



BIOLOGIE
TECHNIQUE

Collection dirigée par
Joël Cnokaert – IA IPR Biochimie – Génie biologique
Françoise Guillet – IGEN Biotechnologies et secteur médico-social

*OPÉRATIONS UNITAIRES
EN GÉNIE BIOLOGIQUE*

.3.

LA FERMENTATION

Pascal Chillet
Professeur agrégé de Biochimie – Génie biologique

SOMMAIRE

PARTIE 1. Aspects technologiques

1. Procédés de fermentation et bioréacteurs	10
1.1. Définitions	10
1.2. Phases et mise à l'échelle d'une fermentation	10
1.3. Différents procédés de fermentation	12
1.4. Exemples de modèles de bioréacteurs	20
2. Les souches microbiennes et leurs milieux de culture	20
2.1. Milieux de culture pour les fermentations industrielles	20
2.2. Stérilisation du milieu de culture et des composés ajoutés	24
2.3. Souches microbiennes et préparation de l'inoculum	28
3. Le bioréacteur et ses équipements	30
3.1. Éléments implantés dans la cuve de fermentation	30
3.2. La cuve	32
3.3. Dispositif de chauffage et de refroidissement	32
3.4. Aération et agitation	32
3.5. Systèmes d'inoculation, d'addition de suppléments et de prélèvement	38
4. Suivi de la fermentation et régulation	40
4.1. Rôles du suivi et de la régulation	40
4.2. Paramètres mesurés	42
4.3. La régulation	42
5. Extraction et purification des produits	46
5.1. Objectifs et choix des méthodes	46
5.2. Méthodes de séparation des particules et des micro-organismes du milieu de culture	46
5.3. Extraction du produit	48
5.4. Concentration et purification du produit	50

PARTIE 2. Applications

1. Applications industrielles	54
1.1. La biomasse	54
1.2. Les enzymes	54
1.3. Les métabolites	54
1.4. Les produits recombinants	56
1.5. Les produits issus des bioconversions (ou biotransformations)	56
2. Mises en œuvre à l'échelle pilote	58
Activité 1. Étude d'un bioréacteur 10/15 L	59
Activité 2. Fonctionnement d'un bioréacteur 10/15 L	65
Activité 3. Mesure du coefficient volumique de transfert $K_L a$	71
Activité 4. Suivi d'une croissance et d'une production en bioréacteur 10/15 L	77
Activité 5. Production et purification d'une protéine recombinante	87

Éléments de correction des exercices et des études documentaires	95
-------------------------------------------------------------------------------	-----------

Annexe 1 - Schémathèque de génie chimique	106
--------------------------------------------------------	------------

Annexe 2 - Fiche de suivi de fabrication	107
-------------------------------------------------------	------------

Bibliographie	109
----------------------------	------------

Crédits	111
----------------------	------------

PARTIE 1

ASPECTS

TECHNOLOGIQUES

La fermentation est une technologie très ancienne de transformation et de conservation des aliments : pain, boissons alcoolisées et vinaigre. Les Sumériens fabriquaient déjà du pain et de la bière en 8000 av. J.-C., les Babyloniens maîtrisaient la fabrication du vin de palme en 5000 av. J.-C., les Égyptiens utilisaient les levures pour la fabrication du pain et des boissons alcoolisées en 4000 av. J.-C. et les Chinois se nourrissaient de chou fermenté dans le vin en 3000 av. J.-C.

Le terme de fermentation provient du latin *fervere* qui signifie *bouillir* : au cours de certaines fermentations apparaissait en effet un dégagement de gaz (souvent du CO₂) avec formation de mousse comme c'est le cas d'un liquide en ébullition.

C'est au cours des années 1862 à 1877 que Louis Pasteur s'intéresse aux fermentations. Il étudie les

ferments, la formation du vinaigre et la transformation de l'alcool en acide acétique par *Mycoderma aceti*.

C'est entre 1900 et 1940 que se développe la fermentation industrielle avec la production d'acétone, de butanol, de glycérol, d'acide citrique et d'acide lactique. À partir de 1940, à l'aide de programmes de sélection et de mutation de souches, diverses productions comme celles d'antibiotiques, d'acides aminés, de nucléotides et d'enzymes sont réalisées. C'est ensuite à partir des années 80 que le génie génétique a permis d'améliorer les souches microbiennes à fort potentiel industriel et d'explorer de nouvelles voies biochimiques.

Les fermentations industrielles concernent ainsi un grand nombre de secteurs : l'alimentaire, la chimie fine, la pharmacie, l'agro-industrie et la cosmétique.

1. PROCÉDÉS DE FERMENTATION ET BIORÉACTEURS

1.1. Définitions

1.1.1. La fermentation

Le mot **fermentation** présente deux significations différentes pour les biochimistes et les microbiologistes industriels.

En biochimie, les fermentations sont des voies cataboliques anaérobies au cours desquelles des composés organiques servent à la fois de donneurs et d'accepteurs d'électrons, la synthèse d'ATP étant réalisée par phosphorylation au niveau du substrat.

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.

Ainsi, contrairement au sens biochimique, le terme de **fermentation industrielle** ne se réfère pas au

métabolisme du micro-organisme. Ce terme s'applique en industrie pour des métabolismes aérobies et anaérobies.

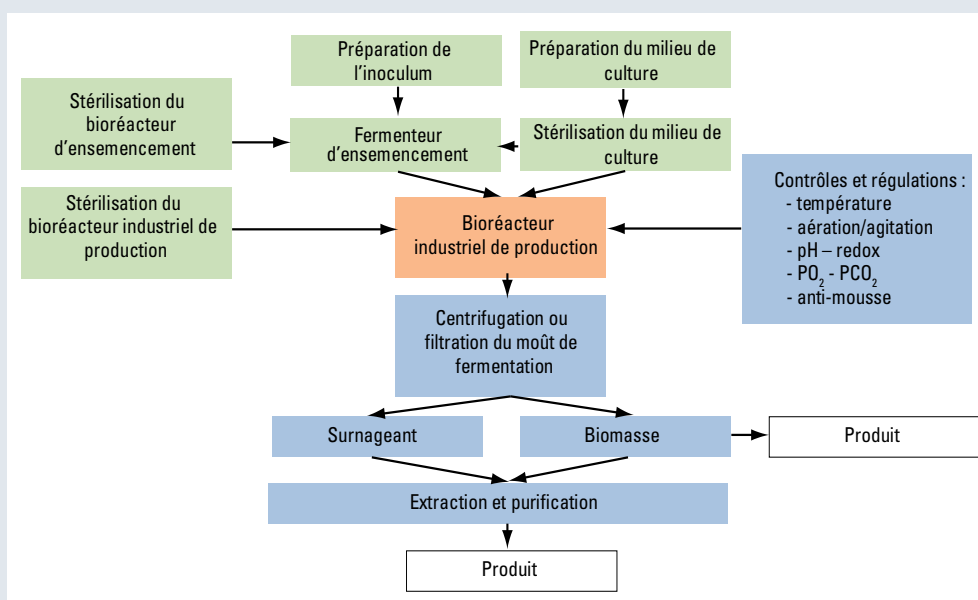
1.1.2. Le bioréacteur

Le bioréacteur (ou fermenteur) est une enceinte 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.

1.2. Phases et mise à l'échelle d'une fermentation

1.2.1. Les différentes étapes

On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation (figure 1) :



1 Les étapes du procédé de fermentation



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



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



Bioréacteur BioPro™ série Pilote (60 à 300 L)



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

2 *Bioréacteurs de laboratoire, bioréacteur pilote et bioréacteur industriel*

- 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.

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

On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal (figure **2**) :

- 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'Erlenmeyer 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. À 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.

1.3. Différents procédés de fermentation

On distingue trois types de procédés de fermentation (figure 3) :

- le procédé *batch* ou fermentation discontinue ;
- le procédé *fed-batch* ou fermentation discontinue alimentée ;
- le procédé de culture continue.

1.3.1. Procédé discontinu (*batch*)

1.3.1.1. Principe

Le procédé est réalisé dans un système clos dans lequel un même volume de milieu non renouvelé est utilisé pour la croissance des micro-organismes ; la quantité de nutriments est donc limitée.

1.3.1.2. Courbe de croissance

La courbe de croissance microbienne en mode discontinu fait apparaître différentes phases (figure 4).

Les phases de latence et d'accélération correspondent à une période d'adaptation métabolique du micro-organisme au milieu. La phase de latence sera réduite au maximum en fermentation industrielle.

La phase exponentielle de croissance est la phase au cours de laquelle la vitesse spécifique de croissance $Q_{x \text{ expo}}$ est maximum. 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. En coordonnées semi-logarithmiques $\ln X = f(t)$, la courbe de la phase exponentielle est une droite.

Pour cette phase :

$$x_t = x_0 \cdot e^{Q_{x \text{ expo}} \cdot t} \text{ et } \ln x_t = \ln x_0 + Q_{x \text{ expo}} \cdot t$$

x_t	Biomasse à l'instant t	g.L ⁻¹
x_0	Biomasse initiale	g.L ⁻¹
$Q_{x \text{ expo}}$	Vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle	h ⁻¹
t	Temps	h

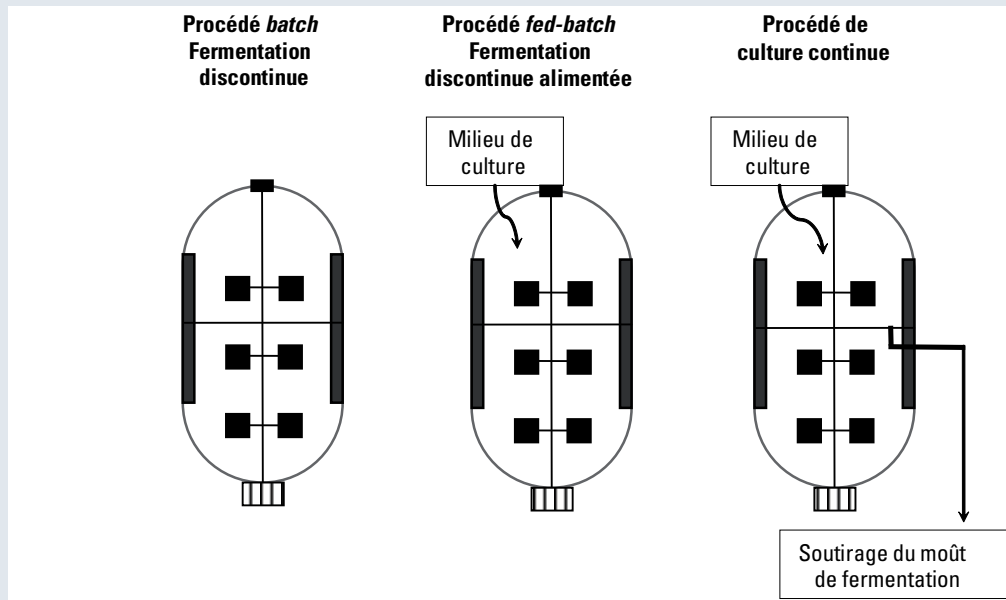
Après une phase de ralentissement, la phase stationnaire apparaît. Elle fait suite à la consommation des nutriments et à la présence de déchets microbiens bactériostatiques et bactéricides. On distingue deux situations possibles : les micro-organismes peuvent survivre sans multiplication cellulaire dans 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 de déclin correspond à la diminution de la biomasse liée à une lyse cellulaire.

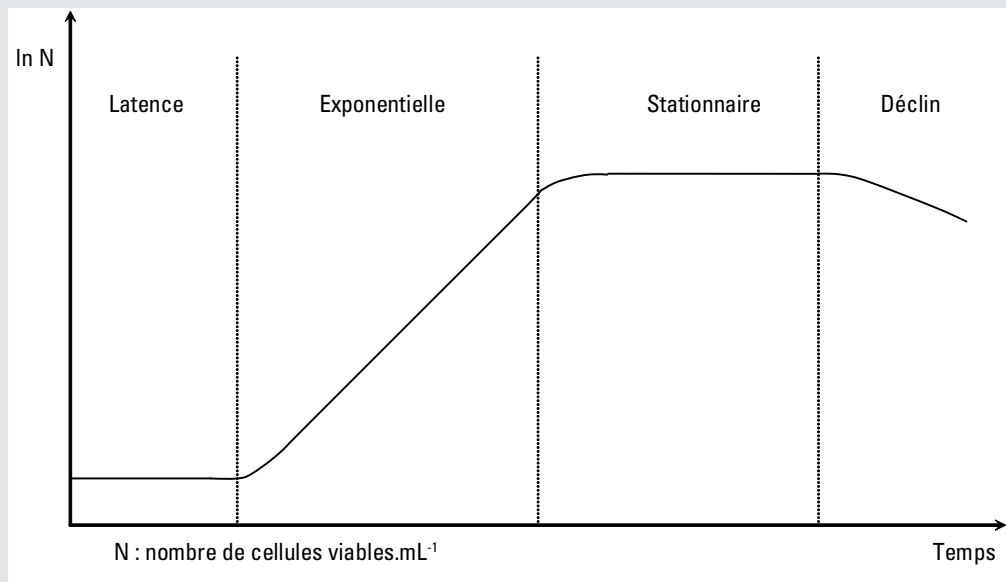
Exercice 1 (Extrait du BTS Biotechnologie 2005) Production de l'antibiotique spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*

L'espèce *Streptomyces ambofaciens* a été sélectionnée pour sa production de spiramycine. À partir d'une fermentation type en bioréacteur, on a suivi l'évolution de la biomasse (X) et de la spiramycine (P) en fonction du temps (t) (tableau 5).

- 1) Tracer la courbe $\ln X = f(t)$. Déterminer la durée de la phase exponentielle, le temps de génération G et la vitesse spécifique de croissance pendant la phase exponentielle $Q_{x \text{ expo}}$.
- 2) Tracer $P = f(t)$ sur le même graphique. En déduire le type de métabolite produit par la bactérie. Justifier la réponse.



3 Les trois types de procédés de fermentation



4 Les phases de la croissance bactérienne en mode discontinu

t (h)	X (g.L ⁻¹)	P (mg.L ⁻¹)
0	3,1	0,0
6	3,2	0,0
12	4,4	0,0
17	6,2	0,0
24	8,8	0,0
36	15,2	9,9
52	18,0	94,5
66	18,2	156,0
72	18,2	182,0
88	18,2	227,0
100	18,2	255,0
114	16,9	280,0
138	14,0	297,0
144	13,3	298,0
162	11,5	306,0
190	10,0	300,0

5 Évolution de la biomasse et de la concentration en spiramycine au cours de la fermentation

PARTIE 2

APPLICATIONS

Objectifs

Dans un service R&D (Recherche et Développement) d'une industrie de fermentation, on se propose d'optimiser un procédé de fermentation aérobie au cours d'un *scale up*. Durant cette étude, on mesure le coefficient volumique de transfert $K_L a$ *in situ* d'un bioréacteur en présence du milieu de culture par méthode statique et par méthode dynamique.

Compétences

- Préparer le bioréacteur dans le contexte de mesure du coefficient volumique de transfert $K_L a$.
- Effectuer la détermination du $K_L a$ par méthode statique et par méthode dynamique.
- Effectuer l'arrêt et la mise en sécurité des installations.
- Présenter et ordonner les valeurs expérimentales. Exprimer les résultats.
- Analyser et interpréter les résultats.

Tâches professionnelles

- Déterminer le $K_L a$ par la méthode statique. Fiche 3.1 72
- Déterminer le $K_L a$ par la méthode dynamique. Fiche 3.2 73

Étude de cas

- Analyse de résultats expérimentaux. Fiche 3.3 74

Documents ressource

- Procédures de mise en route, de mise en œuvre de la fermentation et de mise à l'arrêt du bioréacteur. Fiche 2.1 66

Fiche 3.1

Déterminer le $K_L a$ par la méthode statique

Réactifs

- 10 L de milieu YPG (*Yeast / Peptone / Glucose*) :

Extrait de levure	10 g
Peptones	10 g
Glucose	20 g
H ₂ O	qsp 1 L
pH	6,0 ± 0,2

- Produits nettoyants du bioréacteur : soude et acide nitrique.

Réalisation de la mesure

- Réaliser les opérations de préparation du bioréacteur (voir la fiche 2.1 p. 66)
- Conditions de mesure :

Milieu	10 L de milieu YPG stérile.
Débits de gaz	1 VVM.
Paramètres régulés	Température : 30 °C Agitation : 350 tr/min / hélice HTPG4™ et turbine Rushton. Anti-mousse. pH 6,0.
Paramètre mesuré	O ₂ dissous avec sonde O ₂ polarographique calibrée à 0 % et à 100 %. Valeurs d'O ₂ dissous relevées toutes les 20 s.

- Étapes de la mesure :

1	Injection d'air dans le milieu de culture. Stabilisation de la valeur d'O ₂ mesurée (proche de 100 %).
2	Arrêt de l'injection d'air. Injection de N ₂ dans le milieu de culture jusqu'à élimination totale d'O ₂ . Stabilisation de la valeur d'O ₂ mesurée (proche de 0 %).
3	Injection d'air dans le milieu de culture jusqu'à atteindre la valeur initiale. Stabilisation de la valeur d'O ₂ mesurée (proche de 100 %).

- Réaliser les opérations de nettoyage et de mise à l'arrêt du bioréacteur..

Analyse des résultats expérimentaux

[La fiche 3.3 p. 74 propose des éléments de réponse]

1. Présenter les résultats des mesures d'O₂ dissous.
2. Tracer la courbe $C_L = f(t)$ en précisant les phases d'injection de diazote et d'air.

3. Tracer la courbe $\ln \frac{(C_L^* - C_L)}{C_L^*} = f(t)$ pour les valeurs obtenues après reprise de l'injection d'air. En déduire $K_L a$.

Réactifs

- 9 L de milieu YPG (*Yeast / Peptone / Glucose*)

Extrait de levure	10 g
Peptones	10 g
Glucose	20 g
H ₂ O	qsp 1 L
pH	6,0 ± 0,2

- Préculture : 20 g de levures dans une fiole d'Erlenmeyer contenant 1 L de milieu. Incuber 1,5 h à 25 °C sur un agitateur orbital.

- Produits nettoyants du bioréacteur : soude et acide nitrique.

Réalisation de la mesure

- Réaliser les opérations de préparation du bioréacteur.

- Conditions de mesure :

Milieu	9 L de milieu YPG stérile.
Inoculum	1 L de préculture de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en milieu YPG.
Débit d'air	1 VVM.
Paramètres régulés	Température : 30 °C. Agitation : hélice HTPG4™ et turbine Rushton. Anti-mousse. pH 6,0.
Paramètre mesuré	O ₂ dissous avec sonde O ₂ polarographique calibrée à 0 % et à 100 %. Valeurs d'O ₂ dissous relevées toutes les 60 s pendant l'arrêt de l'aération et toutes les 20 s pendant l'aération.

- Étapes de la mesure :

1	Injection d'air dans le milieu de culture. Agitation à 350 tr/min. Stabilisation de la valeur d'O ₂ mesurée (équilibre entre OTR et OUR).
2	Arrêt de l'injection d'air. Agitation à 30 tr/min.
3	Avant que le taux en O ₂ devienne critique : - injection d'air, - agitation à 350 tr/min, jusqu'à atteindre la valeur initiale. Stabilisation de la valeur d'O ₂ mesurée.

- Décontaminer le bioréacteur en lançant une stérilisation décontamination (121 °C / 30 min).

- Réaliser les opérations de nettoyage et de mise à l'arrêt du fermenteur.

Analyse des résultats expérimentaux

[La fiche 3.3 p. 74 propose des éléments de réponse]

1. Présenter les résultats des mesures d'O₂ dissous.

2. Tracer la courbe $C_L = f(t)$ en précisant les phases d'arrêt et de reprise de l'aération.

3. Tracer la courbe $\frac{dC_L}{dt} = f(C_L^* - C_L)$ pour la période de reprise de l'aération et de l'agitation. En déduire $K_L a$.