

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA –BEJAIA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Sciences Alimentaires
Filière : Sciences Alimentaires
Spécialité : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire



POLYCOPIE DE COURS
« Bioprocédés fermentaires »

Présenté par :

Dr. BOUKHALFA Farid

Année universitaire : 2019 / 2020

Bioprocédés fermentaires

Sciences Alimentaires

Cours destiné aux étudiants des Sciences Alimentaires préparant un Master en Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire.
Assuré depuis le 1^{er} semestre de l'année universitaire 2009/2010 à ce jour.

Important : La compréhension de ce cours nécessite des pré-requis en biochimie, microbiologie et procédés alimentaires.

Fiche descriptive du cours

Enseignant : BOUKHALFA Farid (boukhalfa.farid@univ-bejaia.dz)

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Alimentaires

Intitulé du cours : Bioprocédés, fermenteurs

Public ciblé : Étudiants Master en Sciences Alimentaires. Option : Qualité des Produits et Sécurité Alimentaire

Démarche pédagogique : Expositive et active

Méthodes pédagogiques : Affirmatives, interrogatives

Techniques pédagogiques : Exposé et sortie.

Durée (VHG) : 60 Heures

Semestre : 3 de l'année universitaire

Mise à jour : 2016

Objectifs du cours

Après le succès à cette matière, l'étudiant est censé avoir acquis, les compétences suivantes :

- 1.** Acquérir et approfondir les connaissances sur les micro-organismes utiles en adéquation avec les besoins de l'industrie fermentaire.
- 2.** Acquérir et approfondir les connaissances sur la fermentation et les fermenteurs, ainsi que les différents produits élaborés par fermentation.
- 3.** Maitrise des voies fermentaires nécessaires pour l'élaboration des nouveaux produits à partir des sous-produits (co-produits) des industries agroalimentaires.

Liste des figures

Figure 1 : Courbes de croissance des microorganismes en fonction de la température	8
Figure 2 : Différents hématimètres utilisés dans le comptage des cellules	13
Figure 3 : Courbe de la croissance d'un micro-organisme (En milieu non renouvelé).....	16
Figure 4 : Schéma typique d'un fermenteur avec ses accessoires	28
Figure 5 : Coupe de l'appareil brise mousse mécanique de l'entreprise CHEMAP.....	31
Figure 6 : Schéma d'un thermocouple constitué de fils de Nickel et d'alliage Nickel chrome..	32
Figure 7 : Variation de la résistance en fonction de la variation de la température, pour les CTN et les CTP.....	33
Figure 8 : Modalité de transfert d'O ₂ de la phase gazeuse jusqu'à l'intérieur de la cellule....	39
Figure 9 : Différents mobiles d'agitation utilisés dans un fermenteur.....	46
Figure 10 : Schéma simplifié d'un chémostat.....	53
Figure 11 : Cycle de vie de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	55
Figure 12 : Procédé de fabrication de la levure.....	59

Liste des tableaux

Tableau I : Différents types nutritionnels ou trophiques des micro-organismes	7
Tableau II : Besoin en oxygène de quelques microorganismes utilisés dans l'industrie fermentaire	22
Tableau III : Température de mesure maximale et la tension U produite entre 0°C et 100°C des différents thermocouples utilisés en industrie.....	33
Tableau IV : Besoin maximal et concentration critique d'oxygène (en mMole/l/h) pour quelques microorganismes.	39
Tableau V : Besoins nutritifs pour la croissance de la levure, pour un kilogramme de glucose dans le milieu	57
Tableau VI : Composition type de mélasses (en % des matières sèches totales)	58

Sommaire

Liste des figures	i
Liste des tableaux	ii
Préface	1

Chapitre I : Cinétique microbienne

I-Étude de la cinétique de la croissance microbienne	2
I-1 Conditions de croissance	3
I-1.1 Besoins nutritifs des microorganismes	3
I-1.2 Facteurs physico-chimiques intervenant dans la croissance bactérienne	7
I-2 Méthodes d'étude de la croissance	11
I-2.1 Numération des cellules	11
1. Méthodes de comptage	11
2. Techniques nécessitant une culture	14
I.2.2 Détermination de la biomasse microbienne	14
I.2.3 Autres méthodes.....	15
I.3 Courbe de croissance microbienne	16
I.4 Facteurs affectant le taux de croissance	19
I.5 Modélisation mathématique de la croissance microbienne	22
I.6 Productivité	24
I.7 Rendements	24
I-7.1 Rendements réels ($R_{/s}$ et $r_{/s}$).....	24
I-7.2 Rendement théorique ($Y_{/s}$).....	24
I-7.3 Variation du rendement avec la maintenance	25

Chapitre II : Conception et mode de fonctionnement d'un fermenteur

II-1 Définition de la fermentation	26
II-2 Définition du fermenteur.....	27
II-3 Types et dimension d'un fermenteur	28
II-4 Contrôles de la fermentation	39
II-5 Maîtrise des phénomènes de moussage	39
II-6 Capteurs de mesure	31
1) Mesure de la température.....	31
2) Mesure de la pression.....	35
3) Mesure du niveau utile (volume utile)	35
4) Mesure du potentiel hydrogène (pH)	36
5) Mesure de l'oxygène dissous.....	36
II-7 Transfert de l'oxygène.....	37
II-7.1 Rôles de l'oxygène en fermentation.....	37
II-7.2 Demande en oxygène de la culture	38
II-7.3 Modalités du transfert d'oxygène.....	39
II-7.4 Mesure du coefficient volumétrique ($K_L a$)	41
II-8 Agitation dans les fermenteurs	44
II-8.1 Types d'agitation.....	45
II-8.2 Principaux mobiles d'agitation	45
II-8.3 Calcul de la puissance consommée par un agitateur rotatif	46
II-9 Modes de fonctionnement des fermenteurs	47
1) Fermenteur en discontinue (Batch).....	47
2) Fermenteur en semi-continue (Fed-Batch).....	48
3) Fermenteur en continue.....	50
4) Chémostat.....	51

Chapitre III : Production fermentaire des levures

III.1 Présentation de la levure	54
III-2 Objectifs de la production de la levure boulangère	56
III-3 Conditions industrielles de production	56
III-3.1 Milieu de culture.....	56
III-3.2 Premières étapes de production	59
III-3.3 Cycle industriel.....	60
III-3.3.1 Conditions générales	60
III-3.3.2 Générations successives	62
III-3.3.3 Récolte et conditionnement de la levure fraîche.....	62
III-3.3.4 Techniques de séchage	63
III-3.3.5 Contrôle sur les produits finis	64
1) Aspect et caractères organoleptiques.....	64
2) Composition biochimique.....	64
3) Activité fermentative.....	64
4) Bonne aptitude à la conservation.....	64
5) Qualité bactériologique.....	64

Références bibliographiques

Préface

Bière, vin, vinaigre, yogourt, pénicilline, acide lactique, biogaz, éthanol, glycérine, quelle relation peut-il bien exister entre tous ces produits ? De même, quel point commun pourrait-on trouver entre l'activité principale du boulanger - fabriquer du pain - et le fonctionnement d'une station d'épuration ? En fait toutes ces productions, et bien d'autres, utilisent un outil vivant.

Le processus de transformation mis en œuvre exploite des microorganismes – la biomasse - dont le développement modifie les caractéristiques de la matière – le substrat - sur ou dans laquelle ils se sont développés.

Le succès industriel d'un procédé de fermentation mettant en œuvre des levures ou d'autres microorganismes suppose des installations et des procédés suffisamment importants sur le plan de la productivité, de la viabilité, du coût et de la qualité des produits.

L'objectif de ce travail est de donner un aperçu global sur les procédés fermentaires, utilisant les différents types de microorganismes utiles. Une approche générale sur la croissance microbienne est donnée, suivi d'un chapitre traitant les fermenteurs, conception et mode de fonctionnement jugé utile avant de donner un exemple d'un produit issu de fermentation industrielle.

Préface

Bière, vin, vinaigre, yogourt, pénicilline, acide lactique, biogaz, éthanol, glycérine, quelle relation peut-il bien exister entre tous ces produits ? De même, quel point commun pourrait-on trouver entre l'activité principale du boulanger - fabriquer du pain - et le fonctionnement d'une station d'épuration ? En fait toutes ces productions, et bien d'autres, utilisent un outil vivant.

Le processus de transformation mis en œuvre exploite des microorganismes – la biomasse - dont le développement modifie les caractéristiques de la matière – le substrat - sur ou dans laquelle ils se sont développés.

Le succès industriel d'un procédé de fermentation mettant en œuvre des levures ou d'autres microorganismes suppose des installations et des procédés suffisamment importants sur le plan de la productivité, de la viabilité, du coût et de la qualité des produits.

L'objectif de ce travail est de donner un aperçu global sur les procédés fermentaires, utilisant les différents types de microorganismes utiles. Une approche générale sur la croissance microbienne est donnée, suivi d'un chapitre traitant les fermenteurs, conception et mode de fonctionnement jugé utile avant de donner un exemple d'un produit issu de fermentation industrielle.

Chapitre I : Cinétique microbienne

I-Etude de la cinétique de la croissance microbienne

Les microorganismes sont capables d'effectuer une grande diversité de réactions biochimiques, qui se traduisent par la dégradation, la transformation et/ou la production de substances organiques ou minérales, qui induisent et favorisent la croissance cellulaire. Cette dernière, peut se définir au niveau de l'individu ou au niveau de la population. Au niveau de l'individu, elle se manifeste par l'accroissement de la taille, du volume et de la masse, tandis qu'au niveau de la population, elle se traduit par l'augmentation du nombre d'individus, et ceci, par division cellulaire (multiplication cellulaire).

Lors de la division cellulaire, la cellule croît en volume, puis quand elle atteint une taille suffisante (adulte), elle se divise en deux cellules filles ; les constituants cellulaires seront répartis entre elles, mais les mécanismes de multiplication varient avec les espèces :

- Les bactéries se divisent par **scissiparité**: après doublement de la masse cellulaire, la bactérie mère donne naissance à deux bactéries filles identiques, le temps moyen entre deux divisions, dit *temps de génération*, variant de 15 à 60 min ;
- Les levures se divisent par **bourgeonnement**: une cellule donne naissance à une excroissance qui grossit jusqu'à ce que la séparation entre la cellule mère et la cellule fille intervienne ; le temps de génération varie de 45 à 120 min ;
- Les champignons filamenteux se multiplient grâce à des excroissances cellulaires apicales donnant lieu à la formation de structures ramifiées, dites *mycéliums*, prenant la forme macroscopique d'agrégats sphériques de 0.1 à 10 mm de diamètre ; le temps de génération varie de 4 à 8 heures.

Les trois mécanismes précédents respectent la conservation et la transmission du patrimoine génétique des cellules mères aux cellules filles. Il s'agit d'une **division cellulaire asexuée**, qui est la voie prédominante de multiplication chez les microorganismes en phase de croissance.

Le plus souvent pour simplifier, la croissance est assimilée à la multiplication cellulaire conduisant à la synthèse de biomasse bactérienne. La croissance est alors définie par l'augmentation de la biomasse sèche. L'étude de la **croissance bactérienne** consiste en la détermination des paramètres de croissance pour une souche bactérienne donnée.

I-1 Conditions de croissances

Pour assurer sa croissance ou sa survie, une bactérie doit trouver dans son environnement de quoi satisfaire ses besoins nutritifs : besoin en eau, une source d'énergie, une source de carbone, une source d'azote et d'éléments minéraux, permettant à la cellule de réaliser la synthèse de ses constituants élémentaires et/ou ses matériaux constitutifs.

Ces besoins élémentaires sont suffisants pour permettre la nutrition des bactéries qualifiées de **prototrophes**. Certaines bactéries qualifiées d'**auxotrophes** nécessitent, en plus des besoins élémentaires, la présence de facteurs de croissance.

À cela s'ajoutent des conditions physico-chimiques qui doivent être assurées (température, pH, composition et proportions des gaz ambiants...etc.).

I-1.1 Besoins nutritifs des microorganismes

a) Besoin en eau

L'eau représente 80 à 90 % du poids cellulaire. Elle joue un rôle fondamental en solubilisant les nutriments, en assurant leur transport et en assurant les réactions d'hydrolyse.

Un paramètre noté A_w (Activity of water, activité de l'eau) quantifie la disponibilité de l'eau.

Dans un nutriment, une partie de l'eau est plus ou moins liée aux composants (sels, protéines) et elle n'est pas disponible pour les microorganismes qui ont besoin d'eau libre pour se développer. Les bactéries exigent un certain seuil d'humidité et pour des A_w faibles, leur croissance est ralentie.

b) Source d'énergie

Selon la source d'énergie, les bactéries se divisent en **phototrophes** et **chimiotrophes**. La source d'énergie des bactéries phototrophes est la lumière. Les bactéries **chimiotrophes** puisent leur énergie à partir de composés minéraux ou organiques. Si le donneur d'électrons est un composé minéral, les bactéries sont dites **chimiolithotrophes**, mais si le donneur d'électrons est de nature organique, les bactéries sont dites **chimio-organotrophes**.

c) Sources de carbone

Le carbone est l'un des éléments les plus abondants des microorganismes. Les sources de carbone sont très variées et peuvent être minérales ou organiques. Le plus simple des composés est l'anhydride carbonique (CO_2), qui peut être utilisé par les bactéries dites **autotrophes** qui sont notamment photo- ou chimiolithotrophes, pour la synthèse de certains métabolites essentiels qui feraient intervenir une réaction de carboxylation, sans que la présence de matière

organique préformée soit nécessaire à leur croissance. Certaines bactéries sont strictement **autotrophes** et leur croissance peut même être inhibée en présence de matières organiques préformées.

Pour d'autres bactéries, au contraire, la présence de matières organiques est indispensable à leur croissance : ce sont les bactéries **hétérotrophes**. C'est le cas notamment des bactéries **photo-** et **chimio-organotrophes**. La complexité des substrats organiques indispensables à la croissance de ces bactéries hétérotrophes est variable.

Le dioxyde de carbone (CO_2) est la seule source de carbone pour les bactéries **autotrophes**. Les bactéries **hétérotrophes** utilisent facultativement le dioxyde de carbone. Elles dégradent une grande quantité de substances hydrocarbonées (alcool, acide acétique, acide lactique, polysaccharides et divers sucres).

Le dioxyde de carbone seul ne permet pas la survie des hétérotrophes, mais il joue cependant un rôle important chez ces bactéries. En effet, la croissance de nombreuses espèces bactériennes hétérotrophes est impossible en l'absence de dioxyde de carbone, et une atmosphère enrichie en dioxyde de carbone (un taux de 5 à 10 %) favorise la croissance de certaines espèces comme les *Brucella* spp, *Campylobacter* spp.

Il est à signaler que la liste des substrats carbonés utilisables par une souche bactérienne comme unique source de carbone et d'énergie constitue l'**auxanogramme** de la souche. Les techniques auxanographiques, généralement réalisées en milieu liquide et en utilisant des **microméthodes** (systèmes API20), sont utilisées pour l'identification des souches et pour des enquêtes épidémiologiques. La bactérie à étudier est placée dans un milieu dépourvu de toute source de carbone autre que celle apportée par le nutriment dont on veut étudier l'assimilation. Selon que la bactérie est capable ou non d'assimiler le nutriment qui lui est proposé, on observera une culture (**présence d'un trouble**) ou une absence de culture (**le milieu reste limpide**).

d) Source d'azote

Les bactéries ont besoin de substances azotées pour synthétiser leurs protéines. La provenance de cet azote peut se faire par fixation directe de l'azote atmosphérique ou par incorporation de composés azotés (réactions de désamination et de transamination).

Les besoins en azote des bactéries sont généralement assurés par les produits de dégradation des substrats organiques sous forme ammoniacale.

Quelques espèces sont capables de fixer directement l'azote de l'air (N_2) ou d'assimiler les nitrates et les nitrites. Pour la majorité des bactéries, au contraire, sont totalement incapables de synthétiser les substances azotées indispensables à leur structure, et leur croissance exige l'apport,

dans les milieux de culture, de substrats préformés tels que des acides aminés ou de l'azote organique comme l'**azote** de *corn-steep* (eau de trempage du maïs fermenté) ou les farines végétales (soja, coton...), ou bien par d'autres composés inorganiques (ammoniac, sels d'ammonium, nitrites, nitrates).

e) **Éléments minéraux**

Les bactéries ont besoin d'ions minéraux indispensables à leur croissance, les plus importants sont :

- **Le soufre** : Il est présent dans certains acides aminés (cystéine et méthionine), les groupements thiols et les ponts S-S, et également dans les centres (Fe-S) des ferrédoxines et dans certains cofacteurs comme le coenzyme A.

Il est le plus souvent incorporé sous forme de sulfate ou de composés organiques soufrés. Pour certaines bactéries, le soufre doit être apporté sous forme organique (méthionine, cystéine, biotine, thiamine).

- **Le phosphore** : Il est nécessaire en tant que constituant des acides nucléiques, de l'ATP et de nombreuses coenzymes. Le plus souvent est incorporé dans les milieux de croissance, sous forme de phosphate inorganique (minérale) ou organique.

Certains éléments comme le sodium, le potassium, le magnésium et le chlore jouent un rôle dans l'équilibre physico-chimique de la cellule. D'autres éléments comme le fer, le manganèse, le molybdène, le calcium, le vanadium ou le cobalt sont des oligoéléments nécessaires à des concentrations très faibles.

Dans l'organisme, le fer est lié à la **transferrine** ou à la **lactoferrine** et il n'est pas directement disponible pour les bactéries. Aussi, pour assurer leur multiplication, les bactéries pathogènes ont développé des mécanismes leur permettant de capter le fer chélaté à la transferrine et à la lactoferrine.

f) **Facteur de croissance**

Contrairement aux bactéries prototrophes, les auxotrophes nécessitent, en plus d'une source d'eau, d'énergie, de carbone, d'azote et d'éléments minéraux, un ou plusieurs facteurs de croissance qu'elles sont incapables de synthétiser.

Un facteur de croissance ne doit pas être confondu avec un métabolite essentiel. Les facteurs de croissance et les métabolites essentiels sont des composés organiques strictement nécessaires à la nutrition. Toutefois, un métabolite essentiel peut être synthétisé par une bactérie

alors qu'un facteur de croissance doit être présent dans l'environnement car la bactérie est incapable de le synthétiser.

Dans un milieu contenant du glucose, une source d'azote et des sels minéraux, une bactérie telle que *Escherichiacoli* est capable de se multiplier alors que ce n'est pas le cas pour *Proteusvulgaris*.

La croissance de *Proteusvulgaris* exige l'adjonction supplémentaire de **nicotinamide**. Cette substance est indispensable pour la croissance de ces deux espèces, mais contrairement à *Proteusvulgaris*, *Escherichiacoli* est capable d'en assurer la synthèse. Le nicotinamide est un métabolite essentiel pour ces deux espèces, mais il n'est un facteur de croissance que pour *Proteusvulgaris*. La notion de facteur de croissance est relative à **un genre**, à **une espèce** voire même à **une souche**.

Il est à noter que, les facteurs de croissance sont des bases puriques ou pyrimidiques, des acides gras, des acides aminés, des vitamines (coenzymes, précurseurs de coenzymes, groupements prosthétiques de diverses enzymes) ou divers composés comme l'hème et ses dérivés.

Les besoins quantitatifs en facteurs de croissance sont de l'ordre de 10 µg/mL pour les bases puriques ou pyrimidiques, les acides gras ou les acides aminés et de l'ordre de moins de 1 µg/mL pour les vitamines.

Les besoins en facteur de croissance peuvent parfois être satisfaits par la présence d'une autre bactérie. Ce mécanisme d'interaction métabolique, qualifié de **syntrophie**, se traduit sur un milieu solide par la présence de colonies satellites (bactérie auxotrophe) se développant au voisinage de la bactérie productrice du facteur de croissance.

La croissance d'une bactérie auxotrophe peut être proportionnelle, dans certaines limites, à la concentration d'un facteur de croissance ce qui permet un dosage des facteurs de croissance par voie microbiologique. Un exemple classique est le dosage microbiologique de la vitamine B₁₂ en utilisant une souche de *Lactobacillusleichmannii* ou la souche *Escherichiacoli* 113, auxotrophes pour la vitamine B₁₂.

Un anti-métabolite est un analogue structural d'un facteur de croissance, capable d'entrer en compétition avec ce dernier et d'inhiber la croissance d'une souche auxotrophe. Ainsi, le para-aminobenzène sulfanylamide (ou PAS) est une molécule proche de l'acide para-aminobenzoïque (ou PAB) et il peut jouer le rôle d'un anti-métabolite empêchant la croissance des bactéries auxotrophes pour le PAB.

Les différents types nutritionnels ou trophiques des microorganismes sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau I: Différents types nutritionnels ou trophiques des microorganismes.

Classe du besoin	Nature du besoin	Type trophique
Source d'énergie	Rayonnement lumineux	Phototrophe
	Oxydation de composés organiques ou inorganiques	Chimiotrophe
Donneur d'électrons	Minéral	Lithotrophe
	Organique	Organotrophe
Source de carbone	Composé minéral tel : CO ₂ ,	Autotrophe
	Composé organique tel les sucres,	Hétérotrophe
Facteurs de croissance	Non nécessaires	Prototrophe
	Nécessaires	Auxotrophe

Dans le cas des fermentations industrielles, le choix des nutriments pour une espèce donnée, voire l'adaptation génétique d'une espèce à un nutriment donné, joue un rôle prépondérant dans l'économie du procédé : en effet, le coût du nutriment peut aller jusqu'à 50 % du prix de revient d'une production, même de haute valeur ajoutée (antibiotique par exemple). Il est donc nécessaire de conjuguer faible coût, disponibilité et facilité d'emploi pour les éléments essentiels de la nutrition bactérienne.

I-1.2 Facteurs physico-chimiques intervenant dans la croissance bactérienne

L'utilisation des nutriments par les bactéries dépend des conditions d'environnement susceptibles d'inhiber ou de favoriser le développement bactérien, entre autres :

a) Effet de l'oxygène

Il existe plusieurs classes de bactéries en fonction de leurs rapports avec l'oxygène.

- **Les bactéries aérobies strictes** ne se développent qu'en présence d'air. Leur source principale d'énergie est la respiration. L'oxygène moléculaire, ultime accepteur d'électrons, est réduit en eau (*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Neisseria*).
- **Les bactéries microaérophiles** se développent mieux ou exclusivement lorsque la pression partielle d'oxygène est inférieure à celle de l'air (*Campylobacter*, *Mycobacteriaceae*).
- **Les bactéries aéro-anaérobies facultatives** se développent avec ou sans air. C'est le cas de la majorité des bactéries rencontrées en pathologie médicale : les entérobactéries

(*Escherichia*, *Salmonella*), les streptocoques, les staphylocoques. L'énergie provient de l'oxydation des substrats et de la voie fermentaire.

- **Les bactéries anaérobies strictes** ne se développent qu'en absence totale ou presque d'oxygène qui est le plus souvent toxique. Ces bactéries doivent se cultiver sous atmosphère réductrice. La totalité de l'énergie est produite par fermentation.

b) Effet de la température

Les bactéries peuvent être classées selon leur température optimale de croissance en :

- **Bactéries mésophiles** : leur température de croissance est proche de celle du corps humain (37°C)(Ex. : *Escherichia coli*).
- **Bactéries thermophiles** :leur température de croissance optimale est comprise entre 45°C et 70°C(Ex. : *Thermus aquaticus*).
- **Bactéries hyperthermophiles** :leur température de croissance optimale est supérieure à 80°C (Ex. : *Archaea*).
- **Bactéries psychrophiles** : leur température optimale est proche de 0°C avec un optimum de 10-15°C(Ex. : *Psychrobacter*).
- **Bactéries psychrotrophes** :leur température de croissance est proche de 0°C avec optimum de croissance proche des bactéries mésophiles(Ex. : *Pseudomonas*).

L'effet de la température sur la croissance des bactéries est illustré dans la **figure 1**.

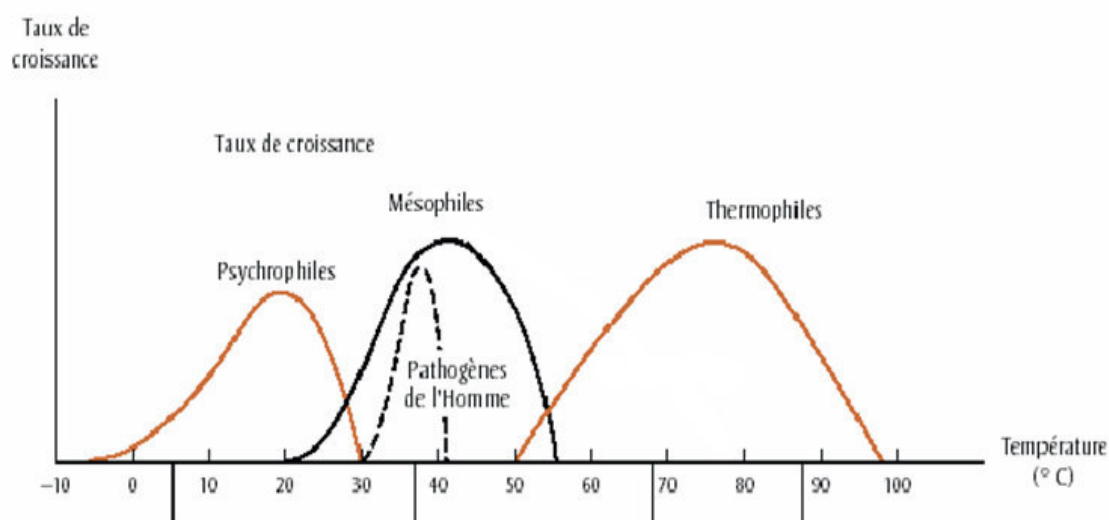


Figure 1 : Courbes de croissance des microorganismes en fonction de la température.

c) Effet du pH

Les bactéries sont généralement tolérantes à des variations de pH entre 6 et 9, grâce à la régulation exercée par leur membrane cytoplasmique à l'encontre des ions H^+ . Dans les cultures en milieux non tamponnés, les alcalins libérés à partir notamment des réactions de décarboxylation des acides aminés ou les acides libérés par dégradation des carbohydrates peuvent modifier le pH dans des conditions tel que le milieu devient toxique pour les bactéries.

Les bactéries pathogènes ou liées à l'écosystème humain se développent le plus souvent dans des milieux neutres ou légèrement alcalins. Les bactéries distinguées sont :

- **Neutrophiles** qui se développent aux pH compris entre 5,5 et 8,5 avec un optimum voisin de 7. La plupart des bactéries médicalement importantes sont ainsi.
- **Alcalophiles** qui préfèrent les pH alcalins : cas de *Pseudomonas* et *Vibrio*, donc milieux de culture particuliers.
- **Acidophiles** qui se multiplient mieux dans des milieux acides : cas des *Lactobacillus*.

Il est à noter qu'au cours des cultures, le métabolisme bactérien engendre des composés acides ou basiques qui seraient susceptibles d'entraver la multiplication bactérienne. Pour éviter ces variations de pH, les milieux de culture sont tamponnés, le plus souvent en utilisant des tampons phosphates.

d) Effet de l'eau libre

L'activité de l'eau se définit comme le rapport de la pression de vapeur saturante du milieu à la pression de vapeur saturante de l'eau pure à la même température. Ce rapport, inférieur ou égal à 1, peut être assimilé à l'humidité relative du milieu. La disponibilité de l'eau présente dans l'atmosphère ou dans une substance intervient dans la croissance bactérienne. Les bactéries exigent un certain seuil d'humidité et pour des A_w faibles, leur croissance est ralentie.

Certains germes ne se développent que pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,97. C'est le cas des *Acinetobacterspp.* ($A_w > 0,99$) ou du *Clostridium botulinum* ($A_w > 0,97$). Les *Salmonellaspp.*, et *Escherichiacoli* commencent à se multiplier pour une valeur de l' A_w supérieure à 0,95.

Le *Staphylococcus aureus* se multiplie à partir de 0,85, mais la production éventuelle de toxines n'est possible que pour des valeurs supérieures à 0,97.

La bactérie *Listeria monocytogenes* peut supporter une valeur de l' A_w de 0,83, alors que les bactéries halophiles croissent même à une valeur de A_w dans les environs de 0,75.

Le degré d'humidité des aliments a une influence sur leur conservation et leur séchage est un procédé de conservation fondé en partie sur la diminution de l' A_w . L'activité de l'eau (A_w) est inversement proportionnelle à la pression osmotique d'un composé. Ainsi, elle est affectée par la présence plus ou moins importante de sels ou de sucres dissous dans l'eau.

- **Présence de sels**

Les bactéries halophiles nécessitent du sel (NaCl) pour leur croissance. Cette concentration peut varier de 1-6% pour les faiblement halophiles, de 15 à 30% pour les bactéries halophiles extrêmes (Ex. : *Halobacterium*).

Les bactéries halotolérantes acceptent des concentrations modérées de sels, mais non obligatoires pour leur croissance (Ex. : *Staphylococcus aureus*).

- **Présence de sucres**

Les bactéries osmophiles nécessitent des sucres pour leur croissance. Les osmotolérantes acceptent des concentrations modérées de sucres, mais non obligatoires pour leur croissance. Enfin les bactéries xérophiles peuvent se multiplier en l'absence d'eau dans leur environnement.

e) Effet de la pression osmotique

Les bactéries, à l'exception des *Mycoplasmatales*, sont peu sensibles aux variations de la pression osmotique car elles sont protégées par leur paroi. Toutefois, certaines espèces marines sont adaptées à des milieux contenant environ 35 g de NaCl par litre.

Selon leur sensibilité à la pression osmotique, trois groupes de bactéries sont distingués :

- Les bactéries non-halophiles capables de croître dans des milieux dont la concentration en NaCl est inférieure à 0,2 M.

- Les espèces halophiles ne pouvant croître que dans des milieux contenant des concentrations en NaCl supérieures à 0,2 M pour les moins halophiles (*Cobetiamarina*) et à 5,2 M pour les plus halophiles (*Halococcus morrhuae*, *Halobacterium salinarum*, *Halorubrum sodomense*).

➤ Les espèces halotolérantes, acceptent des concentrations modérées de sels, mais non obligatoires pour leur croissance, comme les *Staphylococcus* spp., les *Listeria* spp. ou les *Lactobacillus* spp.

Il est à préciser que la conservation des aliments comme les salaisons ou les confitures fait appel à une augmentation de la pression osmotique. Ces procédés ancestraux de conservation ont recours à l'addition de sel ou de sucre qui limitent la croissance de nombreuses bactéries. Seules les bactéries osmophiles se multiplient en présence de fortes concentrations de sucres et seules les bactéries halophiles se multiplient en présence de fortes concentrations de sels.

I-2 Méthodes d'étude de la croissance

Les techniques permettant l'étude de la croissance sont nombreuses, mais aucune n'est parfaite. Les facteurs qui influencent le choix d'une méthode sont d'une part, les propriétés de la biomasse (taille des cellules, isolées ou pas, caractère filamenteux, etc.) et les caractéristiques du milieu (degré de viscosité, les matières en suspension) et d'autre part, le degré de précision et de sensibilité requise et aussi la rapidité recherchée.

Sur un milieu solide, l'étude de la croissance est rendue difficile en raison notamment de l'agrégation des cellules les unes aux autres. En milieu liquide, les cellules sont dispersées (ou si elles sont agrégées, il est possible de les disperser par agitation) ce qui permet des prises d'échantillons. La croissance peut alors être appréciée en se basant sur le nombre de cellules ou sur la masse cellulaire, qui sont rapportés par unité de volume de culture.

I-2.1 Numération des cellules

a) Méthodes de comptage

La façon la plus simple d'étudier la croissance bactérienne est de mesurer le nombre de bactéries à intervalles de temps réguliers dans une culture. Ces méthodes présentent l'avantage de la rapidité et de la simplicité de mise en œuvre.

1. Détection et dénombrement direct au microscopique

L'avantage est que le matériel nécessaire n'est pas très important et qu'on peut faire des colorations différentielles, des observations morphologiques et visualiser les groupements. Ce type de dénombrement permet, grâce à une coloration (au Bleu de Méthylène ou au colorant de Newton), de différencier si on le souhaite les bactéries mortes des bactéries vivantes. L'inconvénient est que la méthode est lente, peu sensible, peu exacte (manque de précision) et

fatigante pour l'observateur. Le dénombrement des cellules d'un volume donné peut être déterminé à l'état frais en utilisant habituellement une cellule hématimétrique. Les plus utilisés sont MALASSEZ, THOMA et NAGEOTTE. Ces hématimètres diffèrent par leur quadrillage, mais tous permettent d'énumérer, dans un volume précis et connu, tous les éléments visibles à l'objectif 40.

Elle consiste à déposer, entre hématimètre et lamelle, une goutte de l'échantillon, dilué ou non, puis à compter dans le quadrillage (volume précis) les éléments voulus. Le résultat obtenu est extrapolé en éléments par litre.

Pour obtenir une numération proche de la réalité, il est important de :

- Ne pas rayer le quadrillage lors du nettoyage de l'hématimètre,
- Bien monter la lamelle sur l'hématimètre,
- Déposer la goutte de l'échantillon à énumérer correctement (décrit ci-dessous),
- Bien laisser sédimenter les particules à énumérer avant le comptage.

Cette méthode nécessite un matériel composé de : Hématimètre (MALASSEZ, THOMA, NAGEOTTE), lamelle en verre épais pour hématimètre, chambre humide, pipette Pasteur, nécessaire à dilution

❖ **Mode opératoire**

Préparation de l'hématimètre

- Coller la lamelle sur l'hématimètre, en humectant les deux bords de celui-ci avec un petit chiffon humide propre et essoré.
- Faire glisser la lamelle sur la largeur de l'hématimètre et vérifier la bonne adhésion " hématimètre - lamelle ».
- Entre hématimètre et lamelle, laisser rentrer, par capillarité, une goutte de l'échantillon à énumérer grâce à la pipette pasteur. La goutte ne doit pas déborder dans les rigoles de l'hématimètre et la goutte doit recouvrir complètement et d'un seul coup toute la surface quadrillée de l'hématimètre.
- Laisser reposer l'hématimètre à plat, pendant 10 minutes afin de laisser les éléments sédimenter.

Et on compte :

- Tous les éléments situés à l'intérieur des lignes délimitant cette surface,
- Et, pour les éléments situés sur les lignes, on compte soit ceux qui sont sur la ligne de gauche et pas ceux qui sont sur la ligne de droite, soit l'inverse

- Et, soit ceux qui sont sur la ligne du haut et pas ceux qui sont sur la ligne du bas, soit l'inverse.

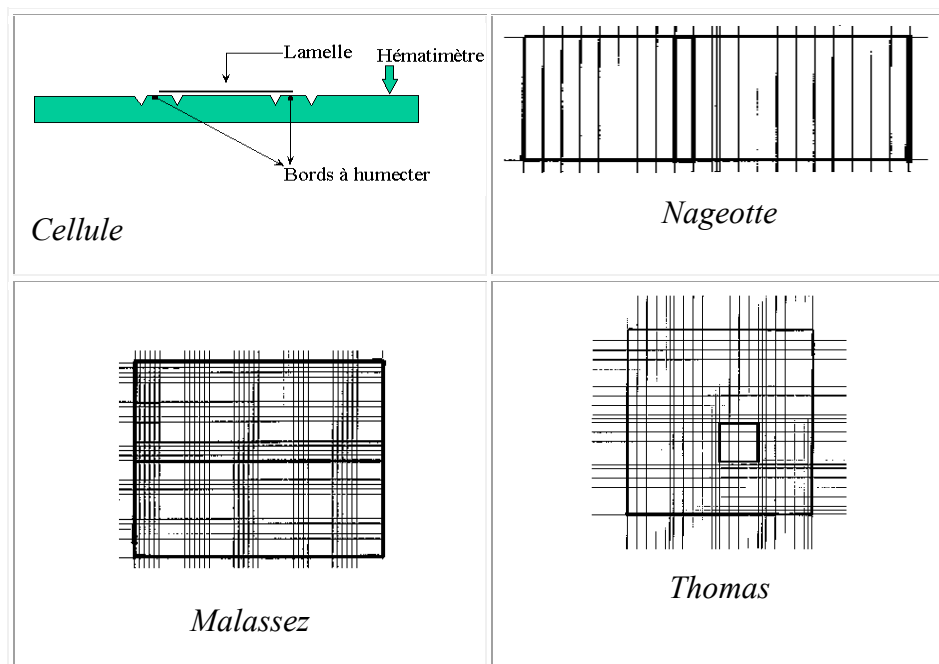


Figure 2 : Différents hématimètres utilisés dans le comptage des cellules.

MALASSEZ

- 1 Rectangle = **0,01** mm³.
- 1 Bande = **0,1** mm³.
- La cellule = **1** mm³.

NAGEOTTE

- 1 Rectangle = **1,25** mm³.
- La cellule = **50** mm³.

On compte quatre bandes, on trouve x éléments. On a : nombre éléments par mm³ = x / 5

THOMAS

- 1 Carré = 0,004 mm³.
- La cellule = 0,1 mm³.

2. Comptage électronique

DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) : Coloration des cellules par un fluorochrome de type acridine orangé (substance oncogène). Ce fluorochrome va se fixer entre les bases azotées des acides nucléiques cellulaires, ce qui permet d'observer sous lumière UV, (Ultraviolet), et d'avoir une fluorescence des acides nucléiques. Les observations seront :

- Cellule à prédominance verte chargée en ADN (Acide DésoxyriboNucléique) ⇒ cellule morte.
- Cellule à prédominance rouge chargée en ARN (Acide Ribonucléique) ⇒ Cellule vivante.

b) Techniques nécessitant une culture (Techniques de UFC)

On considère qu'une seule bactérie va donner une seule colonie sur un milieu de culture, on va donc compter les colonies présentes sur une culture de bactéries connaissant le volume de suspension bactérienne étalée sur le milieu ou présent dans le milieu.

La numération des cellules viables après culture est une technique de référence et d'usage courant. Un volume fixe d'une suspension bactérienne parfaitement homogène et de ses dilutions est étalé sur un milieu gélosé ou incorporé à un milieu gélosé en surfusion. Dans ces conditions, seules les cellules viables donnent une colonie. Après incubation réalisée dans des conditions convenables, on compte les colonies bactériennes apparues sur ou dans le milieu de culture.

L'analyse est réalisée en triple exemplaire et le comptage est effectué sur les boîtes renfermant entre 30 et 300 colonies. On ne peut cependant pas être sûr qu'une colonie résulte du développement d'une seule bactérie. En effet, les amas ou les agglomérats bactériens donnent une seule colonie et plusieurs bactéries déposées par hasard à proximité les unes des autres peuvent également donner naissance à une seule colonie. Aussi, les résultats ne sont pas donnés en nombre de cellules, mais en unités formant colonies (UFC pour : unitéformant colonie ou CFU pour colony forming unit).

Remarque

NPP : Nombre le Plus Probable de cellules viables par tube, s'appuie sur des tables statistiques de tests de croissance (tables de Mac Grady).

I-2.2. Détermination de la biomasse microbienne

De très nombreuses techniques permettent de mesurer la biomasse : détermination du poids sec, mesure de la densité optique, mesure d'un ou de plusieurs constituants cellulaires, mesure de la consommation d'un substrat, mesure des produits d'excrétion, mesure des variations physico-chimiques induites par la croissance, etc.

a) Détermination de la masse sèche

La biomasse est récupérée par centrifugation, lavée afin d'éliminer le milieu de culture retenu entre les cellules, puis séchée à 105 °C en présence de sable de **Fontainebleu** jusqu'à

l'obtention d'une masse constante. C'est la méthode la plus rigoureuse, mais elle s'applique qu'aux suspensions assez dense et dans lesquelles les microorganismes sont les seules particules en suspension. L'inconvénient de cette méthode réside dans l'incompatibilité de distinguer la biomasse vivante de la biomasse morte.

b) Mesure de la densité optique : turbidimétrie

La mesure de la densité optique est la technique la plus simple, la plus rapide et la plus utilisée. Elle consiste à mesurer la lumière absorbée par une suspension bactérienne à l'aide d'un spectrophotomètre réglé à une longueur d'onde de **650 nm** (longueur d'onde pour laquelle l'absorption de la lumière par les constituants cellulaires est la plus importante). Dans des conditions techniques précises, l'absorbance est proportionnelle à la concentration cellulaire. La turbidité étant inversement proportionnelle à la surface de la particule. Pour que la turbidité soit une mesure précise de la masse bactérienne, il faut que la surface cellulaire moyenne reste constante au cours de la mesure. Cette situation ne se produit qu'au cours de la phase active de croissance (phase exponentielle,) et toute mesure effectuée sur des cellules au repos est erronée.

L'inconvénient major de cette technique est la présence de particules en suspension autres que les cellules qui perturbent l'absorbance, mais on peut toutefois homogénéiser la suspension dans des conditions standardisées avant de faire la mesure. Cette technique se prête bien à une détermination en ligne au cours de la fermentation, grâce à la mise au point de bio-photomètres stérilisables fonctionnant en continu.

Il est à noter que la mesure de la densité optique a une sensibilité modérée (il faut au moins 10^7 bactéries/mL, pour pouvoir mesurer une densité optique). Elle est inutilisable avec des milieux très colorés et ne s'applique pas aux filamenteux. De plus, elle est incapable de différencier les cellules vivantes des cellules mortes.

I-2. 3 Autres méthodes

Leur principe consiste à remplacer la détermination de la biomasse microbienne elle-même par celle d'un paramètre facilement déterminable et dont la valeur peut être corrélée avec précision à celle de la biomasse, tel qu'un constituant qu'elle renferme (protéine, acides nucléique, ATP, etc.).

a) Dosage de protéines (l'azote total)

La multiplication cellulaire est étroitement dépendante de la synthèse protéique. La méthode la plus utilisée est celle de Kjeldahl, qui consiste tout d'abord à une minéralisation suivie de distillation et d'une titration avec de la soude. D'autres méthodes telles que celle de Bradford et de Lowry peuvent être utilisées.

b) Dosage des constituants du milieu de culture

La croissance microbienne a pour effet de modifier considérablement la composition du milieu dans lequel elle se déroule. Parallèlement à l'apparition de la biomasse, on assiste à la disparition du substrat, à la consommation d'oxygène, à la modification de la température et à l'apparition de nouvelles substances (produits et sous-produits).

L'étude de la variation de ces paramètres permet de suivre l'évolution de la biomasse, que l'on peut ramener tout d'abord à un dosage de substrat, et par suite à la culture microbienne (en se basant sur la réaction chimique ou enzymatique)

Par ailleurs, le microcalorimétrie dynamique permet de relier le dégagement de la chaleur accompagnant tout développement microbien à la biomasse cellulaire présente et à son métabolisme. Elle permet de mesurer des échanges thermiques entre le milieu de fermentation et le milieu extérieur avec un seuil de détection de 1 à 10 μW . Cette technique peut être utilisée en ligne sur un fermenteur (en pleine production).

I-3 Courbe de croissance microbienne

Lorsqu'un *inoculum* bactérien est placé dans une enceinte contenant un milieu nutritif *non renouvelé*, et dans les conditions favorables, l'étude du développement microbienne, en fonction du temps (t), consiste de suivre l'évolution de la concentration cellulaire (X/v) [nombre de cellules par unité de volume de culture] ou concentration en biomasse microbienne (m/v) [masse en gramme de matière sèche cellulaire par unité de volume] selon le type de microorganisme et le type de méthode choisie.

La cinétique de la croissance peut être divisée en six phases successives : I : latence ; II : accélération de croissance ; III : croissance exponentielle ; IV : décélération de croissance ; V : phase stationnaire ; VI : déclin. Ces différentes phases constituent la courbe de croissance de microorganismes (Figure 3).

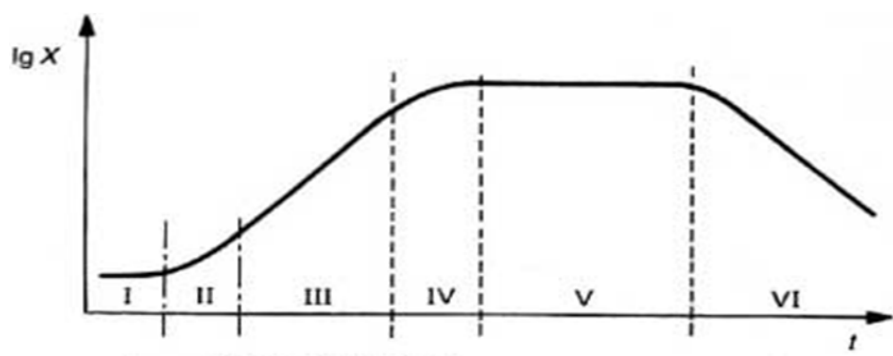


Figure 3 : Courbe de la croissance d'un microorganisme (En milieu non renouvelé)

a) La phase de latence

Elle suit immédiatement l'ensemencement du microorganisme dans le milieu de culture. Il s'agit d'une période d'adaptation aux conditions du milieu (nature du substrat, conditions physicochimiques) au cours de laquelle la cellule synthétise en particulier les enzymes qui lui sont nécessaires pour métaboliser le substrat présent. Durant cette phase, la masse bactérienne reste identique à la masse initiale.

Le **temps de latence** est très variable et dépend à la fois de la nature du milieu ainsi que de la nature et de la taille de l'inoculum bactérien.

Un inoculum bactérien prélevé en phase exponentielle de croissance et ensemencé dans un milieu neuf identique se multiplie sans aucune phase de latence. En revanche, si le même inoculum est placé dans un milieu différent on observe une phase de latence (période d'adaptation enzymatique durant laquelle les bactéries synthétisent de nouvelles enzymes leur permettant d'utiliser de nouveaux nutriments).

L'ensemencement d'un inoculum important réduit la durée de la phase de latence par des mécanismes mal connus. On peut supposer qu'un grand nombre de bactéries est apte à neutraliser rapidement un effet toxique du milieu.

L'âge des bactéries a une influence sur la durée de la latence qui peut être très courte lorsque des cellules jeunes sont introduites dans un milieu neuf. En effet, un inoculum âgé peut contenir de nombreuses cellules mortes, de plus, dans un inoculum âgé, les bactéries sont dans un état physiologique peu favorable et il leur faut du temps pour restaurer leurs systèmes enzymatiques mis au repos.

Il faut noter que, l'abaissement du temps de latence est très recherché dans certaines applications technologiques, qui souvent obtenu en adaptant l'inoculum sur le même milieu en effectuant une pré-culture, ou même en augmentant sa taille. Cependant, l'effet inverse est souvent recherché au cours des opérations de stabilisations (réfrigération, déshydratation, etc.).

b) La phase d'accélération de croissance

À la suite de la phase de latence survient une phase d'accélération au cours de laquelle la multiplication cellulaire démarre avec une vitesse de croissance de plus en plus grande. Elle se caractérise par une augmentation de plus en plus rapide de la masse. Le taux de croissance devient supérieur à zéro et il augmente progressivement.

c) La phase de croissance exponentielle

Les bactéries se multiplient sans entrave ; le **taux de croissance** est maximum et constant. Ce paramètre est une caractéristique d'un microorganisme donné qui est lui-même sous la dépendance des conditions de l'environnement comme la nature et la concentration des nutriments, le pH et la température. Ces facteurs ont une grande influence. C'est ainsi que pour *Escherichia Coli* le taux de croissance est de 0,5 à 18°C et de 3,3 à 40°C. Durant cette phase, la masse microbienne augmente de façon exponentielle.

d) La phase de décélération de croissance

Durant cette phase, la vitesse de croissance se ralentit progressivement et le taux de croissance devient nul. Cela correspond, d'un point de vue biochimique, à l'épuisement du milieu de culture du fait de la disparition d'un ou plusieurs composés nécessaires à la croissance et, aussi dans plusieurs cas à l'accumulation de produits inhibiteurs (éthanol, les toxines, etc.), résultant du métabolisme microbien.

Le changement de certains paramètres physico-chimiques tels que la température, le pH et le potentiel redox, durant la croissance microbienne peut aussi inhiber la croissance du microorganisme.

e) La phase stationnaire

La concentration bactérienne est maximale et constante et le taux de croissance (μ) est égal à zéro. Les bactéries peuvent continuer à se diviser, mais le taux de division est alors égal au taux de mortalité. Cette phase résulte, d'une part de l'épuisement du milieu et de l'accumulation de déchets toxiques, d'autre part de l'apparition de métabolites bactériens *bactériostatiques* (c'est-à-dire inhibant la croissance des bactéries sans les tuer), voire bactéricides. Durant cette phase les bactéries en ayant la capacité peuvent sporuler.

Il est à préciser que les rendements sont calculés au cours de cette phase.

f) La phase de déclin

Pendant cette dernière phase, les bactéries ne se reproduisent plus. Beaucoup d'entre elles meurent et sont décomposées plus ou moins rapidement par les enzymes libérées au moment de leur mort. Ce processus d'autodigestion constitue l'autolyse. Le taux de mortalité peut être constant comme le taux de croissance. Il est alors représenté par une droite, le nombre de cellules étant proportionnel au temps. La pente de cette droite dépend de l'espèce bactérienne ainsi que des conditions de l'environnement.

Cependant, il peut se produire assez fréquemment des déviations de l'ordre exponentiel de déclin en raison de divers degrés de résistance des cellules. Dans certains cas aussi des bactéries peuvent survivre et se multiplier aux dépens des nutriments libérés par la décomposition des autres cellules.

❖ Phénomène de diauxie

Le phénomène de diauxie, mis en évidence par Monod, se traduit par une courbe de croissance diphasique. Il est observé dans des milieux synthétiques contenant au moins deux sources de carbone et il est lié à un mécanisme de répression catabolique. Par exemple, dans un milieu contenant du glucose et du lactose, certaines espèces vont dans un premier temps utiliser le glucose grâce à des enzymes constitutives. La dégradation du lactose est sous la dépendance d'enzymes inductibles dont l'induction est réprimée en présence de glucose. Lorsque le glucose sera épuisé, les bactéries utiliseront le lactose et donneront une nouvelle phase de croissance exponentielle après un temps de latence intermédiaire.

Il est à mentionner que, dans un milieu non renouvelé, la phase exponentielle de croissance ne peut durer que quelques heures. Dans un but industriel, il peut être nécessaire de prolonger cette phase en renouvelant constamment le milieu de culture et en éliminant les produits du métabolisme. Les croissances continues sont obtenues à l'aide de **turbidostat**, de **chémostats**, de fermenteurs en continu multi-étages ou d'autres dispositifs industriels.

I-4 Facteurs affectant le taux de croissance

Le taux de croissance est un paramètre caractéristique d'une espèce (ou d'un biotype). De façon générale, les bactéries se développent plus vite que les microorganismes eucaryotes (levures et moisissures). Le taux de croissance maximum (μ_{\max}) est une donnée théorique difficile à connaître et atteindre, car elle correspond à des conditions idéales dont on n'est jamais sûr qu'elles soient atteintes. Différents facteurs sont susceptibles de modifier l'allure de la courbe de croissance, et le taux de croissance réel dépend de nombreux facteurs.

a) Action de la température

La température exerce une influence déterminante sur l'ensemble de l'activité cellulaire des microorganismes. Aux basses températures, elle peut être totalement bloquée. La croissance est accélérée par une augmentation de la température. Toutefois, à partir d'une certaine température, certains constituants (enzymes, acide nucléique) ou structures cellulaires (enveloppes) peuvent subir des altérations ou dénaturations. La croissance cellulaire s'en trouve perturbée et si la vitesse

de croissance reste élevée, la concentration cellulaire n'atteint pas sa valeur maximale. La destruction thermique des cellules l'emportant sur la croissance.

La croissance cellulaire peut être assimilée à une réaction complexe suivant la **loi d'Arrhenius**, donnée par la relation suivante :

$$\ln X = -\Delta H / RT$$

Ou encore $\log x = -\Delta H / 2,3 RT$

Avec :

ΔH : est l'énergie d'activation de la croissance (variation de l'enthalpie) ;

R : est la constante des gaz parfaits ;

T : est la température absolue en Kelvin $\theta(K)=273+x$ °C.

La représentation graphique du taux de croissance en fonction de la température (ou même $1/T$) montre clairement que le taux de croissance augmente avec l'élévation de la température jusqu'à atteindre une valeur maximale μ_{\max} relative (qui correspond à la température optimale de croissance), au-dessus, ce taux diminue progressivement.

Le coefficient Q_{10} représente le facteur d'augmentation de taux de croissance pour une élévation de la température de 10°C. Pour de nombreuses bactéries, ce coefficient varie de 1,5 à 2, cas d'*E. coli* que le taux de croissance double en passant de 25°C à 35°C.

b) Action du substrat

Si on ensemence un microorganisme dans un milieu de culture, contenant en quantité suffisante tous les composés dont il a besoin sauf un, la croissance ne peut avoir lieu. En revanche, lorsqu'on commence à lui fournir ce composé en quantités faibles et variables d'un essai à l'autre, le taux de croissance augmente avec l'augmentation de la concentration et atteint la valeur maximale pour une concentration de S_{\max} .

Pour toutes les concentrations supérieures à S_{\max} , le taux de croissance n'augmente pas et reste égal au taux de croissance maximal (cela explique pourquoi le taux de croissance reste constant en valeur max en phase exponentielle, et aussi le ralentissement progressif en phase décélération). Ce phénomène a été étudié par MONOD qui déduit que : même dans les conditions, de cultures les plus favorables, le taux de croissance est très affecté par la nature et la concentration du substrat.

- **Nature du substrat**

Un milieu contenant un substrat facilement catabolisable donnera une croissance plus rapide qu'un milieu contenant des substrats plus complexes, qui nécessitent d'être dépolymérisés.

De même, un milieu riche dans lequel des métabolites directement utilisables pour l'anabolisme sont présents et assimilables donnera une croissance plus rapide qu'un milieu où les cellules doivent effectuer la synthèse de ses constituants. De plus, la variation de la composition et de la valeur nutritionnelle et énergétique des divers substrats utilisables donneront des valeurs de taux de croissance différentes.

- **Concentration en substrat**

La concentration en substrat constitue un facteur limitant à la vitesse de croissance et ainsi au taux de croissance. Cet effet peut être résumé par la loi de MONOD donnant la variation de taux de croissance en fonction de la concentration de substrat :

$$\mu = \mu_{\max} S / K_S + S$$

Avec

μ_{\max} : taux de croissance maximal sans facteur limitant (phase exponentielle).

K_S : **constante de saturation** (ayant la dimension d'une concentration en substrat limitant donnant un taux de croissance égal à la moitié de μ_{\max}).

La constante (K_S) est inversement proportionnelle à l'affinité du microorganisme pour son substrat ; elle est analogue à la constante (K_m) de Michaelis-Menten.

Il faut préciser que la valeur de la constante (K_S) varie d'une souche microbienne à une autre. Pour les substrats glucidiques, elle est généralement comprise entre 1 à 100mg/l, alors que pour les composés azotés, elle est souvent beaucoup plus faible.

Il est à signaler qu'une augmentation importante de la concentration en substrat dans le milieu provoque une diminution du taux de croissance, ce qui peut être dû à l'augmentation de la pression osmotique du milieu ou même effet de l'antagonisme d'utilisation. Ce qui nous pousse à parler de concentration d'inhibition (K_i). Cet effet peut être pris en compte par l'équation :

$$\mu = \mu_{\max} S / K_S + S + K_i S^2$$

Avec :

K_i : étant une concentration relative au microorganisme et au substrat considéré dans un milieu de culture donné et pour des conditions environnantes définies.

c) Action de l'oxygène

En fermentation industrielle, l'oxygène provient principalement de l'air qui est injecté dans le réacteur, et contrairement aux autres substrats qui peuvent être en quantité suffisante, l'oxygène se limite à la quantité dissoute, qui est non seulement faible, mais aussi rapidement épuisée. Et on peut considérer que le cas d'une croissance rapide, la teneur en oxygène du milieu devient nulle et par conséquent la vitesse et le taux de croissance sera en fonction de la vitesse de dissolution de l'oxygène dans le milieu. Ainsi deux notions fondamentales apparaissent ; la capacité de transfert d'oxygène de réacteur et la demande en oxygène de la culture. Cette dernière mesure les besoins en consommation d'oxygène de la culture, et s'exprime en $mmol/l/h$ ou $mol/m^3/h$. Cette donnée est déterminée au laboratoire (Tableau II).

Tableau II: Besoin en oxygène de quelques microorganismes utilisés dans l'industrie fermentaire.

Microorganismes	Besoin en O ₂ ($mmol/l/h$)
<i>Escherichia coli</i> (production d'acides aminés : tryptophane-tyrosine-phénylalanine et d'enzyme : chymosine)	5 à 8
<i>Streptomyces</i> sp. (Antibiotiques)	10
<i>Aspergillus niger</i> (Production d'acide citrique)	28
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (Biomasse, Ethanol)	12
<i>Saccharomyces lipotica</i> (Production de lipases)	30
<i>Acetobacter</i> sp. (Production d'acide Acétique)	24

I-5 Modélisation mathématique de la croissance microbienne en milieu non renouvelé

Au temps (t_0), on inocule un milieu de culture de volume (V) et de concentration en substrat (S) avec une pré-culture qui donne une concentration (X_0) en biomasse. Les divers paramètres caractérisant l'évolution de l'activité microbienne sont habituellement classés en paramètres d'état et en paramètres cinétiques (vitesse et taux). Ces paramètres donnent des renseignements sur l'état de la culture et le degré d'avancement des réactions.

a) Paramètres d'état

- Pour la biomasse on caractérise : la biomasse initiale (X_0) ou (X_i) et la biomasse finale (X_f), qui sont exprimées en g de matière sèche /L ou en nombre de cellules/mL de milieu de culture.
- Pour le substrat on caractérise : le substrat initial (S_0) ou (S_i) et le substrat final (S_f), qui sont exprimées en g/L. C'est à mentionner que, le substrat résiduel (S_r), peut être également caractérisé.
- Pour le produit on caractérise : le produit initial (P_0) qui est le plus souvent inexistant, et le produit final (P_f) ainsi que le produit intracellulaire (P_{intr}) et le produit extracellulaire (P_{extr}), qui sont exprimés en g/L.

b) Paramètres cinétiques (dérivés)

Ce sont les vitesses cinétiques d'apparition de biomasse et de produit, et de consommation (utilisation) du substrat.

- Vitesse d'apparition de biomasse (V_x ou r_x), elle nous renseigne sur l'évolution de la biomasse au cours de temps.

On peut l'exprimer par : $V_x = dX/dt$. [g/L/h]

- Vitesse de consommation de substrat (V_s ou r_s), elle nous renseigne sur l'évolution de la concentration en substrat au cours de temps.

On peut l'exprimer par : $V_s = -dS/dt$. [g/L/h]

- Vitesse d'apparition de produit (V_p ou r_p), elle nous renseigne sur l'évolution de l'apparition du produit au cours de temps.

On peut l'exprimer par : $V_p = dP/dt$. [g/L/h]

❖ Quelques caractérisations**• Taux de croissance**

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

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad \mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad \Leftrightarrow$$

X : symbolise la biomasse (exprimée en g /L ou en nombre de cellules).

- **Coefficient métabolique ou taux de conversion (q)**

Le coefficient métabolique q mesure la vitesse de consommation du substrat par la biomasse à un instant (t) de la fermentation. Ce taux caractérise l'intensité de l'activité catalytique.

$$q = \frac{1}{X} \frac{dS}{dt}$$

- **Taux de production (P) ou μ_P**

Ce taux mesure la vitesse de production du produit par la biomasse à un instant (t) de la fermentation.

$$\mu_P = \frac{1}{X} \frac{dP}{dt}$$

I-6 Productivité

La productivité (Q) est la quantité de produit (Q_P) ou de biomasse (Q_X) produite par unité de volume de culture et de temps. Elle est exprimée en g/l/h, et est donnée par :

$$Q_P = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad \text{Et} \quad Q_X = \frac{\Delta x}{\Delta t} = \frac{X_f - X_i}{t_f - t_i}$$

Selon l'intervalle de temps choisi, une productivité maximale et une productivité optimale peuvent être définies

I-7 Rendements

I-7.1 Rendement réel ($R_{x/s}$ et $r_{x/s}$)

Le rendement permet de connaître le degré d'efficacité d'un bioréacteur, en comparant la production à la consommation. À tout instant de la production, un rendement instantané ($r_{x/s}$) en biomasse ou en produit ($r_{p/s}$) peut être calculé. Il représente la quantité produite par gramme de substrat consommé pendant un intervalle de temps très court (dt).

Le rendement global ($R_{x/s}$ ou $R_{p/s}$) s'applique à l'ensemble de la culture.

I-7.2 Rendement théorique ($Y_{x/s}$)

En plus, de l'utilisation du substrat pour la production de la biomasse et de produit, les microorganismes l'utilisent aussi pour survenir aux besoins de maintenance c'est-à-dire pour assurer le turnover chimique des composants cellulaires (renouvellement cellulaire), assurer le

transport membranaire, pour maintenir une pression osmotique interne correcte, pour pouvoir se déplacer. Il faut donc ajouter à l'utilisation de substrat une quantité (m) tel que :

$$S = S_x + S_p + S_m$$

La maintenance existe chez tous les microorganismes, mais à des taux différents. Ce taux est très négligeable chez les microorganismes qui se développent rapidement, mais il est très prononcé chez ceux à temps de génération supérieur à 4 heures, qui est d'environ de 10 à 20% (espèces productrices de l'éthanol). De ce fait, la maintenance est considérée comme une perte de rendement.

I-7.3 Variation du rendement avec la maintenance

Exemple cas de levure (production de biomasse)

Dans ce cas, on considère que la production du produit est nulle. Le substrat est alors utilisé pour la production de la biomasse et pour les besoins de la maintenance.

Alors on peut écrire :

$$S = S_x + S_m \quad \text{alors} \quad V_s = V_{sx} + V_{sm} \dots\dots\dots(1)$$

Le rendement théorique : $Y_{x/s} = dx / -ds_x = V_x / V_{sx}$

$$V_{sx} = V_x / Y_{x/s} \dots\dots\dots(2)$$

Les besoins en maintenance dépendent de concentration en biomasse, ce qui fait :

$$V_{sm} = m \cdot x \dots\dots\dots(3)$$

En remplaçant dans les trois équations, on trouve que :

$$V_s = m \cdot x + V_x / Y_{x/s} \dots\dots\dots(4)$$

Le rendement réel ($R_{x/s}$) = $V_x / V_s = (dX/dt) / m \cdot x + V_x / Y_{x/s}$

$$= \mu \cdot x / m \cdot x + (\mu \cdot x / Y_{x/s})$$

$$= \mu / [(\mu / Y_{x/s}) + m]$$

Alors le rendement réel sera donné par l'équation finale :

$$R_{x/s} = \mu / [(\mu / Y_{x/s}) + m]$$

Chapitre II : Conception et mode de fonctionnement d'un fermenteur

Sans même connaître l'existence de micro-organismes, les Égyptiens, en 4 000 avant Jésus-Christ, utilisaient les levures pour fabriquer du pain et des **breuvages** alcoolisés. Sans asepsie, mais avec un sens développé de l'observation, des savoir-faire ont été perpétués et améliorés au cours des siècles, mais ce n'est qu'au 19^{ème} siècle qu'à vraiment démarré la mise en valeur des propriétés des micro-organismes à des fins utilitaires.

Au cours des deux guerres mondiales, de nombreux procédés aérobies sont utilisés pour la production de composés chimiques à différents rôles ; nutritifs, médicaux et pharmaceutiques, alimentaires, et voire même énergétiques, grâce aux particularismes métaboliques qui sont mis à profit et la maîtrise des techniques de génie génétique qui ont permis d'ouvrir de nouvelles perspectives, notamment dans le secteur des acides aminés, des protéines recombinantes et des antibiotiques.

Au progrès des connaissances s'est ajoutée la nécessité de satisfaire des besoins d'hygiène, de santé et d'alimentation qui ont permis l'essor des procédés de fermentation et le développement de technologies appropriées aux cultures microbiennes massives : les fermenteurs, qui facilitent la maîtrise des cultures de bactéries, levures, champignons et même de cellules animales et végétales.

Compte tenu de cette diversité, des caractéristiques spécifiques de chaque classe d'organismes et des particularités d'espèces, de très nombreux réacteurs ont été élaborés, et la recherche d'une conception industrielle adéquate pour toutes les cultures (bactéries, levures et champignons) reste toujours un objectif recherché afin de mettre en valeur les potentialités du vivant, les technologies et les équipements associés.

II-1 Définition de la fermentation

Le terme de **fermentation** est apparu au 16^{ème} siècle ; il vient du latin **FERVERE** qui signifie : bouillir (dégagement de bulles de CO₂ dans un moût de vinification).

Pasteur, le fondateur de la microbiologie, l'a défini comme « la vie en absence d'oxygène ». Un tel critère ne convient plus actuellement tant sur le plan scientifique que technologique.

Une acception plus pragmatique est préférable, incluant outre la vie en absence d'oxygène (anaérobiose), la vie en présence d'oxygène, et par extension, ce terme est utilisé par le monde industriel pour désigner l'opération unitaire qui va permettre de réaliser les cultures cellulaires et d'effectuer les réactions de bioconversion, qu'elles soient aérobies ou anaérobies.

La **fermentation** est une étape d'un procédé industriel ; elle s'insère dans un ensemble d'opérations unitaires qui aboutiront à la valorisation de la biomasse et/ou de ses composantes et/ou à la valorisation des produits de bioconversion. Cette opération se déroule dans des bioréacteurs (fermenteurs).

II-2 Définition du fermenteur

Les fermenteurs sont des récipients (enceintes, cuves) en verre (pour les fermenteurs destinés le plus souvent au laboratoire), ou le plus souvent en acier inoxydable, de dimension très variable en passant de l'ordre de 5 à 25 litres pour les fermenteurs laboratoire, à environ de 100-200 litres pour les fermenteurs des chaînes pilotes, et à l'ordre de mètres cubes pour les fermenteurs industriels. Ces récipients sont munis le plus souvent d'appareillages et de dispositifs de contrôles (pH-mètre, extracteur des gaz, sondes, agitateurs, etc.) et de matériels annexes (vannes, pompes, filtres, etc.) nécessaires pour assurer une facilité et le bon fonctionnement de la fermentation, ainsi que la récupération des produits, tout en assurant le contrôle des conditions nécessaires à la production. La figure 4, illustre un schéma typique d'un fermenteur avec les accessoires nécessaires.

Il est à noter que :

- Tout au long de l'enchaînement des opérations de production fermentaire, il est nécessaire de pratiquer des contrôles afin de vérifier le bon déroulement du procédé.
- Du stade laboratoire, où les cultures sont de l'ordre de quelques centimètres cubes, au stade production, où les fermenteurs atteignent plusieurs centaines de mètres cubes, il sera nécessaire d'effectuer des étapes de propagation.
- Les critères de conception d'un fermenteur industriel découlent de la réaction biologique de fermentation que l'on souhaite mettre en œuvre dans le but de produire soit de la biomasse soit des molécules contenues dans le microorganisme ou produites par ce dernier (acide organique, acides aminés). En fonction du métabolisme sélectionné, les critères de stérilité, de transfert de matière, de gaz et de transfert de chaleur imposent des conditions de calcul qui gouvernent la conception du fermenteur

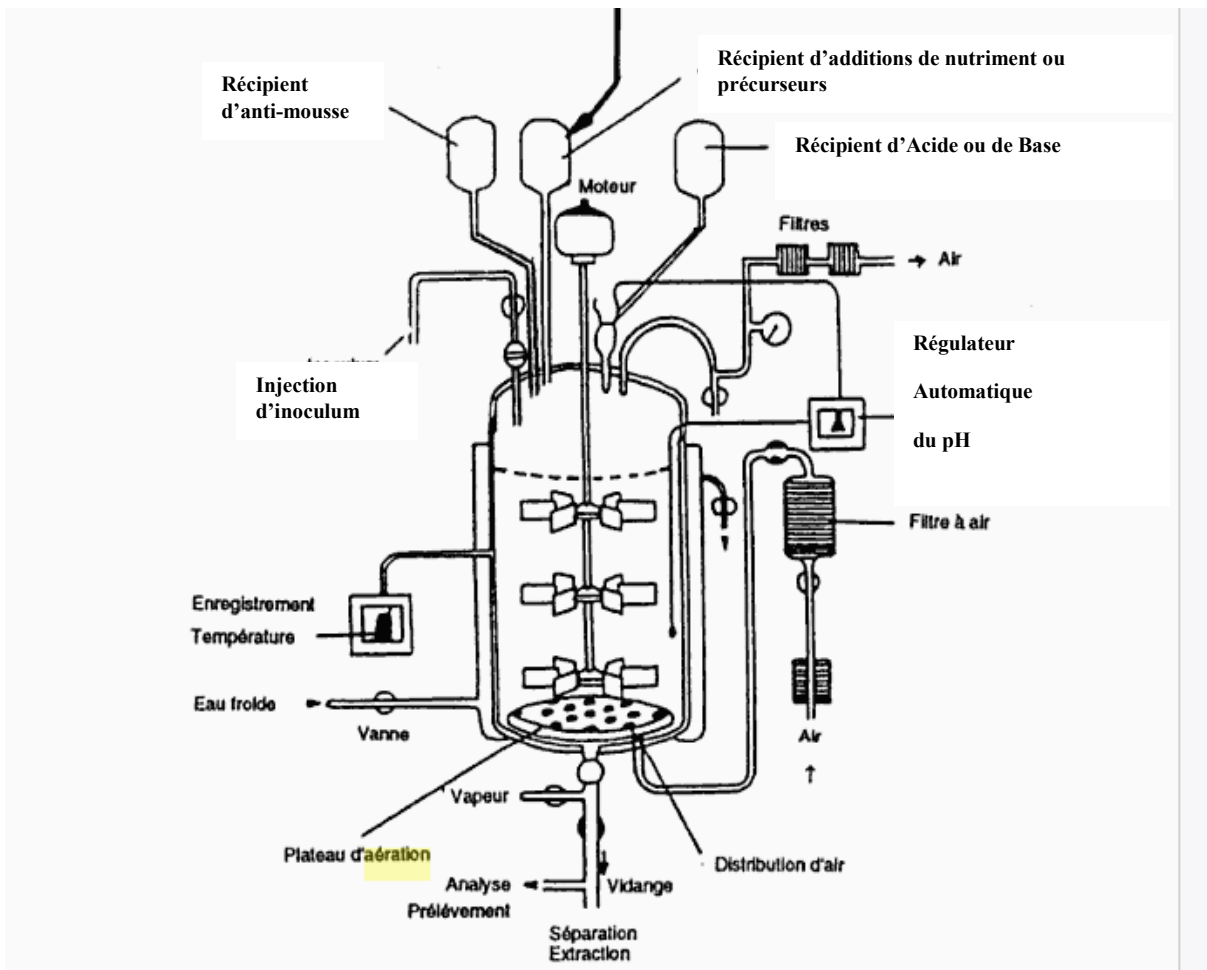


Figure 4 : Schématisation d'un fermenteur avec ses accessoires

II-3 Types et dimension d'un fermenteur

Selon l'objectif d'utilisation de fermenteur, on distingue trois types de fermenteurs :

- Fermenteur laboratoire (Echelle de recherche) : Étude de la faisabilité de la production (Collection de la souche et Préparation des milieux)
- Fermenteur pilote (Echelle de Développement) : Étude et la mise au point des conditions industrielles
- Fermenteur industriel (Echelle de Production) : Mise en œuvre des conditions industrielles

II-4 Contrôles de la fermentation

L'évolution de la fermentation est suivie par l'évolution de paramètres directement mesurables sur la cuve ou par l'examen de prélèvement. Un fermenteur doit être équipé de sondes de température, de pH, de baromètres, de purges, etc. afin de pouvoir mesurer les différents

paramètres physiques, chimiques et biologiques au cours de la fermentation, ce qui facilitera l'optimisation et la modélisation de cette opération. Les **mesures** courantes effectuées sont les suivantes :

- Vitesse d'agitation et degré d'aération (c'est-à-dire volume d'air injecté dans le réacteur par unité de temps) en utilisant des analyseurs (sonde) à O₂ paramagnétique
- Température ; par des thermocouples, thermistor ou résistances de platine
- pH : sondes à électrodes (KCl)
- Pression ;
- Niveau de la mousse ;
- Taux d'oxygène dissous ;
- Taux de gaz carbonique dissous ;
- Taux d'oxygène dans la phase gazeuse en sortie du fermenteur ;
- Taux de gaz carbonique dans la phase gazeuse en sortie du fermenteur ;

Il est à noter que, des mesures plus spécifiques peuvent être nécessaires, d'où l'utilité d'appareil spécifique tel que :

- Turbidimétrie ;
- Boucle de filtration avec analyse en ligne-glucose-acides organiques ;
- HPLC (chromatographie liquide haute pression) ;
- Méthane hydrogène (méthanisation).

II-5 Maîtrise des phénomènes de moussage

L'aération et l'agitation intense que subissent les milieux de culture dans les fermenteurs conduisent à la production abondante de mousse qui tend à déborder du fermenteur, pouvant aboutir à une contamination du milieu et aussi à provoquer la perte du milieu de culture et de charge microbienne. Cette mousse apparaît lorsque la dispersion de gaz dans la phase liquide se stabilise du fait de films liquides résistants enveloppant les bulles de gaz. La tension superficielle (plus la tension superficielle du liquide est élevée, plus la force intermoléculaire sera élevée ce qui empêchera l'apparition de la mousse), la viscosité et la température de liquide conditionnent la formation et la persistance de la mousse.

Il faut préciser que le plus souvent, l'industriel fait recourir à l'action sur la tension superficielle, à l'aide de substances « anti-mousses » présentant un pouvoir inhibiteur minimal ou nul sur le microorganisme en culture. Les principaux produits utilisables sont à base de silicone, de copolymères d'oxydes de propylène et d'éthylène estérifiés ou non, ou encore d'esters

d'organiques à longues chaînes ainsi que traditionnellement d'huiles naturelles (animales ou végétales). Grâce à ces substances, additionnées automatiquement en cours de fermentation, à l'aide d'une électrode qui commande la libération, on arrive à détruire les mousses (ou même à les empêcher de se former).

Ces substances anti-mousse sont parfois utilisées comme aliments et ainsi participent à augmenter les rendements. C'est le cas des phospholipides, de l'huile d'olive et de l'huile de soja au cours de la production de riboflavine.

Il faut noter qu'il est crucial de définir un anti-mousse adapté capable d'assurer un effet choc immédiat et un effet rémanent à coût minimal. La nature de l'anti-mousse n'est pas sans effet sur l'extraction et la purification des produits.

L'emploi de ces composés présente souvent un certain nombre d'inconvénients, en plus d'un léger pouvoir inhibiteur, ils diminuent les capacités de transfert d'oxygène de l'installation, par empoisonnement des interfaces d'échange gaz liquide. Le transfert d'oxygène est globalement réduit, et peut atteindre une baisse de 60%, et comme conséquence une inévitable baisse de productivité.

Pour pallier cette baisse de productivité, certains constructeurs « CHEMAP » ont muni les bioréacteurs d'un dispositif mécanique pour réduire la formation de mousse en la brisant continuellement.

L'appareil (**Figure 5**) est construit en acier inoxydable, composé d'une série d'assiettes coniques comportant sur leur face interne des chicanes radiales. Montées sur un arbre creux, elles sont entraînées en rotation à vitesse plus ou moins élevée (selon leur taille) grâce à un moteur. La mousse, au contact de ce dispositif, est détruite sous l'action de la force centrifuge, et le liquide retournant dans le réacteur et le gaz s'échappant par l'arbre creux.

Il est à noter que, le dispositif mécanique ne peut être installé que sur les bioréacteurs à agitation par le bas ou sans agitation, et son fonctionnement implique une consommation d'énergie, et par conséquent sur le chiffre d'affaires. Pour cela, il est très demandé de bien le coupler en complément à une introduction de substances anti-mousse de façon à les maintenir à un niveau n'entraînant pas une baisse trop importante de la productivité.

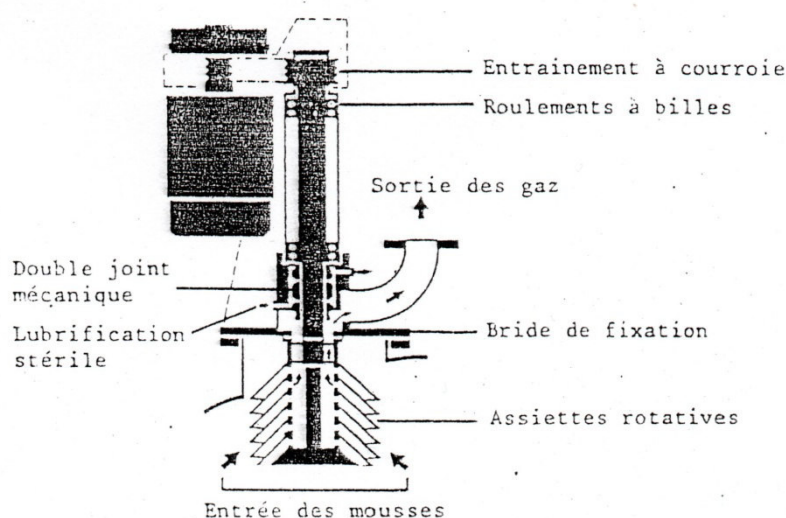


Figure 5 : Coupe de l'appareil brise mousse mécanique de l'entreprise CHEMAP.

II-6 Les capteurs de mesures

La synthèse ou la transformation de substances par un microorganisme se déroule de façon quasi générale dans des conditions proches de l'ambiance fixée au début de lancement de la fermentation, et toute déviation de leur valeur entraîne une chute de taux de croissance, voire même arrêt ou déviation de métabolisme pour certaines espèces microbiennes. La mesure et le contrôle des paramètres qui influencent la croissance de microorganismes ou de cellules animales sont des fonctions essentielles en fermentation, et une précision dans les mesures voisines de quelques pourcent, voire même de quelques milliers est recherchées, car elles définissent l'environnement dans lequel la culture croît avec le temps et conditionnent les rendements et les qualités de produit élaboré.

Une stratégie de contrôle des différents paramètres physique et chimique s'impose plus que nécessaire, et tout au long de processus de production biotechnologique et fermentaire. Le choix de dispositif de mesure et sa précision sont essentiels.

1) Mesure de la température

La température est la grandeur physique qui caractérise de façon objective le gain ou la perte d'énergie du milieu au cours de différentes transformations et réactions qui se déroulent dans ce milieu.

La température est mesurée à l'aide de thermomètre, qui utilise le plus souvent la dilatation d'un corps (alcool ou mercure généralement) placé dans un tube fin (qui amplifie l'effet de

dilatation). L'unité utilisée dans le système international est le degré Celsius ($^{\circ}\text{C}$), mais également l'échelle Fahrenheit est elle aussi utilisée ($0^{\circ}\text{C} = 32^{\circ}\text{F}$ et $100^{\circ}\text{C} = 212^{\circ}\text{F}$).

En fermentation des systèmes de captures électriques sont plus adaptés, dont la mesure est basée sur la production d'une différence de potentiel dépendante de la température comme dans le cas des **thermocouples** ou sur la variation de la résistance d'éléments thermosensibles comme dans le cas des **thermistances**.

a. Thermocouples

Le principe exploité dans les thermocouples revient à SEEBECK en 1821. Ce dernier démontre qu'un courant électrique apparaisse lorsque deux métaux différents sont assemblés, pour former une boucle fermée, dont les deux points d'assemblage sont à des températures différentes, un courant électrique sera alors produit (Figure 6).

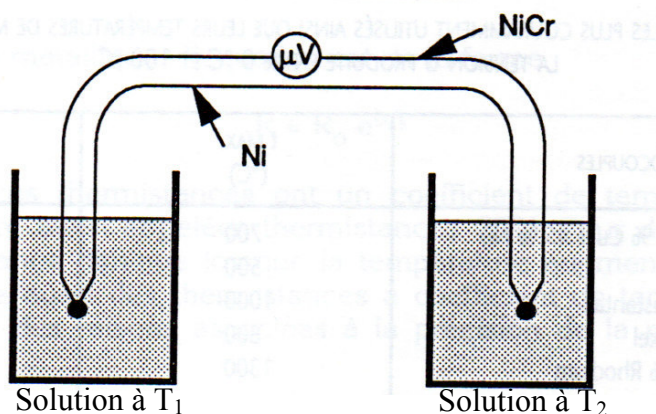


Figure 6: Schéma d'un thermocouple constitué de fils de Nickel et d'alliage Nickel chrome

La force électromotrice produite sera alors mesurée pour chaque différence de températures générées au niveau des soudures intermétalliques dont l'origine est le gradient de température.

Pour mesurer la température dans un fermenteur en utilisant le thermocouple, la soudure chaude est souvent plongée dans le milieu de culture et la soudure froide est maintenue à la température constante (consigne). Un système d'amplificateur électronique assure la mesure avec des précisions de 1/100 degrés.

Les thermocouples les plus couramment utilisés avec leurs températures de mesure maximale et la tension U produite entre 0°C et 100°C , sont indiqués sur le tableau III.

Tableau III : Température de mesure maximale et la tension U produite entre 0°C et 100°C des différents thermocouples utilisés en industries.

Thermocouples	T _{max} (°C)	U (T ₁₀₀ , T ₀) mV
Fer/Constantan (55%Cu +45%Ni)	700	5.268
Cuivre/Constantan	500	4.277
Nickel-Chrome/Constantan	1000	6.317
Nickel-Chrome/Nickel	800	4.095
Platine/Platine-13%Rhodium	1300	0.647

Les avantages des thermocouples sont multiples, à savoir une linéarité de la réponse, avec une sensibilité de précision très élevée (40 à 50 μ Volte/°C quand la soudure a froide est à 0°C), et une durée assez remarquable vu la possibilité d'interchanger les métaux utilisés.

En revanche, les désavantages sont d'ordre mécanique ; les connexions et autres liaisons doivent être réduites autant que possible, car elles peuvent introduisent des forces électromotrices parasites.

b. Thermistances

En électricité, le terme résistance désigne une propriété physique : l'aptitude d'un matériau conducteur à s'opposer au passage d'un courant électrique sous une tension électrique donnée.

Une thermistance est très souvent produite à partir de métaux purs ou d'oxydes métalliques en forme de fil et placés dans le circuit de mesure. Le principe de la mesure utilise la relation qui existe entre la résistance électrique du matériau et la température. Cette relation permet de mesurer la température. On distingue deux types de thermistance (Figure 7) : les CTN et les CTP, mais il existe aussi les CCTPN.

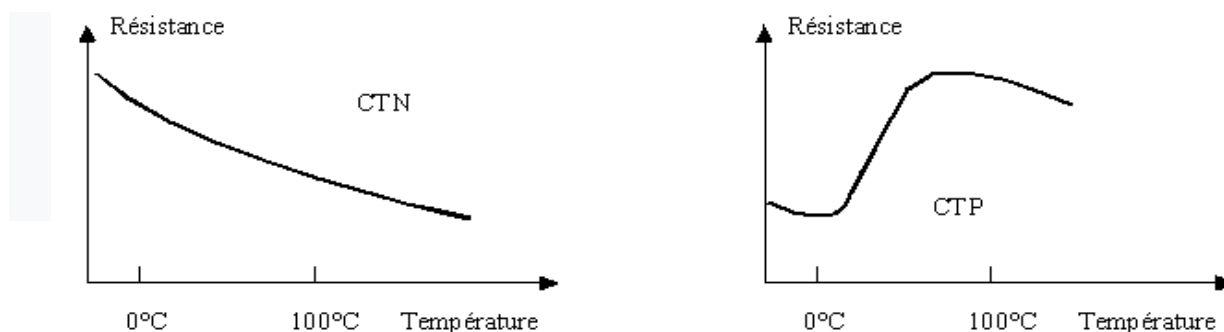


Figure 7 :Variation de la résistance en fonction de la variation de la température, pour les CTN et les CTP.

Les CTN (Coefficient de Température Négative, en anglais NTC, NégativeTempérature Coefficient) sont des thermistances dont la résistance diminue de façon uniforme quand la température augmente et vice-versa.

Lorsque l'effet Joule est négligeable, on peut exprimer une relation entre la résistance de la CTN et sa température par la relation de Steinhart-Hart :

$$\frac{1}{T} = A + B \ln(R_T) + C(\ln(R_T))^3$$

Cette formule, valable à toutes les températures, peut être simplifiée sur une plage limitée de températures. La formule devient :

$$\frac{R_T}{R_0} = \exp\left(\beta \times \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0}\right)\right)$$

Et, pour plus de précision, entre deux températures proches d'une valeur donnée (T_n T) :

$$\frac{R_T}{R_n} = \exp\left(\frac{\alpha_n}{100} \cdot (T_n)^2 \cdot \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_n}\right)\right)$$

Avec :

- R_T : est la résistance (en ohms) du capteur à la température T recherchée (en kelvins);
- T_n : est une température où la résistance R_n est déjà connue ;
- R_0 : est la résistance annoncée à une température de référence T_0 (souvent 25 °C) ;
- A , B et C sont les coefficients de Steinhart–Hart (donnés par le constructeur ou obtenus expérimentalement avec trois mesures de référence) qui sont des constantes caractéristiques du composant valide à toute température;
 - α_n , β (en %/K) et β (en Kelvins) sont des coefficients considérés constants par approximation dont l'usage est limité à certaines températures.

Les CTN sont fabriquées à base d'oxydes de métaux de transition (manganèse, cobalt, cuivre et nickel). Ces oxydes sont semi-conducteurs. Elles peuvent être utilisées dans une large plage de températures, de -200 à + 1 000 °C, et elles sont disponibles en différentes versions : perles de verre, disques, barreaux, pastilles, rondelles, puces, etc. Les résistances nominales vont de quelques ohms(Ω) à une centaine de kilohm($K\Omega$). Le temps de réponse dépend du volume de matériau utilisé.

Les CTN sont utilisées pour les mesures et le contrôle de la température, la limitation d'impulsions transitoires et la mesure de flux de liquides.

Les CTP (Coefficient de Température Positif, en anglais PTC, Positive Température Coefficient) sont des thermistances dont la résistance augmente avec la température. On distingue

les thermo-résistances (augmentation continue et régulière de la résistance avec la température, voir ci-dessus) des CTP dont la valeur augmente fortement avec la température dans une plage de température limitée (typiquement entre 0 °C et 100 °C). Pour ces dernières, il y a deux types principaux :

- CTP fabriquées à base de titanate de baryum. Leur valeur augmente brutalement dans un domaine étroit de température, puis diminue progressivement au-delà de cette zone. Elles sont comme les CTN, disponibles en différentes variantes et valeurs, et sont plutôt utilisées comme capteurs.
- CTP polymère-carbone. Leur valeur augmente aussi brutalement dans un domaine de température étroit, mais sans diminution au-delà. Elles sont principalement utilisées comme fusibles réarmables.

Les CTP peuvent être utilisées comme :

- Détecteur de température, pour protéger des composants (moteurs, transformateurs) contre une élévation excessive de la température ; protection contre des surintensités ;
- Détecteur de niveau de liquide : la température de la CTP et donc sa résistance, sera différente lorsque le capteur est dans l'air ou plongé dans un liquide.

2) Mesure de la pression

C'est généralement la pression de couverture qu'il s'agit de mesurer, c'est-à-dire la pression que l'on maintient dans le bioréacteur, pour améliorer le transfert de gaz (oxygène), et surtout d'éviter les risques d'accidents (explosions). Cette mesure est effectuée le plus souvent en utilisant des manomètres munis d'une membrane très fine en acier inoxydable facilitant son nettoyage et sa stérilisation, tout en permettant au manomètre de détecter les variations de pression les plus fines.

Des capteurs modernes de pression « membranes à jauge de contraintes » composées de fines membranes renfermant des éléments (en général 4) dont la résistance varie avec la déformation. Ce type de capteur se prête bien aux conditions de l'asepsie requise en fermentation.

3) Mesure du niveau utile (volume utile)

La mesure du niveau de remplissage utile dans un fermenteur est très importante pour garantir le bon déroulement de la production fermentaire. Elle intervient lors du remplissage et de la vidange du bioréacteur, mais aussi pour évaluer la formation de mousses. Pour les détecter, on utilise souvent, particulièrement dans le cas de petits fermenteurs, des sondes résistives. Elles

donnent une indication dans tous les endroits, au contact de matière (mousse). Ces sondes génèrent un circuit électrique, permettent ainsi une détermination de la hauteur et le niveau des matières (surtout les mousses) et par conséquent le volume du fermenteur utilisé.

4) Mesure du potentiel hydrogène (pH)

La mesure du pH est couramment pratiquée en fermentation à l'aide de sondes, électrodes combinées en verre, stérilisables, montées dans un dispositif comportant une vanne et une chambre de stérilisation, ce qui facilite, en cas de défaillance, de retirer la sonde tout en isolant le fermenteur, et de la remplacer sans compromettre l'asepsie de la fermentation.

La mesure du pH est indispensable, car le métabolisme microbien modifie plus ou moins rapidement le pH du milieu, alors que chaque microorganisme exige pour sa croissance optimale un pH déterminé. Ainsi, à partir des oses, il y a souvent production d'acides organiques, tandis que l'utilisation du nitrate (de potassium) comme source d'azote conduit à l'alcalinisation du milieu.

La biosynthèse d'une substance particulière se fait également dans une zone de pH bien déterminée. Par exemple, *Clostridiumacétobutylicum* produit de l'acétone et du butanol uniquement en milieu acide, en dehors du pH acide, il produit d'autres substances sans valeur marchande. De même pour la production de pénicilline G, son optimal est au voisinage de l'alcalin.

Pour maintenir le pH, on emploie des agents neutralisants peu coûteux, l'acide chlorhydrique, la lessive de soude, l'ammoniaque. Ce dernier peut, en outre, servir d'aliment azoté aux microorganismes en voie de croissance.

On peut intervenir aussi par l'utilisation de tampons, tels que les phosphates, les carbonates de calcium, mais leur coût élevé en limite l'emploi.

5) Mesure de l'oxygène dissous

C'est un paramètre très important dans tous les processus microbiologiques aérobies. Il permet d'évaluer les capacités de transfert d'oxygène du bioréacteur et de fournir à la culture la quantité d'oxygène dont elle a besoin grâce à une boucle de régulation en modifiant la vitesse de rotation de l'agitateur, le débit et la composition du gaz d'oxygénation. Deux types d'électrodes sont utilisées, toutes munies d'une membrane perméable à l'oxygène :

- Les électrodes polarographiques (ampérométriques) sont constituées d'une anode en platine tandis que la cathode est faite d'un anneau d'argent/oxyde d'argent. L'électrolyte

est un gel de méthyl-cellulose contenant du KCl. Les deux électrodes sont alimentées par une tension continue constante. La réduction de l'oxygène à la cathode modifie l'intensité du courant du circuit ainsi constitué proportionnellement à la quantité présente.

Ce type d'électrode est stérilisable dans le fermenteur ou en autoclave. Leur durée de vie est toutefois relativement faible et il est possible de changer la tête indépendamment du reste de l'électrode.

➤ Les électrodes galvaniques (potentiométrique) n'ont pas besoin d'une mise sous tension pour que la réduction de l'oxygène ait lieu à la cathode. Ce sont des systèmes autoalimentés, la cathode est constituée d'un métal noble tel que l'or, le platine ou l'argent. L'anode est, elle, en zinc, plomb ou cadmium. À la différence des sondes polarographique, l'électrolyte, ne participe pas à la réaction. Par contre, l'anode est peu à peu oxydée et la réduction de l'oxygène à la cathode provoque dans ce cas une modification de la tension entre les deux électrodes, et le signal est amplifié et traité à l'affichage.

II-7 Transfert de l'oxygène

II-7.1 Rôles de l'oxygène en fermentation

L'oxygène joue tout d'abord un rôle essentiel dans le métabolisme aérobie producteur d'énergie, comme accepteur final des électrons et des protons produits par les réactions d'oxydation. Certaines bactéries (*Clostridium* sp.) ne possèdent pas les enzymes nécessaires à l'ensemble de ce métabolisme et en présence d'oxygène produisent de H_2O_2 , que par ailleurs ces bactéries ne sont pas capables de détruire, et qui, du fait de ses propriétés antiseptiques inhibe leur croissance.

Quand elles sont privées d'oxygène pendant plus de 10 jours, les cellules d'*Acétobacter* perdent le pouvoir de se reproduire. Parfois l'apparition de la substance recherchée est liée à la présence ou l'absence d'oxygène. Ainsi une souche de *Serratia marcescens* qui produit de la prodigiosine (pigment rouge) en aérobiose, synthétise de l'asparaginase en anaérobiose.

L'oxygène intervient dans certains mécanismes de régulation du métabolisme de façon directe, comme inducteur ou répresseur de la synthèse d'enzymes respiratoires, mais aussi de façon indirecte du fait de son rôle dans le métabolisme énergétique.

En **fermentation industrielle**, l'oxygène provient principalement de l'air qui traverse le réacteur. À cause de la très faible solubilité de l'oxygène (qui diminue plus quand la température

s'élève), la réserve de ce métabolite est particulièrement faible. Et on peut considérer que le cas d'une croissance rapide, la teneur en oxygène du milieu devient nulle et par conséquent la vitesse et le taux de croissance sera en fonction de la vitesse de dissolution de l'oxygène dans le milieu. Ainsi deux notions fondamentales apparaissent ; *la demande en oxygène de la culture et la capacité de transfert d'oxygène de réacteur.*

II-7.2 Demande en oxygène de la culture

La demande en oxygène de la culture en oxygène (O_2) est une mesure qui détermine, les besoins en consommation d'oxygène de la culture. Elle est exprimée en mmol/L/h ou mol/m³/h. Ce besoin est en fait inégalement réparti dans le temps tout au long du déroulement de la fermentation. Il est défini grâce au coefficient Q_{O_2} qui exprime la quantité d'oxygène consommée en volume, en poids ou en moles, par unité de temps et par unité de biomasse microbienne. Ce coefficient varie d'un microorganisme à un autre, mais également pour un microorganisme donné, en fonction de son âge et de son état physiologique. Il est minimal au cours de la phase de latence, puis augmente progressivement durant la phase de départ pour atteindre sa valeur maximale au début de la phase exponentielle de croissance où il conserve cette valeur maximale tout au long de cette phase, puis décroît progressivement pour redevenir minimal en phase stationnaire.

La demande en oxygène est alors un produit de coefficient (Q_{O_2}) par la concentration cellulaire (X) exprimée par la relation : $OUR = Q_{O_2} \cdot X$.

L'expression OUR (**O**xygen**U**ptake **R**ate) signifie demande en oxygène. Elle augmente rapidement pour atteindre sa valeur maximale en fin de la phase exponentielle puis diminue par la suite (voir figure : évolution de la consommation d'oxygène au cours de la croissance microbienne).

Il faut préciser que cette demande en oxygène doit être satisfaite par le transfert de la phase gazeuse introduite dans la culture vers les sites d'utilisation dans la cellule. Agissant comme substrat, l'oxygène obéit à la loi établie par MONOD, liant le taux de croissance à la concentration, qui est donnée par la relation suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \cdot \left[\frac{O_2}{K_{O_2} + O_2} \right]$$

Avec :

K_{O_2} : la constante d'affinité de la réaction correspondant à la concentration en oxygène pour laquelle le taux de croissance prend la moitié de la valeur maximale.

Cette relation indique que pour une concentration en oxygène inférieure à la concentration critique (C_{crit}), le taux de croissance est inférieur au taux de croissance maximal et proportionnel à la concentration en oxygène.

De cela il résulte que le transfert de la phase gazeuse vers les cellules doit permettre le maintien d'une concentration en oxygène dissous au moins égale à la concentration critique pour que la croissance se déroule dans les meilleures conditions. S'il n'en est pas ainsi, le manque d'oxygène joue le rôle de facteur limitant et la croissance est ralentie. La concentration critique en oxygène variable d'un microorganisme à un autre est faible, de l'ordre de 0,1ppm.

Le tableau IV illustre les besoins et la concentration critique en oxygène à la température optimale de croissance de certains microorganismes utiles.

Tableau IV: Besoin maxima et concentration critique d'oxygène (en mMole/L/h) pour quelques microorganismes.

Micro-organismes	Température de la culture en C°	Concentration critique d'oxygène	Besoins maxima en oxygène
<i>Azotobacter sp.</i>	30	0.018	260
<i>Escherichia coli</i>	37	0.008	5-8
Levures	30	0.004	10-15
<i>Penicillium chrysogenum</i>	24	0.022	20-30
<i>Acétobacter sp.</i>	30		90
<i>Streptomyces griseus</i>	30		15

II-7.3 Modalités du transfert d'oxygène

Le transfert d'oxygène de la phase gazeuse vers les sites de son utilisation dans les cellules comporte plusieurs étapes, qui sont illustrées dans la figure 8.

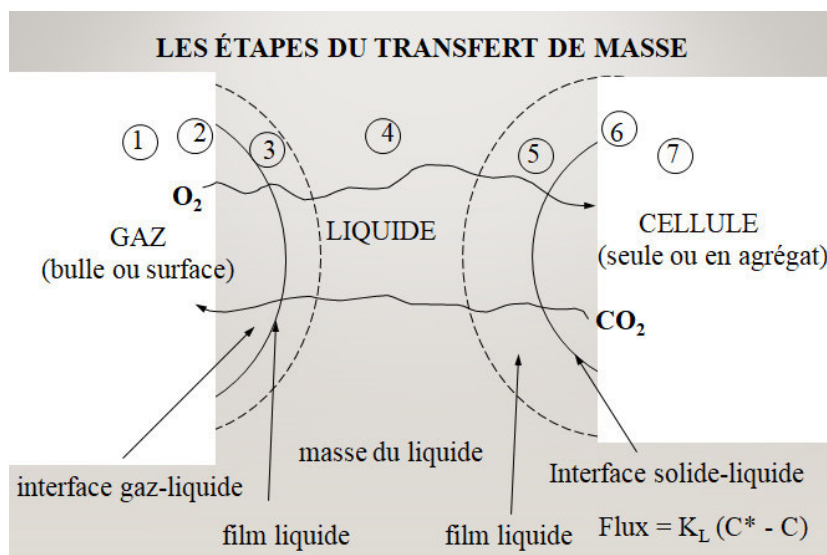


Figure 8 : Modalité de transfert d' O_2 de la phase gazeuse jusqu'à l'intérieur de la cellule.

Ce transfert (unidirectionnel) s'effectue au travers de plusieurs films, chacun d'eux exerçant sur lui une certaine résistance. On considère que l'interface gaz-liquide côté bulle, est doublée d'un film gazeux (étape 1) et du côté liquide, d'un film liquide (étape 2). Ce dernier exerçant une grande influence sur le transfert. L'oxygène dissous diffuse alors vers les cellules (étape 3), au cours desquelles se trouve à nouveau un film liquide (étape 4). L'oxygène doit enfin pénétrer dans la cellule (étape 5). On pourrait figurer alors ce qui se passe dans la cellule, car l'oxygène doit diffuser vers le site où il est effectivement utilisé par le métabolisme.

Chez les microorganismes **eucaryotes** (levures et moisissures), les enzymes respiratoires sont localisées dans la **mitochondrie**. L'oxygène doit donc diffuser dans le **cytoplasme** et traverser la **paroi mitochondriale**. À cela, vient s'ajouter le phénomène de la formation de mycélium qui rend difficile encore le transfert au sein des amas microbiens.

Plusieurs théories permettent d'établir l'équation de transfert, mais la plus répandue est celle du **film laminaire**. À l'intérieur de la bulle de gaz s'établit un gradient de pression partielle d'oxygène due à la présence du film gazeux. La pression partielle d'oxygène à l'interface P_i est en équilibre avec la concentration C_i en oxygène dissous. Au sein du liquide s'établit un **gradient de concentration** en oxygène dissous due au film liquide (voir figure 8). On suppose dans

la formulation du transfert que le profil de concentration est indépendant du temps (régime stationnaire) et que l'équilibre entre P_i et C_i est obtenu instantanément, quand gaz et liquide sont en contact. L'équation de transfert est représentée par la loi de FICK :

$$dC_L/dt = K_G \cdot a (p - p^*) = K_L \cdot a (C^* - C_L)$$

Avec :

dC_L/dt : exprime la vitesse de transfert (mmole $O_2/h/L$) ;

K_G : Le coefficient global de transfert de masse par rapport au film gazeux (m /s) ;

K_L : Le coefficient global de transfert de masse par rapport au film liquide (m /s) ;

a : La surface spécifique d'échange ;

p : La pression d'oxygène partielle dans la phase gazeuse (atm) ;

p^* : La pression d'oxygène partielle en équilibre avec C_L (atm) ;

C^* : La concentration en oxygène dissous (mmoles O_2/L) en équilibre avec p ;

C : La concentration en oxygène dans la phase liquide (mmoles O_2/L).

Il est à préciser que le coefficient (K_L) représente le coefficient de transfert de masse par rapport au film liquide (m /s), est égal au rapport du coefficient de diffusion de l'oxygène (D) dans l'eau à l'épaisseur du film (x) au travers duquel s'effectue le transfert.

On écrit alors : $K_L = D/x$

Il est à préciser également, que la concentration (C^*) représente la concentration en oxygène dissous (mmoles O_2/L) en équilibre avec p . Elle exprime la concentration en oxygène dissous correspondant à la saturation, et elle est proportionnelle à la pression partielle en oxygène dans la bulle selon la loi de Henry :

$$C^* = H_e \times p$$

Avec :

H_e : Représente la constante de Henry (mmole $O_2/L/atm$) ;

P : La pression partielle d'oxygène dans la phase gazeuse (atm).

Il est à noter que, la **constante de Henry** varie avec la température (qui fait varier la solubilité). Elle diminue lorsque la température augmente. À 37°C la concentration en oxygène dissous maximale que l'on peut obtenir avec de l'air comme gaz d'oxygénation est d'environ 7ppm (p dans l'air = 0,209 atm).

Au cours des fermentations, l'équation globale du transfert s'écrit comme :

$$dC_L/dt = K_L \cdot a (C^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X$$

En absence de microorganisme (fermenteur non inoculé), le transfert d'oxygène s'arrête lorsque le milieu est saturé c'est-à-dire $C^* = C_L$. Après l'inoculation, au fur et à mesure que le microorganisme se reproduit, la concentration en O_2 dissous diminue, et le transfert est alors proportionnel à la différence $(C^* - C_L)$ et au produit $(K_L a)$ appelé **coefficient volumétrique de transfert**, exprimé en h^{-1} qui évalue l'efficacité d'un dispositif d'aération (mécanisme agitation) donné.

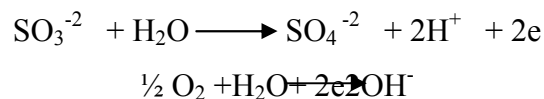
Le transfert d' O_2 maximal est obtenu lorsque $C^* - C_L = C^*$, c'est-à-dire que $(C_L = 0)$, mais par ailleurs, lorsque C_L devient inférieur à la concentration critique, la croissance microbienne est ralentie ce qui impose que C_L doit rester au moins égale à la **concentration critique**. De là, on déduit clairement que le meilleur moyen d'améliorer le transfert est de jouer sur le coefficient volumétrique $(K_L a)$.

II-7.4 Mesure de coefficient volumétrique $(K_L a)$

La mesure de ce coefficient pour un bioréacteur permet d'évaluer ses capacités à transférer l'oxygène. Plusieurs méthodes permettent d'assurer sa mesure entre autres :

- **Méthode au sulfite** : c'est la plus ancienne où l'évaluation de la capacité de transfert du dispositif est ramenée à celle de la vitesse d'oxydation d'une solution de sulfite de sodium ($SO_3^{-2} Na^{+2}$) en sulfate (SO_4^{-2}), placée dans le bioréacteur et soumise aux conditions d'aération, d'agitation dans lesquelles on veut évaluer ce coefficient.

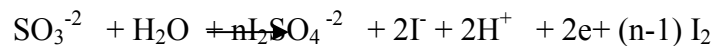
La réaction d'oxydo-réduction est la suivante :



Cette réaction a lieu en présence d'ions de Cu^{++} comme catalyseur.

On peut mettre en œuvre une solution 0,25M de sulfite de sodium. Cette réaction est très rapide et sa vitesse n'étant limitée que par la vitesse de dissolution de l'oxygène (O_2). La vitesse de disparition du sulfite par oxydation permet d'évaluer le coefficient volumétrique $(K_L a)$.

À différents intervalles de temps, on prélève un échantillon de solution en cours d'oxygénation. On dose le sulfite qui n'a pas été oxydé par iodométrie, à l'aide d'iode en excès :



On dose en retour d'iode en excès par la réaction globale :



Tant que la solution étudiée renferme du sulfite, la concentration C_L est nulle. L'évolution de concentration en sulfite en fonction du temps est une droite dont la pente est égale $(K_L a) \times C^*$, dont on déduit $K_L a$.

Cette méthode est relativement facile à mettre en œuvre et présente le grand avantage d'être peu coûteuse. Certaines manipulations telles que les transports d'échantillons doivent être faits à l'abri de l'air pour éviter les réactions parasites. Enfin, cette méthode ne convient pas à l'évaluation du $(K_L a)$ des petits bioréacteurs dont les capacités de transfert sont importantes.

- **Méthode au glucose oxydase**

Le principe de cette méthode consiste à suivre l'oxydation du glucose en acide gluconique en présence de glucose oxydase. Cette réaction nécessite un apport d'oxygène et sa vitesse est égale à la vitesse de dissolution, donc du transfert d'oxygène. Son avantage est de se rapprocher des conditions de culture. En effet, elle peut être conduite dans le milieu de culture qui servira par la suite à la fermentation. Cependant, elle est délicate à mettre en œuvre, car elle suppose un dosage préalable de l'activité de l'enzyme utilisée et elle impose des conditions strictes de pH et de température. À cela s'ajoute le prix coûteux de l'enzyme, ce qui limite son utilisation à la détermination des $(K_L a)$ des gros fermenteurs

- **Méthode microbiologique**

Il est possible d'évaluer le coefficient $(K_L a)$ en mesurant le taux de croissance d'un microorganisme très avide d'oxygène (*Aerobacter aerogenes*) cultivé dans des conditions telles que l'oxygène dissous soit le seul facteur limitant. Le taux de croissance sera alors proportionnel à la concentration en oxygène dissous. Cette méthode est très précise, mais très lente ce qui limite son application.

- **Méthode statique**

Cette méthode est conduite dans le milieu de culture en l'absence des cellules. Elle permet de déterminer la valeur du $(K_L a)$ dans les conditions où se déroulera la fermentation. Après avoir saturé le milieu de culture en oxygène dissous, on arrête l'aération et on injecte de l'azote dans la solution.

La concentration en oxygène dissous diminue et tend vers zéro. On reprend alors l'injection d'air dans les conditions de débit à tester. La concentration (C_L) augmente et la façon dont elle augmente dépend de la capacité de transfert du dispositif dans les conditions (aération – agitation) d'expérience.

On déduit alors le coefficient volumétrique de transfert à partir de la courbe de variation de la concentration (C_L) en fonction du temps. En traçant la courbe de variation $dC_L/dt = f(C^* - C_L)$.

La pente de la droite obtenue représentera le coefficient volumétrique de transfert $(K_L a)$. En procédant à l'intégration de l'équation de transfert : $dC_L/dt = K_L a (C^* - C_L)$

On déduira que : $dC_L / (C^* - C_L) = K_L a dt$

En intégrant entre $(t=0)$ temps de la reprise de l'aération $(C_L=0)$ et $(t= t_f)$

On obtient : $\log[C^*/(C^* - C_L)] = K_L a (t - t_0)$

Il est à préciser qu'on portant les valeurs obtenues par le modèle mathématique : $\log[C^*/(C^* - C_L)] = K_L a (t - t_0)$, on trace la courbe d'évolution de $C_L = f(t)$ est on déterminera aisément le coefficient de transfert volumétrique $(K_L a)$.

- **Méthode dynamique**

Cette méthode permet de mesurer la valeur de coefficient volumétrique de transfert pendant le déroulement de la fermentation. Elle est, de ce fait, très employée. Cette méthode consiste au départ de réaliser l'équilibre entre le transfert et la consommation par les microorganismes. La concentration en oxygène dissous de la culture reste alors constante (dC_L/dt) est obéit à la loi : $dC_L/dt = K_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X$ ce qui entraîne $K_L a (C^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X = 0$

Ce qui donnera : $C_L = C^* [Q_{O_2} \cdot X / K_L a]$

Dans la seconde phase, on arrête l'aération. La consommation d'oxygène n'est plus compensée, et par suite la concentration en oxygène dissous (C_L) diminue du fait de la croissance microbienne qui se poursuivra. La consommation de l'oxygène est constante pendant cette phase et (C_L) diminue linéairement en fonction du temps. La pente de la droite est égale à $Q_{O_2} \cdot X$ c'est-à-dire que : $dC_L/dt = -Q_{O_2} \cdot X$

Enfin, au cours de la troisième phase, on reprend l'aération dans les conditions de la première phase et le transfert d'oxygène provoque une remontée de la concentration en oxygène dissous selon l'équation globale de FICK :

$$dC_L/dt = K_L \cdot a (C^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X$$

À partir de la courbe de variation de $C_L = f(t)$, on peut déduire la valeur de coefficient volumétrique.

En traçant la droite de variation de $dC_L/dt = f(C^* - C_L)$, on obtiendra :

Avec l'axe des ordonnées au point d'interaction : $dC_L/dt = Q_{O_2} \cdot X$

Et avec l'axe des abscisses : $C^* - C_L = [Q_{O_2} \cdot X / K_L \cdot a]$

Ainsi, on calcule facilement la valeur de coefficient volumétrique dans les conditions opératoires pour n'importe quelle culture selon le mode utilisé.

Il est à noter qu'il existe d'autres méthodes pour l'évaluation de coefficient volumétrique, qui repose sur l'oxydation de substrat constituant un milieu de culture ou en calculant le bilan de gaz existant.

Les valeurs de (K_L) et (a) dépendent des conditions hydrodynamiques, le $(K_L a)$ est donc, en grande partie, fonction de l'agitation. On cherchera à augmenter ce coefficient, c'est-à-dire à accroître la turbulence pour diminuer la couche limite et la surface d'échange. Il est généralement admis que le $(K_L a)$ dépend de la puissance dissipée dans le milieu et du type de mobile utilisé, pour assurer à la fois une forte turbulence liée à l'énergie dissipée dans le milieu et une dispersion convenable du gaz, sous forme de bulles les plus fines possible. Le $K_L a$ dépend également de la vitesse moyenne du gaz ramené à la section droite du fermenteur supposé vide (U_g) dans le réacteur, soit :

$$K_L \cdot a = k (P/V)^{\delta} (U_g)^b$$

k : Coefficient qui dépend du système utilisé,

P/V : Puissance volumique dissipée dans le milieu par l'agitateur (kilowatt /unité de volume),

U_g : Vitesse spécifique du gaz, rapport du débit de gaz et de la section de la cuve (m/s),

a, b : Variables dépendent du milieu (coalescent ou non) et de l'agitateur ; en milieu coalescent : $a = 0,5 \text{ à } 0,7$; $b = 0,2 \text{ à } 0,5$

II-8 Agitation dans les fermenteurs

L'agitation est l'opération qui crée ou accélère le contact entre deux ou plusieurs phases. En fermentation, le milieu de culture, qui est composé le plus souvent de plusieurs constituants en

suspension, ou même par des composants non miscibles dans la phase solvant, l'agitation assure leurs dispersions convenables et de ce fait améliore la productivité.

À ce rôle, s'ajoute celui d'améliorer l'incorporation de la phase gazeuse (O_2) tout au long du milieu de culture. Enfin, l'agitation doit favoriser la turbulence ce qui facilite les échanges thermiques entre les différentes phases du milieu et encore avec le milieu externe.

II-8.1 Différents types d'agitation

Généralement, l'agitation est provoquée par une pièce (mobile d'agitation) entraînée dans un mouvement de rotation par un arbre, qui est lui-même relié à une source d'énergie mécanique. Il a pour fonction de mettre en mouvement un fluide constitué de plusieurs phases placé dans un récipient. Ce système est une hydro machine, dont la puissance d'agitation est liée à la puissance de dispersion par l'expression générale : $P = Q \cdot H \cdot g \cdot \rho$

P : exprime la puissance d'agitation

Q : représente le débit du mobile d'agitation en m^3/h

H : correspond à la hauteur manométrique.

g : accélération pesanteur.

Rho : masse volumique du fluide.

Il est à préciser que le débit Q du mobile s'exprime par le produit de sa section par la vitesse de passage du fluide dans la pièce d'agitation, et on écrit : $Q = s \cdot v$

La section (ou la surface) est proportionnelle au produit du diamètre (d) du mobile, alors que la vitesse est proportionnelle au produit du diamètre et de la fréquence de rotation (nombre de tours/ unité de temps).

Et l'équation du débit devient alors : $Q = k_p \cdot d^2 \cdot d \cdot N = k_p \cdot d^3 \cdot N$

k_p : constante de nombre de pompages du mobile qui est donné par le constructeur (exemple : représente nombre de pale ou nombre des ailles de l'hélice).

De l'équation, on peut déduire que la hauteur d'agitation $H = P / Q \cdot g \cdot \rho = P / k_p \cdot d^3 \cdot N \cdot g \cdot \rho$

Cette équation permet de comparer entre les différents types de mobiles d'agitation (**Figure 9**).

En effet, pour la même puissance de dispersion dans un fluide donnée (masse volumique et accélération pesanteur constants), la hauteur manométrique varie, et on rapporte l'action du mobile par le coefficient **Q/H**.

- Lorsque ce coefficient est faible, on dit que le mobile entraîne un débit radial, générateur d'action de turbulence et de cisaillement et le fluide subit alors des forces horizontales. **Exemple** : turbine RUSHTON, turbine à pales incurvées.

- Lorsque ce coefficient est élevé, on dit que le mobile entraîne un débit axial induisant des actions de pompage, et le fluide subit des forces de répulsions de haut vers le bas au-dessous du mobile, et de bas vers le haut au-dessus de mobile. **Exemple** : hélice marine, hélice double flux, et hélice a grandes pales minces.

II-8.2 Principaux mobiles d'agitation

Les principaux mobiles d'agitation peuvent être soit des turbines, pales ou des hélices, comme illustrés dans la figure suivante :

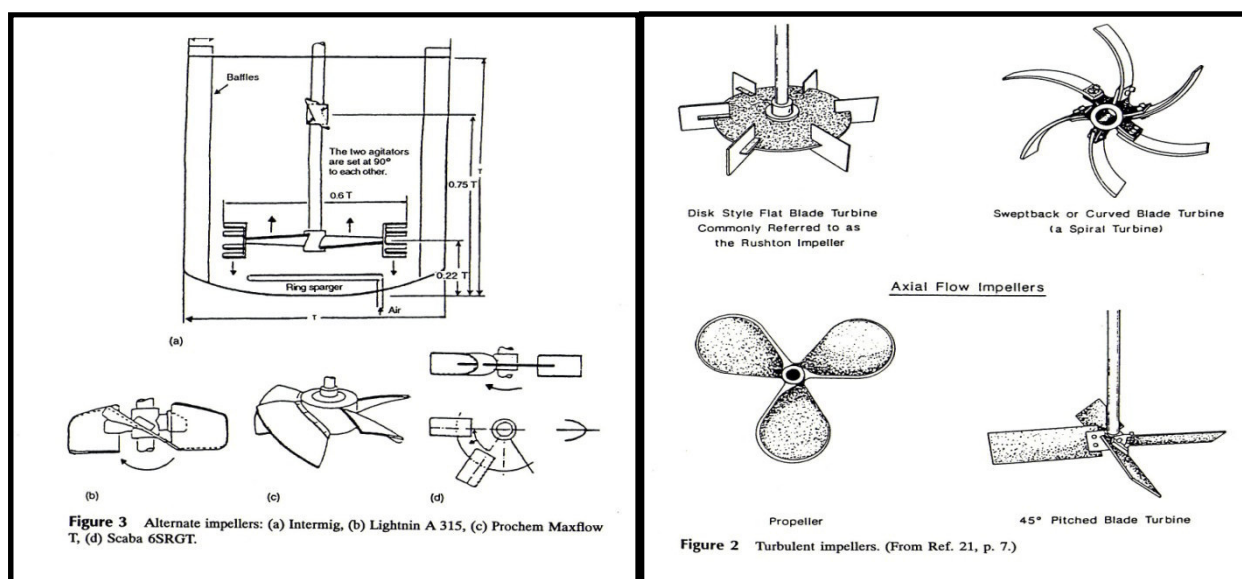


Figure 9 : Différents mobiles d'agitation utilisés dans un fermenteur

Le mobile d'agitation le plus employé en fermentation est la turbine à pales droites et étroites ou encore appelée : turbine RUSHTON, comportant 4, 6 ou même 8 pales montées perpendiculairement sur un disque. C'est un mobile à débit radial, adapté à l'agitation des fluides peu visqueux. L'action de cisaillement de ce type de turbine facilite le transfert d'oxygène. Lorsque la viscosité du fluide à agiter augmente, ce qui est le cas de certaines fermentations (polysaccharides), on utilise d'autres agitateurs à débit radial tel que l'agitateur à pales larges (Paddle) ou l'agitateur à ancre. Pour les fluides visqueux, les hélices à grandes pales minces (sabre) sont intéressantes, du fait de leur débit qui peut être très important. On peut utiliser également dans ce cas les agitateurs à ruban hélicoïdal.

En fermentation, on a souvent besoin des deux actions, de pompage et de cisaillement. C'est pourquoi on peut monter sur le même arbre un mobile à débit radial (turbine RUSHTON) porté sur l'axe d'un mobile à débit axial (hélice à grandes pales minces). La turbine à pales

inclinaison dont le rapport Q/H est intermédiaire est à la fois génératrice d'action de pompage et d'action de cisaillement.

II-8.3 Calcul de la puissance consommée par un agitateur rotatif

Afin de pouvoir calculer la puissance nécessaire à l'agitation, les caractéristiques géométriques de la cuve et de l'agitateur doivent être définies.

Lorsque l'arbre d'agitation ne comporte qu'un seul mobile d'agitation, le calcul de la puissance nécessaire à l'agitation peut être fait à l'aide de l'analyse dimensionnelle, en appliquant le théorème de Waschy et lorsqu'il existe une relation entre n variables dépendant de p unités indépendantes, elle peut être mise sous forme d'une relation $n-p$ nombres sans dimensions constituantes avec variables.

Les variables caractérisant le fonctionnement de l'hydro machine sont les suivantes :

- **Variable caractérisant la géométrie**, qui sont : Le diamètre du bioréacteur (D), le diamètre de l'agitateur (d), la hauteur du liquide (H), la largeur de la contre pale (h), la largeur des pales de la turbine (l) et la hauteur de mobile (w).
- **Variables caractérisant un fluide**, qui sont : La masse volumique (ρ), la tension superficielle (σ) et la viscosité (η).
- **Variable caractérisant le fonctionnement de dispositif (variables cinématiques)**, qui sont : La puissance absorbée par l'agitateur (P), la vitesse de rotation du mobile (N) et l'accélération pesanteur (g).

L'agitation dépend des trois paramètres suivants :

- 1) Le nombre de Reynolds, qui exprime le rapport des forces d'inertie aux forces de viscosité : $Re = (\rho \cdot N \cdot d^2) / \eta$
- 2) Le nombre de Newton : $N_p = P / (\rho \cdot N^3 \cdot d^5)$
- 3) Le nombre de Froude qui exprime le rapport des forces d'inertie aux forces de gravité, caractérisant les phénomènes de vortex (vibration) : $Fr = d \cdot N^2 / g$.

Il est à noter que, l'étude expérimentale, a permis d'établir une relation entre ces trois paramètres, qui donne la relation suivante : $P = C_1 \cdot d^3 \cdot N^2$.

La valeur de C_1 est fonction du type de mobile d'agitation. Dans le cas d'une turbine RUSHTON à 6 pales droites, avec $D/d=3$ et $d/w=5$, C_1 aura la valeur de 71.

II-9 Mode de fonctionnement des bioréacteurs

Pour une souche bactérienne donnée dont on connaît le comportement cinétique et les valeurs des paramètres pour l'optimiser, la productivité du procédé de mise en œuvre est étroitement liée au mode de conduite du bioréacteur utilisé. Les modes de conduite des fermenteurs sont :

1) Fermentation en discontinue (Batch)

Ce mode consiste à effectuer une fermentation discontinue, utilisé le plus souvent lorsque les volumes sont faibles. Après avoir stérilisé le fermenteur vide et l'avoir rempli du milieu stérile (on peut remplir le fermenteur vide avec le milieu de culture ensuite les stériliser), on ensemence le milieu et on laisse se dérouler la fermentation. Durant tout le temps de la fermentation, on n'effectuera ni des ajouts (milieu de culture : substrat, biomasse) ni des soutirages, sauf des anti-mousses ou des neutralisants de pH.

La concentration en biomasse présente augmentera selon la courbe de croissance microbienne propre à l'espèce, de même pour la consommation du substrat et la production du produit. On peut dire que le volume de la suspension restera constant, à condition d'une bonne homogénéisation et sans mousse.

❖ Bilan sur la biomasse

L'évolution de la quantité en biomasse dans la cuve de fermentation est donnée :

$$V dX = V r_X dt - V r_d dt$$

Avec :

V : volume de la cuve de fermentation ;

r_X : vitesse de croissance ;

r_d : vitesse de destruction (souvent négligeable au cours de la phase de croissance).

Alors l'équation devient :

$$dX = r_X dt$$

❖ Bilan sur le produit

Par le même raisonnement, on peut écrire : $V dP = V r_P dt - V r_C dt$ Avec :

V : volume de la cuve de fermentation ;

r_P : vitesse de production ;

r_C : vitesse de consommation du produit (souvent nulle) .

Alors l'équation devient : $dP = r_P dt$

Remarque : Si on pose t_s (temps de séjour) compris entre t_0 (ensemencement par X_0) et t_f (arrêt de la fermentation) on peut écrire :

$$t_s = \int (dx/r) \quad \text{out}_s = \int (dP/r)$$

Si on ajoute au temps de séjour le temps nécessaire pour la préparation du fermenteur (vidange, nettoyage, remplissage et stérilisation), on peut calculer le temps nécessaire pour une production et ainsi d'évaluer la productivité de ce procédé, qui est en pratique relativement faible, ce qui peut être expliqué par :

- La durée de la phase de latence par rapport aux autres phases de la croissance (la phase de croissance exponentielle et stationnaire); qui est due à la dilution importante de la charge bactérienne initiale ;
- Épuisement rapide du substrat ;
- Inhibition de la croissance par l'accumulation des sous-produits de la fermentation (exemple l'éthanol et acide lactique).

Même si ce procédé donne un rendement de production faible par rapport aux autres modes de production, mais il reste le seul mode qui donne la qualité recherchée, par la bonne maîtrise de la cinétique bactérienne et l'aseptisée retrouvée au cours de la production.

2) Fermentation en semi-continue (Fed-Batch)

Pour pallier au problème rencontré au batch, la fermentation commence comme en discontinu, mais avec un volume de milieu de culture plus faible qui est appelée **le pied de la cuve**, et avec la même charge bactérienne initiale X_0 ce qui permettra d'avoir un facteur de dilution plus faible.

La fermentation démarre plus vite et lorsque le microorganisme atteint la phase de croissance exponentielle, la concentration en substrat (**S**) tend vers zéro, on introduit le milieu de culture stérile avec un débit d'alimentation réglé de façon à ce que la concentration en substrat soit constante et correspond à la concentration critique de croissance maximum (Afin d'éviter l'inhibition de la croissance par manque ou excès de substrat ; l'équation de Monod). Le bilan de la biomasse est donné par la relation suivante :

$$V (dX/dt) = X (dV/dt)$$

C'est-à-dire que la variation de la biomasse dans le volume (V) est égale à l'augmentation de volume qui provoque un effet de dilution sur X .

Puisque les ajouts se font en phase exponentielle de croissance alors la relation peut être écrite comme

$$V \cdot \mu_{\max} \cdot X = X \left(\frac{dV}{dt} \right)$$

Et aussi :

$$\mu_{\max} \cdot dt = \left(\frac{dV}{V} \right)$$

Ce qui donne la loi de variation des volumes en fonction de la cinétique de croissance (fermentation). Il est à préciser que, lorsque la cuve est remplie, on coupe l'alimentation et la fermentation évolue conformément à la cinétique de croissance bactérienne en batch (suit la phase stationnaire jusqu'à l'épuisement du substrat puis la phase déclin). Ce mode de conduite est très utilisé en pratique, vu les avantages suivants :

- La concentration en substrat peut être augmentée, à condition de respecter la concentration en substrat critique ;
- Il permet de gagner du temps et d'améliorer la productivité de la cuve de fermentation ;
- L'effet de dilution est moindre, ce qui permet le maintien de la production cellulaire à des niveaux qui ne peuvent pas être atteints en batch et par conséquent une meilleure production en produit.

Comme les autres procédés en discontinu, le Fed batch présente l'inconvénient de la difficulté observer pour maintenir l'innocuité de la production comparé au système en batch ce qui provoque l'abaissement de la qualité et même les rendements. En plus de l'inconvénient cité, ce système présente surtout deux autres à savoir :

- Le volume utile de la cuve de fermentation qui limite le taux de production ;
- L'accumulation des métabolites libérés au cours de la croissance cellulaire qui exerce souvent un effet inhibiteur ou même d'orienter le métabolisme de la souche vers une production désagréable.

De cela, on peut dire, pour appliquer ce type de démarche, il faut toutefois tenir compte notamment de la matière première utilisée et des métabolites secrétés.

3) Fermentation en continu

Elle est utilisée afin de répondre au problème rencontré dans les deux modes précédents :

- Diminution de la productivité, due au temps de production élevée, et l'inhibition de la croissance par les concentrations élevées des sous-produits de métabolisme ;
- Le volume de la cuve qui limite la continuité dans le temps de la production.

Les constructeurs ont pensé à un troisième mode qui est le travail en continu, qui consiste à l'utilisation d'une fermentation en batch, mais en effectuant des apports et des soutirages programmés avec un débit constant ce qui permettra non seulement l'utilisation du tout le volume utile de la cuve de fermentation et aussi le renouvellement progressif du milieu de culture(substrat et biomasse) et l'évacuation progressive de la production désirée(produit et biomasse), ainsi les produits indésirables du métabolisme, ce qui assura la continuité de la production pour une durée plus importante(peut dépasser les 6mois).

La productivité de la cuve de fermentation sera plus importante où la réduction de temps impliquer pour les opérations de nettoyage, vidange, remplissage et stérilisation.

Pour assurer le fonctionnement en continu,on doit tenir compte de trois principes suivants :

- Le débit d'entrée ($F_e=dV/dt$) doit être égal au débit de sortie (F_s) c'est-à-dire : $F_e= F_s$.
- La vitesse de consommation de substrat doit être liée directement à sa consommation (elle dépendra que de la concentration du substrat S).
- Les bilans de matière doivent suivre la règle suivante :

$$\text{Accumulation (variation)} = \text{entrée} - \text{sortie} + \text{apparition} - \text{disparition}$$

4) Le chémostat (fermenteur continu infiniment mélangé)

Dans ce cas,la suspension microbienne en fermentation est homogène en tout point de la cuve, chose qui est assurée par le système d'agitation le plus adapté (Figure 10).

Ce mode de fonctionnement ne se conçoit pas sans une phase de croissance discontinue préalable à l'alimentation et au soutirage en continu. Il faut donc commencer par ensemercer la cuve renfermant un volume V de milieu qui reste constant.L'alimentation et le soutirage aux mêmes débits commencent quand une certaine concentration cellulaire est atteinte dans la cuve, ce qui lui correspond une concentration S en substrat et P en produit formé. À ces concentrations correspondent des vitesses respectivement de croissance cellulaire (R_x) de dégradation de substrat (R_s) et d'apparition de métabolite (R_p).

❖ Bilan sur la biomasse

Le chémostat est un système continu infiniment mélangé c'est-à-dire qu'en tout point du fermenteur la variation de la biomasse, substrat et produit est toujours constante. On peut le traduire par l'équation de variation :

$$\frac{dx}{dt} = \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = 0$$

La variation de biomasse au cours de la fermentation suit l'équation fondamentale :

$$\text{Accumulation (variation)} = \text{entrée} - \text{sortie} + \text{apparition} - \text{disparition}$$

Cette équation s'écrit : $(dx/dt) \times V = Q X_0 - Q X + R_x \cdot V$

En divisant cette équation sur V, On obtient alors :

$$dx/dt = (Q/V) (X_0 - X) + R_x$$

Et puisque (X_0) est très négligeable devant (X) , alors on aura :

$$dx/dt = (Q/V) (- X) + R_x \dots \dots \dots \text{(I)}$$

Et dans le chémostat $\frac{dx}{dt} = \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = 0$, alors l'équation (I) devient :

$$R_x = (Q/V) (X) \dots \dots \dots \text{(II)}$$

D'après l'équation (II), la condition d'équilibre soit atteinte lorsque : $R_x/X = Q/V$

Il est à noter que :

- R_x/X : représente le taux de croissance cellulaire (μ), sa valeur est variable au cours des phases de croissance, et atteint une valeur maximale pendant la phase exponentielle, mais qui n'est pas constante.
- Q/V : représente le taux de dilution D (facteur de dilution), est égale l'inverse du temps de séjours t_c), on écrit le plus souvent : $D = 1/t_c = Q/V$ Avec Q débit d'alimentation, et volume de fermenteur.

D'après cette équation, les conditions pour obtenir un état d'équilibre sont que la vitesse de croissance microbienne ne se soit pas nulle et que le taux de dilution soit égal à la vitesse spécifique de croissance (μ), c'est-à-dire que les paramètres de contrôle de fonctionnement de chemostat sont la vitesse de croissance qui doit être différente de zéro, et le taux de dilution égale au taux de croissance. La représentation graphique de la variation de la vitesse et taux de

croissance au cours de temps de fermentation, nous renseigne sur la possibilité de plusieurs points, lequel on doit choisir ?

On peut opérer avec : $\mu_{\max}/2 < D < \mu_{\max}$

Car avec :

- $D = \mu_{\max}$ on aura plusieurs points sur le graphe qui correspond à des vitesses de croissances de ralentissement.
- $D > \mu_{\max}$, ce point n'existe pas et on aura le phénomène de **lessivage**
- $D < \mu_{\max}/2$, ce point correspond à des vitesses de croissances faibles, ce qui entrainera un mauvais fonctionnement de bioréacteur (faible rendement et de productivité).

❖ Choix des paramètres de fonctionnement (paramètres critiques)

La condition essentielle est que le taux de dilution ne soit pas supérieur au taux de croissance maximal. On doit évidemment tenir compte de la constante de K_s dans l'évaluation de μ_{\max} selon sa valeur par rapport à la concentration du substrat dans le milieu de culture. En effet, le chemostat ne puisse pas être utilisé seul pour effectuer la fermentation complète d'un substrat, car sa disparition totale correspond à la phase stationnaire de la courbe de croissance microbienne au cours de laquelle la vitesse de croissance est nulle. Pour une utilisation optimale, les paramètres critiques (X, S, P) doivent être calculés à l'avance.

La concentration en substrat critique doit être calculée à partir de la loi de MONOD.

Cette equation donnera: $\mu = \mu_{\max} S / K_s + S \quad \Leftrightarrow \quad D = \mu_{\max} S / K_s + S$

L'équation donnera la concentration en substrat critique : $S = (D / \mu_{\max} - D)$

La concentration en biomasse critique doit être calculée à partir du rendement $R_{x/s}$.

Le chémostate est enfin un moyen intéressant pour caractériser une population microbienne dans un état physiologique donné, soit sur le plan biochimique et métabolique, soit sur le plan génétique. En effet, à l'équilibre toutes les cellules sont dans le même état physiologique correspondant à un point de la courbe de croissance. Les cellules peuvent être récupérées et soumises à une analyse fine, par exemple des enzymes présentes quantitativement et qualitativement.

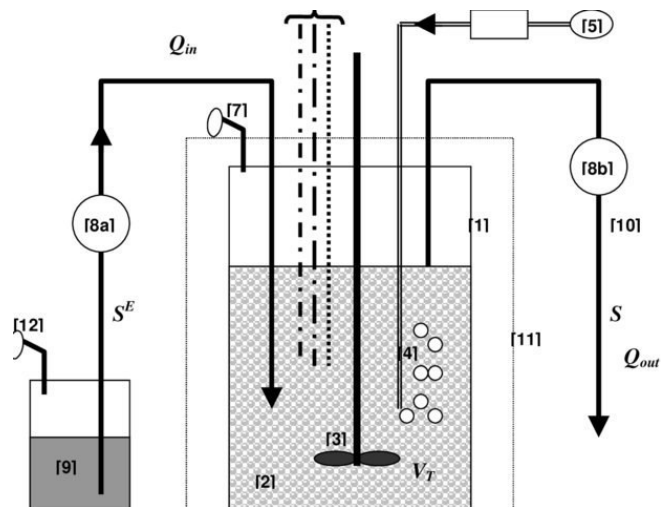


Figure 10: Schéma simplifié d'un Chémostat.

[1] Enceinte du bioréacteur [2] Milieu de culture et cellules [3] Agitateur [4] Diffuseur de gaz (air, oxygène, azote...) [5] Suppresseur [6] Capteurs divers (t° , pH, O_2 , ...) [7] Sortie stérile des gaz ou appareils de mesure (CO_2 , ...) [8a,b] Pompe et débitmètre volumétrique [9] Milieu de culture stérile [10] Sortie du milieu d'excès [11] Enceinte thermostatée [12] Bouchon poreux stérilisant [13] Débitmètre à gaz et humidificateur.

Avec :

- Q_{in} et Q_{out} : sont respectivement les flux volumiques d'entrée et de sortie ;
- V_T : est le volume utile total ;
- S_0 et S : sont les concentrations en substrat limitant à l'entrée et à la sortie du Chémostat.

Chapitre III : Production fermentaire des levures

En Egypte, aux temps des premiers pharaons, fut découvert par hasard un important phénomène : une pâte de farine laissée reposer pendant un peu de temps, augmentait de volume devenant plus souple, légère et alvéolée. Après la cuisson le goût et l'arôme étaient beaucoup plus agréables. Ce phénomène, le levage, mystérieux pour ces temps-là, a été utilisé pour la production du pain et, pendant des millénaires les hommes ont utilisé une petite portion de pâte pour produire le levage dans les pâtes successives.

Seulement dans la moitié du 19^{ème} siècle, l'invention du microscope a permis à Pasteur de démontrer que ce phénomène était provoqué par la levure, un organisme microscopique capable de transformer le sucre en anhydride carbonique et alcool.

Pasteur a découvert que la levure était aussi bien responsable de la fermentation du vin et de la bière, d'où le terme levure de bière que nous utilisons encore aujourd'hui. Au début du 20^{ème} siècle les biologistes ont découvert que la levure se multiplie rapidement à l'air libre, sans produire d'alcool.

Utilisant ces connaissances, les techniciens ont créé l'industrie moderne de la levure, en sélectionnant et en produisant des souches pures aptes aux nécessités spécifiques de l'industrie de la panification et de vinification.

III.1 Présentation de la levure

Le terme courant de levure désigne généralement l'espèce *Saccharomyces cerevisiae* qui est la levure de bière ou de boulangerie. C'est un microorganisme unicellulaire et eucaryote appartenant au Règne **Fungi** division **ascomycète** et à la famille des **champignons**.

Elle possède une paroi cellulaire entourant la membrane plasmique composée de glycoprotéines et servant à protéger la levure des agressions physico-chimiques du milieu extérieur, une membrane cytoplasmique composée principalement d'une double couche phospholipidique et de nombreux complexes protéiques intrinsèques et extrinsèques. La cellule renferme un noyau contenant l'information génétique du génome chromosomique de la levure, et des mitochondries qui jouent un rôle important dans la respiration aérobie de la levure et la production d'ATP.

La levure *Saccharomyces cerevisiae* a un cycle biologique particulier. Elle est capable de se multiplier sous deux formes (**Figure 11**) ; une forme diploïde ($2n = 32$ chromosomes) et une forme haploïde ($1n = 16$ chromosomes). Les cellules haploïdes se multiplient en bourgeonnant donnant naissance à des cellules filles plus petites, mais possédant la même information génétique.

Il existe des cellules haploïdes « a » et des cellules haploïdes « α » qui correspondent à des signes sexuels distincts. Ces deux types de cellules ne se distinguent pas morphologiquement, mais par la phéromone qu'elles produisent. C'est la fusion entre une cellule « a » et « α » qui donne naissance à une cellule diploïde « a/α ». Tant que l'environnement est favorable, le diploïde se multiplie par bourgeonnement. Si les nutriments viennent à manquer, la cellule repasse en phase haploïde par un processus de méiose. On obtient finalement quatre noyaux haploïdes qui sont inclus dans des spores (ascospores) contenues dans un sac appelé asque. L'enveloppe de l'asque se rompt à maturité et libère alors deux cellules « a » et deux cellules « α » qui peuvent recommencer le cycle.

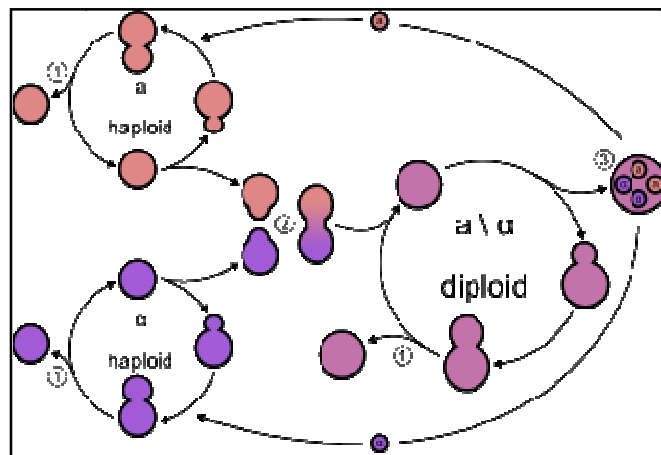


Figure 11: Cycle de vie de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Pour se développer *Saccharomyces cerevisiae* a besoin de composés azotés, composés carbonés, d'éléments minéraux variés, de vitamines et de certains facteurs de croissance. Les deux principaux processus énergétiques sont la respiration et/ou la fermentation

- **Respiration aérobie**

Cette voie métabolique est très énergétique et permet aux cellules de subir une multiplication avec un rendement cellulaire élevé. Elle se déroule selon la réaction suivante :



➤ Fermentation alcoolique

En plus du métabolisme oxydatif, certaines levures peuvent privilégier une dégradation des glucides par un métabolisme fermentatif qui conduit à la formation d'éthanol et de CO₂. Elle se déroule selon la réaction suivante :



III-2 Objectifs de la production de la levure boulangère

La conduite de la multiplication des cellules de levure revêt une importance capitale dans la réalisation d'un double objectif. Le premier est d'ordre qualitatif : pour une souche déterminée, elle doit répondre à des critères multiples qui sont :

- La meilleure force fermentative et sa stabilité,
- La nature du produit fini (un produit adapté au client : souches adaptées à la panification ou à la vinification, levure pressée, levure sèche, etc.).

Le second est d'ordre économique, dont le fabricant doit obtenir la qualité recherchée au meilleur coût. Le monde a produit 2,5 millions de tonnes de levure boulangère en 2000. Il est estimé que ce taux croît en moyenne de 0,2% chaque année. Le principal producteur de levure de boulangerie est le groupe « Le saffre » (France), viennent ensuite :

- Mauri (groupe Burns Philp - Australie).
- GistBrocades (Hollande, groupe DSM).
- Pakmaya (Turquie).
- Lallemand (Canada).

III-3 Conditions industrielles de production

Quels que soient le procédé, la souche utilisée et le produit recherché, quatre points sont à prendre en considération lors d'une production par voie microbiologique ; le milieu de culture, l'inoculum, le bioréacteur, la séparation et la purification.

III-3.1 Milieu de culture

Les milieux de culture utilisés doivent répondre aux exigences nutritionnelles imposées par la croissance et la multiplication des cellules de levure. Si la levure est produite sur un milieu

synthétique à base de glucose comme source de carbone et de sels d'ammonium et de phosphore comme sources d'azote et de phosphate, le milieu de culture devra être complété par les éléments donnés dans le tableau V.

Tableau V: Besoins nutritifs pour la croissance de la levure, pour un kilogramme de glucose dans le milieu

Matière première	Quantité	Matière première	Quantité
Sels minéraux (g)		Vitamines (mg)	
K ₂ SO ₄	24	B1	25
MgSO ₄ , 7H ₂ O	12	B2	1,25
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1,6	B5	95
		B6	12
Oligoéléments (mg)		Biotine	0,5
Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ , 6H ₂ O	1 025	Acide <i>p</i> -aminobenzoïque	5,8
ZnSO ₄ , 7 H ₂ O	192	Acide nicotinique	40
CuSO ₄ , 7H ₂ O	30	Acide nicotinamide	40
MnSO ₄ , H ₂ O	17		
H ₃ BO ₃	23	Inositol	1 440
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	23	Ribitol	43
KI	11		

Ce milieu est complexe et onéreux, c'est pourquoi les mélasses de sucrerie de betterave ou de canne sont des substrats de choix sur les plans économique et technique et sont, à ce jour, la principale matière première utilisée en levurerie. Leur composition est variable et dépend des procédés sucriers dont elles sont issues ainsi que de la qualité des récoltes. Le tableau II illustre la composition de la mélasse de betterave et de canne.

Tableau VI :Composition des types des mélasses (en % des matières sèches totales)

Matière première	Mélasse de betterave	Mélasse de canne
Sucres totaux	66,5	73,1
Saccharose	63,5	45,5
Raffinose	1,5	0
Sucre inverti	0	22,1
Autres	1,5	5,5
Composés organiques totaux	23,0	15,2
Acide glutamique + acide pyrrolidine carboxylique	4,0	2,4
Aminoacides	3,0	0
Bétaïne	5,5	0
Autres formes d'azote	0	3,1
Acides organiques	5,5	7,0
Pectines, etc.	5	2,7
Composés minéraux totaux	10,5	11,7
K ₂ O	6,0	5,3
Na ₂ O	1,0	0,1
CaO	0,2	0,2
MgO	0,2	1,0
Al ₂ O ₃ ; Fe ₂ O ₃	0,1	0
SiO ₂	0,1	0
Cl	1,7	1,1
SO ₂ + SO ₃	0,5	2,3
P ₂ O ₅	0,1	0,8
N ₂ O ₅	0,4	0
Autres	0,2	0,9

La levure a besoin de **biotine** (vitamine H) pour sa croissance. Les mélasses de canne en sont riches (0,5 à 0,8 ppm). Dans le cas de fermentations sur mélasses de betterave, cette vitamine doit être ajoutée à raison de 60 à 100 μg pour 100 g de matière sèche de levure produite. Les autres vitamines sont habituellement présentes en quantité suffisante dans les mélasses. Les vitamines B1 et B6 sont quelquefois ajoutées pour améliorer l'activité fermentative de la levure.

L'apport **azoté** des mélasses est largement insuffisant pour couvrir les besoins de la levure. La bétaine présente dans la mélasse de betterave n'est pas assimilée. Le taux d'azote doit être ajusté de façon à obtenir des proportions de 6 à 9% sur matière sèche, et ce, en ajoutant de l'hydroxyde, des sels d'ammonium (sulfate ou phosphate), ou de l'urée.

La mélasse manque de phosphore. La composition en phosphore de la levure, exprimée en P_2O_5 représente 2 à 3 % sur matières sèches. Le phosphore est ajouté sous forme d'acide phosphorique ou de ses sels. Les mélasses doivent être supplémentées en magnésium, et parfois en zinc.

III-3.2 Premières étapes de production

À partir du tube gélosé contenant la souche, une série de cultures dans des volumes de plus en plus grands conduira au produit commercial. Les différentes étapes de la production sont présentées dans la figure 12.

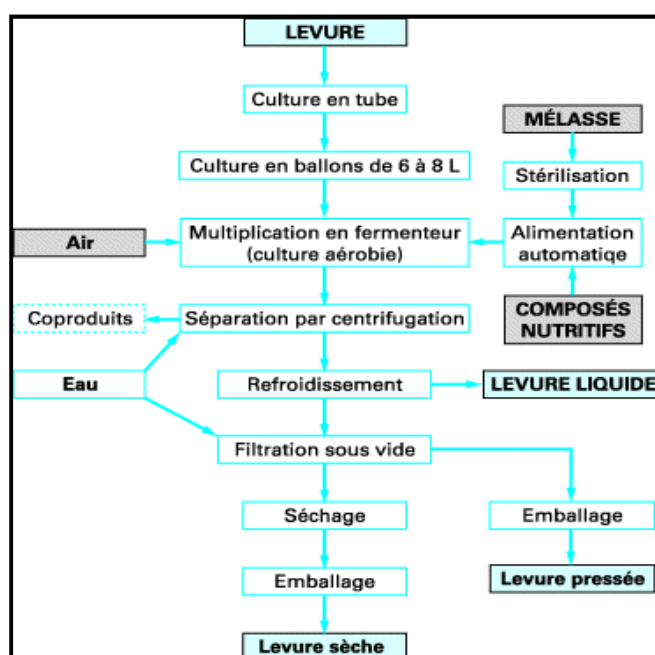


Figure 12 : Procédé de fabrication de la levure

Les premières étapes, réalisées au laboratoire dans des conditions strictes de stérilité, sont appelées culture pure. Elles sont réalisées dans un milieu nutritif riche composé de saccharose et d'extrait de levure en batch agité, il y a donc coproduction d'alcool. Dans ces conditions de semi-aérobies, le rendement biomasse/sucre est faible. Les récoltes sont de 20 à 50 g/L, soit 6 à 15 g de matière sèche/L.

Une récolte de 500 g environ (exprimée en levure à 30 % de matières sèches) sera suffisante pour ensemer un premier fermenteur industriel de 8 à 10 m³ dit pré-fermenteur. Cette première étape de fermentation industrielle est également conduite en batch, avec une faible aération, la mélasse sert de substrat.

Il faut une vingtaine d'heures pour obtenir environ 200 kg de levure (soit un taux d'enrichissement de 400 fois) qui serviront à l'ensemencement de la cuve de première génération industrielle (G1).

III-3.3 Cycle industriel

III-3.3.1 Conditions générales

Les fermentations commerciales sont menées en mode fed- batch. La mélasse est coulée en quantités progressives, en fonction de la masse cellulaire présente à un instant donné, et de la capacité du milieu à dissoudre l'oxygène. Il n'y a pas de soutirage simultané et la fermentation se termine quand le fermenteur est plein. La durée totale d'une fermentation est comprise entre 10 et 18 h.

Le rendement théorique de conversion du sucre en levure en anaérobie est $Y_s = 0,075$ tandis que, en conditions d'aérobies sur substrat mélasse, il est généralement de l'ordre de 0,5. Le producteur de levure recherche les conditions permettant d'optimiser le rendement. Il faut pour cela respecter deux conditions :

- Le taux de croissance qui ne doit pas dépasser 0,2 et la concentration en substrat présente à un moment donné qui ne doit pas dépasser 1 mm en glucose pour éviter l'**effet Crabtree**.
- Le quotient respiratoire [$RQ = Q_{CO_2} / Q_{O_2}$] est défini comme le rapport entre le CO₂ produit Q_{CO_2} exprimé en moles de CO₂ par gramme de matières sèches de levure et par heure, et l'oxygène consommé Q_{O_2} exprimé en moles d'O₂ par gramme de matières sèches de levure et par heure.

En aérobie, le quotient respiratoire est égal à 1. Pour des taux de croissance supérieurs au taux critique μ qui est environ de 0,2, le quotient respiratoire augmente à des niveaux correspondant à la fermentation. Très rapidement, il y a production d'éthanol et le rendement chute de manière brusque.

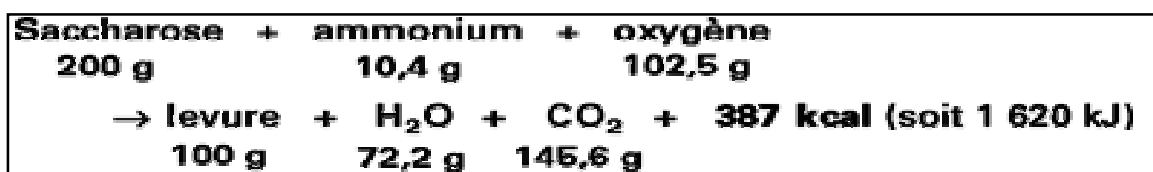
La quantité d'oxygène nécessaire à la croissance est de l'ordre de 1 g d'oxygène par gramme de matières sèches de levure. L'oxygène est fourni en « soufflant » de l'air à travers le liquide contenu dans le fermenteur. Le volume d'air soufflé par minute est de 1 fois à 1,5 fois le volume du liquide dans le fermenteur. On peut utiliser de l'air enrichi en oxygène sans dépasser la concentration critique de 20% environ.

L'efficacité des systèmes d'aération est très variable. D'une façon générale, il est intéressant d'obtenir des bulles plus petites qui remontent plus lentement dans le fermenteur et qui présentent une plus grande surface totale de bulles, ce qui améliore la surface d'échange et le transfert d'oxygène.

L'aération intense des fermenteurs provoque une formation de mousse importante, nécessitant l'emploi d'agents antimousses soient des huiles végétales de qualité alimentaire ou des anti-mousses synthétiques autorisés. L'addition d'antimousse se fait automatiquement grâce à une sonde située au-dessus du niveau du liquide dans le fermenteur.

La levure de boulangerie tolère une large gamme de pH, de 3 à 6 avec un optimum de croissance à pH 4,5 à 5. La plupart des fermentations commerciales commencent à des pH bas pour limiter la contamination bactérienne et se terminent à pH entre 5 et 6.

La production de levure dégage une grande quantité de chaleur qui est en fonction du taux de multiplication et de la concentration cellulaire. La valeur mesurée est de l'ordre de 4,4 kcal/g (18,4 kJ/g) de matières sèches produites, supérieure à la valeur théorique de 3,9 kcal/g (16,3 kJ/g) qui est déduite de l'équation simplifiée de Harrison



Le refroidissement des cuves se fait par circulation d'eau froide dans un réseau de tuyauterie situé le long des parois du fermenteur. Au dernier stade de fermentation, la concentration finale en cellules atteint régulièrement 5 à 6 % (exprimé en matières sèches). Expérimentalement, avec un transfert d'oxygène adapté, des concentrations de 10 % peuvent être atteintes.

III-3.3.2 Générations successives

Le premier stade de fed-batch (G1) permet de récolter entre 35 et 40 fois l'ensemencement initial. Les conditions ne sont plus celles d'une stérilité parfaite, mais sont en conformité avec les normes de l'agroalimentaire.

La récolte obtenue, séparée ou non du moût, servira à ensemer la 2^{ème} génération industrielle (G2). Les taux de multiplication sont plus bas, car le coefficient de transfert de l'oxygène et la capacité de refroidir le fermenteur limitent la concentration de la biomasse pouvant être produite. On récolte 5,5 à 6 fois la quantité de levure ensemencée dont une partie servira à ensemer la génération suivante.

La conduite de la dernière génération, ou génération commerciale est primordiale pour ce qui concerne la qualité de la levure :

- L'ajustement de la composition biochimique (azote, P_2O_5 , sucres de réserve) dont dépendront le pouvoir fermentatif et la stabilité ;
- L'aptitude à fermenter dans des conditions d'applications spécifiques (pâtes acides, sucrées, surgelées...);
- L'aptitude à subir des traitements physiques comme le séchage.

En génération commerciale, la multiplication totale est également de l'ordre de 6. Elle se termine habituellement par une phase de mûrissement dont le but est d'assurer la stabilité de la levure en lui permettant de synthétiser des sucres de réserve (tréhalose, glycogène) en fin de fermentation.

III-3.3.3 Récolte et conditionnement de la levure fraîche

La séparation des cellules de levure du moût de fermentation s'effectue en continu sur des centrifugeuses à plateaux qui lavent la levure, on obtient une suspension ou crème de levure à 18 à 20 % de matières sèches, ce qui correspond à environ 50 % de cellules en volume. La crème est refroidie à 4°C sur échangeur à plaques et stockée à cette température dans des cylindres de garde.

La levure peut être vendue sous cette forme liquide qui correspond à une demande de la boulangerie industrielle, principalement en Australie, aux États-Unis et au Canada.

Elle présente les avantages suivants :

- La possibilité d'automatiser le dosage de la levure ;
- Une dispersion homogène dans la pâte en pétrissage à haute vitesse ;
- La possibilité de standardiser l'activité de la levure ;
- Une bonne stabilité assurée par un bon contrôle de la température de stockage ;
- Un coût plus faible, car peu d'opérations unitaires après la fermentation.

La présentation la plus répandue reste la levure pressée, sous forme de blocs compacts appelés pains de levure. Elle est obtenue par concentration de la crème sur un filtre rotatif sous vide, appelé déshydrateur. L'addition de 0,5 % de sel à la crème avant la filtration permet d'extraire plus d'eau des cellules par la différence de pression osmotique.

Deux rampes de lavage éliminent le sel du gâteau. On obtient ainsi des matières sèches de 30 à 33 %. Après raclage, le gâteau est malaxé, boudiné et extrudé au travers de filières munies de sections carrées, puis divisé en pains.

Une présentation alternative, appréciée des industriels, est la levure émietlée, sous forme de particules relativement fines et d'écoulement facile, ce qui lui permet d'être dosée automatiquement. Elle est emballée en sacs de 25 kg.

La levure fraîche, sous ses différentes présentations, doit être transportée et stockée à des températures de 3 à 7°C. Elle conserve ainsi une bonne activité fermentative et une bonne qualité bactériologique pendant au moins 3 à 4 semaines.

III-3.3.4 Techniques de séchage

Les différentes techniques de séchage partent du gâteau de levure prélevé à la sortie du déshydrateur. Deux types sont distingués :

- **La levure sèche à réhydrater** peut-être produite sous forme granules de 0,2 à 1 mm de diamètre. La levure à 30-35 % de matières sèches est extrudée en particules. Pour la production de **granules**, ces fibres sont transportées en continu sur un tapis à mailles métalliques, dans un tunnel comportant 4 à 6 chambres traversées par des flux d'air verticaux portés à des températures différentes. La durée du processus de séchage est de 3 à 5 h, à des températures ne dépassant pas 45 °C. Les « granules » sont obtenus par broyage et tamisage.

- **La levure sèche instantanée** est obtenue par traitement sur lit fluidisé, en continu ou par batch successifs. Lors du malaxage, un émulsifiant est ajouté à la levure pour favoriser la réhydratation ; il s'agit en général de monoesters de sorbitan. Le gâteau de levure est ensuite extrudé en « vermicelles ». Le passage de l'air chaud s'effectue au travers de soles perforées, de bas en haut, ce qui a pour effet de mettre en suspension les vermicelles qui se fragmentent. La température de l'air est élevée pendant la phase d'évaporation de l'eau libre, mais le produit ne devra pas dépasser 40 °C pendant la seconde phase du séchage. On obtient 95% de matière sèche au bout d'une heure de séchage, la levure est conditionnée sous vide car elle est poreuse et perméable à l'oxygène.

III-3.3.4 Contrôle sur les produits finis

Le contrôle de qualité régulier porte sur les cinq points suivants :

- **Aspect et caractères organoleptiques** : la levure doit être claire avec une odeur sui generis et sans odeur étrangère. On procède à un contrôle sur la consistance de la levure pressée et la forme des particules de la levure sèche.
- **Composition biochimique** : le contrôle porte sur le taux de matières sèches, d'azote et de phosphore.
- **Activité fermentative** : l'aptitude à fermenter la pâte à pain est vérifiée sur chaque lot. On mesure la vitesse du dégagement de gaz carbonique sur des pâtons à base de farine de blé auxquels sont ajoutés les principaux ingrédients rencontrés dans les formules de panification : chlorure de sodium, sucres, sels d'acides faibles en utilisant le fermento-mètre de Burrows et Harrison, qui permet douze mesures simultanées sur des pâtons à base de 20 g de farine.
- **Bonne aptitude à la conservation** : elle concerne le maintien de l'aspect et surtout du pouvoir fermentatif après un test de vieillissement accéléré à 21 ou 26°C pour les levures pressées, à 35 ou 43°C pour les levures sèches.
- **Qualité bactériologique** : étant donné les conditions de production qui ne sont pas totalement stériles, on vérifie l'absence de bactéries pathogène, et ce dans tout le matériel de production et sur le produit fini. D'autres analyses sont réalisées à fréquences déterminées pour vérifier des paramètres relatifs à la sécurité alimentaire, tels que métaux lourds, résidus de pesticides...etc.

Références bibliographiques

- **Bayrock D., Ingledeu W.**, (1998). Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast, *Food research international*, 30, 417-425.
- **Boudrant, J., Georges C., and Pierre C.** (1994). "Capteurs et mesures en biotechnologie." **Editeur** : Tec & Doc. Paris, 496 p.
- **Leveau, J. Y., & Bouix, M.** (1993). Microbiologie industrielle. *Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier TEC et DOC, Paris, 8, 2-92.*
- **Martins, G., Montrocher, R., & Poncet, S.** (1990). Différenciation rapide de souches de levures de vinification par une étude de caractères morphologiques et biochimiques. *Revue française d'oenologie*, 30(126), 35-43.
- **Scriban, R.** (1999). Biotechnologie. 5^{ème} édition. *Techniques et Documentation–Lavoisier (éd.). Paris. p, 401-409.*
- **Pourquié, J., & Vandecasteele, J. P.** (1993). Conversion de la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique et fermentation. *Biotechnologie, 4^e édition, René Scriban, coordinateur Lavoisier TEC & DOC, Paris, 677-700.*