

La biocatalyse solide/gaz

Vers une réalité industrielle

Sylvain Lamare, Karine Roule-Woiry, Isabelle Goubet, Thierry Maugard et Marie Dominique Legoy

Summary

Solid/gas biocatalysis: towards industrial application

Solid/gas biocatalysis appears today as a promising technology for the development of new industrial processes. The use of enzymes or whole cells at the solid/gas interface allows: an important minimization of energetic costs compared to the concurrent liquid processes, a very important reduction of volume during the downstream processes, an important stability of biological catalysts and a very high productivity for minimal plant size.

These advantages result from the ability to control precisely all the thermodynamic parameters influencing the kinetics of the reactions performed, but also the stability of the biocatalysts working in a continuous way at temperatures far higher from the temperatures encountered in nature.

Today, solid/gas biocatalysis is reaching the industrial level for a first application, the production of natural flavoring esters. Nevertheless, others applications are already under development and concern the field of fine chemicals or depollution activities involving isolated enzymes or whole cells.

Mots-clés

Solide/gaz, biocatalyse, procédé, enzyme, cellule.

Key-words

Solid/gas, biocatalysis, process, enzyme, cell.

La nature offre très peu d'exemples de transformations enzymatiques mettant en jeu des substrats gazeux. Citons par exemple l'hydrogénase, dont le substrat naturel est l'hydrogène gazeux. Cette enzyme qui réalise la conversion du p-H₂ en o-H₂ fut étudiée par Yagi et coll. en 1969 [1].

Cependant, au cours des 15 dernières années, l'utilisation de la biocatalyse solide/gaz (enzymes isolées ou cellules mortes) pour le développement d'applications biotechnologiques a connu un engouement et fait l'objet de plusieurs publications [2-6]. Les principaux travaux concernent l'utilisation de lipases ou d'estérases pour la modification ou la synthèse d'esters [7-9], ainsi que l'utilisation d'alcool oxydases ou d'alcool déshydrogénases pour des réactions d'oxydations ou d'oxydo-réduction [10-12].

Des applications relatives à la dépollution d'effluents gazeux ont aussi été développées, telles que la dégradation du trichloréthylène [13] ou l'élimination de phénols [14].

Alors que la faisabilité technique concernant l'utilisation d'un catalyseur biologique à l'interface solide/gaz a été démontrée avec succès, ces recherches sont restées dans leur très grande majorité au stade de développement au laboratoire.

Aujourd'hui, la biocatalyse solide/gaz connaît un nouvel essor, avec le développement d'un procédé au stade préindustriel permettant d'envisager une application importante de cette technologie dans les secteurs de l'aromatique, de la cosmétique, de la chimie fine et de la dépollution.

La catalyse solide/gaz présente des avantages technologiques importants

Le développement de la biocatalyse en milieu « non conventionnel » a étendu d'une façon très importante le

champ d'applications des enzymes et des cellules entraînant, en parallèle, le développement de nouveaux bioprocédés. Les systèmes utilisant des biocatalyseurs dans des milieux très concentrés, en présence ou non de solvants organiques, l'utilisation des fluides supercritiques ou la biotransformation des phases gazeuses ont permis de s'affranchir de problèmes relatifs aux milieux aqueux comme la solubilité des composés apolaires ou la modification des contraintes thermodynamiques, tout en accroissant significativement les caractères de stabilité des catalyseurs, dans la majorité des cas, par un contrôle de la solvation des biocatalyseurs [15].

Cependant, le caractère multiphasique de la plupart de ces milieux constitue souvent un frein à la productivité de ces systèmes, en raison des contraintes diffusionnelles existant entre des phases liquides et solides de polarités différentes. Concernant la biocatalyse solide/gaz, bon nombre de ces problèmes peuvent être évités et les principaux avantages de cette technologie peuvent être résumés ainsi :

- La phase solide étant constituée par le biocatalyseur, les étapes de fixation ou d'immobilisation ne s'avèrent pas indispensables. La récupération du catalyseur est aussi beaucoup plus aisée, qu'il s'agisse de réaction menée en « cuvée » ou en réacteur continu.
- Comparativement à un système solide/liquide, les transferts de masse sont très importants en raison de la diffusion très élevée et de la très faible viscosité des phases gazeuses.
- La phase gazeuse étant composée des substrats et produits purs et d'un gaz vecteur, l'utilisation de tout autre composé (tel que solvant pour pallier d'éventuels problèmes de solubilité) devient alors caduque. Les traitements en aval lors de la récupération du produit sont simplifiés et la quantité de sous-produits est minimisée. De plus, l'utilisation

des substrats purs évite tout risque de toxicité ou de contamination des produits par une tierce molécule.

- L'utilisation de la catalyse solide/gaz est synonyme de température plus importante d'où il résulte une diminution des risques de contamination microbienne des réacteurs.
- Enfin, le dimensionnement à plus grande échelle est largement facilité pour ce type de procédé faisant appel à une phase circulante gazeuse.

Mais l'avantage majeur de ce système tient au fait que l'activité thermodynamique de chaque composé présent dans la phase gazeuse peut être contrôlée de façon indépendante. Ce contrôle thermodynamique permet non seulement une maîtrise des cinétiques réactionnelles, mais représente aussi un facteur clé dans la stabilisation des activités catalytiques biologiques au sein de ces systèmes [9].

Une première application à l'échelle industrielle : la synthèse d'esters naturels à propriété d'arôme

Les esters constituent une classe importante dans les composés à propriété d'arôme. Les esters linéaires sont dans leur grande majorité responsables des notes florales et fruitées et sont utilisés de façon importante en agroalimentaire et en parfumerie. De nombreuses molécules d'intérêt économique comme les esters d'acides acétique, propionique, butyrique et iso-butyrique sont très facilement produits par synthèse chimique, dès lors que le caractère naturel de la molécule n'est pas recherché. Le cas des substances aromatisantes naturelles est alors différent puisque leur obtention est très souvent le fruit de procédés d'extraction (dépendant de variations saisonnières, climatiques et/ou géographiques) ou le résultat de procédés de fermentation dans lesquels la récupération des produits constitue souvent le point critique.

Un procédé biotechnologique enzymatique offre alors une alternative intéressante pour la production de ces molécules naturelles s'il permet de minimiser les coûts en se rapprochant de ceux d'un procédé de chimie industrielle. Le principe de fonctionnement d'un système solide/gaz, schématisé *figure 1*, est relativement simple.

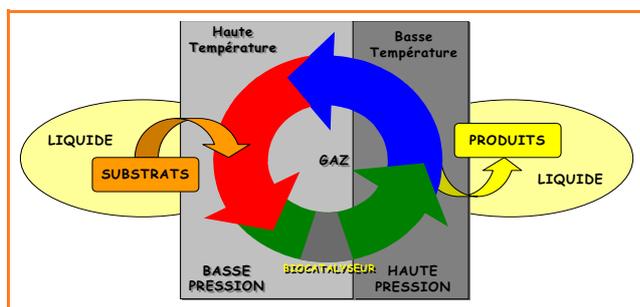


Figure 1 - Schéma de principe de fonctionnement d'un réacteur solide/gaz.

Un ballast de gaz neutre (azote) mis en rotation passe par une zone en dépression à haute température, traverse un réacteur de type lit fixe avant de rentrer dans une zone à haute pression et à basse température. La température et la dépression servent à créer le gaz à transformer sur le lit

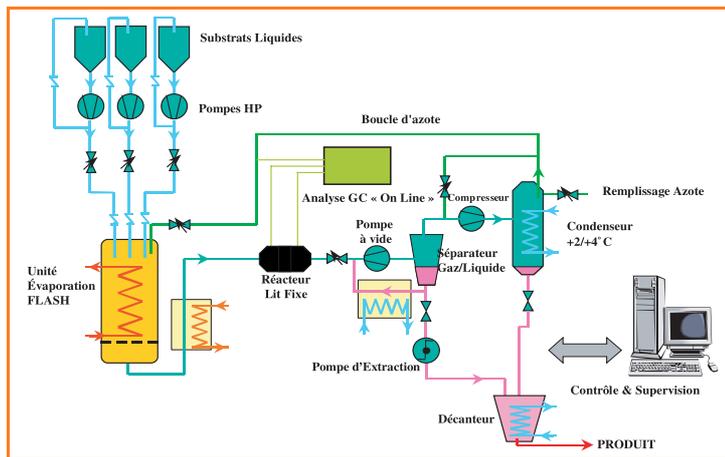


Figure 2 - Représentation schématique de l'installation solide/gaz de taille pré-industrielle.

Tableau I - Spécifications techniques de l'unité pré-industrielle de catalyse solide/gaz.

Gamme de pression absolue en fonctionnement	10 matm à 1,3 atm
Puissance maximale de l'unité « flash » (chaud)	13 kW
Puissance maximale de condensation (froid)	20 kW
Charge catalytique admissible	0,5 à 6 kg de Novozym 435
Débit gazeux maximum	100 m ³ /h à P _a = 10 matm 200 m ³ /h à P _a > 30 matm
Plage du contrôle en température	30 - 120 °C
Charge en azote en fonctionnement	0,700 m ³
Charge organique admissible de la phase gazeuse	80 % (W/W)
Temps de séjour moyen en réacteur	0,1 à 0,3 seconde
Productivité (production ester)	2 à 5 kg/h de produit pur

catalytique en réalisant la vaporisation des molécules à traiter dans la boucle d'azote circulante. A cette fin, des molécules liquides substrats sont injectées à ce niveau et mélangées au gaz vecteur. Une fois créé, le gaz est alors remis en température avant son introduction dans le réacteur proprement dit. En sortie de réacteur, le gaz contenant les produits est comprimé et refroidi afin de récupérer les produits par condensation. Enfin, l'azote épuré est recyclé et réintroduit en tête de procédé.

C'est donc sur ce concept qu'un procédé continu d'estérification en phase solide/gaz a été développé et breveté [16] pour son application à la production d'esters naturels par estérification directe d'acides et d'alcools naturels catalysée par la lipase industrielle immobilisée (lipase B de *Candida antarctica*), développée par Novo Nordisk sous le nom de Novozym 435.

Les spécifications techniques de l'installation réalisée (*figure 2*) sont présentées dans le *tableau I*. Cette installation représente un changement d'échelle d'un facteur 1 000 par rapport à l'installation de type laboratoire (*figure 3*), et tous les paramètres opératoires ont pu être reproduits aisément à cette échelle tels que les vitesses linéaires de gaz, les pertes de charges sur le lit catalytique et les conditions opératoires (pression, température et débits). Cette relative facilité de changement d'échelle a permis de développer une stratégie pour une optimisation rapide des différentes réactions d'estérification ciblées (*figure 4*), et leur transfert du laboratoire à l'échelle pré-industrielle. A titre d'exemple des



Figure 3 - Réacteur solide/gaz de laboratoire.

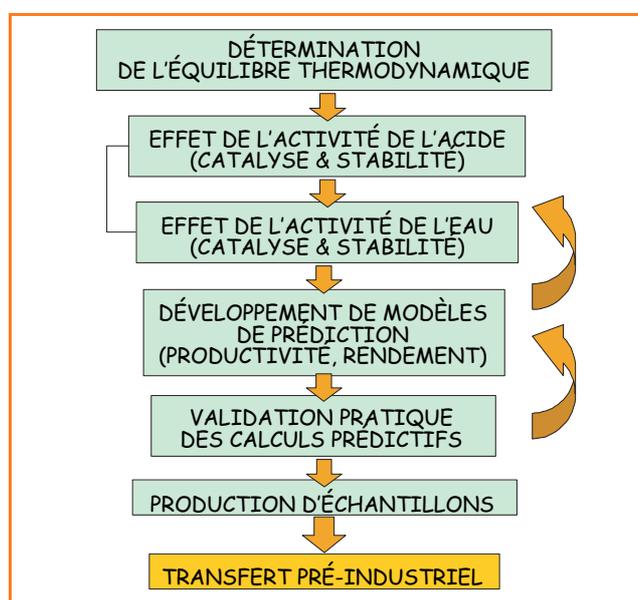


Figure 4 - Méthodologie d'optimisation rapide des synthèses ciblées pour leur transfert au stade pré-industriel.

performances observées à cette échelle, un taux de conversion en ligne supérieur à 95 % peut être obtenu aisément pour un niveau de productivité fixé à 2 kg/h d'ester et un temps de séjour inférieur à la demi-seconde.

On peut noter l'influence du caractère exothermique de la réaction sur les paramètres thermodynamiques (légère baisse du taux de conversion couplée à l'augmentation de la température de sortie), puisqu'une différence de plus de 15 degrés existe entre les températures d'entrée et de sortie. Lorsqu'un mélange partiellement converti est utilisé en alimentation (64 % de conversion dans cet exemple), alors la différence de température chute brusquement pour se stabiliser à environ 1/3 de la valeur précédente. L'influence thermodynamique est alors visible, et la conversion finale redevient légèrement supérieure (95 %) conformément aux calculs de point d'équilibre.

L'optimisation finale du procédé a donc consisté à prendre en compte le paramètre exothermique de la réaction pour adapter les paramètres opératoires, afin de garantir la stabilité en fonctionnement du catalyseur.

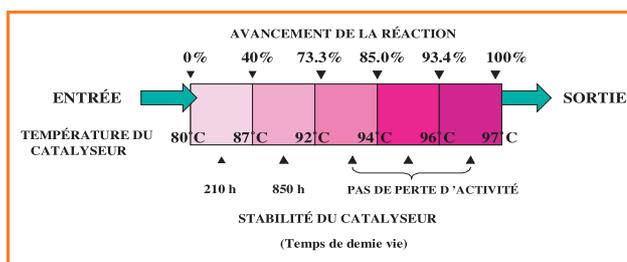


Figure 5 - Évolution de la stabilité du catalyseur et de sa température sur 5 tranches identiques de catalyseur d'un réacteur lors de la production de propionate d'alkyle. La productivité est fixée à 2 kg/h.

Des études plus poussées ont été effectuées et le comportement du lit catalytique a été modélisé pour les différentes réactions afin de contrôler les paramètres cinétiques et la stabilité du procédé (figure 5).

Aujourd'hui, une vingtaine de synthèses d'esters naturels (C_5 à C_{11}) ont été optimisées et transférées au stade préindustriel pour les acides de C_1 à C_4 , et pour une gamme d'alcools allant de C_1 à C_7 . Les productivités atteintes sont comprises entre 2 et 3 kg d'esters/h x kg de catalyseur, à l'exception d'une classe d'esters dont la vitesse sur l'alcool nécessite deux fois plus de catalyseur.

Le contrôle thermodynamique de tous les paramètres de réaction offert par la technologie solide/gaz (activités des substrats et produits, contrôle de l'hydratation du catalyseur), la méthodologie de développement choisie, et la facilité des opérations de « scaling up » ont alors permis la définition et le démarrage d'un procédé économiquement viable pour la production d'esters naturels à propriété d'arômes.

Vers d'autres applications de la technologie

Si la production d'esters naturels est le premier exemple de l'application à grande échelle de la biocatalyse solide/gaz, de nombreux autres champs d'applications sont aujourd'hui étudiés avec un développement envisageable à court ou moyen terme.

Les lipases offrent un potentiel d'applications important puisqu'elles sont en effet capables de réaliser aussi bien des réactions d'estérification (trans-estérification, acidolyse ou alcoololyse) que d'hydrolyse. De plus, leur spécificité et/ou sélectivité peut être mise à profit dans la production de molécules à haute valeur ajoutée (acylation stéréospécifique ou résolution de mélanges racémiques, d'esters ou d'alcools à chaîne courte à modérément longue). Leur utilisation aisée en catalyse solide/gaz offre donc un champ d'applications potentiellement important.

La biocatalyse solide/gaz ne reste cependant pas synonyme d'utilisation d'enzymes isolées et purifiées. La mise en œuvre de cellules entières en catalyse solide/gaz présente un intérêt particulier, d'une part par l'abaissement des coûts relatifs au catalyseur, d'autre part par la possibilité de coupler plusieurs systèmes enzymatiques en cascade pour des procédés nécessitant plusieurs étapes (cas de la dépollution d'effluents gazeux par exemple).

Le prochain challenge concerne donc la mise en œuvre de cellules entières en catalyse solide/gaz pour n'utiliser qu'une activité enzymatique ciblée ou pour permettre une cascade de réactions.

L'utilisation de cellules pour des étapes monoenzymatiques

Une catégorie d'enzymes, les alcools déshydrogénases, présente un intérêt particulier puisqu'elles sont non seulement capables de catalyser des réactions d'oxydoréduction d'alcools primaires ou secondaires avec des spécificités plus ou moins importantes selon leur origine, mais peuvent aussi permettre l'obtention d'énantiomères optiquement purs lors de la réduction de cétones. Elles présentent cependant un inconvénient majeur qui est l'utilisation d'un cofacteur nicotinamide relativement coûteux. Ainsi, l'utilisation de cellules entières utilisées comme sac à enzymes et contenant le cofacteur a-t-elle retenu l'attention des chercheurs souhaitant une régénération *in situ* du cofacteur. Cependant, les systèmes développés ont tous été confrontés au problème de lavage du cofacteur par la phase liquide conduisant à l'arrêt des systèmes catalytiques mis en œuvre.

L'utilisation de la catalyse solide/gaz peut alors apporter une réponse à ce problème, puisque l'entraînement du cofacteur par un gaz circulant est quasi impossible à cause de sa pression de saturation quasi nulle. En 2001, Maugard et coll. ont ainsi pu montrer que la réduction d'aldéhydes en alcools primaires par de la levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* pouvait être réalisée en catalyse solide/gaz, avec une régénération efficace du cofacteur (figure 6).

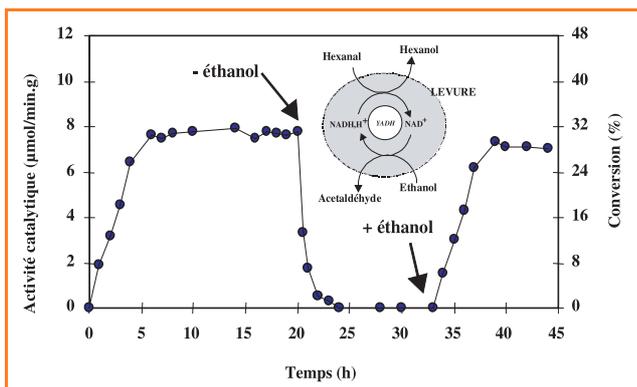


Figure 6 - Mise en évidence de l'efficacité de la régénération du cofacteur en présence d'un co-substrat (éthanol) lors de la réduction d'hexanal catalysée par la levure de boulangerie. La température est de 65 °C, l'activité de l'hexanal est de 0,05, celle de l'éthanol de 0,1 et celle de l'eau de 0,57.

Mais l'oxydation peut aussi s'affranchir de la présence du cofacteur par l'utilisation d'alcools oxydases. L'oxydation d'alcools primaires par des cellules de *Pischia pastoris* a ainsi été réalisée en catalyse solide/gaz [4-5], en association avec d'autres activités enzymatiques (catalase ou peroxydase), permettant un accroissement de stabilité du catalyseur par l'élimination des espèces activées de l'oxygène produites au cours de la réaction.

Ces travaux ont cependant mis en évidence un effet important de la matrice cellulaire dans laquelle est emprisonnée l'enzyme, qui modifie complètement les conditions d'hydratation nécessaires à l'expression de l'activité catalytique recherchée. L'optimisation de ces systèmes doit donc passer maintenant par une meilleure compréhension des effets dus aux macro- et micro-environnements de l'enzyme exprimant l'activité souhaitée.

Plusieurs étapes en cascade peuvent se succéder dans une cellule en catalyse solide/gaz

La possibilité de mener au sein d'une même cellule une cascade de réactions offre un débouché important à la technologie solide/gaz dans le champ des activités de dépollution, et plus particulièrement dans le traitement des effluents gazeux. Suite aux travaux de Hou en 1984, utilisant la méthane monooxygénase d'une bactérie méthanotrophe (*Methylosinus sp* CRL 31) pour la production d'époxydes [17], des tests de dégradation du trichloréthylène par *Methylosinus trichosporium* ont été effectués. Si l'action de la méthane monooxygénase est la seule à s'exprimer, la catalyse donne lieu à la formation soit d'époxyde puis de dichloroacétate, soit d'hydrate de chloral. L'action simultanée de déshydrogénases ou d'autres monooxygénases en cascade permet par contre de dégrader complètement le trichloréthylène, soit en intermédiaires métaboliques, soit en CO₂ et HCl dans le cas d'une dégradation complète (figure 7).

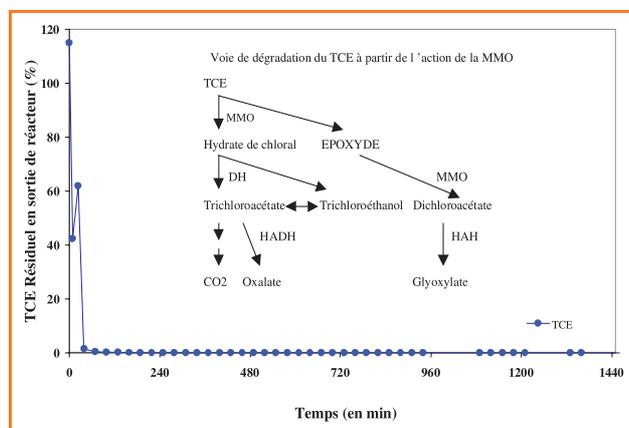


Figure 7 - Élimination de trichloréthylène en catalyse solide/gaz par des cellules lyophilisées de *M. trichosporium*. Un réacteur de 49 mg de cellules lyophilisées est alimenté avec un gaz dont les caractéristiques sont les suivantes : température = 40 °C, a_w = 0,7, a_{TCE} = 0,1, a_{méthanol} = 0,1. Débit total = 500 µmoles/min.

Les capacités des cellules lyophilisées de *M. trichosporium* ont alors été testées en catalyse solide/gaz, et la totalité du trichloréthylène présent dans le gaz d'alimentation est éliminée en continu pendant les 24 heures de test. Aucun produit de l'action de la méthane monooxygénase (époxyde ou hydrate de chloral) n'a pu être jusqu'à présent mis en évidence dans le gaz de sortie, traduisant une possible réutilisation par un second (ou plusieurs) système(s) enzymatique(s).

Compte tenu du champ de molécules à éliminer, la réalisation de cascades enzymatiques apparaît vitale pour le développement de biofiltres, et les exemples se multiplient avec l'élimination d'alkanes ou d'organochlorés par des bactéries méthanotrophes, ou l'élimination des phénols par des souches de *Pseudomonas*. Cependant, alors que la faisabilité a été démontrée, l'optimisation et le développement de ces procédés au niveau industriel restent à faire.

On le voit par ces quelques exemples, la biocatalyse solide/gaz permet la mise en œuvre de nombreuses activités enzymatiques très variées, et permet de multiples applications. Cependant, il est important de noter que la technologie ne reste compatible qu'avec des produits

et substrats de masse molaire relativement modérée, c'est-à-dire présentant une volatilité assez importante.

Certaines applications ne nécessitent pas nécessairement l'expression de l'activité catalytique

En marge des applications potentielles de synthèse ou de transformation, l'utilisation de la technologie solide/gaz ouvre le champ au développement d'une nouvelle génération de biocapteurs. Un biocapteur est défini par une partie biologique constituant l'organe de détection, et un transmetteur. S'ils ont été majoritairement étudiés sur des milieux liquides ou semi solides, quelques exemples sont cependant donnés dans la littérature sur des milieux gazeux [8]. La détection du formaldéhyde par une formaldéhyde déshydrogénase recouvrant un cristal piézo-électrique a pu être réalisée avec une sensibilité allant de 1 à 100 ppm. Les détections de pesticides en utilisant l'acétylcholinestérase pour la détection d'un organophosphoré, ou la butyrylcholinestérase pour la détection du malathion ont aussi été réalisées au niveau du ppb. Enfin, des biocapteurs très spécifiques ont été développés en utilisant des anticorps dirigés contre le parathion, ou encore la benzoylécognine pour la détection de la cocaïne. Comme en témoignent ces exemples, l'adsorption spécifique permettant la réalisation de biocapteurs est possible et de nouvelles applications comme le développement de filtres sélectifs régénérables ou le développement de techniques analytiques telles que la chromatographie d'affinité en phase gazeuse sont envisageables.

Conclusion

Ces systèmes allient performance et productivité importante tout en offrant une relative simplicité de mise en œuvre. La capacité d'un contrôle thermodynamique précis sur chaque constituant du gaz permet une maîtrise aussi bien des paramètres cinétiques que de la stabilité en fonctionnement des catalyseurs biologiques. Pour preuve, il devient possible dans ces systèmes d'utiliser un catalyseur biologique à des températures bien supérieures à celles du monde du vivant malgré la présence d'eau sous forme de vapeur. De plus, les phénomènes de diffusion étant considérablement minimisés, ces réacteurs sont capables de fonctionner avec des temps de séjour 100 à 1 000 fois plus faibles que ceux traditionnellement utilisés dans les procédés liquides à taux de conversion identique.

D'autres améliorations sont encore en développement pour la production de molécules à haute valeur ajoutée. L'utilisation de la stéréospécificité ou de la stéréosélectivité, soit des lipases pour la résolution de mélanges racémiques, soit des alcools déshydrogénases pour la production d'alcools chiraux à partir des cétones correspondantes, doit

permettre d'autres développements à caractère industriel et commercial de la technologie. Enfin, le développement de nouveaux outils d'analyse ou de détection/prévention doit pouvoir tirer parti de ces recherches et connaître de nouvelles réalisations technologiques.

Remerciements

Ce travail a bénéficié des aides de l'ANVAR Poitou-Charentes, du Conseil Régional Poitou-Charentes, de la Communauté d'Agglomérations de La Rochelle et de l'Union Européenne, dans le cadre d'un projet de démonstration BIO CT4 98-0390.

Références

- [1] Yagi T., Tsuda M., Mori Y., Inokuchi H., *J. Am. Chem. Soc.*, **1969**, *91*, p. 2801.
- [2] Pulvin S., Legoy M.D., Lortie R., Pensa M., Thomas D., *Biotechnol. Lett.*, **1986**, *8*, *11*, p. 783.
- [3] Pulvin S., Parvaresh F., Thomas D., Legoy M.D., *Ann. NY Acad. Sci.*, **1988**, *545*, p. 434.
- [4] Barzana E., Klíbanov A., Karel M., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **1987**, *15*, p. 25.
- [5] Barzana E., Klíbanov A., Karel M., *Biotechnol. Bioeng.*, **1989**, *34*, p. 1178.
- [6] Duff S., Murray W., *Process Biochemistry*, **1990**, p. 40.
- [7] Parvaresh F., Robert H., Thomas D., Legoy M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *39*, p. 467.
- [8] Lamare S., Legoy M.D., *Trends in Biotechnol.*, **1993**, *11*, *10*(117), p. 413.
- [9] Lamare S., Legoy M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **1997**, *57*, p. 1.
- [10] Kim C., Rhee S.-K., *Biotechnol. Lett.*, **1992**, *14*, p. 1059.
- [11] Yang F.-X., Russell A.J., *Biotechnol. Bioeng.*, **1996**, *49*, p. 700.
- [12] Maugard T., Lamare S., Legoy M.D., *Biotechnol. Bioeng.*, **2001**, *73*, p. 164.
- [13] Uchiyama H., Oguri K., Yagi O., Kokufuta E., *Biotechnol. Lett.*, **1992**, *14*, p. 619.
- [14] Zilli M., Converti A., Lodi A., Del Borghi M., Ferraiolo G., *Biotechnol. Bioeng.*, **1992**, *41*, p. 693.
- [15] Lamare S., Legoy M.D., *L'Act. Chim.*, **1995**, juin-juillet, p. 33.
- [16] Lamare S., Legoy M.D., International Patent, **1999**, WO 99/04894.
- [17] Hou C., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **1984**, *19*, p. 1.



S. Lamare



I. Goubet

Sylvain Lamare, Isabelle Goubet et Thierry Maugard sont maîtres de conférences au Laboratoire de génie protéique*, que dirige **Marie Dominique Legoy. Karine Roule-Woiry** y a effectué sa thèse.



T. Maugard



M.D. Legoy

* Laboratoire de génie protéique et cellulaire, Université de La Rochelle, bâtiment M. Curie, avenue M. Crépeau, 17042 La Rochelle Cedex 1.
Tél. : 05 46 45 82 75.
Fax : 05 46 45 82 47.
E-mail : slamare@univ-lr.fr