



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Lorraine
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA)
Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP)
Ecole Doctorale Sciences et Ingénierie Ressources Procédés Produits Environnement (RP2E)

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires

Par

Laial HAJ-HUSEIN

Sujet

**Impact de l'agitation et de l'aération sur la réponse
physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ
40338 lors de sa culture en bioréacteurs mécaniquement
agité et gazosiphon**

Soutenue publiquement le 15 octobre 2013

Membres du jury

Rapporteurs :	Caroline GENTRIC	(Professeur, Université de Nantes)
	Florence MATHIEU	(Professeur, Université de Toulouse)
Examineurs :	Rémy CACHON	(Professeur, Université de Bourgogne)
	Michel FICK	(Professeur, Université de Lorraine)
	Eric OLMOS	(Maître de conférences, Université de Lorraine)
	Stéphane DELAUNAY	(Professeur, Université de Lorraine)

Remerciements

Tout d'abord, j'adresse mes sincères remerciements au Pr. Laurent FALK, Directeur de l'équipe Biopromo, de m'avoir accueillie dans son laboratoire et de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son équipe.

Je remercie vivement tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail : le Pr. Caroline GENTRIC et le Pr. Florence MATHIEU d'en avoir assuré la charge de rapporteurs, le Pr. Rémy CACHON, d'avoir été examinateur de ce travail. Vos critiques et suggestions sont très constructives pour la suite de ce projet.

Je remercie mon Directeur de thèse le Pr. Michel FICK. J'ai eu la chance d'être encadrée par toi, suite à la triste disparition du Pr. Jean Louis GOERGEN. Je te remercie du fond du cœur pour le temps que tu m'as consacré, de ton écoute et ton encouragement qui ont fait augmenter ma motivation.

Je souhaite adresser une pensée au Pr. Jean Louis GOERGEN, le Professeur qui pense toujours à ses thésards, croit en leurs capacités, les soutient pour réaliser leurs thèses dans des meilleures conditions.

Je tiens à remercier également le Pr. Stéphane DELAUNAY du savoir qu'il m'a transmis pendant toutes ces années et du temps qu'il a consacré à la correction de ce travail.

Mes remerciements vont droit au Dr. Eric OLMOS. Merci pour les connaissances scientifiques et tes corrections qui ont enrichies le manuscrit.

Fabrice BLANCHARD, c'était un plaisir de travailler avec toi. Merci pour ta disponibilité, ton investissement. Je ne t'ai jamais posé une question sans que tu ne prenes pas le temps de me répondre ou de me donner une explication.

Une pensée particulière à ma chère Syrienne Boudur, à Louai et aux adorables Hadi et Adam. Merci d'avoir été une vraie famille pour moi ici en France. Merci de vos soutiens constants, de vos encouragements et du bonheur que vous m'avez apportés.

Mes chères amies, Tatiana, Françoise et Bambou, merci pour les moments agréables que nous avons passés ensemble et qui font partie de mes beaux souvenirs du laboratoire et de Nancy.

Je remercie Arnaud, Florent, Mickael et Karim. Merci beaucoup de vos gentillesse et de la bonne humeur au quotidien. J'adresse également mes remerciements à tous mes collègues et plus particulièrement Mathilde, Kenza, Amal, Caroline, Claudia, Fred et Mohamad.

Je tiens à remercier mes chères stagiaires Christine, Marine et Zina. Le travail à vos côtés était un bonheur et je vous souhaite beaucoup de réussite.

Je remercie tous les membres de l'équipe Biopromo, de leur sympathie au quotidien.

Ma chère amie Faiza, je te remercie pour tous tes conseils, je n'oublierai jamais tous les moments que nous avons partagés ensemble.

Je ne remercierai jamais assez mes chers et tendres parents, qui ont toujours cru en moi et m'ont soutenue tout au long de mes études et aidée avec tous leurs moyens. Je les remercie énormément pour leur support financier surtout à la fin de ma thèse, pour que je puisse réaliser mes ambitions. Je remercie également mes chers frères Ameen et Maen, de leur encouragement et leur soutien.

Si j'ai pu venir en France pour poursuivre mes études, c'est grâce à mon cher et charmant pays la Syrie. Je souhaite de tout mon cœur que la paix revienne en Syrie.

Liste des travaux

Communications orales

Haj-Husein, L. Olmos, E., Blanchard, F., Poncin, S., Fick, M., Delaunay, S. (2010). Effet des variations de la puissance dissipée sur la production de pristinamycines par *Streptomyces pristinaespiralis* en bioréacteur mécaniquement agité. Colloque "Journées Streptomyces", Paris, 27-28 mai 2010.

Haj-Husein, L. Olmos, E., Blanchard, F., Fick, M., Delaunay, S. (2011). Comparaison de la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de leur culture en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteur agité mécaniquement. XII^{ème} congrès de la société Française de Génie des Procédés, Lille, 29 novembre-1^{er} décembre 2011.

Haj-Husein L., Olmos E., Feustel S., Mehmood N., Malaplate-Armand C., Fick, M et Delaunay S., Impact de la dissipation volumique sur la viabilité cellulaire au sein de pelotes de *Streptomyces pristinaespiralis* cultivées en fiole d'Erlenmeyer agitée, 14^{ème} Congrès de la Société Française de Génie des Procédés, 8-10 octobre 2013, Lyon, France.

Communications par affiche

Haj Husein L., Olmos E., Blanchard F., Poncin S., Goergen J.-L. et Delaunay S. Etude des effets de l'oxygénation et de la puissance dissipée sur le métabolisme de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines. Séminaire de l'Ecole Doctorale RP2E, 28 janvier 2010, Nancy, France. in : « Actes du séminaire 2010 de l'Ecole Doctorale RP2E », 293-300.

Publications

Haj-Husein, L., Olmos, E., Blanchard, F., Fick, M., Delaunay, S. (2011). Comparaison de la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de leur culture en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteur agité mécaniquement. XII^{ème} congrès de la société Française de Génie des Procédés. Numéro 101, Ed. SFGP, Paris, France.

Haj-Husein L., Olmos E., Feustel S., Mehmood N., Malaplate-Armand C., Fick M., Delaunay S. (2013). Impact de la dissipation volumique sur la taille et la viabilité cellulaire au sein de pelotes de *Streptomyces pristinaespiralis* cultivées en fiole d'Erlenmeyer agité. XIV^{ème} congrès de la société Française de Génie des Procédés. Numéro 104, Ed. SFGP, Paris, France

Olmos E., Mehmood N., **Haj Husein L.**, Goergen J.-L., Fick M. et Delaunay S. (2013) Bioreactor hydrodynamics and its effects on the physiology of *Streptomyces*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 36, n°3, 259-272.

Table des matières

I.	Etude bibliographique	25
I.1.	Le genre <i>Streptomyces</i>	25
I.1.1.	Généralités sur le genre <i>Streptomyces</i>	25
I.1.2.	Antibiotiques produits par les <i>Streptomyces</i>	26
I.1.3.	Les pristinamycines.....	28
I.2.	Morphologie des microorganismes filamenteux en cultures submergées.....	29
I.2.1.	Facteurs influençant la formation et le type de morphologie en culture	31
I.2.2.	Influence de la morphologie sur la production de métabolites par des microorganismes filamenteux	33
I.2.3.	Impact des caractéristiques des pelotes sur l'activité microbienne	34
I.3.	Influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique des microorganismes filamenteux.....	40
I.3.1.	Comparaison des paramètres hydrodynamiques dans différents types de bioréacteurs	41
I.3.2.	Effets de l'hydrodynamique des bioréacteurs sur la physiologie de <i>Streptomyces</i>	44
I.4.	Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of <i>Streptomyces</i>	45
I.4.1.	Introduction	45
I.4.2.	Hydrodynamics description.....	46
I.4.3.	Power dissipation.....	46
I.4.4.	Nutrients transfer	49
I.4.5.	Oxygen transfer.....	50
I.4.6.	Hydromechanical stress	53
I.4.7.	Non-Newtonian behavior.....	55
I.4.8.	Agitation effects on <i>Streptomyces</i> physiology	57

I.4.9.	Conclusion.....	69
II.	Matériel et méthodes	79
II.1.	Microorganismes utilisés.....	79
II.2.	Milieux de culture	79
II.2.1.	Milieu de sporulation.....	79
II.2.2.	Milieu complexe insoluble (ICS).....	79
II.2.3.	Composition du milieu de culture synthétique (MPS2).....	79
II.3.	Protocoles de culture	80
II.3.1.	Stockage de spores.....	80
II.3.2.	Conditions de culture.....	80
II.3.3.	Préculture sur milieu ICS	80
II.3.4.	Cultures en bioréacteur en mode discontinu pour les nutriments.....	82
II.4.	Caractéristiques des bioréacteurs utilisés	82
II.4.1.	Réacteur mécaniquement agité	82
II.4.2.	Réacteur de type airlift.....	83
II.4.3.	Logiciel de pilotage des bioréacteurs	86
II.4.4.	Culture en milieu MPS2.....	86
II.5.	Détermination du coefficient volumique de transfert en oxygène, k_La	87
II.6.	Mesure de la concentration en biomasse et des métabolites extracellulaires.....	88
II.6.1.	Mesure de la concentration en biomasse.....	88
II.6.2.	Dosage du glucose.....	89
II.6.3.	Dosage de la concentration en ammonium.....	89
II.6.4.	Dosage de la concentration en phosphate.....	90
II.6.5.	Détection et mesure de la concentration en pristinamycines	90
II.6.6.	Mesure de la concentration en glutamate et arginine par HPLC	91
II.7.	Observation morphologique	93
II.7.1.	Observation sous microscope	93

II.7.2.	Mesure du diamètre des pelotes par diffraction laser	93
II.8.	Analyse par microscopie confocale.....	95
II.8.1.	Marquage fluorescent.....	95
II.8.2.	Microscopie confocale	95
II.9.	Calculs des vitesses spécifiques expérimentales de croissance, consommation et production.....	97
II.9.1.	Vitesse spécifique de croissance	97
II.9.2.	Vitesse spécifique de consommation des substrats.....	97
III.	Validité des paramètres de puissance dissipée et de coefficient volumique de transfert d'oxygène lors du passage de fioles d'Erlenmeyer au réacteur mécaniquement agité	103
III.1.	Analyse et comparaison des environnements hydrodynamiques	105
III.1.1.	Paramètres hydrodynamiques macroscopiques.....	105
III.1.2.	Ecoulements macroscopiques	129
III.2.	Influence de l'agitation et de l'aération en réacteur mécaniquement agité sur la réponse physiologique de <i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ 40338.....	134
III.2.1.	Impact de l'agitation mécanique sur la croissance microbienne et la morphologie en réacteur mécaniquement agité.....	134
III.2.2.	Impact de l'agitation mécanique sur la production d'antibiotiques en réacteur mécaniquement agité.....	137
III.2.3.	Influence de l'agitation mécanique sur la consommation de substrats en réacteur mécaniquement agité.....	139
III.2.4.	Evolution de la concentration en phosphate et en ions ammonium.....	141
III.3.	Influence de l'agitation mécanique sur le transfert en oxygène en réacteur mécaniquement agité.....	142
III.4.	Validité des critères d'extrapolation de la fiole d'Erlenmeyer au réacteur mécaniquement agité.....	144
III.4.1.	Réconciliation des données	144
III.4.2.	Discussion.....	153

III.5.	Conclusion.....	155
IV.	Conception et mise en œuvre d'un réacteur gazosiphon pour la production de pristinaamycines par <i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ 40338	159
IV.1.	Conception du réacteur à gazosiphon.....	161
IV.1.1.	Choix des conditions opératoires du réacteur et caractérisation globale	161
IV.1.2.	Simulation numérique des écoulements au sein du réacteur à gazosiphon	164
IV.2.	Résultats : Ecoulements et caractéristiques hydrodynamiques	176
IV.2.1.	Caractéristiques de la phase liquide.....	176
IV.2.2.	Caractéristiques de la phase gaz	180
IV.2.3.	Transfert d'oxygène gaz-liquide	182
IV.2.4.	Grandeurs globales simulées.....	183
IV.3.	Etudes cinétiques.....	185
IV.3.1.	Impact de l'agitation pneumatique sur la croissance microbienne en réacteur gazosiphon	185
IV.3.2.	Impact de l'agitation pneumatique sur la production d'antibiotiques en réacteur gazosiphon	186
IV.3.3.	Influence de l'agitation pneumatique sur la consommation de substrats en réacteur gazosiphon	188
IV.3.4.	Influence de l'agitation pneumatique sur la morphologie en réacteur mécaniquement agité.....	190
IV.3.5.	Influence de l'agitation pneumatique sur les profils temporels d'oxygène dissous	195
IV.4.	Discussion et conclusion	196
V.	Etude du phénomène de déclenchement précoce de la production de pristinaamycines.	203
V.1.	Comparaison du comportement cinétique de <i>S. pristinaespiralis</i> lors de cultures en fiole, en STR et en airlift.....	204
V.1.1.	Influence de la nature du bioréacteur sur la croissance microbienne	205

V.1.2.	Influence de la nature du bioréacteur sur la consommation de substrats	206
V.1.3.	Influence de la nature de bioréacteur sur la production de pristinamycines	208
V.1.4.	Impact de la nature du bioréacteur sur la morphologie bactérienne	209
V.1.5.	Discussion	211
V.2.	Influence des variations de concentrations en oxygène dissous sur le déclenchement de la production de pristinamycines	212
V.2.1.	Evolution de la concentration en oxygène dissous lors de la préculture en milieu ICS	212
V.2.2.	Adaptation du protocole de culture afin d'étudier l'influence de la variation de la concentration en oxygène dissous entre la fin de la préculture et la culture	214
V.2.3.	Influence des variations de concentration en oxygène dissous lors du procédé de production de pristinamycines par <i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ40338	215
V.2.4.	Discussion et conclusion	224
V.3.	Influence de la composition du milieu de culture sur le déclenchement de la production de pristinamycines	225
V.3.1.	Influence de la composition du milieu de culture sur la croissance <i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ 40338	226
V.3.2.	Influence de la composition du milieu de culture sur la production de pristinamycines par <i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ 40338	227
V.3.3.	Influence de la composition du milieu de culture sur la consommation des substrats par <i>S. pristinaespiralis</i> DSMZ40338	228
V.3.4.	Influence de la composition du milieu de culture sur la consommation en oxygène	231
V.3.5.	Discussion et conclusion	233
VI.	Conclusion générale et perspectives	237
VI.1.	Conclusion	237
VI.2.	Perspectives	241
	Références bibliographiques	247

Nomenclature

Variables

a, a_b	Aire interfaciale de bulle	m^{-1}
C	Couple sur l'arbre de l'agitateur	N.m
C_D	Coefficient de traînée	
C_L	Coefficient de lift	
d	Diamètre maximal de fiole	m
d_0	Diamètre orbital de la table d'agitation	m
d_b	Diamètre de bulle	m
d_h	Grand diamètre de bulle	m
d_p	Diamètre de particule ou de pelote	m
D	Diamètre de l'agitateur	m
D_{gl}	Tenseur de dispersion gaz-liquide	$m^2 \cdot s^{-1}$
D_{iff}	Diffusivité moléculaire	$m^2 \cdot s^{-1}$
F_{ij}	Force d'interaction volumique entre phases	$N \cdot m^{-3}$
F_{ST}	Force volumique de tension de surface	$N \cdot m^{-3}$
g	Gravité	$m \cdot s^{-2}$
h	Hauteur de liquide dans la fiole en l'absence d'agitation	m
h_l	Hauteur de liquide dans la fiole	m
K_{kLI}	Constante de modèle	
K_{kLI}	Constante de modèle	
$k_L a$	Coefficient volumique de transfert d'oxygène	s^{-1}, h^{-1}
l_K	Echelle de Kolmogorov	m
N	Fréquence d'agitation	s^{-1}
$[O_2]$	Concentration en oxygène dissous	$g \cdot L^{-1}, \%$ $mol \cdot L^{-1}, \%$

$[O_2]^*$	Concentration de saturation en oxygène dissous	$g.L^{-1}$ $mol.L^{-1}, \%$
OTR	Oxygen Transfer Rate	$mol.L^{-1}.s^{-1}$
OUR	Oxygen Uptake Rate	$mol.L^{-1}.s^{-1}$
p	Pression	Pa
P	Puissance dissipée	W
P_g	Puissance dissipée en liquide aéré	W
P / V	Puissance volumique	$W.m^{-3}$
$[Prist]$	Concentration en pristinamycines	$mg.L^{-1}$
$[Prist]_{max}$	Concentration maximale en pristinamycines	$mg.L^{-1}$
$q_{arginine}$	Vitesse spécifique de consommation de l'arginine	$g.h^{-1}.g^{-1}$
$q_{glucose}$	Vitesse spécifique de consommation du glucose	$g.h^{-1}.g^{-1}$
$q_{glutamate}$	Vitesse spécifique de consommation du glutamate	$g.h^{-1}.g^{-1}$
q_{O_2}	Vitesse spécifique de consommation de l'oxygène	$mol.s^{-1}.g^{-1}$
q_p	Vitesse spécifique de production	$mg.h^{-1}.g^{-1}$
q_s	Vitesse spécifique de consommation du substrat	$g.h^{-1}.g^{-1}$
Q_g	Débit de gaz	$m^3.s^{-1}$
s	taux de renouvellement de la surface d'échange gaz-liquide	s^{-1}
T	Diamètre de la cuve	m
t	Temps	s, h
t_C	Temps de circulation	s
t_M	Temps de mélange	s
u	Vitesse	$m.s^{-1}$
U_g	Vitesse superficielle de gaz	$m.s^{-1}$
U_t	Vitesse terminale ascensionnelle	$m.s^{-1}$
V_L	Volume de liquide	m^3
X	Concentration en biomasse	$g.L^{-1}$
X_{max}	Concentration maximale en biomasse	$g.L^{-1}$

Variables grecques

α	Fraction volumique	*
----------	--------------------	---

ε	Taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}, \text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$
ψ	Facteur de forme	*
μ	Viscosité dynamique	$\text{Pa} \cdot \text{s}$
μ	Vitesse spécifique de croissance	h^{-1}
ν	Viscosité cinématique	$\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$
ρ_g	Masse volumique du gaz	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
ρ	Masse volumique	$\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$
σ	Tension de surface	$\text{N} \cdot \text{m}^{-1}$
τ_e	Temps d'exposition au transfert gaz-liquide	m

Nombres adimensionnels

$E\ddot{o}$	Eötvös	$E\ddot{o}' = \frac{g \cdot (\rho_g - \rho_l) \cdot d_b^2}{\sigma}$
$E\ddot{o}'$	Eötvös modifié	$E\ddot{o}' = \frac{g \cdot (\rho_g - \rho_l) \cdot d_h^2}{\sigma}$
Fr	Froude	$Fr = \frac{N^2 D}{g}$
Fr_a	Froude axial	$Fr_a = \frac{(2 \cdot \pi \cdot N)^2 \cdot d_0}{2 \cdot g}$
Fr_T	Froude (Tissot et al., 2010)	$Fr_T = \frac{2 \cdot \pi \cdot N \cdot (d_0 + d_i) / 2}{\sqrt{g \cdot d}}$
Mo	Morton	$Mo = \frac{\mu_l^4 \cdot g \cdot (\rho_g - \rho_l)}{\rho_l^2 \sigma^3}$
Ne'	Newton modifié	$Ne' = \frac{P}{\rho N^3 d^4 V^{1/3}}$
Np	Nombre de puissance	$Np = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5}$
Nt_M	Nombre de mélange	$Nt_M = N \cdot t_M$
Ph	Nombre de phase	$Ph = \left(\frac{d_0}{d} \right) \cdot (1 + 3 \cdot \log(\text{Re}_f))$

Re	Reynolds d'agitation	$\text{Re} = \frac{\rho ND^2}{\mu}$
Re _p	Reynolds particulaire	$\text{Re}_p = \frac{ u_g - u_l \cdot d_p}{\nu_l}$
Re _f	Reynolds du film	$\text{Re}_f = \left(\frac{\rho \cdot N \cdot d^2}{\mu} \right) \cdot \frac{\pi}{2} \cdot \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\pi}{4} \cdot \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right)^2$

σ_{gl} Nombre de Prandtl de dispersion

Abréviations

CFD	Computational Fluid Dynamics (Simulation numérique des écoulements)
PIV	Particle Image Velocimetry, Vélocimétrie à Images de Particules
R	Turbine Rushton
RANS	Reynolds Averaged Navier-Stokes
RPM	Rotation par minute
STR	Stirred Tank Reactor, bioréacteur de type cuve agitée et aérée
VOF	Volume Of Fluid

Unités

g	gramme
h	heure
kb	kilobase
L	litre
M	molaire
min	minute
mM	millimolaire
nm	nanomètres
s	seconde
UE	unité enzymatique

W	Watt
°C	degré Celsius
°K	degré Kelvin

Introduction

générale

Ce travail s'inscrit dans la continuité de travaux dans lesquels le LRGP est impliqué depuis 1997. *Streptomyces pristinaespiralis* est une **bactérie filamenteuse**, appartenant au groupe des actinomycètes et connue comme étant **productrice de molécules antibiotiques, les pristinamycines**. Ces dernières, constituant un groupe de onze molécules complexes sont actuellement commercialisées sous le nom de Pyostacine[®] par la société SANOFI.

Les premiers travaux de thèse (Corvini, 2000 ; Saffroy, 2006), menés en bioréacteurs mécaniquement agités, ont permis, par des études macro et microcinétiques, de préciser le comportement de *S. pristinaespiralis* au cours du procédé de production de pristinamycines. La production de pristinamycines a ainsi pu être corrélée à des modifications de flux métaboliques et des variations du pH intracellulaire (Corvini, 2000). L'importance de l'état physiologique des cellules à l'issue de l'étape de préculture, pour la production ultérieure de pristinamycines, a également pu être démontrée (Saffroy, 2006).

Lors de leur culture en bioréacteur, les biocatalyseurs (microorganismes, cellules) exhibent une **réponse physiologique qui dépend du microenvironnement biochimique et physique** qu'ils rencontrent à un temps donné au sein du bioréacteur. Ce microenvironnement est caractérisable par un ensemble de variables généralement mesurées à l'échelle globale du bioréacteur : pH, température, concentration en substrats, puissance dissipée volumique, vitesse en bout de pale. Localement, néanmoins, ce microenvironnement peut être caractérisé par des grandeurs plus pertinentes car plus représentatives de la réalité : flux de transfert de substrats de la phase liquide au biocatalyseur, contraintes hydromécaniques à l'échelle de la cellule, micro-hétérogénéités des concentrations. En raison de leur **morphologie spécifique** (filaments, enchevêtrements ou pelotes), les microorganismes filamenteux sont, sans aucun doute, parmi les microorganismes les plus sensibles aux conséquences de l'hydrodynamique. Ainsi l'influence de l'agitation sur *S. pristinaespiralis* a fait l'objet du travail de thèse de Mehmood (2011). Contrairement aux travaux précédents de l'équipe, cette étude a été réalisée uniquement en fiole d'Erlenmeyer non-chicanées. Ce système de culture présente, en effet, l'avantage de permettre un grand nombre d'expériences en parallèle, d'être d'un coût et d'une mise en œuvre réduits et de présenter une hétérogénéité de microenvironnements moins marquée qu'en réacteur mécaniquement agité. De plus, de nombreuses corrélations permettant le calcul des paramètres caractéristiques de l'hydrodynamique ont déjà été publiées. Dans ce système de culture, il a été montré que le déclenchement de la production des pristinamycines résultait, à la fois, d'une limitation en substrats azotés et d'un apport en oxygène suffisant (k_{La}

> 100 h⁻¹). Par ailleurs, le découplage de l'agitation et de l'aération a permis de montrer que la taille des pelotes, contrôlée par la turbulence, influençait directement la consommation d'oxygène et la quantité de pristinamycines produites.

A l'échelle industrielle, le réacteur mécaniquement agité est le système le plus utilisé. Mais d'autres systèmes, tels que les colonnes à bulles et les réacteurs gazosiphon, peuvent également être rencontrés. Or, **le passage de la fiole d'Erlenmeyer à ce type de réacteur engendre d'importantes ruptures en termes de géométrie** qui mettent à mal l'utilisation des critères classiques d'extrapolation en bioprocédés (dissipation volumique, $k_L a$). Les variabilités de performances de transfert d'oxygène et d'homogénéisation en résultant peuvent avoir d'importantes conséquences sur le métabolisme et la croissance cellulaire lors de la montée en échelle du procédé (Cui et al, 1997). Dans le cas de microorganismes filamenteux, les dérives de réponse peuvent être amplifiées du fait de la sensibilité morphologique aux contraintes extérieures précédemment évoquées. Ainsi, il peut s'avérer nécessaire **d'étudier spécifiquement la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis*** dans chaque géométrie de bioréacteur et d'établir des lois d'extrapolation valides, basées sur une caractérisation fine des environnements physico-chimiques.

Ce travail de thèse s'inscrit donc dans la continuité immédiate du travail de Mehmood (2011). Son principal objectif est **d'appréhender l'influence de l'hydrodynamique et des phénomènes de transport spécifiques dans un réacteur mécaniquement agité et un réacteur gazosiphon sur la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis*** (croissance, consommations, production et morphologie). Les principales questions initiales auxquelles ce travail s'est attaché à trouver une réponse sont donc les suivantes :

- Quels sont les paramètres hydrodynamiques les plus valides pour extrapoler le procédé de production de pristinamycines de la fiole d'Erlenmeyer au réacteur mécaniquement agité ?
- La réponse physiologique de *S. pristinaespiralis* lors de sa culture en réacteur de type gazosiphon, dont l'hydrodynamique est réputée moins contraignante, présente-t-elle des similitudes avec celle observée en réacteur mécaniquement agité ?

A ces questions initialement identifiées s'est ajoutée une problématique issue d'observations expérimentales inattendues :

- Quels paramètres nutritionnels et hydrodynamiques pourraient expliquer un déclenchement précoce, en phase de croissance, de la production de pristinamycines ?

Afin de répondre à ces questions, des cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 ont été réalisées en réacteur mécaniquement agité sous différentes conditions d'agitation et d'aération pour des valeurs de puissances dissipées comprises entre 0,12 et 4,9 kW.m⁻³. Un réacteur gazosiphon a également été conçu spécifiquement pour ce travail.

Le document issu de **ce travail de thèse se décline ainsi en cinq chapitres**. Le **premier chapitre** est une revue bibliographique rédigée en deux parties principales. La première reprend les connaissances actuelles sur les bactéries du genre *Streptomyces* et s'attache notamment à décrire les différents types de morphologies adoptées par ces bactéries au cours des procédés de production de métabolites secondaires et leur impact sur la performance de ces procédés. La seconde partie est présentée sous la forme d'un article publié dans le journal *Bioprocess and Biosystems Engineering*. Après un rappel des connaissances sur la description de l'hydrodynamique des réacteurs aérés, cet article décrit l'influence de l'hydrodynamique des phénomènes de transport sur la physiologie des bactéries du genre *Streptomyces*.

Le **second chapitre** décrit la souche bactérienne utilisée, les milieux ainsi que les modes de culture employés, les protocoles expérimentaux utilisés pour la mesure des concentrations en biomasse, en substrats, en pristinamycines et la caractérisation de la morphologie. Une description des réacteurs utilisés au cours de cette étude est également présente dans ce chapitre.

Le **troisième chapitre** débute par une description comparative des environnements hydrodynamiques en réacteur aéré mécaniquement agité et en fiole d'Erlenmeyer (dissipation volumique, coefficient volumique de transfert d'oxygène, temps de mélange). Une mise en culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 a ensuite été réalisée en réacteur mécaniquement agité, sous différentes conditions d'agitation, afin de mesurer l'impact d'une hydrodynamique différente sur la physiologie de la bactérie. Les réponses ont ensuite été comparées avec celles obtenues au cours du travail précédent en fiole d'Erlenmeyer (Mehmood, 2011). La validité des critères d'extrapolation classiquement utilisée est discutée et de nouveaux critères sont proposés sur la base des observations expérimentales.

Le **quatrième chapitre** est dédié à l'étude de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 en bioréacteur gazosiphon. L'utilisation de deux diffuseurs de gaz différents a permis d'imposer

des conditions d'agitation pneumatique différentes. La première partie du chapitre décrit les caractéristiques du réacteur utilisé spécifiquement pour cette étude. Les écoulements dans ce réacteur ont ensuite été simulés numériquement afin de mieux caractériser les contraintes subies par les bactéries lors de leur mise en culture dans ce réacteur. Ce chapitre se clôture par une analyse des cinétiques bactériennes mesurées lors de cultures dans ce réacteur mais aussi par une analyse de la viabilité des bactéries au sein des pelotes, en fonction de l'agitation imposée.

Lors de toutes les cultures réalisées au cours de ce travail, que ce soit en réacteur mécaniquement agité ou en réacteur gazosiphon, il a été constaté un déclenchement de la production de pristinamycines pendant la phase de croissance de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et sans qu'aucune limitation en substrat azoté ne soit mesurée. Ce comportement atypique est à l'origine du **cinquième** et dernier **chapitre** de ce document. Plusieurs pistes ont été explorées : l'influence de la nature du réacteur (fiolle, réacteur mécaniquement agité ou gazosiphon), l'influence des variations en oxygène, notamment entre la fin de la préculture et la culture, et enfin, la composition du milieu de culture (nature et concentration des substrats azotés).

La **conclusion générale** reprend les principaux résultats obtenus au cours de ce travail et s'achève par **les perspectives** qui en découlent.

Etude

Bibliographique

I. Etude bibliographique

I.1. Le genre *Streptomyces*

I.1.1. Généralités sur le genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces*, est un des genres bactériens les plus étudiés de l'ordre des Actinomycètes, qui comprend également de nombreux genres dont *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* et *Frankia* (Ventura et al., 2007).

Le genre *Streptomyces* appartient à la famille de Streptomycètes dont il représente le genre majoritaire (95,34 %). Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses trouvées principalement dans les sols. Auparavant classées parmi les champignons sur la base de la morphologie de ses colonies, il s'agit cependant de bactéries filamenteuses encore répertoriées comme eubactéries mycéliennes (Breton et al., 1989).

Les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies strictes, Gram positif, qui possèdent un ADN chromosomique linéaire de grande taille (> 8 Mb en moyenne) ayant une composition en bases G et C élevée (% GC de 63 à 78) (Madigan et Martinko, 2005). D'un point de vue génétique, les *Streptomyces* sont sujettes à une grande instabilité (nombreuses régions d'amplification et de délétion) (Dary et al., 1992 ; Aigle et al., 1996).

Ces bactéries présentent aussi un cycle de différenciation morphologique et métabolique unique chez les Procaryotes (Drouin, 1996 ; Seghezzi, 2009). Les métabolites synthétisés au cours du processus de différenciation morphologique présentent une extraordinaire variété de structures chimiques et d'activités biologiques, conférant ainsi aux *Streptomyces* une importance majeure sur le plan industriel.

Les *Streptomyces* peuvent utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 35°C. Ils sont en majorité mésophiles, mais il existe quelques souches psychrophiles ou thermophiles. La gamme de pH optimale est comprise entre 6,5 et 8,0.

Le genre *Streptomyces* est représenté par un grand nombre d'espèces (plus de 500 répertoriées en 1986 dans le « Bergey's manual »). Quelques espèces sont pathogènes pour les hommes et les animaux, les autres sont phytopathogènes.

Les différentes espèces de *Streptomyces* sont identifiées et classées par taxonomie numérique sur une base de critères phénotypiques car, du fait de leur instabilité génétique, une taxonomie basée uniquement sur le génome et sa structure serait difficilement réalisable.

A titre d'exemple, l'identification de la souche de *Streptomyces* T-4 produisant de la tunicamycine a été effectuée sur la base de caractéristiques culturelles, morphologiques, physiologique et biochimiques en parallèle d'une analyse de l'ADNr 16s (Atta, 2012). Par ailleurs, Cuesta et al. (2012) ont isolé 49 souches d'Actinomycètes d'un sol calcaire. Les souches ont été caractérisées aussi bien par l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S que par des procédures phénotypiques.

I.1.2. Antibiotiques produits par les Streptomyces

Actuellement les *Streptomyces* sont responsables de la production de près des deux tiers des antibiotiques commercialisés ainsi que de très nombreuses molécules ayant une activité sur des systèmes eucaryotes comme :

- ✓ Des anticancéreux comme la bléomycine produite par *Streptomyces verticillus* (Shen et al., 2002),
- ✓ Des immunosuppresseurs comme FK-506 (ou tacrolimus) produits par *Streptomyces tsukubaensis* (Wallemacq et Reding, 1993),
- ✓ Des antifongiques (nystatine produite par *Streptomyces noursei*) (Nedal et al., 2007),
- ✓ Des herbicides comme la phosphinothricine produite par *Streptomyces viridochromogenes* (Blodgett et al., 2005).
- ✓ Des insecticides, tels que les avermectines produites par *Streptomyces avermitilis* (Yong et Byeon, 2005).
- ✓ Des anti-helminthiques et des molécules anti-diabète (Challis et Hopwood, 2003) ou anti-obésité telles que la lipastine produite par *Streptomyces toxytricini* (Ellrichmann et al., 2007).

Le Tableau I-1 présente quelques antibiotiques produits par des *Streptomyces* ainsi que leurs cibles (Brock, 1979).

Tableau I-1. Quelques exemples d'antibiotiques synthétisés par des bactéries du genre *Streptomyces*.

Classe chimique	Antibiotique	Producteur	Cible
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>S. griseus</i>	La plupart des Gram-
	Spectomycine	<i>S. spp</i>	<i>M. tuberculosis</i>
	Néomycine	<i>S. fradiae</i>	Large spectre
Tétracyclines	Tétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Large spectre Gram+ et –
	Chlortétracycline	<i>S. aureofaciens</i>	Idem
Macrolides	Spiramycine	<i>S. ambofaciens</i>	<i>Streptococcus</i> , <i>Neisseria</i> et <i>Mycoplasma</i>
	Erythromycine	<i>S. erythreus</i>	La plupart des Gram + Anaérobies strictes
	Clindamycine	<i>S. lincolnensis</i>	
Polyènes	Nystatine	<i>S. noursei</i>	Levures : <i>Candida</i>
	Amphocétine B	<i>S. nodosus</i>	Champignons
Sans classe	Chloramphénicol	<i>S. venezuelae</i>	Large spectre et <i>Salmonella typhi</i>

En effet, plus de 10000 composés à action antibiotique ont été répertoriés jusqu'à présent dont près de 4000 rien que pour le genre *Streptomyces*. Les gènes de biosynthèse des antibiotiques sont généralement organisés en clusters (regroupement de gènes). A ces derniers sont souvent associés les gènes de résistance à l'antibiotique produit, ce qui permet une co-translation pour une protection plus efficace.

La production d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires exige souvent des cultures avec une substance nutritive limitante pour la croissance (Bu'Lock, 1974 ; Bushell, 1983). En général, le métabolisme secondaire débute lorsque le taux de croissance cellulaire diminue ; ceci peut conduire, en culture discontinue, à un découplage entre croissance et production de

l'antibiotique (Liao et al., 1995). Néanmoins, lors de cultures de *Saccharopolyspora erythrae*, la production d'érythromycine est associée à la croissance en limitation ou non d'oxygène. Ceci a été observé aussi bien en fioles agitées qu'en réacteur mécaniquement agité (Clark et al., 1995).

Ainsi, des programmes de recherche industrielle de détection de nouveaux métabolites microbiens sont souvent conçus sur la base d'essais de différentes substances nutritives limitantes pour la croissance (Nisbet, 1982). Ces diverses contraintes exercées sur la cellule sont autant de chances de découvrir de nouveaux métabolites secondaires ; cette démarche est une de celles destinées à fournir de nouvelles molécules pour l'industrie pharmaceutique (Larpent et Sanglier, 1989).

I.1.3. Les pristinamycines

Les pristinamycines sont produites par *Streptomyces pristinaespiralis*, une bactérie isolée d'un échantillon de terre. Ces molécules appartiennent au groupe d'antibiotiques appelés synergistines (aussi streptogramines ou peptolides) (Cocito et al., 1997). Les macrolides, les lincosamines et les synergistines constituent la famille des antibiotiques MLS. Toutefois, ils sont très différents en structure et en composition chimique (Larpent et Sanglier, 1989).

Les synergistines sont produites principalement par des *Streptomyces* et sont constituées de deux composantes sécrétées par le même microorganisme : A (lactones macrocycliques de nature neutre) et B (molécules cycliques de nature depsipepsidiques à caractère amphotère). (Cocito et al., 1997). Les pristinamycines I (groupe de molécule B) et les pristinamycines II (groupe de molécule A) ont séparément une activité bactériostatique et agissent ensemble pour développer une activité bactéricide. L'action de ces molécules se renforce respectivement. Ainsi, la solution de pristinamycines commerciales est un mélange de 20 à 30 % de pristinamycines I et de 70 à 80 % de pristinamycines II (Preud'homme et al., 1968). Il existe neuf pristinamycines I (PI_A à PI_I), dont le principal est la pristinamycine I_A et deux pristinamycines II (PII_A et PII_B) dont la principale est la pristinamycine II_A (Figure I-1).

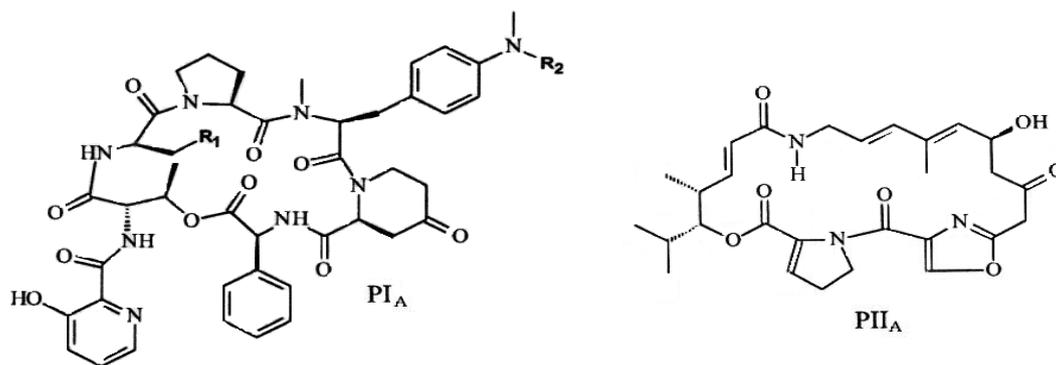


Figure I-1. Structures des pristinamycine I_A et II_A. Avec R₁ et R₂ : CH₃.

L'effet bactériostatique ou bactéricide des pristinamycines s'exerce durant la synthèse protéique et est localisée au niveau de la fraction 50 S des ribosomes. La boucle du peptidyl-transférase est bloquée (Porse et Garrett, 1999) ce qui a pour conséquence des polypeptides incomplets (Tenson et al., 2003). Elles sont actives contre les coques à Gram positif et négatif, contre les divers bacilles à Gram positif et quelques bacilles à Gram négatif anaérobies (Lissac et al., 1977).

Une première production de pristinamycines en réacteur discontinu a été réalisée en 1961 suite à des recherches à l'aide de mutants hyperproducteurs (dépôt de brevet de Rhône-Poulenc). Aujourd'hui, les pristinamycines sont commercialisées sous forme de comprimés par le groupe SANOFI sous le nom PYOSTACINE®.

I.2. Morphologie des microorganismes filamenteux en cultures submergées

Comme la plupart des microorganismes filamenteux, les bactéries du genre *Streptomyces* présentent plusieurs types de morphologie, ou morphotypes, lors de leur culture en milieu liquide. Les morphologies habituelles observées dans les fermentations submergées sont classées sous trois formes : des hyphes, branchés ou non, du mycélium dispersé et ramifié appelé enchevêtrement (clump) ou d'agrégats constitués de réseaux d'hyphes ramifiés et entrelacés appelés pelotes (Figure I-2).

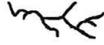
Filament libre non branché	→		40 μm < périmètre ≤ 600 μm Nombre d'extrémités = 2
Filament libre branché	→		40 μm < périmètre ≤ 600 μm Nombre d'extrémités > 2
Enchevêtrement	→		600 μm < périmètre < 12,000 μm 100 μm < périmètre apparent ≤ 950 μm
Pelote	→		950 μm < périmètre apparent < 7,200 μm

Figure I-2. Différents types de morphologie de microorganismes filamenteux (*Streptomyces olindensis*) en culture submergée avec leurs principales caractéristiques (Pamboukian et al., 2002).

Les pelotes peuvent être constituées d'agglomérats sphériques ou ellipsoïdaux. Il existe différentes formes de pelotes : à petit noyau plus ou moins échevelé, ou à gros noyau peu ou pas échevelé.

La structure de la pelote peut être variable selon la compacité des hyphes entrelacés. Une forte compacité conduira à la formation de pelotes compactes, souvent caractérisées par une surface lisse alors qu'une compacité légère mènera à des pelotes lâches avec une surface « chevelue » (Li et al., 2000; Papagianni, 2004). La Figure I-3 montre la diversité des formes obtenues chez le champignon *Paecilomyces tenuipes* dans différents types de culture. L'enchevêtrement est le type de morphologie principal en réacteur de type airlift (Figure I-3 a). En revanche, la pelote est la morphologie observée en réacteur de type STR, la pelote ayant tendance à être plus compacte avec l'augmentation de la vitesse d'agitation de 150 à 400 rpm (Figure I-3 b,c) (Xu et al., 2006).



Figure I-3. Vues microscopiques de *Paecilomyces tenuipes* C240 en réacteur airlift (a) ; réacteur mécaniquement agité à 150 rpm (b); à 400 rpm (c).

On considère que les pelotes sont formées selon trois mécanismes principaux :

- Une création de pelote à partir d'une seule spore comme cela a été montré chez *S. tendae* et *S. griseus*, (Nielsen, 1996).
- Une agglomération initiale de spores qui va conduire à la formation de pelotes dès le début de la germination de ces spores agrégées (Whitaker, 1992 ; Posch et al., 2013).

Un développement de pelotes à partir d'hyphes détachés d'autres pelotes (Cui et al., 1998).

Les mécanismes d'agrégation des éléments cellulaires en pelote seraient liés à leurs propriétés de surface (Vecht-Lifshitz et al., 1989).

I.2.1. Facteurs influençant la formation et le type de morphologie en culture

Différents facteurs peuvent influencer le développement morphologique de cultures de filamenteux, entre la forme mycélienne et la pelote (Krull et al., 2013). Ainsi, le pH influence la charge de surface de la cellule et donc influence sa capacité d'agrégation par le biais des interactions électrostatiques (Dynesén et al., 2003). Par exemple, il a été observé que, dans des conditions optimales de pH pour la croissance (pH 7 à 8), le diamètre de pelote de *Streptomyces tendae* était plus petit (0,1 – 0,2 mm) que celui de cellules cultivées à pH plus faible (pH 4) (1,2 à 1,5 mm) (Vecht-Lifshitz et al., 1989).

Dans des conditions de températures d'incubation élevées (31 à 32°C) une forme lâche de pelote est observée alors que des températures plus faibles (26 à 30°C) entraînent la formation de pelotes compactes chez *S. tendae* (Vecht-Lifshitz et al., 1989). La même observation a été notée par Kim et al. (2000) lors de ses travaux sur *S. griseus*.

La composition du milieu de culture peut également affecter la formation de pelotes (Whitaker, 1992). Jonsbu et al. (2002) ont montré que le milieu contenant du fructose comme source de carbone conduit à des enchevêtrements de *S. noursei* de plus petites tailles par rapport à des cultures dont le milieu contient du glucose.

Choi et al. (2000) ont montré que lorsque *S. fradiae* était cultivée sur un milieu contenant des ions ammonium comme source d'azote, la pelote était 8 fois plus grande que lors d'une culture sur milieu contenant un mélange d'acides aminés. La formation de pelote chez *S. avermitilis* est sous l'influence de la nature et de la concentration de la source d'azote du fait d'un impact direct de la concentration de celle-ci sur la croissance : une forte croissance étant combinée à une diminution de l'agrégation des hyphes (Yin et al., 2008).

La disponibilité de l'oxygène, appauvri dans des conditions privilégiant des taux de croissance élevés, influence également la morphologie des *Streptomyces* notamment en empêchant la formation de pelotes comme indiqué chez *S. tendae* (Vecht-Lifshitz et al., 1990). Il a été montré, par ailleurs, que des interactions hydrophobes entre les hyphes pouvaient être à l'origine de la formation des pelotes. Cet impact de l'hydrophobicité a été biologiquement montré grâce à l'utilisation de bio-floculants (Vecht-Lifshitz et al., 1990 ; Amanullah et al., 2001).

La présence d'ions dans le milieu de culture peut également influencer la formation de pelotes. Braun et Vecht-Lifshitz (1991) ont montré que l'ajout de polycations induit l'agrégation contrairement à l'ajout de polyanions qui l'empêche. La même observation a été faite par Okba et al. (1998) lors de l'ajout d'ions comme Mn^{2+} ou Ca^{2+} qui induisent la formation de pelote dans des cultures de *Streptomyces azureus*. En revanche, Galzebrook et al. (1992) montrent que la force ionique n'influence pas l'agrégation de *Streptomyces akiyoshiensis*.

D'autre part, l'addition de substances variées peut agir sur la morphologie adoptée par les microorganismes filamenteux. L'addition d'éléments minéraux comme des particules de titanate dans le milieu de culture peut influencer le processus d'agrégation et de formation de pelotes. Driouch et al. (2012) ont montré que l'interaction entre les microorganismes et les micro-particules créées des pelotes plus petites et fortement actives. Cependant, par contraste avec le titanate, l'addition de talc et d'alumine aux cultures d'*Aspergillus niger* et à d'autres microorganismes filamenteux mène à la formation de mycélium libre et même à la formation de fragments d'hyphes. Le talc et l'alumine ajoutés au milieu ont été retrouvés à l'extérieur des cellules fongiques, dans le milieu de culture. A l'inverse, les particules de titanate sont prises au piège à l'intérieur des structures fongiques. La formation de pelotes a été constatée même à de hautes concentrations de titanate.

D'autres substances solubles peuvent également avoir une influence sur l'agrégation des microorganismes. Selon Okba et al. (1998), les polymères et les tensio-actifs induisent des répulsions électrostatiques entre les cellules ou les spores qui empêchent l'agrégation initiale dans l'inoculum et par conséquent l'interaction et l'agrégation de la biomasse pendant la culture. Dobson (2008) a montré qu'une augmentation de la concentration de silicone (antimousse) de 0.1 à 5 % conduit à une diminution du diamètre moyen des pelotes de *Streptomyces hygroscopicus* avec une augmentation de nombre de pelotes de petite taille. En

revanche, Vecht-Lifshitz et al. (1989) montrent que l'addition de tensio-actifs comme le triton X-100 et l'acide pluronique induisent la formation de pelotes de *S. tendae* dans des conditions qui ne le permettent pas habituellement.

Enfin, le procédé de mise en culture, comme la concentration initiale en cellules ou en spores, peut affecter la morphologie adoptée ultérieurement au cours de la culture (Posch et al., 2013). Whitaker, (1992) a ainsi montré qu'une forte concentration initiale en spores induit l'apparition de formes filamenteuses alors que de plus faibles concentrations conduisent à la formation de pelotes chez plusieurs Actinomycètes. De même, il a été noté par Vecht-Lifshitz et al. (1990) qu'une augmentation de la concentration initiale en cellules provoque une diminution de la taille moyenne de pelote de *S. tendae*. Cependant, dans une gamme de concentration en spores comprise entre 10^7 et 10^{10} spores/m³, la taille des pelotes ne change pas et reste à un diamètre moyen de l'ordre de 1 mm. De la même façon, la taille des pelotes d'*Aspergillus awamori*, producteur de xylanases, diminue avec l'augmentation de la concentration initiale en spores (Siedenberg et al., 1998). Enfin, en utilisant différentes concentrations initiales en spores (entre $3,2 \cdot 10^5$ et $3,2 \cdot 10^7$ spores par litre) de *Schizophyllum*, différentes tailles de pelotes ont pu être obtenues lors de cultures en fiole (Shu et al., 2005).

De plus, trois mécanismes physiques peuvent conditionner la formation de pelotes : le transfert en oxygène (Sturm et al., 2008), le degré de mélange (Ayazi Shamlou et al., 1994 ; Wan et al., 2011 ; Weyand et al., 2009) et la force mécanique (Tay et al., 2001 ; Amanullah et al., 2000 ; Tamura et al., 1997). Les rôles respectifs de ces trois mécanismes sont toujours controversés en raison de l'interdépendance de ces paramètres (cf. paragraphe I.4)

I.2.2. Influence de la morphologie sur la production de métabolites par des microorganismes filamenteux

Il a été montré que la morphologie adoptée par les microorganismes filamenteux joue un rôle essentiel dans la production de métabolites et l'étude de son influence sur les cinétiques de production est un préalable avant toute application industrielle.

Certains types de morphologie sont associés à la production de certains métabolites. Par exemple, la pelote est la forme de morphologie nécessaire pour la production d'acide citrique par *A. niger* (Gibbs et al., 2000) et pour la production de β -glucanes par des espèces de *Sclerotium* (Sandford, 1979). En revanche, des mycéliums sous forme libre sont nécessaires pour la production de glucoamylase par *Aspergillus awamori* (Ruohang et al., 1995).

Dans le cas de la production de métabolites secondaires par de nombreuses espèces de *Streptomyces*, la forme mycélienne est souvent requise pour débiter la production (Whitaker, 1992). En revanche, Jonsbu et al. (2002) montrent que la production de nystatine par *S. noursei* NG7 semble être reliée à la présence de petites pelotes. La même observation a été faite par Saffroy (2006) et Mehmood (2011) pour la production de pristinamycines par *Streptomyces pristinaespiralis pr11*.

Cependant, selon le type de produit désiré, la morphologie la plus favorable peut être différente chez un même micro-organisme. A titre d'exemple, chez *A. niger*, la présence d'un mycélium dispersé est favorable à la production d'enzymes pectiques (Calam, 1976) alors que c'est la présence de pelotes qui sera recherchée pour la production d'acide citrique (Metz et al., 1979).

Chaque forme morphologique a ses propres caractéristiques et peut influencer, de ce fait, le processus en ayant un impact plus ou moins marqué sur le taux de transfert de matière dans les milieux. Il a été démontré que les mycéliums dispersés conduisent à des milieux de fermentation très visqueux, en raison des interactions entre les filaments de la suspension ; les propriétés rhéologiques du milieu pourront en être modifiées avec, dans certains cas, une évolution vers des fluides non-newtoniens. Ceci a des conséquences en termes de mélange, de dispersion de gaz et de disponibilité d'oxygène ou d'autres nutriments dans le milieu de culture (Mariano et al., 2006). Les pelotes qui peuvent être assimilées à des sphères uniformément réparties dans le milieu agité, auront également une influence sur le processus. Leur influence sera peu marquée dans les milieux à faible viscosité (Suijdam et al., 1980). Driouch et al. (2012) ont mesuré chez *A. niger* SKAn1015 des viscosités de 18,5 mPa.s lorsqu'il est cultivé sous forme de pelotes contre 29,9 mPa.s sous une forme mycélienne libre. Les formes morphologiques rencontrées durant la culture peuvent ainsi être reliées aux caractéristiques rhéologiques du milieu. Selon Krull et al. (2013), différents paramètres morphologiques obtenus par analyse d'image permettent de prédire l'évolution rhéologique du milieu de culture d'*A. niger*.

I.2.3. Impact des caractéristiques des pelotes sur l'activité microbienne

La pelote est le système sur lequel va porter une part importante des investigations de ce travail de thèse. Une étude bibliographique spécifique s'avère donc indispensable avant d'aborder les phases expérimentales.

1.2.3.a. Généralités

Les principales limitations au transfert de matière sont celles qui apparaissent au sein-même de la pelote (Wittler et al., 1986; Nielsen, 1996; Hille et al., 2005) comme le montre la Figure I-4. Dans la littérature, il a ainsi été indiqué que des zones mortes centrales peuvent se former à l'intérieur des pelotes, conséquences d'un transfert limitant au sein des pelotes.

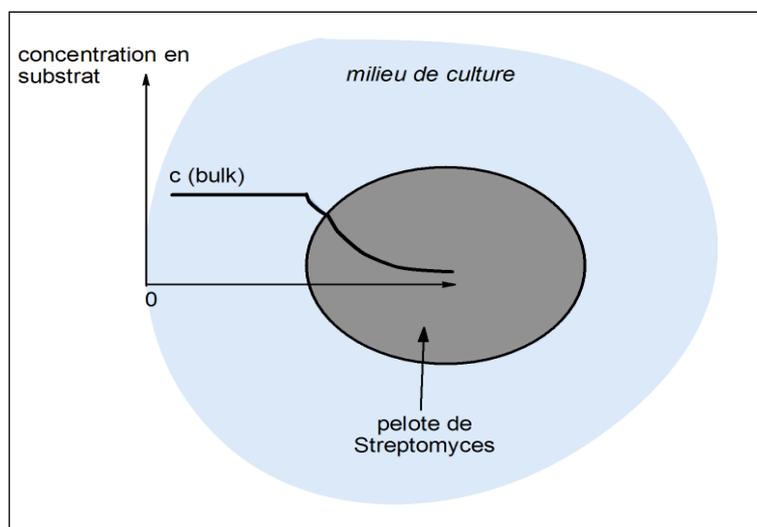


Figure I-4. Représentation des limitations diffusionnelles caractéristiques d'une morphologie en pelote.

Le transfert de matière à l'intérieur de la pelote et en particulier la profondeur de pénétration des nutriments (dont l'oxygène) dépend de plusieurs paramètres : la taille de la pelote (Hille et al., 2005 ; Hamanaka et al., 2001), la compacité de la pelote, la distribution des cellules au sein des pelotes, la vitesse spécifique de consommation de chaque nutriment par les cellules concernées (Cui et al., 1998) mais aussi la concentration en nutriments dans le milieu de culture et les conditions de mélange de ce dernier (Krull et al., 2010).

1.2.3.b. Influence de la taille des pelotes

Metz et Kossen (1977) et Yin et al. (2008) ont montré que la taille des pelotes dans le milieu de fermentation peut influencer l'activité métabolique du microorganisme.

Les petites tailles induisant naturellement moins de limitations diffusionnelles, elles favoriseront l'activité métabolique et la production de molécules d'intérêt (Lin et al., 2010 ; Driouch et al., 2012). Pour les mêmes raisons, la taille idéale est liée à la concentration

d'oxygène dissous et à la vitesse spécifique de consommation d'oxygène des hyphes (Cui et al., 1998) et aux forces mécaniques en présence (Cui et al., 1996).

Les tailles constatées de pelotes qui permettent d'obtenir des concentrations maximales de certains métabolites comme l'acide itaconique par *Aspergillus terreus* était de 0,1 à 0,5 mm (Gyamerah, 1995), de 400 à 500 μm pour la production de pénicilline par *P. chrysogenum* (Schügerl, 1983) et de 12,3 mm lors de la production de polysaccharide anti-tumoral par *Schizophyllum* (Shu et al., 2005).

Gamboa-Suasnavart et al. (2013) montrent que des pelotes de *S. lividans* de grande taille (diamètres > 1 mm) sont obtenues en fiole non-chicanée alors que des enchevêtrements de petite taille (diamètres < 0.25 mm) sont obtenus en fiole chicanée. De plus, en fiole chicanée, une augmentation de la production de protéines totales de $7,45 \text{ g.L}^{-1}$ est obtenue par rapport à $4,5 \text{ g.L}^{-1}$ en fiole non chicanée. Cependant, les concentrations de biomasse sont similaires pour les deux cultures avec une concentration maximale de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ après 30 h de culture. Cette différence de production pourrait être expliquée par des écarts d'hydrodynamique en termes de puissance dissipée volumique ou de contraintes de cisaillement.

D'autres auteurs, comme Feng et al. (2004), ont trouvé qu'un diamètre de pelote contrôlé à 2 mm était le plus approprié à produire la destruxine B par le champignon *Metarhizium anisoplide*, dans différents types de bioréacteurs ; une production de 336 mg.L^{-1} en fiole chicanée était obtenue avec une taille de pelote de 1,9 mm, 240 mg.L^{-1} en réacteur parfaitement agité avec une taille de 2,1 mm et 514 mg.L^{-1} en réacteur airlift à une taille de 1,8 mm. Même si la structure géométrique des différents fermenteurs est variable amenant des concentrations finales également variables, un diamètre moyen optimal de pelote voisin de 2 mm semble systématiquement observé.

Au cours des cultures, la taille des pelotes ayant tendance à croître, il y aura nécessairement une modification des cinétiques de consommation des différents substrats du fait de ces différences de taille. Le cœur d'une pelote plus ancienne sera naturellement soumis à davantage de limitations diffusionnelles (et en particulier pour l'oxygène) qu'une pelote nouvellement formée (Hille et al., 2005).

1.2.3.c. Influence de la viabilité de la biomasse au sein des pelotes

Par la mesure du gradient de pression partielle en oxygène dissous (Wittler et al., 1986) et par des études réalisées sur des sections de pelotes de *P. chrysogenum*, il a été constaté que les

pelotes de diamètre inférieur à 400 μm , sont entièrement constituées de cellules métaboliquement actives. A l'inverse, au-delà de cette taille, il a été constaté que la distribution de la biomasse active dans des pelotes est hétérogène (El-Enshasy et al., 2000 ; Hamanaka et al., 2001 ; Wittler et al., 1986 ; Hille et al., 2005). De même, Mariano et al. (2006) indiquent la présence d'une zone externe métaboliquement active dans la structure de pelote de *Rhizopus nigricans* suivie vers l'intérieur par deux couches de cellules progressivement moins actives et un centre creux de 50 μm . Plusieurs travaux montrent que les cellules métaboliquement actives sont localisées à la périphérie des pelotes. Driouch et al. (2010, 2012) montrent que dans les cultures d'*A. niger*, les pelotes de grande taille sont métaboliquement actives seulement dans une couche extérieure de 200 μm d'épaisseur. Cronenberg et al. (1994) ont constaté que seule la couche extérieure (100 - 200 μm) de pelotes de *P. chrysogenum* était active et consommait le glucose. Durant une culture d'*A. awamori* en réacteur airlift, la production de protéines et la croissance cellulaire n'ont été constatées que dans la couche extérieure des pelotes (Siedenberg et al., 1997).

Des analyses avec des microélectrodes d'oxygène par Schugerl et al. (1983) ont suggéré que les stratifications observées dans les pelotes peuvent être causées par la concentration d' O_2 qui tombe au-dessous de son niveau critique en s'éloignant de la surface des pelotes. Krull et al. (2010) montre que seule la zone extérieure de la pelote d'*A. niger* est à même de produire une protéine fluoresçant en présence d'oxygène.

Enfin, Cui et al. (1998) ont observé que la biomasse exprimée par unité de surface de pelote est uniquement fonction de la concentration en oxygène dissous et indépendante de forces mécaniques, une augmentation de la concentration en oxygène dissous de 0,002 à 0,01 $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ conduit à une augmentation de la concentration en biomasse par unité de surface de pelote

Concernant la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, il a également été supposé que seules les cellules situées à la périphérie des pelotes produisaient de la pristinamycines (Haj Husein et al., 2011; Mehmood et al., 2012 ; Haj Husein et al., 2013). Cette hypothèse a été émise en raison de l'existence d'une corrélation linéaire entre l'aire interfaciale des pelotes et la concentration en pristinamycines produites ainsi que le rendement pristinamycines produites / concentration en biomasse lors de cultures en fiole d'Erlenmeyer non chicanée (Figure I-5).

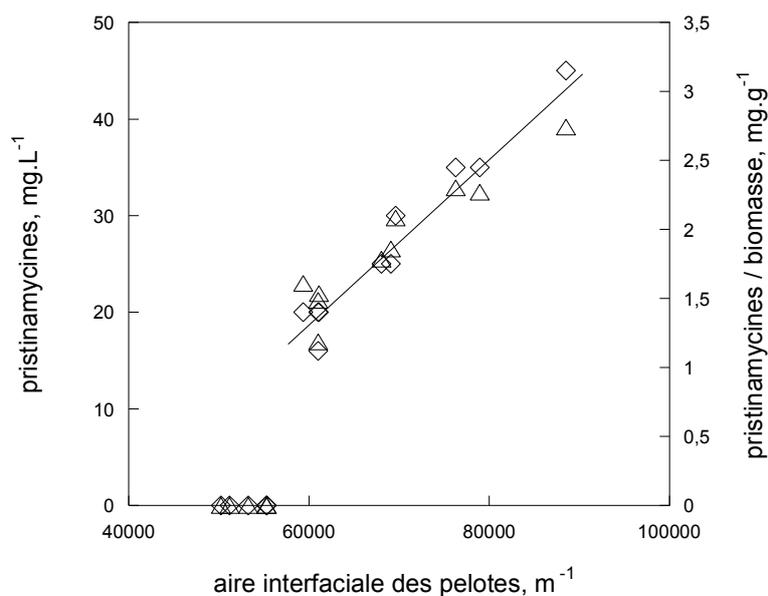


Figure I-5. Corrélation entre le concentration en pristinaamycines (◇), le rapport concentration en pristinaamycines / concentration en biomasse (△) et l'aire interfaciale des pelotes (Mehmood et al., 2012).

1.2.3.d. Influence de la compacité des pelotes

Hille et al. (2005) ont mis en évidence que la diffusion était le principal mécanisme de transfert de matière dans des pelotes d'*Aspergillus awamori*. Celler et al. (2012) ont considéré dans un modèle qualifié de morphologique que le coefficient de diffusion effectif à l'intérieur de pelotes de *Streptomyces* était proportionnel à la porosité de la pelote.

Des pelotes lâches offriraient moins de barrière pour la diffusion de l'oxygène et d'autres substances nutritives (Driouch et al., 2012). Ainsi plus la structure intérieure de pelote est lâche, plus le transfert est massif et la profondeur de pénétration importante dans la pelote. Chez *A. niger*, la pelote lâche peut être distinguée sous deux formes : des pelotes avec une surface duveteuse et un cœur dense, dans lequel le transfert d'oxygène et des substances nutritives sera limité, et des pelotes duveteuses sans cœur dense, sans limitations d'oxygène ou des substances nutritives observées (Hille et al., 2005).

Cependant, des pelotes de densité faible sans aucune limitation de substrat, ne sont pas forcément synonymes de rendement de production élevé (par rapport à des pelotes de même taille mais de densité plus élevée) ; ceci étant dû à des concentrations de biomasse plus faibles dans ce type de pelote (Hille et al., 2005).

La littérature reste confuse quant à la compacité la plus adéquate pour la production de certains métabolites comme la pénicilline (Calam, 1976, Nielsen et al., 1996), le scleroglucane (Sandford, 1979) et l'acide itaconique (Gyamerah, 1995). Il a été montré que la morphologie optimale pour la production de certains métabolites comme les phosphatases acides par *Neurospora crassa* (Su et Jun He, 1997), des acides organiques (Gyamerah, 1995) par des microorganismes filamenteux, était obtenue dans des conditions durant lesquelles des pelotes lâches sont produites ou induites. Prosser et Tough (1991) et Gibbs et al. (2000), indiquent que des pelotes lâches pourraient mener à des rendements plus élevés par rapport à des pelotes compactes du fait des limitations diffusionnelles ; ils constatent que les centres des pelotes compactes sont souvent vides du fait d'une autolyse des hyphes. A l'inverse, Yin et al. (2008) montrent que la pelote compacte et lisse de *S. avermitilis* possède l'activité métabolique la plus importante en culture submergée.

Comme mentionné plus haut, les conditions de mélange du milieu de culture constituent également un paramètre important pour le maintien de l'activité métabolique des cellules au sein des pelotes. Ainsi, Krull et al. (2010) ont montré lors de travaux effectués sur des pelotes d'*A. niger* d'un rayon de 375 μm et de densité de 64 kg.m^{-3} , que sous des conditions de nombre de Reynolds de 47, la concentration d'oxygène dissous était de 1,5 mg.L^{-1} à une profondeur de 300 μm . Cette concentration était voisine de 0 mg.L^{-1} à la même profondeur pour un nombre de Reynolds de 0,14.

Pour conclure, les pelotes doivent être considérées comme des structures complexes, hétérogènes dans lesquelles des mécanismes de limitations diffusionnelles sont induits. Ces derniers peuvent avoir un impact négatif ou positif sur la production de métabolites secondaires comme le sont les antibiotiques.

I.3. Influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique des microorganismes filamenteux

A l'échelle industrielle, les bioréacteurs le plus utilisés sont les réacteurs mécaniquement agités qui représentent environ 93 % du total, contre 7 % pour les réacteurs de type gazosiphon (*i.e.* colonnes à bulles et airlift) (Figure I-6) (Kossen, 1984, Chisti, 1989).

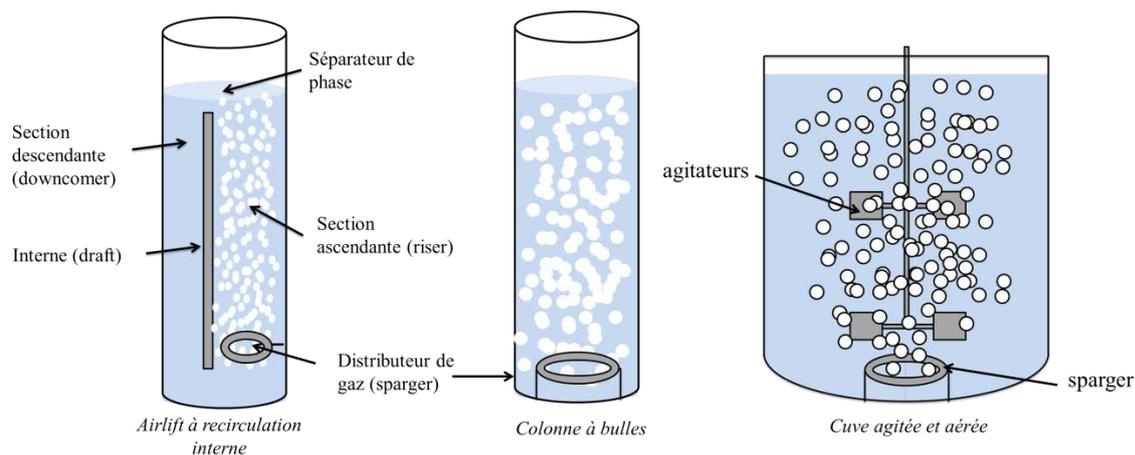


Figure I-6. Principales géométries des bioréacteurs industriels.

Dans les réacteurs de grande taille, Junker (2004) montre que plusieurs paramètres peuvent influencer les procédés, comme les concentrations en dioxyde de carbone dissous élevées, du fait des pressions hydrostatiques importantes, la variation des forces de cisaillement, la puissance dissipée dans le réacteur, l'efficacité du mélange, reliée à la turbulence du liquide et aux temps de circulation, l'existence de régions stagnantes, une distribution de nutriments non uniforme et l'existence de gradients verticaux d'oxygène dissous. Vardar et Lilly (1982) ont mentionné également des gradients radiaux dus à la diminution des taux de cisaillement lorsque le fluide s'éloigne du mobile d'agitation. Ceci induit des microenvironnements physicochimiques évolutifs le long des trajectoires de cellules dans le bioréacteur avec des incidences fortes sur le comportement microbien (Lencastre Fernandes et al., 2011). Ces éléments sont à considérer lorsqu'on connaît, comme le souligne Bushell (1988), la forte demande en oxygène des Actinomycètes durant leur culture.

I.3.1. Comparaison des paramètres hydrodynamiques dans différents types de bioréacteurs

I.3.1.a. Comparaison des paramètres hydrodynamiques entre les fioles d'Erlenmeyers et les réacteurs mécaniquement agités

Nous présenterons ici quelques généralités quant aux différences d'environnement entre les bioréacteurs mécaniquement agités et les bioréacteurs à agitation orbitale. Une étude plus précise est développée dans le chapitre III.

Il est important de comparer les caractéristiques hydrodynamiques des trois types de réacteurs les plus utilisés en laboratoire et au niveau industriel : réacteurs mécaniquement agités (STR), airlift et fioles d'Erlenmeyer. La fiole d'Erlenmeyer est le type de réacteur utilisé en laboratoire pour les essais préliminaires, en raison de leur facilité de manipulation et de leurs faibles coûts d'exploitation. Les fioles d'Erlenmeyers sont devenues irremplaçables surtout en début de processus de développement qui nécessitent un grand nombre d'expériences, par exemple le criblage de souches performantes ou pour l'optimisation des milieux de culture (Freedman et al., 1969).

Les plus grandes différences observées dans le cas de fioles d'Erlenmeyer non chicanées par rapport au réacteur mécaniquement agité sont :

La distribution uniforme de la puissance dissipée dans les fioles par rapport réacteur mécaniquement agité (Büchs et al., 2000 ; Büchs et al., 2001).

Le manque de contrôle des paramètres classiques de culture (comme le pH et la concentration en oxygène dissous).

La méthode d'apport de l'oxygène dissous : Phase dispersée en réacteur mécaniquement agité, aération de surface en fiole agitée (Maier et Büchs, 2001).

La dynamique des fluides dépend de la taille du mobile d'agitation en STR et de la vitesse d'agitation dans les deux systèmes (Weyand et al., 2009) ; ainsi une augmentation de la vitesse d'agitation conduit à augmenter le mélange. Gerson et al. (2001) montrent qu'un nombre de Reynolds critique pour la transition d'un mélange laminaire à un mélange turbulent se produit à des vitesses d'agitation plus faibles en fioles (50 tr.min⁻¹) qu'en STR (250 tr.min⁻¹). Plus récemment Peter et al. (2006) ont indiqué que l'écoulement en fiole agitée

n'était pas turbulent dans des conditions classiques de culture au contraire des écoulements en STR. Ce résultat a été confirmé par des mesures de vitesses par Weheliye et al. (2013).

1.3.1.b. Comparaison des paramètres hydrodynamiques entre le réacteur mécaniquement agité et l'airlift

Comme l'indique le Tableau I-2, les réacteurs de type airlift (AL) présentent des taux de transfert d'oxygène élevés et d'excellentes propriétés de mélange (Gavrilescu et al., 1998). Plusieurs études ont en effet démontré la capacité de l'AL à fournir un mélange efficace et uniforme à une faible consommation d'énergie (Merchuk, 1988).

Tableau I-2. Principales différences entre réacteur airlift et agités mécaniquement : (Gavrilescu et al., 1998 ; Schugerl, 1990 ; Merchuk et al., 1988).

Réacteur airlift		Réacteur agité mécaniquement	
+	-	+	-
transfert d'oxygène	puissance dissipée	puissance dissipée	transfert d'oxygène*
distribution uniforme de la puissance dissipée (mélange homogène)	contraintes de cisaillement	contraintes de cisaillement	Distribution non uniforme de la puissance dissipée (mélange hétérogène, zones mortes)

+ : forte valeur ; - : valeur faible ; * : avec utilisation d'air comme gaz apportant l'oxygène

De plus, ils présentent, *a priori*, un environnement à faibles contraintes hydromécaniques par rapport aux réacteurs mécaniquement agités, du fait de l'absence de pièces mécaniques tournantes (Gavrilescu et al., 1998). Cette absence de pièce mécanique fait de ces réacteurs une technologie à faible coût et robuste dans le temps. Cependant, les bioréacteurs de type airlift, malgré leur fonctionnement sans mobile d'agitation, peuvent également générer des contraintes de cisaillement élevés du fait de la turbulence générée par la phase dispersée. Les sources de contraintes issues de la phase dispersée peuvent être attendues dans le voisinage du distributeur de gaz, dans le sillage des bulles ou dans la zone de désengagement au niveau de la surface libre. Ces contraintes peuvent occasionner des dégâts au niveau des cellules par

rupture de la membrane cellulaire (Meier et al., 1999 ; Koynov et al., 2007 ; Weyand et al., 2009).

Par ailleurs, la distribution de puissance dissipée est relativement uniforme en réacteurs gazosiphons contrairement aux STR, dans lesquels le taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente peut varier d'un facteur 100 entre la zone du mobile et le reste du bioréacteur (ce ratio dépend bien évidemment du type de mobile utilisé). En revanche en STR, les distributions de température et de concentration sont réputées plus uniformes qu'en réacteurs gazosiphon en raison de temps de mélange diminués (Schügerl, 1990).

Le débit volumique de gaz ainsi que la conformation des bulles escomptée (forme et taille) a un également un impact sur les propriétés de mélange et de transfert, en particulier dans les réacteurs à agitation pneumatique pour lesquels le mélange est assuré par les transferts de quantité de mouvement entre les bulles et le liquide. Ainsi, par exemple, en STR, une augmentation du débit d'aération de 1,5 vvm à 2,5 vvm pour une culture de *Monascus purpureus* FTC 5391 conduit à une augmentation de k_La de 144 à 165 h⁻¹. En STR, le transfert de l'oxygène dépend essentiellement de la dissipation volumique via la fréquence d'agitation du mobile. Ainsi, une augmentation de la turbulence favorise le transfert grâce à l'amélioration du renouvellement des surfaces d'échange. (Gomez-Diaz et Navaza, 2003). Ces mêmes auteurs ont par ailleurs montré qu'en STR, l'influence du débit de gaz sur le transfert d'oxygène en fluide non-newtonien est moins sensible que celle de l'agitation. Ainsi, lors de l'augmentation de la fréquence d'agitation de 150 rpm à 350 rpm en maintenant un débit de gaz à 10 L.h⁻¹, une augmentation du coefficient de transfert de matière côté liquide k_L de 1,25.10⁻³ à 2,25.10⁻³ cm.s⁻¹ a été obtenu. Par contre l'augmentation du débit de gaz de 5 à 12 L.h⁻¹ conduit à une plus faible augmentation du k_L de 1,75 à 2,25.10⁻³ cm.s⁻¹ avec une fréquence de 350 rpm et de 0,75 à 1,1.10⁻³ cm.s⁻¹ pour la fréquence de 150 rpm.

En ce qui concerne le bioréacteur airlift, Chiang et al. (2013) ont montré qu'une augmentation de 0,1 à 0,5 vvm conduit à une augmentation du coefficient volumique de transfert d'oxygène de 10,8 à 19,8 h⁻¹ pour la culture d'*Antrodia cinnamomea*. Ces auteurs ont montré que pour une même aération de 0,1 vvm, la valeur de k_La pour les cultures d'*Antrodia cinnamomea* était de 5,2 h⁻¹ en STR en comparaison de 10,8 et 13,7 h⁻¹ pour différents types de réacteurs airlift.

Enfin, dans les colonnes à bulles et les airlifts, le design du distributeur de gaz est connu pour être un paramètre influençant fortement les performances de transfert de matière. Notamment

le choix du type d'apport (cane perforée, anneau multi-perforé, fritté métallique) ainsi que la taille des entrées d'air (diamètre du tube ou des perforations, porosité du fritté métallique) sont des données cruciales qu'il est nécessaire de maîtriser lors du changement d'échelle (Weuster-Botz, 2005).

I.3.2. Effets de l'hydrodynamique des bioréacteurs sur la physiologie de *Streptomyces*

Comme exposé précédemment, de nombreuses études sur des microorganismes filamenteux montrent que la compréhension de l'impact des interactions de l'environnement chimique et physique sur la physiologie des cellules est importante pour l'optimisation du processus et l'amélioration de la productivité. Examiner l'influence du transfert d'oxygène et de l'hydrodynamique sur les performances du réacteur et en particulier sur la physiologie des cultures en fermentation est un travail complexe. En liaison avec le travail expérimental développé au cours de ce doctorat, il semble important de faire un état des lieux de ces aspects en les focalisant sur *Streptomyces*. Ceci a fait l'objet d'une revue publiée dans *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013. L'objectif de cette revue est d'étudier la relation entre les paramètres hydrodynamiques et la production d'antibiotiques par *Streptomyces* (Figure I-7). Des comparaisons des paramètres hydrodynamiques entre fioles, réacteurs agités mécaniquement et airlifts et leurs influences sur la physiologie de microorganismes sont discutées.

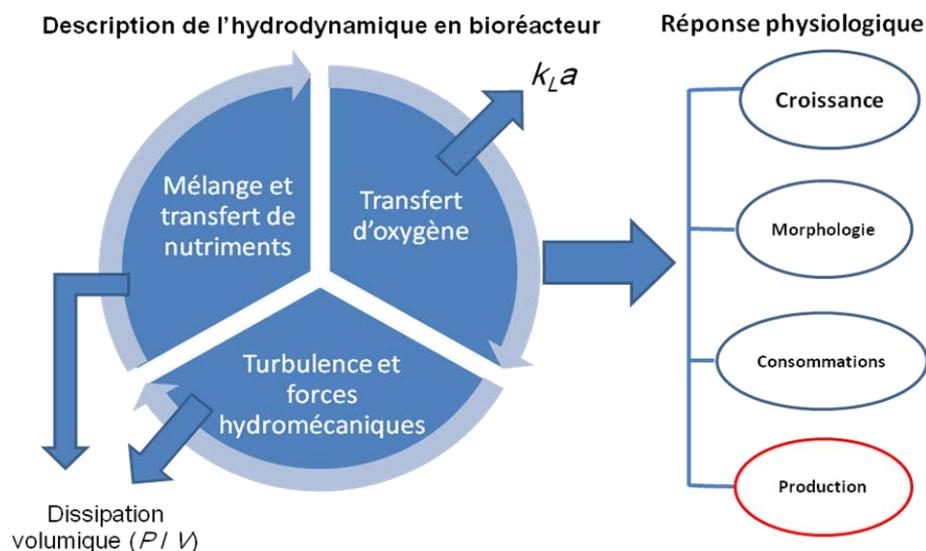


Figure I-7. Représentation des différents éléments de l'hydrodynamique ayant un impact sur l'activité microbienne.

I.4. Effects of bioreactor hydrodynamics on the physiology of *Streptomyces*[‡]

E. Olmos, N. Mehmood, L. Haj Husein, J-L. Goergen, M. Fick, S. Delaunay, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2013, 36, n°3, 259-272.

I.4.1. Introduction

Streptomyces is a genus of Actinomycetes, a group of Gram-positive and generally high GC (65–75 %) content bacteria. These filamentous microorganisms are strictly aerobic. *Streptomyces* are prokaryotic but their life cycle is similar to the cycle of fungi. In liquid medium *Streptomyces* may present three types of morphology: filaments that may be branched or not, clumps and pellets. *Streptomyces* produce a wide range of secondary metabolites including antimicrobial, antifungal, anthelmintic agents, antitumor agents, herbicides, pigments and other bioactive compounds. Much progress has been made in recent years in understanding the genetic and biochemical basis for the biosynthesis of these complex molecules. These studies have been aided by the development of molecular genetics tools and gene transfer methods in *Streptomyces*. For all antibiotics, there is a general interest to obtain high productivities and high titers, as it ensures a cost effective production. This has been achieved by using several approaches like classical strain improvement, optimization of process parameters as well as genetics (Rokem et al, 2007).

Detailed knowledge of the mechanisms implied in antibiotics production is thus a prerequisite to increase the antibiotic titer. Literature regarding medium optimization as well as process parameter is extremely important for the production of antibiotics. There are few reviews, showing influence of nutritional parameters on the production of antibiotics (Ruiz et al, 2010; Sanchez et al, 2010 ; Martin et al, 1977 ; Deutscher et al, 2008 ; Gorke et al, 2008) while reviews regarding relations between hydrodynamic parameters and production of antibiotics by *Streptomyces* are missing in literature. The objective of this review is to analyze the impact of hydrodynamics on the production of antibiotics by *Streptomyces*. This review focused on submerged fermentation carried out in shaking flasks and mechanically stirred bioreactors. First, this review provides the most usual relations for the description of global hydrodynamics in bioreactors: power dissipations in ungassed and gassed conditions, gas-liquid and liquid-solid mass transfer coefficients, hydrodynamic stresses, and rheology. A

[‡] This paper is dedicated to the memory of Professor Jean-Louis Goergen.

commented comparison of the various hypotheses made for hydrodynamics description is then proposed. Secondly, this review synthesises and discusses the literature studies dedicated to the understanding of the impact of hydrodynamics (power dissipation, mass transfer) on the physiological response of *Streptomyces* cultures (growth, consumptions, antibiotic production).

I.4.2. Hydrodynamics description

Hydrodynamics of sparged and mixed bioreactors is still a major subject of discussion in literature. Most of the systems used operate in turbulent flow, especially at the larger scale. However, for small-scaled systems (culture volume inferior to a few liters), at lower agitation rates or with highly viscous broths, the transitional regime may be obtained. For microbial cultures, hydrodynamics complexity arises from both the turbulence generated by the impeller and the gas phase flow. Especially, the description of the bubble size distribution in a turbulent flow is still a hard task. This hydrodynamics can be either described using volume averaged or local values of hydrodynamic quantities (turbulent dissipation rate, stress, Kolmogorov scale, $k_L a$). The methods used today for the local description of mixed reactors (with or without gas) are mainly Computational Fluid Dynamics (Delafosse et al, 2009 ; Mehmood et al, 2010) and Particle Image Velocimetry measurements (Huchet et al, 2009).

Numerous studies have been dedicated to the description of gas-liquid bioreactors hydrodynamics and reviewed in literature. Thus, the purpose of this part is not to make an exhaustive inventory of these studies but to provide the main assumptions, tools and equations used in the works coupling *Streptomyces* physiological response and bioreactor hydrodynamics. When pellet morphology is encountered, flow is generally supposed as Newtonian, the following paragraphs are thus limited to Newtonian flows. A specific discussion will be held in the case of filamentous morphology and to the non-Newtonian behavior of fermentation broth.

I.4.3. Power dissipation

For bioreactor scale-up and operation, the power dissipation per unit of volume P / V ($\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$) is generally used. The mean turbulent dissipation rate $\langle \varepsilon \rangle = \frac{P}{\rho V}$ ($\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$) can be then deduced from the power dissipation. These global parameters are known to be related to many physical phenomena taking place in the bioreactor such as oxygen supply, carbon dioxide removal,

macro- and micro-mixing, turbulence intensity, liquid phase homogeneity and hydrodynamic stress. In mechanically mixed bioreactors, mechanical power is generally brought by one or several impellers. When turbulent regime and Newtonian flow are encountered in the bioreactor, power dissipation without gas sparging P_0 is obtained by supposing a constant power number N_0 :

$$P_0 = N_0 \rho N^3 D^5 \quad (\text{I-1})$$

with ρ (kg.m^{-3}) the liquid density, N (s^{-1}) the rotational frequency and D (m) the impeller diameter. Due to high oxygen demand of *Streptomyces*, the gas flow rates are generally high ($> 1 \text{ L.L}^{-1}.\text{min}^{-1}$). Thus, it is necessary to take into account aeration effects on power dissipation. First, gas cavities around flat-blade Rushton turbines may entail a dramatic decrease of power dissipation. One way to quantify this decrease is the equation of Hughmark (Hughmark, 1980):

$$\frac{P_g}{P_0} = 0,1 \left(\frac{NV_L}{Q_g} \right)^{1/4} \left(\frac{N^2 D^4}{gwV_L^{2/3}} \right)^{-1/5} \quad (\text{I-2})$$

with P_g (W) the power dissipation in aerated conditions, w (m) the turbine width, V_L (m^3) the liquid volume, g ($\text{m}^2.\text{s}^{-2}$) the gravity constant and Q_g the gas flow rate ($\text{m}^3.\text{s}^{-1}$).

Other expressions, tested with 526 data from literature have been given by Cui et al, 1996 for single- and multiple-impeller mixing tanks. For a single-impeller tank, the authors proposed the following relation for the calculation of the power loss:

$$\begin{aligned} 1 - \frac{P_g}{P_0} &= 0.52 + 0.62 \left(\frac{Q_g N^{1/4}}{D^2} \right) && \text{for } \frac{Q_g N^{1/4}}{D^2} \geq 0.055 \\ 1 - \frac{P_g}{P_0} &= 9.9 \left(\frac{Q_g N^{1/4}}{D^2} \right) && \text{for } \frac{Q_g N^{1/4}}{D^2} \leq 0.055 \end{aligned} \quad (\text{I-3})$$

The preceding relations are valid for the bottom impeller in multiple-impeller systems. For middle and top impellers, Cui et al (1996) have shown that the transition of the gassed power was expected for higher gas flow rates than for the bottom impeller. This was confirmed by Fujasova et al(2007) who showed that, under gassed conditions, the power dissipated in the bottom stage could be up to 45 % lower than in the middle and the top stages due to early

impeller flooding. Cui et al(1996) proposed the following relations for the predictions of power loss for the middle and top impellers:

$$1 - \frac{P_g}{P_0} = K_1 Q_g N \quad Q_g N \leq 0.013$$

$$1 - \frac{P_g}{P_0} = K_2 + K_3 Q_g N \quad Q_g N > 0.013 \quad (\text{I-4})$$

with K_1 , K_2 , K_3 constants depending on bioreactor geometry which may be tricky to determine. Thus, Roubos et al (2001) suggested that the bottom, middle and top impeller power dissipations were governed by (I-3) only.

Lastly, an additional dissipation P_{add} arises from adiabatic gas expansion in the liquid:

$$P_{add} = \rho V_L v_g g \quad (\text{I-5})$$

with v_g the superficial gas velocity ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). This specific dissipation can be often neglected except in case of weak or without mechanical mixing (stirred bioreactors with low rotational frequencies, airlift or bubble columns bioreactors). For example, in airlift and bubble column reactors, power dissipation is given by (I-5) only.

In unbaffled shaking flasks, power dissipation can be approximated using the equations of Büchs et al (2000) :

$$\frac{P}{V_L} = \text{Ne}' \cdot \rho \cdot \frac{N^3 \cdot d^4}{V_L^{2/3}} \quad (\text{I-6})$$

$$\text{Ne}' = 70\text{Re}^{-1} + 25\text{Re}^{-0.6} + 1.5\text{Re}^{-0.2} \quad (\text{I-7})$$

with: $\text{Re} = \frac{\rho N d^2}{\mu}$, d (m) the maximum flask diameter and μ (Pa.s) the dynamic viscosity.

For baffled shaking flasks, no general equation has been yet established. Despite the variety of baffle designs commonly noted, it can be assumed that, in the turbulent regime, and by analogy with a stirred tank reactor, $\text{Ne}' = \text{constant}$ (Peter et al, 2006b).

Equations (I-6) and (I-7) remain valid for “in-phase” conditions meaning that liquid interface and flask wall rotate in-phase. These conditions are given by Büchs et al (2001) :

$$\frac{d_0}{d} \left\{ 1 + 3 \log \left[\frac{\pi}{2} \operatorname{Re} \left(1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right)^2 \right] \right\} > 1.26 \quad (\text{I-8})$$

with d_0 (m) the shaking diameter and μ (mPa.s) the dynamic viscosity. Inversely, when out-of phase conditions are encountered, dramatic decrease of power dissipations and weaker flow reproducibility are expected.

I.4.4. Nutrients transfer

The mass transfer flux J (kg.s^{-1}) at the biocatalyst interface is related to microorganism external area A (m^2), bulk and interfacial nutrient concentrations C_b and C_i (kg.m^{-3}) respectively and liquid-side mass transfer coefficient k (m.s^{-1}) by:

$$J = kA(C_b - C_i) \quad (\text{I-9})$$

The measurement of the bulk concentration is quite easy but the knowledge of the interfacial concentration is much harder. This implies that, despite a non-zero bulk concentration, nutrient limitation may occur if interfacial concentration falls to zero. On the basis of a physical approach, with filamentous micro-organisms, power dissipation is expected to influence mass flux transfer by a change of pellet diameter or of the mass transfer coefficient. Mass transfer coefficient can be related to the particle relative velocity u_{LS} using general correlations between Sherwood (Sh), Reynolds (Re) and Schmidt numbers (Sc).

$$\text{Sh} = \frac{kd_p}{D_{\text{diff}}} ; \text{Re} = \frac{\rho_L u_{LS} d_p}{\mu} ; \text{Sc} = \frac{\mu}{\rho_L D_{\text{diff}}} \quad (\text{I-10})$$

Where d_p (m) is the pellet diameter, and u_{LS} (m.s^{-1}) the particle slip velocity. For biocatalysts smaller than the Kolmogorov scale ($l_K > d_p$), it can be considered that a diffusion layer of size l_K circles the microorganism (Douaire et al, 2009), leading to a pure diffusive flow (Sh = 2).

When filamentous or especially pelleted structures are encountered, a next step of nutrients transfer inside the pellet or clump core is mainly governed by diffusion. Mass transfer is then related to the Fick's diffusion law:

$$\mathbf{j} = -D_{diff,p} \cdot \mathbf{grad}(C) \quad (\text{I-11})$$

where \mathbf{j} is the mass flux ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), $D_{diff,p}$ is the molecule diffusivity inside the pellet or the clump core ($\text{m}^2.\text{s}^{-1}$) and C (mol.m^{-3}) is the substrate concentration. Data providing these diffusion coefficients inside *Streptomyces* pellets are missing in literature. These data have been provided inside *Aspergillus niger* pellets by Hille et al (2009, 2005) for oxygen transfer. Diffusion coefficients were related to the pellet morphological structure, especially the hyphal gradient. These authors stated that, in case of oxygen transfer, the most reliable way of determining the mass flux \mathbf{j} is the combination of the radial profiles of biomass and of oxygen concentrations. Despite it was applied to *A. niger* pellets, the studies of Hille et al(2009 2005) offered promising perspective for the understanding of the mass transfer mechanism inside *Streptomyces* pellets, as the pellets formed by those two microorganisms present strong similarities. Using an oxygen microelectrode combined with confocal microscopy and image analysis, these authors revealed the coupling between fungus morphology, culture time and oxygen concentration gradients inside the pellet.

I.4.5. Oxygen transfer

Because oxygen is only sparingly soluble in culture medium and in liquids in general, ensuring a sufficient oxygen transfer to *Streptomyces* appears critical. Oxygen supply to liquid phase and transfer of dissolved oxygen to growing microbial cells can raise major technical problems affecting microbial productivity. Beside nutrients regulation, the production of antibiotics is strongly affected by the dissolved oxygen tension (DOT). Indeed, the DOT can affect the growth, concentration of antibiotics, induction of antibiotic production, enzyme activities as well as morphology of *Streptomyces*. For filamentous microorganisms, broths may exhibit a non-Newtonian rheology which increases the complexity of the oxygen mass transfer description. Mixing intensification is often chosen to enhance oxygen transfer (Makagiansar et al, 1993). The quantification of oxygen transfer in microbial cultures is generally described in terms of DOT, gas-liquid mass transfer coefficient (k_{La}), oxygen transfer rate (OTR) or oxygen uptake rate (OUR). The relationships between hydrodynamic

parameters, DOT, $k_L a$ and OTR has been recently summarized by Garcia-Ochoa et al (2009) (Figure I-8).

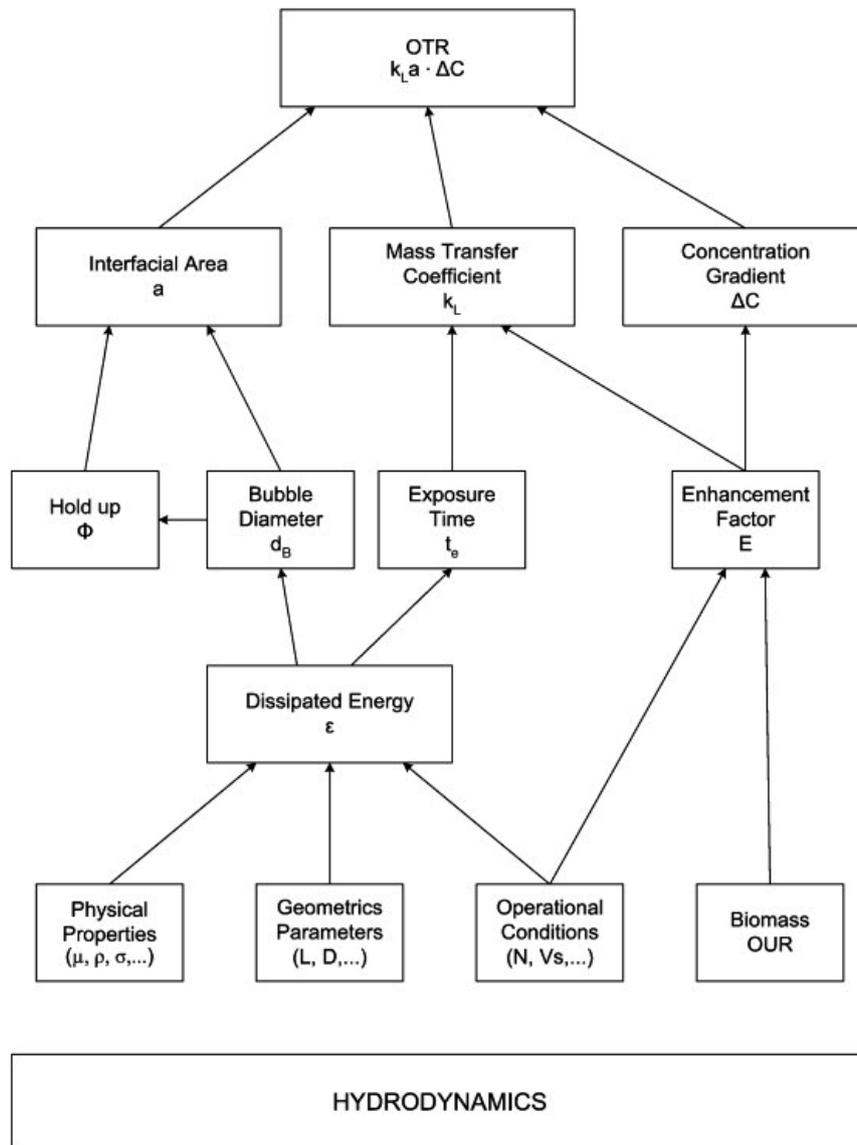


Figure I-8. Relationships between hydrodynamic parameters, gas-liquid mass transfer coefficient ($k_L a$), oxygen transfer rate (OTR) and dissolved oxygen tension (DOT) (Garcia-Ochoa et al, 2009).

During aerobic bioprocesses, oxygen is transferred from a rising gas bubble into a liquid phase and ultimately to the site of oxidative reaction inside the cell. The transport of oxygen from air bubbles to the cells may be decomposed into three steps characterized by specific

transfer resistances, as shown in Figure I-9 (i) gas phase (bulk, film), (ii) liquid phase (film, bulk, film) and (iii) microbial phase (film + pellet or clumps core).

In the first phase, the oxygen inside the bubble is transferred to the gas film. Then, gas moves towards gas-liquid interface and then to bulk liquid and liquid around the cell. The liquid film resistances around bubbles usually control the overall transfer rate outside the microbial pellet (Garcia-Ochoa et al, 2009). Nevertheless, for microbial pellets and filamentous clumps, transfer of oxygen in the pellet core can be considered as a limiting step too. For bubbly systems, interfacial transfer takes place at the bubble interface while for surface-aerated reactors like shaking flasks, gas-liquid mass transfer takes place at the gas-liquid free surface. In both cases, the volumetric mass transfer coefficient k_La can be related to power dissipation or mixing. For mixed and sparged reactors, an estimation of k_La is given by the general equation of Van't Riet:

$$k_La = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha U_g^\beta \quad (\text{I-12})$$

with A , α and β constants depending on bioreactor design and physico-chemical properties of the culture medium and U_g ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) the superficial gas velocity.

For shaking flasks and low-viscosity media, k_La is given by Maier (2002) :

$$k_La = 6.67 \times 10^{-6} N^{1.16} V_L^{-0.83} d_0^{0.38} d^{1.92} \quad (\text{I-13})$$

Where k_La is the volumetric gas-liquid mass transfer coefficient (s^{-1}), N the shaking frequency (min^{-1}), V_L (mL) the filling volume, d_0 (cm) the shaking diameter and d (cm) the maximum shake flask diameter. Equation (I-13) has been successfully applied to *S. pristinaespiralis* cultures in shaking flasks by Mehmood et al(2011) for the prediction of onset of pristinamycins production.

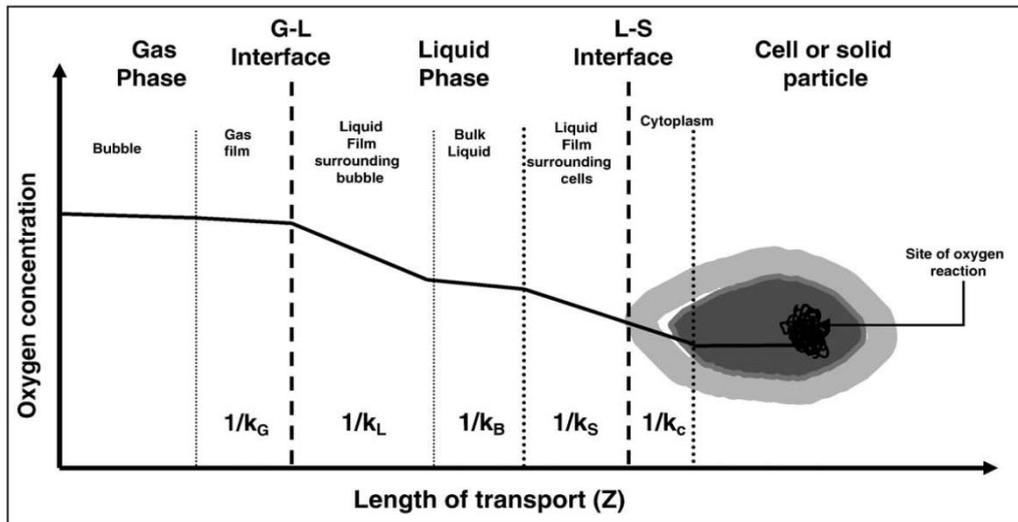


Figure I-9. Different steps involved in oxygen transfer from the gas bubble to the cell or the site of oxygen reaction (Garcia-Ochoa et al, 2009). k_G , k_L , k_B , k_S and k_C are respectively the mass transfer coefficients in the gas film, the liquid surrounding bubble, the bulk liquid, the liquid surrounding cells and inside the cytoplasm.

In both mechanically mixed and shaking bioreactors, the oxygen transfer rate (OTR), which is the maximal transfer capacities of oxygen of the bioreactor at a given DOT and $k_L a$, is then given by:

$$OTR = k_L a ([O_2]^* - [O_2]) \quad (\text{I-14})$$

with $[O_2]$ the DOT and $[O_2]^*$ the oxygen saturation. Then, oxygen transfer takes place in the vicinity of the microorganism-liquid interface, inside the pellet or the clump and, finally, to the cytoplasm of cell for biochemical reaction. This transfer may be quantified by similar relations to nutrient transfer (equations (I-9) to (I-11)). Thus, the same conclusions regarding effects of power dissipation on nutrients transfer at the microorganism interface can be transposed to oxygen.

I.4.6. Hydromechanical stress

Interactions between bioreactor hydrodynamics, turbulence and *Streptomyces*, which are called mechanical stress, have been generally less studied than nutritional stress. When cultured in liquid medium, *Streptomyces* exhibit three characteristic types of morphology

(Paul et al, 1998; Yin et al, 2008) (Figure I-10). The filamentous form is commonly referred to freely dispersed mycelia which may be branched or unbranched. These mycelia often get entangled to form clumps. The general structure of pellets is a core of densely packed and interwoven hyphae, surrounded to a greater or lesser extent by a more dispersed ‘hairy’ region. Their diameters vary from ten micrometers to few millimeters (Kim et al, 2000). The morphological forms affect the rheological properties of the fermentation broth which may affect transport phenomena in the bioreactor and finally the efficiency and the productivity of the entire process (Papagianni, 2004). From this point of view, the morphological characteristics of *Streptomyces* species and their impact on culture processing are similar to fungi, such as *A. niger* (Wucherpfennig et al, 2011; Krull et al, 2010).

The relationships between *Streptomyces* morphology, reactor hydrodynamics and particle stress is particularly complex. Indeed: (i) a change of hydrodynamics can promote cellular shocks and thus possibly clumps interconnections, aggregations and formation of larger clumps or pellet; (ii) an increase in power dissipation is expected to entail a decrease of pellet diameters due to tangential and normal hydrodynamic stress. Depending on the pellet or hyphae size d_p , the microorganisms then state either in the inertial ($d_p > l_I$) or in the viscous subrange of turbulence ($d_p < l_V$). Although it is often assumed that

$$l_I = l_V = l_K = \left(\frac{V \cdot \mu^3}{P \cdot \rho^2} \right)^{0.25} \quad (\text{Coufort et al, 2005; Bouyer et al, 2005}), \text{ some authors (Pilz et al, 2005) proposed } l_I = 12 \cdot l_K \text{ as a transition criterion.}$$

In a turbulent hydrodynamics, velocity fluctuations entail the occurrence of velocity gradients around the pellet and consequently hydrodynamic stresses acting on the clumps or the pellets.

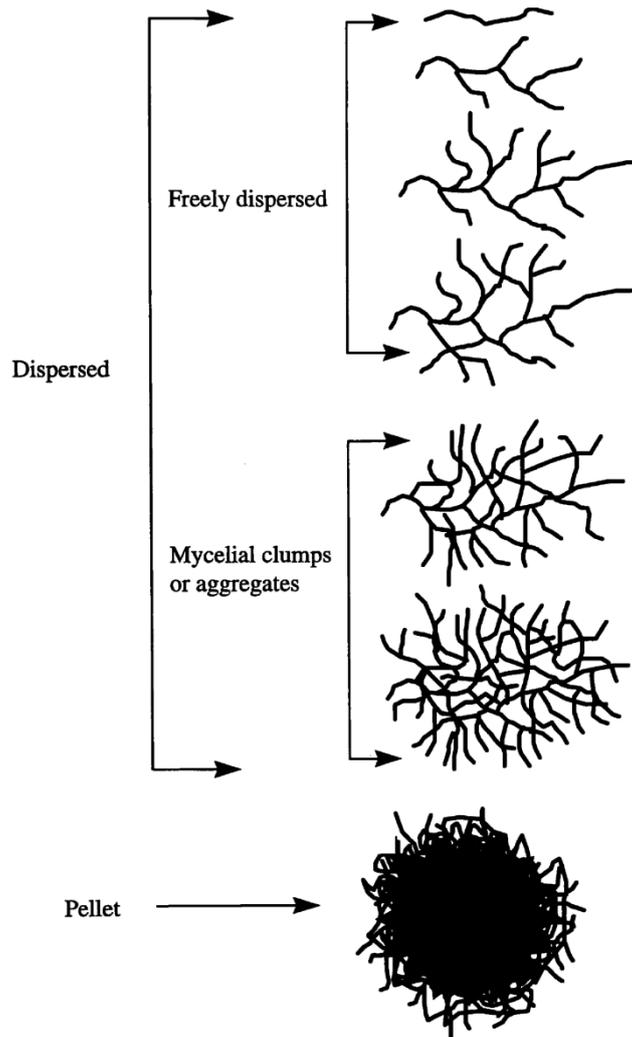


Figure I-10. Different types of *Streptomyces* morphology during growth in liquid cultures (Paul et al, 1998).

I.4.7. Non-Newtonian behavior

When the filamentous form is encountered for *Streptomyces*, high broth viscosity and non-Newtonian flow behavior may be expected, resulting in poor mass and heat transfer. A shear-thinning behavior is most of the time observed (Pamboukian et al, 2005 ; Tamura et al, 1997 ; Warren et al, 1995) . The pellet morphology generally leads to Newtonian behavior of the broth (Papagianni, 2004 ; Ohta et al, 1995 ; Pinto et al, 2004) . A shear-thinning behavior for high biomass concentrations was shown by Mehmood et al (2010) with *S. pristinaespiralis*, despite the occurrence of pellets. However, a Newtonian plateau was observed for the shear rates generally encountered in mixed microbial bioreactors. These authors proposed a Sisko law to model broth rheology at the highest biomass concentrations.

The shift from Newtonian behaviour is all the more marked that the fraction of filaments and the biomass concentration are high. For example, Pamboukian and Facciotti (2005) proposed the modeling of broth rheology by a power law. The consistency K (Pa.sⁿ) and flow indexes n were found to be related to biomass concentration with *Streptomyces olindensis* suspensions:

$$K = 0.21X^{2.3} ; n = 0.58X^{-0.39} \text{ and } \mu = K\dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{I-15})$$

An overview of rheological models used for filamentous microorganisms can be found in the review of Wucherpennig et al(2010). The occurrence of non-Newtonian flow may sensibly impact the mass transfer capacities of the bioreactor, regarding power dissipation, mixing times, among others. In stirred tank bioreactors, the mixing of shear-thinning fluids is generally described using the concept of Otto and Metzner which supposes that the average shear rate is proportional to the rotational frequency. Then, this hypothesis allows the calculation of an apparent viscosity and of the power dissipation. Nevertheless, this concept is theoretically valid for the laminar regime and most of bioreactors operate in the turbulent regime, even when more viscous culture broths are encountered, which should limit its validity in standard culture conditions. Moreover, it has to be noted that *Streptomyces* morphology depends on shear rates due to possible fragmentations of the clumps or of the hyphae. Thus, an increase of agitation not only decreases the apparent viscosity by increasing the shear rate, but may modify the rheological properties of the suspension too (Campesi et al, 2009). Thus, it is a hard task to propose general equations to predict shear rates, power dissipations or mass transfer coefficients in filamentous broths as broth rheology strongly depends on the system (*Streptomyces* strain; culture medium composition) used. For the prediction of oxygen transfer coefficient, the Equation (I-12) is extended to take into account the modification of the apparent viscosity μ_a (Pa.s) during the culture:

$$k_L a = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha U_g^\beta \mu_a^\gamma \quad (\text{I-16})$$

The value of the parameter γ is generally between -0.4 and -1 indicating a sensible negative impact of a viscosity increase on the $k_L a$ Garcia-Ochoa et al (2009). Recently, Campesi et

al(2009) have proposed the following relation for the k_La prediction in stirred culture of *Streptomyces clavuligerus* for gas flowrates respectively equal to 0.5 and 1 L.L⁻¹.min⁻¹.

$$\begin{aligned} k_La &= 8.82 \times 10^{-4} N^{1.285} K^{-0.136} \\ k_La &= 7.7110^{-4} N^{1.372} K^{-0.158} \end{aligned} \quad (\text{I-17})$$

However, these relations remain only valid for the culture system studied. Gabelle et al (2011) have proposed to modify the general form of equation (I-16) for the prediction of k_La in non-Newtonian broth by introducing a critical apparent viscosity μ_c (Pa.s):

$$k_La = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha U_g^\beta \left(1 + \frac{\mu_a}{\mu_c} \right)^{-1} \quad (\text{I-18})$$

These authors proposed a set of values for the constants ($A = 0.023$, $\alpha = 0.44$, $\beta = 0.47$, $\mu_c = 0.018$ Pa.s).

I.4.8. Agitation effects on *Streptomyces* physiology

I.4.8.a. Studying agitation effects on *Streptomyces* physiological response: a hard task

In a general way, the intensity of the agitation applied during fermentation may have an impact on growth rate, product synthesis, metabolism through transport of nutrients and enzyme activities, cell damage, morphology, DOT, broth viscosity in the case of non-Newtonian rheology.

Couplings between these parameters are summarized in Figure I-11. The production of many secondary metabolites produced by *Streptomyces* may be affected by agitation frequency and thus power dissipation. For each of these metabolites, an optimal agitation level seems to exist but, in aerobic submerged fermentations, literature reports on the physiological response to mixing effects only, remain ambiguous. Concerning macro-mixing effects and concentration gradients no data are available in the literature. However, Hristov et al(2001) have shown that, at the industrial scale, *Streptomyces fradiae* could experience large variations of substrate concentrations during their circulation but no biological effect of these variations have been

demonstrated. An example of these results is reported in Figure I-12. Furthermore, a precise quantification of the energy dissipation rate remains quite seldom in literature. Most of the times, one of the following pragmatic hypotheses has to be made:

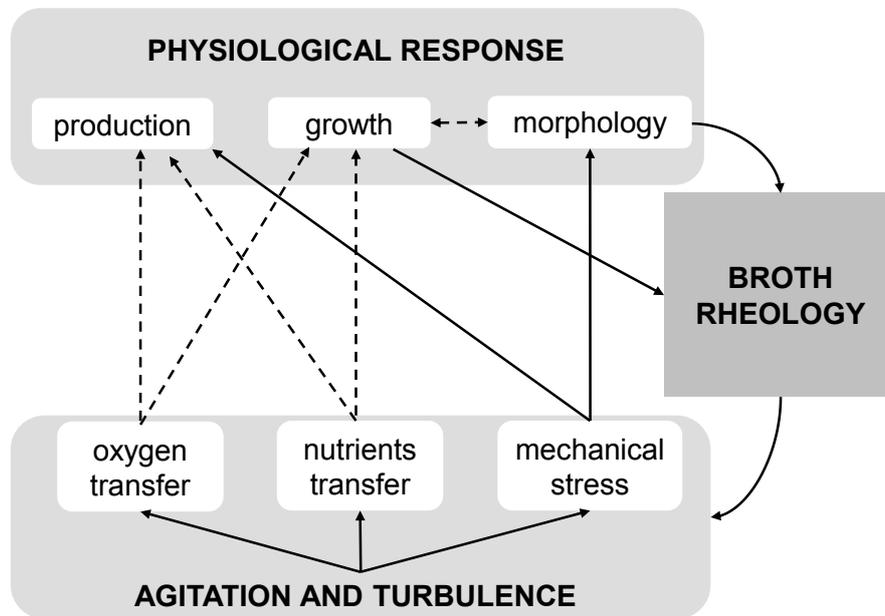


Figure I-11. Coupling between the phenomena related to bioreactor hydrodynamics. Continuous and dotted lines respectively indicate physical and biochemical couplings.

1. *Homogeneity of the turbulent dissipation rates in bioreactors* (Buchs et al, 2000 ; Large et al, 1998). In stirred and sparged bioreactors, the turbulent dissipation rate is expected to reach 100 times the mean dissipation (Mollet et al, 2004). Thus, the hypothesis of homogeneous environment should be considered, in the best case, for concentrations homogeneity only. The determination of local dissipation rates in gas-liquid reactors still raises key problems of practical implementation. For example, in bubbly flows, the use of laser techniques such as Particle Image Velocimetry remains difficult for gas fraction higher than 5 %, due to the opacity of the dispersion. Numerical simulations (Computational Fluid Dynamics) coupled with population balance is another tool to predict dissipation fields in gas-liquid reactors (Olmos et al, 2003 ; Olmos et al, 2001 ; Simonnet et al, 2008 ; Moilanen et al, 2006) but these simulations have to be completed with reliable experimental validations if precise local values of turbulent dissipation rates are required. In particular, the numerical prediction of maximal

dissipation rates is still a major issue even for single-phase mixing processes. Another strategy is the use of dedicated bioreactors promoting more homogeneous hydrodynamics, regarding power dissipation. For example, Mehmood et al (2010) used unbaffled shaking flasks in the transition regime to study power dissipation effects on *S. pristinaespiralis*. Indeed, for these conditions, the maximal dissipation can be assumed equal to its mean value (Peter et al, 2006a), which simplifies the study of the coupling between (mass or momentum) transfers and biological response. Other systems, such as Taylor-Couette bioreactors (Douaire et al, 2010) could be advantageous for the study of hydrodynamics impact on *Streptomyces* strains.

2. *Newtonian behaviour* (Roubos et al, 2001). Depending on fermentation time, the *Streptomyces* strain and bioreactor hydrodynamics, *Streptomyces* may exhibit filamentous morphology entailing a non-Newtonian broth. As developed before, broth rheology may strongly impact power dissipation values. A good alternative is thus the dynamic experimental measurement of the dissipation through couple or electrical power consumption during the culture (Lin et al, 2010).

3. *Homogeneous physicochemical environment*. Most of literature data reporting hydrodynamics effects on *Streptomyces* physiology have been obtained in laboratory-scale systems, with working volumes between 1 and 50 L. For these systems and under usual agitation conditions, concentration gradients are expected to remain low. Thus, *Streptomyces* cells "detect" no sensible concentration fluctuations during their circulation in the reactor. A study with *S. clavuligerus* (Yegneswaran et al, 1991) has been dedicated to recreate the oxygen fluctuations expected in large-scale bioreactors in a 2 L vessel. To do this, Monte-Carlo controlled and periodic on/off oxygenations have been imposed at the gas inlet. These experiments have been compared to a culture with constant gas sparging. It has been shown that, despite the fact that same mean value of gas flow rate has been applied for the three experiments, applying fluctuating values of gas flow rates promoted very low concentrations of oxygen (0 - 5 % of air saturation) between each injection.

In sparged and mixed bioreactors, power dissipation (and thus hydromechanical stress) and mass transfer (among which oxygen transfer) are strongly coupled. It is thus a hard task to study the respective impact of an increase in power dissipation and in oxygen transfer. However, a commonly used strategy for controlling broth aeration is a change in agitation rate (Roubos et al, 2001 ; Shioya et al, 1999). Consequently, this entails non-constant transfer

capacities and non-constant hydromechanical stress. Such varying operating conditions may impact the physiological response despite no study has been specifically dedicated to *Streptomyces* cultures. To maintain a constant agitation rate during the culture and to reach a constant DOT, one strategy found in the literature is to modify the partial pressure of oxygen at the inlet of the bioreactor. For example, Yegneswaran et al (1991) used air / O₂ and O₂ / N₂ mixtures to control DOT at 100 and 50 % of air saturation respectively. Nevertheless, a constant DOT is not a guarantee of a constant mass flux as power dissipation sensibly impacts the liquid-side mass transfer coefficient (see equations (I-9) to (I-11)). On the basis of the preceding remarks, it can be noted that the studies of literature dealing with the impact of hydrodynamics on *Streptomyces* cultures are generally characterized by a diversity of culture systems, of operating conditions and of microbial morphology (see the synthesis of literature data in Table I-3).

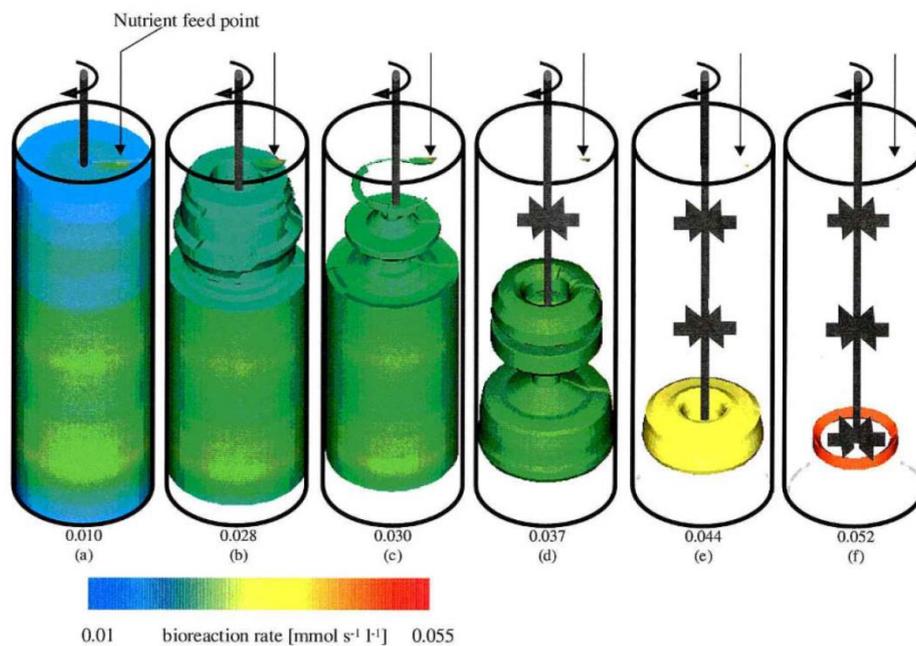


Figure I-12. Local bioreaction rates ($\text{mmol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{L}^{-1}$) modelled by networks of zones for a 3 m^3 triple-impeller industrial pilot-plant bioreactor producing tylosin. Each figure provides iso-values contours (Hristov et al, 2001).

Effects of agitation intensity on growth and enzymatic activity

Until a critical value, the increase in agitation rates globally promotes higher *Streptomyces* biomass concentrations (Mehmood et al, 2010 ; Tough et al, 1996 ; El-Enshasy et al, 2000). It was reported that an increase in power dissipation promoted a higher biomass concentration with *S. pristinaespiralis* and *S. natalensis*, respectively, in shaking flasks. Nevertheless, the expected simultaneous increase in the oxygen transfer capacities of the shaking flasks could seriously be considered to explain the observed biomass increase. On the contrary, in *S. clavuligerus* cultures, the overall biomass yield reduced, when the gassed power input was set above 1.1, 1.7, or 2.0 kW.m⁻³ depending on the composition of the culture medium (Roubos et al, 2001). Large et al (1998) showed that for impeller tip speed from 1.88 to 2.83 m.s⁻¹, the biomass concentration of *S. clavuligerus* was increased. At 3.77 m.s⁻¹, biomass concentration was lower, probably due to cell lysis and hyphae fragmentation. The high agitation speeds at the initial stage of fermentation inhibited the cell growth of *Streptomyces* sp. P6621-RS1726 (Okabe et al, 1992).

Effects of agitation intensity on substrates consumption

The increase in agitation can also affect the consumption of substrates through a modification in *Streptomyces* morphology (pellets, diameter) or of the liquid-side mass transfer coefficient. For example, the increase in power dissipation resulted in faster consumption of oil in *S. fradiae* (Ohta et al, 1995) while this effect was less marked for lipid consumption in *S. clavuligerus* (Large et al, 1998). In a recent study, Mehmood et al (2011) have shown that the specific consumption rate of oxygen of *S. pristinaespiralis pr11* was strongly impacted by power dissipation during its culture in shaking flasks. These authors also showed that the antibiotic production was accompanied by additional specific oxygen consumption.

Effects of agitation intensity on antibiotics production

The increase in agitation is known to modulate the production of antibiotics but the results referenced in literature do not permit to draw a general trend. Rosa et al (2005) have reported that the production of clavulanic acid by *S. clavuligerus* increased with stirrer speed but this was not observed by Belmer-Beiny and Thomas (1991). It was concluded that agitation speed affected the virginiamycin production in *S. virginiae* independently of dissolved oxygen level Shioya et al, 1999. Natamycin production was multiplied by a factor 7 between 50 min⁻¹ and 250 min⁻¹ (El-Enshasy et al, 2000) but this was limited to intermediate dissipations. Indeed, an inverse trend has been reported for the highest power dissipations by Ohta et al (1995) by

testing various agitation rates from 200 to 800 min^{-1} on the production of neomycin by *S. fradiae* in stirred bioreactor. The neomycin concentration increased up to 600 min^{-1} while thereafter the concentration of antibiotic sensibly decreased. Recently, Mehmood et al (2010) have shown that, in unbaffled shaking flasks, pristinamycins concentration and production yield were strongly related to power dissipation, as shown in Figure **1-13**. The decrease in antibiotic concentration observed for the highest power dissipations was attributed to possible cell damage.

Table I-3. Synthesis of the conditions of agitation and aeration in literature studies. T is the vessel diameter, D is the impeller diameter, P_g is the power dissipation under gassed conditions, Q_g is the volumetric gas flow rate, N is the agitation frequency, d_0 the shaking diameter.

Bioreactor design	Agitation and aeration operating conditions	Broth rheology	Morphology	Gassed power dissipation ($\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$) (calculated using eq. (I-2) if not provided in the study)	Ref.
$T = 0.265$ m; 3 Rushton turbines ($D = 0.088$ m); 18 to 33 kg of broth	$Q_g = 15\text{-}25$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; $N = 200$ min^{-1} at $t = 0$ and increasing values to maintain DOT > 50 % air sat.	Newtonian for the calculations	Filamentous	Calculated by the authors using equation (I-3). P/V varies during culture but remains lower than 8 $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	Roubos et al, 2001
5-L bioreactor ($V_L = 1.5$ L). Geometrical data not given	$Q_g = 1$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; $N = 450$ min^{-1} at $t = 0$ and increasing values till to 1000 min^{-1} to maintain DOT > 50 % or DOT > 25 % air sat.	unspecified	Unspecified	Non-calculated. Using $T = 0.18$ m, one Rushton turbine ($D = 0.08$ m) in equation (I-2) : $2.8 < P_g / V < 27.7$ $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	Shioya et al, 1999
250 mL flask; $25 < V_L < 150$ mL; $d_0 = 0.02$ m	$50 < N < 250$ min^{-1}	unspecified	Unspecified	Not calculated in the study. Using equations (I-6) and (I-7), in a unbaffled shaking flask and with the hypothesis of Newtonian rheology $0.0075 < P / V < 0.55$ $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	El-Enshasy et al, 2000
250, 500 and 1000 mL flask; $10 < V_L < 200$ mL; $d_0 = 0.025$ m	$N = 250, 350$ min^{-1}	Newtonian / non-Newtonian	Pelleted	$0.55 < P / V < 13.6$ $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	Mehmo od et al, 2010
$T = 0.17$ m, $V_L = 4$ L; 2 Rushton turbines ($D = 0.0776$ m)	$Q_g = 2$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; Experiments 1 to 4 : $N = 300, 600, 800, 1000$ min^{-1} and no DOT control. Experiment 5 : $250 < N < 800$ min^{-1} , DOT = 50 % air sat	Shear-thinning (power law)	Filamentous	Non-calculated due to non-Newtonian rheology of broth. At $t = 0$, considering a Newtonian rheology and water-like viscosity, equation (I-2) would provide for experiments 1-4: $P_g / V = 0.59, 4.3, 9.7, 18.3$ $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	Rosa et al, 2005
7 L bioreactor ($V_L = 5$ L), $T = 0.15$ m; 2 Rushton turbines ($D = 0.067$ m)	$Q_g = 2.5$ $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ $N = 490, 990, 1300$ min^{-1} No DOT control	unspecified	Filamentous	Not calculated in the study. Considering a Newtonian rheology and water-like viscosity, equation (I-2) would provide: $0.61 < P / V < 9.8$ $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$	Bemar-Beiny et al, 1991

Cell damage

Although agitation is beneficial in most sparged bioreactors, excessive agitation may cause an inhibition of microbial growth, metabolism and an alteration of morphology generally termed as turbohypobiosis. Turbohypobiosis state is the interaction of a medium flow with living cells and depends upon the bioreactor hydrodynamics (Rikmanis et al, 2007). Turbohypobiosis should be considered in the design and operation of bioreactors because it can lead to decreased productivity (Toma et al, 1991). Intense agitation can cause hyphae breaking into fragments and is likely to result in the formation of short, branched hyphae and, in some cases, the release of intracellular substances. Under mild agitation conditions, on the other hand, the individual hyphae tend to become longer and less branched.

For the dispersed form of filamentous micro-organisms, the independent effect of agitation is difficult to quantify as it is coupled with various other parameters (Figure I-11). In many cases, improved microbial growth due to improved oxygen transfer is claimed as a positive effect of agitation and may also possibly compensate shear damage. The effect of mechanical agitation on cell growth is hard to describe in culture media due to the possible presence of additives and toxic compounds which can affect cell wall strength, and hence the susceptibility of cells to rupture (Ayazi et al, 1994). An understanding of how agitation affects mycelial morphology and productivity would be valuable in optimizing the design and operation of large-scale fermentations for the production of antibiotics and other metabolites (Amanullah et al, 2000). *Streptomyces* cell damage study remains thus a challenge.

First, microorganisms exposed to high stresses, and possibly damaged, may recover their metabolic activity under lower hydrodynamic stresses. This ability to recover will depend on the level of damage and of the recovery rate. Then, the exposure to a high shear zone will not necessarily cause instantaneous damage but so will the chronic exposure to those high stresses. Finally, the physiological state of the cell, generally quantified by its instantaneous specific growth rate, impacts cell resistance.

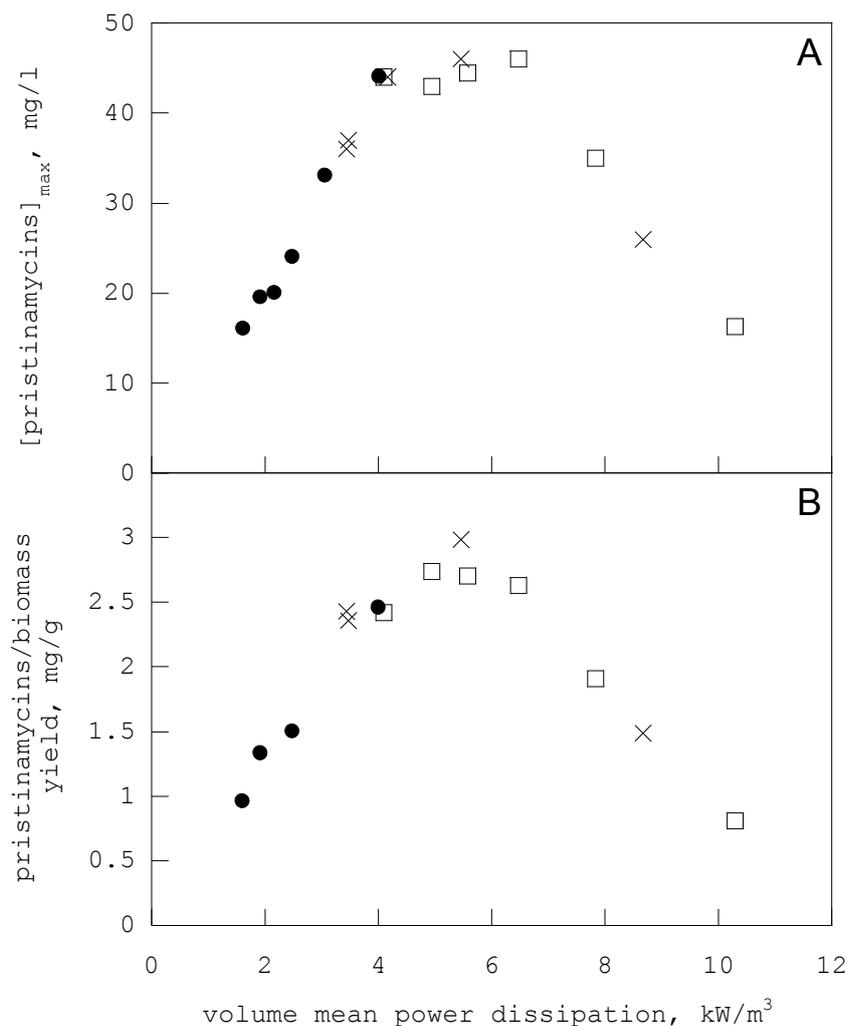


Figure I-13. Variation of pristinamycins maximum concentration (A) and of pristinamycins / biomass yield (B) with power dissipation in 250 mL flasks (●), 500 mL flasks (×) and 1000 mL flasks (□) (Mehmood et al, 2010).

When pellet morphology is encountered, high dissipations promote small, smooth and compact pellets while, under low hydromechanical stress, pellets are larger and more hairy (Tough et al, 1996 ; Bellgardt et al, 1998). Stress of pellets via collision or interaction with impeller can cause fragmentation of aggregates and finally pellet break up and dispersion. Normally, pellets do not form in bioreactors because of the high aeration and vigorous agitation, and dispersed mycelial growth is usually the predominant form (Whitaker, 1992). Conversely, in shaking flask cultures, maximal shear levels are lower, promoting the development of pellet morphology. Kahar et al (2002) have reported that at high power dissipation (8.0 kW.m⁻³), the morphology of *Streptomyces albulus* changed from the pellet to the filamentous form due to the extensive shear stress. Tamura et al (1997) have studied the

effects of various agitation rates ($N = 250, 400, 550, 700$ and 900 min^{-1}) in stirred bioreactor on *S. fradiae* morphology during a culture. These cultures were then compared with cultures operated in an airlift bioreactor. At 900 min^{-1} , the microorganism was mainly in the form of filament and entangled filaments while at 400 min^{-1} , the respective morphology proportions of filamentous, entangled filaments and pellets evolved during the culture till 13, 47 and 40 %, respectively. On the other hand, in the air-lift reactor, the pellet ratio in the airlift reactor increased to 80 % after 160 h of culture. Under the low shear conditions of the air-lift reactor, the pellet area was 100 times larger than under high shear conditions.

1.4.8.b. Oxygen transfer

Effect of oxygen transfer on biomass growth and morphology

Increased DOT resulted in better growth in *Streptomyces globisporus* S186 (Liu et al, 2000), *Streptomyces virginiae* (Shioya et al, 1999), *Streptomyces parvulus* (Kaiser et al, 1994) and *Streptomyces griseoflavus* (Dick et al, 1994). Chen and Wilde (1991) observed that cellular growth rates of *S. fradiae* were severely reduced when DOT fell below 25 % of air saturation, but these rates resumed to initial rates when DOT was raised back to saturation. On the contrary, Rollins et al (1998) reported that a DOT at either 50 % or 100 % of air saturation had no impact on the specific growth rate of *S. clavuligerus*. The DOT also affected the morphology of *Streptomyces*. High DOT promoted pellet morphology while filamentous form was dominant at low DOT (with *Streptomyces tendae* (Vecht-Lifshitz et al, 1990 ; Braun et al, 1991) and with *Streptomyces avermitilis* (Yin et al, 2008) . Biomass concentration of *S. clavuligerus* was not sensibly affected by oxygen fluctuations (Yegneswaran et al, 1991).

Effect of oxygen transfer on antibiotics production

Studies that are dedicated to the effects of DOT on the concentration of antibiotics show that higher DOT generally promotes an enhanced production (see the examples given in Table I-4). Various studies indicate that DOT plays an important role in regulating the activities of the biosynthetic enzymes and thus possibly affects antibiotic production. In *S. clavuligerus*, the specific activities of deacetoxycephalosporin C synthase and isopenicillin N synthetase, two enzymes of the cephamycin C biosynthetic pathway, increased 2.3 and 1.3 times respectively, when the DOT was maintained at 100 % of air saturation in the cultures (Rollins et al, 1991). On the contrary, DOT had no effect on the formation of L- α -aminoadipyl-L-cysteine-D-valine (ACV) synthetase, which is the first enzyme in the biosynthetic pathway for all natural penicillins and cephalosporins (Zhang et al, 1991).

Besides studies showing the effects of DOT on antibiotics titer, very few studies have correlated the onset of antibiotic production with DOT. Clark et al (1995) have observed that erythromycin could be produced in both oxygen limiting and non-limiting conditions by *Saccharopolyspora erythraea*, formerly known as *Streptomyces erythraeus* while vancomycin was only produced in oxygen-sufficient cultures of *Amycolatopsis orientalis* (formerly *Streptomyces orientalis*). However, when *A. orientalis* was transferred from limiting to non-limiting oxygen conditions, production of vancomycin still occurred, indicating that the biosynthetic enzymes necessary for the synthesis of antibiotics were even present in oxygen limiting conditions (Dunstan et al, 2000). The authors suggested that, at low oxygen condition, the oxygen was preferentially transferred for biomass biosynthesis and no oxygen was remaining for antibiotic biosynthesis. In the same way, Yegneswaran et al (1991) reported that the Monte-Carlo or cycling fluctuations of oxygen concentration could lower the Cephamycin C concentration by 30 and 15 % respectively, compared to a culture under continuous aeration. This decrease was attributed to short culture periods during which the oxygen concentration dropped to zero. Recently, Mehmood et al (2011) have shown that the onset of antibiotic production by *S. pristinaespiralis* was observed in shaking flasks only in non-limiting gas-liquid oxygen transfer.

To improve the oxygen solubility and thus oxygen transfer in the fermentation medium, various oxygen carriers such as perfluorocarbon (PFC) have been tested. Elibol and Mavituna (1998) and Elibol et al (1995) reported that by adding PFC, the oxygen transfer capacities of fermentation medium sensibly increased. In these experiments 10 to 50 % (v/v) of PFC were added and tested on the actinorhodin production by *S. coelicolor*. The addition of 50 % (v/v) PFC in the fermentation medium has improved the dissolved oxygen profile and resulted in a five-fold increase in the maximum actinorhodin concentration as well as remarkable increases in glucose and oxygen consumption rates. Actinorhodin concentrations were linearly related to the volumetric oxygen uptake rate.

Table I-4. Effects of dissolved oxygen concentration on antibiotic production by various *Streptomyces*.

Antibiotic	Microorganism	Condition of oxygen transfer tested	Effect on growth and production	Ref.
ratamycin	<i>S. olindensis</i>	dissolved oxygen was controlled at 100 % of air saturation during the growth phase compared to experiments without DOT control	Two-fold increase of ratamycin concentration	Martins et al, 2004
virginamycin	<i>S. virginiae</i>	DOT varying between 10 and 80 % of air saturation	Linear increase of antibiotic concentration	Shioya et al, 1999
cephamycin C	<i>S. clavuligerus</i>	DOT controlled at air saturation 100 % during growth phase	3 fold increase in the maximum cephamycin C	Yegneswaran et al, 1991
chlortetracyclin	<i>S. aureofaciens</i>	increase in the level of aeration	Progressive increase in chlortetracycline yield	Jensen et al, 1966
tylosin and macrosin	<i>S. fradiae</i>	increased aeration	Increased yields of tylosin and macrosin	Peter et al, 2006a
avermectin	<i>S. avermitilis</i>	DOT below 20 % of the saturation	Dramatic reduction of production	Yin et al, 2008
cephalosporin C	<i>S. clavuligerus</i>	reduced oxygen (air plus N ₂ in the inlet gas)	The antibiotic concentration remained stable when air was used to supply oxygen. However, under reduced oxygen concentration antibiotic concentration dropped to one third of its highest value.	Yegneswaran et al, 1988
cephamycin C	<i>S. clavuligerus</i>	DOT dropped to almost zero	Delay of the onset of production and the lowered Cephamycin C concentration	Rollins et al, 1991
cephamycin C and capreomycin	<i>S. tendae</i>	critical DOT required for the production		Feren et al, 1969
mutanolysin	<i>S. globisporus</i> S186			Liu et al, 2000
tylosin	<i>S. fradiae</i>			Chen et al, 2008

I.4.9. Conclusion

Today, industrial cultures of *Streptomyces* play a major role regarding key medical use of antibiotics. Different process parameters like medium composition, temperature, pH and hydrodynamics can affect mass transfer, mixing performance, oxygen transfer, heat transfer, morphology, growth, rheology and ultimately antibiotics production. The physiological response to these various parameters is strain-dependent, which may hard the proposal of general laws concerning optimal process parameters. It is thus quite difficult to optimize fermentation medium without a good knowledge of the antibiotics structure, of the precursors required for antibiotics synthesis as well as of the physiology and of the morphology of the *Streptomyces* strain used. While numerous works have been dedicated to the effects of nutritional “stress” on the production of antibiotics, very few works have correlated hydromechanical stress with antibiotic production although those two stresses are strongly coupled in bioreactors. The impact of hydrodynamic stresses on morphology and production of antibiotics as well as optimum levels of oxygen transfer rate, gas-liquid mass transfer coefficient required for the production of antibiotics are still missing in literature. A better description of the coupling between hydrodynamic stress, morphology, and mass transfer encountered in *Streptomyces* cultures appears thus as a pre-requisite to a more precise description of antibiotics synthesis in bioreactors.

Références bibliographiques partielles.

Amanullah A, Justen P, Davies A, Paul GC, Nienow AW, Thomas CR (2000) Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Eng J* 5:109-114.

Ayazi Shamlou P, Makagiansar HY, Ison AP, Lilly MD, Thomas CR (1994) Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem Eng Sci* 49:2621-2631.

Bellgardt KH (1998) Process models for production of beta-lactam antibiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 60:153-194.

Belmar-Beiny MT, Thomas CR (1991) Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus*: Effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol Bioeng* 37:456-462.

- Bouyer D, Coufort C, Line A, Do-Quang Z (2005) Experimental analysis of floc size distributions in a 1-L jar under different hydrodynamics and physicochemical conditions. *J Colloid Interface Sci* 292:413-428.
- Braun S, Vecht-Lifshitz SE (1991) Mycelial morphology and metabolite production. *Trends Biotechnol* 9:63-68.
- Büchs J, Lotter S, Milbradt C (2001) Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochem Eng J*, 7:135-141.
- Büchs J, Maier U, Milbradt C, Zoels B (2000) Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: II. Nondimensional description of specific power consumption and flow regimes in unbaffled flasks at elevated liquid viscosity. *Biotechnol Bioeng* 68:594-601.
- Campesi A, Cerri MO, Hokka CO, Badino AC (2009) Determination of the average shear rate in a stirred and aerated tank bioreactor. *Bioprocess Biosyst Eng* 32:241-248.
- Chen C, Si S, He Q, Xu H, Lu M, Xie Y, Wang Y, Chen R (2008) Isolation and characterization of antibiotic NC0604, a new analogue of bleomycin. *J Antibiot* 61:747-751.
- Chen HC, Wilde F (1991) The effect of dissolved oxygen and aeration rate on antibiotic production of *Streptomyces fradiae*. *Biotechnol Bioeng* 37:591-595.
- Clark GJ, Langley D, Bushell ME, (1995) Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: Investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology* 141:663-669.
- Coufort C, Bouyer D, Liné A, (2005) Flocculation related to local hydrodynamics in a Taylor-Couette reactor and in a jar. *Chem Eng Sci* 60:2179-2192.
- Cui YQ, Van Der Lans RGJM, Luyben KCAM (1996) Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple Rushton turbines. *Chem Eng Sci* 51: 2631-2636.
- Delafosse A, Morchain J, Guiraud P, Liné A (2009) Trailing vortices generated by a Rushton turbine: Assessment of URANS and large Eddy simulations. *Chem Eng Res Des* 87:401-411.
- Deutscher J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 11:87-93.
- Dick O, Onken U, Sattler I, Zeeck A (1994) Influence of increased dissolved oxygen concentration on productivity and selectivity in cultures of a colabomycin-producing strain of *Streptomyces griseoflavus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 41:373-377.
- Douaire M, Mercade M, Morchain J, Loubière P (2010) A unique phenotypic modification of *Lactococcus lactis* cultivated in a Couette bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 108:559-571.
- Douaire M, Morchain J, Liné A (2009) Mini-review : relationship between hydrodynamic conditions and substrate influx toward cells. 13th European conference on mixing, April, 14-17th 2009, London, UK.

- Dunstan GH, Avignone-Rossa C, Langley D, Bushell ME (2000) The Vancomycin biosynthetic pathway is induced in oxygen-limited *Amycolatopsis orientalis* (ATCC 19795) cultures that do not produce antibiotic. *Enzyme Microb Technol* 27:502-510.
- El-Enshasy HA, Farid MA, El-Sayed ESA (2000) Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *J Basic Microbiol* 40:333-342.
- Elibol M, Mavituna F (1998) A remedy to oxygen limitation problem in antibiotic production: Addition of perfluorocarbon. *Biochem Eng J* 3:1-7.
- Elibol M, Ulgen K, Kamaruddin K, Mavituna F (1995) Effect of inoculum type on actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Biotechnol Lett* 17:579-582.
- Feren CJ, Squires RW (1969) The relationship between critical oxygen level and antibiotic synthesis of capreomycin and cephalosporin C. *Biotechnol Bioeng* 11:583-592.
- Fujasová M, Linek V, Moucha T (2007) Mass transfer correlations for multiple-impeller gas-liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on "local" k_{La} values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chem Eng Sci* 62:1650-1669.
- Gabelle JC, Augier F, Carvalho A, Rousset R, Morchain J (2011) Effect of tank size on k_{La} and mixing time in aerated stirred reactors with non-Newtonian fluids. *Can J Chem Eng* 89:1139-1153.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E (2009) Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol Adv* 27:153-176.
- Görke B, Stülke J (2008) Carbon catabolite repression in bacteria: Many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol* 6:613-624.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H (2005) Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnol. Bioeng.* 92:614-623.
- Hille A, Neu TR, Hempel DC, Horn H (2009) Effective diffusivities and mass fluxes in fungal biopellets. *Biotechnol Bioeng* 103:1202-1213.
- Hristov H, Mann R, Lossev V, Vlaev SD, Seichter P (2001) A 3-D Analysis of Gas-Liquid Mixing, Mass Transfer and Bioreaction in a Stirred Bio-Reactor. *Food Bioprod Proc* 79:232-241.
- Huchet F, Line A, Morchain J (2009) Evaluation of local kinetic energy dissipation rate in the impeller stream of a Rushton turbine by time-resolved PIV. *Chem Eng Res Des* 87:369-376.
- Hughmark GA. (1980) Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine Agitated systems. *Ind Eng Chem Process Des Dev* 19:638-641.
- Jensen AL, Schultz JS, Shu P (1966) Scale-up of antibiotic fermentations by control of oxygen utilization. *Biotechnol Bioeng* 8:525-537.

- Kahar P, Kobayashi K, Iwata T, Hiraki J, Kojima M, Okabe M (2002) Production of alphan-polylysine in an airlift bioreactor (ABR). *J Biosci Bioeng* 93:274-280.
- Kaiser D, Onken U, Sattler I, Zeeck A (1994) Influence of increased dissolved oxygen concentration on the formation of secondary metabolites by manumycin-producing *Appl Microbiol Biotechnol* 41: 309-312.
- Kim JH, Hancock IC (2000) Pellet forming and fragmentation in liquid culture of *Streptomyces griseus*. *Biotechnol Lett* 22:189-192.
- Krull R, Cordes C, Horn H, Kampen I, Kwade A, Neu TR, Nörtemann B (2010) Morphology of filamentous fungi - Linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. *Adv Biochem Eng/Biotechnol* 121:1-21.
- Large KP, Ison AP, Williams DJ (1998) The effect of agitation rate on lipid utilisation and clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *J Biotechnol* 63:111-119.
- Lin PJ, Scholz A, Krull R (2010) Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochem Eng J* 49:213-220.
- Liu TJ, Xu WL, Sun WB, Zhang YZ (2000) Effect of dissolved oxygen on mutanolysin fermentation. *Chin J Biotechnol* 16:229-231.
- Maier U (2002) Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. PhD thesis. RWTH Aachen University. Aachen, Germany.
- Makagiansar HY, Ayazi Shamlou P, Thomas CR, Lilly MD (1993) The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Eng* 9:83-90.
- Martín J (1977) In Control of antibiotic synthesis by phosphate. In *Advances in Biochemical Engineering* 6.
- Martins RA, Guimares LM, Pamboukian CR, Tonso A, Facciotti MCR, Schmidell W (2004) The effect of dissolved oxygen concentration control on cell growth and antibiotic retamycin production in *Streptomyces olindensis* So20 fermentations. *Braz J Chem Eng* 21:185-192.
- Mehmood N, Olmos E, Goergen JL, Blanchard F, Ullisch D, Klöckner W, Büchs J, Delaunay S (2011) Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnol Bioeng* 108:2151-2161.
- Mehmood N, Olmos E, Marchal P, Goergen JL, Delaunay S (2010) Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_{La} . *Process Biochem* 45:1779-1786.
- Moilanen P, Laakkonen M, Aittamaa J (2006) Modeling aerated fermenters with computational fluid dynamics. *Ind Eng Chem Res* 45:8656-8663.

Mollet M, Ma N, Zhao Y, Brodkey R, Taticek R, Chalmers JJ (2004) Bioprocess equipment: Characterization of energy dissipation rate and its potential to damage cells. *Biotechnol Progr* 20:1437-1448.

Ohta N, Yong Soo P, Yahiro K, Okabe M (1995) Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J Ferment Bioeng* 79:443-448.

Okabe M, Kuwajima T, Satoh M, Kimura K, Okamura K, Okamoto R (1992) Preferential and high-yield production of a cephamycin C by dissolved oxygen controlled fermentation. *J Ferment Bioeng* 73:292-296.

Olmos E, Gentric C, Midoux N (2003) Numerical description of flow regime transitions in bubble column reactors by a multiple gas phase model. *Chem Eng Sci* 58:2113-2121.

Olmos E, Gentric C, Vial C, Wild G, Midoux N (2001) Numerical simulation of multiphase flow in bubble column reactors. Influence of bubble coalescence and break-up. *Chem Eng Sci* 56:6359-6365.

Pamboukian CRD, Facciotti MCR (2005) Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations. *Braz J Chem Eng* 22:31-40.

Papagianni M (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnol Adv* 22:189-259.

Paul GC, Thomas CR (1998). Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 60:1-59.

Peter CP, Suzuki Y, Büchs J (2006a) Hydromechanical stress in shake flasks: Correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnol Bioeng* 93:1164-1176.

Peter CP, Suzuki Y, Rachinskiy K, Lotter S, Büchs J (2006b) Volumetric power consumption in baffled shake flasks. *Chem Eng Sci*, 61:3771-3779.

Pilz RD, Hempel DC (2005) Mechanical stress on suspended particles in two- and three-phase airlift loop reactors and bubble columns. *Chem Eng Sci* 60:6004-6012.

Pinto LS, Vieira LM, Pons MN, Fonseca MMR, Menezes JC (2004) Morphology and viability analysis of *Streptomyces clavuligerus* in industrial cultivation systems. *Bioprocess Biosyst Eng* 26:177-184.

Rikmanis M, Berzinš A, Viesturs U (2007) Excess turbulence as a cause of turbohypobiosis in cultivation of microorganisms. *Cent Eur J Biol* 2:481-501.

Rokem JS, Lantz AE, Nielsen J (2007) Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep* 24:1262-1287.

Rollins MJ, Jensen SE, Westlake DWS (1988) Effect of aeration on antibiotic production by *Streptomyces clavuligerus*. *J Ind Microbiol* 3:357-364.

- Rollins, MJ, Jensen SE, Westlake DWS (1991) Effect of dissolved oxygen level on ACV synthetase synthesis and activity during growth of *Streptomyces clavuligerus*. Appl Microbiol Biotechnol 35:83-88.
- Rosa JC, Neto AB, Hokka CO, Badino AC (2005) Influence of dissolved oxygen and shear conditions on clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. Bioprocess Biosystems Eng 27:99-104.
- Roubos JA, Krabben P, Luiten RGM, Verbruggen HB, Heijnen JJ (2001) A quantitative approach to characterizing cell lysis caused by mechanical agitation of *Streptomyces clavuligerus*. Biotechnol Prog 17:336-347.
- Ruiz B, Chevez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Rodriguez-Sanoja R, Sanchez S, Langley E (2010) Production of microbial secondary metabolites: Regulation by the carbon source. Crit Rev Microbiol 36:146-167.
- Sanchez S, Chavez A, Forero A, Garcia-Huante Y, Romero A, Sanchez M, Rocha D, Sanchez B, Valos M, Guzman-Trampe S, and others 2010 Carbon source regulation of antibiotic production. J Antibiot 63:442-459.
- Shioya S, Morikawa M, Kajihara Y, Shimizu H (1999) Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. Appl Microbiol Biotechnol 51:164-169.
- Simonnet M, Gentric C., Olmos E, Midoux N (2008) CFD simulation of the flow field in a bubble column reactor: Importance of the drag force formulation to describe regime transitions. Chem Eng Process 47:1726-1737.
- Tamura S, Park Y, Toriyama M, Okabe M (1997) Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. J Ferment Bioeng 83:523-528.
- Toma MK, Ruklisha MP, Vanags JJ, Zeltina MO, Leite MP, Galinina NI, Viesturs UE, Tengerdy RP (1991) Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. Biotechnol Bioeng 38:552-556.
- Tough AJ, Prosser JI (1996) Experimental verification of a mathematical model for pelleted growth of *Streptomyces coelicolor* A3 (2) in submerged batch culture. Microbiology 142:639-648.
- Vecht-Lifshitz SE, Magdassi S, Braun S (1990) Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. Biotechnol Bioeng 35:890-896.
- Warren SJ, Keshavarz-Moore E, Shamlou PA, Lilly MD, Thomas CR, Dixon K (1995) Rheological measurements of three actinomycetes in submerged cultures. Bioprocess Eng 13:45-48.
- Whitaker A (1992) Actinomycetes in submerged culture. Appl Biochem Biotechnol 32:23-35.

Wucherpfennig T, Hestler T, Krull R (2011) Morphology engineering – Osmolality and its effect on *Aspergillus niger* morphology and productivity. *Microb Cell Fact* 10:58.

Wucherpfennig T, Kiep KA, Driouch H, Wittmann C, Krull R (2010) Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Adv Appl Microbiol* 72:89-133.

Yegneswaran PK, Gray MR (1991). Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnol Prog* 7:246-250.

Yegneswaran PK, Gray MR, Thompson BG (1991) Experimental simulation of dissolved oxygen fluctuations in large fermentors: Effect on *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Bioeng* 38:1203-1209.

Yegneswaran PK, Gray MR, Westlake DWS (1988) Effects of reduced oxygen on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus*. *Biotechnol Lett* 10:479-484.

Yin P, Wang YH, Zhang SL, Chu J, Zhuang YP, Chen N, Li XF, Wu YB (2008). Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. *J Chin Inst Chem Eng* 39:609-615.

Zhang J, Demain AL (1991) Regulation of ACV synthetase in penicillin- and cephalosporin-producing microorganisms. *Biotechnol Adv* 9:623-641.

Matériel

Et

Méthodes

II. Matériel et méthodes

II.1. Microorganismes utilisés

Toutes les manipulations ont été réalisées avec la souche *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338. Cette souche est commercialisée par la «Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (Leipzig, Allemagne).

II.2. Milieux de culture

II.2.1. Milieu de sporulation

La composition du milieu de sporulation est la suivante : Glucose, 4 g.L⁻¹; extrait de levures, 4 g.L⁻¹ ; extrait de malt, 10 g.L⁻¹ ; CaCO₃, 0,02 g.L⁻¹ ; agar, 12 g.L⁻¹. Le pH du milieu est ajusté à 7,2 avant la stérilisation par autoclavage (20 minutes à 120 °C). Le milieu est ensuite distribué dans des boîtes de Pétri à raison d'environ 20 mL par boîte.

II.2.2. Milieu complexe insoluble (ICS)

Le milieu est préparé en deux étapes. Tout d'abord, le corn steep est mis en suspension dans de l'eau distillée, à une concentration de 12,5 g.L⁻¹) et stérilisé par autoclavage (20 minutes à 120°C). Puis la suspension obtenue est centrifugée (10 minutes à 5000 g) et le surnageant est passé sur filtre plissé. Le filtrat est ensuite utilisé pour la seconde étape de préparation. La composition du milieu ICS est la suivante : Saccharose, 15 g.L⁻¹ ; corn steep atomisé, 40 % v/v; (NH₄)₂SO₄, 10 g.L⁻¹; KH₂PO₄, 1 g.L⁻¹; NaCl, 3 g.L⁻¹; MgSO₄, 7 H₂O, 0,2 g.L⁻¹; CaCO₃, 1,25 g.L⁻¹.

Le pH du milieu est ajusté à 6,8 (avec une solution de NaOH 30 %) et le CaCO₃ est ajouté, pour atteindre une concentration finale de 1,25 g.L⁻¹. Le milieu est ensuite distribué en fioles d'Erlenmeyer chicanée (40 mL par fiole) et stérilisé par autoclavage (20 minutes à 120°C).

II.2.3. Composition du milieu de culture synthétique (MPS2)

La composition du milieu de culture synthétique MPS2 est la suivante. Glucose, 30 g.L⁻¹ ; acide malonique, 7,5 g.L⁻¹ ; L-Arginine, 3 g.L⁻¹ ; L-Glutamate, 1,5 g.L⁻¹ ; MgSO₄, 7 H₂O, 0,3 g.L⁻¹; FeSO₄, 7 H₂O, 15 mg.L⁻¹ ; ZnSO₄, 7 H₂O, 0,55 g.L⁻¹, K₂HPO₄, 0,75 g.L⁻¹, CaCl₂, 2 H₂O, 0,40 g.L⁻¹. Le pH est ajusté à 6,8 par l'ajout de NaOH 30 % puis stérilisé par autoclavage (20 minutes à 120 °C) ou à la vapeur selon le type de réacteur utilisé. Pour éviter la précipitation des sels et les réactions de Maillard, des solutions de glucose, K₂HPO₄, CaCl₂,

2 H₂O et FeSO₄, 7 H₂O sont préparées séparément, concentrées, et ajoutées au reste du milieu stérilement.

Lors des cultures en bioréacteur, 0,02% d'un antimousse, le polypropylène glycol sont ajoutés dans le milieu MPS2.

II.3. Protocoles de culture

II.3.1. Stockage de spores

Les cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sont initiées à l'aide de spores stockées et conservées à -20 °C. Les spores sont obtenues suite à une culture sur le milieu de sporulation. Les boîtesensemencées sont incubées à 28 °C pendant environ deux à trois semaines. L'apparition d'un tapis gris constitue un indice de la présence de spores matures. Les spores sont récupérées avec 2 mL d'eau glycérolée (20 % v/v) stérile par boîte. Pour décrocher les spores, la surface du milieu de culture est raclée à l'aide d'un fil à boucle. La suspension collectée est ensuite répartie en microtubes pour être conservée à -20 °C.

II.3.2. Conditions de culture

Toutes les cultures sont réalisées en deux étapes, décrites ci-dessous (Figure II-1). Une préculture est, dans un premier temps réalisée sur le milieu ICS. Après un temps de culture adéquat, cette préculture est utilisée pour ensemenecer la culture sur milieu MPS2 et qui doit permettre la production de pristinamycines. Ce milieu MPS2 peut être contenu dans une fiole, un bioréacteur mécaniquement agité ou un bioréacteur de type airlift.

II.3.3. Préculture sur milieu ICS

II.3.3.a. Mise en œuvre de la préculture

La préculture est préparée dans du milieu complexe ICS en fiole. 30 mL de milieu ICS sont ensemenecés à 1,25 % avec un stock de spores de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 contenant $1,7 \times 10^5$ UFC.mL⁻¹. Puis, le milieu est incubé à 28 °C sur une table d'agitation à 250 rpm. L'objectif de cette étape est d'obtenir une germination des spores et un début de croissance de *S. pristinaespiralis*. La préculture est stoppée lorsque la DO à 660 nm atteint une valeur de 4, généralement après 20 h de culture. Cette préculture est ensuite utilisée pour ensemenecer le milieu synthétique en bioréacteurs à une concentration de 5 % v/v.

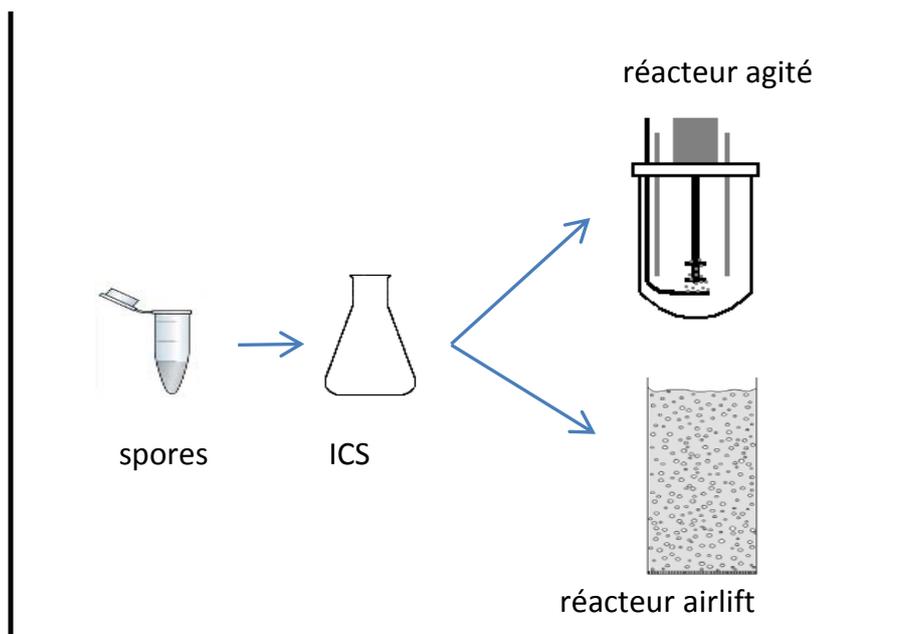


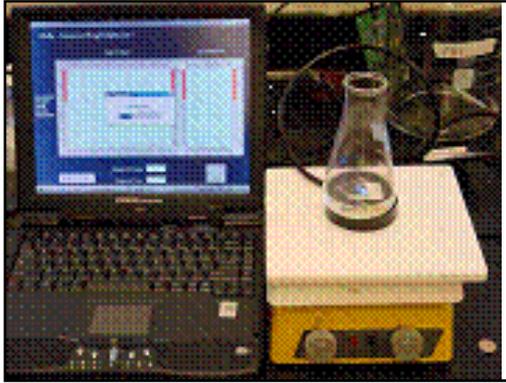
Figure II-1. Etapes de culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338.

II.3.3.b. Suivi de la concentration en oxygène dissous

La concentration en oxygène dissous est mesurée par un capteur d'oxygène optique à patch (Fluorometrix®, Baltimore, USA). Ce capteur d'oxygène optique se compose d'un plateau et d'un patch. Le plateau contient une diode électroluminescente (Light-Emitting Diode, LED), munie d'un filtre, qui émet la lumière d'excitation et d'un détecteur qui reçoit la luminescence réémise du patch. Le patch est mince, autoclavable, et contient un colorant luminescent sensible à l'oxygène, [1, 2-bis (diphényl phosphino) éthane Pt [S2C2 (CH₂-CH₂-N-2-pyrimidine] (BPh₄) immobilisé dans une matrice en silicone. Le patch est monté sur la surface intérieure du fond de la fiole (Figure II-2). La fiole est ensuite placée sur le plateau, lui-même posé sur la table de l'agitation et connecté à un ordinateur d'acquisition.

Au cours de cette procédure, la LED excite le colorant luminescent du patch. Le patch renvoie une lumière dont l'intensité est fonction du pourcentage d'oxygène dissous dans le milieu. La concentration d'oxygène dissous est ainsi mesurée au cours du temps de la culture avec une fréquence de 30 min.

(A)



(B)



Figure II-2. (A) Système de mesure Cellphase®. (B) Zoom sur le plateau de mesure (issu du document Fluorometrix®).

II.3.4. Cultures en bioréacteur en mode discontinu pour les nutriments

Grâce à la possibilité d'une régulation du pH, la culture en bioréacteur discontinu pour les nutriments est réalisée dans le milieu MPS2 sans tampon MOPS. Pour la régulation acido-basique, des solutions de HCl et de NaOH à 1 M sont utilisées lors des cultures en bioréacteur mécaniquement agité alors que ce sont des solutions à 3 M qui sont employées lors des cultures en réacteur airlift. Que ce soit en STR ou en airlift, le pourcentage de saturation en air du milieu de culture est suivi au cours du temps à l'aide d'une sonde électrochimique (Mettler-Toledo, Viroflay, France).

II.4. Caractéristiques des bioréacteurs utilisés

II.4.1. Réacteur mécaniquement agité

Lors des cultures en mode discontinu pour les nutriments et en agitation mécanique, un réacteur Tryton (GPC, La Rochelle, France) a été utilisé. Les caractéristiques de ce réacteur sont listées dans le Tableau II-1 et la Figure II-3.

Tableau II-1. Dimensions géométriques du réacteur Tryton.

Diamètre de cuve	12,5 cm
Volume total	2,85 L
Volume utile min/max	0,5 L / 2,2 L
Hauteur totale de cuve	26 cm
Diamètre de l'axe d'agitation	1 cm
Longueur de l'axe d'agitation	22 cm

Ce réacteur est muni de trois contre-pales et peut être équipé d'une ou plusieurs turbines Rushton à 6 pales droites. Le diamètre total de la turbine est de 6 cm et chaque pale à une hauteur de 1,2 cm. Il est également possible de munir cette cuve d'une hélice marine (Figure II-3) d'un diamètre de 5,5 cm et d'une hauteur de 3,5 cm.

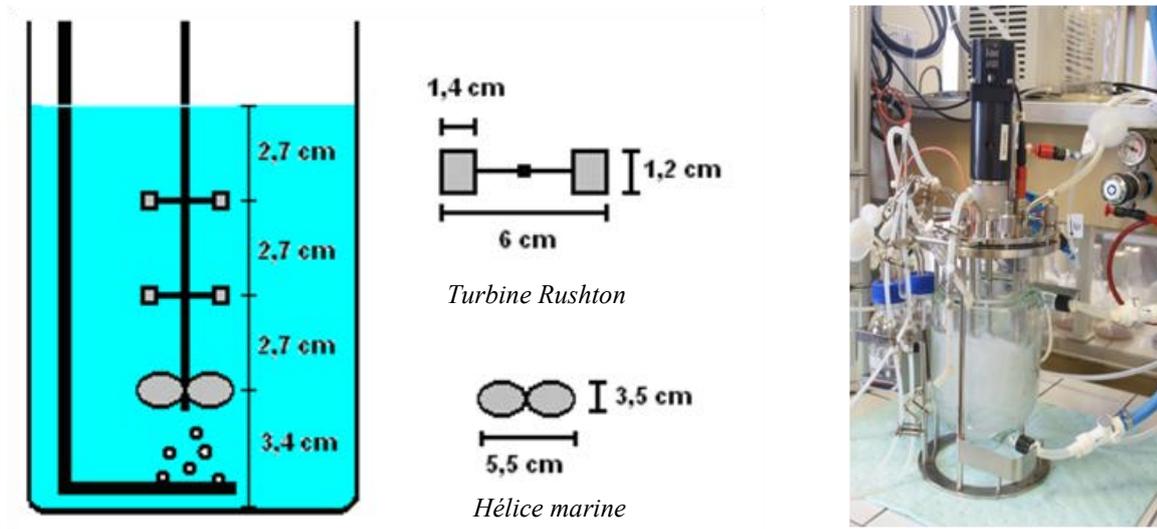


Figure II-3. Coupe longitudinale et photographie du bioréacteur Tryton (GPC, La Rochelle, France) utilisé au cours de ce travail (volume utile 1,2 L).

II.4.2. Réacteur de type airlift

Ce réacteur a été dimensionné et construit au sein du LRGP spécifiquement pour ce travail. La conception de ce bioréacteur sera explicitée ultérieurement dans ce document. La hauteur,

le diamètre et la hauteur du draft de ce bioréacteur sont respectivement de 1,23 m, 0,15 m et 0,85 m (Figure II-4, Tableau II-2). Le bioréacteur présente une « rampe de lancement », pièce en téflon rajoutée sous le downcomer pour accélérer le mouvement de liquide en-dessous du draft et éviter l'accumulation de microorganismes dans la partie inférieure de l'airlift.

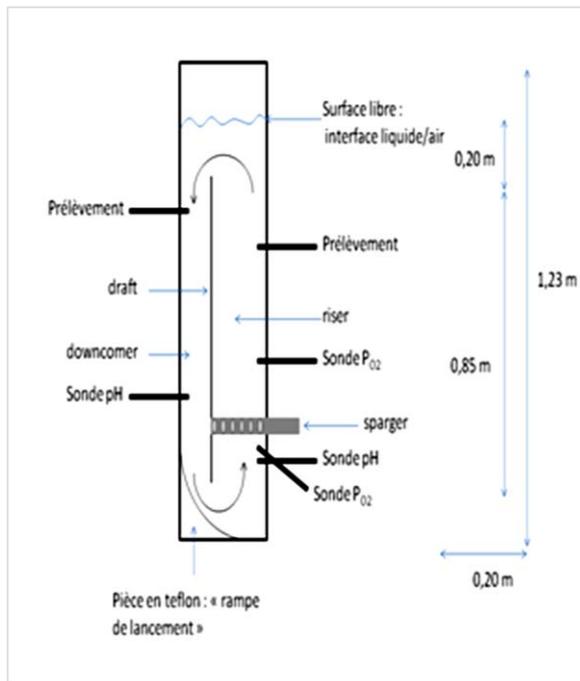


Figure II-4. Coupe longitudinale et photographie du réacteur de type airlift utilisé au cours de ce travail.

Tableau II-2 : Dimensions du réacteur airlift.

Diamètre de cuve D	150 mm
Volume utile	19 L
Hauteur totale	1230 mm
Hauteur de draft H_{draft}	850 mm
H_{draft}/D	5,6
Rapport de la section de la surface descendante et de la surface totale S_d/S_t	24%

Deux types de système d'injection de gaz (sparger) ont été utilisés. Le premier est un tube perforé de 18 fentes (Figure II-5a, Tableau II-3) et le second un tube poreux dont les orifices ont un diamètre moyen d'environ 50 μm (Figure II-5b, Tableau II-3).

Tableau II-3 : Caractéristiques des spargers

Dimensions	Sparger	
	Macro poreux	Perforé
Largeur / longueur	12 / 150 mm	12 / 150 mm
Taille de bulles générées	~ 1 mm	~ 1 - 10 mm
Diamètre de trous	~ 50 μm	3 mm
Nombre de trous	-	18



Figure II-5 : Distributeurs de gaz utilisés : (a) perforé et (b) poreux.

II.4.3. Logiciel de pilotage des bioréacteurs

Les bioréacteurs de type cuve agitée ou airlift sont pilotés par le logiciel C-BIO (GPC, La Rochelle, France). Celui-ci permet l'acquisition et la sauvegarde des données de saturation en oxygène dissous, de température, de pH et de rH. La régulation du pH, de l'oxygène dissous et de la température est assurée par des régulateurs de type PID (action Proportionnelle – Intégrale – Dérivée) que nous avons optimisées afin de réguler aussi finement que possible autour des points de consigne. L'action proportionnelle rend compte de la mesure de l'écart par rapport au point de consigne, l'action sera d'autant plus grande que cet écart est important. L'action intégrale est une correction des écarts continus par rapport au point de consigne ; ces écarts sont intégrés dans le temps depuis le début du procédé. Cette action permet de réduire progressivement les variations par rapport au point de consigne. L'action dérivée est utilisée lors de changements rapides et est donc rarement utilisée lors des cultures réalisées (changements de valeurs suffisamment lents).

II.4.4. Culture en milieu MPS2

A l'issue de la préculture, le milieu MPS2 estensemencé avec 5 % (v/v) de milieu de préculture. Dans un bioréacteur mécaniquement agité, le milieu MPS2 est initialement stérilisé par autoclavage à 120°C pendant 20 min. Dans le bioréacteur airlift, le milieu MPS2 est stérilisé en place par injection de vapeur fluente pendant 30 min (annexe 1).

Au cours de la culture, la température régulée à 28 °C, le pH extracellulaire à 6,8 et le taux d'oxygène dissous minimal à 30 % de la saturation en oxygène du milieu de culture. La concentration en oxygène dissous est contrôlée par modification de l'agitation, du débit d'aération ou de la composition du gaz injecté (air ou air enrichi en oxygène). Ces conditions sont les mêmes pour les deux types de bioréacteur piloté. Le maintien de la température du

milieu de culture est assuré par un chauffage par double enveloppe dans le cas du réacteur mécaniquement agité et à l'aide d'un thermoplongeur pour le bioréacteur airlift.

Des prélèvements sont réalisés à intervalles de temps régulier. Le moût constitué du milieu avec les cellules est utilisé pour le dosage de la concentration en biomasse mais aussi pour les analyses de taille des pelotes et de viabilité des cellules au sein des pelotes. Une partie du moût prélevé est centrifugée pendant 10 min à 15000 rpm, puis les surnageants sont filtrés sur filtre Millex® (Billrica, Etat-Unis) de porosité 0,22 µm. Les surnageants ainsi obtenus sont utilisés pour le dosage des concentrations en glucose, des acides aminés, en ammonium, en phosphate ainsi que pour la détection microbiologique et la mesure de la concentration des pristinamycines.

II.5. Détermination du coefficient volumique de transfert en oxygène, k_La

Le k_La a été calculé selon la méthode statique qui consiste à éliminer l'oxygène du milieu par injection d'azote puis à mesurer l'augmentation de la concentration en oxygène suite à la réinjection de l'air stérile. Partant du bilan en oxygène dans le réacteur :

$$\frac{dO_2}{dt} = OTR - OUR \quad (\text{II-1})$$

avec OTR ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$) : la vitesse volumique de transfert en oxygène et OUR ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$) la vitesse volumique de consommation en oxygène. Dans un milieu sans microorganismes, la consommation d'oxygène est nulle, l'équation devient donc :

$$\frac{dO_2}{dt} = OTR \quad (\text{II-2})$$

Soit:

$$\frac{dO_2}{dt} = k_La \cdot (O_2^* - O_2) \quad (\text{II-3})$$

avec k_La (s^{-1}), le coefficient volumique de transfert en oxygène, O_2^* (mol.L^{-1}) la concentration maximale en oxygène dissous dans des conditions d'oxygénation et de pression données (ou saturation) et O_2 (mol.L^{-1}) la concentration en oxygène à un instant t .

Après intégration de cette équation, on obtient :

$$\ln\left(\frac{O_2^*}{O_2^* - O_2}\right) = k_L a \cdot t \quad (\text{II-4})$$

Grâce au suivi de la concentration en oxygène dans le milieu de culture, la quantité $k_L a \cdot \ln\left(\frac{O_2^* - O_2}{O_2}\right)$ peut être déterminée lors de la phase de remontée de la concentration en oxygène faisant suite à l'injection d'air dans un milieu dans lequel l'oxygène a été chassé par injection d'azote (Figure II-6). La détermination du $k_L a$ a été réalisée pour les deux types de bioréacteur utilisés au cours de cette étude.

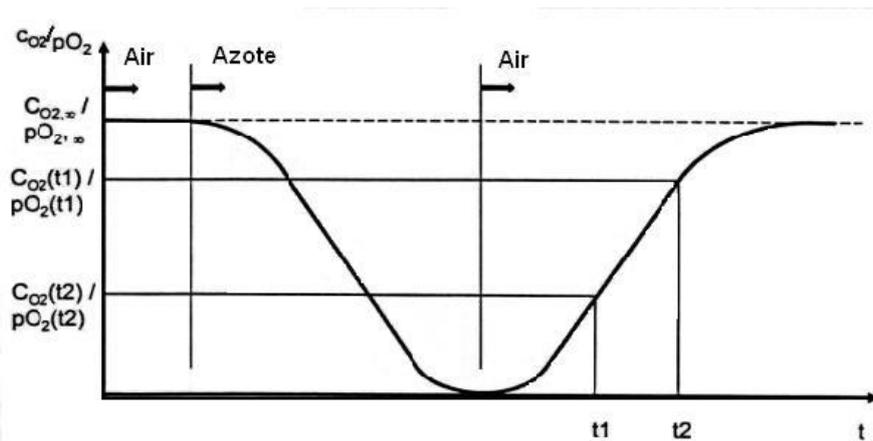


Figure II-6. Variation de la concentration en oxygène dissous au cours de temps suite à des injections de gaz (air ou azote) afin d'estimer le $k_L a$ (méthode statistique).

II.6. Mesure de la concentration en biomasse et des métabolites extracellulaires

II.6.1. Mesure de la concentration en biomasse

La mesure de la concentration en biomasse est réalisée par spectrophotométrie à 660 nm. 1 mL de moût est ajouté à 1 mL de HCl 2,5 M et 8 mL d'eau distillée. Ensuite les pelotes et

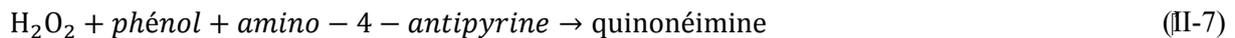
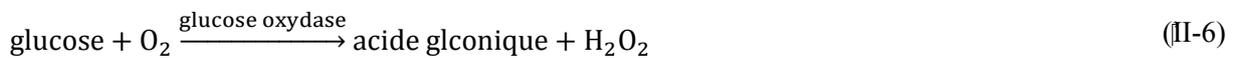
enchevêtrements sont désagrégés par traitement aux ultrasons à une puissance de 60 W pendant 20 s. Puis, la concentration en matière sèche est calculée selon l'équation suivante décrite par Mehmood (2011) :

$$MS = \frac{(Abs + 0,28204)}{1,7695} \quad (II-5)$$

Avec MS, la concentration en matière sèche en g.L⁻¹ et Abs l'absorbance à 660 nm.

II.6.2. Dosage du glucose

Le glucose est dosé par une méthode enzymatique colorimétrique (Uy, 2003). Le principe de dosage repose sur les réactions suivantes :



La quinonéimine est une molécule colorée. L'intensité de la coloration liée à la synthèse de cette molécule est lue à 500 nm. Une gamme étalon est réalisée avec un standard titrant 1 g.L⁻¹. L'erreur de mesure par cette méthode est estimée à environ 5 %.

II.6.3. Dosage de la concentration en ammonium

Les ions ammoniums sont analysés avec une électrode à diffusion gazeuse (Orion, Etats-Unis). En milieu fortement alcalin, les ions ammoniums du milieu de culture sont convertis en NH₃ gazeux selon la réaction suivante :



L'équilibre est déplacé vers la formation d'ammoniac par addition de 3 mL de soude 0,2 N à 3 mL d'échantillon. Le pH final du mélange est proche de 12. L'ammoniac formé diffuse à travers la membrane perméable de l'électrode et entraîne une variation du potentiel selon la loi de Nernst :

$$E = E_0 - S \cdot \log([NH_3]) \quad (II-9)$$

Avec E_0 le potentiel de référence (mV), S la pente de la courbe d'étalonnage et $[\text{NH}_3]$ la concentration en NH_3 (mM). L'étalonnage est réalisé avec des solutions de NH_4Cl de molarité connue (0,5 à 20 mM) en traçant $\log(\text{NH}_4\text{Cl})$ en fonction du potentiel de l'électrode. L'erreur sur la mesure est de l'ordre de 10 %.

II.6.4. Dosage de la concentration en phosphate

En milieu acide et réducteur, les phosphates forment avec l'acide molybdique un complexe phosphomolybdique-molybdeux coloré en bleu. Une gamme étalon est réalisée avec une solution de Na_2HPO_4 (1 mM). Le mélange réactionnel est composé d'acide ascorbique 10 % (1/6 v/v) et d'une solution de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (molybdate d'ammonium tétrahydraté) à 0,42 % dans du H_2SO_4 1N (5/6 v/v). 50 μL de l'échantillon à doser sont ajoutés à 250 μL de HCL 0,5 N. 700 μL du mélange réactionnel sont ensuite ajoutés et le tout est incubé 20 min à 45 C°. L'absorbance des échantillons est ensuite mesurée à 820 nm.

II.6.5. Détection et mesure de la concentration en pristinamycines

II.6.5.a. Détection de la présence de pristinamycines par test microbiologique

Le test microbiologique est une méthode qualitative permettant de mettre en évidence la présence de l'antibiotique dans l'échantillon. Pour cela, *L. ivanovii*, naturellement sensible aux pristinamycines, est utilisée. Après croissance de cette souche sur milieu TSB-YE, 100 mL de milieu TSA-YE sont ensemencés avec 1 mL de la culture de *L. ivanovii* et réparti en boîtes de Pétri à raison de 12 mL de milieu par boîte. Après solidification du milieu à 4°C, des puits sont réalisés dans la gélose à l'aide de cloches de Durham stériles. Le surnageant de la culture à tester est filtré sur filtre Millex® de porosité 0,22 μm et 20 μl sont déposés dans chaque puits. Les boîtes sont tout d'abord placées pendant 3 h à 4°C afin de permettre la diffusion du dépôt dans la gélose, puis incubées à 30°C. Après 24 h, la présence d'antibiotiques dans l'échantillon testé est mise en évidence par l'apparition d'une zone d'inhibition de croissance de la souche cible autour du puits où l'échantillon a été déposé.

II.6.5.b. Mesure de la concentration en pristinamycines

Le dosage des pristinamycines est réalisé par HPLC selon un protocole précédemment décrit (Paquet et al, 1992). La phase mobile utilisée pour la mesure par HPLC des pristinamycines se compose de 34 % (v/v) d'acétonitrile et 66 % (v/v) de tampon phosphate 0,1 M, pH = 2,9. Les standards sont des solutions mères de pristinamycines I et II, dont les concentrations sont

respectivement de 100 mM et de 200 mM. Celles-ci sont diluées afin d'établir un courbe étalon. Les échantillons sont centrifugés à 7 000 rpm pendant 5 min. Les caractéristiques de l'HPLC utilisée sont les suivantes : Colonne, Altima HP C18 Amide 5 μ , 150 mm X 2,1mm (Grace, Chicago, USA) ; pré-colonne de 7,5 mm X 2,1 mm ; four colonne, CTO-10 AS (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France), 25°C ; pompe, LC-10AD-VP (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) ; passeur automatique, SIL 10-AD (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) ; dégazeur, DGU-14A (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) ; barrette de diodes, SPD-M10 A (Shimadzu, Champs-sur-Marne, France). Le débit d'élution est de 0,2 mL.min⁻¹. La détection se fait à 206 nm.

II.6.6. Mesure de la concentration en glutamate et arginine par HPLC

Le dosage du glutamate et de l'arginine est réalisé par HPLC selon un protocole breveté par la société Shimadzu (brevet japonais n° 4-81665). Afin d'être mesurés, le glutamate et l'arginine doivent être dérivatisés. L'ortho-phthalaldéhyde (OPA) a donc été utilisé comme réactif fluorescent de dérivatisation. Cette réaction est très sensible, sélective et réalisée à température ambiante. Les caractéristiques de l'HPLC utilisée sont les suivantes (l'ensemble du matériel utilisé est de la marque Shimadzu, Champs-sur-Marne, France) : Colonne de garde, Shim-pack G-ODS (4.0 mm x 100 mm) ; pré-colonne, Shim-pack GRD-ODS (4.0 mm x 250 mm) ; colonne, Shim-pack CLC-ODS (6.0 mm x 150 mm) ; four, CTO-10 A à 45°C ; pompe, LC-10AD ; dégazeur, DGU-10A ; détecteur de fluorescence, RF-10A. Le débit d'élution est de 1 mL.min⁻¹. L'excitation se fait à une longueur d'onde 350 nm et la mesure à 460 nm.

II.6.6.a. Préparation des réactifs

Un tampon de borate de sodium est utilisé comme réactif. Ce réactif est préparé par dissolution de 100 mM d'acide borique dans de l'eau distillée. Le pH est ajusté à 9 par ajout d'hydroxyde de sodium. L'acide β -mercaptopropionique est préparé en ajoutant 10 μ L d'acide β -mercaptopropionique dans 10 mL de solution tampon de borate de sodium. La solution d'OPA est préparée par dissolution de 20 mg dans 3 mL d'acétonitrile et par ajout de 10 mL de solution tampon de borate de sodium.

II.6.6.b. Préparation de la phase mobile

La solution tampon à pH 6,8 est préparée en dissolvant 5 mM de phosphate de sodium dihydrate et 5 mM de phosphate disodium dans de l'eau distillée (phase A). La phase B est préparée en ajoutant 300 mL d'acétonitrile à 600 mL de phase A. La phase C est une solution

de lavage composée d'eau à 20 % et d'acétonitrile à 80 %. L'élution est réalisée en appliquant un gradient de concentration en phase A et B à un débit constant (Figure II-7).

II.6.6.a. Préparation des standards et des échantillons

Durant le prétraitement de l'échantillon et des standards, la solution de borate de sodium, l'échantillon ou la solution de standard, la solution d'OPA sont ajoutés séquentiellement dans un flacon muni d'un septum. Les réactifs sont mélangés par aspiration et refoulement successifs. Après quelques minutes de réaction, une partie du mélange est injectée dans la colonne.

Les standards sont constitués d'arginine ou de glutamate pur. Une droite étalon est établie à partir de solutions d'acides aminés de concentrations comprises entre 0,25 mM et 2,5 mM. Les échantillons à doser doivent éventuellement être dilués afin que la concentration maximale en acides aminés ne dépasse pas 2,5 mM.

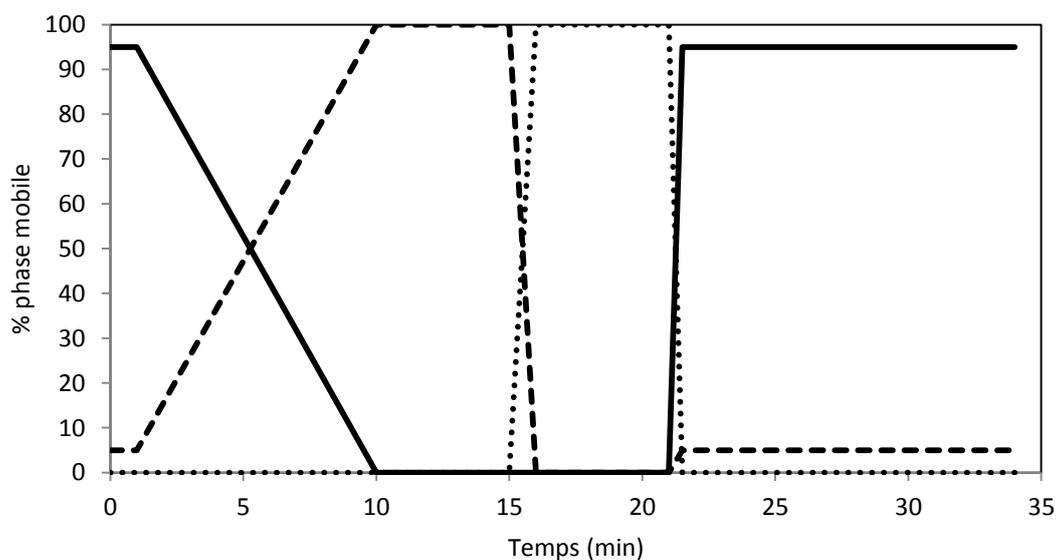


Figure II-7. Proportion des différentes phases mobiles au cours du temps dans la méthode HPLC utilisée pour la séparation et la quantification du glutamate et de l'arginine. Phase A (- - -), phase B (—), phase C (....).

II.7. Observation morphologique

II.7.1. Observation sous microscope

Le microscope DMRB (Leica Leitz, Wetzlar, Allemagne) est utilisé pour les observations sur fond clair (Figure II-8). Plusieurs objectifs comme le PL FLUOTAR X 10 0,30 et le PL FLUOTAR X 40 sont utilisés. Des images sont prises à l'aide d'une caméra Cohu 4910 (Cohu, San Diego, USA) monochrome équipée d'un capteur à 256 niveaux de gris. L'acquisition des images se fait par l'intermédiaire du logiciel Kappa ImageBase Control 2.5 (Kappa opto electronics GmbH, Gleichen, Allemagne).

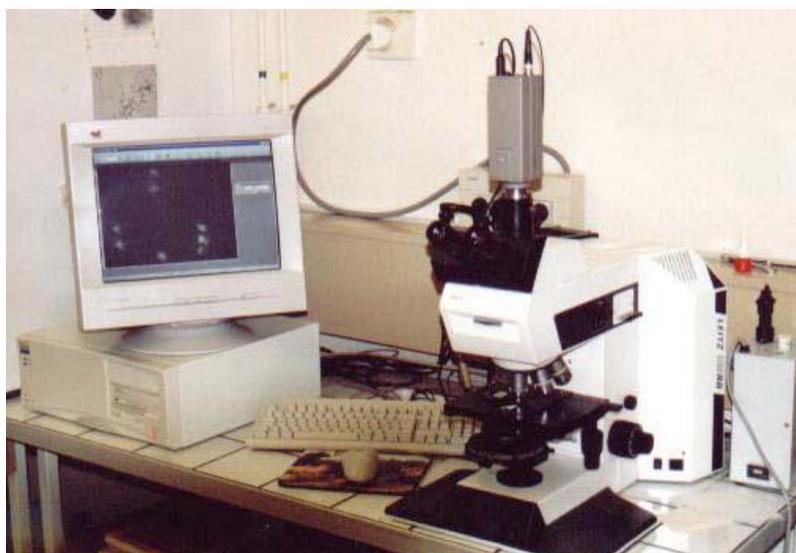


Figure II-8 : Microscope DMRB surmonté de la caméra Cohu 4910 et PC de contrôle et d'acquisition.

II.7.2. Mesure du diamètre des pelotes par diffraction laser

La taille des pelotes mycéliennes a été mesurée en cours des cultures par diffraction laser (Mastersizer, Worcestershire, Royaume-Uni). Ce système se compose d'un laser He-Ne comme source de rayonnement et de plusieurs détecteurs pour mesurer la répartition, sur une large gamme d'angles, de la lumière produite (Figure II-9).

Le principe de base de cette mesure est la diffusion de la lumière observée lorsque des particules traversent le faisceau laser. L'angle de la lumière laser diffusée dépend de la taille

de la particule; une grande dispersion des particules est constatée pour des angles faibles tandis qu'une faible dispersion est constatée à des angles élevés. La diffraction laser est décrite avec précision par l'approximation de Fraunhofer et la théorie de Mie, avec l'hypothèse d'une morphologie sphérique des particules. Cette technique peut être utilisée pour mesurer la taille des particules dans la gamme de 0,02 à 2000 μm .

La limite inférieure et supérieure de l'obscurité a été fixée à 10 et 30 % respectivement. Ces limites ont été suffisantes pour obtenir un bon ratio bruit/signal. La culture est supposée posséder les propriétés optiques de l'eau (Lin et al., 2010). Les angles de la lumière laser diffractée par des pelotes microbiennes fournissent un profil de diffraction caractéristique collecté par les détecteurs et enregistré par un logiciel dédié (Mastersizer, version 2.17). On retiendra le diamètre de Sauter des pelotes ($d_{p4,3}$) dans le cas de la présence d'une seule population. Par contre, en cas de présence de plusieurs populations, on prendra la valeur maximum de chaque pic comme une valeur maximum de diamètre représentative de chaque population.

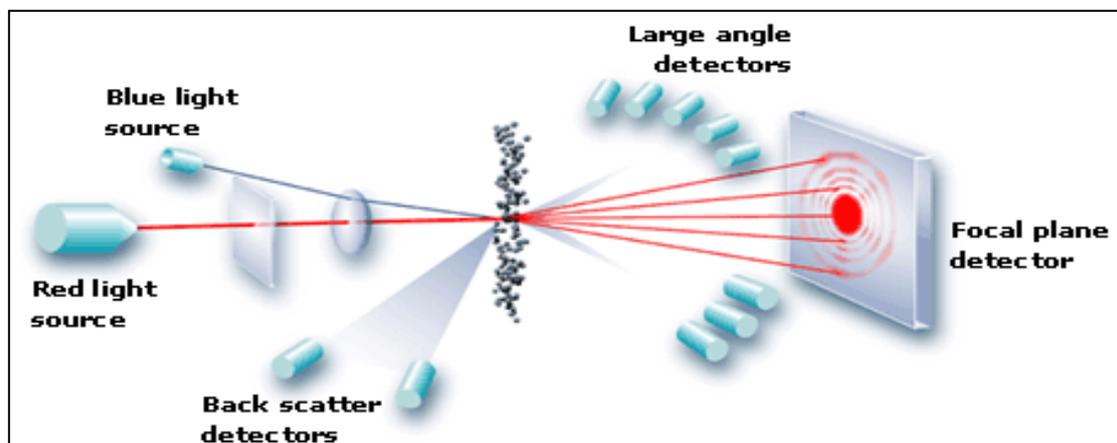


Figure II-9 . Principe de la mesure par diffraction optique du Mastersizer, Malvern (document Malvern) pour la mesure du diamètre des pelotes.

II.8. Analyse par microscopie confocale

II.8.1. Marquage fluorescent

L'utilisation de marqueurs fluorescents peut permettre de mesurer la viabilité cellulaire. Certains marqueurs permettront de visualiser les cellules vivantes, s'autres les cellules mortes. A ce jour, plusieurs marqueurs et plusieurs méthodes de marquage, plus ou moins spécifiques, ont été développés. Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser le fluorochrome SYTO-9 et l'iodure de propidium (IP). Ces deux marqueurs interagissent avec l'ADN des cellules. Cependant, la capacité de ces marqueurs à traverser la membrane plasmique des bactéries est différente. En effet, le SYTO-9 peut traverser la membrane plasmique des cellules bactériennes, que celle-ci soit intègre ou détériorée. La totalité des cellules présentes dans une pelote de *S. pristinaespiralis* seront donc marquées. L'IP, pour sa part, ne peut traverser que les membranes plasmiques détériorées. Il est donc généralement admis que le SYTO-9 est un marqueur des cellules vivantes alors que l'IP est un marqueur des cellules mortes.

II.8.2. Microscopie confocale

La microscopie confocale est une méthode non destructrice qui permet, par superposition de plans successifs de reconstruire une image en trois dimensions de l'objet observé (Brakenhoffe et al, 1979). La structure interne, et en particulier la répartition spatiale de la fluorescence au sein des pelotes formées par *S. pristinaespiralis*, peuvent donc être analysées par microscopie confocale.

II.8.2.a. Prise d'images

Le laser utilisé produit un rayon monochromatique extrêmement focalisé qui peut scanner la structure interne d'un échantillon point par point. Le rayonnement émis par la zone illuminée de l'échantillon est alors récupérée suite au passage par un orifice le plus petit possible (appelée iris confocal) par un détecteur qui mesure l'intensité de ce rayonnement émis (Brackenhoff et al., 1990). La présence de cet iris confocal est une des particularités d'un microscope confocal par rapport à un microscope classique. Il permet d'éliminer les rayonnements provenant de parties non illuminées par le laser.

Le plateau portant l'objet à analyser se déplace par incrément afin de pouvoir prendre plusieurs images de l'objet. Toutes les images prises sont parallèles au support de l'objet. Il est ensuite possible de superposer ces images pour obtenir une vision tri-dimensionnelle de l'objet analysé (Brackenhoff et al., 1990).

II.8.2.b. Analyse des pelotes de *S. pristinaespiralis*

Le kit LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit, L7012 (Molecular Probes) a été utilisé pour analyser la viabilité des cellules au sein des pelotes de *S. pristinaespiralis* DSMZ40338 au cours des différentes cultures réalisées. Ce kit contient 2 intercalants de l'ADN, le SYTO 9 qui fluoresce en vert et l'iodure de propidium (IP) qui émet une lumière rouge après excitation (Figure II-10). La différence entre ces 2 marqueurs est leur capacité à traverser les membranes biologiques. Alors que le SYTO 9 traverse les membranes intègres et altérées, l'IP n'est capable de traverser que les membranes poreuses, lesquelles sont associées aux cellules mortes. Il est ainsi considéré que le SYTO 9 est un marqueur des cellules vivantes et le IP un marqueur des cellules mortes.

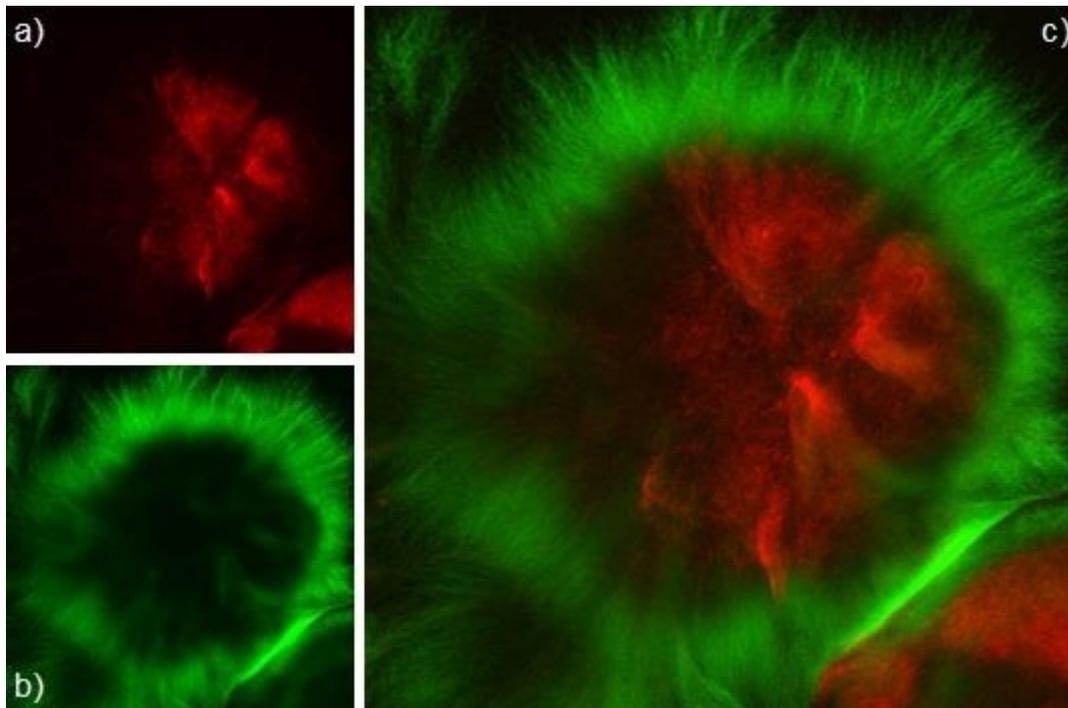


Figure II-10 : images obtenues par microscopie confocale d'une pelote de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après marquage avec a) du iodure de propidium), b) du SYTO[®] 9, green surface, c) après superposition des 2 images précédentes.

La durée de marquage des cellules avec les deux marqueurs est de 15 min dans l'obscurité. Afin d'être analysée, 1 mL de suspension bactérienne est prélevé du milieu de culture et directement mis en contact avec les marqueurs sans lavage préalable. Cette absence de lavage

est due à la volonté de conserver une structure en pelote la plus proche possible de celle rencontrée dans le milieu de culture. Le ratio entre le volume de marqueurs et le volume de suspension cellulaire a fait l'objet d'une courte étude. Le protocole de marquage retenu est un mélange de SYTO 9 (3,34 mM) et de PI (20 mM) dans un rapport 1:1 et une mise en contact de 1 mL de suspension bactérienne avec 3 µL de marqueurs.

Pour l'analyse microscopique, la suspension cellulaire marquée est déposée sur une lame et recouverts délicatement avec une lamelle. Les observations sont réalisées avec un microscope OLYMPUS FluoView FV10 – PSU (Tokyo, Japon). Les longueurs d'onde d'excitation sont de 490 et 537 nm pour le SYTO 9 et le PI respectivement alors que les longueurs d'onde d'émission sont de 540 et 619 nm respectivement.

II.9. Calculs des vitesses spécifiques expérimentales de croissance, consommation et production

Les données expérimentales de concentration en biomasse, nutriments et antibiotiques sont interpolées afin de calculer les vitesses spécifiques instantanées entre deux points interpolés i et $i+1$. Les expressions suivantes sont ainsi obtenues.

II.9.1. Vitesse spécifique de croissance

La vitesse spécifique de croissance :

$$\mu = \frac{1}{X^{i+\frac{1}{2}}} \cdot \frac{\Delta X^{i \rightarrow i+1}}{\Delta t^{i \rightarrow i+1}} \quad (\text{II-10})$$

avec μ la vitesse spécifique de croissance (h^{-1}), X la concentration en biomasse (g.L^{-1}) et t le temps (h).

II.9.2. Vitesse spécifique de consommation des substrats

La vitesse spécifique de consommation des substrats est calculée par :

$$\nu = \frac{1}{X^{i+\frac{1}{2}}} \cdot \frac{\Delta S^{i \rightarrow i+1}}{\Delta t^{i \rightarrow i+1}} \quad (\text{II-11})$$

avec ν la vitesse spécifique de consommation de substrat ($\text{g}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}$), S la concentration des substrats ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et t le temps (h).

Résultats

**Validité des paramètres de
puissance dissipée et de
coefficient volumique de
transfert d'oxygène lors du
passage de fioles
d'Erlenmeyer au réacteur
mécaniquement agité**

III. Validité des paramètres de puissance dissipée et de coefficient volumique de transfert d'oxygène lors du passage de fioles d'Erlenmeyer au réacteur mécaniquement agité

Le développement et l'industrialisation des bioprocédés microbiens ou de culture de cellules animales nécessite, notamment, des étapes de criblage de souches et de milieux de culture. Ainsi, il apparaît commode d'utiliser des bioréacteurs de faible volume afin de réduire les coûts de développement, en particulier de matières premières et de multiplier le nombre d'expériences dans un laps de temps réduit. Pour cela, même si ces dernières années ont vu le développement de systèmes dédiés à petite ou très petite échelle (mini-réacteur, micro-puits de culture agités et instrumentés, etc...), la fiole d'Erlenmeyer agitée orbitalement reste un système largement utilisée du fait de sa simplicité d'utilisation, de son coût très faible et de sa bonne extrapolabilité. Par ailleurs, lors de la montée en échelle des procédés industriels microbiens, les premières phases d'amplification cellulaire sont réalisées dans des systèmes à agitation orbitale dont le design est souvent très similaire à celui de la fiole d'Erlenmeyer. Néanmoins, même si des essais très concluants ont été réalisés à une échelle de plusieurs centaines de litres dans le cas de culture de cellules animales, ce type de réacteur reste limité à des volumes ne dépassant pas quelques litres du fait de la limitation de l'apport d'oxygène par la surface libre à grande échelle. Pour des volumes supérieurs, on observe systématiquement une discontinuité de similitude géométrique, similitude pourtant préconisée comme indispensable à toute procédure de montée en échelle « dans les règles de l'art ». Ainsi, à partir de quelques litres de volume utile, les technologies des procédés microbiens s'orientent préférentiellement vers la cuve agitée mécaniquement et aérée (Figure III-1). Des technologies de type de colonnes à bulles ou réacteurs à gazosiphon « airlift » sont également observées aux échelles de production industrielle (plusieurs dizaines ou centaines de mètres cubes). Cette rupture de design pose la question fondamentale de la validité des critères d'extrapolation communément utilisés en bioprocédés (dissipation volumique, coefficient volumique de transfert d'oxygène) pour le respect des performances de culture et de production. De nombreux exemples de problèmes d'extrapolation entre fiole agitée orbitalement et réacteur agité mécaniquement sont relatés mais assez peu référencés dans la littérature. On notera que, parfois, de meilleures performances sont observées en fiole d'Erlenmeyer malgré l'absence de régulation du pH et de l'oxygène dissous. Une étude

approfondie par Tissot (2011) a montré que les écarts de performance observés dans le cas de culture cellules animales entre un cylindre agité orbitalement et un bioréacteur agité mécaniquement, à dissipation volumique constante, n'étaient pas dues à l'absence de régulation de pH et d'oxygène. Ces travaux ont en effet montré que l'aération surfacique autorisait un meilleur strippage du CO₂ dissous dans des conditions similaires d'agitation.

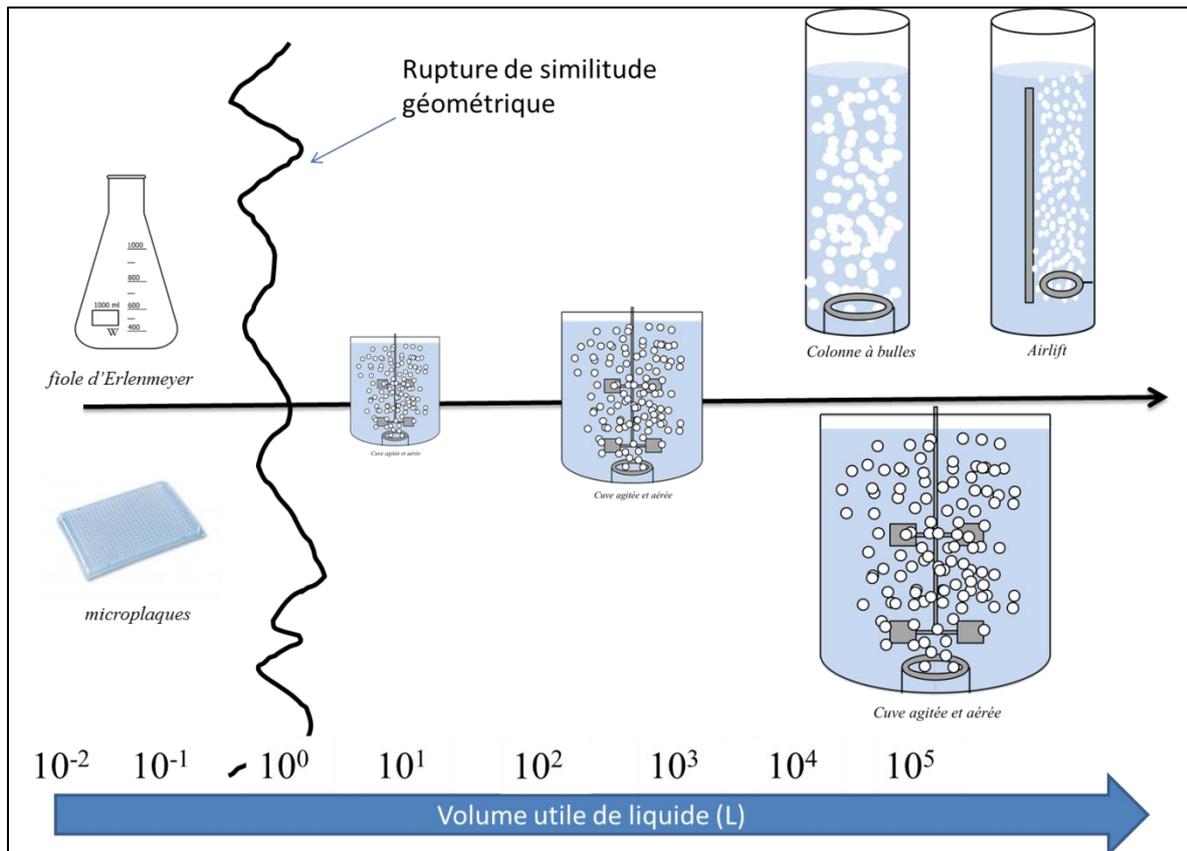


Figure III-1. Technologies de bioréacteurs utilisées selon les volumes utiles considérés.

L'équipe de recherche ayant une solide connaissance de la réponse physiologique globale de *S. pristinaespiralis* en fioles agitées (travaux de thèse de Nasir Mehmood), il semble intéressant d'étudier la validité des critères d'extrapolation identifiées lors de ces travaux (puissance dissipée volumique et coefficient volumique de transfert d'oxygène) lors du passage de fioles lisses en STR par modification des conditions d'agitation et d'aération. Pour cela, dans un premier temps, les environnements hydrodynamiques escomptés en fiole d'Erlenmeyer et en STR sont décrits en détail. Les cinétiques de culture (croissance, consommation, production) en fioles lisses et en bioréacteur mécaniquement agité seront

comparées dans des conditions d'agitation et d'aération respectant les critères d'extrapolation précédemment exposés. Enfin, l'effet d'une augmentation de la dissipation volumique sur les performances de culture sera évalué sur la culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 en STR.

III.1. Analyse et comparaison des environnements hydrodynamiques

III.1.1. Paramètres hydrodynamiques macroscopiques

En systèmes agités, l'hydrodynamique globale est généralement caractérisée par trois paramètres macroscopiques :

- *La puissance dissipée par unité de volume (P / V) ou par unité de poids ($\langle \varepsilon \rangle$).* Elle permet de caractériser notamment les échelles de dissipation de la turbulence, le cisaillement moyen ainsi que les contraintes hydromécaniques.
- *Le coefficient volumique de transfert volumique d'oxygène (k_{La}).* La connaissance de cette grandeur conjointement à celle de la concentration en oxygène dissous fournit la vitesse volumique de transfert de l'oxygène (ou *OTR*) qui, comparée à la vitesse volumique de consommation (*OUR*) permet le dimensionnement et la conduite des systèmes d'aération.
- *Le temps de macro-mélange t_M .* C'est le temps nécessaire pour distribuer uniformément des paquets de fluide B, injectés de manière ponctuelle et instantanée dans un volume supposé beaucoup plus grand de fluide A, sous l'effet des recirculations macroscopiques et des gradients locaux de vitesse.

III.1.1.a. Dissipation volumique

i. Fioles d'Erlenmeyer

En fiole agitée d'Erlenmeyer, les travaux intensifs de l'équipe du Pr. Büchs (université d'Aix-la-Chapelle) ont permis de caractériser la dissipation volumique, notamment en fioles non chicanées. Ainsi, la corrélation de Büchs et al. (2000) offre une très bonne estimation de la dissipation volumique sur la base d'une relation reliant le nombre de Reynolds d'agitation au nombre de Newton modifié Ne' :

$$\frac{P}{V_L} = \text{Ne}' \cdot \rho \cdot \frac{N^3 \cdot d^4}{V_L^{2/3}} \quad (\text{III-1})$$

Avec P / V_L la puissance dissipée volumique ($\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$), Ne' le nombre de Newton modifié, ρ la densité du liquide ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$), N la fréquence d'agitation (s^{-1}), d le diamètre maximum de la fiole (m), V_L le volume de remplissage (m^3).

Le nombre de Newton modifié peut être calculé par la corrélation suivante :

$$\text{Ne}' = 70 \text{Re}^{-1} + 25 \text{Re}^{-0,6} + 1,5 \text{Re}^{-0,2} \quad (\text{III-2})$$

Avec le nombre de Reynolds donné par:

$$\text{Re} = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (\text{III-3})$$

Avec μ (Pa.s) la viscosité dynamique du liquide

A noter que cette corrélation est valable pour des conditions « en-phase » (voir III.1.2.a) et pour des liquides peu visqueux. Mehmood et al. (2010) ont montré par des calculs CFD utilisant une approche de type Volume Of Fluid (VOF) que, dans le cas de suspensions non-Newtoniennes, cette corrélation restait valable sous réserve de remplacer la viscosité dynamique laminaire μ par une viscosité calculée au taux de cisaillement moyen.

Il est ainsi intéressant de souligner ici que, dans le cas de cultures microbiennes entraînant une augmentation de la viscosité au cours du temps due à la production d'une molécule épaississante ou à l'augmentation de la concentration en biomasse, une variation de la dissipation peut être escomptée ou non. Ainsi, dans le cas de fioles lisses, une augmentation de la viscosité promet une baisse du nombre de Reynolds et donc une augmentation de la dissipation.

La quantification de la dissipation volumique apportant une information globale sur l'hydrodynamique du bioréacteur, il est nécessaire, dans un second temps, de tenter une évaluation de l'hétérogénéité de cette grandeur dans le volume de liquide. Peu de travaux se

sont pour l'instant focaliser sur cette question qui reste difficile à traiter du fait de la difficulté d'estimer les taux de dissipations locaux. On pourra citer l'étude de Peter et al. (2006) qui a montré que l'hétérogénéité de dissipation dépendait du régime d'écoulement escompté. Ainsi, l'estimation de la dissipation maximale ε_{max} repose sur les équations suivantes :

$$\text{Re} < 60000, \varepsilon_{max} \approx \langle \varepsilon \rangle \quad (\text{III-4})$$

$$\text{Re} < 60000, \varepsilon_{max} = 0,1 \frac{(\pi Nd)^3}{h_1} \quad (\text{III-5})$$

Ces mêmes auteurs fournissent une estimation de la hauteur de liquide h_l utilisée dans la relation précédente.

$$Fr_a > 0,4 : h_1 = 1,11 \cdot d_0^{0,18} \cdot d^{-0,11} \cdot N^{0,44} \cdot V_L^{0,34} \quad (\text{III-6})$$

$$Fr_a < 0,4 : h_1 = 1,31 \cdot d_0^{0,28} \cdot d^{-0,02} \cdot N^{0,9} \cdot V_L^{0,35} \quad (\text{III-7})$$

Avec :

$$Fr_a = \frac{(2 \cdot \pi \cdot N)^2 \cdot d_0}{2 \cdot g} \quad (\text{III-8})$$

le nombre de Froude axial.

Ainsi, pour des cultures mettant en œuvre des microorganismes sensibles aux contraintes hydromécaniques, le choix de la dissipation maximale ε_{max} comme critère d'extrapolation peut être judicieux en régime turbulent.

ii. Réacteur mécaniquement agité

En réacteur mécaniquement agité, la caractérisation de la dissipation volumique est très bien référencée dans la littérature, il serait donc difficile de reporter ici une liste exhaustive des travaux dédiés à sa mesure ou son calcul. Classiquement, sa détermination passe par deux étapes :

- Détermination de la puissance dissipée volumique en condition non-aérée

- Détermination de la perte de puissance issue de la présence de gaz et, notamment, de l'existence de cavités gazeuses à l'arrière des pales des Rushton.

Une analyse dimensionnelle dans une cuve agitée et chicanée, dans le cas de fluides Newtoniens permet de montrer que la puissance dissipée est facilement obtenue par une relation générale de la forme :

$$Np = f(Re) \quad (\text{III-9})$$

Avec Np le nombre de puissance donné par :

$$Np = \frac{P}{\rho \cdot N^3 \cdot D^5} \quad (\text{III-10})$$

En régime turbulent, c'est-à-dire pour des nombres de Reynolds supérieurs à 1000 - 10000 environ, le nombre de puissance devient indépendant du nombre de Reynolds et donc constant. Le calcul de la puissance P passe alors par la détermination de cette constante, qui dépend du mobile utilisé (taille et design), de sa position, ainsi que de la géométrie de la cuve. A cette puissance peut être ajouté l'apport de la détente adiabatique de la phase gazeuse dans le liquide (Nienow, 2006), donné par la relation suivante :

$$\left(\frac{P}{V}\right)_{add} = \rho_L \cdot U_g \cdot g \quad (\text{III-11})$$

Avec U_g (m/s) la vitesse superficielle de gaz. Pour un débit volumique maximal de 3 vvm, correspondant à une vitesse superficielle de gaz de $2,5 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$ dans le STR utilisé, une dissipation additionnelle de $24,3 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ est obtenue. Au regard des résultats du Tableau III-2 et des variations possibles du débit de gaz en cours de culture, nous négligerons cet apport dans le reste de l'étude.

La présence de la phase gazeuse dans la cuve, inhérente à toute mise en œuvre de procédés microbiens aérobies, induit une diminution de la puissance donnée par la relation précédente. L'estimation de la puissance corrigée reste beaucoup plus approximative que celle en

écoulement monophasique du fait de la forte variabilité des systèmes représentés dans la littérature (régime de dispersion des bulles, taille des bulles, débits de gaz Q_g , etc...). Globalement, une perte de puissance jusqu'à 60 % peut être escomptée. Parmi les relations disponibles dans la littérature, Xuereb et al. (2006) proposent la relation de Cui et al. (1996) qui intrapole un grand nombre de données de la littérature pour l'estimation de la puissance dissipée en liquide aéré P_g . Dans le cas de systèmes multi-étagés, cette relation est valable pour l'agitateur de fond de cuve :

$$\frac{Q_g N^{0,25}}{D^2} \leq 0,055 \quad ; \quad 1 - \frac{P_g}{P} = 9,9 \cdot \frac{Q_g \cdot N^{0,25}}{D^2} \quad (\text{III-12})$$

$$\frac{Q_g N^{0,25}}{D^2} \geq 0,055 \quad ; \quad 1 - \frac{P_g}{P} = 0,52 + 0,62 \cdot \frac{Q_g \cdot N^{0,25}}{D^2} \quad (\text{III-13})$$

Une relation très utilisée mais également très critiquée est celle de Michel et Miller (1962) :

$$P_g = \left(\frac{P^2 \cdot N \cdot D^3}{Q_g^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (\text{III-14})$$

Enfin, nous citerons également la corrélation de Hughmark (1980) :

$$\frac{P_g}{P_0} = 0,1 \left(\frac{Q}{NV} \right)^{-1/4} \left(\frac{N^2 D^4}{g w V^{2/3}} \right)^{-1/5} \quad (\text{III-15})$$

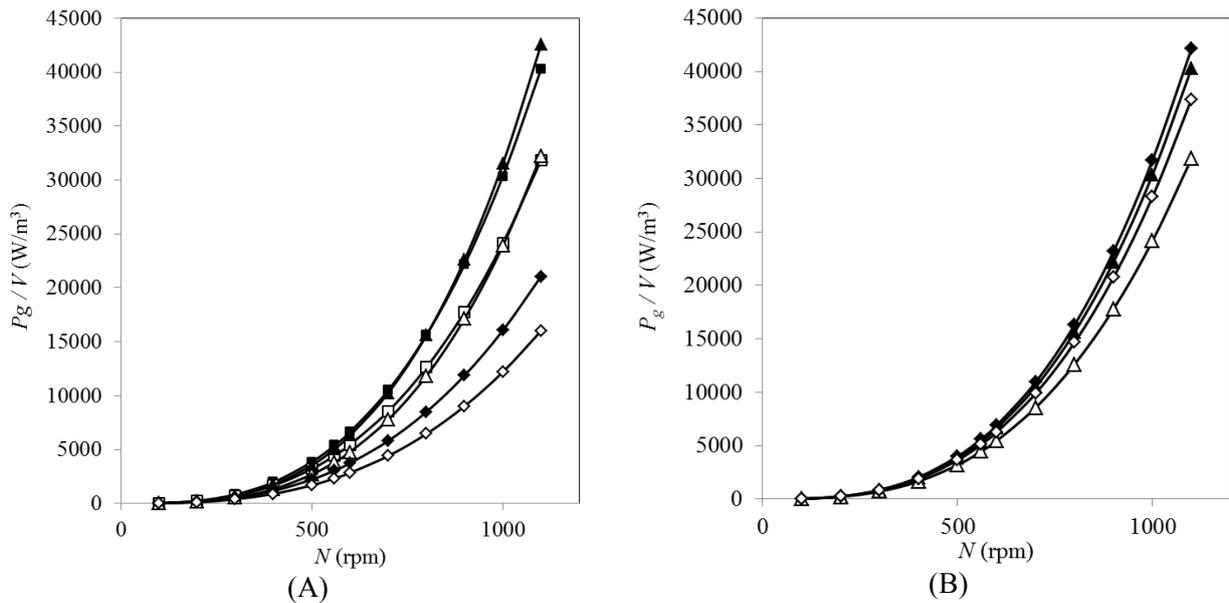


Figure III-2. (A). Comparaison des lois de puissances dissipées volumiques en liquide aéré en fonction de la fréquence d'agitation. Les mobiles sont supposés fournir la même puissance. Cui et al. (1996) (\square , \blacksquare), Michel et Miller (1962) (\blacktriangle , \triangle) et Hughmark (1980) (\blacklozenge , \diamond). (B) Comparaison de lois de puissance de Cui et al. (1996) en supposant que les puissances sont identiques pour les deux mobiles et égales à celle du mobile inférieur (relations (III-12) et (III-18)) (\blacktriangle , \triangle) ou en calculant la dissipation du mobile supérieur par la relation (III-16) (\blacklozenge , \diamond). Calculs réalisés dans une cuve munie de deux turbines Rushton à 6 pales droites ($D = 0,06$ m ; $w = 0,012$ m ; $T = 0,16$ m ; $V_L = 1,2$ L, $Np = 5,6$) avec de l'eau à 28°C. Les symboles pleins et vides correspondent respectivement à des débits de gaz de 1 L. min⁻¹ et de 3 L.min⁻¹.

Dans le cas de systèmes multiétagés, il est difficile de proposer une relation généralisable à tous les systèmes d'agitation. En effet, la répartition de puissance dépend fortement des taux de rétention gazeuse escomptée à chaque étage d'agitation et de l'engorgement relatif de chaque turbine. Il est généralement considéré que l'agitateur du fond de cuve présente une plus grande perte de puissance que les autres du fait de la proximité du distributeur de gaz (Warmoeskerken et Smith, 1988). Néanmoins, les données expérimentales mesurant les contributions de chaque étage d'agitation sont rares dans la littérature et, par voie de conséquence, les corrélations les modélisant. On pourra citer l'étude de Cui et al. (1996) qui a proposé des relations spécifiques pour les contributions des mobiles supérieurs :

$$(Q_g \cdot N) \leq 0,013 \quad : \quad 1 - \frac{P_g}{P_0} = 37,6 \cdot Q_g \cdot N \quad (\text{III-16})$$

$$(Q_g \cdot N) > 0,013 \quad : \quad 1 - \frac{P_g}{P_0} = 0,375 + 8 \cdot Q_g \cdot N \quad (\text{III-17})$$

Cette relation n'a cependant été établie que pour une unique configuration géométrique ($T = 0,625$ m ; $D = 0,256$ m ; $H = 2,2$ m, 3 agitateurs). Une autre possibilité est, faute de mieux, de considérer que les mobiles fournissent une puissance similaire. Cette hypothèse ne semble pas complètement déraisonnable dans des cuves de faibles volumes. Ainsi, pour n agitateurs :

$$P_{g,tot} = \sum_{i=1}^n P_{g,i} \quad (\text{III-18})$$

Avec $P_{g,i}$ la puissance en liquide aéré de l'agitateur i donné par les relations de Cui et al. (1996). On prendra évidemment en compte les modifications possibles de nombres de puissance Np dans le cas où le design des mobiles serait modifié d'un étage à l'autre lors du calcul de la puissance en milieu non-aéré. L'évolution de la puissance en liquide aéré en fonction de la fréquence d'agitation est comparée pour ces trois relations en considérant le réacteur utilisé dans le cadre de ce travail (Figure III-2A). On remarque que pour notre bioréacteur, les relations de Michel et Miller et de Cui et al. fournissent des résultats très similaires. Par contre la relation de Hughmark prédit des pertes de dissipations beaucoup plus importantes. De plus, la relation (III-17) prédit une très faible perte de puissance pour le mobile supérieur (Figure III-2B) mais l'écart observé par rapport à ceux prédits par la relation (III-18) ne dépasse pas 15 %.

Au final, nous avons choisi d'estimer la dissipation volumique dans le STR en utilisant les relations de Cui et al. (1996) et en supposant que le mobile supérieur apportait une puissance similaire à celle de la turbine inférieure. Dans les cas où une hélice marine a été ajoutée dans le bioréacteur, nous ne supposons pas de perte de puissance sur cette dernière, les cavités gazeuses étant peu rencontrées pour ce type de mobile.

En STR, la répartition de la dissipation turbulente est hétérogène, en particulier lors de l'utilisation de mobiles radiaux de type Rushton. L'estimation de cette répartition reste un enjeu scientifique majeur et ne sera donc pas l'objet du présent travail. Nous nous contenterons de recueillir une estimation de la dissipation maximale sur la base des données de la littérature. L'étude de Delafosse et al. (2009) regroupe les données principales de la littérature et montre que la dissipation maximale adimensionnalisée $\varepsilon_{\max}/(N^3 \cdot D^2)$ présente des valeurs similaires selon les études références. De plus, Baldi et Yiannekis (2004) ont montré que cette grandeur restait comprise entre 9 et 10 pour des Reynolds variant entre 10000 et 32000 environ. On pourra, dans notre étude, raisonnablement considérer qu'une estimation moyenne serait donnée par :

$$\varepsilon_{\max}/(N^3 \cdot D^2) = 10 \pm 2 \quad (\text{III-19})$$

L'analyse spatiale des dissipations confirme que les valeurs maximales sont rencontrées dans le jet radial de la turbine dans les environs des pales de la turbine. Il conviendra néanmoins de noter que ces mesures expérimentales et ces déterminations par CFD sont obtenues en liquide non-aéré ; la présence de taux de gaz, même modérés, rend les mesures PIV impossibles et complexifie également les simulations numériques par la nécessité d'intégrer des modèles d'interactions gaz-liquide semi-empiriques. Faute de mieux nous retiendrons la relation (III-19) dans la suite de notre étude, même pour des conditions aérées.

Tableau III-1. Estimation des taux de dissipation maximaux en cuves agitées munies d'une turbine Rushton par PIV et CFD, d'après Delafosse et al. (2009).

	Escudié et Liné (2003), PIV	Baldi et Yiannekis (2004), PIV	Ducci et Yiannekis (2005), LDV	Delafosse et al. (2009), CFD-RANS	Delafosse et al. (2009), CFD-LES
$\varepsilon_{\max}/(N^3 \cdot D^2)$	14	10,5	9,4	11	14
$\varepsilon_{\max}/\langle \varepsilon \rangle$	60	44	40	42	70
r/T	0,22	0,224	0,225	0,16	0,22
z/T	0,36	0,33	0,33	0,34	0,35

Le Tableau III-2 regroupe les conditions opératoires de culture utilisées dans le cadre de ce travail et présentées plus en détail dans le paragraphe III.2.

Tableau III-2. Conditions opératoires d'agitation et d'aération utilisées pour les cultures en STR. R : Turbine Rushton. La dissipation volumique est estimée par les relations (III-12) et (III-18). La viscosité cinématique vaut $0,841.10^{-6} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ (eau à 27°C).

Condition	1_STR	2_STR	3_STR	4_STR	5_STR
N (RPM)	560	560	560	400	200
V_L (L)	1,2	1,2	2	1,2	2
Type et nombre d'agitateurs	2 R+1 hélice	2 R	2 R	2 R	2 R
Re	40000	40000	40000	28500	14300
Q_g (L.min⁻¹)	1	1	1	1	3
P / V (kW.m⁻³)	5,41	5,40	3,24	2,0	0,13
$\langle \varepsilon \rangle$ (m².s⁻³)	5,43	5,42	3,25	2,0	0,13
ε_{max} (m².s⁻³)	29,3	29,3	29,3	10,7	1,3

Afin de respecter un critère de dissipation volumique moyenne entre les expériences menées en STR et en fioles d'Erlenmeyer, nous avons retenu les conditions opératoires présentées dans le Tableau III-3.

Tableau III-3. Conditions opératoires choisies parmi les cultures en fioles d'Erlenmeyer s'approchant d'un critère de *dissipation volumique moyenne constante* avec les expériences menées en STR (Tableau III-2). Le nombre de Reynolds, la dissipation volumique moyenne et maximale sont respectivement estimées par les relations (III-2), (III-4) et (III-5). Les données du STR sont rappelées entre parenthèses.

Condition	1_E (1_STR et 2_STR)	2_E (3_STR)	3_E (5_STR)
Volume total (mL)	500	500	500
V_L (mL)	20	40	100
N (rpm)	350	350	250
d_0 (m)	0,025	0,025	0,025
Re	69400	69400	49500
Régime d'écoulement	Turbulent	Turbulent	Transition
P / V (kW.m ⁻³)	5,19	3,27	0,71
$\langle \varepsilon \rangle$ (m ² .s ⁻³)	5,21 (5,4)	3,28 (3,24)	0,712 (0,15 ; 0,13)
ε_{max} (m ² .s ⁻³)	15,2 (29,3)	12 (29,3)	0,752 (1,3)

Tandis que les conditions opératoires 1_STR à 3_STR peuvent être intrapolées à dissipation volumique constante, les dissipations relatives aux expériences 4_STR et 5_STR ne seront qu'approchées pour des raisons de limitation de transfert d'oxygène observées à plus faibles dissipations en fioles d'Erlenmeyer.

S. pristinaespiralis DSMZ 40338 est un microorganisme filamenteux dont la morphologie dépend des conditions d'agitation mécanique, comme montré par Mehmood et al. (2012) en fioles d'Erlenmeyer. Pour ce type de microorganisme, Peter et al. (2006) conseille un critère de dissipation maximale pour le passage des fioles d'Erlenmeyer aux STR. Néanmoins, les différences de structures d'écoulement entre ces deux designs de bioréacteur ne permettent pas de respecter simultanément un taux de dissipation moyen et un taux de dissipation maximal (Tableau III-2). Il est donc nécessaire de proposer des conditions de culture

spécifiques à chacun de ces deux critères d'extrapolation. Ainsi, le Tableau III-4 propose des conditions opératoires en fioles d'Erlenmeyer permettant de respecter un critère de taux de dissipation maximale sur la base des résultats du Tableau III-2.

Tableau III-4. Conditions opératoires choisies parmi les cultures en fioles d'Erlenmeyer s'approchant d'un critère de *taux de dissipation maximale constant* avec les expériences menées en STR (Tableau III-2). Le nombre de Reynolds, la dissipation volumique moyenne et maximale sont respectivement estimées par les relations (III-2), (III-4) et (III-5). Les données du STR sont rappelées entre parenthèses.

Condition	4_E (1_STR ; 2_STR ; 3_STR)	5_E (5_STR)
Volume total (mL)	1000	500
V_L (mL)	20	40
N (rpm)	350	250
d_o (m)	0,025	0,025
Re	10^5	49500
Régime d'écoulement	Turbulent	Transition
P / V (kW.m ⁻³)	9,78 (5,4 ; 3,25)	1,31 (0,15 ; 0,14)
$\langle \varepsilon \rangle$ (m ² .s ⁻³)	9,82	1,31
ε_{max} (m ² .s ⁻³)	26,9 (29,3)	1,31 (1,3)

A l'instar d'une intrapolation réalisée à dissipation moyenne constante, le changement d'échelle à dissipation turbulente maximale ne permet pas de maintenir la dissipation volumique constante.

III.1.1.b. Coefficient volumique de transfert d'oxygène $k_{L,a}$

La détermination et la connaissance du coefficient de transfert volumique d'oxygène $k_{L,a}$ est l'un des fondements historique du dimensionnement, de l'extrapolation et de la conduite des

bioréacteurs aérobies. En effet, celui est l'unique paramètre « procédé » à maîtriser lorsque des conditions de suffisante aération sont recherchées, comme l'indique la réécriture du bilan en oxygène dissous dans le bioréacteur (en supposant que le système est ouvert pour l'oxygène) :

$$k_L a = \frac{1}{(O_2^* - O_2)} \cdot \left(\frac{dO_2}{dt} + r_{O_2}''' \right) \quad (\text{III-20})$$

En régime permanent, la relation précédente s'écrit simplement sous la forme :

$$k_L a = \frac{r_{O_2}'''}{(O_2^* - O_2)} \quad (\text{III-21})$$

Avec :

O_2^* (mol.L⁻¹) la concentration en oxygène dissous à la saturation, O_2 (mol.L⁻¹) la concentration en oxygène dissous à l'équilibre et r_{O_2}''' (mol.L⁻¹.s⁻¹) la consommation volumique d'oxygène.

Ainsi, de manière générale, soit l'apport d'oxygène est suffisamment important et la régulation en oxygène est autorisée à une valeur non-nulle, soit celui-ci est insuffisant et la concentration en oxygène dissous chute rapidement à une valeur nulle. Les conséquences sont une limitation de la croissance cellulaire et donc, par voie de conséquence, souvent une baisse de la productivité du procédé. En plus des phénomènes précédemment mentionnés, dans le cas des procédés de production d'antibiotiques par *S. pristinaespiralis*, il a été montré par Mehmood et al. (2011) que le déclenchement de la production n'était observé que pour des conditions opératoires assurant une aération suffisante ; une valeur critique de $k_L a = 50 \text{ h}^{-1}$ a ainsi été mise en évidence en fioles d'Erlenmeyer. Ceci montre la nécessité de disposer d'informations aussi précises que possible quant aux capacités d'aération des bioréacteurs utilisés.

i. Réacteur mécaniquement agité

Les coefficients volumiques de transfert d'oxygène ont été déterminés par la méthode statique décrite dans le paragraphe II.5 pour différentes conditions d'agitation et d'aération. L'effet de la vitesse d'agitation sur le coefficient est représenté sur la Figure III-3. Nos résultats indiquent une corrélation entre ces valeurs et la fréquence d'agitation avec un passage de 20 à 97 h⁻¹ sur la gamme de valeurs testées dans le cadre de notre étude.

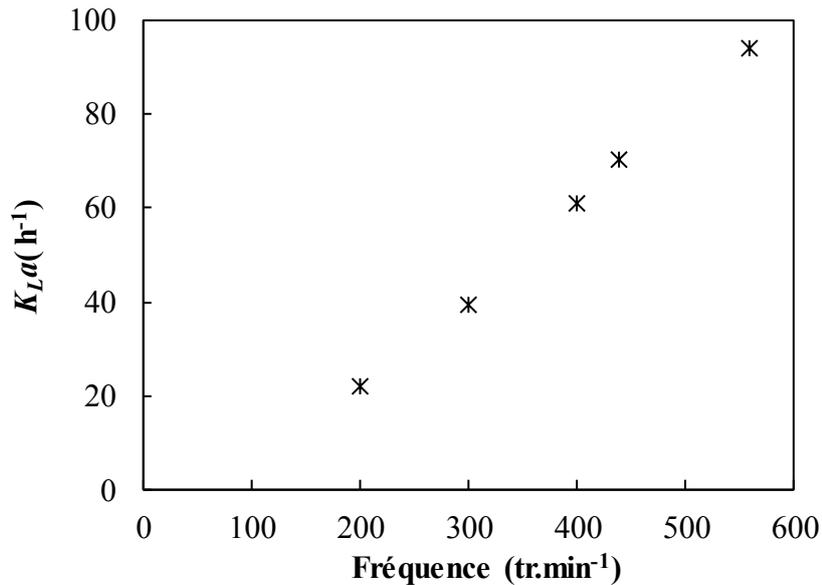


Figure III-3. Valeurs mesurées par méthode statique des $k_L a$ en fonction de différentes vitesses d'agitation et pour un débit d'air fixé à 1 L.min⁻¹. Bioréacteur muni de deux turbines Rushton avec un volume de liquide de 1,2 L.

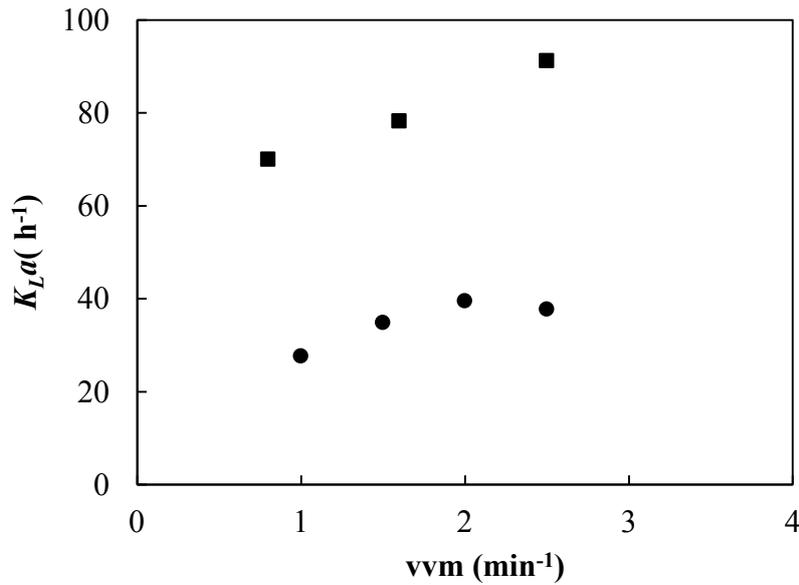


Figure III-4. Mesures du k_La en fonction du débit de gaz (vvm : volume de gaz par volume de liquide et par minute), pour une fréquence d'agitation de 200 rpm et un volume de liquide de 2 L (●) et de 560 rpm et 1,2 L (■).

L'influence du débit de gaz sur le coefficient volumique de transfert d'oxygène est reportée sur la Figure III-4. Comme attendu, l'effet du débit de gaz sur le k_La est sensiblement moins marqué que celui de la fréquence d'agitation. La littérature dédiée à la modélisation du coefficient volumique de transfert d'oxygène en STR est très riche ; le but n'est pas de la rappeler de manière exhaustive. On pourra par exemple se reporter à la revue très complète de Garcia-Ochoa et Gomez (2009) pour de plus amples détails. Classiquement, en réacteur mécaniquement agité, le coefficient volumique de transfert d'oxygène est relié à la dissipation volumique P / V et à la vitesse superficielle de gaz U_g définie par $U_g = (4 \cdot Q_g / \pi \cdot T^2)$ par la relation Van't Riet (1979) :

$$k_La = A \cdot \left(\frac{P_g}{V_L} \right)^\alpha \cdot (U_g)^\beta \quad (\text{III-22})$$

Avec A une constante dépendant des propriétés physicochimiques du milieu de culture et α et β deux constantes dépendant du design de l'agitateur et du sparger. En se référant aux

dissipations volumiques calculées dans le paragraphe III.1.1.a., l'identification paramétrique des coefficients de l'équation (III-22) à l'aide des mesures expérimentales conduit à la corrélation suivante, valable pour un bioréacteur muni de deux turbines Rushton et rempli par un volume de 1,2 L de milieu de culture.

$$k_L a = 9,7 \cdot 10^{-4} \cdot \left(\frac{P_g}{V_L} \right)^{0,48} \cdot (U_g)^{0,13} \quad (\text{III-23})$$

Au final, pour les conditions de culture retenues pour les cultures en bioréacteur, les valeurs expérimentales de $k_L a$ sont les suivantes :

Tableau III-5. Valeurs expérimentales des coefficients volumiques de transfert d'oxygène pour les conditions de culture.

Condition	1_STR	2_STR	3_STR	4_STR	5_STR
N (RPM)	560	560	560	400	200
V_L (L)	1,2	1,2	2	1,2	2
Type et nombre d'agitateurs	2 R+1 hélice	2 R	2 R	2 R	2 R
Re	40000	40000	40000	28500	14300
Q_g (L.min⁻¹)	1	1	1	1	3
$k_L a$ (h⁻¹)	70	99	95	62	15

ii. Fiole d'Erlenmeyer

La mesure des capacités d'aération des fioles agitées orbitalement est délicate car l'utilisation d'une sonde électrochimique est difficile, celle-ci perturbant l'écoulement et risquant de ne pas être toujours immergée. De la même manière, les mesures par fluorescence (patches) sont limitées à des volumes suffisants de liquide. Il est donc nécessaire d'utiliser des méthodes par

dosage des sulfites par exemple. Grâce à cette dernière, Henzler et Schedel (1991) ont proposé une relation adimensionnelle fournissant le $k_L a$ en fioles agitées :

$$k_L a \cdot \left(\frac{\nu}{g^2} \right)^{1/3} = B \left(\frac{d^3}{V_L} \right)^{8/9} \cdot \left(\frac{D_{diff}}{\nu} \right)^{1/2} \cdot \left(\frac{\nu^2}{d^3 g} \right)^{8/27} \cdot \left(\frac{N^2 \sqrt{d_0 d}}{g} \right)^a \quad (\text{III-24})$$

Avec : ν (m²/s) la viscosité cinématique et D_{diff} (m²/s) la diffusivité moléculaire de l'oxygène.

Ces auteurs ont fourni les valeurs suivantes pour les exposants de la relation (III-24) ; ceux-ci sont reportés dans le Tableau III-6. D'un point de vue dimensionnel, l'équation (III-24) peut être réécrite sous la forme suivante (Klößner et Büchs, 2012) :

$$k_L a = 0,5 \cdot d^{73/36} \cdot N \cdot d_0^{1/4} \cdot V_L^{-8/9} \cdot D_{diff}^{1/2} \cdot \nu^{-13/54} \cdot g^{-7/54} \quad (\text{III-25})$$

Tableau III-6. Valeurs de coefficients de la relation (III-24) selon la nature de la phase liquide d'après Henzler et Schedel (1991).

Phase liquide	B	a
Eau	0,5	0,5
Solution de glucose	0,5	0,5
Suspension de <i>S. tendae</i>	1,4	0,666

Il est néanmoins nécessaire d'estimer la diffusivité de l'oxygène dans le milieu de culture considéré. Une autre méthode est de proposer une équation qui ne soit pas consistante d'un point de vue dimensionnel et dont les coefficients et exposants soient déterminés par des mesures expérimentales du $k_L a$. Par exemple, Seletzky et al. (2007) ont déterminé le $k_L a$ en fioles agitées en utilisant l'oxydation d'une solution de sulfites à 1 M :

$$k_L a_{sulf} = 3,212 \cdot 10^{-4} \cdot d^{1,92} \cdot N^{1,16} \cdot d_0^{0,38} \cdot V_L^{-0,83} \quad (\text{III-26})$$

Ces mêmes auteurs ont montré que, pour des suspensions biologiques, il était possible d'estimer le k_La en multipliant le résultat de la relation (III-26) par un coefficient propre à chaque système. Cette relation a ainsi été utilisée par Mehmood et al. (2012) pour l'étude des effets de l'aération et de l'agitation sur *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 en fioles agitées. L'estimation des k_La par les relations (III-24) et (III-26) sont reportées dans le Tableau III-7. Un écart constant de l'ordre de 40 % est donné entre les valeurs données par les deux relations ; par cohérence avec les travaux de Mehmood et al. (2012), nous retiendrons préférentiellement la relation (III-26).

Tableau III-7. Comparaison des valeurs des coefficients de k_La en fioles d'Erlenmeyer données par la littérature et pour des critères de dissipation volumique moyenne et maximale constante. Les valeurs expérimentales obtenues en bioréacteur mécaniquement agité sont rappelées entre parenthèses.

Condition	1_E	2_E	3_E	4_E	5_E
k_La relation (III-24)	375	202	57	552	129
k_La relation (III-26)	210 (70 ; 99)	118 (95)	37 (15)	299 (70 ; 99 ; 95)	80 (15)
Ecart (%)	44	42	35	46	38

La comparaison des coefficients volumiques de transfert d'oxygène données pour des conditions opératoires respectant des critères d'extrapolation à dissipation volumique ou maximale constante montre que les coefficients volumiques sont très sensiblement plus élevés en fioles d'Erlenmeyer qu'en STR. Pour les cas où de l'oxygène pur sera utilisé comme gaz d'aération en STR, il faudra néanmoins intégrer l'augmentation des capacités d'aération totales par celle de la force motrice du transfert via celle de la solubilité de l'oxygène. Sur la base de ce constat, il peut s'avérer pertinent de tester un autre jeu de conditions opératoires en fioles d'Erlenmeyer assurant une intrapolation avec un critère de coefficient volumique de transfert d'oxygène (Tableau III-8).

Tableau III-8. Conditions opératoires choisies en fioles d'Erlenmeyer pour assurer une intrapolation à $k_L a$ constant avec les cultures réalisées en STR. Les valeurs en STR sont rappelées entre parenthèses.

Condition	6_E (1_STR)	7_E (2_STR / 3 STR)	8_E (5-STR)
Volume total (mL)	250	250	500
V_L (mL)	30	30	100
N (rpm)	250	350	250
d_0 (m)	0,025	0,025	0,025
$k_L a$ (h^{-1})	67 (70)	98 (99 ; 95)	37 (15)
P/V (kW/m ³)	0,96	1,51	1,31
$\langle \varepsilon \rangle_{\max}$ (m ² .s ⁻³)	3,2	6,0	5,1

III.1.1.c. Régulation des paramètres opératoires de culture

i. Réacteur mécaniquement agité

La régulation de la concentration en oxygène dissous dans le cas de cultures de microorganismes filamenteux est, conceptuellement, très délicate. Cette régulation peut bouleverser l'environnement hydrodynamique des bactéries alors que l'on cherche, par ailleurs, à le contrôler. Il est donc nécessaire de s'y arrêter, de choisir le meilleur compromis entre réponse aux questions scientifiques sous-jacentes et disponibilité des solutions techniques. Une amélioration des capacités d'oxygénation peut être réalisée selon trois modes opératoires, qui peuvent, si nécessaire, être séquentiels :

- *Augmentation de la fréquence d'agitation de l'agitateur.* Cette solution présente l'avantage d'être très efficace sur le coefficient volumique de transfert d'oxygène. En contrepartie, tous les transferts de matière sont modifiés ainsi que, potentiellement, la morphologie de la bactérie.

- *Augmentation du débit de gaz.* Solution moins efficace que la précédente, on peut supposer que celle-ci ne modifie pas les autres paramètres de culture, hormis une augmentation, peu sensible, de la turbulence du liquide.
- *Augmentation de la pression en oxygène dans le gaz injecté.* Cette solution, basée sur l'augmentation de la force motrice du transfert et non sur celle du k_{La} , est très efficace, ne modifie pas la turbulence du liquide, mais est très délicate à mettre en œuvre (régulation au point de consigne).

Par exemple, une des difficultés techniques rencontrées est de maintenir une valeur faible de dissipation volumique de $0,13 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ constante tout au long de la culture tout en permettant un apport suffisant d'oxygène (concentration en oxygène dissous $\geq 30 \%$ de la saturation en air). Ainsi, pour la plupart des expériences menées en STR, la concentration en oxygène dissous a pu être maintenue au-dessus de 30% de la saturation en air (voir par exemple la Figure III-15). Néanmoins, en-deçà d'une fréquence d'agitation de 300 rpm dans un réacteur équipé de 2 turbines Rushton et pour un volume de liquide de $1,2 \text{ L}$, il n'est plus possible de maintenir un environnement hydrodynamique constant en conservant tous les paramètres opératoires. Ainsi, à 300 rpm et 1 vvm , une augmentation de la fréquence d'agitation a dû être imposée pour conserver une oxygénation suffisante (Figure III-5).

Afin de ne pas trop modifier la turbulence du liquide par la régulation de l'oxygène dissous, une alternative techniquement simple est l'augmentation du débit de gaz. Reprenons l'expérience précédente mais en pilotant la régulation de l'oxygène dissous à l'aide du débit de gaz injecté. La Figure III-6 montre les évolutions temporelles de la concentration en oxygène dissous et du débit d'air lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 réalisée en réacteur mécaniquement agité sous une fréquence d'agitation fixée à 300 rpm . Pour cette expérience, la régulation de la concentration en oxygène à des valeurs supérieures à 30% de la saturation en air, par augmentation du débit d'air jusqu'à sa valeur maximale de $5 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ n'a pu être réalisée que jusque 15 h de culture. Au-delà, la concentration en oxygène dissous descend rapidement à 0% , entraînant une limitation du transfert gaz-liquide.

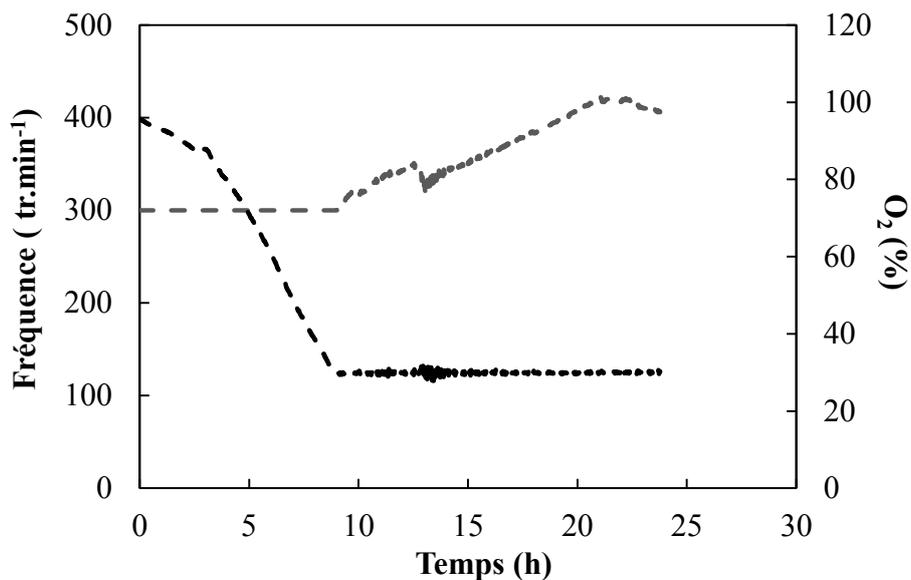


Figure III-5 Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous (—) et de la fréquence d'agitation (---) pour une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 avec un débit d'air fixé à 1 L.min⁻¹. Réacteur équipé de deux turbines Rushton et $V_L = 1,2$ L.

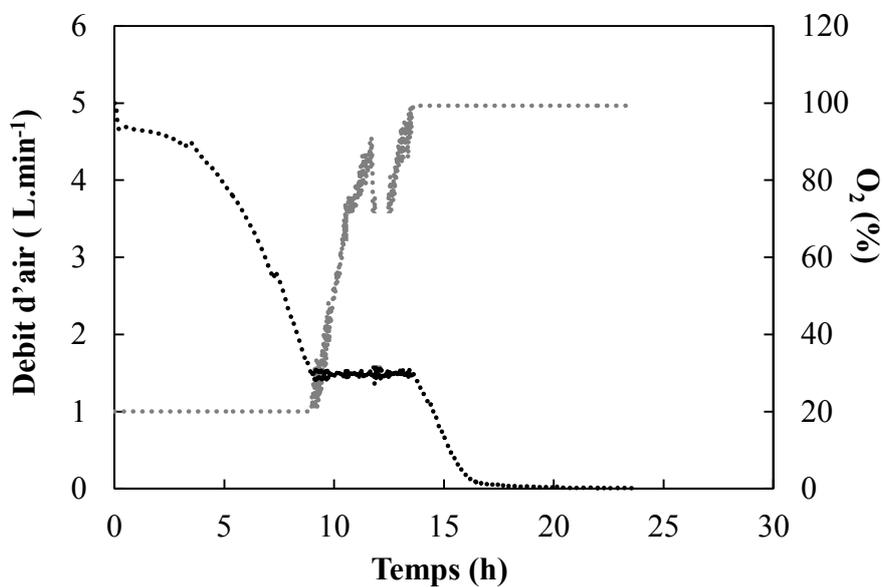


Figure III-6. Evolution temporelle de la concentration en oxygène dissous (—) et du débit de gaz (.....) pour une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 à une fréquence d'agitation de 300 rpm. Réacteur équipé de deux turbines Rushton et $V_L = 1,2$ L.

La dernière alternative reste donc un enrichissement du gaz injecté et donc une augmentation de la solubilité de l'oxygène dans la phase liquide. Dans notre cas, de l'oxygène pur a été utilisé, ce qui permet de multiplier cette solubilité par un facteur 5 et donc la force motrice du transfert $(O_2^* - O_2)$ d'un facteur similaire. Cette solution s'est avérée performante avec le maintien d'une concentration d'oxygène supérieure à 30 % de la saturation en air sans modification de la turbulence du liquide.

ii. Fiole d'Erlenmeyer

En fioles d'Erlenmeyer, les conditions opératoires de culture (pH, oxygénation) ne sont pas régulées. Cette absence de régulation ne doit pas être forcément perçue négativement, comme récemment suggéré par Tissot et al. (2011) pour la culture de cellules animales, mais entraîne *de facto*, un risque de modification de l'environnement physico-chimique selon les conditions de culture et donc, une plus grande complexité de cet environnement. Quelques suivis de pH réalisés en fioles agitées ($V_T = 250$ mL, $N = 250$ rpm, $d_0 = 2,5$ cm, $10 < V_L < 50$ mL) ont montré que le pH diminuait continuellement en cours de culture, pour atteindre des valeurs comprises entre pH = 6,0 et 6,2 en fin de culture.

III.1.1.d. Temps de mélange macroscopique

Le temps de mélange macroscopique au degré x (%) est le temps nécessaire pour que les fluctuations de concentrations observées en tout point du réacteur ne dépassent pas une intensité $100 - x$. Le choix du degré x dépend du cahier des charges du procédé (nature de la molécule, temps biologique associé, etc...). Dans le cas d'un réacteur discontinu alimenté, l'estimation du temps de mélange macroscopique est importante, en particulier dans les réacteurs de grands volumes. En effet, sa valeur, à comparer aux temps caractéristiques de consommation des substrats, conditionne l'existence de gradients de concentration au sein du bioréacteur. Dans le cas de réacteurs discontinus alimentés, le mélange macroscopique est essentiellement critique pour le transport de l'oxygène dissous des zones de transfert gaz-liquide aux zones de liquide sans interface avec la phase gaz.

i. Réacteur mécaniquement agité

En STR, l'écoulement est turbulent si bien que l'analyse dimensionnelle du système montre que le temps mélange macroscopique t_M peut se mettre sous la forme adimensionnelle suivante :

$$N \cdot t_M = cste \quad (\text{III-27})$$

La constante du terme de droite de l'équation (III-27) dépend seulement de la géométrie de la cuve et de l'agitateur. Pour des cuves caractérisées par $H = T$, la corrélation de Nienow (1997) permet la prédiction du temps de mélange pour une large gamme d'agitateurs et de conditions opératoires :

$$t_M = 5,9 \cdot T^{2/3} (\langle \varepsilon_T \rangle)^{-1/3} \left(\frac{D}{T} \right)^{-1/3} \quad (\text{III-28})$$

Nienow (2006) précise que l'équation (III-28) peut être utilisée en réacteur agité gaz-liquide à condition d'y intégrer la dissipation en conditions aérées et la dissipation issue de la détente adiabatique du gaz dans le liquide (cette dernière étant négligeable pour les conditions opératoires testées dans notre travail). L'application de la relation précédente aux conditions opératoires utilisées en STR dans le cadre de notre étude fournit les résultats du Tableau III-9.

Tableau III-9. Temps de mélange calculés par la relation (III-28) pour les conditions opératoires testées en STR.

Condition	1_STR	2_STR	3_STR	4_STR	5_STR
$P / V \text{ (kW.m}^{-3}\text{)}$	5,41	5,40	3,24	2,0	0,13
$t_M \text{ (s)}$	1,4	1,4	1,6	1,9	4,8
$N \cdot t_M$	12,8	12,8	15,2	12,7	15,8

Nous pouvons constater que les temps de mélange restent inférieur à 5 secondes, quelles que soient les conditions opératoires d'agitation et d'aération appliquées. Afin de prédire l'existence de gradients d'oxygène au sein du STR, ce temps de mélange est comparé au temps caractéristique de consommation d'oxygène Δt_{O_2} par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Dans le cas de culture de cellules animales, Nienow et al. (1996) ont proposé de définir ce temps t_M comme le temps nécessaire pour consommer l'oxygène de 30 à 15 % de la

saturation en air. Nous reprendrons une définition similaire en choisissant une borne inférieure de 10 % de la saturation en air, concentration que l'on peut supposer limitante pour *Streptomyces*. Peu de données relatives à la consommation d'oxygène par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sont disponibles dans la littérature. Mehmood et al. (2012) ont mesuré les consommations volumiques d'oxygène en cours de culture et en fioles d'Erlenmeyer agitées orbitalement. Ces consommations dépendent de la dissipation volumique appliquée mais les valeurs maximales obtenues sont de l'ordre de $25 \text{ mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, soit 3,3 % (sat en air).s⁻¹ ce qui fournit un temps caractéristique $\Delta t_{O_2}^{30 \rightarrow 10\%}$ de 6 s. Ainsi, même lorsque la consommation volumique d'oxygène est maximale, les temps de mélange donnés par le Tableau III-9 restent bien inférieurs au temps de consommation $\Delta t_{O_2}^{30 \rightarrow 10\%}$, ce qui permet de s'affranchir de l'existence de gradients d'O₂ au sein du STR.

ii. Fioles d'Erlenmeyer

En fioles agitées orbitalement, la connaissance du temps de mélange est particulièrement critique car le transfert d'oxygène ne s'effectuant que par la surface libre, la cinétique du transport convecto-diffusif dans la phase liquide doit être rapide pour éviter les gradients d'O₂. Par une méthode colorimétrique Tan et al. (2011) ont étudié de manière intensive le mélange en fioles lisses d'Erlenmeyer. Ces auteurs ont montré que :

- En écoulement turbulent ou proche turbulent, Nt_M est indépendant de la géométrie de la fiole et atteint une asymptote aux alentours de 10.
- Pour $Re < 1000$, Nt_M augmente sensiblement.
- Un passage du diamètre orbital d'agitation de 2,5 à 5 cm n'avait pas d'effet sur le nombre de mélange Nt_M .

Ainsi, les estimations de temps de mélange pour les conditions opératoires utilisées fournissent les résultats du Tableau III-10. Les temps de mélange obtenus sont inférieurs (ou similaires) aux temps de mélange calculés en STR ce qui, a fortiori, devrait prévenir toute apparition de gradients d'O₂.

Tableau III-10. Valeurs des temps de mélange estimés en supposant $Nt_M = 10$ pour les conditions opératoires choisies en fioles d'Erlenmeyer. Les valeurs entre parenthèses fournissent les résultats des expériences extrapolées en STR.

Condition	1_E	2_E	3_E	4_E	5_E	6_E	7_E	8_E
N (rpm)	350	350	250	350	250	250	350	250
Re	69400	69400	49500	100000	49500	31700	44400	49500
Fr_T (III-33)	2,3	2,3	1,7	2,4	1,7	1,5	2,2	1,7
Nt_M	10	10	10	10	10	10	10	10
t_M (s)	1,7 (1,4 ; 1,4)	1,7 (1,4)	2,4 (4,8)	1,7 (1,4 ; 1,4 ; 1,6)	2,4 (4,8)	2,4 (1,4)	1,7 (1,4 ; 1,6)	2,4 (4,8)

Ces résultats recourent les mesures expérimentales de temps de mélange de Tissot (2011) en cylindre agité orbitalement. Celle-ci a montré l'existence de régime de mélange selon la valeur du nombre de Froude Fr_T (voir relation (III-33)). Pour de faibles valeurs de Fr_T , l'interface gaz-liquide est plate avec un mélange essentiellement diffusionnel (Figure III-7). Pour des valeurs intermédiaires ($0,7 < Fr_T < 1,1$), les zones mal mélangées se concentrent progressivement au centre et en bas du cylindre. L'interface gaz-liquide devient tridimensionnelle et le temps de mélange diminue rapidement. Pour $Fr_T > 1,1$, le temps de mélange atteint une valeur asymptotique sous l'effet d'un vortex apparaissant en milieu de surface libre.

Dans notre cas, les valeurs du nombre de Froude Fr_T restent toujours supérieures à 1,7 (Tableau III-10) ce qui laisse supposer que le mélange est purement convectif pour les conditions opératoires testées.

Conclusion partielle. Même si les valeurs des temps de mélange diffèrent entre les fioles d'Erlenmeyer agitées orbitalement et les expériences réalisées en STR, ceux-ci restent suffisamment faibles pour raisonnablement affirmer que le mélange macroscopique n'aura pas d'effets sur l'existence de gradients spatiaux et donc d'éventuelles dérives de productivité entre les deux types de bioréacteurs.

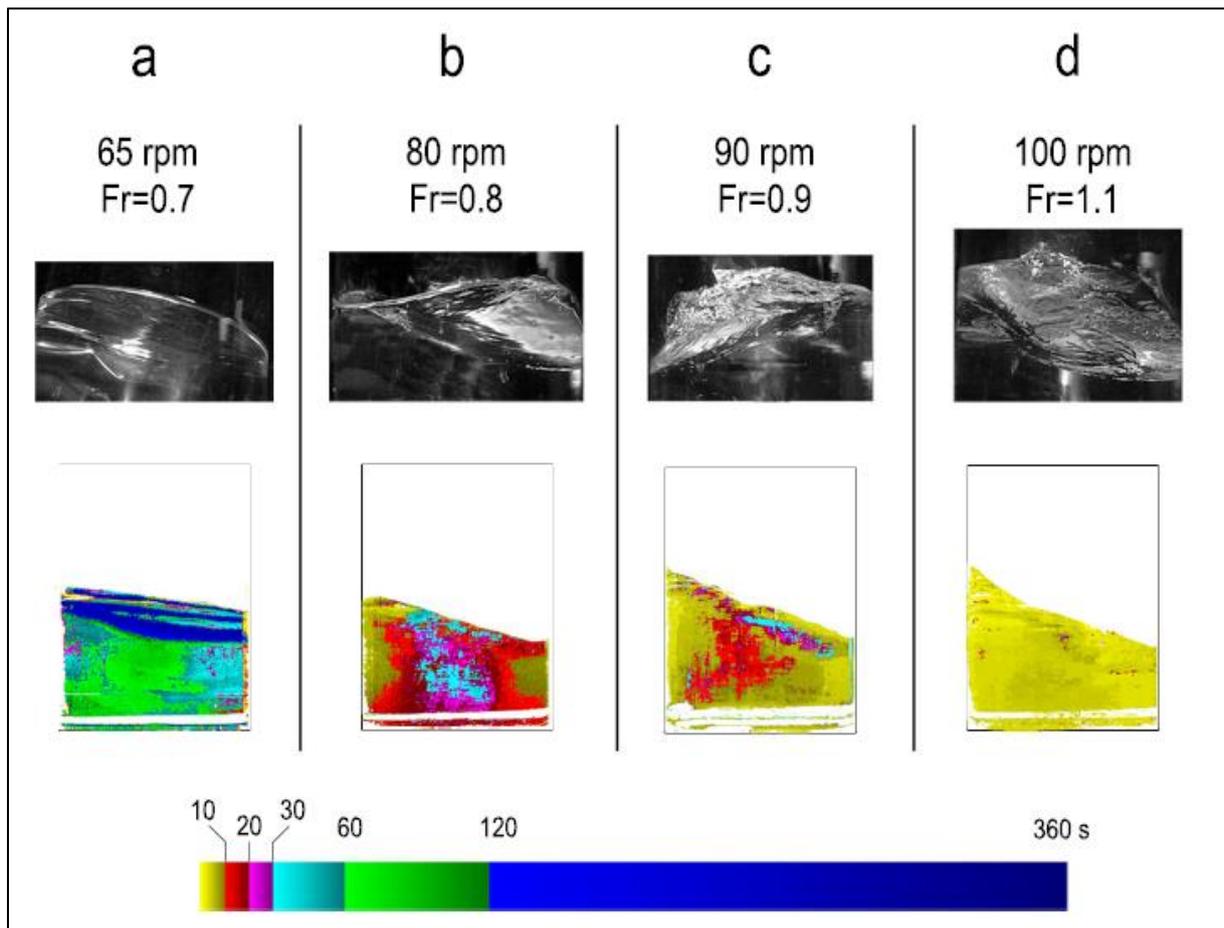


Figure III-7. Observation des temps de mélange locaux en cylindres agités orbitalement. L'échelle de couleur fournit le temps de mélange (s). Le nombre de Froude est défini par la relation (III-33), d'après Tissot (2011).

III.1.2. Écoulements macroscopiques

III.1.2.a. Fioles d'Erlenmeyer : structures en-phase et hors-phase

Les écoulements macroscopiques en réacteurs agités orbitalement présentent deux régimes d'écoulement qui dépendent des propriétés physico-chimiques de la phase liquide (essentiellement de la viscosité), de la taille de la fiole et des fréquences d'agitation (Büchs et al., 2001). Ces deux régimes sont :

- Le régime « en phase » pour lequel le mouvement du liquide est synchrone avec celui de la fiole agitée. La puissance dissipée volumique suit alors la loi (III-2).
- Le régime « hors-phase » pour lequel une partie du liquide n'est plus en rotation synchrone avec celle de la fiole. Il s'en suit une réduction importante de la puissance

dissipée volumique, des capacités de transfert de matière et de mélange, par rapport aux conditions « en phase ».

Les conditions « en-phase » ont été définies par Büchs et al. (2001) par :

$$\begin{cases} Ph = \left(\frac{d_0}{d} \right) \cdot (1 + 3 \cdot \log(\text{Re}_f)) > 1,26 \\ Fr_a > 0,4 \end{cases} \quad (\text{III-29})$$

Avec les nombres de Reynolds, de Froude axial et de phase définis par:

$$\text{Re}_f = \left(\frac{\rho \cdot N \cdot d^2}{\mu} \right) \cdot \frac{\pi}{2} \cdot \left(1 - \sqrt{1 - \frac{\pi}{4} \cdot \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right)^2 \quad (\text{III-30})$$

$$Fr_a = \frac{(2 \cdot \pi \cdot N)^2 d_0}{g} \quad (\text{III-31})$$

$$Ph = \frac{d_0}{d} \left[1 + 3 \log(\text{Re}_f) \right] \quad (\text{III-32})$$

Même si une condition « en-phase » est choisie en début de culture, une augmentation de la viscosité en cours de culture peut entraîner une baisse du nombre de phase et ainsi le passage à des conditions « hors-phase ». Reyes et al. (2003) ont ainsi montré que la baisse de puissance induite par le passage « hors-phase » lors d'un procédé de production d'alginate expliquait les écarts de performance avec le STR. Une diminution de la fréquence d'agitation réalisée en cours de culture en STR pour mimer cette baisse de puissance a permis d'améliorer l'extrapolabilité du procédé.

Récemment, des mesures expérimentales de champs de vitesses ont été réalisées dans des cylindres non chicanés agités orbitalement par P.I.V. (Weheliye et al., 2013). Cette étude, en plus d'obtenir une cartographie précise des champs d'écoulement a montré que la transition des régimes en-phase et hors-phase était progressive. Pour étudier cette transition, ces auteurs ont utilisé l'expression (III-8). A noter que ce choix reste arbitraire et peu informé, si bien que Tissot et al. (2010) ont quant à eux choisi une moyenne entre le diamètre du cylindre et le diamètre orbital :

$$Fr_T = \frac{2 \cdot \pi \cdot N \cdot (d_0 + d_i) / 2}{\sqrt{g \cdot d}} \quad (\text{III-33})$$

En écoulement en phase, deux zones ont été mises en évidence.

Une zone proche de la surface pour laquelle l'existence de deux vortex toroïdaux favorisent un transport convectif de la surface vers le fond du réacteur.

Une zone en fond de bioréacteur dans laquelle le transport de la matière est essentiellement diffusif. Une augmentation de la fréquence d'agitation entraîne une augmentation de la taille des vortex toroïdaux vers le fond de la cuve et, par conséquent, une diminution significative des temps de mélange. La surface libre est une ellipse bi-dimensionnelle (Figure III-8A)

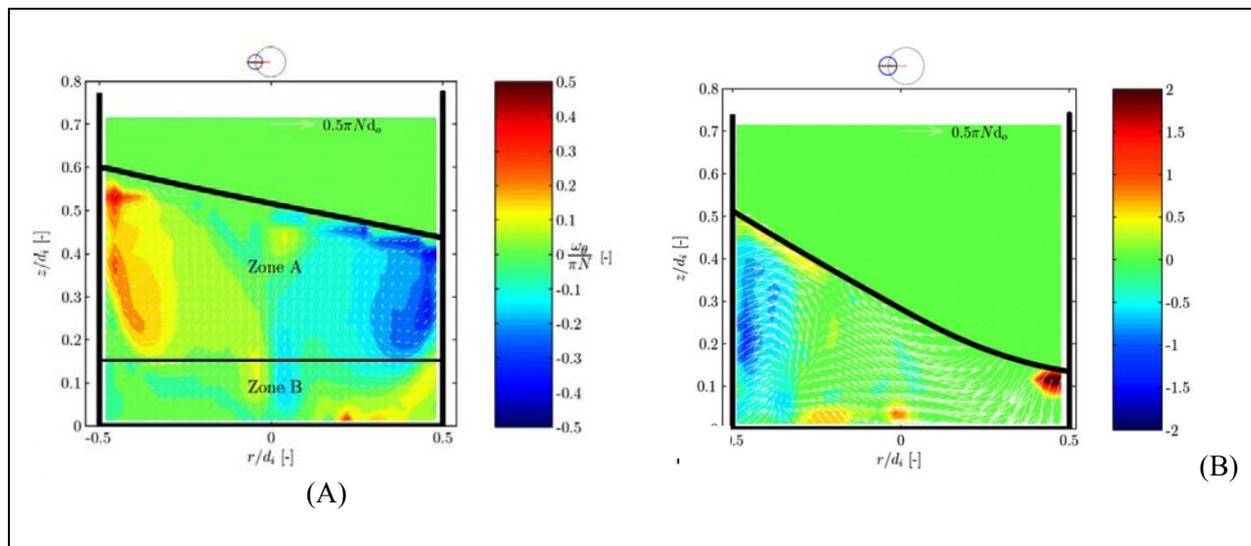


Figure III-8. Exemples de champs d'écoulement mesurés par PIV par Weheliye et al. (2013). Représentation dans un plan vertical des hauteurs de liquide z adimensionnalisés en fonction de la position radiale r adimensionnalisée. d_i est le diamètre interne du réacteur, h est la hauteur de liquide au repos. Contour de vorticité ω adimensionnalisée. (A) $N = 90$ rpm, $d_0 / d = 0,25$; $h / d = 0,5$. (B) $N = 110$ rpm, $d_0 / d = 0,25$; $h / d = 0,3$. D'après Weheliye et al. (2013).

Lorsque l'écoulement devient hors-phase, les tores de recirculation sont plaqués contre la paroi du réacteur et un vortex vertical apparaît, dont l'intensité et l'inclinaison verticale

augmentent avec la fréquence d'agitation appliquée. La surface libre devient progressivement tridimensionnelle (Figure III-8B).

Tableau III-11. Caractérisation des régimes de phase pour les conditions opératoires choisies en fioles d'Erlenmeyer. La transition a été déterminée sur la base des relations (III-29) et (III-30).

Condition	1_E	2_E	3_E	4_E	5_E	6_E	7_E	8_E
Fr	1,71	1,71	0,87	1,71	0,87	0,87	1,71	0,87
h (m)	0,006	0,014	0,0197	0,01322	0,014	0,0096	0,0134	0,014
h / d	0,06	0,14	0,197	0,111	0,14	0,12	0,167	0,14
d₀ / d	0,25			0,21	0,25	0,3125		0,25
Re_f	94	241	610	64,7	172	107	387	172
Ph	1,73	2,04	2,34	1,34	1,93	2,21	2,74	1,93
Ecoulement	en-phase							

Pour toutes les conditions opératoires étudiées dans notre travail, le régime d'écoulement en fiole d'Erlenmeyer est « en-phase ».

III.1.2.b. Réacteur mécaniquement agité, STR

Dans le cas de bioréacteurs de type STR, la connaissance des écoulements macroscopiques et régimes de fonctionnement est importante car elle détermine fortement les capacités d'aération du bioréacteur. Il en reste que les mesures expérimentales de champs de vitesses en réacteur agité gaz-liquide restent problématiques du fait de la présence de fortes concentrations en phase gaz qui perturbent les mesures optiques (LDV ou PIV par exemple). Ainsi, souvent, on se limite à une caractérisation macroscopique et, notamment, à

l'identification du régime de fonctionnement. En cuve agitée gaz-liquide trois régimes d'écoulements sont généralement décrits (Paul et al., 2004) :

- Le régime engorgé pour lequel les agitateurs sont engorgés par le gaz. Les transferts de matière sont sensiblement dégradés.
- Le régime de charge pour lequel l'agitateur disperse le gaz dans la partie haute de la cuve
- Le régime de dispersion avec une dispersion homogène du gaz dans le bioréacteur (dont la zone de liquide située sous l'agitateur).

Considérant le nombre d'aération $Na = \frac{Q_G}{ND^3}$ et le nombre de Froude $Fr = \frac{N^2 D}{g}$, les

règles suivantes sont appliquées :

Absence d'interactions entre l'agitation et la phase gaz :

$$Fr < 0,04 \quad (\text{III-34})$$

Engorgement de l'agitateur

$$Na > 30 \cdot Fr \cdot \left(\frac{D}{T}\right)^{3,5} \quad (\text{III-35})$$

Cavités autour des pales des turbines Rushton

$$Na > \approx 0,025 \cdot \left(\frac{D}{T}\right)^{-0,5} \quad (\text{III-36})$$

Tableau III-12. Détermination du régime d'écoulement en STR pour les conditions de culture appliquées.

Condition	1_STR	2_STR	3_STR	4_STR	5_STR
Na	0,0023	0,0023	0,0023	0,0032	0,0193
Fr	0,533	0,533	0,533	0,272	0,068
Régime (sur la base des relations (III-34) à (III-36))	Dispersion partielle, non engorgée				

Pour toutes les conditions opératoires appliquées, le régime d'écoulement en STR est de type « dispersion partielle sans engorgement ».

III.2. Influence de l'agitation et de l'aération en réacteur mécaniquement agité sur la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

Afin d'étudier l'influence de l'environnement hydrodynamique sur la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de sa culture en bioréacteur, les conditions (2_STR) et (5_STR) ont imposées et répétées (voir le Tableau III-2 pour le détail des conditions opératoires de culture). Ces deux conditions imposent un environnement relativement (2_STR) ou peu contraignant (5_STR). Rappelons que du fait de la faible dissipation imposée et donc du faible $k_L a$ pour la seconde condition ($0,13 \text{ kW.m}^{-3}$), un apport d'oxygène pur a été nécessaire pour compenser la baisse de l'OTR.

III.2.1. Impact de l'agitation mécanique sur la croissance microbienne et la morphologie en réacteur mécaniquement agité

Dans un premier temps, l'effet de la modification de la fréquence d'agitation sur les cinétiques de croissance est étudié. Il a été constaté que la concentration en biomasse maximale était sensiblement améliorée par une augmentation de la dissipation volumique moyenne (Figure III-9). Ainsi, cette concentration maximale passe de $3,5 \text{ g.L}^{-1}$ pour $P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ à $6,5 \text{ g.L}^{-1}$ pour $P / V = 5,4 \text{ kW.m}^{-3}$. De plus, l'augmentation de la concentration maximale de biomasse s'accompagne d'une augmentation de la vitesse spécifique de croissance de $0,16$ à $0,27 \text{ h}^{-1}$. Lors de travaux menés précédemment en fioles lisses

d'Erlenmeyer (Mehmood et al, 2010), il avait été montré que la concentration maximale en biomasse était affectée par la valeur du k_{La} . Néanmoins, à des valeurs de k_{La} proches de celles testées ici, des concentrations nettement supérieures, d'environ 12 g.L^{-1} , avaient été obtenues.

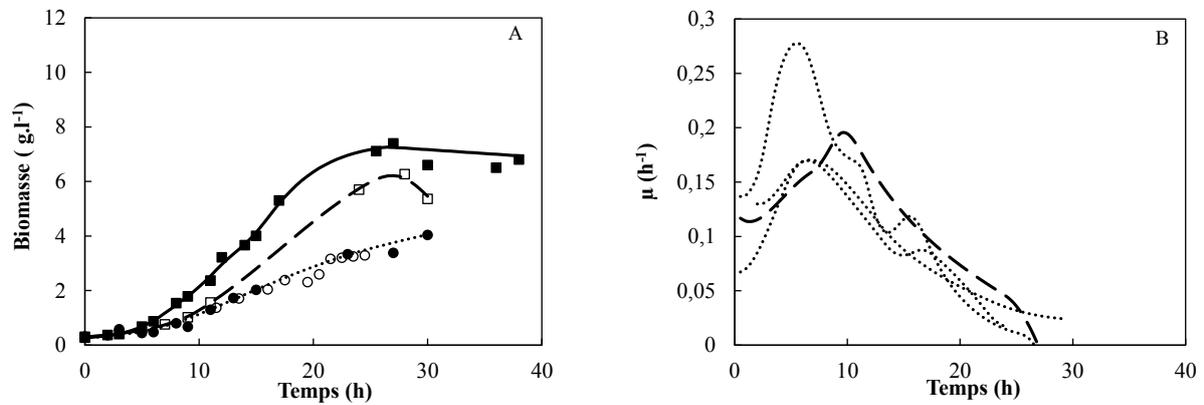


Figure III-9. (A). Cinétiques de concentration de biomasse de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour des dissipations volumiques de $5,4 \text{ kW.m}^{-3}$ (■ et □) et $0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ (○ et ●). (B). Vitesse spécifique de croissance pour des dissipations volumiques de $5,4 \text{ kW.m}^{-3}$ (— et --) et $0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ (⋯).

Comme l'indiquent les photographies de la Figure III-10, la morphologie des pelotes microbiennes est également modifiée par les conditions d'agitation appliquées dans le cadre de cette étude.

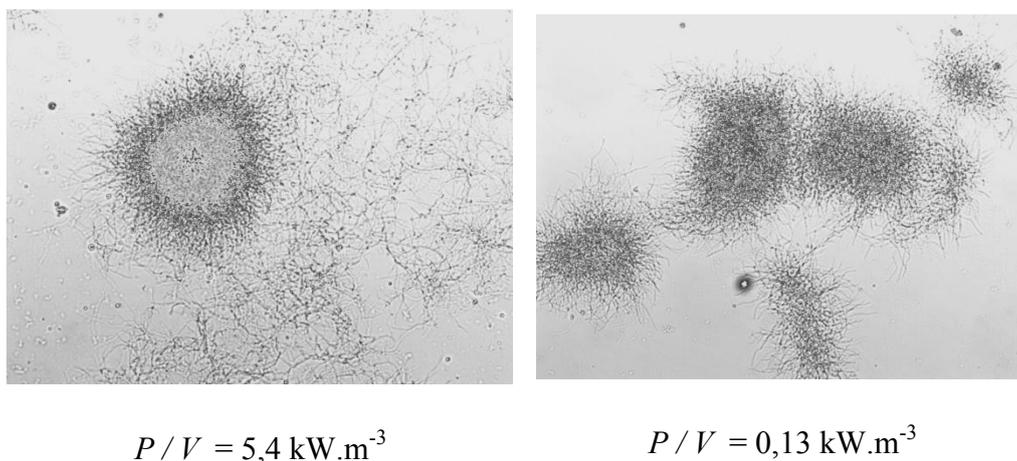


Figure III-10. Morphologie de la bactérie lors de sa culture en bioréacteur mécaniquement agité après 7 h de culture, grossissement x 400.

Ainsi, une augmentation de la vitesse d'agitation entraîne une structure en pelotes avec présence de mycélium libre tandis qu'à faible dissipation volumique on n'observe pas de mycélium libre. La structuration morphologique des microorganismes est connue comme reliée à deux phénomènes issues de l'hydrodynamique et qui rentrent en compétition. D'une part, les contraintes hydromécaniques résultant de la turbulence de la phase liquide conduit à la fragmentation du mycélium, au « rasage » des pelotes et des enchevêtrements, en particulier dans les zones à fortes dissipations turbulentes, dans le voisinage de l'agitateur. Ce phénomène est bien référencé par Amunallah et al. (1999, 2000, 2001, 2002) lors de cultures d'*Aspergillus oryzae*. Ces auteurs ont montré que, pour des bioréacteurs de grands volumes, la seule connaissance de la dissipation moyenne n'était pas suffisante à la prédiction de la morphologie du champignon mais qu'elle devait être complétée par celle du temps de circulation t_c , et donc de la période de passage dans la zone de l'agitateur (voir paragraphe III.4.2).

En second lieu, les structures macroscopiques de l'écoulement générant des gradients de vitesses, les pelotes sont potentiellement soumises à des phénomènes d'agrégation qui modifient à leur tour la structure morphologique (Haj Husein et al, 2013). Un exemple d'agrégation en cours est donné sur la Figure III-11A. Sous faible niveau de turbulence, les phénomènes d'agrégation deviennent dominants par rapport au cisaillement généré sur les pelotes.

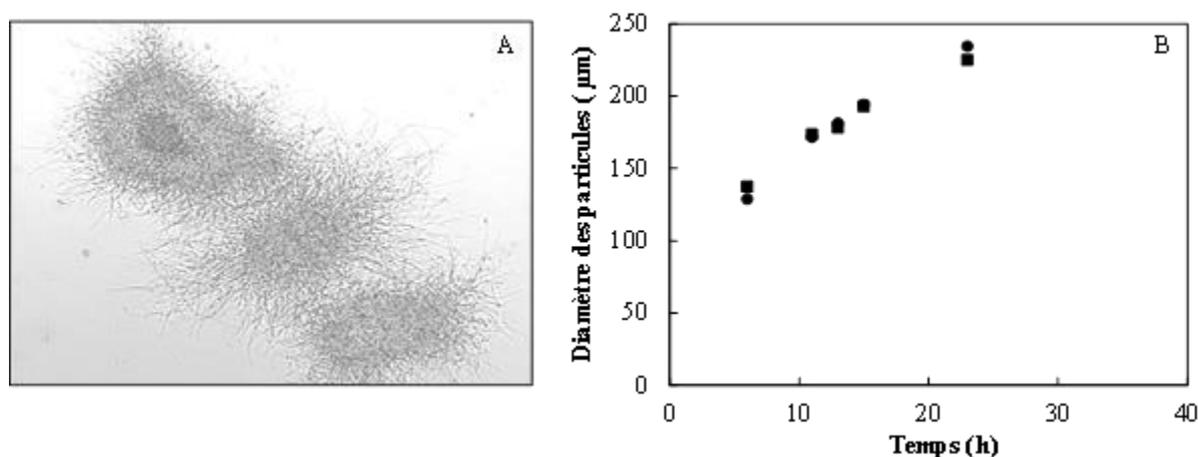


Figure III-11. (A) Agrégation de trois pelotes de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Acquisition par microscopie optique, grossissement x400. (B) Profils de diamètres moyens des pelotes en cours de cinétique pour des dissipations volumiques de $5,4 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ (■) et $0,13 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ (●).

Ainsi, lors de cultures d'*Aspergillus awamori*, il a été observé qu'à 400 rpm, le mycélium libre était la forme de morphologie dominante dans le milieu de culture tandis qu'à 200 et 250 rpm, les pelotes étaient la forme dominante (Cui et al, 1997). Néanmoins, la dissipation volumique moyenne n'a pas d'effet sur la taille moyenne des pelotes, dans la gamme de conditions testées (Figure III-11B) au contraire de ce qui a été noté par Cui et al. (1997) sur des pelotes mycéliennes ou en fioles agitées par Mehmood (2011). De plus, en réacteur mécaniquement agité et pour une dissipation volumique moyenne similaire aux cultures en fioles agitées, les pelotes des *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 cultivées en bioréacteur mécaniquement agité sont environ deux fois plus grosses qu'en fiole agitée (paragraphe 0). Les différences observées peuvent être expliquées par la distribution spatiale de la turbulence et par les différences de macrostructures. Cette question sera plus spécifiquement traitée dans le paragraphe 0.

Il est évident que les différentes structures morphologiques sont à relier aux différences de cinétiques de croissance précédemment observées. Ainsi, les morphologies de type pelote présentent une viabilité globalement dégradée par rapport aux bactéries sous forme de mycéliums libres ou d'enchevêtrements du fait de possibles limitations diffusionnelles des substrats, ce qui expliquerait les performances de croissance amoindries sous faible dissipation volumique.

III.2.2. Impact de l'agitation mécanique sur la production d'antibiotiques en réacteur mécaniquement agité

Quelle que soit la culture, la production des pristinamycines a lieu pendant la phase exponentielle de croissance (entre 9 et 12 h de culture) bien que les pristinamycines soient des métabolites secondaires (Figure III-12). Le déclenchement de la production intervient quasiment au même moment pour les cultures à des P/V supérieures ou égales à $5,4 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$. Un léger décalage est observé pour la culture à $1,6 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$. En revanche, un doublement de la concentration en pristinamycines est mesuré lors du passage de P/V de $0,13$ à $5,4 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$. Ainsi, dans les conditions testées en réacteur mécaniquement agité, la production de pristinamycines est systématique et se déclenche pendant la phase de croissance. Ce n'était pas le cas en fiole d'Erlenmeyer puisqu'une puissance dissipée et un $k_L a$ supérieurs à $4 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ et 150 h^{-1} respectivement étaient nécessaires pour obtenir la production (Mehmood, 2011).

Le rendement de production ($[\text{pristinamycines}] / [\text{biomasse}]_{\text{max}}$) est de 1,5 à 2,5 mg.g^{-1} à 5,4 kW.m^{-3} et est compris entre 0,75 et 1,5 mg.g^{-1} à 0,13 kW.m^{-3} . Ces rendements de production sont similaires à ceux calculés en fioles d'Erlenmeyer sous une dissipation volumique équivalente (environ 1,5 mg.g^{-1}) (Mehmood, 2011).

Ainsi, à l'instar des cultures réalisées en fioles d'Erlenmeyer, l'augmentation de la dissipation volumique semble jouer un rôle positif sur la quantité de pristinamycines produites par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et sur le rendement de production. Peu de données sont disponibles dans la littérature relativement à cette observation. Néanmoins, il semble assez séduisant de relier les performances de production à la morphologie exhibée. Ainsi, Mehmood et al. (2012) a montré que la concentration en pristinamycines était reliée à l'aire interfaciale des pelotes, laissant entrevoir que seules les cellules de périphérie étaient potentiellement capables de produire l'antibiotique. La baisse du rendement de production suggèrerait que les limitations diffusionnelles escomptées dans les pelotes plus denses toucheraient plus sévèrement les cellules vis-à-vis de leurs capacités de production que de leur croissance. L'impact de la morphologie de la bactérie serait donc plus dramatique que les effets directs de l'hydrodynamique, notamment par l'amélioration des capacités d'oxygénation. Ce résultat a été récemment suggéré par Lin et al. (2010) lors de la culture d'*A. niger* sous différentes dissipations volumiques et $k_L a$.

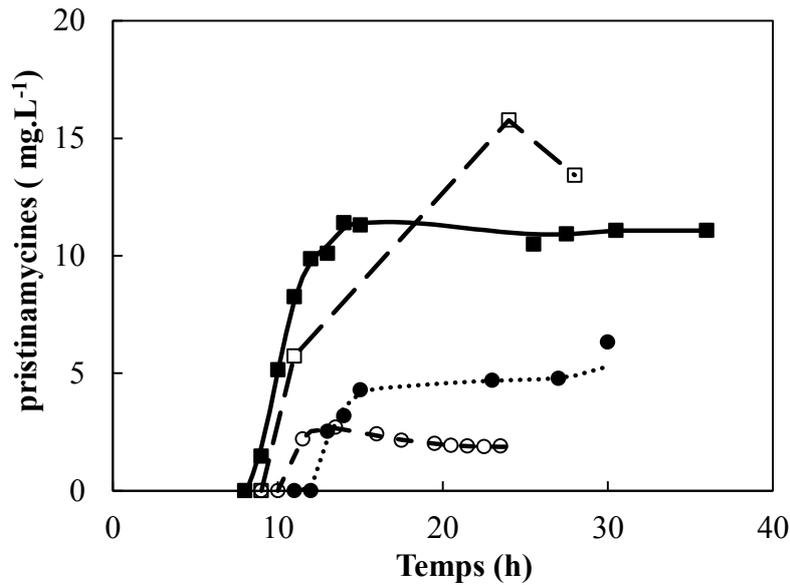


Figure III-12. Cinétiques de production de pristinamycines obtenues avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour des dissolutions volumiques de 5,4 kW.m⁻³ (■ et □) et 0,13 kW.m⁻³ (○ et ●).

III.2.3. Influence de l'agitation mécanique sur la consommation de substrats en réacteur mécaniquement agité

Le suivi cinétique des substrats consommés en cours de culture permet, notamment, de détecter d'éventuelles limitations nutritionnelles pouvant conduire au déclenchement de la production de l'antibiotique. Pour les deux cultures, de façon classique (Corvini et al., 2004), le glutamate est utilisé préférentiellement, à la fois comme source de carbone et d'azote, suivi d'une consommation simultanée de l'arginine et du glucose (voir Figure III-13). Lors du déclenchement de la production, la concentration en glutamate est proche de zéro mais des quantités importantes d'arginine et de glucose sont toujours disponibles. Une discussion spécifique relative à ces observations est proposée dans le chapitre V.

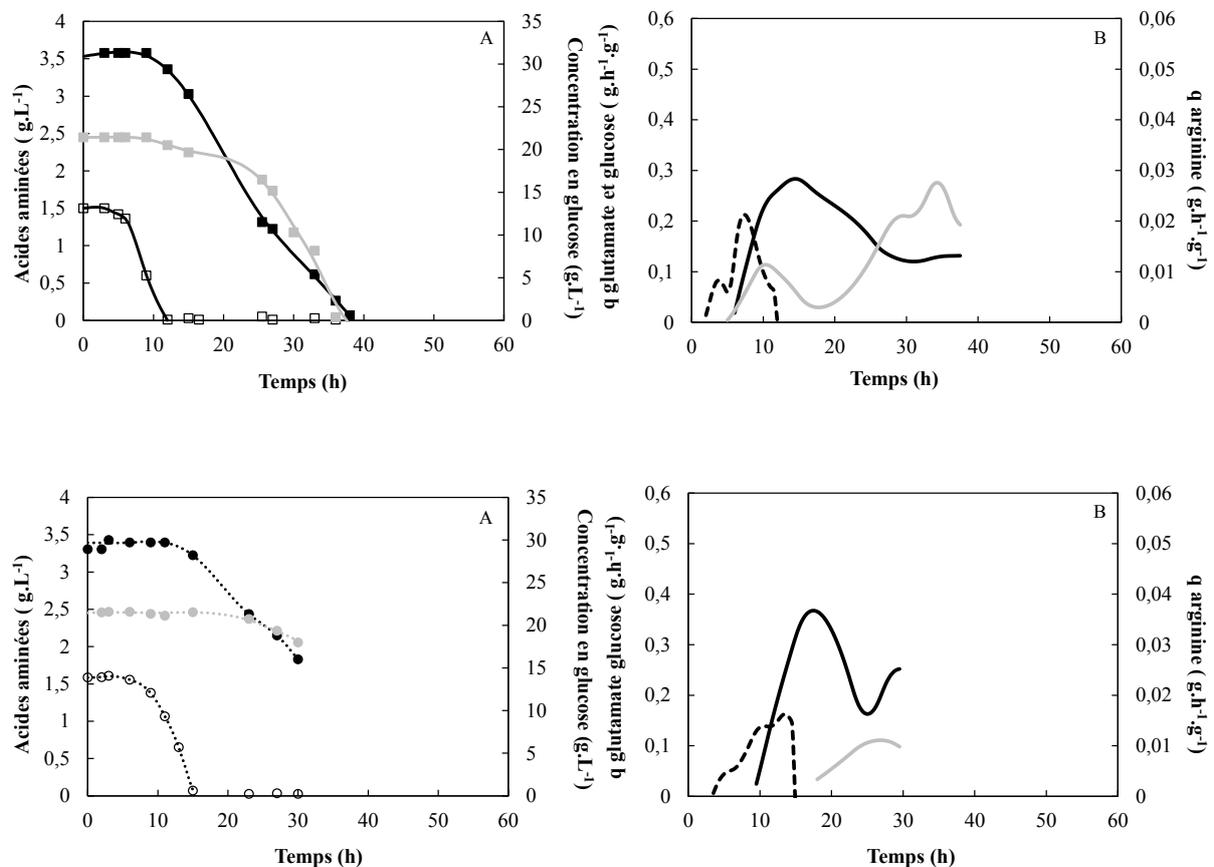


Figure III-13. Cinétiques de consommation en substrats de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour des dissipations volumiques de $5,4 \text{ kW.m}^{-3}$ (■) et $0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ (●). Glucose (■, ●), arginine (■, ●) et glutamate (□, ○). Vitesses spécifiques de consommation de glucose (—), de glutamate (---) et d'arginine (—).

La vitesse spécifique de consommation de glutamate atteint sa valeur maximale au moment du déclenchement de la production ($0,15 \text{ g.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$) pour $P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ tandis que la vitesse spécifique de consommation de glutamate atteint une valeur maximale de $0,2 \text{ g.h}^{-1}.\text{g}^{-1}$ après 8 h de culture et donc avant la production. La déplétion en glutamate entraîne la consommation de l'arginine et du glucose. Ainsi, la consommation de substrats semble activée par une augmentation de la dissipation volumique, ce qui suggère une limitation de l'apport liquide-solide, notamment du glutamate. Ainsi, Siedenberg et al. (1997) ont montré que le taux d'absorption des sources carbonées par *A. awamori* cultivés en fiole agitée était

amélioré par le passage de 200 à 400 rpm, du fait d'une amélioration des capacités de transfert de matière.

III.2.4. Evolution de la concentration en phosphate et en ions ammonium

Les concentrations en phosphate et en ions ammonium sont déterminées pour les deux cultures, afin de détecter d'éventuelles limitations ; ces limitations peuvent être responsables du déclenchement de la production des métabolites secondaires. Par exemple, une limitation en phosphate stimule la production d'agarase par *S. lividans* (Parro et al., 1998). La concentration en ions ammonium peut également affecter la production des métabolites secondaires par leur influence sur la synthèse des enzymes impliquées dans les voies métaboliques primaire et secondaire (Sanchez et al., 2002).

Cependant, pour les deux conditions de culture, même si ces deux substrats sont consommés continuellement pendant la culture, la concentration en phosphate et en ions ammoniums ne semble pas influencer sur la production de pristinamycines. Au moment de la production pour les cultures réalisées en réacteur mécaniquement agité et sous différentes agitations, aucune limitation en phosphate ou en ions ammoniums ne semble être détectée, avec 2,5 mM de phosphate et 4 mM d'ions ammonium résiduels au moment de la production (Figure III-14).

Les concentrations en phosphate et en ions ammonium et donc les vitesses de consommation, restent similaires en cours de culture pour les deux conditions d'agitation, ce qui indique de plus grandes vitesses de consommation spécifiques à plus faible dissipation volumique, au contraire du glutamate.

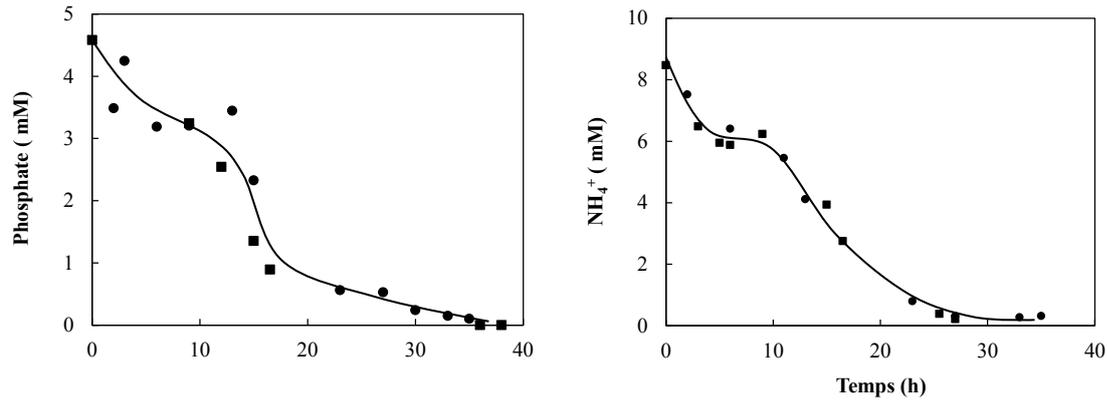


Figure III-14. Cinétiques de consommation de phosphate (A) et des ions ammonium (B) par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour des dissipations volumiques de 5,4 kW.m⁻³ (■) et 0,13 kW.m⁻³ (●).

III.3. Influence de l'agitation mécanique sur le transfert en oxygène en réacteur mécaniquement agité

Une analyse des profils d'oxygène dissous en cours de culture (Figure III-15) montre que la concentration en oxygène dissous reste supérieure à 50 % de la saturation en air tout au long de la culture pour la condition (5,4 kW.m⁻³ ; 99 h⁻¹) tandis que des valeurs proches de 30 % de la saturation en air sont rapidement obtenues pour la condition (0,13 kW.m⁻³ ; 15 h⁻¹), ce qui est attendu compte-tenu des écarts de valeur de k_La entre les deux expériences. Ce phénomène, très référencé dans la littérature, est issu notamment d'un meilleur renouvellement du gaz à l'interface gaz-liquide et à une diminution de l'épaisseur de la couche limite (Gomez-Diaz et al., 2003). On ne citera pas exhaustivement tous les travaux de la littérature décrivant ces observations. Par exemple, Kouda et al. (1997) montrent qu'une agitation de 1200 tr/min est nécessaire pour atteindre des capacités d'oxygénation suffisantes pour assurer la culture d'*Acetobacter xylinum*.

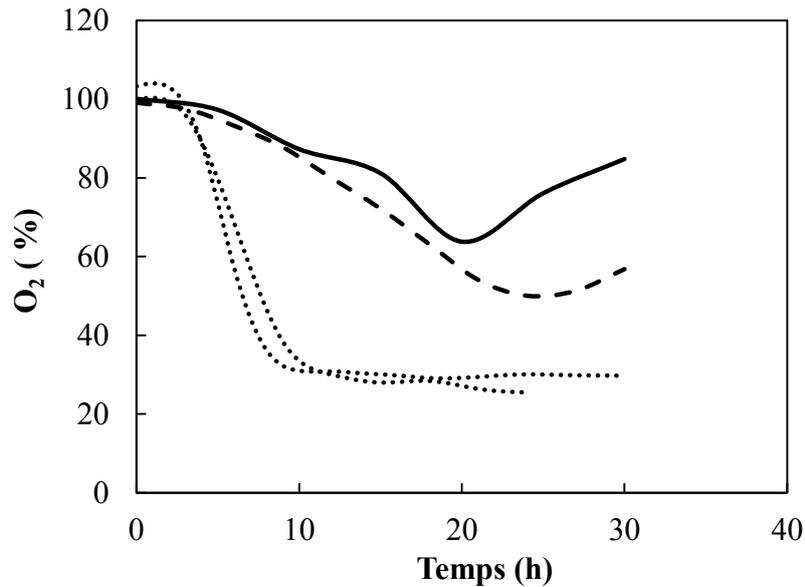


Figure III-15. Profils temporels d'oxygène dissous en cours de cinétique pour des dissipations volumiques de $5,4 \text{ kW.m}^{-3}$ (— et ---) et $0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ (···).

Il a par ailleurs été montré que la concentration en avermectine B_{1a} produite par *Streptomyces avermitilis* augmente respectivement d'un facteur 6 et 9 lorsque la concentration en oxygène dissous est maintenue à 30 et 40 % de la saturation en air pendant la phase exponentielle de croissance comparativement à une culture limitée en oxygène pendant cette même phase exponentielle de croissance (Ki et al., 2006). De la même manière, lorsque la concentration en oxygène dissous a été maintenue à 100 % de la saturation pendant la phase de croissance de *Streptomyces clavuligerus*, un doublement de l'activité spécifique de la β -lactame synthétase, responsable de la synthèse de céphamycine C a été mesuré (Yegneswaran et al., 1991). Ainsi, une concentration en céphamycine C trois fois plus élevée que lors des cultures sans contrôle de concentration en oxygène a pu être obtenue. Vardar et Lilly (1982) ont montré qu'une valeur seuil de 30 % de la saturation en air peut être considérée comme critique pour la production de la pénicilline tandis que Shioya et al. (1999) montre qu'un contrôle de la concentration en oxygène dissous à une valeur 100 % de la saturation en air pendant la phase de croissance et à 5 % de la saturation en air pendant la phase de production conduit à une augmentation de la concentration de virginiamycine par *S. virginiae* par rapport à une culture sans contrôle. Enfin, l'augmentation de la pression partielle d'oxygène conduit à une amélioration de la production de colabomycine par *S. griseoflavus* (Dick et al., 1994). Par

contre, ces mêmes auteurs révèlent aussi que l'augmentation de la pression partielle d'oxygène à 1880 mbar a conduit à une diminution de 50 % de la concentration maximale de biomasse par rapport aux cultures réalisées à une pression partielle de 210 mbar tandis que les vitesses de consommation de mannitol et d'oxygène dissous ont été remarquablement augmentées.

III.4. Validité des critères d'extrapolation de la fiole d'Erlenmeyer au réacteur mécaniquement agité

III.4.1. Réconciliation des données

L'analyse des cinétiques de culture en STR ayant été réalisée précédemment, il semble intéressant d'essayer de comparer les tendances observées aux cinétiques en fioles d'Erlenmeyer. Pour rappel, les résultats majeurs obtenus en fioles d'Erlenmeyer par Mehmood et al. (2011) étaient :

- Une corrélation entre la quantité de biomasse maximale et le coefficient volumique de transfert d'oxygène
- Une corrélation entre la quantité de pristinamycines produite et la dissipation volumique
- Un lien fort entre la taille moyenne des pelotes bactériennes et le rendement de production.

Nous allons donc, dans ce paragraphe, tenter une réconciliation des résultats obtenus dans les deux types de bioréacteurs en se basant sur les prédictions théoriques déclinées intensivement dans le paragraphe III.1. Le Tableau III-13 regroupe les principaux résultats obtenus en fioles d'Erlenmeyer, par respect de critères d'intrapolation de dissipation volumique moyenne, maximale et de coefficient volumique de transfert d'oxygène.

Tableau III-13. Résultats expérimentaux obtenus en fiole d'Erlenmeyer pour des conditions opératoires assurant différents critères d'intrappolation, d'après Mehmood (2011). Les diamètres moyens de pelotes n'ont été déterminés qu'en fioles d'un volume total de 250 mL. En italique sont donnés les résultats en STR.

	1E	2E	3E	4E	5E	6E	7E	8E
X_{max} (g/L)	14,9 <i>7,4</i>	13,4 <i>5,0</i>	9,9 <i>3,5</i>	15,9 <i>7,5 ; 5</i>	12,5 <i>3,5</i>	11,6 <i>7,4</i>	13,6 <i>5,0</i>	9,3 <i>3,5</i>
d_p ¹ (μm)	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	114	101	n.d
[P] (mg/L)	32 <i>11</i>	30 <i>11</i>	0 <i>4</i>	20 <i>11</i>	0 <i>4,0</i>	0 <i>11</i>	16 <i>11</i>	0 <i>4</i>
$Y_{P/X}$ (mg/g) ¹	2,15 <i>1,2</i>	2,23 <i>0,88</i>	0 <i>2,0</i>	1,26 <i>0,92 ; 1,26</i>	0 <i>2,0</i>	1,17 <i>1,2</i>	0 <i>0,88</i>	0 <i>2,0</i>
Critère d'intrappolation	<i>P / V constante</i>			<i>ε_{max} constant</i>		<i>$k_L a$ constant</i>		

¹ calculé après la production (15 h de culture).

Il peut être rapidement constaté que les principaux critères de scale-up / scale-down apparaissent peu à même de reproduire les résultats obtenus en STR. Ainsi, les concentrations en biomasse sont plus faibles en STR qu'en fioles agitées. Concernant la production des pristinamycines, les niveaux de concentration sont dramatiquement plus faibles en STR du fait notamment de la production précoce de celles-ci, phénomène qui n'était pas observé en fioles et qui sera discuté dans le chapitre V. Les rendements de production restent du même ordre de grandeur entre les deux types de bioréacteurs de culture. Pour aller plus loin dans l'analyse des différences observées, il apparaît donc nécessaire de comparer l'ensemble des résultats obtenus.

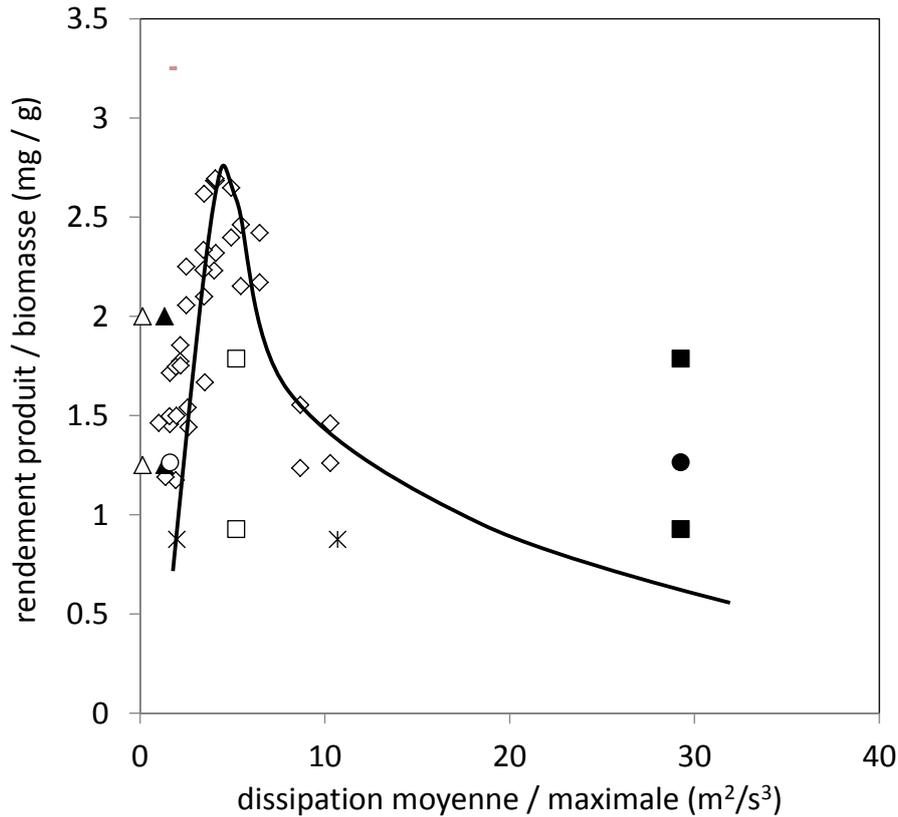


Figure III-16. Variation du rendement P / X (mg/g) en fonction de la dissipation maximale ε_{max} . Comparaison des fioles d'Erlenmeyers et des STR. (\diamond) Fioles d'Erlenmeyer, (\blacksquare) 2_STR ($P / V = 5,4 \text{ kW.m}^{-3}$), (\bullet) 3_STR ($P / V = 3,2 \text{ kW.m}^{-3}$), ($*$) 4_STR ($P / V = 2,0 \text{ kW.m}^{-3}$), (\blacktriangle) 5_STR ($P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$). Les symboles pleins et vides indiquent respectivement les rendements de production déterminés aux valeurs maximales et moyennes de dissipation volumique.

Pour cela, la Figure III-16 fournit le rendement de production de pristinamycines en fonction des dissipations volumiques et maximales calculées précédemment. Dans le cas du STR, le rendement de production / biomasse ne semble pas présenter de tendances significatives aussi bien en représentant celui-ci en fonction de la dissipation volumique moyenne que de la dissipation maximale, au contraire des expériences réalisées en fioles agitées.

De la même manière, la Figure III-17 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** compare les valeurs de concentration en biomasse maximale en fonction du coefficient volumique de transfert d'oxygène. En fioles d'Erlenmeyer, on observe une augmentation sensible de cette concentration avec le k_{La} pour $k_{La} < 75 \text{ h}^{-1}$, puis une augmentation plus douce. Celle-ci est

due à une limitation du transfert d'oxygène limitant de l'apport de l'oxygène à la bactérie. En comparaison, les expériences en STR indiquent une tendance similaire mais celle-ci n'est pas unifiable avec les expériences réalisées en fioles agitées. Il est important de rappeler ici que l'expérience à $P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$ a été rendue possible par une aération à l'oxygène pur.

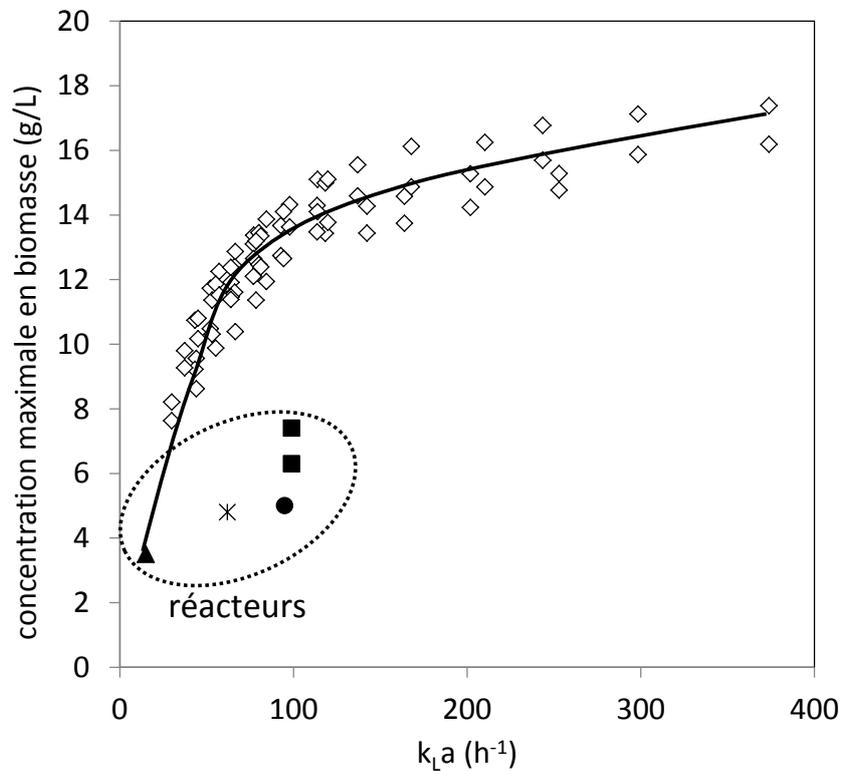


Figure III-17. Variation de la concentration maximale en biomasse en fonction du coefficient volumique de transfert d'oxygène $k_L a$. Comparaison des fioles d'Erlenmeyers et des STR. (◇) Fioles d'Erlenmeyer, (■) 2_STR ($P / V = 5,4 \text{ kW.m}^{-3}$), (●) 3_STR ($P / V = 3,2 \text{ kW.m}^{-3}$), (*) 4_STR ($P / V = 2,0 \text{ kW.m}^{-3}$), (▲) 5_STR ($P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$).

Ainsi, les capacités réelles d'aération sont plus importantes que celles suggérées par le simple coefficient volumique de transfert, comme indiqué par la relation (III-21). De la même manière également, la concentration en oxygène dissous n'est jamais nulle pour les conditions opératoires utilisées (Figure III-15) excluant toute limitation du transfert gaz-liquide. Néanmoins, des conditions d'oxygénation intensifiées permettent l'obtention de concentrations d'oxygène plus élevées, ce qui devrait favoriser le transfert de l'oxygène au sein de la pelote. En effet, en supposant un transfert purement diffusionnel intra-pelote, la

longueur de pénétration de l'oxygène dans la pelote est reliée à la concentration en oxygène dans la phase liquide.

Le maintien des critères classiques d'extrapolation (dissipation volumique, coefficient volumique de transfert d'oxygène, dissipation maximale) ne semble pas permettre de reproduire les performances de culture de la fiole agitée au réacteur mécaniquement agité.

Pour avancer dans l'analyse de ces résultats, il est intéressant de noter ici que, selon l'échelle d'étude considérée, la réaction biochimique de transfert d'oxygène et de consommation pourra soit être considérée comme homogène (sur l'ensemble du bioréacteur), hétérogène (sur un nombre restreint de particules, à la méso-échelle) ou de nouveau homogène dans l'étape de transfert/consommation en intra-pelote (Figure III-18).

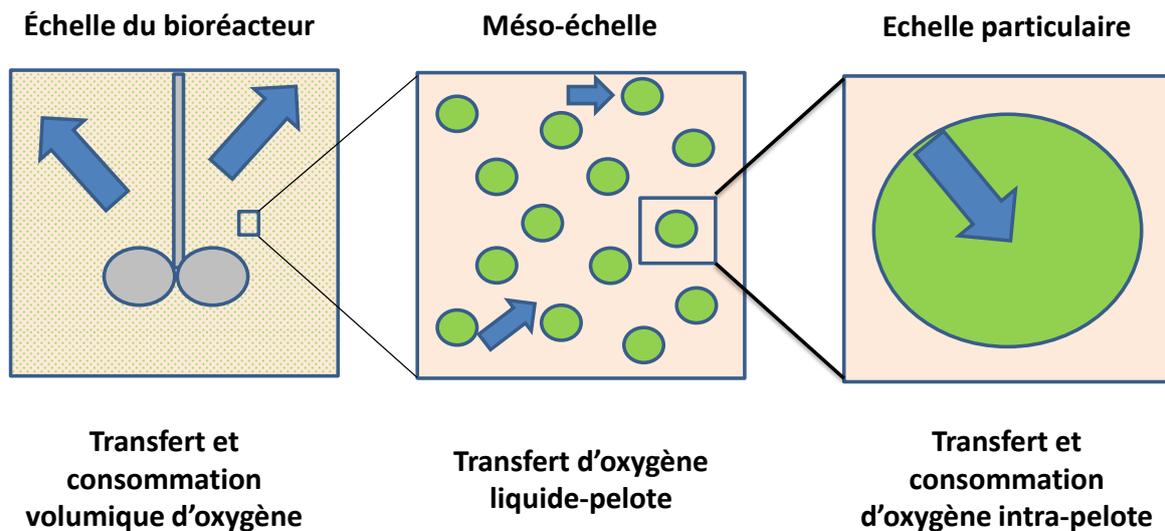


Figure III-18. Représentation des différentes échelles de transfert de matière en bioréacteur.

A l'échelle du bioréacteur, la grandeur influençant la disponibilité en oxygène est l'OTR, c'est-à-dire le coefficient volumique de transfert d'oxygène (turbulence de la phase liquide, taille de bulles) et le type de gaz injecté (via la saturation du gaz apporté).

Dans le cas d'un transfert oxygène-liquide non-limitant et d'un effet de la concentration d'oxygène dissous sur la quantité de biomasse produite, une limitation du transfert liquide-pelote peut être soupçonnée. Dans ce cas, une augmentation de la turbulence devrait favoriser ce transfert via une diminution des épaisseurs de couche-limite autour des pelotes (pour ce cas, garder en mémoire que la turbulence a aussi un impact sur la taille de la pelote). Ainsi, Krull et al. (2010) ont montré, par fixation d'une pelote d'*A. niger* que le passage d'un écoulement caractérisé par un nombre de Reynolds de 0,14 à un Re de 74 suffisait à augmenter la concentration en oxygène dissous à la surface de la pelote de 2 à 7 mg.L⁻¹.

Enfin, dans le cas où les deux précédents transferts seraient non-limitant, seule la concentration en oxygène dissous à l'extérieur de la pelote aurait un effet sur le transfert d'oxygène intra-pelote, pour une taille et une structure de pelote donnée. Ces constatations justifient de reporter la concentration maximale de biomasse en fonction de la concentration en oxygène dissous au temps d'obtention de cette concentration maximale (Figure III-19). Il apparaît que ces deux grandeurs sont bien reliées et que les niveaux d'oxygène dissous sont similaires dans les deux bioréacteurs pour les deux types de culture. Néanmoins, là encore, les tendances respectives observées en STR et en fioles agitées ne s'unifient pas.

Par contre, lorsque la concentration maximale en biomasse est reportée en fonction de l'inverse du diamètre des pelotes (Figure III-20), une unique corrélation unifiant les expériences en fioles agitées et en STR semble obtenue. Ainsi, les plus faibles concentrations en biomasse observées en STR seraient issues de la présence de pelotes sensiblement plus grosses qu'en fioles d'Erlenmeyer, ce qui est cohérent avec l'hypothèse de la seule activité des cellules à la périphérie des pelotes (Haj Husein et al, 2011 ; Mehmood et al., 2012 ; Haj Husein et al, 2013). De la même manière, les seuils plus faibles de production en réacteurs agités seraient, là encore, la conséquence des différences observées au niveau de la taille des structures bactériennes, suggérant que les cellules métaboliquement actives (au sens de la viabilité) seraient également celles qui produisent les pristinamycines.

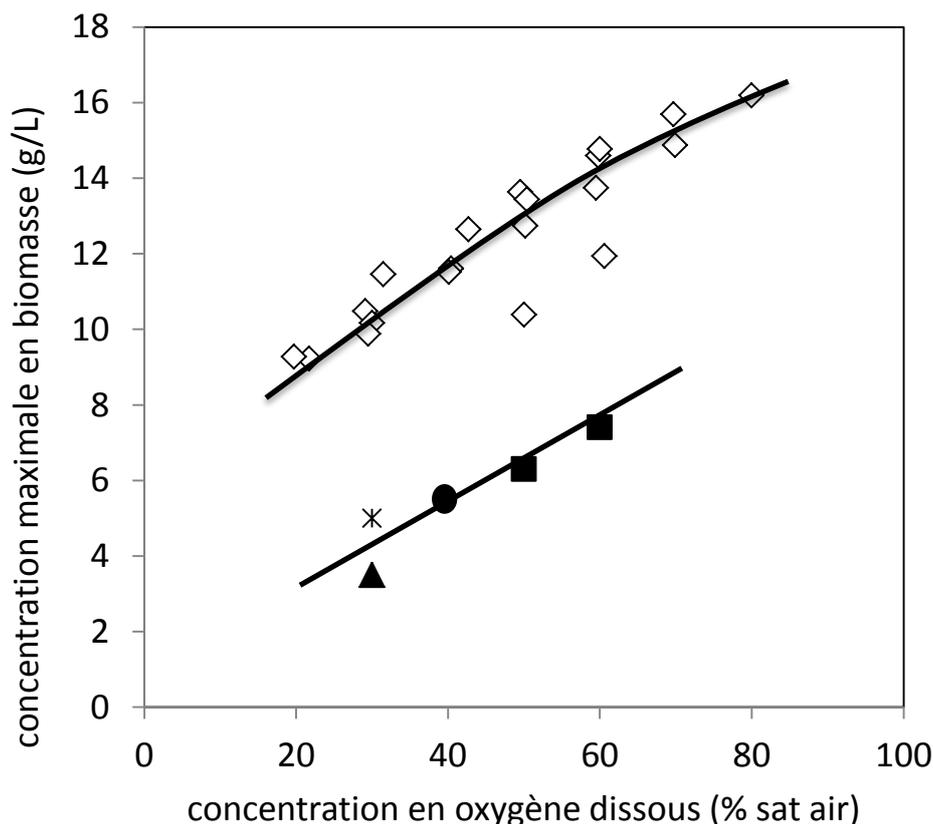


Figure III-19. Evolution de la concentration maximale de biomasse en fonction de la concentration en oxygène dissous au temps d'obtention de cette concentration. (◇) Fioles d'Erlenmeyer, (■) 2_STR ($P / V = 5,4 \text{ kW.m}^{-3}$), (●) 3_STR ($P / V = 3,2 \text{ kW.m}^{-3}$), (*) 4_STR ($P / V = 2,0 \text{ kW.m}^{-3}$), (▲) 5_STR ($P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$).

Peu d'études de la littérature tentent de relier l'ensemble de ces paramètres opératoires (dissipation volumique, $k_L a$, morphologie) à la réponse du procédé (croissance / production) (Wang et al., 2005 ; Liu et al., 2003). Dobson et al. (2008) ont étudié le comportement de *Streptomyces hygroscopicus var. geldanus* lors de sa culture en fiole agitée. La morphologie de la bactérie a été modifiée par modification biochimique du milieu de culture (ajout de tensio-actifs, changement de la viscosité, ajout de billes de verre). Une corrélation linéaire reliant le rendement de production de la geldanamycine / biomasse et le diamètre des pelotes a été clairement mis en évidence.

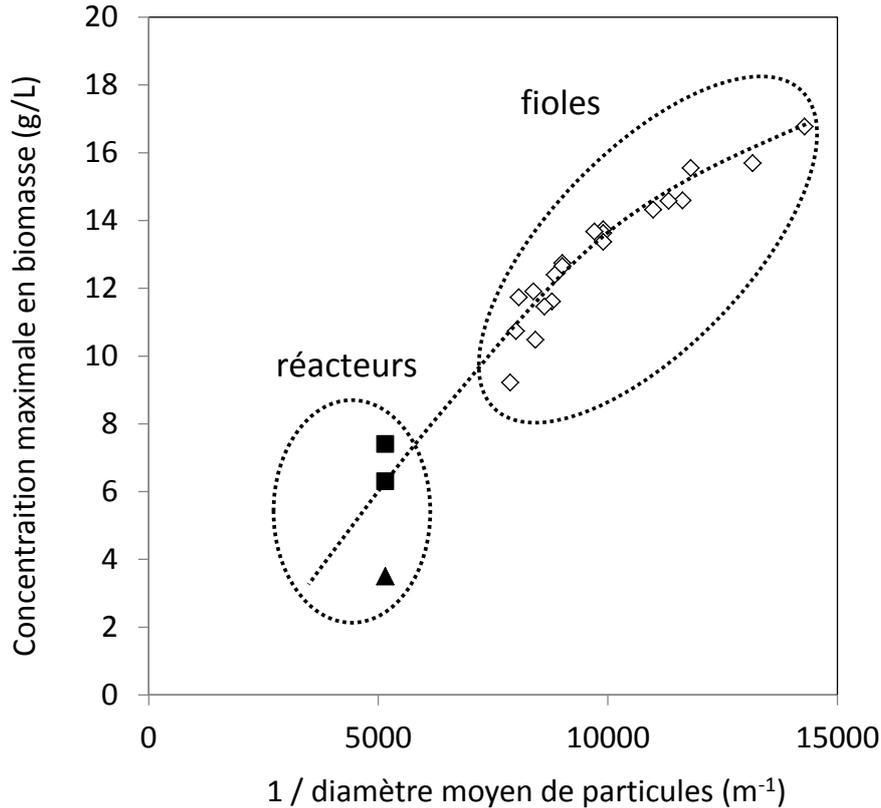


Figure III-20. Variation de la concentration maximale en biomasse en fonction $1 / d_p$. Comparaison des fioles d'Erlenmeyers et des STR. (◇) Fioles d'Erlenmeyer, (■) STR ($P / V = 5,4 \text{ kW.m}^{-3}$), (▲) STR ($P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$).

Gamboa-Suasnavart et al. (2013) ont étudié l'extrapolation d'un procédé de culture de *Streptomyces lividans* de la fiole agitée au STR. Ces auteurs ont montré qu'en utilisant un critère de dissipation volumique, il était possible d'extrapoler la taille des mycéliums, les vitesses spécifiques de croissance ainsi que la qualité de la protéine recombinante produite. Par contre, une différence de 20 % environ a été observée sur la concentration en biomasse ; ces auteurs ont suggéré, de manière peu satisfaisante, des différences de capacités d'aération pour expliquer ce résultat mais sans quantifier celles-ci. Vecht-Lifschitz et al. (1990) ont montré que des conditions d'aération limitantes favorisaient une réduction de la taille des pelotes dans le cas de cultures de *Streptomyces tendae* en bioréacteur ; la morphologie en pelote étant plutôt favorisée par des conditions d'aération suffisantes. Ces auteurs relient ces phénomènes aux variations d'hydrophobie, qui dépendent des niveaux d'oxygène dissous et qui conditionnent la formation des pelotes. Dans une étude similaire, Tamura et al. (1997) ont mis en évidence une formation favorisée de pelotes de *S. fradiae* par une diminution de la fréquence d'agitation en bioréacteur. Cette même étude révèle que cette morphologie est

largement dominante en bioréacteur de type airlift. La problématique de passage des fioles au STR a également été étudiée par Rodriguez et Galindo (1999) mais sur *Beta vulgaris*, une bactérie formant des flocons. Ces auteurs ont montré que lors du passage des fioles gîtées au STR, cette bactérie produisait un polysaccharide extracellulaire qui augmentait sensiblement la viscosité apparente du milieu de culture et réduisait par la même les performances du procédé. Une détérioration des parois cellulaires sous l'effet des contraintes hydrodynamiques générées dans le STR ont été suspectées mais pas clairement démontrées.

Malgré ces résultats, il semble difficile de proposer des lois générales reliant l'environnement hydrodynamique à la réponse cellulaire tant celles-ci semblent dépendantes des microorganismes et des milieux de culture utilisés. Ainsi, El-Enshasy et al. (2006) ont montré pour les cultures d'*Aspergillus niger* en réacteur mécaniquement agité à 200 rpm, une concentration de 30 g.L⁻¹ en biomasse et de 300 µkat.L⁻¹ de glucose oxydase étaient obtenues contre 15 g.L⁻¹ de biomasse et 600 µkat.L⁻¹ de glucose oxydase à 800tr.min⁻¹. La diminution drastique de la quantité de biomasse a été expliquée par une augmentation des contraintes hydromécaniques et en supposant *de facto* une fragilité du microorganisme à celles-ci. On pourrait en réalité l'expliquer aussi par une diminution des temps de contact entre pelotes qui limitent ainsi les phénomènes d'agrégation entre structures mycéliennes. Par contre, à l'instar de ce que nous observons pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, l'obtention de plus petites pelotes promeut une plus grande production du métabolite secondaire.

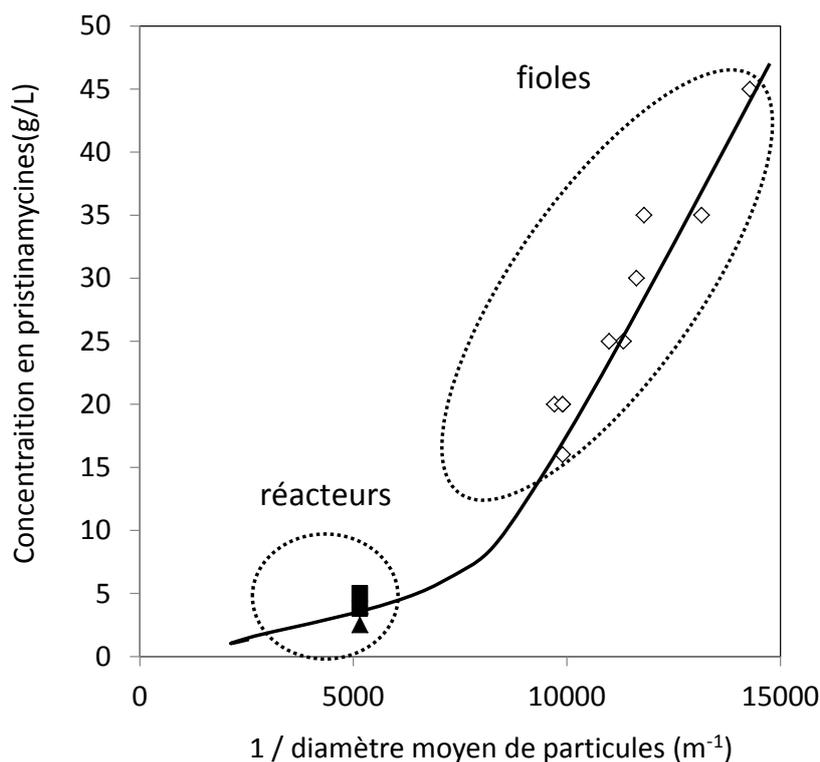


Figure III-21. Variation de la concentration en pristinaamycines en fonction $1 / d_p$. Comparaison des fioles d'Erlenmeyers et des STR. (◇) Fioles d'Erlenmeyer, (■) 2_STR ($P / V = 5,4 \text{ kW.m}^{-3}$) (▲) 5_STR ($P / V = 0,13 \text{ kW.m}^{-3}$).

III.4.2. Discussion

Il apparaît au final assez clair que le contrôle de la morphologie est crucial dans le procédé de production de pristinaamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, aussi bien en fioles agitées qu'en STR. Néanmoins un certain nombre de mécanismes reliant l'hydrodynamique à la morphologie bactérienne restent encore à élucider, même si certains travaux ont tenté d'apporter des réponses partielles. La formation des pelotes est un processus complexe impliquant des considérations biochimiques (taille de l'inoculum, pH, composition du milieu de culture) mais aussi hydrodynamiques (écoulements macroscopiques, turbulence). Ainsi, la construction d'une pelote bactérienne est la résultante des mécanismes de croissance, d'agrégation et de rupture. Pour des paramètres biochimiques donnés, les mécanismes de croissance sont également reliés à l'hydrodynamique du bioréacteur via les transports convecto-diffusifs locaux des substrats au sein du bioréacteur.

L'agrégation des pelotes est un phénomène complexe que l'on peut supposer dépendre de l'intensité maximale d'agitation dans le bioréacteur (Lu et al., 1998). Néanmoins, les contraintes générées par la turbulence sont également susceptibles de « détricoter » ou de

fragmenter les agrégats de pelotes, voire de fragmenter directement les pelotes (Dobson et al., 2005). Rappelons que, dans le cas du STR, le champ de contraintes hydrodynamiques est hétérogène, ce qui a conduit Jüsten et al. (1996) à utiliser la relation III-38 pour tenir compte de la circulation des structures filamenteuses dans le bioréacteur. Sachant que le temps de circulation dans le réacteur t_c est donné par :

$$t_C = \frac{V_L}{N_Q \cdot N \cdot D^3} \quad (\text{III-37})$$

Avec N_Q le nombre adimensionnel de pompage qui ne dépend que de l'agitateur utilisé et que l'on peut donc supposer constant entre les deux conditions de puissance dissipée utilisées (5,4 et 0,13 kW.m⁻³), il vient :

$$\frac{EDC_1}{EDC_2} = \frac{(P/V)_1}{(P/V)_2} \frac{N_1}{N_2} \approx 116 \quad (\text{III-38})$$

Avec EDC la fonction dissipation/circulation qui traduit la notion de fréquence de passage dans les zones énergétiques. Pour ce même rapport d'EDC et des dissipations volumiques similaires, Jüsten et al. (1996) ont observé un passage de la longueur moyenne des hyphes de *Penicillium chrysogenum* de 200 à 150 μM , soit une baisse de 25 %. Cette baisse n'a pas été observée dans notre étude.

Enfin, on peut se poser la question de la validité des mesures expérimentales de diamètre moyen des particules par granulométrie laser. Cette technique, bien adaptée au comptage et à la mesure de particules peut l'être moins dans le cas de mycélium libre. Ce mycélium libre étant peu présent en fioles agitées, les différences observées avec les cultures réalisées en STR seraient en partie expliquées. Rønne et al. (2012) ont utilisé cette technique pour mesurer la taille de pelotes et d'enchevêtrements de *S. coelicolor* et ont montré que cette technique fournit des résultats similaires à l'analyse d'images.

Il est également nécessaire de rappeler ici que les expériences menées en fioles agitées et en STR l'ont été, pour des raisons pratiques, avec des stocks de spores différents.

III.5. Conclusion

La méthodologie développée dans ce chapitre III a permis de caractériser les propriétés de mélange et d'aération de deux bioréacteurs classiquement utilisés en bioprocédés : la fiole d'Erlenmeyer agitée et le bioréacteur mécaniquement agité. Cette caractérisation a été couplée avec l'étude de la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de sa culture en STR sous différents niveaux de puissance dissipée. Nous avons ainsi pu montrer que, même si les critères classiques d'extrapolation permettent de prédire le comportement de la bactérie lors de sa culture dans un design de bioréacteur donné, les bouleversements hydrodynamiques occasionnés par la rupture géométrique entre les deux types de bioréacteurs et leurs conséquences sur la réponse physiologique ne peuvent être décrits par ces mêmes grandeurs.

Ainsi, nous avons montré que l'étape limitante du procédé de production est, à l'instar de ce qui a été précédemment observé en fioles agitées, les transferts de substrats au voisinage et au sein des pelotes. En particulier, nous avons montré qu'en considérant les propriétés locales de transfert (concentration en oxygène dissous, taille des structures bactériennes), il était possible d'unifier la réponse physiologique observée dans les deux bioréacteurs en la reliant, par exemple, à l'aire interfaciale des pelotes.

Pour compléter cette analyse, il est intéressant d'extrapoler ces résultats au cas du réacteur à gazosiphon (ou airlift), classiquement réputé moins « contraignant » sur les microorganismes, en particulier filamenteux. A l'étude cinétique du procédé de production sous différentes conditions d'aération sera avantageusement adjointe une caractérisation de la viabilité cellulaire au sein des pelotes pour confirmer (ou infirmer) l'hypothèse d'activité métabolique des seules cellules périphériques.

**Conception et mise en
œuvre d'un réacteur
gazosiphon pour la
production de
pristinamycines par
*S. pristinaespiralis***

IV. Conception et mise en œuvre d'un réacteur gazosiphon pour la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

Le chapitre précédent a permis d'étudier la validité des critères d'extrapolation classiquement utilisés en procédés microbiens, lors du passage de fioles d'Erlenmeyer à réacteur mécaniquement agité (dissipation volumique, coefficient volumique de transfert d'oxygène) et, in fine, de montrer l'importance des propriétés morphologiques de la bactérie. En parallèle de ces bioréacteurs, d'autres designs peuvent être rencontrés pour la culture industrielle de microorganismes tels que les colonnes à bulles ou les réacteurs à gazosiphon. Les premiers de ces réacteurs sont généralement simplement constitués d'un cylindre muni d'un distributeur de gaz en fond de cuve. L'absence de pièce mécanique tournante permet une bonne robustesse de ces installations. Ils sont ainsi populaires pour leur faible coût de fonctionnement, leurs bonnes capacités de mélange, de transfert de matière et de chaleur. En parallèle de ce premier design, les réacteurs à gazosiphon ou airlift (Figure IV-1) sont munis, en plus, d'une paroi interne (draft) ou d'une jambe externe qui assurent respectivement soit une recirculation interne, soit une recirculation externe. Ils présentent l'avantage de permettre une meilleure structuration de l'écoulement et d'autoriser un régime homogène sur de plus grandes gammes de valeurs de vitesses superficielles de gaz. Une des caractéristiques importantes de ces réacteurs provient du fait que l'agitation n'est assurée que par l'injection de gaz (agitation pneumatique) ce qui, de fait, la rend plus homogène qu'une agitation réalisée par un mobile mécaniquement mis en mouvement.

Les colonnes à bulles et les réacteurs à gazosiphon ont été l'objet de nombreuses études ces dix dernières années, ce qui a permis d'améliorer la connaissance de leur fonctionnement (impact du distributeur de gaz et des vitesses superficielles de gaz sur les vitesses et la turbulence de la phase liquide, le taux de vide global, les transitions de régime, les tailles de bulles et, par voie de conséquence les coefficients volumiques de transfert d'oxygène) et donc leur règles d'extrapolation (Shaikh et Al-Dahhan, 2013).

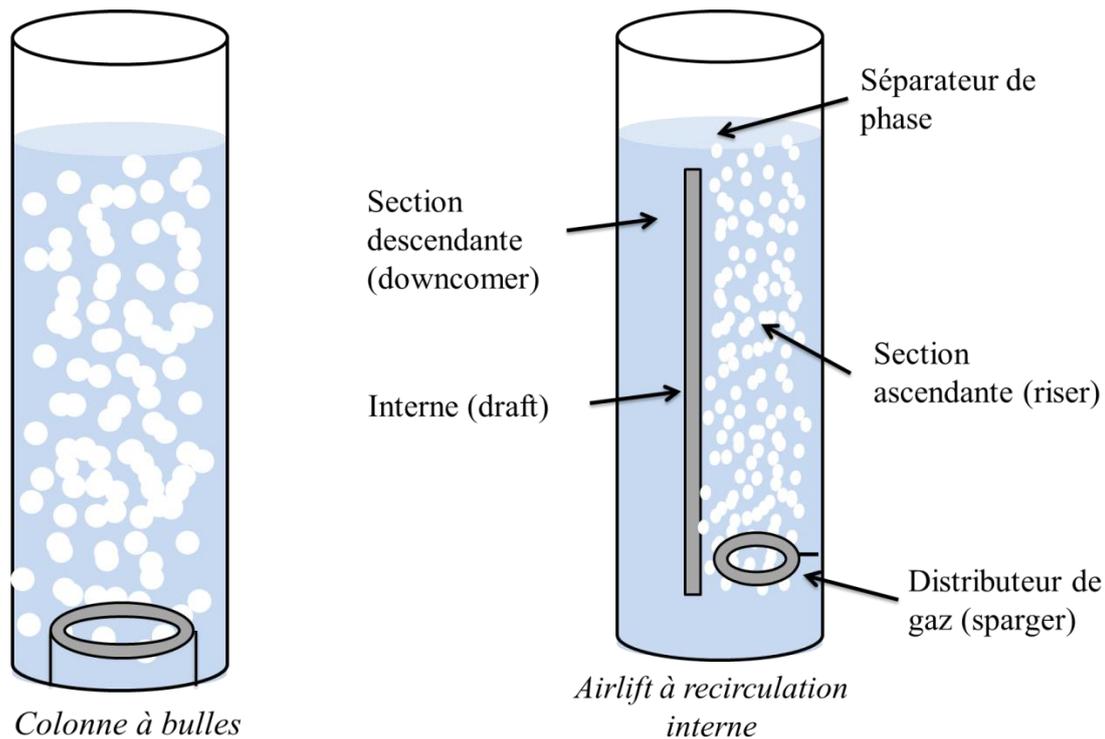


Figure IV-1. Représentation schématique des réacteurs de type colonne à bulles (à gauche) et gazosiphon (à droite).

Sur la base de ces caractéristiques générales, les objectifs de ce chapitre sont multiples :

1. Améliorer l'état de la connaissance quant au couplage hydro-biologique escompté lors du procédé de production de pristinaemycines en réacteur airlift.
2. Caractériser la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis* lors de sa culture dans un environnement hydrodynamique réputé moins contraignant qu'en réacteur mécaniquement agité.

Pour répondre à ces questions, un réacteur airlift a été conçu et fabriqué lors de ces travaux de thèse sur la base des règles générales d'extrapolation appliquées à ces systèmes. Ce réacteur a, dans un premier temps, été caractérisé en termes de coefficients volumiques de transfert d'oxygène et de dissipation volumique moyenne. Dans un second temps, la simulation numérique des écoulements a été appliquée afin d'obtenir une description plus fine des champs d'écoulements et de concentration en oxygène dissous prenant place en son sein (vitesses de liquide et de gaz, coefficients de transfert, taux de dissipation). Enfin, des suivis cinétiques de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 ont été réalisés afin de décrire la

réponse physiologique (croissance, morphologie, productions, consommations) dans ce type de réacteur.

IV.1. Conception du réacteur à gazosiphon

IV.1.1. Choix des conditions opératoires du réacteur et caractérisation globale

Dans le cadre de cette thèse, deux paramètres opératoires ont été étudiés : Le type de sparger (perforé ou poreux) ainsi que le débit volumique de gaz injecté dans la colonne. Les caractéristiques géométriques des spargers ainsi que celles de la colonne ont été données dans le chapitre II. Les coefficients volumiques de transfert d'oxygène ont été déterminés expérimentalement par utilisation de deux sondes à oxygène dissous implémentés dans les parties ascendantes et descendantes du réacteur et par application de la méthode statique (paragraphe II.5). Même si la conception du réacteur à gazosiphon a été réalisée sur la base des recommandations classiques pour ce type de système, la mise en œuvre pratique a rapidement soulevé un certain nombre de contraintes techniques issues de l'utilisation de milieux de culture avec de fortes propriétés surfactantes. Ainsi, lors de l'utilisation du sparger poreux générant des bulles submillimétriques, les phénomènes de moussage très importants sont rapidement apparus, limitant les vitesses superficielles de gaz à des valeurs très faibles. Son remplacement par un sparger perforé a permis de limiter ceux-ci par l'obtention de bulles plus grosses mais sans totalement les éliminer. Les conditions opératoires retenues dans le cadre de notre étude sont donc celles qui sont compatibles avec la réalisation pratique de la culture (milieu de culture, apport suffisant d'oxygène pour la respiration bactérienne). Elles ne sont pas forcément caractéristiques des expériences menées en colonnes à bulles ou airlifts, mais avec des systèmes eau-air. Pour toutes les expériences menées, une consigne minimale d'oxygène dissous de 30 % de la saturation en air a été appliquée. Pour cela, un ajout ponctuel d'oxygène pur a pu s'avérer nécessaire.

La dissipation volumique globale a été déterminée dans un premier temps en supposant une détente adiabatique du gaz au sein de la colonne de liquide (Nienow, 2006) :

$$P/V = \rho_L \cdot U_g \cdot g \quad \text{(IV-1)}$$

Avec g (m.s^{-2}) la constante de gravité et U_g (m.s^{-1}) la vitesse superficielle de gaz injecté. La vitesse superficielle peut être, soit calculée par rapport à la surface de la section ascendante seulement, soit sur l'ensemble du réacteur.

Tandis que, *a priori*, la dissipation volumique ne dépend que de la vitesse superficielle de gaz, le $k_L a$ dépend fortement de la taille de bulle et donc du type de sparger utilisé (Contreras et al., 1999). Ainsi, il est, en théorie, possible de découpler les effets respectifs de la dissipation volumique et des capacités de transfert d'oxygène.

Les conditions opératoires et les valeurs associées de P / V et de $k_L a$ sont données dans le Tableau IV-1. Nos résultats indiquent que l'utilisation de sparger poreux, par la formation de bulles sub-millimétriques permet l'obtention de valeurs de $k_L a$ sensiblement plus élevées (86 h^{-1}) que par utilisation du sparger perforé et ce malgré un débit de gaz sensiblement plus grand (Tableau IV-2).

Tableau IV-1: Valeurs des P / V et des $k_L a$ associées aux cultures réalisées en bioréacteur gazosiphon.

Expérience	Sparger	Débit (L/min)	U_g (m/s)	P / V (W/m ³)	Taux de vide	$k_L a$ (h^{-1}) (Riser/Downcomer)	Forces mécaniques
AL1	Poreux	0,6	$7,7.10^{-4}$	7	+++	86/61	+
AL2	Perforé	6,4	$8,2.10^{-3}$	80	+	18/19	+++

Cette observation a déjà été réalisée par Luo et al. (2011) par comparaison d'un sparger perforé de 2 et 4 trous à une vitesse de gaz de $2,5.10^{-3} \text{ m.s}^{-1}$. Les diamètres respectifs des perforations étaient de 2,6 et 1,8 mm. Le second design a en effet montré un $k_L a$ plus élevé ($7,2 \text{ h}^{-1}$) que pour le premier ($5,4 \text{ h}^{-1}$) du fait de l'obtention de bulles plus petites et donc d'une augmentation de l'aire interfaciale d'échange a . La même observation a été constatée par Peter et al (2004). A noter que, de manière surprenante, une augmentation du débit volumique de gaz peut entraîner une baisse du $k_L a$ due à une baisse du taux de vide global. Merchuk et al. (1998) ont expliqué ce phénomène par une augmentation des phénomènes de coalescence dans le voisinage du distributeur ; ce phénomène a été observé de manière qualitative lors de nos expériences. Néanmoins, d'autres auteurs semblent indiquer des tendances inverses (Bello

et al., 1985 ; Wen, 2005), ce qui confirme les effets primordiaux du distributeur de gaz sur les écoulements générés au sein des réacteurs à agitation pneumatique.

Tableau IV-2. Estimation des tailles de bulles générées au sein de l'écoulement selon le distributeur de gaz utilisé.

Type de distributeur de gaz	poreux	perforé
Taille de bulles d'air (mm)	0,5 - 2	1-10
U_g (m.s ⁻¹)	$7,7.10^{-4}$	$8,2.10^{-3}$

Concernant la **vitesse de circulation du liquide et le temps de mélange**, seuls des essais en eau claire ont pu être réalisés mais sont rapidement apparus peu extrapolables aux conditions réelles de fonctionnement du bioréacteur. Ainsi, nous ne présenterons ici que les tendances qualitatives relevées dans la littérature. Merchurk et al. (1998) ont montré que, dans un réacteur de type airlift, les vitesses de circulation et les temps de mélange sont influencés par la différence de taux de vide entre les parties ascendantes et descendantes. Pour expliquer ce phénomène, ces auteurs ont indiqué que, dans le cas d'un sparger poreux, les bulles plus petites risquent d'être piégées dans la descente de l'airlift, entraînant une diminution du gradient de taux de vide entre les deux sections du bioréacteur et, par voie de conséquence, une diminution des vitesses de circulation et une augmentation du temps de mélange. Par ailleurs, une augmentation de la vitesse superficielle de gaz tend à augmenter le gradient de taux de vide et améliore donc la circulation du liquide dans le réacteur (Kang et al., 2001). A noter que cela peut se faire au détriment de la quantité absolue de bulles présentes dans la section ascendante et donc du k_La . Ces observations montrent l'importance cruciale de la zone de désengagement de gaz sur la circulation du liquide au sein du réacteur, montrant les précautions nécessaires à prendre quant à la généralisation des résultats de la littérature.

La quantification des forces mécaniques générées par chaque système d'aération est difficile à obtenir par la seule voie des mesures expérimentales (une étude complète pourrait y être dédiée) et sera discutée dans le paragraphe IV.1.2. A noter cependant que, selon Contreras et al. (1999), l'utilisation de spargers poreux et de faibles débits de gaz promeuvent des niveaux de taux de cisaillement plus faibles que des spargers perforés et des débits de gaz plus élevés.

En conclusion, nous noterons que l'utilisation du réacteur à gazosiphon a permis de réaliser des cultures bactériennes à des seuils de dissipation volumique largement plus faibles (7 et 80 $W.m^{-3}$) qu'en réacteur mécaniquement agité, pour lesquels les dissipations volumiques globales étaient de l'ordre de 100 $W.m^{-3}$ (chapitre III).

IV.1.2. Simulation numérique des écoulements au sein du réacteur à gazosiphon

IV.1.2.a. Généralités et approches utilisées

La simulation numérique des écoulements basée sur une approche Euler-Euler sera utilisée ici pour simuler les champs de vitesses, de quantités turbulentes (énergie cinétique turbulente et taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente) et de concentration de la phase gaz dans le réacteur à gazosiphon pour deux conditions opératoires. De ces champs simulés, il sera possible de déduire les coefficients volumiques de transfert d'oxygène locaux ainsi que les dissipations volumiques moyennes et maximales.

i. Conservation de la matière et de la quantité de mouvement

Dans le cas de l'approche Euler-Euler, la simulation de l'écoulement de chacune des phases en présence est réalisée par résolution d'un système d'équations de Navier-Stokes spécifique. Les phases sont considérées comme interpénétrantes ce qui implique que chaque maille de calcul est susceptible de contenir une fraction volumique α_i de la phase i . Dans notre cas, seules deux phases, le liquide et le gaz, sont considérées ce qui implique que, en tout point du domaine de calcul :

$$\alpha_l + \alpha_g = 1 \quad (IV-2)$$

Pour chaque phase, le système d'équations de transport de Navier-Stokes consiste en l'écriture de la conservation de la matière et de la quantité de mouvement. En supposant l'absence de transfert entre phases, la conservation de la matière s'écrit :

$$\begin{cases} \frac{D(\alpha_l \rho_l)}{Dt} = 0 \\ \frac{D(\alpha_g \rho_g)}{Dt} = 0 \end{cases} \quad (IV-3)$$

Avec D la fonction dérivée particulière. La conservation de la quantité de mouvement est quant à elle donnée par :

$$\begin{aligned}\frac{D(\alpha_l \rho_l \mathbf{u}_l)}{Dt} &= -\alpha_l \nabla p + \nabla \cdot \boldsymbol{\tau}_l + \alpha_l \rho_l \mathbf{g} + \mathbf{F}_{gl} \\ \frac{D(\alpha_g \rho_g \mathbf{u}_g)}{Dt} &= -\alpha_g \nabla p + \nabla \cdot \boldsymbol{\tau}_g + \alpha_g \rho_g \mathbf{g} + \mathbf{F}_{lg}\end{aligned}\quad (\text{IV-4})$$

- ii. Avec p la pression, $\mathbf{F}_{gl} = -\mathbf{F}_{lg}$ la contribution totale des forces d'interactions entre les phases g et l . Fermeture des équations : Loi de traînée

Les forces d'interactions généralement considérées dans les réacteurs agités pneumatiquement sont la force de traînée, la force de lift, la force de masse virtuelle, la dispersion turbulente de la phase gaz. Le logiciel FLUENT propose une loi générale pour formuler la contribution de la force de traînée seule :

$$\mathbf{F}_D = K_{gl} (\mathbf{u}_g - \mathbf{u}_l) \quad (\text{IV-5})$$

Par définition, $K_{gl} = K_{lg}$. Ce coefficient d'échange est alors donné par :

$$K_{gl} = \frac{3}{4} \cdot \frac{1}{d_b} \cdot \alpha_g \cdot C_D \cdot \rho_l \cdot |\mathbf{u}_g - \mathbf{u}_l| \quad (\text{IV-6})$$

Avec C_D le coefficient de traînée et d_p (m) le diamètre de Sauter des bulles. Le coefficient de traînée n'est généralement pas accessible analytiquement, sauf pour des écoulements à faibles Reynolds. Dans notre cas, nous avons retenu la formulation de Clift, Grace et Weber (1978) :

$$C_D = \max(\min(C_{D,ellipse}, C_{D,cap}), C_{D,sphere}) \quad (\text{IV-7})$$

Avec $C_{D,sphere}$ le coefficient de traînée pour des bulles sphériques :

$$C_{D,sphere} = \begin{cases} 24 / \text{Re}_p & \text{Re}_p < 0,01 \\ \frac{24}{\text{Re}_p} (1 + 0,15 \text{Re}_p^{0,687}) & \text{Re}_p \geq 0,01 \end{cases} \quad (\text{IV-8})$$

Avec le nombre de Reynolds particulière Re_p :

$$\text{Re}_p = \frac{|\mathbf{u}_g - \mathbf{u}_l| \cdot d_p}{\nu_l} \quad (\text{IV-9})$$

$C_{D,ellipse}$ le coefficient de traînée pour des bulles ellipsoïdales :

$$C_{D,sphere} = \frac{4}{3} \frac{g \cdot d_p (\rho_l - \rho_g)}{U_t^2 \rho_l} \quad (\text{IV-10})$$

Avec U_t donnée par :

$$U_t = \frac{\mu_l}{\rho_l \cdot d_p} Mo^{-0,149} (J - 0,857) \quad (\text{IV-11})$$

$$Mo = \frac{\mu_l^4 \cdot g \cdot (\rho_g - \rho_l)}{\rho_l^2 \sigma^3} \quad (\text{IV-12})$$

Et la fonction J fournie par :

$$J = \begin{cases} 0,94 \cdot H^{0,757} & 2 < H \leq 59,3 \\ 3,42 \cdot H^{0,441} & H > 59,3 \end{cases} \quad (\text{IV-13})$$

$$H = \frac{4}{3} \cdot E\ddot{o} \cdot Mo^{-0,149} \left(\frac{\mu_l}{0,0009} \right)^{-0,14} \quad (\text{IV-14})$$

Et le nombre d'Eötvös est donné par :

$$E\ddot{o} = \frac{g \cdot (\rho_l - \rho_g) d_p^2}{\sigma} \quad (\text{IV-15})$$

iii. Terme de fermeture : Force de lift

La seconde force d'interaction qui est généralement retenue pour les écoulements gaz-liquide est la force de lift. Elle traduit le mouvement radial des bulles sous l'effet des gradients de vitesse locaux. Cette force s'écrit :

$$F_L = -C_L \cdot \rho_l \cdot \alpha_g \cdot (\mathbf{u}_g - \mathbf{u}_l) \times (\nabla \times \mathbf{u}_l) \quad (\text{IV-16})$$

La modélisation de cette force, via celle du coefficient de trainée est complexe car dépendante des propriétés de la phase dispersée, notamment de leur diamètres. Ainsi, même si elle a fait l'objet de nombreuses études, aucune formulation générale consensuelle n'est disponible dans la littérature. Elle ne sera donc pas prise en compte dans les simulations numériques.

iv. Terme de fermeture : Force de dispersion turbulente

En écoulement turbulent, il existe une contribution aux interactions gaz-liquide issue du transfert de quantité de mouvement turbulente interphasique. Sa prise en compte revient à écrire :

$$\mathbf{F}_{i,D} = \mathbf{F}_D - K_{gl} \cdot \mathbf{u}_D \quad (\text{IV-17})$$

Avec \mathbf{u}_D la vitesse de drift. Le terme de gauche de la relation précédente est la force de traînée instantanée, \mathbf{F}_D est la force de traînée calculée à partir des vitesses moyennes de liquide (relation (IV-5)) et $K_{gl} \cdot \mathbf{u}_D$ est la force de dispersion turbulente. Dans le cadre de notre étude, nous avons retenu la formulation de Simonin et Violet (1990a) :

$$\mathbf{u}_D = -\mathbf{D}_{gl} \left(\frac{\nabla \alpha_g}{\alpha_g} - \frac{\nabla \alpha_l}{\alpha_l} \right) \quad (\text{IV-18})$$

En utilisant la théorie de Tchen, il est possible de supposer que le tenseur de dispersion gaz-liquide \mathbf{D}_{gl} est assimilable à un scalaire $D_{t,gl} / \sigma_{gl}$ avec $\sigma_{gl} = 0,75$ le nombre de Prandtl de dispersion. La contribution turbulente à la force de traînée s'écrit alors :

$$\mathbf{F}'_D = K_{gl} \frac{D_{t,gl}}{\sigma_{gl}} \left(\frac{\nabla \alpha_g}{\alpha_g} - \frac{\nabla \alpha_l}{\alpha_l} \right) \quad (\text{IV-19})$$

La relation (IV-19) peut être pondérée par une constante de proportionnalité d'ajustement ainsi que par une fonction de limitation, si nécessaire.

i. Modèle de turbulence

La turbulence escomptée dans le bioréacteur a été modélisée à l'aide d'un modèle k-ε à phase dispersée, qui est bien adapté dans le cas d'écoulements à bulles, dans un liquide contenant des fractions volumiques de gaz faibles à modérées. Ce modèle applique un modèle k-ε standard pour la phase liquide avec prise en compte de termes complémentaires pour décrire le transfert turbulent de quantité de mouvement. La description de la turbulence de la phase gaz repose sur la théorie de Tchen. Le tenseur de Reynolds est calculé suivant :

$$\boldsymbol{\tau}'_1 = -\frac{2}{3} (\rho_l \cdot k_l + \mu_{t,l} \cdot \nabla \cdot \mathbf{u}_1) \cdot \mathbf{I} + \mu_{t,l} \cdot (\nabla \mathbf{u}_1 + \nabla \mathbf{u}_1^T) \quad (\text{IV-20})$$

La viscosité turbulente de la phase liquide est donnée par :

$$\mu_{t,l} = 0,09 \cdot \rho_l \cdot \frac{k_l^2}{\varepsilon_l} \quad (\text{IV-21})$$

Les équations de transport de l'énergie cinétique turbulente k et du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ε sont les suivantes :

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} (\alpha_l \cdot \rho_l \cdot k_l) + \nabla \cdot (\alpha_l \cdot \rho_l \cdot \mathbf{u}_l \cdot k_l) = \\ \nabla \cdot \left(\alpha_l \frac{\mu_{t,l}}{\sigma_l} \nabla k_l \right) + \alpha_l \cdot G_{k,l} - \alpha_l \cdot \rho_l \cdot \varepsilon_l + \alpha_l \cdot \rho_l \cdot \Pi_{k_l} \end{aligned} \quad (\text{IV-22})$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial t} (\alpha_l \cdot \rho_l \cdot \varepsilon_l) + \nabla \cdot (\alpha_l \cdot \rho_l \cdot \mathbf{u}_l \cdot \varepsilon_l) = \\ \nabla \cdot \left(\alpha_l \frac{\mu_{t,l}}{\sigma_\varepsilon} \nabla \varepsilon_l \right) + \alpha_l \cdot \frac{\varepsilon_l}{k_l} (1,44 \cdot G_{k,l} - 1,92 \cdot \rho_l \cdot \varepsilon_l) + \alpha_l \cdot \rho_l \cdot \Pi_{\varepsilon_l} \end{aligned} \quad (\text{IV-23})$$

Le terme de production d'énergie cinétique turbulente $G_{k,l}$ est calculé en utilisant l'hypothèse de Boussinesq :

$$\begin{aligned} G_{k,l} = \mu_{t,l} \cdot S^2 \\ S \equiv \sqrt{2 \cdot S_{ij} \cdot S_{ij}} \end{aligned} \quad (\text{IV-24})$$

Les termes d'interaction Π_{k_l} et Π_{ε_l} sont des termes sources modélisant les interactions entre les deux phases. Dans le cas de notre étude, le modèle de Simonin et Viollet (1990b) a été utilisé ; le détail de l'expression de ces deux termes d'interaction peut être consulté dans leurs travaux.

Les équations de transport précédentes ne sont résolues que pour la phase liquide. La turbulence de la phase gazeuse est rendue par le calcul de temps et de longueurs caractéristiques de l'écoulement utilisée pour, notamment, le calcul de coefficients de dispersion. Là encore, plus d'informations peuvent être consultés dans les travaux de Simonin et Viollet (1990b) et dans le guide théorique d'ANSYS Fluent (2012).

ii. Transport de l'aire interfaciale

Les écoulements à bulles sont sujets à des phénomènes de coalescence et de rupture qui peuvent modifier très sensiblement la taille des bulles moyenne dans le bioréacteur mais également la répartition en probabilité de leur taille. Or, la connaissance de leur taille est nécessaire pour estimer précisément les aires interfaciales locales et donc les capacités de transfert de matière du réacteur. Par ailleurs, un changement de diamètre de bulles peut modifier sensiblement la force de traînée interphasique et donc les vitesses des deux phases. Le calcul du diamètre local et / ou de la répartition en tailles peut être abordé selon plusieurs approches :

- Résolution d'une équation additionnelle de transport pour le calcul d'une grandeur caractéristique de la phase gazeuse. Pour cela, il est possible d'appliquer des modèles de coalescence et de rupture afin de calculer un diamètre moyen de bulles ou une aire interfaciale locale. Alors, la distribution peut être décrite en termes de classes de taille (Olmos et al., 2001) ou de moments de la distribution (Sanyal et al., 2005). Cette approche présente l'avantage d'être moins lourde en termes de temps de simulations mais ne décrit les effets de la distribution de tailles sur les transferts de quantité de mouvement et de matière que par une unique grandeur (diamètre de Sauter, aire interfaciale moyenne).
- Approche Eulérienne à plusieurs phases gazeuses. A l'instar de la précédente, celle-ci recalcule les caractéristiques locales de la distribution. Par contre, un système d'équations de Navier-Stokes est résolu pour chaque classe de bulles ou au moins pour un nombre représentatif de classes (Olmos et al., 2003). Cette approche, plus lourde en temps calcul est préférable en cas de distributions de tailles large ou de bimodalité (tandis que les petites bulles participent au transfert de matière, les grosses bulles participent au transfert de quantité de mouvement).

Dans le cadre de notre étude, les effets de tension de surface semblent promouvoir une distribution de taille étroite, les bulles étant peu soumises aux phénomènes de coalescence et de rupture. Ainsi, nous avons choisi une approche par une résolution d'une unique équation de transport additionnelle de l'aire interfaciale locale. Cette approche présente également l'avantage d'être intégrée dans le logiciel FLUENT et d'être bien adaptée aux écoulements à bulles. La forme générale de l'équation est la suivante :

$$\frac{\partial(a_b)}{\partial t} + \nabla \cdot (\mathbf{u}_g \cdot a_b) = S_C + S_R \quad (\text{IV-25})$$

Avec $a_b(\text{m}^{-1})$ l'aire interfaciale moyenne locale, $S_C, S_R (\text{m}^{-1} \cdot \text{s}^{-1})$ sont les termes sources d'aire interfaciale issus respectivement de la coalescence aléatoire issue de la turbulence et de la rupture des bulles sous l'effet des tourbillons turbulents. Ces termes sources sont donnés par Hibiki et Ishii (2000).

Le terme de coalescence des bulles s'écrit comme le produit de la fréquence de collision entre les bulles, l'efficacité de la collision vis-à-vis de la coalescence et le nombre de bulles par unité de volume.

$$S_C = \left(\frac{\alpha_g}{a_b} \right)^2 \cdot \frac{\Gamma_c \cdot \alpha_g^2 \cdot \varepsilon^{1/3}}{d_b^{11/3} (\alpha_{g,\max} - \alpha_g)} \cdot \exp \left[-K_c \left(\frac{d_b^5 \cdot \rho_l^3 \cdot \varepsilon^2}{\sigma^3} \right)^{1/6} \right] \quad (\text{IV-26})$$

Avec $\Gamma_c = 0,188$, $\alpha_{g,\max}$ le taux de vide maximal modélisé et $K_c = 0,129$.

Le terme de rupture des bulles s'écrit comme le produit entre la fréquence de collisions entre les bulles et les tourbillons turbulents, l'efficacité de la collision et le nombre de structures turbulentes par unité de volume.

$$S_R = \left(\frac{\alpha_g}{a_b} \right)^2 \cdot \frac{\Gamma_B \cdot (1 - \alpha_g) \cdot \varepsilon^{1/3}}{d_b^{11/3} (\alpha_{g,\max} - \alpha_g)} \cdot \exp \left[-K_B \frac{\sigma}{\rho_l \cdot d_b^{5/3} \cdot \varepsilon^{2/3}} \right] \quad (\text{IV-27})$$

Avec $\Gamma_B = 0,264$, $K_B = 1,37$.

Le diamètre de Sauter local est alors donné à partir de l'aire interfaciale locale par :

$$d_b = \psi \cdot \frac{\alpha_g}{a_b} \quad (\text{IV-28})$$

ψ est un coefficient intégrant la forme de la bulle. Dans ce modèle, les bulles sont supposées sphériques ($\psi = 6$), ce qui est une hypothèse raisonnable, le facteur de forme ayant peu d'influence sur l'aire interfaciale (Talvy et al., 2008).

iii. Transfert d'oxygène.

A partir du champ de vitesses et de grandeurs de la turbulence, il est possible de déduire d'autres variables confrontables à des données obtenues expérimentales. La plus intéressante d'entre elles est le coefficient volumique de transfert d'oxygène $k_L a$, qui est une grandeur généralement obtenue expérimentalement et à l'échelle du réacteur. L'estimation du coefficient de transfert de matière côté liquide repose généralement sur des théories de transfert de matière.

La première d'entre elles est celle de Dankwerts (1951), affinée par Lamont et Scott (1970). Cette théorie repose sur l'hypothèse que le coefficient k_L s'écrit comme le produit de la diffusivité moléculaire de l'oxygène D_{iff} et du taux de renouvellement de la surface de transfert gaz-liquide s :

$$k_L = \sqrt{D_{iff} s} \quad (\text{IV-29})$$

En supposant que seules les plus petites échelles de la turbulence sont impliquées dans le transfert gaz-liquide, le taux de renouvellement s peut être estimé à partir de la théorie de Kolmogorov de la turbulence.

$$k_L = K_{kL} \cdot \pi \cdot D_{iff}^{1/2} \left(\frac{\varepsilon_l}{\nu_l} \right)^{1/4} \quad (\text{IV-30})$$

La précision de celle-ci a été évaluée par Wang et Wang (2007) en bioréacteur de type colonne à bulles. Ces auteurs ont proposé une constante $K_{kL} = 0,27$ tandis que Kawase et al. (1992) et Linek et al. (2004) ont respectivement proposé 0,301 et 0,523. Hormis la détermination de cette constante, la principale difficulté d'utilisation de la relation (IV-30) réside dans la détermination précise du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente locale. Pour pallier ces imprécisions, une seconde formulation, basée sur la théorie de pénétration de Higbie (1935) peut être proposée pour k_L :

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_{iff}}{\pi \cdot \tau_e}} \quad (\text{IV-31})$$

Avec τ_e (s) le temps d'exposition de l'interface gaz-liquide au transfert de matière que l'on peut supposer relié à la vitesse de glissement de la bulle (hypothèse de mouvement piston pour les bulles)

$$k_L = K_{kL2} \cdot \sqrt{\frac{D_{diff} \cdot u_{gl}}{d_b}} \quad (\text{IV-32})$$

Avec u_{gl} la vitesse relative entre les phases liquide et gazeuse.

Wang et Wang (2007) ont proposé une constante $K_{kL2} = 1,13$; Bannari et al. (2012) ont utilisé avec succès la relation (IV-32) pour estimer les concentrations en oxygène dissous lors de cultures de *Trichoderma reesei* en réacteur airlift.

L'aire interfaciale locale est reliée à la fraction volumique de gaz selon :

$$a = \frac{6 \cdot \alpha_g}{d_b} \quad (\text{IV-33})$$

Le produit des relations (IV-32) et (IV-33) fournit le coefficient volumique de transfert $k_L a$:

$$k_L a = 6,78 \cdot \frac{\alpha_g}{d_b} \sqrt{\frac{D_{diff} \cdot u_{gl}}{d_b}} \quad (\text{IV-34})$$

Talvy et al. (2007) ont proposé une relation similaire mais qui tient compte explicitement de la fraction volumique de liquide :

$$k_L a = 6 \cdot \frac{\alpha_g}{d_b} \sqrt{\frac{D_{diff} \cdot u_{gl}}{d_b}} \quad (\text{IV-35})$$

Le calcul de la concentration en oxygène dans l'airlift est réalisé par résolution d'une équation de transport par espèce transportée. Les espèces transportées considérées dans le cadre de notre étude sont l'eau, l'oxygène et l'azote. Chaque espèce est susceptible de se trouver en phase liquide ou gazeuse sous condition d'existence d'un terme de transfert gaz-liquide ou liquide-gaz.

$$\frac{\partial(\alpha_k^i \cdot c_k^i)}{\partial t} + \nabla \cdot (\alpha_k^i \cdot c_k^i \cdot \mathbf{u}_k) = -\nabla \cdot \left(\alpha_k^i \left(\mathbf{J}_k^i + \overline{c_k^i \mathbf{v}'_k} \right) \right) + \mathbf{L}^{i_1(k) \rightarrow i_2(j)} - r_{O_2}''' \quad (\text{IV-36})$$

Dans l'équation précédente, l'exposant i indique que la quantité de la phase k (liquide ou gaz) se rapporte à l'espèce 1 (eau liquide), 2 (azote), 3 (oxygène gazeux) ou 4 (oxygène dissous).

c_k^i est la concentration massique de l'espèce i dans la phase k , α_k^i est la fraction volumique de l'espèce i dans la phase k . Les termes \mathbf{J}_k^i et $\overline{c_k^i \mathbf{v}'_k}$ sont respectivement la diffusion

moléculaire et turbulente de l'espèce i dans la phase k . Enfin, $\mathbf{L}^{i_1(k) \rightarrow i_2(j)}$ ($\text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$) est le transfert de l'espèce i_1 appartenant à la phase k vers l'espèce i_2 appartenant à la phase j .

Nous ne considérerons que le transfert d'oxygène de la phase gazeuse (O_2 gazeux) vers la phase liquide (O_2 dissous) et négligerons le transfert d'eau de la phase liquide vers la phase gazeuse. Ainsi, le transfert de matière peut s'écrire :

$$\mathbf{L}^{\text{O}_2(\text{g}) \rightarrow \text{O}_2, \text{dissous}(\text{l})} = k_L a \cdot ([\text{O}_2]^* - [\text{O}_2]) \quad (\text{IV-37})$$

La notation $c_i^{\text{O}_2, \text{diss}}$ est simplifiée ici en $[\text{O}_2]$. La saturation en oxygène dissous $[\text{O}_2]^*$ est choisie égale à $0,008 \text{ kg.m}^{-3}$.

Comme indiqué dans la relation précédente, le terme de transfert gaz-liquide inclut ici un terme de consommation volumique d'oxygène r''_{O_2} issu de la respiration bactérienne. Sa modélisation est, en théorie, particulièrement complexe car nécessiterait la mise en œuvre d'un modèle cinétique complet ; ce modèle n'est pas encore disponible pour *S. pristinaespiralis*. Ainsi, nous avons décidé de réaliser la simulation numérique en «worst case» pour le transfert d'oxygène, en considérant une consommation volumique maximale d'oxygène par la bactérie. Sur la base des travaux de Mehmood et al. (2012), cette vitesse de consommation a été supposée égale à $8,9 \times 10^{-5} \text{ kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$.

IV.1.2.b. Paramètres numériques appliqués

i. Définition du domaine de calcul

Les propriétés physico-chimiques des phases en présence sont celles de l'eau à 28°C . La tension de surface est de 50 mN/m . Les conditions aux limites de ce domaine de calcul sont les suivantes :

- Conditions de dégazage pour la surface libre définie par une condition de contraintes nulles pour la phase liquide et de sortie pour la phase gazeuse.
- Conditions de non-glissement pour les deux phases au niveau des parois du bioréacteur (parois externes, draft, fond)
- Entrée de vitesse à la surface des distributeurs de gaz. La vitesse de gaz est imposée de telle sorte à ce que le débit de gaz en sortie du bioréacteur soit celui appliqué lors des expériences réelles.

Tableau IV-3. Conditions appliquées à l'entrée de gaz. L'aire interfaciale est informée dans le cas de la résolution de l'équation de transport de l'aire interfaciale.

Distributeur	Débit volumique de gaz (L/min)	Vitesse (mm.s ⁻¹)	Diamètre de bulles (mm)	Fraction volumique de gaz	Aire interfaciale (m ⁻¹)
Poreux	0,6	0,397	1	1	6000
Perforé	6,4	4,23	5	1	1200

ii. Maillages

Le maillage de l'airlift, réalisé sous ANSYS Gambit 2.4.6, a, dans un premier temps, été constitué de 963 000 cellules de calcul tétraédriques formant un ensemble conforme et non-structuré. Des fonctions de taille de maille ont été appliquées afin d'affiner le maillage dans la zone de distribution de gaz, qui est susceptible d'accueillir les plus forts gradients de vitesse. Celui-ci a ensuite été converti en un maillage constitué de 78 800 cellules polyédriques, permettant une nette réduction du nombre de cellules de calcul (et donc un gain très sensible de temps de calcul) et une amélioration de la convergence du calcul par la meilleure qualité de la géométrie des mailles. Deux représentations du maillage ainsi obtenu sont données sur la Figure IV-2. Un maillage comportant deux fois plus de cellules polyédriques a également été utilisé pour vérifier l'indépendance de la grille sur les résultats de la simulation numérique.

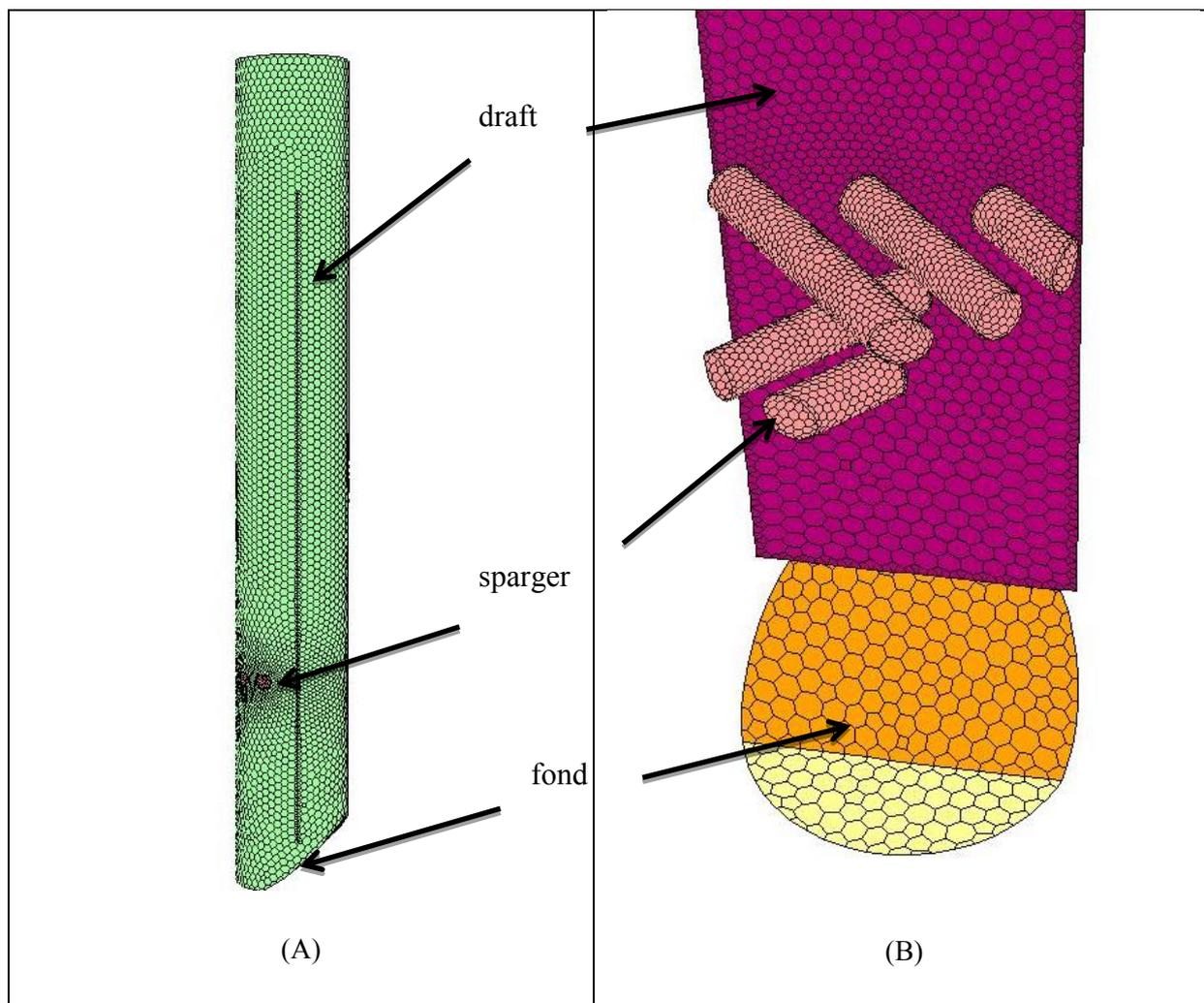


Figure IV-2. Représentation des maillages polyédriques utilisés pour la simulation numérique des écoulements. (A) Vue générale du système, (B) Zoom sur la zone de distribution du gaz.

iii. Méthodes de résolution

Les équations de transport de l'approche Euler-Euler en écoulement turbulent ont été résolues à l'aide du logiciel ANSYS Fluent 14.5 sur un processeur Intel Core i3 2,3 GHz et équipé de 4 Go de RAM. Le couplage pression-vitesse est résolu par un algorithme SIMPLE. Les équations de transport de la quantité de mouvement, de l'énergie cinétique turbulente et du taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente sont discrétisées par un schéma UPWIND du second ordre. Les paramètres de sous-relaxation pour la pression, la masse volumique, les forces volumiques, la quantité de mouvement et la fraction volumique sont respectivement de 0,2, 1, 1, 0,3 et 0,4. L'écoulement est résolu en régime transitoire selon un pas de temps fixe $\Delta t = 1$ ms.

IV.2. Résultats : Ecoulements et caractéristiques hydrodynamiques

Les principaux résultats de la simulation numérique sont présentés ici. En l'absence de données de validation précise, nous commenterons que qualitativement ces résultats.

IV.2.1. Caractéristiques de la phase liquide

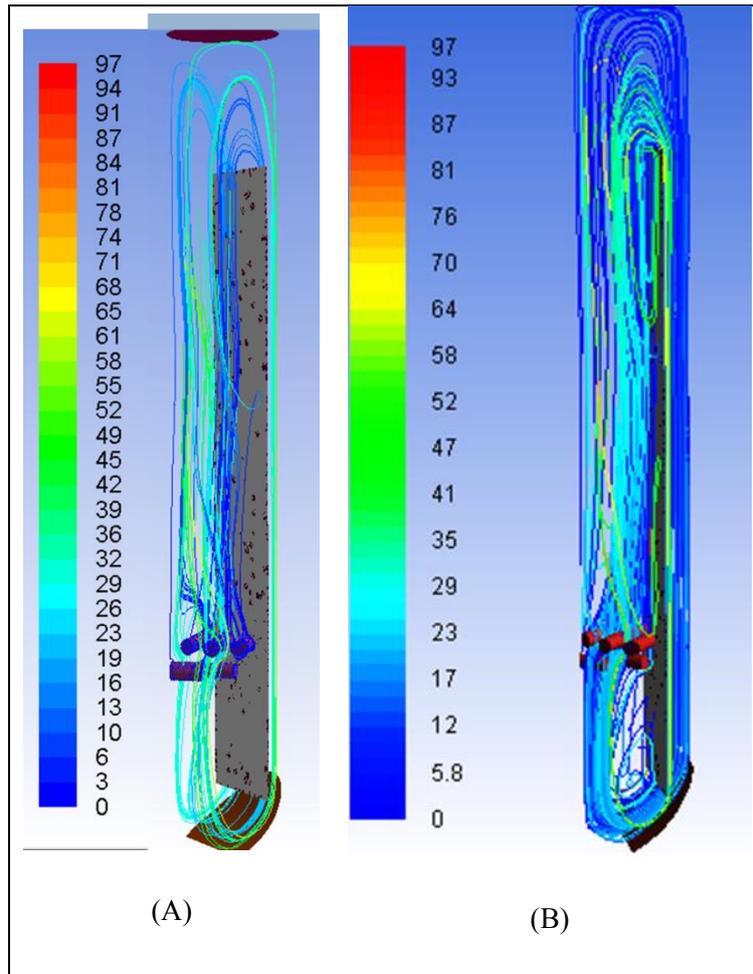


Figure IV-3. Lignes de courant simulées au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6$ L.min⁻¹, (B) $Q_g = 6,4$ L.min⁻¹.

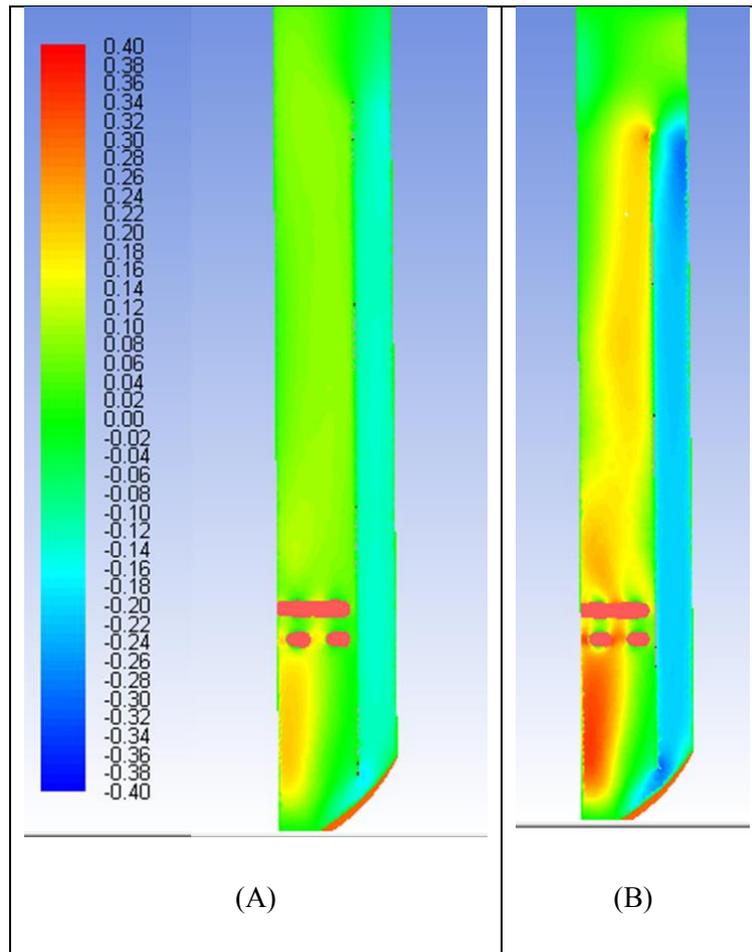


Figure IV-4. Champs de vitesses ($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$) de la phase liquide au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Les champs de la norme de la vitesse de liquide, donnés sur la Figure IV-4, indiquent des différences de structures assez sensibles. Pour le distributeur de gaz poreux (Figure IV-4A), l'écoulement ne présente pas de structures transitoires et le profil de vitesse, radialement plat, est caractéristique du régime homogène. Dans le cas du sparger perforé (Figure IV-4B), l'écoulement de la phase liquide présente, dans la section ascendante, des structures transitoires oscillantes, caractéristiques d'un régime de transition ou hétérogène. Les vitesses de liquide obtenues sont sensiblement plus élevées (environ $0,25 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ dans la section ascendante) que pour le distributeur poreux (moins de $0,1 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$). Cette différence s'explique facilement par les effets conjoints de l'augmentation de la taille de bulles, qui favorise des vitesses de gaz plus grandes, et par l'augmentation du débit de gaz.

Pour les deux distributeurs, on notera une accélération du liquide dans le voisinage du distributeur issue du rétrécissement en fond de colonne.

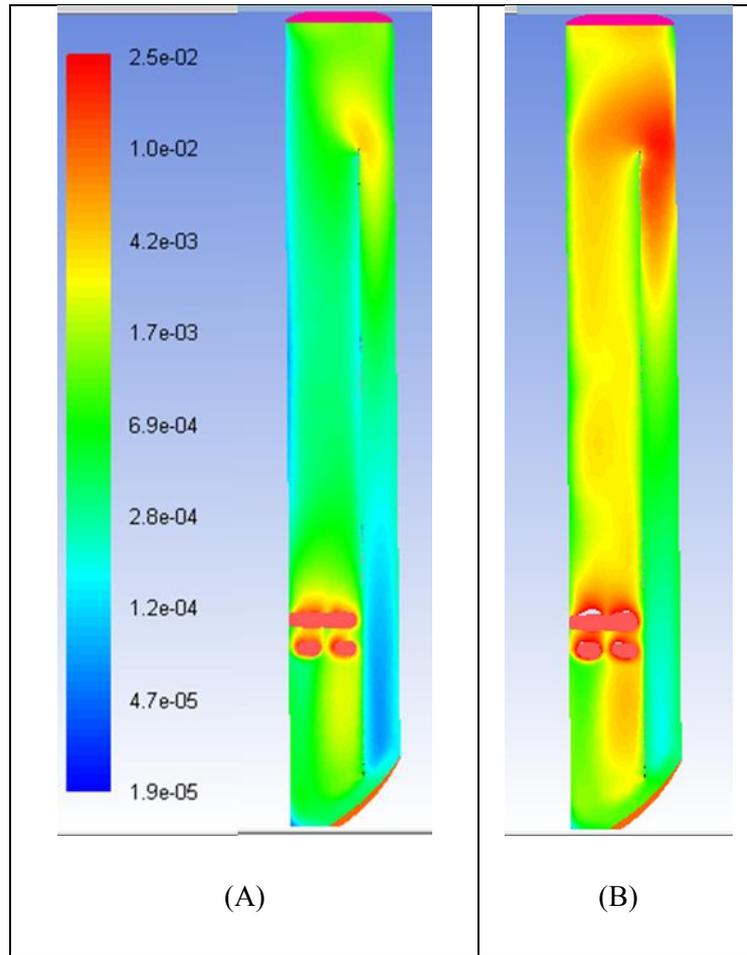


Figure IV-5. Champs d'énergie cinétique turbulente ($\text{m}^2.\text{s}^{-2}$) de la phase liquide au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 \text{ L.min}^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 \text{ L.min}^{-1}$.

L'énergie cinétique turbulente permet de renseigner quant à l'intensité des fluctuations de vitesses de liquide u' , v' et w' autour de leur valeur moyenne (ou plus précisément la moyenne des contraintes normales du tenseur de Reynolds) :

$$k = \frac{1}{2} \left(\overline{u'^2} + \overline{v'^2} + \overline{w'^2} \right) \quad (\text{IV-38})$$

Le modèle de turbulence $k-\varepsilon$ supposant la turbulence isotrope, la précédente équation se simplifie en :

$$k = \frac{3}{2} \overline{u'^2} \quad (\text{IV-39})$$

Nos résultats montrent que la répartition spatiale de l'énergie est assez similaire pour les deux conditions d'aération avec des maxima dans la zone de recirculation supérieure et dans la zone du distributeur de gaz. Par des mesures expérimentales en airlift à recirculation interne par suivi de particules radioactives (CARPT), Luo et Al-Dahhan (2008) ont également montré que la zone de recirculation supérieure présentait de fortes fluctuations de vitesses. Par contre, ces mêmes auteurs n'ont pas identifié d'augmentation des fluctuations dans la zone du distributeur de gaz.

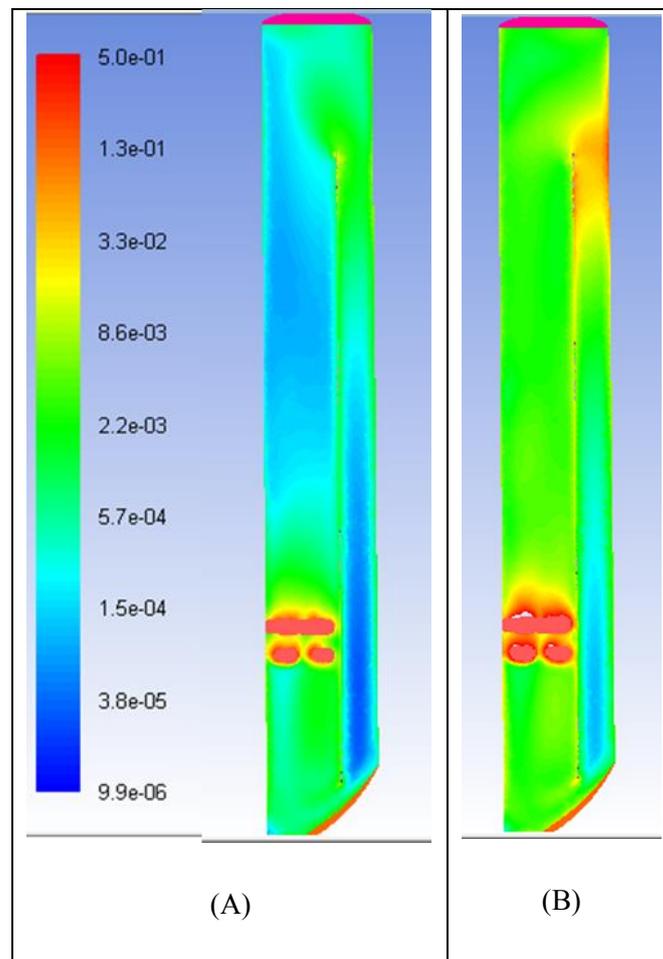


Figure IV-6. Champs de taux de dissipation de l'énergie cinétique turbulente ($\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-3}$) de la phase liquide au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$.

Le taux de dissipation présente des profils similaires à ceux de l'énergie cinétique turbulente (Figure IV-6). Ainsi, on peut remarquer que le taux de dissipation est relativement homogène dans la section ascendante du bioréacteur, au-dessus du distributeur de gaz. Les dissipations

maximales sont obtenues dans le voisinage du distributeur et dans la zone de recirculation supérieure et peuvent atteindre jusqu'à 100 fois les valeurs les plus faibles (respectivement 5 et 100 $W.m^{-3}$ pour les distributeurs poreux et perforés). Ces valeurs, localement très élevées, sont issues d'une accumulation de bulles dans la zone de désengagement (Figure IV-8) qui favorisent la production de turbulence par la phase dispersée.

IV.2.2. Caractéristiques de la phase gaz

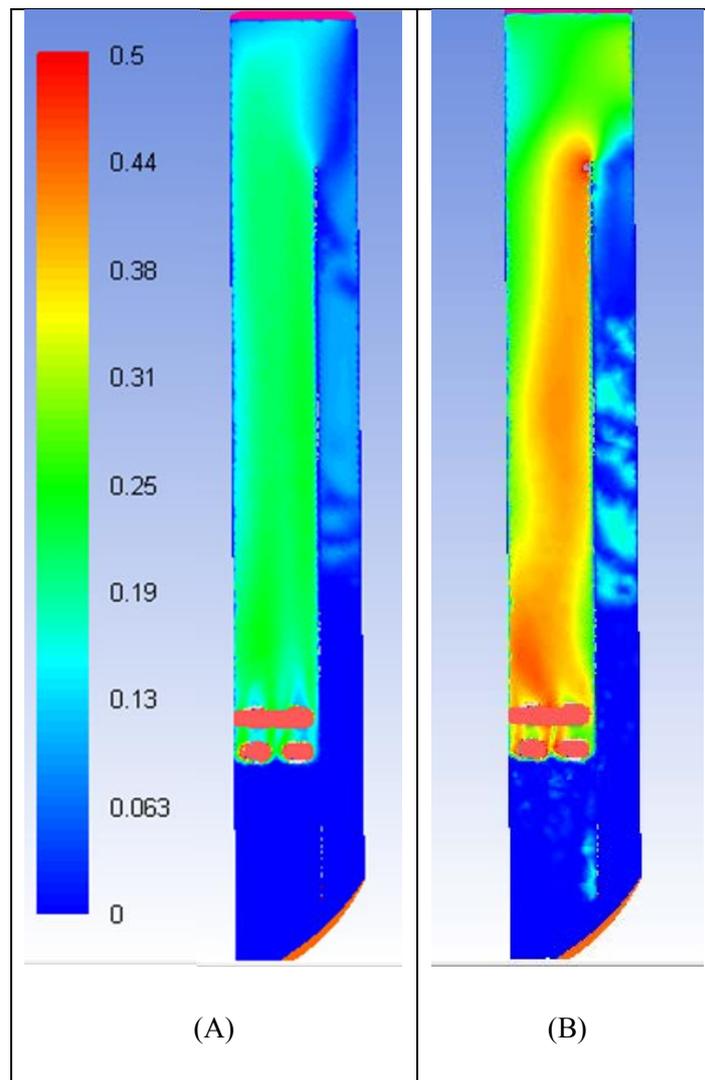


Figure IV-7. Champs de vitesse de la phase gaz ($m.s^{-1}$) au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 L.min^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 L.min^{-1}$.

Le champ de vitesse de la phase gazeuse est très homogène dans le cas du distributeur poreux, ce qui confirme là encore l'occurrence du régime homogène dans la section ascendante (Figure IV-7A). Des structures d'écoulement transitoires oscillantes sont observées lors de l'utilisation du sparger perforé, confirmant là encore que le régime d'écoulement n'est pas parfaitement homogène. Les vitesses de gaz calculées dans la partie descendante de l'airlift sont la conséquence de la recirculation partielle d'une fraction des bulles, qui a été effectivement observée expérimentalement.

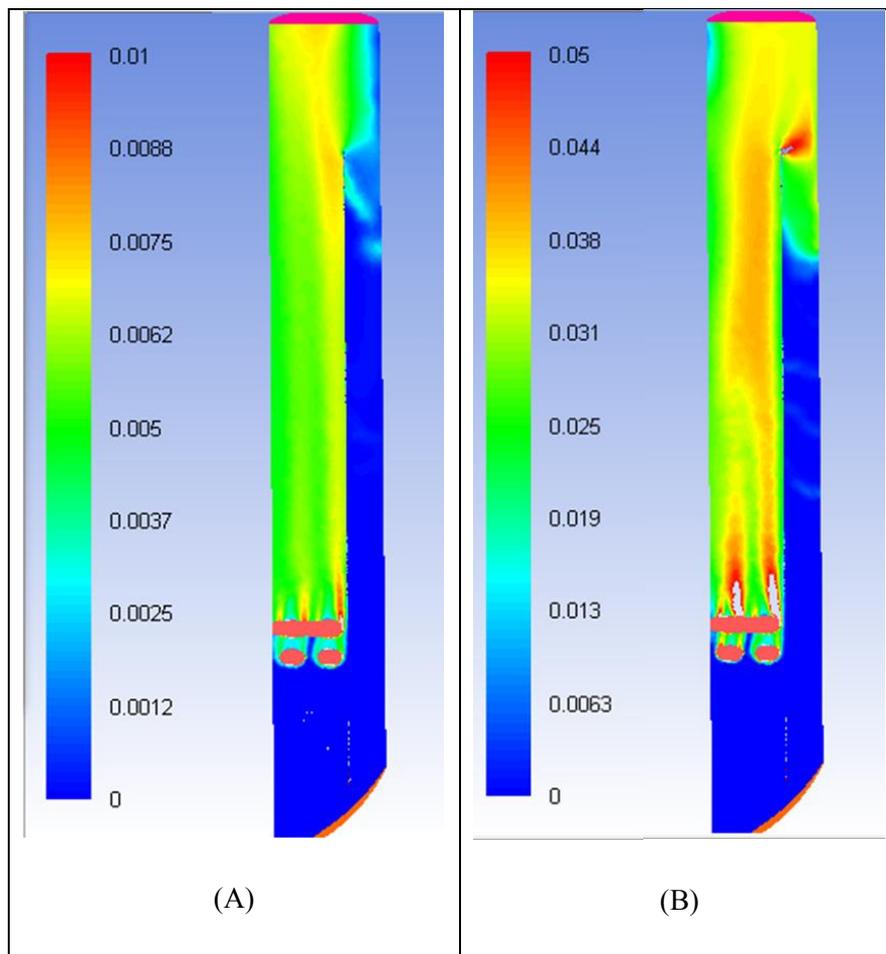


Figure IV-8. Taux de vide au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$.

Dans le cas du distributeur perforé, les bulles atteignent des vitesses environ deux fois supérieures à celles calculées dans le cas du distributeur poreux. Cette différence sensible est largement due aux écarts de diamètres de bulles calculés par le modèle de coalescence-rupture

lors du changement de distributeur et de l'augmentation du débit de gaz. Ainsi, les diamètres de Sauter moyen passent de 1,2 à 6,5 mm lors des deux simulations réalisées.

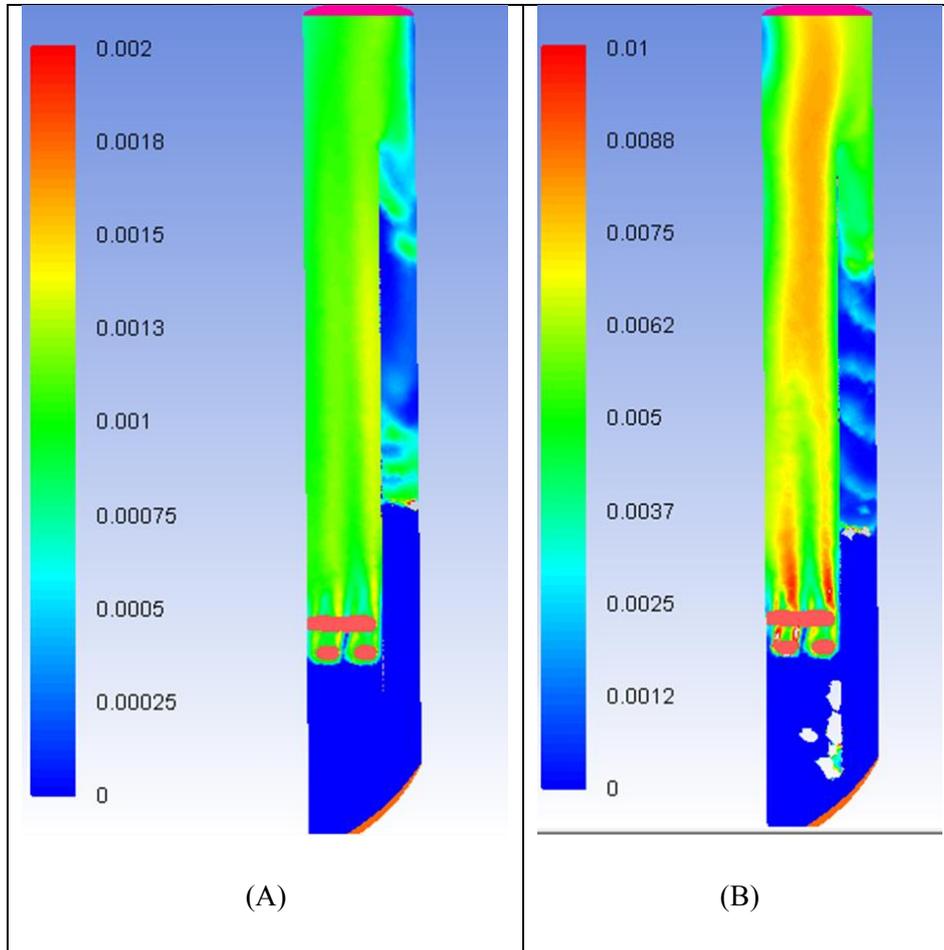


Figure IV-9. Diamètres de Sauter de bulles (m) calculés au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 \text{ L.min}^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 \text{ L.min}^{-1}$.

IV.2.3. Transfert d'oxygène gaz-liquide

L'obtention de forts coefficients volumiques de transfert d'oxygène au sein de l'airlift passe, d'après la relation (IV-35), par une augmentation locale (i) de l'aire interfaciale, (ii) du taux de vide et (iii) de la vitesse de drift u_D . Ainsi, nos résultats montrent une très forte hétérogénéité du kLa dans le bioréacteur, inhérente au fonctionnement de celui-ci et notamment à la zone descendante faiblement chargée en bulles. Malgré de meilleurs taux de

vide et des niveaux plus élevés de turbulence, c'est le distributeur poreux qui permet les meilleurs coefficients de transfert gaz-liquide avec des valeurs qui atteignent ponctuellement 100 h^{-1} dans la zone proche surface. Pour le distributeur perforé, ces valeurs n'atteignent que 50 h^{-1} au maximum.

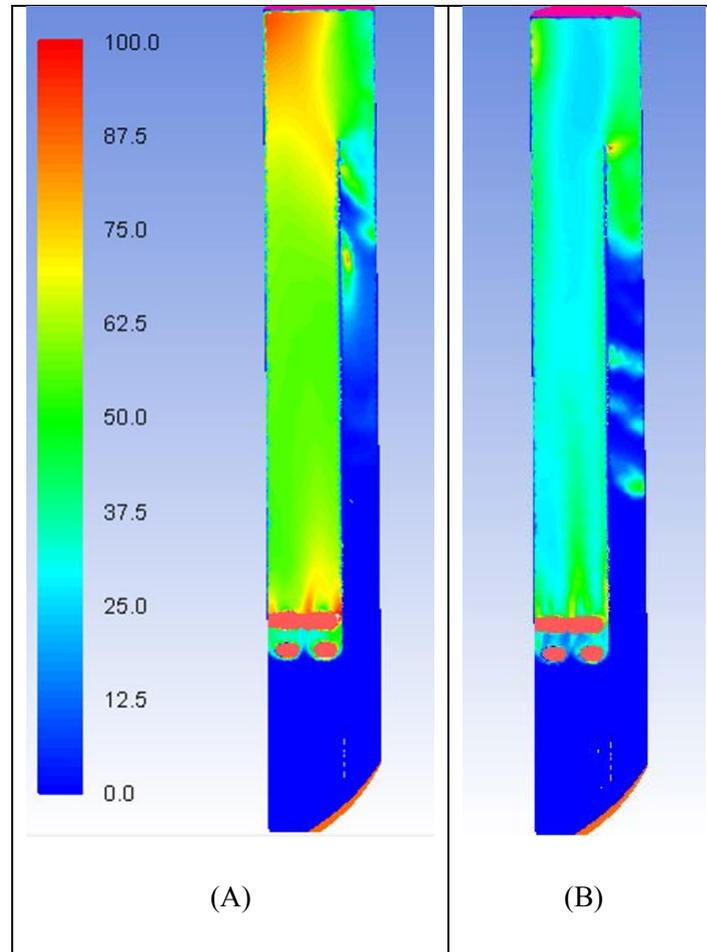


Figure IV-10. Coefficients volumiques de transfert d'oxygène calculés par la relation (IV-35) au sein du réacteur à gazosiphon. (A) $Q_g = 0,6 \text{ L.min}^{-1}$, (B) $Q_g = 6,4 \text{ L.min}^{-1}$.

IV.2.4. Grandeurs globales simulées

Afin de comparer nos résultats avec les expériences présentées dans le paragraphe IV.1.1, les principales grandeurs caractéristiques de l'écoulement au sein du bioréacteur ont été moyennées sur l'ensemble du volume de calcul (Tableau IV-4). Une surestimation des tailles de bulles semble fournie par la simulation numérique même si la détermination expérimentale, visuelle, est entachée d'une très forte erreur expérimentale. A noter également

que le diamètre de Sauter donne un poids important aux bulles de grands diamètres, effectivement observées expérimentalement dans le cas du sparger perforé.

Les dissipations volumiques moyennes sont largement supérieures aux prédictions de la relation (IV-1). A notre connaissance cependant, en réacteur à gazosiphon, les prédictions numériques du taux de dissipation moyen n'ont jamais été confrontées à celles de la relation précédente. Au final, les simulations numériques prédisent tout de même des dissipations volumiques moyennes largement en-dessous des valeurs trouvées en bioréacteur mécaniquement agité.

Tableau IV-4. Valeurs des grandeurs globales calculées par simulation numérique.

Expérience	Sparger	Q_g (L.min ⁻¹)	d_b (mm)	P/V (W.m ⁻³)	$k_L a$ (h ⁻¹)	Taux de vide (%)	[O ₂] dissous (% saturation en air)
AL1	Poreux	0,6	1,2	1,4	42,3	0,3	33
AL2	Perforé	6,4	6,5	8,7	26,4	1,7	0,1

Les $k_L a$ présentent quant à eux des valeurs plus faibles que ceux déterminés expérimentalement. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que ceux-ci ont été déterminés expérimentalement en milieu de culture ainsi que par le fait que la sonde fournit une information ponctuelle au sein du bioréacteur. Lors de la remontée en oxygène de la méthode statique, la sonde mesure une augmentation de concentration issue du transfert gaz-liquide local pondéré par les mécanismes de mélange macroscopiques prenant place dans le bioréacteur. Une étude expérimentale plus poussée des temps de mélange macroscopiques obtenus pour chaque condition opératoire serait nécessaire pour élucider complètement ces interrogations.

Enfin, les résultats du tableau précédent indiquent que, dans le cas d'une consommation d'oxygène maximale par la bactérie, une situation de limitation du transfert gaz-liquide est attendue en cas d'aération par le distributeur perforé. Un apport d'oxygène pur sera alors nécessaire pour assurer une concentration suffisante en oxygène dissous.

IV.3. Etudes cinétiques

Nous présenterons dans ce paragraphe les cinétiques de deux cultures utilisant les conditions opératoires étudiées précédemment. Pour chacune d'entre elles, la réponse biologique est quantifiée en termes de cinétiques de croissance, de consommation et de production de l'antibiotique. Nous conserverons les résultats des simulations CFD pour dénommer les deux environnements hydrodynamiques obtenus (Tableau IV-4)

IV.3.1. Impact de l'agitation pneumatique sur la croissance microbienne en réacteur gazosiphon

Les cinétiques de concentration en biomasse sont reportées en Figure IV-11. Pour les deux conditions opératoires utilisées, une phase de latence de 10 h environ est observée. Seule l'expérience réalisée avec le sparger perforé a pu être répliqué dans le cadre de nos travaux.

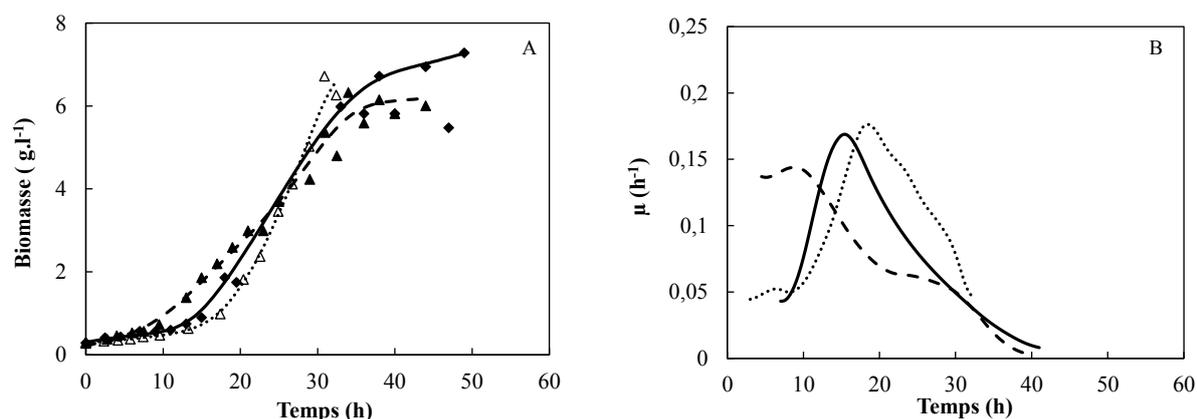


Figure IV-11. (A). Cinétiques de croissance de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, $P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$ ($\blacktriangle, \triangle$) et $P / V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$ (\blacklozenge). (B) Vitesse spécifique de croissance, $P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$ (---, ...) et $P / V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$ (—).

Les concentrations maximales en biomasse sont similaires pour les deux conditions opératoires réalisées et se situent entre 6 g.L^{-1} et 8 g.L^{-1} . Il en est de même pour les vitesses spécifiques maximales de croissance avec des valeurs autour de $0,16 \text{ h}^{-1}$. Dans des conditions similaires de culture mais en réacteur mécaniquement agité, les concentrations maximales de biomasse étaient sensiblement plus faibles (4 g.L^{-1}). Par contre, les vitesses maximales de croissance sont similaires entre les deux designs de bioréacteurs. A noter néanmoins que la phase de latence observée en airlift occasionne un décalage du moment d'obtention de cette croissance maximale de 6 h en STR à 9 à 17 h de culture en airlift.

IV.3.2. Impact de l'agitation pneumatique sur la production d'antibiotiques en réacteur gazosiphon

Les cinétiques de production des pristinamycines montrent un déclenchement de la production après 16 h de culture pour les deux spargers utilisés (Figure IV-12). Lors de la répétition de l'expérience à plus forte dissipation volumique, le déclenchement de la production de pristinamycines est apparu décalé par rapport aux autres expériences, du fait probablement d'une phase initiale de latence plus longue pour cette culture. La production d'antibiotiques est plus marquée par utilisation du sparger perforé (environ 40 mg.L⁻¹) que lors des cultures sous plus faibles dissolutions volumiques (moins de 10 mg.L⁻¹).

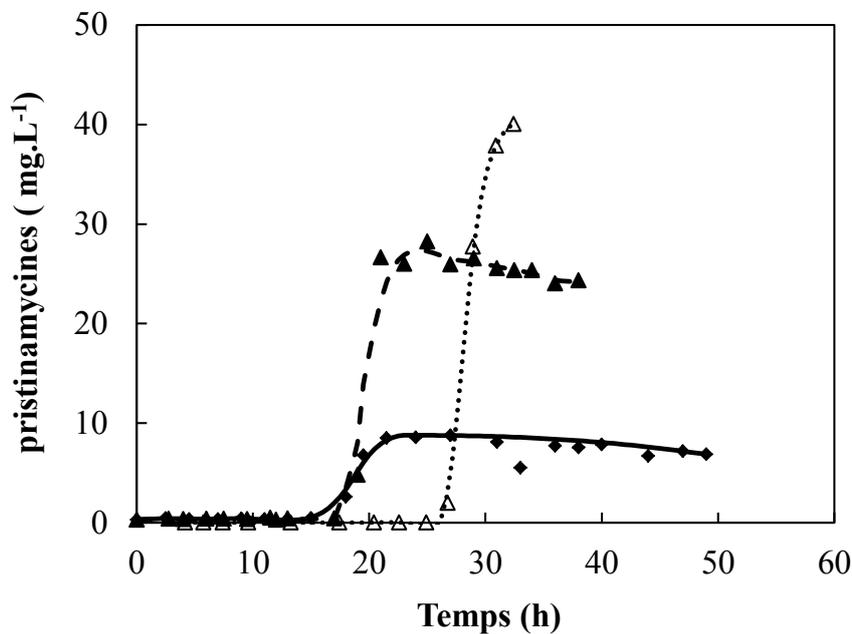


Figure IV-12. Cinétiques de production des pristinamycines en réacteur airlift, $P / V = 8,7$ W.m⁻³ (▲, △) et $P / V = 1,4$ W.m⁻³ (◆).

Au final pour l'une des deux conditions opératoires, la quantité de pristinamycines produite en airlift est 4 fois supérieure à celle obtenue en réacteur mécaniquement agité (de l'ordre de 12 mg.L⁻¹) pour des caractéristiques globales similaires.

Le rendement de production des antibiotiques (P_{\max} / X_{\max}) en réacteur gazosiphon est de 5,4 mg.g⁻¹ (après 31,5 h de culture) à une puissance dissipée volumique 1,4 W.m⁻³ contre 6,4 mg.g⁻¹ (après 32 h de culture) pour $P / V = 8,7$ W.m⁻³. Dans nos travaux précédents, en réacteur mécaniquement agité, ce rendement de production était compris entre 0,75 et

1,5 mg.g⁻¹ pour des conditions opératoires similaires, ce qui indique des rendements de production nettement améliorés en airlift.

Tableau IV-5 : Taille des pelotes ainsi que de leur zone centrale (cellules mortes) au cours du temps pour des cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ40338 en AL dans 2 conditions de P/V (AL1 8,7 et AL2 1,4 W.m⁻³).

temps [h]	AL1 [8,7 W.m ⁻³]			AL2 [1,4 W.m ⁻³]		
	Taille des enchevêtrements allongés	Diamètre moyen des pelotes (μm)	Diamètre de la zone centrale (μm)	Taille des enchevêtrements allongés (μm)	Diamètre des pelotes (μm)	Diamètre de la zone centrale (μm)
15	Faible	20-120	0-60	100-150	- ¹	- ¹
29	- ¹	40-80	10-50	30-110	100-160	0-60
34	- ¹	50-140	20-90	Faible	100-240	40-60

¹ : absence

Contrairement aux cultures en STR, au moment de la production de pristinamycines, soit des enchevêtrements ($P/V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$), soit des pelotes de petite taille ($P/V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$) sont présents (Tableau IV-5). Il est à noter que la taille des pelotes mesurée à $8,7 \text{ W.m}^{-3}$ se rapproche de la taille de celles présentes dans les fioles d'Erlenmeyer lorsque la production de pristinamycines est observée. Ainsi, à $8,7 \text{ W.m}^{-3}$, la production, de 35 mg.L^{-1} , en moyenne, est mesurée pour un diamètre de pelotes d'environ $60 \mu\text{m}$ (à 29 h de culture) soit une valeur de $1/d_p$ de $16\,666 \text{ m}^{-1}$. Dans ces conditions, la corrélation entre la concentration en pristinamycines produite et $1/d_p$ est proche de celle obtenue lors des cultures en fioles. L'absence de présence de pelotes à $1,4 \text{ W.m}^{-3}$ ne permet pas de faire ce rapprochement pour cette condition.

IV.3.3. Influence de l'agitation pneumatique sur la consommation de substrats en réacteur gazosiphon

Pour les deux conditions opératoires d'aération, le glutamate est d'abord préférentiellement utilisé comme source de carbone et d'azote. Sa consommation s'étale entre 10 h (début de la phase de croissance) et 20 h de culture suivant une vitesse spécifique maximale variant 0,13 et 0,16 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pour les deux types de sparger (Figure IV-13 et Figure IV-14).

Par contre, la vitesse spécifique de consommation d'arginine, qui a varié entre 0.018 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ et 0.04 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ pour le distributeur perforé a été sensiblement plus forte et plus précoce (après 14 h de culture) par rapport à la culture menée avec le sparger poreux (environ 0,014 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ près 24 h de culture) comme l'indiquent la Figure IV-13 et Figure IV-14.

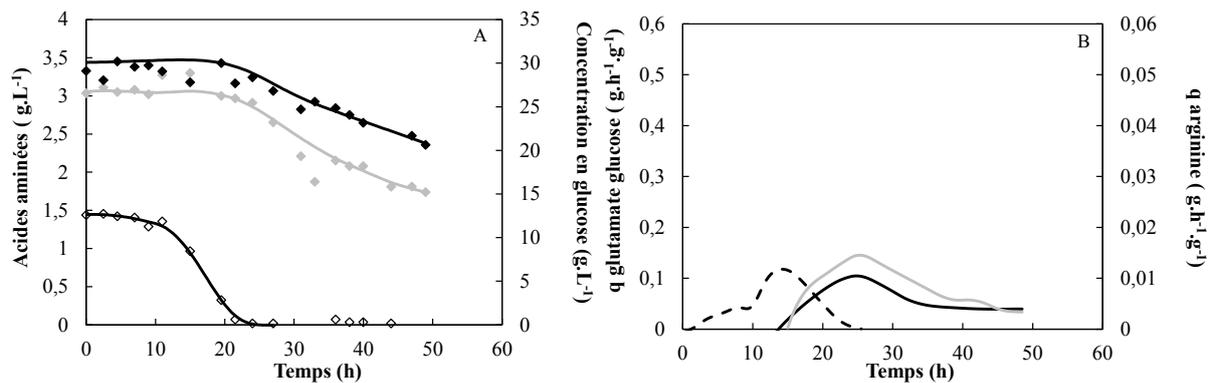


Figure [IV-13. (A) Cinétiques de consommation de substrats pour $P / V = 1,4 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$ [◆ glucose, ◇ glutamate, ◆ arginine] et (B) vitesses spécifiques de consommation de substrats [(—) glucose, (--) glutamate, (---) arginine].

En ce qui concerne la vitesse spécifique de consommation de glucose, on observe pour l'expérience avec le sparger perforé que la vitesse spécifique de consommation de glucose atteint sa valeur maximale de 0,2 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ de manière concomitante à la production de pristinamycines (après 20,5 et 14,5 h pour les deux expériences menées avec ce distributeur de gaz). Pour l'expérience avec le distributeur poreux, la vitesse spécifique atteint une valeur maximale plus faible de 0,1 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ après 23,5 h de culture. Ainsi, la plus forte production de pristinamycines observée (40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ avec le distributeur perforé) est obtenue après

l'épuisement total du glutamate et intervient à un moment similaire de celui de l'épuisement total du glutamate. Par contre, lors de la répétition de cette expérience, la concentration de pristinamycines de 27 mg.L^{-1} a été obtenue après que les vitesses spécifiques de consommation du glutamate et de l'arginine aient atteint leur valeur maximale. Pour l'expérience menée avec le distributeur poreux, la production de pristinamycines a été observée alors que seule la vitesse de consommation du glutamate avait atteint sa valeur maximale.

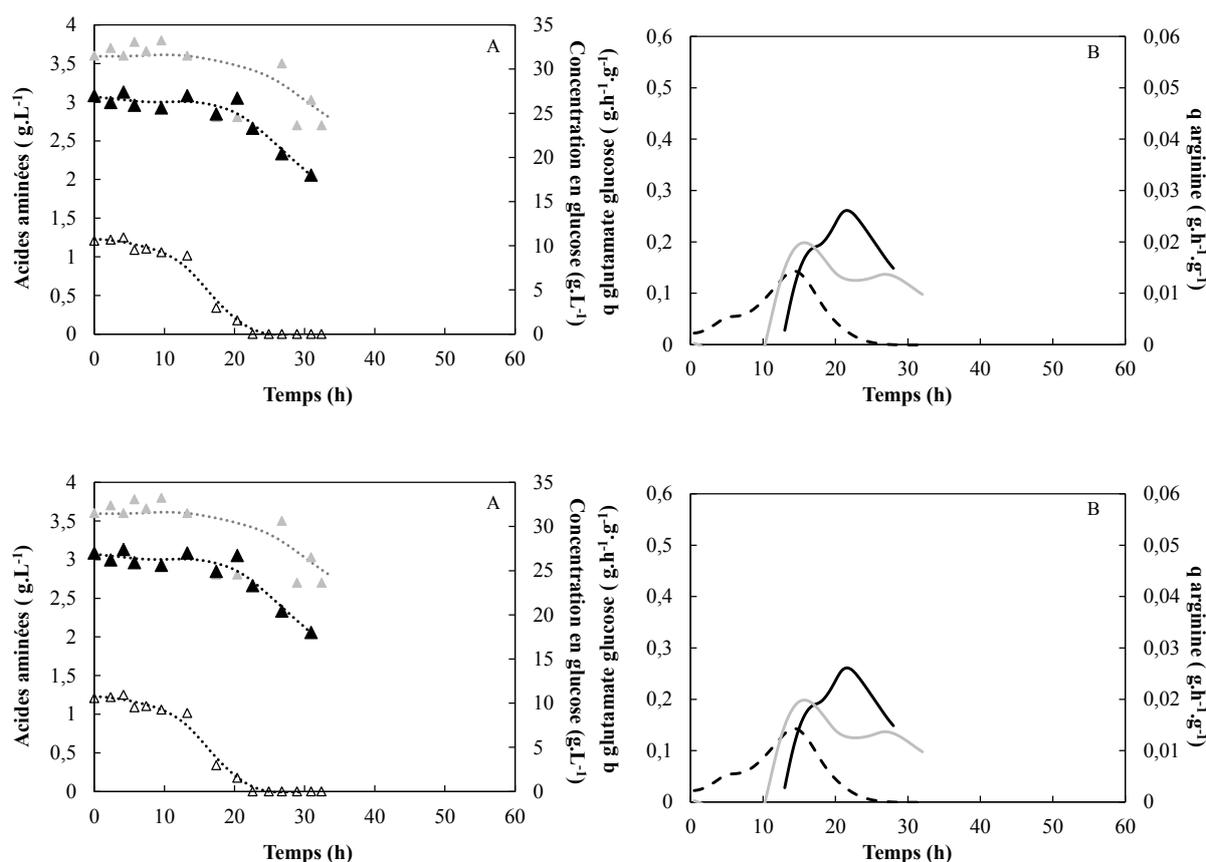


Figure [IV-14. (A) Cinétiques de consommation de substrats pour $P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$ [▲ glucose, △ glutamate, ▲ arginine] et (B) vitesses spécifiques de consommation de substrats [(—) glucose, (--) glutamate, (---) arginine]. Les figures inférieures indiquent la répétition de l'expérience.

Donc, on constate que les expériences dans lesquels les vitesses spécifiques de consommation de substrats arrivent avant le moment de la production de pristinamycines conduit à une augmentation de la concentration en pristinamycines produit par rapport aux expériences dans lesquels les vitesses spécifiques de substrats atteignent leurs valeurs maximales après la production de pristinamycines.

IV.3.4. Influence de l'agitation pneumatique sur la morphologie en réacteur mécaniquement agité

Au cours de cultures réalisées en airlift, des analyses morphologiques de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 ont été réalisées à différents instants de culture : après 15 h (début de la production), 29 h et 34 h (pendant la phase de production) afin de caractériser la viabilité cellulaire au sein des pelotes microbiennes et d'étudier l'influence du distributeur de gaz.

IV.3.4.a. Culture avec le distributeur perforé de gaz ($P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$)

Après 15 h de culture, ce sont essentiellement des enchevêtrements qui sont présents dans le milieu de culture. Aucune ou très peu de cellules mortes sont identifiées dans ces structures (Figure IV-15).

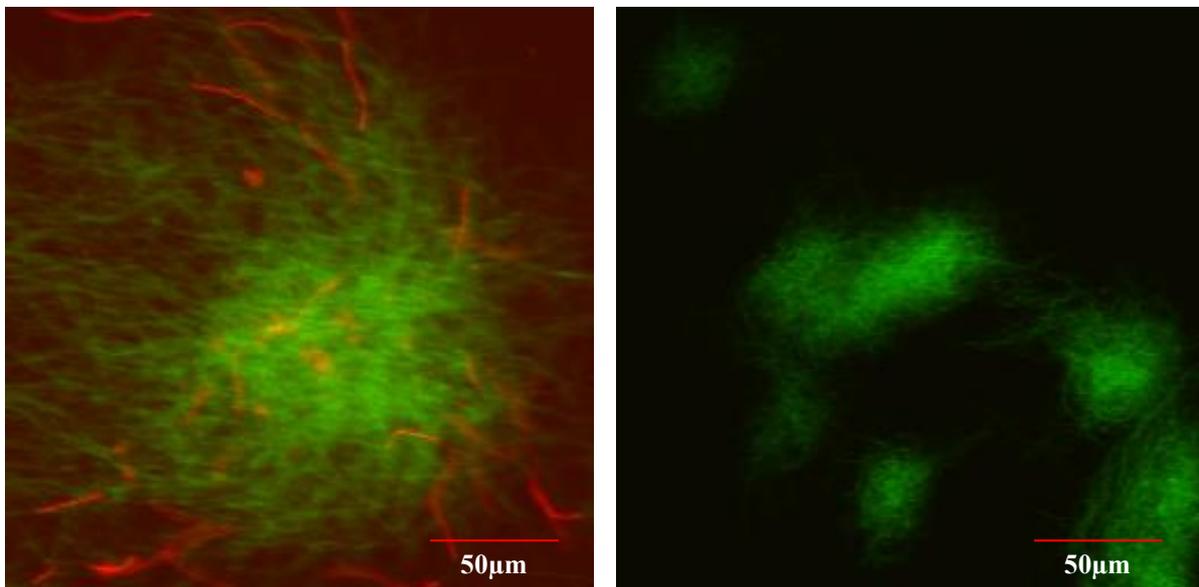


Figure IV-15. Exemples de morphologie et viabilité de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après 11 h de culture airlift ($P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$). Mesures réalisées par microscopie confocale.

Après 29 h de culture, les premières pelotes sont visualisées alors que des enchevêtrements sont encore présents dans le milieu de culture (Figure IV-16). La grande majorité des cellules sont vivantes.

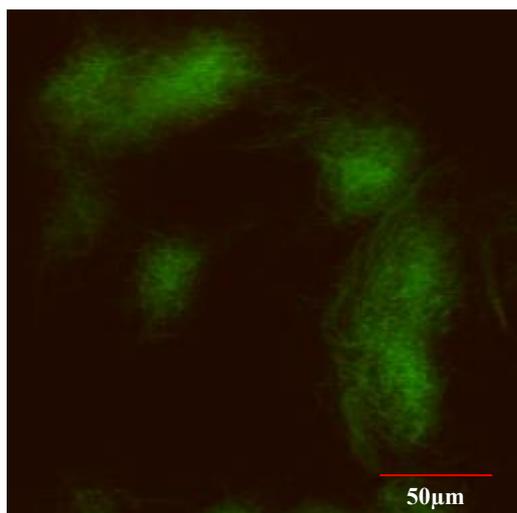


Figure IV-16 Exemples de morphologie et viabilité de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après 29 h de culture en airlift ($P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$). Mesures réalisées par microscopie confocale.

Après 34 h de culture, les pelotes constituent le morphotype majoritaire. Par contre, la quantité d'enchevêtrements tend à devenir négligeable. La plupart de pelotes présente une partie centrale composée de cellules mortes (Figure IV-17).

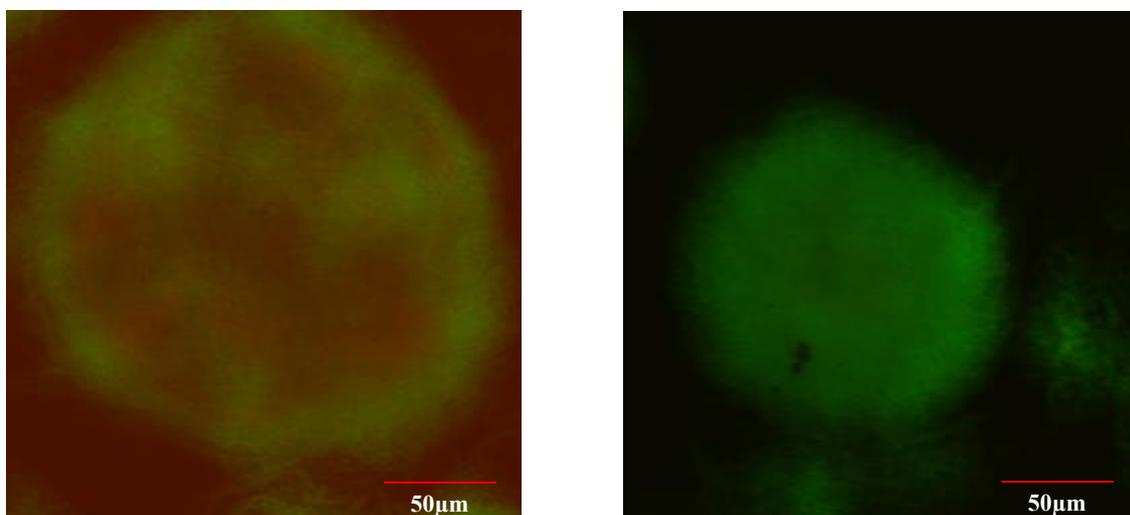


Figure IV-17. Exemples de morphologie et viabilité de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après 34 h de culture en airlift ($P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$). Mesures réalisées par microscopie confocale.

IV.3.4.b. Culture avec le distributeur poreux de gaz ($P / V = 1,4 \text{ kW.m}^{-3}$)

Après 15 h de culture dans l'airlift muni du distributeur poreux et au contraire de ce qui a été observé lors de l'aération par le distributeur perforé, les pelotes représentent la morphologie principale avec présence d'une zone centrale composée de cellules mortes. On n'identifie quasiment plus d'enchevêtrements dans le milieu de culture (Figure IV-18).

Après 29 h de culture, seules des pelotes sont présentes dans le milieu de culture. Il est à noter que plusieurs observations de pelotes en cours de fusion ont pu être observées (Figure IV-19). A noter aussi qu'à partir de 20 h de culture, des flocons commencent à apparaître dans le milieu de culture. En revanche, ces flocons ne sont pas présents sur les analyses par microscopie confocale. Il est probable que ces flocons aient une force de cohésion relativement faibles, ce qui entraîne leur désagrégation rapide au cours des différentes étapes d'analyse

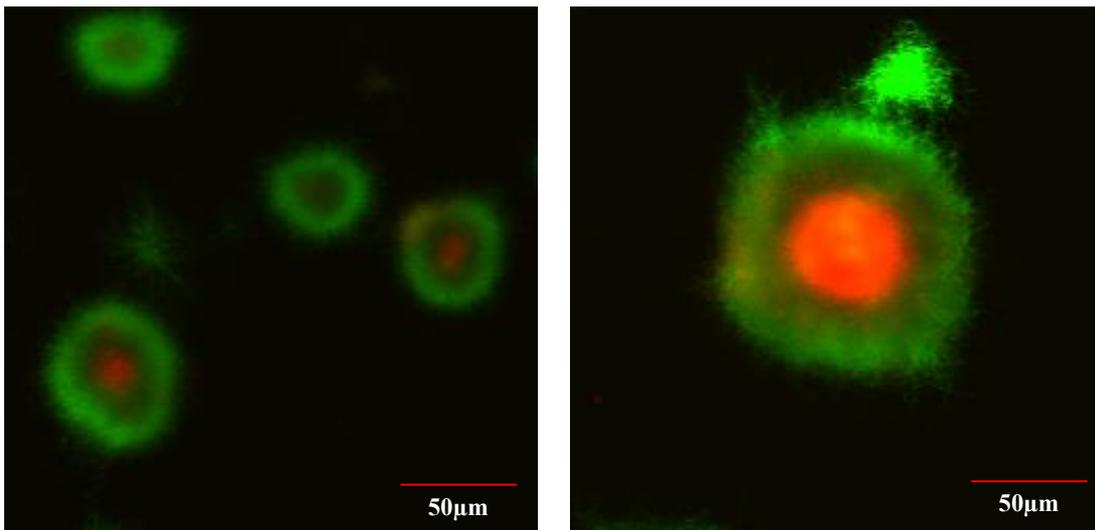


Figure IV-18. Exemples de morphologie et viabilité de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après 11 h de culture en airlift ($P / V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$). Mesures réalisées par microscopie confocale.

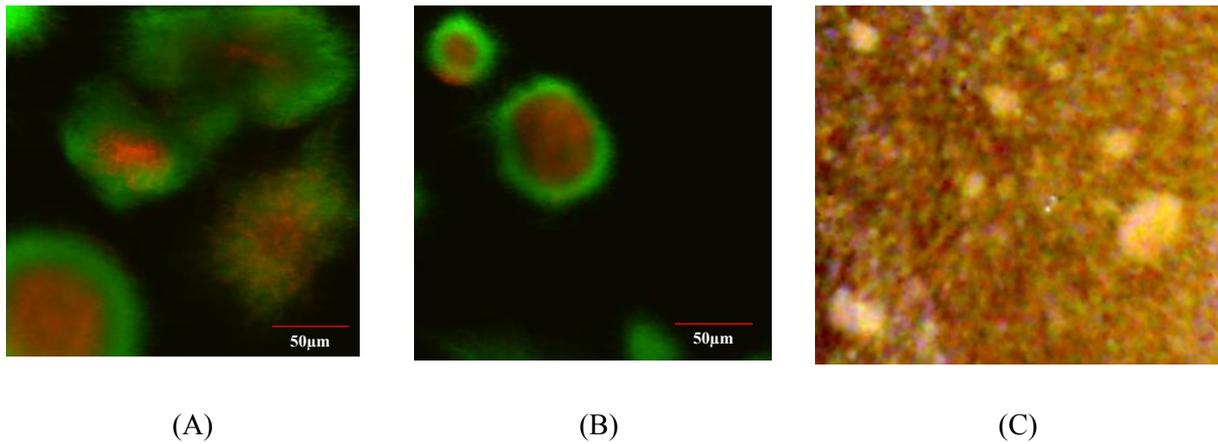


Figure IV-19. Exemples de morphologie et mesure de viabilité de *S. pristinoaespiralis* DSMZ 40338 après 29 h de culture en airlift ($P / V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$). Images réalisées par microscopie confocale (A et B) ou par photographie (C).

Après 34 h de culture, la taille des pelotes est similaire à celle mesurée après 24 h de culture et des fusions de pelotes sont encore observées (Figure IV-20).

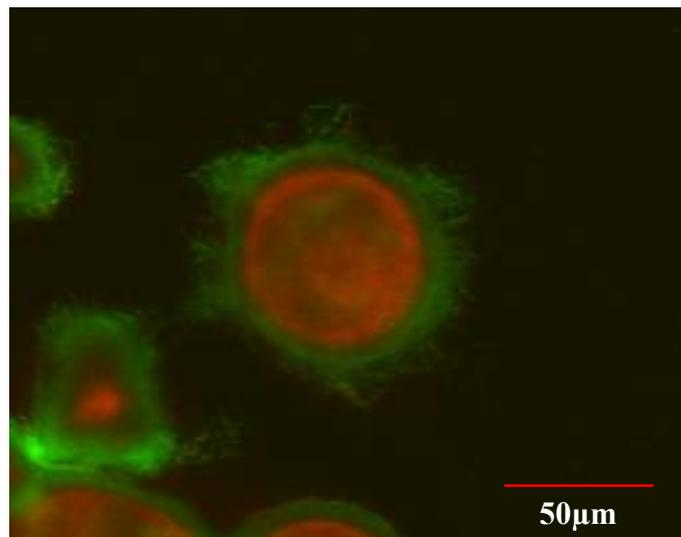
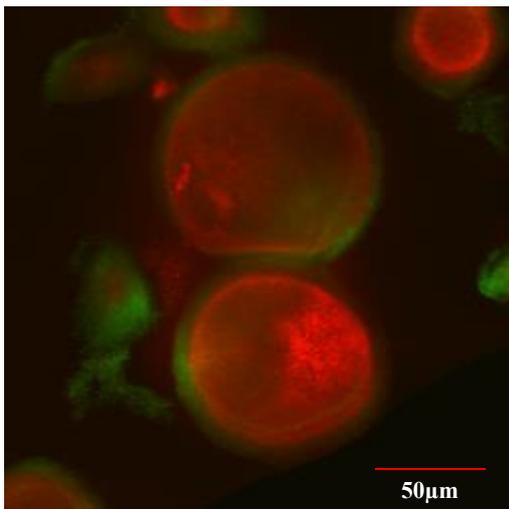


Figure IV-20. Exemples de morphologie et viabilité de *S. pristinoaespiralis* DSMZ 40338 après 34 h de culture en airlift ($P / V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$). Image réalisée par microscopie confocale.

Enfin, en fin de phase de croissance, après 47 h de culture, seules des pelotes incluant une très grande proportion de cellules mortes, sont observées dans le milieu de culture (Figure IV-21).

Les tailles des pelotes sont globalement identiques pour les deux conditions opératoires. Une diminution des tailles moyennes semble observée pour le distributeur poreux (environ $50 \mu\text{m}$

après 30 h de culture contre 100-150 μm environ pour les cultures réalisées avec le distributeur perforé). Faute d'un nombre statistiquement insuffisant de mesures par microscopie confocale, nous ne commenterons pas plus ces résultats. En conclusion, nous noterons que les pelotes microbiennes apparaissent plus tardivement lors de l'utilisation du distributeur de gaz perforé, ce qui peut expliquer les meilleures performances de croissance et de production observées pour cette condition opératoire. (Tableau IV-6).



(A)



(B)

Figure IV-21. Exemples de morphologie et viabilité de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 après 47 h de culture en airlift ($P / V = 1,4 \text{ W}\cdot\text{m}^{-3}$). Images réalisées par microscopie confocale (A) et par photographie (B).

Tableau IV-6. Morphologie dominante observée au cours du temps pour des cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 en airlift pour des dissipations volumiques $P / V = 1,4$ et $8,7 \text{ W.m}^{-3}$).

Temps [h]	1,4 (W.m^{-3})	8,7 W.m^{-3}
15	Enchevêtrements & pelotes	Enchevêtrements
29	Pelotes	Enchevêtrements & pelotes
34	Pelotes	Pelotes

IV.3.5. Influence de l'agitation pneumatique sur les profils temporels d'oxygène dissous

Les suivis temporels de la concentration en oxygène dissous dans l'airlift sont reportés sur la Figure IV-22. Dans le cas du distributeur perforé, une consommation d'oxygène dissous plus rapide qu'avec l'utilisation du distributeur poreux est observée. Ainsi, même si en fin de phase de croissance, les concentrations en oxygène dissous sont similaires et de l'ordre de 30 %, les concentrations en oxygène dissous mesurées lors de la production de l'antibiotique ont varié entre 40 et 80 %. Afin d'assurer un apport d'oxygène suffisant et un maintien d'une concentration en oxygène dissous au-dessus de 30 % de la saturation en air, un ajout d'oxygène pur a été réalisé après 36 h et 15-20 h de culture respectivement pour l'airlift équipé du distributeur poreux et du distributeur perforé, ce qui confirme les prédictions de la CFD relatives aux capacités de transfert d'oxygène insuffisantes dans le cas du distributeur perforé.

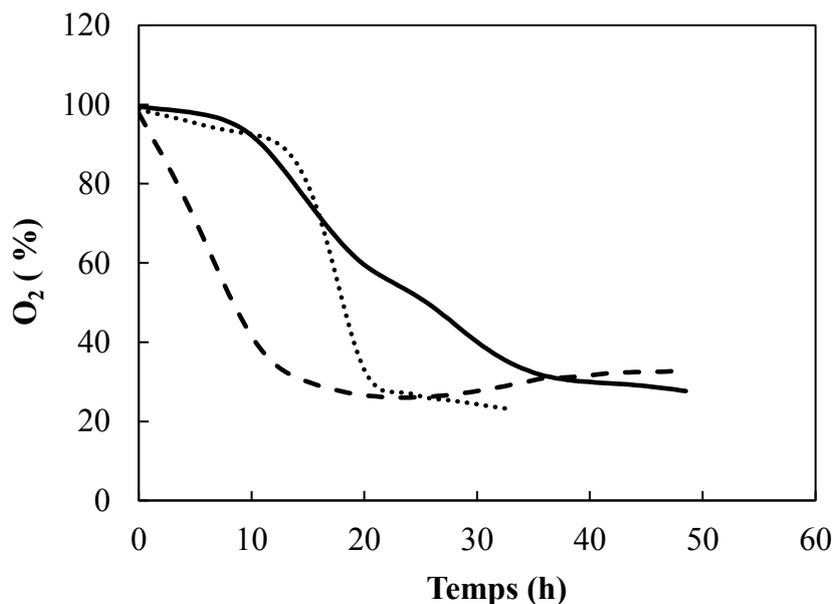


Figure IV-22. Profils temporels de la concentration en oxygène dissous pour des dissipations volumiques $P / V = 8,7 \text{ W.m}^{-3}$ (---, ...) et $P / V = 1,4 \text{ W.m}^{-3}$ (—).

IV.4. Discussion et conclusion

Nos résultats ont étudié, de façon originale, l'influence du design du distributeur de gaz sur les cinétiques de croissance, de consommation et de production de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de leurs cultures en réacteur airlift. Les champs d'écoulement diphasiques ont été simulés numériquement par utilisation de la CFD et d'une approche Euler-Euler. Ces simulations ont permis de montrer que l'écoulement généré était fortement influencé par le débit de gaz appliqué. Ainsi, tandis que l'utilisation du distributeur poreux promeut un régime homogène d'écoulement et des tailles de bulles millimétriques, le distributeur perforé a engendré un régime non complètement homogène avec obtention de tailles de bulles sensiblement plus grandes. Il est également remarquable que, malgré des cinétiques de croissance similaires, les quantités d'antibiotiques produites aient sensiblement varié d'une expérience à l'autre. Ces niveaux de croissance et de production sont plus élevés que lors des cultures en réacteur mécaniquement agité (chapitre III). Ce résultat est en contradiction avec ceux d'Aleksieva et al. (2000) qui ont montré que les cinétiques de croissance et de production du champignon filamentueux *Humicola lutea* étaient similaires entre un réacteur STR et un réacteur airlift malgré l'absence de critères explicites d'extrapolation entre ces

deux réacteurs. De la même manière, Pollard et al. (1998) ont indiqué que la croissance et la production d'erythromycine par *Saccharopolyspora erythraea* étaient de même ordre de grandeur pour deux types de distributeurs de gaz (tube et anneau) avec une concentration maximale en biomasse et d'antibiotique de 10 g.L⁻¹ et 80 mg.L⁻¹ respectivement.

Une hypothèse que l'on pourrait avancer pour expliquer la meilleure croissance observée est une répartition plus homogène du taux de dissipation (Figure IV-6) par rapport à ceux escomptés en réacteur mécaniquement agité. Une hypothèse similaire de « meilleure homogénéisation » des substrats et de l'oxygène dissous a été avancée par Gavrilesco et al. (1998) pour différentes cultures de microorganismes (*Bacillus licheniformis*, *Cephalosporium acremonium* et *Streptomyces noursei*) réalisées dans les deux types de réacteurs autorisant de meilleures croissances mais des profils de production comparables. Yuguo et al. (2000) ont également montré que la concentration en α -amylase produit par *Bacillus subtilis* en airlift (432,3 U.mL⁻¹) était plus élevée par rapport aux cultures en réacteur mécaniquement agité (397,2 U.mL⁻¹). Enfin, Schügerl (1990) a montré que le rendement de production de tétracycline par rapport à la biomasse était plus élevé en airlift ($Y_{P/X} = 0,29 \text{ kg kg}^{-1}$) par rapport au réacteur mécaniquement agité ($Y_{P/X} = 0,14 \text{ kg.kg}^{-1}$).

A l'instar des conclusions réalisées dans le chapitre précédent, il semblerait que les critères classiques utilisés en extrapolation des bioprocédés ne s'appliquent pas directement lors du changement de design de bioréacteurs, dans le cas de culture de bactéries filamenteuses. Ainsi, les capacités de production de la bactérie étant reliées à la morphologie de celle-ci (taille de la pelote et viabilité des cellules au sein des pelotes) et au microenvironnement cellulaire (en particulier la concentration en oxygène dissous), une comparaison de ceux-ci semble nécessaire. Nos résultats ont ainsi montré que les dissipations volumiques moyennes plus faibles en réacteur airlift ont engendré des pelotes plus petites que dans le cas du bioréacteur mécaniquement agité, ce qui pourrait expliquer les meilleures capacités de croissance et de production observées.

La comparaison des cinétiques obtenues pour les deux types de distributeurs de gaz s'avère plus délicate du fait du nombre réduit d'expériences réalisées. Il conviendra donc de prendre les conclusions développées ci-dessous comme des ouvertures de discussion que des expériences futures devront confirmer. Il est, selon nous, essentiel de noter les changements de morphotypes dominants aux instants de production de l'antibiotique. Ainsi, dans le cas du distributeur perforé, des enchevêtrements sont toujours observés dans la culture, ce qui laisse

indiquer en premier lieu que la morphologie « macroscopique » de la bactérie n'a pas d'impact direct sur le moment de déclenchement de la production. Néanmoins, pour cette expérience, des rendements de production sensiblement plus élevés ont été observés par rapport aux expériences menées en STR ou en airlift muni du distributeur poreux, ce qui est attendu, compte-tenu des meilleures proportions de cellules viables observées au sein des enchevêtrements.

Des expériences réalisées en parallèle ont suggéré qu'en fioles d'Erlenmeyer, les phénomènes d'agrégation des enchevêtrements bactériens, qui conduisent en partie à la formation des pelotes, pouvaient voir leur intensité fortement modifiée par les conditions d'agitation (Haj Husein et al, 2013). Ainsi, la structure homogène de l'écoulement généré par l'aération sous forme de petites bulles et par le débit plus faible de gaz serait propice aux phénomènes d'agrégation (en termes de probabilité et d'efficacité), augmentant la taille des pelotes et diminuant la quantité de biomasse active pour la production. L'hypothèse de nécessité de contrôle plus précis des morphologies avait déjà été avancée par Schügerl (1990). Cet auteur a montré que la production de pénicilline par *Penicillium chrysogenum* était améliorée en airlift du fait d'un meilleur « contrôle » de la taille des structures bactériennes autour de 400 μm en comparaison des cultures réalisées en réacteur mécaniquement agité. De la même manière, Theobald et al. (2000) ont observé que la concentration la plus élevée en simocyclinone produit par *Streptomyces antibioticus* TU6040 était obtenue en réacteur de type airlift (300 mg.L^{-1}). Cette concentration n'était que de 100 mg.L^{-1} en STR malgré de mêmes conditions d'aération (0,5 vvm). Là encore, ces auteurs ont expliqué ce résultat par la baisse des contraintes mécaniques appliquées sur les pelotes engendrant des tailles de pelotes homogènes avec un diamètre entre 1 et 2 mm.

La question de la quantification des contraintes mécaniques en réacteurs à agitation mécanique ou pneumatique reste complexe et d'actualité. En particulier, les types de contraintes générées par les bulles sont peu étudiés dans la littérature du fait des difficultés expérimentales (en particulier la nécessité de contrôler la taille des bulles). Nos observations ont montré que, contrairement à des essais préliminaires réalisés en fioles d'Erlenmeyer, les pelotes bactériennes présentent très peu de filaments externes. Ce « rasage » de la pelote est une caractéristique de la présence de contraintes mécaniques délétères (Cui et al., 1997). Une étude récente a également montré que la contribution de la phase gazeuse aux contraintes mécaniques, à dissipation volumique constante, n'était pas la même sur les pelotes d'*A. niger*.

Ainsi, en favorisant un apport de puissance par la phase gazeuse et en défavorisant l'agitation mécanique, les pelotes formées étaient de plus petite taille, ce qui permettait d'améliorer la productivité du procédé (Lin et al., 2010).

Enfin, il est important de noter que la taille des bulles au sein du réacteur peut avoir des effets dramatiques en termes de contraintes hydrodynamiques dans la phase liquide. Ce phénomène, peu considéré dans le cas de cultures microbiennes a fait l'objet d'études intensives en procédés de culture de cellules animales. En effet, il a été montré que des bulles sub-millimétriques engendraient, lors de leur désengagement à la surface libre, des dissipations de l'ordre de 10^7 W.m^{-3} qui sont suffisantes à la destruction des cellules animales présentes dans le voisinage de cette zone de désengagement (Mollet et al., 2007). Nous ne pouvons pas démontrer que ces phénomènes violents de dissipation soient également à l'œuvre au sein des cultures réalisées lors de ces travaux de thèse. Néanmoins, l'effet des tailles de bulles sur les structures bactériennes pourrait s'avérer plus complexe qu'escompté et nécessiter des études approfondies.

**Etude du phénomène de
déclenchement précoce de
la production de
pristinamycines**

V. Etude du phénomène de déclenchement précoce de la production de pristinamycines

Les éléments responsables du déclenchement de la production de pristinamycines sont, à n'en point douter, multi-paramétriques. Ces éléments peuvent être potentiellement reliés :

- *Aux phénomènes de transport* escomptés dans le réacteur de culture tels que les capacités d'homogénéisation et de transfert de matière, niveau et hétérogénéité des contraintes hydrodynamiques. Ainsi, alors qu'il est pertinent d'étudier l'influence de l'agitation sur la physiologie microbienne dans une configuration de réacteur donné (fiolle, airlift, STR), la génération d'environnements hydrodynamiques variés passe par la comparaison de cinétiques microbiennes lors de cultures dans des réacteurs dont les designs varient sensiblement, modifiant *de facto* les phénomènes de transport prenant place en leur sein (Tableau V-1). Ainsi, la réponse physiologique (croissance, production, consommation, morphologie) de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sera comparée lors de cultures en fiolle agitée, réacteur airlift et STR dans des conditions opératoires macroscopiques que nous chercherons à maintenir constante d'un réacteur à l'autre.
- *Aux environnements biochimiques* tels que les variations de concentration en oxygène dissous entre la préculture et la culture ou la composition du milieu de culture. En effet, une différence importante entre la culture en fiolle et les cultures dans les autres réacteurs se situe au moment de l'ensemencement de la culture. En STR et en airlift, le milieu de culture est aéré au préalable afin que la concentration en oxygène dissous soit de 100 % de la saturation en air au démarrage de la culture. Cet apport en oxygène n'est pas réalisé lors des cultures en fiolle. L'apport en oxygène influant la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* (Mehmood, 2011 ; Mehmood et al., 2011), nous avons identifié la variation en oxygène entre la préculture et la culture comme une source de « stress » physiologique pour *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338. Dans un second temps, le début de la production de pristinamycines en STR et en airlift étant concomitante à une limitation en glutamate du milieu de culture, nous avons modifié la nature du milieu de culture essentiellement au niveau de la concentration initiale en glutamate, afin de vérifier l'importance de cet acide aminé pour la

production d'antibiotiques. Ces deux séries d'expérimentations ont été réalisées uniquement en STR.

Tableau N-1. Comparaison des principales caractéristiques « procédés » des bioréacteurs utilisés.

Réacteur	Aération	Régime d'écoulement	Contraintes hydromécaniques	Diamètres de bulles	Phase gazeuse
Fiole agitée	Surfacique sans bulle. Non-contrôlée	Non-turbulent	Modérées et homogènes	*	Air
STR	Bulles Contrôlée	Turbulent	Fortes et hétérogènes	Hétérogènes	Air puis O ₂
Airlift	Bulles Contrôlée	Turbulent	Faibles et homogènes (pour une section donnée du réacteur)	Relativement homogènes	Air puis O ₂

V.1. Comparaison du comportement cinétique de *S. pristinaespiralis* lors de cultures en fiole, en STR et en airlift

Lors des travaux présentés précédemment, une production d'antibiotiques a été mesurée systématiquement en STR et en airlift et ce, quelles que soient les conditions de dissipation ou de transfert en oxygène. Lors des travaux précédents menés avec des fioles d'Erlenmeyer, la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 44338 n'était pas aussi systématique (Mehmood, 2011), En effet, pour que la production soit effective, deux conditions, à savoir une limitation en azote et un transfert en oxygène suffisant ($k_{La} > 100 \text{ h}^{-1}$), devaient être réunies (Mehmood, 2011). Lors des cultures en STR et en airlift, l'application de ces caractéristiques de transfert et de mélange à la culture pour obtenir la production n'a pas été nécessaire. Afin de tenter de comprendre la différence de comportement de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 dans les différents types de réacteurs, une comparaison a été effectuée entre trois cultures réalisées en fiole (Mehmood, 2011), en STR et en airlift. Pour se rapprocher des conditions de dissipation et de transfert en oxygène atteintes en STR et en

airlift, c'est la condition, en fiole, avec laquelle les valeurs de P / V et de $k_L a$ sont les plus faibles qui a été utilisée (Tableau V-2). Dans ces conditions, aucune production de pristinamycines n'a été mesurée en fiole (Mehmood, 2011).

Tableau V-2 : Valeurs de P / V et de $k_L a$ dans les trois conditions de culture comparées.

Type de réacteur	P / V (W/m^3)	$k_L a$ (h^{-1})
Réacteur mécaniquement agité (STR)	120	15
Airlift (AL)	8,7	18
Fiole	550	43

V.1.1. Influence de la nature du bioréacteur sur la croissance microbienne

La Figure V-1 fournit les cinétiques de croissance et des vitesses spécifiques instantanées de croissance durant les trois cultures réalisées dans chaque type de réacteur.

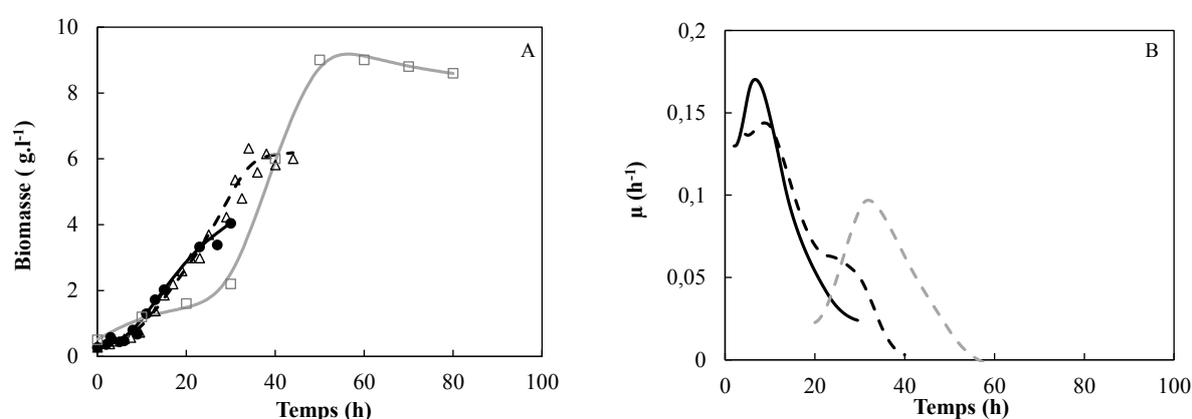


Figure V-1. Cinétiques de croissance de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 en STR (●, —), en AL (△, ---) et en fiole (□, —) (A) et des vitesses spécifiques de croissance respectives (B).

La plus forte concentration en biomasse (9 g.L^{-1}) est obtenue lors de la culture en fiole agitée (Mehmood, 2011). La concentration maximale de biomasse pour le réacteur airlift est de $6,5 \text{ g.L}^{-1}$. La mesure de la concentration de biomasse en STR n'a pas été effectuée après 30 h mais la cinétique de croissance et la valeur maximale obtenue (4 g.L^{-1}) semblent indiquer que cette concentration n'aurait pas atteint la concentration maximale obtenue en airlift.

Les valeurs maximales de vitesses spécifiques croissance sont obtenues en airlift et en STR ($0,15 \text{ h}^{-1}$). Cependant, et contrairement à la culture en fiole, la vitesse spécifique de croissance chute rapidement. La concentration en biomasse plus importante obtenue dans la fiole s'explique donc par un maintien de la croissance dans le temps.

V.1.2. Influence de la nature du bioréacteur sur la consommation de substrats

Le glutamate est consommé par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 dans un premier temps comme source de carbone et d'azote, intervient ensuite une consommation d'arginine et de glucose (Figure V-2, Figure V-3 et Figure V-4). La concentration finale de glucose non consommé est de 15 g.L^{-1} en fiole, de 13 g.L^{-1} pour le STR et l'airlift. Cela induit des rendements globaux biomasse/glucose sensiblement différents d'un type de réacteur à un autre : $0,6 \text{ g.g}^{-1}$ en fiole, $0,3 \text{ g.g}^{-1}$ en STR et $0,5 \text{ g.g}^{-1}$ en airlift.

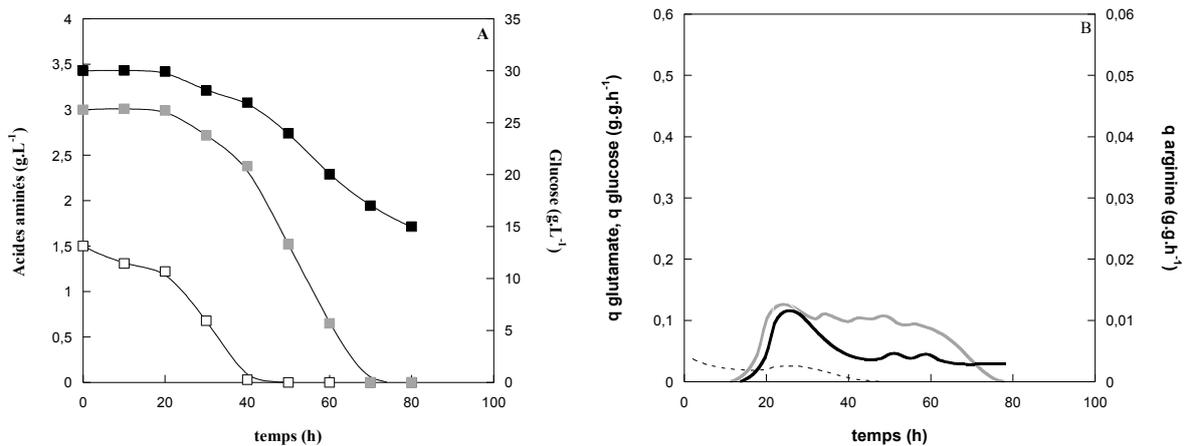


Figure V-2 : Cinétiques de consommation des substrats lors de la culture en fiole de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 (Mehmood, 2011) (■ et —, glucose, ■ et —, arginine, □ et ----, glutamate) (A) et vitesses spécifiques de consommation respectives (B).

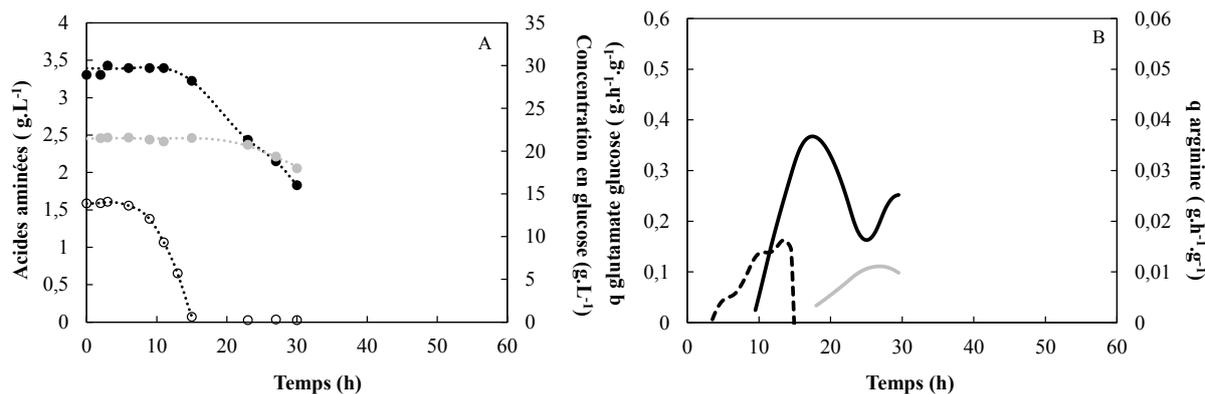


Figure V-3 : Cinétiques de consommation des substrats lors de la culture en STR de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 (● et —, glucose, ● et —, arginine, ○ et ----, glutamate) (A) et vitesses spécifiques de consommation respectives (B).

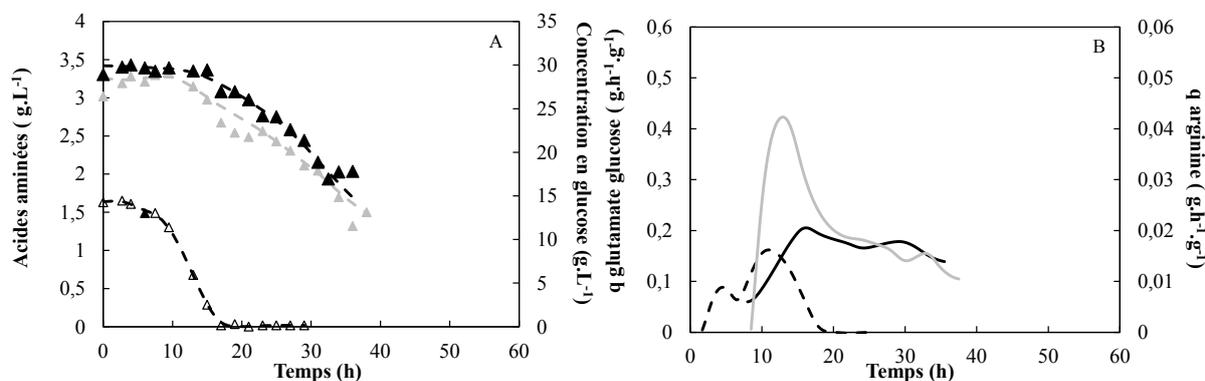


Figure V-4 : Cinétiques de consommation des substrats lors de la culture en airlift de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 (▲ et —, glucose, ▲ et —, arginine, △ et ----, glutamate) (A) et vitesses spécifiques de consommation respectives (B).

Concernant les aspects cinétiques, la vitesse spécifique de consommation d'acide glutamique s'est établie à $0,16 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ après 12 h en STR, valeur proche de celle obtenue en airlift ($0,15 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$) après 13 h. Par contre, en fiole, cette vitesse est beaucoup plus faible puisqu'elle atteint seulement $0,03 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Elle reste cependant non nulle pendant 40 h alors que dans les deux autres réacteurs, tout le glutamate est consommé avant 20 h de culture.

La vitesse spécifique de la consommation de l'arginine, est plus importante en réacteur airlift ($0,04 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ après 14 h de culture) par rapport à $0,01 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ après 24 h en réacteur mécaniquement agité. Dans la fiole, la vitesse spécifique de consommation d'arginine

maximale est du même ordre de grandeur que lors de la culture en STR. Il est difficile de savoir si ces différences peuvent réellement être considérées comme significatives.

La vitesse spécifique maximale de consommation de glucose varie peu entre le STR et l'airlift puisque sa valeur est comprise entre 0,35 et 0,24 $\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Elle est nettement plus faible en fiole où elle atteint au maximum 0,1 g.g.h^{-1} .

V.1.3. Influence de la nature de bioréacteur sur la production de pristinamycines

La Figure V-5 présente la cinétique de production de pristinamycines durant les cultures en STR et en airlift. Aucune production de pristinamycines n'est mesurée lors de la culture en fiole (Mehmood, 2011). Quel que soit le type de bioréacteur utilisé, la production des pristinamycines a lieu durant la phase de croissance avec un moment de déclenchement de 12 h en STR et de 17 h en airlift.

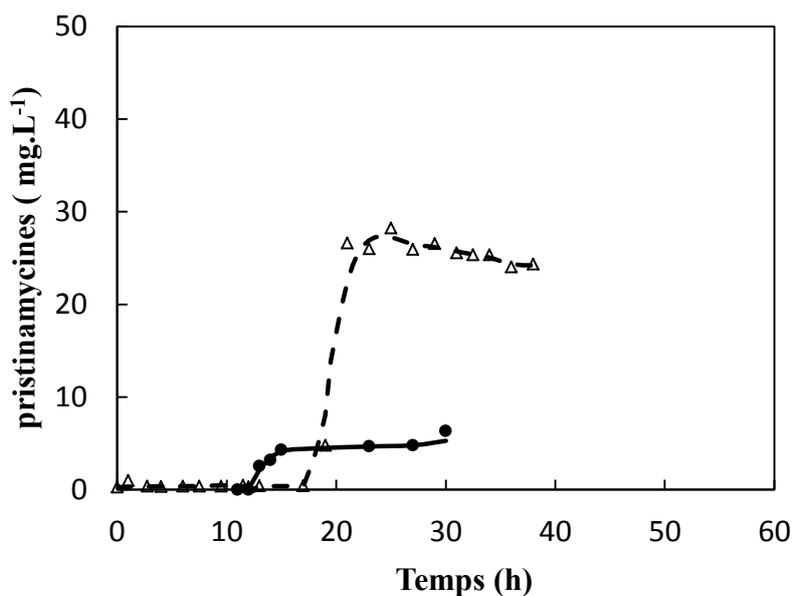


Figure V-5 : Evolution de la concentration de pristinamycines durant les cultures en STR (●) et en airlift (△).

On constate une différence importante de concentration maximale de pristinamycines entre les cultures : 28 mg.L^{-1} en réacteur airlift pour seulement 5 mg.L^{-1} en STR. Par ailleurs, le rendement $[\text{pristinamycines}] / [\text{biomasse}]$ est de 2,5 mg.g^{-1} en réacteur mécaniquement agité, si on considère le temps de culture pour lequel la concentration en pristinamycines est

maximum, pour une valeur de $9,3 \text{ mg.g}^{-1}$ en airlift. A P / V et $k_L a$ équivalents, un régime générant davantage de turbulence (comme c'est le cas pour le STR) serait donc défavorable à la production de pristinamycines tant au niveau du rendement qu'en termes de concentration finale d'antibiotiques. Des interprétations cinétiques sont difficiles à formuler en termes de comparaison de vitesses spécifiques de production de pristinamycines car on atteint des maxima de concentrations très rapidement après le déclenchement de la production.

Si on compare la production de pristinamycines à la consommation des substrats, on constate que le déclenchement de la production intervient soit en fin de phase de consommation de glutamate (STR), soit après la disparition de glutamate (airlift).

Dans la culture en réacteur mécaniquement agité, la production de pristinamycines (après 12 h de culture) intervient alors que le glucose et l'arginine ont été très peu consommés. En airlift, la production arrive plus tardivement (à 17 h). Une consommation de substrats plus avancée est observée lors de cette production.

V.1.4. Impact de la nature du bioréacteur sur la morphologie bactérienne

La Figure V-6 présente l'allure de la morphologie des bactéries au moment du déclenchement de la production de pristinamycines en STR et en airlift et après 30 h de culture en fiole. Le type de morphologie observé en airlift est un enchevêtrement avec une taille comprise entre $70\text{-}150 \text{ }\mu\text{m}$ de longueur et $30\text{-}120 \text{ }\mu\text{m}$ de largeur. En revanche, très peu de pelotes sont observées. En réacteur mécaniquement agité, la pelote est la principale structure observée au moment de la synthèse et la production de pristinamycines avec un diamètre moyen de $170 \text{ }\mu\text{m}$. En fiole, la pelote est également le principal morphotype. Globalement, on observe des pelotes de plus petites tailles en fioles agitées en comparaison des expériences menées en STR.

Il est difficile de relier la production de pristinamycines à un type de morphologie. En effet, des pelotes, de taille similaire, sont présentes en fiole et en STR. Or, la production de pristinamycines n'est observée que dans ce dernier réacteur. Par contre, une différence de compacité existe entre les pelotes du STR et les enchevêtrements de l'airlift. Cet élément est sans doute à considérer pour expliquer les différences de comportement physiologique notamment en termes de concentrations maximales d'antibiotiques produites dans ces deux réacteurs.

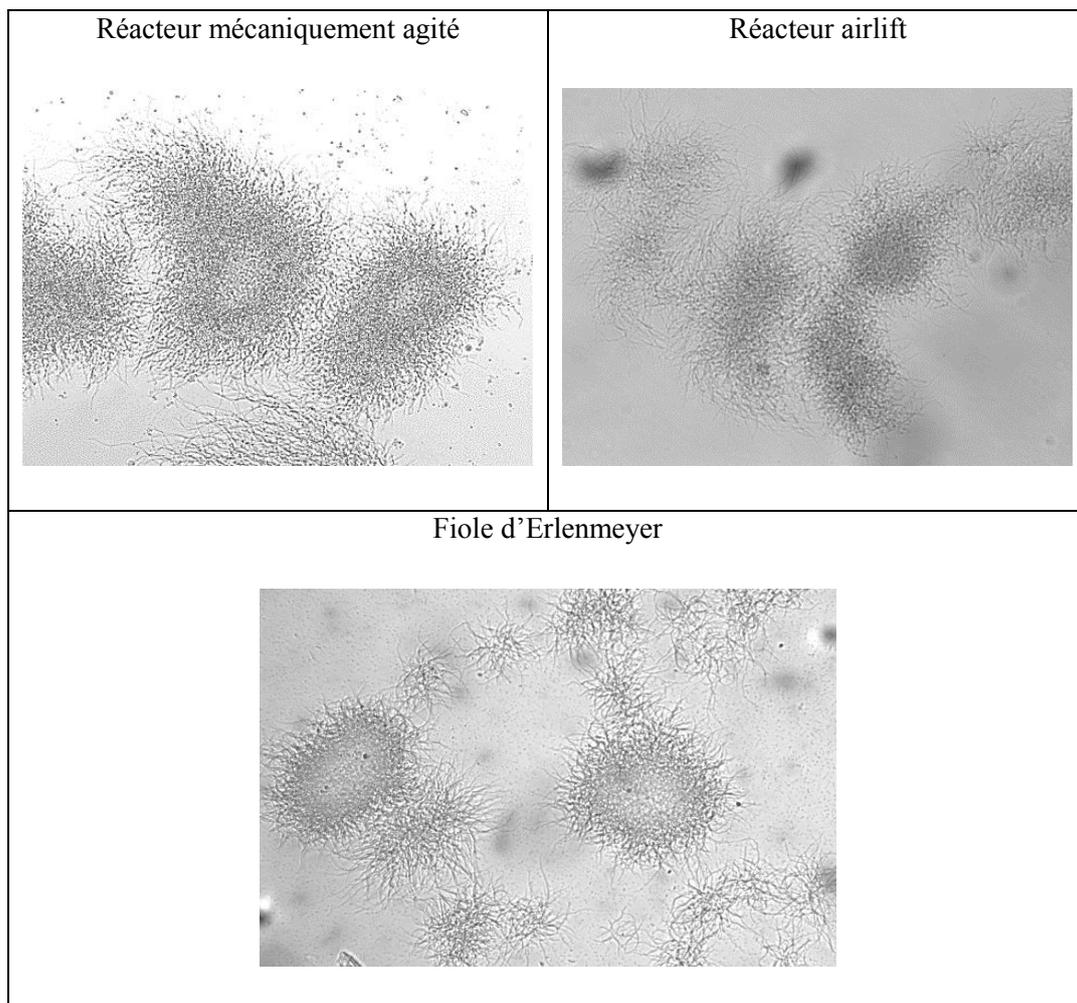


Figure IV-6. Morphologies majoritaires lors de cultures en réacteur mécaniquement agité (x400), en réacteur airlift (x400) et en fiole d'Erlenmeyer (Mehmood, 2011) (x400).

V.1.5. Discussion

Lors des expérimentations menées en airlift et en STR pour les conditions opératoires choisies ici, on ne constate pas de différences significatives en termes de vitesses spécifiques de croissance ou de consommation de substrats, en général. Les écarts observés concernent principalement les concentrations maximales de biomasse (même si un doute subsiste sur le STR) et de pristinamycines ainsi que les rendements pristinamycines / biomasse qui sont nettement supérieurs en airlift qu'en STR. Peu de travaux de la littérature comparent ces deux types de réacteurs. Schugerl (1990) a néanmoins montré que la vitesse maximale de production de pénicilline par rapport à la consommation de substrats était de $1,3 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en airlift et de $1 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en réacteur mécaniquement agité, ce qui semble accréditer de meilleures performances en airlift pour d'autres microorganismes filamenteux tels que *Penicillium*.

Par contre, le comportement de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 est complètement différent en fiole (pour des valeurs de P / V et k_La de $0,55 \text{ kW.m}^{-3}$ et 43 h^{-1} , respectivement). Dans ces conditions de dissipation et de transfert en oxygène, toutes les vitesses spécifiques sont beaucoup plus faibles qu'en STR et en airlift et surtout, la production de pristinamycines est inexistante. En STR et en airlift, le seuil de déclenchement de la production de pristinamycines est variable et paraît en lien avec la consommation du glutamate sur les essais présentés. Lors de travaux en fiole, la production, à des conditions de dissipation et d'aération supérieures à celles présentées ici, intervenait lors de la limitation en azote et pour un $k_La > 100 \text{ h}^{-1}$ (Mehmood, 2011).

Concernant le déclenchement de la production de pristinamycines, des observations similaires à celles de notre étude ont été constatées lors de travaux de Corvini (2000) et Saffroy (2006) avec une autre souche de *S. pristinaespiralis*, la souche pr11. Au moment de la production précoce en phase de croissance (après 13 h) dans les travaux de Saffroy (2006), le glutamate était pratiquement consommé, en revanche le glucose et l'arginine ne l'étaient que très modérément. Cependant, dans les travaux de Corvini (2000) avec une production en début de phase stationnaire de croissance, au moment du déclenchement de la production (après 25 h), le glutamate et l'arginine étaient totalement consommés.

V.2. Influence des variations de concentrations en oxygène dissous sur le déclenchement de la production de pristinamycines

Lors du procédé de production de pristinamycines, *S. pristinaespiralis* est soumis à un environnement physico-chimique potentiellement instable. En effet, les concentrations en substrats auxquelles la bactérie est confrontée au cours du procédé peuvent être très variables. C'est notamment le cas de la concentration en oxygène dissous, en particulier lors du passage de la préculture à la culture. O'Donnell et al. (2007) ont constaté qu'à l'issue d'une préculture en fiole d'Erlenmeyer, le passage d'*Aspergillus niger* d'un environnement peu turbulent et pauvre en O₂ (pression partielle d'oxygène < 6 % de la saturation en air) à un environnement plus turbulent et oxydant (pression partielle d'oxygène = 100 % de la saturation en air) en réacteur mécaniquement agité induisait une augmentation quasi-immédiate de la concentration en radical superoxide (O₂⁻). Cette brusque augmentation de la concentration en O₂⁻ peut avoir une influence sur la régulation des voies de biosynthèse et, par conséquent, sur la productivité des microorganismes. De fait, il a été montré que, dans une culture de *S. clavuligerus*, un stress oxydatif, induit par l'ajout de 10 µM de méthosulfate de phénazine, conduit à une augmentation de la concentration en acide clavulanique produit, de 250 à 320 µM (Kwon et al., 1998).

Nous nous sommes donc demandé si la variation de la concentration en oxygène dissous subie par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, lors de l'ensemencement de la culture principale, pouvait avoir une influence sur le moment de déclenchement de la production des pristinamycines.

V.2.1. Evolution de la concentration en oxygène dissous lors de la préculture en milieu ICS

Afin de déterminer la concentration finale en oxygène dissous lors des précultures, un suivi de la concentration en oxygène dissous a été réalisé lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur le milieu ICS en fiole chicanée. Ce suivi de la concentration en oxygène dissous a été réalisé à l'aide d'un capteur d'oxygène optique (Figure N-7). Aucun apport en air n'est réalisé lors de la préparation du milieu de préculture.

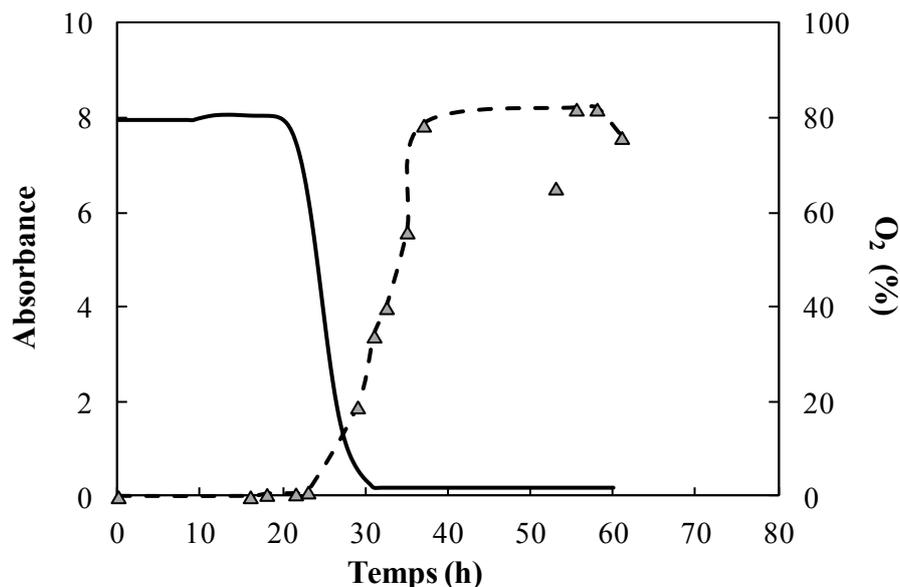


Figure V-7 : Cinétiques de concentration en oxygène dissous (—) et d'absorbance à 660 nm (▲) lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338, en milieu ICS et en fiole d'Erlenmeyer chicanée.

Après une première phase pendant laquelle la concentration en oxygène dissous ne varie pas et reste de l'ordre de 80 % de la saturation en air, la concentration en oxygène dissous chute brutalement après 20 h de culture pour devenir nulle après 31 h de culture. Cette allure en deux phases peut être reliée pour la première partie à la germination des spores introduites dans le milieu de culture puisque, dans le même temps, la densité optique du milieu de culture ne varie pas. La seconde est probablement liée à la reproduction végétative des cellules, la consommation d'oxygène coïncidant avec l'augmentation de la densité optique donc de la population bactérienne. Ainsi lorsqu'une préculture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 est utilisée pour ensemer du milieu MPS2, la croissance est arrêtée lorsque la densité optique à 600 nm atteint une valeur de 4. A un tel niveau, la concentration en oxygène dissous est proche de zéro (Figure V-7). Les bactéries passent donc d'un environnement quasiment dépourvu d'oxygène à un milieu saturé en oxygène lors de l'étape d'ensemencement du milieu de culture (MPS2).

V.2.2. Adaptation du protocole de culture afin d'étudier l'influence de la variation de la concentration en oxygène dissous entre la fin de la préculture et la culture

Le contrôle de la concentration en oxygène dissous n'étant pas réalisable en fiole d'Erlenmeyer, le protocole classiquement utilisé (cf. chapitre II) a dû être adapté. Une étape intermédiaire entre la préculture en fiole, sur milieu ICS et la culture en bioréacteur mécaniquement agité, sur milieu MPS2, a été ajoutée. Cette étape est réalisée sur milieu ICS mais en réacteur parfaitement agité ce qui permet de mesurer et de contrôler la concentration en oxygène dissous (Figure V-8). Afin de peu modifier le niveau d'énergie dissipée dans le réacteur, l'oxygénation du milieu de culture est régulée en modifiant la nature du gaz injecté dans le réacteur (modification de la proportion relative d'air, d'oxygène ou d'azote) sans variation de la fréquence d'agitation. Celle-ci a été fixée à 700 rpm pour la préculture en bioréacteur mécaniquement agité et à 560 rpm pour la culture.

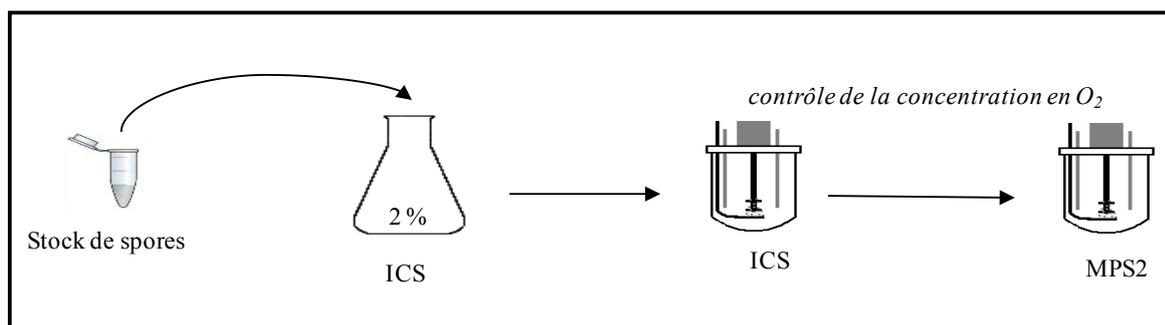


Figure V-8 : Etapes du protocole appliqué pour l'étude de l'influence de la variation de la concentration en oxygène dissous entre la préculture et la culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338.

Plusieurs conditions de variation de la concentration en oxygène dissous entre la préculture et la culture ont été testées (Tableau V-3). Lors de deux expérimentations, la concentration en oxygène dissous a été maintenue constante entre la préculture et la culture mais à deux niveaux : 80 et 50 % de la saturation en air. Par la suite, ces 2 conditions seront nommées 80-80 et 50-50, respectivement. Dans une troisième expérience, la concentration en oxygène dissous lors de la préculture est maintenue à 80 % alors que cette concentration est régulée à 50 % dès le début de la culture. Cette condition sera nommée, 80-50. Enfin, dans une dernière

expérience, la concentration en oxygène dissous sera toujours régulée à 80 % mais les cellules seront transférées dans une culture où la concentration en oxygène dissous sera maintenue à 150 % de la saturation en air par un enrichissement de l'air en oxygène. Cette condition de culture sera nommée 80-150. Il est à noter que le maintien de la concentration en oxygène dissous à 80 et 50 % lors des précultures est assuré par l'ajout d'air et d'air enrichi en azote (70 % air, 30 % azote), respectivement.

Tableau V-3 : Différentes conditions de concentration en oxygène dissous (%) testées lors de précultures et de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 réalisées en bioréacteur mécaniquement agité

appellation	O ₂ (% sat.air) finale (préculture)	O ₂ (% sat. air) initiale (culture)
80-80	80	80
50-50	50	50
80-50	80	50
80-150	80	150

V.2.3. Influence des variations de concentration en oxygène dissous lors du procédé de production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ40338

V.2.3.a. Influence de la concentration en oxygène dissous sur les cinétiques de consommation des principaux substrats par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

Les cinétiques de consommation de substrat montrent peu de différences notables entre les quatre conditions d'aération étudiées. Comme vu précédemment, le glutamate est le substrat consommé préférentiellement. Ici, il est totalement consommé après 10 à 12 h de culture et ce, quel que soit le niveau d'oxygénation du milieu de culture (Figure V-9 et Figure V-10). Les vitesses spécifiques de consommation sont similaires, entre 0,1 et 0,2 g.g⁻¹.h⁻¹.

L'arginine, qui est consommée concomitamment au glucose, est entièrement utilisée lors des procédés sans variation de la concentration en oxygène dissous entre la préculture et la culture

(Figure N-9). Par contre, à peu près $2,5 \text{ g.L}^{-1}$, sont encore présents dans le milieu de culture en fin des cultures 80-50 et 80-150 (Figure N-9 et Figure N-10). La vitesse spécifique de consommation d'arginine est assez variable selon les conditions d'oxygénation. Alors que pour les cultures 80-50 et 80-150, elle est de l'ordre de $0,2 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$, au maximum, elle atteint $0,3 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ lors de la culture 50-50 et même $0,5 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ lors de la culture 80-80.

Dans toutes les cultures, le glucose est entièrement consommé. Néanmoins, alors le glucose n'est plus présent dans le milieu après environ 30 h de culture lors des cultures 80-50 et 80-150, il faut attendre quelques heures supplémentaires pour qu'il soit entièrement consommé lors des cultures 80-80 et 50-50. Les vitesses spécifiques de consommation de glucose sont très similaires dans toutes les conditions de culture testées avec une vitesse maximum de l'ordre de $0,2 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Figure N-9 et Figure N-10). Cette valeur maximum est atteinte après 8 à 15 h de culture selon la concentration en oxygène dissous et sa variation éventuelle.

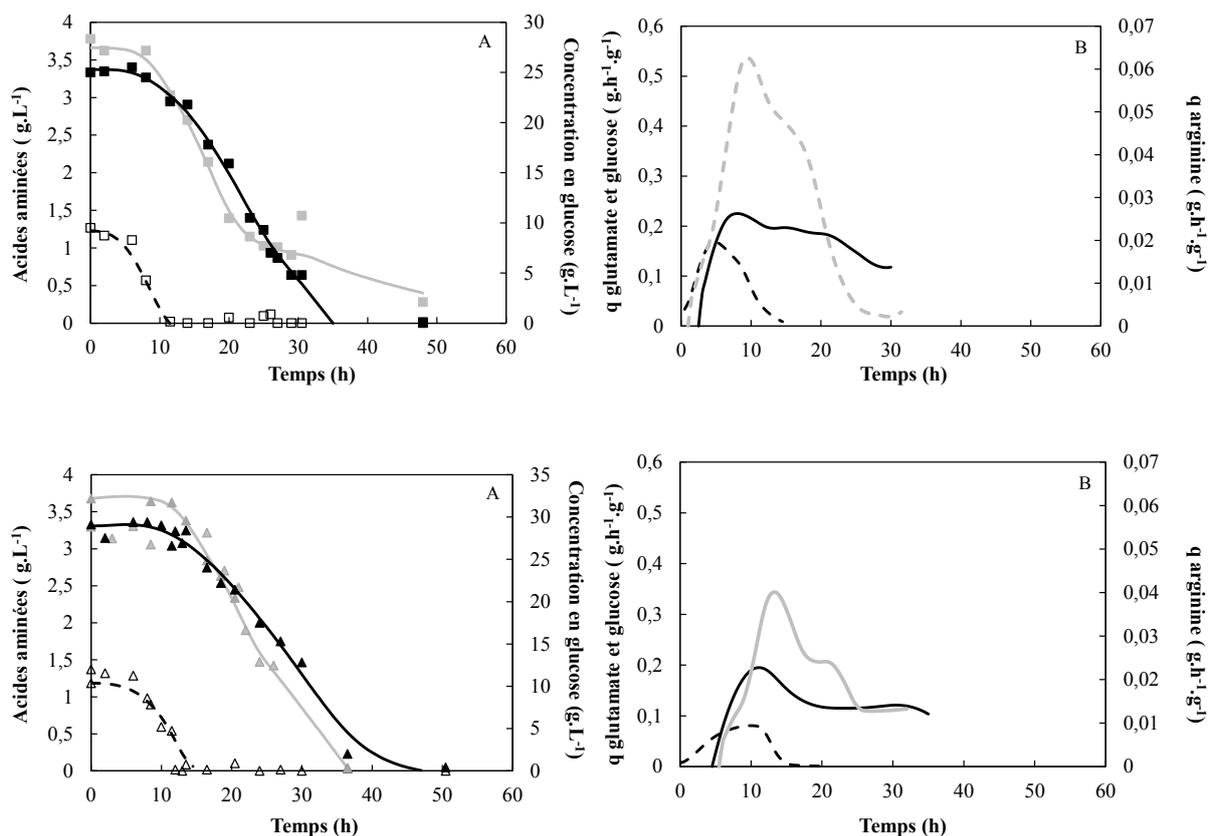


Figure N-9 : Evolution des concentrations en substrats (A) lors des cultures 80-80 (■, glucose, ■, arginine et □, glutamate) et 50-50 (▲, glucose, ▲, arginine et △, glutamate) avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et des vitesses spécifiques de consommation correspondantes (B), $q_{\text{glutamate}}$ (---), q_{glucose} (—) et q_{arginine} (—).

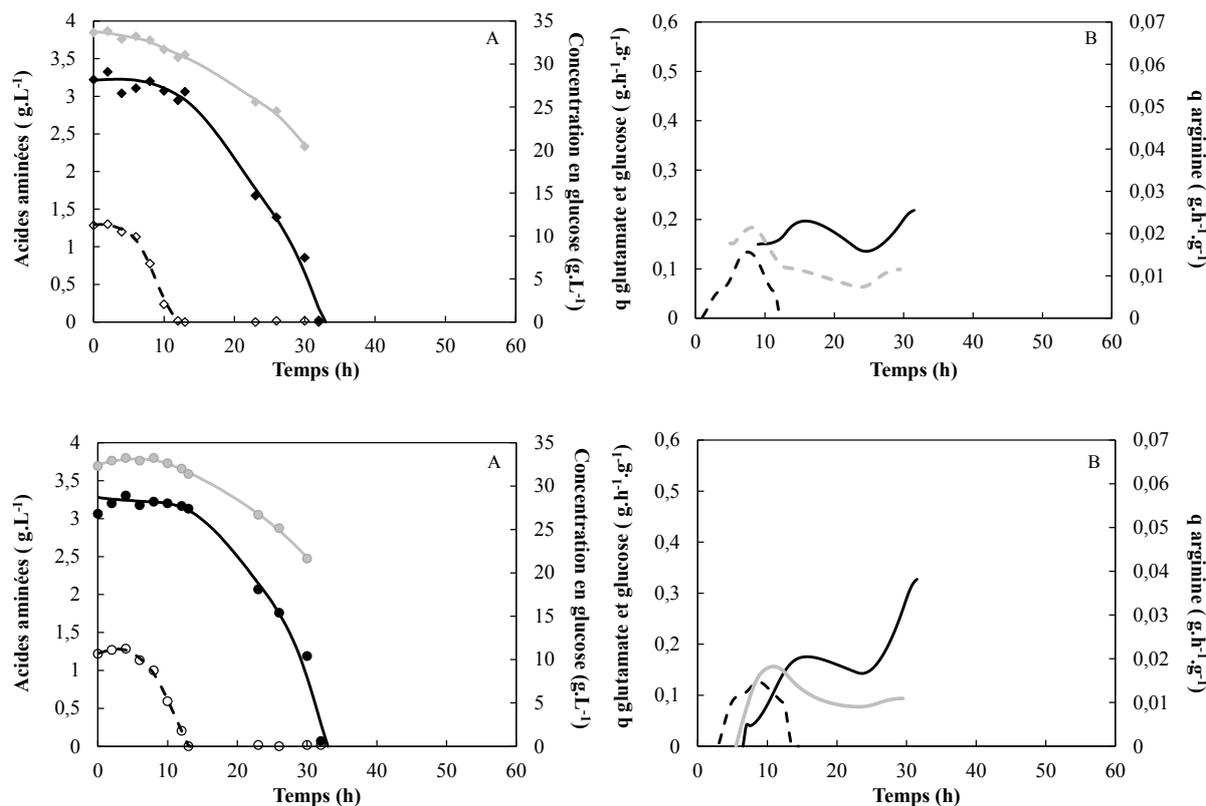


Figure V-10. Evolution des concentrations en substrats (A) lors des cultures 80-150 (◆, glucose, ♦, arginine ◇, glutamate) et 80-50 (●, glucose, ●, arginine, ○, glutamate) avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et des vitesses spécifiques de consommation correspondantes, $q_{glutamate}$ (- -), $q_{glucose}$ (—) et $q_{arginine}$ (—).

V.2.3.b. Influence de la concentration en oxygène dissous sur la croissance de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

La concentration en biomasse maximum obtenue lors des cultures 50-50, 80-50 et 80-150 est similaire, de l'ordre de 10 g.L^{-1} . Par contre, au cours de la culture 80-80, celle-ci atteint seulement 8 g.L^{-1} . En ce qui concerne la vitesse spécifique de croissance, la valeur la plus grande est mesurée lors de la culture 80-80, avec $0,27 \text{ h}^{-1}$. Lors des autres cultures, la vitesse spécifique de croissance maximale est de l'ordre de $0,2 \text{ h}^{-1}$. Par contre, lors de ces cultures, la croissance se maintient légèrement plus dans le temps ce qui explique la concentration en biomasse plus importante obtenue dans ces conditions de culture (Figure V-11 et Figure V-12).

Il est à noter que les concentrations maximales en biomasse obtenues sont légèrement supérieures à celles mesurées pour les cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 réalisées sans l'étape intermédiaire en réacteur mécaniquement agité, sur milieu ICS (chapitre III). Le contrôle de la concentration en oxygène dissous lors de l'étape de préculture à un niveau plus important que celui mesuré lors des cultures en fioles d'Erlenmeyer pourrait être responsable ce phénomène.

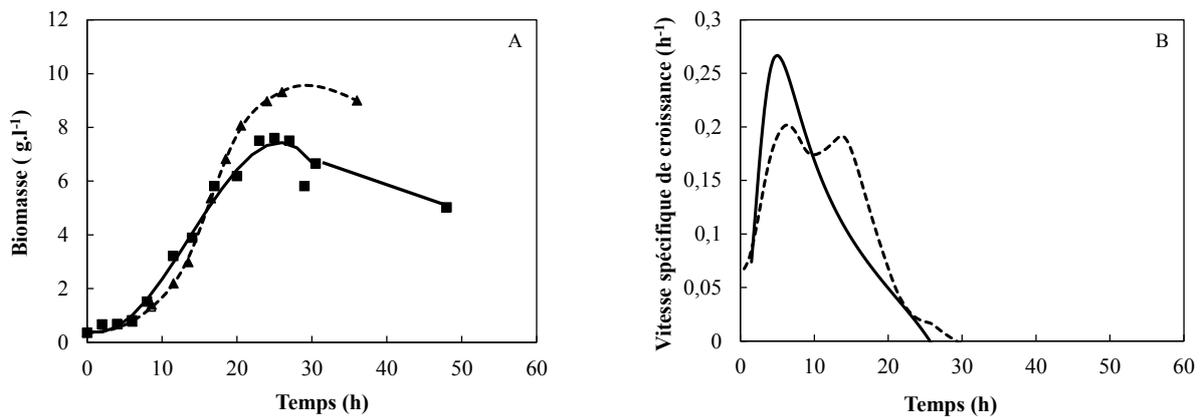


Figure N-11. (A) Cinétiques de croissance de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour les cultures 80-80 (■) et 50-50 (▲) B) et de la vitesse spécifique de croissance correspondante (B) pour 80-80 (-) et 50-50 (---).

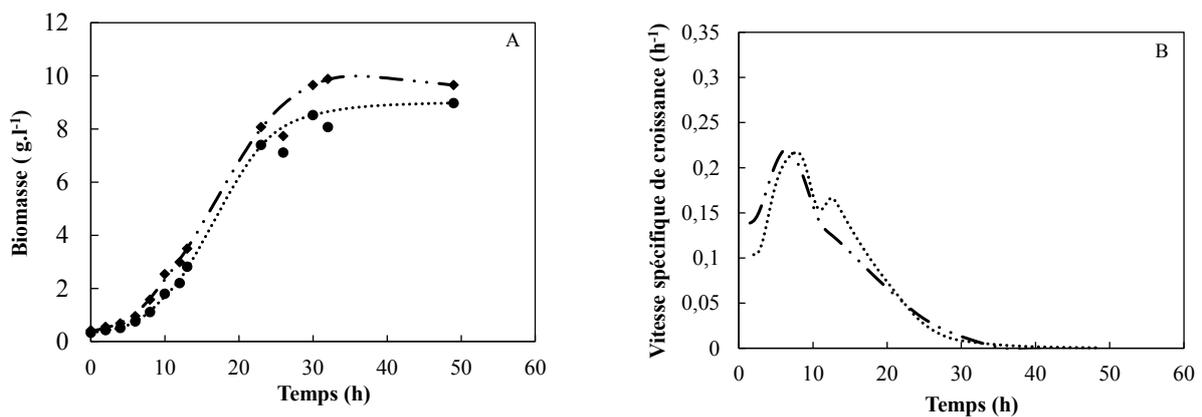


Figure N-12. (A) Cinétiques de croissance de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour les cultures 80-50 (◆) et 80-150 (●) et de la vitesse spécifique de croissance correspondante (B) pour 80-50 (- - -) et 80-150 (···).

V.2.3.c. Influence de la concentration en oxygène dissous sur la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

L'observation la plus marquante est la production de pristinamycines après 22 h de culture lors de la culture 80-80 alors que pour les 3 autres conditions, la production d'antibiotiques est intervenue après seulement 10 h de culture environ (Figure V-13). Lors de la culture 80-80, la production de pristinamycines intervient donc lors de l'entrée des cellules en phase stationnaire de croissance tandis que pour les autres cultures elle intervient lors de la phase de croissance, alors que la vitesse spécifique de croissance est proche de sa valeur maximum. Il est à noter que la culture 80-80 a été répétée et que la production en début de phase stationnaire de croissance a été confirmée.

La culture 80-80 est également celle qui permet d'obtenir la concentration la plus élevée d'antibiotiques avec environ 200 mg.L^{-1} au maximum. Les autres conditions de culture ne permettent d'obtenir qu'entre 18 et 38 mg.L^{-1} (Figure V-13).

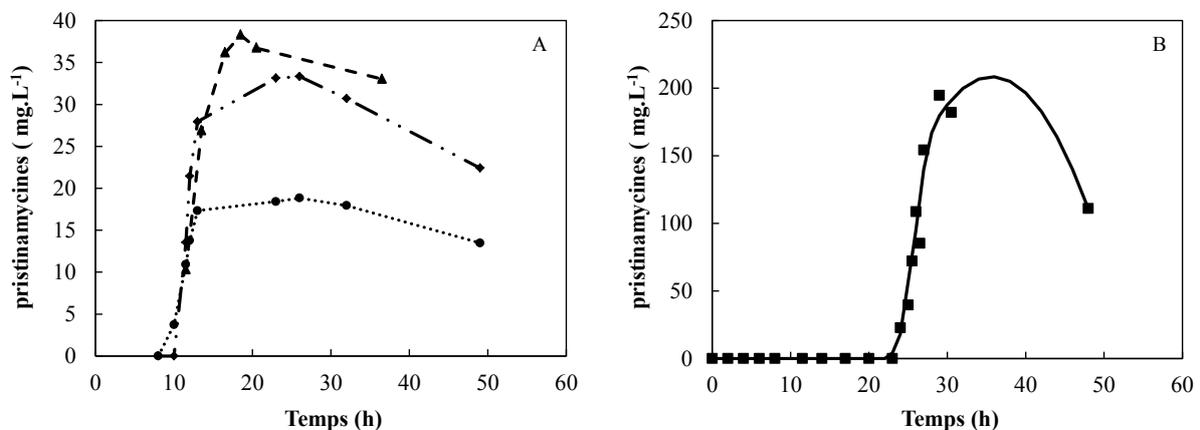


Figure V-13 : Cinétiques de production de pristinamycines obtenues avec *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 pour les cultures 50-50 (A, ▲), 80-50 (A, ◆), 80-150 (A, ●) et 80-80 (B, ■).

Le rendement $[\text{pristinamycines}] / [\text{biomasse}]_{\text{max}}$ le plus élevé est obtenu pour la culture 80-80. Alors qu'un rendement similaire est mesuré pour les cultures 80-50 et 50-50 (3,8 et 3,4 respectivement), le rendement le plus faible est obtenu lors de la culture 80-150 (Tableau V-4). La concentration en biomasse étant similaire pour ces trois dernières conditions de culture, ce résultat laisse penser que les cellules présentent un métabolisme moins orienté vers

la production de pristinamycines lors de la culture 80-150 que lors des autres conditions de cultures. Le nombre de radicaux oxygène, nocifs aux cellules, étant proportionnel à la pression partielle en oxygène (Sawatzky, 2009), cette baisse de rendement de synthèse des pristinamycines pourrait être attribué à un stress oxydatif.

Tableau V-4. Influence de l'oxygénation du milieu sur le rendement $Y_{P/X}$

culture	[pristinamycines] (mg.L ⁻¹)	$Y_{P/X}$ (mg.g ⁻¹)
80-80	200	25
80-50	33	3,8
80-150	18	2,1
50-50	38	3,4

Lors des cultures avec une production de pristinamycines précoce, le début de l'excrétion d'antibiotiques coïncide avec la fin de la consommation du glutamate. Il est cependant difficile de relier l'excrétion des pristinamycines à la consommation du glutamate puisque lors de la culture 80-80, le glutamate est également consommé en environ 10 h sans que cela corresponde avec la production d'antibiotiques. Lors de travaux précédents (Mehmood et al., 2011), réalisés en fioles d'Erlenmeyer, l'excrétion de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* pr 11 avait été reliée à une limitation par la source en azote (concentration résiduelle proche de 0) et une oxygénation non-limitante. Lors de la culture 80-80, la production d'antibiotiques intervient, de façon surprenante, alors que la concentration en arginine dans le milieu de culture est encore de 1 g.L⁻¹ ce qui, *a priori*, ne constitue pas une concentration limitante pour l'apport en azote. Cependant, cette valeur de concentration globale ne donne pas d'indication concernant les champs de concentration locaux notamment à proximité des pelotes de *S. pristinaespiralis*. Ainsi, lors de cultures en fioles, une augmentation de la puissance dissipée jusque 3,3 kW.m⁻³ induisait une consommation plus précoce de l'arginine suggérant que, pour des valeurs de puissances dissipées inférieures, la totalité de l'arginine à proximité de la pelote était consommée et non renouvelée pouvant ainsi engendrer une limitation nutritionnelle locale. Au-delà de cette valeur de 3,3 kW.m⁻³, plus aucun changement n'était noté (Mehmood et al., 2011). Cependant, lors de la culture 80-80, la puissance dissipée est de

5,4 kW.m⁻³ ce qui, en théorie, devrait permettre un renouvellement suffisant des substrats dans l'environnement immédiat des pelotes et éviter le phénomène de limitation nutritionnelle.

V.2.3.d. Influence de la concentration en oxygène dissous sur la morphologie de *S. pristinaespiralis* DSMZ40338

Bien que, lors de cultures en fiole, la taille des pelotes formées par *S. pristinaespiralis* soit essentiellement liée aux conditions hydrodynamiques rencontrées par la bactérie, l'influence de l'oxygène n'est pas nulle (Mehmood et al., 2012). La taille des agrégats cellulaires formés par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 a donc été suivie au cours de la préculture sur ICS et des cultures avec différents niveaux de concentrations en oxygène dissous.

i. Morphologie de *S. pristinaespiralis* DSMZ40338 lors de la préculture sur milieu ICS

Comme dit précédemment, afin d'assurer la régulation de la concentration en oxygène dissous dans la préculture, deux gaz différents ont été utilisés en fonction de la concentration visée. Un suivi de la taille des agrégats cellulaires a donc été réalisé sur les deux précultures utilisées au cours de cette étude.

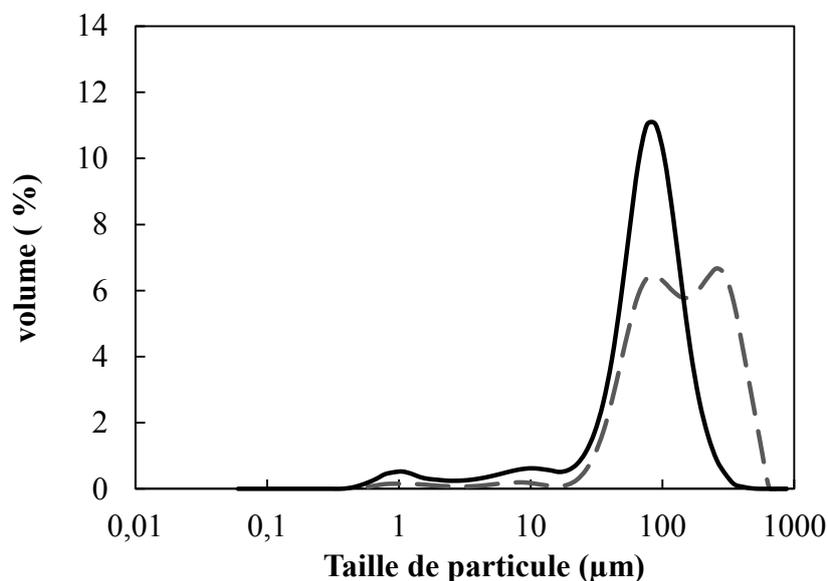


Figure N-14. Taille des agrégats cellulaires mesurée à l'issue des précultures en ICS de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40883. Régulation à 80 % en oxygène dissous avec 1 L.min⁻¹ d'air (—) et à 50 % avec 0,7 L.min⁻¹ d'air et 0,3 L.min⁻¹ d'azote (---).

Au cours des deux précultures, ce sont principalement des enchevêtrements qui sont observés. Quelques pelotes sont néanmoins présentes. La répartition de la taille des agrégats cellulaires est différente entre les deux cultures. Alors que lorsque la concentration en oxygène dissous est régulée à 50 % de la saturation en air avec un mélange d'air et d'azote, une population homogène est observée, avec une taille centrée sur 76 μm , dans la seconde préculture, deux populations sont présentes alors des tailles centrées sur 76 et 220 μm .

ii. Influence de l'oxygène sur la morphologie de *S. pristinaespiralis* DSMZ40338 en culture

Dans toutes les cultures, des pelotes et des enchevêtrements sont présents. Cependant, ces derniers représentent le morphotype majoritaire quelle que soit la condition de culture (données non montrées). Pour la culture 50-50, aucune modification de la répartition des tailles d'agrégats n'est mesurée entre la préculture et la culture : une seule population avec une taille non modifiée est présente que ce soit après 10 h ou 23 h de culture (Figure V-15). Lors des cultures 80-50 et 80-150, les deux populations présentes lors de la préculture sont encore présentes lors des cultures. Cependant, la taille des plus gros agrégats tend à augmenter puisqu'elle est centrée sur 400 et 300 μm après 10 h de culture avec les conditions 80-150 et 80-50, respectivement. Après 23 h de culture, dans ces conditions de culture, la taille des agrégats a tendance à s'homogénéiser. Lors de la culture 80-80, la population des gros agrégats présente en fin de préculture disparaît entièrement dès 10 h de culture au profit de la population centrée autour de 76 μm (Figure V-15).

La production de pristinamycines après 10 h de culture dans les conditions 80-50 et 80-150 semble être corrélée à la présence d'agrégats (enchevêtrements ou pelotes) de grand diamètre, de 300 et 400 μm (Figure V-15 et Tableau V-5). Au contraire, la présence d'une seule population de taille plus petite après 23 h semble correspondre à la production de pristinamycines en fin de phase de croissance. Ce résultat est en accord avec des travaux précédents qui suggéraient que la présence de petites pelotes pouvaient être favorables à la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* (Mehmood et al., 2012).

Lors de la condition 50-50, une seule population de petits agrégats, centrés autour de 76 μm est présente pendant la culture. Pourtant, avec cette population, quasi-identique à celle

observée lors de la culture 80-80, la production de pristinamycines est obtenue pendant la phase de croissance (Figure N-13).

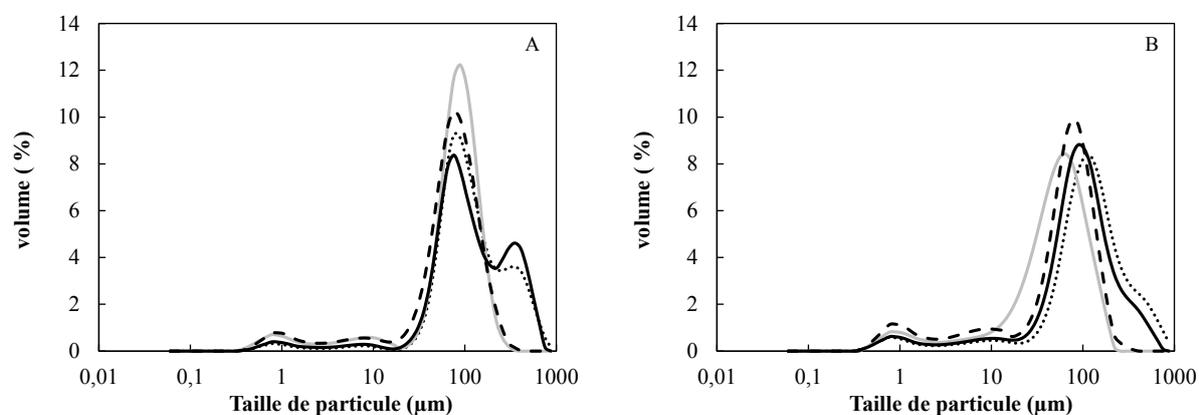


Figure N-15 : Taille des agrégats cellulaires mesurée lors des cultures sur MPS2 de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40883 après 10 h (A) et 23 h (B) de culture pour les conditions 80-80 (— —), 50-50 (—), 80-50 (—) et 80-150 (···).

Tableau N-5 : Taille des agrégats cellulaires mesurée lors des cultures sur MPS2 de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40883 après 10 h de culture pour les conditions 80-80, 80-50, 80-150 et 50-50.

Condition de culture	Préculture		Culture	
	O ₂ finale (% sat. air)	Taille de particule (µm)	O ₂ initiale (% sat. air)	Taille de particule (µm)
80-150			150	88 et 400
80-80	80	76 et 222	80	76
80-50			50	76 et 300
50-50	50	76	50	76

Il est difficile d'expliquer les changements de répartition de tailles d'agrégats observés entre la préculture réalisée avec une concentration d'oxygène dissous régulée à 80 % de la

saturation en air et les cultures suivantes. Il a déjà été montré qu'un air enrichi par ajout de 25 % v/v d'oxygène, conduisant à une concentration en oxygène dissous de 165 % dans des cultures d'*A. niger*, induisait une augmentation de l'adhésion entre les hyphes d'*A. niger* (Kreiner et al., 2002). De même, en environnement oxydatif, la diminution de la surface des microorganismes par l'agrégation est une méthode d'adaptation à la toxicité des espèces d'oxygène réactives qui sont présentes dans un milieu riche en oxygène (Gessler et al., 2007). Cependant, d'autres auteurs ont conclu que la morphologie d'*Aureobasidium pullulans* n'était pas influencée par la concentration en oxygène dissous (Gibbs et al., 1996).

V.2.4. Discussion et conclusion

Afin de tester l'influence de la concentration en oxygène dissous lors du passage de la préculture à la culture, plusieurs conditions opératoires ont été utilisées en bioréacteur mécaniquement agité :

- Une forte augmentation de la concentration en oxygène dissous avec l'apparition d'un stress oxydatif possible (culture 80-150). C'est notamment le cas lors du procédé classique avec passage des cellules de 0 à 100 % d'oxygène dissous.
- Une absence de variation mais application de deux niveaux d'oxygénation lors de la culture (cultures 80-80 et 50-50).
- Une réduction de la concentration en oxygène dissous (culture 80-50).

Seule l'absence de variation de la concentration en oxygène, avec le niveau de transfert en oxygène le plus important, a permis d'obtenir la production de pristinamycines en fin de phase de croissance. Dans tous les autres cas, la production a été obtenue pendant la phase de croissance. Néanmoins, avec les expériences réalisées il reste difficile de préciser si la variation (ou l'absence de variation) de la concentration en oxygène dissous ou le niveau de transfert en oxygène dans la culture est responsable des résultats observés. En effet, le transfert en oxygène de la phase liquide vers la structure bactérienne dépend de la turbulence escomptée au sein du bioréacteur qui, ici, est constante entre les différentes expériences (mêmes agitations appliquées et débits de gaz similaires) ainsi que de la force motrice du flux de transfert en oxygène ($[O_2]_{\text{liquide}} - [O_2]_{\text{interface des pelotes}}$). Dans ces conditions, si on considère que l'étape limitante du transfert d'oxygène est la diffusion d'oxygène au sein des pelotes, une augmentation de la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide devrait, pour des conditions de transfert identiques, promouvoir une meilleure pénétration de l'oxygène au

sein des pelotes. Ainsi, l'oxygénation intra-pelotes sera favorisée pour la condition 80-150, intermédiaire dans la condition 80-80 et, enfin, plus faible lors des cultures 80-50 et 50-50. Il a été montré lors de culture en fioles que le transfert en oxygène était un paramètre clé pour le déclenchement de la production de pristinamycines (Mehmood et al., 2012). Il est alors possible d'imaginer que le maintien de la concentration en oxygène à 50 % de la saturation en air ne permet pas d'obtenir un transfert en oxygène suffisant au sein des pelotes contrairement à la régulation à 80 %. En suivant ce raisonnement, comment expliquer alors la production de pristinamycines lors de la culture avec régulation de la concentration en oxygène dissous à 150 % ? Seule l'apparition d'un stress de type oxydatif peut être envisagée pour expliquer ce résultat assez inattendu.

Il est, également, difficile de corréler les distributions de tailles des enchevêtrements et des pelotes présents dans les cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 et le déclenchement de la production de pristinamycines. Des investigations supplémentaires devront être menées pour rechercher un éventuel lien entre ces deux paramètres.

V.3. Influence de la composition du milieu de culture sur le déclenchement de la production de pristinamycines

Lors des expériences menées précédemment en réacteur mécaniquement agité et en réacteur de type gazosiphon, le déclenchement de la production des pristinamycines intervient, sauf exception, de façon précoce, en présence d'une croissance active, mais semble toujours être associé à l'épuisement du glutamate et au début de la consommation en arginine et en glucose. Ce changement de substrat pourrait être responsable d'un stress nutritionnel relié à une période d'adaptation du métabolisme des bactéries à la consommation d'un nouveau type de substrat. Afin de vérifier si ce changement de substrat pourrait être le paramètre à l'origine du déclenchement de la production de pristinamycines en phase de croissance, la nature et la concentration relative en sources de carbone et d'azote, dans le milieu MPS2, a été modifiée (Tableau V-6). Toutes les cultures sont réalisées en réacteur mécaniquement agité, avec une même fréquence d'agitation de 560 rpm afin d'assurer une capacité de transfert de matière suffisante et de maintenir une puissance mécanique dissipée identique pour toutes les cultures. Le protocole suivi est celui décrit dans le chapitre II, à savoir, une étape de préculture en fiole

dans le milieu ICS suivie d'une culture en STR, dans le milieu MPS2 avec une concentration initiale en oxygène de 100 % de la saturation en air.

Tableau V-6 : Composition en glutamate, arginine et glucose des différents milieux de culture testés.

Milieu	Composition (g.L ⁻¹)			Fréquence d'agitation (rpm)
	glutamate	arginine	glucose	
MPS2	3	1,5	30	560
M1	12	1,5	30	
M2	0	1,5	30	
M3	0	0	30	

V.3.1. Influence de la composition du milieu de culture sur la croissance *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

La concentration en biomasse maximum est de 8 g.L⁻¹ pour les milieux M1 et M2, valeur similaire à celle obtenue avec le milieu MPS2, alors qu'elle est inférieure à 2 g.L⁻¹ pour le milieu M3 (Figure V-16A). Dans ce dernier cas, la faible concentration en biomasse est, sans aucun doute, liée à l'absence d'une source d'azote dans le milieu. La faible croissance observée serait permise uniquement par l'azote apportée par la préculture lors de l'ensemencement ou par la réserve en azote des microorganismes à l'issue de la préculture.

La vitesse spécifique de croissance la plus élevée est obtenue avec le milieu MPS2 (0,27 h⁻¹). Avec les milieux M1 et M2, la vitesse spécifique de croissance maximale est moins importante, de l'ordre de 0,2 h⁻¹. Cependant, avec ces deux milieux, la croissance est maintenue un peu plus dans le temps ce qui explique que la concentration en biomasse finale dans ces trois milieux soit sensiblement la même. Une absence complète d'acide aminé (milieu M3), conduit à une baisse très rapide de la vitesse spécifique de croissance (Figure V-16).

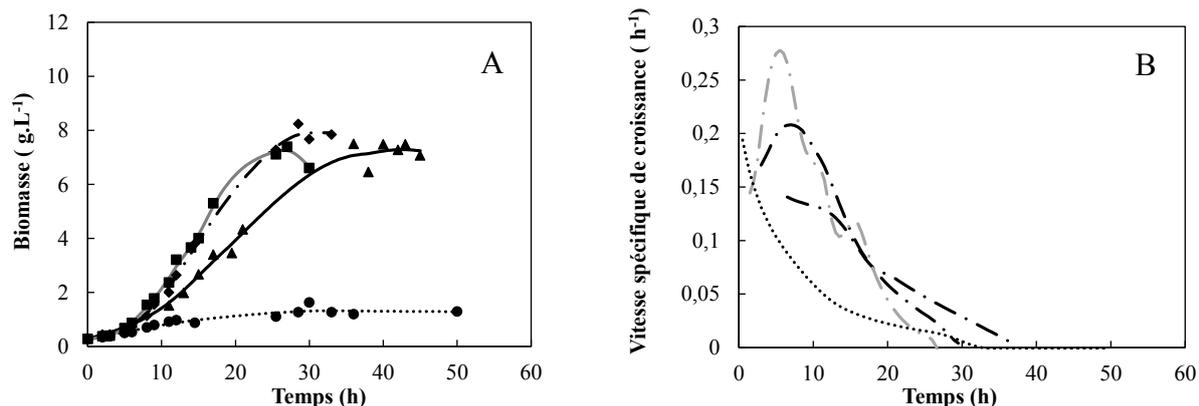


Figure V-16. Cinétiques de croissance (A) et vitesses spécifiques de croissance associées (B) lors de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur milieu MPS2 (■, —), M1 (◆, - -), M2 (▲, —) ou M3 (●,).

V.3.2. Influence de la composition du milieu de culture sur la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338

Quel que soit le milieu de culture utilisé, la production des pristinamycines débute pendant la phase de croissance (entre 8 et 11 h de culture) avec une concentration maximale qui varie entre 3 et 14 mg.L⁻¹.

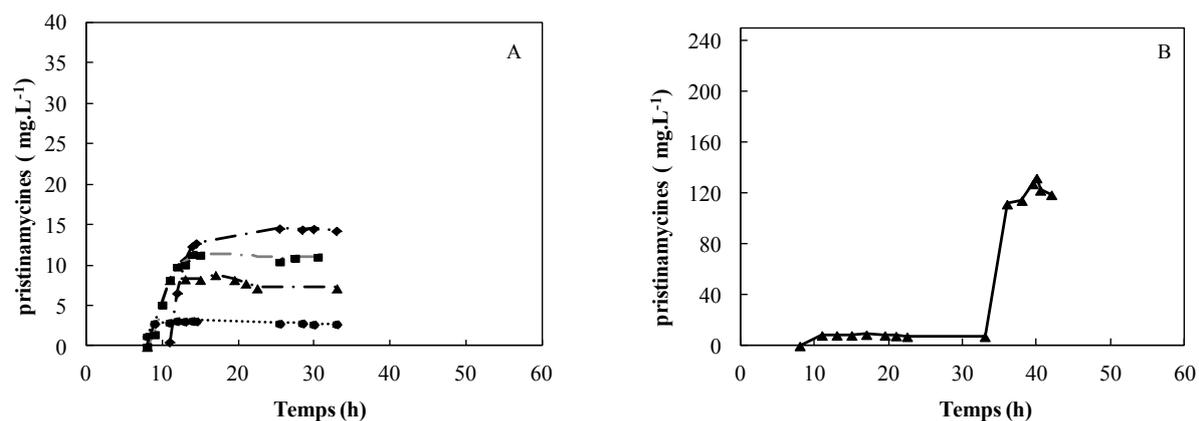


Figure V-17: Concentrations en pristinamycines produites lors de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur milieu MPS2 (A, ■), M1 (A, ◆), M2 (A et B, ▲) ou M3 (A, ●).

Cependant, dans un seul cas, avec le milieu M2 qui ne contient pas de glutamate initialement, une deuxième phase de production de pristinamycines (après 33 h de culture) avec une concentration plus importante de 135 mg.L^{-1} maximum, a été obtenue (**Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). A ce moment de la culture, la bactérie entre en phase stationnaire de croissance. La vitesse spécifique de croissance est alors quasiment nulle (Figure V-16). Cette seconde phase de production a pu être observée systématiquement lors des répétitions de ces conditions de culture.

Lors de la phase de production commune à tous les milieux de culture, le rendement [pristinamycines] / [biomasse] est très similaire puisqu'il se situe entre 3 et 5 mg.g^{-1} (4 mg.g^{-1} avec le milieu MPS2). Lors de la seconde phase de production, sur le milieu M2, ce rendement est nettement plus élevé puisqu'il atteint 17 mg.g^{-1} environ.

V.3.3. Influence de la composition du milieu de culture sur la consommation des substrats par *S. pristinaespiralis* DSMZ40338

Les concentrations résiduelles des différentes sources de carbone et d'azote ont été suivies au cours des cultures menées afin de rechercher une éventuelle corrélation entre leur utilisation par la bactérie et la production de pristinamycines.

Classiquement, lors d'une culture sur milieu MPS2, le glutamate est le substrat utilisé préférentiellement (Figure V-18). La consommation simultanée de glucose et d'arginine intervient lorsque la vitesse spécifique de consommation de glutamate diminue. Après 11 h de culture, la totalité du glutamate initialement présent dans le milieu de culture a été consommé. Sur ce milieu, la production de pristinamycines débute après 8 h de culture alors que la vitesse spécifique de consommation du glutamate est à son maximum et que le glucose et l'arginine n'ont encore quasiment pas été consommés.

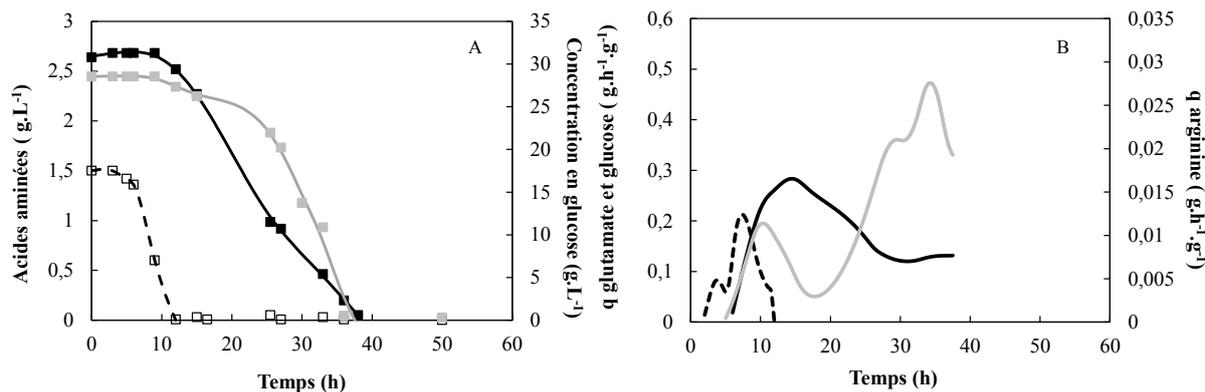


Figure V-18 : Concentration en substrats (A) et vitesses spécifiques de consommation associées (B) lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur le milieu MPS2, glucose (A, ■ et B, —), arginine (A, ■ et B, —) et glutamate (A, □ et B, ---).

Comme lors de la culture précédente, sur milieu MPS2, le glutamate est le substrat utilisé préférentiellement lors de la culture sur le milieu M1 (Figure V-19). Cependant, et certainement en raison de sa concentration initiale nettement plus importante, le glutamate est ensuite utilisé par les bactéries simultanément à l'arginine et au glucose.

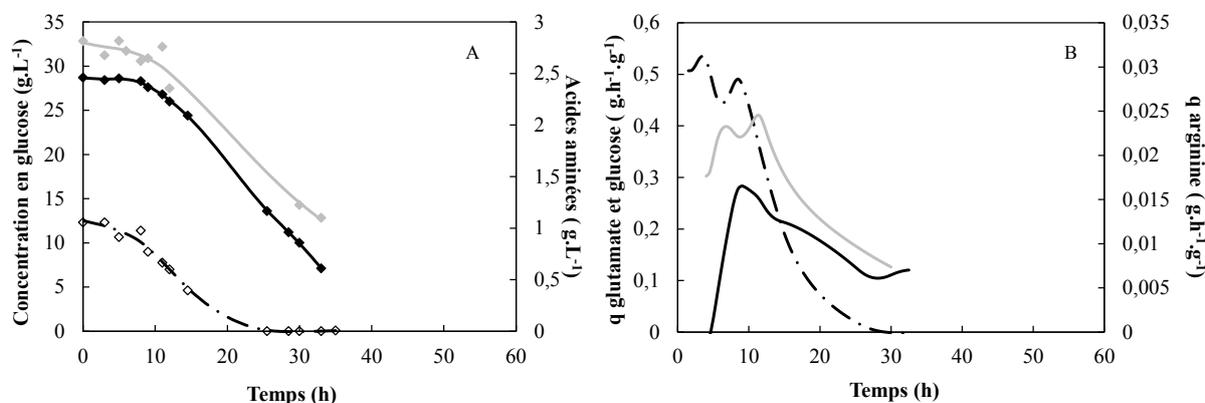


Figure V-19 : Concentration en substrats (A) et vitesses spécifiques de consommation associées (B) lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur le milieu M1, glucose (A, ◆ et B, —), arginine (A, ◆ et B, —) et glutamate (A, ◇ et B, ---).

A l'issue de la culture (35 h), seul le glutamate a été entièrement consommé. Lors de cette culture, la production de pristinamycines est déclenchée entre 11 et 14 h de culture, c'est-à-dire lorsque le glucose, l'arginine et le glutamate sont au niveau les plus élevés de leur

consommation (Figure V-19B). Les résultats cinétiques de la culture sur le milieu M1 semblent donc indiquer qu'il est difficile de corrélér le début de l'excrétion des pristinamycines avec l'épuisement dans le milieu de culture d'un des substrats.

Dans le milieu M2, le glutamate étant absent, l'arginine est la seule source d'azote. Alors que le glucose est consommé dès le début de la culture, la consommation d'arginine semble être un peu décalée dans le temps et ne débute qu'après 10 h de culture. Le glucose et l'arginine sont totalement consommés après 30 - 40 h de culture environ (Figure V-20).

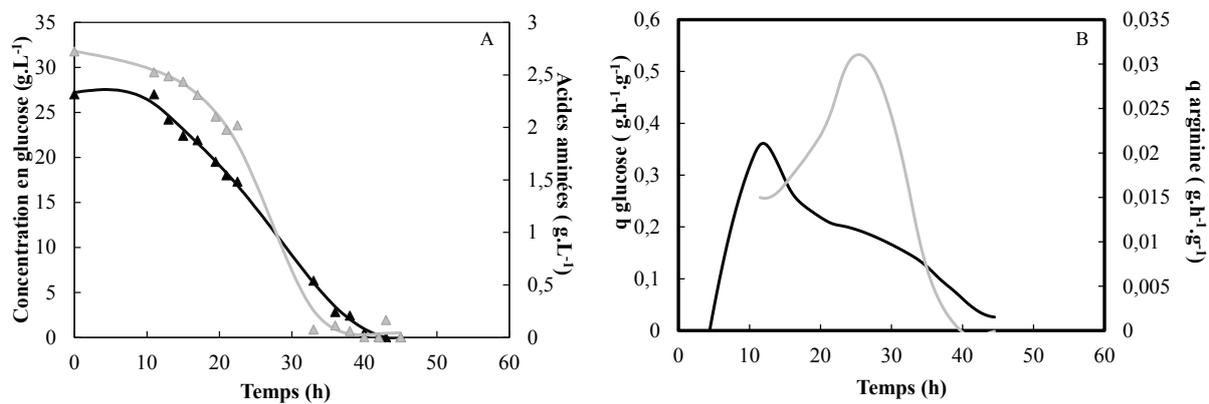


Figure V-20 : Concentration en substrats (A) et vitesses spécifiques de consommation associées (B) lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur le milieu M2, glucose (A, ▲ et B, —) et arginine (A, ▲ et B, —).

La culture dans le milieu M2 présente la particularité de posséder 2 phases de production d'antibiotiques. La première débute après 8 h de culture et la seconde après 33 h. A 8 h de culture, alors que le glucose a commencé à être utilisé par les bactéries, la concentration de la seule source en azote présente dans le milieu de culture, l'arginine, est toujours inchangée. Par contre, 33 h de culture correspond au moment où cette source en azote est épuisée. Alors que la première phase de production ne puisse pas être corrélée avec une variation importante de la source en carbone ou de la source en azote, le début de la seconde phase de production de pristinamycines semble être lié à la limitation du milieu de culture en azote. Cette limitation s'accompagne de l'entrée des bactéries dans la phase de stationnaire de croissance puisqu'après 33 h de culture, la vitesse spécifique de croissance tend vers 0 (Figure V-16B).

Enfin, lors de la culture sur milieu M3, en raison de l'absence de source d'azote, seuls 5 g.L⁻¹ de glucose sont consommés après 50 h de culture. Une production, bien que très faible, de

pristinamycines est toutefois mesurée lors de la culture sur ce milieu. Celle-ci intervient entre 11 et 12 h de culture soit au moment où la vitesse spécifique de consommation de glucose est quasiment à son niveau maximum, de l'ordre de $0,2 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (Figure V-21).

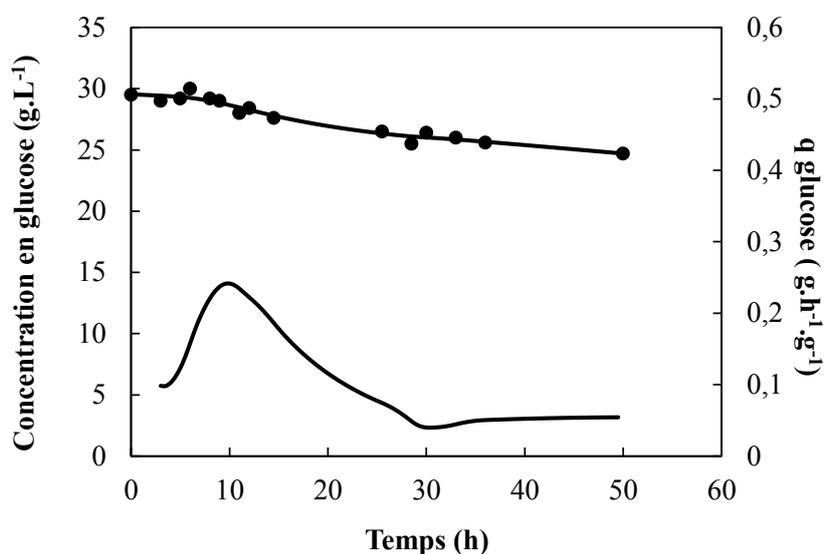


Figure V-21 : Concentration en glucose résiduelle (●) et vitesse spécifique de consommation associée (—) lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur le milieu M3.

V.3.4. Influence de la composition du milieu de culture sur la consommation en oxygène

Un paramètre important lors du déclenchement de la production des pristinamycines est l'oxygénation de la culture (Mehmood et al., 2011). Un suivi de la pression partielle en oxygène dissous a donc été réalisé au cours des cultures menées (Figure V-22). Trois types de profils peuvent être observés. Le premier est celui obtenu avec le milieu M3. Dans ce cas, la concentration en oxygène dissous varie très peu ce qui traduit une faible consommation en oxygène. Il faut rappeler qu'avec ce milieu, la croissance cellulaire est faible (Figure V-16) ce qui se traduit par de faibles besoins en oxygène et donc une faible consommation en oxygène.

Dans le cas du milieu MPS2, l'apport en oxygène assuré par les conditions d'agitation et d'aération initiales est suffisant pour assurer les besoins en oxygène de la bactérie tout au long de la culture. La concentration en oxygène dissous décroît pour être au minimum, 50 % de la

concentration maximum en oxygène dissous, après 25 h de culture (Figure V-16). Ce temps de culture correspond à l'entrée de la bactérie en phase stationnaire de croissance ce qui, classiquement induit une baisse de la consommation en oxygène et donc une remontée de la concentration en oxygène dissous (Figure V-22).

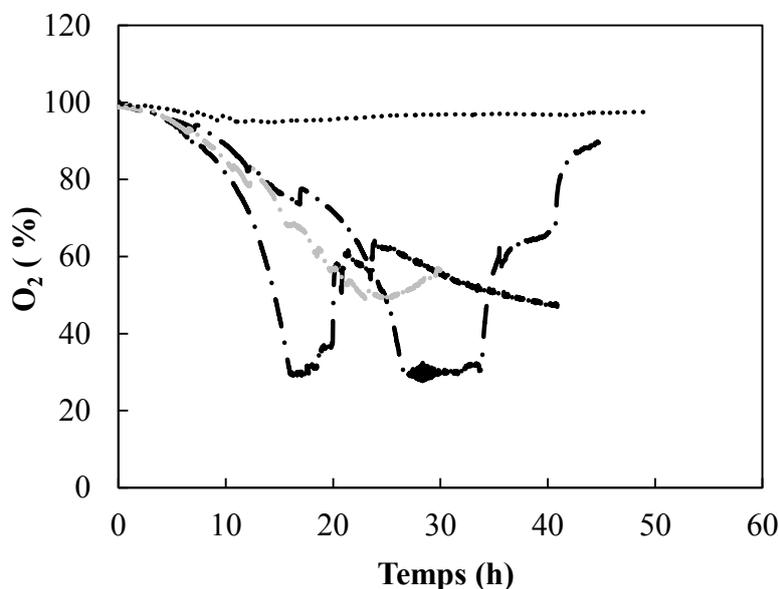


Figure V-22 : Pourcentage en oxygène dissous lors de cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 sur le milieu MPS2 (—), M1 (---), M2 (—) ou M3 (.....).

Enfin, le troisième type de profil est mesuré avec les milieux M1 et M2. Lors des cultures réalisées sur ces deux milieux, la régulation de la concentration en oxygène dissous est déclenchée. Ainsi avec le milieu M1, le débit d'aération est augmenté de 1 à 2,3 L.min⁻¹ entre 13 h et 18 h de culture alors qu'avec le milieu M2, ce débit est accru de 1 à 1,5 L.min⁻¹ entre 25 h et 31 h de culture. Il est à noter que cette augmentation du débit d'aération qui permet le maintien de la concentration en oxygène dissous à une valeur de 30 % de la saturation en oxygène n'a que peu d'influence sur la puissance dissipée dans le milieu de culture. Avec le milieu M1, l'augmentation du débit d'aération intervient après la phase de production de pristinamycines. Avec le milieu M2, l'augmentation de l'aération débute avant le début de la seconde phase de production de pristinamycines et se maintient pendant un laps de temps plus important.

Au final, avec tous les milieux de cultures, une production d'antibiotiques est observée aux alentours de 10 h de culture. A cet instant de la culture, la concentration en oxygène est supérieure à 80 %, quelle que soit la composition du milieu. Il n'y a donc aucune limitation du transfert d'oxygène gaz-liquide au moment de cette phase de production. Avec le milieu M2, le début de la seconde phase de production coïncide avec une consommation accrue d'oxygène. Cependant, là aussi, le transfert d'oxygène gaz-liquide n'est pas limitant puisque la concentration en oxygène demeure supérieure à 30 % de la saturation en oxygène. Ces résultats ne permettent cependant pas de conclure quant à une limitation de l'apport de l'oxygène dissous au sein des structures bactériennes, comme exposé dans le paragraphe V.2.4.

V.3.5. Discussion et conclusion

A l'issue de cette série d'expériences, il apparaît que le glutamate est le substrat préférentiel de *S. pristinaespiralis* DSMZ40338. Lorsqu'il est présent dans le milieu de culture, cet acide aminé est utilisé préférentiellement et dans le cas des milieux MPS2 et M1, la consommation du glucose et de l'arginine ne débute que lorsque le glutamate a été totalement utilisé. Cette utilisation préférentielle du glutamate par *S. pristinaespiralis* a déjà été observée à plusieurs reprises (Corvini, 200 ; Voelker et Altaba, 2001 ; Saffroy, 2006 ; Mehmood, 2011). Dans ces conditions, le glutamate est donc à la fois une source d'azote et une source de carbone. Ce double rôle a déjà été démontré (Voelker et Altaba, 2001). En effet, la première étape de métabolisation des acides aminés est généralement leur désamination qui conduit à la formation de céto-acides. Ces derniers peuvent soit être métabolisés au niveau du métabolisme central lorsqu'ils sont utilisés comme source de carbone soit s'accumuler dans le milieu extracellulaire lorsqu'ils ne sont pas utilisés par le microorganisme. Ainsi, il a pu être montré que lors d'une culture de *S. pristinaespiralis* en présence d'acides aminés branchés (valine, leucine ou isoleucine), les céto-acides résultant de la désamination de ces derniers s'accumulaient dans le milieu de culture. A l'inverse, lorsque le glutamate et d'alanine sont utilisés, les céto-acides correspondant, l' α -cétoglutarate et le pyruvate, ne sont pas retrouvés le milieu de culture ce qui traduit leur utilisation immédiate par *S. pristinaespiralis*.

Malgré la modification de la composition du milieu de culture, une production précoce des pristinamycines a été systématiquement observée, vers 10 h de culture. La production des pristinamycines a été associée en fiole d'Erlemmeyer à une limitation en azote du milieu de culture couplée à un apport en oxygène non limitant (Mehmood et al., 2011). Quel que soit le

milieu de culture utilisé, aucune limitation en azote n'a pu être associée au début de la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ40338 en STR ; ce phénomène a déjà été observé (Voelker et Altaba, 2001 ; Saffroy, 2006). La nature de la source en azote semble être impliquée dans la production précoce de pristinamycines. En effet, Voelker et Altaba (2001) ont montré qu'en utilisant du nitrate comme source d'azote, à la place d'acides aminés, la production de pristinamycines débutait alors que la phase de croissance n'était pas terminée. Il est, de plus, surprenant de constater que dans toutes les expériences menées, la production d'antibiotiques débute toujours aux environs de 10 h de culture. L'un des principaux points communs entre toutes les cultures est le protocole de préculture. Celle-ci est toujours réalisée à l'aide du milieu ICS, lequel est toujoursensemencé de manière identique, et la préculture est toujours utilisée pour ensemenecer un même volume de milieu de culture lorsque sa DO à 660 nm atteint la valeur de 4. Il est alors envisageable qu'un des éléments apportés par la préculture soit entièrement consommé après 10 h de culture ce qui induirait un changement de métabolisme aboutissant à une production de pristinamycines alors que les bactéries se trouvent dans une phase de croissance active. Cette hypothèse mérite, bien entendu, davantage d'investigations.

Dans une seule condition de culture, une seconde phase de production a été mesurée. Il s'agit de la culture réalisée sur le milieu M2. Cette seconde phase de production intervient dans des conditions de culture beaucoup plus classiques puisque les sources d'azote sont complètement consommées, le transfert d'oxygène gaz-liquide est non-limitant et *S. pristinaespiralis* rentre en phase stationnaire de croissance. L'existence de deux phases de production au cours d'une même culture en mode discontinu constitue, à notre connaissance, une originalité. Des productions séquentielles de pristinamycines ont déjà été observées lors de cultures de *S. pristinaespiralis* pr11 mais il s'agissait alors de cultures en mode continu (Corvini, 2000). La production séquencée de pristinamycines avait alors été associée à une inhibition de ces dernières sur leur propre biosynthèse. La présence de cette seconde phase de production reste difficile à expliquer. Mise à part la culture sur le milieu M3, nous pouvons constater que c'est lors de la culture avec une vitesse spécifique de croissance plus faible et prolongée dans le temps que cette production a eu lieu. Dans le même ordre d'idée, lors des cultures avec les milieux MPS2 et M1, la production de pristinamycines intervient alors que la vitesse spécifique de croissance est plus élevée que lorsqu'elle intervient dans le milieu M2 (0,25 et 0,18 h⁻¹ contre 0,14 h⁻¹). Une production d'antibiotiques alors que la vitesse de croissance est élevée pourrait empêcher toute production ultérieure.

Conclusion générale et perspectives de recherche

VI. Conclusion générale et perspectives

VI.1. Conclusion

Faisant suite à une étude réalisée uniquement en fiole d'Erlenmeyer (Mehmood, 2011), l'objectif principal de ce travail de thèse était de comprendre l'influence de l'hydrodynamique sur la réponse physiologique de *S. pristinaespiralis*, dans un réacteur mécaniquement agité et un réacteur gazosiphon. La première question de ce travail a donc porté sur le changement d'échelle du système de culture (de la fiole au réacteur mécaniquement agité).

Dans un premier temps, la puissance dissipée et le coefficient volumique de transfert d'oxygène ont été estimés en réacteur mécaniquement agité à l'aide de corrélations issues de la littérature. Ces estimations ont permis de choisir des conditions de puissance dissipée volumique et de k_La proches de celles précédemment étudiés en fioles. Dans ces conditions, tout comme lors des cultures en fiole, le temps de mélange reste faible (inférieur à 5 s) ce qui suggère qu'il n'a pas une influence significative sur les performances du procédé.

Par la suite, en comparant la réponse de *S. pristinaespiralis* lors de cultures en réacteurs mécaniquement agités et en fioles d'Erlenmeyer, nous nous sommes attachés à répondre à la question suivante :

- Quels sont les paramètres hydrodynamiques les plus valides pour prédire les performances du procédé de production lors du passage de la fiole au STR ?

A l'instar des cultures réalisées en fioles d'Erlenmeyer, l'augmentation de la dissipation volumique en réacteur mécaniquement agité semble jouer un rôle positif sur la production de biomasse (vitesse de croissance et concentration finale), la vitesse de consommation des substrats, la quantité de pristinamycines produites par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 ainsi que sur le rendement de production [pristinamycines / [biomasse]_{max}]. Cependant, le maintien des critères d'extrapolation classiquement utilisés (P / V , k_La et ε_{max}) ne permettent de maintenir les performances du procédé de production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors du changement de réacteur. Les concentrations en biomasse, en pristinamycines ainsi que le rendement [pristinamycines / [biomasse]_{max} sont quasi-systématiquement inférieurs à ce qui est mesurée en fiole d'Erlenmeyer. Les paramètres classiques d'extrapolation **n'apparaissent donc pas pertinents lors de ruptures de similitude géométrique pour le procédé** de production de pristinamycines.

D'autre part, contrairement à ce qui avait été mesuré en fiole, la taille des pelotes ne semble pas affectée par la dissipation appliquée. La taille moyenne des pelotes est cependant plus importante en réacteur mécaniquement agité qu'en fiole. Ces différences peuvent être attribuées aux conditions hydrodynamiques qui sont très différentes entre le réacteur mécaniquement agité et la fiole (hétérogénéité de turbulence en réacteur mécaniquement agité et homogénéité en fiole lisses). Par contre, tout comme en fiole, un lien entre la taille moyenne des pelotes bactériennes et la concentration maximum en biomasse et en pristinamycines a été obtenu. Cela renforce l'hypothèse émise précédemment (Mehmood, 2010) selon laquelle seules les cellules présentes en périphérie des pelotes seraient métaboliquement actives donc à même de croître et de produire des antibiotiques. La morphologie adoptée par les cellules ainsi que l'état physiologique des cellules au sein de celles-ci pourraient donc constituer des paramètres centraux du procédé de production de pristinamycines et de son extrapolation.

La seconde question posée en début de ce travail de thèse était la suivante :

- La réponse physiologique de *S. pristinaespiralis* lors de sa culture en réacteur de type gazosiphon, dont l'hydrodynamique est réputée moins contraignante, présente-t-elle des similitudes avec celle observée en réacteur mécaniquement agité ?

Pour y répondre, nous avons conçu, dans le cadre de ce travail, un réacteur airlift afin de mesurer l'influence d'un environnement peu turbulent sur la physiologie de *S. pristinaespiralis*. Au cours de ces essais, deux types de diffuseurs d'air, engendrant des valeurs de k_{La} différentes, ont été utilisés. Le champ d'écoulement gaz-liquide (vitesses, turbulence, taux de gaz) a été simulé numériquement par utilisation de la CFD. En particulier, le transfert d'oxygène a été décrit ainsi que la consommation de l'oxygène dissous, ce qui a permis l'obtention des champs de concentration en oxygène dissous. A notre connaissance, ces simulations des environnements biochimiques **escomptés en bioréacteur airlift** de culture de *Streptomyces* est original dans la littérature.

Il a été remarqué que, malgré des cinétiques de croissance similaires, les quantités d'antibiotiques produites sont significativement supérieures à celles obtenues en STR. Ces résultats sont à rapprocher de la morphologie rencontrée dans le réacteur airlift au moment de

la production d'antibiotiques : soit des enchevêtrements soit des pelotes plus petites que celles rencontrées en réacteur mécaniquement agité, d'une taille similaire à celles présentes en fiole d'Erlenmeyer. Quel que soit le type de réacteur, la morphologie de *S. pristinaespiralis* semble donc jouer un rôle important dans le processus de production d'antibiotiques. Une analyse de viabilité cellulaire au sein des structures (enchevêtrements ou pelotes) obtenue lors des cultures en réacteur airlift a alors été réalisée. Lors de la culture avec la plus faible puissance dissipée, des enchevêtrements composés uniquement de cellules vivantes sont présents au moment du déclenchement de la production de pristinamycines. A l'inverse, lors de la culture avec une puissance dissipée plus importante, ce sont des pelotes dont les cellules vivantes sont situées à la périphérie des pelotes et donc le cœur est composé de cellules considérées comme mortes qui sont présentes au même moment. Ce résultat laisse penser que la morphologie adoptée par les bactéries n'aurait pas d'impact direct sur le moment de déclenchement de la production de pristinamycines. Néanmoins, alors que les rendements [pristinamycines] / [biomasse] sont sensiblement les mêmes, les concentrations les plus importantes en antibiotiques sont obtenues lorsque des pelotes contenant des cellules a priori non métaboliquement actives sont présentes. Ce résultat s'explique par une période de production courte (de quelques heures) et surtout un déclenchement précoce de la production des pristinamycines, à un moment donc, où la concentration en biomasse est peu importante. Ce phénomène de production a également été observé lors des cultures en STR et est complètement différent à ceux obtenus lors du travail précédent, en fiole d'Erlenmeyer (Mehmood, 2010). Cette observation est donc à l'origine d'une interrogation initialement non prévue :

- Quels paramètres nutritionnels, hydrodynamiques pourraient expliquer un déclenchement précoce de la production de pristinamycines ?

Toutes les vitesses spécifiques sont beaucoup plus faibles lors des cultures de *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 en fiole d'Erlenmeyer par rapport à celles mesurées en STR et en airlift. Il semblerait que lors des cultures dans ces 2 derniers systèmes de culture, le métabolisme soit préférentiellement orienté vers la croissance au détriment de la production d'antibiotiques. Les conditions d'écoulement et de mélange, qui changent lors d'une modification de la fréquence d'agitation ou lors d'un changement de type de réacteur, pourraient être un des paramètres responsables de cette modification de la réponse physiologique.

Nous avons également suspecté qu'une variation de la concentration en oxygène dissous au moment de passage de la préculture de fiole d'Erlenmeyer, qui présente un environnement pauvre en oxygène (< 5 % sat.air), à la culture en réacteur mécaniquement agité qui, initialement, est un environnement riche en oxygène puisque la concentration initiale en oxygène est classiquement fixée à 100% de la saturation du milieu en air, pourrait être responsable d'un stress oxydatif. Ce dernier pourrait engendrer un déclenchement précoce de la production en pristinamycines. Pour vérifier cette hypothèse, des précultures et cultures ont été réalisées en réacteur mécaniquement agité avec un contrôle de la concentration en oxygène dissous. Ainsi, *S. pristinaespiralis* DSMZ 40338 a pu être soumise à diverses concentrations en oxygène dissous en fin de préculture et en début de culture. Seule l'absence de variation de la concentration en oxygène, et le maintien de celle-ci à 100 % de la saturation en air a permis d'obtenir la production de pristinamycines en fin de phase de croissance au cours de la culture en MPS2. Dans tous les autres cas testés, la production a été obtenue pendant la phase de croissance.

Il est étonnant de constater que la production de pristinamycines débute très souvent après 10 à 15 h de culture. Ce moment de la culture coïncide avec l'épuisement du milieu en glutamate qui est la source préférentielle en carbone et en azote dans le milieu de culture synthétique utilisé. Pour cette raison, nous sommes penchés sur la composition du milieu de culture et notamment la concentration initiale en sources d'azote. La mesure d'une production de pristinamycines en absence de glutamate et toujours au même moment de la culture démontre que l'épuisement du milieu de culture en glutamate n'est pas la cause du déclenchement de la production de pristinamycines. Par contre, dans une seule condition de culture, une seconde phase de production a été mesurée. Il s'agit de la culture réalisée sur un milieu qui contient de l'arginine et de glucose comme source d'azote et de carbone. Cette seconde phase de production intervient dans des conditions de culture beaucoup plus classiques puisque les sources d'azote sont complètement consommées, l'apport en oxygène semble être non limitant et *S. pristinaespiralis* rentre en phase stationnaire de croissance. L'existence de 2 phases de production au cours d'une même culture en mode discontinu constitue, à notre connaissance, une originalité. Il est également à noter que lors de cette culture, la vitesse spécifique de croissance est plus faible et prolongée dans le temps. Une production d'antibiotiques alors que la vitesse de croissance est élevée pourrait empêcher toute production ultérieure.

En conclusion, les éléments responsables du déclenchement de la production de pristinamycines sont multi paramétriques. Sur ce point, mais également sur l'importance de la morphologie au cours du procédé de production de pristinamycines, des investigations approfondies restent à mener. Nous proposons ainsi un certain nombre de perspectives à notre étude.

VI.2. Perspectives

A l'issue de ce travail, le challenge le plus important se situe, sans aucun doute, au niveau de la compréhension du rôle de la morphologie adoptée par les cellules de *S. pristinaespiralis* au cours des procédés de production de pristinamycines.

Au cours de notre travail, l'analyse des enchevêtrements et des pelotes a été effectuée par microscopie optique et confocale mais sur un nombre de structures trop restreint. Des méthodes telles que la granulométrie apporte des informations sur un nombre important d'objets mais n'est pas entièrement satisfaisante car elle ne permet pas de faire une distinction entre les enchevêtrements et les pelotes, et ne donne que des informations sur la taille des structures bactériennes. L'analyse microscopique reste donc, à notre avis, l'outil de choix. Cependant, d'un point de vue méthodologique, elle nécessiterait d'être beaucoup plus standardisée, voire automatisée, que ce que nous avons pu faire. Des outils d'analyse d'images devront être utilisés afin de pouvoir définir avec précision la répartition des différents types de structures mais aussi la proportion de cellules actives et de cellules non actives dans les pelotes.

L'étude de cette hétérogénéité au niveau des pelotes constitue un autre enjeu. Actuellement toutes les vitesses spécifiques sont rapportées à la biomasse totale. Or, nous savons maintenant qu'une partie de cette biomasse n'est pas active. Il faudrait connaître avec précision la part de la biomasse active afin de corriger les valeurs de vitesses spécifiques et se rapprocher des valeurs réelles.

Une meilleure connaissance de la répartition de la physiologie des cellules au sein des pelotes apparaît également indispensable pour mieux comprendre l'impact des phénomènes de transfert intra-pelotes, notamment d'oxygène, sur le procédé de production de pristinamycines. Il apparaît donc nécessaire d'adapter des systèmes de caractérisation instrumentés miniaturisés à l'étude plus spécifique des pelotes de *Streptomyces*. Cette approche locale de mesure et de modélisation des transferts de matière au sein des pelotes

microbiennes n'est actuellement pas en place au sein de notre laboratoire. Deux approches nous semblent envisageables. Il existe depuis récemment sur le marché des sondes optiques pour la mesure de l'oxygène dissous (Presens, GmbH). La résolution spatiale de ces sondes est d'environ 50 μm et leur temps de réponse à 90 % est inférieur à 1 s. L'insertion d'une sonde de ce type dans des pelotes pourrait permettre de mesurer des profils radiaux d'oxygène dissous dans la structure microbienne. La difficulté de cette approche sera de maintenir fixée une pelote de *Streptomyces* tout en la maintenant dans un environnement biochimique et hydrodynamique proche de celui rencontré dans les bioréacteurs. La seconde approche consisterait à utiliser des sondes fluorescentes spécifiques de l'oxygène. Des complexes de Ruthenium constituent une classe de molécules qui pourraient permettre le suivi des gradients d'oxygène au sein des pelotes de *Streptomyces*, par microscopie confocale. La mise en œuvre de ces molécules pour cette application spécifique reste à être imaginée.

Au niveau du procédé de production de pristinamycines, bien que quelques pistes aient été explorées, la production précoce reste encore mal comprise. Nous avons fait le choix de tester diverses pistes séparément (oxygénation, composition du milieu de culture). Il semble judicieux de croiser les résultats que nous avons obtenus en examinant par exemple l'effet cumulé de l'oxygénation et de la composition du milieu de culture.

La production de pristinamycines intervenant très souvent au même moment de la culture (entre 10 et 15 h de culture) suggère également que la préculture pourrait avoir un impact important sur l'étape ultérieure de production de pristinamycines. Il est ainsi envisageable qu'un des éléments apportés par la préculture soit entièrement consommé après 10 h de culture en réacteurs mécaniquement agité et airlift et induise un stress nutritionnel à l'origine du déclenchement de la production de pristinamycines alors que les bactéries sont en phase de croissance. D'autres pistes comme la concentration initiale en spores dans la préculture, l'état physiologique des cellules à l'issue de la préculture, sont également envisageables. Ces aspects de mise en œuvre du procédé sont souvent regardés de façon empirique (répétition de la mise en bactéries de façon strictement identique de façon à obtenir toujours les mêmes performances) mais une caractérisation physiologique des cellules lors de cette étape clé du procédé et une connaissance de son influence sur l'étape de production d'antibiotiques apporterait, sans nul doute, des informations importantes sur le pilotage du procédé.

Bien qu'appliquée industriellement depuis plusieurs décennies, la production de pristinamycines par *S. pristinaespiralis* demeure donc un champ d'investigation scientifique particulièrement intéressant.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Aigle, B., Schneider, D., Morhilat, C., Vandewiele, D., Dary, A., Holl, A. C., Simonet, J. M., Decaris, B. (1996) Amplifiable and deletable locus of *Streptomyces ambofaciens* RP 181110 contains a very large gene homologous to polyketide synthase genes. *Microbiology*, 142, 2815-2824.

Aleksieva, P., & Peeva, L. (2000). Investigation of acid proteinase biosynthesis by the fungus *Humicola lutea* 120-5 in an airlift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 26(5), 402-405.

Alves, S. S. and Vasconcelos, J. M. T. (1996) Optimisation of agitation and aeration in fermenters. *Bioprocess Engineering*, 14, 119–123.

Amanullah, A., Blair, R., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. (1999). Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 62(4), 434-446.

Amanullah, A., Jüsten, P., Davies, A., Paul, G. C., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal*, 5(2), 109-114.

Amanullah, A., Leonildi, E., Nienow, A. and Thomas, C. (2001). Dynamics of mycelial aggregation in cultures of *Aspergillus oryzae*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 24(2), 101-107.

Amanullah, A., Christensen, L. H., Hansen, K., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. (2002). Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*, 77(7), 815-826.

Anderlei, T. and Büchs, J. (2001). Device for sterile online measurement of the oxygen transfer rate in shaking flasks. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 157–162.

Atta, H. (2012). Biochemical studies on antibiotic production from *Streptomyces sp.*: Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *Journal of Saudi Chemical Society*. In press, doi:10.1016/j.jscs.2011.12.011.

Ayazi Shamlou, P., Makagiansar, H. Y., Ison, A. P., Lilly, M. D. and Thomas, C. R. (1994) Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chemical Engineering Science* 49, 2621–2631.

Bai, Z., Harvey, L. M. and McNeil, B. (2003). Oxidative stress in submerged cultures of fungi. *Critical Reviews in Biotechnology*, 23, 267–302.

Baldi, S., and Yianneskis, M. (2004). On the quantification of energy dissipation in the impeller stream of a stirred vessel from fluctuating velocity gradient measurements. *Chemical Engineering Science*, 59(13), 2659-2671.

- Banks, G.T. (1979). *Scale-up of fermentation processes*, p. 170-266. In Wiseman, A. (ed), Topics in enzyme and fermentation biotechnology, 3. John Wiley & Sons, New York.
- Blodgett, J.A.V., Zhang, J.K. and Metcalf, W.W. (2005). Molecular cloning, sequence analysis, and heterologous expression of the phosphinothricin tripeptide biosynthetic gene cluster from *Streptomyces viridochromogenes* DSM 40736. *Antimicrobial Agents Chemother*, 49, 230–240.
- Brakenhoff, G. J., Blom, P., & Barends, P. (1979). Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses. *Journal of Microscopy*, 117(2), 219-232.
- Brakenhoff, H.T.M., Voort, V.D., Spronsen, E.A., Nanninga, N. (1990). Confocal scanning laser microscopy : from 3-D data collection to 3-D image visualization and analysis. Science on form: Proceedings of the second international symposium for science on form, Editor: S. Ishizaka, 39-46.
- Braun, S. and Vecht-Lifshitz, S.E. (1991). Mycelial morphology and metabolite production. *Trends in Biotechnology*, 9, 63-68.
- Breton, A., Theilleux, J., Sanglier, J.J. and Vobis. G. (1989). Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. *Biotechnologie des antibiotiques (édition Masson)*. 33-70.
- Brock, M. (1979). Biology of microorganisms 5th edition. *Filamentous Actinomycetes* 766-769.
- Bannari, R., Bannari, A. Vermette, P. and Proulx, P. (2012). A model for cellulase production from *Trichoderma reesei* in an airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 109(8), 2025–2038.
- Bello, R. A., Robinson, C. W. and Moo-Young, M. (1985) Gas holdup and overall volumetric oxygen transfer coefficient in airlift contactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 27, 369–381.
- Brakenhoff, G. J., Blom, P., & Barends, P. (1979). Confocal scanning light microscopy with high aperture immersion lenses. *Journal of Microscopy*, 117(2), 219-232.
- Büchs, J., Maier, U., Milbradt, C. and Zoels, B. (2000). Power consumption in shaking flasks on rotary shaking machines: I. Power consumption measurement in unbaffled flasks at low liquid viscosity. *Biotechnology and Bioengineering*, 68(6), 589-593.
- Büchs, J. and Zoels, B. (2001). Evaluation of maximum to specific power consumption ratio in shaking bioreactors. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 34, 647–653.
- Büchs, J., Lotter, S. and Milbradt, C. (2001). Out-of-phase operating conditions, a hitherto unknown phenomenon in shaking bioreactors. *Biochemical engineering journal*, 7(2), 135-141.
- Bu'Lock, J.D. (1974). *Secondary metabolism of microorganisms*. In Industrial aspects of microorganisms, 1, 335-345. Ed. B.Spencer, Amsterdam, Elsevier.

Bushell, M. E. (1983). *Microbiological aspects of the discovery of novel secondary metabolites*. Ed. A. Wiseman, Glasgow, Blackie, 6, 32-67.

Bushell, M. E. (1988). Growth, metabolism and fermentation technology. In *Biotechnology of the Actinomycetales*, 185-215. Ed., M. Goodfellow, S. T. Williams & M. Mordarski, London, Academic Press.

Calam, C.T. (1976). Starting investigational and production cultures. *Process Biochemistry*, 11, 7-9.

Celler, K., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. and van Wezel, G. (2012). Structured morphological modeling as a framework for rational strain design of *Streptomyces* species. *Antonie van Leeuwenhoek*, 102, 409–423.

Chao, Y., Ishida, T., Sugano, Y. and Shoda, M. (2000). Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 68, 345–352.

Challis, G.L., Hopwood, D.A. (2003). Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100, 14555–14561.

Chiang, C. and Chiang, B. (2013). Processing characteristics of submerged fermentation of *Antrodia cinnamomea* in airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 73, 65–71.

Chisti, Y.C. (1989). *Airlift bioreactors*, Elsevier Science.

Choi, D., Park, E. and Okabe, M. (2000) Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. *Biotechnology Progress*, 16, 525-532.

Clark, G.J. and Bushell, M.E. (1995). Oxygen limitation can induce microbial secondary metabolite formation: investigations with miniature electrodes in shaker and bioreactor culture. *Microbiology*, 141, 663–669.

Clift, Grace, Weber (1978). Bubbles, drops and particules, technical report. Academic Press.

Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E. and Vannuffel, P. (1997). Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemother*, 39(A), 7–13.

Contreras, A., Garcia, F., Molina, E. and Merchuk, J. C. (1999). Influence of sparger on energy dissipation, shear rate, and mass transfer to sea water in a concentric-tube airlift bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*, 25, 820–830.

Corvini, P.F.X. (2000). Etude physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* producteur de pristinamycines : Activités enzymatiques du métabolisme central et mesure du pH intracellulaire. Thèse de doctorat, Nancy-Université. Nancy, France.

- Corvini, P. F. X., Delaunay, S., Maujean, F., Rondags, E., Vivier, H., Goergen, J. L. and Germain, P. (2004). Intracellular pH of *S pristinaespiralis* is correlated to the sequential use of carbon sources during the pristinamycins-producing process. *Enzyme and microbial technology*, 34(2), 101-107.
- Cronenberg, C. C. H. *et al.* (1994). Influence of age and structure of *Pencillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles. *Bioprocess Engineering*, 10, 209–216.
- Cuesta, G., García-de-la-Fuente, R., Abad, M. and Fornes, F. (2012). Isolation and identification of actinomycetes from a compost-amended soil with potential as biocontrol agents. *Journal of Environmental Management*. 95, S280-S284.
- Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M. and Luyben, K. C. A. M. (1996). Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple Rushton turbines. *Chemical Engineering Science*, 51(11), 2631-2636.
- Cui, Y. Q., Van der Lans, R. G. J. M. and Luyben, K. C. A. M. (1997). Effects of dissolved oxygen tensions and mechanical forces on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 57, 409–419.
- Cui, Y., Van der Lans, R.G.J., Giuseppin, M.L. and Luyben, K.C.A. (1998). Influence of fermentation conditions and scale on the submerged fermentation of *Aspergillus awamori*. *Enzyme and Microbial Technology*, 23, 157–167.
- Dary, A., Bourget, N., Girard, N., Simonet, J.M. and Decaris, B. (1992). Amplification of a particular DNA sequence in *Streptomyces ambofaciens* RP 181110 reversibly prevents spiramycin production. *Res. Microbiology*, 143, 99-112.
- Delafosse, A., Liné, A., Morchain, J. and Guiraud, P. (2008). LES and URANS simulations of hydrodynamics in mixing tank: Comparison to PIV experiments. *Chemical Engineering Research and Design*, 86(12), 1322-1330.
- Dick, O., Onken, U., Sattler, I. and Zeeck, A. (1994). Influence of increased dissolved oxygen concentration on productivity and selectivity in cultures of a colabomycin-producing strain of *Streptomyces griseoflavus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 41(4), 373-377.
- Dobson, L. F., O’Cleirigh, C. C. and O’Shea, D. G. (2008). The influence of morphology on geldanamycin production in submerged fermentations of *Streptomyces hygroscopicus* var. *geldanus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 79(5), 859-866.7
- Driouch, H., Hänsch, R., Wücherpfennig, T., Krull, R. and Wittmann, C. (2012). Improved enzyme production by bio-pellets of *Aspergillus niger*: Targeted morphology engineering using titanate microparticles. *Biotechnology and Bioengineering*, 109, 462–471.
- Driouch, H., Roth, A. and Dersch, P. (2010). Filamentous fungi in good shape: Microparticles for tailor-made fungal morphology and enhanced enzyme production. *Bioengineering Bugs*, 2, 1-5.

Drouin, J.F. (1996). *Caractérisation de la différenciation cellulaire de Streptomyces ambofaciens en culture submergée. Etude des relations avec la production de spiramycine par analyse quantitative d'images*. Thèse de doctorat, ENSAIA INPL, Nancy, France.

Ducci, A. and Yianneskis, M. (2005). Direct determination of energy dissipation in stirred vessels with two-point LDA. *AIChE journal*, 51(8), 2133-2149.

Dynesen, J. and Nielsen, J. (2003). Surface hydrophobicity of *Aspergillus nidulans* conidiospores and its role in pellet formation. *Biotechnology Progress*, 19, 1049-52.

El-Enshasy H.A., Farid M.A. and El-Sayed E.S.A. (2000). Influence of inoculum type and cultivation conditions on natamycin production by *Streptomyces natalensis*. *Journal of Basic Microbiology*, 40, 333-342.

El-Enshasy, H., Kleine, J. and Rinas, U. (2006). Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger*. *Process Biochemistry*, 41(10), 2103-2112.

Ellrichmann, M. et al. (2007). Orlistat reduces gallbladder emptying by inhibition of CCK release in response to a test meal. *Regulatory Peptides*, 139, 136–140.

Escudié, R. and Liné, A. (2003). Experimental analysis of hydrodynamics in a radially agitated tank. *AIChE journal*, 49(3), 585-603.

Feng, K.C., Rou, T.M., Liu, B.L., Tzeng, Y.M. and Chang, Y.N. (2004). Effect of pellet size on the high yield production of destruxin B by *Metarhizium anisopliae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 34, 22-25.

Frank, J. M. Shi, and A. D. Burns. (2004). Validation of Eulerian Multiphase Flow Models for Nuclear Safety Applications. *Third International Symposium on Two-Phase Flow Modeling and Experimentation*, Pisa, Italy. Sept. 22–24.

Freedman, D. (1969). The shaker in bioengineering. *Process Biochemistry*, 2, 35-40.

Gamboa-Suasnavart, R. A., Marín-Palacio, L. D., Martínez-Sotelo, J. A., Espitia, C., Servín-González, L., Valdez-Cruz, N. A. and Trujillo-Roldán, M. A. (2013). Scale-up from shake flasks to bioreactor, based on power input and *Streptomyces lividans* morphology, for the production of recombinant APA (45/47 kDa protein) from *Mycobacterium tuberculosis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1-9.

Garcia-Ochoa, F. and Gomez, E. (2009). Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology advances*, 27(2), 153.

Gavrilescu, M. and Roman, R. V. (1998). Performance of airlift bioreactors in the cultivation of some antibiotic producing microorganisms. *Acta Biotechnologica*, 18(3), 201-229.

Gerson, D. F. and Kole, M. M. (2001). Quantitative measurements of mixing intensity in shake-flasks and stirred tank reactors. Use of the Mixmeter, a mixing process analyzer. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 153–156.

Gessler, N. N., Aver'yanov, A. A. and Belozerskaya, T. A. Reactive oxygen species in regulation of fungal development (2007). *Biochemistry Moscow*, 72, 1091–1109.

Gibbs, P. A. and Seviour, R. J. (1996). Does the agitation rate and/or oxygen saturation influence exopolysaccharide production by *Aureobasidium pullulans* in batch culture? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 46, 503–510.

Gibbs, P. A., Seviour, R. J., & Schmid, F. (2000). Growth of filamentous fungi in submerged culture: problems and possible solutions. *Critical reviews in biotechnology*, 20(1), 17-48.

Glazebrook, M., Vining, L. and White, R. (1992). Growth morphology of *Streptomyces akiyoshiensis* in submerged culture - Influence of pH, inoculum and nutrients. *Canadian Journal of Microbiology*, 38, 98-103.

Gómez-Díaz, D. and Navaza, J. M. (2003). Mass Transfer in a Flat Gas/Liquid Interface using non-Newtonian Media. *Chemical Engineering and Technology*, 26(10), 1068-1073.

Gyamerah, M. (1995). Factors affecting the growth form of *Aspergillus terreus* NRRL 1960 in relation to itaconic acid fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 356–361.

Haj-Husein, L., Olmos, E., Blanchard, F., Fick, M., Delaunay, S. (2011). Comparaison de la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de leur culture en fioles d'Erlenmeyer et en bioréacteur agité mécaniquement. XIIème congrès de la société Française de Génie des Procédés. Numéro 101, Ed. SFGP, Paris, France.

Haj-Husein L., Olmos E., Feustel S., Mehmood N., Malaplate-Armand C., Fick M., Delaunay S. (2013). Impact de la dissipation volumique sur la taille et la viabilité cellulaire au sein de pelotes de *Streptomyces pristinaespiralis* cultivées en fiole d'Erlenmeyer agité. XIVème congrès de la société Française de Génie des Procédés. Numéro 104, Ed. SFGP, Paris, France

Hamanaka, T., Higashiyama, K., Fujikawa, S., Park and E.Y. (2001). Mycelial pellet intrastucture and visualization of mycelia and intracellular lipid in a culture of *Mortierella alpina*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56, 233-238.

Henzler, H. J. and Schedel, M. (1991). Suitability of the shaking flask for oxygen supply to microbiological cultures. *Bioprocess Engineering*, 7(3), 123-131.

Hibiki, T. and Ishii, M. (2000). One-group interfacial area transport of bubbly flows in vertical round tubes. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 43(15), 2711-2726.

Hille, A., Neu, T. R., Hempel, D. C. and Horn, H. (2005). Oxygen profiles and biomass distribution in biopellets of *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 614–623.

Hughmark, G. A. (1980). Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 19(4), 638-641.

- Islam, R.S., Tisi, D., Levy, M.S. and Lye, G.J. (2007). Scale up of *Escherichia coli* growth and recombinant protein expression conditions from microwell to laboratory and pilot scale based on matched k_La . *Biotechnology and Bioengineering*, 99, 1128-1139.
- Jonsbu, E., McIntyre, M. and Nielsen, J. (2002). The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *Journal of Biotechnology*, 95, 133-144.
- Junker, B. H. (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 347-364.
- Jüsten, P., Paul, G. C., Nienow, A. W. and Thomas, C. R. (1996). Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*, 52(6), 672-684.
- Kang, X., Wang, H., Wang, Y., Harvey, L. M. and McNeil, B. (2001). Hydrodynamic characteristics and mixing behaviour of *Sclerotium glaucum* culture fluids in an airlift reactor with an internal loop used for scleroglucan production. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 27, 208-214.
- Ki, S. S., Jeong, Y. S., Kim, P. H. and Chung, G. T. (2006). Effects of dissolved oxygen level on avermectin B1a production by *Streptomyces avermitilis* in computer-controlled bioreactor cultures. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 16(11), 1690-1698.
- Kim, J.H. and Hancock, I.C. (2000). Pellet forming and fragmentation in liquid culture of *Streptomyces griseus*. *Biotechnology Letters*, 22, 189-192.
- Klößner, W., Tissot, S., Wurm, F. and Büchs, J. (2012). Power input correlation to characterize the hydrodynamics of cylindrical orbitally-shaken bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 65, 63-69.
- Klößner, W. and Büchs, J. (2012). Advances in shaking technologies. *Trends in Biotechnology*, 30(6), 307-314.
- Kossen N.W.F. (1984). Problems in the design of large scale bioreactors. 7th *International Biotechnology Symposium*, New Delhi, Inde.
- Kouda, T., Yano, H. and Yoshinaga, F. (1997). Effect of agitator configuration on bacterial cellulose productivity in aerated and agitated culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(4), 371-376.
- Koynov, A., Tryggvason, G. and Khinast, J. G. (2007). Characterization of the localized hydrodynamic shear forces and dissolved oxygen distribution in sparged bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 97, 317-331.
- Kreiner, M., Harvey, L. M. and McNeil, B. (2003). Morphological and enzymatic responses of a recombinant *Aspergillus niger* to oxidative stressors in chemostat cultures. *Journal of Biotechnology*, 100(3), 251-260.

- Krull, R., Cordes, C., Horn, H., Kampen, I., Kwade, A., Neu, T. R. and Nörtemann, B. (2010). Morphology of filamentous fungi: linking cellular biology to process engineering using *Aspergillus niger*. In *Biosystems Engineering II* (pp. 1-21). Springer Berlin Heidelberg.
- Krull R., Wucherpennig T., Esfandabadi M.E., Walisko R., Melzer G., Hempel D.C., Kampen I., Kwade A. and Wittmann C. (2013). Characterization and control of fungal morphology for improved production performance in biotechnology. *Journal of Biotechnology*, 163(2), 112-123.
- Kwon, H.-J. and Kim, S.-U. (1998). Enhanced biosynthesis of clavulanic acid in *Streptomyces clavuligerus* due to oxidative challenge by redox-cycling agents. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49, 77–83.
- Larpent J.P. and Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Edition Masson, 1-70.
- Larsson, G., Törnkvist, M., Wernersson, E.S., Trägårdh, C., Noorman, H. and Enfors, S-O. (1996). Substrate gradients in bioreactors: origin and consequences. *Bioprocess Biosystem Engineering*, 14, 281–289.
- Legendre, D. and Magnaudet, J. (1998). The lift force on a spherical bubble in a viscous linear shear flow. *Journal of Fluid Mechanics*, 368, 81-126.
- Lencastre Fernandes, R., Nierychlo, M., Lundin, L., Pedersen, A.E. Puentes Tellez, P. Dutta, A. Carlquist, M. Bolic, A. Schäpper, D. Brunetti, D. Helmark, S. Heins, A.L. Jensen, A. Nopens, I. Rottwitt, K. Szita, N. van Elsas, J. Nielsen, P. Martinussen, J. and Sørensen, S. (2011). Experimental methods and modeling techniques for description of cell population heterogeneity. *Biotechnology Advances*, 29, 575-599.
- Li, X., Zhang, J., Tan, Y., Li, Z., Yu, X., Xia, J., Chu, J. and Ge, Y. (2013). Effects of flow field on the metabolic characteristics of *Streptomyces lincolnensis* in the industrial fermentation of lincomycin. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 115, 27-31.
- Li, Z. J. *et al.* (2000). Fungal morphology and fragmentation behavior in a fed-batch *Aspergillus oryzae* fermentation at the production scale. *Biotechnology and Bioengineering*, 70, 300–312.
- Liao, X., Vining, L.C. and Doull, J.D. (1995). Physiological control of trophophase and iodophase separation on *Streptomyces* cultures producing secondary metabolites. *Canadian Journal of Microbiology*, 41, 309–315.
- Lin, P. J., Scholz, A. and Krull, R. (2010). Effect of volumetric power input by aeration and agitation on pellet morphology and product formation of *Aspergillus niger*. *Biochemical Engineering Journal*, 49(2), 213-220.
- Lissac J. and Avril J.L. (1977). Synergistines, vancomycines et polymyxines. *Antibiotiques. Anntibacteriens (II)*. 27 (45), 2959-2964.
- Liu, B. L., Kao, P. M., Tzeng, Y. M. and Feng, K. C. (2003). Production of chitinase from *Verticillium lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, 33(4), 410-415.

- Lu, S., Ding, Y. and Guo, J. (1998). Kinetics of fine particle aggregation in turbulence. *Advances in Colloid and Interface Science*, 78(3), 197-235.
- Luo, L., Liu, F., Xu, Y. and Yuan, J. (2011). Hydrodynamics and mass transfer characteristics in an internal loop airlift reactor with different spargers. *Chemical Engineering Journal* 175, 494–504.
- Luo, H. P. and Al-Dahhan, M. H. (2008). Local characteristics of hydrodynamics in draft tube airlift bioreactor. *Chemical Engineering Science*, 63(11), 3057-3068.
- Madigan, M. and Martinko, J. (2005). *Brock Biology of Microorganisms*. 11th ed. Prentice-Hall, New Jersey, USA.
- Maier, U. and Büchs, J. (2001). Characterisation of the gas–liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 7, 99–106.
- Mariano, G.S., Enrique, B.A., Hugo, J.I., Jose, N.B., Eloy, B.C. and Ramiro, R.M. (2006). Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures. *Journal of Advances in Agricultural and Food Biotechnology*, 2, 17-34.
- Matsmura, M., Imanaka, T., Yoshida, T. and Taguchi, H. (1980). Morphological differentiation in relation to cephalosporin C synthesis by *Cephalosporium acremonium*. *Journal of Fermentation Technology*, 58, 197–204.
- Mehmood, N., Olmos, E., Marchal, P., Goergen, J. -L. and Delaunay, S. (2010). Relation between pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis*, power dissipation and volumetric gas-liquid mass transfer coefficient, k_La . *Process Biochemistry* 45 (11), 1779-1786.
- Mehmood, N., Olmos, E., Goergen, J. L., Blanchard, F., Ullisch, D., Klöckner, W. and Delaunay, S. (2011). Oxygen supply controls the onset of pristinamycins production by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks. *Biotechnology and Bioengineering*, 108(9), 2151-2161.
- Mehmood, N. (2011). Effets de l'hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de cultures en flacons agités. Thèse de doctorat. INPL, Nancy, France.
- Mehmood, N., Olmos, E., Marchal, P., Goergen, J. -L., Klöckner, W., Büchs, J. and Delaunay, S. (2012). Decoupling power dissipation and oxygen transfer rate for the study of the production of pristinamycines by *Streptomyces pristinaespiralis* in shaking flasks, *Biochemical Engineering Journal*, 68, 25-33.
- Meier, S. J., Hatton, T. A. and Wang, D. I.C. (1999). Cell death from bursting bubbles: role of cell attachment to rising bubbles in sparged reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 62, 468–478.
- Merchuk, J. C. and Siegel, M. H. (1988). Air-lift reactors in chemical and biological technology. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 41, 105–120.

- Merchuk, J. C., Contreras, A., García, F. and Molina, E. (1998). Studies of mixing in a concentric tube airlift bioreactor with different spargers. *Chemical Engineering Science* 53, 709–719.
- Metz, B. and Kossen, N. W. F. (1977). The growth of molds in the form of pellets—a literature review. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 781–799.
- Metz B, Kossen N.W.F and Van Suijdam J.C. (1979). The rheology of mould suspensions. *Advances Biochemical. Engineering*, 11, 104-159.
- Michel, B. J. and Miller, S. A. (1962). Power requirements of gas-liquid agitated systems. *AIChE Journal*, 8(2), 262-266.
- Mohamed, M., Mohamad, R., Manan, M. and Ariff, A. (2012). Enhancement of red pigment production by *Monascus purpureus* FTC 5391 through retrofitting of helical ribbon impeller in stirred-tank fermentor. *Food Bioprocess Technology*, 5, 80–91.
- Mollet, M., Godoy-Silva, R., Berdugo, C., and Chalmers, J. J. (2007). Acute hydrodynamic forces and apoptosis: a complex question. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 772-788.
- Möller, J., Niehoff, J., Hotop, S., Dors, M. and Schügerl, K. (1992). The influence of preculture on the process performance of penicillin V production in a 100-L air-lift tower loop reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology* 37, 157–163.
- Nagata, S. (1975). *Mixing: principles and applications*. Wiley- Verlag, New York.
- Nedal, A. et al. (2007). Analysis of the Mycosamine Biosynthesis and Attachment Genes in the Nystatin Biosynthetic Gene Cluster of *Streptomyces noursei* ATCC 11455. *Applied Environmental and Microbiology*, 22,.
- Nielsen, J. (1996). Modelling the morphology of filamentous microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 14, 438–443.
- Nienow, A. W., Langheinrich, C., Stevenson, N. C., Emery, A. N., Clayton, T. M. and Slater, N. K. (1996). Homogenisation and oxygen transfer rates in large agitated and sparged animal cell bioreactors: Some implications for growth and production. *Cytotechnology*, 22(1-3), 87-94.
- Nienow, A. W. (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50(1-3), 9-33.
- Nisbet, L.J. (1982). Current strategies in the search for bioactive microbial metabolites. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 32, 251–270.
- O'Donnell, A., Bai, Y., Bai, Z., McNeil, B. and Harvey, L. M (2007). Introduction to bioreactors of shake-flask inocula leads to development of oxidative stress in *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*. 29, 895–900.

- Okba, A., Ogata, T., Matsubara, H., Matsuo, S., Doi, K. and Ogata, S. (1998). Effects of bacitracin and excess Mg^{2+} on submerged mycelial growth of *Streptomyces azureus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 28-33.
- Olmos, E., Gentric, C., Vial, C., Wild, G. and Midoux, N. (2001). Numerical simulation of multiphase flow in bubble column reactors. Influence of bubble coalescence and break-up. *Chemical Engineering Science*, 56(21), 6359-6365.
- Pamboukian, C, Guimarães, L., Facciotti, M. (2002). Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 17-21.
- Papagianni, M. (2004). Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*, 22, 189–259.
- Paquet, V. (1990). Mise en évidence de facteurs d'induction de la production des pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.
- Parro, V., Mellado, R. P. and Harwood, C. R. (1998). Effects of phosphate limitation on agarase production by *Streptomyces lividans* TK21. *FEMS microbiology letters*, 158(1), 107-113.
- Paul, E.L., Atiemo-Obeng, V.A. and Kresta, S.M. (2004), *Industrial mixing*. Wiley Interscience.
- Peter, M. and Kilonzo, A. M. (2004). The effects of non-Newtonian fermentation broth viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal*, 17, 27–40.
- Peter, C. P., Suzuki, Y. and Büchs, J. (2006a). Hydromechanical stress in shake flasks: correlation for the maximum local energy dissipation rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 93(6), 1164-1176.
- Peter, C. P., Suzuki, Y., Rachinskiy, K., Lotter, S. and Büchs, J. (2006b). Volumetric power consumption in baffled shake flasks. *Chemical Engineering Science*, 61(11), 3771-3779.
- Pollard, D. J., Ison, A. P., Shamlou, P. A. and Lilly, M. D. (1998). Reactor heterogeneity with *Saccharopolyspora erythraea* airlift fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 58(5), 453-463.
- Porse, B. T. and Garrett, R. A. (1999). Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms. *Journal of Molecular Biology*, 286, 375–387.
- Posch, A.E., Herwig, C. and Spadiut, O. (2013). Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*, 31(1), 37-44.
- Preud'homme J et al. (1968). Pristinamycine: isolement, caractérisation et identification des constituants. *Bulletin de la Société de Chimie Française*, 2, 585-591.

Prosser, J. I. and Tough, A. J. (1991). Growth mechanisms and growth kinetics of filamentous microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, 10, 253–274.

Qu, L., Ren, L. and Huang, H. (2013). Production of recombinant proteins by filamentous fungi Scale-up of docosahexaenoic acid production in fed-batch fermentation by *Schizochytrium sp.* based on volumetric oxygen-transfer coefficient. *Biochemical Engineering Journal*, 77, 82- 87.

Reyes, C., Peña, C. and Galindo, E. (2003). Reproducing shake flasks performance in stirred fermentors: production of alginates by *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Biotechnology*, 105(1), 189-198.

Rodríguez-Monroy, M. and Galindo, E. (1999). Broth rheology, growth and metabolite production of *Beta vulgaris* suspension culture: a comparative study between cultures grown in shake flasks and in a stirred tank. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(10), 687-693.

Rønnest, N. P., Stocks, S. M., Lantz, A. E., & Gernaey, K. V. (2012). Comparison of laser diffraction and image analysis for measurement of *Streptomyces coelicolor* cell clumps and pellets. *Biotechnology letters*, 34(8), 1465-1473.

Roth, M., Noack, D. and Reinhardt, G. (1982). Properties of non-differentiating derivatives of *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Genetic Microbiology*, 128, 2687–2691.

Rousseau, I. and Bu'Lock, J. D. (1980). Mixing characteristics of a simple air-lift. *Biotechnology Letters*, 2, 475–480.

Ruohang, W. and Webb, C. (1995). Effect of cell concentration on the rheology of glucoamylase fermentation broth. *Biotechnology Technology*, 9, 55–58.

Saffroy S. (2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat. Nancy-Université. Nancy, France.

Sanchez, S. and Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzyme and Microbial Technology*, 31(7), 895-906.

Sandford, P.A. (1979). Extracellular microbial polysaccharides. *Advances Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, 36, 265-313.

Sanyal, J., Marchisio, D. L., Fox, R. O. and Dhanasekharan, K. (2005). On the comparison between population balance models for CFD simulation of bubble columns. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 44(14), 5063-5072.

Sawatzky, D. (2008). Oxygen toxicity part 1 how does it work, *Diver magazine*.

Schügerl, K., Wittler, R. and Lorenz, T. (1983). The use of molds in pellet form. *Trends in Biotechnology*, 1, 120-123.

Schügerl, K. (1990). Comparison of the performances of stirred tank and airlift tower loop reactors. *Journal of Biotechnology*, 13(4), 251-256.

Seghezzi, N. (2009). *Métabolisme énergétique et régulation de la biosynthèse d'antibiotiques chez Streptomyces*. Thèse de doctorat, UFR scientifique d'ORSAY, Université Paris XI, Paris, France.

Seletzky, J. M., Noak, U., Fricke, J., Welk, E., Eberhard, W., Knocke, C. and Büchs, J. (2007). Scale-up from shake flasks to fermenters in batch and continuous mode with *Corynebacterium glutamicum* on lactic acid based on oxygen transfer and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(4), 800-811.

Serrano-Carreón, L., Balderas-Ruíz, K., Galindo, E. and Rito-Palomares, M. (2002). Production and biotransformation of 6-pentyl-alpha-pyrone by *Trichoderma harzianum* in two-phase culture systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 58, 170–174.

Shaikh, A. and Al-Dahhan, M. (2013). Scale-up of Bubble Column Reactors: A Review of Current State-of-the-Art. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. In press.

Shen, B. et al. (2002). Cloning and Characterization of the Bleomycin Biosynthetic Gene Cluster from *Streptomyces verticillus* ATCC150031. *Journal of Natural Products*, 65, 422–431.

Shioya, S., Morikawa, M., Kajihara, Y. and Shimizu, H. (1999). Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(2), 164-169.

Shomura, T., Yoshida, J., Amani, S., Kojima, M., Inouye, S. and Niida, T. (1979). Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces balstedii* strain SF-1993. *Journal of Antibiotics*, 32, 427.

Shu, C.-H., Chou, P.-F and Hsu, I.-C. (2005). Effects of morphology and oxygen supply on schizophyllan formation by *Schizophyllum commune* using a pellet size controlling bioreactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80, 1383–1388.

Siedenberg, D., Gerlach, S. R., Schügerl, K., Giuseppin, M. L. F. and Hunik, J. (1998). Production of xylanase by *Aspergillus awamori* on synthetic medium in shake flask cultures. *Process Biochemistry*, 33(4), 429-433.

Simonin, O. and Viollet, P.L. (1990a). Modeling of turbulent two-phase jets loaded with discrete particles. *Phenomena in Multiphase Flows*, 259-269.

Simonin, O. and Viollet, P.L. (1990b). Predictions of an oxygen droplet pulverization in a compressible subsonic coflowing hydrogen flow. *Numerical Methods for Multiphase Flows*. FED91. 65-82.

Smit, G., Straver, M., Lugtenberg, B. and Kijne, J. (1992). Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Applied Environmental Microbiology*, 58, 3709-3714.

- Sturm, B. S. M. and Irvine, R. L. (2008). Dissolved oxygen as a key parameter to aerobic granule formation. *Water Science and Technology*, 58, 781–787.
- Su, W. and Jun He, B. (1997). Secreted enzyme production by fungal pellets in a perfusion bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 54, 43–52.
- Suijdam, J. C. van, Kossen, N. W. F. and Paul, P. G. (1980). An inoculum technique for the production of fungal pellets. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 10, 211–221.
- Tamura, S., Park, Y., Toriyama, M., and Okabe, M. (1997). Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(6), 523-528.
- Talvy, S., Cockx, A., and Liné, A. (2007). Modeling of oxygen mass transfer in a gas–liquid airlift reactor. *AIChE Journal*, 53(2), 316-326.
- Talvy, S., Cockx, A. and Liné, A. (2008). Analyse et modélisation du fonctionnement des air-lifts, dans *Phénomènes de transferts en génie des procédés*, Lavoisier Tec&Doc, Paris, 783.
- Tan, R. K., Eberhard, W. and Büchs, J. (2011). Measurement and characterization of mixing time in shake flasks. *Chemical Engineering Science*, 66(3), 440-447.
- Tay, J.-H., Liu, Q. S. and Liu, Y. (2001). The effects of shear force on the formation, structure and metabolism of aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 57, 227–233.
- Tenson, T., Lovmar, M and Ehrenberg, M. (2003). The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 330, 1005–1014.
- Theobald, U., Schimana, J. and Fiedler, H. P. (2000). Microbial growth and production kinetics of *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. *Antonie van Leeuwenhoek*, 78(3-4), 307-313.
- Tissot, S., Farhat, M., Hacker, D. L., Anderlei, T., Kühner, M., Comninellis, C. and Wurm, F. (2010). Determination of a scale-up factor from mixing time studies in orbitally shaken bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 52(2), 181-186.
- Tissot, S. (2011). *OrbShake Bioreactors for Mammalian Cell Cultures: Engineering and Scale-up*. Thèse de doctorat de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suisse).
- Tissot, S., Oberbek, A., Reclari, M., Dreyer, M., Hacker, D. L., Baldi, L., Farhat, M. and Wurm, F. M. (2011). Efficient and reproducible mammalian cell bioprocesses without probes and controllers? *New biotechnology*, 28(4), 382-390.
- Tomiyama. "Struggle with computational bubble dynamics". *Third International Conference on Multiphase Flow, Lyon, France*. June 8–12, 1998.
- Uy D. (2003) Etude cinétique et métabolique de *Corynebacterium glutamicum* 2262 au cours de la fermentation glutamique : instabilité de la production de glutamate en procédé continu thermo-induit. Thèse de doctorat, ENSAIA, INPL, Nancy, France.

- Van't Riet, K. (1979). Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 18(3), 357-364.
- Vardar, F. and Lilly, M. D. (1982). Effect of cycling dissolved oxygen concentrations on product formation in penicillin fermentations. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 14(4), 203-211.
- Vecht-Lifshitz, S., Magdassi, S. and Braun, S. (1989) Effects of surface active agents on pellet formation in submerged fermentations of *Streptomyces tendae*. *Journal of Dispersion Science and Technology*, 10, 265-275.
- Vecht-Lifshitz, S. E., Magdassi, S. and Braun, S. (1990). Pellet formation and cellular aggregation in *Streptomyces tendae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(9), 890-896.
- Ventura, M. *et al.* (2007). Genomics of *Actinobacteria* : tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 71, 495–548.
- Voelker, F and Altaba, S. (2001). Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* 147(9), 2447-2459.
- Wallemacq, P. E. and Reding, R. (1993). FK506 (tacrolimus), a novel immunosuppressant in organ transplantation: clinical, biomedical, and analytical aspects. *Clinical Chemistry*, 39, 2219–2228.
- Wan, J. (2011). Evolution of bioaggregate strength during aerobic granular sludge formation. *Biochemical Engineering Journal*, 58–59, 69–78.
- Wang, D. I. C., Cooney, C. L., Demain, A. L., and Dunnill, P. (1979). *Fermentation and enzyme technology*. 194-211. John Wiley and Sons, New York.
- Wang, L., Ridgway, D., Gu, T. and Moo-Young, M. (2005). Bioprocessing strategies to improve heterologous protein production in filamentous fungal fermentations. *Biotechnology Advances*, 23(2), 115-129.
- Wang, T. and Wang, J. (2007). Numerical simulations of gas–liquid mass transfer in bubble columns with a CFD–PBM coupled model. *Chemical Engineering Science*, 62(24), 7107-7118.
- Warmoeskerken, M. and Smith, J. (1988). 2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics.
- Weheliye, W., Yianneskis, M. and Ducci, A. (2013). On the fluid dynamics of shaken bioreactors—flow characterization and transition. *AIChE Journal*, 59(1), 334-344.
- Wen, X. J. (2005). Characteristics of three-phase internal loop airlift bioreactors with complete gas recirculation for non-Newtonian fluids. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 27, 193–205.

- Weuster-Botz, D. (2005). Parallel reactor systems for bioprocess development. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, 125-143.
- Weyand, B., Israelowitz, M., Schroeder, H. P. and von Vogt, P. M. (2009). Fluids dynamics in bioreactor design: considerations for the theoretical and practical approach in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering* (Kasper, D. C., Griensven, P. M. van & Pörtner, D. R.) 251–268, Springer Berlin Heidelberg.
- Whitaker, A. (1992). *Actinomycetes* in submerged culture. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 32, 23-35.
- Wittler, R., Baumgardtl, H., Lubbers, D. and Schugerl, K. (1986). Investigations of oxygen transfer into *Penicillium chrysogenum* pellets by microprobe measurements. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 1024-1036.
- Xu, C. P., Kim, S. W., Hwang, H. J. and Yun, J. W. (2006). Production of exopolysaccharides by submerged culture of an entomopathogenic fungus, *Paecilomyces tenuipes* C240 in stirred-tank and airlift reactors. *Bioresource Technology*, 97, 770–777.
- Xuereb, C., Poux, M. and Bertrand, J. (2006). *Agitation et Mélange*, Editions Dunod, Paris, France.
- Yegneswaran, P. K., Gray, M. R. and Thompson, B. G. (1991). Effect of dissolved oxygen control on growth and antibiotic production in *Streptomyces clavuligerus* fermentations. *Biotechnology Progress*, 7(3), 246-250.
- Yen, H.W. and Hsiao, H.P. (2013). Effects of dissolved oxygen level on rapamycin production by pellet-form of *Streptomyces hygroscopicus*, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, in press, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.03.011>
- Yin, P. Wang, Y.H., Zhang, S.L., Chu, J., Zhuang, Y.P., Chen, N., Li, X.F. and Wu, Y.B. (2008). Effect of mycelial morphology on bioreactor performance and avermectin production of *Streptomyces avermitilis* in submerged cultivations. *Journal of the Chinese Institute of Chemical Engineers* 39, 609–615.
- Yong, J.H. and Byeon, W.H. (2005). Alternative production of avermectin components in *Streptomyces avermitilis* by gene replacement. *Journal of Microbiology*, 43, 277–284.
- Yuguo, Z., Zhao, W. and Xiaolong, C. (2000). α -Amylase production by *Bacillus subtilis* with dregs in an external-loop airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*, 5(2), 115-121.

Titre : Impact de l'agitation et de l'aération sur la réponse physiologique de *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338 lors de sa culture en bioréacteurs mécaniquement agité et gazosiphon

Résumé

Des travaux préliminaires réalisés en fiole d'Erlenmeyer ont montré que l'environnement hydrodynamique, caractérisé par la puissance dissipée volumique (P/V) et le coefficient de transfert en oxygène (k_La), jouait un rôle important lors du procédé de production de pristinamycines par *Streptomyces pristinaespiralis* (Mehmood, 2011). L'objectif de ce travail est donc d'étudier l'influence de ces deux phénomènes dans des bioréacteurs mécaniquement agités (STR), largement utilisés à l'échelle industrielle, et de type gazosiphon. Dans un premier temps, une description de l'environnement hydrodynamique global a été réalisée en STR. En ce qui concerne le bioréacteur gazosiphon, celui-ci a été conçu et dimensionné spécifiquement pour ce travail. Une caractérisation des écoulements dans ce bioréacteur a ensuite été réalisée par simulation numérique des écoulements. En appliquant les mêmes conditions hydrodynamiques que celles étudiées lors de culture en fioles d'Erlenmeyer, les performances en terme de croissance et de production de pristinamycines ont toujours été moindres en STR et en gazosiphon qu'en fiole. Ceci démontre que P/V , k_La mais également la dissipation maximum, ne constituent pas les bons paramètres d'extrapolation. Par contre, les performances mesurées semblent être reliée aux variations de formes morphologiques observées (présence et taille des pelotes) et à la physiologie des cellules au sein de ces structures. De façon surprenante, au cours de ce travail, le déclenchement de la production de pristinamycines a quasiment toujours été obtenu lors de la phase de croissance de *S. pristinaespiralis*. Nos travaux n'ont pas permis de mettre en évidence la raison de ce phénomène. Celui-ci est certainement la conséquence de plusieurs paramètres qui restent encore à préciser.

Mots-clé : *Streptomyces pristinaespiralis*, pristinamycines, hydrodynamique, puissance dissipée volumique, transfert d'oxygène, bioréacteur gazosiphon, CFD

Title: Influence of agitation and aeration on the physiological behavior of *Streptomyces pristinaespiralis* DSMZ 40338 during cultures in stirred tank and airlift bioreactors.

Abstract

Previous results performed in Erlenmeyer flasks have shown that the hydrodynamics, characterized by power dissipation per unit of volume (P/V) and volumetric oxygen mass transfer coefficient (k_La), impacted the production of pristinamycins by *Streptomyces pristinaespiralis* (Mehmood, 2011). The aim of this work is then to study the influence of these two parameters in a stirred tank bioreactor (STR), widely used in industry, and in an airlift bioreactor. This last bioreactor has been designed specifically for this work. In a first part, the hydrodynamic environment was described in STR and the fluid flows were simulated by computational fluid dynamics (CFD). Using the same hydrodynamic conditions in STR and in airlift bioreactor than in flasks, the process performance (bacterial growth and pristinamycin production) were always lower in STR and airlift bioreactor. This demonstrates that P/V , k_La and also maximum dissipation were not pertinent scale-up criteria for the pristinamycin production from flask to STR or airlift bioreactor. On the contrary, the determined performances seemed to be related to the changes in bacterial morphology (presence and size of pellets) and to the physiology of the cells inside these structures. Surprisingly, during this work, the initiation of the pristinamycin production occurred almost always during the growth phase of *S. pristinaespiralis*. This phenomenon was probably due to the conjunction of several parameters which remain to identify.

Keywords: *Streptomyces pristinaespiralis*, pristinamycins, hydrodynamics, power dissipation, oxygen transfer, airlift bioreactor, CFD.