

Chapitre 3 : Culture des mycètes sur milieux de fermentation (milieux liquides et solides)

Introduction

Les microorganismes peuvent être cultivés aussi bien sur milieux nutritifs solides que liquides. Pour le travail en laboratoire, on utilise souvent des boîtes de Pétri remplies de milieux gélosés et des flacons. Ces flacons appelés fioles ou erlen-meyers (volume de remplissage : 50 à 500 ml) contiennent un milieu nutritif stérile qui peut être liquide (culture submergée) ou solide (fermentation sur milieu solide). On utilise souvent des erlen-meyers à encoches qui, par des mouvements réciproques ou circulaires dans un incubateur-agitateur, garantissent un approvisionnement suffisant en oxygène. On se sert la plupart du temps de bioréacteurs (fermenteurs) dans les domaines techniques. Ce sont des réacteurs fermés dont le volume varie de 1 litre à 500 m³. La plupart des réacteurs sont équipés d'un mélangeur (à pales) pour brasser la biomasse et, dans le cas des procédés en aérobie, celui-ci assure souvent l'apport en oxygène. La composition des milieux nutritifs a une grande influence sur la croissance des microorganismes et la formation des produits de leur métabolisme.

Quel que soit le procédé, la souche utilisée et le métabolite recherché, quatre points sont à prendre en considération lors d'une production par voie microbiologique (figure 4) : L'inoculum, le milieu nutritif, le bioréacteur et la séparation et purification.

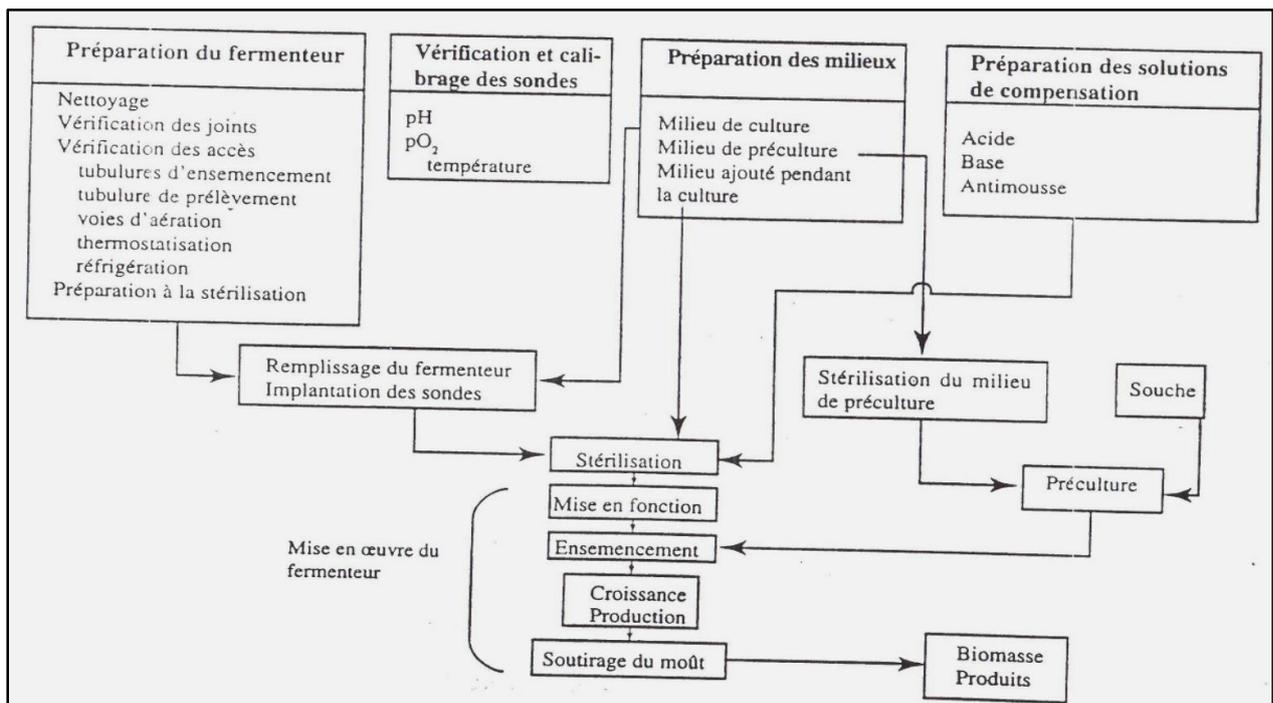


Figure 4 Organisation d'une production par voie microbienne

I-Inoculum

A-Propriétés : Pour réussir une production microbiologique, le matériel biologique doit répondre à ces exigences :

-Qualité La culture doit posséder une capacité maximale de production. La souche provient d'une colonie dont les potentialités de production et l'homogénéité morphologique sont analysées. Il est donc important d'avoir un génotype stable pendant tout le développement des cultures. Cet inoculum de base doit être soigneusement conservé si non le nombre de spores viables diminue et leur capacité à produire certains métabolites également. La conservation des spores ou du mycélium s'effectue sur milieu de protection sous azote liquide, qui assure une bonne viabilité et bonne stabilité de la très grande majorité des champignons. Les milieux de protection sont à base de glycérol, de diméthylsulfoxyde, de sérum, de lait ou de polyéthylène glycol. La lyophilisation permet l'obtention un matériel facile à transporter et, une fois préparé, celui-ci ne demande plus de soins spéciaux.

-Quantité La quantité de matériel d'inoculation des précultures et des cultures principales influe sur les caractères morphologiques des cultures et sur leur productivité. La suspension de spores est préparée dans le milieu de préculture auquel est ajouté un agent tensioactif tel que le tween 80 pour obtenir une suspension homogène, assurant un maximum de centre de croissance. Pour chaque souche et chaque procédé la quantité optimale d'inoculum pour les différents stades doit être déterminée.

-Axénie Des tests de stérilité servent à détecter la présence de contaminants à tous les stades de la préparation des inoculats (inoculum sporale, préculture, culture principale). Des prélèvements sont étalés sur des milieux gélosés ou inoculés en milieux liquides. Cette analyse est complétée par un examen microscopique.

B-Préparation :

a-Inoculum sporale

1-Milieux solides C'est le procédé habituel pour la reprise de croissance des souches, l'analyse des populations et la détection des contaminants. Après incubation, les spores sont récupérées par addition d'un milieu de protection et agitation intense.

2-Milieux liquides C'est la méthode idéale pour obtenir des inoculats de grand volume facile à manipuler. Cependant, beaucoup de champignons ne sporulent pas aisément en culture liquide

agitée. Les spores sont récupérées par filtration ou centrifugation. Elles sont ensuite mises en suspension dans un milieu de protection et conservées à basse température.

b-Inoculum végétatif Préculture, culture de propagation ou pied de la cuve. Avec l'inoculum sporal sont inoculés, en erlen meyers, puis en bioréacteur, des milieux de propagation permettant une germination rapide des spores et une croissance intense des hyphes. Les concentrations en nutriments peuvent être progressivement augmentées. Des milieux de propagation de composition qualitative proche du milieu de production permettent de réduire la phase de latence, et donc de diminuer les temps d'incubation (les milieux de propagation contiennent des substrats naturels : extrait de malt, extrait de levure, peptone, caséine...). Le type de milieu de propagation, les conditions et la durée d'incubation influent sur les taux de production obtenus dans la culture principale.

II- Milieux de culture

A-Formulation :

a-Eléments du milieu : Le milieu de culture approprié doit :

- Favoriser la croissance ;
- Dans le cas de la production de métabolites, assurer la production horaire maximale.

Chaque milieu doit être complet et fournir :

- Une source de carbone et d'énergie (glucose, amidon, mélasse, huiles...);
- Une source d'azote (sels d'ammonium ou de nitrate, acides aminés, farine de soja, peptone, extrait de levure...);
- Des sels minéraux (Mg, P, S, Cl...);
- Des oligo-éléments (Fe, Zn, Mn, Ca, Co...). Ces éléments sont présents en concentrations faibles (non optimale) dans les substrats naturels complexes. Une addition d'une solution d'éléments trace est généralement requise.

Dans certains cas, il est nécessaire d'ajouter des facteurs de croissance (acides aminés ou vitamines).

En cours de fermentation, diverses substances peuvent ou doivent être ajoutées : certains composants du milieu, précurseurs et des agents anti-mousse (les cultures en bioréacteurs ont tendance à former une mousse intense qu'il faut combattre avec des huiles ou des silicones). Il faut choisir un produit anti-mousse qui ne gêne ni la croissance de la souche, ni l'extraction du métabolite recherché. Le choix des éléments de croissance dépend de la souche de microorganisme, du type de production et des facteurs économiques et géographiques. Les éléments du milieu peuvent constituer jusqu'à 15-20% des coûts de production.

b-Optimisation : La productivité est influencée par l'ensemble des facteurs de l'environnement en particulier par les éléments nutritifs. L'amélioration des conditions s'effectue par l'utilisation des plans expérimentaux permettant l'étude simultanée de plusieurs facteurs (Ex : matrice de Placquet et Burman : sélection qualitative des sources de carbone et d'azote, plan composite centré de Box et Wilson : détermination des optima des facteurs sélectionnés).

B-Stérilisation : En laboratoire, la stérilisation est souvent effectuée par autoclavage. Après 15 minutes à 121°C, même les spores de bactéries thermophiles sont détruites. Les composés nutritifs sensibles à la chaleur (par exemple glucose, certaines vitamines) sont ajoutés à la suite d'une filtration stérilisante.

III- Bioréacteur

III-1- Définition : Un bioréacteur est une enceinte permettant la culture de tout type de cellule (animale, végétale, levure, moisissures et bactéries), et répondant à des critères de conception permettant d'influer efficacement sur la culture, de contrôler les paramètres physiques et chimiques (température, pH, aération, substrat...). Il doit permettre une stérilisation facile et un maintien de l'aseptie pendant toute la durée de la culture, et être caractérisé par une résistance mécanique et chimique aux contraintes liées à la culture du microorganisme (surpression, corrosion...)

Le type du réacteur idéal pour une production optimale, dépend : des caractéristiques de la souche productrice, du milieu utilisé ainsi que le produit recherché.

III-2- Types de bioréacteur : Les bioréacteurs à agitation mécanique sont les modèles utilisés par la très grande majorité des producteurs. Dans certains procédés industriels, des bioréacteurs pour substrats solides sont aussi utilisés.

III-2-1 Bioréacteurs à fermentation liquide : La performance des bioréacteurs dépend de leur construction géométrique, conception interne, la dispersion du gaz (aération et agitation), et les modes opératoires. Les types de réacteurs les plus utilisés dans les applications industrielles sont les cuves agitées. Dans l'objectif d'évaluer et de comparer des types de bioréacteurs, les critères de base les plus utilisés sont le transfert de masse gaz-liquide, le mixage du liquide, l'hydrodynamique des fluides et les forces de cisaillement. A titre d'exemple, pour une fermentation aérobie, la vitesse de consommation de l'oxygène est souvent très élevée et ainsi la capacité de transfert de matière (oxygène) est très importante dans ce cas. Pour des grandes installations (échelle industrielle), des hétérogénéités peuvent apparaître à cause de l'insuffisance d'agitation et on constate des fluctuations de concentrations des substrats et des produits (zones mortes) ce qui diminue les performances des réacteurs. Dans le cas des microorganismes sensibles aux forces de cisaillement, il est approprié d'employer d'autres types de bioréacteurs tels que les colonnes à bulles ou les réacteurs Air-Lift.

- 1) Cuve mécaniquement agitée
- 2) La cuve mécaniquement agitée aérée
- 3) Bioréacteurs avec agitation pneumatique
- 4) Réacteur à couche fixe ou à couche fluidisée
- 5) Les bioréacteurs membranaires

III-2-2- Bioréacteurs à substrats solides : Pour réaliser une fermentation en milieu solide, il est nécessaire d'avoir des équipements appropriés. Le développement de la FMS a ainsi entraîné le développement de fermenteurs solides. Cependant, le choix d'un fermenteur est délicat puisqu'il faut tenir compte de la granulométrie et de la capacité de rétention d'eau du substrat utilisé et de différents paramètres liés à la croissance du micro-organisme tels que : l'agitation, l'aération, la chaleur, etc. Les différents types de réacteurs industriels existants sont principalement destinés à la production de saké ou de sauce soja et présentent généralement une taille de 1 à 2 tonnes, mais certaines sociétés d'ingénierie sont capables de réaliser des réacteurs allant jusqu'à 20 tonnes (société Fujiwara). Le nombre de réacteurs conçus pour la FMS reste cependant encore limité et ceux-ci ne sont pas optimisés. Les quatre principaux types de réacteurs communément utilisés sont :

- 1) Les bioréacteurs à plateaux (*Tray bioreactor*)
- 2) Les bioréacteurs à lit fixe (*Packed bed bioreactor*)
- 3) Les bioréacteurs à tambour rotatif (*Rotating drum bioreactor*)
- 4) Les bioréacteurs à lit fluidisé (*Fluidized bed bioreactor*)

III-3-Modes de culture :

III-3-1-Culture sur substrat solide (fermentation sur milieu solide : FMS) : La culture sur substrat solide est traditionnelle en Asie pour l'obtention de produits dérivés fermentés du riz et du soja. La fermentation en milieu solide (FMS) est décrite comme un processus où les micro-organismes sont cultivés sur une matrice solide, servant de support et/ou de substrat, en absence ou presque d'eau libre. Cependant, la matrice doit contenir assez d'eau pour permettre la croissance du micro-organisme. Le maximum d'humidité dépend de la capacité d'absorption du substrat utilisé. Les milieux solides sont l'habitat naturel des champignons, il est donc naturel que la FMS soit mieux adaptée à leur culture par rapport aux micro-organismes unicellulaires. De part leurs propriétés biochimiques, enzymologiques et physiologiques, les champignons permettent de produire des molécules très variées. De plus, la croissance apicale des champignons permet une colonisation rapide du milieu.

Inconvénients et avantages de la fermentation en milieu solide

Divers problèmes peuvent être rencontrés au cours d'une fermentation en milieu solide. Les principaux obstacles rencontrés sont : la faible capacité à réguler les paramètres influençant la FMS, la forte hétérogénéité du milieu, le passage à grande échelle, l'estimation de la biomasse. La fermentation en milieu liquide (FML) semble alors être plus facile à contrôler et donc à utiliser.

Cependant, la FMS possède de nombreux avantages par rapport à la FML. Tout d'abord, elle se prête bien à la croissance de champignons filamenteux puisqu'elle mime les conditions naturelles de développement de ces micro-organismes. Le procédé se déroulant à de faibles taux d'humidité, le risque de contamination par les bactéries et les levures est moins important. De plus, un ensemencement important permet de contourner une éventuelle contamination par d'autres champignons. Les conditions de stérilité ne sont donc pas aussi strictes qu'en FML. La FMS permet d'utiliser beaucoup moins de liquide par rapport à la FML ce qui permet de réduire le volume d'eau à traiter entraînant ainsi une diminution du coût de production global. Il est également décrit que la FMS permet d'obtenir de meilleurs rendements pour la production d'enzymes. Un des avantages majeurs de la FMS est la valorisation des co-produits solides agro-industriels. Ceci est très important au niveau environnemental et économique.

III-3-2-Fermentation liquide : La fermentation submergée comprend une large variété de processus microbiens agités et non agités, où la biomasse est complètement encerclée dans le milieu de culture liquide. Celles-ci sont réalisées avec différents substrats, habituellement

dissout ou en suspension dans un milieu aqueux. Il existe trois modes de culture sur milieu liquide parfaitement agité :

1-Culture liquide agitée en batch : C'est une culture discontinue, le procédé est réalisé dans un système clos (fermé) dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes ; la quantité de nutriments est donc limitée, se déroule dans un fermenteur parfaitement mélangé. Un même volume du milieu reste constant dans la cuve et sert à réaliser les phases de croissance, de production et d'accumulation du produit. Après avoir remplis le fermenteur de milieu stérile et l'inoculer, on n'introduit rien, que la solution de correction de pH et l'agent anti-mousse. La croissance se poursuit jusqu'à l'épuisement du milieu nutritif, les conditions extérieures de température, en particulier, étant maintenues constantes et favorables au développement du microorganisme étudié (figure 12).

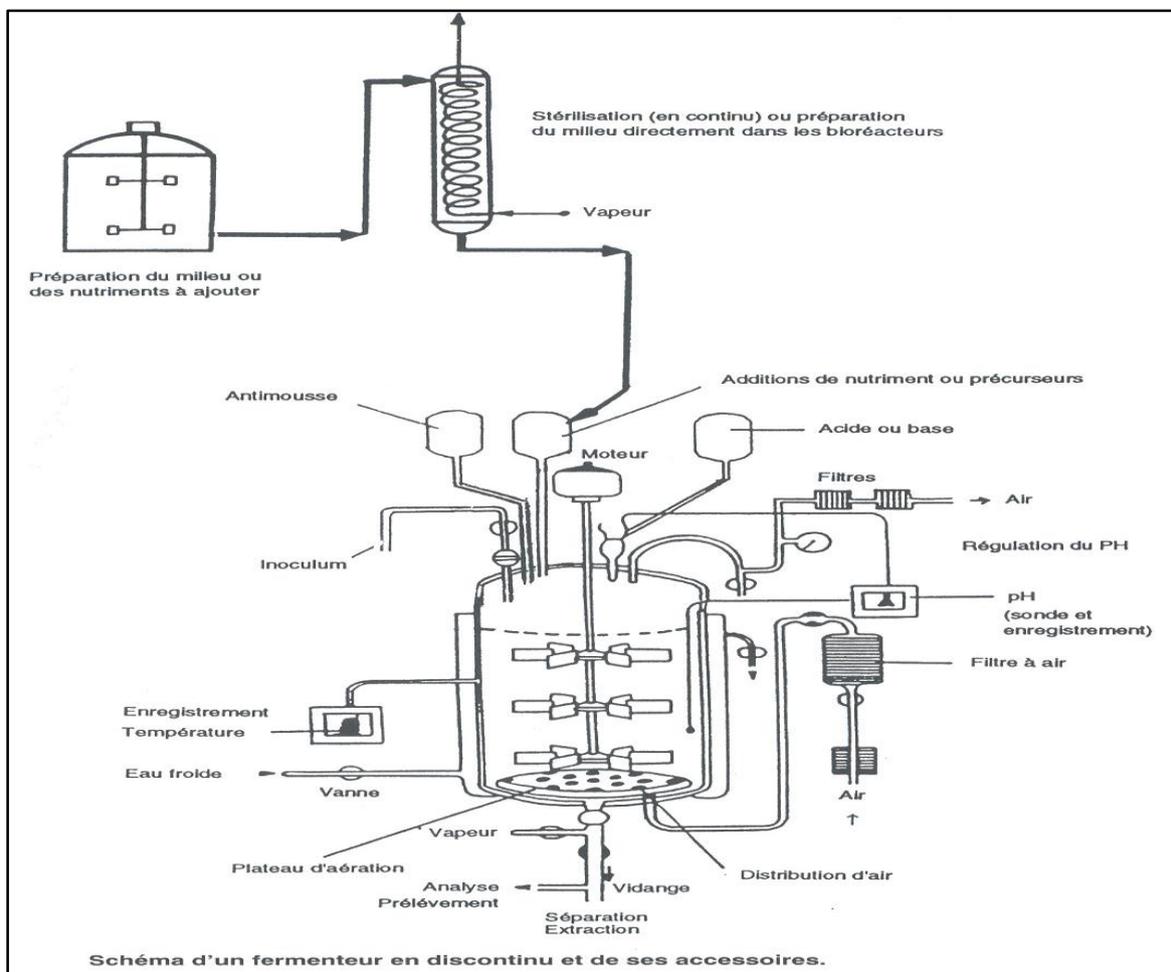


Figure 12 Schéma d'un fermenteur en mode discontinu et ses accessoires.

Il se déroule dans le temps selon la figure 13 qui donne l'évolution de la concentration cellulaire en fonction du temps. La courbe de croissance microbienne en mode discontinu fait apparaître différentes phases (figure 13).

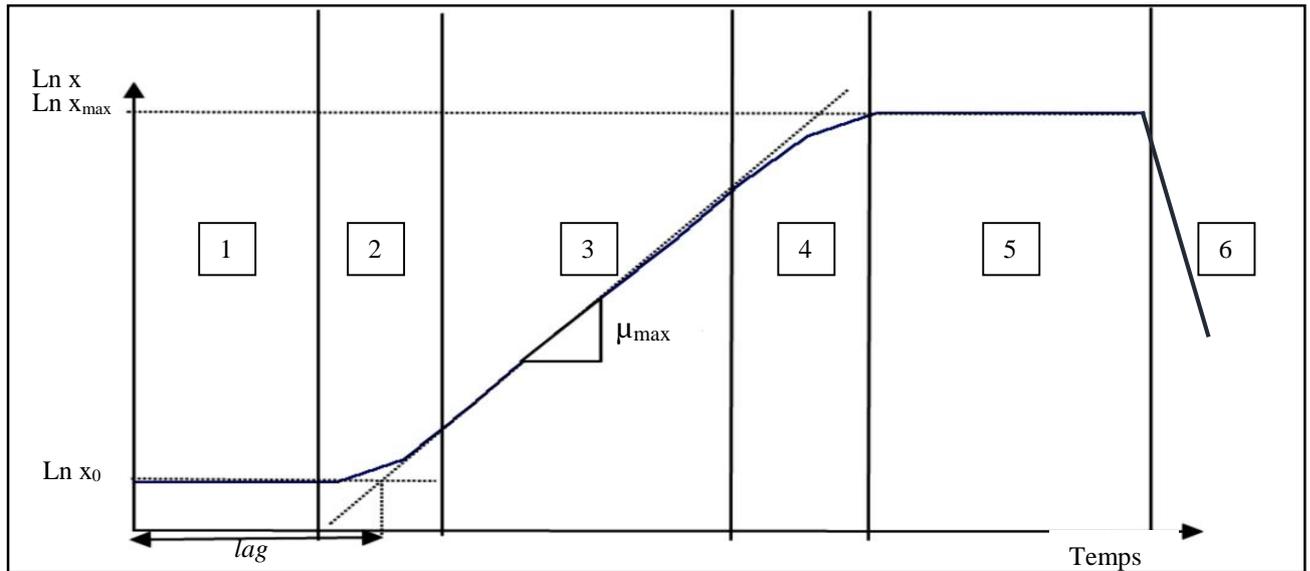


Figure 13 Courbe de croissance microbienne avec ces différentes phases en mode discontinu.

Les microbiologistes utilisent classiquement les paramètres cinétiques suivants pour caractériser ces différentes phases :

La densité cellulaire (biomasse) initiale (x_0), le temps de latence (lag), la vitesse spécifique maximale également appelée taux de croissance (μ_{max}), le temps de génération (T_g) et la densité maximale atteinte (X_{max}).

Le temps de latence, lag , est défini par convention comme étant l'intersection de la droite correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques) avec la droite horizontale passant par la concentration initiale x_0 (figure 13). La vitesse de multiplication ou taux de croissance (vitesse de croissance par unité de densité) maximum, μ_{max} , est la pente correspondant à la phase exponentielle (en coordonnées semi-logarithmiques).

1-Phase de latence : C'est une période d'adaptation métabolique du microorganisme au milieu, au cours de laquelle, il synthétise les enzymes nécessaires à la métabolisation des substrats disponibles. Cette phase est sans division cellulaire ($x = x_0$ population constante), la vitesse de croissance est nulle ($\mu=0$). Sa durée est variable et dépend de plusieurs facteurs : âge, état physiologique des cellules, qualité du milieu. Cette phase peut être réduite et peut même être supprimée par l'inoculation de cellules (ou de spores) en bon état physiologique, obtenues en pré culture sur le même milieu.

2-Phase d'accélération : La multiplication cellulaire démarre avec une vitesse spécifique de croissance de plus en plus grande ($0 < \mu < \mu_{max}$).

3-Phase exponentielle : La croissance est maximale et constante. Les cellules filles croissent au même taux que leurs cellules mères. Le nombre de cellules en culture et leur masse augmente proportionnellement au temps, selon une progression géométrique, d'où l'allure exponentielle du phénomène. En coordonnées semi-logarithmique, $\log x = f(t)$, cette phase est représentée par une droite. Le taux de croissance μ est constant et maximum pendant cette phase (il est nul pendant la phase de latence et stationnaire). Il est graphiquement représenté par la pente de cette droite. La quantité de nutriments est en excès et la biomasse augmente donc le plus rapidement. Les produits formés au cours de cette phase sont les métabolites primaires. Tant que n'apparaît pas de facteur limitant la croissance, la phase exponentielle se poursuit.

On peut relier μ au temps de génération t_g . Une population initiale de biomasse x_0 se multipliant par division binaire évoluera de la façon suivante (t_g est alors un temps de doublement) : après **un** doublement ($t=t_g$), on aura $x_1=2 x_0$ individus ; après **deux** doublement ($t=2 t_g$) on aura $x_2=2^2 x_0$ individus ; après **n** doublement ($t=n t_g$) on aura $x_n=2^n x_0$ individus

Pour cette phase :

L'équation exponentielle de la croissance est donnée par : $X_t = X_0 e^{\mu t}$, et $\ln X_t = \ln X_0 + \mu t$

X_t : biomasse à l'instant t ($g.l^{-1}$)

X_0 : biomasse initiale ($g.l^{-1}$)

μ : vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle h^{-1}

t : temps (heure)

- **Le temps de génération G** (heures) c'est le temps qui sépare deux divisions successives (temps nécessaire au doublement), exprimé par : $G = 1/\mu$.
- **Le taux de croissance μ ou la vitesse spécifique de croissance** ($heures^{-1}$), correspond au nombre de division effectuée par unité de temps, on dit aussi la vitesse de croissance par unité de densité cellulaire. $\mu = 1/G$ aussi $\mu = n \ln 2 / t$. Graphiquement, μ représente la pente de la droite de la phase exponentielle : $\mu = \ln x_2 - \ln x_1 / (t_2 - t_1)$.

4-Phase de ralentissement : La population ne peut pas croître indéfiniment dans un milieu non renouvelé. Le taux de croissance diminue progressivement, entraînant une augmentation de plus en plus réduite du nombre de cellules. Un ralentissement ou un arrêt de la croissance apparaissent lorsque un nutriment essentiel est épuisé : limitation par le substrat énergétique, la

source d'azote, un facteur de croissance. Le milieu devient carencé : le facteur impliqué est appelé facteur limitant la croissance. L'arrêt peut aussi survenir à la suite de l'accumulation de substances toxiques spécifique ou non (acidité).

5-Phase stationnaire : C'est le niveau d'accumulation maximum de la biomasse, X atteint son niveau maximum X_f (la croissance cesse). L'augmentation de la concentration cellulaire s'arrête ($\mu = 0$), Ceci se traduit graphiquement par un plateau de durée variable mais généralement courte. Elle fait suite à la consommation des nutriments et à la présence de déchets microbiens bactériostatiques et bactéricides. On distingue deux situations possibles : les micro-organismes peuvent survivre sans multiplication cellulaire dans un milieu défavorable à leur développement ; il peut également se produire des divisions cellulaires mais celles-ci donnent naissance chacune à deux cellules dont une est mort-née. Les métabolites secondaires, qui ne présentent pas de fonction particulière dans le métabolisme et dans la croissance cellulaire, sont formés le plus souvent en fin de phase de ralentissement et pendant la phase stationnaire.

La phase stationnaire permet de déterminer les rendements :

- **Le rendement en biomasse** : appelé aussi **coefficient de conversion de substrat**, représente la quantité de biomasse produite par gramme de substrat consommé pendant un intervalle de temps très court. Le rendement global s'applique à l'ensemble de la culture : $Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S = (X - X_0) / (S_0 - S)$ en grammes de biomasse (masse sèche) produit par gramme de substrat consommé.
- **La productivité** est la quantité de biomasse produite par unité de volume et de temps : $Q_x = \Delta X / \Delta t = (X - X_0) / (t - t_0)$, X est une concentration (g/L) et Q_x s'exprime en g/L/h. Selon l'intervalle de temps choisi, on définit une productivité maximale et une productivité totale.
- **Le rendement en produit** par rapport à la biomasse produite et par rapport au substrat consommé, respectivement : $Y_{P/X} = \Delta P / \Delta X = (P - P_0) / (X - X_0)$,

$$Y_{P/S} = \Delta P / \Delta S = (P - P_0) / (S_0 - S).$$

6-Phase de décroissance (phase de déclin) : La phase de déclin correspond à la diminution de la biomasse liée à une lyse cellulaire. Le nombre de cellules viables diminue, du fait de la mortalité dont le taux augmente progressivement. Parallèlement, la concentration en biomasse décroît à la suite de l'autolyse des cellules mortes, sous l'action de leurs propres enzymes hydrolytiques (protéases, lipases, nucléases, polysaccharidases).

Remarque : La phase de ralentissement et la phase stationnaire sont extrêmement importantes, dans le cas de microorganismes producteurs de métabolites secondaires tels que les antibiotiques.

2-Culture discontinue alimentée (fed-batch) : C'est une culture en batch, qui commence dans un petit volume de milieu de culture (pied de la cuve). La culture démarre plus vite par le fait de l'inoculation d'un faible volume par un même taux d'inoculum que précédemment. Cette phase de démarrage correspond à la culture discontinue. Lorsque le microorganisme est en phase exponentielle, le milieu de culture stérile est introduit dans la cuve. Le débit d'alimentation est réglé de telle sorte que la concentration en substrat soit constante dans la cuve et corresponde à une étape de la phase logarithmique de croissance. L'augmentation de la quantité de biomasse dans le fermenteur au cours d'un intervalle de temps est due à la croissance microbienne et à l'augmentation du volume de milieu du fait de l'alimentation en milieu frais. Lorsque la cuve est remplie, l'alimentation est coupée. La culture évolue conformément à la courbe de croissance discontinue. Cela correspond à la phase de ralentissement puis à la phase stationnaire au cours desquelles on observe l'épuisement en substrat du milieu.

3-Culture continue : La croissance continue correspond à un système ouvert dans lequel la population microbienne est maintenue dans un état de croissance équilibré et optimale en phase exponentielle. Cette situation est stabilisée par le renouvellement permanent du milieu de culture, assuré par un apport régulier de milieu nutritif qui est compensé par le retrait simultané du même volume de culture. Les paramètres physico-chimiques de la culture (pH, température, concentration en oxygène et la mousse) sont contrôlés en permanence en cours de culture par leur correction si nécessaire. Dans un milieu non renouvelé, la phase de déclin est vite atteinte. Cela crée des problèmes pour les bio-industries. **Du point de vue économique**, il est très important de prolonger la phase exponentielle plusieurs jours. La solution est de renouveler constamment le milieu de culture et en récupérant les produits du métabolisme et les déchets. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de chémostat et d'autres équipements plus complexes.

III-3-3-Comparaison entre la fermentation liquide et la fermentation solide

Divers problèmes peuvent être rencontrés au cours d'une fermentation en milieu solide.

Les principaux obstacles rencontrés sont : la faible capacité à réguler les paramètres influençant la FMS, la forte hétérogénéité du milieu, le passage à grande échelle, l'estimation de la biomasse. La fermentation en milieu liquide (FML) permet un meilleur contrôle des facteurs

environnementaux tels que la température et le pH. Cependant, les produits sont dilués et les extraits enzymatiques peuvent être moins stables.

Cependant, la FMS possède de nombreux avantages par rapport à la FML. Tout d'abord, elle se prête bien à la croissance de champignons filamenteux puisqu'elle mime les conditions naturelles de développement de ces micro-organismes. Le procédé se déroulant à de faibles taux d'humidité, le risque de contamination par les bactéries et les levures est moins important. De plus, un ensemencement important permet de contourner une éventuelle contamination par d'autres champignons. Les conditions de stérilité ne sont donc pas aussi strictes qu'en FML. La FMS permet d'utiliser beaucoup moins de liquide par rapport à la FML ce qui permet de réduire le volume d'eau à traiter entraînant ainsi une diminution du coût de production global. Il est également décrit que la FMS permet d'obtenir de meilleurs rendements pour la production d'enzymes. Un des avantages majeurs de la FMS est la valorisation des coproduits solides agro-industriels. Ceci est très important au niveau environnemental et économique.

III-4-Processus de mise à l'échelle (ou extrapolation)

On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal :

- 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 500 000 L (500 m³).

Le *scale up* (ou mise à l'échelle) est le transfert du procédé d'un bioréacteur de laboratoire de petit volume à celui d'un bioréacteur industriel à grande échelle. Le *scale up* s'effectue en plusieurs étapes : de la fiole d'erlen meyer au bioréacteur de paillasse, du bioréacteur de paillasse au bioréacteur pilote de laboratoire et du bioréacteur pilote de laboratoire au bioréacteur industriel. Il est impossible de conserver l'ensemble des paramètres identiques ou proportionnels au changement d'échelle. Chaque transfert à une plus grande échelle est complexe car divers paramètres tels que le barème de stérilisation, l'aération et l'agitation sont modifiés lorsqu'on augmente le volume, le diamètre et la hauteur du bioréacteur. Des conditions physicochimiques similaires doivent être maintenues dans l'environnement de chaque cellule malgré l'augmentation du volume de culture. Chaque étape du *scale up*, divers paramètres sont analysés puis modifiés car les réactions physicochimiques et enzymatiques se produisant à l'intérieur du bioréacteur varient en fonction du volume du réacteur utilisé.

En outre, lors du changement d'échelle il est indispensable :

- de prendre en compte les coûts d'investissement du matériel (bioréacteur, techniques d'extraction et de purification) et de fonctionnement (milieu de culture et énergie) ;
- de réaliser si possible une automatisation du matériel ;
- de réduire la production de déchets ;
- d'obtenir des produits correspondant à la qualité souhaitée.

III-5-Contrôle de la fermentation

Au cours de la fermentation, un ensemble de paramètres physiques, chimiques et biologiques (tableau 3) est mesuré afin de contrôler le procédé et de rassembler des informations permettant une optimisation et une modélisation.

Tableau 3 Paramètres de la fermentation et mesures.

Paramètre	Mesure
Température	Thermocouples, thermistors ou résistances de platine
pH	Sondes
Oxygène dissout	Sondes polarographiques, électrodes galvaniques
Bilan gazeux	Spectrophotomètre de masse
Bilan O ₂	Analyseur à O ₂ paramagnétique
Bilan CO ₂	Analyseur infrarouge
Substrat et métabolites	Dosages chimiques et physico-chimiques, électrodes spécifiques
Population cellulaire	Examen microscopique, poids sec, volumes de culots de centrifugation, dosages chimiques (ADN, protéines...)

III-6-Problèmes spécifiques aux champignons filamenteux

Les champignons filamenteux ont tendance à s'agglomérer en grumeaux plus ou moins denses et plus ou moins développés au sein desquels les transferts de nutriments et d'oxygène sont

atténués. Tout un ensemble de facteurs joue un rôle sur la formation de ces « pellets ». Si certaines fermentations requièrent une croissance filamenteuse homogène pour une production maximale, d'autres s'effectuent avec succès avec ces pellets (par exemples la production d'alcaloïdes par diverses souches de *Claviceps purpurea*). Divers champignons filamenteux se révèlent sensibles aux forces de cisaillement. Dans ce cas, il faut adapter les systèmes d'aération ou sélectionner des mutants adaptés. Souvent, la production d'un métabolite est liée à un stade physiologique et morphologique déterminé qu'il faut atteindre et maintenir. Les champignons peuvent former à la surface du milieu un mycélium qui peut sporuler. Ces spores provoquent des mélanges de génération.

IV-Séparation et purification

La part des couts totaux d'une production par voie microbiologique des processus de séparation, extraction et purification n'est pas négligeable et varie entre 20 et 50%. Dans le cas de la production de biomasse, les cellules sont récupérées par filtration ou centrifugation. Pour les métabolites (primaires, secondaire), l'extraction se fait en différentes étapes selon les caractéristiques chimiques du produit puis les extraits sont purifiés.

IV- 1-Filtration : Les membranes de filtration sont de plus en plus utilisées (polysulfone, polyamide, polycarbonate...). Il y a aussi les filtres rotatifs, qui sont des tambours perforés tournent dans le bouillon de culture et une pompe à vide aspire le milieu vers l'intérieur du tambour. Celui-ci peut être recouvert d'une couche d'agents filtrants (fibres de cellulose, perlite...).

IV -2-Centrifugation : La centrifugation est efficace lorsque la séparation des phases solides et/ou liquide est impossible par sédimentation simple par filtration. Les avantages de ces appareils sont nombreux :

*Traitement de grands volumes de liquide en continu ;

*Travail dans des conditions aseptiques, si nécessaire ;

*Encombrement réduit ;

*Durée de travail brève permettant la manipulation de molécules relativement instables.

IV-3-Extraction par solvants : Le but de l'extraction à l'aide de solvants est de faire passer le métabolite de la phase aqueuse à une phase organique (purification partielle du produit). Le pH

du bouillon de fermentation est ajusté, souvent par acidification, avant l'extraction par le solvant. Le choix de ce dernier dépend de plusieurs paramètres :

- *Stabilité des métabolites lors de l'extraction et de la concentration par distillation ;
- *Stabilité du solvant et coefficient de partage de la molécule entre le milieu et le solvant ;
- *Sélectivité du solvant et sécurité d'emploi (toxicité, point d'inflammation) ;
- *Coût d'acquisition et facilité de distillation.

Après mélange du bouillon de fermentation avec le solvant, les phases sont séparées soit par décantation spontanée, soit par centrifugation. La séparation des phases se fait généralement dans un décanteur-extracteur. Elle est suivie d'une étape de concentration par distillation pour réduire le volume.

IV-4-Séparation sur résines : Certaines substances chimiques mises en solution ont la faculté d'adhérer, dans des conditions précises à un support granulé ou sphérique, la résine. Ce pouvoir de capter les substances est lié à des phénomènes de charges électriques (échanges d'ions) et à des phénomènes provoqués par les forces de liaison moléculaires de VAN DER WAALS (adsorption). Les modes de séparation sur résine varient d'après les propriétés chimiques et physiques des supports :

*Purification par adsorption : le support est un adsorbant qui fait appel à la tendance plus ou moins prononcée que possède une molécule à se lier à un solide (silice, alumine, résines organiques synthétiques) ;

*Séparation par échange d'ion : cette technique est basée sur les différences de charge moléculaire entre les produits recherchés et les impuretés qui les accompagnent d'une part, et le support d'autre part : résines cationiques avec charges positives et résines anioniques avec charges négatives....

*Séparation d'affinité : cette technique exploite la formation d'un complexe biospécifique. Son coût est très élevé. Elle sert à préparer des produits de grande pureté.

Les opérations successives d'une séparation sur résine sont les suivantes :

-La solution contenant le métabolite est passée sur la résine. Le métabolite est fixé sur le support, la plupart des impuretés ne sont pas retenues et traversent la colonne ;

-Suivant les besoins, l'introduction d'une solution de lavage enlève d'autres impuretés sans éluer le métabolite recherché ;

-Le métabolite est ensuite élué par passage d'une solution d'élution et récupéré sous sa forme purifiée à la sortie de la colonne ;

-Finalement, la résine est régénérée pour le traitement suivant.

IV-5-Etapes finales de l'extraction : Le métabolite extrait, est en grande partie purifié, se trouve en solution aqueuse ou organique. Plusieurs opérations industrielles choisies en fonction du type de métabolite restent à effectuer :

-Séparation des solvants par distillation ;

-Purification par précipitation (addition d'un solvant ou formation d'un sel) ;

-Réduction des volumes par osmose inverse ou par évaporation du solvant ;

-Séchage de l'extrait (séchoir, vaporisateur ou lyophilisateur) ;

-Stérilisation par filtration sous pression au travers de membranes ;

-Formulation.

IV-6-Traitement des effluents : Les effluents d'une usine de production microbiologique par fermentation sont constitués de dizaines ou de centaines de m³ de liquide chargé de nombreux composés biodégradables comme les cellules, leur débris, des protéines, des glucides, des lipides, des vitamines ainsi que des composants inorganiques. Après concentration ou séchage préalable, la charge de matière contenue dans ces fluides est valorisée par son utilisation comme aliment pour les animaux ou comme fertilisant. La digestion sur les lits bactériens des stations d'épuration biologique ou la destruction par incinération est également possible.