudié.<sup>[123]</sup> Ce système a été combiné à l'isomérisation du glucose et la déshydratation du fructose. Après 4 étapes d'isomérisation et extraction le rendement d'isomérisation a été augmenté à 89% par déplacement de l'équilibre thermodynamique. Un résultat à nuancer par la nécessité d'ajouter une étape de purification afin d'extraire le fructose du liquide ionique.

#### I.4.5. Procédés catalytiques de conversion du glucose et de transport du fructose

Des procédés catalytiques de conversion du glucose en 5-HMF utilisant une étape de transport sélectif du fructose par un acide boronique ont été mis en œuvre. Nous pouvons citer celui de Palkovits et Delidovich et celui d'Alipour.<sup>[123],[113]</sup> Le procédé proposé par Alipour est détaillé dans la partie III.1. Le procédé envisagé par Palkovits et Delidovich propose une première isomérisation chimique du glucose en fructose *via* un tampon phosphate  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .<sup>[113]</sup> L'extraction du fructose est réalisée par un acide boronique vers une phase octan-1-ol contenant également l'Aliquat336<sup>®</sup>. Vient ensuite l'étape de déshydratation du fructose après le relargage de ce dernier en milieu aqueux acide (Figure 30).

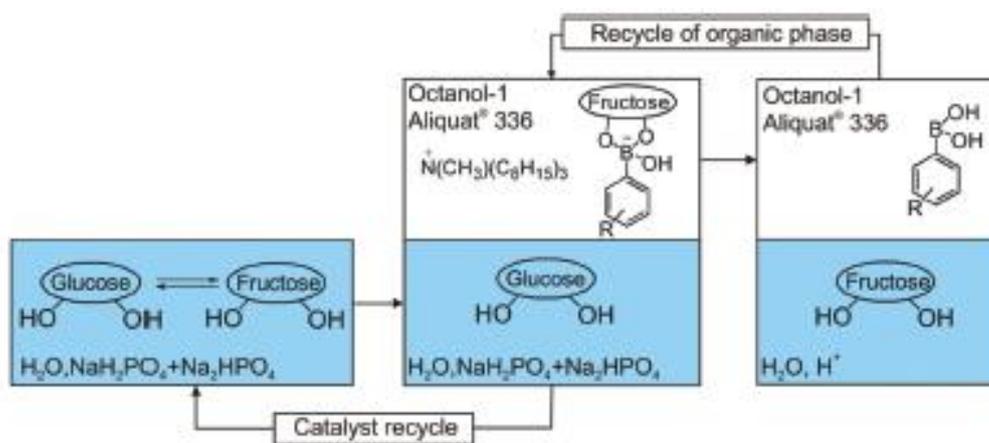


Figure 30. Conversion du glucose en fructose utilisant le principe d'extraction sélective du fructose par un acide boronique.<sup>[113]</sup>

La première étape de cette cascade consiste en l'isomérisation chimique du glucose à 100 °C durant 70 minutes à partir d'une solution de phosphate de sodium de pH = 7,5 à 10wt% en glucose. Une fois le milieu réactionnel refroidi, une première extraction du fructose est réalisée à l'aide d'une phase organique constitué de d'octanol contenant 0,4 M d'acide ortho-hydroxyméthylphénylboronique (HMPBA) et 0,4 M d'Aliquat336<sup>®</sup>. Cette étape d'extraction est répétée une deuxième fois. La conversion du glucose s'élève à 62% avec une sélectivité de 85%. Le rendement d'extraction du fructose s'élève à 51%. Le relargage est effectué vers une

phase aqueuse constituée d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 0,25 M à température ambiante. Le rendement de relargage est de 81% du fructose extrait après 1h d'expérience (contre 89% du glucose). Ce type de procédé est limité par sa mise en œuvre, principalement par le nombre de cycles d'extraction à réaliser et par les ajustements de concentrations en acide boronique à effectuer à chaque extraction afin de se placer dans les conditions optimales. La sélectivité de 85% de l'isomérisation montre une nouvelle fois les limitations de performance d'une isomérisation chimique comparativement à une isomérisation enzymatique.

#### I.5. Les procédés chémoenzymatiques en cascade pour l'obtention du 5-HMF

Les procédés de productions du 5-HMF en cascade utilisant la combinaison de l'isomérisation enzymatique du glucose et de la déshydratation chimique du fructose représente un premier pas vers un procédé intégré dit « hybride ».

Un procédé proposant le passage de la cellulose au 5-HMF a été développé.<sup>[124]</sup> La transformation du glucose en fructose est réalisée par une isomérase immobilisée sur de la silice mésoporeuse (isomérase- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -MSN) (MSN = Mesoporous Silica Nanoparticles) en phase aqueuse. La transformation du fructose en 5-HMF est réalisée en phase organique par un catalyseur acide : MSN- $\text{SO}_3\text{H}$ . Le rendement d'isomérisation est de 51% après 24h à 70°C à pH = 7,5. Le catalyseur enzymatique est habilement soutiré du milieu par aimantation. Du DMSO est ajouté à la phase aqueuse de façon à obtenir un mélange à 10% en volume d'eau afin d'augmenter le rendement de déshydratation. La catalyse est réalisée à 60°C durant 15 heures, donnant un rendement final en 5-HMF de 40%.<sup>[124]</sup>

Un second procédé, remarquable de par l'utilisation d'eau de mer, de production de 5-HMF en cascade est composé d'une première étape d'isomérisation du glucose en milieu aqueux (eau de mer concentrée). Une fois l'équilibre thermodynamique de la réaction atteint, l'enzyme est filtrée (Figure 31). La seconde étape consiste en l'ajout d'acide oxalique dans la phase aqueuse et la mise en place de la réaction de déshydratation du fructose dans un système biphasique avec le 2-méthyltétrahydrofurane permettant l'extraction *in situ* du 5-HMF. Le rendement en 5-HMF à partir du fructose est de 57% après 1 heure à 140°C et à pH 1. L'étape d'isomérisation étant limitée à un rendement de 50%, le rendement maximum en 5-HMF à partir du glucose est théoriquement de 28,5% par passe.<sup>[125]</sup>

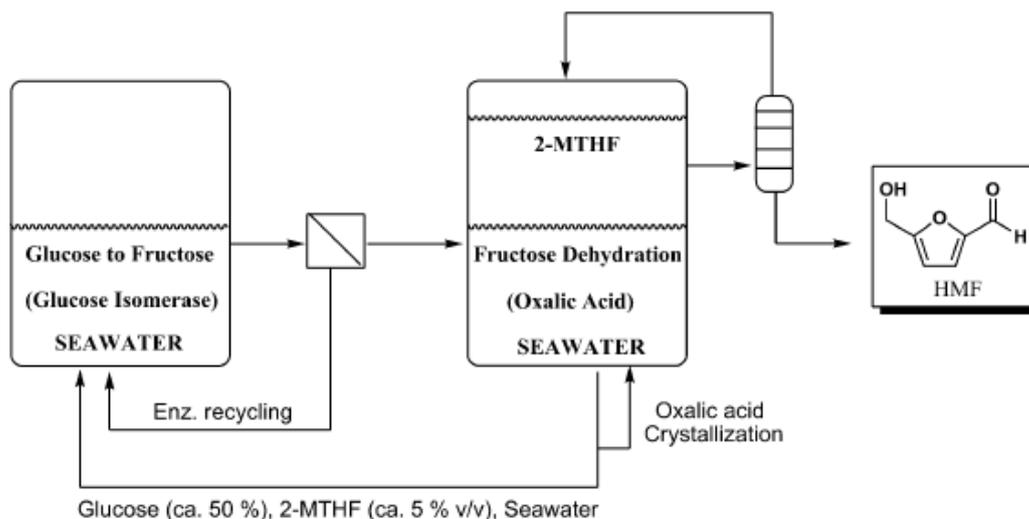


Figure 31. Concept proposé pour la production du 5-HMF à partir du glucose en utilisant de l'eau de mer.

Lors des études concernant la réaction d'isomérisation du glucose par voie enzymatique ou chimique en milieu aqueux, il a été mis en évidence que l'addition d'espèces borate permettait d'augmenter le rendement en fructose, grâce à la formation d'un complexe borate-fructose. C'est donc naturellement que cette approche a été exploitée lors de la mise en place de procédés de production du 5-HMF en cascade.

Huang *et al.* ont développé un procédé (Figure 32) qui consiste en une première étape d'isomérisation enzymatique du glucose par la glucose isomérase immobilisée (Sweetzyme® IT Extra) en présence de sodium tétraborate avec un ratio molaire glucose/tétraborate de 0,5/1. Après 8h à 70°C, 90% du glucose ont été convertis. Lors de la seconde étape de déshydratation du fructose en 5-HMF, l'enzyme est soutirée du milieu puis de l'acide chlorhydrique dilué est ajouté ainsi qu'une phase d'extraction au butan-1-ol afin d'extraire le 5-HMF formé. 63,3% de rendement en 5-HMF sont obtenus après 45 minutes à 463K.<sup>[126]</sup>

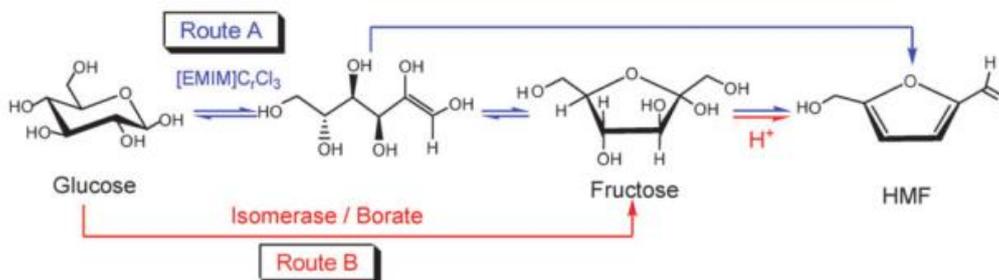


Figure 32. Schéma de la cascade chemoenzymatique pour la synthèse du 5-HMF.<sup>[126]</sup>

Récemment, Alipour *et al.* ont proposé une synthèse du 5-HMF à partir du glucose en 3 étapes (Figure 33). Une première étape d'isomérisation du glucose se fait simultanément à l'extraction du fructose dans une phase organique (octan-1-ol) assistée par l'acide naphthalène-2-boronique

après une étape de pré-isomérisation. Lors d'une seconde étape, le relargage du fructose s'effectue dans un liquide ionique ([EMIM]HSO<sub>4</sub>). La troisième étape consiste en la déshydratation du fructose dans le liquide ionique et l'extraction simultanée du 5-HMF dans une phase THF. Le rendement en 5-HMF obtenu à partir du glucose est de 80%.<sup>[123]</sup>

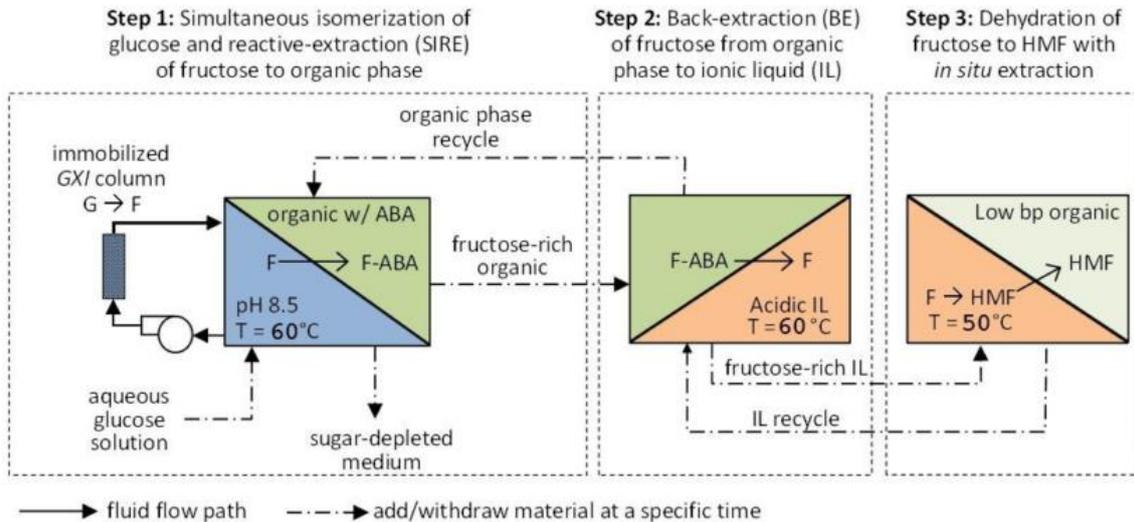


Figure 33. Schéma du procédé développé par Alipour et al. pour la conversion du glucose en 5-HMF.<sup>[123]</sup>

La mise en œuvre d'un tel procédé est rendue difficile par le nombre important d'étapes. En effet ce procédé comporte une étape de pré-isomérisation puis 4 étapes d'extraction et d'isomérisation simultanées puis une étape de relargage et enfin une étape de déshydratation simultanée à l'extraction du 5-HMF. Soit 7 étapes distinctes. Cette mise en œuvre en cascade permet de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction d'isomérisation (d'environ 35%) mais multiplie malheureusement le nombre d'étapes.

## I.6. Procédés hybrides

### I.6.1. Définition de la « catalyse hybride » dans le cadre de l'étude

L'objectif de cette partie est de montrer l'essor de la catalyse hybride et les stratégies mises en place pour faire fonctionner simultanément la catalyse chimique et la catalyse biologique. Les transformations décrites peuvent donc paraître éloignées du concept décrit dans la thèse, mais elles ont été une source de discussion et d'inspiration à la mise en place de notre système.

La finalité de la catalyse hybride est d'exploiter les avantages de chacune des catalyses afin d'accéder à de nouvelles transformations, non réalisables indépendamment ou alors à des transformations ayant montré de faibles rendements. Pour cela, un effet synergique et/ou complémentaire entre les réactions est recherché. Cet effet réside dans le fonctionnement simultané de catalyseurs chimique et enzymatique, tout en offrant les conditions optimales pour un fonctionnement efficace. L'association est alors nommée catalyse hybride et requiert une compatibilité réactionnelle totale. Dans le cadre de la thèse, nous nous placerons dans le cas d'un tandem dans un seul et même réacteur, nommé « one-pot » ou concurrent par Hartwig *et al.*<sup>[16]</sup>

Ces mises en œuvre en réacteur one-pot sont réalisées par différents moyens : utilisation d'un milieu biphasique, utilisation de membrane ...

Le défi majeur est la compatibilité de tous les substrats et de tous les catalyseurs avec une mise en œuvre dans les conditions optimales pour chacune des deux catalyses. Des solutions expérimentales et méthodologiques sont mises en place pour limiter les interactions croisées entre les systèmes catalytiques et les conditions réactionnelles.

#### I.6.2. Mises en œuvre de la catalyse hybride avec des problèmes de compatibilité des catalyseurs : résolution du verrou de compatibilité

Les problèmes de compatibilité entre une enzyme en solution et un catalyseur chimique ont été soulevés et des mises en œuvre originales tentent d'éliminer ces problèmes.

##### I.6.2.1. Utilisation d'un microorganisme pour supporter et isoler l'enzyme

Une première mise en œuvre d'un système hybride est proposée par Turner *et al.* et consiste en l'utilisation simultanée d'une monoamine oxygénase et de nanoparticules de palladium dans le but de catalyser l'hydrogénation sélective vers la formation d'une amine secondaire cyclique (Figure 34). Cependant, le catalyseur chimique d'hydrogénation (nanoparticules de palladium) produit un mélange équimolaire R et S. L'équipe de Turner a alors combiné la catalyse chimique avec une monoamine oxydase qui catalyse la déracémisation de l'amine secondaire cyclique de stéréochimie S vers la régénération du substrat MDQ (MéthylDihydroisoQuinoline). Ainsi le milieu est enrichi en isomère R. D'autre part, l'utilisation d'une cellule entière permet d'isoler l'enzyme du catalyseur chimique (Figure

34). Les catalyseurs opèrent alternativement grâce à des cycles air/hydrogène pour les faire fonctionner mais sont présents simultanément dans le milieu réactionnel. Sans cette mise en œuvre, la déracémisation est impossible.

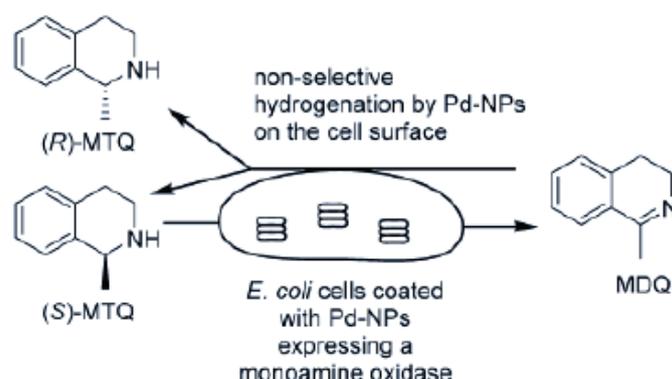


Figure 34. Mise en œuvre d'une catalyse hybride pour la déracémisation d'une amine secondaire.

Toutefois, l'utilisation de cellules entières ou microorganismes présente l'inconvénient d'apporter des contaminations dans le milieu dues à la présence de nutriments. Ainsi la catalyse hybride s'oriente vers l'utilisation des enzymes seules au lieu de la cellule entière.

#### I.6.2.2. Encapsulation du catalyseur chimique

Une seconde mise en œuvre consiste en la séparation physique du catalyseur chimique et du catalyseur enzymatique par encapsulation du catalyseur chimique. C'est le système proposé par Toste *et al.* avec l'encapsulation de complexes d'Au(I) et Ru(II) dans des clusters tétraédriques de  $\text{Ga}_4\text{L}_6$  combinée à des estérases, lipases et déshydrogénases (Figure 35).

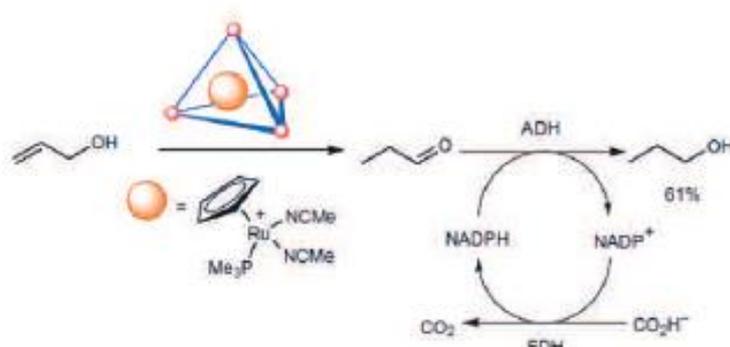


Figure 35. Synthèse hybride avec encapsulation du catalyseur métallique.

Les rendements sont identiques aux rendements obtenus par un procédé en cascade mais dans le cas de la synthèse hybride il n'est pas nécessaire d'avoir une étape de purification

intermédiaire.<sup>[127]</sup> La catalyse hybride a donc permis de réduire le nombre d'étape de la synthèse.

### I.6.3. Mise en œuvre de la catalyse hybride sans problème de compatibilité

#### I.6.3.1. Utilisation d'un catalyseur unique dit « hybride »

Une mise en œuvre de la catalyse hybride consiste en l'utilisation d'un unique catalyseur comportant les deux fonctions biocatalytique et chémocatalytique.

Un premier système présente un unique support sur lequel sont fixées deux fonctions catalytiques orthogonales. Un exemple est le développement de catalyseurs dit nanobiohybrides synthétisés par l'assemblage d'enzymes et de nanoparticules. Ces nanohybrides ont été mis en place par Palomo *et al.* pour réaliser une transestérification enzymatique et une racémisation métallique avec des catalyseurs CALB-PdNPs (Figure 36).<sup>[128]</sup> Dans le cas le plus favorable, une transformation quantitative est obtenue en 4h avec une pureté énantiomérique supérieure à 99%.

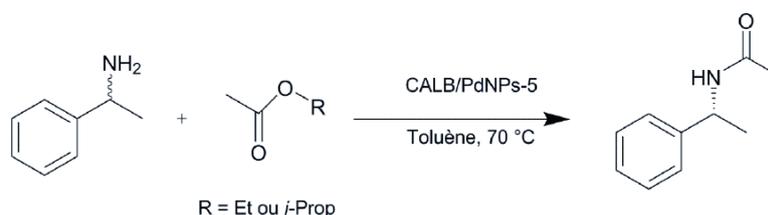


Figure 36. DKR d'une amine catalysée par nanobiohybride.<sup>[128]</sup>

Un second système présente l'incorporation de catalyseurs métalliques dans les protéines créant ainsi des métalloenzymes artificielles. Cette mise en œuvre est appliquée par Ward *et al.* dans le cadre de l'incorporation d'un complexe d'iridium biotinylé dans la streptavidine (Figure 37).

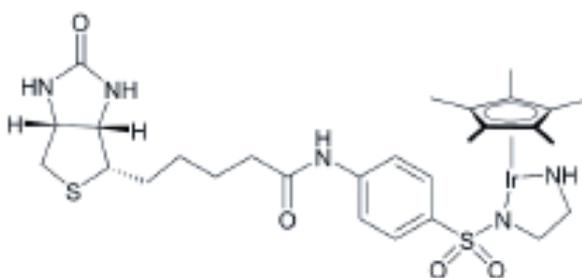


Figure 37. Complexe d'iridium biotinylé.<sup>[129]</sup>

Le couplage de ces catalyseurs métalliques avec des mono-oxydases ou mono-oxygénases donne des systèmes hybrides sélectifs.<sup>[129]</sup> Ce principe d'incorporation a permis de biocompatibiliser le complexe organométallique vis-à-vis des autres enzymes utilisées par rapport à son utilisation en tant que complexe libre.

### I.6.3.2. Exemple d'utilisation de catalyseurs compatibles

Mutti *et al.* ont développé un système hybride combinant des catalyseurs organométalliques et deux enzymes (alcool déshydrogénase ADH-A et formate déshydrogénase FDH). Dans le milieu réactionnel cohabitent deux enzymes, un complexe d'iridium et les 7 produits organiques (substrats et produits).<sup>[130]</sup> Les différentes étapes sont présentées Figure 38.

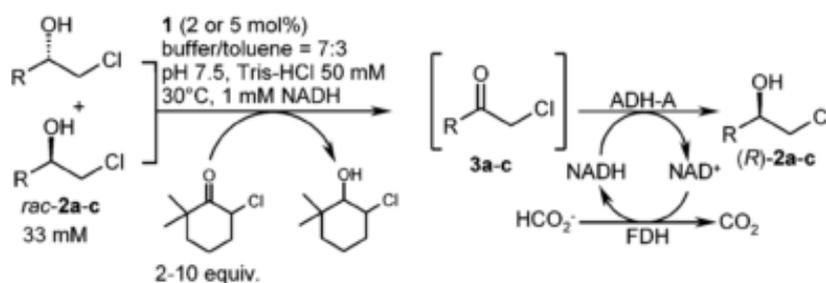


Figure 38. Système hybride pour la racémisation d'halohydrine.<sup>[130]</sup>

### I.6.4. Procédé hybride, la catalyse enzymatique au service de la catalyse chimique, régénération des cofacteurs

Deux grandes familles d'enzymes rédox peuvent être utilisées pour la valorisation de la biomasse : les oxydases et les alcools déshydrogénases.

- Les oxydases, utilisant majoritairement l'oxygène comme oxydant, conduisent à la formation de peroxyde d'hydrogène toxique pour l'enzyme. L'utilisation d'une catalase pour transformer ce dernier en eau et oxygène est utilisée pour assurer le fonctionnement de l'enzyme.
- Les alcools déshydrogénases sont dépendantes de cofacteurs NAD(H) ou NADP(H) qui nécessitent une régénération par une enzyme rédox. Ces systèmes enzymatiques de régénération représentent un coût et un frein au développement.

La catalyse hybride apparaît être une méthodologie attractive pour remplacer l'utilisation d'enzymes complémentaires coûteuses utilisées pour ces deux familles d'enzymes pour respectivement dégrader le peroxyde d'hydrogène formé et régénérer le cofacteur.

#### I.6.4.1. Système hybride permettant la régénération du NADH

Un exemple de régénération du NADH par un catalyseur organométallique lors de la réduction enzymatique d'une cétone est proposée par Stepnicka *et al.* en 2007 (Figure 39).<sup>[131]</sup>

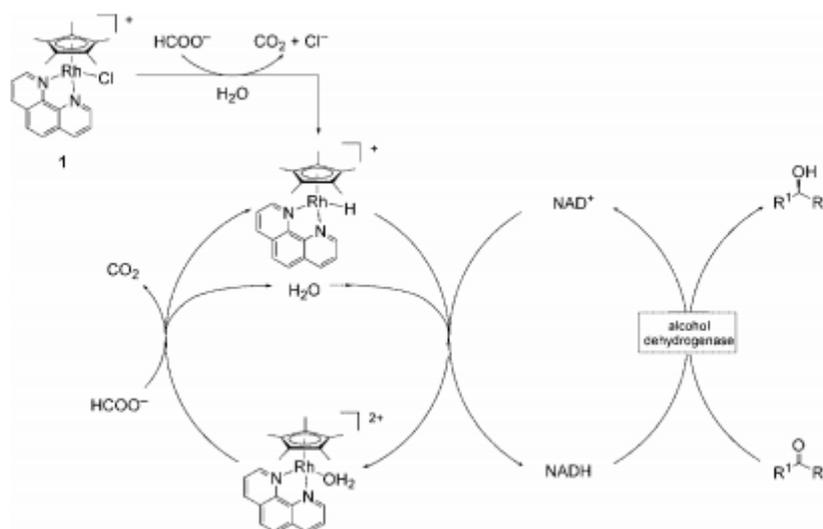


Figure 39. Système hybride pour la réduction d'une cétone.<sup>[131]</sup>

Les catalyseurs de rhodium, iridium et ruthénium utilisés comportent un ligand phénantroline. Les conditions utilisées sont celles de la réaction enzymatique, à savoir 38°C à pH 7. Les catalyseurs de rhodium et ruthénium montrent des conversions totales dans ces conditions. La catalyse hybride donne un rendement de la réaction enzymatique de 62%. Ce rendement est de 80% lors de la synthèse enzymatique en présence d'un excès de cofacteurs. Cependant les quantités de matières initiales montrent que le catalyseur organométallique a régénéré 20 fois le cofacteur. De plus il n'est pas noté d'inhibition de l'enzyme due au catalyseur chimique.

#### I.6.4.2. Système hybride permettant la régénération du NAD<sup>+</sup>

La mise en place d'une réaction d'oxydation enzymatique couplée à la régénération du NAD<sup>+</sup> par un catalyseur chimique est décrite par Gröger *et al.*<sup>[132]</sup> Le complexe utilisé est un complexe de porphyrine de fer sulfonée. Deux réactions enzymatiques sont testées, la

production d'acide gluconique à partir du glucose par la glucose déshydrogénase et la production de cyclo-octanone à partir de cyclo-octanol par une alcool déshydrogénase.

Un exemple récent d'utilisation d'un catalyseur organométallique pour la régénération du  $\text{NAD}^+$  produit lors d'une réaction enzymatique est proposé par *Dumeignil et al.* en 2017.<sup>[133]</sup> La proposition de l'étude est de synthétiser le fructose à partir de composés accessibles industriellement à haute pureté, comme le sorbitol obtenu par hydrogénation quantitative du glucose). Ces deux enzymes sont des alcools déshydrogénases et nécessitent donc la présence de cofacteurs. Le système hybride consiste en la réaction de la déshydrogénase avec le sorbitol et la régénération du  $\text{NAD}^+$  par un complexe organométallique à base d'iridium. Le système hybride avec le sorbitol est présenté Figure 40.

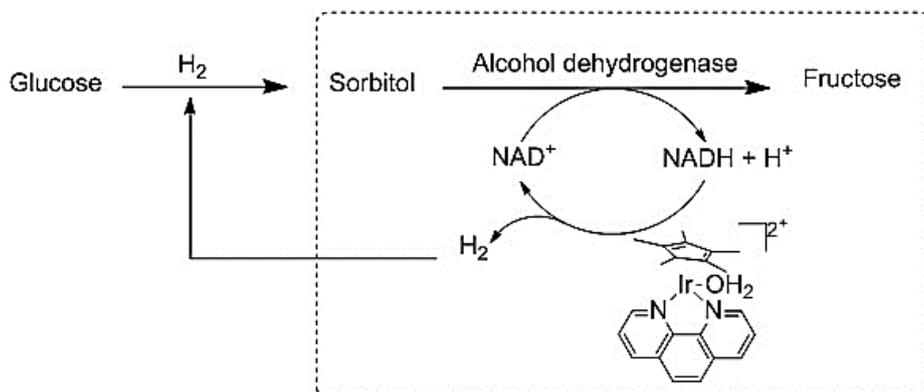


Figure 40. Systèmes hybride pour la formation de fructose.<sup>[133]</sup>

Expérimentalement, il a été montré que les deux catalyses pouvaient fonctionner simultanément. Cependant, il a été difficile de trouver des conditions idéales de pH pour un fonctionnement catalytique correct du complexe. Nous pourrions nous inspirer de ces travaux pour la gestion du pH car nous avons déjà identifié grâce à la littérature sur les acides boroniques que le pH sera un facteur déterminant du bon fonctionnement du système hybride dans sa globalité.

#### I.6.5. Mise en œuvre du concept de catalyse hybride pour l'obtention du 5-HMF

Le premier procédé de catalyse hybride pour la transformation du glucose en 5-HMF a été reporté par *Dumesic et al.* Il présente le couplage d'un catalyseur hétérogène acide et d'une glucose isomérase thermophile dans un milieu THF:H<sub>2</sub>O 4:1 (v:v). Bien que la réaction soit nommée en tandem, elle entre bien dans la catégorie des synthèses hybrides telles que nous les avons définies. Une silice mésoporeuse fonctionnalisée ( $\text{NH}_2$ -aminopropyl-FMS) est utilisée

pour immobiliser l'enzyme et la protéger. Le catalyseur de déshydratation du fructose est une silice mésoporeuse fonctionnalisée par des groupements acides de Bronsted ( $\text{SO}_3\text{H}$ ). Le rendement en fructose obtenu est de 61% et le rendement en 5-HMF de 30%. La température est dans un premier temps de 90°C durant 1h, permettant à la glucose isomérase de fonctionner puis la température est augmentée à 130°C durant 24h, permettant au catalyseur de déshydratation de fonctionner. Bien que la faisabilité d'un procédé hybride pour la production de 5-HMF par catalyse hybride soit démontrée, la réutilisation du système catalytique reste impossible de par la dénaturation de l'enzyme dans les conditions appliquées pour la déshydratation. Ainsi le verrou de la compatibilité des conditions de réaction n'est pas entièrement levé.

### I.7. Description du procédé mis en œuvre dans ce travail

Le procédé présenté dans la thèse vise à la production du 5-HMF à partir du glucose par catalyse hybride combinant une étape d'isomérisation enzymatique du glucose par la xylose isomérase et une étape de déshydratation chimique du fructose. Les verrous de ce projet ont été identifiés et sont les suivants :

- L'équilibre thermodynamique de l'isomérisation enzymatique du glucose qui s'établit et limite la production de fructose
- La compatibilité des conditions réactionnelles (pH et température) des deux catalyseurs

Afin de lever le verrou de l'équilibre thermodynamique et de le déplacer en faveur de la formation de fructose, nous avons choisi d'exploiter la capacité des acides boroniques à complexer sélectivement le fructose et l'extraire vers une phase organique. Cette phase organique en contact avec le milieu de déshydratation réalise une séparation physique entre le milieu d'isomérisation et le milieu de déshydratation, levant ainsi le second verrou identifié. Le verrou de compatibilité réactionnelle sera également levé par l'utilisation d'un réacteur adapté au procédé mis en place.

Le principe du transport du fructose ainsi que les différentes catalyses mises en jeu sont résumés sur le schéma suivant :

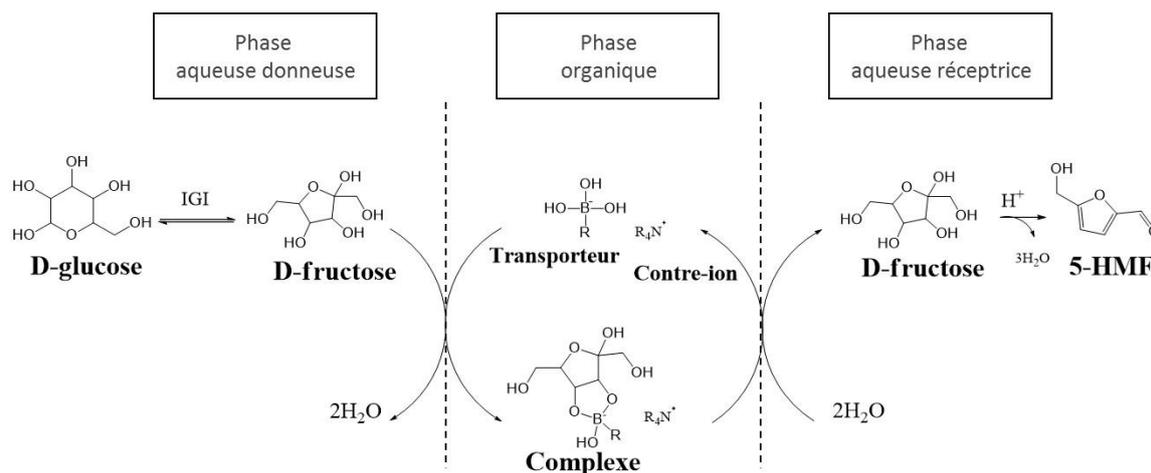


Figure 41. Principe de l'isomérisation enzymatique du D-glucose, du transport du D-fructose, et de la formation du 5-HMF.

Dans la phase aqueuse donneuse est réalisée la première étape d'isomérisation du D-Glucose en D-Fructose. Ce D-Fructose est complexé par le transporteur (T) (dérivé d'acide boronique) à l'interface entre la phase aqueuse donneuse et la phase organique formée par le 4-méthylpentan-2-one (MIBC pour MéthylIsoButylCétone). L'ester obtenu, chargé négativement sous forme borate, est soluble dans la phase organique et va former une paire d'ions avec l'ammonium quaternaire (coT) (Aliquat336<sup>®</sup>) présent dans la phase organique. A l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse réceptrice l'ester est hydrolysé et le D-Fructose est libéré. Dans cette phase aqueuse réceptrice le D-Fructose va subir une déshydratation afin d'obtenir le 5-HMF.

## Chapitre II. Matériel et méthodes

---

Ce chapitre présente les protocoles expérimentaux utilisés ainsi que les méthodes d'analyses et de calculs.

Les produits suivants, nécessaires à la réalisation des expériences de cette thèse, ont été achetés auprès de Sigma-Fluka, Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO) et Merck.

Produit	Abréviation	Pureté	Fournisseur
D-glucose	D-Glc	≥99,5%	Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO)
D-fructose	D-Fru	≥99%	
Chlorure de N-méthyl-N,N-dioctyl-1-octanaminium	Aliquat336®	-	
acide 3,4-dichlorophénylboronique	3,4-DCPBA	≥95%	
acide 3,5-dichlorophénylboronique	35-DCPBA	≥98%	
acide 2,4-dichlorophénylboronique	24-DCPBA	≥95%	
acide 2,3-dichlorophénylboronique	23-DCPBA	≥95%	
acide 4-tert-butylphénylboronique	4-TBPBA	≥95%	
acide 4-(trifluorométhyl)phénylboronique	4-TFMPBA	≥95%	
acide 2-(trifluorométhyl)phénylboronique	2-TFMPBA	≥95%	
acide 3-(trifluorométhyl)phénylboronique	3-TFMPBA	≥95%	
acide 4-(trifluorométhoxy)phénylboronique	4-TFMeOPBA	≥95%	
acide 3,5-bis(trifluorométhyl)phénylboronique	35-TFMPBA	≥95%	
acide 3-nitrophénylboronique	3-NPBA	≥98%	
acide 2(N,N-diméthylaminométhyl)phénylboronique	2-NNMPBA	-	
acide 4-méthyl-2-(1H-pyrazol-1-yl)phénylboronique	4-M21HPBA	-	
acide 2-(tétrazol-5-yl)phénylboronique	2-T5PBA	≥95%	
acide 3-(2-carboxyéthyl)phénylboronique	32-CarboPBA	-	
acide 4-bromo-1-naphtalèneboronique	4-B1nPBA	≥95%	
Trizma® base	Tris	≥99,9%	
acide chlorhydrique	HCl	36,8-38%	
acide sulfurique	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	95-97%	
Sweetzyme®IT Extra (≥350 U/g)	IGI	-	
Dowex monosphere 650C	Dowex650	-	
acide lévulinique	LA	98%	
acide formique	FA	95%	
citrate de sodium	-	≥99%	
5-hydroxyméthylfurfural	5-HMF	99%	
acide phénylboronique	PBA	95%	Sigma- Fluka
4-méthyl-2-pentanone	MIBC	≥99%	
méthyl-tert-amyl-éther	TAME	97%	
5-méthyl-2-héxanone	5M2H	99%	
acide citrique	-	≥99%	Merck

L'eau utilisée pour la préparation de toutes les solutions a été obtenue d'un système de purification MilliQ Water (Millipore, Academic, SA, France).

### II.1. Mise en place des méthodologies expérimentales

Les expériences sont menées dans un but de rationalisation et de systématisation pour définir des conditions et protocoles expérimentaux nécessaires à l'étude de chaque étape du procédé. Les résultats de cette étude sont présentés dans le chapitre III.

### II.1.1. Méthodologie pour l'étude de l'isomérisation enzymatique du glucose

La réaction d'isomérisation est étudiée soit en tubes Eppendorf de 1,5 mL soit en réacteur, aux dimensions différentes. Il convient donc de définir les méthodologies adoptées dans chacun des deux cas.

Avant son utilisation, la glucose isomérase Sweetzyme®IT Extra (IGI) est réhydratée durant 12h à 5°C dans un volume d'eau distillée suffisant pour l'immerger entièrement. Après centrifugation l'enzyme est récupérée.

#### II.1.1.1. Réactions en Eppendorf

La réaction d'isomérisation enzymatique du glucose réalisée en Eppendorf a été étudiée dans les conditions définies selon le protocole suivant :

Une solution initiale de glucose est préparée par dissolution de D-glucose (Tableau 4), Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (8 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM) dans 1 mL de tampon (Tableau 4). Dans un premier tube Eppendorf (1,5 mL) est introduit 1 mL de cette solution initiale.

Ce tube est ensuite incubé (température : Tableau 4) dans un agitateur orbitalaire thermostaté (Mixing Block, BIOER Thermocell) agité à 900 rpm.

Dans un second tube Eppendorf sont introduits 10 mg d'IGI ainsi que 1 mL de tampon (identique à celui introduit dans le premier tube contenant la solution de glucose). Après 10 minutes d'incubation, le tampon est soutiré du tube 2 contenant l'enzyme par pipetage puis remplacé par les 1 mL de solution de D-glucose du tube 1. L'incubation est reprise à la température donnée, à 900 rpm durant 90 minutes.

Afin de mesurer l'activité de l'enzyme, 20 µL de solution sont prélevés et analysés toutes les 10 minutes par HPLC après une dilution de l'échantillon (de 4 à 50 par une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM) pour être dans la gamme d'analyse de la colonne utilisée.

Dans le Tableau 4, les conditions expérimentales et concentrations sont exprimées pour les différentes séries d'expériences.

Conditions:	Expérience A	Expérience B	Expérience C
Paramètre variable	T (°C): 50; 60; 70; 80; 90	pH: 4,5; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9	Rapport $m_{IGI}/m_{D-Glc}$ : 20/18 ; 10/18 ; 5/18 ; 2,5/18 ; 1,7/18 ; 1,25/18 ; 1/18
Paramètres fixés	pH = 7,5 $m_{IGI}/m_{D-Glc} = 10/18$ [D-Glc] <sub>i</sub> (mM) = 100	T = 70 °C $m_{IGI}/m_{D-Glc} = 10/18$ [D-Glc] <sub>i</sub> (mM) = 100	T = 70 °C pH = 8,5 $m_{IGI} = 10$ mg

Tableau 4. Conditions expérimentales pour les expériences de recherche de la température optimale (A), du pH optimal (B) et du rapport Enzyme/glucose (C) de la réaction d'isomérisation du glucose.

### II.1.1.2. Réactions en réacteur

La réaction enzymatique est conduite dans un réacteur de 250 mL à double enveloppe (Reactor-Ready™ Lab Reactor, Radley) équipé d'un système de contrôle de température (Ministat, Huber temperature control system, HUBER, UK).

Dans ce réacteur sont introduits 100 mL de solution de D-glucose. La dite solution est préparée par dissolution de D-glucose (100 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (8 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM) dans 100 mL de tampon Tris-HCl (100 mM, pH = 8,5). La température est contrôlée à 70°C. Après 15 minutes, le réacteur rotatif (panier) contenant 500 mg d'IGI est introduit dans la phase aqueuse. L'agitation est fixée à 200 rpm et la température à 70°C durant 120 minutes.

Afin de mesurer l'activité de l'enzyme, 20 µL de solution sont prélevés et analysés toutes les 10 minutes par HPLC après une dilution (de 5 par une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM) de l'échantillon pour être dans la gamme d'analyse de la colonne utilisée.

### II.1.2. Méthodologie pour l'étude du transport du fructose en Eppendorf

L'approche pratique des expériences pour caractériser le transport du fructose (extraction du fructose et relargage) est présentée Figure 42.

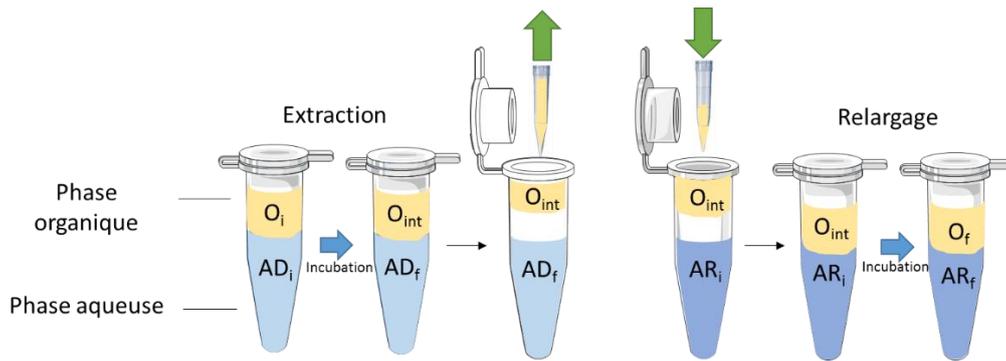
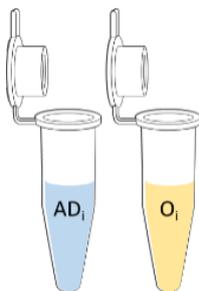


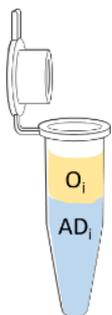
Figure 42. Schéma du protocole d'extraction et de relargage de monosaccharides

### II.1.2.1. Extraction des monosaccharides

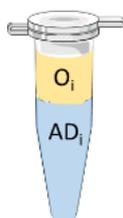
D'un point de vue pratique, le protocole général pour les réactions d'extraction du fructose et du glucose réalisées en Eppendorf, est standardisé comme tel :



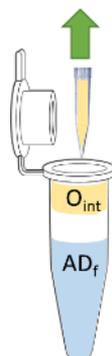
600  $\mu$ L d'une solution de monosaccharides tamponnée à pH = 8,5 par du Tris-HCl (100 mM) sont introduits dans un tube Eppendorf (phase AD<sub>i</sub>). La phase organique initiale est obtenue par dissolution d'Aliquat336<sup>®</sup> et d'acide arylboronique dans le solvant organique. 600  $\mu$ l de cette solution sont introduits dans un second tube Eppendorf (phase O<sub>i</sub>). Les phases AD<sub>i</sub> et O<sub>i</sub> sont incubées à la température donnée pendant 5 minutes à 750 rpm dans un agitateur orbitaire thermostaté (Mixing Block, BIOER Thermocell).



Ensuite, les deux solutions sont réunies dans le tube contenant O<sub>i</sub>.



Le tube Eppendorf est incubé dans les mêmes conditions durant 90 minutes. 20  $\mu$ L de solution aqueuse sont prélevés et analysés toutes les 15 minutes par HPLC après une dilution de l'échantillon (de 5 par une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM) pour être dans la gamme d'analyse.



Une fois la réaction d'extraction terminée, la phase organique surnageante (phase O<sub>int</sub>) est prélevée par pipetage.

Dans le Tableau 5, les conditions expérimentales et concentrations sont exprimées pour les différentes séries d'expériences réalisées.

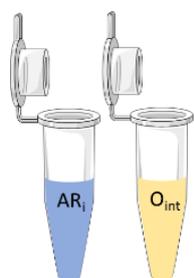
Conditions	Paramètres variables	Paramètres fixes
Expérience A	Nature de l'acide boronique	T=70°C, [D-Fru]=100 mM, [acide boronique]=100 mM, [Aliquat336®]=200 mM, solvant organique: MIBC
Expérience B	Nature de l'acide boronique	T=70°C, [D-Fru]=100 mM, [D-Glc]=100 mM, [acide boronique]=100 mM, [Aliquat336®]=200 mM, solvant organique: MIBC
Expérience C	Nature du solvant organique : MIBC, TAME, 5M2H	T=70°C, [D-Fru]=100 mM, [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336®]=200 mM,
Expérience D	Volume de MIBC (mL): 0 ; 0,5	T=70°C, [D-Glc]=100 mM, [Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ]=8 mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=20 mM, V <sub>Tris-HCl pH8,5, 100 mM</sub> =1 mL, m <sub>IGI</sub> =15 mg
Expérience E	[Aliquat336®] (mM) : 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400	T=70°C, [D-Fru]=100 mM, [3,4-DCPBA]=100 mM, solvant organique: MIBC
Expérience F	[D-Fru] (mM) : 25 ; 50 ; 100 ; 200 ; 300 ; 400 ; 500 ; 600 ; 1000	T=70°C, [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336®]=200 mM, solvant organique: MIBC
Expérience G	« [D-Fru]/[3,4- DCPBA]/[Aliquat336®] » (mM) : 100/100/200 ; 200/200/400 ; 300/300/600	T=70°C, solvant organique: MIBC
Expérience H	T (°C): 25 ; 50 ; 70	[D-Fru]=100 mM, [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336®]=200 mM, solvant organique: MIBC

Tableau 5. Conditions expérimentales des expériences de recherche des conditions optimales d'extraction du fructose.

### II.1.2.2. Relargage du fructose

Au préalable une réaction d'extraction dans les conditions optimales est réalisée avec un volume de phase aqueuse donneuse initiale formée par 50 mL de tampon Tris-HCl (100 mM, pH 8,5) contenant initialement 100 mM de fructose et une phase organique initiale formée par 50 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336®. Le tout est thermostaté à 70 °C durant 90 minutes sous une agitation de 200 rpm. A la suite de cette expérience, la phase organique intermédiaire MIBC (phase O<sub>int</sub>) est obtenue.

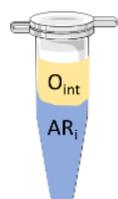
Le protocole général pour les réactions de relargage du fructose réalisées en Eppendorf est donné ci-dessous :



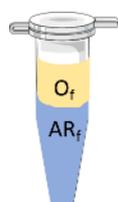
600  $\mu$ L de phase aqueuse réceptrice tamponnée (de concentration 100 mM) (phase aqueuse réceptrice initiale, AR<sub>i</sub>) sont introduits dans un Eppendorf. 600  $\mu$ L de phase organique O<sub>int</sub> sont introduits dans un second Eppendorf. Les tubes sont incubés à 70 °C pendant 5 minutes à 750 rpm dans un agitateur orbitalaire thermostaté (Mixing Block, BIOER Thermocell).



Ensuite, les deux solutions sont réunies dans le tube contenant la phase aqueuse réceptrice (phase AR<sub>i</sub>).



L'incubation est reprise à 70°C, 750 rpm durant 60 minutes. 20  $\mu$ L de solution aqueuse sont prélevés et analysés toutes les 15 minutes par HPLC après une dilution de l'échantillon (de 2 par une solution de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM) pour être dans la gamme d'analyse.



Une fois la réaction de relargage terminée, les deux phases (O<sub>f</sub> et AR<sub>f</sub>) sont séparées par pipetage.

Dans le Tableau 6, les conditions expérimentales et concentrations sont exprimées pour les différentes séries d'expériences réalisées.

Conditions	Expérience A	Expérience B	Expérience C	Expérience D
pH de la phase aqueuse réceptrice	1	3	5	8
Nature du tampon	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 25 mM	Citrate de sodium 100 mM	Citrate de sodium 100 mM	Tris-HCl 100 mM

Tableau 6. Constitution de la phase aqueuse réceptrice utilisée pour les expériences de relargage.

## II.1.3. Déshydratation du fructose

Des résines acides sont utilisées pour la déshydratation du fructose. Ces résines sont des résines échangeuses d'ions portant des groupements sulfoniques et sont utilisées comme des catalyseurs acides. Cinq résines différentes sont utilisées : la Dowex® Monosphere® 650C, l'Ambertlite® IR120, la Dowex® 50wx8, l'Amberlyst® 15H et la Rink Acide Resin. Les spécificités de chaque résine sont données dans le Tableau 7.

Résine	Propriétés	Température limite d'utilisation	Groupe ment actif	Humidité	Matrice	Taille particules
Dowex®650C		150°C	Acide sulfonique	46-51%	styrene-divinylbenzene (gel)	600-700 µm
Ambertlite®IR120		121°C	Acide sulfonique	53-58%	styrene-divinylbenzene (gel)	620-830 µm
Dowex®50wx8		130 °C	Acide sulfonique	50-58%	styrene-divinylbenzene (gel)	100-200 mesh
Amberlyst®15H		120°C	Acide sulfonique	≤1,6%	styrene-divinylbenzene (macroréticulé)	<300 µm
Rink Acid Resin		-	Acide sulfonique	-	-	100-200 mesh

Tableau 7. Propriétés des résines utilisées.

Prétraitement des résines :

Avant leur utilisation, les résines sont lavées avec 4 fois leur volume en eau, suivi par un lavage avec 2 volumes d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M puis placées durant 24h dans de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 M à température ambiante.

Préparation de la solution de fructose :

Deux solutions de fructose (500 mM) sont préparées par dissolution de la quantité requise de fructose dans de l'eau MiliQ d'une part et dans une solution de tampon citrate de sodium à 500 mM de pH = 3 d'autre part.

Expérience type :

100 mL de la solution de D-fructose sont introduits dans le réacteur contenant la masse de résine nécessaire (Tableau 8) préalablement rincée et prétraitée. Le milieu réactionnel est alors chauffé

à la température requise (Tableau 8) avec une agitation de 200 rpm. Un prélèvement de 500  $\mu\text{L}$  de solution est effectué après 30 minutes de réaction, 1h, 2h, 3h, 5h et 7h30 puis analysé par HPLC après une dilution de l'échantillon (de 20 par une solution de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  à 5 mM) pour être dans la gamme d'analyse permettant une réponse linéaire entre l'aire sous le pic et la concentration en produit. Dans le Tableau 8, les conditions expérimentales et concentrations sont exprimées pour les différentes séries d'expériences.

Conditions:	Expérience A	Expérience B	Expérience C
Paramètre variable	T ( $^{\circ}\text{C}$ ): 70 ; 80 ; 90	$n_{\text{H}^+}/n_{\text{Fru}}$ : 1 ; 2 ; 3	pH : 3 ; 6,7
Paramètres fixés	Solvant : $\text{H}_2\text{O}$ $V_{\text{H}_2\text{O}}=100 \text{ mL}$ $n_{\text{H}^+}/n_{\text{Fru}}=3$ $[\text{D-Fru}]_i=0,5 \text{ M}$	Solvant : $\text{H}_2\text{O}$ $V_{\text{H}_2\text{O}}=100 \text{ mL}$ T= $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ $[\text{D-Fru}]_i=0,5 \text{ M}$	T= $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ V= $100 \text{ mL}$ $n_{\text{H}^+}/n_{\text{Fru}}=3$ $[\text{D-Fru}]_i=0,5 \text{ M}$

Tableau 8 Conditions expérimentales pour les expériences de recherche de la température optimale (A), du rapport massique m<sub>résine</sub>/m<sub>fructose</sub> (B) et du pH optimal (C) de la réaction de déshydratation du fructose.

Calcul de la masse de résine à introduire, du nombre de meq à introduire :

La masse de résine à introduire est calculée en fonction du nombre de  $\text{H}^+$  à introduire pour réaliser la réaction de déshydratation du fructose. Ce nombre de  $\text{H}^+$  est représenté par le nombre de sites acides sur la résine.

Le nombre de moles de fructose présent dans le milieu réactionnel est calculé comme suit :

$$n(\text{Fru}) = C \times V = X \text{ mol soit } X \times 10^3 \text{ mmol ce qui correspond à } X \times 10^3 \text{ meq.}$$

Pour introduire le nombre de meq souhaité de résine, les données fournisseurs des résines sont récapitulées dans le Tableau 9.

Résine	meq/mL	meq/g
Dowex <sup>®</sup> 650C	2	3
Ambertlite <sup>®</sup> IR120	1,8	2,25
Dowex <sup>®</sup> 50wx8	1,7	2,12
Amberlyst <sup>®</sup> 15H	1,7	7,7
Rink Acide Resin	-	0.7

Tableau 9 Nombre de meq pour chaque résine par gramme et par ml.

## II.2. Protocoles pour les expériences en réacteurs

Les expériences réalisées dans le cadre de la mise en œuvre en cascade ont été réalisées dans un réacteur thermostaté Radley™. Les expériences dans le cadre d'une mise en œuvre, avec ou sans catalyse, ont été réalisées dans un réacteur coaxial et un réacteur en H.

### II.2.1. Procédé en cascade

Dans cette partie ne sont exposés que les méthodologies et paramètres expérimentaux pour l'étude de la réaction de la transformation du glucose en 5-HMF au travers d'un système de réactions en cascade. Les résultats catalytiques obtenus sont présentés dans le chapitre IV.

#### II.2.1.1. Description du réacteur Radley™ utilisé

Un réacteur de 250 mL à double enveloppe (Reactor-Ready™ Lab Reactor, Radley) équipé d'un système de contrôle de température (Ministat, Huber temperature control system, HUBER, UK) est utilisé dans les expériences de réactions en cascade.

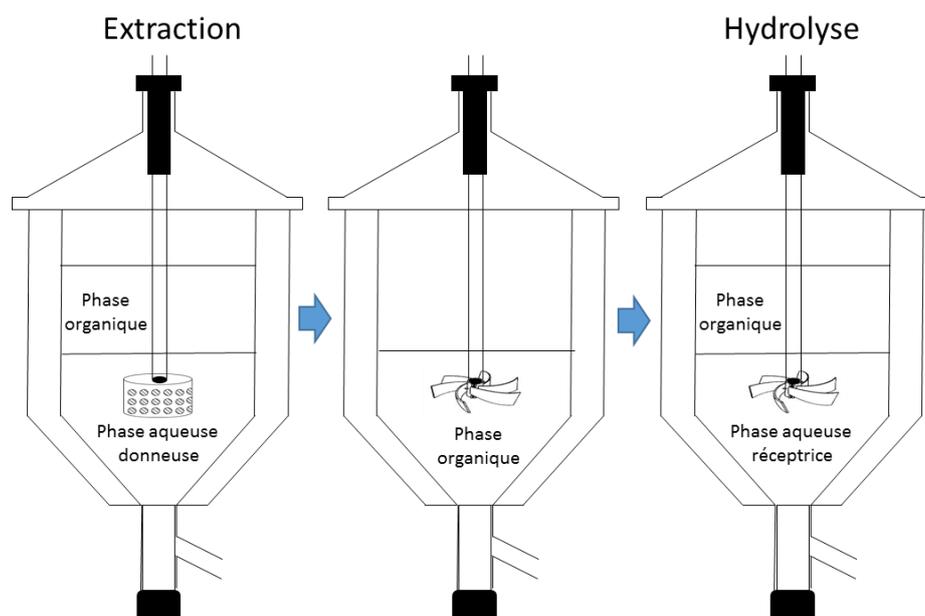


Figure 43. Schéma du protocole de réaction en cascade dans le réacteur Radley™.

Le panier d'agitation utilisé est un réacteur à lit rotatif en acier inoxydable fourni par SpinChem® dont les mesures sont données Figure 44.



Figure 44. Illustration et dimensions du panier d'agitation.

Ce panier permet d'y introduire l'enzyme immobilisée. Il est ensuite plongé dans la phase aqueuse donneuse (milieu dans lequel a lieu l'isomérisation) ainsi, le contact direct entre l'enzyme et le solvant organique est minimisé, prévenant l'inhibition de l'enzyme résultant d'un contact prolongé, il sera nommé réacteur rotatif dans la suite de ce travail.

La pale d'agitation utilisée est fournie par Radley®. Elle est en polytétrafluoroéthylène (PTFE) et les dimensions sont données Figure 45.

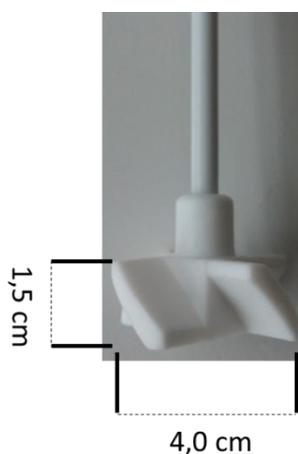


Figure 45. Illustration et dimensions de la pale d'agitation utilisée dans le réacteur en H.

## II.2.1.2. Méthodologies expérimentales des réactions en cascades

### II.2.1.2.1. Isomérisation et extraction simultanées

La phase aqueuse donneuse est formée par 100 mL de solution de D-Glucose (100 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM) dissouts dans du tampon Tris-HCl (100 mM, pH = 8,5). Le système est chauffé à 70°C durant 15 minutes puis 0,5 g d'IGI sont placés dans le réacteur rotatif puis plongés dans la phase aqueuse donneuse. Ensuite, 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336® sont introduits dans le réacteur. Le milieu réactionnel biphasique est agité à 200 rpm et thermostaté à 70°C durant 180 minutes. Un échantillon de 200 µL est prélevé toutes les 15 minutes. La concentration en monosaccharides est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

#### II.2.1.2.2. Etude du déplacement de l'équilibre thermodynamique

Deux mises en œuvre sont réalisées, une monophasique et l'autre biphasique.

La mise en œuvre monophasique est constituée d'une phase aqueuse formée par 100 mL de solution de D-glucose (100 mM), Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (8 mM), MgCl<sub>2</sub> (20 mM) dissouts dans du tampon Tris-HCl (100 mM, pH = 8,5). Le système est chauffé à 70 °C durant 15 minutes puis 0,5g d'IGI sont placés dans le réacteur rotatif puis plongés dans la phase aqueuse donneuse. Le milieu réactionnel est agité à 200 rpm et thermostaté à 70 °C durant 90 minutes. Un échantillon de 200 µL est prélevé toutes les 15 minutes. La concentration en monosaccharides est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

La mise en œuvre biphasique est identique à celle de l'expérience d'isomérisation et d'extraction simultanées. Le milieu réactionnel est agité à 200 rpm et thermostaté à 70 °C durant 90 minutes. Un échantillon de 200 µL est prélevé toutes les 15 minutes. La concentration en monosaccharides est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

Les expériences témoins relatives aux deux mises en œuvre monophasique et biphasique sont réalisées sans IGI et sans le couple 3,4-DCPBA/Aliquat336® respectivement.

#### II.2.1.2.3. Transfert et relargage du D-fructose

100 ml de phase organique issue de la réaction d'extraction et d'isomérisation simultanées sont chauffés à 70 °C. Ensuite, la phase aqueuse réceptrice composée de 100 mL de tampon citrate de sodium (100 mM, pH = 3) est introduite. Le milieu réactionnel biphasique est agité à 200 rpm à l'aide d'une pale d'agitation et thermostaté à 70 °C durant 180 minutes. Un échantillon

de 200  $\mu\text{L}$  est prélevé toutes les 20 minutes. La concentration en monosaccharides est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

#### II.2.1.2.4. Déshydratation du D-fructose

La phase aqueuse réceptrice issue de l'étape de relargage (100 mL) est placée dans le réacteur ainsi que 3,7 g de Dowex<sup>®</sup>Monosphere<sup>®</sup>650C. Le milieu réactionnel est agité à 200 rpm et thermostaté à 80 °C. Des échantillons de 200  $\mu\text{L}$  sont prélevés pendant 40 heures. La concentration en réactifs et produits est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

### II.2.2. Procédé hybride, réacteur coaxial

Les expériences font référence à l'étude du procédé couplé dans le réacteur coaxial dont les résultats sont présentés chapitre IV.

#### II.2.2.1. Description du réacteur utilisé

Le réacteur utilisé est nommé réacteur « coaxial » dont les dimensions sont détaillées dans le chapitre IV. La Figure 46 illustre la répartition des différentes phases liquides au sein du réacteur.

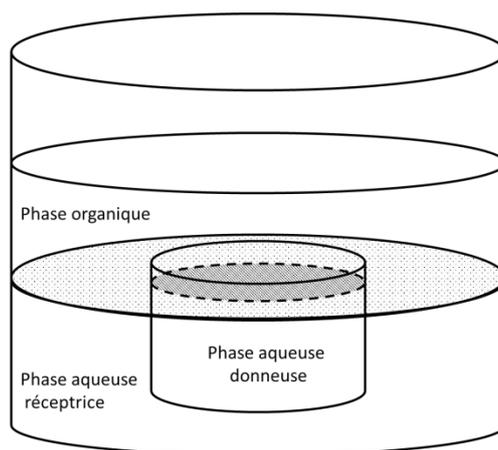


Figure 46. Schéma illustrant la répartition des phases dans le réacteur coaxial

#### II.2.2.2. Méthodologies expérimentales

##### II.2.2.2.1. Expérience de catalyse hybride

La phase aqueuse donneuse est formée par 50 mL de Tris-HCl (100 mM, pH = 8,5) contenant 100 mM de D-fructose, 20 mM de MgCl<sub>2</sub> et 8 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La phase aqueuse réceptrice est formée par 55 mL de tampon citrate de sodium (100 mM, pH = 3). Les phases aqueuses sont introduites dans le réacteur et chauffées à 70°C durant 15 minutes. Ensuite, 200 mg d'IGI sont introduits dans la phase aqueuse donneuse puis la phase organique constituée de 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> introduite dans le réacteur. Le tout maintenu à 70°C durant 35 h. L'agitation est effectuée à 180 rpm à l'aide d'une pale d'agitation plongée dans la phase organique. La concentration en monosaccharides est mesurée par HPLC après dilution des échantillons des phases aqueuses obtenues après 35h d'expérience.

#### II.2.2.2. Expérience de transport du fructose

La phase aqueuse donneuse est formée par 50 mL de Tris-HCl (100 mM, pH = 8,5) contenant 100 mM de D-fructose. La phase aqueuse réceptrice est formée par 55 mL de tampon citrate de sodium (100 mM, pH = 3). Les phases aqueuses sont introduites dans le réacteur et chauffées à 70°C durant 15 minutes. Ensuite, la phase organique constituée de 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> est introduite dans le réacteur. Le tout maintenu à 70°C durant 7 h. L'agitation est effectuée à 180 rpm à l'aide d'une pale d'agitation plongée dans la phase organique. Des prélèvements des différentes phases aqueuses sont effectués toutes les heures. La concentration en monosaccharides est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

### II.2.3. Catalyse hybride dans le réacteur en H

Les expériences font référence à l'étude du procédé couplé dans le réacteur en H dont les résultats sont présentés chapitre V.

#### II.2.3.1. Description du réacteur utilisé

Le réacteur utilisé est nommé réacteur « en H » dont les spécificités sont détaillées dans le chapitre V. La Figure 47 illustre la répartition des différentes phases liquides au sein du réacteur.

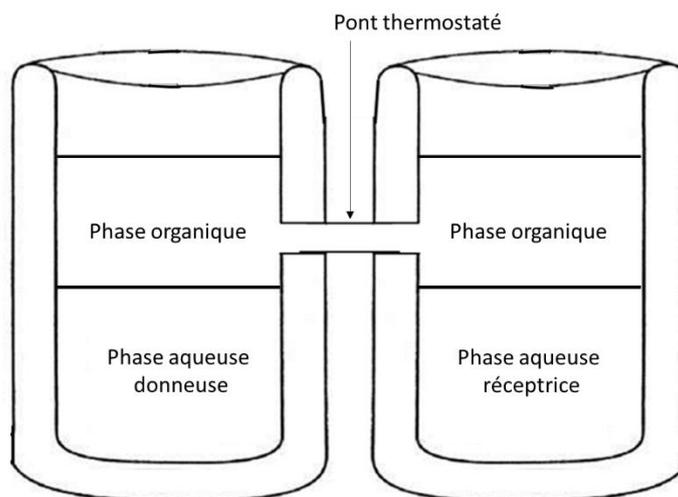


Figure 47. Schéma illustrant la répartition des phases dans le réacteur en H.

### II.2.3.2. Méthodologies expérimentales

#### II.2.3.2.1. Etudes colorimétriques

Le réacteur en H est utilisé dans sa forme complète, c'est-à-dire avec le pont thermostaté. 700 mL d'eau déminéralisée sont introduits dans le réacteur. Les volumes X1 et X2 de colorants (Tableau 10) sont introduits dans les compartiments. L'agitation est réalisée par un agitateur magnétique introduit sous chaque compartiment durant 8h. Un prélèvement de 1 mL est effectué dans chacun des compartiments et l'absorbance des échantillons est mesurée à 425 et 530 nm.

Dans le Tableau 10, les conditions expérimentales et concentrations sont exprimées pour les différentes séries d'expériences.

Conditions	Expérience C1	Expérience C2	Expérience C3
Compartiment D (Donneur)	300 $\mu$ L colorant 1	300 $\mu$ L colorant 1	300 $\mu$ L colorant 1
Compartiment R (Récepteur)	-	300 $\mu$ L colorant 2	300 $\mu$ L colorant 2
Configuration du pont	Avec réfrigérant	Sans réfrigérant	Sans réfrigérant Avec système de contre-pale

Tableau 10. Conditions expérimentales pour les expériences colorimétriques C1, C2 et C3.

Les caractéristiques des colorants sont exprimées dans le Tableau 11.

	Type	Chromophore	Formule brute	Masse molaire (g/mol)
Colorant 1	E122 (rouge Vahiné)	Azorubine	$C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$	502,4
Colorant 2	E102 (jaune Vahiné)	Tartrazine	$C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$	534,4

Tableau 11. Caractéristiques des colorants utilisés.

#### II.2.3.2.2. Expérience de transport de fructose

La solution aqueuse donneuse en fructose est formée par du tampon Tris-HCl de concentration et pH donné, dans lequel est introduit une quantité donnée de D-fructose. La phase aqueuse donneuse est introduite dans le compartiment D. La solution aqueuse réceptrice est formée par un volume de tampon citrate de sodium de concentration et pH donné. La phase aqueuse réceptrice est introduite dans le compartiment R. La température de l'ensemble du réacteur est portée à 70°C. Après 15 minutes, la phase organique constituée par un volume de MIBC contenant une concentration donnée de 3,4-DCPBA et d'Aliquat336<sup>®</sup> est introduit dans le réacteur. La température de l'ensemble du réacteur est maintenue à 70 °C. Les pales d'agitation plongeant dans les phases aqueuses sont fixées à des vitesses données.

Les paramètres expérimentaux sont donnés dans les Tableau 12, Tableau 13, Tableau 14.

Expérience	Compartment D				
	[tampon] (mM)	V (mL)	pH <sub>i</sub>	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	Agitation (rpm)
A	100	175	8,5	100	200
B	100	175	8,5	100	200
D	100	175	8,5	100	200
E	100	200	9,2	100	200
F1	100	200	7,5	100	200
F2	100	200	8,9	100	200
G1	100	200	9,0	100	200
G2	300	200	8,7	100	200
G3	500	200	8,8	100	200
H	300	200	8,8	-	200
I1	300	200	8,8	100	100
I2	300	200	8,8	100	198
I3	300	200	8,8	100	300
J	300	200	8,8	100	280
K1, K2, K3	300	200	8,8	100	280

Tableau 12. Conditions expérimentales des expériences de transport du fructose dans le réacteur en H pour le compartiment D.

Expérience	Phase organique			Configuration du pont	
	V (mL)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)	Présence du réfrigérant	Présence de la contre-pale
A	200	100	200	oui	non
B	75	100	200	compartiments non reliés	non
E	200	-	-	non	oui
D, G1, G2, G3, H, I1, I2,I3, F1, F2	200	100	200	non	oui
J, K1	200	25	50	non	oui
K2	200	12,5	25	non	oui
K3	200	5	10	non	oui

Tableau 13. Conditions expérimentales des expériences de transport du fructose dans le réacteur en H pour la phase organique.

Expérience	Compartment R				
	[tampon] (mM)	V (mL)	pH	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	Agitation (rpm)
A	100	175	3	-	200
B	100	175	3	-	200
D	100	175	3	-	200
E	100	200	3,1	-	200
F1	100	200	2,2	-	200
F2	100	200	3,6	-	200
G1	100	200	4,0	-	200
G2	300	200	3,1	-	200
G3	500	200	3,6	-	200
H	300	200	2,9	100	200
I1	300	200	2,9	-	100
I2	300	200	2,9	-	200
I3	300	200	2,9	-	300
J	300	200	2,9	-	300
K1, K2, K3	300	200	2,9	-	300

Tableau 14. Conditions expérimentales des expériences de transport du fructose dans le réacteur en H pour le compartiment R.

#### II.2.3.2.3. Catalyse hybride dans le réacteur en H, différence de température appliquée

La solution aqueuse donneuse en glucose est formée par 200 mL de tampon Tris-HCl (300 mM de pH = 8,7) dans lequel sont introduits 100 mM de D-glucose, 8 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>. La solution aqueuse réceptrice est formée par 200 mL de tampon citrate de sodium 300 mM à pH = 2,97 contenant la Dowex<sup>®</sup> Monosphere<sup>®</sup> 650C (15 mL). La température de l'ensemble du réacteur est portée à 70°C. Après 15 minutes, 1,5g d'IGI sont introduits dans un réacteur rotatif plongé dans la phase aqueuse donneuse. La phase organique constituée par 200 ml de MIBC contenant de 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> est introduite dans le réacteur. Le système est thermostaté à 70 °C dans le compartiment de gauche, 80 °C dans le compartiment de droite. La vitesse d'agitation dans le compartiment de gauche est de 280 rpm et de 300 rpm dans le compartiment de droite.

#### II.2.3.2.4. Catalyse hybride dans le réacteur en H, dans les conditions optimisées

La solution aqueuse donneuse en monosaccharide est formée par 200 mL de tampon Tris-HCl (300 mM à pH = 8,5) dans lequel sont introduits 100 mM de D-glucose, 8 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>. La solution aqueuse réceptrice est formée par 200 mL de tampon citrate de sodium 300 mM à pH = 2,97 contenant la Dowex<sup>®</sup>Monosphere<sup>®</sup>650C (15 ml). La température de l'ensemble du réacteur est portée à 70°C. Après 15 minutes, 1,5 g d'IGI sont introduits dans un réacteur rotatif plongé dans la phase aqueuse donneuse. La phase organique constituée par 200 ml de MIBC contenant de 50 mM de 3,4-DCPBA et 100 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> est introduite dans le réacteur. La température de l'ensemble du réacteur est maintenue à 70 °C. La vitesse d'agitation dans le compartiment de gauche est de 280 rpm et de 300 rpm dans le compartiment de droite.

### II.3. Techniques analytiques

La quantification des monosaccharides en solution aqueuse est réalisée par HPLC. L'HPLC utilisée est une HPLC de marque Shimadzu équipée d'une pompe LC-20ADXR, d'un dégazeur DGU-20A5R, d'un passeur d'échantillon automatique SIL-20ACXR, d'un détecteur à barrettes d'iode SPD-MD20A, d'un détecteur à indice de réfraction RID-20A, d'un four CTO-20AC et d'un module de communication CBM-20A, le tout contrôlé par l'interface LabSolution. La colonne utilisée est une Aminex HPX-87H (300mm x 7,8mm, 9µm) (Bio-Rad). La phase mobile est composée de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 5 mM (mode isocratique) à un débit de 0,6 ml.min<sup>-1</sup> et 0,4 ml.min<sup>-1</sup> (utilisé dans le cas des mélanges glucose/fructose). La température est de 35 °C et le volume d'injection de 10 µL.

Les méthodes de détections, longueurs d'ondes sélectionnées des différents réactifs et produits ainsi que les plages de concentrations utilisées pour les standards sont données dans le Tableau 15.

Méthode analytique	RID				UV 284 nm	UV 195 nm		
Produit	5-HMF	D-Glc	D-Fru	LA	5-HMF	D-Glc	D-Fru	FA
Concentrations (mM)	0,14-30	0,5-25	0,5-25	0,5-25	0,007-0,5	0,5-25	0,5-25	0,5-35

Tableau 15. Concentrations et méthodes analytiques.

Les calibrations sont réalisées toutes les 100 injections et/ou après une période d'inutilisation de la colonne supérieure à deux semaines.

## II.4. Calculs

Le rendement de la réaction d'isomérisation de glucose (Glc) en fructose (Fru) est défini de la façon suivante :

$$R(t) = \frac{n_{Fru}(t)}{n_{Glc}(0)} = \frac{n_{Glc}(0) - n_{Glc}(t)}{n_{Glc}(0)}$$

Le rendement de la réaction de déshydratation du fructose (Fru) en 5-HMF est calculé de la façon suivante :

$$R(t) = \frac{n_{5HMF}(t)}{n_{Fru}(0)}$$

Le rendement global du processus de transformation du glucose (Glc) introduit dans la phase donneuse (D) en 5-HMF obtenu dans la phase réceptrice (R) via les deux types de catalyse est obtenu suivant le calcul :

$$R_G(t) = \frac{n_{5HMF}(t) \text{ dans la phase R}}{n_{Glc}(0) \text{ dans la phase D}}$$

La conversion du fructose lors de la réaction de déshydratation est calculée de la façon suivante :

$$X(t) = 1 - \frac{n_{Fru}(t)}{n_{Fru}(0)}$$

La sélectivité en 5-HMF obtenue lors de la réaction de déshydratation est calculée est défini par :

$$S_{5HMF}(t) = \frac{n_{5HMF}(t) - n_{5HMF}(0)}{n_{Fru}(0) - n_{Fru}(t)}$$

La productivité de la réaction de déshydratation est calculée de la façon suivante :

$$P_{5HMF}(t) = S_{5HMF}(t) \times X(t)$$

Le rendement d'extraction d'une espèce i d'une phase aqueuse vers une autre phase est calculé de la façon suivante :

$$R(t) = \frac{n_i(0) \text{ dans la phase aqueuse} - n_i(t) \text{ dans la phase aqueuse}}{n_i(0) \text{ dans la phase aqueuse}}$$

Le rendement de relargage d'une espèce *i* d'une phase organique vers une phase aqueuse est défini de la façon suivante :

$$R(t) = \frac{n_i(t) \text{ dans la phase aqueuse}}{n_i(0) \text{ dans la phase organique}}$$

Où  $n_i(0) \text{ dans la phase organique} = n_i \text{ extrait}$

La vitesse initiale d'extraction ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ ) d'une espèce d'une phase aqueuse vers une phase organique est définie de la façon suivante :

$$v \left( \frac{\mu\text{mol}}{\text{min}} \right) = \frac{n_i(t=15) \text{ dans la phase aqueuse} - n_i(0) \text{ dans la phase aqueuse}}{15}$$

## Chapitre III. Etude des conditions réactionnelles de l'isomérisation enzymatique du glucose, du transport du fructose et de la déshydratation chimique vers l'obtention du 5-HMF

---

Dans ce chapitre sont exposées les démarches expérimentales systématiques et les résultats obtenus pour l'étude de chaque étape du procédé pour la production du 5-HMF à partir du D-glucose. Le but est de pouvoir définir, en première approche expérimentale, les paramètres optimisés pour chaque étape du procédé, prise individuellement. Cela permettra ainsi de poser les jalons pour vérifier les gammes de mise en œuvre permises pour aller vers un système couplant simultanément toutes ces étapes. Cette approche débute donc par l'étude des conditions d'isomérisation du D-glucose par la glucose isomérase Sweetzyme®IT EXTRA, puis par l'étude et l'optimisation des conditions de transport du D-fructose (extraction et relargage), pour s'achever par l'étude des conditions nécessaires et optimales à la réaction de déshydratation vers l'obtention du 5-HMF.

### III.1. Isomérisation enzymatique

La première étape du procédé de synthèse du 5-HMF exposé est l'isomérisation enzymatique du D-glucose par la glucose isomérase Sweetzyme®IT Extra (IGI). Afin d'optimiser sa cinétique et atteindre rapidement l'équilibre thermodynamique, l'activité de l'enzyme immobilisée, en fonction de la température, du pH et du rapport Enzyme/Substrat est étudiée.

#### III.1.1. Effet de la température et du pH

Les gammes de température et de pH d'utilisation de l'IGI doivent être déterminées afin d'optimiser l'activité de l'enzyme, tout en maintenant des conditions compatibles pour une future extraction simultanée du D-fructose (présentée dans la partie III.2.1.). Une première comparaison est réalisée par Tükel *et al.* avec une glucose isomérase libre (GI) issue de l'espèce *Streptomyces Rubiginosus* (Gensweet™) afin de cibler une première gamme de pH et de température fonctionnelle. L'activité de la GI libre est proportionnelle à la température : <sup>[134]</sup> une fois immobilisée, la gamme de température d'utilisation se situe entre 40 °C et 80 °C et celle de pH entre pH = 5 et pH = 9, avec un optimal décrit à 60°C pour un pH = 7.<sup>[134]</sup>

Une première étude de l'activité de l'IGI (Sweetzyme®IT Extra) sur une gamme de température de 50 à 90 °C est réalisée à pH = 7,5. L'expérience est réalisée avec une masse d'IGI de 10 mg, une concentration initiale en glucose de 100 mM pour 1 mL de tampon Tris-HCl (100 mM) de pH = 7,5. La concentration en D-fructose formée dans le milieu réactionnel est suivie en fonction du temps pendant 90 minutes. La Figure 48 présente l'activité relative de l'enzyme. L'activité maximale calculée à 60 minutes d'expérience est rapportée à 100% afin d'obtenir des activités enzymatiques relatives (Figure 48).

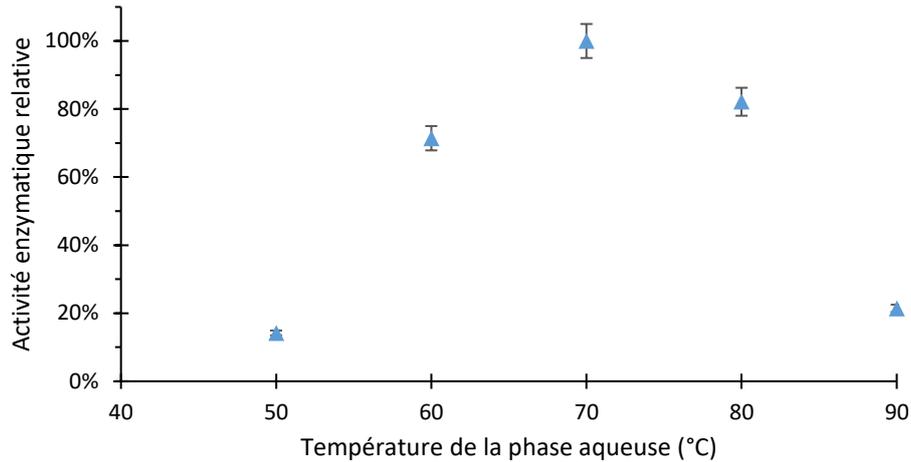


Figure 48. Activité enzymatique relative de l'IGI à 60 min de réaction en fonction de la température.  $V=1\text{ mL}$  Tris-HCl 100 mM pH = 7,5,  $m_{IGI}=10\text{ mg}$ ,  $[D\text{-Glc}]_i=100\text{ mM}$ ,  $[MgSO_4]=20\text{ mM}$ ,  $[Na_2SO_3]=8\text{ mM}$ , 900 rpm.

L'activité maximale est obtenue à 70 °C. A 80 °C et 60 °C, l'activité enzymatique reste significative (82% et 71% respectivement). Une chute est observée à 50 et 90 °C avec une activité diminuée de 86% et 79%, respectivement.

Une seconde étude de l'activité de l'IGI est réalisée à 70°C sur une gamme de pH comprise entre 4,5 et 9. L'expérience est réalisée avec une masse d'IGI de 10 mg, une concentration initiale en D-glucose de 100 mM pour 1 mL de tampon. La nature du tampon utilisé dépend du pH souhaité :

- Tampon citrate de sodium      pH = 4,5
- Tampon phosphate de sodium    pH = 6,5
- Tampon Tris-HCl                    pH = 7-7,5-8-8,5-9

La concentration en D-fructose formée dans le milieu réactionnel est analysée au cours de l'expérience (90 minutes). La Figure 49 présente l'activité relative de l'enzyme en fonction du pH. L'activité maximale calculée à 60 minutes d'expérience est rapportée à 100% afin d'obtenir des activités enzymatiques relatives.

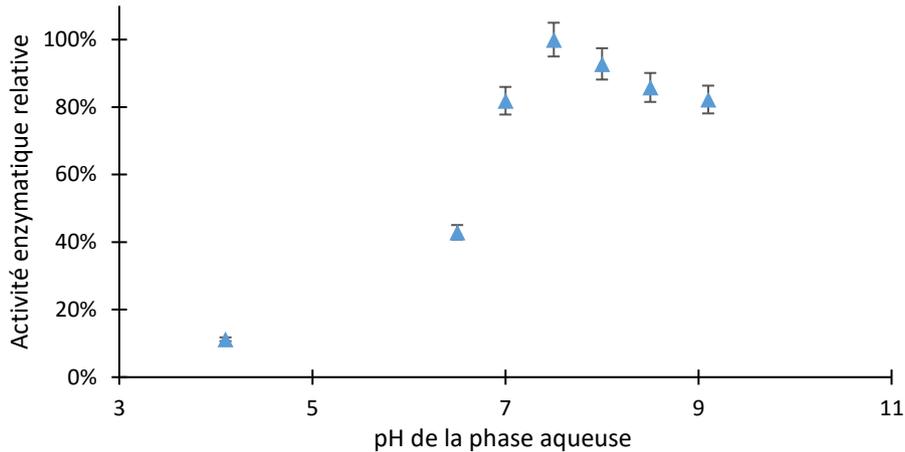


Figure 49. Activité enzymatique relative de l'IGI en fonction du pH de la phase aqueuse à 70°C.  $V=1$  mL Tampon 100 mM,  $m_{IGI}=10$  mg,  $[D-Glc]_i=100$  mM,  $[MgSO_4]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM, 900 rpm. Tampons : citrate de sodium à pH 4,5, phosphate de sodium à pH 6,5, Tris-HCl à pH 7, 7,5, 8, 8,5 et 9.

Entre pH = 7 et 9, l'activité enzymatique est supérieure à 80% avec une maximale obtenue à un pH de 7,5. Afin de minimiser la dégradation du D-fructose et l'inactivation de l'enzyme, les pH supérieurs à 9 n'ont pas été envisagés dans cette étude. A pH = 6,5, la perte d'activité enzymatique est de 57% et à pH = 4,5 elle est de 89%.

Le pH et la température retenus doivent à la fois permettre le fonctionnement optimal de l'enzyme mais également favoriser le phénomène d'extraction en maintenant un pH supérieur au pKa de l'acide boronique. En effet, l'extraction du D-fructose par formation d'un complexe [D-fructose-acide boronique]<sup>-</sup> est favorisée si le pH de la solution aqueuse contenant le D-fructose est supérieur au pKa de l'acide boronique (chapitre I, partie I.4.).<sup>[31],[113]</sup> Les pKa des principaux acides boroniques retenus dans l'étude sont inférieurs à 8,5.<sup>[20]</sup> Dans ce cadre, les paramètres retenus sont 70°C et pH 8,5 permettant à la fois d'optimiser l'activité de l'enzyme et de minimiser le phénomène d'évaporation de l'eau. Le pH de 8,5, supérieur au pKa de l'acide boronique, permet de transporter de manière optimale le fructose vers la phase organique tout en maintenant une activité relative de plus de 80%.

### III.1.2. Effet du rapport massique IGI/glucose

Le pH et la température d'utilisation de l'IGI ayant été déterminés, il est nécessaire d'examiner l'effet du rapport massique IGI/glucose dans le but de l'optimiser. Il convient de noter que l'enzyme étant immobilisée, la masse d'enzyme désigne la masse « enzyme + support ».

L'étude est réalisée avec une masse d'IGI de 10 mg, une concentration initiale en D-glucose variant de 50 mM à 1 M pour 1 mL de tampon Tris-HCl 100 mM stabilisé à pH = 8,5. Les échantillons sont agités à 900 rpm (limité par l'appareil) et incubés 60 minutes à 70°C. La Figure 50 présente les concentrations résultantes en D-fructose et D-glucose à partir de la concentration initiale en D-glucose dans les échantillons à 10 minutes et à 60 minutes d'expérience.

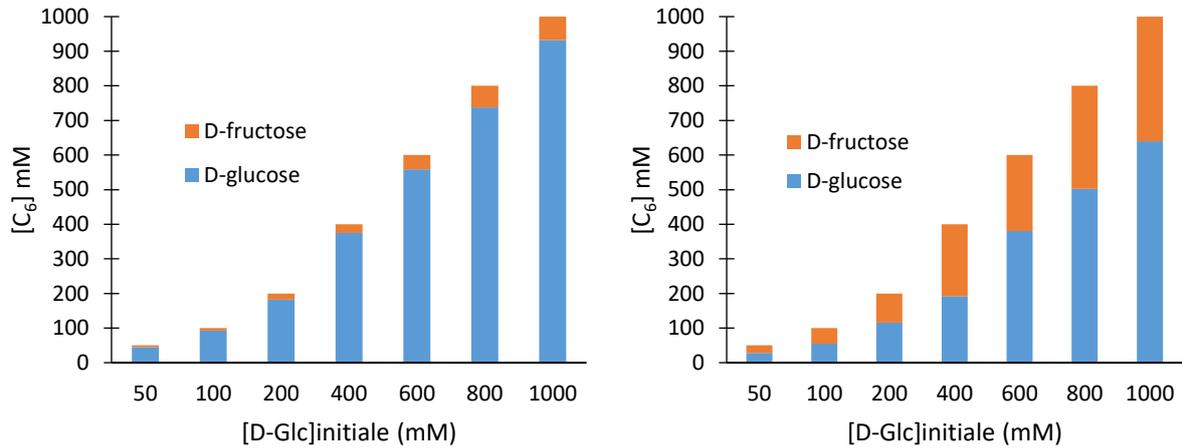


Figure 50. Evolution des concentrations en D-glucose et D-fructose après 10 minutes (gauche) et 60 minutes (droite) de réaction en fonction de la concentration en D-glucose initialement introduite.  $V=1$  mL Tris-HCl 100 mM pH = 8,5,  $m_{IGI}=10$  mg,  $[D-Glc]_i=50$  mM à 1 M,  $[MgSO_4]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM, 900 rpm, 70°C.

Pour les expériences contenant initialement 50 mM à 1M de glucose, au bout de 10 minutes (Figure 50, gauche), la proportion de D-fructose formée augmente avec la concentration initiale en D-glucose. Après 60 minutes (Figure 50, droite), l'équilibre thermodynamique est atteint pour les concentrations initiales en D-glucose inférieures ou égales à 400 mM. Pour des concentrations supérieures, la proportion de D-fructose est inférieure à celle du D-glucose. En se reportant aux concentrations après 10 minutes de réaction, le calcul des vitesses initiales de consommation du D-glucose (en  $\text{mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) permet d'aboutir à la représentation de Lineweaver Burk présentée Figure 51.

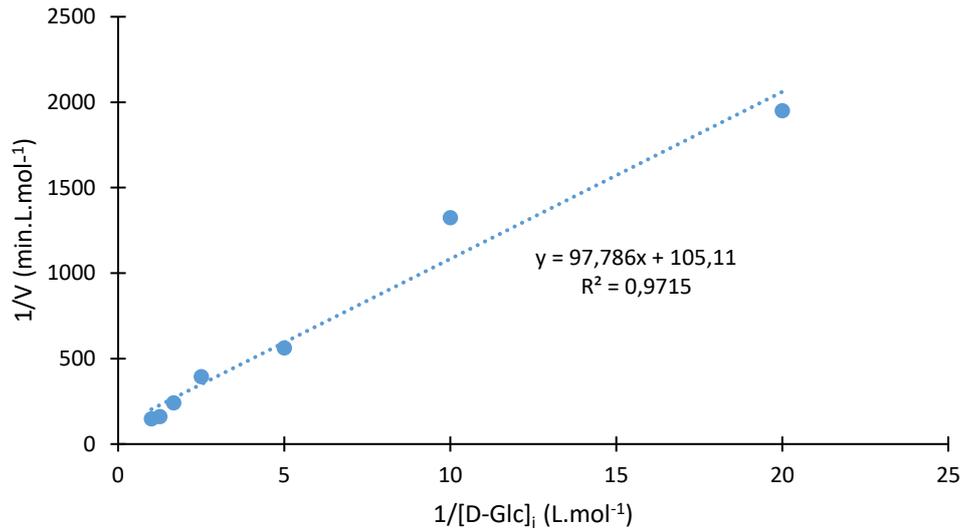


Figure 51. Représentation de Lineweaver Burk.

La représentation de Lineweaver Burk permet de calculer la constante de Michaelis Menten ( $K_M$ , car quand  $y = 0$   $x = -1/K_M$ ). Ainsi le calcul donne un  $K_M$  égal à  $0,93 \text{ mol.L}^{-1}$  ainsi qu'une vitesse  $V_{\max}$ , de  $9,5 \times 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$ .

Cette valeur de  $K_M$  se place dans la même gamme que celles obtenues dans la littérature. En effet, différents travaux portent sur la cinétique de la réaction d'isomérisation du glucose.<sup>[4],[5]</sup> Ces études affiches des  $K_M$  présentés Tableau 16.

$K_M$	T	pH	Enzyme	source
0,394	70	8	GI de <i>Bacillus sp.</i>	[65]
1,331	80	8	GI de <i>Bacillus sp.</i>	[65]
0,671	65	7,5	IGI :Sweetzyme®	[5]

Tableau 16.  $K_M$  calculés dans les différentes études pour des glucose isomérases.

L'évolution de la conversion du D-glucose à 60 minutes en fonction du rapport massique IGI/D-glucose<sub>initial</sub> est représentée Figure 52.

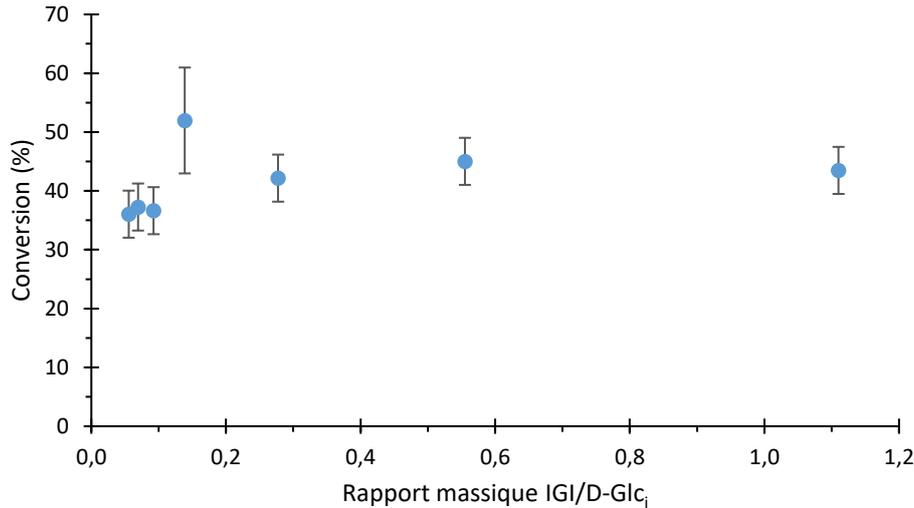


Figure 52. Conversion du D-glucose à 60 minutes d'isomérisation en fonction du rapport massique IGI/D-glucose.

Pour les rapports enzyme/D-glucose<sub>initial</sub> compris entre 0,14 (2,5/18) et 1,11 (20/18) le rendement d'isomérisation est supérieur à 40% (pour rappel, l'équilibre thermodynamique à 25°C correspond à une conversion de glucose de 55%). Pour les rapports compris entre 0,06 (1/18) et 0,09 (1,7/18), le rendement d'isomérisation est similaire, compris entre 36% et 38%. Le résultat correspondant au rapport 0,14 présente une incertitude élevée due à un triplicat présentant une déviation élevée attribuée à l'expérimentateur. Les rendements sont inférieurs à ceux obtenus avec les rapports plus élevés. D'après les résultats concernant le rendement d'isomérisation à 60 minutes et le rapport massique IGI/D-glucose<sub>initial</sub>, l'équilibre thermodynamique de la réaction n'est pas atteint après 60 minutes de réaction pour des rapports inférieurs à 0,14. Soit pour une masse de D-glucose supérieure à 7 fois la masse de l'enzyme. Ainsi pour la suite des expériences nous nous devrions nous placer dans le cas où la masse de glucose est inférieure à 7 fois la masse de l'enzyme afin d'améliorer la cinétique de la réaction.

### III.1.3. Analyse du rendement d'isomérisation

Dans les conditions expérimentales déterminées précédemment (pH = 8,5, 70°C), l'évolution du rendement en fructose en fonction du temps est analysée.

L'étude est réalisée avec une masse d'IGI de 500 mg, une concentration initiale en D-glucose de 100 mM pour 100 mL de tampon Tris-HCl 100 mM de pH = 8,5. Les concentrations en D-fructose et D-glucose dans le milieu réactionnel sont suivies au cours de l'expérience (120 minutes) et permettent de calculer le taux de chacun des monosaccharides dans l'échantillon. Une expérience témoin, sans IGI, est réalisée dans les mêmes conditions. La Figure 53 présente

l'évolution du taux de chaque monosaccharide en fonction du temps. L'activité maximale est rapportée à 100% afin d'obtenir des activités enzymatiques relatives.

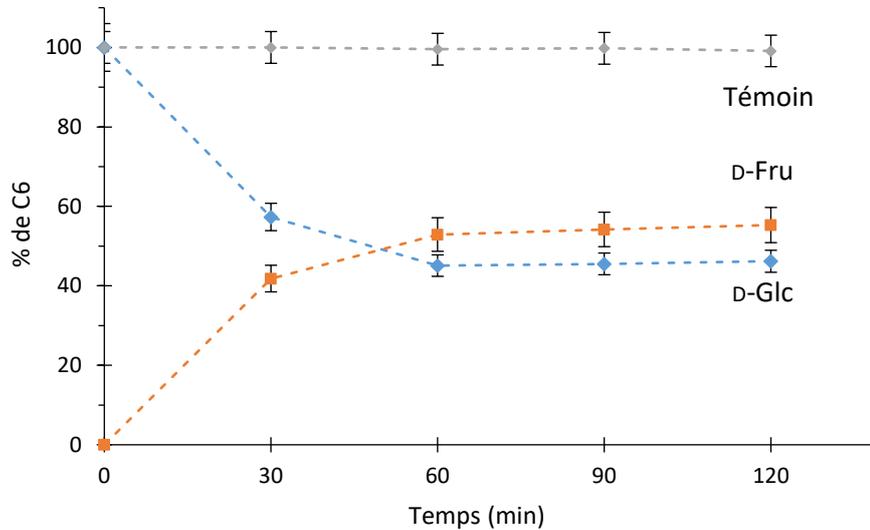


Figure 53. Suivi du % de monosaccharides dans le milieu réactionnel au cours de l'isomérisation du D-glucose..  $V=100$  mL Tris-HCl 100 mM pH = 8,5,  $m_{IGI}=100$  mg,  $[D-Glc]_i=100$  mM,  $[MgSO_4]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM, 900 rpm, 70°C.

Lorsque l'IGI est introduite dans le milieu réactionnel, la proportion de D-fructose augmente jusqu'à un plateau atteint au bout de 60 minutes. Un maximum de conversion du D-glucose de 55,3% est atteint. Les conditions optimales sont donc une température de 70°C, un pH de 8,5, et un rapport  $m_{IGI}/m_{D-glucose}$  de 5/18 ici. Dans ces conditions, la conversion du glucose atteint un équilibre à 55,3% après 60 minutes ( $K = 1,23$ ). Cet équilibre thermodynamique établi a été observé par Takasaki *et al.* en 1966 avec une constante d'équilibre  $K = 1,30$  à 70°C, pH = 7,  $[D-Glc]_i = 0,011\%$ ,  $[GI] = 6,2 \times 10^{-2}\%$ .<sup>[22]</sup> Leur étude à 60°C a mis en avant que l'équilibre est atteint après 2h45 d'incubation pour une constante d'équilibre  $K = 1,00$  et ce, avec une enzyme produite par *Streptomyces sp.* McKay *et al.* ont également étudié la cinétique de cette réaction à l'aide d'une glucose isomérase libre produite par *Bacillus sp.*<sup>[65]</sup> La réaction d'isomérisation se déroule à pH = 8 à 60°C et donne une constante d'équilibre  $K=1,15$ . Dans une autre étude, avec une isomérase produite par *Streptomyces phaeochromogenus*, à l'équilibre, à 60°C et pH = 7,5, la quantité de fructose atteint 52% de la quantité de glucose initial (soit  $K=1,08$ ). Un équilibre toutefois atteint après 8h de réaction.<sup>[20]</sup> Avec une glucose isomérase immobilisée suivant la même méthode que la Sweetzyme®IT Extra, à 65°C et pH = 8,2, la constante d'équilibre est de 1,12.<sup>[67]</sup> Une étude de la cinétique d'isomérisation avec la Sweetzyme®IT Extra à 65°C et pH = 7,5, a permis de déterminer une constante d'équilibre égale à 1,17.<sup>[68]</sup> Les

résultats obtenus ( $K_M$  égal à  $0,93 \text{ mol.L}^{-1}$ ) sont donc conformes à la littérature montrant un bon contrôle et une bonne analyse des réactions.

### III.2. Transport du fructose au sein d'une membrane liquide organique

La réaction de déshydratation du D-fructose issu de l'isomérisation ne peut avoir lieu dans le même milieu réactionnel pour cause d'incompatibilité de pH de travail de l'enzyme et du catalyseur acide, menant à l'inactivation de l'enzyme. Ainsi, une méthode d'extraction sélective et simultanée du D-fructose vers un milieu où se déroule la déshydratation est proposée. Ce transport du monosaccharide s'effectue au travers d'une phase liquide organique, dénommée membrane liquide, contenant un agent complexant du D-fructose (transporteur), issu de la famille des acides arylboroniques, accompagné d'un contre-ion de type ammonium quaternaire (co-transporteur). La première phase aqueuse où le D-fructose est produit lors de l'isomérisation est la « phase aqueuse donneuse ». La seconde phase aqueuse où D-fructose est transformé en 5-HMF est la « phase aqueuse réceptrice ». L'étude du transport du D-fructose, de la phase donneuse vers la réceptrice via la membrane liquide, débute donc par l'optimisation des conditions d'extraction du D-fructose (complexation + extraction du complexe dans la phase organique) pour se terminer par celles de l'hydrolyse du complexe, permettant le relargage du D-fructose.

#### III.2.1. Formation et extraction du complexe [D-fructose-acide boronique]

L'extraction du D-fructose de la phase aqueuse d'isomérisation (phase aqueuse donneuse) vers la phase organique repose sur la réaction de complexation du D-fructose par l'acide boronique (transporteur, noté T) et son passage dans la phase organique est permis par la présence du contre-ion (co-transporteur, noté coT). Le mécanisme est exposé en Figure 54.

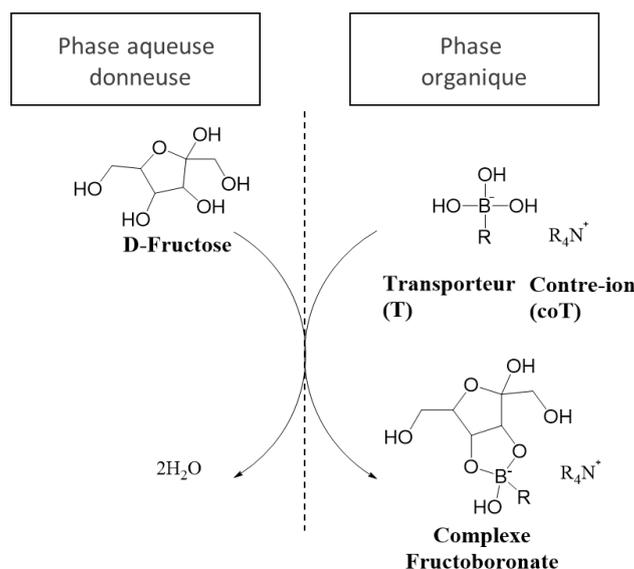


Figure 54. Représentation schématique de la formation et du transport du complexe [D-fructose-acide boronique]<sup>-</sup> aussi nommé complexe fructoborate.

L'optimisation d'un tel procédé repose sur la nature et la quantité de transporteur et de cotransport à utiliser ainsi que celles du contre-ion. Différentes phases organiques sont également testées ainsi que différentes températures afin d'évaluer leur impact sur l'efficacité de l'extraction.

### III.2.1.1. Effet du transporteur

La nature du transporteur est investiguée afin d'optimiser le transport du D-fructose, tant au niveau de son rendement d'extraction qu'au niveau de sa sélectivité vis-à-vis du D-fructose. Il est en effet préférable de ne pas transporter de glucose dans la phase aqueuse réceptrice car sa réactivité est trop faible avec le catalyseur acide et sa présence pourrait induire des réactions secondaires indésirables supplémentaires. Comme mentionné précédemment, les transporteurs envisagés font partie de la famille des acides boroniques possédant un groupement aryle substitué.<sup>[110],[115]</sup> Il s'agit donc de sélectionner le meilleur substituant pour permettre la formation du complexe avec une fonction diol du fructose. Dans le chapitre I partie I.4.2., il est rapporté que l'acide boronique sous sa forme anionique borate favorise la formation de l'ester.<sup>[116],[114]</sup> Cet anion est stabilisé par l'augmentation de l'électrophilie du bore qui est induite par un substituant électroattracteur. Ainsi, l'acidité (de Lewis) de l'acide boronique augmente avec la présence d'un substituant électroattracteur sur le groupe aryle. Il s'agit alors de déterminer la nature du substituant électroattracteur, et ainsi choisir l'acide boronique le plus

favorable à la complexation sélective du fructose dans les conditions de pH et température déterminées précédemment pour la réaction d'isomérisation (70°C et pH = 8,5).

#### III.2.1.1.1. Criblage de familles d'acides boroniques

Un premier criblage d'acides boroniques est réalisé dans le but de caractériser l'extraction du D-fructose depuis un milieu aqueux basique à pH = 8,5. Ces acides sont choisis parmi la famille des boroniques présentant des substituants électroattracteurs de différentes natures (chlorés et fluorés). Quatre acides boroniques présentent une double substitution chlorée sur le groupement phényle, les acides 3,4-dichlorophénylboronique (3,4-DCPBA), 2,4-dichlorophénylboronique (2,4-DCPBA), 2,3-dichlorophénylboronique (2,3-DCPBA) et 3,5-dichlorophénylboronique (3,5-DCPBA) et un acide contient un substituant fluoré, l'acide 4-(trifluorométhyl)phénylboronique (4-TFMPBA). Un acide boronique de référence est également utilisé : il présente un groupement aryle non substitué, il s'agit de l'acide phénylboronique (PBA). Pour comparaison, un acide avec un substituant électrodonneur est ajouté. Il possède un substituant tertbutyle, l'acide 4-tertbutylphénylboronique (4-TBPBA). Les structures de ces acides boroniques sont présentées Figure 55.

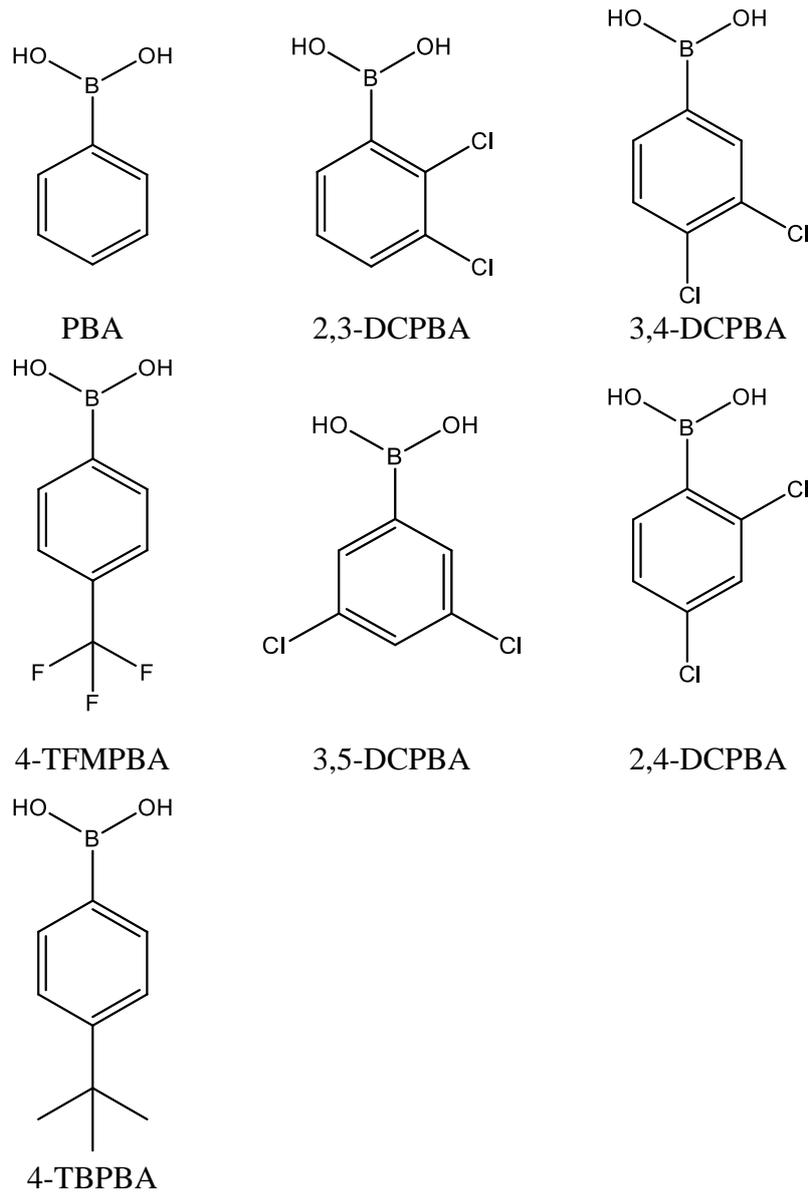


Figure 55. Structures des acides boroniques utilisés pour le premier criblage.

L'expérience A est menée dans un système liquide/liquide constitué de 600  $\mu$ l de tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5 contenant initialement 100 mM de D-fructose en contact avec une phase organique de 600  $\mu$ l formée par du MIBC contenant 100 mM d'acide boronique et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> comme contre-ion. Le tout est porté à 70 °C agité à 750 rpm pendant 90 minutes. Cette vitesse d'agitation évite la formation d'une émulsion entre les deux phases liquides dans le but de concevoir une membrane organique liquide. La concentration en D-fructose au cours de l'expérience (60 minutes) est suivie par HPLC, permettant le calcul du rendement d'extraction du D-fructose en fonction du temps présenté Figure 56.

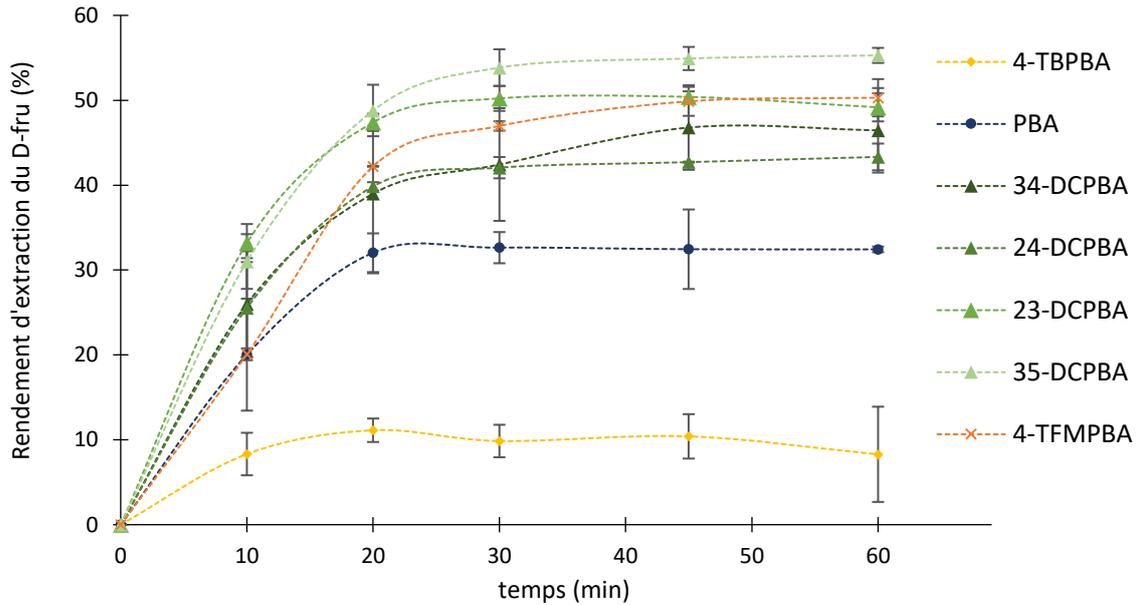


Figure 56. Evolution des rendements d'extraction du D-fructose au cours du temps pour différents acides boroniques.  $V_{aq}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl pH = 8,5 100mM)  $[D-Fru]_i=100 \text{ mM}$ ,  $V_{org}=600 \mu\text{l}$  (MIBC),  $[T]=100 \text{ mM}$ ,  $[coT]=200 \text{ mM}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 750 rpm. (Expérience A)

De façon générale, le rendement d'extraction augmente avec le temps pour atteindre après 30 minutes un plateau, et ce, quel que soit le type d'acide boronique utilisé. Cependant, selon la nature de l'acide boronique, le rendement d'extraction final à 60 minutes et la vitesse initiale d'extraction, calculée sur les 10 premières minutes de réaction, sont différents. Le Tableau 17 présente le rendement d'extraction du D-fructose et la vitesse initiale d'extraction pour chacun des acides boroniques utilisés. Dans l'optique d'obtenir *in fine* un système d'extraction fonctionnant en continu, la vitesse initiale d'extraction est un paramètre à considérer. En effet, l'extraction du fructose s'effectuera en continu sans atteindre un équilibre (du moins dans les premières heures de fonctionnement du système).

Acide boronique	Rendement d'extraction du D-Fru (%)		Vitesse initiale d'extraction ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	
PBA	32,4	$\pm 0,3$	1,3	$\pm 0,39$
2,4-DCPBA	43,3	$\pm 1,5$	1,6	$\pm 0,34$
3,4-DCPBA	46,5	$\pm 4,9$	1,5	$\pm 0,23$
2,3-DCPBA	49,2	$\pm 1,6$	2,0	$\pm 0,17$
3,5-DCPBA	55,3	$\pm 0,8$	1,9	$\pm 0,20$
4-TFMPBA	50,3	$\pm 2,2$	1,3	$\pm 0,13$
4-TBPBA	8,3	$\pm 2,6$	0,5	$\pm 0,08$

Tableau 17. Rendements d'extraction du D-fructose et vitesses initiales d'extraction correspondantes pour les différents acides boroniques utilisés.  $V_{aq}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl pH = 8,5 100mM),  $[D-Fru]_i=100 \text{ mM}$ ,  $V_{org}=600 \mu\text{l}$  (MIBC),  $[T]=100 \text{ mM}$ ,  $[coT]=200 \text{ mM}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 750 rpm. (expérience A)

Les valeurs des rendements d'extraction (Tableau 17) permettent de classer les acides boroniques en quatre catégories. La première est uniquement composée du 4-TBPBA avec un rendement d'extraction de 8,3%. La suivante est composée du PBA avec un rendement d'extraction de 32,4% et la troisième est composée des acides 2,4-DCPBA, 3,4-DCPBA, 2,3-DCPBA, 4-TFMPBA avec un rendement d'extraction compris entre 43,3% et 50,3%. Enfin la dernière est composée du 3,5-DCPBA avec un rendement d'extraction de 55,3%.

L'étude des vitesses initiales d'extraction (Tableau 17), autorise aussi un classement des acides boroniques en trois catégories. La première est composée du 4-TBPBA avec une vitesse initiale d'extraction de 0,5  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . La deuxième est composée du PBA, 4-TFMPBA, 3,4-DCPBA, 2,4-DCPBA avec une vitesse d'extraction plus élevée entre 1,3 et 1,6  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . La troisième composée du 2,3-DCPBA et du 3,5-DCPBA avec des vitesses initiales d'extraction les plus élevées de 1,9 et 2,0  $\mu\text{mol}/\text{min}$  respectivement.

Afin de croiser les observations, l'approche consiste à mettre en place un système de notation en fonction des performances. Ainsi, la catégorie présentant des rendements ou des vitesses initiales les plus faibles se voit affecter la note de 1 ; la note 4 étant décernée pour les plus élevés. Cette approche permet un classement des acides boroniques (Tableau 18).

Acide boronique	Note attribuée pour le rendement d'extraction	Note attribuée pour la vitesse initiale d'extraction	Note totale
PBA	2	2	4
2,4-DCPBA	3	2	5
3,4-DCPBA	3	2	5
2,3-DCPBA	3	3	6
3,5-DCPBA	4	3	7
4-TBPBA	1	1	2
4-TFMPBA	3	2	5

Tableau 18. Présentation des scores obtenus par chaque acide boronique.

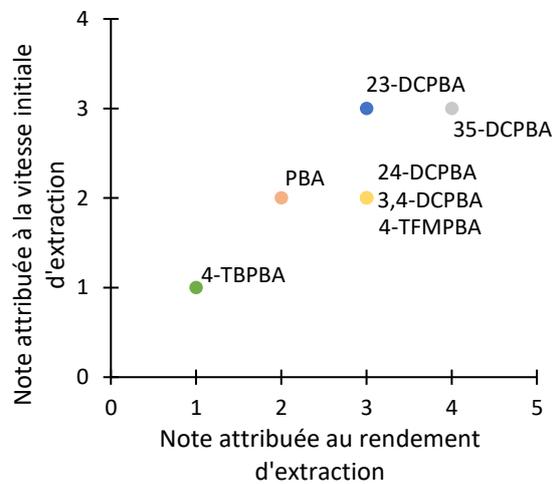


Figure 57. Graphique représentant les différents groupes d'acides boroniques.

Pour des notes totales allant de 2 à 7, Tableau 18, les acides boroniques sont classés en cinq groupes visibles sur la Figure 57. Le premier groupe avec une note de 2 formé par le 4-TBPBA, le deuxième groupe avec une note de 4 formé par le PBA, le troisième groupe avec une note de 5 formé par le 24-DCPBA, le 3,4-DCPBA et le 4-TFMPBA une note attribuée au rendement d'extraction du fructose identique au quatrième groupe composé du 2,3-DCPBA, puis le

cinquième groupe avec un score de 7 formé par le 35-DCPBA. Ce classement montre que le 35-DCPBA est celui qui allie à la fois une vitesse initiale et un rendement d'extraction importants.

Ce premier criblage a permis de d'étudier la réaction d'extraction en fonction de l'acide boronique utilisé avec une durée caractéristique de 30 minutes. Il a également permis de former un premier groupe contenant le 4-TPBPA qui obtient la moins bonne note de ce classement. Ce faible résultat peut être expliqué par l'effet inductif des substituants présents sur le cycle aromatique (Figure 55).

En effet, parmi les sept acides boroniques testés, le 4-TPBPA est l'unique acide boronique possédant un substituant inductif donneur :  $-C(CH_3)_3$ . Cet effet inductif donneur défavorise la réaction de complexation du D-fructose en diminuant la force du centre électrophile de l'atome de bore. Cela a pour effet de diminuer l'acidité de la molécule et ainsi d'augmenter la valeur du pKa. Le pKa du 4-TPBPA est de 9,4<sup>[117]</sup> ainsi supérieur aux autres acides et donc supérieur au pH de 8,5. Cette expérience confirme que dans le cas où le pH est inférieur au pKa de l'acide boronique, la formation de l'ester boronique n'est pas favorisée.<sup>[113],[116],[114]</sup> De même avec le PBA obtenant une note moyenne de 4 et dénué de substituant. La formation du complexe est plus favorisée que dans le cas du 4-TPBPA mais reste difficile du fait du pKa (à 20°C) de 8,9<sup>[117]</sup>, toujours supérieur, mais de peu, au pH de 8,5 de la réaction.

Les acides restants (2,4-DCPBA, 3,4-DCPBA, 4-TFMPBA, 2,3-DCPBA, et le 3,5-DCPBA qui possède un pKa=7,4<sup>[117]</sup>) obtiennent les notes les plus élevées et contiennent des substituants à effet inductif attracteur ce qui explique les meilleurs résultats par rapport aux groupes précédents. Plus particulièrement, le 3,5-DCPBA permet d'obtenir un rendement d'extraction du fructose supérieur aux autres. Cet acide possède la particularité d'être symétrique. Une symétrie qui confère à cet acide un moment dipolaire supérieur aux autres acides et donc une ionisation favorisée pour former le complexe ester borate lorsque le pH le permet.

En conclusion de cette étude, les substituants sur le groupement phényle favorables à l'extraction du fructose sont les substituants à effet électroattracteur. Dans ce cas, les substituants chlorés ou fluorés présentent un potentiel certain pour la formation d'un complexe avec le fructose. Afin d'approfondir les recherches et sélectionner la formulation de l'acide boronique la plus adaptée, plusieurs substituants électroattracteurs parmi les familles identifiées sont testés.

III.2.1.1.2. Sélection de l'acide boronique le mieux adapté à l'extraction sélective du fructose

Plusieurs séries d'acides boroniques appartenant aux familles définies précédemment (substituants chlorés, fluorés et azotés) sont utilisées pour leur sélectivité vis-à-vis du fructose.

- Acides boroniques comportant des substituants chlorés : 2,4-DCPBA, 2,3-DCPBA, 3,4-DCPBA et 3,5-DCPBA
- Acides boroniques comportant des substituants fluorés :  
l'acide 2-(trifluorométhyl)phénylboronique (2-TFMPBA),  
l'acide 3-(trifluorométhyl)phénylboronique (3-TFMPBA),  
l'acide 4-(trifluorométhoxy)phénylboronique (4-TFMeOPBA)  
et l'acide 3,5-bis(trifluorométhyl)phénylboronique (3,5-BTFMPBA),
- Acides boroniques comportant des substituants azotés :  
l'acide 3-nitrophénylboronique (3-NPBA),  
l'acide 2(N,N-diméthylaminométhyl)phénylboronique (2-NNMPBA),  
l'acide 4-méthyl-2-(1H-pyrazol-1-yl)phénylboronique (4-M21HPBA),  
l'acide 2-(tétrazol-5-yl)phénylboronique (2-T5PBA).

D'autres substituants inductifs attracteurs sur le cycle aromatique sont également testés, il s'agit de l'acide 3-(2-carboxyéthyl)phénylboronique (3,2-CarboPBA) et de l'acide 4-bromo-1-naphtalèneboronique (4-B1nPBA).

Les structures de ces différents acides boroniques sont présentés Figure 58.

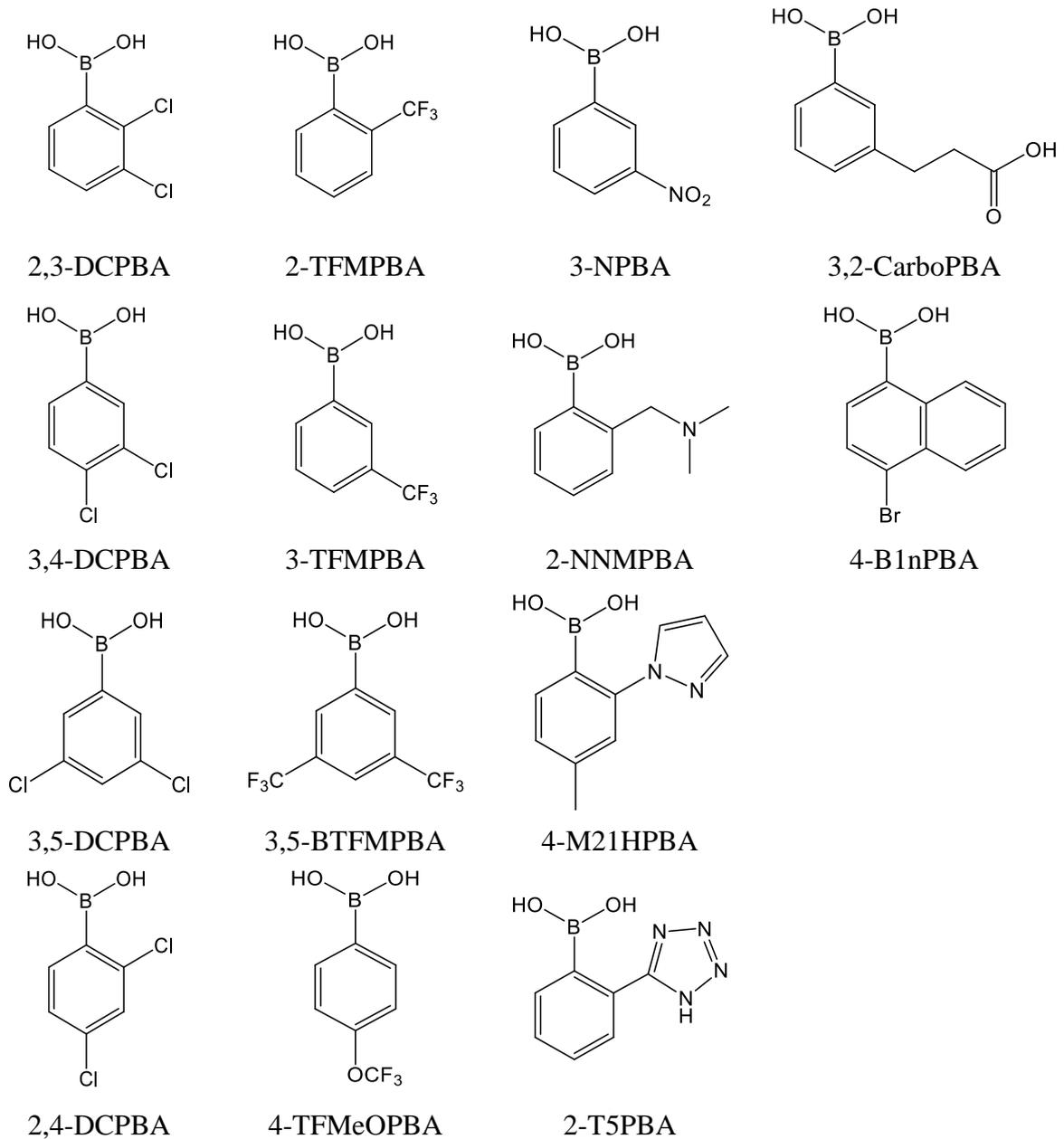


Figure 58. Structures des acides boroniques utilisés pour le criblage de sélectivité pour le D-fructose.

L'expérience B est constituée d'une partie aqueuse constituée d'une solution de 600 µl de tampon Tris-HCl pH = 8,5 à 100 mM contenant initialement 100 mM de D-glucose et 100 mM de D-fructose en contact avec une phase organique constituée d'une solution de 600 µl de MIBC contenant 100 mM d'acide boronique et 200 mM d'Aliquat336® (contre-ion). Les deux phases en contact sont portées à 70°C et agitées à 750 rpm pendant 90 minutes. Le suivi de la concentration en glucose et fructose dans la phase aqueuse est réalisé au cours de l'expérience par prélèvement et analyse par HPLC, permettant ainsi le calcul du rendement d'extraction du D-fructose et D-glucose à 90 minutes (temps permettant à la réaction d'extraction d'atteindre

son plateau). Les résultats, ainsi que le rapport des rendements d'extraction  $\frac{R_{D-Fru}}{R_{D-Glc}} = \frac{\text{Rendement extraction fructose}}{\text{Rendement extraction glucose}}$  sont présentés Tableau 19.

Acide boronique	Rendement d'extraction du D-Fru (%)	Rendement d'extraction du D-Glc (%)	$\frac{R_{D-Fru}}{R_{D-Glc}}$
2,4-DCPBA	24,4 ± 5,2	4,6 ± 6,0	5,3
3,4-DCPBA	23,0 ± 5,2	3,7 ± 6,0	6,2
3,5-DCPBA	16,7 ± 5,6	2,6 ± 5,9	6,4
2,3-DCPBA	36,0 ± 6,6	4,5 ± 6,6	8,0
2-TFMPBA	28,0 ± 6,6	4,9 ± 6,6	5,8
3-TFMPBA	34,1 ± 6,6	6,7 ± 6,6	5,1
4-TFMeOPBA	27,6 ± 6,2	1,5 ± 7,0	11,4
35-BTFMPBA	44,4 ± 6,6	10,8 ± 6,6	4,1
3-NPBA	33,6 ± 6,2	6,1 ± 7,0	4,6
2-NNMPBA	8,4 ± 7,1	7,5 ± 7,5	1,1
4-M21HPBA	18,3 ± 5,2	2,6 ± 6,0	7,2
2T5PBA	5,2 ± 6,6	4,2 ± 6,6	1,2
3,2-carboPBA	1,8 ± 5,2	4,4 ± 6,0	1,1
4-B1nPBA	30,7 ± 6,2	0,8 ± 7,0	10,2

Tableau 19. Rendement d'extraction du D-fructose et du D-glucose et pour les acides boroniques testés.  $V_{aq}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl pH = 8,5 100mM),  $[D-Fru]_i=100 \text{ mM}$   $[D-Glc]=100 \text{ mM}$ ,  $V_{org}=600 \mu\text{l}$  (MIBC),  $[T]=100 \text{ mM}$ ,  $[CoT]=200 \text{ mM}$ ,  $70^\circ\text{C}$ , 750 rpm. (Expérience B)

Concernant les acides boroniques chlorés, quels que soient les acides utilisés, les rendements d'extraction du D-fructose mesurés sont, au minimum, plus de 5 fois supérieurs à ceux du D-glucose (Tableau 19), montrant une forte sélectivité pour le fructose. L'acide boronique le plus performant est le 2,3-DCPBA, qui permet d'extraire 8 fois plus de fructose que de glucose soit un rendement d'extraction de 36,0% et 4,5% en fructose et glucose respectivement. La présence de deux substituants chlore sur le site aromatique confère à l'acide boronique un fort potentiel de sélectivité vis-à-vis du D-fructose.

Concernant les acides boroniques fluorés, les rendements d'extraction mesurés sont, au minimum, plus de 4 fois supérieurs à ceux du D-glucose (Tableau 19), montrant également une forte sélectivité pour le fructose. L'acide boronique le plus performant est le 4-TFMeOPBA qui

permet d'extraire 18 fois plus de fructose que de glucose, soit un rendement d'extraction de 27,6% et 1,5% en fructose et glucose respectivement.

Concernant les acides boroniques azotés, le 2-NNMPBA et le 2T5PBA présentent les plus faibles rendements d'extraction du fructose à peine plus d'une fois supérieur à ceux de glucose. L'acide boronique le plus performant en termes de sélectivité pour le fructose est le 4-M21HPBA, qui permet d'extraire 7 fois plus de fructose que de glucose soit un rendement d'extraction de 18,3% et 2,6% en fructose et glucose respectivement.

Le 4-B1nPBA présente un rendement d'extraction du fructose de 30,7% c'est-à-dire 38 fois supérieur à celui du glucose de 0,8%. Le 32-carboPBA est l'unique acide boronique testé présentant une sélectivité pour le glucose, avec un rendement d'extraction de ce dernier 2,6 fois supérieure à celui du fructose soit 4,4% et 1,8% respectivement.

Le 4-TFMeOPBA obtient la meilleure sélectivité d'extraction avec un rapport de 11,4. Parmi les acides testés, le 4-TFMeOPBA est celui présentant le moins d'encombrement à proximité du bore et des groupements hydroxyles. Or un substituant volumineux près du bore diminue son acidité à cause d'une inhibition stérique à la formation du tétraèdre autour de l'atome bore.

L'étude des valeurs de rendement et de vitesses initiales d'extractions du D-fructose a permis de sélectionner le 4-TFMeOPBA comme l'acide boronique le plus sélectif pour l'extraction du D-fructose.

Cependant, bien que n'étant pas un critère purement scientifique mais plutôt de R&D, le prix doit aussi être pris en compte. Les fourchettes de prix commerciaux par mole sont récapitulées dans le Tableau 20.

Acide boronique	Prix (€/g)
2,3-DCPBA	3000-5000
3,4-DCPBA	
4-TFMeOPBA	
3-NPBA	
3,5-BTFMPBA	5000-10000
3,5-DCPBA	
2,4-DCPBA	
2-TFMPBA	10000-20000
3-TFMPBA	
4-B1nPBA	
4-M21HPBA	20000-50000
2-T5PBA	
2-NNPBA	50000-150000
3,2-carboPBA	

Tableau 20. Prix (€/g) des acides boroniques utilisés pour l'étude. Prix au 1<sup>er</sup> juin 2017 chez Sigma.

Ainsi, parmi les acides présentant une bonne sélectivité pour le fructose et un rendement d'extraction satisfaisant, nous avons pris en compte le critère prix pour le sélectionner. Le 3,4-DCPBA permet une bonne sélectivité pour le D-fructose (6,2, Tableau 19). Il a également été mis en évidence un rendement d'extraction de 46% atteint en 30 minutes dans le cas d'un milieu exclusivement composé de D-fructose et de 23% dans le cas d'un milieu composé d'un mélange 50/50 D-glucose/D-fructose. De plus, il fait partie des acides boroniques appartenant à la gamme de prix la plus faible. Le 4-TFMeOPBA n'est arrivé que plus tard dans les études et n'a donc pu être sélectionné dès le départ. L'acide 3,4-dichlorophénylboronique (3,4-DCPBA) est donc sélectionné pour la suite de l'étude.

### III.2.1.2. Effet de la phase organique

L'objectif de cette partie est de sélectionner la nature du solvant organique constituant la membrane liquide. Le procédé de conversion du glucose en 5-HMF souhaité ne doit pas contenir de solvant jugé « non vert », tel que le THF ou le toluène. Ainsi la recherche du solvant se fait parmi les solvants ayant un impact environnemental et/ou une toxicité faible ainsi qu'une faible miscibilité à l'eau. Quatre solvants organiques sont proposés, il s'agit de la méthylisobutylcétone (MIBC), du méthyl-tert-amyl-éther (TAME), de la 5-méthyl-2-héxanone (5M2H) et du carbonate de diméthyle (DMC). Le premier caractère étudié est la miscibilité à l'eau de chacune de ces phases organiques qui sont récapitulées Tableau 21.

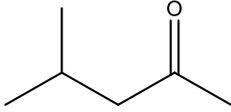
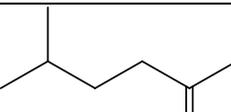
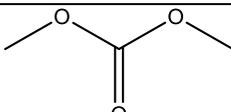
Phase organique	Structure	Miscibilité à l'eau	Source
MIBC (MéthylIsoButylCétone)		18 g/L	[135]
TAME (TertioAmylMéthylEther)		12 g/L	[136]
5M2H (5-Méthyl-2-Hexanone)		5 g/L	[137]
DMC (DiMéthylCarbonate)		139 g/L	[138]

Tableau 21. Solubilité dans l'eau des solvants organiques à 20 °C.

D'après ces données, le carbonate de diméthyle (DMC) ne doit pas être sélectionné car il présente une miscibilité à l'eau plus de 7 fois supérieure aux autres solvants organiques listés. Les trois autres solvants ont donc été testés afin de déterminer si leur nature a une influence sur la cinétique et le rendement d'extraction du D-fructose.

Ainsi, une phase aqueuse constituée de 600 µl de tampon Tris-HCl à 100 mM de pH = 8,5 contenant initialement 100 mM de D-fructose est mis en contact avec une phase organique de 600 µl formée soit de MIBC, de TAME ou de 5M2H et contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> (contre-ion). Le tout est porté à 70°C et agité à 750 rpm pendant 90 minutes. Une série expériences témoins, dans les mêmes conditions mais ne contenant ni acide boronique ni contre-ion est aussi menée. Le suivi de la concentration en D-glucose et D-fructose dans la phase aqueuse est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. Les résultats sont présentés dans la Figure 59.

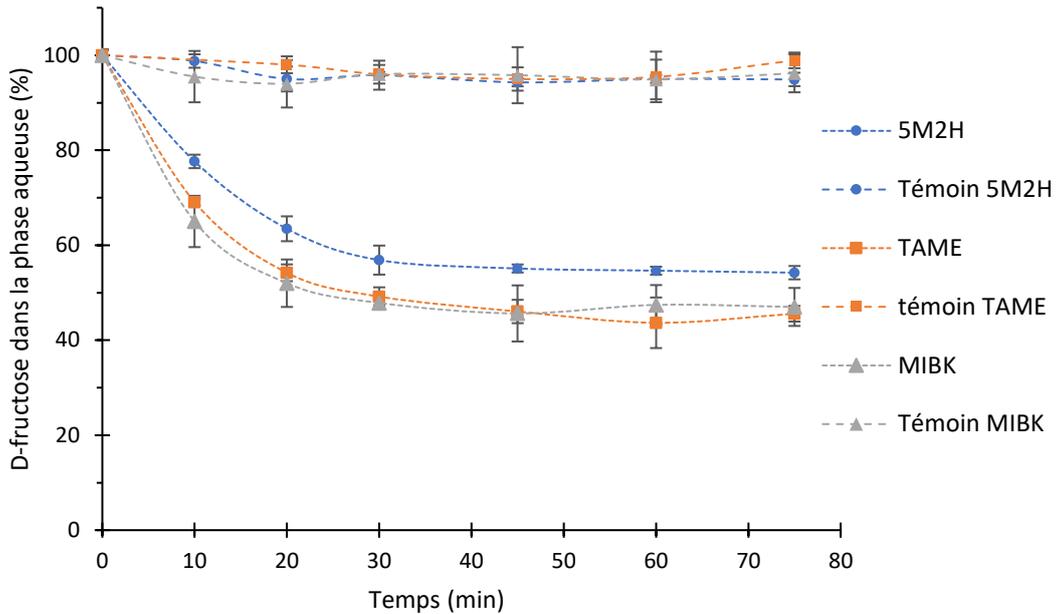


Figure 59. Evolution de la composition en D-fructose de la phase aqueuse donneuse.  $V_{aq}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl  $\text{pH} = 8,5$   $100\text{mM}$ ),  $[D-Fru]_i=100 \text{mM}$ ,  $V_{org}=600 \mu\text{l}$  (MIBC, TAME ou 5M2H),  $[3,4\text{-DCPBA}]=100 \text{mM}$ ,  $[Aliquat336^{\text{®}}]=200 \text{mM}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$ ,  $750 \text{rpm}$ . (Expérience C)

Une première analyse des résultats montre une diminution du taux de D-fructose dans la phase aqueuse donneuse avec un maximum d'extraction de 6%, montrant l'inefficacité du solvant seul à pouvoir extraire le fructose en l'absence de transporteur.

Concernant les expériences d'extraction avec T et coT, il est observé, et ce quel que soit le solvant organique utilisé, que la quantité de D-fructose dans la phase aqueuse diminue durant les 30 premières minutes puis se stabilise. Lorsque le solvant 5M2H est utilisé, l'extraction finale, à 75 minutes, n'est que de 45,8%. Lorsque le TAME et le MIBC sont utilisés, 54,4% du fructose initial sont extraits. Ainsi, le TAME et le MIBC présentent un comportement similaire vis-à-vis de l'extraction du D-fructose. Le choix du solvant organique se portera donc sur le MIBC ou le TAME qui permettent les meilleurs rendements d'extraction.

Un paramètre important est la température d'ébullition du solvant organique. La température d'ébullition du TAME est de  $86,3^{\circ}\text{C}$ <sup>[136]</sup> et celle du MIBC d'environ  $117^{\circ}\text{C}$ .<sup>[135]</sup> Comme l'objectif final est de mettre en œuvre cette étape au sein d'un procédé multiphasique avec des températures pouvant atteindre au maximum  $100^{\circ}\text{C}$ . C'est donc le MIBC qui est retenu pour le reste de l'étude. De plus, le MIBC peut être obtenu à partir de la biomasse (par exemple par une approche en cascade biologique/chimique), ce qui lui donne l'avantage d'être un solvant potentiellement biosourcé.<sup>[139]</sup>

### III.2.1.3. Effet du MIBC sur l'activité de la glucose isomérase

Dans le cadre de la mise en œuvre simultanée de la glucose isomérase immobilisée (IGI) et de l'extraction du D-fructose, l'impact de la présence du solvant organique, le MIBC, sur l'activité de l'enzyme doit être déterminé.

L'étude (expérience D) est réalisée avec une masse d'IGI de 15 mg et 100 mM de D-glucose dans un 1 ml de tampon Tris-HCl 100 mM pH = 8,5 qui est mis en contact avec 500  $\mu$ l de MIBC. Une expérience témoin est réalisée sans MIBC. Le tout est porté à 70 °C et agité à 750 rpm pendant 60 minutes. Le suivi de la concentration en D-glucose et D-fructose dans la phase aqueuse est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. En Figure 60 est présentée la concentration en D-glucose en fonction du temps pour chaque échantillon.

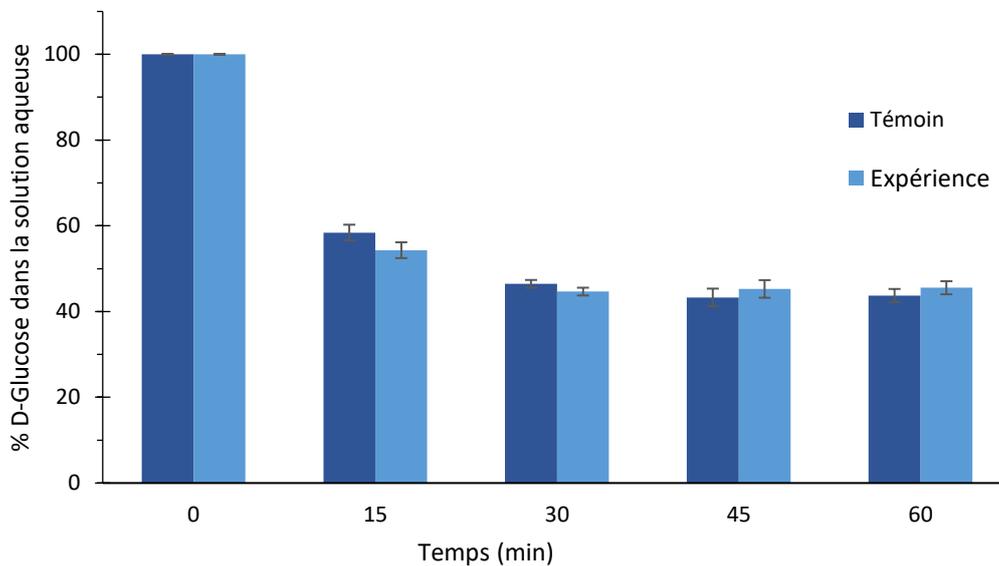


Figure 60. Evolution du taux de D-glucose dans la phase aqueuse au cours du temps.  $V_{aq}=1$  mL (Tris-HCl pH = 8,5 100mM),  $[D-Glc]_i=1$  M,  $V_{org}=500$   $\mu$ l (MIBC), 70°C, 750 rpm. (expérience D)

L'expérience témoin dans le tampon Tris-HCl, sans MIBC, présente un taux de D-glucose après 15 minutes de réaction de 58,4%. Ce taux se stabilise à 43,0% après 30 minutes. L'expérience menée dans le système biphasique présente un taux de D-glucose en phase aqueuse après 15 minutes de réaction de 54,3%. Ce taux se stabilise à 45,0% après 30 minutes. L'expérience dans le tampon Tris-HCl au contact du MIBC montre un rendement d'isomérisation à 15 minutes inférieur de 4,1pp à celui de l'expérience témoin. Cet écart n'est pas significatif. La valeur atteinte au plateau est identique pour les deux expériences (un écart non significatif de 2%). En conclusion, la présence de MIBC en contact avec la phase aqueuse permet d'atteindre de la même manière l'équilibre thermodynamique d'isomérisation.

#### III.2.1.4. Développement de la membrane liquide

Le transport d'une espèce à travers une membrane liquide composée d'un solvant organique MIBC à l'aide du transporteur est dépendant de plusieurs étapes : <sup>[140],[116],[141]</sup>

- 1) La diffusion du substrat jusqu'à l'interface phase aqueuse/membrane liquide
- 2) Réaction entre le substrat et le transporteur, formation du complexe
- 3) Diffusion du complexe au travers de la membrane liquide
- 4) Hydrolyse du complexe et relargage du substrat dans la phase aqueuse réceptrice
- 5) Diffusion du substrat dans la phase réceptrice

Afin de développer la membrane liquide pour le transport du fructose, l'effet de différents paramètres potentiellement influents sur les différentes étapes listées ci-dessus est étudié. Il s'agit du ratio molaire transporteur/contre ion (T/coT), du ratio molaire fructose/transporteur, de la concentration des espèces dans la membrane liquide et de la température.

##### III.2.1.4.1. Effet du rapport molaire T/coT

L'effet du rapport molaire « T/coT » c'est-à-dire du ratio entre le transporteur (3,4-DCPBA) et le contre-ion (Aliquat336<sup>®</sup>) sur le rendement et la vitesse initiale d'extraction est examiné. L'étude s'effectue à une concentration fixe en transporteur (T) et variable en cotransporteur (coT).

L'expérience E est menée dans 600 µl de tampon Tris-HCl à 100 mM pH = 8,5 contenant initialement 100 mM de D-fructose porté au contact d'une phase organique de 600 µl formée par du MIBC, contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et l'Aliquat336<sup>®</sup> en concentration initiale variable de 50 à 400 mM. Cela correspond à un rapport molaire T/coT de 1/0,5 à 1/4. Le tout est porté à 70°C et agité à 750 rpm pendant 90 minutes. Les expériences témoins diffèrent par la composition de la phase organique qui ne contient ni acide boronique ni contre-ion. Le suivi de la concentration en D-fructose dans la phase aqueuse est réalisé par prélèvement au cours de l'expérience et analyse HPLC de l'échantillon. Le résultat est présenté Figure 61. A partir de ces valeurs, le rendement d'extraction et la vitesse initiale d'extraction sont calculés et présentés Tableau 22.

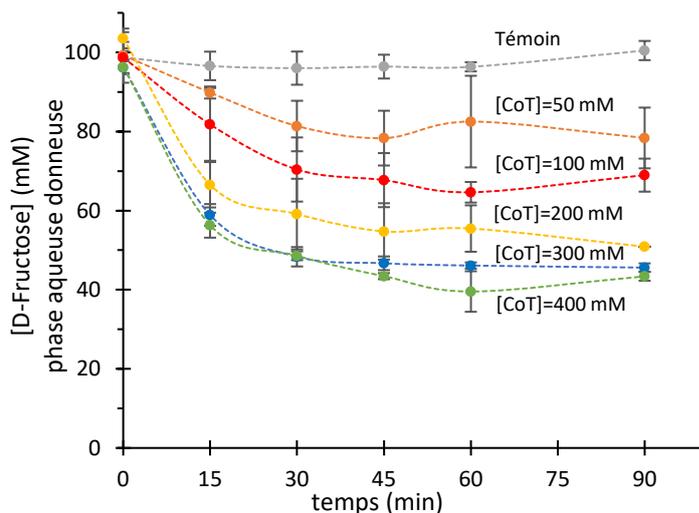


Figure 61. Evolution de la concentration en D-fructose de la phase aqueuse donneuse au cours de l'extraction.  $V_{aq}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl pH = 8,5 100mM),  $[D-Fru]_i=100 \text{ mM}$ ,  $V_{org}=600 \mu\text{l}$  (MIBC),  $[3,4\text{-DCPBA}]=100 \text{ mM}$ ,  $[Aliquat336^{\text{®}}]=50 \text{ à } 400 \text{ mM}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$ ,  $750 \text{ rpm}$ . (Expérience E)

T/CoT	Vitesse initiale d'extraction ( $\mu\text{mol}/\text{min}$ )	Rendement extraction (%)
0/0	0,09	3,4
1/0,5	0,38	16,8
1/1	0,68	34,3
1/2	1,48	46,5
1/3	1,49	52,1
1/4	1,60	58,9

Tableau 22. Vitesses initiales d'extraction et rendements d'extraction pour différents rapports molaires T/coT. (Expérience E)

Quelles que soient les concentrations en cotransporteur Aliquat336<sup>®</sup>, le profil des courbes (Figure 61) est similaire ; une concentration en D-fructose dans la phase aqueuse donneuse qui diminue jusqu'à 30 minutes puis se stabilise, entraînant l'apparition d'un plateau. La valeur de ce plateau atteint par la concentration en D-fructose dans la phase aqueuse diffère en fonction de la concentration en coT Aliquat336<sup>®</sup> introduite.

Ces valeurs de concentrations en D-fructose permettent de calculer les vitesses initiales d'extraction et les rendements d'extraction (Tableau 22). La valeur de la vitesse initiale d'extraction augmente avec la concentration en coT Aliquat336<sup>®</sup> de 0,38 à 1,48  $\mu\text{mol}/\text{min}$  pour des rapports molaires « T/coT » allant de 1/0,5 à 1/2 respectivement. Cependant pour les rapports 1/2, 1/3 et 1/4 la vitesse initiale d'extraction reste similaire, 1,48, 1,49 et 1,60  $\mu\text{mol}/\text{min}$  respectivement. L'étude du rendement d'extraction du D-fructose affiche une augmentation de 0 à 30 minutes suivie d'un plateau jusque 90 minutes. La valeur atteinte à 60 minutes augmente en fonction de la concentration en coT Aliquat336<sup>®</sup> initialement introduite pour des rapports molaires de 1/0,5 à 1/2 allant de 16,8% à 46,5%. Cependant pour les rapports 1/2, 1/3 et 1/4 le rendement final d'extraction reste similaire, 46,5%, 52,1% et 58,9% respectivement.

Les résultats montrent un rendement d'extraction croissant suivi d'un plateau après 30 minutes de réaction pour toutes les concentrations. Plus la concentration en cotransporteur est importante plus le rendement et la vitesse initiale d'extraction sont élevés. Ce résultat est expliqué par le phénomène de formation de paires d'ions entre le complexe [D-fructose-3,4-

DCPBA]<sup>-</sup> et le contre-cation du cotransporteur à l'interface des phases aqueuse et organique, permettant le passage du complexe dans la phase organique.<sup>[121],[114],[117],[142],[120]</sup> Plus il y a de contre-ion dans le milieu et donc à l'interface, plus la rencontre entre les deux espèces est rapide et améliore la vitesse d'extraction. Ceci est valable jusqu'au rapport 1/2 après lequel le rendement d'extraction ainsi que la vitesse initiale n'évoluent plus. Cette valeur limite de concentration en contre-ion peut s'expliquer par le fait que l'extraction du fructose dépend de sa réaction avec le transporteur. Or les concentrations en fructose en transporteur étant fixes, c'est elles qui deviennent limitantes dans la réaction de transport.<sup>[122]</sup>

Le rapport 1/2 a donc été choisi pour les études suivantes.

#### III.2.1.4.2. Effet du rapport molaire D-fructose/3,4-DCPBA

Dans le but de parvenir à un système mettant en œuvre simultanément l'isomérisation du D-glucose et l'extraction du D-fructose formé, il est nécessaire de connaître l'influence de la quantité initiale de D-fructose présent dans la phase aqueuse donneuse sur l'efficacité d'extraction du D-fructose dans la phase organique. Lors de cette étude, le rapport molaire transporteur/contre-ion d'une valeur de 1/2 déterminé précédemment est conservé.

L'expérience F est menée dans un système biphasique « liquide / liquide » constitué de 600 µl de tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5 contenant initialement 25 mM à 1M de D-fructose et d'une 600 µl de MIBC, contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. Soit un rapport molaire D-Fru/3,4-DCPBA variant de 0,25/1 à 10/1. Le tout est porté à 70°C et agité à 750 rpm pendant 90 minutes. Les expériences témoins diffèrent par la composition de la phase organique qui ne contient ni acide boronique ni contre-ion. Le suivi de la concentration en D-fructose dans la phase aqueuse est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. A partir de ces valeurs, le rendement d'extraction et la vitesse initiale d'extraction sont calculés et présentés Figure 62.

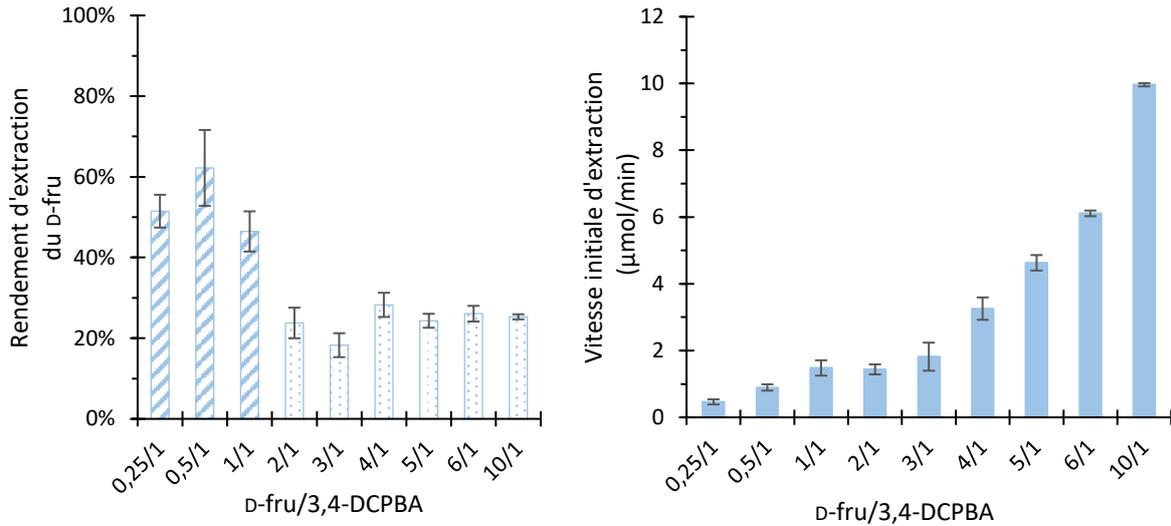


Figure 62. Rendements d'extraction en fonction du temps pour différents rapports molaires D-Fru/3,4-DCPBA. (Gauche). Vitesse initiales d'extraction en fonction du rapport molaire D-Fru/3,4-DCPBA droite)  $V_{aq}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl pH = 8,5, 100mM),  $[D-Fru]_i=25 \text{ mM}$  à 1 M,  $V_{org}=600 \mu\text{l}$  (MIBC),  $[3,4-DCPBA]=100 \text{ mM}$ ,  $[Aliquat336^{\text{®}}]=200 \text{ mM}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$ , 750 rpm. (Expérience F)

La valeur du rendement d'extraction est comprise entre 18,3% et 28,3% pour des rapports molaires compris entre 2/1 et 10/1. Pour les rapports molaires 0,25/1, 0,5/1 et 1/1, le rendement d'extraction est supérieur à 40%, respectivement 51,2%, 62,2% et 46,5%.

La vitesse initiale d'extraction augmente lorsque la quantité de D-fructose augmente. Pour les rapports supérieurs ou égaux à 2/1 la corrélation est représentée Figure 63.

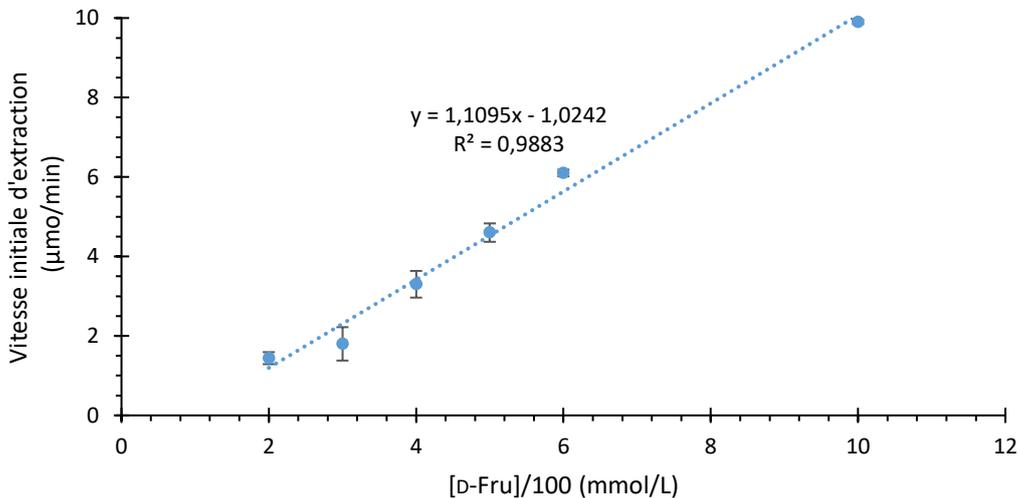


Figure 63. Corrélation entre la vitesse initiale d'extraction calculée et la concentration initiale en D-Fru.

La vitesse initiale d'extraction augmente linéairement (Figure 63) en fonction de la concentration en D-fructose initialement introduite pour les rapports supérieurs à 2/1 et une concentration fixe en 3,4-DCPBA et Aliquat336<sup>®</sup>. L'examen des vitesses initiales montre une augmentation corrélée à la concentration initiale en D-fructose lorsque ce dernier est introduit

en excès par rapport au transporteur. Ce résultat est en accord avec le déroulement de la réaction d'extraction à l'interface entre la phase aqueuse donneuse et la phase organique. En effet, plus le D-fructose est introduit en quantité importante dans la phase aqueuse, plus sa présence à l'interface sera rapide (effet de concentration) et il pourra être complexé par le transporteur puis extrait dans la phase organique.

Pour les études suivantes, afin de minimiser la consommation en réactifs et maximiser le transport du D-fructose, un rapport D-Fru/3,4-DCPBA de 1/1 a été choisi. Ce rapport permet également d'avoir une vitesse d'extraction proche de celle du rapport 2/1.

#### III.2.1.4.3. Effet de la concentration des espèces

L'effet de la nature et du rapport molaire entre les différentes espèces, D-fructose, transporteur (3,4-DCPBA) et cotransporteur (Aliquat336<sup>®</sup>), a été déterminé précédemment. L'effet de concentration des espèces sur le rendement d'extraction et la vitesse initiale d'extraction est observé pour une proportion molaire en « D-fructose/3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> » fixée à « 1/1/2 ». Ainsi les concentrations relatives de « 100/100/200 », « 200/200/400 » et « 300/300/600 » sont choisies pour les expériences suivantes.

L'expérience G est menée dans un système biphasique liquide/liquide constitué de 600 µl de tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5 contenant initialement 100 mM à 300 mM de D-fructose et de 600 µl de MIBC, contenant 100 à 300 mM de 3,4-DCPBA et 200 à 600 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. Le tout est porté à 70°C et agité à 750 rpm pendant 90 minutes. Le suivi de la concentration en D-fructose dans la phase aqueuse est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. A partir de ces valeurs, le rendement d'extraction et la vitesse initiale d'extraction sont calculés et présentés Tableau 23.

[D-fructose]	[3,4-DCPBA]	[Aliquat336 <sup>®</sup> ]	Extraction	stdv	V <sub>0</sub>	stdv
mM	mM	mM	%	%	(µmol/min)	(µmol/min)
100	100	200	46,5	4,9	1,48	0,23
200	200	400	32,6	1,2	1,34	0,04
300	300	600	24,8	9,6	2,56	0,52

Tableau 23. Influence de la concentration des espèces constituant le système d'extraction du D-fructose.  $V_{aq}=600 \mu l$  (Tris-HCl pH = 8,5 100mM),  $[D-Fru]_i= 100 \text{ mM à } 300 \text{ mM}$ ,  $V_{org}=600 \mu l$  (MIBC),  $[3,4-DCPBA]=100 \text{ à } 300 \text{ mM}$ ,  $[Aliquat336^{\circledast}]=200 \text{ à } 600 \text{ mM}$ , 70°C, 750 rpm. (Expérience G)

Le rendement d'extraction diminue lorsque la concentration des espèces dans le milieu augmente. Le rendement d'extraction est de 46,5% pour les ratio de concentrations (mM) « [D-fructose]/[3,4-DCPBA]/[Aliquat336] » de « 100/100/200 », de 32,6% pour « 200/200/400 » et de 24,8% pour « 300/300/600 ». La vitesse initiale d'extraction augmente conjointement à l'augmentation des concentrations des espèces dans le système, de 1,48  $\mu\text{mol}/\text{min}$  à 2,56  $\mu\text{mol}/\text{min}$ . L'augmentation des concentrations induit donc une augmentation des vitesses initiales tandis que le rendement d'extraction diminue, conformément à ce qui est attendu.

#### III.2.1.4.4. Effet de la température

L'influence de la température sur le système d'extraction du D-fructose est étudiée dans ce paragraphe dans les conditions optimales déterminées, à savoir un rapport molaire « D-fructose/3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> » de « 1/1/2 ».

L'expérience H est menée dans un système biphasique liquide/liquide de 600  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5 contenant initialement 100 mM de D-fructose et de 600  $\mu\text{l}$  de MIBC, contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. Le tout est porté à 70 °C, 50 °C et 25 °C suivant l'expérience et agité à 750 rpm pendant 60 minutes. Le suivi de la concentration en D-fructose dans la phase aqueuse est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. A partir de ces valeurs, le pourcentage de D-fructose en phase aqueuse donneuse est calculé et présenté Figure 64.

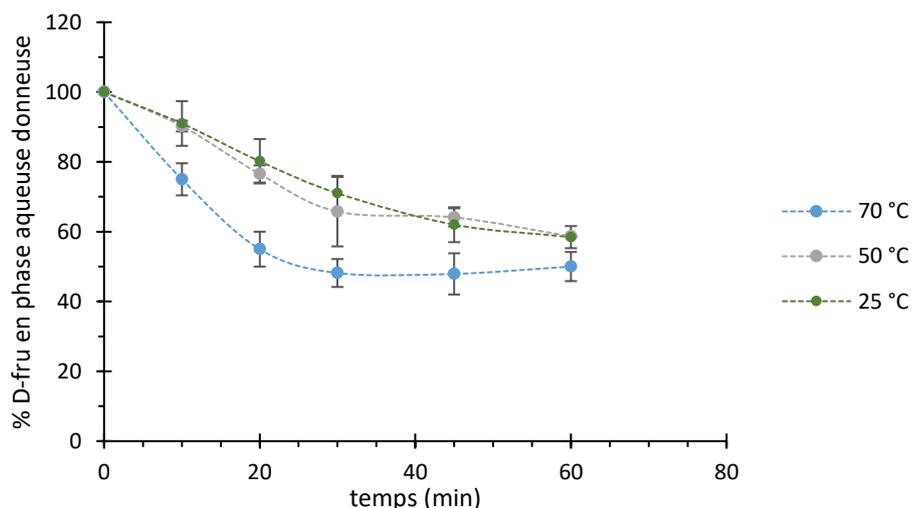


Figure 64. Evolution de la quantité de D-fructose dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps durant l'extraction et en fonction de la température.  $V_{\text{aq}}=600 \mu\text{l}$  (Tris-HCl pH = 8,5 100mM),  $[\text{D-Fru}]_i=100 \text{ mM}$ ,  $V_{\text{org}}=600 \mu\text{l}$  (MIBC),  $[\text{3,4-DCPBA}]=100 \text{ mM}$ ,  $[\text{Aliquat336}^{\text{®}}]=200 \text{ mM}$ , 750 rpm. (Expérience H)

Durant l'extraction, et quelle que soit la température utilisée, la quantité de D-fructose dans la

phase aqueuse donneuse diminue en fonction du temps. Pour l'expérience réalisée à 70°C, la quantité de D-fructose diminue de 0 à 30 minutes jusqu'à 48,2% puis atteint un plateau entre 30 et 90 minutes. Concernant les expériences réalisées à 50 et 25 degrés, la quantité de D-fructose présent dans la phase aqueuse donneuse diminue de 0 à 90 minutes pour atteindre la valeur de 58,7% et 58,4% respectivement.

Pour les températures de 25 et 50 °C, il semble que le plateau ne soit pas encore atteint au bout de 60 minutes de réaction. La température optimale déterminée pour l'isomérisation enzymatique du glucose (partie I.1.1) est de 70°C. Ainsi ces résultats vont dans le sens d'une compatibilité cinétique entre les étapes et donc d'un possible déroulement simultané de l'extraction du D-fructose et de l'isomérisation enzymatique du D-glucose, condition sine qua non pour la bonne intégration de l'isomérisation et de la déshydratation ultérieure.

#### III.2.1.5. Conclusion et discussion, conditions optimales de transport du fructose

Les conditions optimales ( $[D-Fru]_i = 100$  mM, Tris-HCl pH = 8,5 100mM, [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336<sup>®</sup>]=200 mM, MIBC, 70°C, 750 rpm), permettent au rendement d'extraction d'atteindre son maximum à 30 minutes de réaction de 46,5%. La vitesse initiale d'extraction est de 1,48  $\mu\text{mol}/\text{min}$ .

Une étude concernant la nature des espèces contenues dans la phase organique pour le transport de monosaccharides a été réalisée par Karpa *et al.*<sup>[120]</sup> Entre les acides boroniques (PBA et acide diphenylboronique-DPBA) en présence d'Aliquat336<sup>®</sup> dans le 1,2-dichloroéthane à 20 °C, le DPBA permet un rendement maximum d'extraction du fructose depuis une phase aqueuse (tampon phosphate 100 mM) à pH = 8 de 47,9%. Ce rendement est obtenu après seulement 10 minutes de réaction dans le milieu biphasique. Le rendement obtenu est comparable à celui que nous obtenons, cependant le système d'agitation est différent puisque dans l'étude de Karpa une agitation dite « vigoureuse » est utilisée qui induit probablement la formation d'une émulsion et la phase aqueuse est ensuite récupérée après centrifugation. Une méthode d'extraction qui n'est donc pas tout à fait similaire à nos études. Même si la vitesse d'agitation permet une cinétique d'extraction supérieure à celle obtenue dans nos études, dans l'optique d'un procédé comportant deux phases aqueuses séparées par une phase organique cette vitesse ne peut être envisagée sans éviter un mélange des phases aqueuses et organique. Le rendement d'extraction de 47,9%<sup>[120]</sup> est obtenu avec un ratio molaire « D-fructose/DPBA/Aliquat336<sup>®</sup> »

de « 0,6/1/1 » contre un ratio molaire « D-fructose/DPBA/Aliquat336<sup>®</sup> » de « 1/1/2 » dans notre étude. Le système présenté dans notre étude permet alors de travailler à des concentrations en D-fructose plus élevées.

Lee *et al.* ont étudié l'extraction du D-fructose dans un système biphasique eau/kérosène sous forme d'une émulsion avec une phase aqueuse contenant des sels inorganiques.<sup>[122]</sup> L'objectif est d'optimiser l'étape d'extraction du D-fructose avec différents acides boroniques substitués et l'Aliquat336<sup>®</sup>. Un ratio « D-fructose/3,5-BTMPBA(acide 3,5-bis(trifluorométhyl)phénylboronique)/Aliquat336<sup>®</sup> » de « 0,1/1/4 » (concentration molaire) aboutit à 50% d'extraction après 35 minutes à 22°C. Notre système d'extraction est mis en œuvre sans émulsion et est formé par un ratio « D-fructose/3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> » de « 1/1/2 ». Même si nous obtenons une vitesse moins élevée, un rendement comparable est obtenu avec un système d'extraction plus économique en acide boronique et en contre ion.

### III.2.2. Relargage, hydrolyse du complexe [D-fructose-3,4-DCPBA]<sup>-</sup>

La seconde étape du transport est l'hydrolyse du complexe [D-fructose-acide boronique]<sup>-</sup> au contact d'une seconde phase aqueuse dite réceptrice. Cette étape d'hydrolyse permet le relargage du D-fructose dans cette phase (Figure 65). Le paramètre influent pour la réaction d'hydrolyse est le pH de la solution aqueuse qui sera le réservoir des ions H<sup>+</sup> permettant l'hydrolyse. Plusieurs expériences de relargage du D-fructose ont donc été réalisées afin d'étudier l'influence du pH de la phase aqueuse réceptrice sur le relargage.

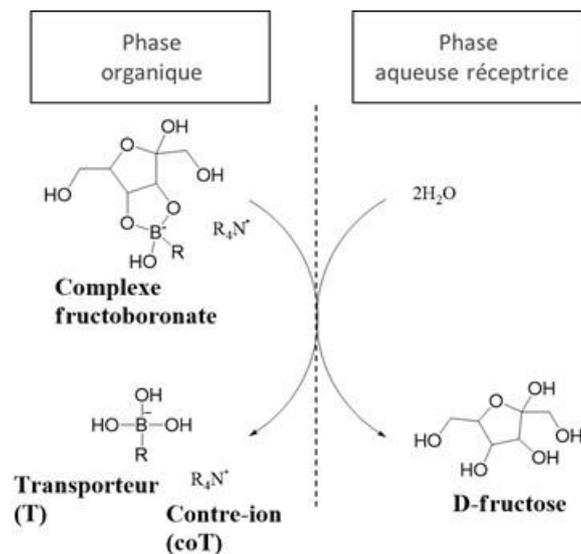


Figure 65. Représentation schématique de la réaction d'hydrolyse du complexe fructoboronate et ainsi du relargage du fructose dans la phase aqueuse réceptrice.

Lors de l'étude, une première étape de transport du D-fructose de la phase aqueuse donneuse (Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5), contenant initialement 100 mM de D-fructose, vers la phase organique contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup> est réalisée. La phase organique est alors soutirée puis mise en contact avec la phase aqueuse réceptrice à différents pH : pH 3 et 5 avec 600 µl de tampon citrate à 100 mM ou pH 8 avec 600 µl de tampon Tris-HCl à 100 mM. Une expérience est également réalisée en remplaçant le tampon par une solution d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 25 mM, permettant d'obtenir un pH de 1. Les phases sont au préalable incubées à 70°C puis mises en contact avec une agitation de 750 rpm. Le rendement de relargage est calculé en suivant la concentration de D-fructose dans la phase aqueuse réceptrice et par différence avec la concentration de D-fructose restante dans la phase aqueuse donneuse après extraction. Le rendement de cette dernière étape de transport est présenté Figure 66.

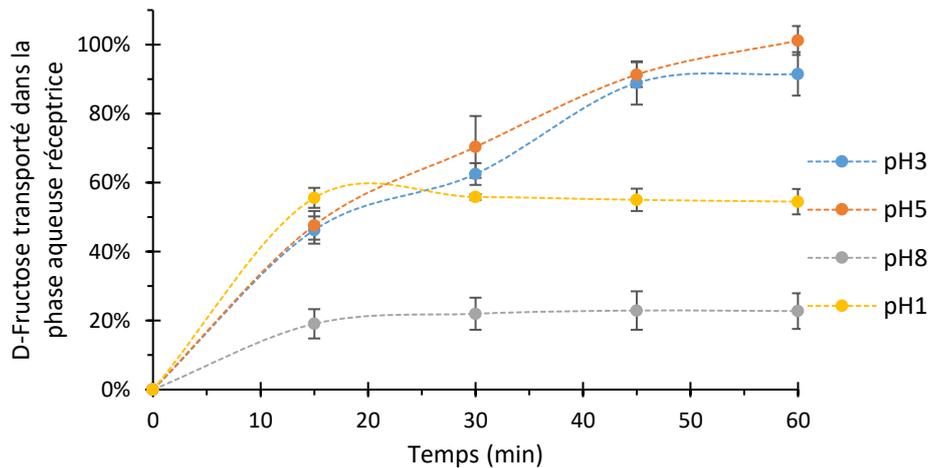


Figure 66: Influence du pH de la phase aqueuse réceptrice sur la réaction d'hydrolyse de l'ester boronique.

Les phases aqueuses à pH 5 et 3 permettent un transport de plus de 90% du D-fructose présent dans la phase organique. La phase aqueuse à pH = 8 permet un transport limité à 20% du D-fructose présent dans la phase organique. La phase aqueuse réceptrice est paramétré à pH = 1 par ajout d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> permet un transport rapide et comparable à celui obtenu avec les pH 3 et 5 sur les 15 premières minutes mais ensuite la concentration en D-fructose dans la phase aqueuse se stabilise. L'analyse de la phase aqueuse réceptrice a permis de mettre en évidence la présence d'acide formique, d'acide lévulinique et de 5-HMF dans l'expérience à pH = 1. Les deux premiers sont obtenus par réhydratation du 5-HMF, lui-même obtenu par déshydratation du D-fructose en conditions acides. Nous montrons donc qu'un catalyseur acide unique peut réaliser l'hydrolyse du complexe et la déshydratation du fructose en 5-HMF. Cependant, un manque de stabilité du 5-HMF formé a été mis en évidence dans ces conditions.

Dans cette partie, l'objectif est de sélectionner les conditions les plus adaptées au système d'hydrolyse du complexe, permettant le relargage du D-fructose dans la phase aqueuse réceptrice. Les meilleurs rendements de transport sont obtenus aux pH = 3 et 5. Par conséquent, les conditions expérimentales sélectionnées sont un tampon citrate de sodium à 100 mM à pH = 3. A 70 °C, le rendement de relargage est de 91,5%. Ce rendement montre que l'hydrolyse de l'ester boronique n'est pas le facteur limitant du transport du fructose.<sup>[120],[116]</sup>

### III.3. Réaction de déshydratation

Après extraction du D-fructose dans la phase organique puis relargage dans la phase aqueuse réceptrice, l'étude de sa déshydratation par catalyse acide pour former le 5-HMF est réalisée. L'utilisation de catalyseurs acides solides permet la facilitation de la séparation et du recyclage, de traitement des déchets et des risques liés à la manipulation et au chauffage d'acides forts sous forme liquide.<sup>[143],[107],[144]</sup> La stabilité des résines sulfoniques dans le temps et en température devra néanmoins être validée ultérieurement. Le type de catalyseur de déshydratation sélectionné pour cette étude est une résine acide, plus particulièrement une résine sulfonique greffée sur un support solide. L'étude de la réaction de déshydratation du fructose débute par l'étude de l'effet de la température sur le rendement et la sélectivité de la réaction pour ensuite déterminer le rapport massique résine/D-fructose. Enfin, l'étude se termine par l'étude de l'effet du pH sur l'efficacité de la réaction.

Les résines étudiées sont listées dans le Tableau 24.

Résine	Abréviation
Dowex650C	R1
AmberliteIR120	R2
Dowex50wx8	R3
Amberlyst15H	R4

Tableau 24. Résines utilisées pour la réaction de déshydratation du fructose et abréviations correspondantes.

#### III.3.1. Effet de la température

Il existe une corrélation entre la température de la réaction et la durée nécessaire à la conversion du fructose.<sup>[145]</sup> Par exemple, à 150°C dans l'eau, la durée nécessaire pour la conversion d'un minimum de 20% du fructose se situe entre 1 h et 5 h alors qu'à 270°C elle est de 10 s.<sup>[146],[145].</sup><sup>[89]</sup> L'énergie d'activation nécessaire à la formation du 5-HMF est supérieure à celle nécessaire pour sa dégradation, impliquant que le rendement maximum de formation possible augmente lorsque avec la température.<sup>[145],[147]</sup> La vitesse de formation du 5-HMF augmente avec la proportion de la forme acyclique du fructose qui augmentent avec la température. Si le 5-HMF est stable dans le solvant considéré, tout semble aller dans le sens de l'utilisation de la température la plus haute possible.

La température optimale pour la réaction de déshydratation par les résines est ici étudiée. Le milieu étant aqueux, cette température ne peut dépasser la valeur de 100°C à pression atmosphérique. Afin de se placer dans les conditions les plus favorables à la formation du 5-HMF, les températures de 70°C, 80°C et 90°C sont envisagées.

L'expérience est menée dans 100 mL d'eau contenant initialement 500 mM de D-fructose et une quantité de résine correspondante à 3 équivalents de fructose en sites acides (voir chapitre II, partie II.2). La réaction est réalisée à 70°C, 80°C et 90°C et agitée à 200 rpm pendant 7h30. Le suivi de la concentration en 5-HMF est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. A partir de ces valeurs, le rendement en 5-HMF est calculé et présenté Figure 67.

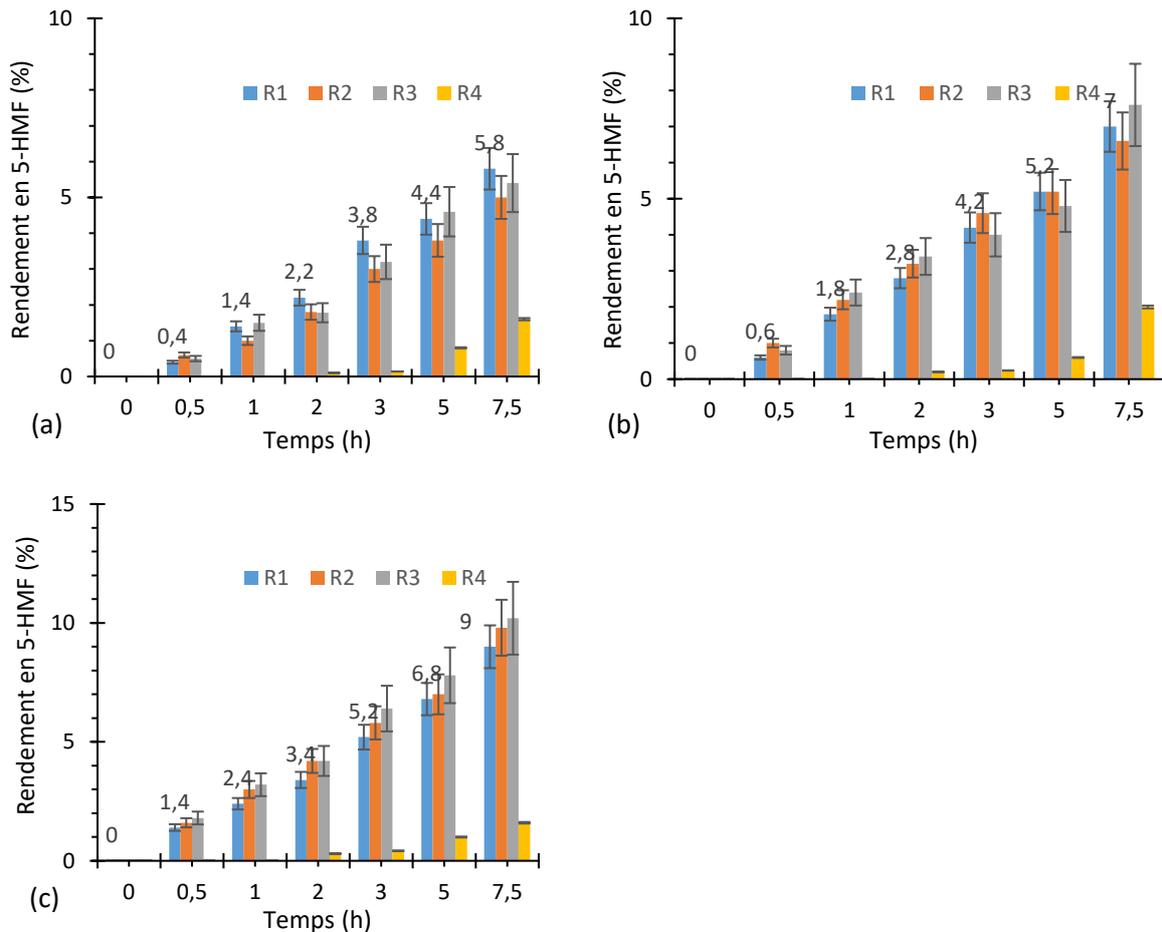


Figure 67. Rendement en 5-HMF en fonction du temps pour les différents catalyseurs : R1, R2, R3, R4. (a) 70°C, (b) 80°C, (c) 90°C.

Concernant les résines R1, R2 et R3, quelle que soit la température, le rendement en 5-HMF augmente en fonction du temps. A 70°C après 7h30 de réaction, le rendement en 5-HMF pour les catalyseurs R1, R2 et R3 est compris entre 5,0% et 5,8%. A 80 °C, ce même rendement est compris entre 6,6% et 7,6% et entre 9,0% et 10,2% à 90°C. La résine R4, quant à elle, affiche un rendement 6 fois plus faible avec un rendement maximal de 2,0% après 7h30 de réaction atteint à 80 °C. La résine R4 est écartée de la sélection de résine pour la suite des expériences.

Après 15h d'expérience à 90°C, les billes de résines présentent une coloration brune visible Figure 68.



Figure 68. Résine R1 après 15h de déshydratation à 90°C, (gauche) et à 80°C (droite).

Cette coloration peut s'expliquer par la formation d'humines lors de l'expérience.<sup>[82,109],[106]</sup> Ces humines sont alors susceptibles de recouvrir la résine. Le matériel se recouvre d'une fine couche d'oligomère à sa surface, diminuant son efficacité catalytique. La température de 90 °C permet une augmentation du rendement de 2,6pp mais la formation d'humines diminue la sélectivité de la réaction en 5-HMF. Ainsi, dans le but d'optimiser à la fois le rendement en 5-HMF et la sélectivité de la réaction, les expériences suivantes sont réalisées à 80 °C.

L'utilisation d'une résine échangeuse d'ion à 80°C a déjà été rapportée par Kröger *et al.* pour la déshydratation de fructose en 5-HMF au sein d'un procédé de production d'acide 2,5-furanedicarboxylique.<sup>[148]</sup> Une étape du procédé est la déshydratation du fructose en 5-HMF en phase aqueuse par la Lewatit SPC108 à 80°C. Cette déshydratation réalisée avec une concentration initiale en fructose de 55 mM mène à un rendement en 5-HMF de 12%. Cependant le 5-HMF n'est qu'un intermédiaire et le produit final est l'acide lévulinique avec un rendement de 79%.

### III.3.2. Effet du rapport massique résine/D-Fru

La quantité de résine optimale pour la réaction de déshydratation est étudiée. La quantité de résine est directement liée à la quantité d'acide introduite par le nombre de sites actifs par lequel l'échange peut se faire. Pour exemple, la résine R1 a une capacité de 3 meq/g. C'est-à-dire que pour un gramme de résine, 3 meq de H<sup>+</sup> sont présents soit 3 mmol de H<sup>+</sup>. Ainsi il est possible de calculer la masse de résine à introduire pour un nombre de moles de H<sup>+</sup> souhaité. L'objectif est de tester trois rapports massiques « résine/D-Fru » : « 1/1 », « 2/1 », et « 3/1 ».

L'expérience est menée dans 100 mL d'eau contenant initialement 500 mM de D-fructose et une quantité de résine correspondante à 3 équivalents  $H^+$  de fructose, 2 équivalents  $H^+$  et 3 équivalents  $H^+$  de fructose (voir chapitre II, partie II.2.). La réaction est réalisée à 80 °C et agitée à 200 rpm pendant 7h30. Le suivi de la concentration en 5-HMF est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. A partir de ces valeurs, le rendement en 5-HMF est calculé et présenté Figure 69.

Les valeurs de rendement sont globalement faibles et il conviendra d'être conscient de la difficulté de comparaison entre des valeurs proches en prenant bien en compte les valeurs d'incertitudes présentes sur les histogrammes.

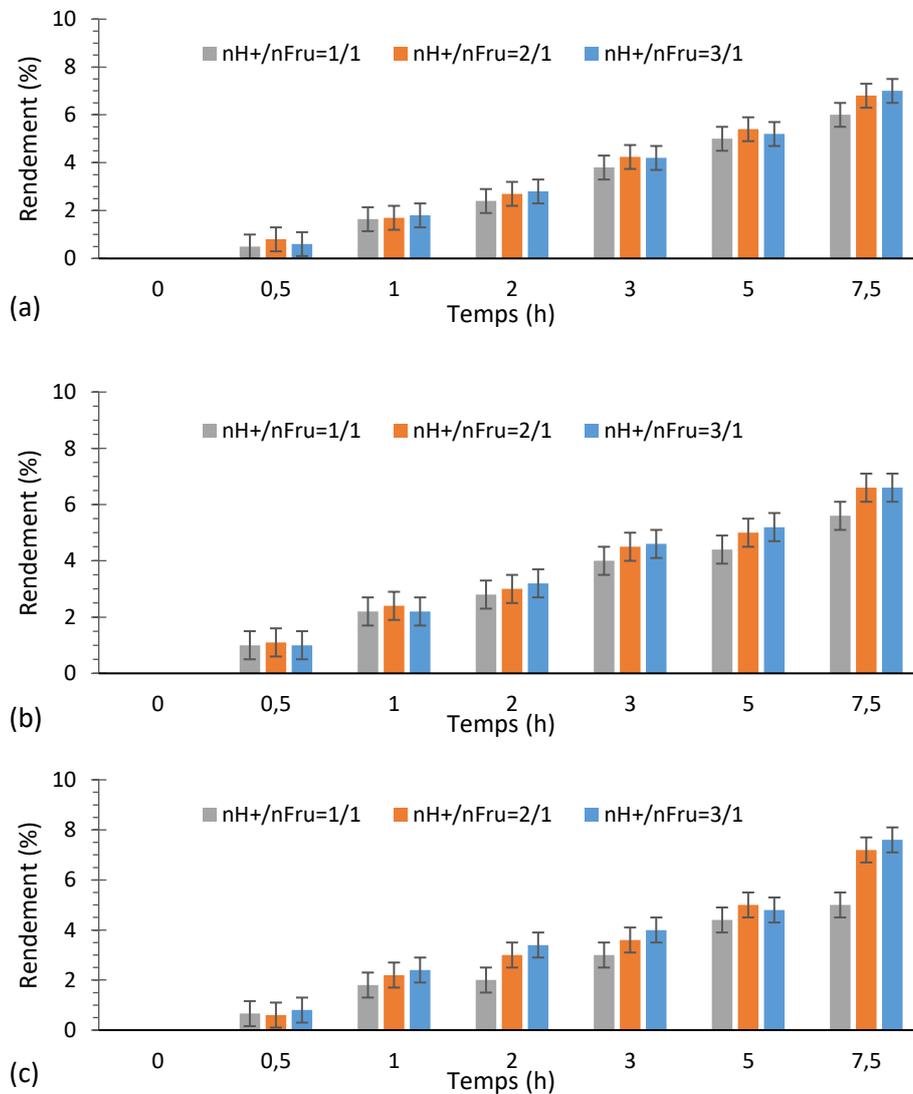


Figure 69. Rendement de la réaction de déshydratation en fonction du temps pour différents rapports molaires  $H^+$ /fructose. (a) résine R1, (b) résine R2, (c) résine R3.

Les profils de rendement en fonction du temps pour les différentes masses de résines introduites

sont similaires. Après 7h30 de réaction, le rendement pour le rapport masse résine/masse fructose de 1/1 est inférieur aux deux autres rapports massiques avec des rendements compris entre 5 et 6%. Les rendements à 7h30 pour les différentes résines et les rapports massiques 2/1 et 3/1 sont compris entre 6,6% et 7,6%.

La résine R1 est sélectionnée pour la suite des expériences, pour un rapport massique résine/D-fructose de 3/1.

### III.3.3. Effet du pH du milieu réactionnel

L'expérience est menée dans 100 ml d'eau ou de tampon citrate à 100 mM et pH = 3 contenant initialement 500 mM de D-fructose et une quantité de résine correspondante à 3 équivalents  $H^+$  de fructose, (voir chapitre 2, partie II). La réaction est réalisée à 80°C et agitée à 200 rpm pendant 7h30. Le suivi de la concentration en 5-HMF est réalisé au cours de l'expérience par HPLC. A partir de ces valeurs, le rendement en 5-HMF est calculé et présenté Figure 70.

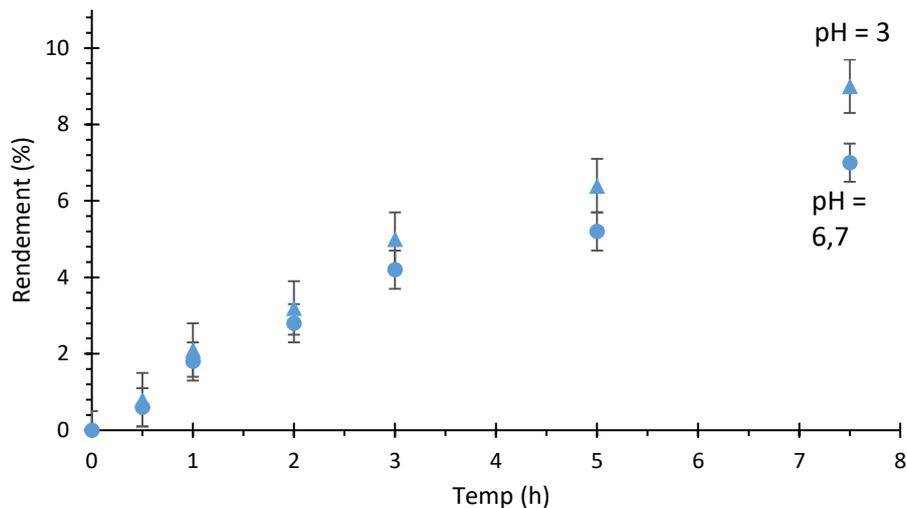


Figure 70. Rendement en 5-HMF en fonction du temps pour un pH = 3 (triangle) et un pH = 6 (rond)  $[D-Fru]_i=500$  mM,  $V_{aq}=100$  mL, 80 °C, 200 rpm.

Quel que soit le pH de la phase aqueuse, le rendement en 5-HMF augmente en fonction du temps. Après 7h30 d'expérience, le rendement dans le milieu à pH = 3 est supérieur à celui obtenu dans le milieu à pH 6,7, soit 9,2% et 7,1% respectivement.

L'étude des conditions de relargage du D-fructose nous a menés à la sélection du pH = 3 pour la phase aqueuse réceptrice, valeur de pH en accord avec le pH déterminé pour la déshydratation du D-fructose, réactions toutes deux acido-catalysées.

Les conditions de déshydratation retenues sont l'utilisation de la Dowex<sup>®</sup>Monosphere<sup>®</sup>650C à la température de 80°C, pour un rapport massique « résine/fructose » de « 3/1 » dans une phase aqueuse tamponnée à pH = 3. Qi *et al.* ont obtenu un rendement en 5-HMF de 73,4% en utilisant la Dowex50wx8 (rapport massique résine/fructose=2/1) dans un mélange acétone/eau chauffé à 150 °C par micro-ondes durant 10 minutes.<sup>[89]</sup> Le rendement obtenu est 8 fois supérieur à celui obtenu dans notre étude. D'une part, il apparaît que la présence d'un cosolvant (acétone, DMSO, 1-méthyl-2-pyrrolidinone) ajouté dans l'eau augmente le rendement de la réaction de déshydratation.<sup>[89],[149]</sup> De plus la présence d'un solvant d'extraction (par exemple le butan-1-ol) du 5-HMF permet également d'augmenter le rendement.<sup>[149]</sup> D'autre part, l'utilisation de la résine acide dans un solvant organique type DMSO permet d'obtenir sélectivement le 5-HMF avec un rendement acceptable. La déshydratation du fructose consiste en 3 cycles de 3 étapes : protonation, déshydratation, déprotonation. Zhou *et al.* ont prouvé, par suivi RMN, que l'eau facilite le transfert de proton et bloque les réactions secondaires (formation de levoglucosenone) lors de la déshydratation du fructose catalysée par P-BnNH<sub>3</sub>Cl dans DMSO/D<sub>2</sub>O (12 %vol).<sup>[147]</sup> Nakamura *et al.* ont obtenu un rendement en 5-HMF de 90% à 80°C et après 8h30 de réaction en utilisant le DIAION PK-216 dans le DMSO avec un rapport massique résine/fructose de 1/2,5.<sup>[99]</sup> Le DMSO, en tant que solvant polaire aprotique, prévient la formation d'acide lévulinique et d'humines. Cependant son utilisation entraîne des difficultés de séparation et purification. Ainsi, ces différentes études montrent que l'ajout d'un cosolvant, l'augmentation de la température, l'utilisation de micro-ondes pourraient permettre d'améliorer de façon significative le rendement en 5-HMF qui reste relativement faible dans notre étude. Cependant, le procédé final que nous envisageons présente deux contraintes importantes : (i) il ne permet pas une augmentation de la température à une température supérieure à la température d'ébullition de l'eau, (ii) il ne permet pas l'ajout d'un cosolvant miscible à la phase organique pour éviter sa diffusion dans la phase aqueuse contenant l'enzyme, pouvant potentiellement entraîner son inactivation.

### III.4. Conclusion

La première étape du procédé de synthèse du 5-HMF est l'isomérisation enzymatique du D-glucose par la glucose isomérase Sweetzyme<sup>®</sup> IT Extra (IGI). L'étude de l'activité de l'enzyme immobilisée, en fonction de la température, du pH et du rapport Enzyme/Substrat est réalisée dans le but de maximiser le rendement d'isomérisation du D-glucose. La température optimale à pH = 7,5 est de 70°C avec une concentration initiale en glucose de 100 mM et une masse d'IGI de 10 mg. Cependant, dans l'optique du fonctionnement simultané des différentes étapes du procédé, la réaction d'isomérisation sera réalisée conjointement à l'extraction du fructose vers la phase organique. Ces deux étapes (isomérisation et extraction) ont donc en commun la phase aqueuse. Or le pH de la phase aqueuse est un paramètre influençant l'efficacité de la réaction d'extraction. En effet, l'extraction du D-fructose par formation d'un complexe [D-fructose-acide boronique]<sup>-</sup> est favorisée si le pH de la solution aqueuse contenant le D-fructose est supérieur au pKa de l'acide boronique. Les pKa des principaux acides boroniques sont inférieurs à 8. Ainsi se placer à un pH de 8,5 favoriserait l'extraction du fructose. D'après les expériences à 70 °C et à pH = 8,5 l'activité relative est supérieure à 80%. C'est donc le couple 70 °C et pH = 8,5 qui est sélectionné.

La seconde étape du procédé de synthèse du 5-HMF exposé ici est le transport D-fructose. Ce transport comporte deux étapes, l'extraction du fructose (complexation du fructose puis extraction du complexe) de la phase aqueuse donneuse vers la phase organique puis le relargage du fructose par hydrolyse du complexe formé vers la phase aqueuse réceptrice.

L'étude des conditions d'extraction du fructose concerne le choix de l'acide boronique, les quantités d'acide boronique et de cotransporteur, les proportions optimales entre acide boronique et contre-ion. L'optimisation repose également sur le choix du solvant organique. Les résultats du criblage en prenant en compte le prix des acides boroniques a orienté notre choix vers l'acide 3,4-dichlorophénylboronique (3,4-DCPBA). Le solvant organique sélectionné est le MIBC, parmi trois solvants organiques testés (MIBC, TAME et 5M2H). L'isomérisation du glucose réalisée en présence de MIBC a permis de valider son utilisation en ne provoquant pas d'inactivation de l'enzyme dans les conditions d'expérience (70 °C, tampon Tris-HCl pH = 8,5 à 100 mM, 2/1 v:v H<sub>2</sub>O/MIBC, 1 h). Le rapport molaire 3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> optimal défini est de 1/2. Le rapport molaire D-fructose/3,4-DCPBA optimal défini est de 1/1. Le rapport molaire défini des espèces D-fructose/3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> est de 1/1/2. Dans ces conditions, l'augmentation des concentrations de

ces espèces provoque une diminution du rendement d'extraction et une augmentation de la vitesse initiale d'extraction. L'effet de la température sur l'extraction a également été étudié et la température a été fixée à 70°C.

La seconde étape du transport est l'hydrolyse du complexe [D-fructose-acide boronique]<sup>-</sup> au contact d'une seconde phase aqueuse dite réceptrice permettant le relargage du D-fructose extrait. Les conditions expérimentales sélectionnées sont un tampon citrate de sodium à 100 mM à pH = 3. A 70 °C, le rendement de relargage est de 91,5%.

La troisième étape du procédé de synthèse du 5-HMF est la déshydratation du D-fructose en 5-HMF dans la phase aqueuse réceptrice. L'étude des conditions optimales de cette étape avec une résine sulfonique repose sur la définition de la température et du pH optimaux, sans toutefois dépasser la température d'ébullition de l'eau, puis la définition du rapport massique résine/D-fructose. L'étude de l'influence de la température sur 4 résines a permis de déterminer que la température optimale en prenant en compte l'ensemble de nos contraintes est de 80 °C. L'étude de la masse de résine à introduire (reliée au nombre de sites acides introduits) par rapport à la masse de fructose initiale a permis de sélectionner le rapport massique 3/1. L'étude de l'effet du pH sur le rendement de déshydratation a mis en évidence un rendement supérieur après 7h30 de réaction à pH = 3 par rapport au pH = 6,7, 9,2% et 7,1% respectivement. Ces études ont permis de déterminer les conditions de déshydratation telles que l'introduction de la résine Dowex<sup>®</sup> Monosphere<sup>®</sup> 650C à la température de 80 °C, pour un rapport massique résine/fructose de 3/1 dans une phase aqueuse tamponnée à pH = 3 ; donnant un rendement de déshydratation de 9,2%.

Ces études sont une étape préliminaire à l'établissement d'un premier système catalytique en cascade mettant simultanément en œuvre les étapes d'isomérisation et de transport du fructose pour s'achever par sa déshydratation. Compte-tenu des premiers rendements obtenus, c'est cette dernière étape qui nécessitera une optimisation ultérieure conséquente.

## Chapitre IV. Système en cascade, vers un système couplé

---

Les conditions physico-chimiques optimales de chacune des étapes (isomérisation, extraction, relargage, déshydratation), prises individuellement, sont exposées dans le chapitre précédent. Ainsi, ce chapitre est dédié dans un premier temps aux résultats obtenus lors d'une mise en œuvre en mode « cascade ». Cette cascade couple les étapes d'isomérisation du glucose et d'extraction du fructose et permet d'établir un premier cycle complet jusqu'à la formation du 5-HMF. Dans un second temps, ce chapitre présente les résultats obtenus par la création d'un premier système où les quatre réactions seront couplées en continu et dépendantes les unes des autres.

## IV.1. Etude du système en mode « cascade » pour la production du 5-HMF

## IV.1.1. Présentation du système

Le système est découpé en 3 étapes physiquement distinctes (Figure 71). La première étape regroupe dans un premier réacteur la réalisation simultanée de la réaction d'isomérisation du D-glucose en D-fructose avec l'extraction de ce dernier vers la phase organique. La seconde étape représente la réaction de relargage du D-fructose dans la phase aqueuse réceptrice et nécessite le transfert de la phase organique dans un second réacteur. Enfin, la troisième étape consiste à suivre la réaction de déshydratation du D-fructose en 5-HMF après avoir retiré la phase organique à l'issue de la seconde étape et introduit le catalyseur.

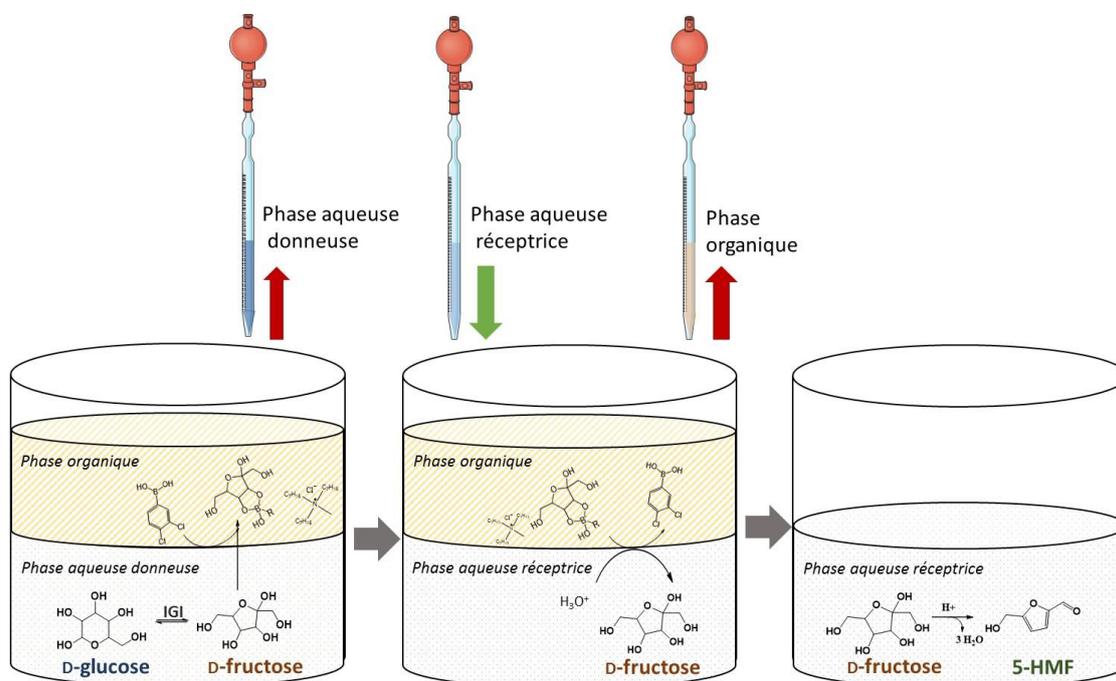


Figure 71. Schéma du système découpé. Phase retirée pour l'étape suivante (flèche rouge), phase introduite (flèche verte).

Ainsi, il sera possible de suivre les concentrations en réactifs et produits et de calculer le taux de conversion de chaque étape puis d'établir le taux de conversion global à partir de la quantité de D-glucose initialement introduite.

## IV.1.2. Première étape : isomérisation et extraction simultanées

La première étape de la cascade consiste en la mise en œuvre simultanée de la réaction d'isomérisation du D-glucose et de l'extraction du D-fructose formé par complexation, depuis la phase aqueuse donneuse vers la phase organique dans les conditions optimales déterminées

dans le chapitre III. La phase aqueuse est ainsi composée de Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5. La phase organique est constituée de MIBC contenant le transporteur (3,4DPCBA) et le cotransporteur (Aliquat336<sup>®</sup>) avec un rapport molaire 1/2 pour des concentrations de 100 et 200 mM respectivement.

#### IV.1.2.1. Mise en œuvre expérimentale et résultats

La première étape est menée dans un système biphasique liquide/liquide constitué d'une phase aqueuse composée de 100 mL de tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5 contenant initialement 100 mM de D-glucose, 8 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 500 mg d'IGI et de 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. Les expériences sont réalisées dans un réacteur Radley<sup>®</sup> de 250 mL thermostaté à 70 °C et agité à 200 rpm. Cette vitesse d'agitation est déterminée comme étant l'agitation maximale sans formation d'une émulsion entre les deux phases liquides. Les concentrations en D-glucose et D-fructose dans la phase aqueuse sont suivies par HPLC durant 3 heures. Ces concentrations permettent de calculer les rendements des différentes réactions de la même façon que dans la partie précédente (Tableau 25).

Temps (h)	Rendement (%)		
	Conversion du D-Glc	Extraction du D-Fru	Extraction du D-Glc
0,3	45,2	65,6	-
1	71,2	52,7	-
3	74,5	56,5	1,56

Tableau 25. Rendements obtenus durant les étapes d'isomérisation et d'extraction menées simultanément.

$V=100$  mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH = 8,5,  $m_{IGI}=0,5$  g,  $[D-Glc]_i=100$  mM,  $[MgCl_2]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM,  $V_{org}=100$  mL, MIBC,  $[3,4-DCPBA]=100$  mM,  $[Aliquat336^{\text{®}}]=200$  mM, 200 rpm, 70°C.

A 0,3h d'expérience, la conversion du D-glucose est de 45,2% et augmente au cours du temps à 71,2% à 1h et 74,5% à 3h. Le rendement d'extraction du D-fructose est de 65,6% à 0,3h ce qui correspond à  $2,97 \times 10^{-3}$  mol de D-fructose extrait, à 1h il est de 52,7% ce qui correspond à  $3,75 \times 10^{-3}$  mol de D-fructose extrait et à 3h il est de 56,5% soit  $4,21 \times 10^{-3}$  mol de D-fructose extrait.

La conversion du D-glucose augmente au cours du temps. D'autre part, un déplacement de l'équilibre thermodynamique de 29,3pp après 3h grâce à la présence du système d'extraction

est observé. A 0,3h la conversion du D-glucose est de 45,2% donnant 45,2 mM de D-fructose en phase aqueuse donneuse pour 100 mM de transporteur introduit dans la phase organique, soit un rapport molaire D-Fru/T de 0,45/1. A 1h, la conversion est de 71,2% donnant 71,2 mM de D-fructose en phase aqueuse donneuse soit un rapport molaire D-Fru/T de 0,71/1.

Dans le chapitre III, partie III.2.1.4.2., le rendement d'extraction du D-fructose en fonction du rapport molaire D-Fru/T a été mesuré. Il a été mis en évidence que le rendement d'extraction est maximum lorsque le rapport molaire D-Fru/T est inférieur à 1/1 (46,5%) avec un maximum à 0,5/1 (62,2%). Les rendements obtenus ici sont juxtaposés à ceux obtenus dans le chapitre III (Figure 72).

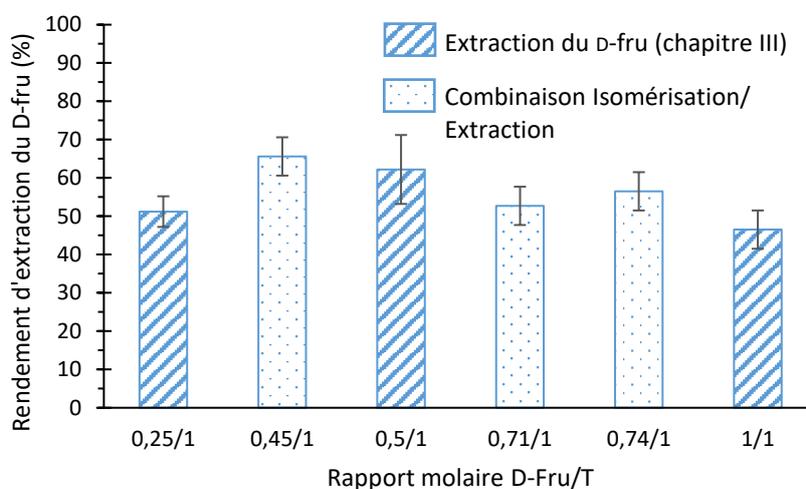


Figure 72. Comparaison des rendements d'extraction du D-Fru en fonction du rapport D-Fru/T pour l'étape d'isomérisation combinée à l'extraction (étape I de la cascade) et des rendements obtenus lors de la recherche des conditions d'extraction du D-Fru. Phase organique dans les deux cas : MIBC, [3,4-DCPBA] = 100 mM, [Aliquat336<sup>®</sup>] = 200 mM, 70°C.

D'après les résultats obtenus dans le chapitre III, le rendement d'extraction du fructose pour un rapport molaire 0,5/1 est supérieur à celui obtenu pour un rapport molaire 1/1. C'est la même évolution que suit, ici dans l'étude simultanée de l'extraction et de l'isomérisation, le rendement d'extraction au cours du temps. En effet, au cours du temps la concentration en fructose augmente donc le rapport Fru/T augmente, passant de 0,45/1 à 0,3h à 0,74/1 à 3h. Le rendement d'extraction passe alors de 65,6% à 56,5%. Le comportement du système d'extraction est similaire à celui observé durant l'étude présentée dans le chapitre III.

Ainsi, d'après les résultats du chapitre III, l'augmentation de la concentration en transporteur dans la phase organique ne permettrait pas d'augmenter le rendement d'extraction du fructose (Figure 72, rapports molaires inférieurs à 1/1). L'intérêt est ici de comparer le rendement d'isomérisation du glucose avec une expérience réalisée sans extraction du fructose afin d'observer l'intérêt et le rendement de cette extraction.

IV.1.2.2. Etude du déplacement de l'équilibre thermodynamique d'isomérisation

L'objectif est ici d'étudier la conversion de D-glucose afin de mettre en évidence un éventuel déplacement de l'équilibre thermodynamique en faveur de la formation du D-fructose. Pour ce faire, deux expériences sont mises en parallèles (Figure 73), une mise en œuvre monophasique avec une unique phase aqueuse donneuse dans laquelle se déroule la réaction d'isomérisation du D-glucose est présente et une mise en œuvre biphasique qui constitue la première étape de la réaction en mode « cascade ».

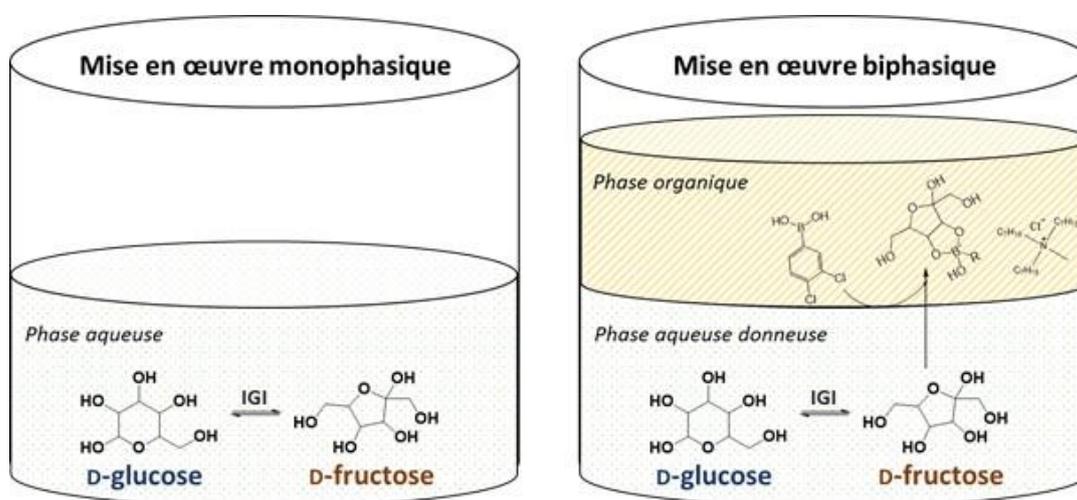


Figure 73. Schéma des mises en œuvre de la catalyse enzymatique d'isomérisation du D-glucose. Monophasique (gauche), biphasique (droite).

L'expérience monophasique est menée dans les conditions optimales déterminées dans 100 mL de phase aqueuse en présence d'IGI. L'expérience témoin monophasique quant-à-elle, ne contient pas d'IGI. L'expérience biphasique est menée avec une phase aqueuse identique à l'expérience monophasique et une phase organique de 100 mL telle que déterminée dans le chapitre III. L'expérience témoin biphasique diffère par l'absence d'IGI dans la phase aqueuse. Les expériences sont réalisées dans un réacteur Radley® de 250 mL thermostaté à 70 °C et agité à 200 rpm. Les concentrations en D-glucose et D-fructose dans la phase aqueuse sont suivies par HPLC durant 90 minutes. Ces concentrations permettent de calculer le pourcentage de monosaccharides en solution présentées Figure 74 et Figure 75.

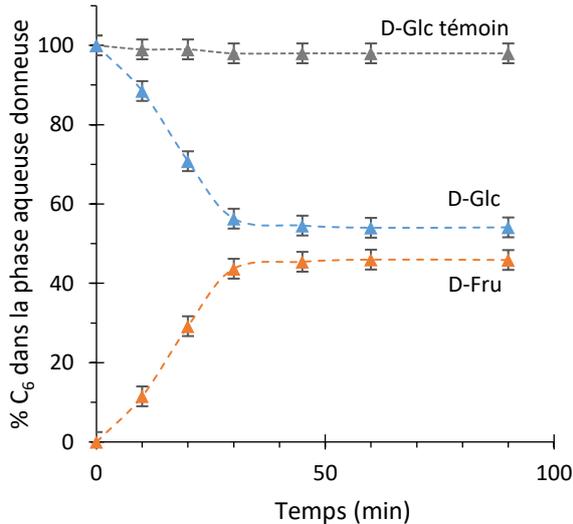


Figure 74. Pourcentages de monosaccharides dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps dans le système monophasique :  $V=100$  mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH = 8,5,  $m_{IGI}=0,5$  g,  $[D-Glc]_i=100$  mM,  $[MgCl_2]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM, 200 rpm, 70°C.

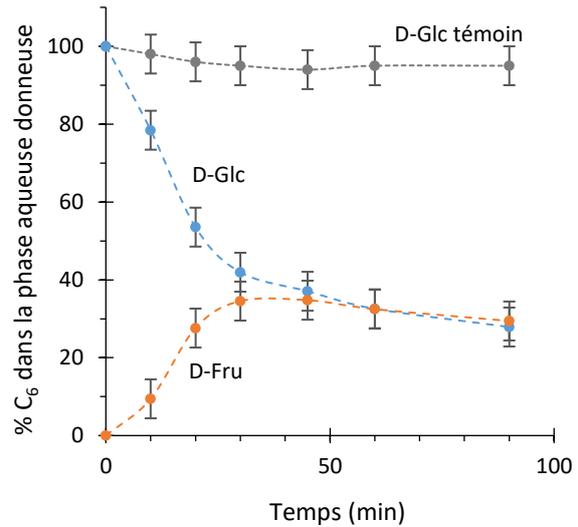


Figure 75. Pourcentages de monosaccharides dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps dans le système biphasique:  $V_{aq}=100$  mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,5,  $m_{IGI}=500$  mg,  $[D-Glc]_i=100$  mM,  $[MgCl_2]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM,  $V_{org}=100$  mL, MIBC,  $[3,4-DCPBA]=100$  mM,  $[Aliquat336^{\text{®}}]=200$  mM, 200 rpm, 70°C.

Dans le système monophasique, la quantité de D-glucose dans la phase aqueuse diminue puis atteint un palier après 30 minutes d'expérience. Après 90 minutes d'expérience le pourcentage de D-glucose est de 54,0%. De façon complémentaire, la quantité de D-fructose dans le milieu augmente de 0 à 43,6% durant les 30 premières minutes pour atteindre un palier, et 46,0% à 90 minutes. Le bilan des espèces à 90 minutes permet de retrouver 100% des monosaccharides présents à l'instant initial. L'expérience témoin met en évidence une concentration du D-glucose constante entre 98% et 100% durant les 90 minutes de réaction.

Dans le système biphasique, la quantité de D-glucose dans la phase aqueuse donneuse diminue de 100% à 41,9% durant les 30 premières minutes puis diminue encore de 41,9% à 27,9% entre 30 et 90 minutes. La quantité de D-fructose augmente de 0 à 34,5% en 30 minutes puis diminue pour atteindre 29,4% à 90 minutes. Pour rappel, l'expérience témoin mettait en évidence une diminution de la quantité de D-glucose dans la phase aqueuse de 6% en 90 minutes.

Les résultats du taux de conversion sont représentés Figure 76.

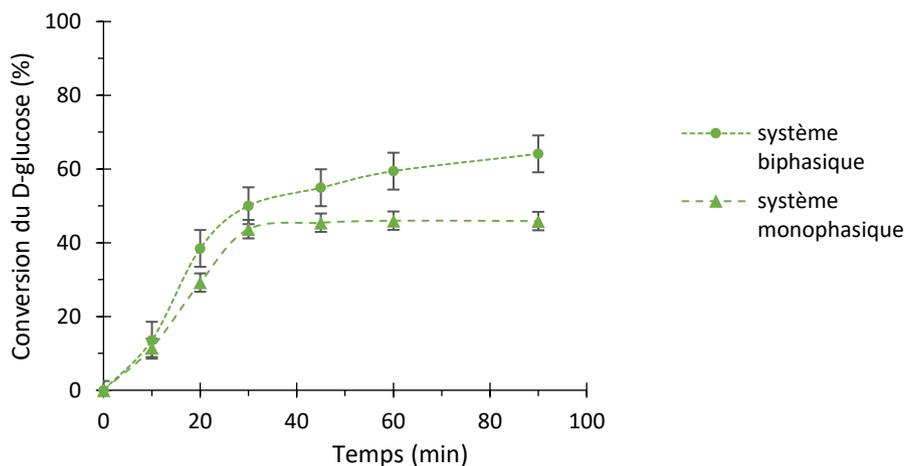


Figure 76. Conversion du D-glucose calculé dans le cas du système monophasique et du système biphasique.

Dans le système monophasique, la conversion du D-glucose augmente de 0 à 43,7% en 30 minutes puis reste stationnaire pour atteindre 45,9% après 90 minutes. Dans le système biphasique, la conversion du D-glucose augmente de 0 à 50% en 30 minutes puis augmente encore pour atteindre 64% après 90 minutes.

D'après les résultats exposés en Figure 74 et Figure 75, une première observation est que dans le système biphasique, la quantité de D-fructose augmente les 30 premières minutes puis diminue les 60 suivantes, contrairement au système monophasique où la quantité de D-fructose dans la phase aqueuse augmente de manière concomitante à la consommation du D-glucose au cours de la réaction d'isomérisation. Plus précisément, pendant les 20 premières minutes les courbes représentant le D-fructose dans le système monophasique et dans le système biphasique se superposent. Ensuite la quantité de D-fructose devient moins importante dans la phase aqueuse du système biphasique que dans la phase aqueuse du système monophasique jusqu'à la fin de l'expérience. Cette différence est due à l'extraction du D-fructose dans la phase organique présente dans le système biphasique.

De manière attendue, la conversion du D-glucose est alors supérieure dans le système biphasique comparé au système monophasique. Cette différence est due à l'extraction du D-fructose qui s'opère dans le système biphasique. Cette différence augmente avec la durée de l'expérience. La comparaison de la conversion du D-glucose dans les systèmes monophasique et biphasique montre une différence de 6,4pp à 30 minutes d'expérience et 18,2pp à 90 minutes. L'équilibre thermodynamique d'isomérisation a donc été « déplacé » de 18,2pp en faveur de la production du D-fructose lorsque l'extraction opère, donnant une conversion du D-glucose de 64,1%.

La conversion du D-glucose dans le système biphasique n'a pas atteint de palier en 90 minutes, ce qui suggère que la réaction d'isomérisation n'est pas terminée et que la vitesse de la réaction d'extraction du D-fructose est supérieure à celle d'isomérisation. Une hypothèse validée par la comparaison des vitesses initiales. La vitesse initiale d'isomérisation (calculée à partir des résultats de la Figure 74) est de  $7,7 \times 10^{-9}$   $\mu\text{mol}/\text{min}$  alors que la vitesse initiale d'extraction du fructose est de  $9,5 \mu\text{mol}/\text{min}$  (expérience en annexe 2). Ainsi, la vitesse initiale d'extraction est bien supérieure à la vitesse initiale d'isomérisation.

Cette première étape du système en cascade a mis en évidence un déplacement de l'équilibre thermodynamique d'isomérisation de 28,6% après 3h avec un rendement d'extraction de 56,5%. La faible quantité (1,56%) de glucose extrait montre la très bonne sélectivité du transporteur pour le fructose. Par comparaison des rendements d'extraction du D-fructose avec les résultats obtenus dans le chapitre III pour différents rapports massiques D-Fru/3,4-DCPBA, le comportement du système d'extraction en présence de la réaction d'isomérisation s'avère similaire. Alipour *et al.* ont réalisé une étude de l'extraction du fructose simultanée à son isomérisation par la glucose isomérase Gensweet®.<sup>[123]</sup> Dans leur étude de l'étape d'extraction, le caractère simultané des réactions a été, dans un premier temps, mimé par l'utilisation d'un mélange glucose/fructose 55/44 (mol/mol) issu de l'isomérisation du glucose (Figure 77).

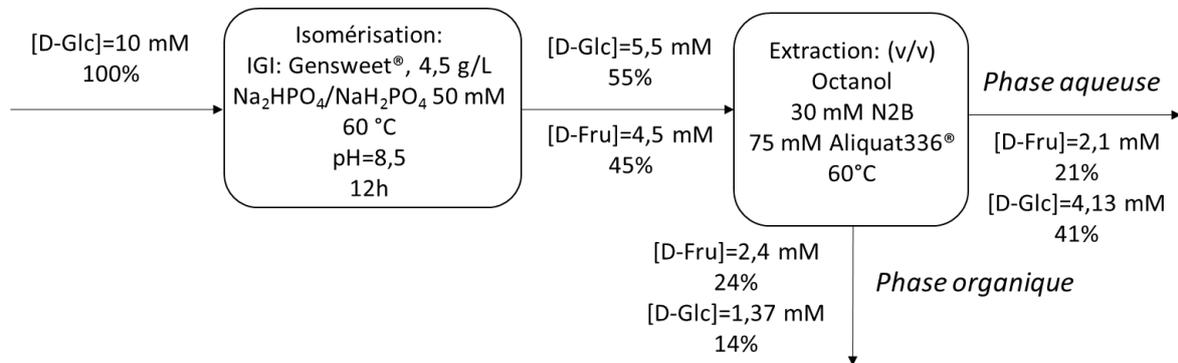


Figure 77. Diagramme schématisé du procédé d'isomérisation et d'extraction développé par Alipour *et al.*<sup>[123]</sup>

Le rendement d'extraction à 60 °C du fructose ainsi obtenu est d'environ 53%. Un rendement comparable au 56,5% d'extraction obtenus dans notre étude lors d'une réalisation simultanée de l'isomérisation du glucose et de l'extraction du fructose. Si l'on raisonne en concentration, le procédé d'Alipour met en œuvre une proportion de glucose, transporteur et contre-ion (1/3/7,5) supérieure au procédé présenté dans notre étude (1/1/2). De plus, avec 14%

d'extraction du glucose, la sélectivité de cette mise en œuvre est inférieure à celle de notre étude.

La réalisation par Alipour *et al.* d'un procédé d'isomérisation du glucose simultanée à l'extraction du fructose a été réalisée dans les conditions données dans le diagramme présenté Figure 78(a).

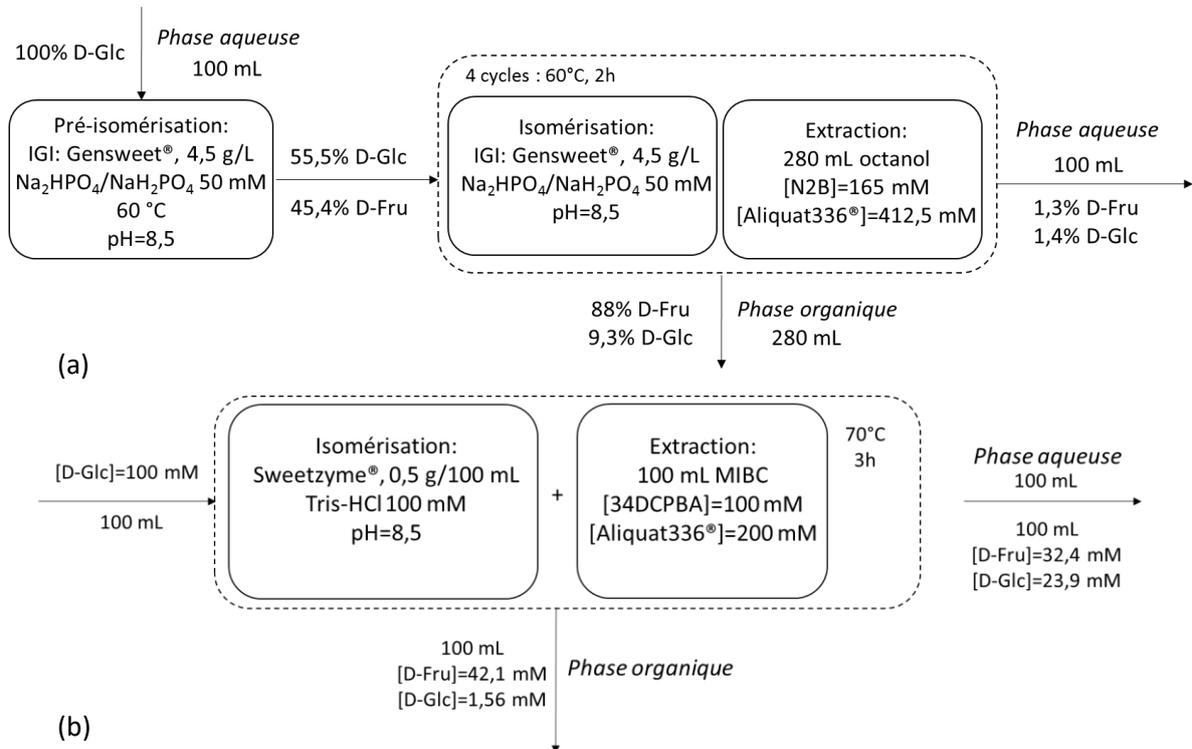


Figure 78. Diagrammes schématiques des procédés d'isomérisation et d'extraction simultanés. (a) procédé mis au point par Alipour *et al.*<sup>[123]</sup> (b) procédé mis au point dans notre étude.

Tout d'abord, la mise en œuvre de la Figure 78(a) comporte une étape de pré-isomérisation durant laquelle il n'y a pas d'extraction donc pas de déplacement de l'équilibre de la réaction thermodynamique d'isomérisation. De plus, le rendement d'extraction du fructose de 98% est obtenu après 4 étapes d'extraction et d'isomérisation simultanées de 2 h, chacune nécessitant un ajustement du volume de phase organique (pour un volume total de 280 mL) afin de respecter le rapport molaire D-Fru/N2B de 1/1 pour la première extraction, 1/2 pour la seconde extraction, 1/3 pour la troisième extraction et enfin 1/3,5 pour la quatrième. La durée totale de l'expérience est de 20 h (une nuit d'isomérisation et 8h d'extraction). Dans notre étude (Figure 78(b)), le rendement d'extraction de 56,5% obtenu est inférieur aux 98% obtenus par Alipour *et al.* mais après seulement 1 étape d'extraction soit 3 h d'expérience. Cependant, au vu de l'augmentation du rendement d'extraction (98%) et d'isomérisation (89%) obtenue par Alipour en utilisant 4 étapes d'extraction, la réalisation de notre étape d'isomérisation et d'extraction simultanée au

sein d'un procédé permettant leur fonctionnement en continu semble être une solution adaptée à une productivité optimisée via une démarche originale et prometteuse.

#### IV.1.3. Deuxième étape : transfert et relargage du D-fructose

La seconde étape consiste à mettre en contact la phase organique obtenue en sortie de la première étape (Isomérisation/Extraction) avec une seconde phase aqueuse nommée phase aqueuse réceptrice.

La deuxième étape est menée avec une phase aqueuse composée de 100 mL de tampon citrate de sodium 100 mM à pH = 3. L'expérience est toujours réalisée dans un réacteur Radley® de 250 mL thermostaté à 70°C et agité à 200 rpm. Les concentrations en D-glucose et D-fructose dans la phase aqueuse sont suivies par HPLC pendant 3 heures. Ces concentrations permettent de calculer le rendement de relargage du fructose (Tableau 26).

	Relargage du D-Fru
Temps (min)	Rendement (%)
0	0,0
20	57,2
60	61,8
180	57,4

Tableau 26. Rendement de relargage du D-Fru dans la phase aqueuse réceptrice.  $V_{aq}=100$  mL tampon citrate de sodium 100 mM pH = 3,  $V_{org}=100$  mL issus de l'étape 1, 70°C, 200 rpm.

Le rendement de relargage (calculé à partir de la quantité de D-fructose présente initialement dans la phase organique) s'élève à 57,2% après 0,3h d'expérience, 61,8% après 1h d'expérience et 57,4% après 3h d'expérience. Ce rendement atteint son maximum après seulement 20 minutes de réaction.

Par conséquent, il apparaît que la réaction de relargage, dans ces conditions, soit suffisamment rapide pour être envisagée dans le système couplé. Une étude de conversion du glucose en fructose réalisée par Delidovich et Palkovits<sup>[113]</sup> comporte une étape de relargage du fructose (et glucose) suivant une première étape d'extraction du fructose depuis un mélange de glucose et de fructose à 1,56 mM et 0,67 mM respectivement à l'aide d'une phase organique constitué de d'octan-1-ol contenant 0,4 M d'acide ortho-hydroxyméthylphenylboronique (HMPBA) et 0,4M d'Aliquat336®. Le relargage est effectué vers une phase aqueuse constituée d'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à

0,25 M à température ambiante. Le rendement de relargage est de 81% du fructose extrait après 1h d'expérience.<sup>[113]</sup> Le procédé développé par Alipour *et al.* comporte une étape de relargage du fructose dans un liquide ionique ([EMIM]HSO<sub>4</sub>). Le rendement de relargage à 60 °C est de 84% (calculé à partir du fructose extrait).<sup>[123]</sup> Le schéma du procédé est présenté Figure 79.

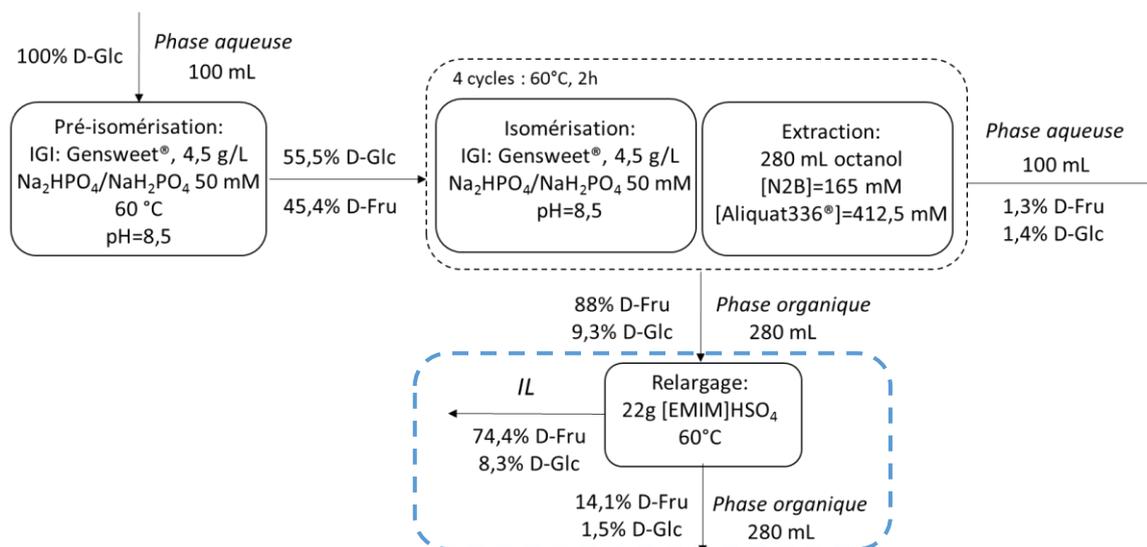


Figure 79. Diagramme schématique du procédé d'isomérisation du glucose et transport du fructose développé par Alipour *et al.*<sup>[123]</sup>

Conclusion intermédiaire et positionnement par rapport à Alipour

#### IV.1.4. Troisième étape : déshydratation du D-fructose

La troisième étape consiste à soutirer la phase organique, cette dernière ayant relargué le fructose dans la phase aqueuse réceptrice, et introduire la résine dans cette phase aqueuse réceptrice utilisée pour la réaction de déshydratation du D-fructose, dans les conditions déterminées lors de l'étude préliminaire (chapitre III).

Ainsi, 3,7 g de résine (Dowex<sup>®</sup> Monosphere<sup>®</sup> 650C) sont introduits pour réaliser la réaction de déshydratation du D-fructose dans les 100 mL de la phase aqueuse réceptrice. L'expérience est toujours réalisée dans un réacteur Radley<sup>®</sup> de 250 mL mais thermostaté à 80°C et agité à 200 rpm. La concentration en D-fructose, acide lévulinique et acide formique dans la phase aqueuse sont suivies par HPLC durant 40 heures. Ces concentrations permettent de calculer le rendement de déshydratation, la conversion du fructose, la sélectivité, la productivité de la réaction et également de suivre le bilan carbone de l'expérience (Tableau 27).

Déshydratation				
Temps (h)	Conversion D-Fru (%)	Rendement (%)	Sélectivité (%)	Bilan carbone (%)
2	1,3	1,2	90,6	99,9
3	2,1	2,0	96,5	99,9
6,5	6,9	6,2	90,0	99,3
18	16,8	13,5	80,3	99,1
22	21,6	15,3	70,5	98,4
30	33,5	18,9	56,6	93,8
35	44,6	21,9	49,2	87,8
40	55,6	22,6	40,6	80,0

Tableau 27. Résultats de l'étape de déshydratation obtenus pendant 40h de réaction. Vaq=100 mL obtenus après l'étape 2, 80°C, 200 rpm.

De manière générale, le taux de conversion du fructose et le rendement en 5-HMF augmentent avec le temps pour atteindre respectivement 55,6% et 22,6% à 40h. Cependant, ces augmentations sont au détriment de la sélectivité et du bilan carbone qui diminuent au cours du temps pour atteindre respectivement 40,6% et 80% à 40h.

Le bilan carbone n'atteint pas les 100%, ce qui correspondrait à la formation d'un produit non détecté qui n'est donc pas pris en compte dans le calcul du bilan carbone. Il s'agit probablement de la production d'humines. Ces humines sont visibles car elles « brunissent » les billes du catalyseur en venant s'adsorber à la surface.<sup>[106],[100]</sup> La baisse de sélectivité est due à la formation des acides lévulinique et formique issus de la réhydratation du 5-HMF selon la réaction :

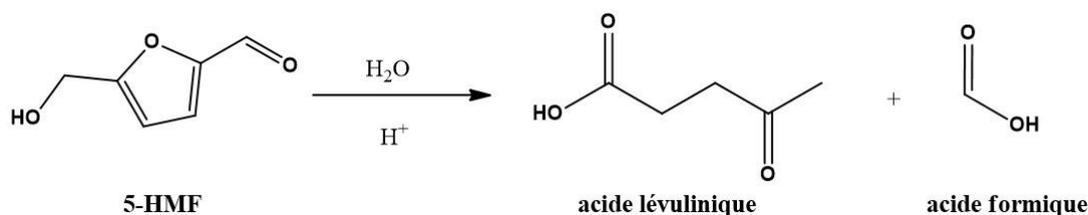


Figure 80. Réaction de formation de l'acide lévulinique et de l'acide formique à partir du 5-HMF.

A 18h de réaction, la sélectivité est de 80,3% et le bilan carbone de plus de 90%. Ce temps de réaction permet d'obtenir un rendement de déshydratation de 13,5% ce qui semble être le

meilleur compromis entre productivité et pureté, même si la valeur de rendement reste loin d'être satisfaisante.

Une résine sulfonique acide, la Dowex50wx8-100, a été utilisée par Qi *et al.* pour réaliser la réaction de déshydratation du fructose.<sup>[89]</sup> Dans une phase purement aqueuse, l'introduction de la résine à un rapport massique résine/fructose=1 à 150°C (par irradiation micro-ondes) a permis un rendement de déshydratation de 34% après 1h d'expérience, pour une conversion du fructose de 83% (soit une sélectivité de 41%). Ce rendement moyen est expliqué par la présence d'acide lévulinique (24%) indiquant la réhydratation du 5-HMF dans le milieu réactionnel. Le rendement de déshydratation de 73% avec une sélectivité de 81% a cependant été atteint par ajout d'acétone (70%wt) dans la phase aqueuse. Avec un rendement de déshydratation de 13,5% après 18h de réaction, notre étude par comparaison, présente un rendement 2,5 fois plus faible bien que la sélectivité soit de 84,6%.

L'utilisation de liquide ionique à faible température (50°C) pour la déshydratation du fructose a également été étudiée par Alipour *et al.*<sup>[123]</sup> A 50°C et un taux de fructose initial de 10% massique, le rendement de déshydratation est compris entre 25% et 30% après 3h à 9h d'expérience. Un rendement qui atteint 80% en 3h avec l'utilisation d'HCl à 0,42 mM et de THF pour extraire le 5-HMF. Des rendements supérieurs à ceux obtenus dans notre étude. Cependant, l'utilisation de liquide ionique n'a pas été envisagée ici. La cause en est le caractère discutable du label « vert » de ce genre de solvant avec pour cause son recyclage.<sup>[150],[151]</sup> nous avons alors choisi de continuer dans l'optique de l'utilisation d'une phase aqueuse pour la déshydratation.

#### IV.1.5. Rendements cumulés de l'approche en mode « cascade »

Les valeurs des rendements des différentes étapes du système en cascade sont cumulées à partir de la quantité de glucose initialement présente et sont présentées dans le Tableau 28 .

	Conversion D-Glc	Extraction du D-Fru	Extraction du D-Glc	Relargage du D-Fru	Déshydratation
Rendement (%)	74,5	42,1	1,56	24,2	5,5
Temps cumulés (h)	3			3	40

Tableau 28. Récapitulatif des rendements des différentes étapes du système « en mode » cascade. Chaque rendement est calculé par rapport aux quantités obtenues à l'issue de l'étape précédente.

Le système en cascade a permis un rendement global en 5-HMF de 5,5% avec 74,5% de conversion du D-glucose au bout de 46 heures. La répartition des différentes espèces dans le système final est représentée en Figure 81.

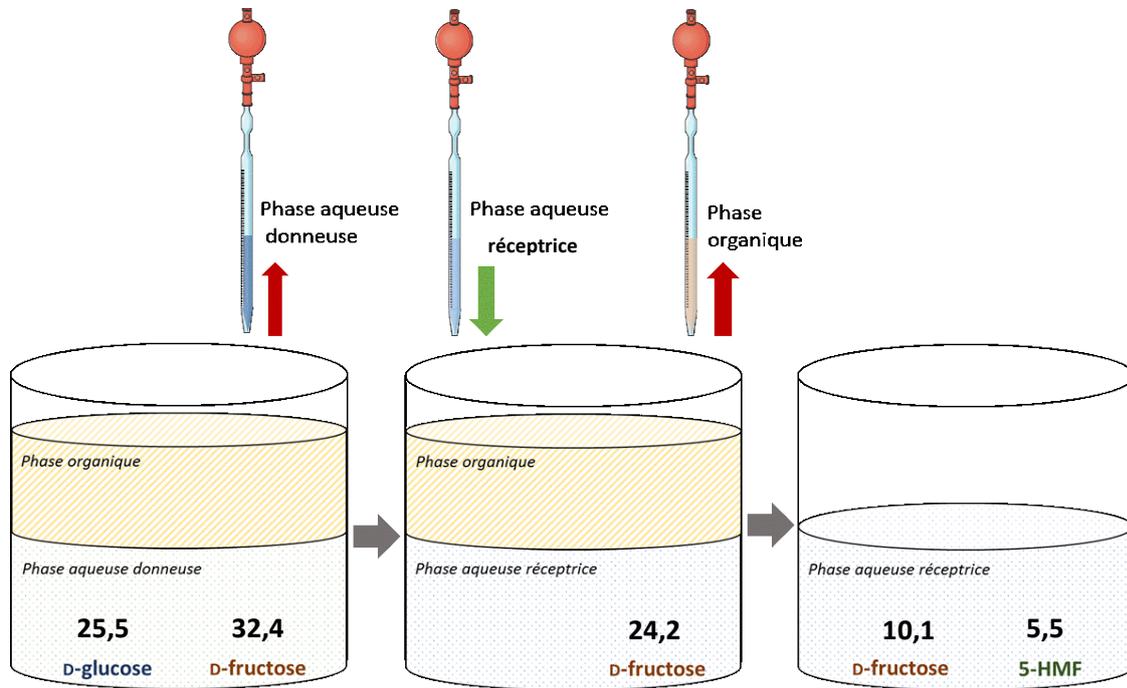


Figure 81. Répartition des différentes espèces dans les différentes phases à la fin du système « en mode » cascade.

L'étude du système en mode « cascade » a permis la démonstration du fonctionnement de chacune des étapes. Cependant, les rendements peuvent être améliorés par la mise en œuvre d'un système dans lequel toutes les étapes fonctionnent simultanément. Pour réaliser cet objectif, plusieurs types de réacteurs seront utilisés et décrit, la partie suivante présente le premier type de réacteur avec le coaxial.

#### IV.2. Etude d'un réacteur couplant toutes les étapes de formation du 5-HMF

Dans cette partie est présentée une mise en œuvre d'un réacteur coaxial permettant la réalisation simultanée des différentes étapes de la cascade précédente : isomérisation, extraction, relargage et déshydratation

##### IV.2.1. Design du réacteur coaxial

Des réacteurs comportant des systèmes triphasiques liquide/liquide/liquide ont déjà été mis en œuvre dans le cadre d'études de membranes liquides.<sup>[140],[120],[117],[152],[153],[154]</sup> Dans le cas de

trois phases liquides, trois géométries de réacteurs ont été utilisées dans le cadre de l'utilisation d'une membrane liquide (Figure 82, Figure 83, Figure 84).

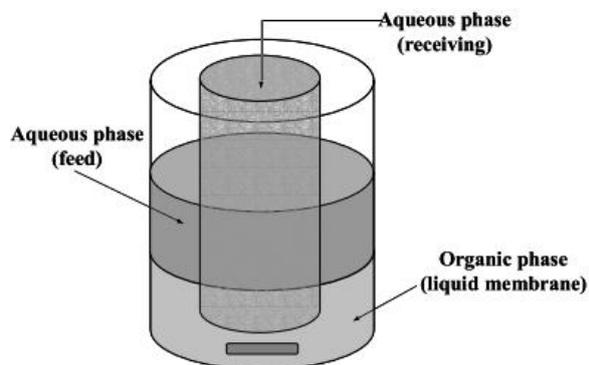


Figure 82. Configuration d'un réacteur coaxial triphasique recensé par Ferraz et al. généralement utilisé pour l'étude des membranes liquides.<sup>[140]</sup>

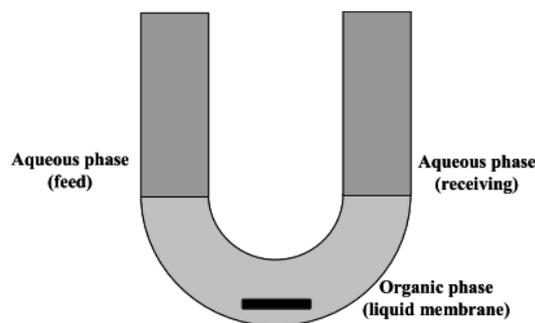


Figure 83. Configuration d'un réacteur en U triphasé recensé par Ferraz et al. généralement utilisé pour l'étude des membranes liquides.<sup>[140]</sup>

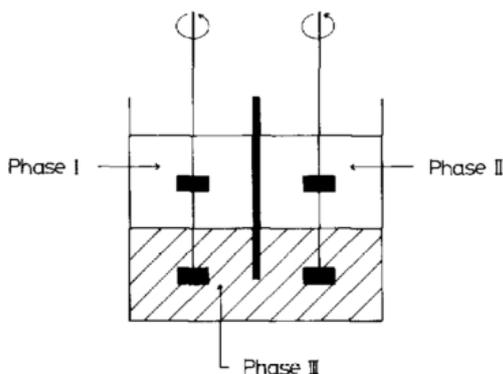


Figure 84. Configuration d'un réacteur type « rédox » triphasé.<sup>[152]</sup>

La configuration en U (Figure 83) implique l'utilisation d'un solvant organique plus dense que l'eau. Or, dans notre cas la densité du MIBC étant de  $0,802 \text{ g.mL}^{-1}$ , la phase organique est moins dense que l'eau. Cette configuration n'est donc pas envisagée avec notre exemple mais pourrait l'être avec un solvant plus lourd que l'eau, comme le dichlorométhane par exemple. Il en est de même pour les deux autres configurations. Cependant, le réacteur coaxial (Figure 82) peut être adapté à un solvant organique moins dense que l'eau en modifiant la position du cylindre intérieur. Nous avons donc adapté cette configuration à notre système triphasique.

Le réacteur nommé « réacteur coaxial » est composé de deux cylindres placés de façon coaxiale (Figure 85), surmonté d'un couvercle cloche permettant le passage de la pale d'agitation et l'utilisation d'un réfrigérant. Le cylindre extérieur est constitué d'un réacteur à double

enveloppe. Le cylindre intérieur, constitué d'un cristalliseur, est positionné au centre du réacteur.

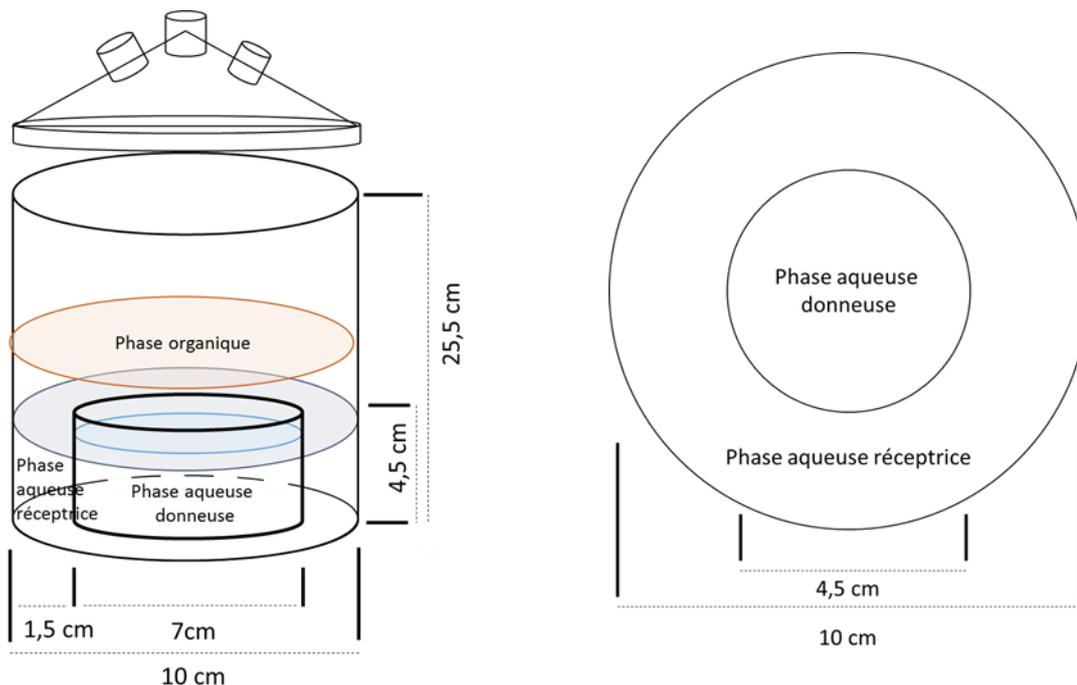


Figure 85. Dimensions et configuration du réacteur coaxial. Vue de face (gauche) vue de dessus (droite).

Le cylindre intérieur contient la phase aqueuse donneuse et a une hauteur inférieure à celle du cylindre extérieur qui contient la phase aqueuse réceptrice, ce qui permet à la phase organique d'être en contact avec les deux phases aqueuses. La phase aqueuse donneuse a un volume de 50 mL et la phase aqueuse réceptrice un volume de 55 mL pour une phase organique d'un volume de 100 mL.

#### IV.2.2. Validation du concept de catalyse hybride pour la production du 5-HMF

Le réacteur coaxial mis en place consiste en la réalisation simultanée des étapes d'isomérisation, d'extraction, de relargage et de déshydratation. L'isomérisation est réalisée dans la phase aqueuse donneuse et la déshydratation dans la phase aqueuse réceptrice (Figure 86).

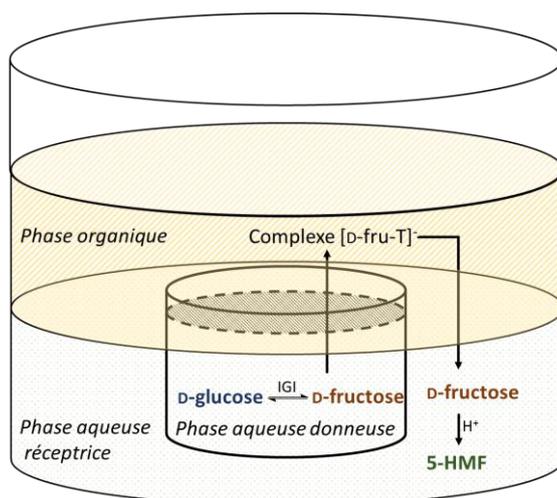


Figure 86. Schéma du réacteur coaxial permettant la mise en œuvre simultanée des différentes étapes.

L'expérience est menée avec une phase aqueuse donneuse formée par : 50 mL de Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5 contenant 100 mM de D-glucose, 200 mg d'IGI, 20 mM de MgCl<sub>2</sub>, 8 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>. La phase aqueuse réceptrice est formée par 55 mL de tampon citrate de sodium 100 mM pH 3. La phase organique est constituée de 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. Le tout est maintenu à 70°C. L'agitation est effectuée à 180 rpm, vitesse maximale permettant une agitation sans mélange des phases, par une pale d'agitation plongée dans la phase organique, au plus près de la phase aqueuse donneuse. Pour des raisons de dimensions la pale n'est pas plongée dans la phase aqueuse donneuse. Le suivi de la concentration en D-fructose dans les phases aqueuses est réalisé au cours de l'expérience par HPLC permettant le calcul du rendement d'isomérisation, d'extraction du fructose et de déshydratation. Les résultats sont présentés Tableau 29.

	Isomérisation (%)	Extraction du fructose (%)	Rendement en 5-HMF (%)	Sélectivité (%)
Rendement	70,1	50,2	4,1	70,4

Tableau 29. Rendements obtenus après 35h de mise en œuvre de la catalyse hybride dans le réacteur coaxial.  $V=50$  mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH = 8,5,  $m_{IGI}=200$  mg,  $[D-Glc]_i=100$  mM,  $[MgCl_2]=20$  mM,  $[Na_2SO_3]=8$  mM,  $V_{org}=100$  mL, MIBC,  $[3,4-DCPBA]=100$  mM,  $[Aliquat336^{®}]=200$  mM,  $V=55$  ml tampon citrate de sodium 100 mM pH = 3. 180 rpm, 70°C.

Le rendement d'isomérisation est de 70,1 % après 35h de réaction. Le rendement d'extraction lui est de 50,2% pour un rendement final en 5-HMF de 4,1% et une sélectivité de 70,4%.

L'équilibre thermodynamique d'isomérisation du glucose est « déplacé » de 24,2%. La production de 5-HMF dans ce réacteur coaxial est mise en évidence. Grâce à ce système

triphasique, le concept de catalyse hybride dans un tel réacteur coaxial est démontré pour la première fois.<sup>[133]</sup> Cependant, le faible rendement en 5-HMF pourrait être la conséquence de limitations diffusionnelles à chaque interphase, probablement liées à des surfaces d'échange réduites et à la faible agitation des trois phases.<sup>[140]</sup> Une agitation des phases d'autant plus limitée qu'elle n'est réalisée que par une pale d'agitation plongeant dans la phase organique car l'utilisation d'agitateurs magnétiques n'a pu être réalisée à cause de la géométrie du réacteur. Ces limitations affectent également la maîtrise des réactions dans ce réacteur coaxial, caractérisée par une faible reproductibilité de l'expérience. De plus, une température unique est imposée au réacteur alors que l'isomérisation et la déshydratation nécessitent idéalement deux températures différentes (chapitre III).

#### IV.2.3. Limitation du système : l'agitation

Afin de valider l'hypothèse selon laquelle la principale limitation lors de la mise en œuvre de la catalyse hybride dans le réacteur coaxial est la diffusion des espèces et notamment du fructose et du complexe au sein du réacteur, une expérience de transport du fructose est réalisée. Le D-fructose est initialement placé dans la phase aqueuse donneuse. La vitesse de répartition du D-fructose et du complexe dans les différentes phases au cours du temps est déterminée.

L'expérience est menée avec une phase aqueuse donneuse formée par 50 mL de Tris-HCl 100 mM pH = 8,5 contenant 100 mM de D-fructose, une phase aqueuse réceptrice formée par 55 mL de tampon citrate de sodium 100 mM pH = 3 et une phase organique constituée de 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. Le tout est maintenu à 70°C. L'agitation est effectuée à 180 rpm par une pale d'agitation plongée dans la phase organique, au plus près de la phase aqueuse donneuse. Ainsi au cours de l'expérience, le D-fructose est extrait dans la phase organique à l'interface avec la phase aqueuse donneuse sous la forme du complexe [D-fructose-3,4-DCPBA]<sup>-</sup> puis relargué dans la phase aqueuse réceptrice à l'interface avec la phase organique (Figure 87).

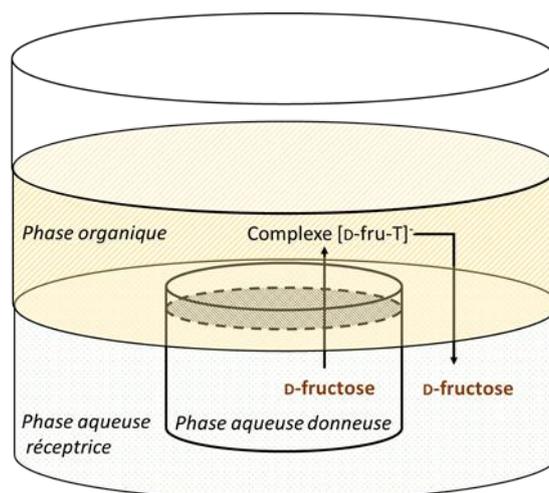


Figure 87. Schéma du transport du D-fructose dans le réacteur coaxial.

Le suivi de la concentration en D-fructose dans les phases aqueuses est réalisé au cours de l'expérience par HPLC permettant le calcul du rendement d'extraction et de relargage du D-fructose. Les résultats sont présentés Tableau 30.

Temps (h)	Rendement d'extraction du D-Fru (%)	Rendement de relargage du D-Fru (%)	Rendement global de relargage du D-Fru (%)
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0
1	3,3 ± 1,1	0,0 ± 0,0	0,0
3	7,9 ± 0,5	37,0 ± 12,8	2,9
5	20,0 ± 12,7	31,1 ± 19,4	6,2
7	45,1 ± 11,9	21,8 ± 7,9	9,8

Tableau 30. Rendements d'extraction et de relargage du fructose au cours du temps dans le réacteur coaxial.  $V_{aq\text{ donneuse}}=50\text{ mL}$  (Tris-HCl pH 8,5 100mM)  $[D\text{-Fru}]_i=100\text{ mL}$ ,  $V_{aq\text{ réceptrice}}=55\text{ mL}$  (tampon citrate pH = 3, 100 mM),  $V_{org}=100\text{ mL}$  (MIBC),  $[3,4\text{-DCPBA}]=100\text{ mM}$ ,  $[Aliquat336^{\text{®}}]=200\text{ mM}$ ,  $70^{\circ}\text{C}$ , 180 rpm.

Le rendement d'extraction augmente au cours du temps pour atteindre 45,1% après 7h. Le rendement de relargage, calculé à partir du D-fructose extrait dans la phase organique est de 37% à 3h, 31,1% à 5h et 21,8% à 7h. L'observation du rendement global de relargage (calculé à partir de la quantité initiale de D-fructose dans la phase aqueuse donneuse) montre une augmentation au cours du temps pour atteindre 9,8% après 7h de réaction.

Cette expérience peut être comparée à l'expérience de transport de monosaccharides menée par Karpa *et al.* dans une géométrie de réacteur identique.<sup>[120]</sup> L'expérience ayant obtenu le meilleur résultat en terme de relargage de fructose a été réalisé avec une membrane organique composée de 60 mL de 1,2-dichloroéthane contenant 10 mM de PBA et 10 mM d'Aliquat336<sup>®</sup>. La phase aqueuse donneuse est composée du tampon phosphate de potassium 100 mM à pH = 11

contenant 6 mM de chacun des monosaccharides : fructose et glucose. La phase aqueuse réceptrice est composée de tampon phosphate de potassium 100 mM à pH = 6. Le tout réalisé à 22 °C. Après 5 à 6 h d'expérience, le flux de monosaccharides dans la phase aqueuse réceptrice est de  $18,2 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$  pour le fructose, pour une interface phase aqueuse réceptrice/phase organique de 18,1 cm<sup>2</sup>. Dans le cas du réacteur coaxial, la surface de l'interface entre la phase aqueuse réceptrice et la phase organique est de 40 cm<sup>2</sup>. Après 5 h d'expérience, le flux de fructose dans la phase aqueuse réceptrice est de  $47 \times 10^{-7} \text{ mol.s}^{-1}.\text{m}^{-2}$ . Une valeur plus de deux fois supérieure à celle de l'expérience de Karpa *et al.* pour une surface deux fois plus grande. Cependant, le transporteur n'est pas le même, ni la température, ni l'agitation, ni les concentrations en espèces utilisées ; ce qui rend toute comparaison plus poussée difficile.

La vitesse de l'extraction du D-fructose met en évidence une limite due à la faible agitation des phases : seulement 3,3% sont extraits après 1 h et 45% après 7 h de réaction, correspondant à la valeur maximale atteinte en seulement 30 minutes en Eppendorf (chapitre III). Le rendement du transport étant proportionnel à l'agitation.<sup>[116]</sup> ; il est nécessaire d'optimiser ce paramètre. En effet, seule la phase organique est directement agitée par la pale. Les phénomènes de diffusions sont donc dominants dans les phases aqueuses.<sup>[155],[156]</sup> Cette hypothèse est validée par la faible reproductibilité des résultats, caractérisée par les valeurs de l'écart type variant de 0,5% à 12,7%, qui traduisent un contrôle difficile de l'extraction du fructose dans le réacteur coaxial. La valeur atteinte par le rendement de relargage du D-fructose, 37% maximum, est inférieure au 61,8% atteints en 1 heure lors de l'étape 2 du système découplé (ce chapitre : partie IV.1.3.) et bien inférieure aux 90% atteints lors des tests en Eppendorf en 1 heure (chapitre III, partie III.2.2.). Ce résultat met encore en évidence une limitation due à la faible agitation utilisée dans le réacteur. De plus, dans les différentes mises en œuvre de l'extraction du fructose (Eppendorf, réacteur Radley® et réacteur coaxial) il est possible de calculer les vitesses initiales d'extraction et de les mettre en relation avec les surfaces des interfaces. Les résultats sont donnés dans le Tableau 31.

Mise en œuvre	Surface (cm <sup>2</sup> )	Vitesse initiale d'extraction (μmol/min)	Vitesse initiale d'extraction (μmol/min/cm <sup>2</sup> )
Eppendorf	0,79	1,48	1,87
Radley <sup>®</sup>	79	9,5	0,12
Coaxial	38	2,75	0,07

Tableau 31. Aires des surfaces d'extraction et vitesses initiales d'extraction dans les différentes mises en œuvre expérimentales.

Entre les expériences dans le réacteur Radley<sup>®</sup> et en Eppendorf, la surface d'échange est divisée par 100 pour une vitesse d'extraction divisée par 6,5. Entre les expériences dans le réacteur Radley<sup>®</sup> et dans le réacteur coaxial, la surface est divisée par 2 et la vitesse d'extraction est divisée par 3,5. La vitesse initiale d'extraction augmente lorsque la surface de l'interface entre la phase organique et la phase aqueuse augmente. Les différentes agitations ne sont pas les mêmes et le rendement d'extraction est dépendant de la vitesse d'agitation, ainsi la comparaison entre les 3 mises en œuvre n'est qu'à titre indicatif. <sup>[116]</sup> Cependant dans le cas du réacteur coaxial, l'augmentation de la vitesse initiale par rapport à la mise en œuvre en Eppendorf est inférieure au résultat attendu.

Cette étude, bien que montrant une limite due à l'agitation des phases, a permis de démontrer la mise en œuvre du système de membrane liquide pour le transport du D-fructose.

### IV.3. Conclusion

Le système en mode « cascade » est découpé en 3 étapes physiquement distinctes : isomérisation et extraction simultanée, relargage, déshydratation. La première étape, l'isomérisation du D-glucose et l'extraction simultanée du D-fructose formé est réalisé dans les conditions optimales déterminées dans le chapitre précédent. La phase aqueuse est ainsi composée de 100 mM de D-glucose dans un tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5. La phase organique est constituée de MIBC contenant le transporteur (3,4DPCBA) et le contre-ion (Aliquat336<sup>®</sup>) à un rapport molaire 1/2 pour des concentrations de 100 et 200 mM respectivement. Cette étape est réalisée à 70°C. L'expérience d'isomérisation simultanée à l'extraction réalisée durant 90 minutes a permis de déplacer l'équilibre thermodynamique de la réaction d'isomérisation de 18,2% en atteignant 64,1% de conversion du D-glucose. Par conséquent, la mise en œuvre du relargage simultané du fructose dans une seconde phase

aqueuse (réceptrice) devra permettre la régénération du couple transporteur-contre ion dans la membrane liquide organique, permettant un déplacement plus important de l'équilibre thermodynamique grâce au transport continu du fructose. La troisième étape, la déshydratation du fructose en 5-HMF est réalisée dans les conditions déterminées dans le chapitre III par introduction de Dowex<sup>®</sup> Monosphere<sup>®</sup> 650C à une quantité correspondant à 3 fois le nombre de H<sup>+</sup> (de sites acides) nécessaire pour réaliser la réaction de déshydratation du D-fructose, à 80 °C. 18h de réaction semble être le meilleur compromis entre productivité et pureté avec une sélectivité de 80,3% et un bilan carbone supérieur à 90%. Ce temps de réaction permet d'obtenir un rendement de déshydratation de 13,5%. Un rendement qui est conforme (et même légèrement supérieur) aux attentes à la suite des 9,2% de rendements obtenus dans le chapitre III après 7h30 de déshydratation.

Un réacteur coaxial a été mis en œuvre pour réaliser le transport du fructose simultanément aux réactions d'isomérisation et de déshydratation. Un rendement d'isomérisation de 70,1% avec un transport de fructose (extraction) de 50,2% et un rendement global en 5-HMF de 4,1% ont été obtenus. Le réacteur coaxial mis en place a permis, dans le cadre de l'étude du transport de fructose sans catalyse, un rendement d'extraction de 45% après 7h et un rendement de relargage de 21,8% du fructose extrait. Le rendement d'extraction et la vitesse d'extraction sont inférieurs à ceux obtenus lors de la mise en œuvre en cascade, indiquant une limitation due à la mauvaise agitation des phases. De plus cette géométrie de réacteur ne permet pas de thermostatier indépendamment les deux phases aqueuses. Cependant, même si des verrous restent à lever, une première preuve de concept d'une catalyse hybride a ici été obtenue avec le réacteur coaxial.

Afin de parvenir à une meilleure maîtrise des réactions en termes de contrôle des températures et de l'optimisation de l'agitation des différentes phases, un second réacteur est spécialement conçu et étudié dans le chapitre suivant.

## Chapitre V. Catalyse hybride dans le réacteur « en H »

---

La recherche des conditions optimales de chacune des étapes (isomérisation, extraction, relargage, déshydratation), prises individuellement, est exposée dans le chapitre III. Une seconde phase d'optimisation, en couplant certaines de ces réactions pour obtenir 3 étapes distinctes (isomérisation + extraction, relargage, déshydratation) est présentée dans le chapitre IV. Dans ce même chapitre, est présentée l'étude qui a abouti à une première démonstration de la catalyse hybride mise en œuvre dans un réacteur « coaxial ». Ce système permet d'obtenir un rendement d'isomérisation 25% plus élevé en présence du système d'extraction du fructose formé, démontrant le « dépassement » de l'équilibre thermodynamique, et un rendement final de production de 5-HMF de 4,1%. Ce rendement final est relativement faible et pourrait s'expliquer par une géométrie du réacteur ne permettant pas une agitation efficace des différentes phases, ce qui engendrerait des limitations diffusionnelles.

Ainsi, ce chapitre est dédié à la mise en œuvre et l'étude d'un réacteur de géométrie différente, nommé réacteur en « H ». Il débute par la présentation du design du réacteur puis une étude de l'échange de matières entre les deux compartiments identifiera un premier élément crucial, la circulation des espèces au niveau du pont. Un point qui sera alors optimisé. Ensuite, l'étude du transport du fructose dans le réacteur en H mettra en évidence deux paramètres influents, l'agitation et le pH des différentes phases. Une modification du ratio D-Fru/T validera également le cycle de fonctionnement du couple T/coT. Dans une dernière partie, les différentes catalyses seront mises en œuvre et mettront en évidence une production significative du 5-HMF au travers de ce procédé.

## V.1. Design du réacteur en H

Il s'agit ici de proposer un design innovant de réacteur triphasique liquide/liquide/liquide comportant deux phases aqueuses et une phase organique. La phase organique est constituée d'un solvant moins dense que l'eau et doit être en contact simultanément avec les deux phases aqueuses. Toutes les parties du réacteur doivent être indépendamment thermostatées afin d'avoir un contrôle fin et constant des températures d'isomérisation du glucose, de déshydratation du fructose et de la membrane liquide. Ce cahier des charges a mené à la conception et à la réalisation du réacteur dit « en H » (de par sa forme globale) présenté Figure 88.

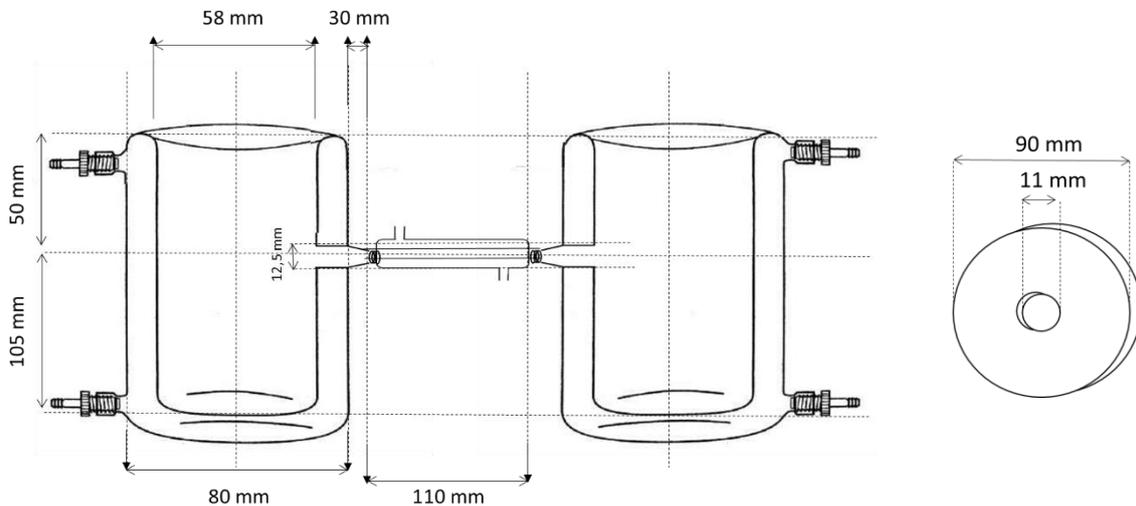


Figure 88. Schéma et dimensions du réacteur en H (à gauche) et représentation d'un couvercle (à droite).

Ce réacteur est constitué de deux compartiments cylindriques munis d'une double paroi, reliés par un pont amovible, lui aussi muni d'une double paroi. La présence de doubles parois permet de faire circuler un liquide thermostaté permettant une régulation en température individuelle de chacune de ses trois parties. Deux couvercles circulaires identiques viennent compléter le réacteur, ils disposent d'un trou au centre permettant d'insérer la pale d'agitation ou le panier d'agitation. L'ensemble du réacteur, couvercle compris, a été réalisé en verre (par M. Laurent D'Apolito, verrier à l'ENSC Lille). Les joints présents aux jonctions sont en polytétrafluoroéthylène (PTFE). La jonction dans chaque compartiment est à une hauteur permettant d'accueillir un volume de phase aqueuse maximum de 200 mL sans risquer un transfert accidentel de liquide *via* le pont.

Le panier d'agitation utilisé est le réacteur à lit rotatif (Figure 89), décrit dans le chapitre II.



Figure 89. Illustration et dimensions du panier d'agitation.

Le schéma complet comportant les différentes réactions mises en œuvre est présenté Figure 90.

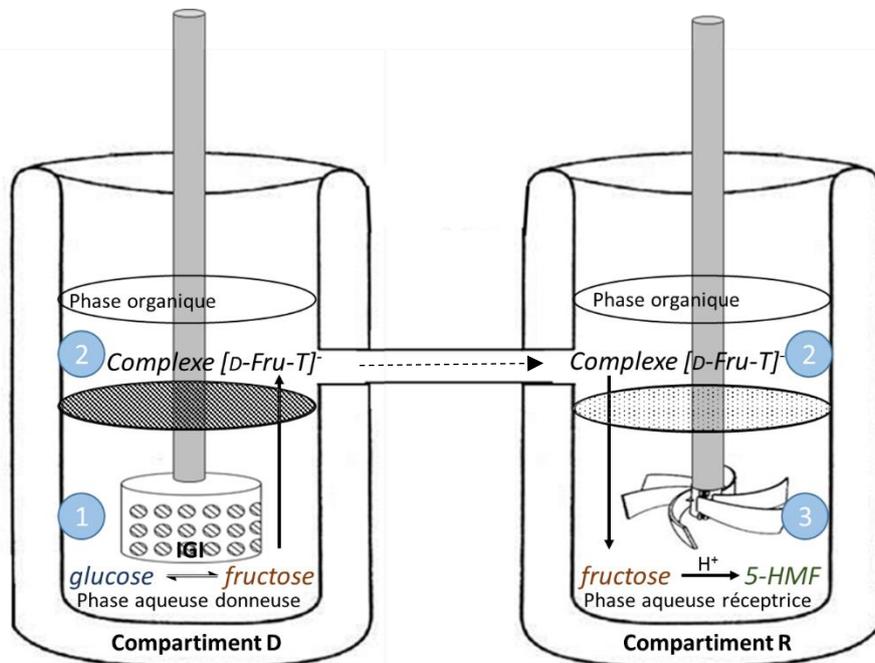


Figure 90. Schéma du procédé total de production du 5-HMF à partir du glucose mis en œuvre dans le réacteur en H.

Dans le premier compartiment (compartiment D), est présente la phase aqueuse donneuse (phase 1) dans laquelle se déroule l'isomérisation du glucose à l'aide de la glucose isomérase immobilisée introduite dans le panier d'agitation. Le fructose formé est extrait par formation d'un ester avec l'acide boronique,  $[D-Fru-T]^-$  et d'une paire d'ion avec l'Aliquat336<sup>®</sup>, vers la phase organique (phase 2). Cette phase organique est aussi en contact dans le deuxième compartiment (compartiment R) avec la phase aqueuse réceptrice (phase 3), vers laquelle le fructose est relargué. Dans cette dernière phase aqueuse se déroule la réaction de déshydratation

du fructose en 5-HMF.

## V.2. Etude des échanges de matières entre les deux compartiments du réacteur

La productivité finale en 5-HMF dépend de la diffusion du complexe  $[D-Fru-3,4-DCPBA]^-$  au travers de la phase organique mais aussi de l'efficacité des étapes d'extraction et de relargage (dont la détermination des conditions optimales est présentée dans le chapitre III). Ce rappel met en exergue toute l'importance de la jonction (= du pont) entre les deux compartiments, qui contient la phase organique

### V.2.1. Le pont entre les deux compartiments : un élément crucial

Un test est réalisé afin de mettre en évidence la faisabilité du transport du fructose depuis le compartiment D (phase aqueuse donneuse) vers le compartiment R (phase aqueuse réceptrice) *via* le pont thermostaté. Ce test permet l'obtention d'une première quantification des temps caractéristiques d'extraction et de relargage. Le schéma du réacteur et de la dynamique de transport du fructose attendue sont présentés Figure 91.

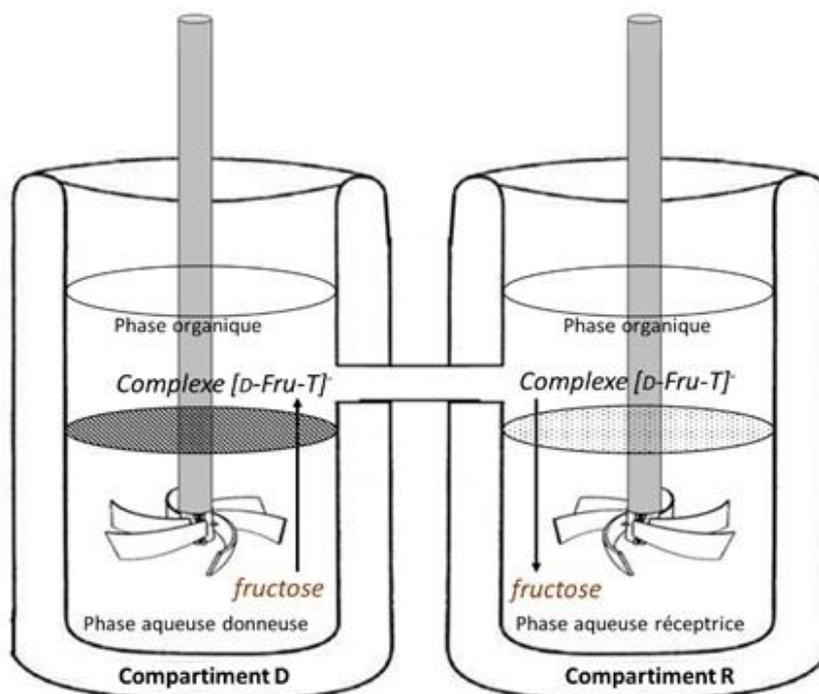


Figure 91. Schéma du réacteur en H utilisé pour l'étude de faisabilité de transport du fructose.

Les paramètres expérimentaux sont présentés en Tableau 32.

Expérience A Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
D	H <sub>2</sub> O	175	Tris-HCl 100 mM	8,5	100	-	-
D Pont R	MIBC	200	-	-	-	100	200
R	H <sub>2</sub> O	175	Citrate de sodium 100mM	3	-	-	-

Tableau 32. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de faisabilité de transport du fructose. (Expérience A)

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70 °C et agité à 200 rpm à l'aide de deux pales d'agitation dans chaque compartiment. La vitesse d'agitation est suffisamment faible pour éviter la formation d'une émulsion entre les phases aqueuses et la phase organique. La concentration en fructose de chacune des phases aqueuses est suivie au cours du temps par HPLC. Les résultats obtenus sont présentés Tableau 33 et Figure 92.

Expérience A				
Temps (h)	[D-Fru] <sub>D</sub> (mM)	[D-Fru] <sub>R</sub> (mM)		
0	107,4 ±3,1	0,00 ±0,0		
0,5	91,0 ±4,0	2,8 ±3,7		
1,5	75,3 ±0,5	2,9 ±0,2		
3,5	69,6 ±6,5	4,4 ±0,6		
5,5	73,6 ±6,5	5,4 ±0,3		
20,5	68,0 -	10,8 -		
22,5	67,5 -	11,0 -		

Tableau 33. Concentrations en fructose obtenus lors de l'expérience de transport du fructose dans le réacteur en H.

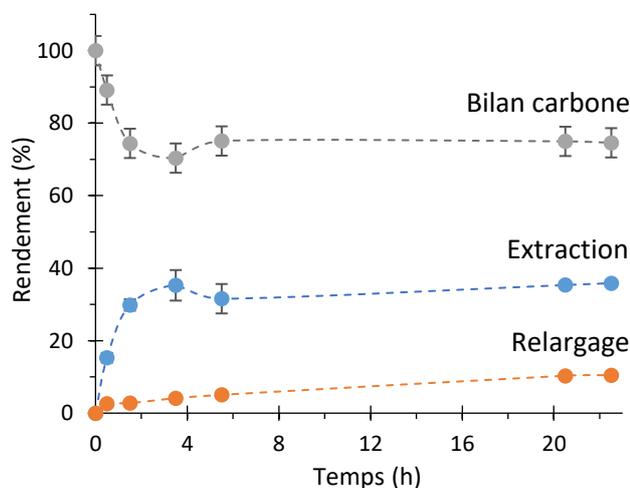


Figure 92. Rendements et bilan carbone obtenus lors de l'expérience A. Les rendements d'extraction et de relargage sont calculés par rapport à la concentration initiale en fructose de la phase aqueuse donneuse.

Le rendement d'extraction du fructose (Figure 92) augmente significativement au cours du temps pour atteindre 31,6% (33,8 mM) après 5,5h puis reste stable ensuite. Ce rendement atteint 35,3% (39,9 mM) après 22,5h d'expérience. Le calcul du rendement de relargage est effectué à partir du fructose initialement présent dans la phase aqueuse donneuse. Ce rendement de

relargage augmente pour atteindre 10,4% (11,0 mM) à 22,5h d'expérience, soit 16,2% du fructose extrait dans la phase organique. Le bilan carbone diminue au cours de l'expérience pour atteindre 74,6% à 22,5h d'expérience.

Le bilan carbone chute durant les quatre premières heures d'expérience de 25%, valeur qui correspondant à peu près au rendement de fructose extrait durant la même période. Cette observation tend à mettre en évidence qu'une partie du complexe fructoboronique s'accumule dans la phase organique et ainsi le fructose associé n'est pas relargué. Cette observation est confirmée par un rendement très faible (4% toujours après 4h de réaction et 10% au bout de 22,5h), inférieur à ceux obtenus précédemment. Pour mémoire, la mise en œuvre en mode « cascade » (chapitre IV) a donné lieu à un rendement de relargage de 57,4% du fructose extrait au bout de 4h d'expérience. Lors de l'utilisation du réacteur coaxial, un rendement de relargage de 31,1% à 5h (soit un rendement global de relargage de 6%) est observé.

Il peut être conclu que le passage à travers le pont devient un verrou à lever pour que notre système soit viable.

Afin de vérifier cette hypothèse, une étude est réalisée en découplant les réactions d'extraction et de relargage en deux étapes distinctes (Figure 93). Ainsi les compartiments ne sont pas connectés entre eux lors de l'extraction (étape 1) et du relargage (étape 2). A la fin de l'étape 1, la phase organique est prélevée et mise en contact avec la phase aqueuse réceptrice pour réaliser l'étape 2.

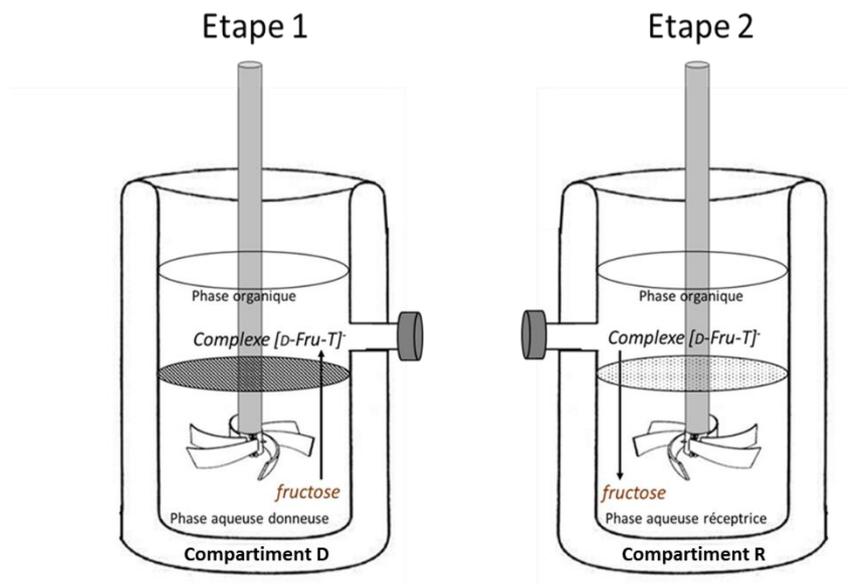


Figure 93. Schéma des deux étapes de l'utilisation du réacteur en H en découpé. Etape 1 : extraction du fructose dans le compartiment D. Etape 2 : relargage du fructose extrait dans le compartiment R.

Les paramètres expérimentaux diffèrent de l'expérience A uniquement par le volume de la phase organique de 75 mL au lieu des 200 mL précédents. Les résultats sont présentés Tableau 34 et Figure 94.

Expérience B			
Etape 1: Extraction		Etape 2: Relargage	
Temps	[D-Fru] <sub>D</sub>	Temps	[D-Fru] <sub>R</sub>
(h)	(mM)	(h)	(mM)
0,00	109,7	0,00	0,0
0,25	97,0	0,25	19,2
0,50	90,8	0,50	21,6
0,75	89,9	0,75	24,3
1,00	88,4	1,00	26,3
1,50	87,1	1,50	30,7
2,00	80,7	2,00	30,3
3,00	79,1	4,00	30,2

Tableau 34. Concentrations en fructose et rendements obtenus lors de l'expérience B.

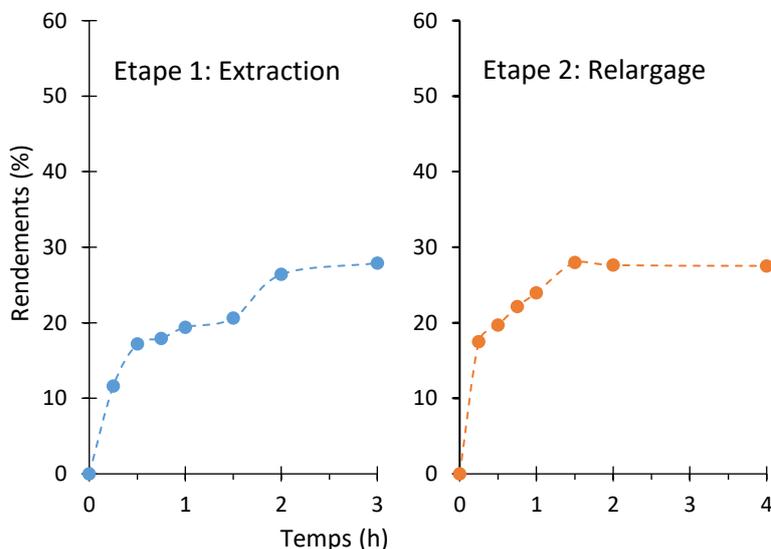


Figure 94. Rendements obtenus lors de l'expérience B en fonction du temps. Les rendements d'extraction et de relargage sont calculés par rapport à la concentration initiale en fructose de la phase aqueuse donneuse.

Il apparaît qu'environ 31 mM (27,9%) de fructose sont extraits au bout de 3h et que c'est cette même quantité (27,5%) qui est relarguée au bout de 2h dans l'étape 2. Cette étude confirme qu'un des verrous de ce procédé reste le passage du complexe fructoboronique à travers le pont entre les deux compartiments.

### V.2.2. Etude colorimétrique des phénomènes de circulation au niveau du pont

Afin de lever le verrou défini précédemment, une série d'expériences est menée par étude colorimétrique pour caractériser les échanges de matière au niveau de la jonction (pont) entre les deux compartiments.

#### V.2.2.1. Réacteur en H avec jonction thermostatée

Initialement, les deux compartiments sont reliés par le réfrigérant. Une quantité (700 mL) d'eau déminéralisée à température ambiante, est introduite dans le réacteur puis 300  $\mu$ L de colorant alimentaire E122 (défini dans le chapitre II, partie II.2.3.2.1.) sont introduits dans le compartiment D. L'agitation dans les deux compartiments est réalisée à l'aide d'agitateurs magnétiques réglés à des vitesses identiques. Les photographies présentées Figure 95 illustrent

l'homogénéisation au sein du réacteur.



Figure 95. Photographies illustrant l'homogénéisation des espèces en solution au sein du réacteur en H. De gauche à droite,  $t=0$ ,  $t=1h$  et  $t=8h$ , (expérience C1).

L'absorbance de la solution est mesurée à 530 nm dans le compartiment R afin de suivre l'apparition de la coloration rouge (Figure 96). Cette absorbance augmente au cours du temps et une vitesse de coloration ( $V_{DR}$ ), assimilable à une vitesse d'homogénéisation, est calculée par différence entre l'absorbance mesurée à  $t=0$  et celle mesurée à 12h. Les mesures d'absorbance en fonction du temps ainsi que les concentrations en colorant alimentaire E122 sont données en Figure 96 et Tableau 35 .

Expérience C1		
Temps (h)	$A_{R530}$	$V_{DR}$ (mol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0	0,00	$5,4 \times 10^{-8}$
1	0,05	
8	0,35	
12	0,57	

Tableau 35. Mesure de l'absorbance à 530 nm de la phase aqueuse dans le compartiment R. Vitesse de transfert de matière du compartiment D vers le compartiment R.

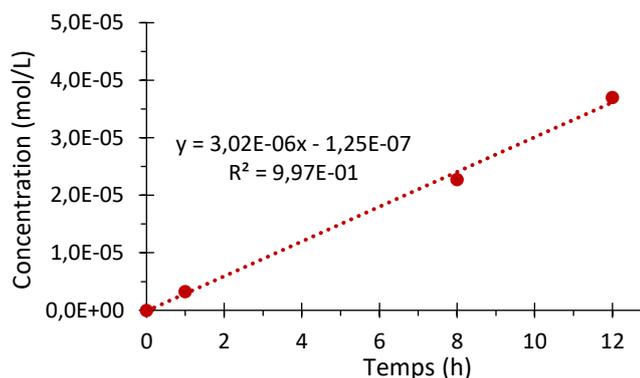


Figure 96. Concentration en colorant (azorubine) de la phase aqueuse dans le compartiment R en fonction du temps.

D'après ces résultats, la vitesse de coloration du compartiment R, assimilable à la vitesse d'homogénéisation du colorant dans le compartiment est de  $5,4 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup>.

La vitesse d'homogénéisation du colorant au sein du réacteur semble relativement lente par rapport aux cinétiques réactionnelles envisagées. Plus de 12 h sont nécessaires pour obtenir une homogénéisation entre les deux compartiments. Une première limitation à la bonne circulation du liquide entre les deux compartiments peut être la longueur du pont entre ces deux compartiments. Ainsi il est décidé de raccourcir la jonction entre les deux compartiments.

V.2.2.2. Réacteur en H avec jonction courte non thermostatée

Afin de montrer que les phénomènes de transfert entre les deux compartiments peuvent être améliorés, le pont réfrigérant est retiré et les deux compartiments directement joints (Figure 97). Le système ainsi configuré, un second test colorimétrique est réalisé. Une quantité globale (700 mL) d'eau déminéralisée est introduite dans le réacteur puis 300  $\mu\text{L}$  de colorant alimentaire E122 sont introduits dans le compartiment D et 300  $\mu\text{L}$  de colorant alimentaire E102 sont introduits dans le compartiment R. L'agitation dans les deux compartiments est réalisée à l'aide d'agitateurs magnétiques réglés à des vitesses identiques. Des photographies présentées Figure 97 illustrent le déroulé de l'expérience.



Figure 97. Illustration de l'homogénéisation des espèces en solutions dans les deux compartiments. De gauche à droite  $t=0$  minutes,  $t=1\text{h}$ ,  $t=3\text{h}$  et  $t=8\text{h}$ .

Le suivi de la coloration de chacun des compartiments donne une estimation du transfert de matière. Ces observations sont validées par la mesure des absorbances à 530 nm dans le compartiment R et 425 nm dans le compartiment D (Figure 98). Les résultats obtenus sont reportés en Tableau 36.

Expérience C2				
Temps (h)	$A_{D425}$	$A_{R530}$	$V_{RD}$ (mol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	$V_{DR}$ (mol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0	0,05	0,08	$5,4 \times 10^{-8}$	$6,5 \times 10^{-8}$
1	0,12	0,14		
3	0,30	0,38		
8	0,64	0,55		

Tableau 36. Mesure de l'absorbance à 530 nm de la phase aqueuse dans le compartiment R, à 425 nm dans le compartiment D. Vitesse de transfert de matière du compartiment D vers R ( $V_{DR}$ ) et du compartiment R vers D ( $V_{RD}$ ).

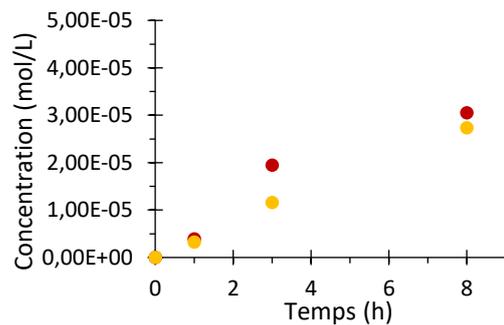


Figure 98. Concentration en colorant de la phase aqueuse dans le compartiment R (azorubine-rouge) et dans le compartiment D (tartrazine-jaune) en fonction du temps.

Les absorbances mesurées augmentent au cours du temps et une vitesse de coloration est calculée. Cette vitesse de transfert de matière est de  $6,5 \times 10^{-8}$  mol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> dans le

compartiment R et de  $5,4 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$  dans le compartiment D.

Lorsque le pont est raccourci (jonction courte non thermostaté), l'homogénéité est obtenue après 8h de réaction (Figure 97) contre 12h précédemment. Le raccourcissement du pont permet donc une amélioration de la cinétique du transfert de matière illustré par une vitesse d'homogénéisation augmentée d'environ 20%, mais cela reste encore trop lent. Un système de contre-pales a donc été imaginé pour améliorer les transferts entre les phases.

### V.2.2.3. Insertion d'un système de contre-pales

Afin d'optimiser la vitesse de circulation et d'échange entre les deux compartiments, une lamelle flanquée de deux contre-pales orientées chacune en sens contraire du vortex de mélange est disposée dans la jonction entre les deux compartiments D et R. L'ajout de cette pièce doit favoriser la circulation de la phase organique entre les deux compartiments comme schématisé en Figure 99.

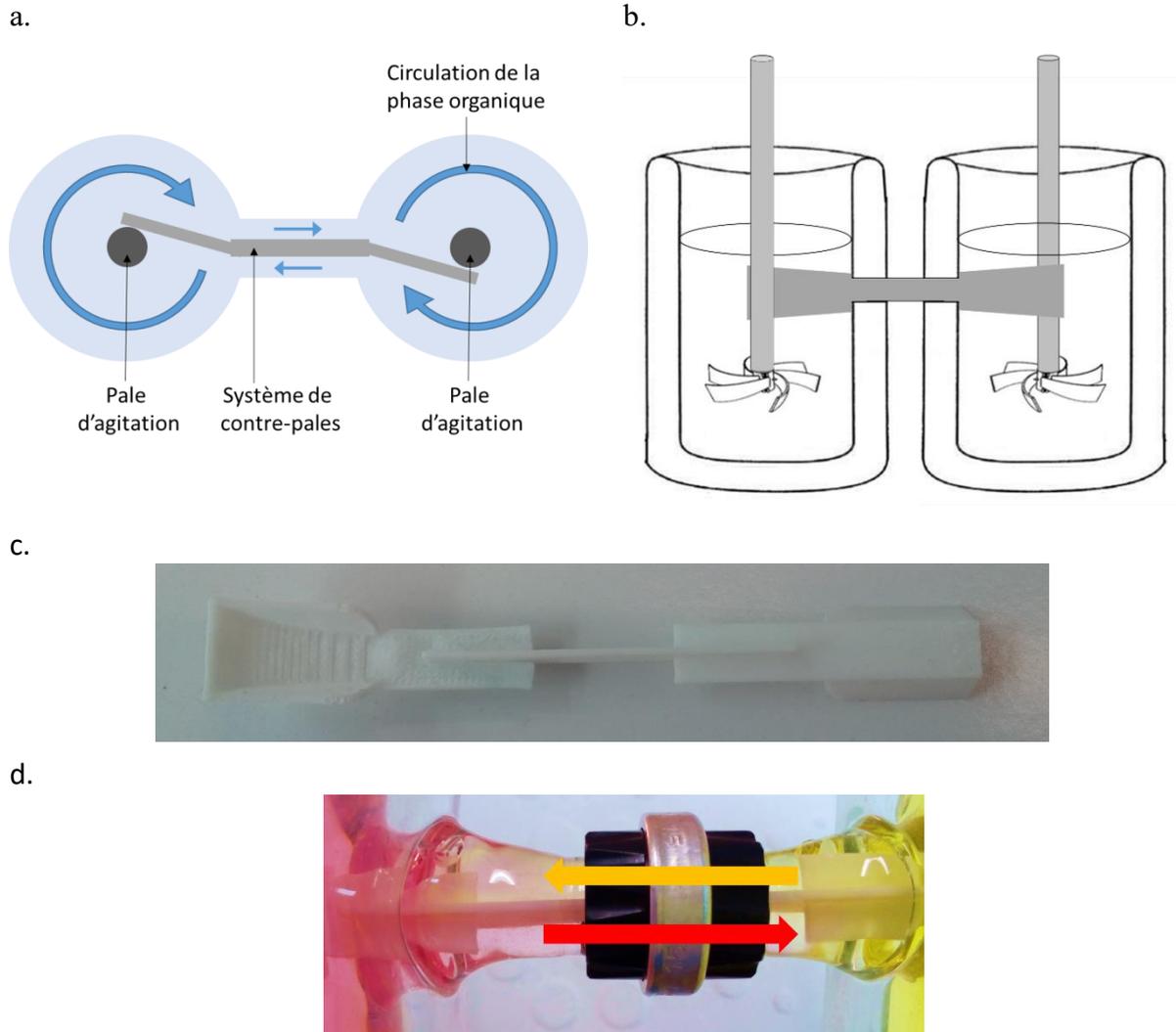


Figure 99. Schémas de la circulation du fluide au sein du réacteur en H comportant le système de contre-pales. Vue de dessus (a), vue de face (b). (c) Photographie du système de contre-pales, (d) Photographie illustrant la circulation du liquide (colorants jaune et rouge) au sein du pont.

Cette pièce (Figure 99(c)) est conçue par impression 3D en polyacide lactique.

Un test colorimétrique (E122 et E102) est effectué pour prouver l'efficacité de la circulation d'un compartiment à l'autre grâce à l'insertion de la pièce décrite précédemment. Ainsi, 700 mL d'eau déminéralisée sont introduits dans le réacteur puis 300  $\mu$ L de colorant alimentaire E122 sont introduits dans le compartiment D et 300  $\mu$ L de colorant alimentaire E102 dans le compartiment R. L'agitation dans les deux compartiments est réalisée à l'aide d'agitateurs magnétiques réglés à des vitesses identiques. Des photographies présentées Figure 100 illustrent les variations de couleur en début et fin d'expérience.



Figure 100. Photographies illustrant l'homogénéisation des espèces en solution au sein du réacteur avec le système de contre-pales. A gauche à  $t=0$  minutes, à droite à  $t= 30$  minutes

Ces observations (Figure 100) sont validées par la mesure des absorbances à 530 nm dans le compartiment R et 425 nm dans le compartiment D. Les résultats sont exprimés dans le Tableau 37.

Expérience C3				
Temps (h)	$A_{D425}$	$A_{R530}$	$V_{RD}$ (mol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )	$V_{DR}$ (mol.L <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
0	0,04	0,09	$1,0 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$
0,5	0,62	0,72		

Tableau 37. Mesure de l'absorbance à 530 nm de la phase aqueuse dans le compartiment R, à 425 nm dans le compartiment D. Vitesse de transfert de matière du compartiment D vers R ( $V_{DR}$ ) et du compartiment R vers D ( $V_{RD}$ ).

La vitesse d'homogénéisation, calculée par mesures des absorbances entre 0 et 30 min dans chaque compartiment, est de  $1,0 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (compartiment D) et  $1,4 \times 10^{-6}$  mol.L<sup>-1</sup>.min<sup>-1</sup> (compartiment R). Dans un tel système, le phénomène prédominant est la convection des molécules. Or la convection est indépendante des espèces et ne dépend que du système (phase aqueuse agitée dans le réacteur).<sup>[157],[158]</sup> Ainsi les vitesses de coloration de chacun des compartiments ( $V_{DR}$  et  $V_{RD}$ ) sont théoriquement égales. Bien que du même ordre de grandeur, la différence entre les deux vitesses est de 28%. Cette différence pourrait s'expliquer par des vitesses d'agitation légèrement différentes des deux compartiments (agitateurs magnétiques).

Par comparaison avec l'expérience C2 (jonction raccourcie sans le système de contre-pales), l'utilisation de la contre pôle permet une multiplication de la vitesse d'homogénéisation du système d'un facteur 20.

L'utilisation de la contre pôle semble donc prometteuse pour permettre un transfert rapide du complexe de fructose du compartiment où il se forme (interphase compartiment D/Phase Organique) vers celui où il est hydrolysé en fructose (interphase Phase

Organique/Compartiment R). Cependant, le transport du fructose implique l'utilisation de MIBC à 70°C et, malheureusement, une étude préliminaire a montré que la contre-pale en polyacide lactique se solubilise dans le solvant.



Figure 101. Photographie du système de contre-pales en aluminium.

Pour lever ce verrou, un second système de contre-pales, aux mêmes dimensions est alors réalisé en aluminium par la société Shapeways (Figure 101).

### V.2.3. Validation en conditions réelles du système avec contre-pales

Le système de contre-pales, mis au point dans l'étude précédente, est testé dans les conditions réelles de transport du fructose dans le réacteur en H.

Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 38.

Expérience D Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
D	H <sub>2</sub> O	175	Tris-HCl 100 mM	8,5	100	-	-
D Pont R	MIBC	200	-	-	-	100	200
R	H <sub>2</sub> O	175	Citrate de sodium 100mM	3	-	-	-

Tableau 38. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de la validation en conditions réelles du système avec circulation optimisée.

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70 °C et agité à 200 rpm à l'aide de deux pales plongeant dans chaque phase aqueuse. Le système de contre-pales est introduit dans la zone de pontage entre les deux compartiments (Figure 102).



Figure 102. Photographie du réacteur en H comportant le système de contre-pâles pour l'étude de transport du fructose. Vue de face et vue du dessus.

La vitesse de rotation des pâles appliquée n'engendre pas la formation d'une émulsion entre les phases aqueuse et organique. La concentration en fructose de chacune des phases aqueuses est suivie au cours du temps (30 minutes) par HPLC. Les résultats obtenus sont présentés Tableau 39.

	Avec système de contre-pâles (Expérience D)					Sans système de contre-pâles (expérience A)		
Temps (h)	[D-Fru]aq donneuse (mM)	[D-Fru]aq réceptrice (mM)	Extraction (%)	Relargage (%)	Bilan carbone (%)	Extraction (%)	Relargage (%)	Bilan carbone (%)
0	110	0	0	0	0	0	0	100
0,5	97,1	7,8	11,8	60	95,4	15,3	17	87,3

Tableau 39. Suivi de la concentration en fructose dans les phases aqueuses du réacteur en H comportant le système de contre-pâles en A1 lors de l'étude du transport du fructose.

Après 30 minutes d'expérience, le rendement d'extraction est de 11,8%. Le rendement de relargage est calculé par rapport à la quantité de fructose extrait de la phase aqueuse donneuse. Le bilan carbone après 30 minutes s'élève à 95,4%. Pour comparaison, sans le système de contre-pâles (expérience A), le rendement d'extraction est de 15,3% après 30 minutes et le rendement de relargage de 17%. Le pH initial mesuré de la phase aqueuse donneuse est de 8,5, après 1h ce dernier est de 7.

Les expériences avec ou sans système de contre-pâles montrent un rendement d'extraction d'un ordre de grandeur similaire, respectivement 11,8% et 15,3%. Par contre, le rendement de relargage est plus de 3 fois supérieur dans le cas de l'expérience avec le système de contre-pâles

(60% contre 17% sans le système). Cette expérience permet de lever un des verrous pour un meilleur fonctionnement du système de transport du fructose via le complexe

Cependant il est noté une perte de masse de 10 mg du système de contre-pales entre chaque expérience. Cette perte de masse résulte d'un phénomène de lixiviation attribuée probablement à une dissolution d'un oxyde d'aluminium superficiel formé en extrême surface.

En conséquence, un nouveau système de contre-pales a été réalisé à partir d'une feuille de titane. Dans ce cas, aucune perte de masse n'a été notée après son utilisation dans le réacteur en H et les résultats en termes de rendement sont similaires au module en aluminium.

### V.3. Optimisation du transport du fructose : pH et vitesse d'agitation

La circulation de la phase organique entre les deux compartiments du réacteur ayant été optimisée, les différents paramètres influents le transport du fructose (le pH des différentes phases aqueuses, les vitesses des pales d'agitation, la concentration en transporteur et contre-ion) sont étudiés dans cette partie.

#### V.3.1. Le pH, l'élément moteur clé du système

Le pH optimal pour réaliser simultanément la réaction d'isomérisation et l'extraction du fructose est fixé à 8,5 (voir chapitre III). La valeur de pH pour le relargage du fructose et sa déshydratation est de 3. D'autre part, il est observé une évolution du pH de la phase aqueuse donneuse lors de l'expérience de transport du fructose (expérience D). Dans la présente étude, il s'agit de déterminer la corrélation qui existe entre l'évolution de la différence de pH entre les deux phases aqueuses et le rendement de transport du fructose entre les deux compartiments.

##### V.3.1.1. Etude de l'évolution des pH au cours du transport du fructose

Une expérience « témoin » est d'abord réalisée, dans laquelle le couple transporteur/contre-ion, 3,4-DCPBA/Aliquat336®, est absent et sans régulation du pH de chaque phase aqueuse. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 40.

Expérience E Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH initial	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 100 mM	9,2	100	-	-
D Pont R	MIBC	200	-	-	-	-	-
R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 100mM	3,1	-	-	-

Tableau 40. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'expérience « témoin ».

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70°C et agité à 200 rpm à l'aide de deux pales d'agitation plongeant dans les phases aqueuses. Le système de contre-pales est introduit dans la zone de pontage entre les deux compartiments. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours du temps et présenté Figure 103.

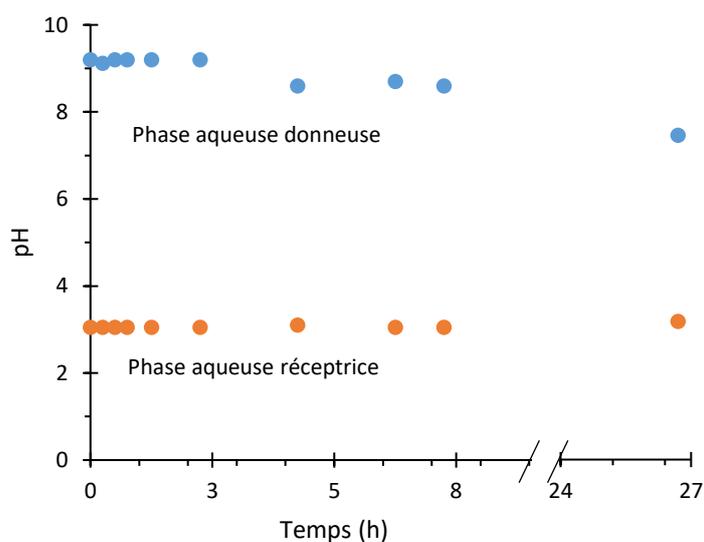


Figure 103. Suivi du pH des phases aqueuses donneuse et réceptrice lors de l'expérience témoin de transport du fructose.

Le pH de la phase aqueuse donneuse, initialement de 9,2, reste constant durant 2h15 puis diminue progressivement pour atteindre 7,4 après 26 h d'expérience. Le pH de la phase aqueuse réceptrice reste constant à une valeur de 3. La concentration en fructose dans la phase réceptrice est nulle après 26 h d'expérience alors que celle dans la phase donneuse a diminué de 5%.

L'expérience est ensuite réalisée en présence du couple 3,4-DCPBA/Aliquat336® mais

toujours sans régulation du pH. Deux expériences avec une différence de pH initial ( $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{\text{phase aqueuse donneuse}} - \text{pH}_{\text{phase aqueuse réceptrice}} = \text{pH}_{(D)} - \text{pH}_{(R)}$ ) de 5,5 sont réalisées. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 41.

Expérience	Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
F1	D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 100 mM	7,5	100	-	-
	R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 100mM	2,2	-	-	-
F2	D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 100 mM	8,9	100	-	-
	R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 100mM	3,6	-	-	-
F1 et F2	D Pont R	MIBC	200	-	-	-	100	200

Tableau 41. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de l'évolution du pH sans régulation.

Le système est thermostaté à 70 °C et agité à 200 rpm à l'aide de deux pales d'agitation plongeant dans les phases aqueuses. Le système de contre-pales est introduit dans la zone de pontage entre les deux compartiments. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours du temps (Figure 104), ainsi que la concentration en fructose des phases aqueuses, ce qui permet de calculer les rendements d'extraction et de relargage. Les résultats sont présentés Figure 105.

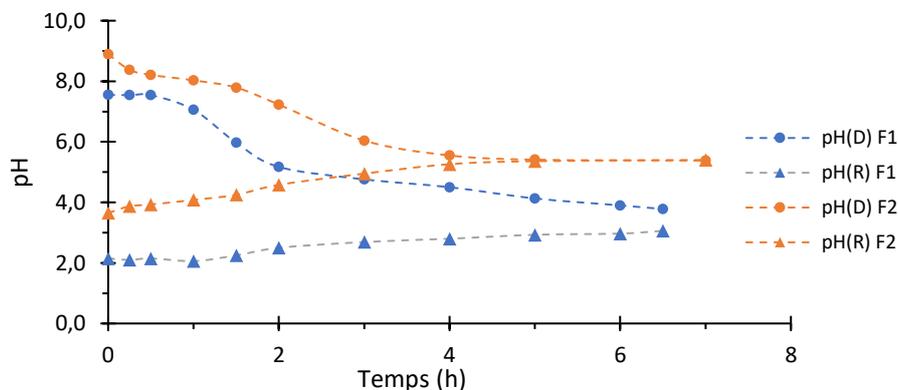


Figure 104. Evolution du pH de la phase aqueuse (pH(D)) et de la phase aqueuse réceptrice (pH(R)) au cours du temps pour les expériences F1 et F2.

Au cours des expériences, dans les deux cas, le pH de la phase aqueuse donneuse diminue et le

pH de la phase aqueuse réceptrice augmente. Les pH des phases aqueuses D et R tendent à atteindre une valeur commune, soit un  $\Delta\text{pH}$  de 0.

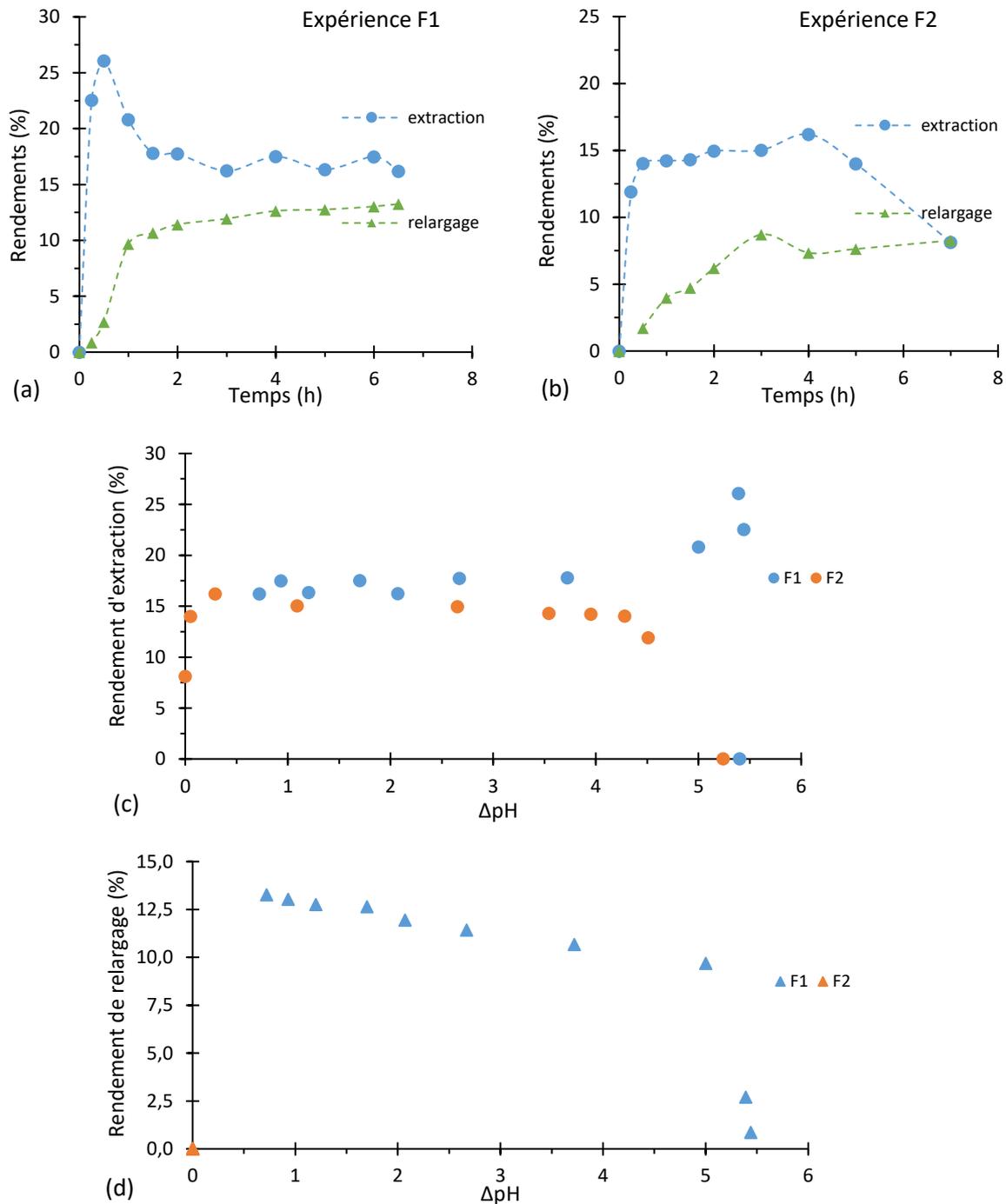


Figure 105. Rendements d'extraction et de relargage au cours du temps, (a) expérience F1, (b) expérience F2. (c) Rendement d'extraction en fonction de  $\Delta\text{pH}$ . (d) Rendement de relargage en fonction de  $\Delta\text{pH}$   $\Delta\text{pH} = \text{pH}_{(D)} - \text{pH}_{(R)}$ .

Dans le cas de l'expérience F1, en 30 minutes, le rendement d'extraction du fructose atteint un maximum de 26,1% pour ensuite diminuer pour atteindre 17,7% après 2h d'expérience puis rester constant. Dans le cas de l'expérience F2, en 30 minutes, le rendement d'extraction du

fructose atteint 14% pour ensuite augmenter pour atteindre 16,2% après 4h d'expérience puis diminuer pour atteindre 8,1% après 7h. Dans les deux expériences, le rendement de relargage augmente tout au long de l'expérience pour atteindre, dans l'expérience F1, 13,3% avec une augmentation plus importante la première heure permettant d'atteindre 9,7% et, dans l'expérience F2, 8,3% après 7h.

L'examen du rendement d'extraction en fonction de  $\Delta\text{pH}$  met en évidence un rendement d'extraction stationnaire pour des pH compris entre à 4,3 et 0,3 dans le cas de l'expérience F1 et entre 3,7 et 0,7 dans le cas de l'expérience F2. Pour un  $\Delta\text{pH}$  inférieur à 0,3, le rendement d'extraction diminue. L'examen du rendement de relargage en fonction de  $\Delta\text{pH}$  ne montre pas d'influence notable dans les deux expériences. En effet, bien que le rendement de relargage augmente lorsque le  $\Delta\text{pH}$  diminue, cette augmentation est due au temps. Etant donné que le  $\Delta\text{pH}$  diminue en fonction du temps, le lien entre rendement de relargage et  $\Delta\text{pH}$  n'est pas avéré.

Il a été mis en évidence la tendance du pH à diminuer dans le cas de la phase aqueuse donneuse et à augmenter dans le cas de la phase aqueuse réceptrice. Une première hypothèse est la complexation des ions  $\text{OH}^-$  de la phase aqueuse donneuse avec l'Aliquat336®, puis leur passage en phase organique, qui provoquerait la diminution du pH de la phase aqueuse donneuse. Si ce complexe est hydrolysé à l'interface avec la phase aqueuse réceptrice, les ions  $\text{OH}^-$  relargués dans la phase aqueuse réceptrice pourraient réagir avec les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  selon la réaction suivante :  $\text{OH}^- + \text{H}_3\text{O}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ . Ce qui aurait pour effet d'augmenter le pH de la phase aqueuse réceptrice, du fait de la diminution de la quantité d'ions  $\text{H}_3\text{O}^+$  dans la phase.

La valeur du  $\Delta\text{pH}$  semble donc avoir une influence directe sur le rendement d'extraction. Les prochaines études viseront à identifier le  $\Delta\text{pH}$  favorable au transport du fructose

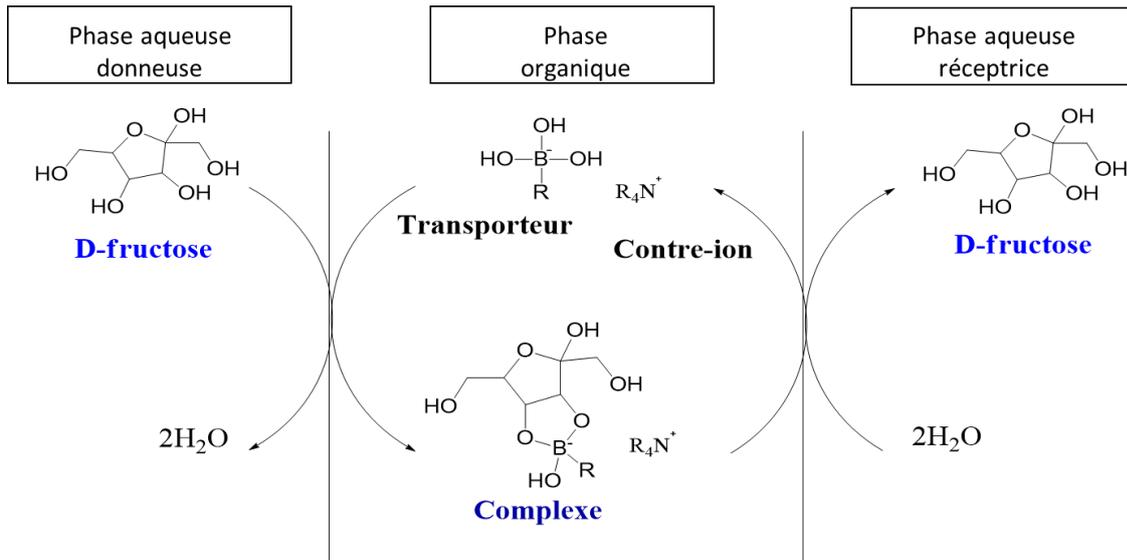


Figure 106. Schéma du transport du fructose.

L'observation des mécanismes impliqués dans le transport du fructose (Figure 106) permet d'avancer quelques explications à la consommation des espèces. Le contre ion (ici Aliquat336<sup>®</sup>) est fourni sous la forme  $[R_4N^+, Cl^-]$ . Un contre anion est présent initialement. Une fois le complexe formé, ce contre anion chlorure ne forme plus de paires d'ions avec le  $R_4N^+$ . Ce chlorure est alors libre d'aller vers les phases aqueuses. Le contre anion citrate du tampon citrate de sodium peut alors se trouver en phase organique jouant le rôle du contre anion chlorure. Ce transport induit une augmentation du pH de la phase aqueuse réceptrice.

Afin de déterminer l'influence de la variation de pH de la phase aqueuse donneuse sur l'extraction et d'identifier la gamme de  $\Delta pH$  favorable au transport du fructose, 3 expériences de transport du fructose ont été réalisées avec 3 concentrations différentes de la solution tampon. Il s'agit d'un tampon Tris-HCl à  $pH = 9$  et de concentration 100, 300 et 500 mM. Cela implique 3 concentrations différentes du tampon pour la phase aqueuse réceptrice. A savoir un tampon citrate de sodium à  $pH = 3$  et de concentration 100, 300 et 500 mM. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 42.

Expérience	Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
G1	D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl <b>100 mM</b>	9,0	100	-	-
	R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium <b>100 mM</b>	4,0	-	-	-
G2	D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl <b>300 mM</b>	8,7	100	-	-
	R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium <b>300 mM</b>	3,1	-	-	-
G3	D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl <b>500 mM</b>	8,8	100	-	-
	R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium <b>500 mM</b>	3,6	-	-	-
G1, G2, G3	D, pont, R	MIBC	200	-	-	-	100	200

Tableau 42. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de l'effet de la concentration des solutions tampons sur l'évolution des pH et l'identification du  $\Delta pH$  optimal.

Le système est thermostaté à 70 °C et agité à 200 rpm à l'aide de deux pales d'agitation plongeant dans les phases aqueuses. Le système de contre-pales est introduit dans la zone de pontage entre les deux compartiments. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours du temps, ainsi que la concentration en fructose des phases aqueuses, permettant de calculer le rendement d'extraction. Le résultat sous forme de tableau est donné en annexe 3. Les graphiques sont présentés Figure 107.

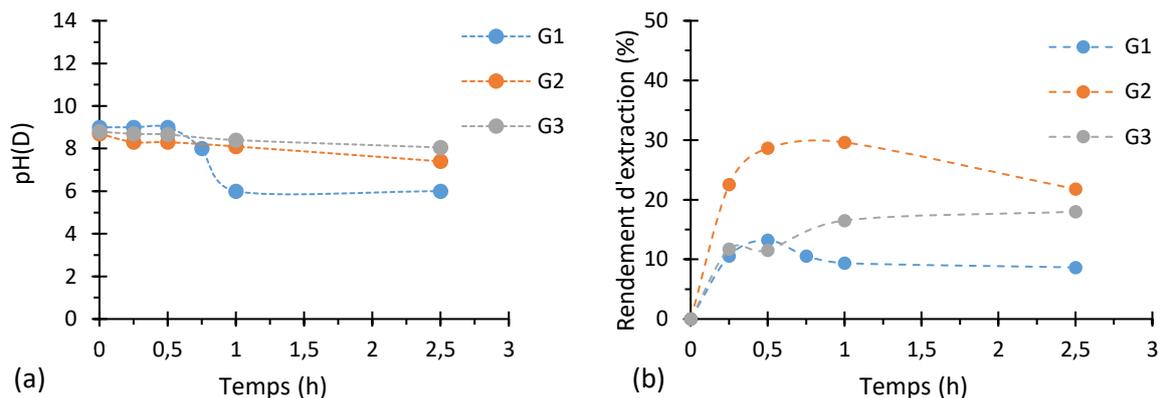


Figure 107. (a) Evolution du pH(D) en fonction du temps. (b) Rendement d'extraction en fonction du temps.

Lors de l'expérience G1, le rendement d'extraction du fructose augmente dans un premier temps, atteignant 10,6% à 30 minutes puis diminue pour atteindre 8,6% après 2h30. Lors de l'expérience G2, le rendement d'extraction augmente et atteint 29,6% après 45 minutes puis diminue à 21,8% à 2h30. Lors de l'expérience G3, le rendement d'extraction augmente jusqu'à 18% à 2h30 d'expérience. Le pH du tampon de concentration 100 mM (expérience G1) chute après 30 minutes d'expérience de 2 unités pH en 30 minutes. Le pH du tampon de concentration 300 mM (G2) chute de 1,3 unités pH en 2h30 et le tampon de concentration 500 mM de 0,7 unité pH. De manière attendue, plus la concentration du tampon est élevée moins la valeur de pH(D) diminue.

La relation entre le rendement d'extraction et le  $\Delta\text{pH}$  est présenté Figure 108.

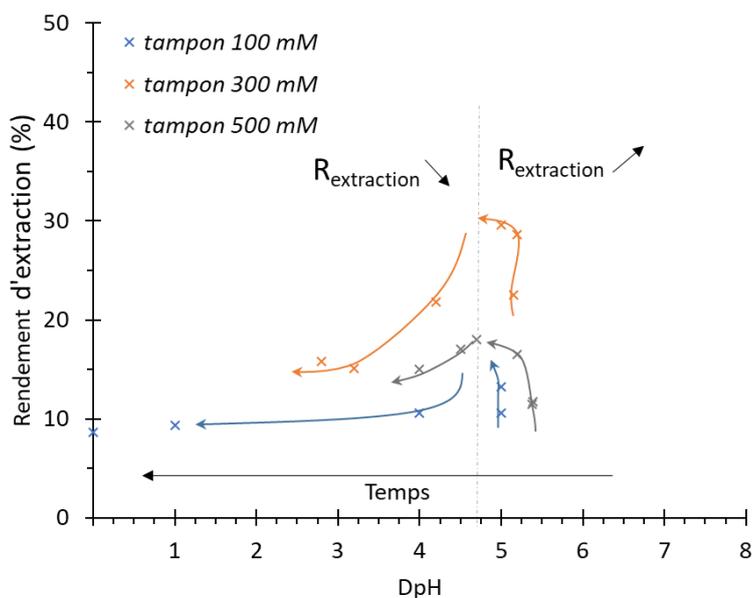


Figure 108. Représentation graphique de l'évolution du rendement d'extraction en fonction de  $\Delta\text{pH}$ .

Dans le cas du tampon 100 mM (G1), la chute du  $\Delta\text{pH}$  est concomitante à la chute du rendement d'extraction. Dans le cas du tampon 300 mM (G2), la chute du rendement d'extraction intervient lorsque le  $\Delta\text{pH}$  est inférieur à 5. Dans le cas du tampon 500 mM (G3), le rendement d'extraction ne diminue pas pour des valeurs de  $\Delta\text{pH}$  supérieures à 4,5.

En observant la différence de pH entre les phases aqueuses donneuse et réceptrice permettant l'extraction du fructose dans les différents cas, on obtient le tableau Tableau 43.

Expérience	Encadrement du $\Delta\text{pH}$ correspondant à la chute du rendement	Temps (h)
G1 (100 mM)	$4 < \Delta\text{pH} < 5$	0,5
G2 (300 mM)	$4,2 < \Delta\text{pH} < 5$	1
G3 (500 mM)	$4,5 < \Delta\text{pH}$	>2h30

Tableau 43. Encadrement de la valeur de  $\Delta\text{pH}$  correspondant à la baisse d'activité de l'extraction du fructose pour les différentes expériences G1, G2 et G3.

D'une part, l'augmentation de la concentration du tampon permet de retarder la chute du  $\Delta\text{pH}$  entraînant la baisse de l'efficacité de l'extraction. D'autre part, les différentes expériences permettent de situer la valeur de  $\Delta\text{pH}$  limitant à  $4,5 < \Delta\text{pH} < 5$ . Ainsi pour conserver une extraction efficace il est nécessaire de se placer à un  $\Delta\text{pH}$  supérieur à 5.

#### V.3.1.2. Influence de la régulation du pH sur le transport du fructose

L'expérience G3 d'extraction dans le tampon de concentration de 500 mM peut être étudiée plus en détail. En effet cette expérience a été réalisée sur une durée totale de 27h mais en y ajoutant NaOH et HCl pour réguler les différents pH des deux phases aqueuses. Le résultat et le déroulé de l'expérience sont présentés Figure 109.

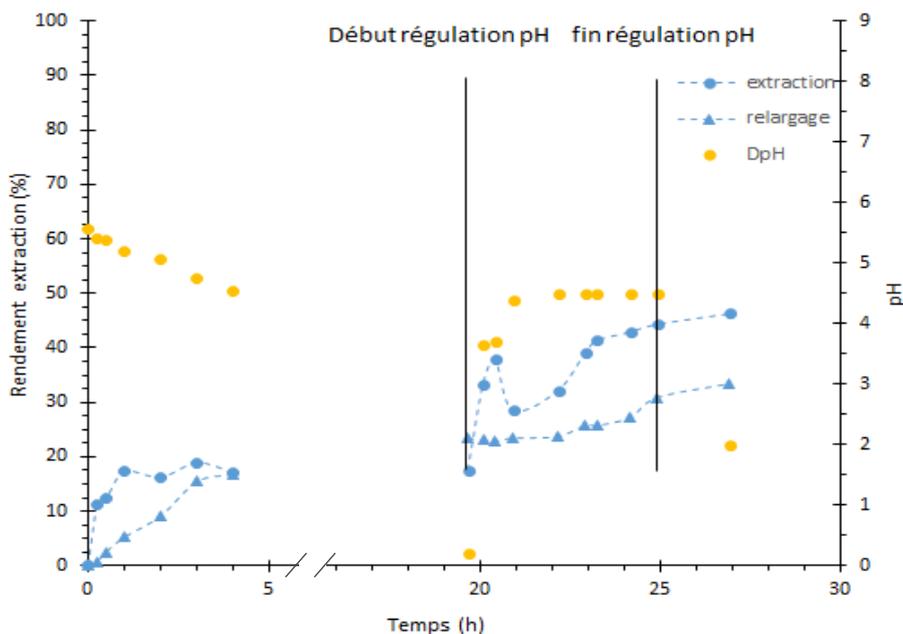


Figure 109. Suivi du rendement d'extraction du fructose et du  $\Delta pH$  au cours du temps (expérience G3).

Les résultats permettant le tracé de ce graphique sont présentés en annexe 4.

Une différence de pH ( $\Delta pH$ ) de 5,6 au départ et de 4,5 après 4h est mesurée. Sur cette plage de temps, le rendement d'extraction augmente pour atteindre 17%. Après 19h de réaction, la différence de pH est de 0,2. Le rendement d'extraction est alors de 17,5%. Le pH de la phase aqueuse donneuse est ensuite régulé à 7,5 par ajout de NaOH 10M et le pH de la phase aqueuse réceptrice est régulé à 3,9 par ajout de HCl 10M puis abaissé progressivement pour amener le  $\Delta pH$  jusqu'à la valeur de 4,5 entre 19,7h et 22,2h. Sur cet intervalle, le rendement d'extraction augmente de 17,5% à 37% à 20,4h puis diminue à 28,5% à 20,9h pour augmenter à nouveau jusqu'à 32,1%. Après 22,9h, avec un  $\Delta pH$  de 4,5, le rendement d'extraction est de 39,1%. Cette différence est maintenue jusqu'à 25h et le rendement d'extraction atteint 44,3%. Entre 20,4h et 20,9h, le rendement d'extraction du fructose diminue. Cette diminution est causée pas un  $\Delta pH$  sur l'intervalle précédent qui est inférieure à la valeur limite de 4,5 déterminée dans la partie précédente. Ainsi le pH de la phase aqueuse donneuse n'est pas assez élevée par rapport à celui de la phase aqueuse réceptrice pour que celle-ci n'induisse que l'extraction du fructose et dans le cas présent elle permet aussi le relargage d'une partie du fructose extrait et stocké dans la phase organique.

Le rendement de relargage augmente de 0 à 4h pour atteindre 16,9% (soit plus de 99% du fructose extrait). Après régulation du pH le rendement est de 23,0% (soit 69,2%) à 20,1h. Ce rendement d'extraction oscille pour atteindre 30% (69,5%) après 24,9h.

Le pH n'étant plus régulé de 25h à 27h, le  $\Delta pH$  diminue jusqu'à 2. Les rendements finaux

d'extraction et de relargage sont de 46,3% et 33,3% respectivement.

Le transport de fructose entre les deux phases aqueuses est efficace, en est pour preuve les 99,1% atteints par le rendement de relargage après 4h d'expérience. Ce rendement est plus faible ensuite, ce qui est due à la reprise de la réaction d'extraction. Le rendement de relargage continue alors à augmenter progressivement.

La régulation du pH après 19,7h d'expérience montre une augmentation significative (+15,8%) du rendement d'extraction. Un  $\Delta\text{pH}$  de 3,6 a ainsi permis de relancer la réaction d'extraction. Cependant ce  $\Delta\text{pH}$  n'est pas suffisant pour maintenir le rendement d'extraction élevé puisque l'on observe une baisse à 28,5%. Il faut imposer un  $\Delta\text{pH}$  de 4,5 minimum pour maintenir la réaction d'extraction du fructose active.

### V.3.1.3. Différence de pH, moteur du transport unilatéral

Dans le cadre du réacteur en H dans lequel le fructose sera à un temps  $t$  de l'expérience présent à la fois dans la phase aqueuse donneuse et dans la phase aqueuse réceptrice, il convient de s'assurer que le transport se fait de façon unilatérale depuis la phase aqueuse donneuse vers la phase aqueuse réceptrice. A cette fin, une étude de transport du fructose est réalisée en introduisant initialement le fructose dans la phase aqueuse réceptrice. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 44.

Expérience H Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 300 mM	8,8	-	-	-
R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 300mM	2,9	100	-	-
D, pont, R	MIBC	200	-	-	-	100	200

Tableau 44. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude du transport du fructose de la phase réceptrice vers la phase donneuse, expérience H.

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70 °C et agité à 200 rpm à l'aide de deux pales d'agitation plongeant dans les phases aqueuses. Le système de contre-pales est introduit dans la zone de pontage entre les deux compartiments. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours

du temps, ainsi que la concentration en fructose des phases aqueuses, permettant de calculer le rendement d'extraction et de relargage. Le pH est régulé par ajout de NaOH ou HCl 10M. Les résultats est présenté Tableau 45.

Expérience H						
Temps (h)	[D-Fru] <sub>D</sub> (mM)	[D-Fru] <sub>R</sub> (mM)	pH donneuse	pH réceptrice	extraction (%)	relargage (%)
0,00	0,0	109,0	8,8	2,9	0	0
0,25	0,0	107,5	8,7	3,2	1,4	0
0,50	0,0	108,4	8,5	3,2	0,5	0
1,00	0,0	108,8	8,2	3,3	0,2	0
1,50	0,0	114,8	7,9	3,3	-5,3	0
2,00	0,0	107,1	8,7	3,1	1,8	0
3,00	0,0	-	7,7	3,2	-	0
<b>5,00</b>	<b>0,0</b>	<b>105,5</b>	<b>7,5</b>	<b>2,9</b>	<b>3,2</b>	<b>0</b>
7,00	0,0	109,1	7,7	3,1	-0,1	0
8,00	0,0	106,7	7,9	3,6	2,1	0
22,00	9,3	95,0	7,6	6,2	12,8	66,6

Tableau 45. Résultats de l'étude du transport du fructose depuis la phase aqueuse réceptrice.

Au cours des 8 premières heures d'expérience, le rendement d'extraction depuis le compartiment R ne dépasse pas les 3,2% et reste nul en ce qui concerne le relargage dans le compartiment D. Après 22h, le rendement d'extraction est de 12,8% et 66,6% du fructose extrait ont été relargué. On note également une évolution du pH vers un équilibre car le pH n'est plus régulé après 8h d'expérience.

Le rendement d'extraction maximal de 3,2% est attribuable, par comparaison à l'expérience témoin sans T/coT (expérience E), à la solubilité du fructose dans la phase organique. Ainsi, cette étude démontre que le transport du fructose, dans les conditions définies, est unilatéral, depuis la phase aqueuse donneuse vers la phase aqueuse réceptrice pour une durée de réaction de 22h.

### V.3.2. Influence de l'agitation sur le transport du fructose

L'agitation des phases dans le réacteur a une influence importante sur le transport du fructose, c'est-à-dire sur l'étape d'extraction et de relargage du fructose (phénomène d'interface dépendant de la surface de l'interface à laquelle se déroule les échanges et de l'agitation de la phase permettant aux molécules d'accéder à cette interface) ainsi que sur la circulation du solvant organique entre les deux compartiments. Cette partie met en évidence l'effet de la

vitesse d'agitation des compartiments et définira les conditions optimales d'agitation à utiliser. Il convient cependant de rappeler qu'un mélange des deux phases aqueuses entre elles est à éviter dans la géométrie du réacteur en H. Une agitation trop forte peut créer une émulsion de phase aqueuse dans la phase organique et ainsi engendrer un mélange des deux phases aqueuses.

Trois expériences sont réalisées avec pour différence trois couples de vitesses d'agitation différentes afin de déterminer leur influence sur le transport du fructose. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 46 et Tableau 47.

Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)
D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 300 mM	8,8	100	-	-
R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 300mM	2,9	-	-	-
D, pont, R	MIBC	200	-	-	-	100	200

Tableau 46. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude du transport du fructose de la phase réceptrice vers la phase donneuse.

Expérience	Vitesse de rotation D (rpm)	Vitesse de rotation R (rpm)
I1	100	100
I2	198	200
I3	300	300

Tableau 47. Vitesse de rotation des pales d'agitation dans chacun des compartiments pour les expériences I1 à I3.

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70 °C. Le pH des phases aqueuses et la concentration en fructose des phases aqueuses sont suivis au cours du temps, permettant de calculer le rendement d'extraction et de relargage. Le pH est régulé par ajout de NaOH ou HCl 10M. Les résultats sont présentés en annexe 5. Les rendements sont calculés à partir de la quantité initiale de fructose présent dans la phase aqueuse donneuse et sont présentés Figure 110. La régulation du pH est effectuée de façon à ce que le ΔpH soit maintenu supérieur à 4,5.

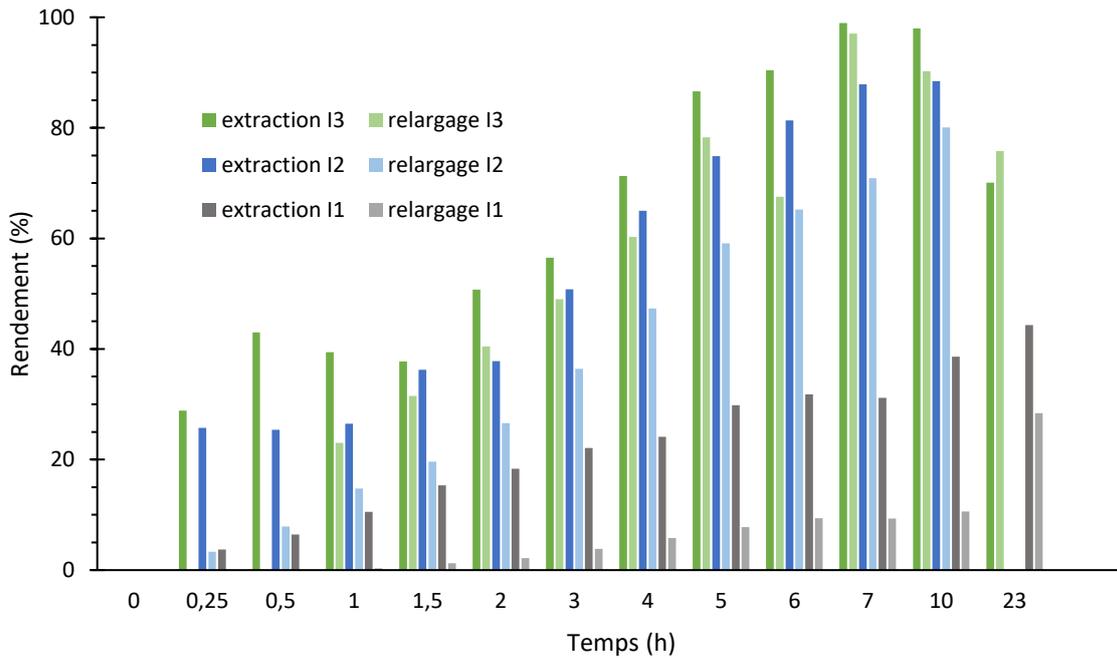


Figure 110. Suivi des rendements d'extraction et de relargage du fructose pour les différentes agitations imposées dans les compartiments. (Expériences I1 à I3).

D'après la Figure 110, l'expérience I1 montre que le rendement d'extraction augmente au cours du temps pour atteindre 38,6% après 10h. Le rendement de relargage augmente pour atteindre un rendement global (calculé par rapport à la quantité de fructose initial en phase aqueuse donneuse) de 10,6%, soit 27,4% du fructose extrait qui se retrouvent effectivement relargués. Le bilan matière effectué entre 2 et 10h montre une valeur décroissante de 72% à 10h.

Concernant l'expérience I2, le rendement d'extraction augmente au cours du temps pour atteindre 88,4% après 10h. Le rendement de relargage augmente pour atteindre une valeur globale de 70,9% soit 80,2% du fructose extrait. Le bilan matière effectué sur les 10h d'expérience dépasse les 90% à 10h et est compris entre 77,5% et 91,6% durant l'expérience.

Concernant l'expérience I3, le rendement d'extraction augmente jusqu'à 7h pour atteindre 99% avec un relargage atteignant dans le même temps 97% soit 98% du fructose extrait. De 7h à 10h la valeur du rendement de relargage reste stable, la valeur du rendement de relargage diminue à 90,2%. Le bilan matière atteint 98% à 7h.

Entre 10h et 23h le pH n'a pas été régulé et le  $\Delta pH$  à 23h est inférieur à 1. Après 23h d'expérience le rendement d'extraction I1 augmente pour atteindre 44,3%, de même pour le rendement global de relargage qui est de 28,4% soit 64,1% du fructose extrait relargués. Ce temps d'expérience exhibe un bilan matière de 84,1%. Le rendement d'extraction de l'expérience 3 diminue à 70,1% et le relargage 75,8% soit un relargage total du fructose extrait et un bilan matière de 100%.

L'augmentation des vitesses d'agitation améliore à la fois le rendement d'extraction et de relargage à des temps donnés. Concernant l'expérience 3 (235-300), le transport du fructose est terminé et atteint 99% à 7h d'expérience. Le bilan matière supérieur à 90% confirme l'efficacité de l'étape de relargage. A la fin de l'expérience, la totalité du fructose se trouve dans les phases aqueuses. Pour cette expérience I3, une forte diminution des rendements est observée entre 10h et 23h, en lien avec la différence de pH qui n'est plus maintenu supérieur à 4,5.

L'agitation effectuée dans l'expérience I3 est celle utilisée lors des études ultérieures afin de favoriser le transport du fructose.

### V.3.3. Mise en évidence des cycles effectués par le couple T/coT

Dans le chapitre III, l'étude de l'extraction du fructose montre que l'utilisation à d'un rapport molaire « 1/1 » « D-Fru/T » donne les meilleurs résultats. Ici, il s'agit d'effectuer en continu l'extraction du fructose au cours de sa formation par isomérisation du glucose. Dans l'optique de minimiser les coûts lors de ce procédé, la quantité de transporteur doit être diminuée, en maintenant un rapport molaire 1 pour 2 avec le cotransporteur.

Cette diminution des quantités de T/coT peut mettre en évidence un turn-over number effectué par ce couple. C'est-à-dire, plus d'une molécule de fructose sera transportée par ce couple au cours d'une expérience. Une étude de l'influence de la quantité de matière du couple sur le transport du fructose est également présente dans cette partie.

#### V.3.3.1. Mise en évidence du turn-over du transporteur

Cette étude vise à déterminer si un turn-over number du couple T/coT existe vis-à-vis de l'extraction du fructose. Pour cela, la quantité de 3,4-DCPBA/Aliquat336® est diminuée par rapport à celle du fructose initial. Le rapport molaire D-Fru/3,4-DCPBA est maintenant de 1/0,25, tandis que le rapport molaire 3,4-DCPBA/Aliquat336® est maintenu à 1/2. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 48.

Expérience J Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D-Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)	Agitation (rpm)
D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 300 mM	8,8	100	-	-	280
R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 300mM	2,9	-	-	-	300
D, pont, R	MIBC	200	-	-	-	<b>25</b>	<b>50</b>	-

Tableau 48. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'expérience de mise en évidence du turn-over du transporteur, (expérience J).

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70 °C. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours du temps, ainsi que la concentration en fructose des phases aqueuses, permettant de calculer le rendement d'extraction et de relargage. Le pH est régulé par ajout de NaOH ou HCl 10M, soit un volume compris entre 0,1 et 0,5 mL modifiant les volumes de phases aqueuses. Les résultats sont présentés en annexe 6.

Le bilan matière au cours de l'expérience varie entre 84,7% et 100%, validant la bonne efficacité de l'agitation et du transport du fructose. Les valeurs des rendements d'extraction et de relargage et du ΔpH sont reportés Figure 111.

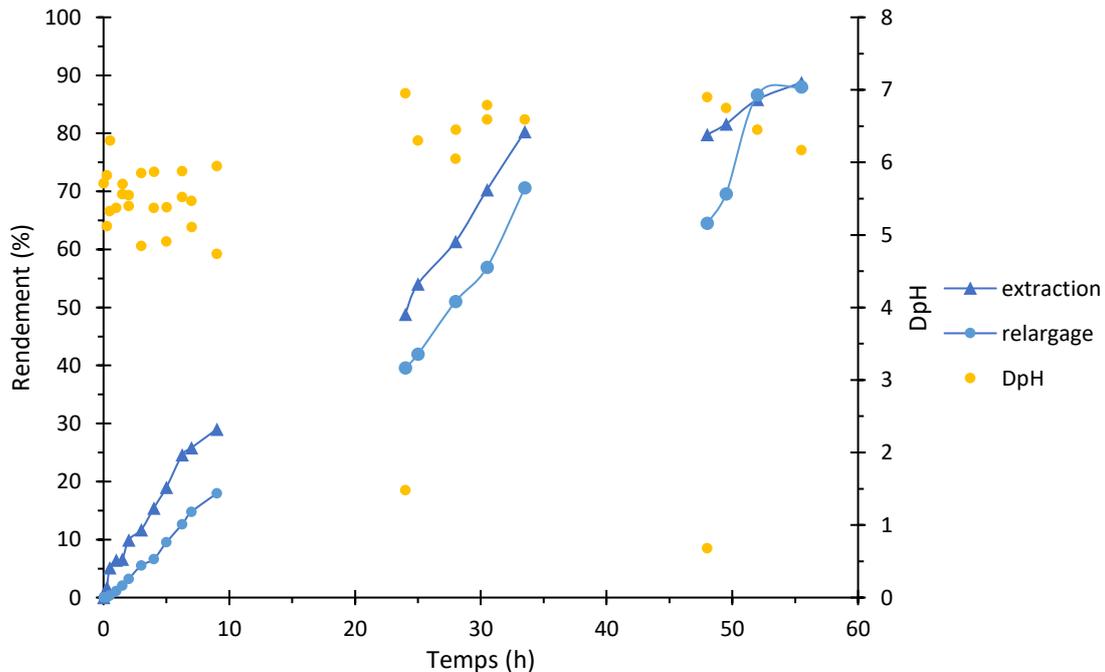


Figure 111. Représentation graphique des rendements d'extraction et de relargage et du ΔpH au cours du temps.

Le rendement d'extraction augmente au cours des 55,5h de l'étude pour atteindre 88,8%. Le rendement de relargage augmente de façon relative pour atteindre 88%. Soit 99% du fructose extrait se trouvent relargués après 55,5h. Une valeur confirmée par le bilan de matière affichant 99,2%.

La valeur du  $\Delta\text{pH}$  varie entre 4,8 et 7 sur les intervalles de temps où le pH est régulé (entre 0 et 9h, 24h et 33,5h, 48h et 55,5h). Sur les intervalles où le pH n'est pas régulé, le  $\Delta\text{pH}$  diminue à 1,5 et 0,8.

Après 7h d'expérience, le rendement d'extraction dépasse 25%. La quantité de fructose extraite est supérieure à la quantité de fructose que pourrait extraire durant 1 cycle d'extraction toutes les molécules de 3,4-DCPBA présentes dans la phase organique. Par conséquent, le couple 3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> est recyclé au cours de l'expérience. Ce turn-over number met également en évidence la diffusion des molécules de 3,4-DCPBA (T) et Aliquat336<sup>®</sup> (coT) dans les deux sens au sein du pont reliant les deux compartiments du réacteur.

Le turn-over ayant été démontré, il est maintenant nécessaire d'examiner l'effet de la quantité du couple 3,4-DCPBA/ Aliquat336<sup>®</sup> sur la cinétique d'extraction du fructose.

#### V.3.3.2. Etude de l'influence de la quantité du couple T/coT sur la cinétique d'extraction

L'effet potentiel de la modification de la quantité des espèces 3,4-DCPBA et Aliquat336<sup>®</sup> est réalisée avec différents ratio D-Fru/3,4-DCPBA. Trois expériences présentent un ratio de 1/0,25, de 1/0,125 et de 1/0,05. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 49.

Expé- rience	Comparti- ment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D- Fru] <sub>i</sub> (mM)	[3,4- DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)	Agitation (rpm)
K1, K2, K3	D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 300 mM	8,8	100	0	0	280
	R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 300mM	2,9	0	0	0	300
K1	D,pont,R	MIBC	200	-	0	0	<b>25</b>	<b>50</b>	-
K2	D,pont,R	MIBC	200	-	0	0	<b>12,5</b>	<b>25</b>	-
K3	D,pont,R	MIBC	200	-	0	0	<b>5</b>	<b>10</b>	-

Tableau 49. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de l'influence de la concentration en 3,4-DCPBA et Aliquat336® sur la cinétique d'extraction du fructose.

Le système est thermostaté dans sa globalité à 70 °C. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours du temps, ainsi que la concentration en fructose des phases aqueuses, permettant de calculer le rendement d'extraction et de relargage. Le pH est régulé par ajout de NaOH ou HCl 10M. Les résultats sont présentés en annexe 7. Le rendement d'extraction pour chacune des expériences est présenté Figure 112.

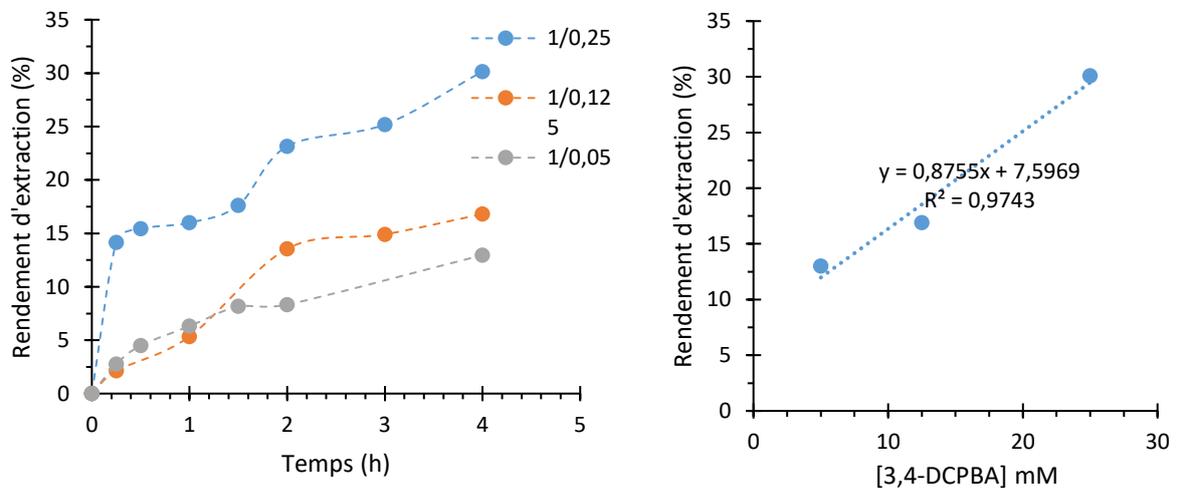


Figure 112. (gauche) Rendement d'extraction au cours du temps pour les différents rapports Fru/3,4-DCPBA. (droite) Rendement d'extraction après 4h en fonction de la concentration en 3,4-DCPBA.

Pour les trois expériences le rendement d'extraction augmente au cours du temps : il atteint 30,1% pour l'expérience 1, 16,9% pour l'expérience 2 et 13% pour l'expérience 3 après 4h de réaction. Le tracé du rendement d'extraction à t=4h en fonction de la concentration en 3,4-DCPBA montre une fonction linéaire modélisée par l'équation

$$\mu (\%) = 0,876 \times [34 - DCPBA] (mM) + 7,597$$

Avec un coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de 0,974.

En observant le rendement après 4h d'expérience, la quantité de 3,4-DCPBA introduite a un effet sur le rendement d'extraction de façon proportionnelle. Plus précisément il semble que ce soit la cinétique d'extraction qui soit influencée. En effet dans le paragraphe précédent, un rendement d'extraction de 88,8% après 55,5h est atteint, le rendement final d'extraction n'est donc pas limité par la quantité de transporteur.

#### V.3.4. Conclusion

Les études précédentes ont permis de déterminer qu'il est nécessaire d'imposer une différence de pH supérieur à 4,5 entre les deux phases aqueuses afin d'extraire un maximum de fructose de la phase aqueuse donneuse. L'influence de l'agitation a été démontrée et une vitesse optimale de 280-300 rpm a été déterminée. Cette vitesse d'agitation permet un transport optimal de plus de 90% du fructose initialement présent. Il a également été mis en évidence la possibilité pour une molécule de 3,4-DCPBA de participer au transport de plus d'une molécule de fructose, lié au recyclage du couple 3,4-DCPBA/Aliquat336®. De plus, la quantité de 3,4-DCPBA influence proportionnellement la cinétique d'extraction du fructose.

Cette expérience peut être comparée à l'expérience de transport de monosaccharides menée par Karpa *et al.* dans un réacteur de type coaxial.<sup>[120]</sup> L'expérience ayant obtenu le meilleur résultat en terme de relargage de fructose a été réalisée avec une membrane organique composée de 60 mL de 1,2-dichloroéthane contenant 10 mM de PBA et 10 mM d'Aliquat336®. La phase aqueuse donneuse est composée du tampon phosphate de potassium 100 mM à pH = 11 contenant 6 mM de chacun des monosaccharides : fructose, glucose et sucrose. La phase aqueuse réceptrice est composée de tampon phosphate de potassium 100 mM à pH = 6. Le tout réalisé à 22°C. Après 5 à 6h d'expérience, le flux de matières dans la phase aqueuse réceptrice est calculé. Le résultat est présenté dans le Tableau 50 avec les valeurs expérimentales obtenues dans le réacteur en H et le réacteur coaxial.

Mise en œuvre	Flux de fructose $\times 10^3$ (mol.s <sup>-1</sup> .m <sup>-2</sup> )	Surface interphase phase organique/phase aqueuse réceptrice
Karpa et al <sup>[120]</sup>	$1,8 \times 10^{-3}$	18,1 cm <sup>2</sup>
Réacteur coaxial	$4,7 \times 10^{-3}$	40,0 cm <sup>2</sup>
Réacteur en H (expérience I3)	2,9	26,4 cm <sup>2</sup>

Tableau 50. Comparaison des flux de fructose dans la phase aqueuse réceptrice dans différentes expériences de transport de fructose.

Dans la mise en œuvre en réacteur coaxial de Karpa *et al.*, le flux de fructose est de  $1,8 \times 10^{-6}$  mol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>, pour une interface phase aqueuse réceptrice/phase organique de 18,1 cm<sup>2</sup>. Dans le cas du réacteur coaxial, après 5h d'expérience, le flux de fructose dans la phase aqueuse réceptrice est de  $4,7 \times 10^{-6}$  mol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>, pour une interface de 40 cm<sup>2</sup>. Dans le réacteur en H, dans les conditions optimales déterminées (expérience I3), le flux de fructose dans la phase aqueuse réceptrice est de  $2,9 \times 10^{-3}$  mol.s<sup>-1</sup>.m<sup>-2</sup>, pour une interface de 26,4 cm<sup>2</sup>. Soit un flux 600 fois supérieur à celui obtenu avec le réacteur coaxial pour une surface 1,5 fois inférieure. Le transport du fructose est donc plus favorable dans les conditions optimisées dans le réacteur en H.

#### V.4. Production du 5-HMF par catalyse hybride

Les différents paramètres influençant le transport du fructose ont été étudiés (différence de pH, vitesses d'agitation, concentration en 3,4-DCPBA/Aliquat336®). Dans cette partie sont présentés les résultats issus de la combinaison des étapes de catalyse enzymatique, de transport du fructose et de catalyse chimique pour l'obtention du 5-HMF à partir du glucose dans le réacteur en H.

Une expérience a été réalisée dans les conditions « non conformes » pour le transport du fructose ( $\Delta pH < 4,5$ ). Cette expérience ne permet pas le transport du fructose et donc pas non plus la production du 5-HMF. Cette expérience est présentée en annexe 8. Une seconde étude est réalisée dans les conditions optimisées dans ce chapitre et dans le chapitre III. Puis, une dernière partie présentera la mise en œuvre du réacteur dans les conditions optimisées.

#### V.4.1. Catalyse hybride dans le réacteur en H, effet de la température

Dans le chapitre III, la température optimale de la déshydratation du fructose a été fixée à 80°C. C'est ce nouveau paramètre qui est appliqué au système en vue de la production de 5-HMF à partir du glucose.

L'étude est réalisée avec une différence de pH favorable au transport. Il s'agira d'une différence de pH initial de 6,2. Une température dans le compartiment D de 70°C favorable à l'isomérisation et une température de 80°C dans le compartiment R sont utilisées. Les conditions expérimentales sont présentées dans le Tableau 51.

Expérience L Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH <sub>i</sub>	[D-Glc] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336®] (mM)	Agitation (rpm)
D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 300 mM	<b>8,7</b>	100	-	-	280
R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 300mM	<b>3</b>	-	-	-	300
D Pont R	MIBC	200	-	-	-	100	200	-

Tableau 51. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de la catalyse hybride dans le réacteur en H, (expérience L).

L'expérience est menée durant 25 h. Après 25 h, les quantités de matières sont mesurées et les différents rendements calculés et présentés Tableau 52.

Expérience L				
bilan carbone	rendement			conversion
	extraction	isomérisation	5-HMF	D-Glc
%	%	%	%	%
80	60,1	73,6	27,5	77,9

Tableau 52. Résultats obtenus après 25h d'expérience à 70°C dans le compartiment d'isomérisation et 80°C dans le compartiment de déshydratation.

Le rendement d'extraction est de 60,1%. Le rendement d'isomérisation est de 73,6%. Le rendement en 5-HMF est de 27,5%. La conversion du glucose est de 77,9%.

Le rendement d'isomérisation est de même ordre de grandeur et démontre le déplacement de l'équilibre thermodynamique de la réaction. Le rendement de déshydratation démontre la faisabilité du procédé de production du 5-HMF. Cependant durant l'expérience il a été noté une diminution du volume de la phase aqueuse dans le compartiment R (celui thermostaté à 80°C). Cette variation de volume pourrait remettre en cause la précision des calculs de rendements et de conversion. Cette variation de volume peut s'expliquer par un réacteur pas totalement hermétique et donc une évaporation possible des solvants. Ainsi, une nouvelle expérience de catalyse hybride est réalisée entièrement à 70°C.

#### V.4.2. Catalyse hybride dans le réacteur en H dans les conditions optimisées

L'étude est réalisée avec une différence de pH favorable au transport. Il s'agit d'une différence de pH initial de 5,5. Les conditions expérimentales sont les mêmes que précédemment, à la différence de la concentration en 3,4-DCPBA de 50 mM, de la concentration en Aliquat336® de 100 mM et de la température dans les compartiments D et R qui est fixée à 70°C. L'expérience a été réalisée sans interruption durant 32h. Les résultats sont présentés en annexe 9 l'évolution des quantités de matière est représentée Figure 114.

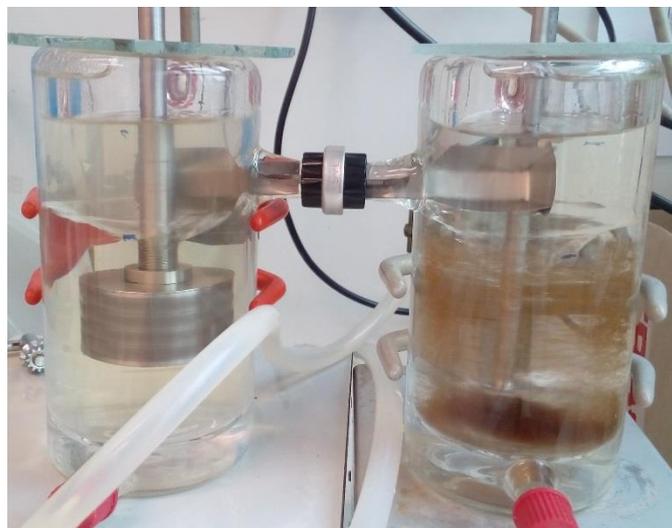


Figure 113. Photographie de la mise en œuvre de la catalyse hybride dans le réacteur en H.

La Figure 113 représente la photographie du réacteur au cours de l'expérience de catalyse hybride.

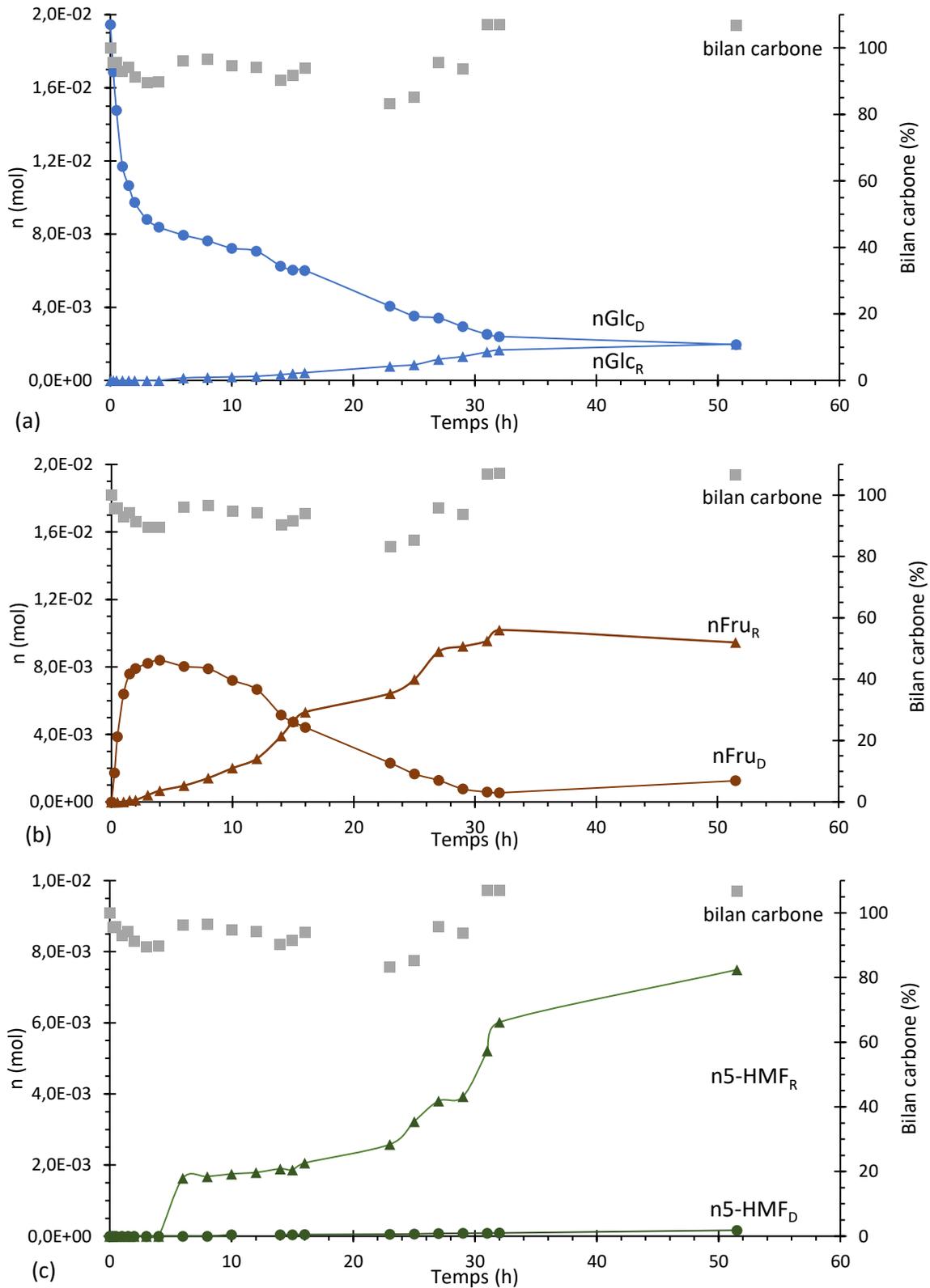


Figure 114. Représentations des quantités de matières des différentes espèces en solution. Expérience M. (a) Suivi de la quantité de matière de glucose dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice. (b) Suivi de la quantité de matière de fructose dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice. (c) Suivi de la quantité de matière de 5-HMF dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice.

Au cours de l'expérience, le bilan matière varie entre 83,26% et 100%. La quantité de glucose dans la phase aqueuse donneuse diminue fortement pendant les 4 premières heures puis plus lentement jusqu'à la fin de l'expérience. La quantité de fructose augmente fortement pendant les 4 premières heures, de façon complémentaire à la diminution de la quantité de glucose, puis diminue jusqu'à la fin de l'expérience. Dans la phase aqueuse réceptrice, la quantité de fructose augmente au cours du temps, tandis que la quantité de glucose est nulle pendant les 6 premières heures puis elle augmente légèrement. La quantité de 5-HMF, nulle les 4 premières heures, augmente ensuite jusqu'à la fin de l'expérience. Les différents rendements sont calculés et présentés Figure 115.

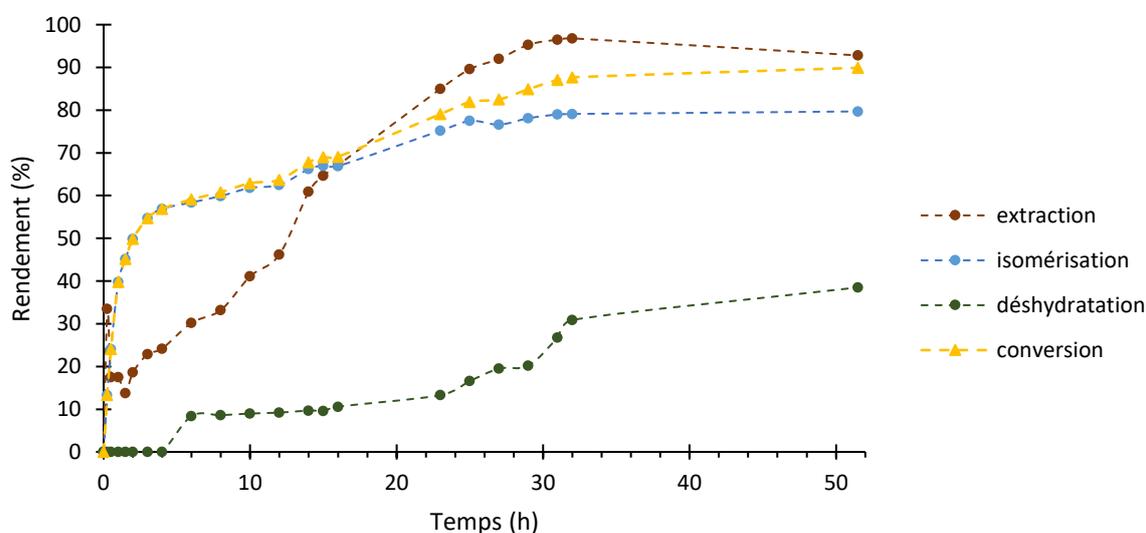


Figure 115. Représentation graphique des rendements d'isomérisation, d'extraction et de déshydratation et de la conversion du glucose au cours du temps (Expérience M).

Le rendement d'extraction augmente au cours du temps pour atteindre 96,8% après 32 h de réaction. Le rendement d'isomérisation augmente tout au long de l'expérience et atteint 79,1% après 32 h. Le rendement en 5-HMF augmente pour atteindre 30,9% après 32 h. Le calcul de la conversion du glucose dans ce procédé après 32h donne 87,7%. De 32 h à 51,5 h le pH n'est plus régulé et comme pour les études précédentes le rendement d'extraction diminue. Ce dernier atteint la valeur de 92,8%. Le rendement d'isomérisation est alors de 79,7% et celui de déshydratation de 38,5%. La conversion du glucose atteint alors 89,9%.

Le rendement d'extraction de 96,8% après 32h de réaction montre un transport efficace au sein du réacteur. Le rendement d'isomérisation de 79,1% démontre un déplacement de l'équilibre d'isomérisation de 29pp, dû à l'extraction du fructose de la phase aqueuse donneuse. Le bilan matière de plus de 90% effectué sur les espèces en phases aqueuses valide l'efficacité

du relargage. Le rendement de déshydratation de 30,9% après 32 h valide la production de 5-HMF par catalyse hybride au sein du réacteur en H.

#### V.4.3. Discussion

C'est la première fois qu'un tel procédé de production du 5-HMF est mis au point. Cependant d'autres procédés ont été étudiés. Le premier procédé de catalyse hybride pour la transformation du glucose en 5-HMF a été reporté par Huang *et al.*<sup>[23]</sup> Il présente le couplage d'un catalyseur hétérogène acide, -SO<sub>3</sub>H immobilisé sur de la silice mésoporeuse, et d'une glucose isomérase thermophile dans un milieu THF:H<sub>2</sub>O 4:1 (v:v). Une silice mésoporeuse fonctionnalisée (NH<sub>2</sub>-aminopropyl-FMS) est utilisée pour immobiliser l'enzyme et la protéger. Le rendement en fructose obtenu est de 61% et le rendement en 5-HMF de 30%. La température est dans un premier temps de 90°C durant 1 h, permettant à la glucose isomérase de fonctionner puis la température est augmentée à 130°C durant 24 h, permettant au catalyseur de déshydratation de fonctionner. Ainsi, même si la faisabilité d'un procédé hybride pour la production de 5-HMF est démontrée, la recyclabilité du système reste impossible de par la dénaturation de l'enzyme dans les conditions appliquées pour la déshydratation. Bien que le rendement de déshydratation soit similaire à celui obtenue dans notre étude, le verrou de la compatibilité des conditions de réaction n'est pas levé dans leur cas, au contraire de notre procédé dans le réacteur en H.

Alipour *et al.* ont présenté un procédé de production du 5-HMF, non pas hybride mais en cascade, utilisant le principe de membrane liquide pour l'extraction du fructose afin de s'affranchir des problèmes de compatibilité entre les deux réactions (isomérisation et déshydratation).<sup>[123]</sup> Le schéma de toutes les étapes du procédé est présenté dans la Figure 116.

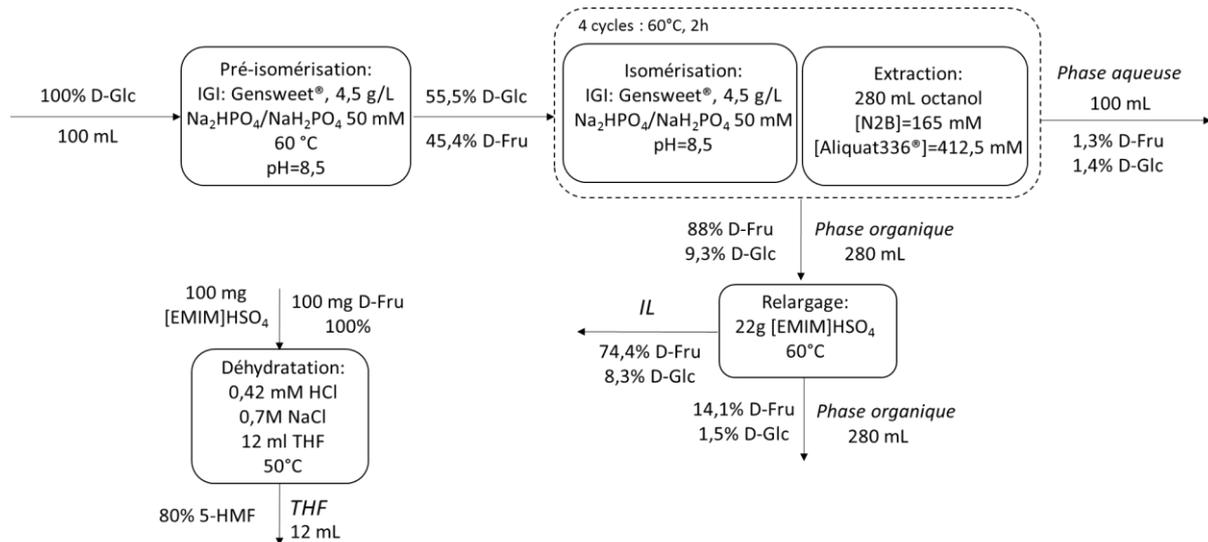


Figure 116. Diagramme schématisé du procédé d'isomérisation du glucose et transport du fructose développé par Alipour *et al.* et de l'étape de déshydratation d'un mélange exclusivement constitué de fructose.<sup>[123]</sup>

Cette mise en œuvre débute par une étape de pré-isomérisation. Ensuite 4 cycles simultanés d'isomérisation et d'extraction permettent un rendement d'extraction du fructose de 98%. Chaque cycle nécessite un ajustement du volume de phase organique (pour un volume total de 280 mL) afin de respecter le rapport molaire D-Fru/N2B (acide naphthalène-2-boronique) de 1/1 pour la première extraction, 1/2 pour la seconde extraction, 1/3 pour la troisième extraction et 1/3,5 pour la quatrième. La durée totale de l'expérience est de 20h (une nuit d'isomérisation et 8h d'extraction). Le rendement d'isomérisation est de 89%. Soit un déplacement de l'équilibre d'isomérisation (calculé par rapport à l'étape de pré-isomérisation) de 44%. Le déplacement d'équilibre dans le cadre de la mise en œuvre dans le réacteur en H est de 29% pour un rendement d'extraction de 96%. Le procédé développé par Alipour *et al* comporte une étape de relargage du fructose dans un liquide ionique ([EMIM][HSO<sub>4</sub>]). Le rendement de relargage à 60°C est de 84% (calculé à partir du fructose extrait). Cette étape est théoriquement suivie par la déshydratation du fructose et l'extraction du 5-HMF dans une phase organique. Expérimentalement, la réaction réalisée a consisté en la modélisation du milieu de relargage par la préparation de fructose dans le liquide ionique. La déshydratation menée dans les conditions données Figure 116 permet d'obtenir un rendement de déshydratation de 80%, valeur supérieure aux 31% obtenus après 32h d'expérience dans le cadre de la mise en œuvre dans le réacteur en H. Cependant, dans le cas du réacteur en H, ce rendement est obtenu dans une mise en œuvre simultanée des 3 étapes du procédé : isomérisation enzymatique, transport et déshydratation chimique.

## V.5. Conclusion

Dans ce chapitre le design du réacteur en H a été étudié pour lever les verrous identifiés dans l'art antérieur :

- Incompatibilité entre les catalyseurs et les conditions réactionnelles (Huang et al.)
- Nombre d'étapes de réactions et de séparations important (Alipour et al.)

Nous avons donc développé ce réacteur pour mettre en œuvre un milieu triphasique, contenant deux phases aqueuses et une phase organique, cette dernière devant être en permanence au contact des deux autres. Le réacteur devait aussi être thermostaté, idéalement de façon indépendante pour chacune des phases aqueuses. La volonté de lever ces verrous a donné lieu au réacteur bicompartimenté présenté dans ce chapitre.

Les échanges de matière au sein du réacteur ont été étudiés et optimisés. Afin de permettre le mouvement à double sens de la phase organique dans le pont reliant les deux compartiments, un jeu de contre-pales a été inséré. Ce jeu a permis le transport du fructose dans sa forme complexée depuis la phase aqueuse donneuse vers la phase aqueuse réceptrice avec des performances globales améliorées.

Les différents paramètres influençant le transport du fructose au sein du réacteur ont ensuite été mis en évidence. Il s'agit de la différence de pH entre les deux phases aqueuses, de l'agitation et de la quantité de matière du couple 3,4-DCPBA/Aliquat336®. La différence de pH, devant être supérieur à 4,5, s'avère être le véritable moteur de l'extraction du fructose. Une vitesse d'agitation de 280 rpm dans la phase aqueuse donneuse et de 300 rpm dans la phase aqueuse réceptrice a montré l'absence de formation d'émulsions et de mélange entre les différentes phases, et favorise la circulation au sein du réacteur, permettant un relargage de plus de 95% des molécules de fructose extraites. Enfin la diminution du rapport molaire Fru/3,4-DCPBA de 1/1 à 1/0,25 a permis le transport de plus de 80% du fructose initialement présent. Ce rendement valide le fait qu'une même molécule de 3,4-DCPBA intervient au moins deux fois dans le transport du fructose. Ainsi le couple 3,4-DCPBA/Aliquat336® effectue un turn-over au sein de la phase organique. De plus ce turn-over valide une fois de plus la bonne circulation des espèces au sein du réacteur avec des aller-retours du couple transporteur/cotransporteur entre les interphases donneuse/réceptrice et la phase organique. Plusieurs études réalisées avec des quantités du couple 3,4-DCPBA/Aliquat336® différentes

ont permis de démontrer une proportionnalité entre la cinétique d'extraction et la quantité de matière de 3,4-DCPBA.

Un design de réacteur proche du réacteur « en H » et un réacteur commercial à deux chambres, utilisé pour la production de CO dans un compartiment D, son passage par le pont et sa consommation pour réaction de carbonylation dans un compartiment R.<sup>[153],[159]</sup> Cependant les contraintes de circulation entre les deux chambres ne sont pas un paramètre limitant puisqu'il s'agit d'un système liquide/gaz/liquide. De plus les dimensions et agitations ne sont pas similaires.

La production de 5-HMF par catalyse hybride au sein du réacteur bicompartimenté a été démontrée dans ce chapitre. Dans un premier temps, l'utilisation d'une différence de pH défavorable de 2,5 a illustré la non production de 5-HMF, due à un transport limité de fructose. Dans les conditions favorables de  $\Delta\text{pH}$  ( $>4,5$ ), un rendement de production en 5-HMF de 30,9% et un rendement d'isomérisation de 79,1% ont été obtenus. Ce rendement d'isomérisation illustre le déplacement de l'équilibre d'isomérisation rendu possible par un rendement d'extraction du fructose de 96,8%. Ces rendements sont toutefois limités par la quantité de glucose, augmentant au cours du temps, qui est extraite par la phase organique et qui est transféré dans la phase aqueuse réceptrice, le rendant ainsi indisponible pour la réaction d'isomérisation.

Enfin, l'application de deux températures différentes dans les phases aqueuses a montré une augmentation du rendement de production en 5-HMF de 10,9%. Cependant la durée de la réaction et la température appliquée sont limitées par l'étanchéité du réacteur tel qu'il a été conçu. En effet, au niveau des couvercles l'étanchéité peut être améliorée.

Ces résultats démontrent la possibilité de produire du 5-HMF à partir du glucose par catalyse hybride, au sein d'un seul et même réacteur compartimenté.

## Conclusion générale et perspectives

---

Le procédé de catalyse hybride étudié vise à la production du 5-HMF à partir du D-glucose. Cette synthèse comporte une première réaction d'isomérisation enzymatique du D-glucose en D-fructose suivie d'une seconde étape de déshydratation chimique du D-fructose en 5-HMF (Figure 117).

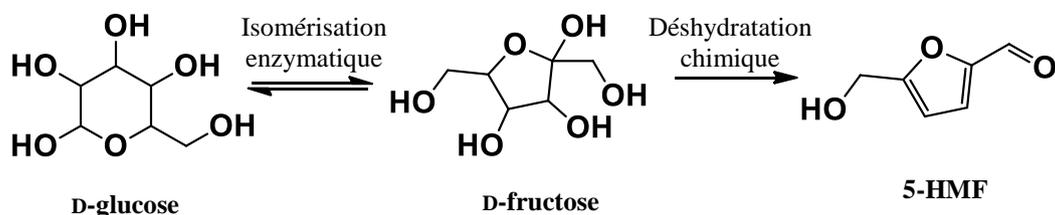


Figure 117. Transformation du D-glucose en 5-HMF.

Rappelons que la finalité de ce projet est dans un premier temps de résoudre le verrou de l'incompatibilité réactionnelle des deux étapes de synthèse afin de permettre le fonctionnement des deux catalyses simultanément, dans un deuxième temps de « déplacer » l'équilibre thermodynamique de la réaction enzymatique d'isomérisation du glucose en faveur de la production de fructose afin d'augmenter le rendement final en 5-HMF, et enfin de démontrer la faisabilité d'un procédé catalytique hybride appliqué à la production du 5-HMF à partir du glucose.

La méthode sélectionnée dans ce travail pour lever le verrou de l'incompatibilité des conditions réactionnelles, est l'utilisation d'une membrane liquide faisant le lien entre les deux milieux réactionnels de catalyse en transportant le fructose formé par la première réaction dans le milieu dans lequel se déroule la seconde réaction. Le procédé est schématisé Figure 118.

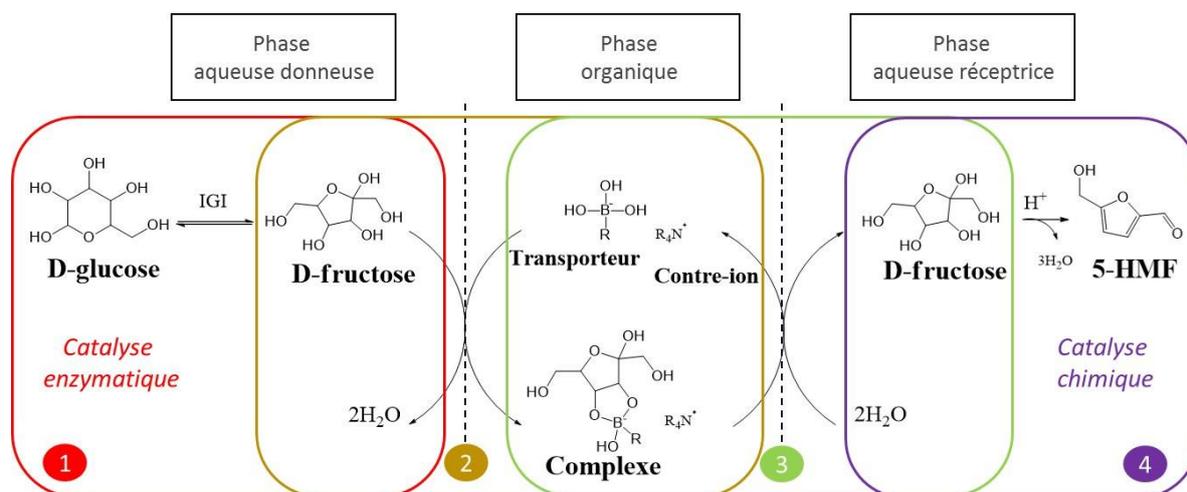


Figure 118. Procédé hybride de conversion du glucose en 5-HMF.

La première partie de ce travail est l'étude des différentes étapes du procédé indépendamment.

1 La première étape du procédé de synthèse du 5-HMF est l'isomérisation enzymatique du D-glucose par la glucose isomérase Sweetzyme®IT Extra (IGI). La définition des conditions optimales de réaction a nécessité l'étude de l'activité de l'enzyme immobilisée, en fonction de la température, du pH et du rapport Enzyme/Substrat, dans le but de maximiser le rendement d'isomérisation du D-glucose. Le couple pH = 7,5 et 70°C est donc le couple optimal pour la réalisation de l'isomérisation du D-glucose par l'IGI avec une concentration initiale en glucose de 100 mM et une masse d'IGI de 10 mg. Cependant, dans l'optique du fonctionnement simultané des différentes étapes du procédé, la réaction d'isomérisation est réalisée conjointement à l'extraction du fructose vers la phase organique et le pH de la phase aqueuse donneuse apparaît comme un paramètre influençant l'efficacité de la réaction d'extraction. L'extraction du D-fructose par formation d'un complexe [D-fructose-acide boronique] est favorisée si le pH de la solution aqueuse contenant le D-fructose est supérieur au pKa de l'acide boronique. Aussi, se placer à un pH de 8,5 favorise l'extraction du fructose. L'activité relative est supérieure à 80% lorsque la réaction d'isomérisation est réalisée à 70°C et à pH = 8,5. C'est donc le couple 70°C et pH = 8,5 qui est sélectionné. Ces conditions mènent à un équilibre thermodynamique ( $K=1,23$ ) après 60 minutes.

La seconde étape du procédé de synthèse du 5-HMF est le transport D-fructose. Le D-fructose est complexé par le transporteur (T) (un acide arylboronique). L'ester borate (ou complexe) obtenu, chargé négativement, est soluble dans la phase organique et va former une paire d'ions avec l'ammonium quaternaire (coT) (Aliquat336®) présente dans la phase organique. Au contact de la phase aqueuse réceptrice, l'ester est hydrolysé et le D-fructose est libéré. Ce transport comporte donc deux étapes, l'extraction du fructose (complexation + extraction du complexe) de la phase aqueuse donneuse vers la phase organique et le relargage du fructose par hydrolyse de l'ester formé vers la phase aqueuse réceptrice.

2 L'étude des conditions d'extraction du fructose ont permis la définition des paramètres optimums de la membrane liquide. La nature de la phase aqueuse donneuse est définie par les conditions d'isomérisations (tampon Tris-HCl pH = 8,5 à 100 mM). Le transporteur sélectionné pour son rendement d'extraction et sa sélectivité est l'acide 3,4-dichlorophénylboronique (3,4-DCPBA). Le solvant organique sélectionné est le MIBC. L'isomérisation du glucose réalisée en présence de MIBC a permis de valider son utilisation en ne provoquant pas d'inactivation de l'enzyme dans les conditions étudiées (70°C, tampon Tris-HCl pH = 8,5 à 100 mM, 2/1 v:v

H<sub>2</sub>O/MIBC, 1h). Le rapport molaire défini des espèces « D-fructose/3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> » est de « 1/1/2 ». Cette étude nous a permis de valider la possibilité du couplage entre l'extraction du fructose et l'isomérisation du glucose.

3 La seconde étape du transport est l'hydrolyse du complexe [D-fructose-acide boronique] au contact d'une seconde phase aqueuse dite réceptrice permettant le relargage du D-fructose extrait. Les conditions expérimentales sélectionnées sont un tampon citrate de sodium à 100 mM à pH = 3. A 70°C, le rendement de relargage est de 91,5%.

4 La dernière étape du procédé de synthèse du 5-HMF est la déshydratation du D-fructose en 5-HMF. L'étude des conditions optimales de cette étape avec une résine sulfonique repose sur la définition de la température et du pH optimaux, sans toutefois dépasser la température d'ébullition de l'eau, puis la définition du rapport massique résine/D-fructose. La résine utilisée est la Dowex<sup>®</sup> Monosphère<sup>®</sup> 650C. L'étude de l'influence de la température a permis de déterminer que la température optimale pour notre étude est de 80 °C. L'étude de la masse de résine à introduire (reliée au nombre de sites acides introduits) par rapport à la masse de fructose initiale a permis de sélectionner le rapport massique 3/1. L'étude de l'effet du pH sur le rendement de déshydratation a mis en évidence un rendement supérieur après 7h30 de réaction à pH = 3 par rapport au pH = 6,7, de 9,2% et 7,1% respectivement.

Cette première étude systématique réalisée étape par étape a permis la mise en œuvre d'un premier système catalytique en cascade dans lequel l'isomérisation du glucose et l'extraction du fructose sont réalisées simultanément dans les conditions déterminées par l'étude. La phase aqueuse est ainsi composée de 100 mM de D-glucose dans un tampon Tris-HCl 100 mM à pH = 8,5. La phase organique est constituée de MIBC contenant le transporteur (3,4DPCBA) et le contre-ion (Aliquat336<sup>®</sup>) à un rapport molaire 1/2 pour des concentrations de 100 et 200 mM respectivement. Cette étape est réalisée à 70°C. Cette première étape du système en cascade a mis en évidence un déplacement de l'équilibre thermodynamique d'isomérisation de 28,6% après 3h avec un rendement d'extraction de 56,5%. L'extraction de 1,56% de glucose confirme la sélectivité vis-à-vis du fructose par le transporteur. La suite de la mise en œuvre en cascade est l'étape de relargage du fructose dans les conditions optimales déterminées dans le chapitre III, à savoir du tampon citrate de sodium 100 mM à pH = 3 à 70°C. Le rendement de relargage atteint son maximum après seulement 20 minutes de réaction à la valeur de 52,7%. La dernière étape de la cascade est la déshydratation du fructose en 5-HMF,

réalisée dans les conditions déterminées dans le chapitre III par introduction de Dowex<sup>®</sup>Monosphere<sup>®</sup>650C à une quantité correspondant à 3 fois le nombre de H<sup>+</sup> nécessaire pour réaliser la réaction de déshydratation du D-fructose, à 80 °C. 18h de réaction semblent être le meilleur compromis entre productivité et pureté avec une sélectivité de 81% et un bilan carbone supérieur 90%. Ce temps de réaction permet d'obtenir un rendement de déshydratation de 13,5%. Ce procédé en cascade a permis de valider la possibilité de « déplacer » l'équilibre d'isomérisation en faveur de la consommation du glucose.

Une première mise en œuvre de la catalyse hybride a été réalisée dans un réacteur coaxial. Un rendement d'isomérisation de 70,1% avec un transport de fructose (extraction) de 50,2% et un rendement global en 5-HMF de 4,1% ont été obtenus. Grâce à ce système triphasique liquide/liquide/liquide, le concept de catalyse hybride a été démontré. Cependant, le faible rendement en 5-HMF serait la conséquence de limitations diffusionnelles du fructose via son complexe, liées à la faible agitation des phases. Ces limitations diffusionnelles affectent également la maîtrise de la catalyse hybride dans le réacteur coaxial, caractérisée par une faible reproductibilité des résultats. De plus, une température unique est imposée au réacteur alors que l'isomérisation et la déshydratation nécessitent idéalement deux températures différentes.

Afin de parvenir à une meilleure maîtrise de la catalyse hybride, du point de vue du contrôle des températures et de l'optimisation de l'agitation des différentes phases, un second réacteur a été spécialement conçu et étudié. Il s'agit du réacteur nommé « en H » (Figure 119).

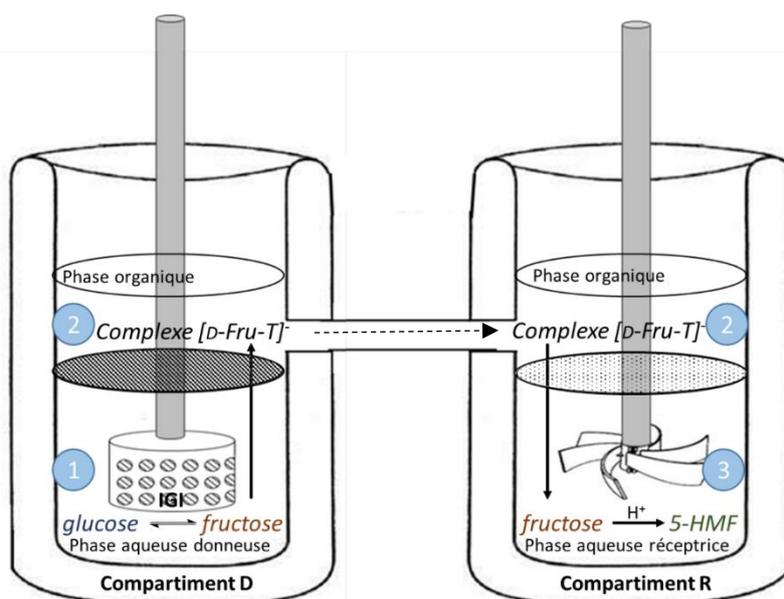


Figure 119. Schéma du procédé total de production du 5-HMF à partir du glucose mis en œuvre dans le réacteur en H.

Les échanges de matière au sein du réacteur ont été étudiés et optimisés. Afin de permettre le mouvement à double sens de la phase organique dans le pont reliant les deux compartiments, un système de contre-pales a été inséré. Ce système a permis le transport du fructose depuis la phase aqueuse donneuse vers la phase aqueuse réceptrice. Les différents paramètres influençant le transport du fructose au sein du réacteur ont ensuite été mis en évidence. Il s'agit de la différence de pH (différence) entre les deux phases aqueuses, de l'agitation et de la quantité de matière du couple 3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup>. La différence de pH, devant être supérieur à 4,5, s'avère être le véritable moteur de l'extraction du fructose. La vitesse d'agitation optimale est de 280 rpm dans le compartiment D et 300 rpm dans le compartiment R, permettant un relargage de plus de 95% des molécules de fructose extraites. Enfin la diminution du rapport molaire Fru/3,4-DCPBA de 1/1 à 1/0,25 a permis le transport de plus de 80% du fructose initialement présent. Ce rendement valide le fait qu'une même molécule de 3,4-DCPBA intervient au moins deux fois dans le transport du fructose. Ainsi le couple 3,4-DCPBA/Aliquat336<sup>®</sup> effectue un turn-over au sein de la phase organique.

La production de 5-HMF par catalyse hybride a été démontrée par un rendement de production en 5-HMF de 30,9%. De plus, un rendement d'isomérisation de 79,1% a été obtenu. Ce rendement d'isomérisation illustre le déplacement de l'équilibre d'isomérisation rendu possible par un rendement d'extraction du fructose de 96,8%. Ces rendements sont toutefois limités par la quantité de glucose, augmentant au cours du temps, qui est extraite par la phase organique et qui est transféré dans la phase aqueuse réceptrice, le rendant ainsi indisponible pour la réaction d'isomérisation.

Ces résultats démontrent la possibilité de produire du 5-HMF à partir du glucose par catalyse hybride. De plus, le verrou de l'incompatibilité des conditions d'utilisation des catalyseurs est levé et l'équilibre thermodynamique d'isomérisation a été déplacé en faveur de la consommation du glucose.

De par la réalisation du procédé de catalyse hybride, le nombre d'étapes a été minimisé. De plus, nous avons au maximum tenté de minimiser l'utilisation de solvants organiques. Cependant la mise en œuvre choisie n'est rendue possible que par l'utilisation de la membrane organique liquide. D'autre part, il a été relevé une certaine difficulté à maintenir dans le temps des conditions optimales de réaction. L'étape de déshydratation doit notamment être encore améliorée pour déplacer plus rapidement l'ensemble des équilibres vers la production de 5-

HMF. Peut-être une catalyse homogène pourrait favoriser la cinétique de déshydratation et participer à l'équilibre ionique entre les phases grâce à la présence de l'ion chlorure.

Si l'on veut s'affranchir de l'utilisation d'une membrane liquide, une approche de ce système à l'échelle microfluidique est envisagée.

Une mise en œuvre sans membrane liquide peut être possible en utilisant un système microfluidique, qui représente également un outil pour l'écoconception de procédés couplés continus. En effet, la technologie microfluidique est susceptible de répondre : (i) à la recherche d'un dimensionnement de réacteur susceptible de permettre une maîtrise accrue de la catalyse enzymatique et chimique, en termes de maîtrise de la cinétique et de la sélectivité de la réaction par un contrôle plus poussé des phénomènes de transfert (matière et chaleur), et (ii) au développement de catalyses hybrides raisonnées, sans solvant et sans surfactant. L'utilisation d'équipements spécifiques (capillaires, pousse seringues et plaques chauffantes) permettrait de mieux gérer les conditions des réactions vers une amélioration des rendements et la possibilité de travailler en flux continu.

La réalisation de ce projet (dans le cadre du projet de stage de M. Théo Daboudet) a nécessité dans un premier temps de produire l'enzyme nécessaire à la catalyse enzymatique, la glucose isomérase (GI), pour l'utiliser en catalyse homogène (sous forme libre) dans le réacteur microfluidique. Cette enzyme a été produite par une souche de *Microbacterium arborescens* de façon intracellulaire. Par la suite, l'extraction et purification de l'enzyme a été réalisée.

La démarche choisie pour la mise au point du procédé réalisée durant cette thèse a été appliquée pour la mise au point du réacteur microfluidique. Dans un premier temps, l'étude des conditions réactionnelles optimales (température, pH, rapport substrat/catalyseur, temps de séjour) des deux étapes (isomérisation et déshydratation) est réalisée. Ensuite, une étude en cascade a été réalisée : le produit de la première réaction (catalyse enzymatique) devient le substrat de la seconde réaction (déshydratation chimique du fructose formé dans la première réaction). Enfin, le réacteur microfluidique pour la synthèse hybride a été mis en place. La mise en œuvre est présentée Figure 120.

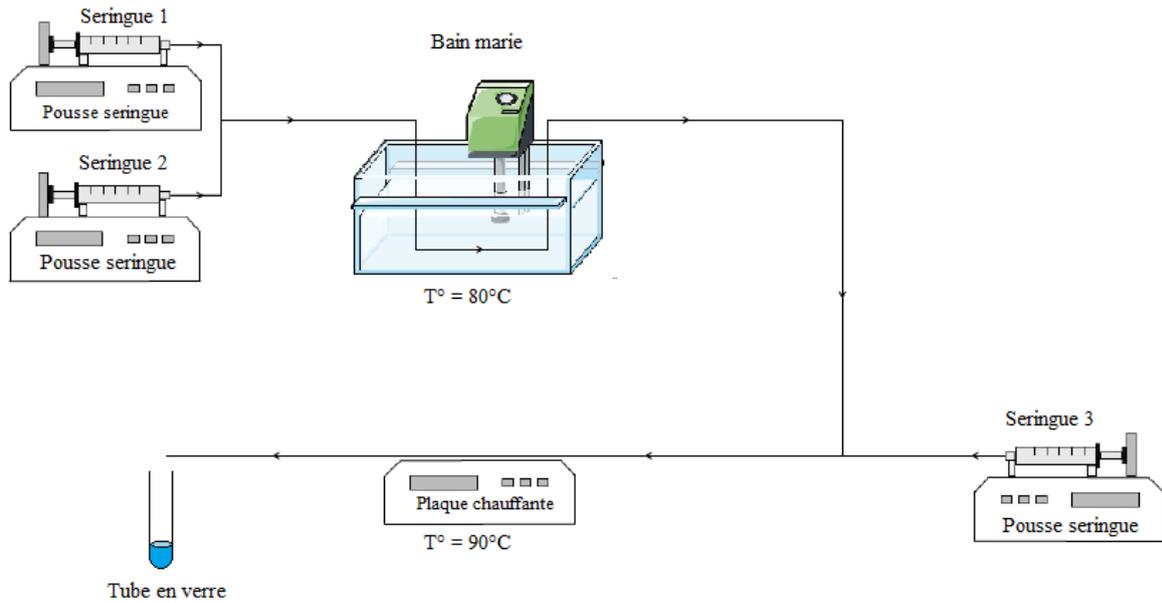


Figure 120. Schéma du procédé microfluidique de conversion du glucose en 5-HMF.

La seringue 1 contient le tampon TrisHCl à 100 mM de pH = 9. Ce tampon contient également une concentration en D-glucose de 50 mM. La seringue 2 est remplie avec la solution d'enzyme purifiée à 1,7 U/mL. Cette enzyme est produite à partir d'une souche de *Microbacterium arborescens* dans un milieu de culture de 10 g/L de peptone, 5 g/L d'extrait de levure, 5 g/L de D-xylose, 10 g/L de potassium phosphate dibasique et 10 g/L de phosphate de potassium monobasique ajusté à pH = 7. Une pré-culture correspondant à 10% du volume final de culture est incubée pendant 48h à 30°C et 180 rpm. Le milieu de culture est ensuiteensemencé par la totalité de la pré-culture et incubé dans l'étuve pendant 72h à 30°C et 180 rpm. Après extraction de l'enzyme des cellules par des cycles de sonnication/centrifugation dans du tampon phosphate de pH = 7, l'enzyme est purifiée par précipitation par choc thermique à 80°C pendant 10 minutes dans du tampon Tris-HCl à pH = 9.

La seringue 3 contient une solution d'HCl à 2 M et le débit réglé sur le pousse seringue est le même que celui en sortie des deux premières seringues, soit 1,5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Le débit en sortie du système est donc de 3  $\mu\text{L}/\text{min}$ .

Le « 'T' mélangeur 1 » permet le mélange du contenu des seringues 1 et 2, ce mélange correspond à la réaction d'isomérisation enzymatique. Le « 'T' mélangeur 2 » permet le mélange de la solution issue de la catalyse enzymatique et de la seringue 3, ce mélange correspond à la réaction de déshydratation chimique.

La réaction enzymatique est réalisée à 80 °C et la déshydratation à 90 °C. Les résultats obtenus sont présentés Tableau 53.

Mise en œuvre	Taux d'isomérisation D-Glc→D-Fru	Rendement de déshydratation D-Fru→5-HMF	Rendement global D-Glc→5-HMF
cascade	43,5%	16,8%	7,3%
hybride	38,3%	16,4% ± 0,1	3,14% ± 0,01

Tableau 53. Résultats obtenus lors de la catalyse hybride en réacteur microfluidique.

Dans le système fonctionnant en mode « cascade », la catalyse enzymatique de la troisième cascade est réalisée avec un temps de séjour de 66 minutes et une concentration initiale en glucose de 50 mM et la catalyse chimique avec une solution d'HCl (2 M). Le taux d'isomérisation s'élève à 43,5% et le rendement de déshydratation à 16,8%. Dans le système fonctionnant en mode « hybride », un rendement d'isomérisation de 38,3% et un rendement de déshydratation de 16,8% sont obtenus. Les résultats montrent un rendement global de réaction s'élevant à 3,14%. On note cependant que le taux d'isomérisation est diminué de 5,2% dans le mode hybride par rapport au mode cascade. Cette diminution du taux d'isomérisation peut s'expliquer par le fait que la température dans le bain marie n'est pas homogène sur toute la longueur du capillaire mais aussi par le fait que l'enzyme est conservée à pH = 9 depuis sa purification et par conséquent elle pourrait avoir perdu de son activité.

Une première amélioration de ce réacteur microfluidique en mode hybride pourrait être de greffer l'enzyme dans le capillaire. Ainsi, le rendement d'isomérisation pourrait s'en trouver augmenté. De plus le greffage de l'enzyme pourrait être avantageux pour la réutilisation de celle-ci car dans le mode hybride, les conditions utilisées pour la déshydratation sont dénaturantes pour l'enzyme. Une seconde amélioration pourrait être d'augmenter les temps de séjour en jouant sur la longueur des capillaires qui permettraient d'augmenter le rendement global. Enfin, l'utilisation d'acide Niobique ou de dérivé de cet acide comme catalyseur hétérogène permettrait d'augmenter le rendement de déshydratation. En effet, l'utilisation de ce catalyseur sous sa forme solide a été reportée pour la déshydratation du fructose sans montrer de formation de produits secondaires.<sup>[109]</sup> De plus, la configuration choisie du système microfluidique permet l'injection d'un co-solvant pour l'étape de déshydratation, qui aurait potentiellement pour effet d'augmenter le rendement de déshydratation. Ainsi, plusieurs voies d'optimisation sont envisageables pour l'optimisation du réacteur microfluidique.

## Références bibliographiques

---

1. Besson M., Gallezot P., Pinel C., *Chem. Rev.* **114**, 1827–1870 (2014).
2. Nanda S., Mohammad J., Reddy S. N., Kozinski J. A., Dalai A. K., *biomass Conv. Bioref.* **4**, 157–191 (2014).
3. Cherubini F., *Energy Convers. Manag.* **51**, 1412–1421 (2010).
4. Gallezot P., *Chem. Soc. Rev.* **41**, 1538–58 (2012).
5. Pacheco J. J., Davis M. E., *PNAS* **111**, (2014).
6. Bajpai P., *Pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuel production* 7–12 (2016).
7. Fernandes E. M., Pires R. A., Mano J. F., Reis R. L., *Prog. Polym. Sci.* **38**, 1415–1441 (2013).
8. Hara M., *et al. Angew. Chemie - Int. Ed.* **43**, 2955–2958 (2004).
9. Onda A., Ochi T., Yanagisawa K., *Green Chem.* **10**, 1033 (2008).
10. Caes B. R., Palte M. J., Raines, R. T., *Chem. Sci.* 196–199 (2013).
11. Binder J. B., Raines R. T., *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 1979–85 (2009).
12. Liu Z., Li L., Liu C., Xu A., *Renew. Energy* **106**, 99–102 (2017).
13. Hu L., Lin L., Wu Z., Zhou S., Liu, S., *Appl. Catal. B Environ.* **174–175**, 225–243 (2015).
14. Shanks B. H., *ACS Chem. Biol.* **2**, 533–535 (2007).
15. Vennestrøm P. N. R. *et al. ChemCatChem* **2**, 943–945 (2010).
16. Denard C. A., Hartwig J. F., Zhao H., *ACS Catal.* **3**, 2856–2864 (2013).
17. Dumeignil F., *Public Serv. Rev. Eur. Union* **22**, 528 (2011).
18. van Putten, R. *et al. Chem. Rev.* **113**, 1499–1597 (2013).
19. Delidovich I., Palkovits R., *ChemSusChem* **9**, 547–561 (2016).
20. Demerdash M., Attia R. M., *Zentralbl. Mikrobiol.* **147**, 297–303 (1992).
21. Gaily M. H., Elhassan B. M., Abasaeed A. E., Al-shrhan M., *Int. J. Eng. Technol.* **10**, 1–5 (2010).
22. Takasaki Y., *Agric. Biol. Chem.* **31**, 309–313 (1967).
23. Huang H. *et al. ACS Catal.* **4**, 2165–2168 (2014).
24. Climent M. J., Corma A., Iborra S., *Green Chem.* **16**, 516–547 (2014).

25. Werp T., Petersen, G., *US DOE Rep.* (2004).
26. Bozell J. J., Petersen G. R., *Green Chem.* **12**, 539 (2010).
27. Düll G., *Chem.-Ztg.* **19**, 216 (1895).
28. Kiermayer J., *Chem.-Ztg.* **19**, 1003 (1895).
29. Rosatella A., Simeonov S. P., Frade R. F. M., Afonso C. *Green Chem.* **13**, 754 (2011).
30. Boot M., Xu H., Wan, C. *Biofuels from Lignocellulosic Biomass: Innovations beyond Bioethanol.* (2016).
31. Antonetti C., Pisa U., Licursi D., *catalysts* **6**, 196 (2016).
32. Girisuta B., Janssen L. P. B. M., Heeres H. J., *Green Chem.* **8**, 701 (2006).
33. Redmon B. C., Process for the production of levulinic acid. (1956).
34. Mukherjee A., Dumont M. J., Raghavan V., *Biomass and Bioenergy* **72**, 143–183 (2015).
35. Hansen, T. S., Woodley, J. M. & Riisager, A. Efficient microwave-assisted synthesis of 5-hydroxymethylfurfural from concentrated aqueous fructose. *Carbohydr. Res.* **344**, 2568–2572 (2009).
36. Antal M. J., Mok W. S. L., Richards G. N., *Carbohydr. Res.* **199**, 91–109 (1990).
37. Lewkowski J., *ARKIVOC* **i**, 17–54 (2001).
38. Mcneff C. V, Nowlan D. T., Mcneff L. C., Yan B., Fedie R. L., *Appl. Catal. A, Gen.* **384**, 65–69 (2010).
39. Moliner M., Román-Ishkov Y., Davis M. E., *PNAS* **107**, 6164–6168 (2010).
40. Gerardus J., Gruter M., Manzer L. E., Hydroxymethylfurfural ethers from sugars or hmf and mixed alcohols. (2008).
41. Flood A. E., Johns M. R., White E. T., *Carbohydr. Res.* **288**, 45–56 (1996).
42. Angyal S. J., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* **49**, 19–35 (1984).
43. Lichtenthaler F. W., Rönninger S., *J. Chem. Soc. Perkin trans.* **2**, 1489–1497 (1990).
44. Barker R., Seriannit A., *Acc Chem Res* **19**, 307–313 (1986).
45. Bermejo-Deval R. *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 9727–9732 (2012).
46. Marshall R. O., Kooi, E. R., *Science (80- )*. **125**, 648–649 (1957).
47. DiCosimo R., McAuliffe J., Poulouse A. J., Bohlmann, G. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6437 (2013).
48. Takasaki Y., Tanabe, O., *Agric. Biol. Chem.* **28**, 740–74 (1964).

49. Takasaki Y., Tanabe O., *Agric. Biol. Chem.* **30**, 220–225 (1966).
50. Bhosale S. H., Rao M. B., Deshpande V. V., *Microbiol. Rev.* **60**, 280–300 (1996).
51. Bandlish R. K., Hess J. M., Epting K. L., Vieille, C., Kelly, R. M., *Biotechnol. Bioeng.* **80**, 185–194 (2002).
52. Jorgensen O. B., Karlsen L. G., Nielsen N. B., Pedersen S., Rugh S., *Sta* **40**, 307–313 (1988).
53. Drazic M., Golubic Z., Czime, S., *Period. Biol.* **82**, 481–484 (1980).
54. Shieh K. K. *et al.* US3834988. 3–7 (1974).
55. Brownwell, C. E. US4348480. (1982).
56. Diers I., *Continuous culture, vol. 6. Applications in new fields.* (1976).
57. Yoshimura S., Danno G., Natake M., *Agric. Biol. Chem.* **30**, 1015–1023 (1966).
58. Tucker M. Y., Tucker M. P., Himmel M. E., Grohman K., Lastick S. M., *Biotechnol. Lett.* **10**, 79–84 (1988).
59. Gong C., Chen L. F., George T., *Biotechnol. Bioeng.* **XXII**, 833–845 (1980).
60. Lee C., Zeikus J. G., *Biochem. J.* **273**, 565–571 (1991).
61. Chen W. P., Anderson A. W., *Appl. Environ. Microbiol.* **38**, 1111–1119 (1979).
62. Rasmussen B. Y. H., La T., Nyborg J., Scholein M., *acta Cryst* **D50**, 124–131 (1994).
63. Vangrysterre W. *et al.* *Biochemistry* **265**, 699–705 (1990).
64. Kasumi T., Hayashi K., Tsumura N., *Agric. Biol. Chem.* **46**, 21–30 (1982).
65. McKay G., Tavlarides, *J. Mol. Catal.* **6**, 57–69 (1979).
66. Hlima H., Aghajari N., Ben Ali M., Haser R., Bejar, S., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **39**, 537–546 (2012).
67. Kikkert A., Vellenga K., De Wilt H. G. J., Joosten G. E. H., *Biotechnol. Bioeng.* **XXIII**, 1087–1101 (1981).
68. Dehkordi A. M., Tehrani M. S., Safari I., *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**, 145–153 (2009).
69. Tewari Y. B., *Appl. Biochem. Biotechnol. Part A Enzym. Eng. Biotechnol.* **23**, 187–203 (1990).
70. Mohamad N. R., Marzuki H. C., Buang N. A., Huyop F., Wahab R. A., *Biotechnol. Equip.* **29**, 205–220 (2015).
71. Amotz S., Nielsen T. K., Thiesen N. O., US3980521 (1976).
72. Bray G. A., Nielsen S. J., Popkin B. M., *J. Clin. Nutr.* **79**, 537–543 (2004).

73. Chandrakant P., Bisaria V. S., *Biotechnol. Bioprocess Eng* **5**, 32–39 (2000).
74. Ueng P. P., Hunter C. A., Gong C. S., Tsao G., *Biotechnol. Lett.* **3**, 315–320 (1981).
75. Gong C., Chen L., Flickinger M. C., Chiang L., Tsao G. T., *Appl. Environ. Microbiol.* **41**, 430–436 (1981).
76. Ladisch M. R., Lin K. W., Voloch M., Tsao G. T., *Enzyme Microb. Technol.* **5**, 82–102 (1983).
77. Wang P. Y., Shopsis C., Schneider H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **94**, 248–254 (1980).
78. Moreau C., Belgacem M. N., Gandini A., *Top. Catal.* **27**, 11–30 (2004).
79. Kuster B. F. M., Temmink H. M. G. K., *Carbohydr. Res.* **54**, 185 (1977).
80. Kuster B. F. M., *Carbohydr. Res.* **54**, 177–183 (1977).
81. Li Y., Lu X., Yuan L., Liu X., *Biomass and Bioenergy* **33**, 1552 (2009).
82. van Dam H. E., Kieboom A. P. G., van Bekkum H., *Starch - Stärke* **38**, 95–101 (1986).
83. Rapp K. M., Process for preparing pure 5-hydroxymethylfurfuraldehyde. (1987)
84. Seri K. I., Inoue Y., Ishida H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **74**, 1145–1150 (2001).
85. Armaroli T. *et al.* *J. Mol. Catal.* **151**, 233–243 (2000).
86. Benvenuti F. *et al.* *Appl. Catal. A Gen.* **193**, 147 (2000).
87. Carlini C., Patrono P., Raspolli Galletti A., Sbrana G., *Appl. Catal. A Gen.* **275**, 111 (2004).
88. Asghari F., Yoshida H., *Carbohydr. Res.* **341**, 2379 (2006).
89. Qi X., Watanabe M., Aida M., Smith R. L., *Green Chem.* **10**, 799–805 (2008).
90. Qi X., Watanabe M., Aida, T. M., Smith R. L., *J. Catal. Commun.* **9**, 2244 (2008).
91. Qi X., Watanabe M., Aida T. M., Smith R. L., *J. Catal. Commun.* **10**, 1771 (2009).
92. Carniti P., Gervasini A., Biella S., Auroux A., *catalysts* **118**, 373 (2006).
93. Watanabe M. *et al.*, *Carbohydr. Res.* **340**, 1925 (2005).
94. de Souza R. L., Yu H., Rataboul F., Essayem N., *Challenges* **3**, 212–232 (2012).
95. De Dardel F., *Tech. l'Ingénieur* **33**, 932 (1925).
96. Corain B., Zecca M., Jeřábek K., *J. Mol. Catal. A Chem.* **177**, 3–20 (2001).
97. Ramirez E. *et al.* **28**, 303–325 (2007).
98. Guyot A., Sherrington D. C., *Syntheses and separations using polymers supports.* (1988).

99. Nakamura Y., Morikawa S., *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **59**, 3705–3706 (1980).
100. Tsilomelekis G. *et al.*, *Green Chem.* **18**, 1983–1993 (2016).
101. Baccile N. *et al.*, *J. Phys. Chem. C* **113**, 9644–9654 (2009).
102. Titirici M., Antonietti M., Baccile N., *Green Chem.* **10**, 1204–1212 (2008).
103. Sevilla M., Fuertes A. B., *Carbon N. Y.* **47**, 2281–2289 (2009).
104. Sevilla M., Fuertes A. B., *Chem. Eur. J.* 4195–4203 (2009).
105. Van Zandvoort I. *et al.*, *ChemSusChem* **6**, 1745–1758 (2013).
106. Patil S. K. R., Lund C. R. F., *Energy and Fuels* **25**, 4745–4755 (2011).
107. Moreau C. *et al.*, *Appl. Catal. A Gen.* **145**, 211–224 (1996).
108. Horvat J., Klaić B., Metelko B., Sunjic V. *Tetrahedron Lett.* **26**, 2111–2114 (1985).
109. Carniti P., Gervasini A., Marzo M., *Catal. Commun.* **12**, 1122–1126 (2011).
110. Lorand J. P., Edwards J. O., *J. Org. Chem.* **24**, 769–774 (1959).
111. Pappin B., Kiefel M., Houston T., *Boron-Carbohydrate Interactions. Carbohydrates - Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology* (2012)
112. Yasuda M. *et al.*, *Org. Lett.* **8**, 761–764 (2006).
113. Delidovich I., Palkovits R., *Green Chem.* **18**, 5822–5830 (2016).
114. Morin G. T., Paugam M.-F., Hughes M. P., Smith B. D., *J. Org. Chem.* **59**, 2724–2728 (1994).
115. Shinbo T., Nishimura K., Yamaguchi T., Sugiura M., *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 349–351 (1986).
116. Morin G. T., Hughes M. P., Paugam M. F., Smith B. D., *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 8895–8901 (1994).
117. Westmark P. R., Gardiner, S. J., Smith B. D., *J. Am. Chem. Soc.* **118**, 11093–11100 (1996).
118. Takeuchi M., Koumoto K., Goto M., Shinkai S., *Tetrahedron* **52**, 12931–12940 (1996).
119. Dowlut M., Hall D. G., *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 4226–4227 (2006).
120. Karpa M. J., Duggan P. J., Griffin G. J., Freudigmann S. J., *Tetrahedron* **53**, 3669–3678 (1997).
121. Paugam M., Riggs J. A., Smith B. D., 2539–2540 (1996).
122. Lee S. C., Lee H. K., *J. Memb. Sci.* **264**, 13–19 (2005).

123. Alipour S., Relue P. A., Viamajala S., Varanasi S., *Green Chem.* **18**, 4990–4998 (2016).
124. Lee Y. C., Dutta S., Wu K. C. W., *ChemSusChem* **7**, 3241–3246 (2014).
125. Grande P. M., Bergs C., Domíngue De María P., *ChemSusChem* **5**, 1203–1206 (2012).
126. Huang R., Qi W., Su R., He Z., *Chem. Commun. (Camb)*. **46**, 1115–7 (2010).
127. Wang Z. J., Clary K. N., Bergman R. G., Raymond K. N., Toste F. D., *Nat. Chem.* **5**, 100–103 (2013).
128. Filice M., Marciello M., del Puerto Morales M., Palomo J. M., *Chem. Commun.* **49**, 6876–6878 (2013).
129. Kohler V. *et al.*, *Nat. Chem.* **5**, 93–99 (2013).
130. Mutti F. G. *et al.*, *Chem. Commun.* **46**, 8046–8048 (2010).
131. Canivet J., Süß-fink G., Stepnicka P., *Eur. J. Inorg. Chem.* 4736–4742 (2007).
132. Maid H. *et al.* *Angew. Chem. Int. Ed.* **50**, 2397–2400 (2011).
133. Gimbernat, A. *et al.* *ChemCatChem* **9**, 2080–2084 (2017).
134. Seyhan Tükel S., Alagöz D., *Food Chem.* **111**, 658–662 (2008).
135. [http://www.dow.com/assets/attachments/business/pcm/solvents/methyl\\_isobutyl\\_ketone/tds/methyl\\_isobutyl\\_ketone.pdf](http://www.dow.com/assets/attachments/business/pcm/solvents/methyl_isobutyl_ketone/tds/methyl_isobutyl_ketone.pdf).
136. <http://www.chemicaland21.com/industrialchem/solalc/tert-AMYL METHYL ETHER.htm>.
137. [http://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/5-Methyl-2-hexanone,MDA\\_CHEM-822093?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.fr%2F](http://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/5-Methyl-2-hexanone,MDA_CHEM-822093?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.fr%2F).
138. [http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty\\_EN\\_CB8853983.htm](http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8853983.htm).
139. Multer A., McGraw N., Hohn K., Vadlani P., *Eng. Chem. Res.* **52**, 56–60 (2013).
140. Ferraz H., Duarte L., *Brazilian J. Chem. Eng.* **24**, 101–118 (2007).
141. Rhlalou T. *et al.*, *J. Memb. Sci.* **168**, 63–73 (2000).
142. Paugam M.-F., Valencia L. S., Boggess B., Smith B. D., *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 11203–11204 (1994).
143. Moreau C., Durand R., Pourcheron C., Razigade S., *Ind. Crops Prod.* **3**, 85–90 (1994).
144. Schraufnagel R. A., Rase H. F., *Ind. Eng. Chem. Res.* **14**, 40–44 (1975).
145. Kuster B. F. M., *Starch - Stärke* **42**, 314–321 (1990).
146. Haworth W. N., Jones W. G., *J. Chem. Soc.* 667–670 (1944).

147. Zhou F., Sun X., Wu D., Zhang Y. Su H., *ChemCatChem* **9**, 2784–2789 (2017).
148. Kröger M., Prübe U., Vorlop K.-D., *Top. Catal.* **13**, 237–242 (2000).
149. Chheda J. N., Dumesic J. A., *Catal. Today* **123**, 59–70 (2007).
150. Frade R. F., Afonso C. A., *Hum. Exp. Toxicol.* **29**, 1038–1054 (2010).
151. Costa S. P. F. *et al.* *ChemPhysChem* **18**, 1351–1357 (2017).
152. Shinbo T., Sugiura M., Kamo N., Kobatake Y., *J. Memb. Sci.* **9**, 1–11 (1981).
153. Friis S. D., Lindhardt A. T., Skrydstrup T., *Acc. Chem. Res.* **49**, 594–605 (2016).
154. Curran D. P., Luo Z., US 2004/00 (2004).
155. Winne D., *Biochim. Biophys. Acta* **298**, 27–31 (1973).
156. Green K., Otori T., *J. Physiol.* **207**, 93–102 (1970).
157. Lauriat G., Gobin D., *Techniques de l'Ingénieur* 0–18 (2008).
158. Padet J., Convection thermique et massique - Principes généraux Convection thermique et massique Principes généraux. (2017).
159. Brancour C., Fukuyama T., Mukai Y., Skrydstrup T., Ryu I., *Org. Lett.* **15**, 2794–2797 (2013).

## Annexes

---

*Annexe 1*

Les neuf critères d'évaluation d'un composé proposés par Bozell *et al.*<sup>[26]</sup>

1. Le composé ou la technologie d'obtention a été la cible d'une attention significative dans la littérature.
2. Le composé illustre une technologie applicable à de multiples produits.
3. La technologie permet la production de substituts à des produits pétrochimiques existant.
4. La technologie est applicable des productions de grand volume.
5. Un composé montre un fort potentiel de molécule plateforme.
6. La production à plus grande échelle ou un pilote est en bonne voie.
7. Le composé est un produit commercial existant.
8. Le produit peut servir de building block à la bioraffinerie.
9. La production commerciale du composé à partir de source de carbone renouvelable est bien établie.

## Annexe 2

### Extraction du fructose dans le réacteur Radley

Le réacteur utilisé est un réacteur de 250 mL à double enveloppe (Reactor-Ready™ Lab Reactor, Radley) équipé d'un système de contrôle de température (Ministat, Huber temperature control system, HUBER, UK).

La phase aqueuse donneuse est formée par 100 mL de solution de D-glucose (100 mM) dissouts dans du tampon Tris-HCl (100 mM, pH =8,5). Le système est chauffé à 70 °C durant 15 minutes. Ensuite, 100 mL de MIBC contenant 100 mM de 3,4-DCPBA et 200 mM d'Aliquat336® sont introduits dans le réacteur. Le milieu réactionnel biphasique est agité à 200 rpm et thermostaté à 70 °C durant 90 minutes. Un échantillon de 200 µL est prélevé toutes les 15 minutes. La concentration en fructose est mesurée par HPLC après dilution de l'échantillon.

Le taux de fructose dans la phase aqueuse est représenté sur la Figure 121.

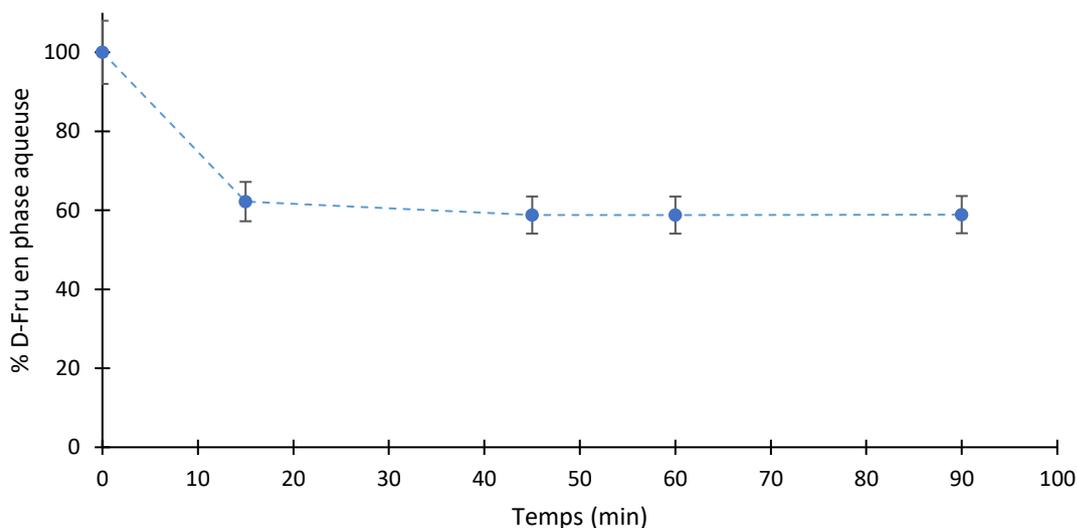


Figure 121. Pourcentages de fructose dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps dans le système biphasique sans catalyse enzymatique:  $V_{aq}$ =100 mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,5,  $[D-Fru]_i$ =100 mM,,  $V_{org}$ = 100 mL, MIBC,  $[3,4-DCPBA]$ =100 mM,  $[Aliquat336^{\circledR}]$ =200 mM, 200 rpm, 70°C.

## Annexe 3

Figure 122. Résultats des expériences G1, G2, G3 de transport du fructose. Suivi de la concentration en fructose dans la phase aqueuse donneuse, du pH et calculs des rendements d'extraction.

Temps (h)	[D-Fru] (mM)			pH phase aqueuse donneuse/réceptrice			Rendement extraction (%)		
	G1	G2	G3	G1 <sup>(1)</sup>	G2 <sup>(2)</sup>	G3 <sup>(2)</sup>	G1	G2	G3
0	98,2	98,5	104,5	9/4	8,7/3,05	8,8/3,2	0	0	0,0
0,25	87,8	76,3	92,3	9/4	8,3/3,1	8,7/3,3	10,6	22,5	11,7
0,5	85,2	70,3	92,5	9/4	8,3/3,1	8,7/3,2	13,2	28,6	11,5
0,75	87,9	-	-	8/4	-	-	10,6	-	-
1	89,0	69,3	87,3	6/5	8,1/3,1	8,4/3,2	9,4	29,6	16,5
2,5	89,7	77,0	85,0	6/6	7,4/3,2	8,0/3,4	8,6	21,8	18,0

(1) mesure au papier pH (2) mesure au pH-mètre

## Annexe 4

Tableau 54. Suivi des résultats lors de l'expérience de transport du fructose (expérience G3).

Temps (h)	[D-Fru]aq donneuse (mM)	[D-Fru]aq réceptrice (mM)	pH <sub>D</sub>	pH <sub>R</sub>	Rendement (%)		ΔpH
					extraction	relargage	
0,0	105,3	0,0	8,8	3,3	0,0	0,0	5,6
0,3	93,5	0,8	8,7	3,3	11,3	6,8	5,4
0,5	92,3	2,7	8,7	3,3	12,3	20,5	5,4
1,0	87,2	5,5	8,4	3,2	17,2	30,4	5,2
2,0	88,3	9,7	8,4	3,3	16,1	56,8	5,1
3,0	85,5	16,4	8,1	3,4	18,8	82,5	4,7
4,0	87,4	17,8	8,0	3,5	17,0	99,1	4,5
19,7	86,9	24,7	5,6	5,4	17,5	-	0,2
20,1	70,3	24,3	7,5	3,9	33,3	69,2	3,6
20,4	65,5	24,2	7,5	3,8	37,8	60,7	3,7
20,9	75,4	24,7	7,5	3,1	28,5	82,2	4,4
22,2	71,5	25,0	7,5	3,0	32,1	74,0	4,5
22,9	64,2	27,1	7,5	3,0	39,0	66,0	4,5
23,3	61,8	27,1	7,5	3,0	41,3	62,3	4,5
24,2	60,1	28,6	7,5	3,0	42,9	63,3	4,5
24,9	58,7	32,4	7,5	3,0	44,3	69,5	4,5
26,9	56,6	35,1	6,0	4,0	46,3	72,0	2,0

$pH_D$  = pH de la phase aqueuse donneuse,  $pH_R$  = pH de la phase aqueuse réceptrice,  $\Delta pH$  : différence de pH entre les deux phases aqueuses.

## Annexe 5

Tableau 55-58. Suivi des concentrations en fructose et calculs des rendements de transport du fructose (expérience I1-I3) et suivi du pH

Expérience I1						
	donneuse	réceptrice				
Temps	nD-Fru	nD-Fru	ntot	%tot	extraction	relargage
h	mol	mol	mol	%	%	%
0	2,4E-02	0,0E+00	2,4E-02	100,0	0,0	0,0
0,25	2,3E-02	0,0E+00	2,3E-02	96,3	3,7	0,0
0,5	2,2E-02	0,0E+00	2,2E-02	93,6	6,4	0,0
1	2,1E-02	7,9E-05	2,1E-02	89,8	10,6	0,3
1,5	2,0E-02	2,9E-04	2,0E-02	85,9	15,4	1,2
2	1,9E-02	5,1E-04	2,0E-02	83,8	18,3	2,2
3	1,8E-02	9,0E-04	1,9E-02	81,7	22,1	3,8
4	1,8E-02	1,4E-03	1,9E-02	81,7	24,1	5,8
5	1,7E-02	1,8E-03	1,8E-02	77,9	29,8	7,8
6	1,6E-02	2,2E-03	1,8E-02	77,6	31,8	9,4
7	1,6E-02	2,2E-03	1,8E-02	78,1	31,2	9,3
10	1,5E-02	2,5E-03	1,7E-02	72,0	38,6	10,6
23	1,3E-02	6,7E-03	2,0E-02	84,1	44,3	28,4

Expérience I2						
	donneuse	receptrice				
Temps	nD-Fru	nD-Fru	ntot	%tot	extraction	receptrice
h	mol	mol	mol	%	%	%
0	2,1E-02	0,0E+00	2,1E-02	100	0	0
0,25	1,6E-02	7,0E-04	1,6E-02	77,5	25,8	3,3
0,5	1,6E-02	1,7E-03	1,7E-02	82,5	25,4	7,9
1	1,6E-02	3,1E-03	1,9E-02	88,3	26,5	14,8
1,5	1,3E-02	4,1E-03	1,8E-02	83,3	36,2	19,6
2	1,3E-02	5,6E-03	1,9E-02	88,8	37,8	26,6
3	1,0E-02	7,7E-03	1,8E-02	85,6	50,8	36,4
4	7,4E-03	1,0E-02	1,7E-02	82,3	65,0	47,3
5	5,3E-03	1,2E-02	1,8E-02	84,3	74,9	59,1
6	3,9E-03	1,4E-02	1,8E-02	83,9	81,3	65,2
7	2,6E-03	1,5E-02	1,8E-02	83,0	87,9	70,9
10	2,4E-03	1,7E-02	1,9E-02	91,6	88,4	80,1

Expérience I3						
	donneuse	receptrice				
Temps	nD-Fru	nD-Fru	ntot	%tot	extraction	relargage
h	mol	mol	mol	%	%	%
0	2,0E-02	0,0E+00	2,0E-02	100,0	0,0	0,0
0,25	1,4E-02	0,0E+00	1,4E-02	71,2	28,8	0,0
0,5	1,1E-02	0,0E+00	1,1E-02	57,0	43,0	0,0
1	1,2E-02	4,6E-03	1,7E-02	83,6	39,4	23,0
1,5	1,3E-02	6,3E-03	1,9E-02	93,8	37,7	31,5
2	9,9E-03	8,1E-03	1,8E-02	89,7	50,7	40,4
3	8,7E-03	9,8E-03	1,9E-02	92,5	56,5	49,0
4	5,8E-03	1,2E-02	1,8E-02	89,0	71,3	60,3
5	2,7E-03	1,6E-02	1,8E-02	91,7	86,6	78,3
6	1,9E-03	1,4E-02	1,5E-02	77,1	90,4	67,5
7	2,1E-04	1,9E-02	2,0E-02	98,1	99,0	97,0
10	4,1E-04	1,8E-02	1,9E-02	92,3	98,0	90,2
23	6,0E-03	1,5E-02	2,1E-02	105,7	70,1	75,8

t (h)	Expérience I1			Expérience I2			Expérience I3		
	pH donneuse	pH réceptrice	$\Delta$ pH	pH donneuse	pH réceptrice	$\Delta$ pH	pH donneuse	pH réceptrice	$\Delta$ pH
0,00	8,8	2,9	5,9	8,7	3,1	5,6	8,7	2,83	5,87
0,25	8,58	2,98	5,6	7,8	3,0	4,8	8,14	3,05	5,09
0,26				8,2	3,0	5,2	8,55	2,75	5,8
0,50	8,44	2,97	5,47	8,0	3,1	4,9	8,16	2,93	5,23
0,51				8,3	3,1	5,2	8,62	0	5,69
1,00	8,36	2,95	5,41	7,4	3,5	3,9	7,55	3,46	4,09
1,01				8,6	3,0	5,6	8,56	2,82	5,74
1,50	8,26	2,98	5,28	8,0	3,6	4,4	7,7	3,17	4,53
1,51	8,15	2,98	5,17	8,3	2,7	5,6	8,55	2,55	6
2,00	8,55	0	5,57	7,6	3,5	4,1	7,47	3,9	3,57
2,01	8,34	2,99	5,3	8,6	3,0	5,6	8,5	1,73	6,77
3,00	8,49	0	5,5	8,1	4,0	4,1	7,43	2,8	4,63
3,01	8,29	3,04	5,25	8,6	2,0	6,6	8,5	2	6,5
4,00	8,61	0	5,57	8,0	4,0	4,0	7,73	4	3,73
4,01	8,49	3,07	5,42	8,3	2,0	6,3	8,57	1,27	7,3
5,00	8,29	3,15	5,14	8,0	2,4	5,6	7,95	2,85	5,1
5,01	8,45	2,5	5,95	8,2	2,4	5,8	8,55	0	5,7
6,00	8,36	2,95	5,41	8,0	5,5	2,5	8,37	7,23	1,14
6,01	8,45	0	5,5	8,5	1,7	6,8	0	1,39	6,98
7,00	8,38	3,05	5,33	8,2	1,2	7,0	8,49	1,6	6,89
10,00	8,55	0	5,5	6,5	5,7	0,8	7,5	1,95	5,55
23,00	6,3	5,32	0,98	-	-	-	6,73	6,31	0,42

Tableau 58. Suivi du pH des phases aqueuses donneuse et réceptrice.

## Annexe 6

*Tableau 59. Suivi de la quantité de fructose dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice.  
Calcul du bilan matière et des rendements d'extraction et relargage au cours de l'expérience*

J.

	donneuse	receptrice				
Temps	nD-Fru	nD-Fru	ntot	%tot	extraction	relargage
h	mol	mol	mol	%	%	%
0,00	2,04E-02	0,00E+00	2,04E-02	100	0,00	0,00
0,25	2,01E-02	0,00E+00	2,01E-02	98,23	1,77	0,00
0,50	1,94E-02	6,94E-05	1,94E-02	95,22	5,12	0,34
1,00	1,91E-02	2,35E-04	1,93E-02	94,71	6,44	1,15
1,50	1,91E-02	4,15E-04	1,95E-02	95,38	6,65	2,03
2,00	1,84E-02	6,55E-04	1,90E-02	93,26	9,95	3,21
3,00	1,80E-02	1,13E-03	1,92E-02	93,84	11,69	5,53
4,00	1,73E-02	1,36E-03	1,86E-02	91,21	15,44	6,65
5,00	1,65E-02	1,95E-03	1,85E-02	90,52	19,01	9,53
6,25	1,54E-02	2,58E-03	1,80E-02	88,04	24,60	12,63
7,00	1,51E-02	3,02E-03	1,82E-02	88,94	25,84	14,77
9,00	1,45E-02	3,66E-03	1,82E-02	88,94	29,00	17,94
24,00	1,05E-02	8,08E-03	1,85E-02	90,78	48,82	39,59
25,00	9,38E-03	8,56E-03	1,79E-02	87,89	54,04	41,93
28,00	7,88E-03	1,04E-02	1,83E-02	89,64	61,39	51,04
30,50	6,06E-03	1,16E-02	1,77E-02	86,62	70,31	56,92
33,50	4,02E-03	1,44E-02	1,84E-02	90,33	80,31	70,64
48,00	4,13E-03	1,32E-02	1,73E-02	84,72	79,80	64,52
49,50	3,75E-03	1,42E-02	1,80E-02	87,95	81,61	69,56
52,00	2,89E-03	1,77E-02	2,06E-02	100,82	85,83	86,65
55,50	2,29E-03	1,80E-02	2,03E-02	99,22	88,77	87,99

## Annexe 7

Tableau 60-63. Suivi des quantités de fructose et calcul des rendements de transport du fructose. (expériences K1 à K3)

Expérience K1

	donneuse	réceptrice			
Temps	nD-Fru	nD-Fru	%tot	extraction	relargage
h	mol	mol	%	%	%
0,00	2,16E-02	0,00E+00	100	0,00	0,00
0,25	1,85E-02	1,22E-03	91,49	14,16	5,65
0,50	1,82E-02	2,51E-03	96,18	15,44	11,62
1,00	1,87E-02	2,63E-03	99,06	13,14	12,21
1,50	1,78E-02	3,48E-03	98,52	17,62	16,14
2,00	1,66E-02	4,20E-03	96,31	23,15	19,46
3,00	1,61E-02	4,83E-03	97,21	25,19	22,40
4,00	1,51E-02	6,27E-03	98,93	30,15	29,08

Expérience K2

	donneuse	réceptrice			
Temps	nD-Fru	nD-Fru	%tot	extraction	relargage
h	mol	mol	%	%	%
0,00	2,16E-02	0,00E+00	100	0,00	0,00
0,25	2,11E-02	1,60E-04	98,62	2,13	0,74
0,50	2,13E-02	4,34E-04	100,61	1,41	2,01
1,00	2,04E-02	6,69E-04	97,76	5,34	3,10
1,50	-	1,93E-03	-	-	8,94
2,00	1,86E-02	1,77E-03	94,63	13,56	8,19
3,00	1,84E-02	2,55E-03	96,94	14,91	11,84
4,00	1,79E-02	2,94E-03	96,82	16,81	13,63

Expérience K3

	donneuse	réceptrice			
Temps	nD-Fru	nD-Fru	%tot	extraction	relargage
h	mol	mol	%	%	%
0,00	2,18E-02	0,00E+00	100	0,00	0,00
0,25	2,12E-02	-	-	2,76	-
0,50	2,08E-02	1,34E-04	96,12	4,49	0,61
1,00	2,04E-02	6,19E-04	96,53	6,31	2,85
1,50	2,00E-02	1,06E-03	96,70	8,17	4,87
2,00	-	1,64E-03	-	-	7,55
4,00	1,89E-02	2,98E-03	100,75	12,96	13,71

## Annexe 8

Catalyse hybride dans le réacteur en H dans des conditions de  $\Delta pH$  non conformes

Afin que le  $\Delta pH$  soit non favorable au transport du fructose, les pH sont ajustés de façon à obtenir un  $\Delta pH$  initial de 2,5. Ainsi les conditions sont favorables à l'isomérisation et la déshydratation, seul le transport du fructose est défavorisé. Cette étude a pour objectif de montrer l'influence du  $\Delta pH$  sur la catalyse hybride pour l'obtention du 5-HMF. Les paramètres expérimentaux sont présentés dans le Tableau 64.

Compartiment	Solvant	V (mL)	Régulateur pH	pH	[D-Glc] <sub>i</sub> (mM)	[3,4-DCPBA] (mM)	[Aliquat336 <sup>®</sup> ] (mM)	Agitation (rpm)
D	H <sub>2</sub> O	200	Tris-HCl 300 mM	7,5	100	-	-	280
R	H <sub>2</sub> O	200	Citrate de sodium 300mM	5	-	-	-	300
D Pont R	MIBC	200	-	-	-	50	100	-

Tableau 56. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de la catalyse hybride dans le réacteur en H dans des conditions de  $\Delta pH$  non conformes.

Dans la phase aqueuse donneuse sont ajoutés 8 mM de Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, 20 mM de MgCl<sub>2</sub> et 1,5g de Sweetzyme<sup>®</sup>IT extra sont placés dans le panier d'agitation. Dans la phase aqueuse réceptrice sont ajoutés 15 mL de Dowex<sup>®</sup>Monosphere<sup>®</sup>650C. Le système est thermostaté à 70 °C. Le pH des phases aqueuses est suivi au cours du temps, ainsi que la concentration en fructose des phases aqueuses, permettant de calculer le rendement d'extraction et de relargage. Le pH est régulé par ajout de NaOH ou HCl 10 M. Les résultats sont présentés en annexe 5.

Le rendement d'extraction augmente au cours du temps et atteint 12,0% après 26,5h. Le rendement d'isomérisation augmente pendant 4,5h pour atteindre 56,9% puis diminue pour atteindre 49,1% après 26,5h. Le rendement de déshydratation du fructose en 5-HMF est de 0% ainsi que le rendement global en 5-HMF.

La réaction d'isomérisation atteint son équilibre à 55%. La différence de pH imposé ne permet pas un transport efficace du fructose donc une quantité très faible de fructose se retrouve dans la phase aqueuse réceptrice, limitant la réaction de déshydratation.

## Annexe 9

*Tableau 57. Suivi des quantités de glucose, fructose et 5-HMF dans les différentes phases aqueuses au cours du temps. Calcul du bilan matière. Catalyse hybride dans le réacteur en H dans les conditions optimisée.*

Temps h	donneuse			réceptrice			Bilan matière	
	nD-Fru mol	nD-Glu mol	n5-HMF mol	nD-Fru mol	nD-Glu mol	n5-HMF mol	ntot mol	%tot %
0,00	0,00E+00	1,95E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,95E-02	100
0,25	1,72E-03	1,69E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,86E-02	95,55
0,50	3,87E-03	1,48E-02	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	1,86E-02	95,77
1,00	6,39E-03	1,17E-02	0,00E+00	5,75E-06	0,00E+00	0,00E+00	1,81E-02	93,07
1,50	7,59E-03	1,07E-02	0,00E+00	1,02E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,83E-02	94,30
2,00	7,91E-03	9,74E-03	0,00E+00	1,16E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,78E-02	91,29
3,00	8,22E-03	8,81E-03	0,00E+00	4,03E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,74E-02	89,56
4,00	8,39E-03	8,39E-03	0,00E+00	6,70E-04	0,00E+00	0,00E+00	1,74E-02	89,67
6,00	8,03E-03	7,95E-03	0,00E+00	9,69E-04	1,38E-04	1,63E-03	1,87E-02	96,23
8,00	7,89E-03	7,63E-03	0,00E+00	1,42E-03	1,71E-04	1,68E-03	1,88E-02	96,59
10,00	7,20E-03	7,23E-03	4,08E-05	2,01E-03	1,96E-04	1,75E-03	1,84E-02	94,67
12,00	6,66E-03	7,07E-03	-	2,57E-03	2,28E-04	1,79E-03	-	-
14,00	5,16E-03	6,26E-03	4,29E-05	3,91E-03	3,12E-04	1,89E-03	1,76E-02	90,29
15,00	4,73E-03	6,04E-03	4,36E-05	4,78E-03	3,76E-04	1,86E-03	1,78E-02	91,62
16,00	4,42E-03	6,02E-03	4,55E-05	5,33E-03	4,26E-04	2,06E-03	1,83E-02	94,01
23,00	2,31E-03	4,06E-03	5,63E-05	6,43E-03	7,71E-04	2,58E-03	1,62E-02	83,26
25,00	1,66E-03	3,52E-03	6,32E-05	7,27E-03	8,56E-04	3,22E-03	1,66E-02	85,28
27,00	1,28E-03	3,41E-03	7,70E-05	8,91E-03	1,15E-03	3,80E-03	1,86E-02	95,75
29,00	7,69E-04	2,94E-03	8,26E-05	9,22E-03	1,31E-03	3,92E-03	1,82E-02	93,76
31,00	5,86E-04	2,52E-03	8,72E-05	9,55E-03	1,56E-03	5,21E-03	1,95E-02	106,97
32,00	5,41E-04	2,40E-03	8,91E-05	1,02E-02	1,66E-03	6,02E-03	2,09E-02	107,11
51,50	1,26E-03	1,96E-03	1,65E-04	9,45E-03	1,99E-03	7,49E-03	2,23E-02	106,75

## Liste des figures

---

Figure 1. Répartition des constituants majeurs de la biomasse lignocellulosique. <sup>[7]</sup> .....	3
Figure 2. Avantages (○) et inconvénients (●) de la catalyse enzymatique et de la catalyse chimique....	4
Figure 3. Evolution de la liste des molécules dites « prioritaires » pour les recherches portant sur le thème de la bioraffinerie. (*Hydrogène associé au monoxyde de carbone pour la formation du syngas).....	8
Figure 4. Le 5-HMF, une molécule plateforme. <sup>[18]</sup> .....	9
Figure 5. Nombre de publications sur la synthèse du 5-HMF et la synthèse du 5-HMF à partir d'hexoses telles que recensées par Scopus .....	10
Figure 6. Schéma réactionnel d'obtention du 5-HMF par triple déshydratation à partir du glucose directement (voie B) à partir du glucose mais incluant une étape intermédiaire d'isomérisation en fructose (voie A). <sup>[29]</sup> .....	11
Figure 7. Formation du 5-HMF et réactions parasites rencontrées. ....	12
Figure 8. Représentation de la réaction d'isomérisation du glucose. <sup>[45]</sup> .....	13
Figure 9. Isomérisation du D-glucose en D-fructose et leur pouvoir sucrant respectif. <sup>[47]</sup> .....	14
Figure 10. Evolution du nombre de publications portant sur le développement de xyloses isomérases au cours du temps telles que recensées par Scopus.....	14
Figure 11. Liste de microorganismes capables de produire la glucose isomérase. <sup>[50]</sup> .....	15
Figure 12. Structure de la glucose isomérase de <i>Streptomyces ruminus</i> .....	17
Figure 13. Représentation de la poche catalytique de la glucose isomérase produite par <i>Streptomyces rubiginosus</i> . ....	18
Figure 14. Procédé d'immobilisation de la glucose isomérase par Novo Industri. ....	20
Figure 15. Déshydratation d'hexoses en 5-HMF. ....	22
Figure 16. Schémas réactionnels proposés pour la réaction de déshydratation. (a)Mécanisme acyclique, (b) Mécanisme faisant appel à des intermédiaires cycliques. <sup>[18]</sup> .....	22
Figure 17. Sélectivité en fonction du rendement de déshydratation des réactions de déshydratation par catalyse homogène en phase aqueuse pour différents catalyseurs.....	23
Figure 18. Sélectivité en fonction du rendement de déshydratation des réactions de déshydratation par catalyse hétérogène en phase aqueuse pour différents catalyseurs. (mo) : micro-ondes.....	24
Figure 19. Structure de sulfonate de polystyrène réticulé. <sup>[95]</sup> .....	25
Figure 20. Schéma réactionnel de formation de l'acide lévulinique en milieu acide à partir du 5-HMF. <sup>[31]</sup> .....	28
Figure 21. Schéma de la voie de formation des produits en milieux aqueux acide depuis le fructose..	29
Figure 22. Structure des acides alkyl- et aryl- boroniques .....	29
Figure 23. Equilibre d'ionisation des acides boroniques dans l'eau. ....	30
Figure 24. Formation de l'ester boronique à partir d'un diol et d'un acide phénylboronique à différents pH. <sup>[111]</sup> .....	30
Figure 25. Deux mécanismes possibles pour le transport de monosaccharide par complexation avec un acide arylboronique. A : pH < pKa. B : pH > pKa. <sup>[116]</sup> .....	31
Figure 26. Exemples d'acides boroniques. <sup>[118]</sup> .....	33
Figure 27. Structures des acides arylboroniques ortho- et méta- substitués. <sup>[119]</sup> .....	33
Figure 28. Structures des complexes fructoboroniques et glucoboronique à partir des formes furanose et pyranose. <sup>[120]</sup> .....	34
Figure 29. Configuration du procédé de transport des monosaccharides .....	34
Figure 30. Conversion du glucose en fructose utilisant le principe d'extraction sélective du fructose par un acide boronique. <sup>[113]</sup> .....	36
Figure 31. Concept proposé pour la production du 5-HMF à partir du glucose en utilisant de l'eau de mer.....	38
Figure 32. Schéma de la cascade chemoenzymatique pour la synthèse du 5-HMF. <sup>[126]</sup> .....	38

Figure 33. Schéma du procédé développé par Alipour et al. pour la conversion du glucose en 5-HMF. [123] .....	39
Figure 34. Mise en œuvre d'une catalyse hybride pour la déracémisation d'une amine secondaire. ....	41
Figure 35. Synthèse hybride avec encapsulation du catalyseur métallique.....	41
Figure 36. DKR d'une amine catalysée par nanobiohybride. [128] .....	42
Figure 37. Complexe d'iridium biotinylé. [129] .....	42
Figure 38. Système hybride pour la racémisation d'halohydrine. [130] .....	43
Figure 39. Système hybride pour la réduction d'une cétone. [131] .....	44
Figure 40. Systèmes hybride pour la formation de fructose. [133] .....	45
Figure 41. Principe de l'isomérisation enzymatique du D-glucose, du transport du D-fructose, et de la formation du 5-HMF. ....	47
Figure 42. Schéma du protocole d'extraction et de relargage de monosaccharides .....	52
Figure 43. Schéma du protocole de réaction en cascade dans le réacteur Radley™. ....	58
Figure 44. Illustration et dimensions du panier d'agitation.....	59
Figure 45. Illustration et dimensions de la pale d'agitation utilisée dans le réacteur en H. ....	59
Figure 46. Schéma illustrant la répartition des phases dans le réacteur coaxial.....	61
Figure 47. Schéma illustrant la répartition des phases dans le réacteur en H.....	63
Figure 48. <i>Activité enzymatique relative de l'IGI à 60 min de réaction en fonction de la température. V=1 mL Tris-HCl 100 mM pH = 7,5, m<sub>IGI</sub>=10 mg, [D-Glc]<sub>i</sub>=100 mM, [MgSO<sub>4</sub>]=20 mM, [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]=8 mM, 900 rpm. ....</i>	72
Figure 49. <i>Activité enzymatique relative de l'IGI en fonction du pH de la phase aqueuse à 70°C. V=1 mL Tampon 100 mM, m<sub>IGI</sub>=10 mg, [D-Glc]<sub>i</sub>=100 mM, [MgSO<sub>4</sub>]=20 mM, [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]=8 mM, 900 rpm. Tampons : citrate de sodium à pH 4,5, phosphate de sodium à pH 6,5, Tris-HCl à pH 7, 7,5, 8, 8,5 et 9. ....</i>	73
Figure 50. <i>Evolution des concentrations en D-glucose et D-fructose après 10 minutes (gauche) et 60 minutes (droite) de réaction en fonction de la concentration en D-glucose initialement introduite. V=1 mL Tris-HCl 100 mM pH = 8,5, m<sub>IGI</sub>=10 mg, [D-Glc]<sub>i</sub>=50 mM à 1 M, [MgSO<sub>4</sub>]=20 mM, [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]=8 mM, 900 rpm, 70°C. ....</i>	74
Figure 51. <i>Représentation de Lineweaver Burk. ....</i>	75
Figure 52. <i>Conversion du D-glucose à 60 minutes d'isomérisation en fonction du rapport massique IGI/D-glucose. ....</i>	76
Figure 53. <i>Suivi du % de monosaccharides dans le milieu réactionnel au cours de l'isomérisation du D-glucose.. V=100 mL Tris-HCl 100 mM pH = 8,5, m<sub>IGI</sub>=100 mg, [D-Glc]<sub>i</sub>=100 mM, [MgSO<sub>4</sub>]=20 mM, [Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>]=8 mM, 900 rpm, 70°C.....</i>	77
Figure 54. <i>Représentation schématique de la formation et du transport du complexe [D-fructose-acide boronique] aussi nommé complexe fructoborate. ....</i>	79
Figure 55. <i>Structures des acides boroniques utilisés pour le premier criblage.....</i>	81
Figure 56. <i>Evolution des rendements d'extraction du D-fructose au cours du temps pour différents acides boroniques. Vaq=600 µl (Tris-HCl pH = 8,5 100mM) [D-Fru]<sub>i</sub>=100 mM, Vorg=600 µl (MIBC), [T]=100 mM, [coT]=200 mM, 70°C, 750 rpm. (Expérience A).....</i>	82
Figure 57. <i>Graphique représentant les différents groupes d'acides boroniques.....</i>	83
Figure 58. <i>Structures des acides boroniques utilisés pour le criblage de sélectivité pour le D-fructose.....</i>	86
Figure 59. <i>Evolution de la composition en D-fructose de la phase aqueuse donneuse. Vaq=600 µl (Tris-HCl pH = 8,5 100mM), [D-Fru]<sub>i</sub>=100 mM, Vorg=600 µl (MIBC, TAME ou 5M2H), [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336®]=200 mM, 70°C, 750 rpm. (Expérience C) .....</i>	91
Figure 60. <i>Evolution du taux de D-glucose dans la phase aqueuse au cours du temps. Vaq=1 mL (Tris-HCl pH = 8,5 100mM), [D-Glc]<sub>i</sub>= 1 M, Vorg=500 µl (MIBC), 70°C, 750 rpm. (expérience D) .....</i>	92

Figure 61. Evolution de la concentration en D-fructose de la phase aqueuse donneuse au cours de l'extraction. Vaq=600 $\mu$ l (Tris-HCl pH = 8,5 100mM), [D-Fru] <sub>i</sub> =100 mM, Vorg=600 $\mu$ l (MIBC), [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336 <sup>®</sup> ]=50 à 400 mM, 70°C, 750 rpm. (Expérience E) .....	94
Figure 62. Rendements d'extraction en fonction du temps pour différents rapports molaires D-Fru/3,4-DCPBA. (Gauche). Vitesse initiales d'extraction en fonction du rapport molaire D-Fru/3,4-DCPBA droite) Vaq=600 $\mu$ l (Tris-HCl pH = 8,5, 100mM), [D-Fru] <sub>i</sub> =25 mM à 1 M, Vorg=600 $\mu$ l (MIBC), [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336 <sup>®</sup> ]=200 mM, 70°C, 750 rpm. (Expérience F) .....	96
Figure 63. Corrélation entre la vitesse initiale d'extraction calculée et la concentration initiale en D-Fru.....	96
Figure 64. Evolution de la quantité de D-fructose dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps durant l'extraction et en fonction de la température. Vaq=600 $\mu$ l (Tris-HCl pH = 8,5 100mM), [D-Fru] <sub>i</sub> =100 mM, Vorg=600 $\mu$ l (MIBC), [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336 <sup>®</sup> ]=200 mM, 750 rpm. (Expérience H) .....	98
Figure 65. Représentation schématique de la réaction d'hydrolyse du complexe fructoboronate et ainsi du relargage du fructose dans la phase aqueuse réceptrice. ....	100
Figure 66: Influence du pH de la phase aqueuse réceptrice sur la réaction d'hydrolyse de l'ester boronique. ....	101
Figure 67. Rendement en 5-HMF en fonction du temps pour les différents catalyseurs : R1, R2, R3, R4. (a) 70°C, (b) 80°C, (c) 90°C. ....	104
Figure 68. Résine R1 après 15h de déshydratation à 90°C, (gauche) et à 80°C (droite). ....	105
Figure 69. Rendement de la réaction de déshydratation en fonction du temps pour différents rapports molaires H <sup>+</sup> /fructose. (a) résine R1, (b) résine R2, (c) résine R3. ....	106
Figure 70. Rendement en 5-HMF en fonction du temps pour un pH = 3 (triangle) et un pH = 6 (rond) .....	107
Figure 71. Schéma du système découplé. Phase soutirée pour l'étape suivante (flèche rouge), phase introduite (flèche verte). ....	112
Figure 72. Comparaison des rendements d'extraction du D-Fru en fonction du rapport D-Fru/T pour l'étape d'isomérisation combinée à l'extraction (étape 1 de la cascade) et des rendements obtenus lors de la recherche des conditions d'extraction du D-Fru. Phase organique dans les deux cas : MIBC, [3,4-DCPBA] =100 mM, [Aliquat336 <sup>®</sup> ]=200 mM, 70°C.....	114
Figure 73. Schéma des mises en œuvre de la catalyse enzymatique d'isomérisation du D-glucose. Monophasique (gauche), biphasique (droite). ....	115
Figure 74. Pourcentages de monosaccharides dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps dans le système monophasique : V=100 mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH = 8,5, m <sub>IGF</sub> =0,5 g, [D-Glc] <sub>i</sub> =100 mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=20 mM, [Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ]=8 mM, 200 rpm, 70°C.....	116
Figure 75. Pourcentages de monosaccharides dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps dans le système biphasique: Vaq=100 mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,5, m <sub>IGF</sub> =500 mg, [D-Glc] <sub>i</sub> =100 mM, [MgCl <sub>2</sub> ]=20 mM, [Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> ]=8 mM, Vorg= 100 mL, MIBC, [3,4-DCPBA]=100 mM, [Aliquat336 <sup>®</sup> ]=200 mM, 200 rpm, 70°C.....	116
Figure 76. Conversion du D-glucose calculé dans le cas du système monophasique et du système biphasique.....	117
Figure 77. Diagramme schématique du procédé d'isomérisation et d'extraction développé par Alipour et al. <sup>[123]</sup> .....	118
Figure 78. Diagrammes schématiques des procédés d'isomérisation et d'extraction simultanés. (a) procédé mis au point par Alipour et al. <sup>[123]</sup> (b) procédé mis au point dans notre étude.....	119
Figure 79. Diagramme schématique du procédé d'isomérisation du glucose et transport du fructose développé par Alipour et al. <sup>[123]</sup> .....	121
Figure 80. Réaction de formation de l'acide lévulinique et de l'acide formique à partir du 5-HMF..	122

Figure 81. Répartition des différentes espèces dans les différentes phases à la fin du système « en mode » cascade.....	124
Figure 82. Configuration d'un réacteur coaxial triphasique recensé par Ferraz et al. généralement utilisé pour l'étude des membranes liquides. <sup>[140]</sup> .....	125
Figure 83. Configuration d'un réacteur en U triphasé recensé par Ferraz et al. généralement utilisé pour l'étude des membranes liquides. <sup>[140]</sup> .....	125
Figure 84. Configuration d'un réacteur type « rédox » triphasé. <sup>[152]</sup> .....	125
Figure 85. Dimensions et configuration du réacteur coaxial. Vue de face (gauche) vue de dessus (droite). .....	126
Figure 86. Schéma du réacteur coaxial permettant la mise en œuvre simultanée des différentes étapes. ....	127
Figure 87. Schéma du transport du D-fructose dans le réacteur coaxial.....	129
Figure 88. Schéma et dimensions du réacteur en H (à gauche) et représentation d'un couvercle (à droite). ....	134
Figure 89. Illustration et dimensions du panier d'agitation.....	135
Figure 90. Schéma du procédé total de production du 5-HMF à partir du glucose mis en œuvre dans le réacteur en H. ....	135
Figure 91. Schéma du réacteur en H utilisé pour l'étude de faisabilité de transport du fructose. ....	136
Figure 92. Rendements et bilan carbone obtenus lors de l'expérience A. Les rendements d'extraction et de relargage sont calculés par rapport à la concentration initiale en fructose de la phase aqueuse donneuse.....	137
Figure 93. Schéma des deux étapes de l'utilisation du réacteur en H en découplé. Etape 1 : extraction du fructose dans le compartiment D. Etape 2 : relargage du fructose extrait dans le compartiment R. ....	138
Figure 94. Rendements obtenus lors de l'expérience B en fonction du temps. Les rendements d'extraction et de relargage sont calculés par rapport à la concentration initiale en fructose de la phase aqueuse donneuse. ....	139
Figure 95. Photographies illustrant l'homogénéisation des espèces en solution au sein du réacteur en H. De gauche à droite, t=0, t= 1h et t=8h, (expérience C1).....	140
Figure 96. Concentration en colorant (azorubine) de la phase aqueuse dans le compartiment R en fonction du temps. ....	140
Figure 97. Illustration de l'homogénéisation des espèces en solutions dans les deux compartiments. De gauche à droite t=0 minutes, t=1h, t=3h et t=8h.....	141
Figure 98. Concentration en colorant de la phase aqueuse dans le compartiment R (azorubine-rouge) et dans le compartiment D (tartrazine-jaune) en fonction du temps.....	141
Figure 99. Schémas de la circulation du fluide au sein du réacteur en H comportant le système de contre-pales. Vue de dessus (a), vue de face (b). (c) Photographie du système de contre-pales, (d) Photographie illustrant la circulation du liquide (colorants jaune et rouge) au sein du pont. ....	143
Figure 100. Photographies illustrant l'homogénéisation des espèces en solution au sein du réacteur avec le système de contre-pales. A gauche à t=0 minutes, à droite à t= 30 minutes .....	144
Figure 101. Photographie du système de contre-pales en aluminium. ....	145
Figure 102. Photographie du réacteur en H comportant le système de contre-pales pour l'étude de transport du fructose. Vue de face et vue du dessus.....	146
Figure 103. Suivi du pH des phases aqueuses donneuse et réceptrice lors de l'expérience témoin de transport du fructose.....	148
Figure 104. Evolution du pH de la phase aqueuse (pH(D)) et de la phase aqueuse réceptrice (pH(R)) au cours du temps pour les expériences F1 et F2.....	149

Figure 105. Rendements d'extraction et de relargage au cours du temps, (a) expérience F1, (b) expérience F2. (c) Rendement d'extraction en fonction de $\Delta pH$ . (d) Rendement de relargage en fonction de $\Delta pH$ $\Delta pH = pH_{(D)} - pH_{(R)}$ .	150
Figure 106. Schéma du transport du fructose.	152
Figure 107. (a) Evolution du pH(D) en fonction du temps. (b) Rendement d'extraction en fonction du temps.	154
Figure 108. Représentation graphique de l'évolution du rendement d'extraction en fonction de $\Delta pH$ .	154
Figure 109. Suivi du rendement d'extraction du fructose et du $\Delta pH$ au cours du temps (expérience G3).	156
Figure 110. Suivi des rendements d'extraction et de relargage du fructose pour les différentes agitations imposées dans les compartiments. (Expériences I1 à I3).	160
Figure 111. Représentation graphique des rendements d'extraction et de relargage et du $\Delta pH$ au cours du temps.	162
Figure 112. (gauche) Rendement d'extraction au cours du temps pour les différents rapports Fru/3,4-DCPBA. (droite) Rendement d'extraction après 4h en fonction de la concentration en 3,4-DCPBA.	164
Figure 113. Photographie de la mise en œuvre de la catalyse hybride dans le réacteur en H.	168
Figure 114. Représentations des quantités de matières des différentes espèces en solution. Expérience M. (a) Suivi de la quantité de matière de glucose dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice. (b) Suivi de la quantité de matière de fructose dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice. (c) Suivi de la quantité de matière de 5-HMF dans les phases aqueuses donneuse et réceptrice.	169
Figure 115. Représentation graphique des rendements d'isomérisation, d'extraction et de déshydratation et de la conversion du glucose au cours du temps (Expérience M).	170
Figure 116. Diagramme schématique du procédé d'isomérisation du glucose et transport du fructose développé par Alipour et al. et de l'étape de déshydratation d'un mélange exclusivement constitué de fructose. <sup>[123]</sup>	172
Figure 117. Transformation du D-glucose en 5-HMF.	176
Figure 118. Procédé hybride de conversion du glucose en 5-HMF.	176
Figure 119. Schéma du procédé total de production du 5-HMF à partir du glucose mis en œuvre dans le réacteur en H.	179
Figure 120. Schéma du procédé microfluidique de conversion du glucose en 5-HMF.	182
Figure 121. Pourcentages de fructose dans la phase aqueuse donneuse au cours du temps dans le système biphasique sans catalyse enzymatique: $V_{aq}=100$ mL Tampon Tris-HCl 100 mM pH 8,5, $[D-Fru]_i=100$ mM, $V_{org}=100$ mL, MIBC, $[3,4-DCPBA]=100$ mM, $[Aliquat336^{\circledR}]=200$ mM, 200 rpm, $70^{\circ}C$ .	194
Figure 122. Résultats des expériences G1, G2, G3 de transport du fructose. Suivi de la concentration en fructose dans la phase aqueuse donneuse, du pH et calculs des rendements d'extraction.	195

## Liste des tableaux

---

Tableau 1. Exemples de conditions de culture microbienne et d'extraction pour la préparation de la glucose isomérase.....	16
Tableau 2. Avantages et inconvénients de l'immobilisation des enzymes. <sup>[47]</sup> .....	18
Tableau 3. Déshydratation du fructose par des résines échangeuses d'ions. <sup>[97]</sup> .....	27
Tableau 4. Conditions expérimentales pour les expériences de recherche de la température optimale (A), du pH optimal (B) et du rapport Enzyme/glucose (C) de la réaction d'isomérisation du glucose. ....	51
Tableau 5. Conditions expérimentales des expériences de recherche des conditions optimales d'extraction du fructose. ....	54
Tableau 6. Constitution de la phase aqueuse réceptrice utilisée pour les expériences de relargage.....	55
Tableau 7. Propriétés des résines utilisées. ....	56
Tableau 8. Conditions expérimentales pour les expériences de recherche de la température optimale (A), du rapport massique mrésine/mfructose (B) et du pH optimal (C) de la réaction de déshydratation du fructose. ....	57
Tableau 9. Nombre de meq pour chaque résine par gramme et par ml. ....	57
Tableau 10. Conditions expérimentales pour les expériences colorimétriques C1, C2 et C3. ....	63
Tableau 11. Caractéristiques des colorants utilisés. ....	64
Tableau 12. Conditions expérimentales des expériences de transport du fructose dans le réacteur en H pour le compartiment D.....	65
Tableau 13. Conditions expérimentales des expériences de transport du fructose dans le réacteur en H pour la phase organique.....	65
Tableau 14. Conditions expérimentales des expériences de transport du fructose dans le réacteur en H pour le compartiment R. ....	66
Tableau 15. Concentrations et méthodes analytiques.....	67
Tableau 16. $K_M$ calculés dans les différentes études pour des glucose isomérases. ....	75
Tableau 17. Rendements d'extraction du D-fructose et vitesses initiales d'extraction correspondantes pour les différentes acides boroniques utilisés. ....	82
Tableau 18. Présentation des scores obtenus par chaque acide boronique.....	83
Tableau 19. Rendement d'extraction du D-fructose et du D-glucose et pour les acides boroniques testés. (expérience B) .....	87
Tableau 20. Prix (€/g) des acides boroniques utilisés pour l'étude. Prix au 1 <sup>er</sup> juin 2017 chez Sigma. ....	89
Tableau 21. Solubilité dans l'eau des solvants organiques à 20 °C.....	90
Tableau 22. Vitesses initiales d'extraction et rendements d'extraction pour différents rapports molaires T/coT..	94
Tableau 23. Influence de la concentration des espèces constituant le système d'extraction du D-fructose. (expérience G).....	97
Tableau 24. Résines utilisées pour la réaction de déshydratation du fructose et abréviations correspondantes. .	102
Tableau 25. Rendements obtenus durant les étapes d'isomérisation et d'extraction menées simultanément..	113
Tableau 26. Rendement de relargage du D-Fru dans la phase aqueuse réceptrice.....	120
Tableau 27. Résultats de l'étape de déshydratation obtenus pendant 40h de réaction. $V_{aq}=100$ mL obtenus après l'étape 2, 80°C, 200 rpm. ....	122

Tableau 28. Récapitulatif des rendements des différentes étapes du système « en mode » cascade. Chaque rendement est calculé par rapport aux quantités obtenues à l'issue de l'étape précédente.	123
Tableau 29. Rendements obtenus après 35h de mise en œuvre de la catalyse hybride dans le réacteur coaxial.	127
Tableau 30. Rendements d'extraction et de relargage du fructose au cours du temps dans le réacteur coaxial.	129
Tableau 31. Aires des surfaces d'extraction et vitesses initiales d'extraction dans les différentes mises en œuvre expérimentales.	131
Tableau 32. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de faisabilité de transport du fructose.	137
Tableau 33. Concentrations en fructose obtenus lors de l'expérience de transport du fructose dans le réacteur en H.	137
Tableau 34. Concentrations en fructose et rendements obtenus lors de l'expérience B.	139
Tableau 35. Mesure de l'absorbance à 530 nm de la phase aqueuse dans le compartiment R. Vitesse de transfert de matière du compartiment D vers le compartiment R.	140
Tableau 36. Mesure de l'absorbance à 530 nm de la phase aqueuse dans le compartiment R, à 425 nm dans le compartiment D. Vitesse de transfert de matière du compartiment D vers R ( $V_{DR}$ ) et du compartiment R vers D ( $V_{RD}$ ).	141
Tableau 37. Mesure de l'absorbance à 530 nm de la phase aqueuse dans le compartiment R, à 425 nm dans le compartiment D. Vitesse de transfert de matière du compartiment D vers R ( $V_{DR}$ ) et du compartiment R vers D ( $V_{RD}$ ).	144
Tableau 38. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de la validation en conditions réelles du système avec circulation optimisée.	145
Tableau 39. Suivi de la concentration en fructose dans les phases aqueuses du réacteur en H comportant le système de contre-pales en Al lors de l'étude du transport du fructose.	146
Tableau 40. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'expérience « témoin ».	148
Tableau 41. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de l'évolution du pH sans régulation.	149
Tableau 42. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de l'effet de la concentration des solutions tampons sur l'évolution des pH et l'identification du $\Delta$ pH optimal.	153
Tableau 43. Encadrement de la valeur de $\Delta$ pH correspondant à la baisse d'activité de l'extraction du fructose pour les différentes expériences G1, G2 et G3.	155
Tableau 44. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude du transport du fructose de la phase réceptrice vers la phase donneuse, expérience H.	157
Tableau 45. Résultats de l'étude du transport du fructose depuis la phase aqueuse réceptrice.	158
Tableau 46. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude du transport du fructose de la phase réceptrice vers la phase donneuse.	159
Tableau 47. Vitesse de rotation des pales d'agitation dans chacun des compartiments pour les expériences I1 à I3.	159
Tableau 48. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'expérience de mise en évidence du turn-over du transporteur, (expérience J).	162
Tableau 49. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de l'influence de la concentration en 3,4-DCPBA et Aliquat336® sur la cinétique d'extraction du fructose.	164

Tableau 50. Comparaison des flux de fructose dans la phase aqueuse réceptrice dans différentes expériences de transport de fructose.....	166
Tableau 51. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de la catalyse hybride dans le réacteur en H, (expérience L). .....	167
Tableau 52. Résultats obtenus après 25h d'expérience à 70°C dans le compartiment d'isomérisation et 80°C dans le compartiment de déshydratation. ....	167
Tableau 53. Résultats obtenus lors de la catalyse hybride en réacteur microfluidique. ....	183
Tableau 54. Suivi des résultats lors de l'expérience de transport du fructose (expérience G3). ....	196
Tableau 55-58. Suivi des concentrations en fructose et calculs des rendements de transport du fructose (expérience I1-I3) et suivi du pH .....	197
Tableau 64. Paramètres expérimentaux appliqués pour l'étude de la catalyse hybride dans le réacteur en H dans des conditions de $\Delta pH$ non conformes. ....	202
Tableau 65. Suivi des quantités de glucose, fructose et 5-HMF dans les différentes phases aqueuses au cours du temps. Calcul du bilan matière. Catalyse hybride dans le réacteur en H dans les conditions optimisée.....	203

## Production scientifique

---

**Brevet déposé :**

Brevet déposé à l'INPI le 21 juin 2017, par IFP Energies nouvelles  
Second brevet déposé le 1 février 2018.

**Article :**

Hybrid catalysis: a suitable concept for valorization of biosourced saccharides to value-added chemicals, *ChemCatChem*, 2017, 9, 2080-2084.

Alexandra Gimbernat, Marie Guehl, Mickaël Capron, Nicolas Lopes Ferreira, Rénato Froidevaux, Jean-Sébastien Girardon, Pascal Dhulster, Delcroix Damien, Franck Dumeignil.

**Communications orales lors de congrès :**

*SMILE2016, Rueil-Malmaison, (2016), congrès international*

« Dual catalysis, a new process for coupling bio- and chemical catalysis. Application to the synthesis of 5-HMF from glucose. »

Alexandra Gimbernat, Pascal Dhulster, Rénato Froidevaux, Franck Dumeignil, Jean-Sébastien Girardon.

*Sfr Condorcet, journée jeunes chercheurs, Reims (2016)*

« Nouveau procédé de « catalyse hybride » : couplage de la biocatalyse et de la catalyse chimique pour l'obtention du 5-HMF à partir du glucose. »

Alexandra Gimbernat, Pascal Dhulster, Jean-Sébastien Girardon, Rénato Froidevaux.

*CBSO, Evian, (2016)*

« Catalyse hybride, un nouveau concept pour le couplage de la biocatalyse et la catalyse chimique. Application à la synthèse du 5-hydroxyméthylfurfural à partir du glucose ».

Alexandra Gimbernat, Pascal Dhulster, Jean-Sébastien Girardon, Rénato Froidevaux.

**Communications par affiche lors de congrès :**

*GeCat, île d'Oléron, (2017)*

« Catalyse hybride : couplage de la biocatalyse et de la catalyse chimique appliqué à la production de 5-HMF à partir du glucose. »

Alexandra Gimbernat, Franck Dumeignil, Jean-Sébastien Girardon, Pascal Dhulster, Damien Delcroix, Nicolas Lopes Ferreira, Rénato Froidevaux et Jean-Sébastien Girardon.

*Sfr Condorcet, journée jeunes chercheurs, Amiens, (prix poster), (2017)*

« Catalyse hybride, un nouveau concept pour le couplage de la biocatalyse et la catalyse chimique. Application à la synthèse du 5-hydroxyméthylfurfural à partir du glucose hybride. »

Alexandra Gimbernat, Jean-Sébastien Girardon, Damien Delcroix, Pascal Dhulster, Rénato Froidevaux.

*BIOTRANS, Budapest, (2017), congrès international*

« Multistep catalytic transformation applied to the 5-HMF production from glucose: coupling biocatalysis and chemical catalysis toward an efficient hybrid catalytic process. »

Alexandra Gimbernat, Pascal Dhulster, Franck Dumeignil, Delcroix Damien, Nicolas Lopes Ferreira, Jean-Sébastien Girardon, Rénato Froidevaux.