



HAL
open science

Réacteurs milli-structurés pour le scale-up de bioréacteurs en flux avec enzymes immobilisées en parois

Maité Michaud, Chalore Teepakorn, Véronique de Berardinis, Anne Zaparucha, Guillaume Nonglaton, Thierry Baffie, Pierre Coste, Zoé Anxionnaz-Minvielle

► To cite this version:

Maité Michaud, Chalore Teepakorn, Véronique de Berardinis, Anne Zaparucha, Guillaume Nonglaton, et al.. Réacteurs milli-structurés pour le scale-up de bioréacteurs en flux avec enzymes immobilisées en parois. Congrès de la SFGP 2024, Société française de génie des procédés, Oct 2024, Deauville, France. cea-04887309

HAL Id: cea-04887309

<https://cea.hal.science/cea-04887309v1>

Submitted on 14 Jan 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Réacteurs milli-structurés pour le scale-up de bioréacteurs en flux avec enzymes immobilisées en parois

Maïté MICHAUD¹, Chalore TEEPAKORN¹, Véronique De BERARDINIS², Anne ZAPARUCHA², Guillaume NONGLATON³, Thierry BAFFIE¹, Pierre COSTE¹ et Zoé ANXIONNAZ-MINVIELLE¹

¹Univ. Grenoble Alpes, CEA, LITEN, France

²Génomique Métabolique, Genoscope, CEA, CNRS, Univ Evry, Univ. Paris-Saclay, France

³Univ. Grenoble Alpes, CEA, LETI, France

zoe.minvielle@cea.fr

CONTEXTE DE L'ETUDE

L'exploitation des enzymes, en substitut des catalyseurs chimiques, permet de répondre aux exigences d'éco-responsabilité et de sobriété énergétique des procédés. Cependant, face à la concurrence, les biosynthèses se doivent d'être également rentables. Ce défi passe par une réutilisation des enzymes et une production continue des produits d'intérêts (Bolivar et al., 2022). Pour l'industrie pharmaceutique, les réacteurs structurés avec enzymes immobilisées en parois sont la solution technique privilégiée (Basso et Serban, 2019). En revanche, la réduction systématique des réacteurs à l'échelle micrométrique rend le transfert à l'industrie coûteux et complexe (Hajba et al., 2016). Par ailleurs, un autre frein à leur industrialisation est le manque de protocoles d'immobilisation simples, efficaces, fiables, reproductibles et robustes (Bolivar et al., 2022).

De ce fait, les challenges en matière de transfert à l'industrie des bioréacteurs avec enzymes en parois sont élevés. Les réacteurs de taille millimétrique, fabriqués en impression 3D, présentent des caractéristiques pouvant répondre à l'ensemble des critères avancés. Or ce potentiel reste à démontrer car les études sur les bioréacteurs milli-structurés, notamment ceux usinés en fabrication additive, sont relativement récentes et peu nombreuses (Peris et al., 2017 ; Sriwong et Matsuda, 2022). L'objectif de l'étude est donc d'étudier, d'optimiser et de prédire les performances de ces bioréacteurs millimétriques en vue d'une industrialisation.

RESUME DES TRAVAUX

La molécule d'intérêt pour l'étude est la vitamine B3, synthétisée à partir de la 3-cyanopyridine (10 mmol/L) alimentée en continu à l'entrée du réacteur à 0.04 mL/min (Fig. 1). L'avancement de la réaction au cours du temps, X, est suivi par analyse HPLC. Le milli-réacteur est un réacteur à piliers, obstacles de forme cylindrique, dont la hauteur de la chambre mesure 1 mm, avec un volume disponible d'environ 0.5 mL.

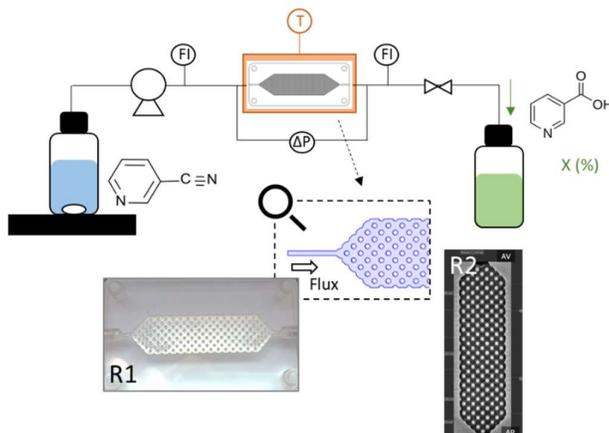


Fig. 1. Schéma du montage expérimental pour la transformation de la 3-cyanopyridine en acide nicotinique et photographies des réacteurs R1 et R2 (vue tomographie).

L'enzyme nitrilase a été immobilisée par liaison covalente sur deux types de réacteurs à piliers afin de comparer l'effet de la stratégie d'immobilisation : (i) R1, un réacteur usiné en polyméthacrylate, PMMA, recouvert de microbilles nanoporeuses en surface, (ii) et R2, un réacteur métallique fabriqué en impression 3D. Dans une optique de mise à l'échelle industrielle des réacteurs, la préparation des surfaces de R2 et son assemblage sont moins complexes que pour R1. R2 est également plus robuste. En revanche, la charge en enzymes dans R1 est de $1200 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{m}^2$ contre $226 \text{ mg}_{\text{enz}}/\text{m}^2$ dans R2, ce qui reste légèrement supérieur à celles

relevées dans la littérature, de 70-130 mg_{enz}/m² pour les réacteurs en fabrication additive (i.e., Peris et al., 2017 ; Sriwong et Matsuda, 2022).

Lors des essais de biocatalyse en flux sur R1 (cf. figure 2), après activation de l'enzyme (de t₀ à t₀+5h), le rendement de réaction maximal (i.e. X_{sh} à 85%) a chuté de moitié au bout de 5,5 jours d'utilisation en continu. Le turnover est alors de 148 mg de produit par mg d'enzymes immobilisées, ce qui est supérieur au minimum de rentabilité des produits à haute valeur ajoutée, fixé à 100 (Basso et Serban, 2019). Pour R2, les essais en flux sont actuellement en cours de réalisation.

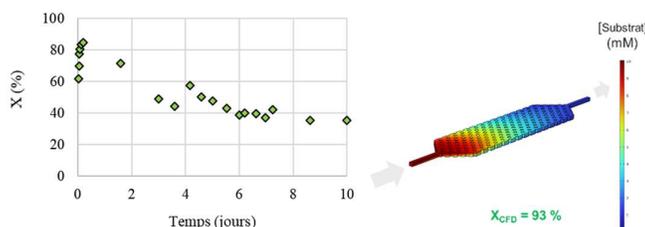


Fig. 2. Evolution de la conversion au cours du temps dans le réacteur biocatalytique R1 (à gauche) et modélisation CFD (à droite) du point de conversion maximale (t=5h).

Un modèle CFD 3D a été développé avec le logiciel COMSOL, en considérant (i) un écoulement laminaire, (ii) un transfert de masse des espèces en milieu dilué, (iii) et une réaction de surface avec une cinétique de type Michaelis-Menten. Cette cinétique a été établie via des résultats expérimentaux produits à cet effet en batch sur les billes de PMMA. Pour R1, la géométrie CAO a été ajustée en considérant le volume occupé par les billes en surface et pour R2, en considérant les dimensions issues des analyses tomographiques. Le modèle permet une prédiction des performances avec une déviation relative de 9% pour R1 ce qui est acceptable pour une étude de sensibilité des paramètres (cf. figure 2).

Les simulations de sensibilité aux différents paramètres cibles (i.e. hauteur de chambre, répartition des enzymes en parois, ratio surface-sur-volume) démontrent que les performances sont caractérisées par un régime mixte, avec une influence de l'efficacité de mélange et de l'efficacité de réaction. Le ratio surface-sur-volume et la répartition des enzymes dans le réacteur (dépendante de la stratégie d'immobilisation des enzymes et du type de réacteur) sont les deux principaux leviers d'action pour l'optimisation de la productivité (mol/min/mg_{enz}). Une perspective d'étude expérimentale intéressante pour l'optimisation des performances serait la génération d'instabilités dans l'écoulement pour améliorer l'efficacité de mélange en utilisant une enzyme plus active.

MOTS-CLES DU THEME

Fabrication en continu, intensification et miniaturisation, modélisation, simulation, réduction de modèle

MOTS-CLES LIBRES

Fabrication Additive, biocatalyse, milli-réacteur continu, immobilisation d'enzymes, nitrilase

RÉFÉRENCES

Basso, A., and Serban, S., 2019, Industrial applications of immobilized enzymes—A review, *Molecular Catalysis*, 479: 110607, <https://doi.org/10.1016/j.mcat.2019.110607>.

Bolivar, J.M., Woodley, J.M., and Fernandez-Lafuente, R., 2022, Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization, *Chem Soc Rev*, 51:6251, <https://doi.org/10.1039/D2CS00083K>.

Hajba, L., and Guttman A., 2016, Continuous-Flow Biochemical Reactors: Biocatalysis, Bioconversion, and Bioanalytical Applications Utilizing Immobilized Microfluidic Enzyme Reactors, *Journal of Flow Chemistry*, 6:8–12, <https://doi.org/10.1556/1846.2015.00028>.

Peris, E., Okafor, O., Kulcinskaja, E., Goodridge, R., Luis, S.V., Garcia-Verdugo, E., O'Reilly, E., Sans, V., 2017, Tuneable 3D printed bioreactors for transaminations under continuous-flow, *Green Chemistry*, 19: 5345–5349, <https://doi.org/10.1039/C7GC02421E>.

Sriwong, K.T., Matsuda, T., 2022, Facile mussel-inspired polydopamine-coated 3D-printed bioreactors for continuous flow biocatalysis, *Reaction Chemistry and Engineering*, 7: 1053–1060, <https://doi.org/10.1039/D2RE00040G>.