

Chapitre 4: Fermentations industrielles



Les fermenteurs

Les procédés de préparation comportent au moins une étape mettant en jeu **des microorganismes** ou **des enzymes** :

- lorsque cette étape fait appel à des **microorganismes** qui se développent en consommant une partie d'un réactif appelé **substrat** et en transformant l'autre en divers **produits**, le réacteur employé est **un fermenteur**;
- si cette étape est une réaction biochimique catalysée par des enzymes transformant un substrat en produit, elle est réalisée dans **un réacteur enzymatique**.

La différence!!

- Il est courant de faire une distinction entre **fermenteurs** et **réacteurs enzymatiques**, car les premiers mettent en jeu de la **matière vivante** et doivent souvent fonctionner en **conditions stériles**.
- Les technologies de construction de ces deux types de réacteurs sont donc différentes, les fermenteurs nécessitent l'emploi de **matériaux résistant** à la stérilisation par la chaleur et doivent être absolument **étanches**.

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, avec un volume variable allant de quelques litres jusqu'à plusieurs mètres cubes dans le cas d'unités industrielles. La cuve est hermétiquement fermée.
 - 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.
- un fermenteur industriel est un équipement utilisé pour la production à grande échelle de substances biologiques par fermentation, offrant un environnement contrôlé pour la croissance des microorganismes et la production des métabolites. Il permet la fabrication efficace de produits biologiques à des fins commerciales et industrielles.

Les mesures courantes effectuées sont les suivantes :

- Vitesse d'agitation
- Aération (volume d'air injecté dans le réacteur par unité de temps)
- Température
- pH
- Pression
- Détection de mousse
- Oxygène dissout
- Gaz carbonique dissout
- Oxygène dans la phase gazeuse en sortie du fermenteur
- Gaz carbonique dans la phase gazeuse en sortie du fermenteur
- Masse

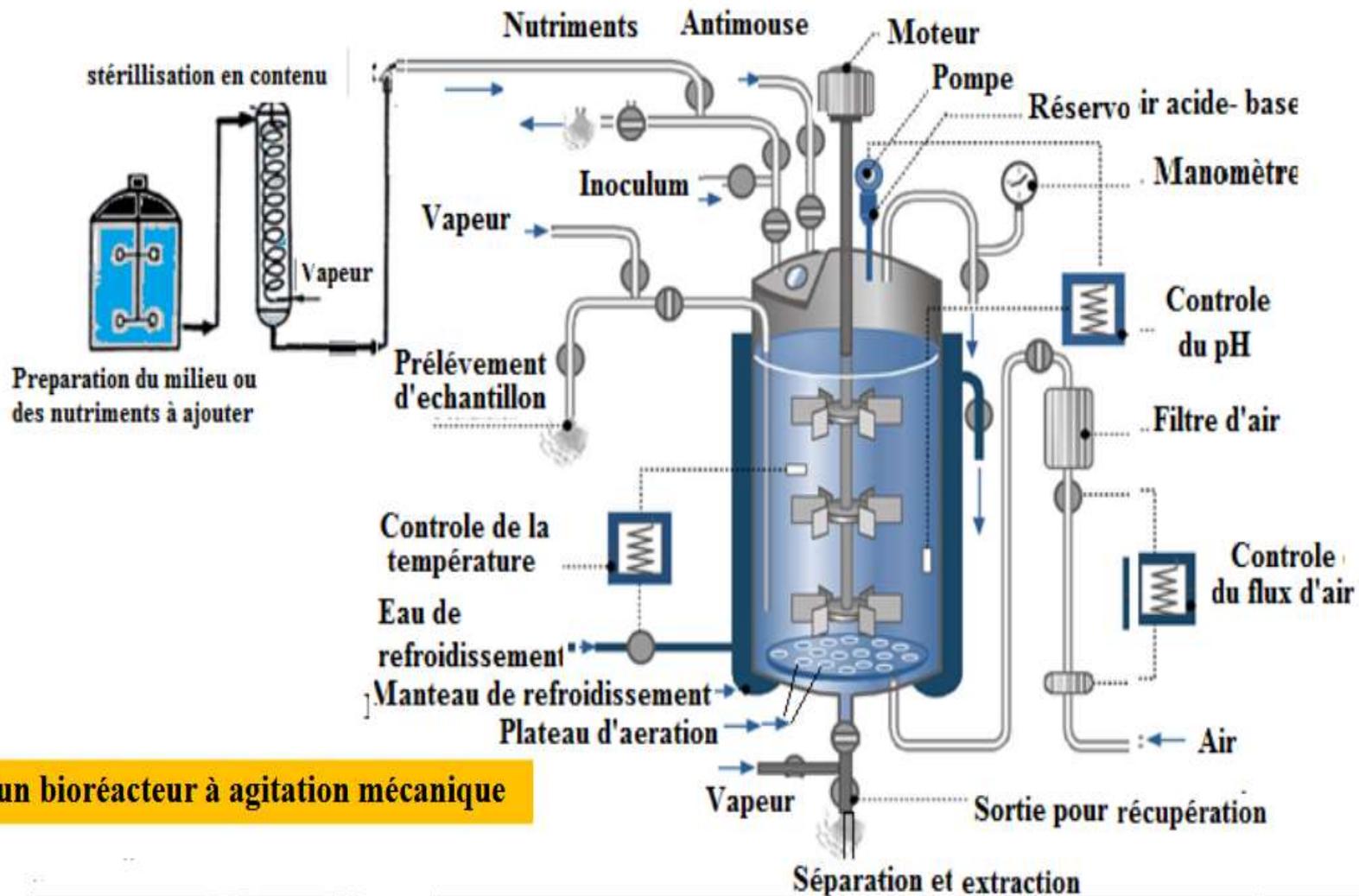


schéma général d'un bioréacteur à agitation mécanique

1.1. Principes de choix

- dépend **du nombre de phases** à mettre en présence pour effectuer la bioréaction : une seule phase liquide ou une phase gaz dispersée dans une phase liquide (cultures aérobies) ou encore une phase solide dispersée dans une phase liquide (d'enzymes immobilisées).
- son **dimensionnement** et son **mode de conduite** reposent sur la connaissance des vitesses des réactions biochimiques ou biologiques et de leur couplage avec les vitesses de transfert de substrats.

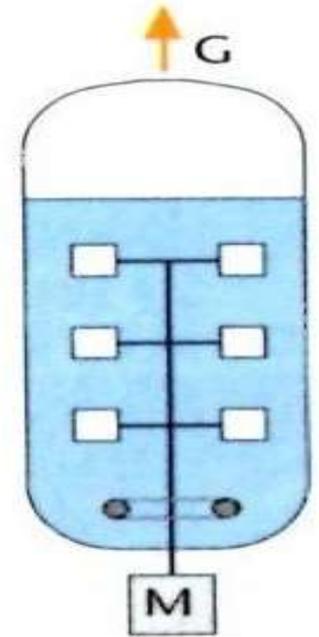
1.2. Principaux types de bioréacteurs

- Cuve mécaniquement agitée
- Cuve mécaniquement agitée aérée
- Les bioréacteurs à agitation pneumatique
- Réacteurs à couche fixe et couche fluidisée
- Les bioréacteurs membranaires



1.2.1. Cuve mécaniquement agitée

Ce type est choisi lorsque tous les acteurs de la bioréaction (substrats, enzymes, microorganismes) 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.



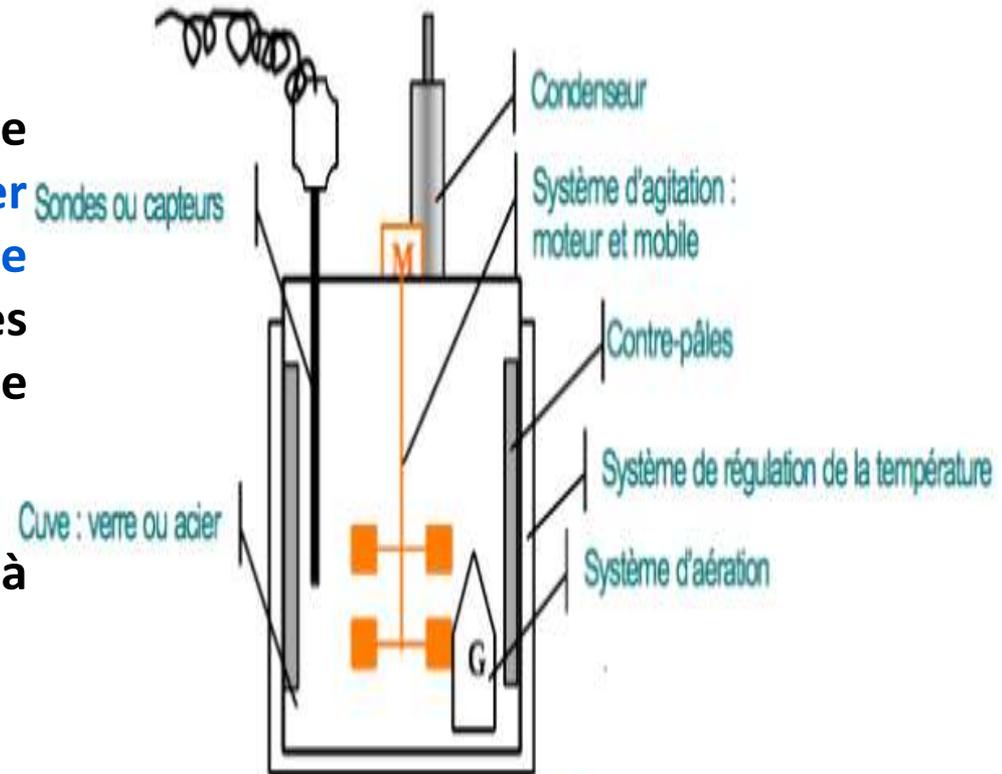
✓ des fermentations anaérobies.

1.2.2. Cuve mécaniquement agitée aérée

- **la production de microorganismes 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 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.

- Leur volume s'étend de 1L à quelques centaines de m³.

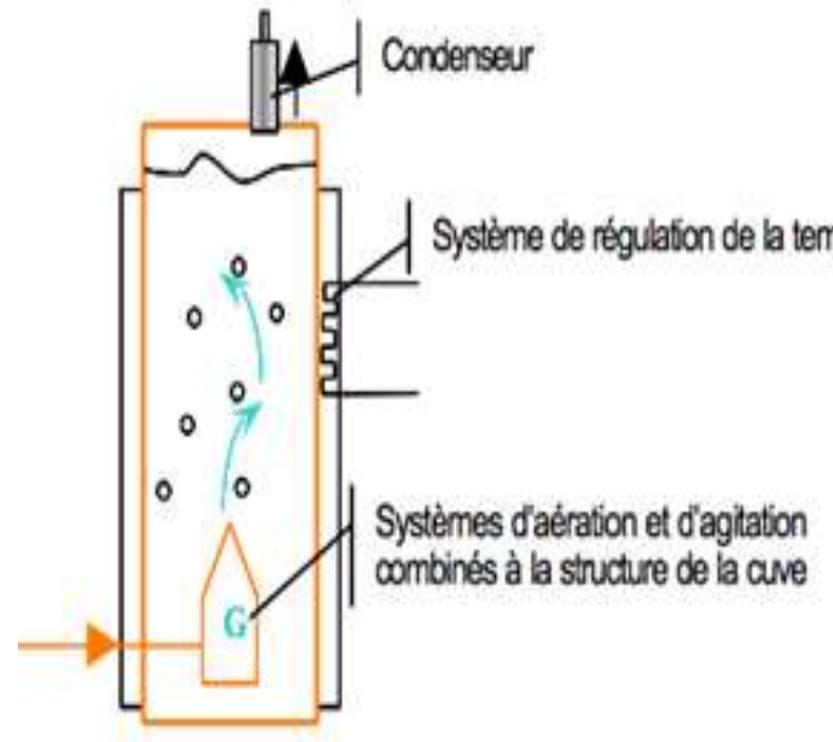


1.2.3. Les bioréacteurs à agitation pneumatique

- ✓ les plus fréquents car ils diminuent le coût des fermentations.
- ✓ fermenteurs en acier qui ne possèdent pas de mobiles d'agitation. L'**agitation** est assurée par **les mouvements d'air** dans le fermenteur (**double emploi de l'air**).

➤ La colonne à bulles

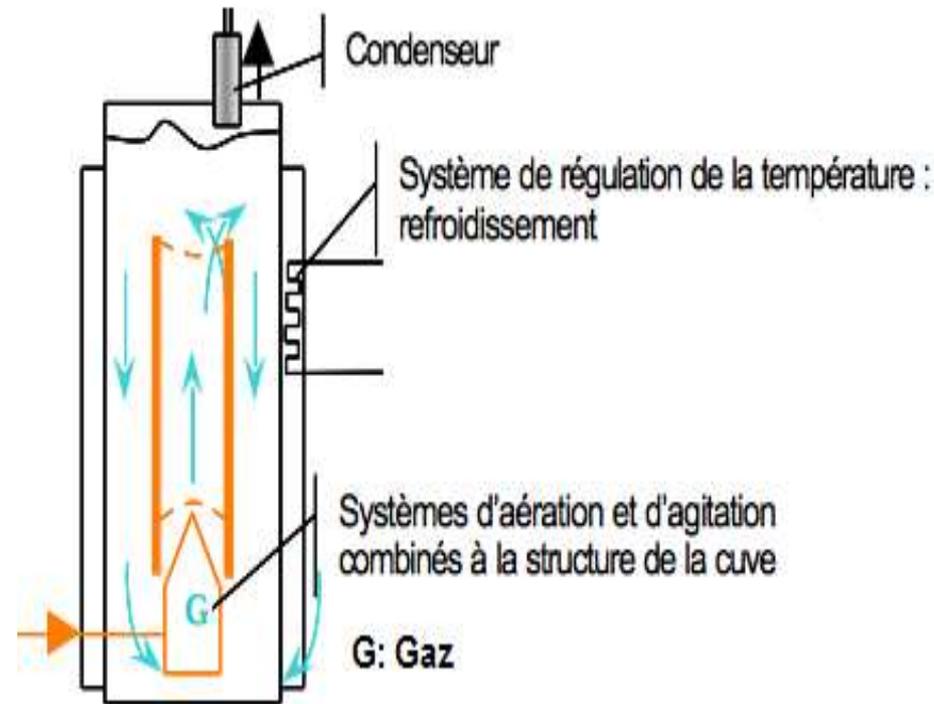
- production de microorganismes **en aérobiose**.
- Aussi lors des fermentations **anaérobies**, l'agitation pneumatique étant alors réalisée par les bulles de gaz carbonique dégagées *in situ* pendant la fermentation



- **Le réacteur air-lift ou gazo-siphon** est un appareil dérivé de la colonne à bulles ===== **seules les cultures aérobies**.
- Un flux d'air est réalisé à la base du fermenteur. Il est caractérisé par l'existence de compartiments.

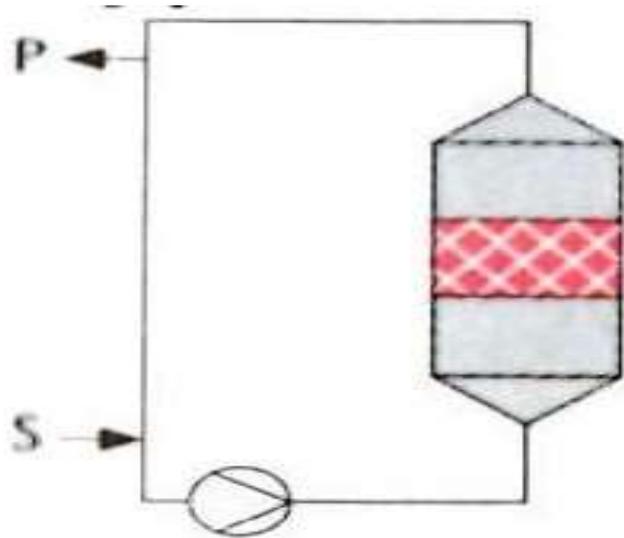
✓ il faut **refroidir** de tels fermenteurs (les envois d'air provoquent une agitation moléculaire importante, ce qui entraîne une **élévation de la T° importante**)

✓ Ils sont généralement de grande capacité (de 0,5 m³ à 5 000 m³) et de forme cylindrique.

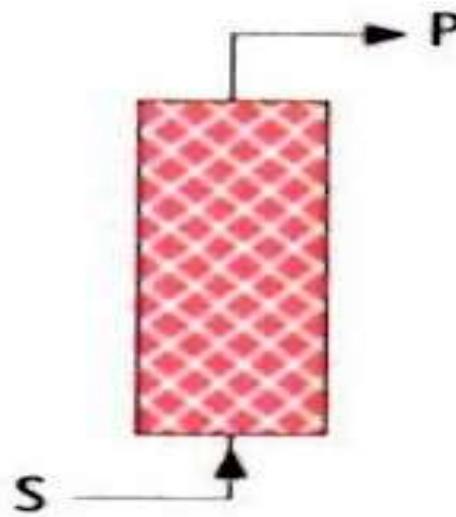


1.2.4. Réacteurs à couche fixe et couche fluidisée

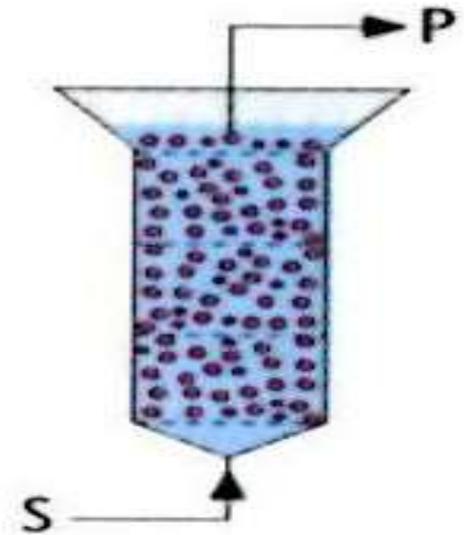
✓ Les réacteurs à **enzymes immobilisées** sont exclusivement des colonnes percolées par le liquide, à couche fixe ou couche fluidisée de particules solides.



Réacteur à lit fixe
avec circulation



Réacteur
à lit fixe



Réacteur à lit
fluidisé

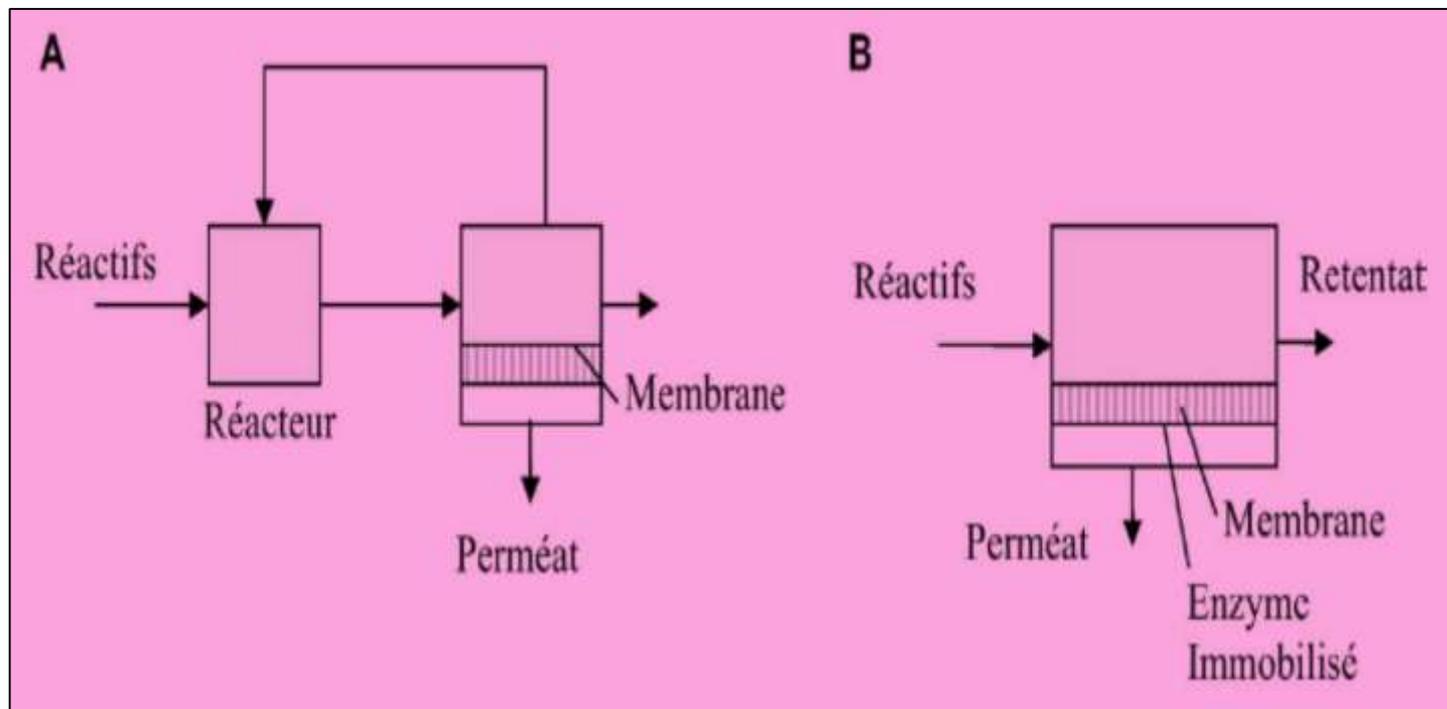
1.2.5. Les bioréacteurs membranaires

L'utilisation des modules membranaires associés aux bioréacteurs en vue du **recyclage des cellules** conduit:

- à travailler avec des concentrations cellulaires élevées,
- donc augmenter les productivités
- réduire la taille des installations
- diminuer les prix de revient
- ces dispositifs permettent, en parallèle, l'extraction des composés produits par le métabolisme, d'où le concept de **fermentation extractive**.

Sur la base de l'immobilisation des biocatalyseurs et le fonctionnement de la membrane, ces bioréacteurs sont classifiés en deux types:

- Des biocatalyseurs sont suspendus en solution, compartimentés par la membrane == celle-ci sert seulement à la séparation.
- Des biocatalyseurs sont immobilisés dans la membrane, celle-ci agit en tant que support des biocatalyseurs et unité de séparation.



Conduite d'une fermentation industrielle

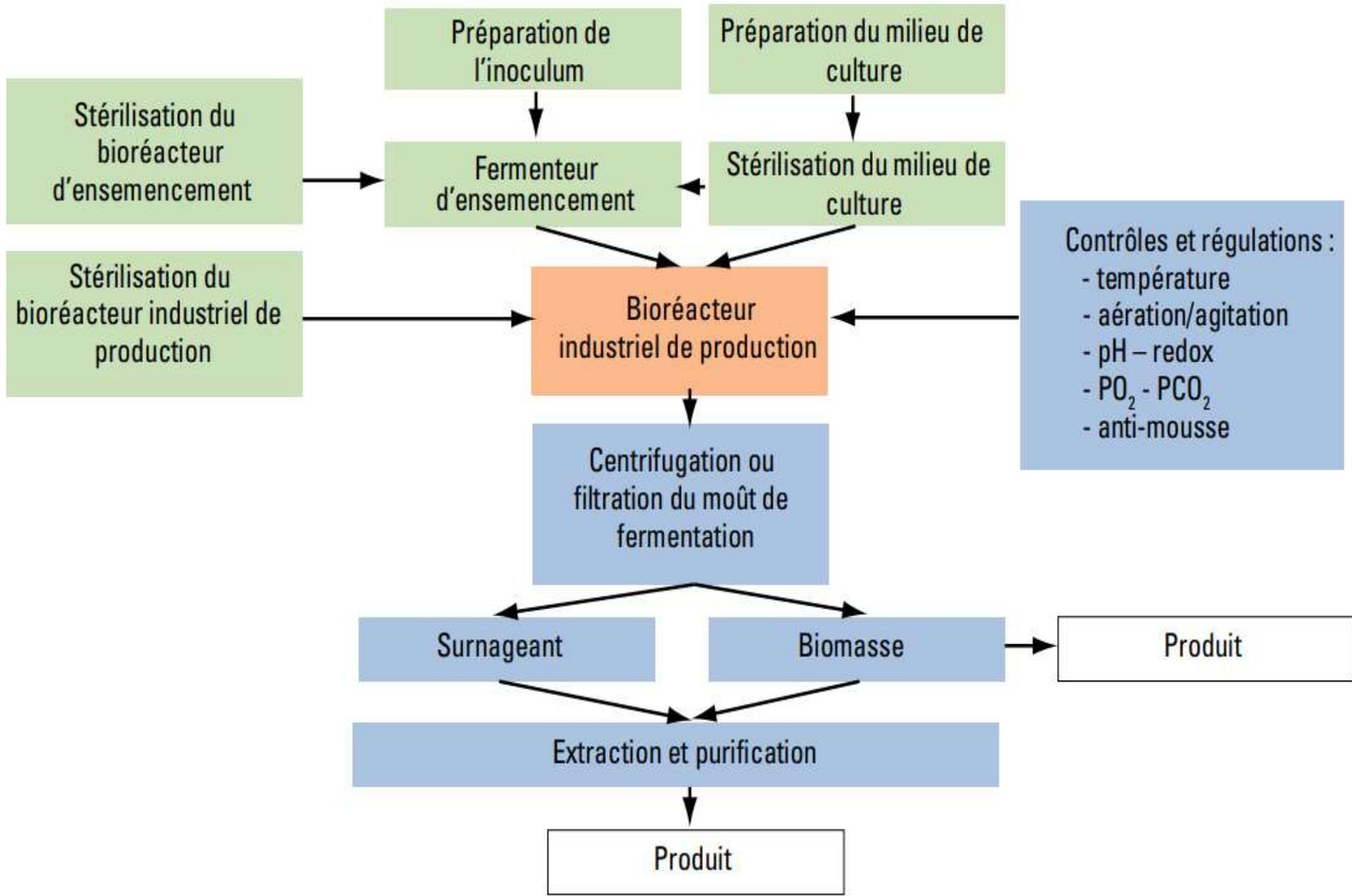
En microbiologie industrielle, le terme de fermentation désigne l'opération unitaire qui permet de produire de la biomasse ou des produits de bioconversion par la culture de micro-organismes.

On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation :

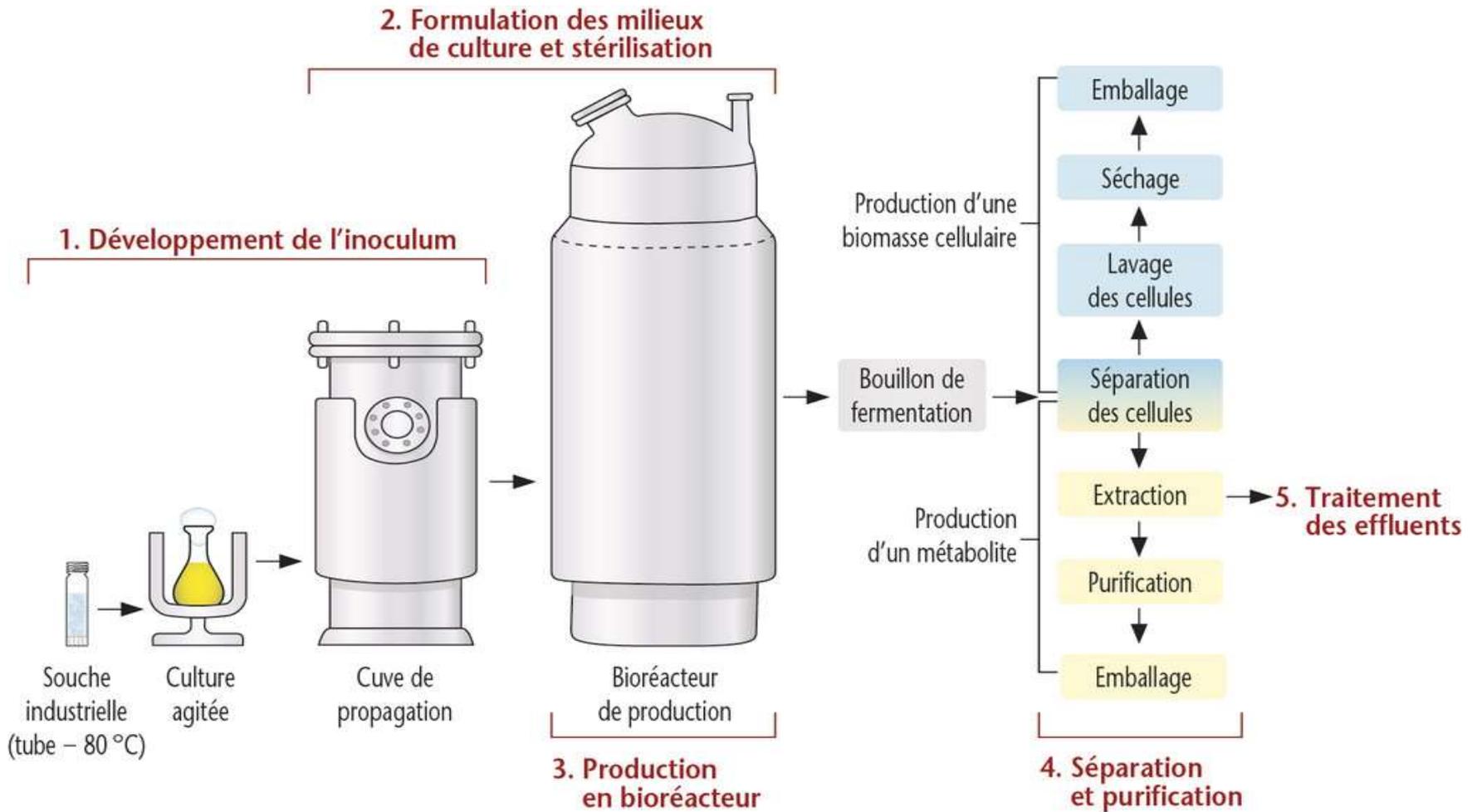
- la fabrication du milieu de culture ;
- la stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture ;
- la préparation de l'inoculum ;
- la production en bioréacteur ;
- l'extraction du produit et sa purification.

Remarque : 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).



Les étapes du procédé de fermentation



Types de processus de fermentation

L'unité de fermentation en microbiologie industrielle est similaire à une usine chimique dans l'industrie chimique. Un processus de fermentation est un processus biologique et, par conséquent, a des exigences de stérilité et d'utilisation de réactions enzymatiques cellulaires au lieu de réactions chimiques assistées par des catalyseurs inanimés, fonctionnant parfois à des températures et des pressions élevées. Les procédés de fermentation industriels peuvent être divisés en deux types principaux, avec diverses combinaisons et modifications.

Les principaux types de fermentation sont les suivants :

1. Fermentation en milieu solide
2. Fermentation submergée
3. Fermentation anaérobie
4. Fermentation aérobie

État de culture

fermentation en milieu liquide (FML)
(également connus sous le nom submergé)

fermentation en milieu solide (FMS)
(également connu sous le nom surface).



- La plupart des fermenteurs utilisés dans l'industrie sont du **type submergé** ; ce dernier **économise de l'espace et facilite** son contrôle technique et conception.

Fermentation en milieu solide (FMS)

Les processus de fermentation en milieu solide (FMS) peuvent être définis comme "la croissance de micro-organismes (principalement des champignons) sur des matériaux solides humides en l'absence d'eau libre".

Méthodes semi-solides ou à l'état solide - Dans ce cas, le milieu de culture est imprégné d'un support tel que la bagasse, le son de blé, la pulpe de pomme de terre, etc. et l'organisme peut s'y développer. Cette méthode offre une plus grande surface de croissance. La production de la substance souhaitée et la récupération sont généralement plus faciles et satisfaisantes. Dans le développement d'un processus de fermentation, la composition du milieu de culture joue un rôle majeur et déterminera dans une très large mesure le niveau du produit final. Par exemple, un milieu de culture contenant du saccharose permet une meilleure production d'acide citrique par *A. niger* que tout autre hydrate de carbone

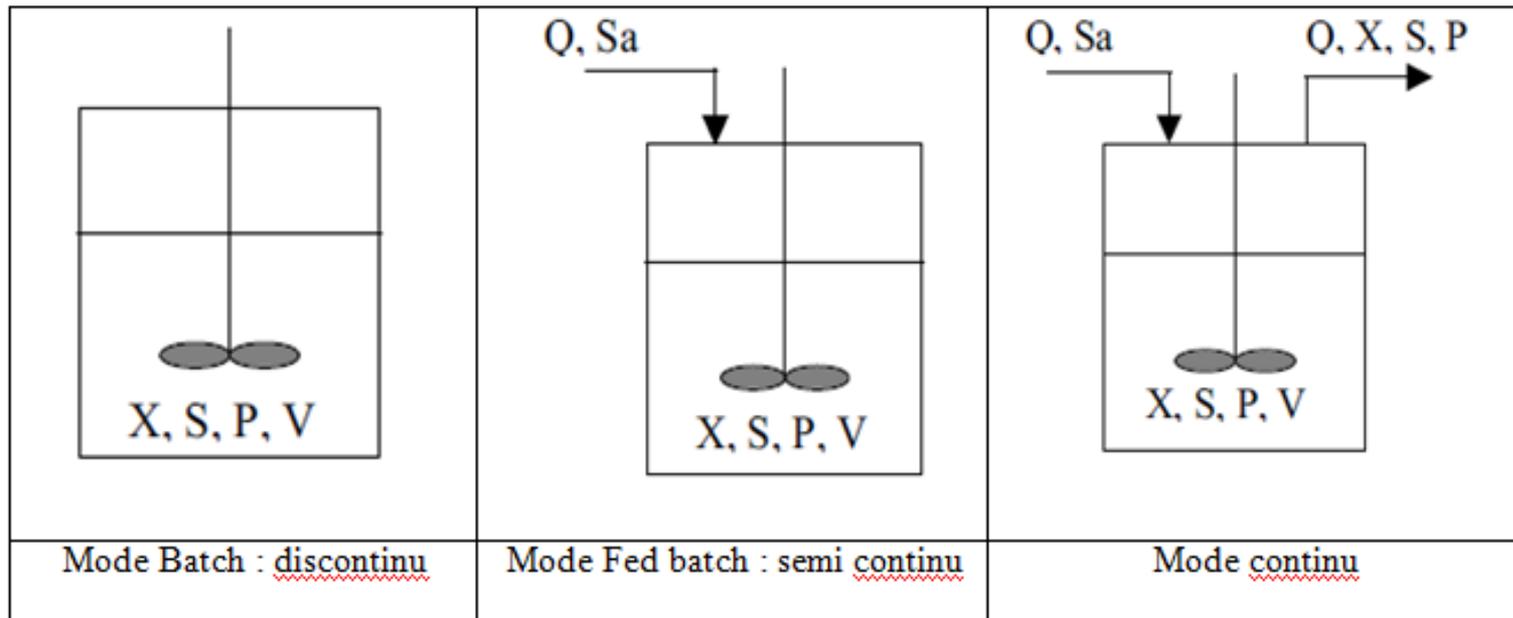
Dans ces fermentations, la croissance microbienne et la formation du produit se produisent à la surface de substrats solides. Des exemples de telles fermentations sont la culture de champignons, les fromages affinés à la moisissure, les cultures starter, etc. Plus récemment, cette approche a été utilisée pour la production d'enzymes extracellulaires, de certains produits chimiques précieux, de toxines fongiques et de spores fongiques (utilisées pour la biotransformation).

Les substrats traditionnels sont plusieurs produits agricoles, le riz, le blé, le maïs, le soja, etc. Le substrat constitue une source riche et complexe de nutriments, qu'il n'est pas forcément nécessaire de compléter. Ces substrats favorisent sélectivement les organismes mycéliens, qui peuvent se développer à des concentrations élevées de nutriments et produire une variété d'enzymes extracellulaires, par exemple un grand nombre de champignons filamenteux et quelques bactéries (actinomycètes et une souche de Bacillus).

1.3. Les modes de fonctionnement

Selon le mode d'alimentation en substrat, nous distinguons trois modes principaux:

- Le mode discontinu (Batch)
- Le mode semi continu (Fed batch)
- Le mode continu (Chemostat)



Les trois modes de conduite de bioréacteurs

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

.1. Le mode discontinu (ou batch)

Dans ce modèle, les cultures sont donc réalisées en système clos dans lequel aucun apport ni soutirage de milieu n'est réalisé. La synthèse de biomasse et de métabolites découle alors uniquement de la quantité de substrats initialement présente. Les performances de tels procédés étaient très faibles.

.2. Le mode semi-continu (ou Fed-batch)

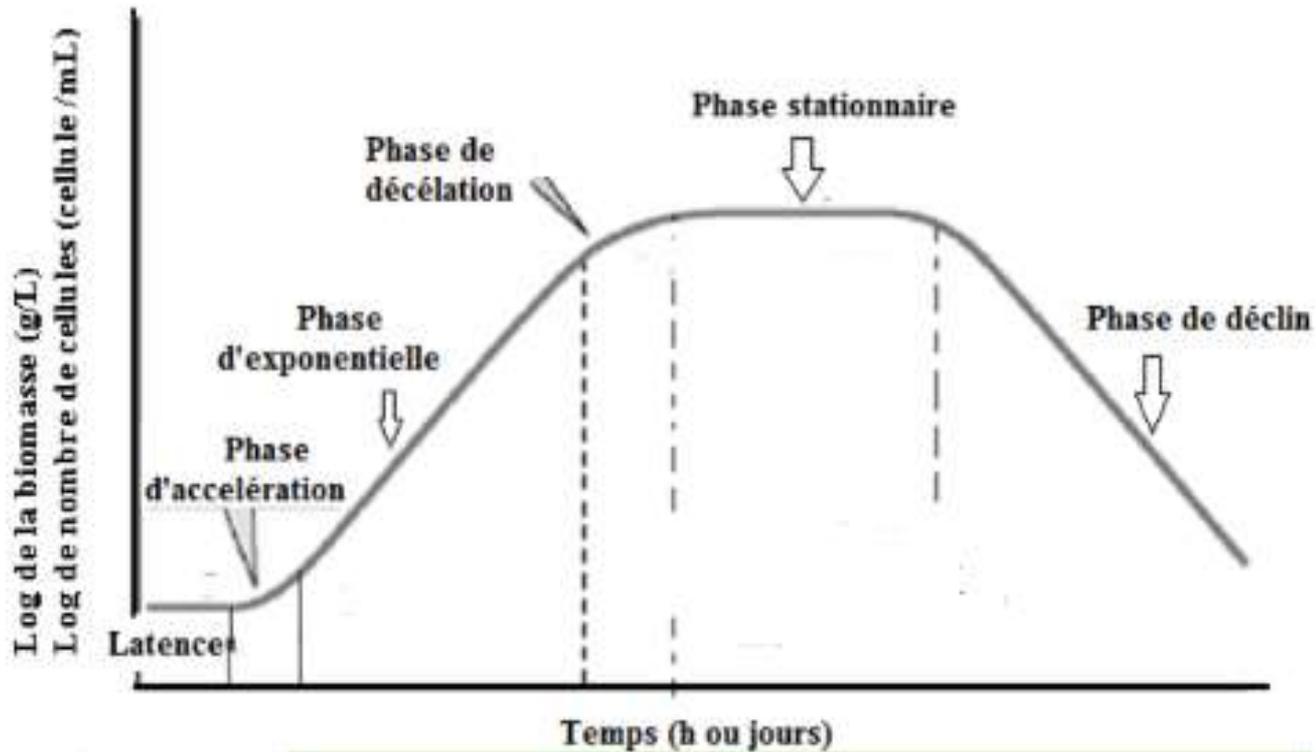
Le principe en est de faire perdurer la phase productive identifiée au niveau de la culture discontinue de référence en déclenchant une alimentation en milieu frais ou en dérivés éventuellement concentrés (Sa) avec un débit constant ou variable Q . Le passage en ce mode permet d'améliorer de façon notable la productivité. D'un point de vue physiologique, ce mode de mise en œuvre, en contrôlant mieux les apports en substrats, permet de limiter l'ampleur de phénomènes connus et courants d'inhibition de l'activité microbienne par excès de substrat.

.3. Le mode continu (ou Chemostat)

Un apport de substrat ainsi qu'un soutirage de milieu de culture (cellules, substrats et produits mélangés) sont réalisés simultanément et en continu au cours du procédé. Le soutirage est effectué par une canule de niveau fixe de façon à ce que le volume du milieu dans le bioréacteur reste constant. Ainsi, le soutirage se réalise à la même vitesse que l'alimentation.

D'un point de vue physiologique, ces réacteurs permettent de placer les cellules dans des conditions quasi constantes sur des périodes prolongées. Cependant, il est possible de constater que des cellules sortent en permanence du réacteur au niveau de la canule de sortie. Il y a alors systématiquement des pertes en biocatalyseur.

Cinétique de croissance microbienne



Cinétique de croissance bactérienne en milieu non renouvelé (Batch)

❖ Les paramètres de la croissance microbienne

1. Taux de croissance

Le taux de croissance μ (h^{-1}) mesure l'accroissement de la population microbienne au cours d'une période de temps t donnée et dans des conditions déterminées, on a :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \Rightarrow X = \frac{1}{\mu} \frac{dX}{dt}$$

X symbolise la biomasse (exprimée en g /L ou en nombre de cellule)

NB: Le taux de croissance maximal (μ_{max}) est calculé au niveau de la phase exponentielle par projection sur les axes du graphe ($\mu_{\text{max}} = \text{tg}$)

2. Temps de génération ou doublement

Ce temps G (h) est donné par : $G = \ln 2 / \mu_{\text{max}}$

3. Nombre de générations

Au temps t de la fermentation, le nombre de générations N est : $N = t/G$

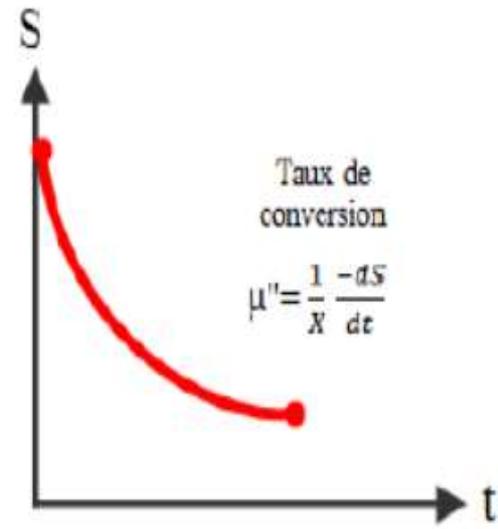
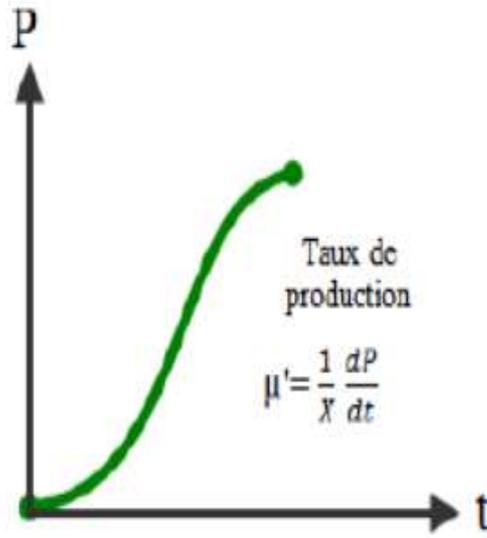
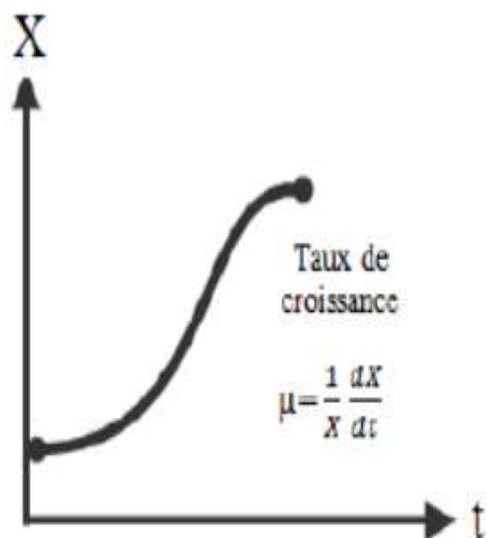


Schéma d'évolution de la masse cellulaire X , du produit P et de la consommation du substrat S en fonction du temps.

Activer Winc
Accédez aux pa

1.4. Critères de conception d'un bioréacteur

- 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

1.5. Pilotage des bioréacteurs

Temps d'homogénéisation en fonction du volume du bioréacteur

Volume du bioréacteur (L)	3	9	100	300	1000	3000	24000
Vitesse de l'agitateur (rpm)	750	2000	230	350	200	180	30
Temps d'homogénéisation (s)	5	3	6,6	5	25	20	66

Pilotage (mesure et régulation) des bioréacteurs

Paramètres physiques

Température

Pression

Puissance

Viscosité

Taux du flux d'air

Ajout de substrat

Turbidité

Poids du réacteur

Paramètres chimiques

Valeur du pH

O₂ dissout

O₂ et CO₂ dans les gaz rejetés

Potentiel redox

Concentration en substrat

Concentration en produit

Concentration en ions

Paramètres biologiques

Activités enzymatiques

Teneur en ATP

Teneur en NADH

Teneur en protéines

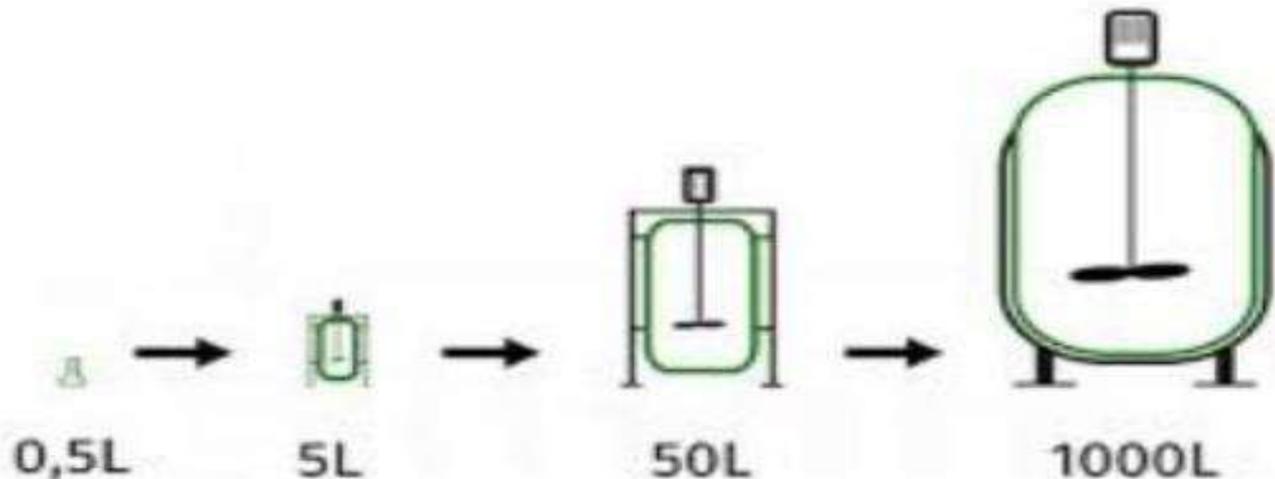
Paramètres
mesurés

Paramètres
régulés

1.6. Processus de mise à l'échelle (ou extrapolation) : *scale up*

Quel que soit le domaine des applications de la microbiologie industrielle, le passage depuis les Erlenmeyer de laboratoire au bioréacteur industrielle reste un défi. D'où l'idée de processus de mise à l'échelle, ou *scale up* en anglais, qui consiste à transférer la culture microbienne, préparée dans des Erlenmeyers du laboratoire, à des bioréacteurs de laboratoire de petit volume, puis à des bioréacteurs pilotes, ensuite la culture sera introduite dans un fermenteur industriel.

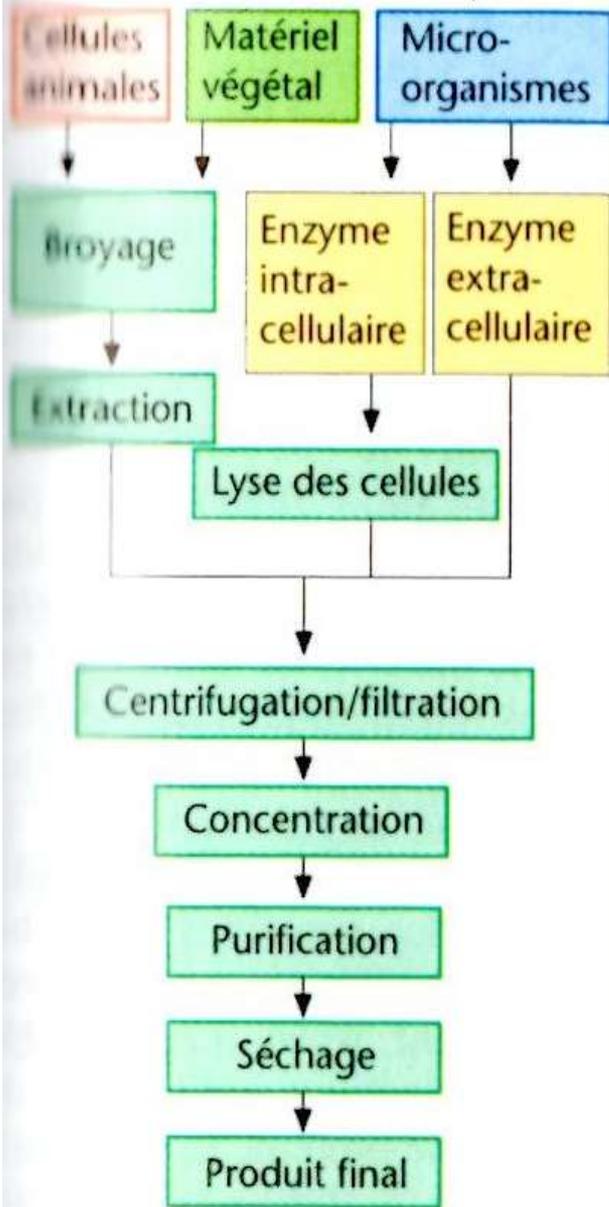
Afin d'assurer la réussite de l'extrapolation, les divers paramètres physicochimiques sont analysés puis modifiés durant chaque étape de la mise à l'échelle, car les réactions physicochimiques et enzymatiques des cellules microbiennes, qui se produisent à l'intérieur du bioréacteur varient en fonction du volume du réacteur utilisé. Donc on cherche à obtenir le même rendement, malgré l'augmentation du volume de la culture.



2. Purification des produits de fermentation

- **Masse cellulaire** (centrifugation, filtration, atomisation...)
- **Produits intracellulaires** (lyse enzymatique, ultrasons, dialyse, cristallisation, extraction par solvants, chromatographie, ...)
- **Produits extracellulaires** (concentration, précipitation, cristallisation, extraction par solvants, atomisation,...)

Fermentation



Taille

Diffusion

Charge

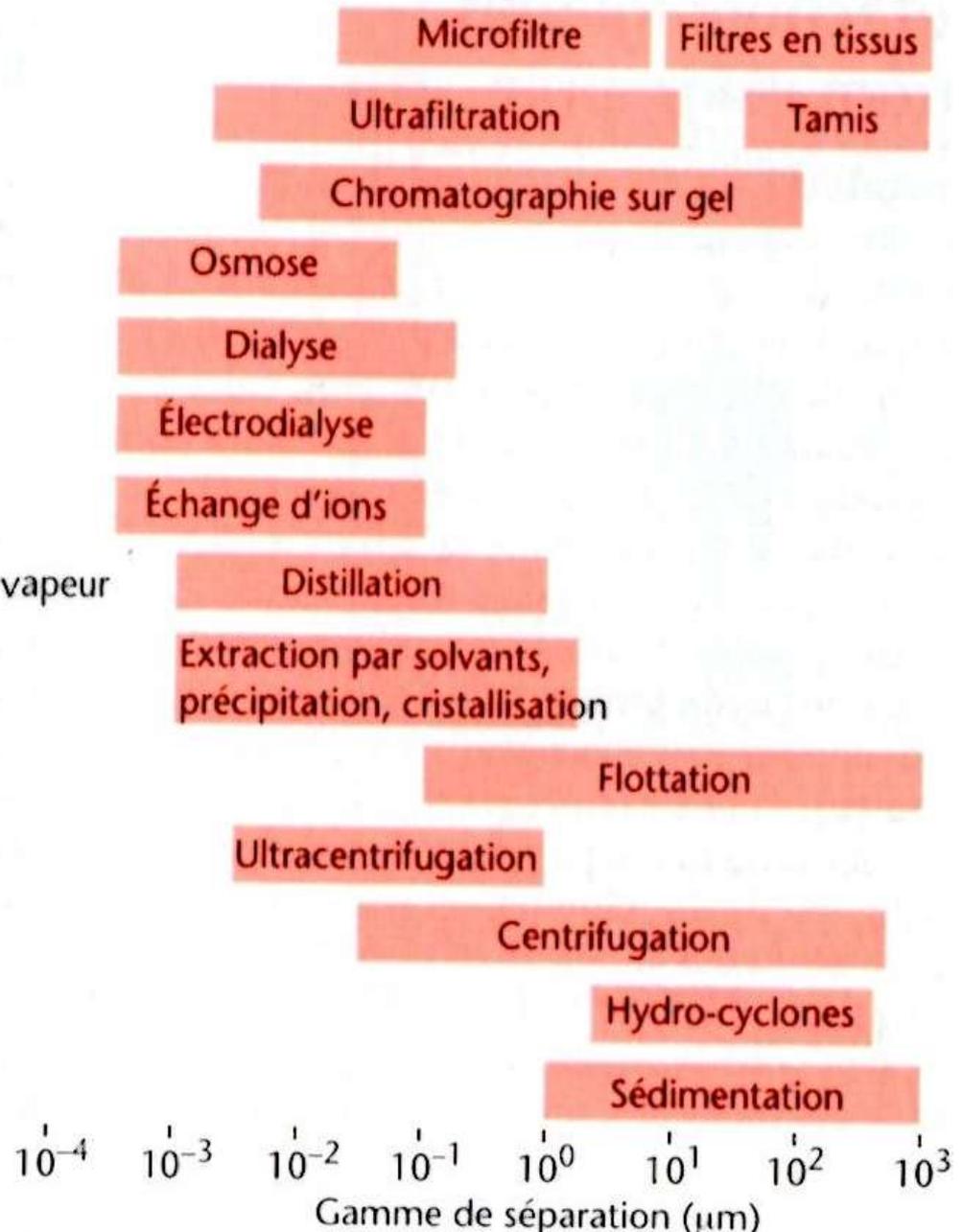
Pression de vapeur

Solubilité

Tension de surface

Densité

Principes de séparation



4. Exemples de production

4.1. Production des Protéines d'Organismes Unicellulaires (POU)

4.1.1. Définition

Les protéines d'organismes unicellulaires « POU » (SCP : *Single Cell Protein* en anglais) sont une source non conventionnelle de protéines. Ces protéines sont obtenues à partir de culture de micro-organismes (levures, champignons filamenteux, bactéries, cyanobactéries) utilisant le plus souvent des substrats qui sont des produits de l'industrie agroalimentaire et des productions agricoles afin de combler le déficit alimentaire (aussi bien humain qu'animal) en protéines au niveau mondial.

4.1.2. Intérêt des POU

La production de protéines d'origine unicellulaire possède certains avantages par rapport à l'élevage et à l'agriculture.

- permet de résoudre un problème environnemental ;
- une croissance rapide en biomasse (50 fois plus rapide que la production bovine) ;
- demande peu d'espace et peu d'eau ;

- est indépendante des conditions climatiques ;
- offre un contenu protéique élevé ;
- génère peu de résidus ;
- permet la modification génétique des micro-organismes.

Toutefois, certaines caractéristiques des POU représentent un désavantage, toujours par rapport à l'élevage et à l'agriculture :

- peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles ;
- possèdent des propriétés physiologiques qui peuvent ne pas convenir à la consommation directe par les humains ;
- présentent un contenu élevé en acides nucléiques.

4.1.3. Processus de production des POU

La production de POU consiste à faire croître des micro-organismes sur un substrat. Afin d'obtenir une production optimale, certains critères doivent d'être respectés dans la sélection d'un type de micro-organisme et pour faire le choix du substrat. Le contrôle des conditions dans le milieu de culture est également d'une très grande importance. Enfin, le mode d'opération du fermenteur affecte la productivité de la fermentation.

A) Choix du micro-organisme

Dans la production de POU, quatre types de micro-organismes sont utilisés. Il s'agit des micro-algues, des bactéries, des levures et des champignons filamenteux. Les critères qui doivent guider le choix d'un micro-organisme sont :

- Taux de croissance élevé ;
- Facilité pour la récolte ;
- Bonne résistance aux variations dans les conditions d'opération ;
- Non pathogène ;
- Contenu en protéines élevé.

Les levures sont le type de micro-organisme le plus fréquemment employé. Malgré que les levures aient un taux de croissance plus faible que les bactéries, elles sont plus faciles à récolter après la production. De plus, le fait qu'elles croissent dans un milieu acide diminue de façon importante les risques de contamination par des organismes pathogènes. Bien que la levure de boulangerie et de brassage de la bière, *Saccharomyces cerevisiae*, soit disponible en grande quantité, la levure de fourrage, *Candida utilis*, lui est préférée pour la production de POU puisqu'elle est moins sensible aux fortes concentrations de glucose.

B) Choix du substrat

Plusieurs types de résidus organiques peuvent être utilisés lors de la production des POU; notamment, les résidus agricoles, de l'industrie forestière et des usines de transformation d'aliments. Les trois critères principaux qui servent au choix d'un substrat sont, par ordre d'importance, le prix (normalement nul ou négatif), les frais de transport et la qualité du substrat.

C) Conditions de culture

Les souches levuriennes exigent pour leur croissance :

- Une source de carbone et d'énergie,
- Azote assimilable,

- Sels minéraux,
- Oligo-éléments,
- Facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, ...).

Les conditions de culture nécessitent un contrôle étroit afin de favoriser la croissance des micro-organismes.

- Contrôler le rapport Carbone / Azote / Phosphore (*CNP*). Un substrat idéal a un rapport *CNP* de 100 / 5 / 1. Comme les résidus ont souvent un faible contenu en azote, il faudra normalement ajouter des nitrates ou de l'ammoniaque comme source additionnelle d'azote.
- Contrôler est la température. Le plus souvent, la température utilisée varie entre 30 et 35°C. Dans certains cas, il est préférable de maintenir le milieu de culture à une température inférieure à 30°C car un taux de croissance trop élevé peut affecter le procédé.
- Contrôler le pH de croissance des levures qui doit être maintenu entre 4.0 et 5.5.
- Contrôler la concentration en oxygène dissout. En effet, l'efficacité de l'aération dépend de plusieurs facteurs comme la viscosité, la température, le mode de dispersion de l'oxygène, l'agitation, la taille du fermenteur et le volume de milieu de culture. Pour des fermentations aérobies, le milieu devrait être saturé à 40 % en oxygène ".
- Mesure de la concentration en substrat et de certains produits de fermentation, tel l'éthanol, dans le milieu de culture.

D) Le fermenteur

La culture est lancée, après être inoculée par une préculture en pleine phase exponentielle. La production de biomasse se fait dans un fermenteur dans lequel les besoins physiologiques et nutritionnels essentiels pour permettre une culture microbienne sont rencontrés. Pour qu'une fermentation aérobie soit optimale, l'aération se doit d'être adéquate. Un type de fermenteur souvent utilisé est le complètement mélangé en mode discontinue ou en continue.

E) Récolte et séchage

Après avoir terminé la production, les POU obtenus sont très dilués. En effet, la quantité de matière solide du bouillon de culture varie entre 1 et 5 % seulement. De meilleurs résultats ont été obtenus avec la centrifugation multiple. Elle permet d'augmenter la quantité de matière solide jusqu'à 10 ou même 20 %. Après avoir été concentré, le produit est soit emmagasiné dans des barils soit séché afin d'obtenir une poudre exempte de toute cellule vivante.