

# La Bio-ingénierie

## 1. Généralités

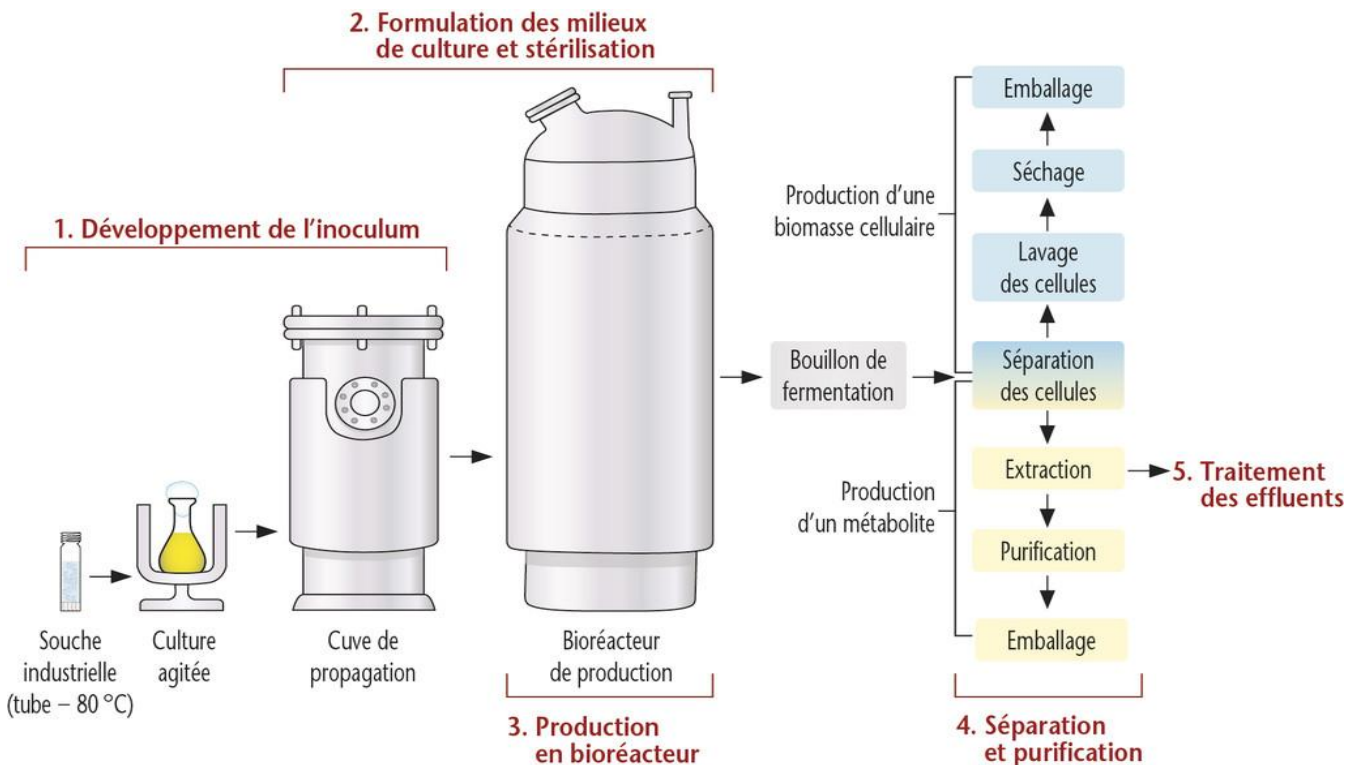
La bio-ingénierie dans la microbiologie appliquée et industrielle implique l'application de techniques d'ingénierie pour manipuler les micro-organismes et exploiter leurs capacités biologiques à des fins bénéfiques pour la santé, l'environnement et l'industrie.

La fermentation industrielle est un processus clé utilisé dans de nombreuses industries pour produire une large gamme de produits utiles en exploitant l'action de micro-organismes tels que les bactéries, les levures et les champignons. Le but principal de la fermentation industrielle est de convertir des matières premières (habituellement des substrats organiques) en produits finis de grande valeur en grande quantité dans un temps court et au moindre coût possible.

Pour ce faire, on doit cultiver un microorganisme dans des conditions physico-chimiques contrôlées au sein d'une enceinte de grand volume spécialement conçu à cet effet : le bioréacteur ou fermenteur.

On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation :

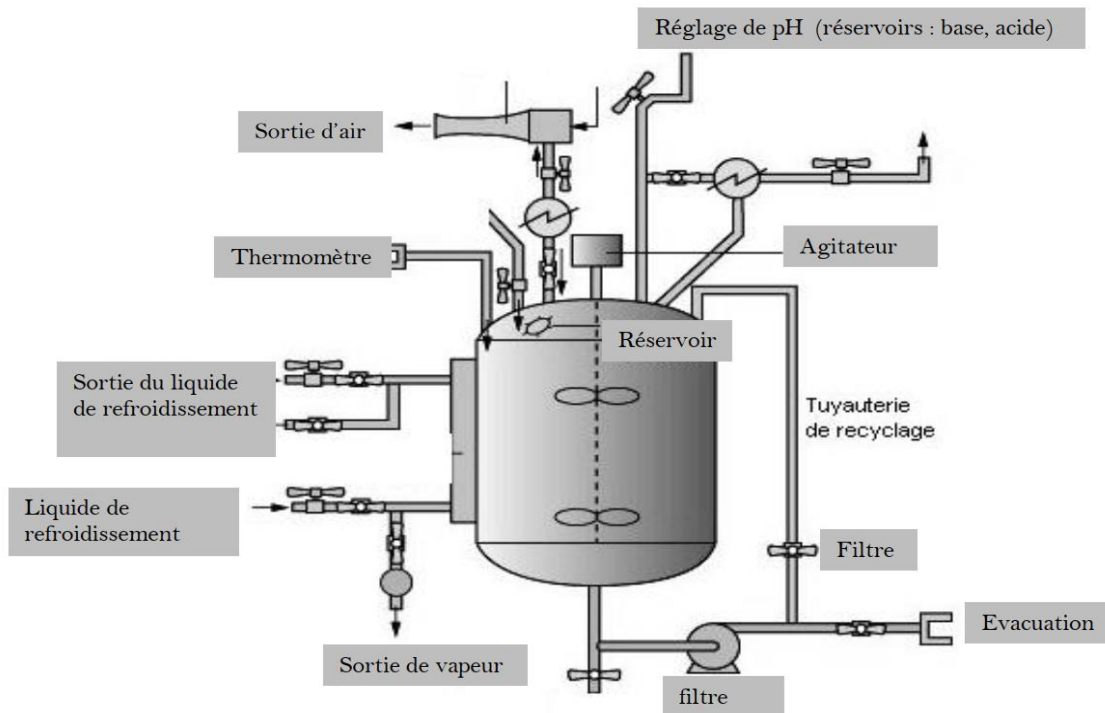
- la fabrication du milieu de culture ;
- la stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture ;
- la préparation de l'inoculum ;
- la production en bioréacteur ;
- l'extraction du produit et sa purification.



## 2. C'est quoi un fermenteur ou bioréacteur ?

Un bioréacteur (ou fermenteur), par définition, est une enceinte en verre ou en acier inoxydable permettant d'assurer une croissance des micro-organismes et une production optimale dans un environnement dont les paramètres physiques et chimiques de la fermentation sont contrôlés. Il comporte :

- Une enceinte de culture, en verre ou en acier inoxydable, dont le rapport hauteur / Diamètre se situe entre 2 et 5, avec un volume variable allant de quelques litres jusqu'à plusieurs mètres cubes dans le cas d'unités industrielles. La cuve est hermétiquement fermée et la tôle doit supporter la pression de vapeur de stérilisation.
- Un système d'agitation (selon le cas) est utilisé pour assurer l'agitation et l'aération de la culture, il est formé par un moteur externe, et un ou plusieurs turbines intérieures (selon la taille de fermenteur).
- Une seringue pour injecter le milieu de culture ou des éléments nutritifs.
- Des sondes pour la vérification de la température (thermomètre), du pH (pH-mètre), de la concentration en oxygène dissous (sonde oxymétrique),
- Une unité de contrôle gérée par un ordinateur permet d'enregistrer et piloter tous les paramètres de fonctionnement.



**Figure :** Schéma général d'un fermenteur.

➤ On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal (image):

- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 L ;
- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables *in situ* jusqu'à 30 L ;
- les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 L ;
- les bioréacteurs industriels jusqu'à 500000 L (500 m3).



Bioréacteur de laboratoire stérilisable à l'autoclave Tryton™ (1 à 18 L)



Bioréacteur de laboratoire stérilisable *in situ* BioPro™ (10 à 30 L)



Bioréacteur BioPro™ série Pilote (60 à 300 L)



Bioréacteur BioPro™ série Industrie (600 à 30 000 L)

**Image : Bioréacteur de laboratoire, bioréacteur pilote et bioréacteur industriel.**

## ➤ Critères de conception d'un bioréacteur

Les critères de conception d'un bioréacteur industriel découlent de la réaction biologique de fermentation que l'on souhaite mettre en œuvre dans le but de produire soit de la biomasse soit des molécules contenues dans le micro-organisme ou produites par ce dernier. En fonction du métabolisme sélectionné, les bioréacteurs sont conçus tel qu'ils doivent assurer 5 grandes fonctions :

- Maintien de la stérilité
- Bons transferts de matière
- Bon transfert de chaleur
- Suivi des paramètres et conduite de régulations
- La Nettoyabilité

### 2.1. Principaux types de bioréacteurs

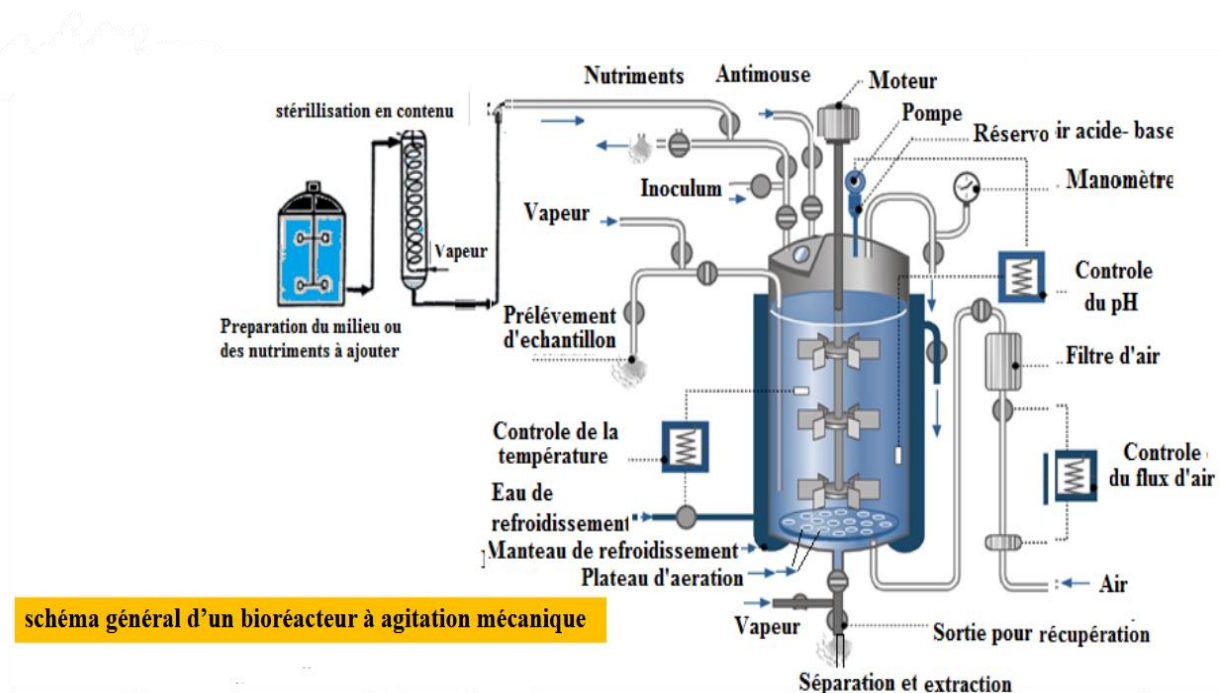
Comparativement aux réactions chimiques, les bioréactions s'effectuent toujours dans un solvant, l'eau, et les concentrations en substrats et produits, ainsi que les vitesses de réaction, sont faibles. Pour obtenir des productions convenables, il est donc nécessaire de recourir à des volumes réactionnels et des temps de séjour importants, par exemple, en brasserie, la fermentation principale s'effectue dans des cuves pouvant atteindre 600 m<sup>3</sup> et dure de 5 à 10 jours.

Les principaux appareils utilisés pour effectuer des bioréactions sont les cuves mécaniquement agitées, aérées ou non, les bioréacteurs à agitation pneumatique qui comportent les colonnes à bulles et les air-lifts.

#### 2.1.1. Cuve mécaniquement agitée

La cuve mécaniquement agitée est le réacteur choisi lorsque tous les acteurs de la bioréaction (substrats, enzymes, micro-organismes) sont dans une phase liquide unique. Sous réserve d'une agitation suffisante pour que la phase liquide soit parfaitement mélangée, le seul phénomène à prendre en compte dans le dimensionnement et la conduite du bioréacteur est la vitesse de la bioréaction.

La cuve agitée est employée pour effectuer des réactions enzymatiques avec des enzymes en solution ou encore des fermentations anaérobies. Dans ce dernier cas, le gaz carbonique produit se désorbe du milieu de culture sous forme de bulles, mais sa concentration en phase liquide, constante et donnée par la loi de Henry, n'intervient pas, en général, dans l'expression de la vitesse de croissance du micro-organisme.



### 2.1.2. Cuve mécaniquement agitée aérée

La cuve mécaniquement agitée aérée est utilisée pour la production de micro-organismes en aérobiose. L'oxygène qui est très peu soluble dans les milieux de fermentation (8 mg/L à 25 °C dans l'eau) est alors le substrat limitant.

La vitesse globale de formation des micro-organismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée vers le milieu de fermentation. La puissance mécanique consommée sert à la fois à mélanger la phase liquide et à générer une aire interfaciale importante entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation.

### 2.1.3. Les bioréacteurs à agitation pneumatique

- **La colonne à bulles** est un réacteur également utilisé pour la production de micro-organismes en aérobiose. Les bulles d'air injectées à la base de la colonne apportent l'oxygène aux micro-organismes et mélangent la phase liquide au cours de leur mouvement ascendant. Comme pour la cuve mécaniquement agitée aérée, la vitesse globale de formation des micro-organismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée vers le milieu de fermentation.

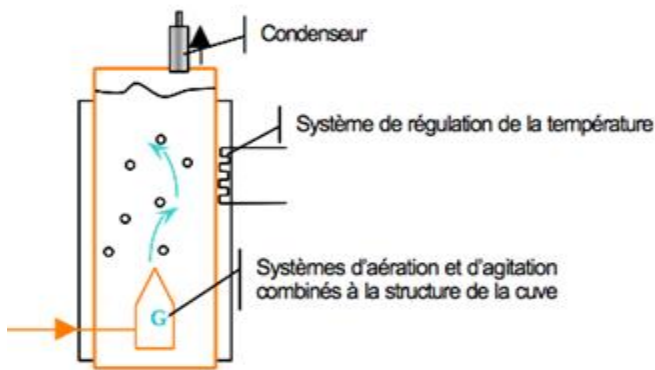
Comparativement à la cuve mécaniquement agitée aérée, la colonne à bulles ne comporte pas de pièces en mouvement et ne consomme pas de puissance mécanique d'agitation. Sa fiabilité est plus grande et son coût en investissement et en fonctionnement plus faible. Par



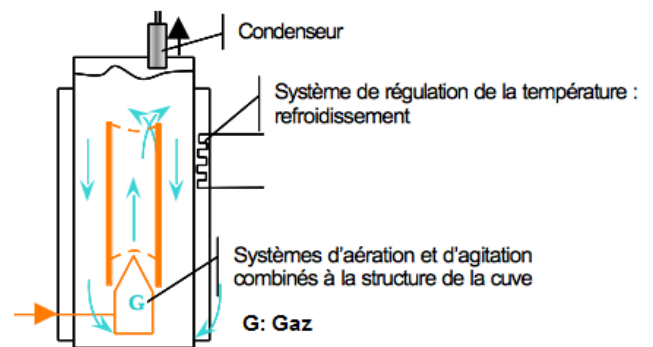
contre, ses performances de transfert d'oxygène sont nettement moins bonnes, car aucun effet mécanique ne vient s'opposer à la coalescence des bulles de gaz, phénomène qui diminue l'aire interfaciale entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation.

La colonne à bulles est aussi employée lors des fermentations anaérobies, l'agitation pneumatique étant alors réalisée par les bulles de gaz carbonique dégagées *in situ* pendant la fermentation ; on peut citer, à titre d'exemple, les cuves de vinification.

- **Le réacteur air-lift** ou **gazo-siphon** est un appareil dérivé de la colonne à bulles et est utilisé pour les seules cultures aérobies. Un flux d'air est réalisé à la base du fermenteur. Il est caractérisé par l'existence de compartiments. Ces envois d'air provoquent une agitation moléculaire importante, ce qui entraîne une élévation de la température importante : il faut donc refroidir de tels fermenteurs. Ils sont généralement de grande capacité (de 0,5 m<sup>3</sup> à 5 000 m<sup>3</sup>) et de forme cylindrique.



**La colonne à bulle**

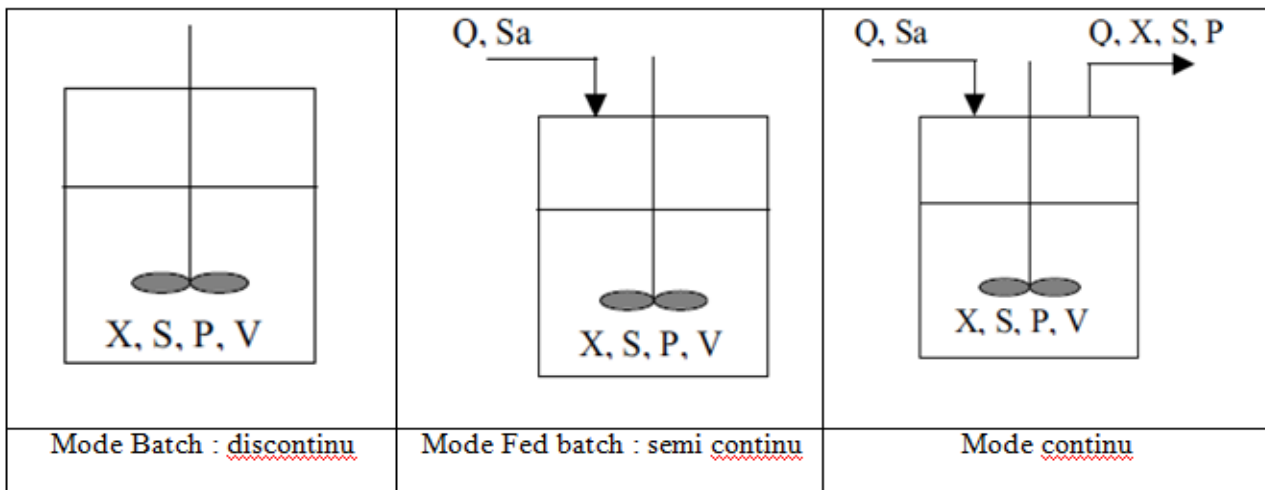


**Air-lift ou gazo-siphon**

## 2.2. Modes de conduite des bioréacteurs

Pour conduire une fermentation à l'échelle industrielle en utilisant une souche microbienne dont les exigences et la cinétique de croissance sont connues, il est crucial de sélectionner le mode de fermentation le plus adapté. Cela permet de produire efficacement la substance recherchée dans un bioréacteur. Ce choix stratégique de mode de fermentation est essentiel pour garantir un processus industriel efficace et optimal, en tenant compte des besoins spécifiques de la souche microbienne et des objectifs de production visés. Il existe trois types de procédés (modes) de fermentation :

- Le mode **batch** ou fermentation discontinue ;
- Le mode **fed-batch** ou fermentation discontinue alimentée ;
- Le mode de culture continu.



### Les trois modes de conduite de bioréacteurs

Concentrations en substrats (S), biomasse (X), produits (P), volume donné (V)

#### 2.1. Fermentation discontinue (*batch*)

Une fois le fermenteur rempli de milieu de culture et stérilisé, ou bien stérilisé à vide puis rempli de milieu de culture stérilisé séparément, l'inoculum est introduit pour démarrer la fermentation. Pendant toute la durée de la culture, aucun ajout de milieu de culture n'est effectué (système clos), à l'exception éventuelle d'un réactif de neutralisation ou d'un produit antimousse en petite quantité. La concentration en biomasse augmente conformément à la courbe de croissance microbienne, tandis que le microorganisme consomme le substrat et que le produit recherché se forme, augmentant sa concentration (P). À la fin de la culture, le fermenteur est vidé et le produit final est extrait.

#### 2.2. Fermentation discontinue alimentée (*fed-batch*)

La fermentation démarre dans un petit volume de milieu de culture préalablementensemencé avec l'inoculum (pied de cuve). Un démarrage rapide de la fermentation est favorisé par une concentration élevée d'inoculum, et une fois que le microorganisme entre en phase exponentielle de croissance, le milieu de culture stérile est introduit dans la cuve principale. Le débit d'alimentation est ajusté pour maintenir une concentration constante en substrat dans la cuve, correspondant à une phase logarithmique de croissance cellulaire. Après le remplissage de la cuve, l'alimentation est stoppée, la culture suit alors la courbe de croissance de manière discontinue.

#### 2.3. La fermentation continue

Dans ce procédé, un état d'équilibre dans la cuve est maintenu par l'alimentation de milieu et le soutirage de façon continue. Le microorganisme est resté dans un état physiologique constant ou il produit de façon maximale.

### **2.3.1. Le mode continu sans recyclage de la biomasse**

En fermentation en mode continu, la croissance débute en système fermé pour favoriser la croissance maximale de la biomasse jusqu'à la phase exponentielle. Une fois ce point atteint, l'alimentation en milieu frais démarre et le milieu usé est soutiré pour maintenir des concentrations constantes dans le fermenteur. Après une phase transitoire, les concentrations se stabilisent, maintenant les cellules en croissance exponentielle pour une productivité maximale. Les produits ne s'accumulent pas dans la culture car ils sont évacués vers une cuve de soutirage pour récupération.

### **2.3.2. Le mode continu avec recyclage de la biomasse**

En fermentation en mode continu, le taux de dilution de la culture est limité par le taux de croissance spécifique maximal ( $\mu_{max}$ ) du microorganisme, et la concentration en biomasse reste constante car les cellules sont retirées aussi vite qu'elles se multiplient. Pour optimiser le processus, des techniques de recyclage de la biomasse sont utilisées, telles que la microfiltration membranaire, permettant de réintroduire la biomasse récupérée dans le réacteur. Cela évite les pertes de microorganismes et augmente la concentration en biomasse au fil du temps. Le filtrage sous pression sur une membrane de porosité absolue retient les microorganismes dans la culture soutirée, dont le débit doit correspondre à celui de l'alimentation en milieu frais pour maintenir le volume de culture constant.

## **2.3. Modélisation des cultures en fermenteur**

La modélisation d'une culture microbienne consiste à représenter mathématiquement les dynamiques de croissance et de métabolites des microorganismes. C'est une représentation simplifiée d'un problème : le modèle. Le modèle constitue une représentation possible du système pour un point de vue donné. Généralement, l'objectif de la modélisation est de répondre à trois besoins principaux : la compréhension des phénomènes, le contrôle et l'optimisation. En effet, le choix du modèle nécessite la définition de ces objectifs. La modélisation oblige le scientifique à mieux comprendre le procédé, puisque, lors de l'établissement du modèle, il est nécessaire de considérer les paramètres les plus importants du procédé, leurs effets et les traduire sous forme d'équation mathématiques. Après la formulation du modèle, celui-ci est résolu et les valeurs prédites sont comparées avec les valeurs expérimentales. Des données expérimentales sont nécessaires pour établir, ou valider le modèle.

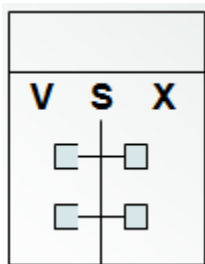
### **2.3.1- Modèle de la culture *batch***

A partir des données liées à la cinétique de croissance microbienne et la production de métabolites, il est possible de modéliser et d'optimiser les rendements et les productivités de culture qui attesteront de la performance du bioprocédé.



Considérons la culture « batch » d'une bactérie dans le but de produire de la biomasse (figure 15). Afin de faciliter l'étude, nous ferons les hypothèses suivantes:

- Le fermenteur est infiniment mélangé (culture homogène)
- Il n'y a pas de mortalité cellulaire
- Il n'y a pas de produit formé
- Le seul substrat limitant est la source carbonée (source énergétique)
- L'oxygène est apporté en excès.



**V** = volume de culture (ou volume utile) (m<sup>3</sup>)

**S** = concentration en substrat limitant au temps « t » (g/l)

**X** = concentration en biomasse (g/l) (avec une évolution de X<sub>0</sub> à X<sub>f</sub>)

L'indice « 0 » pour l'état initial et « f » pour l'état final.

**Figure 15** Illustration de la culture batch

Dans ces conditions, la courbe de croissance est comparable à celle décrite au paragraphe 1.5.2 (chapitre 1) et la courbe de Monod est applicable :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S}$$

La vitesse de croissance (g/l.h) est donnée par la relation suivante :

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu \cdot X, \text{ donc}$$

$$r_x = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} X \text{ Où,}$$

X : concentration en cellules (g de cellules/litre) ;

S : concentration en substrat limitant (g/l) ;

$\mu_m$  : taux de croissance maximum (h<sup>-1</sup>) ;

K<sub>s</sub>: constante de saturation du substrat (g/l).

En ce qui concerne **la consommation du substrat**, l'équation est donnée par l'équation suivante:

$$\frac{ds}{dt} = -r_s = -\left(\frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s \cdot X\right)$$

$$\frac{ds}{dt} = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s \cdot X \text{ où,}$$



$r_s$  : vitesse de consommation du substrat carboné (g/l.h) ;  
 $Y_{x/s}$ :coefficient de conversion du substrat carboné en biomasse ou rendement ; de bioconversion (g de biomasse formée par g de substrat consommé);  
 $m_s$  : constante de maintenance (g de substrat / g de cellules. H).

➤ **Estimation de  $\mu_m$  et de  $K_s$**

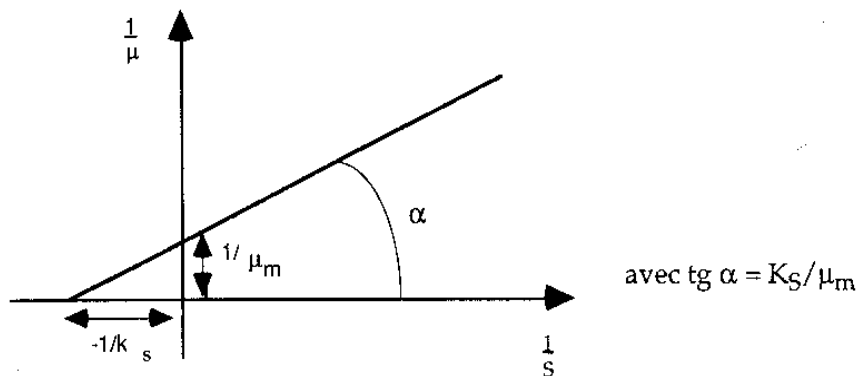
L'équation de Monod est utilisée pour obtenir les valeurs maximales du taux de  $\mu_{max}$  et de  $K_s$ .  
 La linéarisation de cette équation donne la droite  $\frac{1}{\mu}$  en fonction du  $\frac{1}{s}$  (figure 16)

Selon Monod :

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S}$$

L'inverse de l'équation de Monod donne :

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \frac{S + K_S}{S}$$



**Figure 16** Estimation de  $\mu_m$  et de  $K_s$

De cette représentation, les valeurs de «  $K_s$  » et  $\mu_m$  » peuvent être déduites

$$\frac{K_S}{\mu_{max}} = \text{pente de la droite du graphique}$$

$$\frac{1}{\mu_{max}} = \text{ordonnée à l'origine}$$

➤ **Estimation de  $Y_{x/s}$  et de  $m_s$**

La méthode d'estimation est similaire à celle décrite ci-dessus. La linéarisation de cette équation donne la droite  $\frac{r_s}{X}$  en fonction  $\frac{r_x}{X}$  (figure 17). En effet, à partir de l'expression de la vitesse de consommation en substrat:



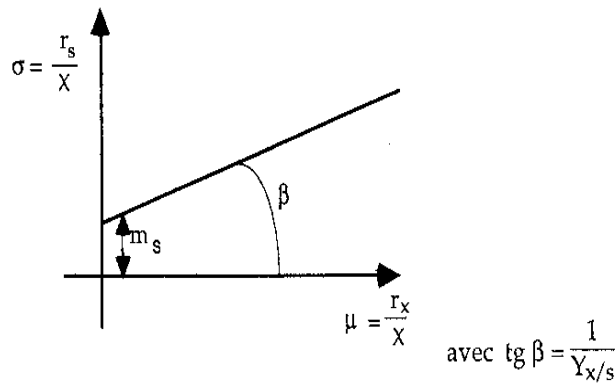
$$r_s = -\frac{ds}{dt} = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s \cdot X$$

La division de l'équation sur X donne :

$$\frac{r_s}{X} = \frac{1}{Y_{x/s}} \frac{r_x}{X} + m_s / r_x = \mu \cdot X$$

On peut écrire :

$$\frac{r_s}{X} = \frac{1}{Y_{x/s}} \mu + m_s$$



**Figure 17** Estimation de  $Y_{x/s}$  et de  $m_s$

### 2.3.1.1- Le rendement de la culture batch

Le rendement est une variable exprimant la transformation du substrat en biomasse (X) ou en produit (P). On le détermine en exprimant le rapport entre la quantité de biomasse ou de produits formés et la quantité de substrat consommé pendant une période donnée. Comme il s'agit d'un rapport sans unité, on l'exprime, par convention, en pourcentage. En mode discontinu, le rendement est calculé du début de la fermentation jusqu'à un moment choisi qui correspond généralement à l'arrêt de la fermentation.

### 2.3.1.2- Le rendement en biomasse

Le rendement en biomasse ( $Y_{x/s}$ ) est défini comme la masse sèche de cellule produite par unité de masse de substrat consommé (g/g) dans un volume donné de culture. Pour l'ensemble d'une fermentation en mode discontinu, le rendement en biomasse est donc donné par l'équation suivante :



$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \text{ où,}$$

X = concentration finale en biomasse ;  
 $X_0$  = concentration initiale en biomasse ;  
 $S_0$  = concentration initiale en substrat.

### 2.3.1.3- Le rendement en produit

Le rendement en produit ( $Y_{p/s}$ ) est défini comme la masse de produit formé par unité de masse de substrat consommé (g/g) dans un volume donné de culture. Pour l'ensemble d'une fermentation en mode discontinu, le rendement en produit est donné par l'équation suivante :

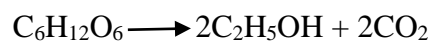
$$Y_{p/s} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \text{ où,}$$

P: concentration finale en produit (g/L) ;  
 $P_0$ : concentration initiale en produit (g/L) ;  
 $S_0$ : concentration initiale en substrat (g/L) ;  
 S: concentration résiduelle en substrat (g/L).

Le substrat choisi pour calculer le rendement en produit est souvent la source de carbone et d'énergie, en particulier si le produit est dépendant de la croissance. Mais il peut être justifié de choisir un substrat différent pour certaines fermentations, en particulier dans le cas des bioconversions.

Pour certains produits dont les voies métaboliques de synthèse sont relativement simples (les métabolites primaires notamment), il est possible de prédire combien de produit sera formé à partir d'une quantité donnée de substrat, par stœchiométrie: c'est le **rendement théorique maximal** ( $Y_{p/s}$ ). Dans la pratique, ce rendement stœchiométrique est rarement atteint, car de nombreux facteurs sont susceptibles de réduire l'efficacité de la production ; mais il peut être intéressant de le calculer pour le comparer avec le rendement en produit réel obtenu ( $Y_{p/s}$ ). En effet, plus le rendement pratique se rapproche du rendement théorique maximal, plus le substrat est investi efficacement dans la synthèse du produit au cours de la fermentation.

Par exemple, dans la production d'éthanol sur sucre de maïs (glucose) par *S. cerevisiae*, le rendement théorique maximal de production peut être réduit de l'équation globale de la fermentation alcoolique :



L'équation montre que si la totalité du glucose consommé était converti en éthanol, alors la fermentation produirait 2 moles d'éthanol (2moles.46g/mole =92g) pour chaque mole de glucose investi (1mole x 180g/mole=180g), pour un rendement théorique maximal de :

$$Y_{p/smax} = \frac{\text{éthanol}}{\text{glucose}} = \left( \frac{92g}{180g} \right) = 0,511g/g = 51,1\%.$$

➤ **Le rendement en produit par rapport à la biomasse et le taux de production spécifique**

Dans le cas des produits dépendants de la croissance, les cinétiques de croissance et de production sont liées de telle sorte que la production reste toujours proportionnelle à la croissance. Ainsi, à tout moment de la fermentation, on peut évaluer indirectement la production en mesurant la croissance, à condition de connaître le rapport qui existe entre les deux. Ce rapport est le rendement en produit par rapport à la biomasse ( $Y_{p/x}$ ). Il est défini comme la masse de produit formé par unité de masse sèche de cellules produites (g/g) et peut être facilement évalué à partir des données utilisées pour calculer le  $Y_{p/x}$  et  $Y_{x/s}$  selon l'équation suivante :

$$Y_{p/x} = \frac{P - P_0}{X - X_0}$$

Ou, puisque  $Y_{p/x}$  et  $Y_{x/s}$  sont déterminés pour une consommation égale de substrat :

$$Y_{p/x} = \frac{(P - P_0)/(S_0 - S)}{(X - X_0)/(S_0 - S)} = \frac{Y_{p/s}}{Y_{x/s}}$$

Ce rendement fournit aussi une information précieuse dans l'analyse de la cinétique de production dans le cas d'un produit dépendant de la croissance. En effet, cette cinétique est analogue à la cinétique de croissance et la vitesse de synthèse d'un tel produit, à tout moment de la croissance, peut être donc modélisée mathématiquement par l'équation différentielle suivante

$$\frac{dP}{dt} = Q_p \cdot X \quad \text{Où,}$$

P : Concentration finale en produit (g/l) ;  
t : temps (h) ;  
 $Q_p$ : taux de production spécifique ( $h^{-1}$ ) ;  
X: concentration finale en biomasse (g/l).



En combinant cette équation à celle de la croissance ( $dX/dt = \mu X$ ) et à celle du rendement en produit par rapport à la biomasse, on peut démontrer mathématiquement (démonstration non présentée ici) une relation constante unissant le taux de croissance et le taux de production et s'exprimant par l'équation suivante :

$$Q_p = Y_{P/X} \cdot \mu$$

Ainsi, pour un produit dépendant de la croissance, le taux de production spécifique ( $Q_p$ ) est à tout moment proportionnel au taux de croissance spécifique ( $\mu$ ). Il a donc une valeur maximale en phase de croissance maximale ( $Q_{p \max}$ ) en phase exponentielle, une valeur qu'on peut aisément calculer à partir de l'équation si on connaît  $\mu_{\max}$  et  $Y_{P/X}$ .

Pour les produits partiellement dépendant ou indépendant de la croissance, le rapport entre la croissance et la production n'étant pas constant durant la fermentation, le taux de production spécifique ( $Q_p$ ) n'est pas lié aux taux de croissance spécifique ( $\mu$ ) par une relation constante impliquant  $Y_{P/X}$ . **On détermine alors  $Q_p$  à partir de l'analyse expérimentale de la cinétique de production unique de la fermentation particulière en cause.**

#### **2.3.1.4- La productivité**

La productivité est une variable exprimant la croissance ou la production d'une culture dans le temps. On la détermine en établissant la biomasse sèche ou la quantité de produit formé dans un volume donné de culture pendant une certaine période de temps (g/L/h). En mode discontinu, la productivité fournit ainsi une mesure de la croissance ou de la production moyenne d'un litre de culture pendant une heure de fermentation, ce qui, en industrie, en fait un critère essentiel pour évaluer la capacité de production réelle d'un réacteur et, donc, l'éventuelle rentabilité d'un procédé de fermentation.

##### ➤ **La productivité en biomasse**

La productivité en biomasse correspond au poids en grammes de biomasse produite par litre de culture par heure (g/l/h). On la calcule de la façon suivante :

$$P_x = \frac{X_t - X_0}{t - t_0} \quad \text{où,}$$

$P_x$  : Productivité en biomasse au temps  $t$  (g/l/h) ;  
 $X_t$  : Concentration en biomasse au temps  $t$  (g/l/h) ;  
 $X_0$  : Concentration en biomasse au temps  $t_0$  (g/l/h).  
 $t$  : temps (h).





De façon générale, la productivité en biomasse est calculée pour l'ensemble de la fermentation, et les temps  $t_0$  et  $t$  correspondent respectivement aux moments du départ et de l'arrêt de la fermentation. On calcul aussi une productivité totale ( $P_{xtot}$ ). Mais, dans certaines fermentations, la production se poursuit en idiophase, après la fin de la croissance, ce qui a pour effet de réduire la productivité totale en biomasse. Dans ces cas, il peut être pertinent de calculer la productivité maximale ( $P_{xmax}$ ) en biomasse pour évaluer la performance de la croissance.

➤ ***La productivité maximale en biomasse***

La productivité maximale ( $P_{x/max}$ ) correspond à la quantité maximale de cellules qui peuvent être produite par litre de culture par heure de fermentation. La productivité maximale est calculée de la façon suivante :

$$P_{x/max} = \frac{X_m - X_0}{t_m - t_0} \text{ où,}$$

$P_{xmax}$  : productivité maximale en biomasse (g/l/h);  
 $X_m$  : concentration en biomasse au temps  $t_m$  (g/l/h);  
 $X_0$  : concentration initiale en biomasse (g/l);  
 $t_m$  : temps où la productivité en biomasse est maximale (h);  
 $t_0$  : temps au début de la fermentation (h).

➤ ***La productivité totale en biomasse***

La productivité totale en biomasse, quant à elle, représente tout simplement la quantité totale de cellules ont été produites à l'arrêt de la fermentation par litre de culture par heure. On la calcule de la façon suivante :

$$P_{xtot} = \frac{X_f - X_0}{t_f - t_0} \text{ où,}$$

$P_{Xtot}$  : productivité totale en biomasse (g /L /h) ;  
 $X_f$  : concentration en biomasse à la fin de la fermentation (g /L) ;  
 $X_0$  : concentration initiale en biomasse (g /L) ;  
 $t_f$  : temps à la fin de la fermentation (h) ;  
 $t_0$  : temps au début de la fermentation (h).

➤ ***La productivité en produit***

Cette variable est l'une des plus importantes dans l'industrie des fermentations, car elle permet de connaître la capacité de production dans le temps d'un réacteur de volume donné en exploitation. On la calcule comme la productivité en biomasse – à laquelle elle est d'ailleurs



équivalente lorsque le produit de la fermentation est la biomasse mais à partir de la concentration en produit

$$P_p = \frac{P_t - P_0}{t - t_0}$$

$P_p$  : productivité en produit au temps  $t$  (g /L /h) ;  
 $P_t$  : concentration en produit au temps  $t$  (g /L) ;  
 $P_0$  : concentration en produit au temps  $t_0$  (g /L) ;  
 $t$  : temps (h).

En mode discontinu, la productivité est calculée pour l'ensemble de la fermentation, et les temps  $t_0$  et  $t$  correspondent donc respectivement aux moments du départ et de l'arrêt de la fermentation. Pour le produit, la productivité totale ainsi calculée sera toujours équivalente à la productivité maximale puisqu'on choisira précieusement le dernier moment, au cours d'une fermentation, où la productivité est maximale pour arrêter le réacteur et récupérer le produit. En effet, il serait aberrant, sur le plan économique, de poursuivre une fermentation dont la productivité totale est en train de chuter puisque chaque heure de fermentation rapporterait alors moins de produit en moyenne.

Dans la réalité de l'industrie, l'importance de la productivité pour quantifier la productivité et évaluer la rentabilité d'un procédé de fermentation est telle qu'on voudra souvent tenir compte, dans son calcul, du temps d'inactivité du réacteur. En effet, diverses opérations essentielles empêchent l'utilisation continue du réacteur et génèrent, de ce fait, des périodes improductives qui nécessitent tout de même des investissements en termes de coûts et de main-d'œuvre. Les périodes sont: le temps de vidange ( $t_v$ ), le temps de nettoyage ( $t_n$ ), le temps de remplissage ( $t_r$ ), le temps de stérilisation ( $t_s$ ) et le temps de la récolte ( $t_{rf}$ ) Evidemment, lorsqu'on ajoute ces temps de traitement au temps de fermentation proprement dit, la productivité est significativement réduite, et on peut la calculer de la façon suivante :

Le temps total d'un cycle de production est donné par :

$$T_{total} = T_{exp} + t_0 = \frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_f}{X_0} + t_0$$

En effet,

$$\ln \frac{X_f}{X_0} = \mu_m \cdot T_{exp}$$

$T_{exp}$  : période de croissance exponentielle ;  
 $t_0$  : appelé temps de délai pour la culture avec :  $t_0 = t_v + t_n + t_r + t_s + t_{rf}$ .



On peut aussi calculer la quantité totale de biomasse produite :

$$X_f - X_0 = Y_{x/s} \cdot S_0 \text{ (g/l)}$$

La productivité totale pour une culture discontinue est :

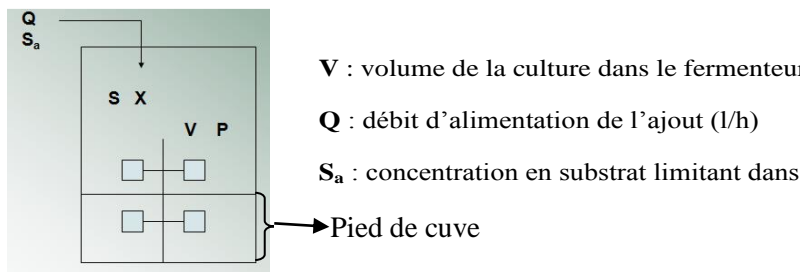
$$\text{Productivité} = \frac{X_f - X_0}{T_{\text{total}}} = \frac{Y_{x/s} S_0}{\frac{1}{\mu_m} \ln \frac{X_f}{X_0} + t_0},$$

La multiplication de cette équation par  $\mu_m$  donne :

$$\text{Productivité} = \frac{\mu_m \cdot Y_{x/s} S_0}{\ln \frac{X_f}{X_0} \mu_m \cdot t_0} \text{ (g/l.h)}$$

### 2.3.2- Modèle de la culture fed-batch

La culture en fed-batch présente deux périodes : la période de culture batch qui correspond à la constitution d'une population cellulaire (ou pied de cuve) et la période de culture fed-batch où on procède à l'ajout progressif du substrat « S » (figure 18).



**Figure 18** illustration de la culture fed-batch

Les hypothèses suivantes seront prises en considération:

- aucune mortalité cellulaire ;
- l'oxygène est apporté en excès ;
- la source carbonée est le substrat limitant ;
- les autres nutriments sont fournis en quantités suffisantes.

Les équations relatives à la première période sont comparables à la culture **batch**. Pour la période de production de métabolite (période *fed-batch*), quelques conditions sont choisies pour faciliter le modèle :



$S \approx 0$ : au cours du *fed-batch*, le substrat est complètement consommé au fur et à mesure de son apport ;

$V = V_0$ : volume du milieu de culture dans la cuve au début de la phase de production ;

$V < V_f$ : avec  $V_f$  est le volume final maximal (volume utile) du fermenteur ;

$X_p$  = concentration en cellules au début de la période de production.

- **Pour la biomasse** : la variation de la concentration en cellule dans le milieu de culture ne dépend que de l'effet de dilution par l'ajout  $(-\frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V})$  :

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V}$$

- **Pour le substrat** :

La variation de la concentration en substrat dans le milieu de culture du fermenteur en *fed-batch* dépend de :

- la vitesse de consommation de celui-ci par la cellule ( $-r_s$ ) ;
- la dilution du milieu dans le fermenteur par l'ajout  $(-\frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V})$  ;
- l'apport de substrat par l'ajout  $(Q \cdot \frac{S_a}{V})$ .

$$\frac{dS}{dt} = -r_s S - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} + \frac{dV}{dt} \frac{S_a}{V}$$

Dans les conditions ci-dessous, on suppose que la concentration en substrat reste constante et voisine de zéro  $S=0$  donc :

$$\frac{dS}{dt} = -r_s S + Q \cdot \frac{S_a}{V}$$

- **Pour le produit**

La variation de la concentration en produit du métabolisme dans le milieu de culture dépend de :

- la vitesse de production de celui-ci par les cellules  $+r_p$  ;
- la dilution du milieu de culture par l'ajout  $(-\frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V})$  donc :

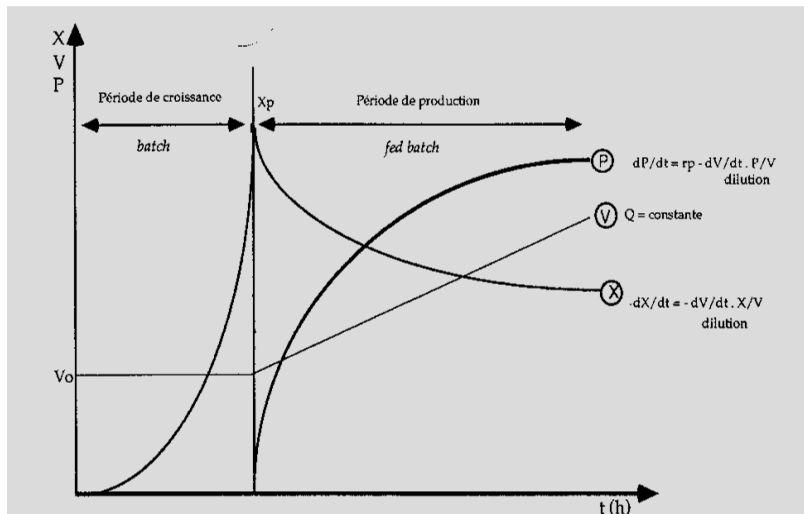
$$\frac{dP}{dt} = +r_p P - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V}$$

L'évolution des paramètres au cours des deux périodes de la culture est schématisée sur la figure 19. On observe au cours de la période de production :

- une augmentation linéaire du volume  $\frac{dV}{dt} = Q = C^{te}$  ;



- une diminution de la concentration cellulaire suite à la dilution  $\frac{dX}{dt} = \frac{dV}{dt} \frac{X}{V}$
- une augmentation de la concentration en produit  $\frac{dP}{dt} = r_p - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V}$



**Figure 19** Evolution des variables X, V et P au cours des deux périodes d'une fermentation en « fed-batch »

### ➤ La mortalité cellulaire

Jusqu'à présent, l'hypothèse de travail négligeait toute mortalité cellulaire, or, pendant la phase de production, l'effet de la mortalité cellulaire peut être important. Dans ce cas, il faut donc adapter l'expression du bilan en biomasse :

$$\frac{dX}{dt} = r_x = -K_d \cdot X - Q \cdot \frac{X}{V} \text{ où,}$$

$K_d$ : le taux de mortalité (1/h). La mortalité cellulaire a un effet sur la longueur de la phase de production mais ne modifie pas la concentration finale en produits. Dès lors, seule la productivité globale du processus est influencée.

**La productivité** pour la culture fed-batch est calculée comme suit :

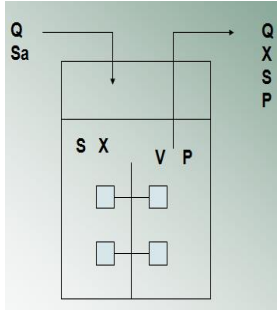
$$\text{Productivité (fed-batch)} = \frac{X_f - X_0}{T_{\text{total}}} \text{ avec : } T_{\text{total}} = t_{\text{fb}} + t_0 \text{ où,}$$

$t_{\text{fb}}$  = Période de la culture avec ajout et  $t_0$  = temps de délai ( $t_v + t_n + t_r + t_s$ ).

### 2.3.3- Modèle de la culture continue

La clé, pour établir une fermentation en continu, réside dans la détermination du débit d'écoulement du milieu dans le réacteur (alimentation en milieu frais et soutirage du milieu, ce qui permettra de maintenir les concentrations constantes dans la culture (figure 20).





$V$  : volume de la culture dans le fermenteur (l)  
 $Q$  : débit d'alimentation (l/h)  
 $S_a$  : concentration en substrat limitant dans l'ajout (g/l)

**Figure 20** Illustration de la culture continue

Pour établir le débit d'écoulement exact permettant de maintenir la culture en croissance exponentielle dans des conditions constantes où la productivité est maximale, il faut d'abord comprendre qu'une culture en continu constitue un système en équilibre, à volume constant, perpétuellement dilué à taux fixe, ce taux de dilution est en relation avec le débit et le volume de culture selon :

$$D = \frac{\text{Débit d'alimentation}}{\text{Volume de la culture}} = \frac{Q}{V} \text{ (h}^{-1}\text{)}$$

Dont, l'évolution de la biomasse est :

$$\frac{dx}{dt} = rx - D \cdot X$$

Par définition  $rx = \mu X$  donc

$$\frac{dx}{dt} = \mu X - D \cdot X = \frac{dx}{dt} = X \cdot (\mu - D)$$

avec:

- + $\mu \cdot X$ : composante positive de la croissance des cellules;
- $D \cdot X$  = composante négative résultant de la dilution par le milieu frais.

➤ **Pour le substrat**

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot S_a - r_s - D \cdot S \text{ avec :}$$

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_a - S) - r_s$$

- + $D \cdot S_a$  : composante positive résultant du substrat apporté par le milieu frais ;
- $r_s$  : composante négative résultant de la consommation par les cellules ;
- $D \cdot S$  : composante négative résultant de l'effet de la dilution.



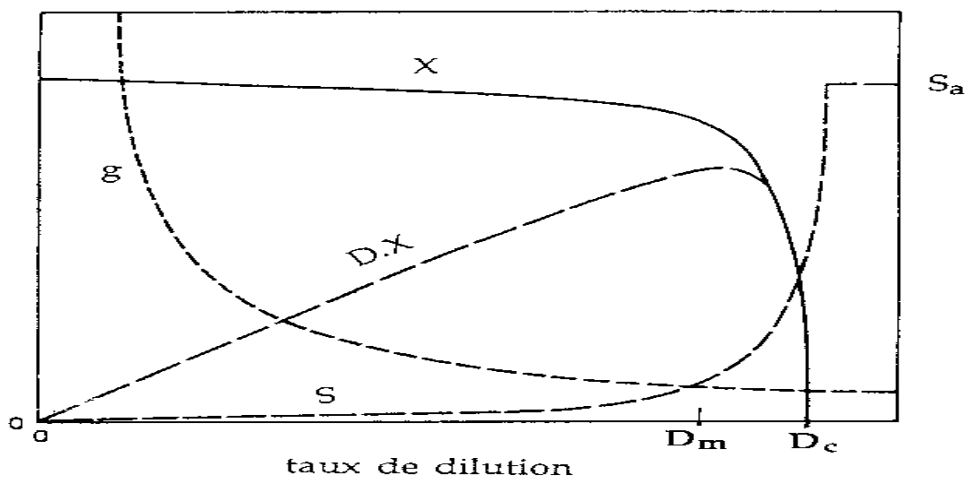


➤ Pour le(s) produit(s) :

$$\frac{dP}{dt} = r_P - D \cdot P$$

$r_P$ : composante positive résultant de la synthèse par les cellules ;  
 $D \cdot P$ : composante négative résultant de l'effet de la dilution.

Par conséquent, lors de la constitution de la culture continue, l'évolution de la concentration en biomasse, en substrat et en produit est déterminé par le choix du taux de dilution "D". Ce paramètre devra être bien choisi selon les objectifs de la culture continue. La figure 21, va nous permettre de discuter le choix d'un taux de dilution approprié.



**Figure 21** Effet du taux de dilution sur la concentration à l'équilibre en biomasse « X », en substrat « S », le temps de génération « g » et la productivité « D.X » ( $D_m$  : est le taux de dilution correspondant à la production maximale et  $D_c$  : est taux de dilution critique)

Trois cas peuvent se présenter :

$\mu < D \rightarrow$  lessivage

$\mu = D$  ou  $\mu_{max} = D \rightarrow$  turbidostat

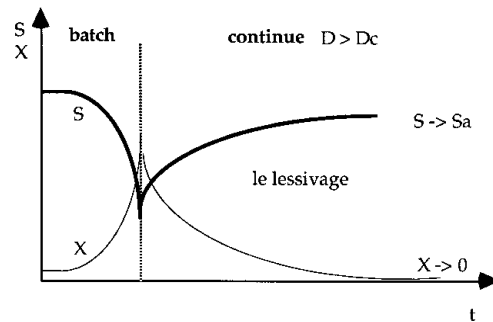
$\mu_m > D \rightarrow$  chemostat

En effet, si «  $D > D_c$  » alors «  $D > \mu_{max}$  » et le taux de dilution reste toujours supérieur au taux de croissance. Selon l'expression, on a :

$$\frac{dX}{dt} = X \cdot (\mu - D) \text{ avec, } (\mu - D) < 0 \text{ et donc } \frac{dX}{dt} < 0$$



La concentration cellulaire chute dans le fermenteur jusqu'à atteindre la disparition complète des cellules et le remplacement par du milieu frais : c'est le **lessivage complet** de la culture (figure 22).



**Figure 22** Evolution des paramètres pour une culture continue avec lessivage (« X » tend vers 0 et « S » tend vers Sa).

En pratique, pour une fermentation continue, on choisira un taux de dilution « D » tel que :  $0 < D \leq D_c$  (ou  $0 < D \leq \mu_m$ ). Pour toutes ces valeurs du taux de dilution, les paramètres de culture continue évoluent vers un état stationnaire « apparent » défini par l'établissement d'un équilibre :

- **Pour la biomasse :**

$$X = X_{eq} = \text{Cte, donc, } r_x = D \cdot X \text{ (ou } \mu = D)$$

- **Pour le substrat:**

$$S = S_{eq} = \text{Cte, donc, } r_s = D(S_a - S)$$

- **Pour le produit**

$$P = P_{eq} = \text{Cte, donc } r_p = DP$$

Essayons de comprendre la raison de l'établissement de cet équilibre au cours de la culture continue (figure 23). Supposons une culture continue telle que le milieu frais à une concentration  $S_a$  soit ajouté en phase exponentielle de croissance (les conditions initiales sont :  $\mu = \mu_m$ ;  $S = S_0$  et  $X = X_0$ ).

Prenons la situation telle que le taux de dilution choisi soit strictement inférieur au taux de croissance initial ( $< \mu_m$ ) :  $D \ll \mu_m$  (avec  $D = \text{Cte}$ ), et  $S_0 \approx S_a$

**Au cours de la période de transition** (avant l'établissement de l'équilibre), la biomasse augmente tandis que la teneur en substrat diminue suite à la consommation par les cellules :



$$\frac{dX}{dt} = X \cdot (\mu_m - D) \text{ avec, } (\mu_m - D) \gg 0$$

Avec,  $\frac{dX}{dt} \gg 0$  et donc la concentration cellulaire augmente rapidement dans le bioréacteur

➤ **En ce qui concerne la concentration en substrat**

$$\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_a - S_0) - r_s: \text{ avec, } S_0 \approx S_a$$

Dès lors,  $r_s \gg D \cdot (S_a - S_0)$ , ainsi,  $\frac{dS}{dt} \ll 0$

Ce qui signifie que la teneur en substrat diminue suite à la consommation par les cellules.

Selon la relation de Monod, cette diminution de la concentration en substrat affecte le taux de croissance : Par conséquent, «  $\mu$  » diminue et devient inférieur à «  $\mu_m$  »

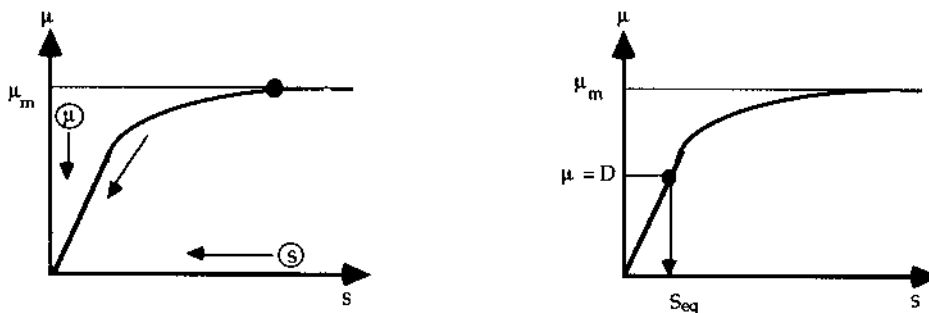
**Lors de l'établissement de l'équilibre** : le taux de croissance des cellules dans le fermenteur continue à chuter et tend progressivement vers la valeur du taux de dilution «  $D$  » choisi : dès lors  $(\mu - D)$  diminue et tend vers 0 (figure 23).

$$\text{Selon } \frac{dX}{dt} = X \cdot (\mu - D) /$$

$\frac{dX}{dt}$  tend vers 0 et par conséquent la biomasse «  $X$  » vers une constante ( $X_{eq}$ )

De plus, la concentration en substrat «  $S$  » diminue et  $(S_a - S)$  augmente.

Selon  $\frac{dS}{dt} = D \cdot (S_a - S_0) - r_s$ ,  $\frac{dS}{dt}$  tend vers 0 et «  $S$  » vers une constante ( $S_{eq}$ )

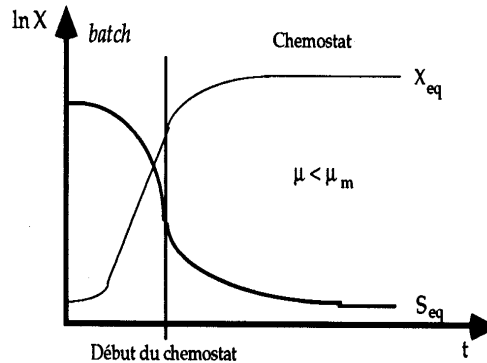


**Figure 23** Etablissement de l'équilibre lors d'une fermentation continue en « chemostat »

Dans ce cas, le taux de croissance atteint à l'équilibre ( $\mu_{eq}$ ) est inférieur à  $\mu_m$  et résulte de l'établissement d'une concentration limitante en un substrat ( $S_{eq}$ ). Pour ces conditions de travail, c'est la concentration en ce substrat limitant à l'équilibre qui contrôle la culture



continue. Ce type de fermentation continue est dénommé chemostat car l'état stationnaire résulte de l'action limitante de la concentration en un élément chimique du milieu de culture figure 24.



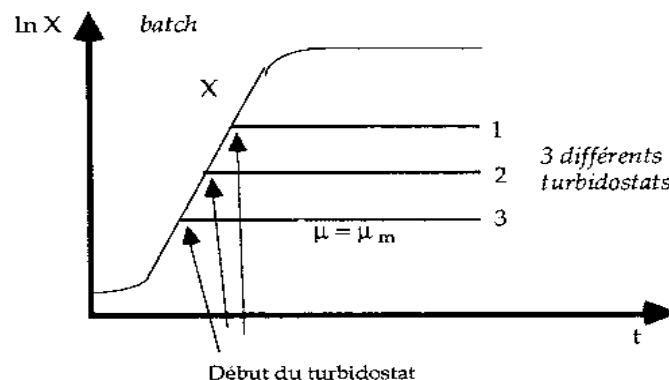
**Figure 24** Etablissement de l'équilibre lors d'une culture continue de type chemostat

Reste à décrire une dernière situation possible. En effet, le taux de dilution (D) peut être choisi de telle manière que celui-ci soit égal au taux de croissance initiale (μ<sub>m</sub>), c'est à dire lors de l'instauration de la fermentation continue.

Comme la culture est en phase de croissance exponentielle

$$\frac{dX}{dt} = X \cdot (\mu_m - D) = 0, \text{ Donc, } X=X_0=\text{constante}$$

La concentration en biomasse est donc maintenue constante et égale à la valeur du début de l'ajout. Dans ces conditions, aucun substrat n'est limitant. De plus, la concentration en cellules à l'équilibre peut être choisie arbitrairement et ce type de fermentation continue est dénommée turbidostat. La figure 25 présente la zone de travail du turbidostat.



**Figure 25** Zone de travail dans le cas d'un turbidostat



Pour les conditions de culture déterminées et constantes, on peut résumer les différents modes de fermentation continue comme suit (tableau 4)

**Tableau 4** Evolution des paramètres de la culture continue

Choix du taux de dilution	Type de culture continue	Evolution des paramètres
$D > \mu_m$	Lessivage	$X \rightarrow 0$ $S \rightarrow S_a$
$D < \mu_m$	Chemostat	$X \rightarrow X_{eq}$ et $S \rightarrow S_{eq}$ $\mu \rightarrow \mu_{eq} = D$
$D = \mu_m$	Turbidostat	$X = \text{constante}$ et $\mu = \mu_m$

➤ *Application du modèle de culture en chemostat*

Considérons le cas d'un modèle simple avec un seul substrat limitant (substrat carboné) où l'oxygène est apporté en excès et où la mortalité cellulaire est négligée. Dans ces conditions, on peut essayer de prévoir l'état stationnaire :

$X_{eq}$  : concentration en biomasse à l'équilibre ;  
 $S_{eq}$  : concentration en substrat limitant à l'équilibre.

À l'équilibre:

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X = 0$$

Donc,

$$\mu \cdot X = D \cdot X$$

Et comme :

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} = \text{ou } \mu_{eq} = D \text{ (tableau 4) on peut écrire:}$$

$$D = \mu_m \cdot \frac{S_{eq}}{K_s + S_{eq}}$$

$$\text{L'évolution du substrat} = \frac{dS}{dt} = D \cdot (S_a - S) - r_s = 0$$

Donc à l'équilibre :

$$D \cdot (S_a - S_{eq}) = r_s \text{ avec : } r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s X_{eq} \text{ on peut écrire :}$$

$$D \cdot (S_a - S_{eq}) = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s X_{eq} \text{ ou,}$$



$$D \cdot (S_a - S_{eq}) = D \frac{X_{eq}}{Y_{x/s}} + m_s \cdot X_{eq} = X_{eq} \left( \frac{D}{Y_{x/s}} + m_s \right)$$

Donc :

$$D \cdot (S_a - S_0) = X_{eq} \cdot \left( \frac{D}{Y_{x/s}} + m_s \right)$$

À partir de cette équation on peut retirer la concentration des cellules à l'équilibre comme suit :

$$X_{eq} = \frac{Y_{x/s} \cdot D}{D + m_s \cdot Y_{x/s}} \cdot (S_a - S_{eq})$$

Cette expression peut être simplifiée si on néglige l'énergie de maintenance

$$X_{eq} = Y_{x/s} (S_a - S_{eq})$$

La concentration cellulaire à l'équilibre ( $X_{eq}$ ) est fonction de la concentration en substrat limitant à l'équilibre ( $S_{eq}$ )

➤ **La productivité (chemostat)**

Dans le cas d'une culture continue (type chemostat), la productivité maximale est donnée par

$$P_{max} = D_m \cdot X_m \text{ avec,}$$

$$\ll X_{eq} = X_m \gg \text{ pour } \ll D = D_m \gg$$

**N.B :** La productivité (ou rendement horaire) est nettement supérieure aux cultures discontinues (batch et *fed-batch*) (moins de temps mort).

