



Funzymplant

Etude de faisabilité de mélanges d'enzymes hydrolytiques issues du champignon
industriel *Penicillium funiculosum* pour la biodégradation de complexes polysaccharidiques.
Projet PRC09-2 .1.1-1

Partenaires



LISBP –UMR CNRS 5504 (Toulouse)

Pr Jean M François (coordinateur)



ISM2 UMR –CNRS 6263 (Marseille)

Pr Thierry Giardina



INRA IR 1268 (Nantes)

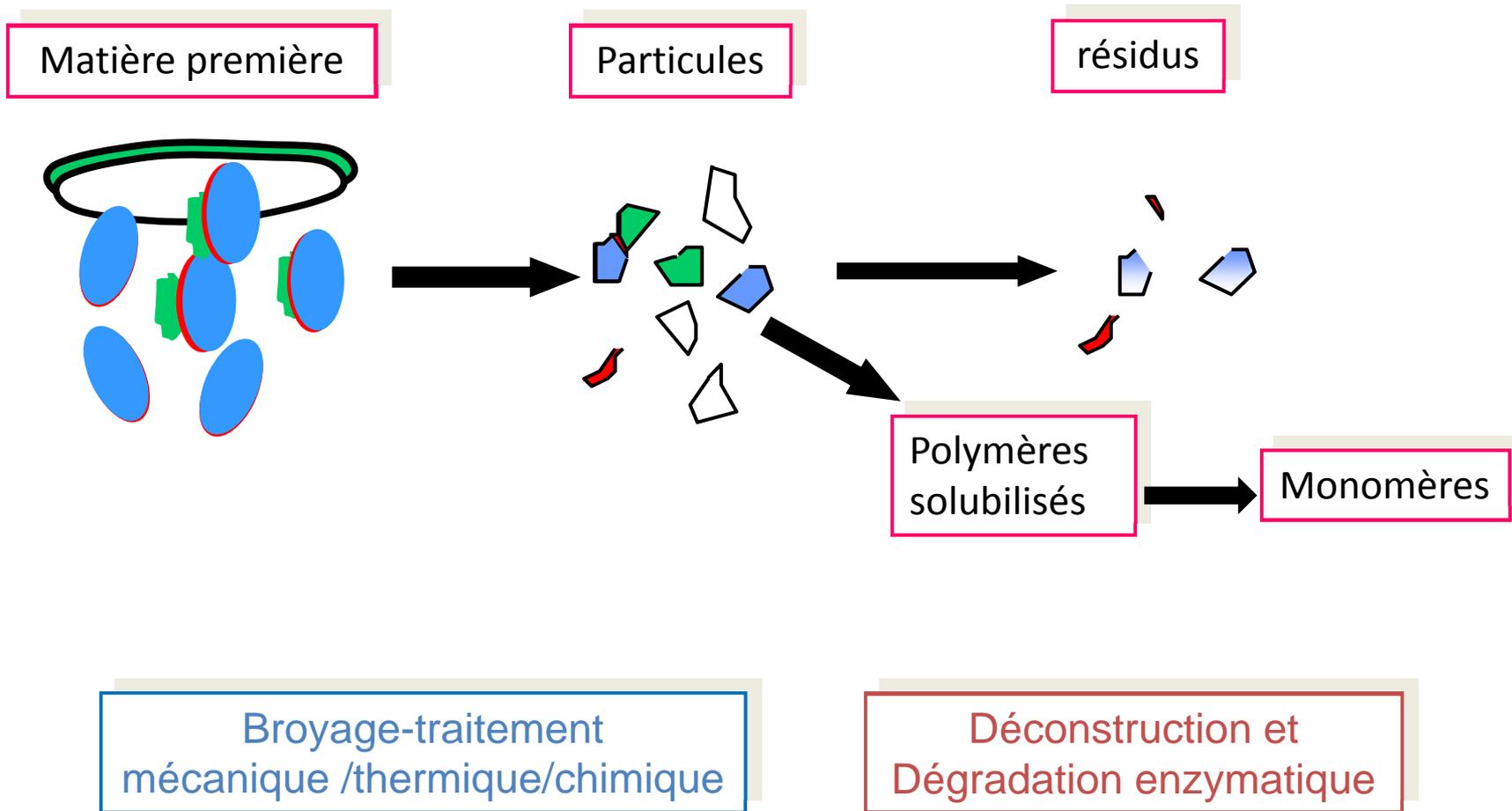
Dr Estelle Bonnin



ADISSEO France (Toulouse)

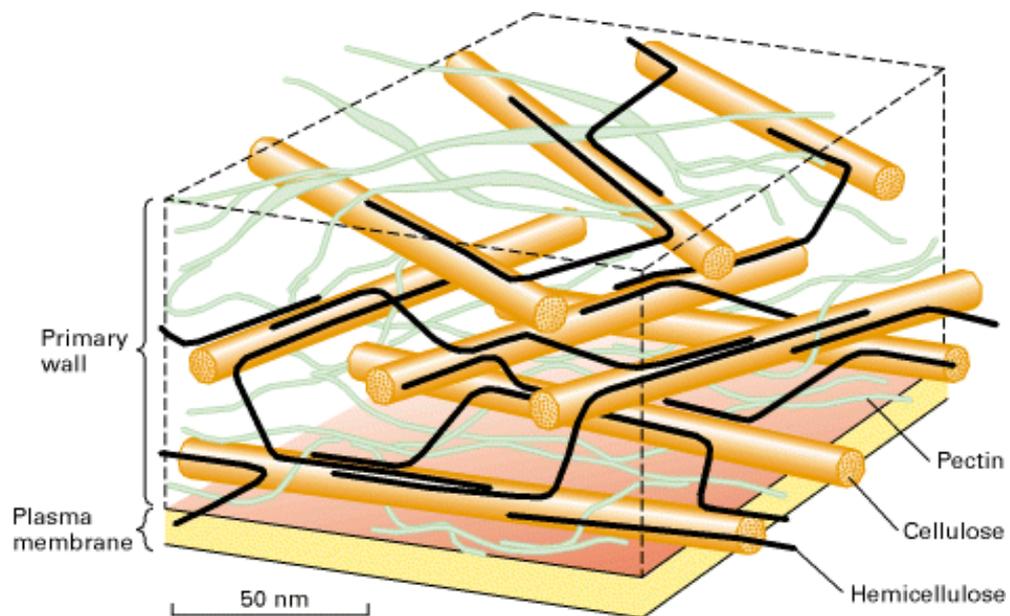
Dr Marc Maestracci

• Origine & motivation



• Origine et motivation

- Biomasse végétale: lignocellulose -hemicellulose

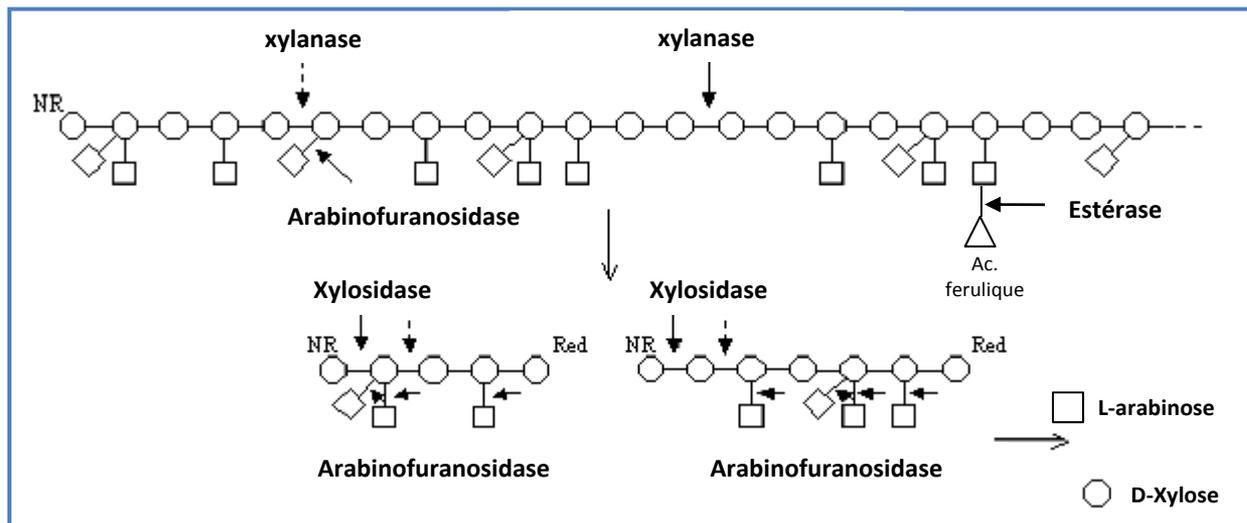


- hémicellulose représente entre 20 et 40 % de la matière sèche végétale:

• Origine et motivation

- Hemicellulases pour hydrolyser les hemicelluloses
 - ❖ Endo enzymes
 - ❖ Exo enzymes
 - ❖ Enzymes auxiliaires

Ex: dégradation de l'Arabinoxylane



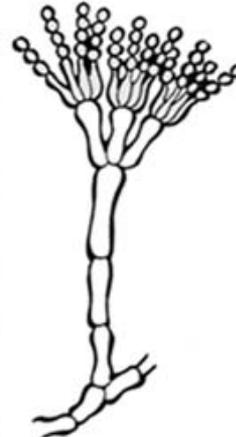
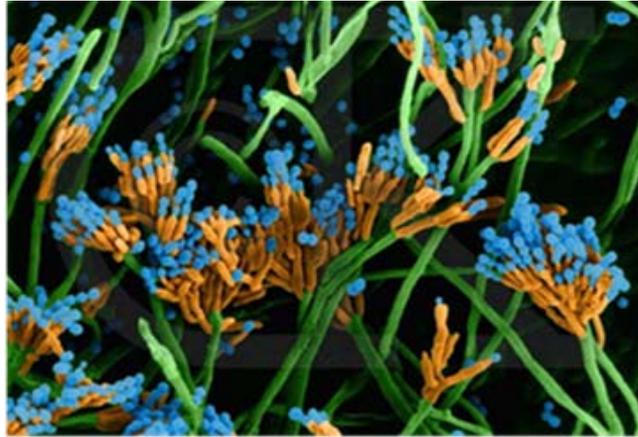
Adapté de Lee *et al.*, 2002

**Dépolymérisation efficace si action combinée des ABFs, des xylosidases et des xylanases ?
Lesquelles ?
En quelle proportion ?**

FUNZYMPLANT

• Origine et motivation

Penicillium funiculosum -industrial strain-



Genomique du *Penicillium*

35 - 40 mega bases

≅ 10000 genes

> 200 GH encoded genes

> 100 GT encoded genes

> Pf secretome > other fungal secretomes sequenced up to now



Proteomique du ROVABIO™
(cocktail enzymatique)



115 protéines identifiées

63 glycosides hydrolases

5 oxidoreductases

6 estérases

5 protéases

36 autres

• Origine et motivation

Vision à l'échelle du génome des potentialités de production d'enzymes de type 'carbohydrases' utiles à la dégradation de matériel cellulosique et hémicellulosique

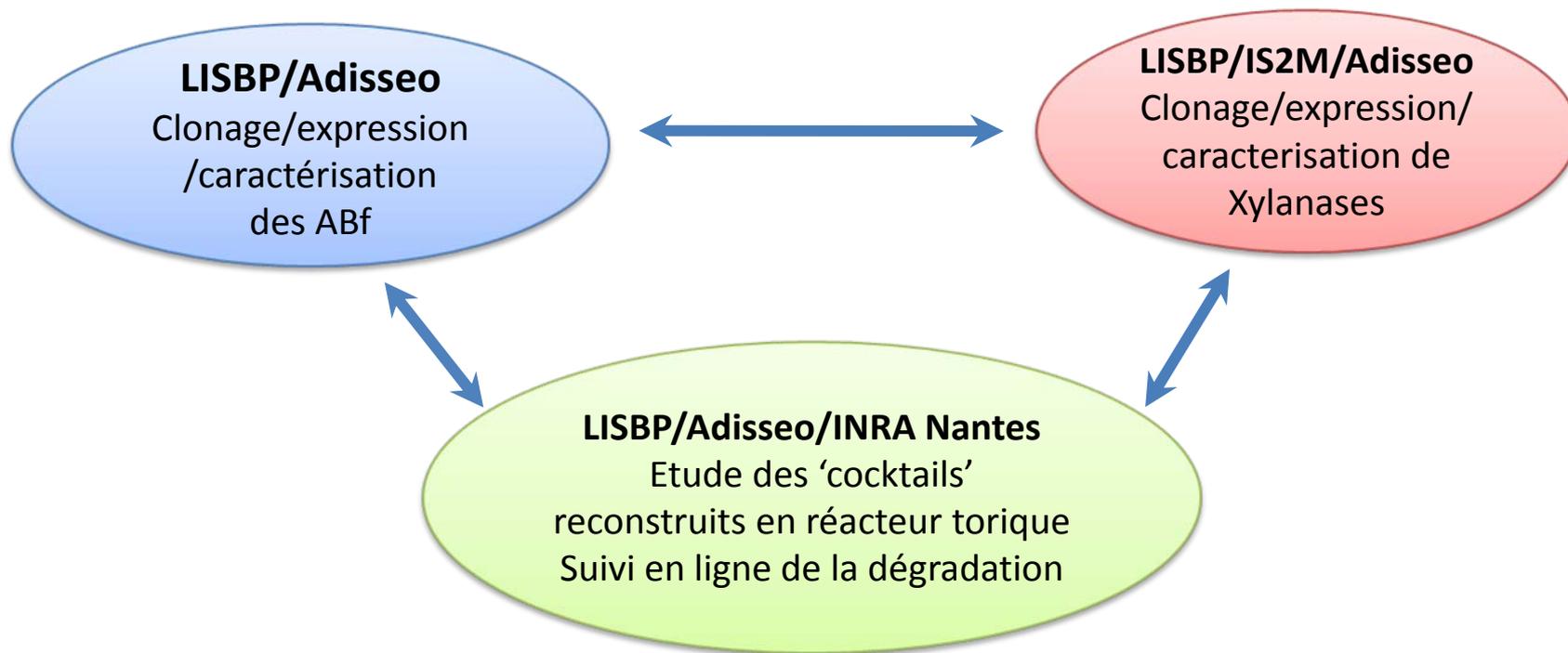
Fungal species	GH2	GH3	GH5	GH6+ GH7	GH10	GH11	GH12	GH16	GH17	GH27	GH43	GH51	GH54	GH61	GH62	GH74	GH93	total
<i>Penicillium funiculosum*</i>	nc	nc	nc	7	4	5	nc	nc	nc	nc	nc	1	4	nc	3	nc	nc	±130
<i>Chrysosporium lucknowense</i>	5	11	8	9	4	7	1	8	4	2	10	2	0	24	2	1	2	114
<i>Aspergillus niger CBS13.88</i>	6	16	8	4	1	4	3	13	5	5	10	3	1	7	1	1	0	88
<i>Aspergillus nidulans FGSA4</i>	10	20	17	5	3	2	1	13	5	3	15	3	1	9	2	2	2	113
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	0	13	18	10	6	1	11	2	0	2	4	2	0	14	0	4	1	88
<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	0	13	18	10	6	1	11	2	0	2	4	2	0	14	0	4	1	88
<i>Trichoderma reesei</i>	1	3	2	2	1	4	1	1	0	2	2	0	2	3	1	1	0	26

GH2 = β -mannosidase; GH3 = β -glucosidase/cellobiase; GH5= endoglucanase; GH6 et GH7= cellobiohydrolase; GH10= endo1, 4- β -xylanase/Endo1, 3 xylanase; GH11 = xylanase, GH12= endoglucanase; GH16= endo1, 3 (4) β -glucanase; GH17 = glucan endo-1,3- β -glucosidase; GH27= α -galactosidase; GH43= β -xylosidase/ β -glycosidase; GH51, GH54, GH62 = L- α -arabinofuranosidase; GH61 = endoglucanase/cellulase (fonction non précisée); GH74= xyloglucanase/endoglucanase; GH93 =exo- α -L-1,5-arabinanase

FUNZYMPLANT

• Objectif & programme

Démontrer les effets synergiques des Abf et Xylanases dans la dégradation de complexes hémicellulosique de plantes



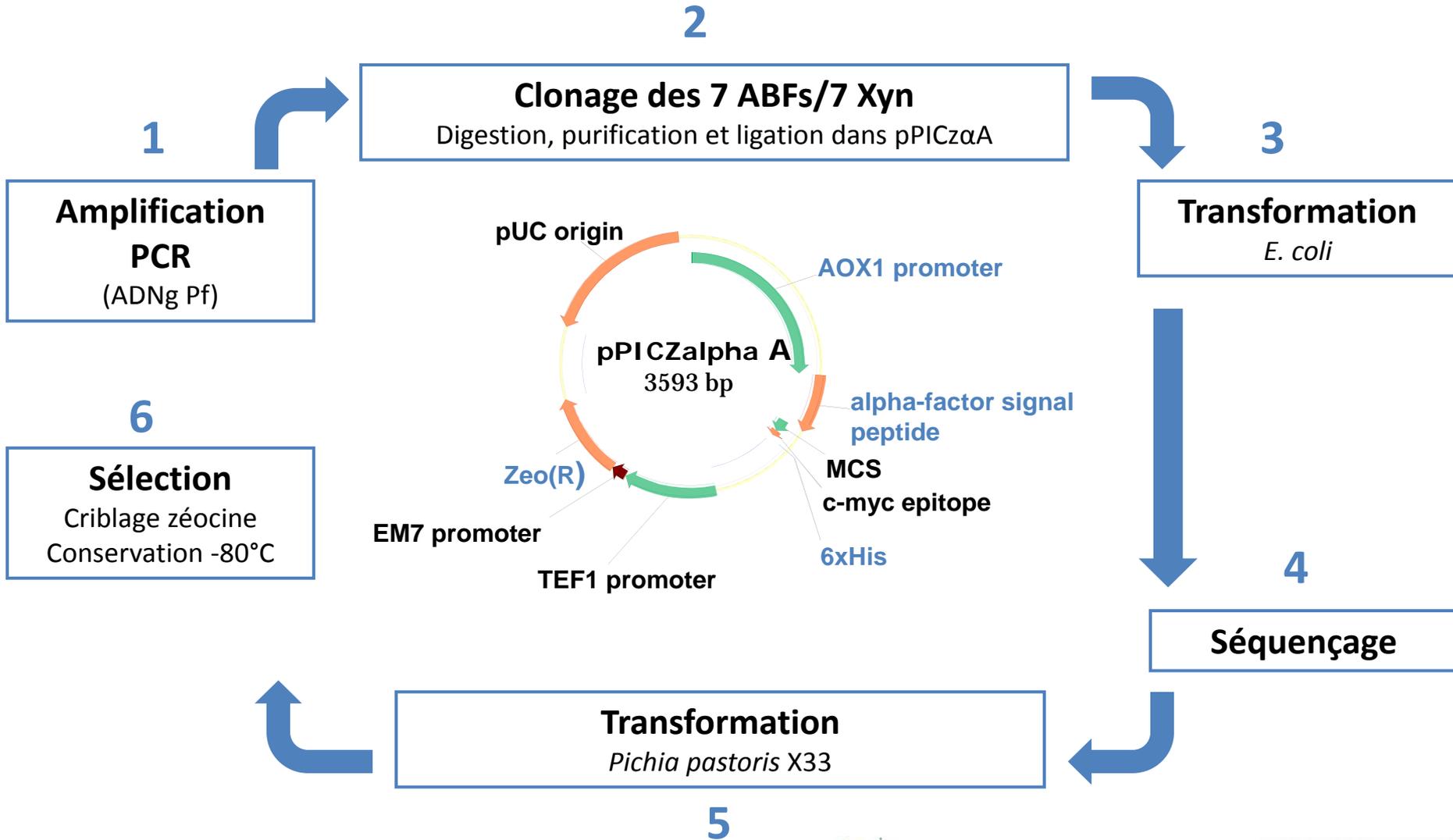
Livrables 1: Caractérisation enzymatique de toutes les ABF et Xyn du Pf

Livrables 2: Démontrer les effets synergiques entre Abf et Xyn sur hemicellulose

Attentes: Optimiser le 'Rovabio' par ingenierie de Pf et/ou créer des 'cocktails' spécifiques.

FUNZYMPLANT

• Etats des travaux



- Etat des travaux

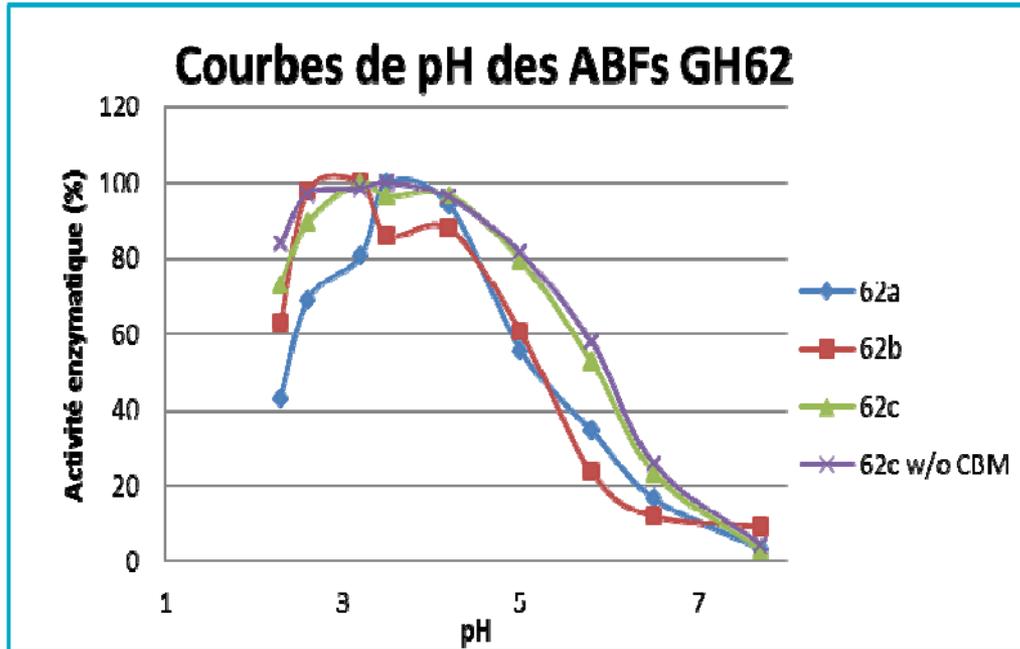
Les Xylanases

Paramètres cinétiques	PfXynB GH11	PfXynC GH11	PfXynE GH11	PfXynF GH11	PfXynD GH10
K_m (mg/mL)	23,0	11,54	16,1	23,0	5,1
v_{max} (UI/mL)	1,73	1,1	1,49	1,43	1,24
k_{cat}/K_m (mg/mL/s)	2782	3963	204	170	167

Substrat	PfXynB	PfXynC	PfXynD	PfXynE	PfXynF
Produits d'hydrolyses					
<i>Xylotetraose</i>	X2, X3, X1	X2, X3, X1	X2	X2, X3, X1	X2, X3, X1
<i>Xylopentaose</i>	X2, X3	X2, X3	X3, X2	X2, X3	X2, X3
<i>Xylohexaose</i>	X3, X4, X2	X3, X4, X2	X2, X3, X4	X3, X4, X2	X3, X2, X4

FUNZYMPLANT

• Etat des travaux



Condition : Substrat
Arabinoxylane de blé 5 mg/mL
(Waxy)
À T° Optimale des enzymes

	GH62		
substrat WAXY	62a	62b	62c
Optimum temperature	40	40	50
Optimum pH	3,5	3,2	3,2

• Etat des travaux

Squelette α 1, 5
et ramification α 1, 2 et 1, 3

Bilan (mU/mg)	62a	62b	62c
WAXY	2688	217	2664
RAXY	3163	259	2638
ARAB	0	0	0
D-ARAB	530	29	518
arabinobiose	0	0	0
arabinotriose	0	0	0
arabinotétraose	0	0	0
arabinopentose	0	0	0
pNPaf	0	0	0

Liaison α 1, 5

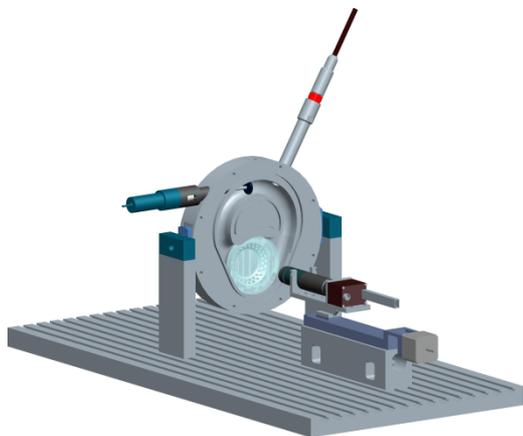


GH 62 ne sont pas actives sur pNPaf, oligoarabinoses et arabinane ramifié de betteraves

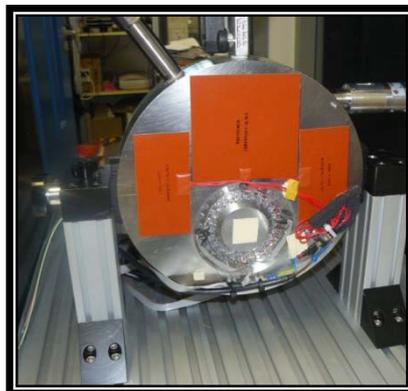
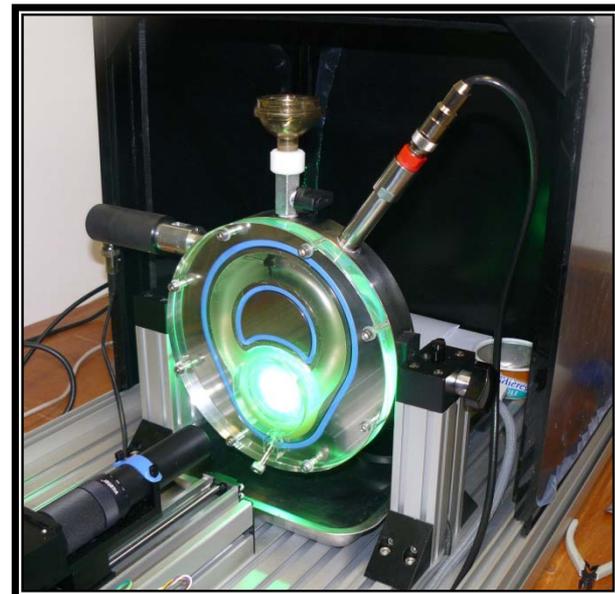
- Suite et perspectives

Le réacteur torique

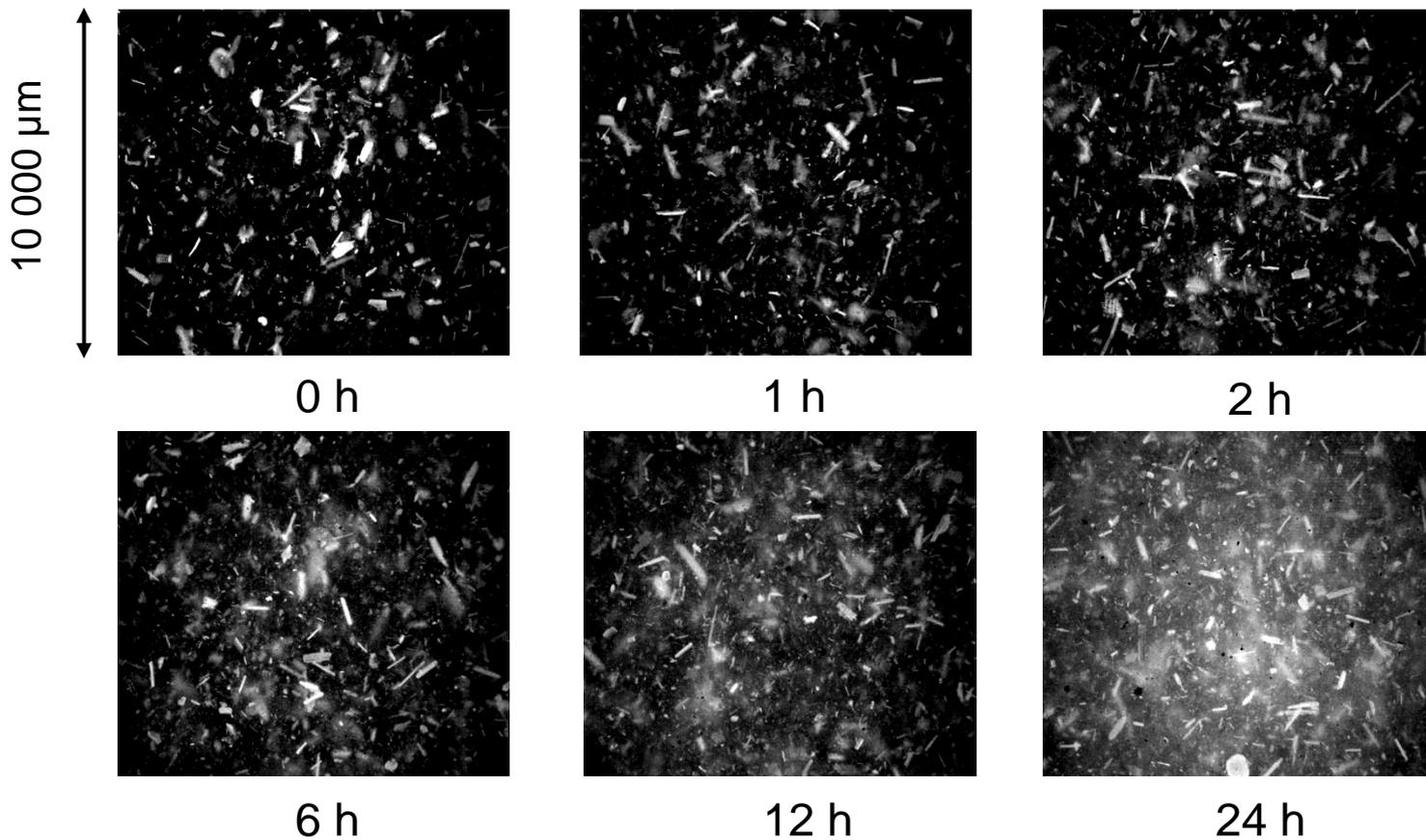
De l'idée ...



À la réalisation

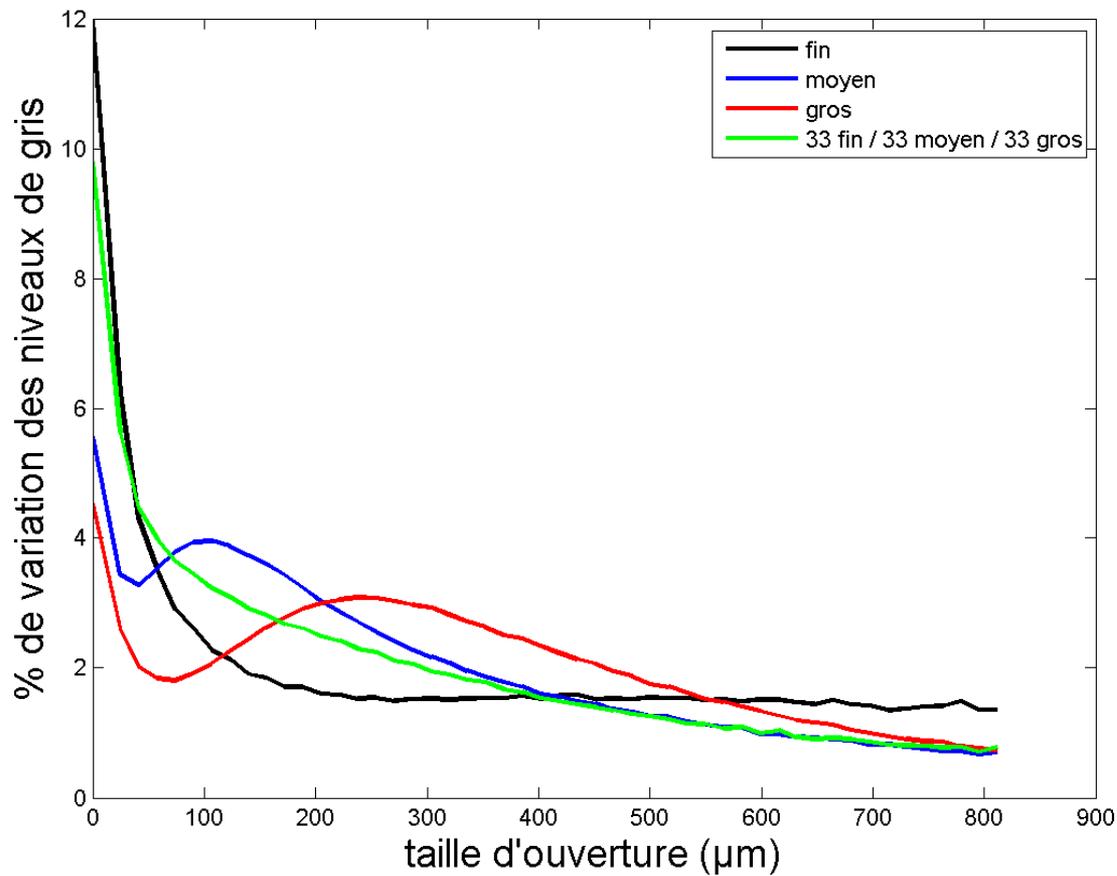


• Suite et perspectives



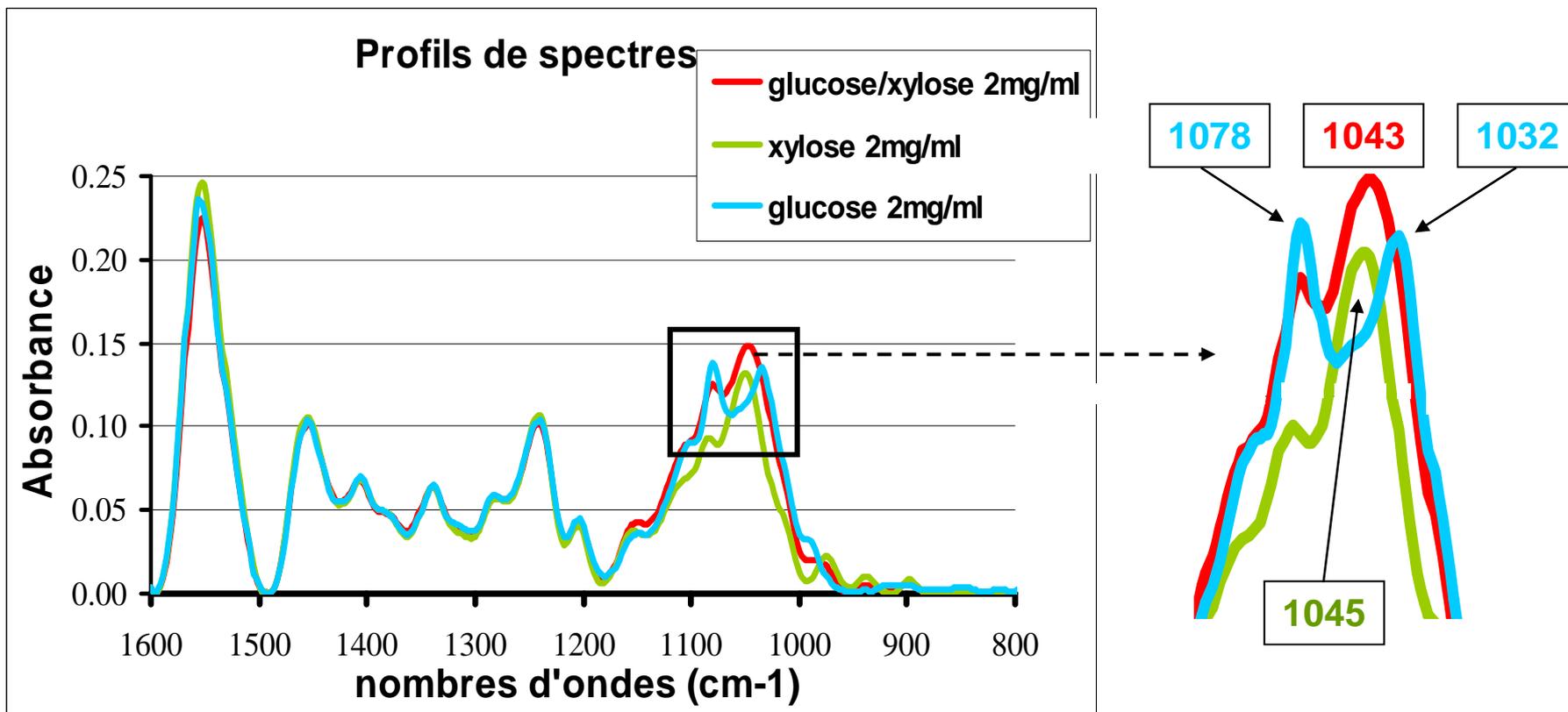
- Suite et perspectives

Courbes granulométriques



• Suite et perspectives

Détection en ligne des produits de dégradation par spectrométrie infra-rouge



• Conclusions

▪ Programme:

Lot 1: terminé

Lot 2: en cours

Nous sommes dans les 'temps '

▪ Travaux et valorisation

Xylanases: caractérisée et publication réalisée

ABF62 : famille originale qui demande approfondissement de sa fonction catalytique

▪ Remerciements

Marion de La Mare:

Thésard Cifre Adisseo 2010 -2012

Mickael Lafond:

Post-doc Adisseo Mai –Decembre 2010

Olivier Guais:

thèse Adisseo 2008 -2010, puis CDI Adisseo

avec le concours de Dr Jean Luc Parrou (CR1- CNRS , LISBP)