

## **AVIS DE SOUTENANCE DE THESE**

**Madame Fangfang YANG** est autorisé(e) à présenter ses travaux en vue de l'obtention du diplôme national de DOCTORAT délivré par l'école CENTRALE MARSEILLE

**Le 19 octobre 2021, à 9h00**

à : Amphi INSPE, faculté Saint Jérôme,  
52 Avenue Escadrille Normandie Niemen, 13013 Marseille

Titre: **Développement ciblé de systèmes hybrides supportés à base de laccase pour la catalyse en flux continu**

Ecole doctorale : ED 250 Sciences Chimiques

Spécialité : Sciences Chimiques

Rapporteurs :

Madame Belen ALBELA, Maitre de Conférences, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.  
Monsieur Nicolas MANO, Directeur de Recherche CNRS, Univ. Bordeaux, CRPP, France.

Membres du Jury

Madame Belen ALBELA, Maitre de Conférences, Ecole Normale Supérieure de Lyon, France.  
Monsieur Nicolas MANO, Directeur de Recherche CNRS, Univ. Bordeaux, CRPP, France.  
Madame Yasmina MEKMOUCHE, Chargée de recherche, Aix-Marseille Université, France.  
Madame Ling PENG, Directeur de recherche, Aix-Marseille Université, France.  
Monsieur Thierry TRON, Directeur de Recherche, Aix-Marseille Université, France.  
Madame Laurence HECQUET, Professeur, Université Clermont Auvergne, France.

Résumé :

Les catalyseurs hétérogènes sont aujourd'hui largement développés afin d'obtenir une meilleure stabilité, une meilleure réutilisation ainsi qu'une meilleure localisation. Dans cette optique, nous avons d'abord préparé des catalyseurs hétérogènes à base d'enzymes par l'immobilisation d'une laccase d'origine fongique contenant seulement deux lysines de surface spatialement proches ( $K_{40}$ ,  $K_{71}$ ) ainsi que deux de ses variants contenant une lysine unique -une située à proximité du site d'oxydation du substrat ( $K_{157}$ ) et une à l'opposé de ce site d'oxydation ( $K_{71}$ )- dans des mousses de silice de type Si(HIPE) à porosités contrôlées. L'immobilisation a été réalisée par liaison covalente entre l'enzyme et la mousse activée à faible teneur en glutaraldéhyde. En testant la décoloration de colorants dans un réacteur à flux continu, nous montrons que l'activité du catalyseur hétérogène est comparable à son homologue homogène. Son activité opérationnelle reste aussi élevée que 60 % après douze cycles de décoloration consécutifs et un an de stockage. Plus important encore, en comparant les activités sur différents substrats pour des catalyseurs orientés différemment, nous montrons une discrimination double pour l'ABTS par rapport à l'ascorbate. Par ailleurs, les métalloenzymes artificielles peuvent utiliser les avantages des catalyseurs métalliques et enzymatiques pour réaliser une oxydation aérobie de manière durable. Nous avons donc immobilisé un complexe Pd(II) à base de biquinoline et une laccase dans des monolithes de silice pour l'oxydation de l'alcool veratrylique. Afin de contrôler la réactivité, trois

méthodes d'immobilisation ont été utilisées pour la construction de ces catalyseurs hybrides hétérogènes.



Les catalyseurs hybrides immobilisés présentent une activité améliorée par rapport au complexe de Pd immobilisé seul pour chaque méthode testée, attestant de la synergie entre le Pd et la laccase. En modulant l'orientation de l'enzyme vers le complexe de Pd(II) et la mousse de silice, nous montrons que l'activité de l'hybride de Pd(II)/UNIK<sub>157</sub> est en moyenne deux fois plus importante que celle de Pd(II)/UNIK<sub>71</sub>. Une bonne stabilité et réutilisation est observée quel que soit l'orientation de l'enzyme. Cette étude donne un aperçu de l'utilisation de supports solides qui au-delà de permettre la stabilité et la réutilisation deviennent des partenaires synergiques dans le processus catalytique.

Mots clés : Métalloenzyme artificiel, catalyseur hétérogène, palladium, laccase, oxydation aérobie, alcool veratrylique, décoloration de colorants.

#### Abstract:

Heterogeneous catalysts are now widely developed to obtain improved stability, reusability, and localization. In this view, we first prepared the enzyme-based heterogeneous catalysts by the immobilization of a fungal laccase containing only two spatially close surface lysines (K<sub>40</sub>, K<sub>71</sub>) and its variants containing a unique lysine -one located in the vicinity of the substrate oxidation site (K<sub>157</sub>) and one at the opposite side of this oxidation site (K<sub>71</sub>)- into Si(HIPE) type silica foams bearing controlled porosities. Immobilization was achieved by a covalent bond forming reaction between the enzyme and the low glutaraldehyde activated foam. Testing dye decolorization in a continuous flow reactor, we show that the activity of the heterogeneous catalyst is comparable to its homogeneous counterpart. Its operational activity remains as high as 60 % after twelve consecutive decolorization cycles and one-year storage. More importantly, comparing activities on different substrates for differentially oriented catalysts, we show a two-fold discrimination for ABTS relative to ascorbate. In addition, artificial metalloenzymes can use the advantages of both metallic and enzymatic catalysts to perform aerobic oxidation in a sustainable fashion. We thus co-immobilized a biquinoline-based-Pd(II) complex and laccase into silica monoliths for veratryl alcohol oxidation. To address the control of reactivity, three methods of immobilization were used for the construction of the heterogeneous hybrid catalysts. The immobilized hybrid catalysts show an improved activity compared to the immobilized Pd complex alone for each tested method, attesting for the synergy between Pd and laccase. By tuning enzyme orientation towards Pd(II) complex and silica foam, we show that the activity of the Pd(II)/UNIK<sub>157</sub> hybrid exhibits an averaged two-fold increase compared to Pd(II)/UNIK<sub>71</sub>. A good stability and reusability is observed for both enzyme orientations. This study provides insights into the use of solid supports that beyond allowing stability and reusability becomes synergistic partners in the catalytic process.

Keywords : Artificial metalloenzyme, heterogeneous catalyst, palladium, laccase, aerobic oxidation, veratryl alcohol, dye decolorization.