



Sciences.be
Réseau Scité

science
infuse
UCL

Printemps des sciences 2011 : Matières et matériaux

Université catholique de Louvain

« La chimie du vert » ou comment allier
industrie des couleurs et écologie ?



Diffusé par la maison des sciences

BATAILLE Gwenaël
COSTER Quentin
GILET Monique
ROBISE Aurélie

Année académique 2010-2011

Dossier pour le professeur

Table des matières

I) Question problème contextualisée :.....	3
II) Lien avec le programme :.....	3
III) Carte conceptuelle :.....	4
IV) Déroulement des activités et expériences envisagées :.....	6
A. Introduction:	6
B. Expériences :	6
B.1) A réaliser avant chaque séance :	7
B.2) Test de différentes conditions de dégradation :.....	8
B.3) Etude de la cinétique de perte de coloration bleue :.....	9
B.4) Evolution visuelle du phénomène :	10
B.5) Fixation de colorants à un textile (la laine) :.....	10
B.6) Activités parallèles :	11
V) Matériel :.....	12
VI) Produits :	15
VII) Bibliographie :	16
VIII) Annexes : Notes complémentaires :.....	15

I) Question problème contextualisée :

Lors d'une de vos ballades le long d'une rivière que vous connaissez bien, vous remarquez que l'eau habituellement limpide a pris une coloration bleu marine. Remontant le cours d'eau, vous vous apercevez alors qu'une usine, « Color Textil Plus », s'est implantée à proximité et est à l'origine du rejet. Il s'agit d'une usine spécialisée dans la production et l'utilisation de colorants textiles.

Les méthodes actuelles de synthèse des colorants textiles sont énergivores, grandes consommatrices d'eau et utilisent des composés dangereux pour les ouvriers. De plus, après fixation au textile, on retrouve une partie des colorants employés dans les eaux de rejets, la majorité d'entre eux étant toxiques pour la santé humaine et l'environnement. Actuellement, les industries font de gros efforts pour diminuer leur empreinte écologique, c'est-à-dire leur impact sur l'environnement.

Dès lors, comment supprimer cette toxicité liée aux colorants...tout en respectant la santé et l'environnement ? Existe-t-il des colorants et/ou des méthodes de production plus écologiques ?

II) Lien avec le programme :

Public visé :

6^{ème} (sciences de bases et générales)

Pré-acquis :

- Fonctions en chimie organique
- Notions d'acidité
- Facteurs influençant les cinétiques de réactions
- Notions d'écologie
- Hétérotrophie
- Mycète

Compétences visées :

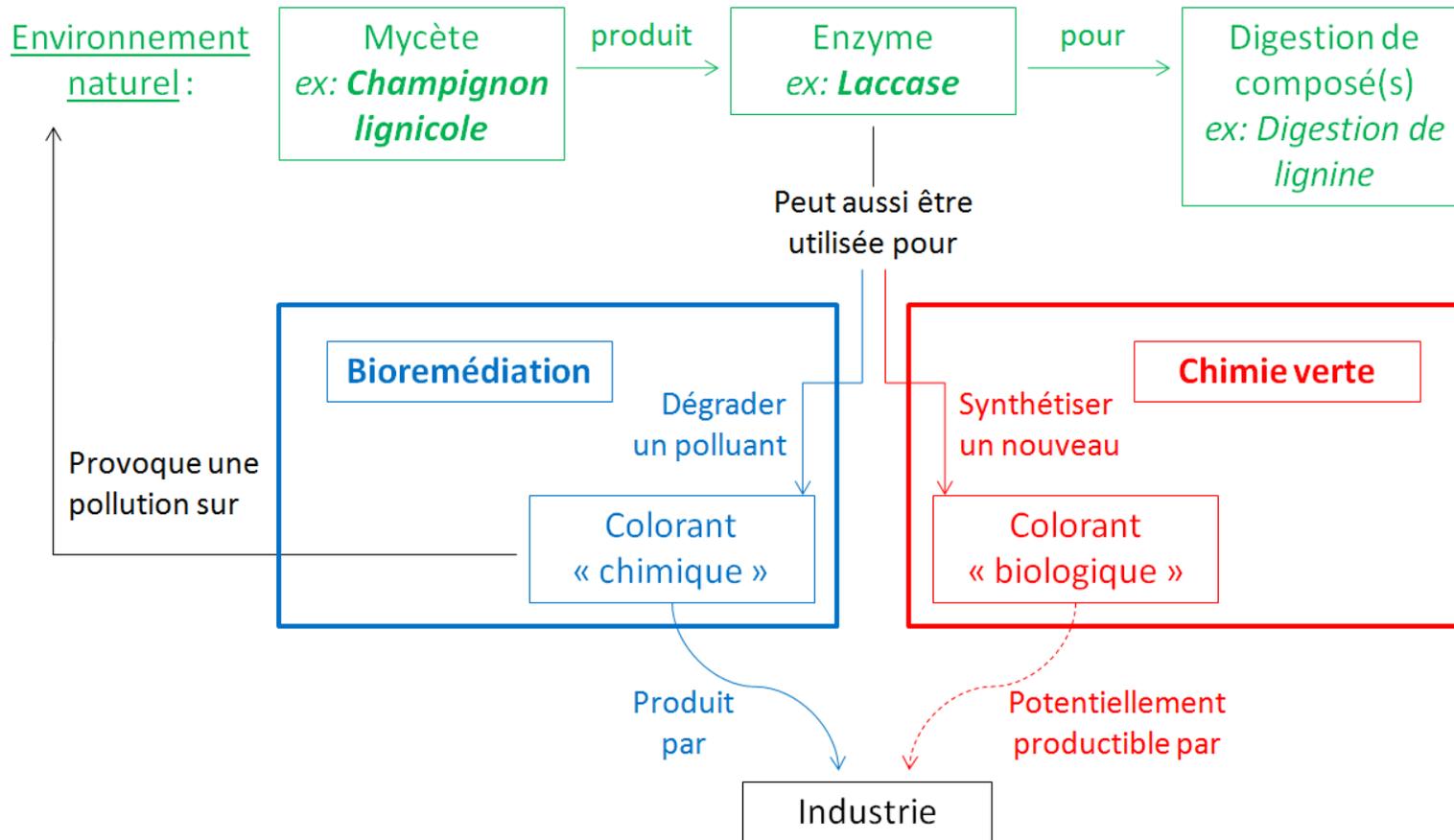
- C4 : Expérimenter
- C2 : Modéliser

Concepts à faire acquérir :

- **Biotechnologie** : ensemble des techniques d'utilisation des organismes vivants à des fins technologiques (i.e. bioremédiation et chimie verte).
- **Chimie verte** : ensemble des procédés et synthèses chimiques réalisés de manière écologique (i.e. en consommant peu d'énergie, en limitant l'utilisation et le rejet de substances toxiques).
- **Bioremédiation** : utilisation d'organismes vivants à des fins de dépollution.

- **Champignon lignicole** : se dit d'un mycète qui se nourrit du bois.
- **Lignine** : un des constituants majeurs du bois.
- **Enzyme** : Protéine qui permet le déroulement de réactions dans des conditions qui sont compatibles avec la vie.
- **Laccase** : enzyme (peu spécifique) sécrétée entre-autre par les mycètes de la pourriture blanche du bois (ex: polypores) et permettant la dégradation de la lignine.
- **Détournement de la fonction d'une enzyme** : utilisation d'une enzyme à d'autres fins que sa fonction naturelle (substrat différent).

III) Carte conceptuelle



Légende

En gras : nouveaux concepts

IV) Déroulement des activités et expériences envisagées :

A. Introduction:

- Mise en scène de la situation problème et discussion des hypothèses pour y remédier. Le but de la discussion sera d'amener les élèves à envisager l'utilisation d'organismes vivants à des fins de dépollution ou de synthèse de colorants.
- Observation de carpophores de mycètes colorés pour amener les élèves sur la piste de l'utilisation potentielle de mycètes pour la production de colorants utilisables dans l'industrie (ou leur dégradation).
- Des chercheurs ont remarqué de certains mycètes pouvaient être utilisés pour décolorer des colorants textiles. Cette décoloration devait faire intervenir des enzymes, et les chercheurs ont identifié comme acteur principal de décoloration d'un colorant (Acid Blue 62) la laccase (enzyme normalement impliquée dans la dégradation de la lignine, pour la nutrition du mycète). Mais le fonctionnement d'une enzyme dans des conditions naturelles peut différer de son utilisation à des fins appliquées. Il est donc primordial de bien étudier l'enzyme avant son utilisation à grande échelle.
- A cette fin, les élèves seront répartis en 4 sous-groupes de 3, puis leur seront expliquées les consignes en sous-groupes (~15 min).

NB : *Le terme « champignon » n'est en théorie pas scientifiquement correct et qu'il faut parler de « mycète ». Mais le terme est couramment utilisé, y compris dans la littérature.*

B. Expériences :

Questions :

- La laccase, une des enzymes de certains mycètes, est-elle responsable de la dégradation ou de la production des colorants ?
- Quels seraient les facteurs (dé)favorables à l'action de l'enzyme si elle est responsable de la (dé)coloration (aspect pratique) ?

Utilisation de l'enzyme laccase pour dégrader un colorant « polluant » : test de différentes conditions de dégradation et étude de la cinétique. (~1h)

Chaque sous-groupe disposera d'un échantillon présentant les conditions optimales de l'enzyme, et testera en plus deux variations pour l'une des 4 conditions suivantes : température, pH, salinité et concentration en enzyme.

B.1) A réaliser avant chaque séance :

1) Préparation du tampon Britton-Robinson :

Pour une séance, il faut : 4 sous-groupes x 3 échantillons par sous-groupe x 6ml par échantillon = 72ml. A cela, il faut ajouter 4 sous-groupes x 1 échantillon « tube visuel » x 2 ml = 8. Il faut donc au minimum 80 ml par séance.

Mélanger des volumes identiques (35ml) de solutions de H_3BO_3 (0,2M), H_3PO_4 (0,2M) et CH_3COOH (0,2M). Répartir ensuite en 91ml, 7ml et 7ml et ajuster le pH respectivement à 4,5 (pH optimal ; environ 30ml de NaOH 0,2M ajoutés pour 90ml de tampon), 3 et 7 (pH testés) avec une solution de NaOH (0,2M). Préparer pour trois sous-groupes un flacon (avec couvercle) contenant environ 30ml du tampon. Le sous-groupe testant les différents pH recevra trois tubes à essai contenant 6ml de tampon respectivement à pH 4,5, 3 et 7. Le tampon Britton-Robinson stabilise les pH entre 2 et 12.

2) Préparation d'une solution de colorant :

Préparer le colorant à 0,5g/L (0,2g dans 400ml). Ce qui donne une solution à $0,5/422 = 1,18 \times 10^{-3} M$. Répartir le colorant dans 4 flacons de 100 ml.

***NB :** Cette solution sera diluée 12X au sein de chaque échantillon par l'ajout des autres composants, ($1,5 \times 10^{-4} M$) ce qui est un bon compromis pour permettre à la fois la mesure au spectrophotomètre et la visualisation de l'évolution de la coloration (le spectrophotomètre sature à $8 \times 10^{-5} M$)*

3) Préparation de l'enzyme :

Pour deux séances d'une matinée, il nous faut préparer 80 ml d'une solution de laccase à 2,5 UI/ml (sachant que 1 g de laccase à 20 UI/mg dilué dans 1L d'eau distillée donne une solution à 20.000 UI/L).

Pour cela, préparer une solution à 100 UI/ml (dans un pot fermant étiqueté « Laccase 100 UI/ml ») en diluant 0,1 gr de laccase dans 20ml d'eau distillée. Ensuite, prendre 2 ml de la solution (à 100 UI/ml) et la diluer dans 80 ml d'eau distillée. On obtient 80ml d'une solution final à 0,125 gr/L et 2500 UI /L (2,5 UI/ml). Mélanger en agitant pour une bonne dissolution de l'enzyme et répartir cette solution dans 4 pots en plastiques fermants (20 ml par pot étiqueté « Laccase 2,5 UI/ml »).

4) Préparation de la solution saline :

Préparer 100ml d'une solution de NaCl (300mM), dont on réalise une dilution 10X pour obtenir une solution 30mM. ($M_{NaCl} = 58g$; $58 \times 0,3 = 17,4g/L$; 1,74g de NaCl dans 100 ml donne une solution de 300mM)

B.2) Test de différentes conditions de dégradation et étude de la cinétique de perte de coloration bleue :

1) Quel est le rôle de la température ?

- Dans 3 tubes à essais numérotés, ajouter 6ml de tampon Britton-Robinson, 1ml de solution contenant le colorant bleu, 4ml d'eau distillée.
- Placer le premier tube à essai dans de la glace pilée (+/- 1°C), placer le second dans un bain-marie à 45°C et laisser le troisième à température ambiante (+/- 25°C).
- Ajouter ensuite 1 ml de laccase à 2,5 UI/ml
- Placer à l'extrémité de chaque tube un morceau de parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélanger le contenu des tubes en les inversant doucement.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Température	1°C	25°C	45°C
Tampon (pH 4.5)	6ml	6ml	6ml
Colorant	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	4ml	4ml	4ml
Enzyme	1ml	1ml	1ml

2) Quel est le rôle de l'acidité ?

- Dans 3 tubes à essais numérotés, ajouter 6ml de tampon Britton-Robinson (un pH différent pour chaque tube), 1ml de solution contenant le colorant bleu et 4ml d'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 1ml de solution de laccase à 2,5 UI/ml.
- Placer à l'extrémité de chaque tube un morceau de parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélanger le contenu des tubes en les inversant doucement.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon	6ml (pH 7)	6ml (pH 3)	6ml (pH 4,5)
Colorant	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	4ml	4ml	4ml
Enzyme	1ml	1ml	1ml

3) Le présence de sels influence t-elle l'action de l'enzyme ?

- Dans 3 tubes à essais numérotés, ajouter 6 ml de tampon Britton-Robinson et 1 ml de solution contenant le colorant bleu.
- Dans le premier tube, ajouter 4ml d'une solution saline à 300mM, dans le second 4ml d'une solution saline à 30mM et dans le dernier, 4 ml d'eau distillée.
- Ajouter dans chaque tube 1ml de solution de laccase à 2,5 UI/ ml.
- Placer à l'extrémité de chaque tube un morceau de parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt, et mélanger le contenu des tubes en les inversant doucement.

NB : Avec 4ml de solution stock dans 12ml d'échantillon, on obtient des concentrations finales de 100mM ($C_f = V_i C_i / V_f = 4\text{ml} \cdot 300\text{mM} / 12\text{ml}$), 10mM ($1/10^{\text{ème}}$) et 0mM.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon (pH 4.5)	6ml	6ml	6ml
Colorant	1ml	1ml	1ml
Solution saline	4ml (300mM)	4ml (30mM)	/
Eau distillée	/	/	4ml
Enzyme	1ml	1ml	1ml

4) Une concentration variable en enzyme fait-elle varier la vitesse de la réaction ?

- Dans 3 tubes à essais numérotés, ajouter 6ml de tampon Britton-Robinson et 1ml de solution contenant le colorant bleu.
- Dans le premier tube, ajouter 4,5 ml d'eau distillée, puis 0,5 ml de solution de laccase à 2,5 UI/ml.
- Dans le deuxième tube, ajouter 4ml d'eau distillée, puis 1ml de solution de laccase à 2,5 UI/ml.
- Dans le troisième tube, ajouter 0ml d'eau, puis 5ml de solution de laccase à 2,5 UI/ml.
- Placer à l'extrémité de chaque tube un morceau de parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt, et mélanger le contenu des tubes en les inversant doucement.

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon (pH 4.5)	6ml	6ml	6ml
Colorant	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	4,5ml	4ml	0ml
Enzyme	0,5ml	1ml	5ml

B.3) Etude de la cinétique de perte de coloration bleue :

Pour le spectrophotomètre, chaque sous-groupe (testant une condition particulière) préparera un « blanc » (tube contenant uniquement du tampon) et l'utilisera pour calibrer l'appareil avant chaque lecture.

Ensuite, le groupe prélèvera, pour chaque tube, 1 échantillon (2-3ml, suivant le volume des cuvettes de spectrophotomètre). Chaque échantillon sera lu toutes les 3 minutes au spectrophotomètre. Ainsi, il y aura au total 15 mesures effectuées pendant environ 20 minutes. (Attention à ne pas poser les doigts sur les surfaces de la cuvette devant servir à la mesure)

NB : Le colorant bleu présente deux pics d'absorption (595 et 625nm). La lecture se fera à 595 nm.

B.4) Evolution visuelle du phénomène :

Afin de suivre l'évolution qualitative du changement de couleur, les groupes auront tous un tube plus concentré en colorant (tube « visuel »). Chaque tube contiendra 2 ml de tampon, 2 ml de colorant (0,5 g/L), 1 ml de laccase (non dilué (100 UI/ml)). Un prélèvement sera effectué à l'aide d'une pipette Pasteur toutes les 3 minutes et déposé sur un papier absorbant. Le dépôt sur papier absorbant fournira une information visuelle de l'évolution de la coloration.

Exploitation des résultats obtenus :

Pour chaque condition, les sous-groupes seront amenés à tracer un graphique (fourni dans avec le « document élèves » représentant l'évolution de l'absorbance de la solution en fonction du temps, indice de l'avancement de la réaction de conversion du colorant bleu. Les axes seront déjà préparés à l'avance, de sorte que les élèves n'auront plus qu'à replacer les points expérimentaux et tracer l'allure des courbes résultantes. Les élèves seront également amenés à indiquer sur chaque graphique le moment où le changement de coloration sera le plus marqué. Ils pourront ainsi observer l'effet de la laccase sur le colorant et expliquer brièvement les variations observées en fonction des conditions testées.

A partir de ces résultats, une restructuration sera faite en groupe et une discussion pourra être entamée sur les différents facteurs pouvant affecter le fonctionnement d'une enzyme et les conséquences pour des applications pratiques.

B.5) Fixation de colorants à un textile (la laine) :

Prélever 1ml du colorant bleu de départ (0,5g/l) dans un tube à essai avec 5ml de tampon. Ajouter du sel de cuisine (NaCl) et mélanger le contenu du tube à l'aide d'un parafilm. Tremper l'extrémité d'un fil de laine « vraie » et d'un fil de laine synthétique (pour comparer) à l'intérieur du tube.

Ajouter la même quantité de sel dans un tube « visuel » (avec 3ml tampon, 1ml de colorant bleu et 1ml de laccase ; laisser jusqu'à ce que la couleur rouge soit stabilisée). Tremper l'extrémité d'un fil de laine à l'intérieur du tube.

Placer les deux tubes à essai au bain-marie (fixé à 40°C) pendant quelques minutes. Sortir les fils de laine et les rincer dans un bécher rempli d'eau. Les laisser sécher sur du papier absorbant. Le colorant se fixe à la laine, mais pas à la laine synthétique (il part au rinçage).

NB : Pendant la fixation, montrer aux élèves qu'il est indiqué dans la notice des colorants pour textiles (que l'on trouve en droguerie) qu'il faut ajouter du sel. Expliquer aussi que les sels inhibent l'enzyme (cf. expérience d'un des sous-groupes) et les problèmes qui se posent en pratique avec la présence de sel dans les effluents ainsi que les pistes envisagées pour résoudre ce problème.

B.6) Activités parallèles :

1) Développement de quelques explications théoriques.

2) Observation des hyphes (filaments constituant le mycélium) de mycètes lignicoles et des fils de laine colorés (au microscope). Répartition pour les microscopes : 3 microscopes pour 2 groupes de 6 étudiants, en alternance (ou au minimum 2 microscopes pour 3 groupes de 4 étudiants).

***NB :** Préparer à l'avance les lamelles avec les hyphes pour les microscopes.*

3) Illustration des capacités de dégradation à partir d'une culture fongique :

L'utilisation d'une culture de mycètes permet d'obtenir une décoloration complète d'un colorant (Acid Blue 62) en une dizaine de jours. A cet effet, une réaction sera démarrée 10 jours avant le « Printemps des sciences » pour un premier échantillon, puis de nouvelles réactions seront entamées tous les deux jours de manière à pouvoir observer la décoloration au cours du temps. A placer idéalement à l'étuve à 25°C.

4) Présentation d'une petite vidéo sur le projet SOPHIED.

5) Démonstration aux élèves de la toxicité potentielle des deux colorants sur des algues ou sur des cultures de cresson.

V) Matériel :

Matériel pour préparer les expériences

Tampon

- Balance
- Pipettes graduées de 1ml+propipettes
- Burettes de 10 et 100 ml
- 3 berlins de 250 ml
- 1 berlin de 500 ml
- 3 flacons fermants de 500ml
- 1 spatule
- 1 coupelle de pesée
- 1 agitateur électrique et aimant
- PH mètre
- 2 flacons de 80ml (pour le tampon 3 et le tampon 7)
- 1 flacon fermant de 500 ml (pour le tampon 4.5)
- pour les élèves 4 flacons de min 30ml (en plastique)*

Produits : H₃BO₄ ; H₃PO₄ ; CH₃COOH ; NaOH; eau distillée

Colorant

- 1 flacon de min 400ml (fermant)
- 1 berlin de 500 ml
- aimant
- pour les élèves 4 flacons de 100 ml*

Produits : colorant ABU62 ; eau distillée

Enzyme (garder la solution concentrée d'un jour à l'autre (réserve))

- 1 berlin de 50 ml
- 1 berlin de 100ml
- 1 burette de 10 ml (spéciale laccase)
- 1 pipette graduée de 1 ml (spéciale laccase)
- pour les élèves 4 flacons de min 20ml*

Produits : laccase ; eau distillée

Solution saline

- 2 berlins de 250 ml

-aimant

-pour les élèves 2 flacons de 50 ml

Produits : sel ; eau distillée

Il nous faut aussi 4 marqueurs indélébiles de couleurs différentes

Un pc et vidéo

Plein de pipettes pasteurs

4 chronomètres

Du parafilm

Un microscope

Pour les expériences de décoloration

Température

-1 boîte en frigolite +glace pilée

-1 plaque chauffante+ un berlin de 250ml + eau + thermomètre (bain-marie)

-6 grands tubes à essais (environ 15cm de haut)

-12 cuvettes de spectro neuves (ou lavées au lave-vaisselle)

-1 portoir en bois (pour les tubes à essais)

-7 pipettes (laccase, colorant, tampon, eau, 3 conditions)

-1 pot de 20 ml de laccase

-1 pot de 100 ml de colorant

-1 pot de tampon PH 4,5 de 200ml

-1 berlin d'eau distillée de 50ml

-papier absorbant

PH

-6 grands tubes à essais (environ 15cm de haut)

-3 cuvettes de spectro neuves (ou lavées au lave-vaisselle)

-1 portoir en bois (pour les tubes à essais)

-9 pipettes (laccase, colorant, 3 tampon, eau, 3 conditions)

-1 pot de 20 ml de laccase

-1 pot de 100 ml de colorant

-1 pot de tampon PH 4,5 de 200ml

-1 pot de tampon PH 3 de 80ml

-1 pot de tampon PH 4,5 de 80ml

-1 berlin d'eau distillée de 50ml

-papier absorbant

Sel

- 6 grands tubes à essais (environ 15cm de haut)
- 3 cuvettes de spectro neuves (ou lavées au lave-vaisselle)
- 1 portoir en bois (pour les tubes à essais)
- 9 pipettes (laccase, colorant, tampon, 2 sel, eau, 3 conditions)
- 1 pot de 20 ml de laccase
- 1 pot de 100 ml de colorant
- 1 pot de tampon PH 4,5 de 200ml
- 1 pot de sol saline à 300mM
- 1 pot de sol saline à 30mM
- 1 berlin d'eau distillée de 50ml
- papier absorbant

Enzyme

- 6 grands tubes à essais (environ 15cm de haut)
- 3 cuvettes de spectro neuves (ou lavées au lave-vaisselle)
- 1 portoir en bois (pour les tubes à essais)
- 9 pipettes (laccase, colorant, tampon, eau, 3 conditions)
- 1 pot de 20 ml de laccase
- 1 pot de 100 ml de colorant
- 1 pot de tampon PH 4,5 de 200ml
- 1 berlin d'eau distillée de 50ml
- papier absorbant.

Coloration de la laine

- 1 berlin de 500 ml
- 1 plaque chauffante
- 1 thermomètre
- de la laine pure (ou des cheveux ou poils d'animaux)

NB : Les cuvettes de spectrophotométrie doivent avoir un volume de 3ml (petites cuvettes).

VI) Produits :

- **Laccase** : 1g de *Trameto* ou *Versicolor* (69€) (www.sigmaaldrich.com).
- **Tampon** : 400ml H_3BO_3 (0.2 M), 400ml H_3PO_4 (0.2 M) et 400ml CH_3COOH (0.2 M).
- **H_3PO_4** (85%) ; densité de 1,71 ; M=98g ; $(0,85 \times 1710 / 98 = 14,83 \text{ mol/L})$. Si on veut 200ml à 0,2M, il faut $0,2 \times 200 / 14,8 = 2,7 \text{ ml}$ H_3PO_4 (85%) et 199,46ml d' H_2O .
- **CH_3COOH** (96%) ; densité de 1,06 ; M= 60g ; $(0,96 \times 1060 / 60 = 16,96 \text{ mol/L})$. Si on veut 200ml à 0,2M, il faut $0,2 \times 200 / 16,96 = 2,36 \text{ ml}$ de CH_3COOH (96%) et 197,64ml d' H_2O .
- **H_3BO_3** en poudre soit 2.47gr dans 200ml pour obtenir une solution 0,2M.
- **NaOH** (0.2 M) soit 1.6g dans 200ml pour obtenir une solution de 0.2M.
- **NaCl** (Sel de table).

VII) Bibliographie :

A) **Bruyneel F., Enaud E., Billottet B., Vanhulle S., Marchand-Brynaert J.**, (2008), Regioselective Synthesis of Regioselective synthesis of 3-hydroxyorthanilic acid and its biotransformation into a novel phenoxazinone dye by use of laccase, *Eur.J. Org. Chem*, 72-79.

B) **Clayden J., Warren S., Greeves N.**, (2002), Chimie organique, De Boeck Université.

C) Fiche spectrophotomètre. Eric DAINI – Lycée Paul Cézanne – Aix en Provence, 2011. Accès en ligne janvier 2011. <http://www.spc.ac-aix-marseille.fr/labospc/IMG/pdf/spectrophotometre.pdf>

D) **De Aragão Umbuzeiro G., Freeman H.S., Warren S.H., Palma de Oliveira D., Yoshiyasu T., Watanabe T., Claxton L.D.**, (2005), The contribution of azo dyes to the mutagenic activity of the Cristais River, *Chemosphere* **60**: 55-64.

E) **Enaud E., Trovaslet M., Bruyneel F., Billottet L., Karaaslan R., Sener M.E., Coppens P., Casas A., Jaeger I.J., Hafner C., Rob C.A., Corbisier A., Marchand-Brynaert J., Vanhulle S.**, (2010), A novel azoanthraquinone dye made through innovative enzymatic process, *Dye and Pigments* **85**: 99-108.

F) **Enaud E.**, UCL, unité de Microbiologie (MBLA), communications personnelles.

G) **Epolito W.J., Lee Y.H., Bottomley L.A., Pavlostathis S.G.**, (2005), Characterization of the textile anthraquinone dye Reactive Blue 4, *Dyes and Pigments* **67**: 35-46.

H) Les champignons, Société d'Histoire Naturelle du Creusot (SHNC), 2011. Accès en ligne janvier 2011. http://rene.delahaye.perso.sfr.fr/Files/2010_04_01_utilite_des_champignons.pdf

I) **Kaushik P., Anushree, M.**, (2009), Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential, *Environment International* **35**: 127-141.

J) **Robert D, Catesson A-M.**, (2000), Organisation végétative, Volume 2 de Biologie végétale: caractéristiques et stratégie évolutive des plantes, Editions Doin.

K) **Rodríguez Couto S., Toca Herrera J. L.**, (2006), Industrial and biotechnological applications of laccases: A review, *Biotechnology Advances* **24**: 500–513.

L) **Slokar Y. M., Majcen Le Marechal, A.**, (1998), Methods of decoloration of textile wastewaters, *Dyes and Pigments* **37**: 335-356.

M) SOPHIED, accès en ligne le 6/11/2010, <http://www.sophied.net>.

N) **Sponza D.T.**, (2006), Toxicity studies in a chemical dye production industry in Turkey, *Journal of Hazardous Materials* **138**: 438-447.

O) **Suryavathi V., Subhasini S., Shweta S., Pratibha S., Shipra P., Ruby G., Suresh K., Sharma K.P.**, (2005), Acute toxicity of textile dye wastewaters (untreated and treated) of Sanganer on male reproductive systems of albino rats and mice, *Reproductive Toxicology* **19**: 547-556.

P) Teinture végétale. Accès en ligne janvier 2011. http://www.teinturevegetale.fr/rubrique.php3?id_rubrique=50

Q) **Tron T., Gaudin C., Lacazio G.**, Etude des relations structures-fonctions chez les laccases, LBS, accès en ligne le 15/12/2010, <http://www.lbs.fst.u-3mrs.fr/laccases-fr.html>.

R) **Trovaslet M., Enaud E., Naveau F., Decristoforo A., Bizet S., Vanhulle S., Jolival C.**, Laccase inhibition by chloride can be reduced by an anthraquinonic substrate. Poster. Université Catholique de Louvain, ParisTech.

S) **Vanhulle S., Enaud E., Trovaslet M., Billotet L., Kneipe L., Habib Jiwan J.L., Corbisier A.M., Marchand-Brynaert J.**, (2008), Coupling occurs before breakdown during biotransformation of Acid Blue 62 by white rot fungi, *Chemosphere* **70**: 1097-1107.

T) Wikipédia, l'encyclopédie libre. Accès en ligne janvier 2011. <http://fr.wikipedia.org/>

VIII) Annexes : Notes complémentaires :

Remarques générales

Le colorant « polluant » utilisé ici n'est pas réellement toxique, mais considéré comme tel dans le cadre de ce travail. Il présente une similarité structurale avec d'autres colorants utilisés dans l'industrie (colorants dits « anthraquinoniques ») et possède une particularité intéressante : sa dégradation passe par une première étape de transformation en un colorant rouge « azoïque », par action de l'enzyme laccase (sa dégradation complète semblant requérir d'autres enzymes du mycète). Le colorant rouge obtenu peut lui-même être fixé à un textile. Il a été testé et est aussi considéré comme non-toxique et non-mutagène. En fin d'expérience, mentionner que le colorant bleu utilisé n'était en réalité pas toxique mais que le mécanisme d'action de la laccase reste valable pour toute une famille de colorants (anthraquinones), dont beaucoup sont toxiques. Ce colorant est autorisé pour les teintures de cheveux. Malgré tout, se pose toujours le problème de la coloration au sein des cours d'eau, qui diminue le passage de la lumière et est donc délétère pour les algues et les microorganismes (cyannobactéries) qui dépendent de celle-ci.

Nous réaliserons ici uniquement la première étape de dégradation, c'est-à-dire la transformation d'un colorant bleu en un autre colorant, de couleur rouge, en utilisant une laccase purifiée. Il est également possible d'obtenir cette conversion du colorant bleu en colorant rouge à partir d'un filtrat brut (réalisé à partir d'une culture d'un mycète lignicole comme *Trametes versicolor* en milieu liquide). En ajoutant le colorant directement au milieu de culture, il est même possible d'obtenir une décoloration complète en 10 jours.

Projet SOPHIED

Le projet SOPHIED [M], établi sur 4 ans, rassemble et coordonne les recherches, analyses et tests pilotes de 7 universités, 3 centres de recherches et 16 PME à travers l'Europe (10 pays) Le budget total est de 9 655 200 euros, il est composé de fonds européens, nationaux et régionaux. Le projet est conduit par l'Université catholique de Louvain et une PME belge, Wetlands Engineering (Louvain-la-Neuve, Belgique).

Axé sur une approche biotechnologique, le cœur du projet couvre parallèlement 3 objectifs :

- Développer une nouvelle technologie de bioremédiation pour réduire la toxicité d'eaux industrielles colorées.

- Modifier des procédés de production de colorants pour les rendre plus respectueux de l'environnement et des travailleurs grâce à l'utilisation d'enzymes.

- Créer de nouveaux bio colorants moins toxiques et synthétisés par biotechnologie.

Définitions

Biotechnologie : application des principes scientifiques et de l'ingénierie à la transformation de matériaux par des agents biologiques pour produire des biens et services

Chimie verte : ensemble de principes qui ont pour but de réduire ou d'éliminer l'utilisation ou la génération de substances dangereuses émanant des processus de design, de fabrication et d'application de produits chimiques

Biorémédiation : utilisation de système biologique (micro-organismes ou plantes) pour dépolluer un milieu

Champignons de pourriture blanche (White Rot Fungi)

Champignon lignicole : champignon qui pousse sur le bois (écologie) -> peut se nourrir du bois en en se nourrissant des substances nutritives ou de réserve (comme l'amidon) des cellules vivantes ou fraîchement mortes, ou à partir des composants du bois

Champignon lignivore/lignolytique : transforme les composants du bois (mort ou vivant) en composés assimilables par le champignon -> dégrade la lignine (lignolyse), voire la cellulose

Pourriture blanche du bois (ou pourriture fibreuse) -> différents agents, ex : *Phanerochaete*, *Trametes versicolor* (deux Basidiomycètes de l'ordre des Polyporales)

Problématique des colorants

La synthèse de colorants azo intervient via diazotisation (formation d'un cation diazonium, avec une triple liaison entre deux N, à partir d'une amine aromatique ou hétérocyclique (N dans le cycle)), suivie d'un couplage azo (couplage avec un deuxième composé aromatique, donnant un lien azo) ; très peu d'exceptions existent.

La diazotisation d'une amine aromatique ou hétérocyclique est habituellement réalisée à 0°C, en présence de nitrite de sodium NaNO₂, et d'un excès d'acide minéral comme HCl, H₂SO₄ ou HBF₄. Ensuite, le couplage requiert un pH plus élevé.

=> - Danger pour les travailleurs : due à l'utilisation d'acides forts.

- Synthèse énergivore car nécessite le refroidissement en deçà de 5°C.

- Problème environnemental : de grandes quantités d'électrolytes sont produites pour la neutralisation du mélange réactionnel et la purification du colorant, et des rendements faibles peuvent mener à une coloration des effluents (10 à 40% du colorant employé !) [M].

Problème de pollution : colorants se retrouvant dans les eaux d'effluents absorbent et reflètent la lumière solaire, interférant avec les écosystèmes aquatiques (les cyanobactéries et algues ne peuvent plus photosynthétiser).

Il y a également des risques de toxicité [G]

Les traitements communs des eaux usées sont généralement ineffectifs contre les colorants synthétiques, conçus pour être résistants physiquement, chimiquement et à la dégradation microbienne [S].

Colorants

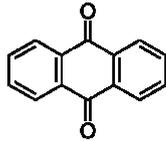
Un colorant est appelé « teinture » s'il est soluble dans le milieu qu'il colore ou « pigment » s'il est insoluble. Les colorants peuvent être utilisés dans l'industrie alimentaire, textile, ou cosmétique (teintures de cheveux)... On retrouve parmi les colorants alimentaires 3 sortes autorisés : les colorants naturels (ex : caroténoïdes), de synthèse fabriqués par l'industrie chimique (existent dans la nature, mais produits industriellement) et artificiels (qui n'ont pas d'équivalent dans la nature).

Colorants industriels :

Classés en dix grandes familles :

- nitro dérivés
- dérivés du triphénylméthane
- xanthéniques
- dérivés de l'acridine
- dérivés de la quinoléine

- **anthraquinoniques** -> les plus répandus après les colorants azoïques
- indigoïdes -> colorants des jeans -> avant, Estelle travaillait là-dessus (extraction des glycosydases de plants de pastel et de renouée des teinturiers)
- phtalocyanines -> pour les encres
- bases d'oxydation
- **azoïques** -> le plus grand groupe de colorants, en référence au nombre de structures chimiques différentes et au volume total de production. Ils sont utilisés de manière extensive dans la coloration textile et l'impression papier du fait de leur grande variété de couleurs [M,T].



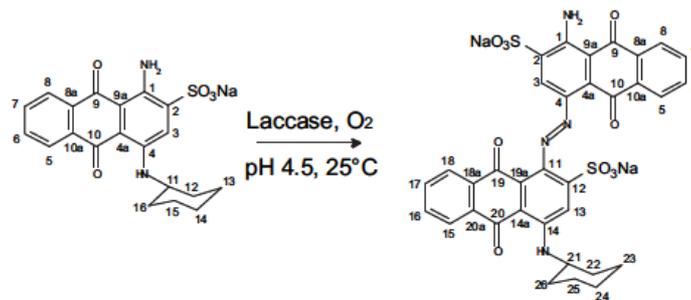
Anthraquinone :

Colorant azoïque : présence dans la structure d'un groupement azoïque N=N reliant deux noyaux benzéniques

Colorants dans notre travail :

- Colorant bleu : ABu62 (Acid Blue 62) : Colorant anthraquinonique (il en existe des mutagènes, dont une naturelle)

-> "acid" est lié à la façon dont le colorant se fixe au tissu. Il est autorisé pour les teintures de cheveux (=> niveau de toxicité suffisamment bas)



- Colorant rouge: LAR1 (Laccase Acid Red 1): Azoanthraquinone (colorant azoïque).
- > encore moins toxique que le colorant bleu (faible toxicité et faible écotoxicité démontrées) ; moins de coloration (diminution de 50 à 75% de l'aire sous la courbe du spectrophotomètre) car il faut deux molécules d'Abu62 pour former un LAR1 ; intérêt du composé azoïque pour l'industrie (potentiel de brevets).

En comparant LAR1 avec des colorants du commerce : un seul montre de meilleurs résultats dans tous les systèmes testés. Il montre des propriétés colorantes moyennes sur les textiles et semble prometteur dans l'industrie du cuir [M].

Textiles et teintures

Un tissu n'est rien d'autre qu'un assemblage de fibres, qui peuvent être d'origine :

- végétale : cellulosique (coton, chanvre, lin ...)
- animale : protéique (soie, laine ...)
- artificielle : synthétique (polyester, nylon ...),

Selon l'origine de la fibre, la réaction des pigments peut changer. On peut obtenir des teintes différentes sur un tissu de fibres cellulosiques ou protéiques. Quant aux fibres synthétiques, elles ne peuvent pas être teintées ; les pigments sont mélangés à chaud dans la cuve avant la formation des fibres [P].

Le colorant à mordant est un colorant appliqué sur un mordant selon un procédé appelé mordantage : le mordant est un sel métallique qui est fixé sur la fibre par un traitement préalable à la teinture. Le colorant se fixe sur ce sel au cours de la teinture ultérieure et forme ainsi un complexe très solide. Suivant le sel fixé, un colorant donné produira une nuance différente [T].

Couleur et spectrophotométrie

La couleur d'un objet correspond à la lumière qui se reflète sur cet objet (qui n'est pas absorbée). Ainsi, un objet rouge absorbe les couleurs bleues, vertes, jaunes... mais pas le rouge. Ainsi un objet blanc n'absorbe aucune lumière alors qu'un objet noir les absorbe toutes.

Spectre visible : Généralement, on considère que la réponse de l'œil couvre une gamme de longueurs d'ondes d'environ 400 à 700nm, correspondant respectivement aux extrêmes de violet et de rouge [T].

Si un composé absorbe une couleur, c'est la couleur complémentaire qui est transmise. Tous les colorants et tous les pigments sont des composés très conjugués (liaisons π délocalisées). Chaque double liaison conjuguée supplémentaire du système augmente la longueur d'onde de la lumière absorbée. S'il y a moins de huit doubles liaisons conjuguées, le composé absorbe dans l'ultraviolet, et nous ne percevons pas de la différence. Avec plus de huit doubles liaisons conjuguées, l'absorption glisse vers le visible et, lorsqu'on arrive à 11, le composé est rouge. Si nous voulions un composé bleu ou vert, nous devrions avoir un très grand nombre de doubles liaisons conjuguées et de tels pigments ne comportent pas uniquement des liaisons π . Des transitions entre orbitales π liantes et anti-liantes (transitions $\pi \rightarrow \pi^*$) peuvent également intervenir ; on peut facilement trouver par ce moyen des composés colorés couvrant tout le domaine des longueurs d'onde.

Longueurs d'onde approximatives des différentes couleurs

Fréquence absorbée, nm	Couleur absorbée	Couleur transmise	R(CH=CH) _n , n =
200-400	ultraviolet	—	< 8
400	violet	jaune-vert	8
425	bleu indigo	jaune	9
450	bleu	orange	10
490	bleu-vert	rouge	11
510	vert	pourpre	
530	jaune-vert	violet	
550	jaune	bleu indigo	
590	orange	bleu	
640	rouge	bleu-vert	
730	pourpre	vert	

(La dernière colonne donne la longueur approximative de la chaîne conjuguée qui donne la couleur en question ; le nombre n est le nombre de liaisons conjuguées) [B]

Le colorant bleu Abu62 présente deux pics d'absorption : 595 et 625nm.

Parmi les composés obtenus lors de la dégradation d'ABu62 par la laccase, le principal absorbe autour de 500 nm, expliquant la couleur rouge [S].

Spectrophotométrie : Lorsqu'une lumière d'intensité I_0 passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par le(s) soluté(s). L'intensité I de la lumière transmise est donc inférieure à I_0 . On définit l'absorbance de la solution comme :

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right)$$

L'absorbance est une valeur positive, sans unité. Elle est d'autant plus grande que l'intensité transmise est faible. La relation de **Beer-Lambert** décrit que, à une longueur d'onde λ donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à la concentration des espèces de la solution, et à la longueur du trajet optique (distance sur laquelle la lumière traverse la solution).

Alors, pour une solution limpide contenant une seule espèce absorbante : $A_\lambda = \epsilon_\lambda l c$,
où :

- A_λ est l'absorbance ou la densité optique (sans unité) de la solution pour une longueur d'onde λ
 - C (en mol/m³) est la concentration de l'espèce absorbante
 - l (en m) est la longueur du trajet optique
 - ϵ_λ (en mol⁻¹.m²) est le coefficient d'extinction molaire de l'espèce absorbante en solution. Il rend compte de la capacité de cette espèce à absorber la lumière, à la longueur d'onde λ
- Selon la loi de Beer-Lambert, l'absorbance est additive. Ainsi, pour une solution contenant plusieurs espèces absorbantes, l'absorbance de la solution est la somme de leurs absorbances.

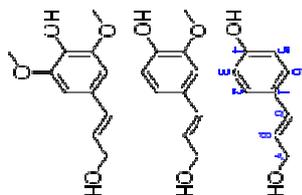
Le lien entre A_λ et C permet ensuite de connaître l'évolution temporelle de la concentration $C(t)$ de l'espèce colorée lors d'une transformation chimique à partir de l'évolution temporelle de l'absorbance $A_\lambda(t)$.

Une solution colorée absorbe certaines radiations du spectre de la lumière blanche. La couleur de la solution est la somme des radiations non absorbées $[C,T]$.

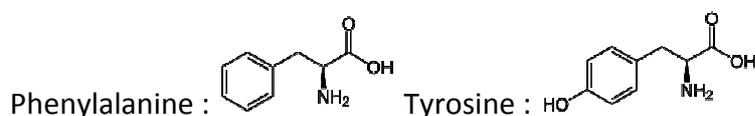
Lignine

La lignine est un des principaux composants du bois, avec la cellulose, l'hémicellulose et des matières extractibles. Ses principales fonctions sont d'apporter de la rigidité, une imperméabilité à l'eau et une grande résistance à la décomposition. Toutes les plantes vasculaires, ligneuses et herbacées, en forment.

C'est un polymère de monolignols. Le précurseur des monolignols est la phénylalanine. La synthèse comprend une série d'étapes impliquant des méthyl-transférases, puis une peroxydase agit sur les monolignols pour former la lignine (couplage de deux radicaux) ; la laccase elle-même interviendrait aussi dans la synthèse de la lignine !



Monolignols (exemples) :



[T]

Laccase

Différentes enzymes sont capables de dégrader la lignine : lignine peroxydases (lignases), peroxydases à manganèse, laccase [J].

Les laccases sont présentes dans les plantes, dans de très nombreux champignons (dégradation de la lignine) ainsi que dans quelques bactéries (NB : le mécanisme d'action est différent).

Les laccases sont des oxydases (ou oxygénases), capables d'oxyder une large variété de composés organiques, pour donner des réactions de déméthylation sur des O ou N, des clivages de liens C-C ou des polymérisations. Elles requièrent de l'oxygène comme accepteur d'électrons, formant de l'eau au cours de la réaction [M]. Capables d'oxyder les polyphénols (groupement aromatique avec plusieurs hydroxyles), elles sont donc indispensables pour métaboliser les produits de dégradation de la lignine [J].

D'après les structures connues de laccases, le site actif est constitué de 4 atomes de cuivre, un isolé, responsable de l'oxydation du substrat, et un groupe de 3 cuivres responsable de l'activation du dioxygène. Le mécanisme d'action des laccases reste mal connu.

La dégradation de la lignine commencerait par l'action d'une première enzyme, une tyrosinase (enzyme qui catalyse l'oxydation des phénols, comme la tyrosine), qui donne un diphenol (deux -OH sur le cycle aromatique) à partir d'un phénol. Il serait alors transformé, soit par une tyrosinase soit par une laccase, en une ortho-quinone (deux carbonyles =O sur le cycle aromatique). La deuxième réaction donne ceci :



Au cours du processus, on a arrachage d'un électron (et d'un proton) à un premier OH pour donner un oxygène radicalaire, formation du =O, puis résonnance et arrachage d'un deuxième électron (et d'un proton) au niveau du -OH restant, donnant à nouveau un =O. A chaque fois, un électron est arraché au substrat par le cuivre isolé et transféré aux autres. Quand tous les cuivres sont chargés + (au lieu de 2+), quatre électrons sont transférés à un (réduction de) O₂, qui donne avec quatre protons deux molécules d'eau.

On a donc génération de radicaux libres par la laccase au cours du processus.

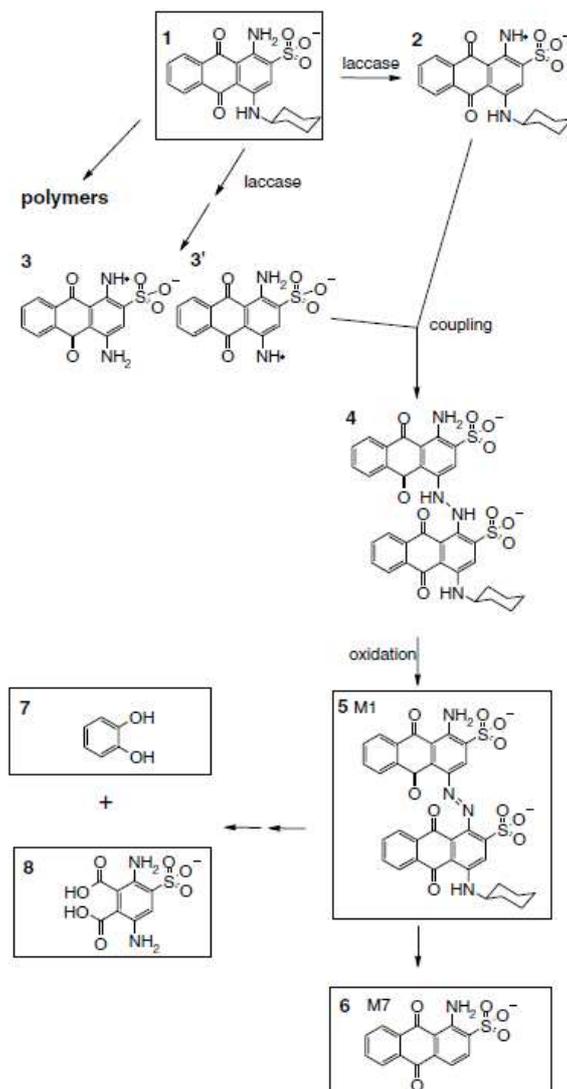


Fig. 4. Suggested biotransformation pathway during decolourisation of ABu62 by *Pycnoporus sanguineus* MUCL 41582.

La laccase est peu spécifique, et peut arracher un électron au niveau d'un hydroxyle (lignine) ou d'une amine (-NH₂ ; colorant).

On a formation d'un lien azo N=N, et perte d'un groupement cyclohexyl suite à la conjugaison de deux radicaux obtenus par action de la laccase.

1 : anthraquinone ABu62

5 : colorant azoïque Laccase Acid Red 1

Un problème des laccases est leur manque de spécificité : l'enzyme peut réutiliser son produit comme substrat. Mais pour notre colorant rouge, elle n'y touche plus [F].

Problème : Inhibition par les chlorures (l'enzyme va moins vite), or on retrouve des sels dans les effluents de par le procédé de fixation des colorants (jusqu'à 1M NaCl !!). L'inhibition pourrait être due à l'interaction d'un ion chlorure avec le premier cuivre, empêchant par conséquent l'arrachage d'électron au substrat => si on cherche à modifier l'enzyme pour empêcher ça, c'est par là qu'il faut jouer ; l'inhibition dépend du colorant. On peut aussi chercher dans la nature après des enzymes naturellement plus résistantes aux sels, chez des champignons halophiles (dans les mangroves, par exemple) [F,R,S].

Autres utilisations des laccases

Les laccases peuvent également être utilisées pour la biorémédiation d'autres composés (hydrocarbures aromatiques polycycliques, tels que le TNT), mais possèdent aussi d'autres applications possibles : dans l'industrie du papier (blanchiment : on ne veut garder que les fibres cellulosiques -> utilisation de champignons lignivores qui ne touchent pas à la cellulose), utilisation potentielle dans la synthèse de polymères ou de molécules d'intérêt pharmacologique [K].

Autres perspectives :

- tester la dégradation d'autres colorants ; cela peut donner d'autres intermédiaires de dégradation intéressants pour la coloration.
- synthèse de nouveaux colorants : placer des fonctions particulières sur un composé (grosse chimie) pour qu'il puisse se faire oxyder par la laccase -> pour la facilité de fixation au substrat des composés azo.

Les laccases sont disponibles à faible coût et peuvent être sécrétées en grandes quantités par certains champignons sous induction. Les bioprocessus sont habituellement moins énergivores, requièrent moins de matières premières et pas de réactifs supplémentaires ; ils permettent d'atteindre des rendements supérieurs et sont généralement plus sélectifs. Pour éviter les coûts, il est possible d'immobiliser la laccase sur un « porteur » à faible coût (ex : Perlite).

La coloration in situ du coton et de fibres kératineuses est en étude. Les laccases sont également impliquées naturellement dans la coloration des champignons. Quelques études récentes cherchent à développer des réactions de synthèse de colorants alimentaires catalysés par laccase.

Les laccases étant capables d'oxyder des composés aromatiques variés, elles ont le potentiel pour plusieurs applications comme :

- la modification des fibres de bois dans l'industrie de la pulpe à papier (processus 'Lignozym®')
- la chimie verte organique
- la biorémédiation des eaux et sols

- le blanchiment de textiles ; Un processus de blanchiment de tissus colorés à l'indigo par laccase est déjà commercialisé **[M]**

Les nombreux usages industriels et médicaux des champignons

Bio-dépollution :

- recyclage non polluant des matières plastiques en particulier
- recyclage des Compact-Disques usagés
- blanchiment non-polluant des pâtes à papier (délignification)
- élimination non polluante des colorants industriels
- élimination non polluante des pesticides et autres composés phénolés hautement toxiques
- élimination non polluante des dioxines
- absorption dépolluante des métaux lourds hautement toxiques

Industries chimiques "durables" : bio-catalyse de la polymérisation des résines & matières plastiques

Energies renouvelables : conversion en bio-carburants des cellulose & lignine issues des pailles céréalières & bagasses de canne à sucre

Médecine :

- création des molécules antibiotiques (anti-bactériens)
- création d'anti-virus et anti-rétrovirus (HIV)
- création de molécules anti-tumorales
- création de molécules anti-rejet des greffes d'organes (immuno-régulatrices) **[H]**



Dossier pour l'élève

Nom :

Prénom :

Printemps des sciences 2011 : Matières et matériaux

Université catholique de Louvain



« La chimie du vert » ou comment allier
industrie des couleurs et écologie ?

novel sustainable bioprocess
for european

COLOUR

industries

science
UCL infuse



BATAILLE Gwenaël
COSTER Quentin
GILET Monique
ROBISE Aurélie

Année académique 2010-2011

Lors d'une de tes ballades le long d'une rivière que tu connais bien, tu remarques que l'eau habituellement limpide a pris une coloration bleu marine. Remontant le cours d'eau, tu t'aperçois alors qu'une usine, « Color Textil Plus », s'est implantée à proximité et est à l'origine du rejet. Il s'agit d'une usine spécialisée dans la production et l'utilisation de colorants textiles.

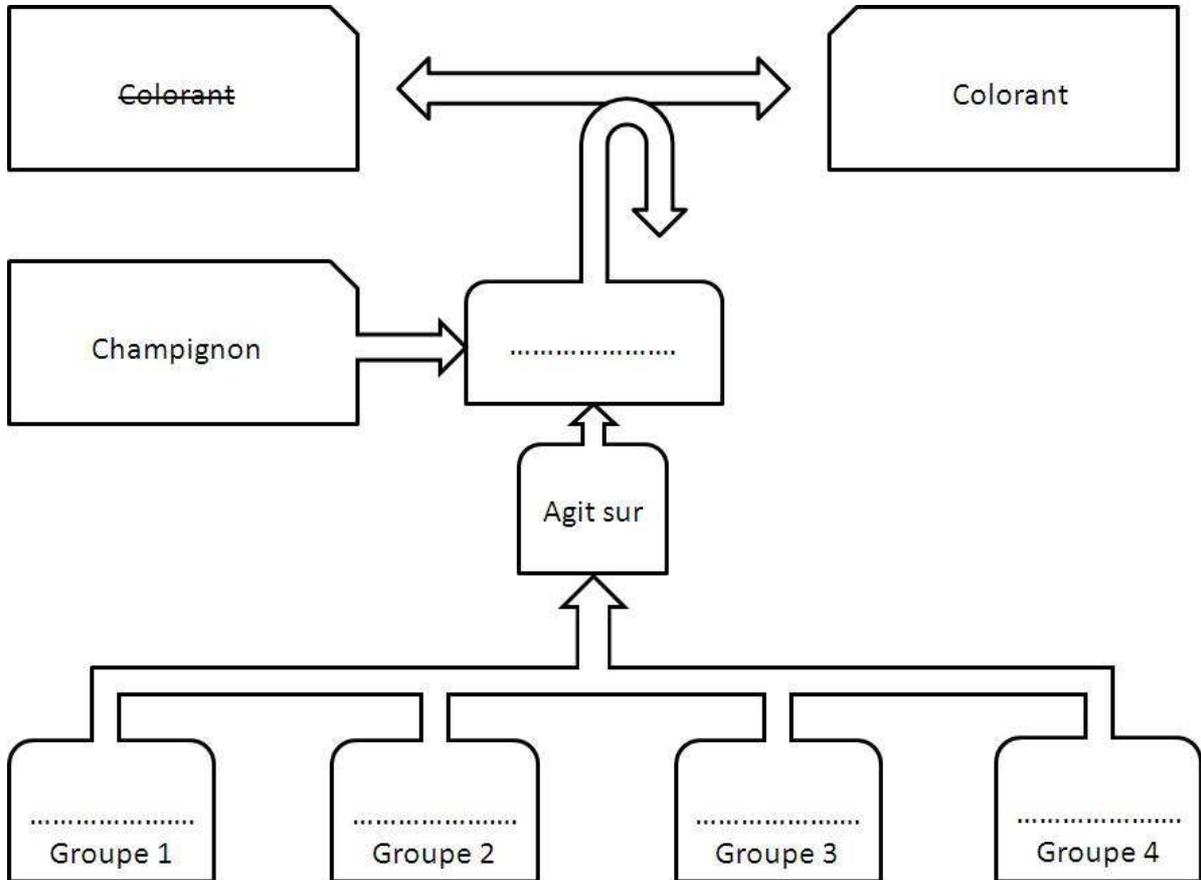


Les méthodes actuelles de synthèse des colorants textiles sont énergivores, grandes consommatrices d'eau et utilisent des composés dangereux pour les ouvriers. De plus, après fixation au textile, on retrouve une partie des colorants employés dans les eaux de rejets, la majorité d'entre eux étant toxiques pour la santé humaine et l'environnement. Actuellement, les industries font de gros efforts pour diminuer leur empreinte écologique, c'est-à-dire leur impact sur l'environnement.

Quelles pourraient être les pistes pour supprimer cette toxicité en respectant la santé et l'environnement ?



Pour situer les idées...



Expérience : Quels sont les facteurs susceptibles d'influencer l'action de la laccase ?

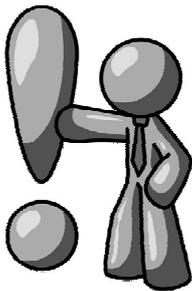


Comme tu viens de l'apprendre, la laccase est une enzyme de champignon lignicole qui aurait la capacité de dégrader des colorants synthétiques ou d'en permettre la formation de nouveaux.

Cette enzyme semble intéressante pour pouvoir remédier aux problèmes sanitaires et écologiques des industries textiles. Mais, une enzyme est une « machine » exigeante dont l'efficacité varie en fonction de différents paramètres...

Donc, afin de savoir dans quelles conditions elle « fonctionnerait » le mieux, tu décides de réaliser des expériences pour tester l'efficacité de la laccase.

Pour chaque expérience tu pourras suivre l'évolution visuellement et au moyen d'un spectrophotomètre.



- Si tu testes **la température**, rendez-vous en page **4**
- Si tu testes **l'acidité**, rendez-vous en page **7**
- Si tu testes **les concentrations en sels**, rendez-vous en page **10**
- Si tu testes **les concentrations en enzymes**, rendez-vous en page **13**



ATTENTION : N'OUBLIE PAS DE PORTER DES GANTS ET UN TABLIER POUR TOUTES TES EXPERIENCES !

Utilisation du spectrophotomètre :

- Les mesures au spectrophotomètre se feront à une longueur d'onde de 595nm.
- Avant chaque mesure, le spectrophotomètre doit être calibré à l'aide d'une cuvette contenant du mélange tampon.
- Attention à ne pas poser les doigts sur les surfaces de la cuvette devant servir à la mesure.



La laccase et la température

L'activité d'une enzyme est influencée par la température. Serait-ce également le cas pour la laccase du champignon ? **Avant de commencer l'expérience, lis attentivement les différentes étapes qui sont décrites ci-dessous.**

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Température	1°C	25°C	45°C
Tampon (pH 4.5)	6ml	6ml	6ml
Colorant	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	4ml	4ml	4ml
STOP	STOP	STOP	STOP
Laccase (2,5UI /ml)	1ml	1ml	1ml

✓ E
t
a
p
e

1 : Dans chacun des tubes à essai 1, 2 et 3, ajoute successivement, à l'aide d'une pipette Pasteur, le tampon, le colorant et l'eau distillée comme indiqué dans le tableau ci-dessus. **Attention, n'ajoute pas encore l'enzyme !**

✓ **Etape 2 :**

- Place le tube n°1 dans de la glace pilée (+/- 1°C)
- Fixe le tube n°3 dans un bain-marie à 45°C
- Laisse le tube n°2 à température ambiante (+/- 25°C)
- calibre le spectrophotomètre avec une cuvette remplie de 3ml de la solution tampon (cuvette B).

✓ **Etape 3 :** Prépare 12 cuvettes numérotées de 1 à 12 et ajoute-y 1,5 ml d'eau distillée

✓ **Etape 4 :** Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°1

✓ **Etape 5 :** Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.

➤ **Etape 6 :** Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 1,5 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°1. Essuie la **condensation** qui pourrait se former sur la cuvette !

✓ **Etape 7 :** Place cette cuvette dans le spectrophotomètre, démarre le chronomètre et note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, au temps « 0 » pour le tube 1.

Pour le tube 1, répète les étapes 6 à 7 toutes les 3 minutes en changeant à chaque fois de cuvette (n°1 → n°4) et en notant les valeurs aux temps correspondants. Attention, avant chaque mesure, tu dois **re-calibrer le spectrophotomètre** avec la cuvette B !

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube 1 :

- ✓ **Etape 8** : Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°2
- ✓ **Etape 9** : Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.
- ✓ **Etape 10** : Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 1,5 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°5
- ✓ **Etape 11** : Calibre le spectrophotomètre et place y ensuite la cuvette n°5 :
 - Note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, pour le tube n°2
 - Note le temps indiqué par le chronomètre dans la colonne de gauche
 - Remplis le reste de cette colonne en ajoutant 3 minutes à chaque fois

Pour le tube 2, répète les étapes 10 à 11, toutes les 3 minutes en changeant à chaque fois de cuvette (n°5 → n°8) et en notant les valeurs aux temps correspondants.

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube n°2, répète les étapes 8 à 11 pour le tube n°3 en utilisant les cuvettes appropriées (n°9 → n°12).

Mesures

Temps (min)	Tube 1	Temps (min)	Tube 2	Temps (min)	Tube 3
0					
3					
6					
9					

Observations

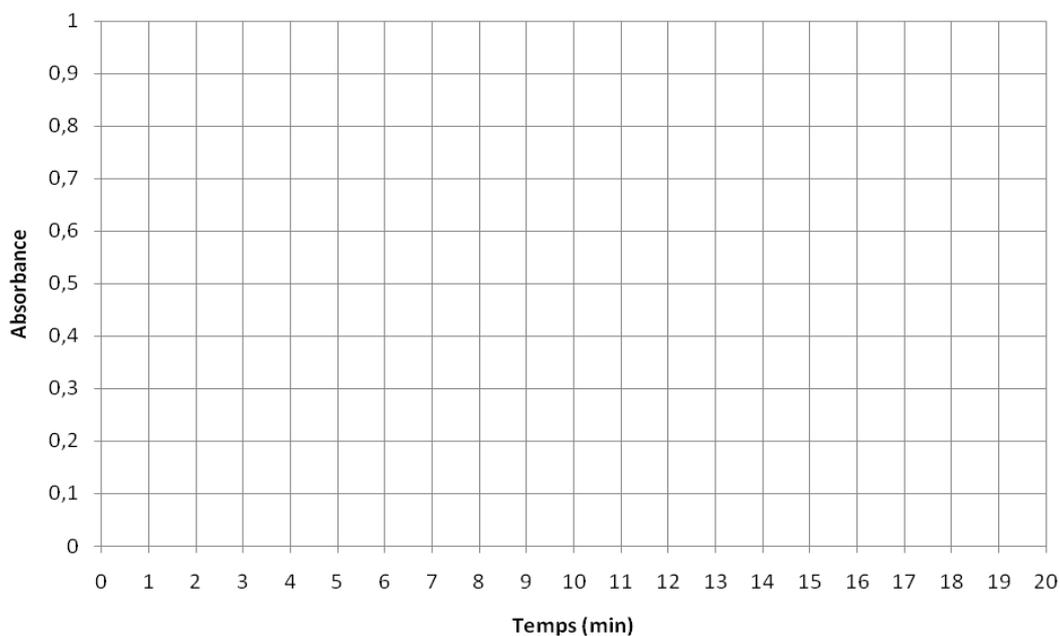
Que se passe-t-il au niveau de la couleur de la solution ? A quel moment ?

.....

Résultats



Utilise les valeurs du tableau pour tracer trois courbes dans le graphique ci-dessous. Indique sur chaque courbe le moment de la décoloration :

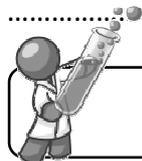


Interprétations

A ton avis, quelle est l'influence de la température sur la vitesse de la réaction ?

.....

.....



La laccase et l'acidité

Les champignons étudiés sont considérés comme étant acidophiles. Mais la laccase est-elle plus efficace en conditions acides ? **Avant de commencer l'expérience, lis attentivement les différentes étapes qui sont décrites ci-dessous.**

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon	6ml (pH 7)	6ml (pH 3)	6ml (pH 4,5)
Colorant	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	4ml	4ml	4ml
STOP	STOP	STOP	STOP
Laccase(2,5UI/ml)	1ml	1ml	1ml

- ✓ **Etape 1 :** Dans chacun des tubes à essai 1, 2 et 3, ajoute successivement, à l'aide d'une pipette Pasteur, le tampon, le colorant et l'eau distillée comme indiqué dans le tableau ci-dessus. **Attention, n'ajoute pas encore l'enzyme !**

- ✓ **Etape 2 :**
 - Calibre le spectrophotomètre avec une cuvette remplie de 3ml de la solution tampon (cuvette B)

- ✓ **Etape 3 :** Prépare 3 cuvettes numérotées de 1 à 3

- ✓ **Etape 4 :** Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°1

- ✓ **Etape 5 :** Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.

- **Etape 6 :** Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 3 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°1.

- ✓ **Etape 7 :** Place cette cuvette dans le spectrophotomètre, démarre le chronomètre et note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, au temps « 0 » pour le tube 1.

Pour la cuvette n°1, répète l'étape 7 toutes les 3 minutes en notant les valeurs aux temps correspondants. Attention, avant chaque mesure, tu dois **re-calibrer le spectrophotomètre** avec la cuvette B !

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube 1 :

- ✓ **Etape 8** : Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°2
- ✓ **Etape 9** : Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.
- ✓ **Etape 10** : Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 3 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°2
- ✓ **Etape 11** : Calibre le spectrophotomètre et place y ensuite la cuvette n°2 :
 - Note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, pour le tube n°2
 - Note le temps indiqué par le chronomètre dans la colonne de gauche
 - Remplis le reste de cette colonne en ajoutant 3 minutes à chaque fois

Pour la cuvette n°2, répète l'étape 11 toutes les 3 minutes en notant les valeurs aux temps correspondants.

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube n°2, répète les étapes 8 à 11 pour le tube n°3 en utilisant la cuvette n°3. Des mesures seront aussi effectuées toutes les 3 minutes pour cette cuvette.

Dès que les trois cuvettes sont prêtes pour le spectrophotomètre, rendez-vous en page 16 pour un des membres du groupe.

Mesures

Temps (min)	Tube 1	Temps (min)	Tube 2	Temps (min)	Tube 3
0					
3					
6					
9					

Observations

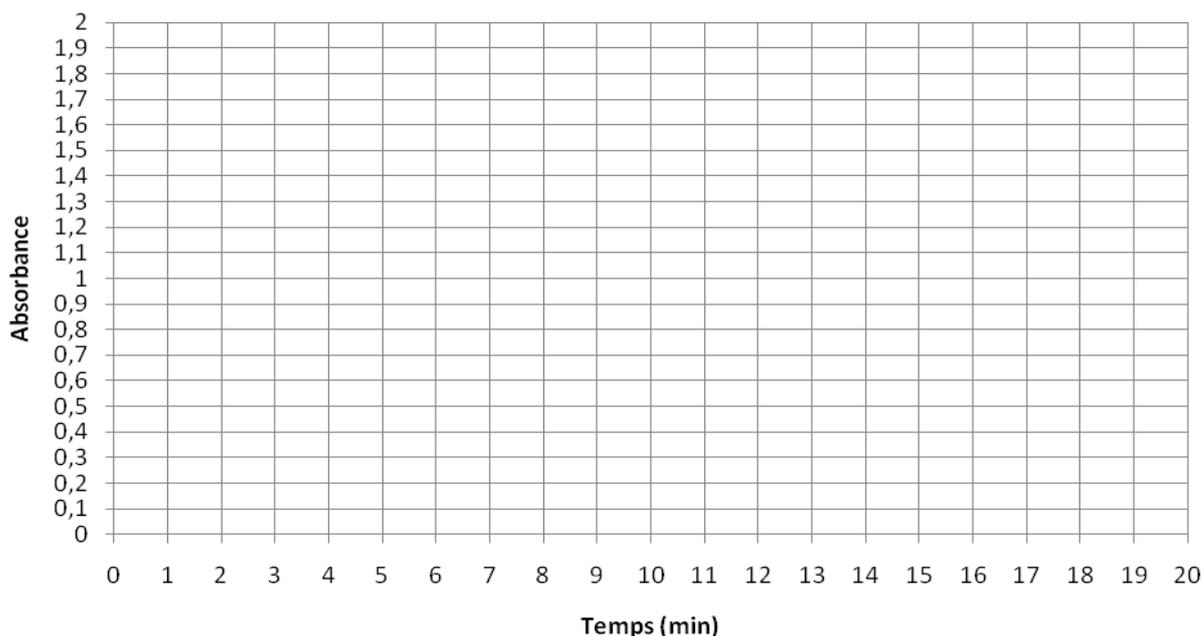
Que se passe-t-il au niveau de la couleur de la solution ? A quel moment ?

.....

Résultats



Utilise les valeurs du tableau pour tracer trois courbes dans le graphique ci-dessous. Indique sur chaque courbe le moment de la décoloration :



Interprétations

A ton avis, quelle est l'influence de l'acidité sur la vitesse de la réaction ?

.....

.....



La laccase et le sel

Afin de fixer le colorant au textile, il faut souvent ajouter du sel. Tu as d'ailleurs à ta disposition le mode d'emploi d'une coloration textile « maison » qui illustre cela. Le sel peut-il influencer l'action de la laccase ? **Avant de commencer l'expérience, lis attentivement les différentes étapes qui sont décrites ci-dessous.**

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon (pH 4.5)	6ml	6ml	6ml
Colorant	1ml	1ml	1ml
Solution saline	4ml (300mM)	4ml (30mM)	/
Eau distillée	/	/	4ml
STOP	STOP	STOP	STOP
Laccase(2,5UI/ml)	1ml	1ml	1ml

- ✓ **Etape 1 :** Dans chacun des tubes à essai 1, 2 et 3, ajoute successivement, à l'aide d'une pipette Pasteur, le tampon, le colorant, la solution saline et l'eau distillée comme indiqué dans le tableau ci-dessus. **Attention, n'ajoute pas encore l'enzyme !**

- ✓ **Etape 2 :**
 - Calibre le spectrophotomètre avec une cuvette remplie de 3ml de la solution tampon (cuvette B)

- ✓ **Etape 3 :** Prépare 3 cuvettes numérotées de 1 à 3

- ✓ **Etape 4 :** Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°1

- ✓ **Etape 5 :** Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.

- **Etape 6 :** Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 3 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°1.

- ✓ **Etape 7 :** Place cette cuvette dans le spectrophotomètre, démarre le chronomètre et note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, au temps « 0 » pour le tube 1. Pour la cuvette n°1, répète l'étape 7 toutes les 3 minutes en notant les valeurs aux temps correspondants. Attention, avant chaque mesure, tu dois **re-calibrer le spectrophotomètre** avec la cuvette B !

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube 1 :

- ✓ **Etape 8** : Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°2
- ✓ **Etape 9** : Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.
- ✓ **Etape 10** : Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 3 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°2
- ✓ **Etape 11** : Calibre le spectrophotomètre et place y ensuite la cuvette n°2 :
 - Note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, pour le tube n°2
 - Note le temps indiqué par le chronomètre dans la colonne de gauche
 - Remplis le reste de cette colonne en ajoutant 3 minutes à chaque fois

Pour la cuvette n°2, répète l'étape 11 toutes les 3 minutes en notant les valeurs aux temps correspondants.

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube n°2, répète les étapes 8 à 11 pour le tube n°3 en utilisant la cuvette n°3. Des mesures seront aussi effectuées toutes les 3 minutes pour cette cuvette.

Dès que les trois cuvettes sont prêtes pour le spectrophotomètre, rendez-vous en page 16 pour un des membres du groupe.

Mesures

Temps (min)	Tube 1	Temps (min)	Tube 2	Temps (min)	Tube 3
0					
3					
6					
9					

Observations

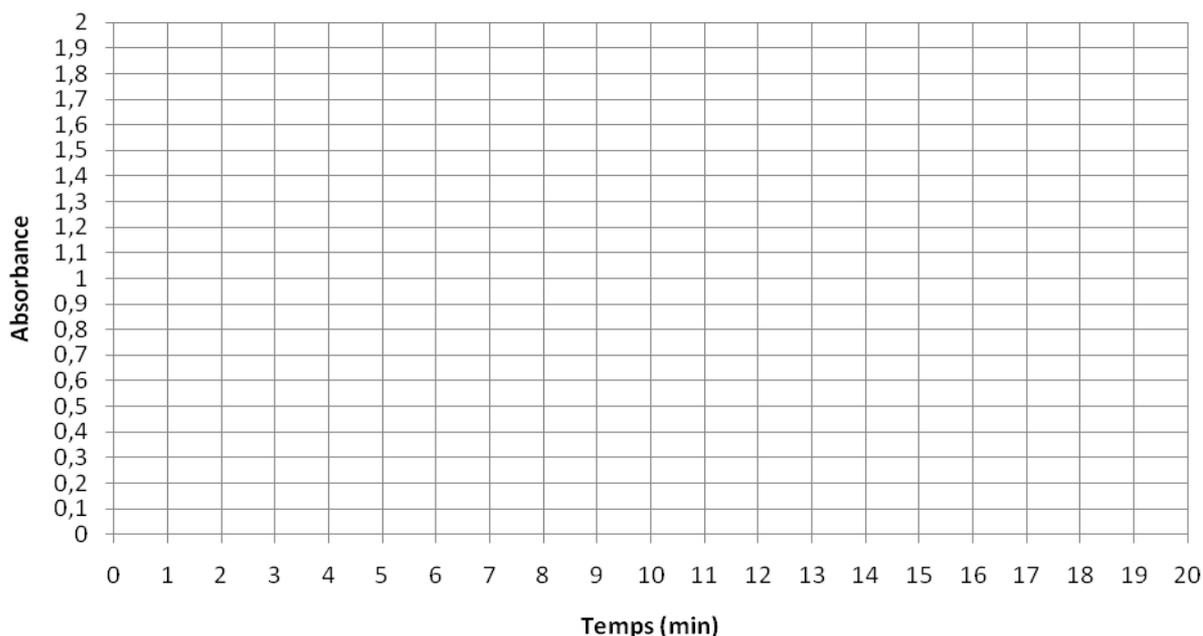
Que se passe-t-il au niveau de la couleur de la solution ? A quel moment ?

.....

Résultats



Utilise les valeurs du tableau pour tracer trois courbes dans le graphique ci-dessous. Indique sur chaque courbe le moment de la décoloration :



Interprétations

A ton avis, quelle est l'influence de la présence de sel sur la vitesse de la réaction ?

.....

.....



Variation de la quantité de laccase

Faire varier la quantité de laccase (et donc, le rapport laccase/colorant) influence-t-il son efficacité ? **Avant de commencer l'expérience, lis attentivement les différentes étapes qui sont décrites ci-dessous.**

	Tube 1	Tube 2	Tube 3
Tampon (pH 4.5)	6ml	6ml	6ml
Colorant	1ml	1ml	1ml
Eau distillée	4,5ml	4ml	0ml
STOP	STOP	STOP	STOP
Laccase(2,5UI/ml)	0,5ml	1ml	5ml

- ✓ **Etape 1 :** Dans chacun des tubes à essai 1, 2 et 3, ajoute successivement, à l'aide d'une pipette Pasteur, le tampon, le colorant et l'eau distillée comme indiqué dans le tableau ci-dessus. **Attention, n'ajoute pas encore l'enzyme !**

- ✓ **Etape 2 :**
 - Calibre le spectrophotomètre avec une cuvette remplie de 3ml de la solution tampon (cuvette B)

- ✓ **Etape 3 :** Prépare 3 cuvettes numérotées de 1 à 3

- ✓ **Etape 4 :** Ajoute 0,5ml de laccase dans le tube n°1

- ✓ **Etape 5 :** Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.

- **Etape 6 :** Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 3 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°1.

- ✓ **Etape 7 :** Place cette cuvette dans le spectrophotomètre, démarre le chronomètre et note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, au temps « 0 » pour le tube 1. Pour la cuvette n°1, répète l'étape 7 toutes les 3 minutes en notant les valeurs aux temps correspondants. Attention, avant chaque mesure, tu dois **re-calibrer le spectrophotomètre** avec la cuvette B !

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube 1 :

- ✓ **Etape 8** : Ajoute 1ml de laccase dans le tube n°2
- ✓ **Etape 9** : Place à l'extrémité de ce tube un morceau de Parafilm maintenu fermement avec l'extrémité du doigt et mélange le contenu du tube en l'inversant doucement.
- ✓ **Etape 10** : Prélève, au moyen d'une pipette Pasteur, 3 ml du tube et verse-le dans la cuvette n°2
- ✓ **Etape 11** : Calibre le spectrophotomètre et place y ensuite la cuvette n°2 :
 - Note la valeur indiquée dans le tableau ci-dessous, pour le tube n°2
 - Note le temps indiqué par le chronomètre dans la colonne de gauche
 - Remplis le reste de cette colonne en ajoutant 3 minutes à chaque fois

Pour la cuvette n°2, répète l'étape 11 toutes les 3 minutes en notant les valeurs aux temps correspondants.

Dès que tu as effectué la première mesure pour le tube n°2, répète les étapes 8 à 11 pour le tube n°3 en ajoutant cette fois **5ml** de laccase et en utilisant la cuvette n°3. Des mesures seront aussi effectuées toutes les 3 minutes pour cette cuvette.

Dès que les trois cuvettes sont prêtes pour le spectrophotomètre, rendez-vous en page 16 pour un des membres du groupe.

Mesures

Temps (min)	Tube 1	Temps (min)	Tube 2	Temps (min)	Tube 3
0					
3					
6					
9					

Observations

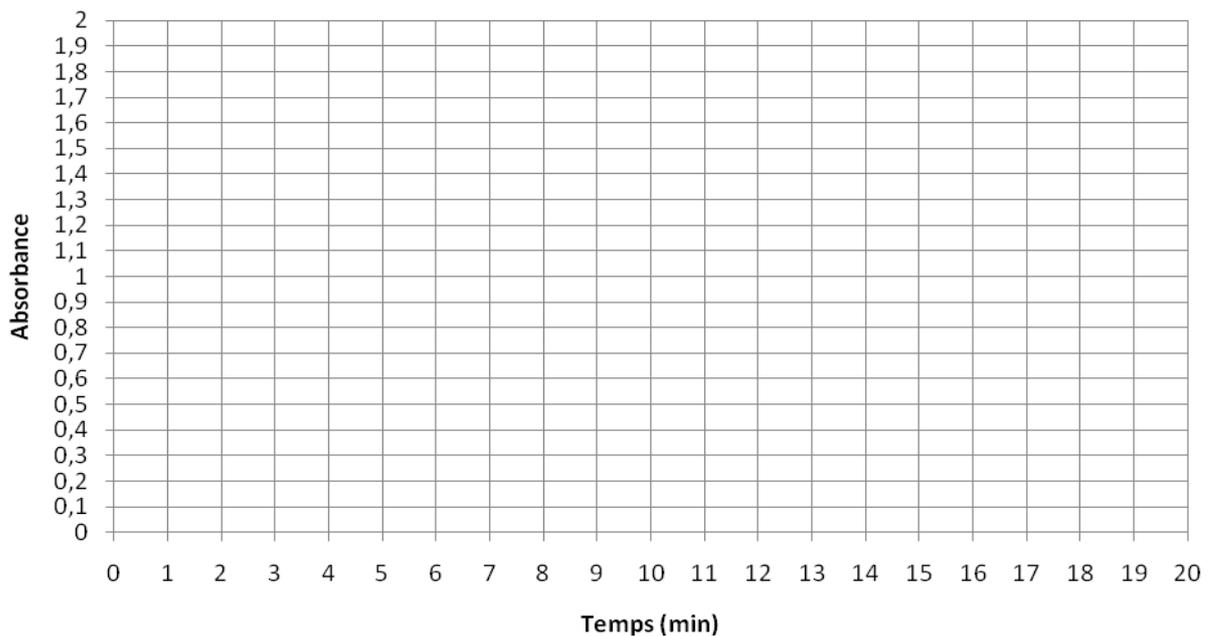
Que se passe-t-il au niveau de la couleur de la solution ? A quel moment ?

.....

Résultats



Utilise les valeurs du tableau pour tracer trois courbes dans le graphique ci-dessous. Indique sur chaque courbe le moment de la décoloration :



Interprétations

A ton avis, quelle est l'influence de la quantité de laccase sur la vitesse de la réaction ?

.....

.....



Fixation de colorants à un textile

- ✓ **Etape 1 :** Verse dans le tube à essai numéro 4 : 2 ml de tampon, 2 ml de colorant (0,5 g/L), 1 ml de laccase (non diluée (100 UI/ml)). Attends la stabilisation de la couleur avant de passer à l'étape 3 ou 4 pour ce tube.
- ✓ **Etape 2 :** Verse dans le tube à essai numéro 5 : 2ml du colorant bleu de départ (0,5g/l) et 3ml d'eau distillée.
- ✓ **Etape 3 :** Si tu es dans le groupe étudiant l'influence du sel, ajoute du sel de cuisine (NaCl ; une petite cuillère à café) dans les tubes 4 et 5 et mélange le contenu de chacun des tubes à l'aide d'une baguette en bois (pic à brochette).
- ✓ **Etape 4 :** Trempe l'extrémité de 2 fils de laines différentes à l'intérieur des tubes.
- ✓ **Etape 5 :** Place les 2 tubes à essai au bain-marie (fixé à 40-60°C) pendant 2 min.
- ✓ **Etape 6 :** Sort les fils de laine, note leur coloration, et rince-les dans un bécher rempli d'eau. Laisse-les sécher sur du papier absorbant. Qu'observes-tu ?



Observations au microscope

Observe des hyphes (filaments constituant le mycélium du champignon) de champignons lignicoles au microscope et réalise un schéma de ce que tu observes :



Observe des fils de laine colorés. Que remarques-tu ?

.....
.....



Synthèse

En t'aidant de tes résultats et de ceux obtenus dans les autres groupes, complète le tableau ci-dessous. Indique -, +, ++ ou +++ en fonction de l'efficacité de la réaction.

Température			Acidité (pH)		
1°C	25°C	45°C	7	3	4,5
Quantité d'enzyme			Concentration en sel		
0,5 ml	1 ml	5 ml	300 mM	30 mM	0 mM

Quelles conclusions en déduis-tu ? Dans quelles conditions travaillerais-tu si tu devais employer toi-même de la laccase pour la biodégradation d'un colorant ?

.....
.....
.....

Outre la biodégradation de colorants, quelle peut être une autre utilité de la laccase dans l'industrie des colorants ?

.....