

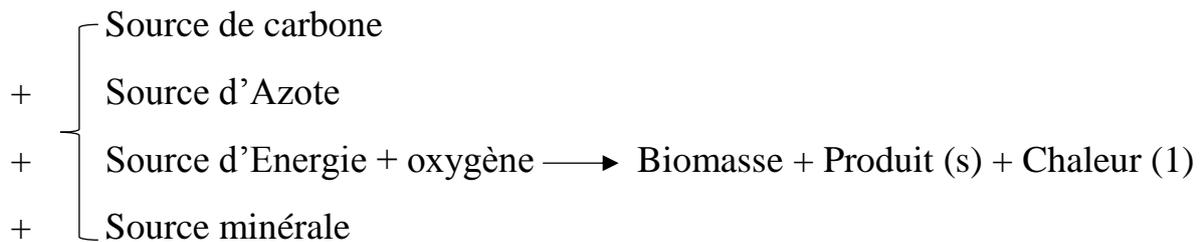
## Conclusion chapitre cinétique de croissance

- Bilan des procédés microbiologiques en fermentation.

Il est basé sur le principe de conservation de la matière et de l'énergie au sein de celui-ci. Par contre les bilans précédents nous avons décrit l'évolution des différents paramètres du système (S, X et P) au cours du temps (étude cinétique).

Pour cette conclusion nous parlerons de culture en fermenteur d'un microorganisme aérobie au cours de laquelle les cellules consomment les substrats disponibles pour produire de la biomasse et synthétiser des produits :

*Nous résumerons de la façon suivante :*



Dans l'expression (1), les produits représentent l'ensemble des molécules libérées par la cellule lors de son métabolisme (produits de la biosynthèse et/ou résidus du catabolisme :  $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \dots$ ).

Souvent, la source de carbone et la source énergétique sont apportés simultanément par le même composé présent dans les substrats et c'est la situation la plus classique et qui caractérise les microorganismes dits hétérotrophes-chimioorganotrophes.

L'expression (1) peut être scindée au niveau du métabolisme cellulaire en trois parties :

a/ les réactions de synthèse de biomasse :



b/ les réactions de synthèse de produits (bioconversion de substrat en produits)



c/ Réactions de maintenance qui rassemblent les réactions n'appartenant ni à la première et ni à la deuxième catégorie et qui ont pour rôle la production d'énergie pour le métabolisme propre à la survie de la cellule.



## *Nouveau chapitre*

### Pourquoi Optimiser ?

Les industries biotechnologiques sont peut-être celles pour lesquelles l'étude de l'optimisation du procédé est actuellement la plus importante. En effet, les procédés de *type Batch* sont largement utilisés en fermentation. Cependant, le *fed-batch* est actuellement l'approche la plus souhaitée pour le « dimensionnement » des bioréacteurs.

L'ajout de substrat permet de maintenir la croissance cellulaire pendant des périodes satisfaisantes dans des conditions où la production est optimale (c'est principalement le cas lorsque la modification des concentrations en nutriments affecte le rendement ou la productivité en biomasse ou métabolites).

Le *batch* simple vient en deuxième position. Les conditions de fonctionnement y sont bien régulées mais la croissance cellulaire ne peut être maîtrisée. Les procédés continus sont les moins maîtrisés car il est difficile de maintenir des conditions de culture correctes (contamination, mutation...). Reste alors à choisir le profil d'alimentation en substrat pour optimiser la culture *fed-batch* (c'est-à-dire augmenter la productivité tout en respectant la qualité de la production).

L'objectif étant de maximiser la quantité finale de biomasse tout en minimisant la durée de la fermentation sous des contraintes de volume final et débit maximal, les profils optimaux de débit sont calculés à partir de modèles prévisionnels. Ces modèles sont difficiles à établir du fait de la variabilité du matériel vivant (le microorganisme). Dans ces conditions, le suivi aveugle des profils optimaux prédéterminés peut conduire à des catastrophes si l'on ne surveille pas l'évolution des variables caractérisant le bioprocédé.

Cependant, la modélisation permet de simuler (modèle prévisionnel) et d'optimiser les procédés. Le modèle a aussi son rôle dans la conception et le dimensionnement des installations, ainsi que dans l'extrapolation (*scale-up*) vers de nouvelles unités de production. Par conséquent la modélisation va favoriser l'automatisation et l'informatisation des procédés.

## Introduction

### Généralités sur la modélisation des cultures

- La croissance microbienne est, par le nombre et le type de réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis de nombreux facteurs extérieurs, un phénomène très complexe.
- L'application des méthodes mathématiques et statistiques au traitement des résultats expérimentaux permet d'établir des équations (**Appelés Modèles**).

→ Traduisant de façon précise et concise les phénomènes observés.

En utilisant des calculateurs puissants, car cette équation peut être complexe et de ce fait faire intervenir un grand nombre de paramètres.

- Il existe un certain nombre de catégorie des modèles :

#### 1/ les modèles cinétiques ou non structurés.

Ils utilisent les cinétiques microbiennes les plus classiques pour exprimer les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de (S) et de production de métabolites, en faisant abstraction de l'évolution de l'entité cellulaire ⇒ Modèles simples et Semblables à ceux qui ont été décrits précédemment (Modèles de Monod). Mais présentent des désavantages (ex. : n'expliquent pas la concurrence dans l'utilisation de plusieurs substrats coexistants).

#### 2/ les modèles physiologiques ou structurés :

Ce type de modèles tient compte de l'évolution interne du microorganisme (**composition de la cellule**) et de la répartition des catégories de cellules dans la population. Elle demande le minimum de connaissance sur les voies métaboliques empruntées par la cellule, ainsi que le processus de régulation (information génétique...).

⇒ Modèles complexes et encombrants, mais parviennent à modéliser les changements du métabolisme cellulaire au cours de la culture.

#### 3/ les modèles mécanistiques ou semi-structurés.

Ils tiennent compte que d'une partie des réactions intracellulaires.

Ils décrivent la conversion du substrat en biomasse et/ou en produit.

Ils permettent une meilleure description du système et conduisent à une complexité modérée.

## - de Modélisation

La Croissance microbienne est un phénomène très complexe, par le nombre et le type de réactions mises en jeu au cours de son déroulement et par leur dépendance vis-à-vis de facteurs extérieurs pouvant exercer des influences susceptibles d'interaction.

- Jusqu'en 1960 - la maîtrise des phénomènes microbiens était une affaire d'habileté, d'expérience et d'intuition.

c.à.d → pour optimiser un milieu de culture → on étudie le plus grand nombre possible de paramètres maîtrisables (Composition du milieu, facteurs extérieurs) Ceci en faisant varier qui un seul à la fois.

⇒ demande beaucoup de temps pour arriver à une amélioration palpable.

Application de méthodes mathématiques et statistiques

Apparition des Paléoplatémes

permettre plus succès sans la connaissance des phénomènes entourant le Bio process (fermentation)

Résultats expérimentaux

Equation Mathématique est établie traduisant la façon concise et aussi précise du phénomène que l'on veut analyser.

• l'équation peut être complexe et faire intervenir tous les paramètres que l'on souhaite étudier



on peut tester la validité du modèle  
c.à.d s'interroger sur la précision avec laquelle  
il traduit les phénomènes.



évaluation de l'écart entre les valeurs  
expérimentales et les valeurs fournies par  
le calcul à l'aide du modèle.



entreprendre des modifications



résultat final optimisation  
d'où un gain de temps et d'argent



Associé à la régulation et à l'automatisation permet  
d'accroître la rentabilité et la sécurité d'exploitation  
des phénomènes microbiens (Microbiologiques).

② Les différents types de modèles mathématiques :

↳ Croissance microbienne

L'étude de la croissance microbienne peut être considérée comme celle d'un système constitué de deux phases :

1) phase vivante (biologique) : certains paramètres

- propriétés génétiques
- Biochimiques
- physiologiques



paramètres stables difficilement modifiables que par  
sélection - mutations

2) phase non vivante (abiotique).

Constituée par l'environnement physico-chimique immédiat de cellules.

- $\frac{1}{2}$  la culture
- air,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{O}_2$



paramètres ~~non~~ maîtrisables, ou variables d'action  
sur lesquelles on peut agir pour améliorer le  
résultat de la fermentation.



Ces paramètres sont contrôlés aux moyens de paramètres  
à contrôler → la mesure de la biomasse.

- (\*)
- 1/ Modèles déterministes
  - 2/ Modèles structurés
  - 3/ Modèles biotiques et abiotiques
  - 4/ Modèles biomathématiques et phénoménologiques
- 

\* Biotechnologie (Bio-ingénierie - Bioreacteurs Industriels et les problèmes du Scale-up - <sup>Augmentation de l'échelle</sup> et <sup>Extractions</sup>)

Nous aborderons ce problème par les exemples

(1) Production industrielle de levures

- Production : 3 objectifs

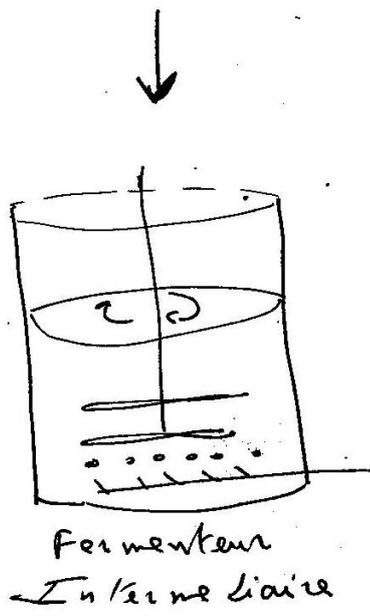
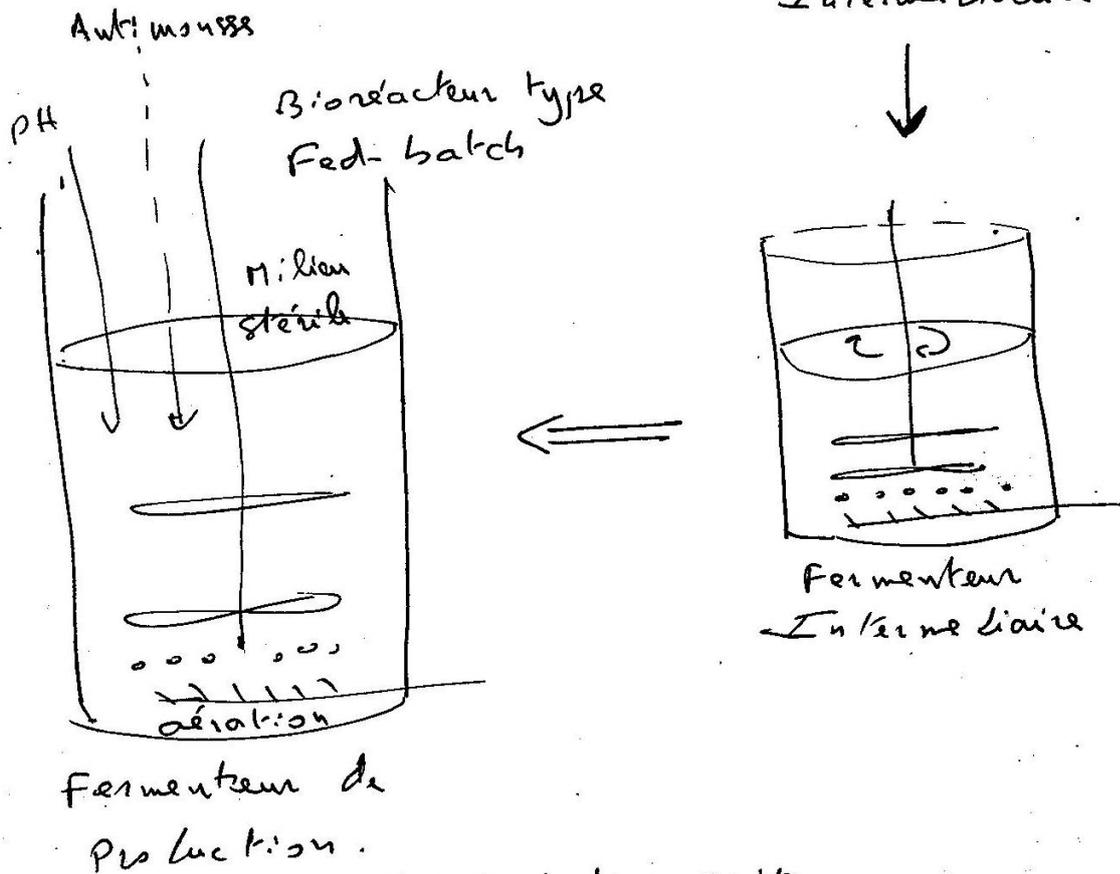
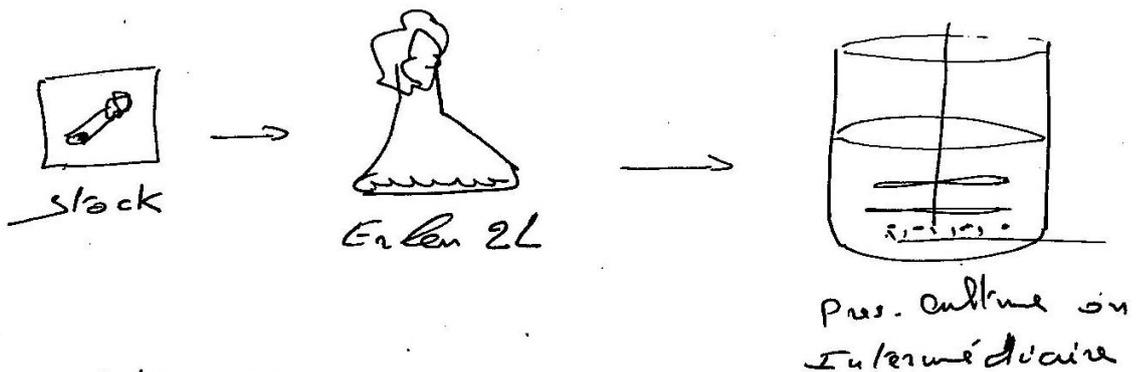
- 1- produire un produit adapté au client  
(Souvent adaptés panification / vinification)
- 2- maîtriser la contamination microbiologique

3- produire au meilleur prix

Pour la production nous avons besoin d'un 1/2 aliquot

⇒ Besoins nutritionnels levure

- Milieu synthétique : trop cher
- Milieu complexe : Hélasse : riche en glucose, en biotine, potassium, Calcium et soufre.
- Ajout de Vitamines B1, B2, sels d'ammonium, acide phosphorique, magnésium et zinc.



⇓ Pour cette Production ou Va avoir

- ① Augmentation du volume de culture (scale-up) de la fiole d'Erlen (0,5 l) au fermenteur de production (400 000 l).
- ② Problème principal du scale-up pour les productions aérobies : diffusion de l'oxygène : pour conserver les mêmes paramètres de croissance / production → on doit conserver la même teneur de diffusion de l'oxygène.

## \* Paramètres importants pendant la Croissance

1. Morphologie et Consistance
2. Composition biochimique du milieu
3. Aptitude fermentaire
4. Qualité bactériologique
5. Qualité alimentaire

x ⇒ La mise en oeuvre d'un procédé biotechnologique ne s'improvise pas : il est le fruit de travaux réalisés successivement avec des quantités croissantes de Matière. Mais ~~il faut le fait~~ le mettre en oeuvre d'importante quantité de matière n'est pas sans imposer un certain nombre de Contraintes matérielles, économiques, législatives et organisationnelles.

Pour ces raisons la production doit être essayée en mettant en oeuvre des quantités ~~de matière~~ croissantes de matières premières. c.à.d en réalisant des mises au point successives à des échelles croissantes.

Laboratoire → pilote → production.

Ainsi chaque procédé biotechnologique a une Histoire  
 de Recherche → de Développement → de production Industrielle.

	Echelle Labo	E. Pilote	E. Industrielle
Temps	Recherche	Développement	Production
objectif	Etude de la faisabilité de la production	Etude/mise au point des conditions industrielles	mise en oeuvre des conditions industrielles.

## - Les Contraintes Industrielles

Rappelons d'abord que la notion de "grande échelle" est relative au type de produit d'intérêt:

une production à grande échelle d'enzymes de restriction utilisés en génie génétique ne représentera en final que quelques centaines de ml (quelques centaines de mg) alors qu'il s'agira de qq tonnes pour la enzyme la glucos-amylose, de qq dizaines ou centaines de tonnes pour les acides aminés (Acide glutamique) ou qq centaines de milliers de tonnes pour le sirop de glucose ou l'acide citrique.

- Il n'est pas possible de traiter de grands volumes de matières premières en gardant le même type d'organisation du travail qu'au laboratoire.  $\Rightarrow$  qu'il faut traiter en une seule fois de plus grands volumes de matières premières (10 000 à 30 000 l)  $\Rightarrow$  prévoir des cuves de grande taille.

- Mais des cuves d'environ 20 m de haut et de 6 m de diamètre pour un volume de 200 000 l. ne peuvent trouver la place sur une paillasse, dans un labo de labo ou même dans un bâtiment ou sur site universitaire.  
 $\Rightarrow$  bâtiment spécial  $\neq$  problème de stockage

## ④ Un deuxième exemple

Pour Augmenter la production des mycoprotéines produits par Fusarium graminearum sur melasse de betteraves il fallait augmenter le volume de productions.

- Soit de multiplier les appareils (plusieurs fermenteurs de 1200l)
- Soit d'augmenter la taille de l'appareillage.

En fait, la solution retenue pour la fermentation a été d'augmenter sa taille (scale-up)

### \* La scale-up la fermentation

L'augmentation de la taille de fermentation, comme de tout bioréacteur n'est pas sans revêtir un aspect paradoxal : en effet plus la taille augmente, plus les performances par unité de volume, par exemple, la productivité volumique (g de produit / litre de bioréacteur et par heure) diminue.

Alors pourquoi mettre en oeuvre une telle solution ?

La raison est liée aux très importantes économies de main d'œuvre réalisées à grande échelle...

Mais globalement, cet argument de la perte de performance ne tient pas la route. Parce que les origines de cette baisse de performance à grande échelle sont de deux ordres.

① plus le volume augmente, moins l'hypothèse d'homogénéité des concentrations dans le bioréacteur est vérifiée: le catalyseur n'est pas partout au contact de la même concentration de réactants. cette concentration est inférieure pour les substrats (d'où une diminution de vitesse de réaction) et supérieure pour les produits (d'où risque d'une inhibition).

② La concentration des réactants réellement au contact du catalyseur (défini comme le micro-environnement) est différente de celle qui est accessible à la mesure (défini comme le macro-environnement): la encore, elle est inférieure pour les substrats et supérieure pour les produits... avec l'augmentation du volume, la diffusion des réactants aux interfaces peut être le facteur limitant le procédé: Ceci a été particulièrement étudié dans le cas de l'aération des fermenteurs où la possibilité de fournir les quantités d'oxygène nécessaires (satisfaire la demande en oxygène) a été reconnue dès le début des cultures submergées comme susceptible d'être limitante.

③ Un aspect important du "scale up" est donc celui de la fourniture de  $O_2$ .  $O_2$  est un gaz peu soluble et sa demande en  $O_2$  augmente lorsque la concentration en biomasse augmente. or le but d'une production industrielle est justement d'obtenir une seule concentration finale.

de plus Fusarium graminearum est un champignon  
filamenteux ; sa croissance augmente la viscosité du  
milieu dans lequel il se développe et diminue  
la capacité de transfert de l'oxygène.

- une solution est d'augmenter la quantité d' $O_2$  dissous  
et d'augmenter la pression d'introduction de l'air. ~~et~~  
n'est cependant pas possible d'augmenter indéfiniment  
cette pression.

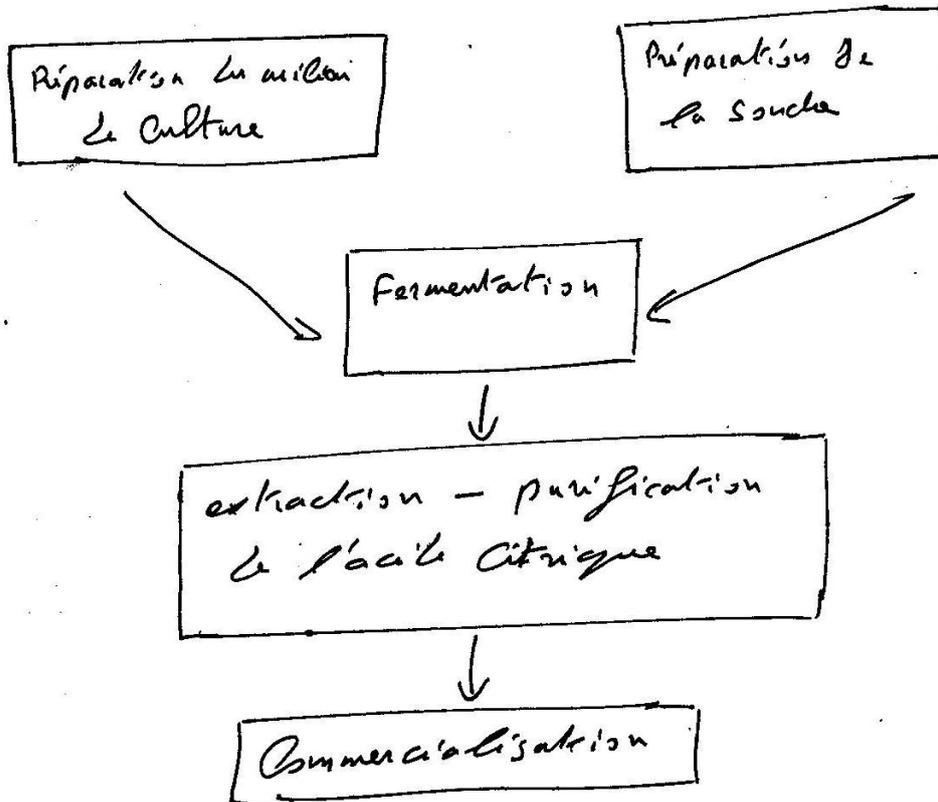
- une autre solution : pression constante mais avec  
augmentation de l'agitation qui fractionne les  
bulles. Avec l'augmentation de volume prévue  
l'agitation mécanique tellement importante à fournir  
pour assurer un transfert d' $O_2$  se serait esquivée  
en fait - d'un côté exorbitant et surtout les forces  
de cisaillement qui encombreraient le mycélium.



faire appel à un autre type de technologie  
de fermentation.

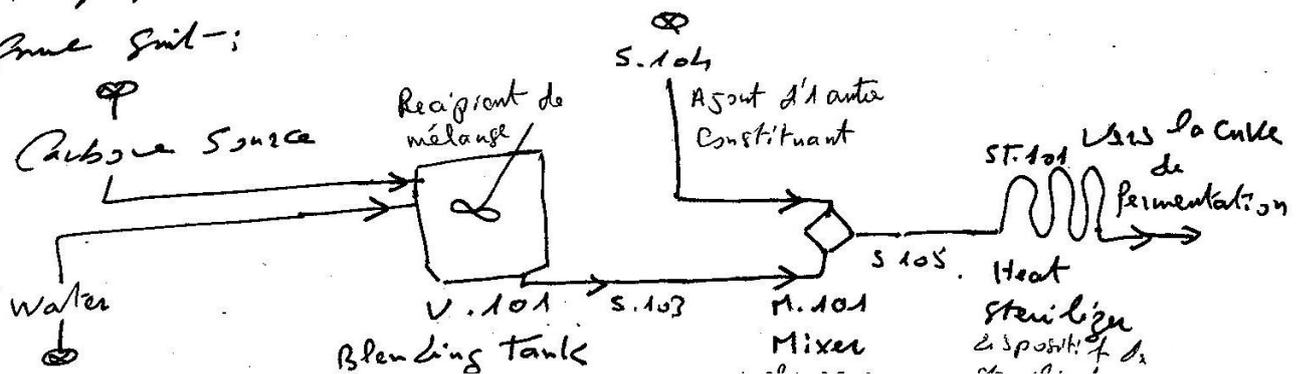
Prendons un autre exemple

## Production d'acide Citrique Différentes étapes



Chaque étape est analysable, à son tour et dans le détail en terme d'opération techniques élémentaires mettant en jeu les appareils à déterminer.

Exemple: à l'échelle industrielle, la première étape, celle de la préparation du milieu de culture, peut être schématisée comme suit:



Les symboles utilisés pour schématiser ces appareillages sont normalisés par la génie chimique, science de l'ingénieur qui traite les procédés chimiques, c-à-d la réalisation de réactions chimiques, en grand volume. Chacune des opérations élémentaires peut être modélisée, et par conséquent éviter le problème au scale up.

### Empaquet A Retenir :

Les étapes d'un bioprocédé industriel.

- ① développement d'un inoculum hautement producteur
- ② formulation d'un milieu de culture approprié
- ③ stérilisation du milieu de culture, du bioréacteur et de ses composants
- \* ④ Croissance optimale et contrôlée de la souche dans le bioréacteur.
- ⑤ Séparation et purification du produit final
- ⑥ Élimination des effluents et résidus du procédé.

→ le type de bioréacteur que l'on choisira d'utiliser dépend de :

- ① Caractéristiques de la souche sélectionnée
- ② le milieu de culture utilisé
- ③ le produit que l'on veut obtenir.

- Cette enceinte fournit les conditions propices afin de faire proliférer les cellules et la synthèse du produit d'intérêt dans le plus grand volume possible.

- Paramètres qui doivent être rigoureusement contrôlés :  
Température, pH, aération, agitation du milieu,

- Bioreacteurs à agitation mécanique:

Le type C bioreacteur le plus utilisé en laboratoire et en industrie

\* Applications des biotechnologies:

→ Fermentations

→ Cultures de cellules animales et végétales

→ Bioprocédés environnementaux.

① Biomasse microbienne

② Métabolites microbiens

Fermentations

③ Enzymes microbiennes

→ Protéines: catalyseurs  
biologiques  
→ production à partir de  
cellules animales - végétales  
microbiennes

④ Protéines recombinantes  
Production à partir de cellules génétiquement modifiées  
- ADN microbien + ADN étranger.

⑤ Plasmides microbiens  
Petites molécules d'ADN extra chromosomiques

⑥ Bioproduits. Cellule microbienne qui peut  
convertir une substance en un produit à  
valeur ajoutée.

Le tableau suivant cite quelques autres modèles non structurés rencontrés dans la littérature. La plupart de ceux-ci sont plus précis que l'équation de Monode et permettent de décrire les autres phases de la courbe de croissance (autre que la phase exponentielle). Tous ces modèles sont établis pour la culture discontinue et peuvent être éventuellement modifiés et adaptés aux cultures semi-continues et continues.

Tableau résumant la liste des principaux modèles utilisés dans l'étude des cultures en fermenteur.

Modèle de	Equations	Descriptions
Monod (1949)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S}$	Modèle hyperbolique $K_s$ : constante de saturation
Teissier (1936)	$\mu = \mu_m \cdot [1 - \exp(-S/K_s)]$	Exprime le contrôle de la diffusion du substrat
Moser (1958)	$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_m} + \frac{K_s}{\mu_m} \cdot \frac{1}{S^n}$	Analogie avec la cinétique des enzymes allostériques
Contois (1959)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_1 \cdot X + S}$	Modèle hyperbolique $K_1$ : constante
Powell (1967)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{(K_2 + K_3 \cdot D) + S}$	$K_2$ et $K_3$ : constantes $D$ : diffusion du substrat
Edwards et Wilke (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \left(1 - \frac{X}{X_f}\right) \cdot (a_1 + 2 \cdot a_2 \cdot t + 3 \cdot a_3 \cdot t^2 + \dots)$ avec $X_f$ = biomasse finale	Fonction polynomiale du temps $a_1, a_2, a_3, \dots$ : constantes
Herbert (1967)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} - K_d$	$K_d$ : taux de mortalité
Edwards (1970)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-S/K_i}$	inhibition par le substrat $K_i$ : constante d'inhibition
Edwards (1970)	$\mu = \mu_m \cdot [e^{-S/K_i} - e^{-S/K_s}]$	inhibition par le substrat selon l'équation de Teissier
Andrews (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S + S^2/K_i}$	inhibition par le substrat $K_i$ : constante d'inhibition
Luong (1987)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{S}{S_m}\right]^n$	$S_m$ : concentration limite > il n'y a plus de croissance
Hinshelwood (1946)	$\mu = (\mu_m - K_i \cdot P) \cdot \frac{S}{K_s + S}$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Aiba (1968)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot e^{-P/K_i}$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Nagatani (---)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + P}\right)$	inhibition par le produit $K_i$ : constante d'inhibition
Levenspiel (1980)	$\mu = \mu_m \cdot \frac{S}{K_s + S} \cdot \left[1 - \frac{P}{P_m}\right]^n$	$P_m$ : concentration limite > il n'y a plus de croissance

- $t_R$  : temps de remplissage (h)  
 $t_S$  : temps de stérilisation (h)  
 $t_s = \tau$  : temps de séjour moyen du milieu dans le fermenteur (h)  
 $t_{Total}$  : durée totale du procédé (h)  
 $t_V$  : temps de vidange (h)  
 $V$  : volume de culture ou volume utile (l)  
 $V_f$  : volume final maximal (l)  
 $X$  : concentration en biomasse ou masse de cellules (g de matière sèche/l)  
 $X_{eq}$  : concentration en biomasse à l'équilibre pour un *chemostat* (g/l)  
 $X_f$  : concentration en biomasse en fin de culture (g/l)  
 $X_0$  : concentration en biomasse au début de la culture (g/l)  
 $Y$  : la teneur d'un constituant cellulaire (mg ou mole/ml)  
 $Y_{p/s}$  : rendement de bioconversion du substrat en produit du métabolisme (g de produit/g de substrat)  
 $Y_{p/x}$  : quantité de métabolite produit par unité de biomasse (g de produit/ g de cellules)  
 $Y_{x/s}$  : coefficient de rendement pour la transformation du substrat en biomasse (g de cellules formées / g de substrat consommé)  
 $[O_2]$  : concentration en oxygène dissous du milieu (mg/l)
- $\chi$  : vitesse spécifique de production d'un métabolite (g produit/g cellules . h)  
 $\Delta H_1^*$  : enthalpie d'activation de la relation d'Arrhénius (kJ/mole)  
 $\Delta H_2$  : enthalpie d'inactivation thermique (kJ/mole)  
 $\epsilon$  : coefficient de turbidité (l/g cm)  
 $\Phi_s$  : flux de substrat par unité de surface cellulaire (Kg/m<sup>2</sup>.s);  
 $\mu$  : vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance (h<sup>-1</sup>)  
 $\mu_{max}$  ou  $\mu_m$  : taux de croissance maximal (h<sup>-1</sup>)  
 $\mu_t$  : taux de croissance associé au transfert de masse (h<sup>-1</sup>)  
 $\rho_c$  : masse spécifique de la cellule (kg/m<sup>3</sup>)  
 $\sigma$  : vitesse spécifique de consommation du substrat (g substrat/g cellules . h)