

Biocatalyse industrielle

Claude Bensoussan

Summary

Industrial biocatalysis

A significant number of industrial processes for the synthesis of fine chemicals, pharmaceutical and agrochemical intermediates utilizes biocatalytic steps. The combination of new molecular biology techniques and process engineering have led to new industrial biocatalysts. We present some examples which are in use in chemical companies.

Mots-clés

Biocatalyse, industrie, chimie fine, intermédiaire chiral, synthèse asymétrique.

Key-words

Biocatalysis, industry, fine chemistry, chiral intermediate, asymmetric synthesis.

Même si les biochimistes et les microbiologistes ont toujours pensé que la biocatalyse constituerait un domaine d'application prometteur pour la synthèse chimique, les procédés industriels mettant en œuvre des enzymes ou des micro-organismes restaient peu nombreux. Des idées préconçues et un manque de connaissances des enzymes ont fortement contribué à limiter l'utilisation de la biocatalyse dans l'industrie chimique [1]. Trop souvent appliquée en dernier recours alors que toutes les voies chimiques avaient échoué, la biocatalyse était considérée par les chimistes organiciens comme une méthode peu viable.

Ce temps est révolu, principalement grâce aux progrès réalisés ces dernières années en biologie moléculaire. La production d'une enzyme « industrielle », en termes de qualité, quantité et prix, ne constitue plus un problème. Les techniques de biologie moléculaire, l'ingénierie des voies métaboliques et l'évolution moléculaire dirigée ont ouvert la voie à l'utilisation d'enzymes présentant de nouvelles caractéristiques en termes de spécificité de substrat, de sélectivité, de « turnover », de stabilité thermique et de résistance aux solvants [2]. Des systèmes de criblage « haut débit » intelligents ont été conçus [3-4] et des systèmes d'expression efficaces ont été développés pour la production de biocatalyseurs en quantité suffisante pour une application industrielle.

Cet ensemble relayé par une abondante littérature renforce cette envolée et produit un effet « booster » [5-8]. L'industrie chimique voit dans l'utilisation de la biocatalyse un double intérêt : la possibilité d'amélioration de voies de synthèse existantes et l'accès à de nouveaux produits. Si les promesses de la biocatalyse pour la chimie résident majoritairement dans l'accès à des structures moléculaires jusqu'alors difficilement accessibles, l'utilisation de matières premières moins coûteuses et la mise en application de meilleurs procédés restent attractives.

Nous présentons dans cet article des exemples d'applications industrielles de procédés de biocatalyse décrits par quelques sociétés chimiques. Nous avons délibérément soustrait de ces exemples les produits de

commodité chimique pour nous focaliser sur la production de synthons chiraux. Deux exceptions cependant, les productions d'acrylamide et de fructose qui constituent à elles seules, en termes de volume, les productions les plus importantes. Le lecteur souhaitant obtenir plus de renseignements concernant l'accès aux produits de commodités chimiques par biocatalyse, trouvera de nombreuses références dans l'article de Danner et Braun [9].

Exemples de procédés industriels mettant en œuvre la biocatalyse

Les produits de commodité chimique

Production d'acrylamide

La production industrielle d'acrylamide catalysée par une nitrile hydratase (NIH) est réalisée par la société Nitto à l'échelle de 30 000 t/an [10]. Cette production représente à ce jour « le grand exemple » de mise en œuvre d'une enzyme (figure 1a). DuPont a utilisé une approche similaire pour la production de 5-cyanovaléramide, un précurseur d'herbicide [11]. L'hydratation régiosélective de l'adiponitrile en 5-cyanovaléramide catalysée par la NIH de *Pseudomonas chlororaphis* (figure 1a), s'est révélée être un excellent moyen de substitution de la voie chimique dans laquelle l'hydratation était peu sélective et conduisait à l'apparition

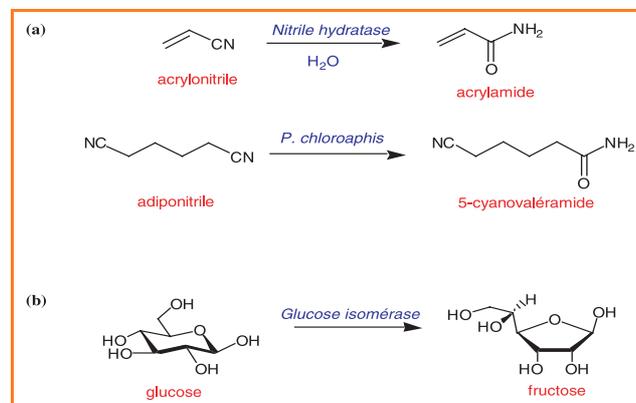


Figure 1 - Produits de commodité chimique obtenus par biocatalyse.
 (a) acrylamide et 5-cyanovaléramide ; (b) fructose.

Abréviations

NIH : nitrile hydratase
 6-APA : acide 6-aminopénicillanique
 7-ADCA : acide 7-amino désacétoxy céphalosporanique

de nombreux sous-produits. Cette NIH, une fois immobilisée, a permis de générer, après plus de 50 batch successifs, 12 tonnes de 5-cyanovaléramide avec un rendement de 93 % et une sélectivité de 96 %.

Production du fructose

L'isomérisation du glucose en fructose catalysée par la glucose isomérase est largement utilisée par de nombreuses sociétés sucrières (figure 1b). Le volume total de production de fructose par ce procédé biocatalytique est supérieur à 1 million de t/an et est à ce titre l'exemple phare de la biocatalyse industrielle [12].

Les produits pour la chimie fine

Nous avons extrait de la littérature quelques grands procédés industriels de biocatalyse décrits par des compagnies chimiques, notamment BASF, DSM, Lonza et Zeneca, pour l'accès à des « building blocks » chiraux.

Procédés BASF

Ce groupe a depuis longtemps développé une compétence dans le domaine des biotechnologies, en particulier dans celui de la production d'alcools, d'amines et d'acides hydroxy-carboxyliques chiraux (figure 2a-c).

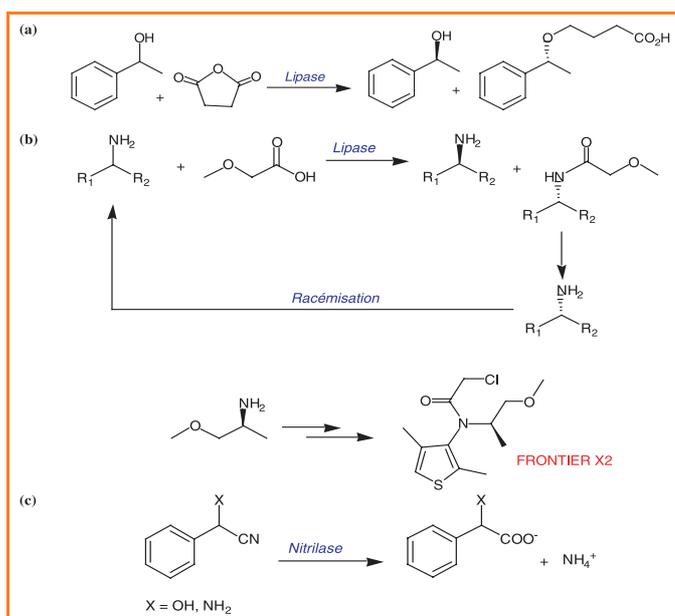


Figure 2 - Procédés BASF mettant en jeu des lipases pour la synthèse. (a) d'alcools énantiomériquement purs ; (b) d'amines chirales ; (c) d'acides hydroxy-carboxyliques.

• Résolution d'alcools et d'amines racémiques

La résolution d'alcools et d'amines racémiques par des lipases constitue un axe fort de développement chez BASF puisque la production des composés chiraux correspondants s'établit à plusieurs t/an. L'idée d'utiliser des lipases pour l'obtention de ces composés découle de la connaissance du mécanisme réactionnel de ces enzymes. En effet, les lipases étaient jusqu'alors utilisées pour catalyser l'hydrolyse d'esters d'acides gras. Dans un premier temps, il y a attaque nucléophile du carbonyle de la liaison ester par l'hydroxyle de la sérine, conduisant à la formation d'une acyl-enzyme. L'hydrolyse de cette dernière conduit à

l'acide gras correspondant avec régénération de l'enzyme. Dès qu'il a été démontré que les lipases étaient actives en présence de solvants organiques [13], on a envisagé de remplacer l'eau par d'autres nucléophiles comme des alcools ou des amines. En mettant à profit ces réactions, BASF a eu accès à un large spectre d'alcools et d'amines chiraux. Cette voie est utilisée pour la production de la (S)-méthoxypropylamine qui entre dans la composition de l'herbicide Frontier X2 (figure 2b). Une installation industrielle a été construite en 2000 autour de cette application, dont les capacités en 2001 étaient de l'ordre de 2 000 t/an.

• Production d'acides α -hydroxy-carboxyliques et d'acides α -amino-carboxyliques

Ces composés résultent de l'hydrolyse d'un nitrile α -substitué par une nitrilase (figure 2c). La production des acides α -hydroxy-carboxyliques est « mécanistiquement » intéressante puisque la racémisation des cyanhydrines en milieu aqueux permet de bioconvertir, par résolution cinétique dynamique, 100 % du substrat de départ en un seul énantiomère. Plusieurs tonnes d'acide mandélique et de ses dérivés ont été ainsi produites.

Procédés DSM

Dès les années 70, DSM s'est forgée une image de société chimique utilisant la biocatalyse, la biotransformation et la fermentation pour la production d'intermédiaires chimiques. La résolution enzymatique de D,L-phénylglycinamide en D-phénylglycine et L-phénylglycine par la leucine aminopeptidase et la L- α -aminoacylase de *Pseudomonas putida* constitue le premier exemple industriel chez DSM [14]. Elle s'est ensuite illustrée dans la production d'aspartame et de dérivés hémisynthétiques de pénicillines et de céphalosporines.

• Production d'aspartame

La production d'aspartame à l'échelle de plusieurs tonnes par voie enzymatique est réalisée à ce jour par Holland Sweetener Company, une « joint-venture » entre Tosoh et DSM. Le couplage du carbobenzyloxy-L-aspartate (Z1) et du D,L-phénylalanine méthyle ester est catalysé par la thermolysine (figure 3a). Le D-phénylalanine méthyle ester restant est racémisé puis recyclé.

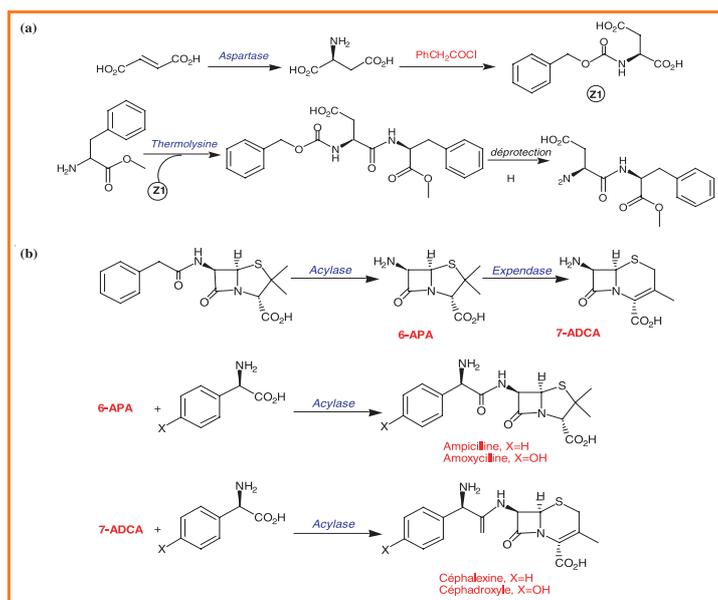


Figure 3 - Procédés appliqués chez DSM.

(a) étape biocatalytique pour la production d'aspartame ; (b) production de pénicillines et de céphalosporines hémisynthétiques.

- Production de pénicillines et de céphalosporines hémisynthétiques

Les pénicillines sont des produits d'origine naturelle obtenus par fermentation. L'utilisation d'acylase puis d'expandase avec la pénicilline comme substrat permet l'accès à deux synthons clés : l'acide 6-aminopénicillanique (6-APA) et l'acide 7-amino-désacétoxycephalosporanique (7-ADCA) (figure 3b). Ces motifs constituent le point de départ de toute une série de pénicillines et de céphalosporines hémisynthétiques après couplage avec la D-phénylglycine ou la D-p-hydroxyphénylglycine catalysée par une acylase (figure 3b) [15]. L'ampicilline, l'amoxicilline, la céphalexine et la céphalexine, dont les productions annuelles avoisinent les 2 000 t/an, sont produites par ce procédé enzymatique.

Procédés Lonza

Une des grandes spécialités de Lonza est la production par voie enzymatique de composés azotés, notamment d'hétérocycles azotés, difficilement modifiables par voie chimique.

- Production d'acide hydroxynicotinique

L'utilisation de la Niacine hydroxylase sur la Niacine permet d'avoir accès à l'acide 6-hydroxynicotinique. Ce « building block » est le motif clé d'un ensemble de nouveaux insecticides produits à l'échelle de plusieurs t/an (figure 4a).

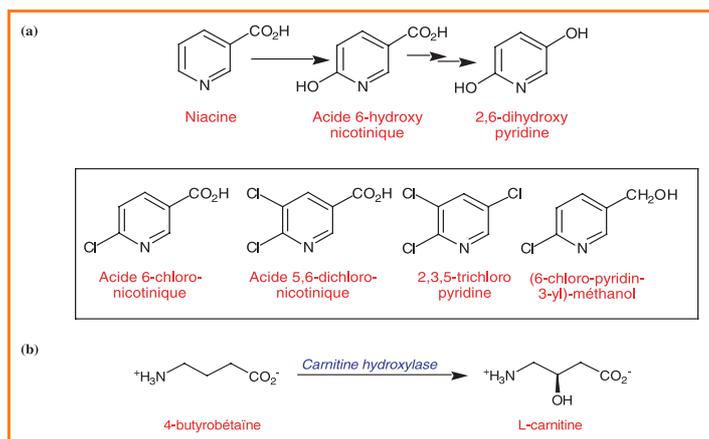


Figure 4 - Procédés appliqués chez Lonza.

(a) production d'acide 6-hydroxynicotinique catalysé par *Achromobacter xylosoxidans* LK1 ; (b) production de la L-carnitine.

- Production de L-carnitine

La L-carnitine présente de nombreuses propriétés médicales et nutritionnelles alors que la forme D ne présente, à ce jour, aucune activité décrite. La préparation chimique de cette molécule, à partir du mélange d'épichlorhydrine racémique et d'acide tartrique, aboutissait à l'obtention de la D,L-carnitine avec un faible rendement. Le dédoublement par recristallisation en présence d'un sel chiral constituait un handicap car il grevait lourdement le coût du procédé. L'accès à la L-carnitine par voie enzymatique, à partir d'un substrat achiral peu coûteux, est devenu très vite la voie industrielle retenue. Deux voies d'accès sont envisageables : l'hydroxylation asymétrique de la 4-butyrobétaine (figure 4b), ou l'hydratation asymétrique de la crotonobétaine. A ce jour, l'expression de la carnitine hydroxylase dans *Escherichia coli* permet de produire, par hydroxylation asymétrique de la 4-butyrobétaine, 300 t/an de L-carnitine [16].

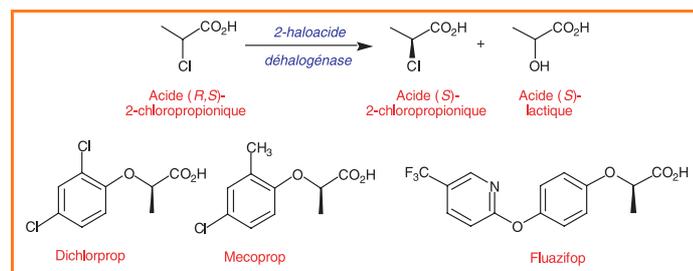


Figure 5 - Procédés appliqués chez Zeneca.

Production d'herbicides optiquement actifs à partir d'acide (S)-chloropropionique optiquement pur.

Procédé Zeneca

En développant la voie d'accès enzymatique au (S)-chloropropionique, Zeneca s'est doté d'un arbre-produit très attractif à la base de nombreux herbicides actuellement sur le marché (figure 5).

- Production d'acide (S)-chloropropionique

L'hydrolyse énantiosélective de l'acide 2-chloropropionique racémique par une déshalogénase permet d'obtenir l'acide (S)-chloropropionique énantiomériquement pur (figure 5). Cette déshalogénase surexprimée chez *Escherichia coli* permet, par un procédé « fed-batch », de synthétiser plus de 2000 t/an d'acide (S)-chloropropionique [17].

Conclusions

Au vu des exemples non exhaustifs présentés dans cet article, nous constatons que le développement de procédés mixtes chimie/biocatalyse constitue l'un des enjeux économiques forts du moment. L'impasse sur une approche « bio » pourrait, à terme, être lourde de conséquence. La plupart des compagnies chimiques ont aujourd'hui dans leur axe de recherche et développement, en interne ou en externe, des équipes de biologistes moléculaires, de microbiologistes et de biochimistes, dédiées à l'étude des voies de synthèse de nouveaux composés. Rhodia a su saisir cette opportunité en associant étroitement un département de biocatalyse et un département de chimie de catalyse asymétrique dans la production d'intermédiaires pharmaceutiques ou agrochimiques à forte valeur ajoutée. Ces nouvelles approches stratégiques influent fortement sur l'orientation des secteurs industriels. Ceux-ci s'adaptent en modifiant ou en renforçant leurs installations afin d'accueillir ces nouveaux procédés qui donnent accès à des réactions chimiques difficiles, voire impossibles à réaliser par une chimie conventionnelle.

Références

- [1] Rozzell J.D., Commercial scale biocatalysis: Myths and realities, *Bioorg. Med. Chem.*, **1999**, 7, p. 2253.
- [2] Arnold F.H., Volkov A.A., Directed evolution of biocatalysts, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **1999**, 3, p. 54.
- [3] Marrs B., Delgrave S., Murphy D., Novel approaches for discovering industrial enzymes, *Curr. Opin. Microbiol.*, **1999**, 2(3), p. 241.
- [4] Preisig C., Byng G., Applications of mass spectrometry in screening for new biocatalysts, *J. Mol. Cat.*, **2001**, 11(4-6), p. 733.
- [5] Dordick J.S., *Biocatalysts for industry*, Plenum press, New York, **1991**.
- [6] Faber K., *Biotransformations in organic chemistry*, Springer, **1997**.
- [7] Roberts S.M. et al., *Biocatalysis for fine chemical synthesis*, W. Sons, **1999**.
- [8] Wandrey C., Liese A., Kihumbu D., Industrial Biocatalysis: past, present, and future, *Org. Proces. Res. Dev.*, **2000**, 4, p. 286.
- [9] Danner H., Braun R., Biotechnology for the production of commodity chemicals from biomass, *Chem. Soc. Rev.*, **1999**, 28, p. 395.

- [10] Nagasawa T., Nitrile hydratase. Its application for the industrial production of acrylamide, *Kikan Kagaku Sosetsu*, **1995**, *24*, p. 180.
- [11] Hann E.C. *et al.*, 5-cyanovaleramide production using immobilized *Pseudomonas Chlororaphis* B23, *Biorg. Med. Chem.*, **1999**, *7*, p. 2239.
- [12] Jensen V.J., Rugh S., Industrial scale production and application of immobilized glucose isomerase, *Methods Enzymol.*, **1987**, *136*, p. 356.
- [13] Klibanov A.M., Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents, *Acc. Chem. Res.*, **1990**, *23*, p. 114.
- [14] Boesten W.H.J., Meyer-Hoffman L.R.M., Enzyme production with L-alpha-aminoacylamidase activity, *Novo*, GB 1577087, **1977**.
- [15] Bruggink A., Roos E.C., De Vrom E., Penicillin acylase in the industrial production of b-lactam antibiotics, *Org. Proces. Res. Dev.*, **1998**, *2*, p. 128.
- [16] Hoeks F. *et al.*, Process integration for the production of fine biochemicals illustrated with the biotransformation of gamma butyrobetaine into L-carnitine, *J. Biochem. Eng. J.*, **1996**, *61*, p. 53.
- [17] Taylor S.C., (S) 2-chloropropionic acid developments in its industrial manufacture, *Chirality in industry II*, A. Collins, G.N. Scheldrake, J. Crosby éd., Wiley & Sons, **1987**.



Claude Bensoussan

a dirigé le service Biocatalyse (Groupe Expertise et développement pharmaceutique) de Rhodia Recherches*. Il a quitté cette fonction fin juillet 2002 pour créer la société Enzymomics** dans le domaine de la biocatalyse.

* Rhodia Recherches, Centre de Recherches de Lyon, 85 rue des Frères Perret, 69192 Saint-Fons.

** Enzymomics, Hall 3-Gilbert Durand, 135 avenue de Ranguueil, 31077 Toulouse Cedex 4.

E-mail : Claude.Bensoussan@wanadoo.fr

Exemples de composés produits à l'échelle industrielle par biocatalyse

Compagnie	Production	Tonnes/an
Ajinomoto Co.	dihydroxyphénylalanine	250
AMINO GmbH	acide malique	2 000
BASF	(R)-phényléthylamine	> 100
Chemferm	pénicillines hémisynthétiques	2 000
Degussa-Hüls AG	L-aminoacides	200
Dr Vig Medicaments	7-ADCA	300
DSM	aspartame	> 2 000
DuPont	5-cyanovaléramide	10
Gist-Brocades/Novo-Nordisk	fructose	> 250 000
Hoechst Marion	acide 7 amino céphalosporanique	200
Kanegafuchi	D-p-hydroxyphénylglycine	200
Krebs Biochemicals Ltd.	phénylacétylcarbinol	120
Lonza AG	vitamine B3	3 000
Monsanto	acides aminés	> 10
Nitto Chemical Industry	acrylamide	> 30 000
Tanabe Seiyaku Co.	acide malique	450
Toray Industries	lysine	4 000
Zeneca	acide (S)-2-chloropropionique	2 000