

Université de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Chapitre 4

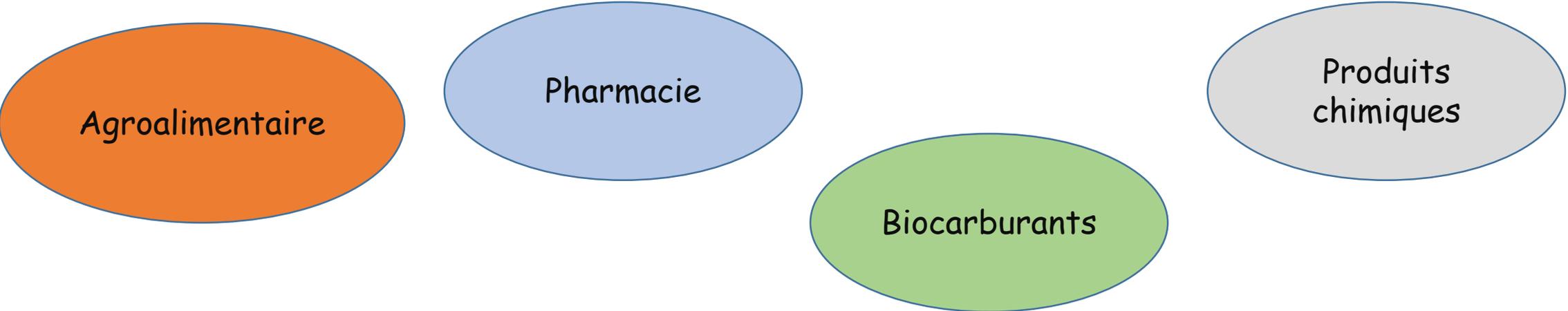
Les fermentations industrielles



Niveau: Licence L3 Microbiologie
Dr. DJINNI I.
2023-2024

Définition

- Les fermentations industrielles désignent les processus biotechnologiques utilisés à grande échelle pour produire une large gamme de produits.
- Ces processus impliquent l'utilisation de microorganismes, tels que des bactéries, des levures ou des champignons, pour catalyser des réactions biochimiques qui conduisent à la production de substances d'intérêt commercial.
- Les fermentations industrielles sont utilisées dans divers secteurs



Agroalimentaire

Pharmacie

Biocarburants

Produits
chimiques

1. Les fermenteurs

- Les fermenteurs, appelés également bioréacteurs, sont des équipements utilisés dans les processus de fermentation industrielle pour cultiver et maintenir les microorganismes dans des conditions optimales de croissance et de production de produits.
- Ces équipements sont conçus pour fournir un environnement contrôlé, où des paramètres tels que la température, le pH, l'agitation et l'aération peuvent être ajustés selon les besoins du processus de fermentation spécifique.

Chapitre 4 Les fermentations industrielles

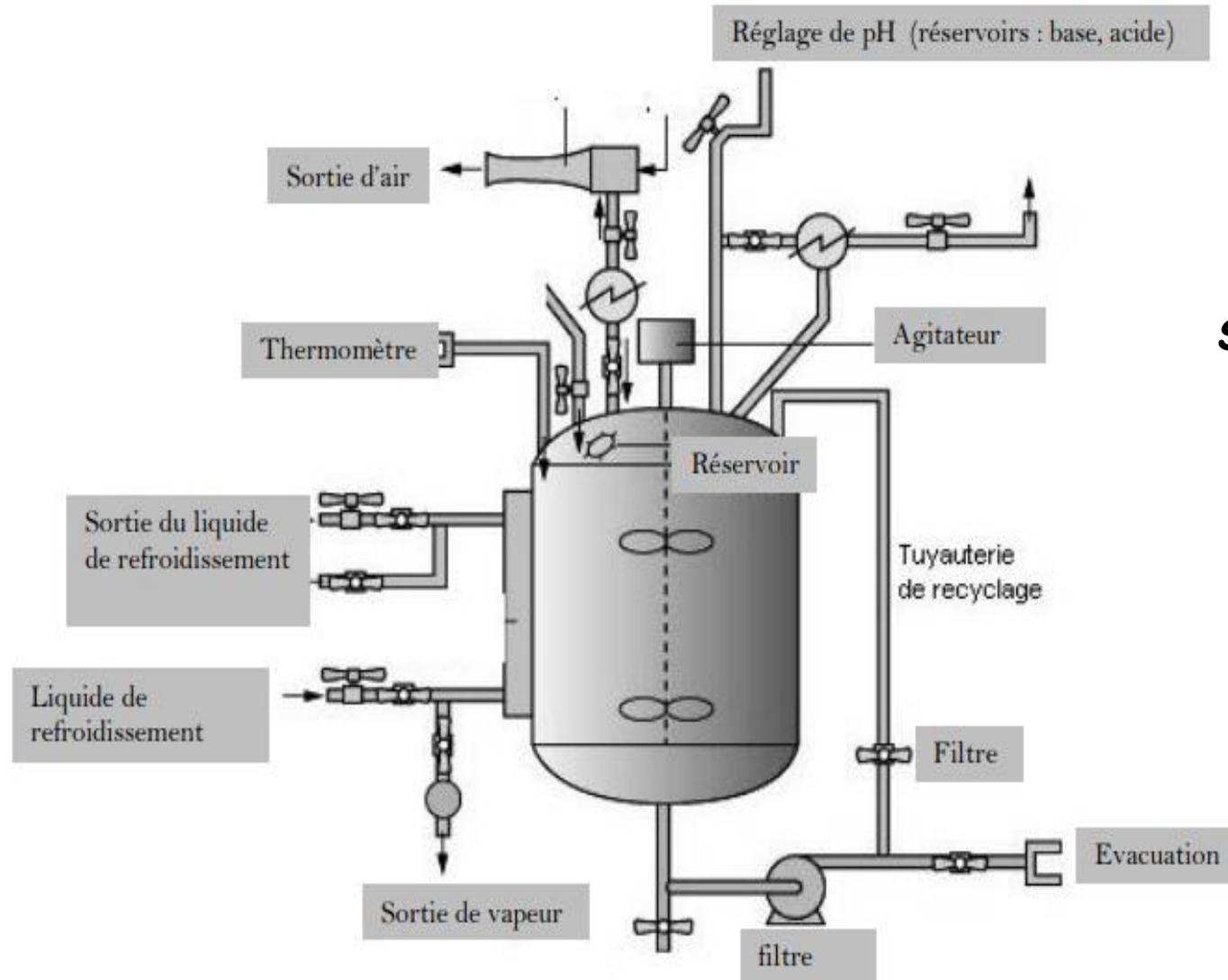


Schéma d'un bioréacteur

Chapitre 4 Les fermentations industrielles

Les bioréacteurs sont classés en fonction de leur volume maximal:

- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18 L ;
- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables in situ jusqu'à 30 L ;
- les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300 L ;
- les bioréacteurs industriels jusqu'à 500 000 L (500 m³)



2. Structure et fonctionnement d'un fermenteur industriel

- Les fermenteurs industriels sont des équipements complexes conçus pour cultiver des microorganismes dans des conditions optimales de croissance afin de produire des substances d'intérêt commercial.

Cuve de fermentation

C'est le cœur du fermenteur, où se déroule la croissance des microorganismes. La cuve est généralement fabriquée en acier inoxydable pour assurer une stérilité adéquate et une résistance à la corrosion. Elle est conçue pour maintenir des conditions de culture spécifiques telles que la température, le pH, l'agitation et l'aération.



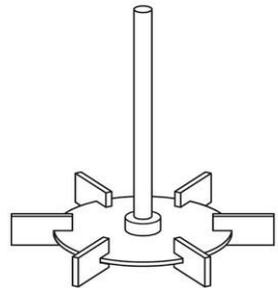
Systèmes de contrôle et de surveillance

Les fermenteurs sont équipés de systèmes de contrôle avancés pour surveiller et réguler les paramètres de fermentation en temps réel. Cela comprend des capteurs de température, de pH, de concentration en nutriments, ainsi que des systèmes d'agitation et d'aération automatisés.

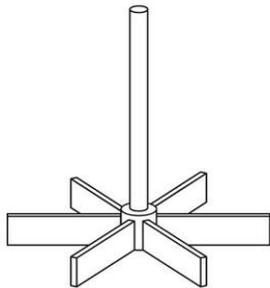
Chapitre 4 Les fermentations industrielles

Agitateurs

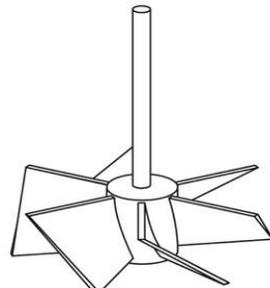
Les fermenteurs sont équipés d'agitateurs pour assurer un mélange homogène du milieu de culture et des microorganismes. Ces agitateurs peuvent prendre la forme de pales, d'agitateurs magnétiques ou d'injecteurs de gaz pour garantir une distribution uniforme des nutriments et de l'oxygène.



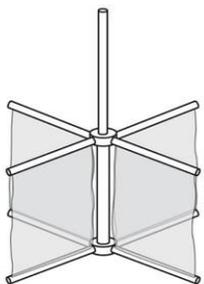
Turbine à pales droites, modèle de Rushton



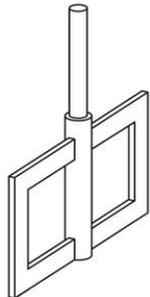
Turbine à pales droites



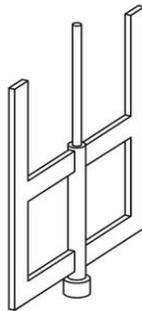
Turbine à pales inclinées



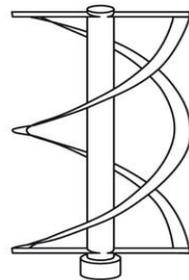
Roue à voile



Turbine à pales creuses



Ancre

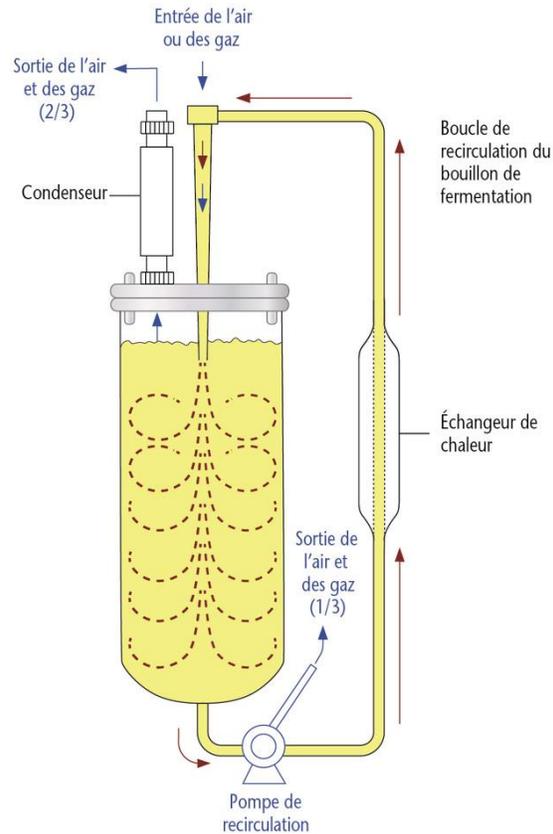


Double ruban hélicoïdal

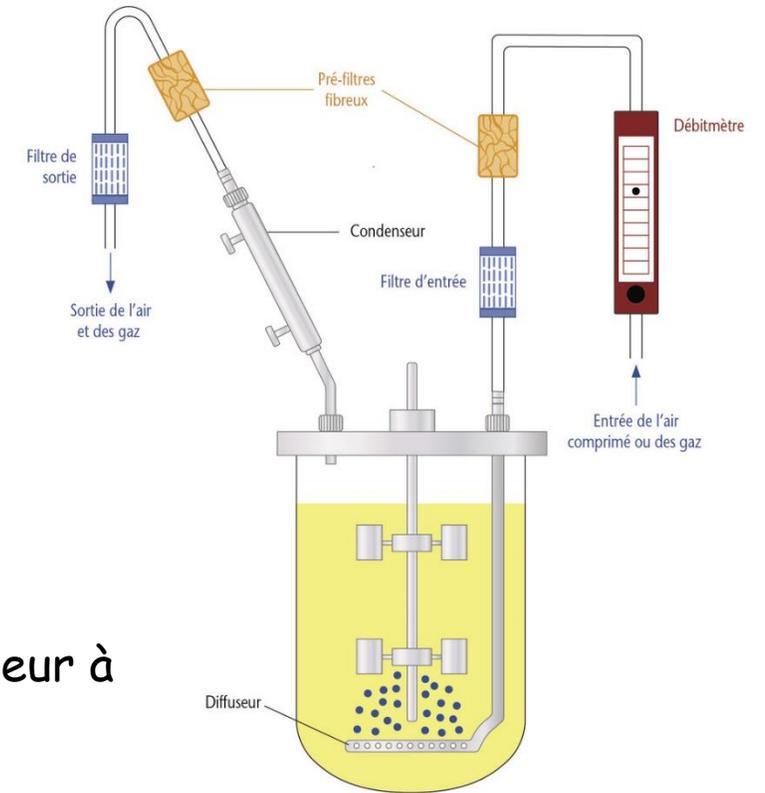


Systemes d'aération

L'aération est cruciale pour fournir de l'oxygène aux microorganismes en croissance. Les fermenteurs sont équipés de systèmes d'aération qui peuvent inclure des bulleurs, des spargers ou des agitateurs à jet pour maximiser l'efficacité de transfert d'oxygène



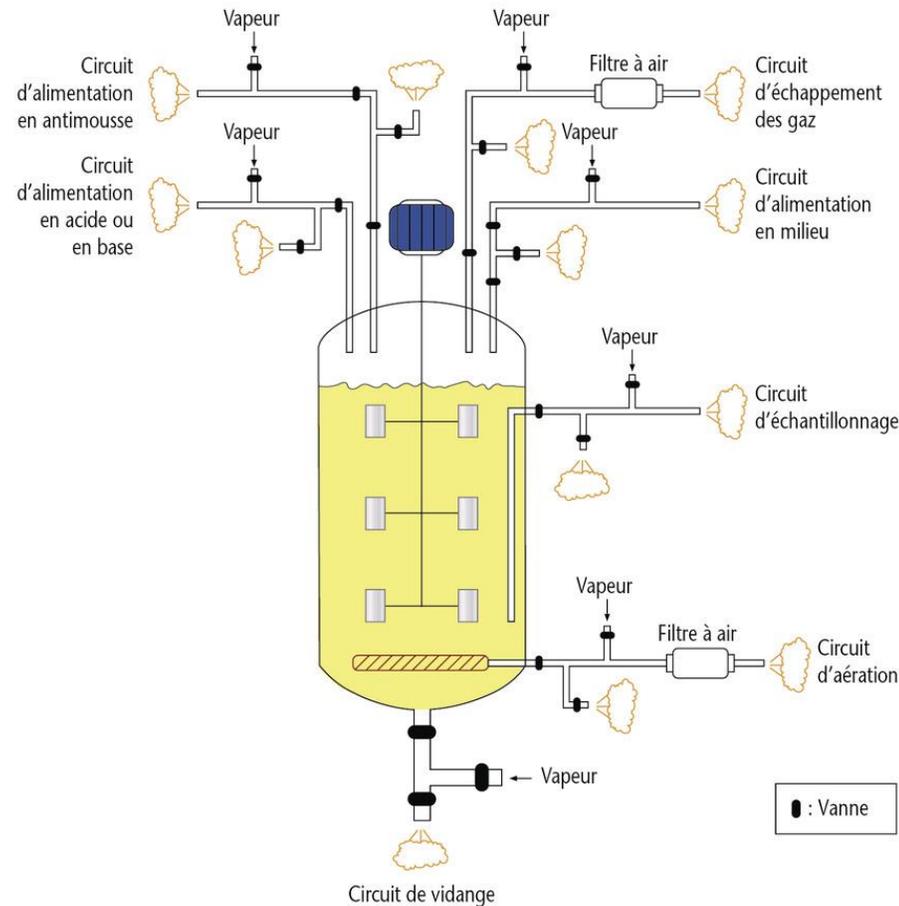
Fermenteur à jet d'air



Fermenteur à bulleurs

Systèmes de stérilisation

Avant chaque utilisation, les fermenteurs doivent être stérilisés pour éliminer toute contamination microbologique. Cela peut être réalisé à l'aide de vapeur d'eau sous pression, de rayonnements ultraviolets ou de produits chimiques désinfectants.

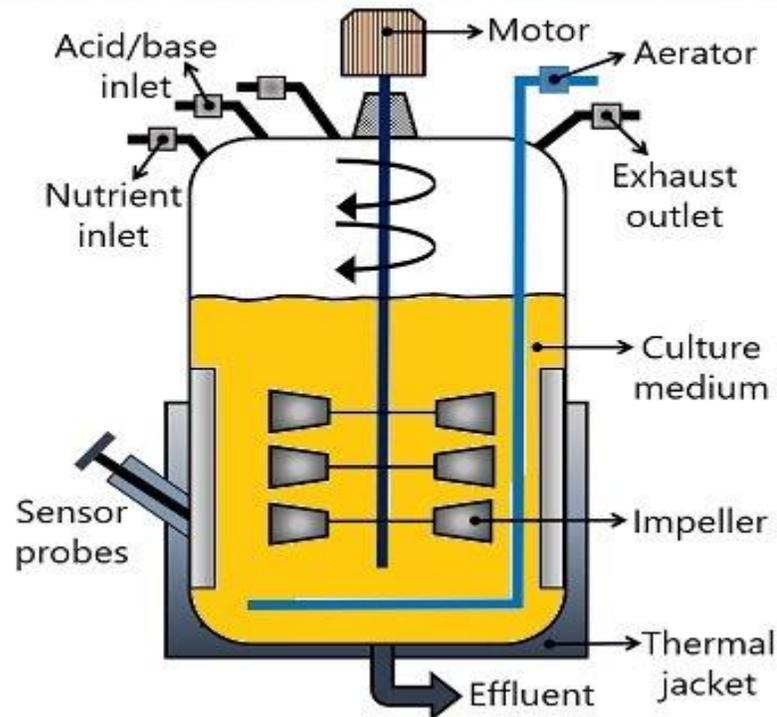


3. Les modes de fermentation

3.1. Le mode discontinu (ou batch)

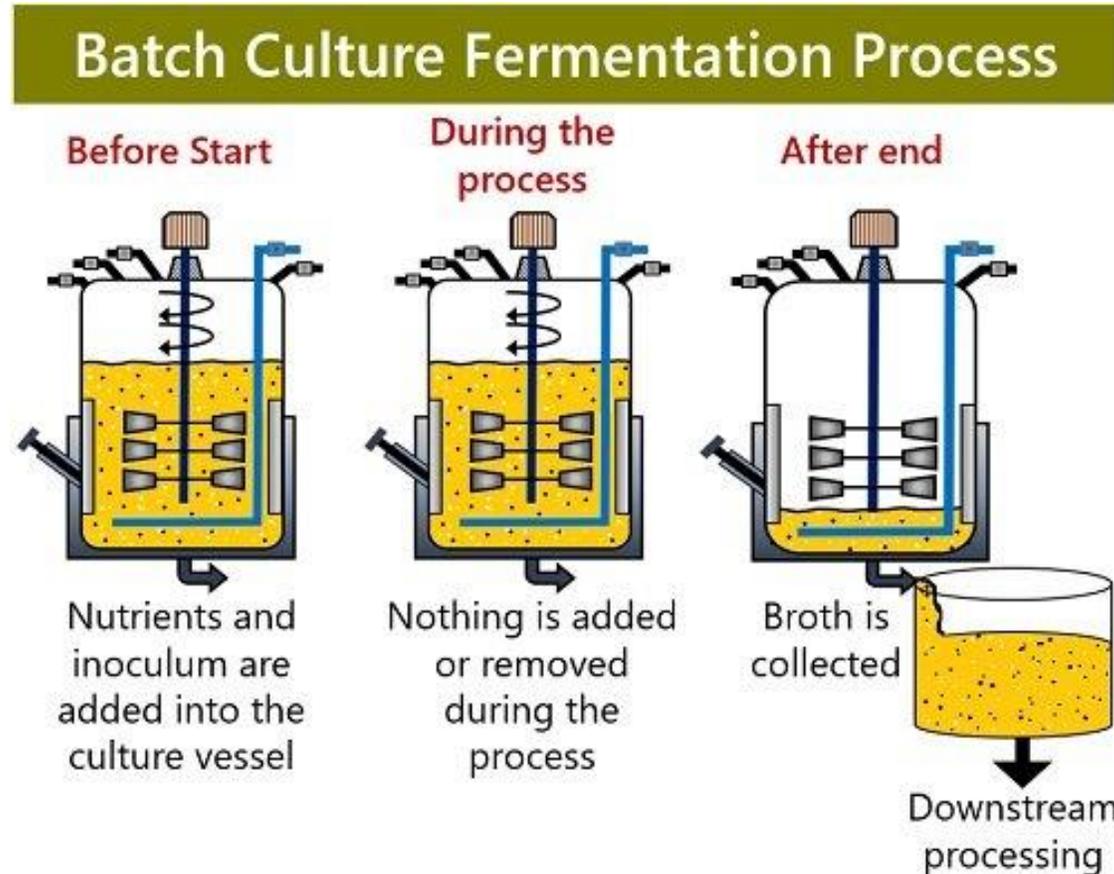
- Dans ce type de fermenteur, le système est fermé et garde un volume constant.
- La cuve est remplie par le milieu de culture stérile, puis il sera inoculé par la souche industrielle.
- La fermentation se déroule sous agitation, et durant tout le temps de la fermentation, le volume de la culture reste constant sans introduction supplémentaire de milieu de culture.
- Les réactifs de neutralisation, ou encore un produit antimousse, peuvent être ajoutés.

Batch or Stirred Tank Fermentor

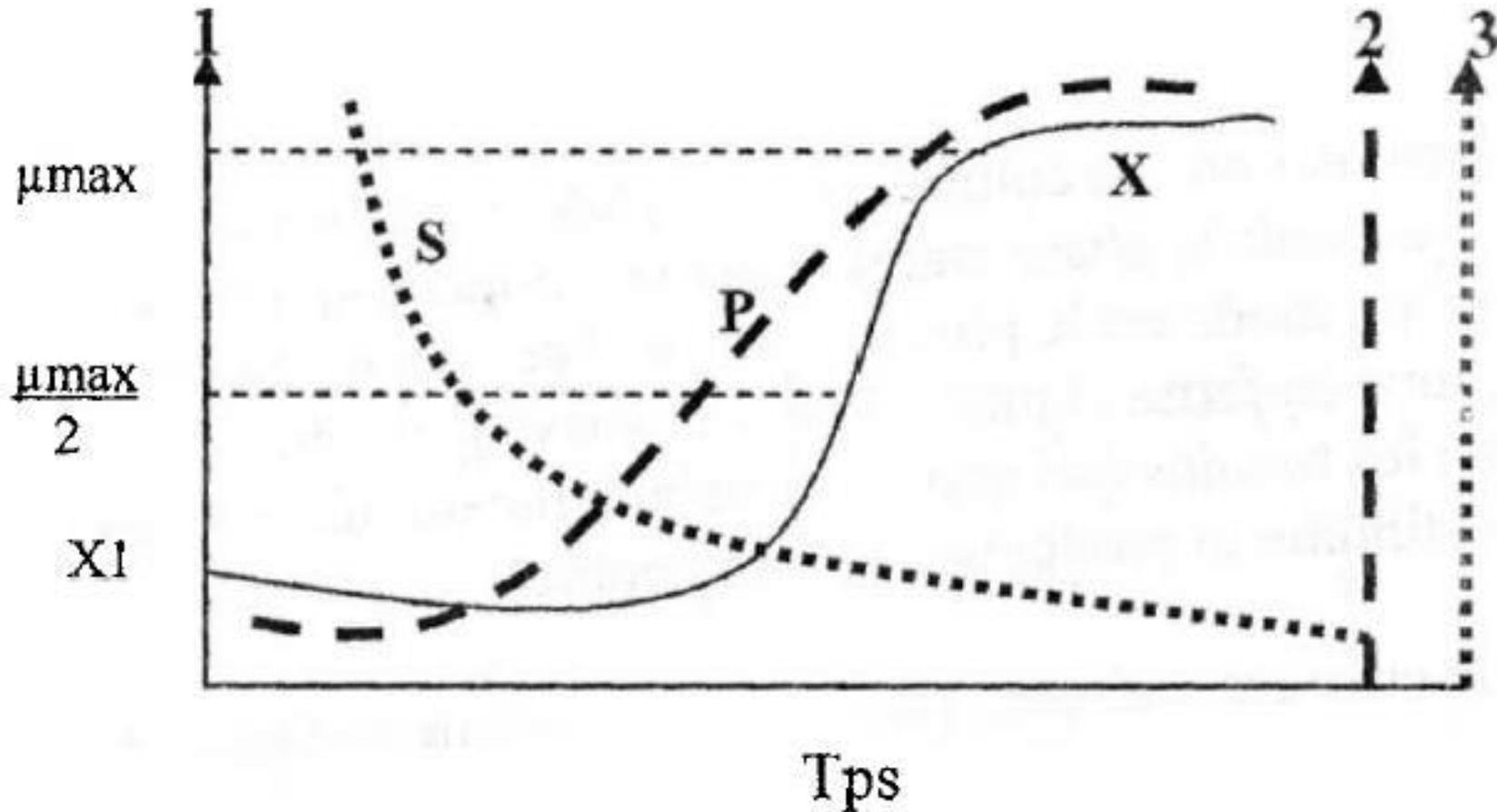


Chapitre 4 Les fermentations industrielles

- La concentration en biomasse augmente selon la courbe de croissance microbienne.
- Au même temps, le substrat est consommé par le microorganisme et la concentration de produits (P) recherchés augmente.
- À la fin de culture on vide le fermenteur et on extrait le produit désiré



S: Substrat
X: Biomasse
P: Produit



Évolution de taux de croissance des cellules (X), par rapport aux taux de conversion de substrat (S), la production de métabolites (P), au cours d'une fermentation industrielle

Les avantages en mode discontinu (Batch) de la fermentation

- Configuration est facile à mettre en place et à exécuter.
- Large applicabilité dans les laboratoires et les industries
- Le produit désiré peut-être recueilli à tout moment.
- Le risque de contamination est faible.
- La conversion complète d'un substrat en un produit est possible

Les inconvénients de la fermentation en mode discontinu (Batch)

- Le temps de latence est très long.
- La durée de la phase exponentielle est très courte, donc la biomasse et le produit final sont produits en quantités faibles : rendement limité.
- La récupération du produit est difficile. En effet, le bouillon de fermentation contient des nutriments, des produits, des réactifs, des débris cellulaires et des toxines.
- Cela implique un temps d'arrêt élevé entre deux lots consécutifs.
- Nécessite un coût de main-d'œuvre élevé et entraîne une variabilité entre les lots.

Applications

- La technique permet aux microbiologistes d'observer l'activité métabolique des bactéries.
- Aide à étudier la physiologie cellulaire des microorganismes.
- Elle est efficace pour la production de métabolites secondaires tels que les antibiotiques.

3.2. Fed Batch (fermenteur discontinue et alimenté)

- Dans ce type de fermentation, pour réduire la durée de la phase de latence tout en prolongeant la phase exponentielle de croissance, la culture démarre avec l'utilisation d'un petit volume de milieu de culture appelé "pied de cuve", qui estensemencé avec un inoculum microbien.
- Une fois que le microorganisme atteint la phase exponentielle de croissance, le milieu de culture stérile est introduit dans la cuve.
- Le débit d'alimentation est ajusté pour maintenir une concentration constante en substrat dans la cuve, tout en évitant d'exercer un effet inhibiteur sur la production de biomasse.
- La fermentation est interrompue dès que la cuve est remplie avec le milieu de culture.
- Ce type de fermenteur présente un risque de contamination plus élevé.
- Aucun milieu de culture n'est retiré jusqu'à la fin du processus.
- Le volume à l'intérieur de la cuve de culture augmente en raison de l'ajout périodique de substrats ou de nutriments.
- Il permet d'obtenir une densité cellulaire élevée et de produire davantage de métabolites pour augmenter la productivité globale.

Applications du Fed-batch

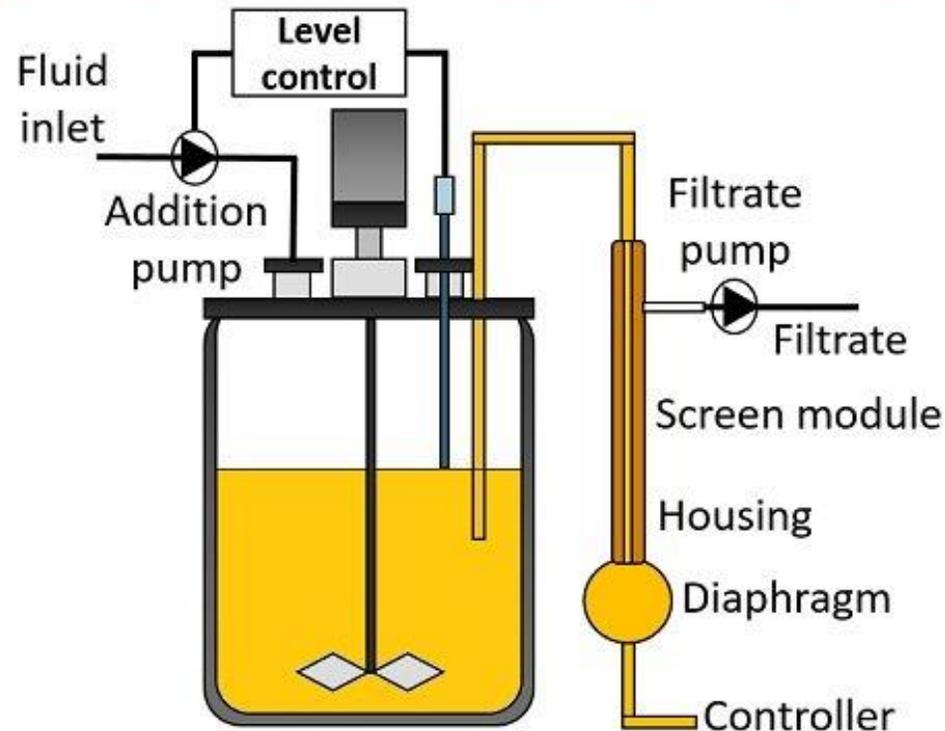
- La production d'antibiotiques tels que la pénicilline, qui nécessite une alimentation contrôlée en nutriments.
- Une sous-alimentation ou une suralimentation des substrats peut entraîner respectivement une carence en nutriments et une dilution du produit.
- Ainsi, le fed-batch permet un flux contrôlé de nutriments pour atteindre une production maximale des produits désirés ou pour obtenir une densité cellulaire élevée.
- Il est également utilisé dans la production de levure de boulangerie

Les avantages du mode de fermentation en fed-batch

- Il permet un flux d'alimentation contrôlé pendant la fermentation.
- Le fed-batch aide à surmonter des conditions telles que la répression catabolique et l'inhibition du substrat.
- Il a un coût d'exploitation plus faible que la fermentation en batch.
- Il réduit la viscosité du bouillon.
- La culture en fed-batch maintient les cellules microbiennes dans leur phase de croissance exponentielle ou la phase productive de la culture, ce qui libère la plupart des métabolites primaires.
- Elle produit des densités cellulaires élevées.

- Les inconvénients du mode de fermentation en fed-batch
- La culture en fed-batch est un processus complexe à mener.
- Elle nécessite des compétences techniques pour son fonctionnement et sa maintenance.
- La fermentation en fed-batch nécessite un équipement sophistiqué pour contrôler le flux d'alimentation.
- Il est également nécessaire d'étudier la physiologie des cellules microbiennes par rapport à la productivité.

Fed Batch Fermentor

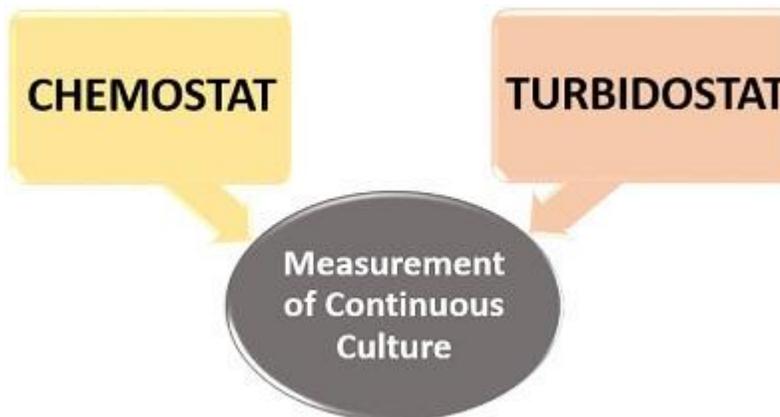


3.3. Fermentation continue

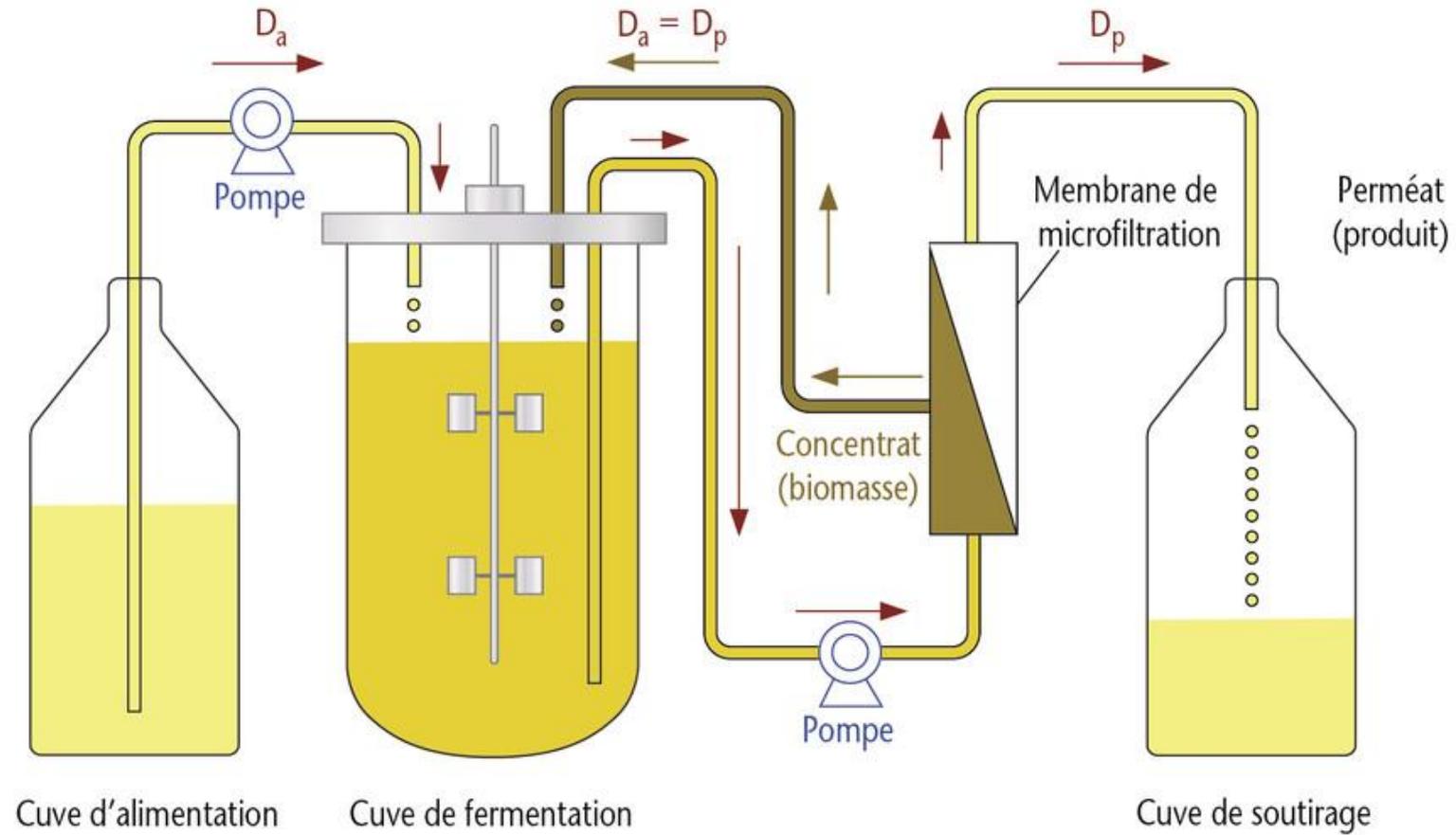
- Dans ce type de fermentation, la phase exponentielle de croissance microbienne est maintenue en permanence, grâce à une addition régulière de milieu de culture neuf par un débit constant, ce qui permet un réapprovisionnement en nutriments et le maintien de pH; et en même temps une quantité équivalente de milieu de culture additionné doit être soutirée, ce qui permet d'éviter l'accumulation des déchets
- Dans la culture continue, le taux de croissance des cellules microbiennes est maintenu dans la phase exponentielle, c'est-à-dire que les cellules ne peuvent pas atteindre la phase stationnaire de croissance.

Il est nécessaire d'avoir certains équipements supplémentaires pour maintenir la phase stable des cellules microbiennes afin de réaliser la méthode de culture continue.

Le **chemostat** et le **turbidostat** sont les deux types d'équipements uniques les plus couramment utilisés en culture continue.



Chapitre 4 Les fermentations industrielles



Fonctionnement d'un bioréacteur en mode continu

Chemostat

- Il s'agit d'un mode utilisé pour la culture continue de bactéries où la densité cellulaire est maintenue constante en maintenant le taux de dilution et le débit du milieu nutritif constants.
- Le chemostat a été introduit dans les années 1950 par trois scientifiques, Monod, Novick et Szilard.
- Le milieu nutritif stérile est ajouté dans le réservoir avec les cellules microbiennes.
- Le taux de dilution contrôle la concentration du milieu nutritif.
- Dans un chemostat, le substrat est continuellement ajouté dans le réservoir, et les produits dérivés sont continuellement élués du réservoir.
- Les cellules bactériennes vont croître à un taux constant, c'est-à-dire la phase exponentielle, car il n'y aura pas d'épuisement des nutriments en raison de l'apport continu de nutriments dans le réservoir.

Turbidostat

Il est également appelé "Biostat". Un turbidostat est un dispositif qui maintient une densité cellulaire constante en contrôlant le débit du milieu frais. Le turbidostat est un appareil introduit par les deux scientifiques Bryson et Szybalski en 1952. C'est un dispositif dont le fonctionnement dépend de deux composants :

- Dispositif photoélectrique
- et dispositif de détection optique

- Un turbidostat est un dispositif qui comprend un **réservoir stérile, un vaisseau de culture, une cellule photoélectrique et une source lumineuse.**
- Dans le turbidostat, le milieu nutritif frais est régulé automatiquement, ce qui maintient la turbidité prédéterminée.
- Le milieu nutritif frais est ajouté au vaisseau de culture par l'intermédiaire d'une vanne, qui contrôle le débit du milieu.
- **Le milieu nutritif frais est ajouté une fois que la densité optique augmente. La densité cellulaire est maintenue constante dans le vaisseau de culture grâce à un dispositif photoélectrique.**
- Le dispositif photoélectrique mesure la turbidité du milieu en absorbant la source lumineuse. La turbidité est surveillée tout au long du processus.

Avantages du mode continu

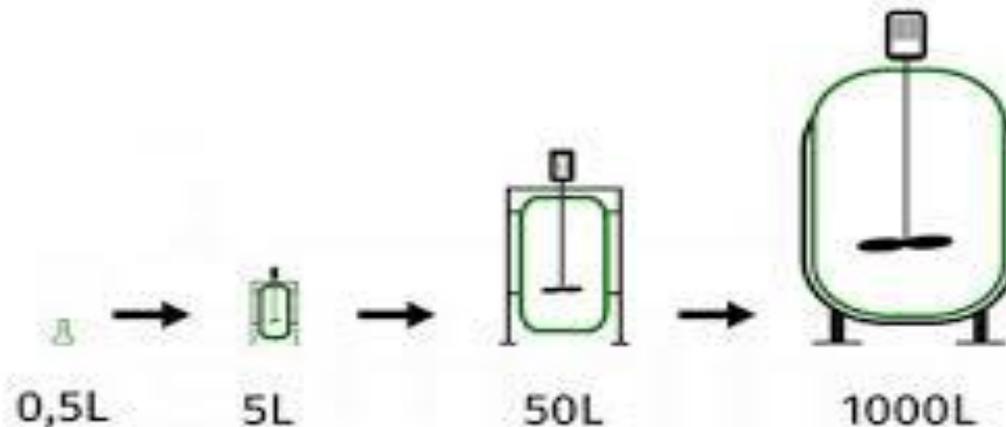
- Le processus est rentable
- Étant donné qu'il y a un traitement continu, cela réduit le nombre d'étapes telles que le nettoyage, la stérilisation, la préparation des cultures de départ, etc.
- En culture continue, la population cellulaire peut être maintenue dans la phase exponentielle à une concentration cellulaire constante pendant longtemps.
- En réduisant le nombre d'étapes, cela permet également de gagner du temps et de l'énergie.
- Comme le produit est continuellement évacué, la toxicité des métabolites secondaires n'affecte pas le milieu de culture. Par conséquent, la culture continue évite l'accumulation de substances toxiques.

Inconvénients du mode continu

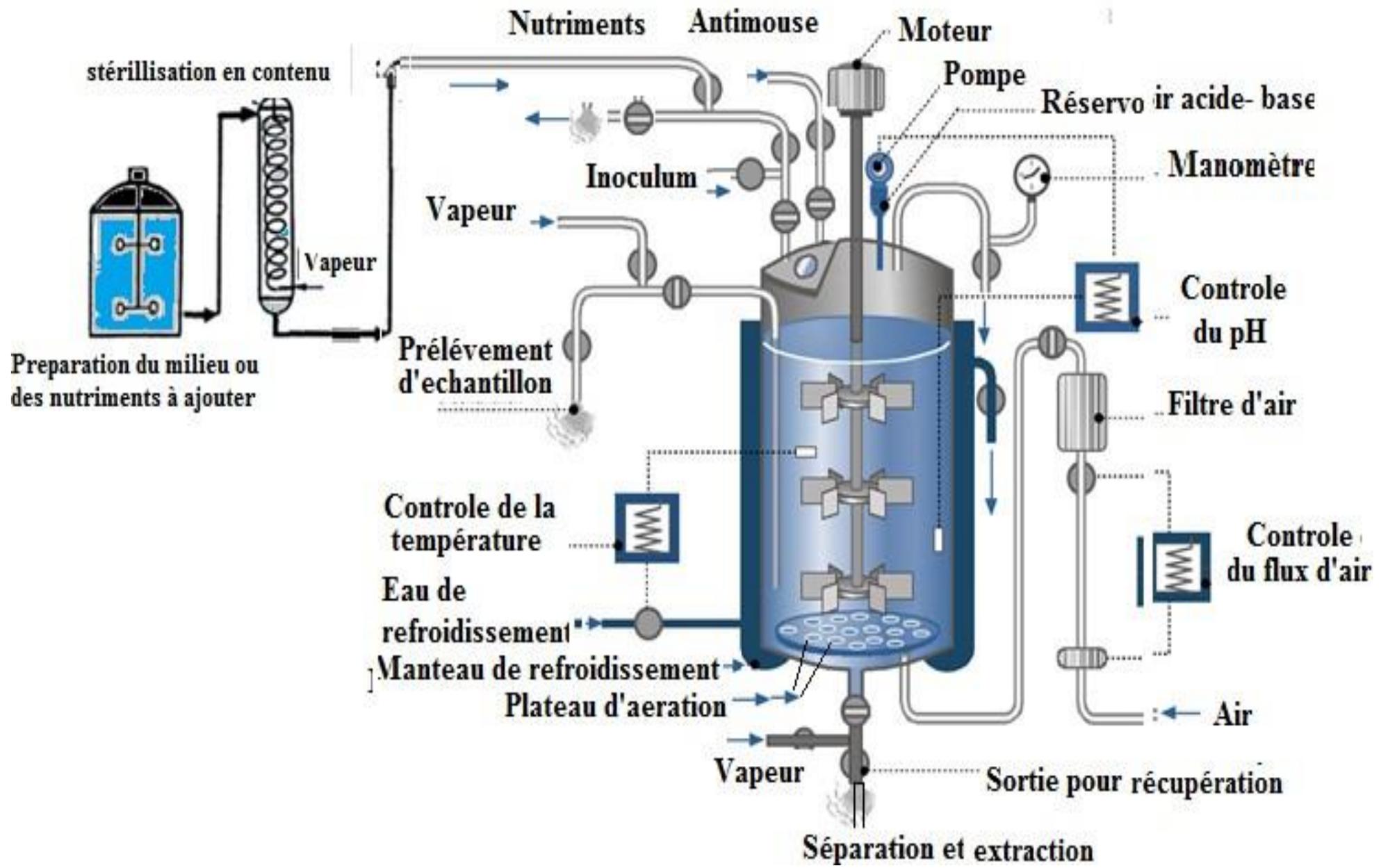
- Il existe un risque élevé de contamination, car le processus se poursuit sans nettoyage ni stérilisation appropriés.
- Pour mener à bien le processus de culture continue, des compétences techniques élevées sont nécessaires pour maintenir l'état stable des cellules bactériennes.
- Pour effectuer une culture continue, des équipements supplémentaires et spécifiques sont nécessaires.

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

- Le processus de mise à l'échelle, également appelé extrapolation ou "scale up", fait référence à la transition d'un processus ou d'une méthode développée à petite échelle vers une mise en œuvre à grande échelle.
- Cela implique généralement l'adaptation des conditions et des paramètres utilisés dans le processus initial pour s'adapter à des volumes de production plus importants tout en maintenant des performances et des résultats optimaux.
- La mise à l'échelle est une étape cruciale dans le développement de produits et de processus industriels, permettant de garantir **la faisabilité, l'efficacité et la rentabilité** de la production à grande échelle.



Chapitre 4 Les fermentations industrielles



4. Cinétique de croissance en Batch

4.1. Les paramètres intégraux

a. Biomasse X

X_f : paramètre à la fin de la fermentation

X_0 : inoculum: petite quantité pour démarrer

En industrie, le nombre totale de cellules $X = X \text{ vivantes} + X \text{ mortes}$

b. Substrat S (g/L)

A t_0 : S_0

t_f : S_r substrat résiduel (non consommé)

c. Produit (g/L)

A t_0 : $P_0 \rightarrow$ tend vers 0

t_f : P_f

4.2. Paramètres dérivés

Ce sont les vitesses

a. Vitesse de croissance (rate): $r_x = dX/dt = (X_2 - X_1) / (t_2 - t_1)$ (g/L)/h

b. Vitesse de consommation du substrat S: $r_s = -dS/dt = -(S_2 - S_1)/(t_2 - t_1)$ (g/L)/h

c. Vitesse de production du produit P: $r_p = dP/dt = (P_2 - P_1)/(t_2 - t_1)$ (g/L)/h

3. Paramètres à vitesses spécifiques

a. Vitesse spécifique de croissance : $\mu = r_x/X = dX/dt \cdot 1/X$ (h⁻¹)

b. Vitesse spécifique de consommation du substrat S: $q_s = r_s/X = -dS/dt \cdot 1/X$ (h⁻¹)

c. Vitesse spécifique de production du produit P: $\mu_p = r_p/X = dP/dt \cdot 1/X$ (h⁻¹)

- Toutes les caractéristiques (vitesse globale, vitesse spécifique) se calculent en phase exponentielle
- L'industriel s'intéresse à la **Vitesse spécifique de croissance** et à la **Vitesse spécifique de production du produit P**

4. Les rendements

a. Les rendements globaux

- Biomasse

$$R_{X/S} = \frac{X_f - X_0}{S_0 - S_r}$$

- Produit

$$R_{P/S} = \frac{P_p - P_0}{S_0 - S_r}$$

b. Les rendements instantanés

$$R_x = \frac{r_x}{r_s} = \frac{dx/dt}{-ds/dt} = \frac{dx}{-ds} = \frac{x_2 - x_1}{-(s_2 - s_1)}$$

5. Paramètres cinétiques globaux: productivité (γ)

a. Productivité en biomasse (g/L/h)

$$P_x = \frac{\Delta X}{\Delta t} = r_x$$

b. Productivité en produit (g/L/h)

$$P_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = r_p$$

c. Productivité en consommation du substrat

$$-\frac{\Delta S}{\Delta t} = r_s$$

Les protéines d'organismes unicellulaires (POU)

1. Définition

- On appelle "Protéines d'Origine Unicellulaire" (P.O.U), ou en anglais Single Cell Proteins (SCP), toute biomasse microbienne riche en protéines destinée à l'alimentation humaine ou animale.
- Les P.O.U ne sont pas des protéines pures, mais contiennent également des glucides, des lipides, des acides nucléiques, des sels minéraux et des vitamines.

2. La raison du besoin mondial des protéines d'origine unicellulaire

Les sources de protéines sont essentiellement couverts par les protéines animales, représenté principalement par la viande de différents types, cependant, à cause de son prix élevé, le régime alimentaire de beaucoup de pays accuse un grave déficit en protéines animales, et la recherche de nouvelles ressources protéiques est l'une des préoccupations de ces pays.

Donc la motivation de l'utilisation de P.O.U dans l'alimentation humaine, à principalement comme objectif de surmonter la sous-alimentation dans ces pays, et permet donc de satisfaire leurs besoins en protéines. Dans les pays où il n'y a pas de graves problèmes de sous-alimentation, l'utilisation des P.O.U en alimentation humaine est très limitée, et elle est plutôt destinée à l'alimentation animale (Ravindra et al, 2000).

3. Les microorganismes utilisés pour la production des P.O.U

Les levures généralement utilisées comme P.O.U, sont principalement :

- *Saccharomyces cerevisiae*: utilisé surtout comme additif alimentaire.
- *Candida utilis* : après inactivation par chauffage, elle est utilisée en tant qu'aliment nutritif, puisqu'elle est riche en protéines et en acides aminés libres, et possède une saveur légère de viande.

La moisissure, *Fusarium venenatum*, est utilisée pour la production de Quorn, qui est une marque de substitut de viande à base de mycoprotéine, possédant un goût qui ressemble à la viande de poulet.

Les cyanobactéries peuvent être utilisées comme des compléments alimentaires, c'est le cas par exemple de la spiruline, produit principalement à partir des espèces, *Arthrospira platensis* ou *Arthrospira maxima*. La spiruline est riche en protéines (60% de protéines) et de vitamines, ainsi que des sels minéraux et des oligoéléments.



4. Critère de choix de microorganisme pour la production de P.O.U.

Avant d'être utilisé comme source de P.O.U, le microorganisme doit remplir certains critères, il doit être:

- Non pathogène
- Possédant un taux de protéines élevé
- Taux de croissance élevé
- Facilité pour la récolte
- Bonne résistance aux variations dans les conditions de production

5. Production industrielle des P.O.U.

1. Les conditions de culture.

- Le rapport idéal pour les différentes sources de carbone, d'azote et de phosphore, entrant dans la composition de milieu de culture pour la production des P.O.U, doit être égal à 100 / 5 / 1.
- La température d'incubation est généralement comprise entre 30 et 35 °C, selon le microorganisme, alors que le pH doit être maintenu entre 4.0 et 5,5.
- Un paramètre critique est la concentration en oxygène dissout. Pour des fermentations aérobies, le milieu devrait être saturé à 40 % en oxygène.

2. Fermentation et purification des P.O.U.

- Après avoir stérilisé le milieu de culture, la production de biomasse est réalisée dans un fermenteur.
- Les POU sont récupérés, ensuite, par centrifugations multiples, puis sont emmagasiné dans des barils, ou bien sont séchés afin d'obtenir une poudre exempte de toute cellule vivante.

6. Avantages et inconvénient des POU

L'utilisation des microorganismes comme source de protéines d'origine unicellulaire possède certains avantages par rapport aux sources de protéines d'origine animale ou végétale (Nasseri et al, 2011) :

- Taux de croissance rapide, par rapport aux animaux d'élevage
- Teneur élevée en protéines (30-80% du poids sec);
- La possibilité d'utiliser une large gamme de substrats bon marché (peu coûteux), y compris les déchets organiques, pour leur croissance
- Demande peu d'espace et peu d'eau, par rapport à l'élevage.
- La production des P.O.U est indépendante des variations climatiques.

Inconvénients pouvant accompagner l'utilisation des P.O.U, comme source de protéines

- Ils peuvent produire des toxines ou autres métabolites nuisibles.
- Le contenu en acides nucléiques des POU limite leur utilisation en alimentation humaine. En effet, une grande consommation d'acides nucléiques, élève la concentration en acide urique dans le plasma sanguin. Il y a alors un risque de précipitation d'urée dans les tissus et les articulations, ce qui aboutit à des symptômes analogues à la maladie de la goutte.