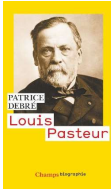


*Définition au sens biochimique du terme*



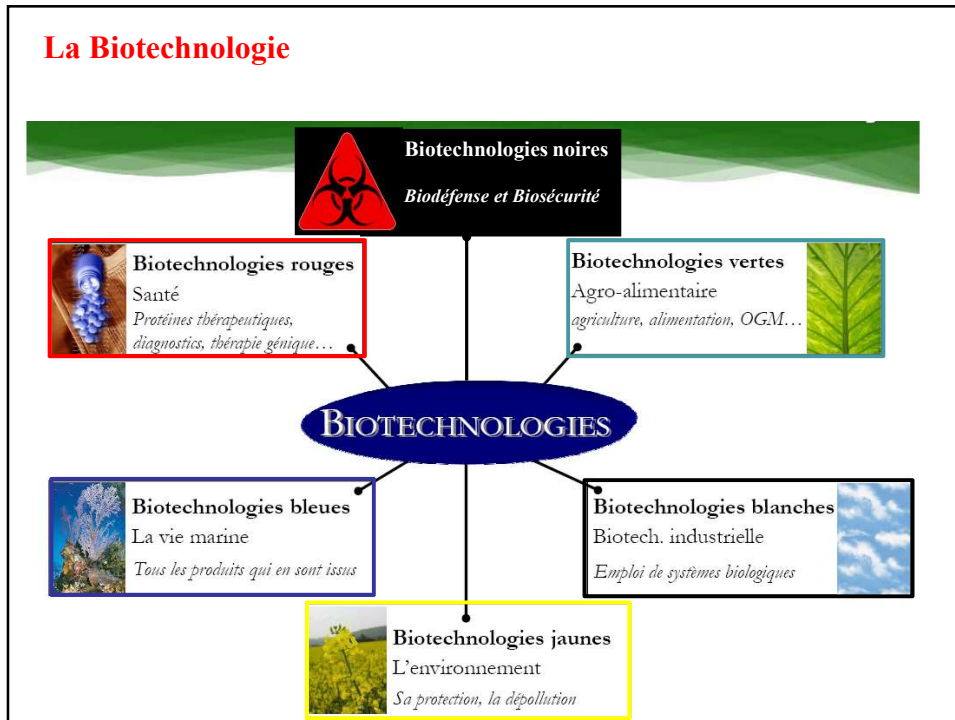
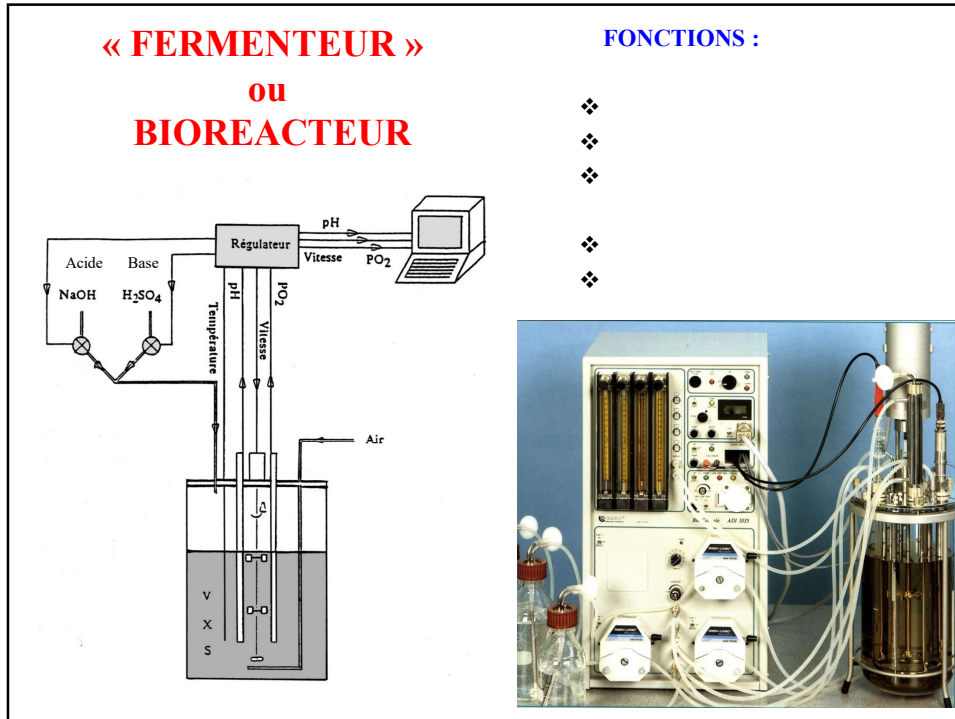
*Ambiguïté de la définition*

## La fermentation



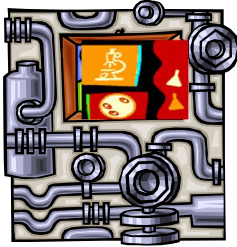
### Fermentation et Biologie de Synthèse

- Alternative à la chimie de synthèse :  
pour la production à large échelle  
de molécules complexes  
*via* des micro-organismes  
« *via* des outils biologiques »





## La bioproduction



La diversité des métabolismes microbiens  
induit  
la diversité des procédés de culture

Comment cultiver un micro-organisme :

- Quels sont les paramètres importants ?

- Selon quels modes de culture ?  
Avec quelles cinétiques microbiennes ?

Dans quels appareillages ?

### Les paramètres importants

#### Paramètres physico-chimiques

- pH
- l'O<sub>2</sub>
- T°c, chaleur
- Pression osmotique : Aw
- Lumière

#### Paramètres cinétiques

- taux de dilution
- débit d'alimentation

#### Choix du matériel biologique

- Sélection variétale
- Construction de souche
- Stabilité génétique
- Performance métabolique

#### Milieux de culture

- Source d'azote
- Source de carbone
- Nutriments
- Qualité de l'eau

#### Accumulation de métabolites ou produits

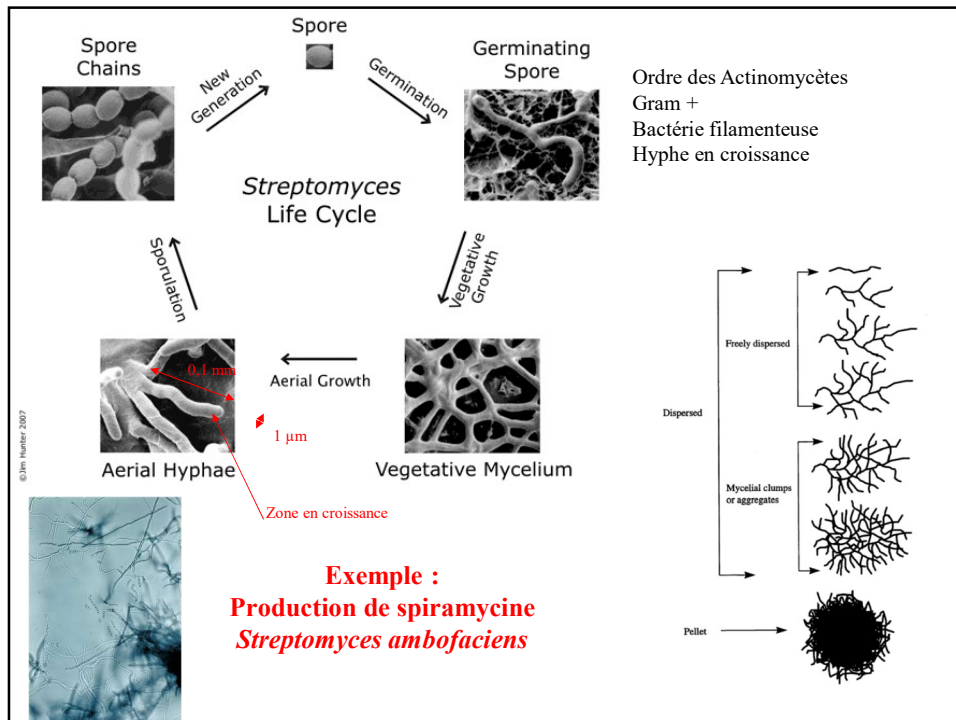
« P »

#### Rusticité et robustesse Adaptation métabolique

#### Bioprocédé

- Bioréacteur
- Mode de culture
- Automatisation des procédures





### Définir l'environnement physico-chimique de croissance

pH  
T°C  
pO<sub>2</sub> %  
aw  
...

acidophile    neutrophile    alkaliphile

Psychrophile  
Psychrotroph  
Mesophile  
Thermophile  
Extreme thermophile

**Impact d'un paramètre environnemental sur la croissance et la production d'un métabolite**

**Optima de croissance**

pH 6-7  
Température 30-37°C

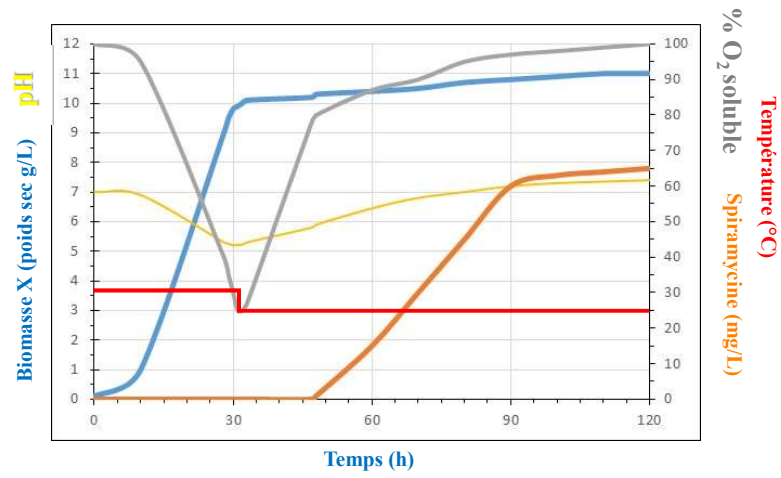
**Exemple de la production d'antibiotiques par des actinomycètes**

*Streptomyces*

- Spiramycine    25°C
- Acide paspalique    21°C
- Rifamycine    23°C
- Nébramycine    28°C
- Monensine    32°C

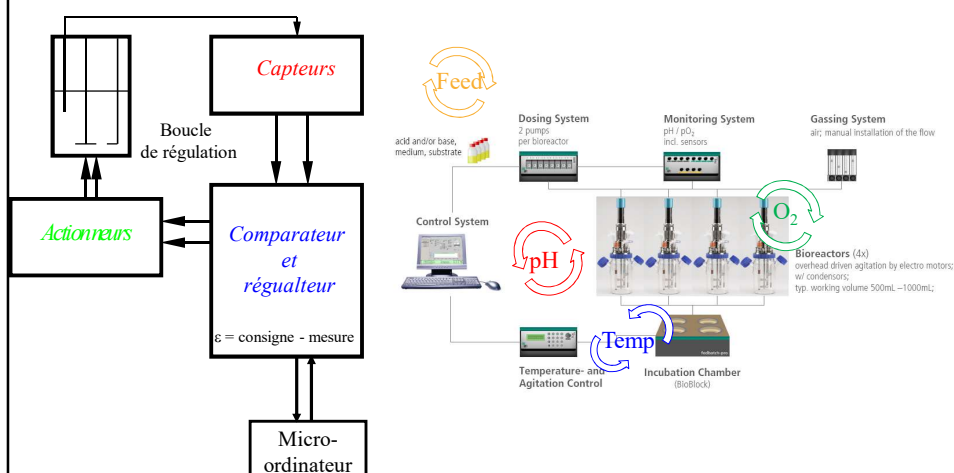
**Spiramycine**

## Analyse du métabolisme de *Streptomyces ambofaciens*



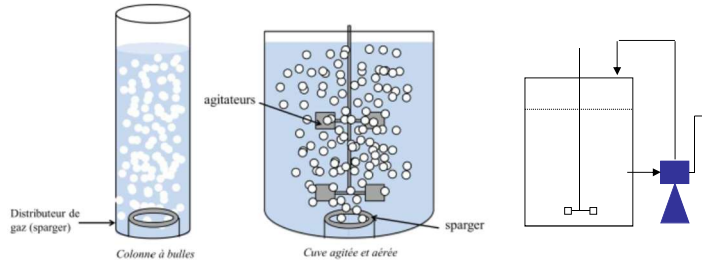
? Métabolisme acidifiant ou alcalinisant  
? Aérobie ou anaérobie

## Les Modes de régulation en bioréacteur



Quels mécanismes de régulation peut-on mettre en œuvre ?

## Quel régime d'agitation choisir ?



**1-agitation  
pneumatique**

**Réacteur Air lift,  
colonne à bulle**



**2- agitation mécanique  
Pompe  
Agitation radiale  
ou axiale**

**Stirred Tank Reactor,**

## Diversité des outils de brassage

### Agitation mécanique

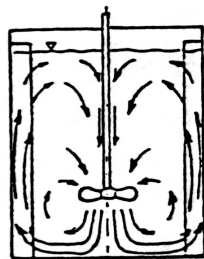


Ruban hélicoïdal



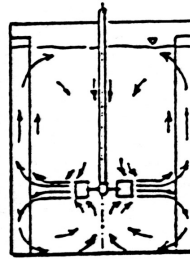
Hélice marine

Agitation à débit axial



↗ Temps de séjour

Agitation à débit radial



↗ Cisaillement



Hélice Ruschton



Paddle

Turbines à débit radial

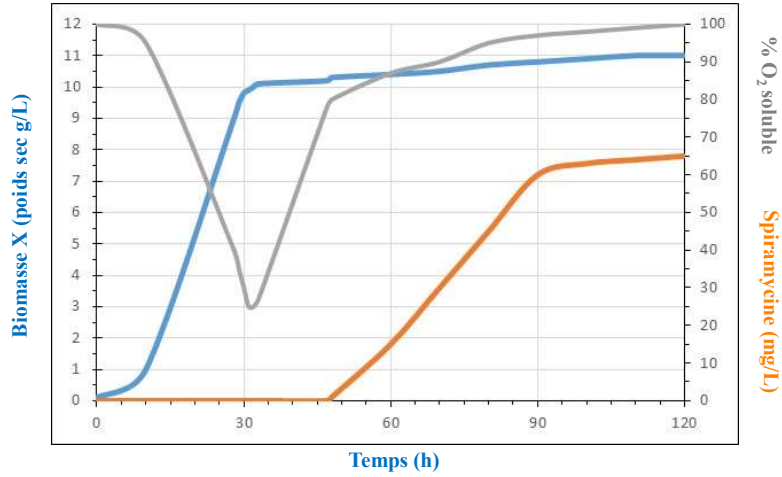
Turbines à débit axial

- ✓ Efficacité du transfert en O<sub>2</sub>
- ✓ Fragilité des cellules
- ✓ Viscosité des suspensions
- ✓ Utilisation des volumes morts

...



## Bilan cinétique



? Analyse des phases de croissance

## Cinétique de croissance en culture « BATCH »

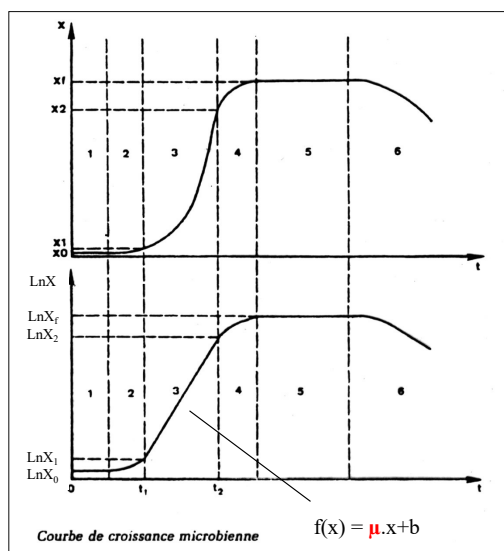
- 1- LA PHASE DE LATENCE
- 2- La phase d'accélération
- 3- LA PHASE EXPONENTIELLE
- 4- La phase de ralentissement
- 5- LA PHASE STATIONNAIRE
- 6- La phase de déclin

**En phase exponentielle (3)**

$$X_2 = X_1 \cdot e^{(\mu \cdot \Delta t)}$$

$$\ln(X_2) = \mu \cdot (t_2 - t_1) + \ln(X_1)$$

$$\mu = \text{Cste} = \ln(X_2/X_1)/(t_2 - t_1)$$





**En phase exponentielle :**

Tg : temps de génération cellulaire

$$T_g = \Delta t = (t_2 - t_1)$$

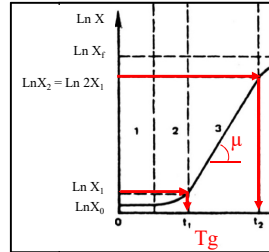
si

$$[X_2] = 2[X_1]$$

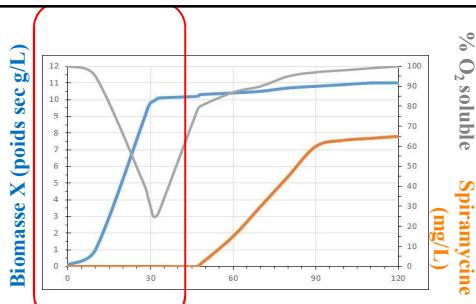
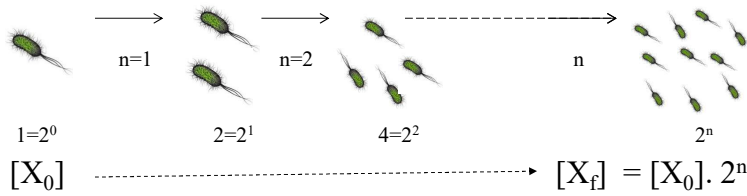
$$\mu = \text{Ln} (X_2/X_1) / (t_2 - t_1)$$

$$\mu = \text{Ln} 2 / T_g$$

$$T_g = \text{Ln} 2 / \mu$$



n : nombre de génération cellulaire



? Bilan cinétique

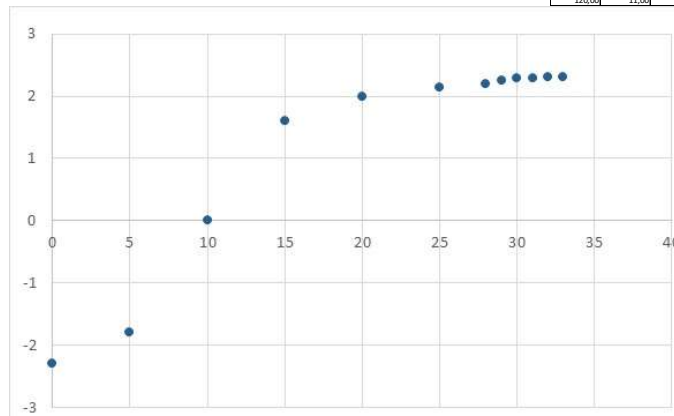
Temps	[X]	Ln
h	g/L	
0,00	0,10	-2,30
5,00	0,17	-1,80
10,00	1,00	0,00
15,00	4,95	1,60
20,00	7,39	2,00
25,00	8,58	2,15
28,00	9,00	2,20
29,00	9,50	2,25
30,00	9,80	2,28
31,00	9,90	2,29
32,00	10,00	2,30
33,00	10,10	2,31
34,00	10,20	2,32
35,00	10,30	2,33
36,00	10,40	2,34
37,00	10,50	2,35
38,00	10,60	2,37
39,00	10,69	2,38
40,00	10,80	2,39
41,00	11,00	2,40
42,00	11,00	2,40

$\mu =$

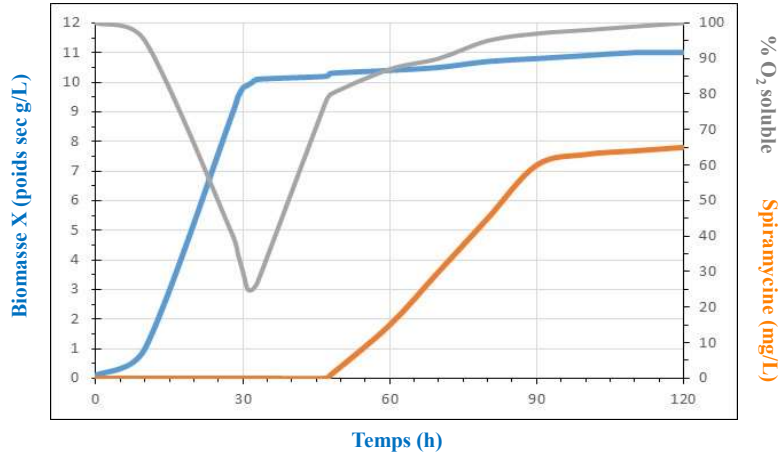
$T_g =$

$N =$

Ln(X)

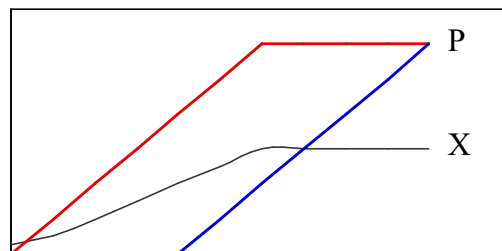


## Bilan métabolique



? Métabolites primaires ou secondaires

## Bilan métabolique

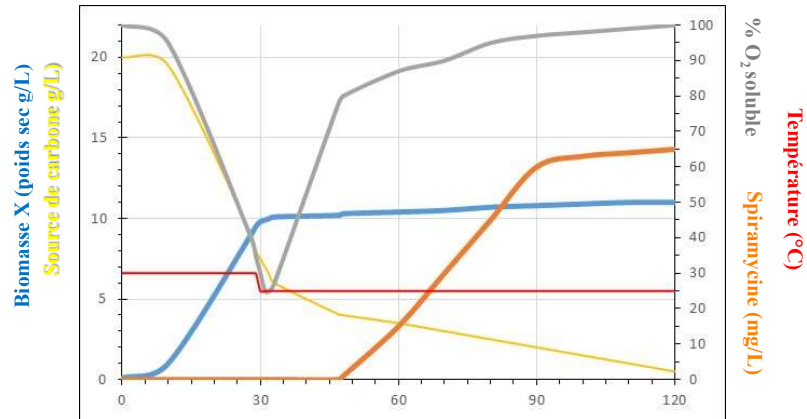


**Métabolisme**

**Primaire / Secondaire**

**Couplage / découplage**  
**Croissance et production**

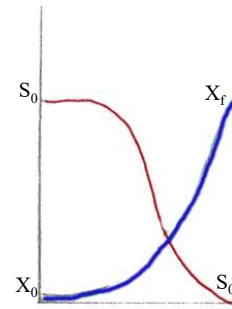
## Bilan métabolique



Analyse des rendements et productivités du procédé ?

## Bilan métabolique

**La notion de rendement (Y) et de productivité**



Rendement en Biomasse

$$Y_{X/S} = -dX/dS \approx -\Delta X/\Delta S \approx (X_{\text{final}} - X_{\text{initial}}) / (S_{\text{initial}} - S_{\text{final}})$$

Rendement en Produit « P »

$$Y_{P/X} = dP/dX \approx \Delta P/\Delta X \approx (P_{\text{final}} - P_{\text{initial}}) / (X_{\text{final}} - X_{\text{initial}})$$

Les productivités

$$r_X = dX/dt \approx \Delta X/\Delta t$$

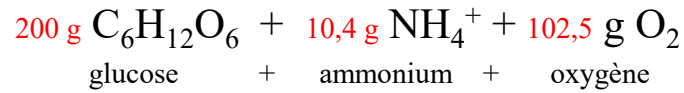
$$r_P = dP/dt \approx \Delta P/\Delta t$$

## Exemple de Quantification des besoins nutritionnels

### Modèle de Harison

Exemple : Cas d'une levure en culture aérobie

#### S Substrat carboné



$$Y_{X/S} = 50\%$$

$$Y_{NH_4^+/X} = 10\%$$

$$Y_{O_2/X} = 1 \text{ g de } O_2 / \text{g biomasse}$$



#### X Biomasse ou Levure (PM : 24)

$$Y_{N/X} = 10-15\%$$

$$Y_{C/X} = 50\%$$

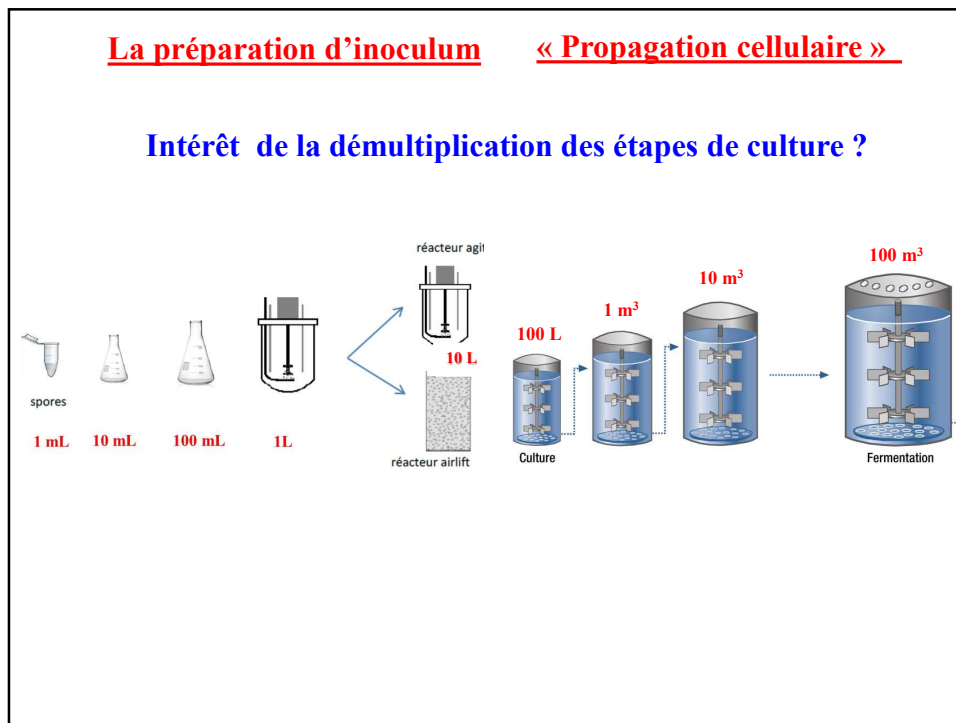
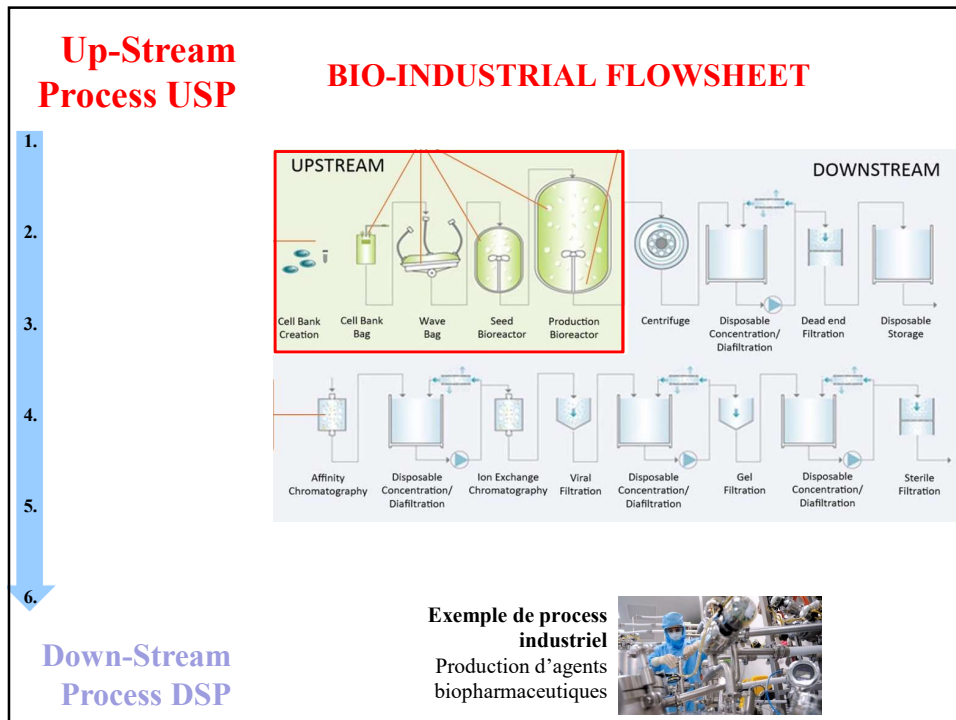
Culture <i>Streptomyces ambofaciens</i>			
Production de Spiramycine			
Temps (h)	[X] (g/L)	[Spiramycine] = [P] (mg/L)	[S] (g/L)
0	0,1	0	20
10	1	0	19,5
28	9	0	9
29	9,5	0	8
30	9,8	0	7,5
31	9,9	0	7
32	10	0	6,5
33	10,1	0	6
47	10,2	0	4,05
48	10,3	1	4
60	10,4	15	3,5
70	10,5	30	3
80	10,7	45	2,5
90	10,8	60	2
100	10,9	63	1,5
110	11	64	1
120	11	65	0,5

Rendement moyen en Biomasse  
 $Y_{X/S}$  ?

Rendement moyende production  
en spiramycine  $Y_{P/X}$  ?

Productivité en biomasse  
 $d[X]_{\text{moy}}/dt$  ?

Productivité en spiramycine  
 $d[P]_{\text{moy}}/dt$  ?

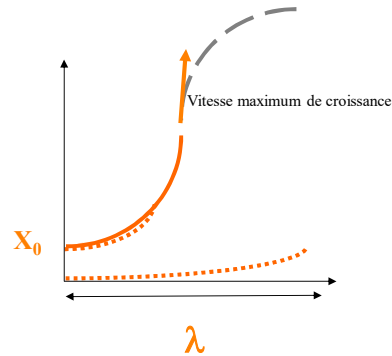


## La propagation cellulaire ou la préparation des inocula

- **Qualité de l'inoculum**
  - Adaptation cellulaire aux conditions industrielles
  - Inoculum en phase exponentielle
- **Quantité d'inoculum**



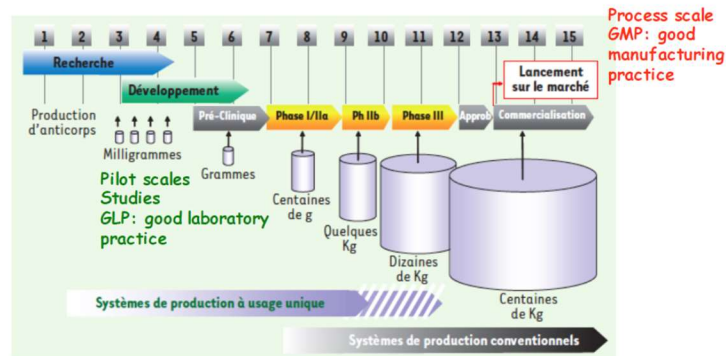
Réduire la durée de la phase de latence de l'étape terminale industrielle



## Diversités des modes cinétiques de culture des microorganismes en milieu homogène

La culture discontinue	La culture Semi-continue	La culture continue mono-étagée		La culture continue multi-étagée	
		Chemostat Ouverte	Fermée		
<p style="text-align: center;"><b>Batch</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Fed batch</b></p>	<p style="text-align: center;"><b>Perfusion</b></p>		<p style="text-align: center;"><b>Tubular Reactor</b></p>	
				<p style="text-align: center; font-size: small;">Assimilation du fermenteur continu à gradient de concentration à une série de fermenteurs continus en cascade</p>	

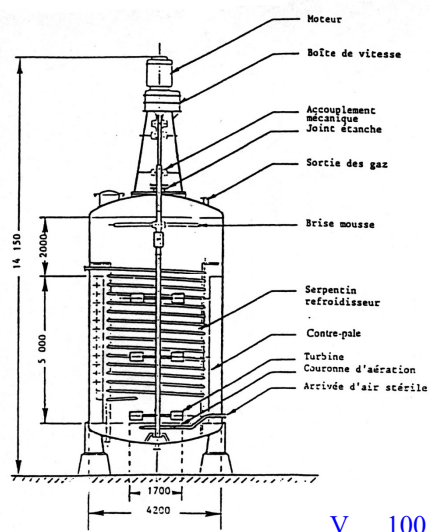
## Illustration de la diversité des appareillages



- ✓ Bioreacteur classique ou STR
- ✓ Adaptation à la culture de microorganismes fragiles
- ✓ Adaptation aux contraintes de production volumétriques ou quantitatives
  - ✓ Adaptation des niveaux d'automatisation et d'analyse
  - ✓ Adaptation aux propriétés métaboliques exploitées

## Bioréacteurs STR (à agitation mécanique)

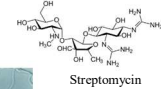
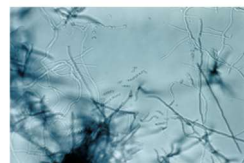
Stirred Tank reactor



$V_{\max} 100 \text{ m}^3$



Exemple : production d'antibiotiques  
chez Sanofi  
*Streptomyces griseus*

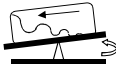
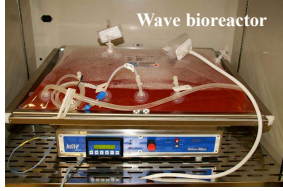
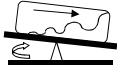




**Culture de cellules fragiles et/ou à croissance difficile**

Ex : Production cellules animales

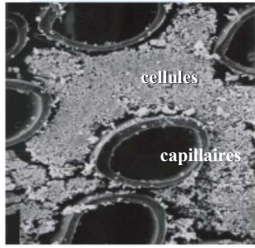
**Culture en milieu homogène**

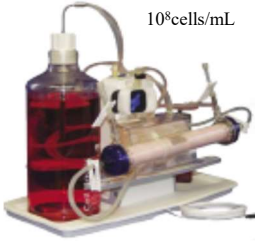
0.1 à 500 L

**Culture en milieu hétérogène**

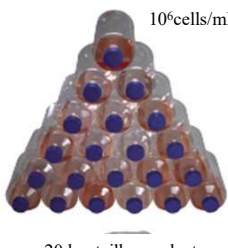
**Hollow fiber reactor**



cellules  
capillaires



10<sup>8</sup> cells/mL

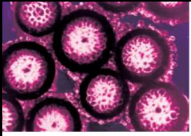
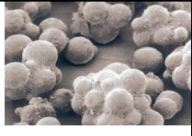


10<sup>6</sup> cells/mL

1 réacteur à fibre creuse = 20 bouteilles roulantes de suspension cellulaire

**Exemples de bioréacteurs production d'anticorps en Culture Immobilisées**

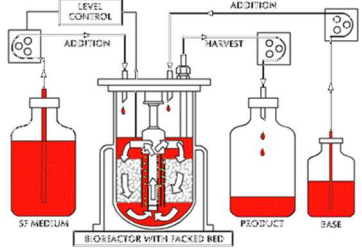

**Microcarrier beads**

**Supports**  
Polystyrène "coaté"\*  
Collagène, Pronectine recombinante  
Verre \*, Plastique\*

\*Traitement cationique des surfaces obligatoires

**Packed bed Perfusion bioreactor with microcarrier beads**

Ex : traitements des eaux usées en station d'épuration

### Bioréacteur à membranes MBR

**Nitrification**

$\text{NH}_4^+$  +  $\text{O}_2$  →  $\text{NO}_3^-$

Bactéries lithotrophes  
aérobie-strictes  
*Nitrosomonas, Nitrobacter*

**Dénitrification**

$\text{NO}_3^-$  +  $\text{N}_2$  +  $\text{CO}_2$

Bactéries organotrophes  
aéro-anaérobies  
*Pseudomonas, Rhodococcus...*

Exo  
Poly  
Saccharides

**Nitrification**

Membranes d'ultrafiltration

Bassin d'aération  
**Nitrification**

Décanteur primaire  
Bassin d'anoxie  
**Dénitrification**

### « Le scale up » ou le changement d'échelle

**Au plus petit**

24x 2 mL de culture immergée



**Screening**

**Du plus grand ...**

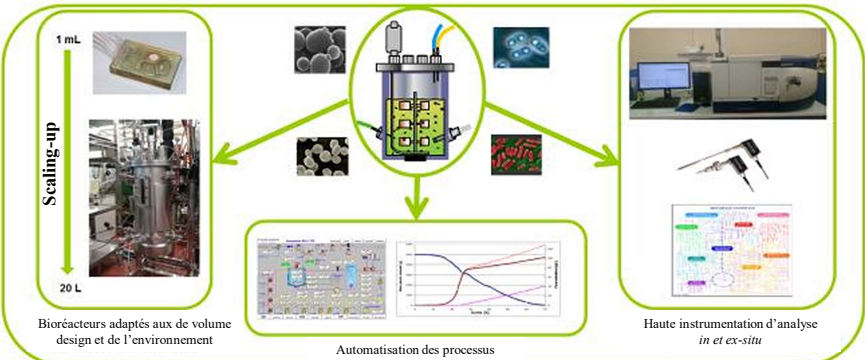
Production de P.O.U. pour l'alimentation animale  
Culture continue sur méthanol de *Pseudomonas*  
dans un bioréacteur de 2 000 000 L

Firme I.C.I.

## Analyse des processus microbiens

**INSA**  
Fatty Acid  
Methyl Esters



Scaling-up  
1 mL  
20 L

Bioréacteurs adaptés aux de volume design et de l'environnement

Automatisation des processus

Haute instrumentation d'analyse in et ex-situ

**Matériels**

Cultures en milieu homogène

- mode discontinu,
- discontinu alimenté
- continu

Culture en milieu hétérogène

- Bioréacteurs à membranes

**Equipements de mesure *in situ***

*Physico-chimique* : capteur T°, pH, pO<sub>2</sub>, analyseurs de gaz

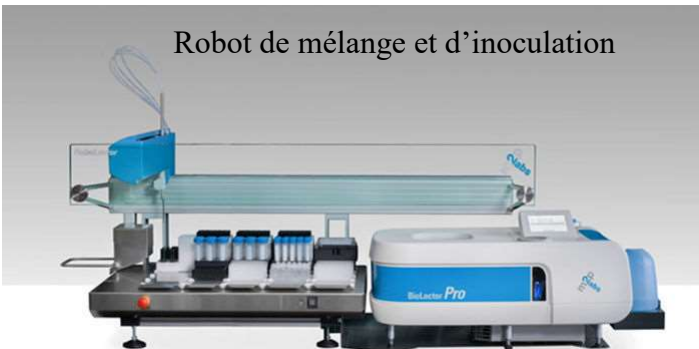
*Cytologique* : capteur de biomasse, cytométrie de flux,

*Biochimique* : GC-MS ; HPLC; spectromètre, balance

**Autres mesures « off-line »** : analyses transcriptomiques & protéomiques


## ROBOLECTOR m2P

Robot de mélange et d'inoculation

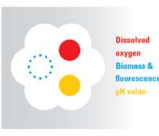


**BIOLECTOR m2P**

48 µcuves

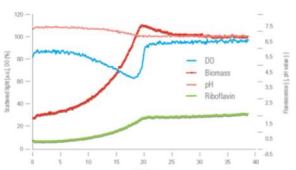


Multi-capteurs

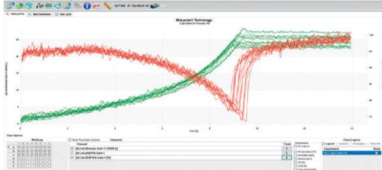


Multiparameter FlowFluor® with Optodes

Suivi cinétique



Screening



### Bioréacteurs à agitation pneumatique

Avec circulation externe

*Centrale de cogénération (Cogen) du Massachusetts*  
*Institute of Technology (MIT) couplée aux photobioréacteurs à microalgues de GreenFuel Corporation*

Réacteur triangulaire

Photobioréacteur pour la culture de micro-algues

### La culture urbaine en Plug Flow Tubular Reactor

Utilisation des gaz d'échappement (Nox, CO, CO<sub>2</sub>)  
Production d'algocarburant (lipides) par des micro-algues.  
Photobioréacteur Urbain

Solabia Algatech (Israël/ Beauvais)