



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>

1360035736

98INPL024N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE
Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique

THESE

présentée à l'INPL

par

Thierry PAYOT

en vue d'obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialisation : Biotechnologie et Industries Alimentaires

**DEVELOPPEMENT D'UN PROCEDE INTEGRE DE
PRODUCTION ET D'EXTRACTION D'ACIDE
LACTIQUE PAR UN BACILLE THERMOPHILE**

**ETUDES CINETIQUES, REALISATION D'UN REACTEUR A HAUTE DENSITE CELLULAIRE
ET MODELISATION**

Soutenu publiquement le 31 mars 1998 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Président : M J.-M. ENGASSER

Examineurs : MM J.C. BOGAERT

T. ERPICUM

Rapporteurs : MM C. DIVIES

Directeur de thèse : M. FICK

G. GOMA

*A Laurie-Anne,
à Sylvie,
et à toute ma famille.*

~ Avant - propos ~

Avant - Propos

Je remercie Messieurs Daniel TONDEUR et Hans-Günter LINTZ, Directeurs du Laboratoire des Sciences du Génie Chimique de m'avoir accueilli au sein de ce laboratoire. Ce travail a été réalisé dans le Groupe Génie des Procédés Biotechnologiques et Alimentaires dont je remercie les Directeurs successifs Madame Annie MARC et Monsieur Ivan MARC.

Je remercie également Monsieur Gérard VIVIER, Délégué Régional du Centre National de la Recherche Scientifique, pour m'avoir permis de faire partie du personnel du CNRS pendant trois ans.

Je tiens à remercier plus particulièrement Monsieur Michel FICK, Professeur à l'ENSAIA, pour m'avoir un jour laissé ma chance, pour avoir encadré mon travail et pour la confiance qu'il a su me témoigner pendant ces années.

Je remercie Messieurs Charles DIVIES, Professeur à l'ENSBANA de Dijon et Gérard GOMA, Professeur à l'INSA de Toulouse, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail.

Je tiens également à remercier, Messieurs Jean -Marc ENGASSER, Professeur à l'ENSAIA, Thomas ERPICUM, Directeur de recherche chez ROQUETTE et Jean-Christophe BOGAERT, Directeur de recherche chez GALACTIC auquel j'adresse une sympathie particulière.

Je remercie également nos partenaires du programme AIR3 CT 94-2285, Brussels Biotech de Bruxelles, le Centre Européen de Recherche sur les Macromolécules (CERM) de Liège, l'Institut für Kunststoff Technologie (IKT) de Stuttgart et la société Buck Werk de Bad-Reichenhall.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes que j'ai côtoyé durant ces trois années au GPBA, et particulièrement, Evelyne, Bernard et Fabrice pour leur aide technique, Marie-Thérèse et Christelle pour l'administratif et leur bonne humeur, Mohamed pour son aide pour le pilote. Merci également à Michel L., Alain J. pour leur aide spécifique.

*Ces remerciements s'adressent également à tous les chercheurs et amis :
Delphine, Isabelle, Samia, Pascale, Florence, Marianne, Cathy, Catherine, Manu, Pierre-Yves, Denis, Ali, Fabrice, Aurélio, Séraphim, Claude, Daniel, Hichem, Damien, Stéphane et tous les autres...*

*Et à ceux qui ont contribué directement à ce travail :
Zahi, Frédéric, Sandrine, Isabelle, David, Arnaud, Jean-Claude et Nicolas.*

~ SOMMAIRE
GENERAL ~

SOMMAIRE GENERAL

	Pages
INTRODUCTION	1
CONTEXTE DE L'ETUDE	7
CHAPITRE I : <i>Etude bibliographique : la production d'acide lactique</i>	15
CHAPITRE II : <i>Etude bibliographique : le réacteur à membrane</i>	63
CHAPITRE III : <i>Matériels et Méthodes</i>	77
CHAPITRE IV : <i>Etude cinétique de la souche modèle</i>	107
CHAPITRE V : <i>Etude de la filtration d'un milieu de fermentation</i>	185
CHAPITRE VI : <i>Etude du pilote de fermentation à recyclage cellulaire</i>	225
CHAPITRE VII : <i>Essais de modélisation</i>	265
CONCLUSIONS et PERSPECTIVES	279
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	285
ANNEXES	

~ Nomenclature ~

NOMENCLATURE

		<i>Unités</i>
ATP	adénosine tri-phosphate	
C	carbone	
CLHP	chromatographie liquide de haute performance	
Colm.	colmatage de la membrane de filtration	%
D	taux de dilution	h^{-1}
d	durée de la fermentation	h
decolm.	temps entre deux « back-flush »	mn
DHAP	dihydroxy-acétone phosphate	
D.O.	densité optique	
dP	pression transmembranaire	bar
D_x	taux de purge	h^{-1}
E.L.	extrait de levure	
EMP	Embden Meyerhoff Parnas	
Ext.	extrait	
F6P	fructose 6-phosphate	
FDP	fructose di-phosphate	
Fructose_f	concentration en fructose finale	$g.L^{-1}$
G6P	glucose 6-phosphate	
GA-3P	glycéraldéhyde 3-phosphate	
GPT	glutamate pyruvate transaminase	
INTER	interaction	
J	flux de perméat	$L.h^{-1}.m^{-2}$
K_d	constante de décès cellulaire	h^{-1}
K_{ip}	constante d'inhibition par l'acide lactique	$g.L^{-1}$
K_{is}	constante d'inhibition par le substrat	$g.L^{-1}$
K_s	constante d'affinité pour le substrat	$g.L^{-1}$
Liq.	liquide	
m	constante de maintenance	h^{-1}
max.	maximal	
n	puissance d'inhibition	
NAD	Nicotinamide Adénine Dinucléotide	
nd	non déterminé	
ns	non significatif	

N_{tot.}	azote total	
P	concentration en acide lactique	g.L ⁻¹
P₁	pression d'entrée de la membrane	bar
P₂	pression sortie de la membrane (rétentat)	bar
P_r	concentration maximale en acide L(+) lactique	g.L ⁻¹
P_i	pente initiale	L.h ⁻¹
PEP	phosphoénol pyruvate	
PPC	pentose phosphocétolase	
prod_f	concentration finale (totale) en co-produits de la fermentation	g.L ⁻¹
PS	poids sec	
Q_a	débit d'alimentation	L.h ⁻¹
Q_p	débit de perméat	L.h ⁻¹
Q_{ps}	débit de perméat à l'état stationnaire	L.h ⁻¹
Q_r	débit de recyclage	L.h ⁻¹
q_s	vitesse spécifique de consommation du substrat	g.g ⁻¹ .h ⁻¹
Q_x	débit de purge	L.h ⁻¹
Re	Nombre de Reynolds	
r_p'''	vitesse d'accumulation d'acide lactique	g.l ⁻¹ .h ⁻¹
RPA	réacteur parfaitement agité	
RPM	rotation par minute	rpm
r_s'''	vitesse de consommation de saccharose	g.l ⁻¹ .h ⁻¹
r_x'''	vitesse de croissance	g.l ⁻¹ .h ⁻¹
S	concentration en substrat	g.L ⁻¹
S_a	concentration en substrat dans l'alimentation	g.L ⁻¹
S_r	concentration en sucre résiduel	g.L ⁻¹
Sol.	solide	
t	temps	h
t_{1/2}	temps pour la perte de la moitié du débit de perméat	mn
t_r	durée de la partie recyclage	h
t_s	temps pour arriver à l'état stationnaire	mn
ufc	unité formant colonie	
V	volume	L
X	concentration en biomasse	g.L ⁻¹
X_r	concentration maximale en biomasse	g.L ⁻¹
Y_{P/S}	rendement de production d'acide lactique	g.g ⁻¹
Y_{P/S0}	rendement (acide lactique produit sur sucre total)	g.g ⁻¹
Y_{X/S}	rendement (biomasse produite sur substrat consommé)	g.g ⁻¹

Indices :

0	initial
max	maximal
c	critique
f	final

Lettres Grecques :

δ	productivité	$\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Δ	productivité spécifique	$\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$
Π_p	vitesse spécifique de production d'acide lactique	$\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$
μ	vitesse spécifique de croissance	h^{-1}
τ	temps de passage	h
ψ	capacité spécifique de production d'acide lactique par un micro-organisme	g.g^{-1}

~ Liste des Graphiques ~

GRAPHIQUES

Graphe IV. 1 : Fermentation F1. Etude sommaire de la souche en culture discontinue. Evolution des concentrations en sucres et acides.	114
Graphe IV. 2 : Fermentation F1. Etude sommaire de la souche en culture discontinue. Evolution de la concentration en biomasse et détermination du μ_{max}	114
Graphe IV. 3 : Fermentations F2-4. Etude du pH de la culture et préculture. Evolution comparative des concentrations en biomasse.	120
Graphe IV. 4 : Fermentation F3. Etude du pH de la culture et préculture. Evolution du PH de la fermentation F3 non régulée.	120
Graphe IV. 5 : Fermentations F2-4. Etude du pH de la culture et préculture. Evolution comparative des concentrations en acide lactique.	120
Graphe IV. 6 : Fermentations F3. Etude du pH de la culture et préculture. Relation de linéarité entre la production de lactate et la diminution du pH.	120
Graphe IV. 7 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en biomasse.	124
Graphe IV. 8 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en fructose.	124
Graphe IV. 9 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en acide lactique.	124
Graphe IV. 10 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en acétate et autres produits (total).	124
Graphe IV. 11 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en saccharose.	124
Graphe IV. 12 : Fermentation F8. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.	128
Graphe IV. 13 : Fermentation F9. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.	128
Graphe IV. 14 : Fermentation F11. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.	128
Graphe IV. 15 : Fermentation F10. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.	128
Graphe IV. 16 : Fermentation F8-11. Etude de l'assimilation du fructose. Détermination des μ_{max}	128
Graphe IV. 17 : Fermentation F12. Etude de l'assimilation du fructose. Pulse de 20 g/L de glucose. Evolution de la biomasse et détermination du μ_{max}	132
Graphe IV. 18 : Fermentation F12. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en sucres et acide L(+) lactique.	132
Graphe IV. 19 : Fermentation F13. Etude comparative de deux sources de saccharose. Evolution de la concentration en biomasse et détermination des taux de croissances maximum (μ_{max}).	132

Graphe IV. 20 : Fermentation F14. Impulsion d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution des concentrations en biomasse et acide acétique.....	136
Graphe IV. 21 : Fermentation F14. Impulsion d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution des concentrations en sucres et acide lactique.....	136
Graphe IV. 22 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution de la concentration en biomasse.....	136
Graphe IV. 23 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu.. Linéarité entre concentration et nombre de cellules.....	136
Graphe IV. 24 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution des concentrations en sucres et acides.....	136
Graphe IV. 25 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu. Linéarité entre la concentration en lactate et la conductivité.....	136
Graphe IV. 26 : Fermentation F16. Plan d'expérience essai n°1. Evolution des concentrations en biomasse, saccharose et acide lactique.....	142
Graphe IV. 27 : Fermentation F16. Plan d'expérience essai n°1. Evolution des concentrations en fructose et autres co-produits du métabolisme.....	142
Graphe IV. 28 : Fermentations F16-17. Plan d'expérience essais n°1 et 2. Evolution de la concentration en biomasse.....	142
Graphe IV. 29 : Fermentations F18-21. Plan d'expérience essais n°3 à 6. Evolution de la concentration en biomasse.....	142
Graphe IV. 30 : Fermentations F22-24. Plan d'expérience essais n°7 à 9. Evolution de la concentration en biomasse.....	142
Graphe IV. 31 : Fermentations F25-27. Plan d'expérience essais n°10 à 12. Evolution de la concentration en biomasse.....	142
Graphe IV. 32 : Fermentations F28-29. Plan d'expérience essais n°13 à 14. Evolution de la concentration en biomasse.....	146
Graphe IV. 33 : Fermentation F30. Plan d'expérience essai n°16. Evolution des concentrations en biomasse, saccharose et acide lactique.....	146
Graphe IV. 34 : Fermentations F31-33. Plan d'expérience essais n°15a à 15c. Evolution comparative de la concentration en biomasse.....	146
Graphe IV. 35 : Fermentations F31-33. Plan d'expérience essais n°15a à 15c. Evolution comparative de la concentration en acide lactique.....	146
Graphe IV. 36 : Fermentation F31. Plan d'exp. essais n°15a. Evolution de la concentration en biomasse, saccharose et acide lactique.....	146
Graphe IV. 37 : Fermentation F31. Plan d'exp. essais n°15a. Evolution des concentrations en fuctose et des autres métabolites de la fermentation.....	146
Graphe IV. 38 : Fermentation Continue 1 (C1). Impulsion de 5g de corn steep. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.....	152
Graphe IV. 39 : Fermentation C1. Impulsion de 2g de corn steep filtré. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.....	152

Graphe IV. 40 : Fermentation Continue 2 (C2). Impulsion de l'extrait cellulaire n°1. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.	152
Graphe IV. 41 : Fermentation C2. Impulsion de l'extrait cellulaire n°2. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.	152
Graphe IV. 42 : Fermentation C2. Impulsion de l'extrait cellulaire n°3. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.	152
Graphe IV. 43 : Fermentation C2. Impulsion de l'extrait cellulaire n°4. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.	152
Graphe IV. 44 : Fermentations F34-F36 : Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en biomasse.	156
Graphe IV. 45 : Fermentations F34,F37,F38 : Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en biomasse.	156
Graphe IV. 46 : Fermentations F34,F39,F40 : Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en biomasse.	156
Graphe IV. 47 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en acide lactique.	156
Graphe IV. 48 : Fermentations F34-F36: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution des concentration en sucres.	158
Graphe IV. 49 : Fermentations F34,F37,F38: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution des concentration en sucres.	158
Graphe IV. 50 : Fermentations F34,F39,F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution des concentration en sucres.	158
Graphe IV. 51 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Calcul des μ_{max}	158
Graphe IV. 52 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. μ_{pmax} en fonction de μ_{max}	158
Graphe IV. 53 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. q_{smax} en fonction de μ_{max}	158
Graphe IV. 54 : Fermentation continue C3: Impulsion de 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	164
Graphe IV. 55 : Fermentation continue C3: Impulsion de 2 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	164
Graphe IV. 56 : Fermentation continue C3: Impulsion de 2 g/L de KH_2PO_4 . Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	164
Graphe IV. 57 : Fermentation continue C3: Impulsion de 0,5 g/L de $MgSO_4$. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	164
Graphe IV. 58 : Fermentation continue C4: Impulsion de 0,1 g/L de $MnSO_4$. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	164
Graphe IV. 59 : Fermentation continue C4: Impulsion de 0,1 g/L de $FeSO_4$. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	164
Graphe IV. 60 : Fermentation continue C5: Impulsion de 1 mg/L d'acide pantothénique. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	170

Graphe IV. 61: Fermentation continue C5: Impulsion de 75 µg/L de pyridoxal. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	170
Graphe IV. 62 : Fermentation continue C5: Impulsion de 100 µg/L de cyanocobalamine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	170
Graphe IV. 63 : Fermentation continue C5: Impulsion de 1,5 mg/L d'acide nicotinique. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	170
Graphe IV. 64 : Fermentation continue C5: Impulsion de 150 µg/L de thiamine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	170
Graphe IV. 65 : Fermentation continue C5: Impulsion de 150 µg/L de riboflavine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	170
Graphe IV. 66 : Fermentation continue C5: Impulsion de 6 µg/L d'acide folique. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	172
Graphe IV. 67: Fermentation continue C5: Impulsion de 30 µg/L de biotine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	172
Graphe IV. 68 : Fermentation continue C5: Impulsion de 100 µg/L de biotine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	172
Graphe IV. 69 : Fermentations F34, F40, F41 et F42: Effet des vitamines en culture discontinue. Effet sur la production de biomasse.	172
Graphe IV. 70 : Fermentations F34, F40, F41 et F42: Effet des vitamines en culture discontinue. Effet sur la production d'acide lactique.	172
Graphe IV. 71 : Fermentation continue C6: Ajout d'oxygène de l'air. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	178
Graphe IV. 72: Fermentation continue C6: Ajout d'oxygène de l'air. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.	178

Graphe V. 1 : Corrélation entre l'affichage et le débit réel de la pompe.	190
Graphe V. 2 : Filtration S1- Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et de la température du fluide. Représentation en 3D.	190
Graphe V. 3 : Filtration S1- Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et de la température du fluide. Représentation en 2D.	190
Graphe V. 4 : Filtration S2- Evolution du flux de perméat en fonction du débit de recyclage et de l'ouverture de la vanne de contre pression à 25°C. Représentation en 3D	192
Graphe V. 5 : Filtration S2- Evolution du flux de perméat en fonction du débit de recyclage et de l'ouverture de la vanne de contre pression à 50°C. Représentation en 3D	192
Graphe V. 6 : Filtration S2 - Pression en fonction du flux. vanne ouverte à 75 %.	192
Graphe V. 7 : Filtration S2 - - Pression en fonction du flux. vanne ouverte à 60 %.	192
Graphe V. 8 : Filtration S3 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de contre pression.	194
Graphe V. 9 : Filtration S3 - Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de pression.	194

Graphe V. 10 : Filtration S3 - Evolution du débit de perméat en fonction de la pression d'entrée P1 et pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de contre pression.	194
Graphe V. 11 : Filtration S4 - Membrane 0,2 μ m 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1	198
Graphe V. 12 : Filtration S4 - Membrane 0,2 μ m 19 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1	198
Graphe V. 13 : Filtration S4 - Membrane 0,45 μ m 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1	198
Graphe V. 14 : Filtration S4- Membrane 0,45 μ m 19 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1	198
Graphe V. 15 : Filtration S4 - Membrane 0,8 μ m 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1	198
Graphe V. 16 : Filtration S4 - Membrane 0,8 μ m 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et de la pression d'entrée P1	198
Graphe V. 17 : Filtration S4 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 100%.	200
Graphe V. 18 : Filtration S4 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 75%.	200
Graphe V. 19 : Filtration S4 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 60%.	200
Graphe V. 20 : Filtration S4- Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 50%.	200
Graphe V. 21 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la pression (P1) et du débit de recyclage (Q_r)	210
Graphe V. 22 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la pression (P1) et du débit de recyclage (Q_r)	210
Graphe V. 23 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la concentration en biomasse (X) et du débit de recyclage (Q_r)	210
Graphe V. 24 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) final en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)....	212
Graphe V. 25 : Evolution du colmatage en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)	212
Graphe V. 26 : Evolution du temps pour stabiliser le flux en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)....	212
Graphe V. 27 : Evolution de la pente initiale en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)	216
Graphe V. 28 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la pression (P1) et de X (g/L) pour une fréquence de décolmatage de 0,5 mn ⁻¹ et un débit de recyclage de 1500 L/h	216
Graphe V. 29 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) final en fonction de 3 paramètres du plan d'expériences. Le paramètre 4 (décolmatage) n'ayant pas d'influence - Membrane 0,45 μ m.....	216

Graphe V. 30 : Evolution du colmatage en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre) - Membrane 0,45 μm	218
Graphe V. 31 : Evolution de la pente initiale en fonction de la pression et du débit de recyclage pour la membrane 0,45 μm	218
Graphe V. 32 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) final en fonction de 3 paramètres du plan d'expériences. Le paramètre 4 (décolmatage) n'ayant pas d'influence - Membrane 0,8 μm	218

Graphe VI. 1 : Fermentation avec recyclage cellulaire R1 - Evolution de la productivité, des concentrations en biomasse et en acide L(+) lactique.	226
Graphe VI. 2 : Fermentation avec recyclage cellulaire R1 - Evolution du débit de perméat, du taux de dilution et de l'ouverture de la vanne de contre-pression.	226
Graphe VI. 3 : Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des concentrations en biomasse.	232
Graphe VI. 4 : Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des concentrations en acide lactique.	232
Graphe VI. 5 : Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des concentrations en saccharose.....	232
Graphe VI. 6 : Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des pics de fructose.	232
Graphe VI. 7 : Fermentation Recyclage 2 (R2) . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution des concentrations en biomasse et lactate.	236
Graphe VI. 8 : Fermentation R2 . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution du débit de perméat et de la productivité.....	236
Graphe VI. 9 : Fermentation R2 . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution des rendements.	236
Graphe VI. 10 : Fermentation R2 . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution de la pression de l'installation et de la fermeture de la vanne de pression.	236
Graphe VI. 11 : Fermentation R3 . Etude du taux de dilution et du taux de purge. Evolution des concentrations en biomasse et en acide lactique.....	242
Graphe VI. 12 : Fermentation R3. Etude du taux de dilution et du taux de purge.. Evolution de la productivité, du taux de dilution et du débit de perméat.....	242
Graphe VI. 13 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la concentration maximale en biomasse obtenue.....	242
Graphe VI. 14 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge Principaux effets des deux paramètres sur la concentration maximale en biomasse obtenue.....	242
Graphe VI. 15 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la productivité maximale obtenue.....	244
Graphe VI. 16 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la productivité maximale obtenue.....	244
Graphe VI. 17 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la durée de la phase de production en recyclage cellulaire.....	244

Graphe VI. 18 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la durée de la phase de production en recyclage cellulaire.....	246
Graphe VI. 19 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Détermination de la zone optimale pour améliorer les performances du procédé - critères = productivité et durée.	246
Graphe VI. 20 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Effets des paramètres sur la productivité spécifique ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$).	246
Graphe VI. 21 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des concentrations en biomasse et en acide lactique.....	252
Graphe VI. 22 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des concentrations en saccharose dans le fermenteur et dans l'alimentation.	252
Graphe VI. 23 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions du taux de dilution et du taux de purge.....	252
Graphe VI. 24 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions de la pression d'entrée P1 et transmembranaire.	252
Graphe VI. 25 : Fermentation R12. Conditions optimales - Concentration en extraits azotés dans l'alimentation. et productivité spécifique obtenue.	252
Graphe VI. 26 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des rendements de conversion.	252
Graphe VI. 27 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolution de la productivité volumétrique du procédé.	254
Graphe VI. 28 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolution du rapport entre la quantité d'acide D(-) et L(+) lactique.....	254
Graphe VI. 29 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions du flux de perméat et de l'ouverture de la vanne de contre pression.	254
Graphe VI. 30 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des concentrations en métabolites de la voie hétérolactique et D(-) lactate.	254
Graphe VI. 31 : Fermentation R12. Conditions optimales - Rapport entre la concentration de lactate dosé par C.L.H.P et la conductivité.	254
Graphe VI. 32 : Fermentation R12. Conditions optimales - Détermination de la vitesse spécifique de croissance.....	254

Graphe VII. 1 :Modélisation de l'évolution de la biomasse (g/L).....	269
Graphe VII. 2 : Modélisation des évolutions des concentrations en saccharose et en acide lactique (g/L) pour les cultures discontinues.	269
Graphe VII. 3 :Modélisation de l'évolution de la biomasse (g/L).....	270
Graphe VII. 4 : Modélisation des concentrations en saccharose et en acide lactique (g/L) pour une culture continue à $0,15 h^{-1}$	271
Graphe VII. 5 :Modélisation de l'évolution de la biomasse, de l'acide lactique et du saccharose (g/L) pour une culture continue avec recyclage cellulaire.	272
Graphe VII. 6 : Modélisation du débit de perméat pour la membrane $0,2 \mu m$	276
Graphe VII. 7 : Modélisation du flux de perméat pour la membrane $0,8 \mu m$	276

~ INTRODUCTION ~

INTRODUCTION

L'expansion du marché de l'acide lactique, qui n'a cessé de progresser depuis 20 ans, va prendre une dimension supplémentaire avec le développement de polymères totalement biodégradables: les PLA ou polymères d'acide lactique. Ces biopolymères peuvent être utilisés directement pour la substitution de certains plastiques polluants comme ceux utilisés en emballage (PVC, polyéthylène) et qui ne sont pas totalement recyclables.

Les applications industrielles sont multiples et touchent aussi bien l'agro-alimentaire que la médecine, comme cela va être décrit dans le contexte de l'étude.

Le programme de travail s'inscrit donc dans le cadre d'un consortium international regroupant des universités et des industriels de l'Europe occidentale (Allemagne, Belgique, France) au sein d'un programme AAIR financé par l'Union Européenne.

L'intitulé exact de ce programme est : « Développement de polymères d'acide lactique biodégradables à partir de matières premières agricoles pour de nouvelles applications industrielles. » (Van Gansberghe et al., 1995)

L'objectif affiché est la mise en place à l'échelle pilote d'une filière complète de production de PLA (Polymères d'acide lactique) allant de l'utilisation des substrats (jus vert ou lactosérum) jusqu'à l'étude économique du produit fini.

Le programme de travail, d'une durée de trois ans, a été divisé en six tâches réparties entre les cinq partenaires du projet :

- ❶ Développement d'un procédé intégré de production et d'extraction d'acide lactique.
- ❷ Optimisation de la purification de l'acide lactique.
- ❸ Réaction de polymérisation de l'acide lactique à partir de lactide.
- ❹ Caractérisation chimique et physique des PLA nouvellement développés.
- ❺ Alliage, mélange des PLA avec d'autres biopolymères
- ❻ Potentialités économiques et emballages à base de PLA

Un cahier des charges a été réalisé, dès la mise en place du projet, pour répartir les tâches de chaque partenaire en fonction de ses compétences.

Le Laboratoire des Sciences du Génie Chimique (LSGC) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) est impliqué dans ce projet au niveau de l'amélioration de la production de l'acide lactique par rapport au procédé industriel. Deux voies ont été choisies pour relever ce défi scientifique et technique. La première voie, et c'est l'objet de la présente thèse de doctorat, est un changement global de procédé alliant fermentation et extraction du lactate d'ammonium via un réacteur à haute densité cellulaire, avec du jus vert comme source de carbone. Il s'agit donc d'un procédé intégré.

Le deuxième voie de recherche, qui est en cours actuellement, vise à améliorer le procédé industriel vers un passage en continu total avec un couplage fermentation continue et extraction du lactate de calcium par cristallisation continue. La source de carbone étant le lactosérum. Cette seconde voie, commencée postérieurement à la première, est réalisée également au sein du LSGC dans le cadre d'une autre thèse de doctorat.

La seconde tâche de ce programme européen est réalisée par un industriel belge GALACTIC, via son unité de R&D BRUSSELS BIOTECH S.A. (2B). L'étude porte sur la purification de la forme estérifiée de l'acide lactique par distillation continue.

La troisième et quatrième partie sont étudiées conjointement par 2B et le Centre Européen de Recherche sur les Macromolécules (CERM) basé à l'Université de Liège en

Belgique. Leurs travaux sont orientés vers la production de dimères (lactide), d'oligomères et de polymères d'acide lactique, ainsi que la détermination des propriétés physiques et chimiques des PLA.

Les biopolymères produits à Liège sont étudiés dans une cinquième partie par une collaboration entre le CERM et l'Institut für Kunststoff Technologie (IKT) basé à l'Université de Stuttgart en Allemagne. Des alliages ou mélanges avec d'autres polymères sont étudiés afin de montrer les applications potentielles des PLA.

Enfin, lors d'une sixième partie, une étude économique poussée sur les applications potentielles des polymères d'acide lactique, ainsi que des emballages ou produits finis sont réalisés par un industriel allemand de Bad Reichenhall BUCK Werk.GmbH & Co.

La production de monomère d'acide lactique par fermentation est le premier travail à réaliser dans cette filière de production.

Plusieurs objectifs scientifiques et industriels ont été définis afin d'orienter les recherches conformément au cahier des charges fixé au préalable.

L'objectif industriel principal est le développement d'un procédé performant et innovant de production d'acide lactique à partir d'un substrat carboné non-raffiné. Les procédés industriels actuels étant réalisés dans des conditions discontinues avec des performances de productivité perfectibles.

Les objectifs scientifiques qui découlent de ce projet sont multiples:

Premièrement, il s'agit d'étudier une souche productrice d'acide lactique modèle dont les caractéristiques sont proches des souches industrielles utilisées pour ce type de bioconversion. Ceci amène une première question :

- ❶ Quelles sont les particularités physiologiques et cinétiques de ce type de souche ?

Deuxièmement, il s'agit de mettre en oeuvre cette souche afin de comparer ses paramètres cinétiques et ses performances en fonction des conditions de fermentation. Dans l'optique d'une amélioration du procédé, ceci amène une seconde question :

❷ Quelle technologie faut-il mettre en oeuvre pour améliorer la production d'acide lactique par ce micro-organisme ?

Troisièmement, il s'agit de développer un procédé de production d'acide lactique performant dans un domaine d'expérimentation relativement large en utilisant des techniques rapides d'expérimentations et d'optimisations. Ceci soulève une nouvelle question :

❸ Quels moyens d'expérimentation utiliser pour développer et tester le procédé ?

Enfin, les données acquises au cours de ce travail engendrent une dernière question :

❹ Peut-on élaborer un modèle permettant de simuler les conditions opératoires non testées lors de cette étude ?

Les démarches scientifiques et expérimentales choisies vont permettre, d'emblée, de répondre partiellement à la troisième question. En effet, seule l'utilisation de plans d'expériences, couplés à des expérimentations ponctuelles, peuvent répondre à l'objectif fixé.

En ce qui concerne le cheminement de ce travail de recherche, plusieurs parties sont nécessaires pour aboutir aux objectifs:

- Tout d'abord, des études physiologiques et cinétiques de la souche, de la composition du milieu de culture et des paramètres physico-chimiques vont être réalisées.
- La conception d'un réacteur à haute densité cellulaire couplant fermenteur et membrane de microfiltration va être entreprise à partir des connaissances acquises dans la littérature.
- La partie microfiltration va être découplée de la fermentation et étudiée à part, pour tenter d'optimiser les deux parties séparément.
- L'optimisation finale sera ensuite réalisée sur le procédé global en étudiant les paramètres intrinsèques à ce type de réacteur et en intégrant la fermentation et la microfiltration.
- Enfin des essais de modélisation des fermentations et de la microfiltration seront validés par confrontation avec les valeurs expérimentales.

Après la présentation du contexte de ce travail à l'aide d'études de marchés et de perspectives scientifiques de long terme, un premier chapitre résumera les connaissances acquises et décrites dans la littérature scientifique et dans certains brevets industriels relatifs aux souches productrices et à la production d'acide lactique.

Le deuxième chapitre bibliographique sera consacré à l'étude du réacteur à haute densité cellulaire en évoquant ses points forts et ses faiblesses.

Le chapitre III décrira les techniques, les matériels et les méthodes employés lors de ce travail.

Le chapitre IV proposera une étude morphologique et cinétique de la souche utilisée en fermentation.

Le chapitre V traitera de la microfiltration d'un milieu de culture modèle chargé en bactéries.

Dans le chapitre VI, nous étudierons le pilote de fermentation avec recyclage cellulaire.

Et enfin, dans le chapitre VII, une étude permettra de réaliser des essais de modélisation du procédé de fermentation et de microfiltration.

~ Contexte de l'étude ~

Contexte de l'étude

SOMMAIRE

1. LES POLYMERES D'ACIDE LACTIQUE (PLA).....	8
1.1. LE MARCHÉ DES BIOPOLYMERES	8
1.2. LES APPLICATIONS DES PLA.....	10
1.3. LE CYCLE DES POLYMERES D'ACIDE LACTIQUE	11
1.4. RECHERCHE ET DEVELOPPEMENT SUR LES PLA	12
2. CONCLUSION.....	13

TABLEAUX

Tableau 0.1: Principaux polymères biodégradables produits industriellement.....	9
Tableau 0.2 : Classement des biomatériaux en fonction de leur capacité à être assimilés.....	9

FIGURES

Figure 0.1: Marché potentiel des bioplastiques	8
Figure 0.2: Marché potentiel par application.....	8
Figure 0.3 : Applications potentielles des polymères d'acide lactique ou PLA.....	10
Figure 0.4 : Voie de synthèse et de dégradation des PLA (- synthèse - dégradation).....	11
Figure 0.5 : Principaux producteurs de PLA, production estimée (tonnes).....	12
Figure 0.6 : Estimation du prix des PLA (F ₉₅ /Kg).....	12

CONTEXTE DE L'ETUDE

Le travail réalisé lors de cette thèse s'inscrit dans le cadre d'un programme européen AIR (Agriculture and agro-Industry Research), n°3 CT 94-2285. Ce programme vise à étudier la production de nouveaux matériaux biodégradables tout en valorisant des co-produits en excès dans les pays de l'Union Européenne.

En effet, certains co-produits des industries laitières ou sucrières sont en excès dans beaucoup de pays de l'U.E. La valorisation non alimentaire est une voie intéressante pour réduire la quantité de ces produits d'origine agricole.

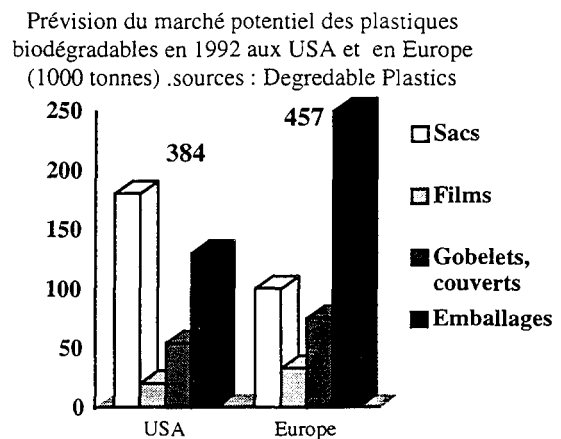
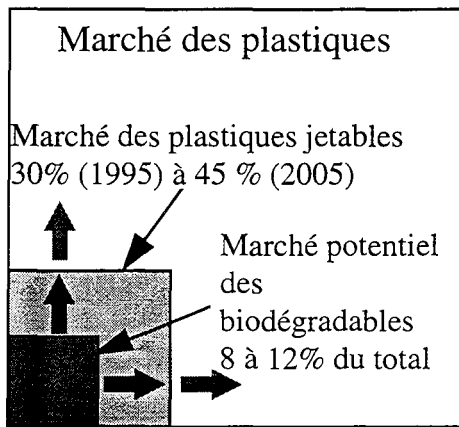
Mais la véritable philosophie de ce projet AIR est le développement de nouveaux matériaux totalement biodégradables à base de PLA (polymères d'acide lactique) qui dans un avenir proche pourront remplacer des matériaux plastiques polluants (PVC, polyéthylène...). Cette nouvelle génération de polymères est l'objet de nombreuses études actuellement, les applications potentielles sont aussi nombreuses que variées comme nous le verrons par la suite.

1. LES POLYMERES D'ACIDE LACTIQUE (PLA)

1.1. Le marché des biopolymères

La consommation des plastiques dans le monde atteint 120 millions de tonnes en 1995 et devrait atteindre 140 millions de tonnes en 2000 pour un marché global de 200 milliards de \$ US (Tournois, 1997). Le marché des plastiques jetables représente 30% de la consommation des plastiques; cette part de marché ne cesse de croître pour atteindre 45% en l'an 2005 selon de nombreux experts (Daridon, 1996, **Figure 0.1**).

Figure 0.1: Marché potentiel des bioplastiques **Figure 0.2:** Marché potentiel par application



Le marché potentiel des matériaux biodégradables représenterait au moins 25% du marché des plastiques jetables soit 16 milliards de \$US à ce jour. Les sacs et emballages biodégradables étant le plus gros marché, à la fois aux USA et dans l'Union Européenne (**Figure 0.2**).

Les biopolymères les plus répandus étant à base d'amidon et d'acétate de cellulose, mais qui présentent deux inconvénients majeurs : l'hydrophilie et la biodégradabilité limitée. D'autres types de biopolymères sont également connus et étudiés et leurs principales caractéristiques sont décrites dans le **Tableau 0.1** (Daridon, 1996).

Tableau 0.1: Principaux polymères biodégradables produits industriellement.

Polymère	Coût (FF94/Kg)	Niveau de production (1000 t/an)	Facteurs de performances	Points positifs	Points négatifs
Amidon	1,84 -9,8	<10 000	rapport amylose /amylopectine	faible coût dégradation rapide	hydrophilie
Acétate de cellulose	13,5	1 000 -1 100	degré de substitution	résistance à l'élongation	biodégradabilité limitée si ° de substitution >2.2
Polyhydroxyalca. PHB ou PHV	73,5-98	0,3	longueur des chaînes latérales ratio copolymères	biodégradation rapide, résiste à l'eau	coût
poly(vinyl alcool) PVOH	18,4-30,6	68 - 90	poids moléculaire % d'hydrolyse	bonne barrière à l'oxygène résistant	soluble dans l'eau
Polycaprolactone PCL	33,1	<4,5	poids moléculaire, cristallinité	biodégradable résistant à l'eau	biodégradation lente
Poly(lactic acid) PLA	12,2-36,7	4,5	ratio D/L, poids moléculaire	résistance à l'élongation film transparent	sensible à l'hydrolyse

Parmi les polymères les plus étudiés, figurent les polymères d'acide lactique ou PLA. Ce biopolymère est une source renouvelable au sens scientifique du terme et est donc totalement biodégradable. Les PLA font partie des matériaux de deuxième catégorie dit « biodégradables et bioassimilables » définis par des normes ASTM aux USA, normes AFNOR et ISO 846-1978 en France (**Tableau 0.2**) (Daridon, 1996)

Tableau 0.2 : Classement des biomatériaux en fonction de leur capacité à être assimilés.

<p>Selon normes ASTM, AFNOR et ISO-846-1978</p> <p><u>Comestibles, bioassimilables et biodégradables</u> : protéines, glucides et huiles végétales. (Catégorie 1)</p> <p><u>Bioassimilables et biodégradables</u> : polyesters, polyhydroxyalcanoates (PHA), polyhydroxybutyrate (PHB), polycaprolactone (PCL) et produits dérivés du lactate (PLA). (Cat. 2)</p> <p><u>Bioassimilables à plus de 60%, biodégradables et biofragmentables</u> : amidon, cellulose et plastifiant. (Cat. 3)</p> <p><u>Biofragmentables</u> : 5% d'amidon, pas bioassimilables, mais disparition du champ visuel. (Cat. 4)</p>
--

Ces différents matériaux sont également classés en fonction de leur intérêt actuel et de leur niveau de développement (Hakola, 1997). Ainsi les matériaux de première génération au milieu des années 80 étaient le polyéthylène modifié ou composés amidon-polyéthylène, qui ont été finalement très peu utilisés. La seconde génération des matériaux biodégradables a été à la fin des années 80 et début 90 : les polycaprolactone-amidon et polyvinyl-alcool amidon. Enfin la dernière génération ou biopolymères des années 90 sont les PLA.

1.2. Les applications des PLA

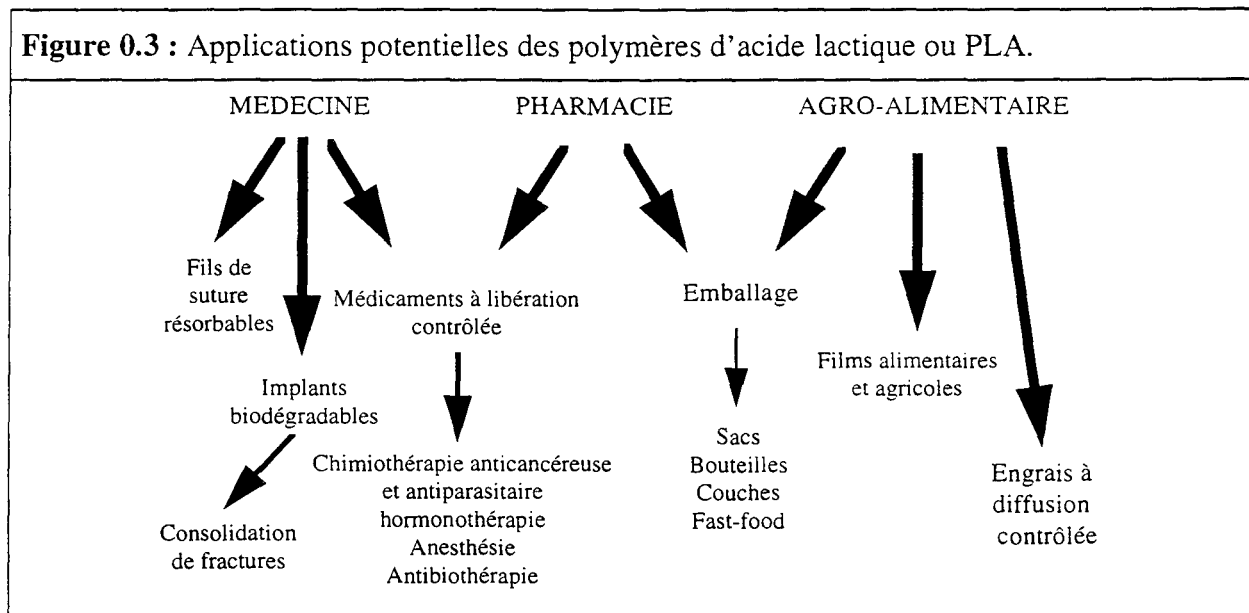
Les avantages des PLA sont indéniables : ils sont faciles à réaliser, possèdent des propriétés très variées et ont donc un champ d'application très large (**Figure 0.3**); ils ont également l'avantage d'être totalement biodégradables et renouvelables (Daridon, 1996).

Les applications qui sont développées couramment sont les fils de sutures résorbables et les médicaments à effet retard. En général, ce sont des applications à haute valeur ajoutée, compte tenu du prix encore élevé de ce polymère (120 F₉₅/Kg).

Les trois principaux secteurs concernés dans un avenir proche sont: la médecine, la pharmacologie et l'agro-alimentaire. Les applications les plus spectaculaires sont les implants biodégradables (clous de consolidation de fracture remplaçant les broches) et des implants nerveux qui après un accident pourraient réduire le nombre de para et tétraplégiques par insertion dans la moelle épinière.

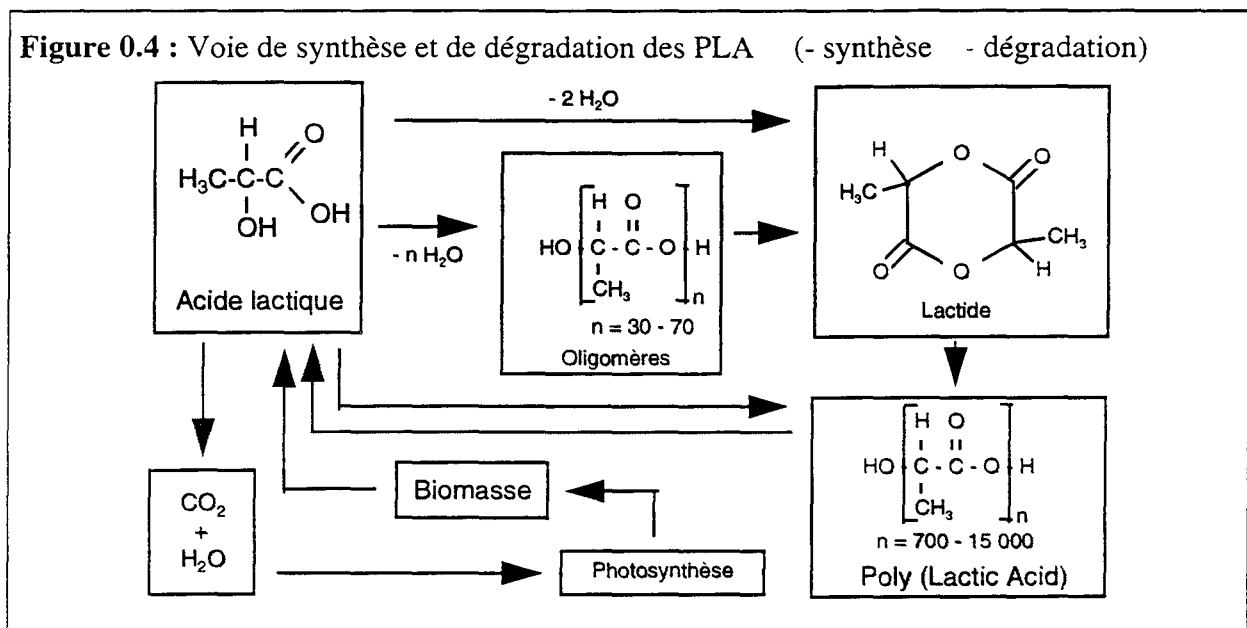
Pour la pharmacie, réalisation de couches et de médicaments à effet retard (Prix EUREKA de l'Union Européenne 1996, EUREKA, 1997)

Pour l'agro-alimentaire, développement de films étirables, bouteilles et couverts pour la restauration rapide.



1.3. Le cycle des polymères d'acide lactique

La voie de synthèse et de biodégradation est décrite schématiquement dans la **Figure 0.4**. L'acide lactique utilisé est obtenu par voie fermentaire car la polymérisation ne se fait principalement qu'avec l'isomère L(+) de l'acide; la voie chimique ne produisant que la forme DL racémique. L'étape clé de cette polymérisation est le passage du dimère cyclique de l'acide lactique, appelé lactide, vers les polymères d'acide lactique. La qualité du polymère obtenu, ou facteur de performance, dépend du rapport entre l'isomère L(+) et D(-) et du poids moléculaire moyen du PLA. En jouant sur ces deux principaux paramètres, des propriétés très différentes peuvent être obtenues : des films étirables aux emballages alimentaires. Les études sur la biodégradabilité ont montré que le nom de biopolymère renouvelable donné aux PLA n'était pas exagéré. Le polymère est sensible à l'hydrolyse et relargue des oligomères puis monomères de lactate qui peuvent être éliminés par des micro-organismes présents dans le sol ou dans les composts.



La synthèse des PLA va absorber une grande partie du marché du lactate dans quelques années (Daridon, 1996).

L'importance de la production et de la purification d'acide lactique est donc primordiale pour la suite du procédé, c'est probablement pour cette raison que CARGILL (le numéro 1 mondial des PLA) s'est associé avec PURAC (le numéro 1 du lactate) pour produire de grandes quantités de polymères de hauts poids moléculaires. La production mondiale de PLA doit

passer de 3500 tonnes à 110000 tonnes en moins de 10 ans et les prix devraient chuter considérablement (**Figure 0.5** et **Figure 0.6**) (Daridon, 1996).

Figure 0.5 : Principaux producteurs de PLA, production estimée (tonnes)

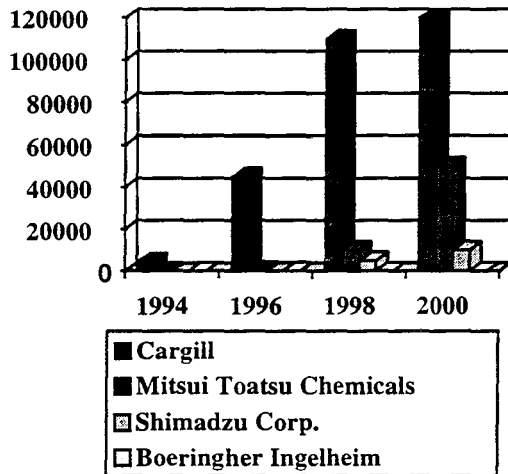
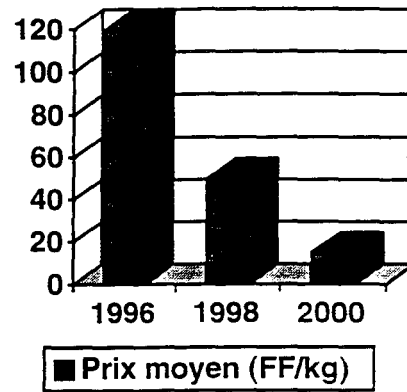


Figure 0.6 : Estimation du prix des PLA (FF₉₅/Kg)



1.4. Recherche et développement sur les PLA

De nombreuses équipes s'intéressent de plus en plus à ce thème de recherche. L'étude des polymères, des propriétés physiques et chimiques, les études technologiques et économiques sont publiées dans la littérature scientifique (Andreopoulos and Theophanides, 1994, Datta et al., 1995, Hakola, 1997). Les entreprises productrices de lactate investissent dans la recherche et le développement de ce nouveau débouché (Purac, 1990).

De nombreux domaines de recherche sont concernés par le développement de ces nouveaux biomatériaux à base de PLA:

❶ la production d'acide lactique (cf. étude bibliographique)

en fermentation : sélection de souches microbiennes

en génie des procédés : mode de fermentation

en extraction-purification : filtration, cristallisation ou centrifugation du lactate

❷ la chimie des polymères : synthèse et étude de la biodégradabilité (Lofgren and Albertsson, 1994).

en médecine : neurologie, chirurgie orthopédique (Agrawal et al., 1995).

en pharmacologie : traitement de la douleur.(Domb et al., 1994)

dans l'agro-alimentaire : emballage alimentaire (Conn et al., 1995)

- ③ la physique des matériaux (élongation, résistance)

2. CONCLUSION

Le marché de l'acide lactique subit une profonde mutation depuis le début des années 90, principalement à cause du développement du nouveau marché des PLA. Ce marché des polymères d'acide lactique biodégradables nécessite la mise en place de groupes de recherches et développements pluridisciplinaires. C'est dans cette perspective que le programme européen AIR3 CT94.2285 a été mis en place, englobant la production d'acide lactique, la polymérisation et la réalisation de produits finis. Le choix des techniques et des matières employées lors de la réalisation de ce travail se devait d'être en accord avec les intérêts scientifiques, techniques et économiques de chacun des partenaires.

~ CHAPITRE I ~

*Etude bibliographique :
La production d'acide lactique*

- CHAPITRE I -

Etude bibliographique : la production d'acide lactique

SOMMAIRE

1. HISTORIQUE	16
2. PROPRIETES CHIMIQUES ET PHYSIQUES.....	18
3. UTILISATIONS COURANTES	19
3.1. - APPLICATIONS ALIMENTAIRES.....	19
3.2. - APPLICATIONS NON ALIMENTAIRES.	20
3.2.1. - Pharmacie	21
3.2.2. - Cosmétique.....	21
3.2.3. - Applications industrielles.....	21
3.3. - NOUVELLES APPLICATIONS	21
4. SOUCHES MICROBIENNES PRODUCTRICES D'ACIDE LACTIQUE.....	22
4.1. - LES BACTERIES LACTIQUES	22
4.1.1. - Classification des lactobacilles.....	24
4.1.2. - Classification des bacilles.....	24
4.2. - LES CHAMPIGNONS FILAMENTEUX	25
4.3. - METABOLISME DES BACTERIES LACTIQUES	26
4.3.1. - Métabolisme carboné et énergétique	26
4.3.2. - Métabolisme azoté.....	35
4.3.3. - Exigences nutritionnelles.	38
4.3.4. - Effet de l'oxygène.....	40
4.3.5. - Influence de la température	41
4.3.6. - Influence du pH.....	42
4.3.7. - Influence de la concentration en acide lactique.....	42
5. PROCEDES DE PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE.....	44
5.1. - LA PRODUCTION.....	44
5.1.1. - La voie chimique	44
5.1.2. - La voie enzymatique.....	44
5.1.3. - La voie fermentaire	45
5.1.4. - Conclusion	50
5.2. - EXTRACTION DE L'ACIDE LACTIQUE PAR MEMBRANE DE FILTRATION	51
5.2.1. - La microfiltration tangentielle et l'ultrafiltration	51
6. BREVETS ET PROCEDES INDUSTRIELS.....	54
6.1. - MICRO-ORGANISMES.....	54

6.2. - PROCEDES BREVETES.....	54
6.3. - PROCEDE INDUSTRIEL.....	56
7. MODELISATION.....	58
7.1. - MODELISATION DE LA FERMENTATION LACTIQUE.....	58
7.1.1. - <i>La croissance</i>	58
7.1.2. - <i>La consommation du substrat</i>	59
7.1.3. - <i>La production d'acide lactique</i>	60
7.1.4. - <i>Les modélisations récentes</i>	60
8. CONCLUSION DU CHAPITRE I.....	61

FIGURES

Figure I.4.1: Voies de transport et de métabolisme des glucides par les bactéries lactiques.....	29
Figure I.4.2 : Transport du saccharose chez les bactéries lactiques.....	30
Figure I.4.3 : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.....	32
Figure I.4.4 : Processus de synthèse et d'utilisation de l'énergie chez les bactéries lactiques.....	35
Figure I.4.5 - Assimilation des acides aminés et peptides chez les bactéries lactiques.....	36
Figure I.5.1 : Production d'acide lactique par la voie fermentaire.....	48
Figure I.6.1 : Brevet de 1983 sur la production d'acide lactique.....	54
Figure I.6.2 : Procédé utilisé industriellement pour la production du lactate.....	57

TABLEAUX

Tableau I.1.1 : Procédé de fermentation d'acide lactique de l'Avery Lactate Company.....	16
Tableau I.2.1 : Propriétés sélectives des énantiomères d'acide lactique.....	18
Tableau I.3.1 : Les applications les plus courantes de l'acide lactique et de ses sels en industrie alimentaire.....	20
Tableau I.4.1 : Souches sélectionnées pour leur intérêt dans la production d'acide lactique racémique ou optiquement pur.....	23
Tableau I.4.2 : Souches de moisissures sélectionnées pour leur intérêt dans la production d'acide lactique.....	25
Tableau I.4.3 : exemples de matières premières carbonées utilisées pour la production d'acide lactique par voie fermentaire.....	27
Tableau I.4.4 : Sources azotées utilisées en complément de fermentation.....	37
Tableau I.4.5: Les exigences vitaminiques pour les lactobacilles et deux Bacilli.....	39
Tableau I.5.1 : Modes de production, souches et performances relevés dans la littérature.....	45
Tableau I.6.1 : Brevets récents sur la production d'acide lactique.....	55

Les études et publications concernant l'acide lactique d'origine biologique citent de plus en plus les polymères d'acide lactique biodégradables comme étant un débouché potentiel important (Andreopoulos et Theophanides, 1994). Mais, la majorité des travaux rédigés sur les bactéries lactiques restent des études sur leur physiologie et sur leur mise en oeuvre dans un procédé.

Aucune publication ou brevet ne décrit précisément le procédé réellement employé en production industrielle. Cependant, le procédé industriel supposé est sûrement assez éloigné des résultats obtenus dans les laboratoires de recherche.

Pourtant, les connaissances sur la production d'acide lactique et sur ses micro-organismes, accumulées depuis plus de cent ans, est un formidable réservoir pour tenter de développer un procédé industriel innovant.

Une revue des souches et des procédés étudiés pour la production d'acide lactique est donc nécessaire pour comprendre et choisir le type de procédé que nous allons mettre en oeuvre lors de ce travail.

1. HISTORIQUE

L'acide α -hydroxypropanoïque ou acide lactique est depuis très longtemps utilisé comme conservateur alimentaire dans les laits fermentés, les légumes, les fruits, les viandes et le pain et ceci sans aucune connaissance de sa structure chimique. Il aurait été découvert vers 1780 par Carl Wilhelm Scheele qui lui aurait donné le nom « d'acide de lait ». Les premiers travaux scientifiques sur l'identification des bactéries productrices d'acide lactique ou bactéries lactiques ont été réalisés par Louis Pasteur, Joseph Lister et Max Delbrück (Benninga, 1990). Ces travaux ont été réalisés pour la plus grande partie en Europe de l'ouest. Mais, c'est aux Etats-Unis que la première commercialisation de l'acide lactique a eu lieu; elle est attribuée à l'« Avery Lactate Company » à Littleton dans le Massachusetts vers 1883. Les premiers brevets sur le procédé de fabrication de l'acide lactique ont été déposés par le fondateur Charles E. Avery et ses associés comme étant un procédé de fermentation microbienne permettant la transformation du sucre en acide lactique par des cultures purifiées appelées « ferments lactiques purifiés » (Benninga, 1990).

La première description du milieu de fermentation est présentée dans un brevet de 1887, il montre bien la difficulté de transcription du savoir-faire empirique en procédé industriel , (Tableau I.1.1) (Waite, 1887).

Tableau I.1.1 : Procédé de fermentation d'acide lactique de l'Avery Lactate Company

Composition du milieu	Masse (Kg)
Glucose (blanc), sucre de canne ou féculé	45,4
Carbonate de Calcium	22,7
Sulfate d'ammonium	0,227
Acide phosphorique	0,009
Ferments lactiques	Faible ajout
Conditions de fermentation	
Température	40-50°C
Tension en oxygène	Air exclu, récipient fermé
Durée	12 à 15 jours

A partir du début du siècle, l'utilisation de l'acide lactique se généralise sur les cinq continents. C'est l'alimentaire qui est le plus gros consommateur de lactate, puis les industries pharmaceutiques et enfin les tanneries qui l'utilisent pour traiter les peaux; la production est alors presque exclusivement réalisée par synthèse biologique. Dès 1950, la production du

lactate devient exclusivement la propriété des grands groupes chimiques qui le synthétisent par voie chimique; la voie microbiologique est peu à peu abandonnée.

Dès 1960 et jusqu'en 1980, le secteur alimentaire et surtout pharmaceutique n'a cessé d'augmenter sa consommation en acide lactique; les tanneries ont peu à peu disparu pour laisser place à l'industrie des peintures qui l'utilise comme solvant non toxique sous forme d'esters de lactate (Purac, 1990). Cette période marque le début du retour vers la production microbiologique à grande échelle.

Au début des années 80, 50% du lactate provient de fermentations. La crise économique s'amorçant, la progression du marché se ralentit pour se stabiliser autour de 8% de croissance annuelle en 1988. Le marché pharmaceutique est en perte de vitesse, l'agro-alimentaire est stable; heureusement, le secteur de la cosmétique devient peu à peu un consommateur important notamment en lactate de calcium (abrasif dans les dentifrices) (Daridon, 1996).

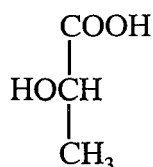
Avec le développement de nouveaux matériaux biodégradables dans les années 90, la consommation de l'acide lactique semble être de nouveau en forte croissance. Les PLA dérivés du lactate sont utilisés pour des applications à hautes valeurs ajoutées comme les fils de suture résorbables en chirurgie, ou les médicaments de nouvelles générations à effet retard (Andreopoulos et Theophanides, 1994).

Ces dernières années montrent un tournant décisif dans la production d'acide lactique au niveau mondial : l'acide lactique est presque exclusivement produit par fermentation (Sterling Chemicals, Houston, Texas, qui produisait le lactate par synthèse chimique, a définitivement arrêté sa production en 1996).

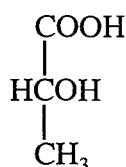
Il est maintenant clair que l'avenir de l'acide lactique passe par sa forme polymérisée (Hakola, 1997; Tournois, 1997).

2. PROPRIETES CHIMIQUES ET PHYSIQUES

Les deux isomères actifs de l'acide lactique (énantiomères) sont désignés par L(+) ou S(+) (dextrogyre) et D(-) ou L(-) (levogyre) (Holten et al., 1971) comme :



Acide L(+)- lactique



Acide D(-)- lactique

Les formes L(+) et D(-) de l'acide lactique se trouvent toutes deux dans les systèmes biologiques. Optiquement actif, l'acide lactique de haute pureté forme un cristal monoclinique sans coloration. Les propriétés générales de l'acide lactique sont résumées dans le **Tableau I.2.1**. La Rotation Optique spécifique des énantiomères de lactate de zinc est de signe opposé à celle des énantiomères d'acide libre.

Tableau I.2.1 : Propriétés sélectives des énantiomères d'acide lactique.

Propriétés	Résumé des propriétés des énantiomères		
	acide L(+) lactique	acide D(-) lactique	acide DL lactique
Poids Moléculaire (g.mol ⁻¹)	90,08	90,08	90,08
Point de fusion (°C)	52,8 à 53,6	52,8 à 53,6	16,8 à 33
Point d'ébullition (°C) à 1 atm	-	103	82-85
<i>Rotation Optique</i> [α] _D ²⁰ , degrés			
Acide	+ 2,5	- 2,5	-
sel de zinc	- 8,2	+ 8,18	-
Constante de dissociation	1,9 x 10 ⁻⁴	-	1,38 x 10 ⁻⁴
pK (25°C)	3,73	3,83	3,79

Holten, et al., 1971; Litchfield, 1996; Lockwood, 1979

L'acide lactique est soluble en toute proportion avec l'eau et est très peu volatile. En solution à 20% ou plus, il peut se produire une auto-estérification de par la présence des groupements hydroxyle et carboxyle dans la molécule d'acide lactique. Le lactate forme alors un dimère cyclique appelé lactide ou des polymères linéaires de formule générale H[OCH(CH₃)CO]_nOH.

3. UTILISATIONS COURANTES

L'acide lactique est commercialisé en tant que tel avec trois degrés différents de pureté, 50, 80 et 88%. Le produit à 88% de pureté est utilisé en alimentaire, pharmacie et applications industrielles (incluant les plastiques).

3.1. - Applications alimentaires

Le marché le plus important pour l'acide lactique est le secteur des additifs alimentaires. Ce secteur utilise l'acide lactique et ses sels, car cette molécule est reconnue comme saine (Generally Recognized As Safe) par la FDA (Food and Drug Administration) aux USA.

Le **Tableau I.3.1** résume les différentes applications alimentaires de l'acide lactique et de ses dérivés. Les applications courantes de l'acide lactique sont dues à ses propriétés acidifiantes (agent anti-microbien) et d'exhausteur de goût.

Le lactate de calcium est un bon stabilisant et épaississant, il est également utilisé en tant que source de nourriture pour les crevettes dans le sud-est asiatique, et ce marché n'est pas négligeable. Le lactate ferreux est utilisé comme source de fer pour la supplémentation des laits maternisés. Enfin le lactate de potassium et d'ammonium sont connus pour être de très bon humectants, exhausteurs de goût et émulsifiants (Litchfield, 1996).

Ce tableau montre également des additifs alimentaires formés par réaction de l'acide lactique sur des acides gras comme le stéaryl-2-lactylate de calcium et le stéaryl lactylate de sodium.

Ces molécules, ainsi que d'autres esters lactylates d'acide gras sont reconnus comme surfactants, émulsifiants ou plastifiants en alimentaire; les esters de lactate étant plutôt utilisés comme exhausteurs de goût.

Tableau I.3.1 : Les applications les plus courantes de l'acide lactique et de ses sels en industrie alimentaire

Composés d'après Litchfield, 1996	Applications en alimentaire
Acide lactique L(+)	Agent antimicrobien, salaison et saumurage,
Acide lactique D(-)	Assaisonnement, exhausteur de goût, adjuvant,
Acide lactique DL	Contrôleur de pH, solvant et excipient
Lactate de calcium	Assaisonnement, agent de fermeté, levain, supplément nutritif, stabilisant, épaississant
Lactate ferreux	Suppléments nutritifs et lait en poudre pour nourrissons
Lactate de potassium	Exhausteur de goût, agent d'assaisonnement, humectant, contrôleur de pH
Lactate de sodium	Exhausteur de goût, agent d'assaisonnement, humectant, contrôleur de pH, émulsifiant
Stéroyl-2-lactylate de calcium	Agent de conditionnement de la pâte à pain et des pommes de terre déshydratées
Stéroyl lactylate de sodium	Agent de conditionnement de la pâte à pain, émulsifiant, stabilisant dans les substituts de lait et de crèmes, pommes de terre déshydratées
Esters lactyle d'acides gras	Emulsifiant, plastifiant, surfactants alimentaires
Esters lactyle d'acide gras de glycérol et de propylène glycol	Emulsifiant, plastifiant, surfactants alimentaires
Esters glycero-lacto d'acides gras	Emulsifiant, plastifiant, surfactants alimentaires

3.2. - Applications non alimentaires.

Les applications industrielles non alimentaires sont très diversifiées et la liste qui va être dressée n'est en aucun cas exhaustive.

A l'origine, l'acide lactique produit par « l'Avery Lactate Company » était utilisé comme acidifiant dans le beurre, puis très rapidement comme agent chimique pour les textiles et le tannage des peaux (Benninga, 1990).

3.2.1. - Pharmacie

Les applications pharmaceutiques du lactate sont également importantes, cet acide organique est utilisé notamment sous sa forme ester (méthyl, éthyl ou isopropyl lactate) optiquement active comme intermédiaire pour la synthèse de molécule chirale. Le lactate de sodium est utilisé comme solution de dialyse rénale et le lactate de calcium et magnésium pour le traitement des déficiences en ces minéraux (Purac, 1990).

3.2.2. - Cosmétique

En cosmétique, le lactate de sodium et de calcium sont utilisés pour leur propriété humectante. Les acyl-lactate, préparés par réaction de l'acide lactique sur des acides gras de la classe des acides caprique et stéarique, sont connus pour leurs propriétés émulsifiantes, épaississantes et stabilisantes en cosmétique. L'acide lactique appartient également à la classe des « α -hydroxy acides » qui sont utilisés dans les produits capillaires pour améliorer la texture des cheveux et réduire les effets du vieillissement (Smith et al., 1977). Le lactate de calcium est aussi un additif courant des dentifrices de par son pouvoir abrasif (élimination de la plaque dentaire) et son apport de calcium assimilable.

3.2.3. - Applications industrielles

Les esters alkyl-lactate, comme l'éthyl et butyl-lactate sont une bonne alternative aux éthers glycol et autres solvants grâce à leur faible toxicité (Bahner, 1994). L'éthyl L(+) lactate est un remplaçant avantageux de certains solvants toxiques pour le nettoyage de métaux de précision pour l'électronique, l'aérospatiale et les industries des semi-conducteurs (Hill et Carter, 1993).

3.3. - Nouvelles applications

Les nouvelles applications de l'acide lactique sont essentiellement dues à sa forme polymérisée : poly-(acide lactique) ou PLA. Formés à partir de la forme dimère cyclique ou lactide, les PLA sont biocompatibles, biodégradables et bioassimilables. Les applications sont multiples et très variées: médecine (fils résorbables, implants biodégradables) (Lipinski et Sinclair, 1986; Seeley, 1992); alimentaire (containers, sacs) (O'Marro, 1993); agriculture (système de relargage pour engrais et pesticides) (Lipinski et Sinclair, 1986). Voir chapitre contexte de l'étude.

4. SOUCHES MICROBIENNES PRODUCTRICES D'ACIDE LACTIQUE

Un nombre très important de genres et d'espèces bactériennes et même quelques moisissures transforment des carbohydrates en acide lactique. La majorité des études sur la production de l'acide lactique vient de souches utilisées en alimentaire pour la production de fromages, de laits et d'aliments fermentés.

4.1. - Les bactéries lactiques

La définition des bactéries lactiques est très vague : « Groupe des micro-organismes et autres bactéries qui produisent de l'acide lactique comme étant un des principaux produits de la fermentation ».

La première classification date de 1919, elle s'appuyait sur la dégradation des sucres, la formation de gaz (hétéro ou homofermentaire), la morphologie (coque ou bâtonnet), les effets de l'oxygène (catalase, microaérophile ou anaérobie stricte) et la température optimale de croissance (mésophile ou thermophile). Cette classification est toujours utilisée comme base de la taxonomie des bactéries lactiques. Et même si la biologie moléculaire par l'intermédiaire du séquençage de l'ARN ribosomal a permis de décrire la phylogénie des différentes espèces et sous espèces, cette première classification est toujours très utilisée notamment pour la caractérisation de nouvelles espèces. Les tests microbiologiques peuvent se réaliser en routine (Teuber, 1993).

La neuvième édition du « Bergey's Manual of Determinative Bacteriology » classe le genre bactérie lactique en trois groupes principaux (Holst et al., 1985):

- ❶ Groupe 17 - Coque gram-positif : *Lactococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Saccharococcus* sp., *Streptococcus* spp.
- ❷ Groupe 18 - Coque et bâtonnet sporulant gram-positif : *Bacillus* spp., *Sporolactobacillus* sp.
- ❸ Groupe 19 - Bâtonnet gram-positif non sporulant, régulier : *Lactobacillus* spp.

D'autres classifications séparent *Bacillus* spp. des bactéries lactiques (Teuber, 1993).

Tableau I.4.1 : Souches sélectionnées pour leur intérêt dans la production d'acide lactique racémique ou optiquement pur (Litchfield, 1996)

Organismes	Type de métabolisme fermentaire	Enantiomère de l'acide lactique	Références
<i>Bacillus coagulans</i>	Hétérofermentaire facultatif	L(+)	Heriban et al., 1993b
<i>Bacillus laevolacticus</i>	Hétérofermentaire facultatif	D(-)	deBoer J.P. et al., 1993
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Homofermentaire	L(+)	Kandler et Weiss, 1986 Yumoto et Ikeda, 1995
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Homofermentaire	DL	Kandler et Weiss, 1986 Zhang et Cheryan, 1994
<i>Lactobacillus casei</i> subsp <i>casei</i>	Hétérofermentaire facultatif	L(+)	Kandler et Weiss, 1986 Yoo et al., 1997
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Homofermentaire	D(-)	Kandler et Weiss, 1986 Siebold et al., 1993 Benthin et Villadsen, 1995
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Homofermentaire	DL	Kandler et Weiss, 1986 Amrane et Prigent, 1997
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Hétérofermentaire facultatif	L(+)	Kandler et Weiss, 1986 Siebold, et al., 1993
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Homofermentaire	L(+)	Ishisaki et Vonkaveesuk, 1996 Cachon et Divies, 1993
<i>Streptococcus faecalis</i>	Homofermentaire	L(+)	Ohara et Yoshida, 1993
<i>Streptococcus thermophilus</i>	Homofermentaire	L(+)	Beal et Corrieu, 1994
<i>Sporolactobacillus cellulosolvens</i>	Homofermentaire	D(-)	Kanvar et al., 1995

Toutes ces bactéries ne sont pas utilisées dans des procédés de production d'acide lactique.

Quelques espèces sont étudiées pour leur capacité de production (**Tableau I.4.1**):

- ➔ *Lactobacillus* spp. : le plus étudié, performant
- ➔ *Streptococcus* spp. : souvent en culture mixte
- ➔ *Lactococcus* spp.: peu utilisé
- ➔ *Bacillus* spp.: peu de descriptions, sporulant
- ➔ *Sporolactobacillus* spp.: très peu utilisé, performances limitées

➔ *Lactobacillus* spp. étant le genre le plus utilisé et décrit dans la littérature pour la production d'acide lactique et *Bacillus* spp. le genre probablement employé en production industrielle (probablement une espèce thermophile). C'est sur ces deux genres que les principales connaissances vont être décrites.

4.1.1. - Classification des lactobacilles

Lactobacillus spp. est souvent classé en fonction du type de métabolisme observé pour le sucre, mais aussi en fonction des températures optimales de croissance et de production, de l'effet de l'oxygène, et de sa localisation dans la biosphère. Les souches étudiées pour la production d'acide lactique sont généralement issues du lait, homofermentaires ou hétérofermentaires facultatives, mésophiles et aérotolérantes. Nous nous contenterons de donner quelques exemples de souches rencontrées couramment : *Lb. casei* (Hujanen et Linko, 1996; Yoo, et al., 1997), *Lb. helveticus* (Amrane et Prigent, 1993; Timmer et Kromkamp, 1994), *Lb. rhamnosus* (Demirci et Pometto III, 1995) et *Lb. delbrueckii* (Monteagudo et al., 1994; Ye et al., 1996).

➔ Excellents producteurs, mais les lactobacilles thermophiles sont rares et la limite de croissance se situe vers 45°C, ceci est un inconvénient pour la production industrielle où la stérilisation est difficile.

4.1.2. - Classification des bacilles

Cette classification est basée sur l'aspect physionomique, physiologique et des similarités phénotypiques (%G+C) (Priest, 1993).

Les *Bacillus* sont classés en 6 groupes en fonction notamment de l'aspect des spores:

☞ Groupe I : anaérobies facultatives, endospores elliptiques qui déforment la cellule végétative. (*B. circulans*)

☞ Groupe II : spores elliptiques qui ne déforment pas la cellule végétative (*B. alcalophilus*, *B. lichenformis* et *B. subtilis*).

☞ Groupe III : aérobies strictes, ne produisent pas d'acide à partir des sucres, spores elliptiques qui déforment la cellule végétative (*B. brevis*).

☞ Groupe IV : aérobies strictes, spores sphériques qui peuvent déformer la cellule mère, production d'acide très faible (*B. pasteurii*, *B. insolitus*)

☞ Groupe V : thermophiles, groupe très hétérogène, spores ovales qui peuvent déformer la cellule mère (*B. coagulans*, *B. stearothermophilus*).

☞ Groupe VI : thermophiles, acidophiles (*B. acidocaldarius*).

➔ Le groupe des bacilles thermophiles est très hétérogène, peu de souches sont capables de produire de l'acide lactique en forte concentration (>50 g/L), mais leur caractère thermophile est très attracteur pour une utilisation industrielle : limitation des problèmes de contamination et des coûts de refroidissement; c'est le cas pour *Bacillus coagulans* (Heriban, et al., 1993b).

4.2. - Les champignons filamenteux

En marge des bactéries lactiques, il existe quelques espèces de moisissures productrices d'acide lactique (Hamamci et Ryu, 1994; Soccol et al., 1994). Le **Tableau I.4.2** résume les recherches récentes sur ces moisissures.

Tableau I.4.2 : Souches de moisissures sélectionnées pour leur intérêt dans la production d'acide lactique. (Litchfield, 1996)

Organismes	Type de métabolisme fermentaire	Enantiomère de l'acide lactique	Références
<i>Rhizopus arrhizus</i>	Hétérofermentaire	L(+)	Soccol, et al., 1994
<i>Rhizopus delmar</i>	Hétérofermentaire	L(+)	Soccol, et al., 1994
<i>Rhizopus oryzae</i>	Hétérofermentaire	L(+)	Soccol, et al., 1994 Yang et al., 1995 Hamamci et Ryu, 1994 Kosakai et al., 1997
<i>Rhizopus stolonifer</i>	Hétérofermentaire	L(+)	Soccol, et al., 1994

Rhizopus spp. utilise le glucose et le saccharose pour produire de l'acide lactique L(+), la supplémentation en acides aminés ou vitamines n'est pas nécessaire si une source d'azote inorganique est présente (sels d'ammonium, nitrates) contrairement à beaucoup de bactéries lactiques. Cependant les performances restent limitées (Yang, et al., 1995), les étapes de séparation restent complexes pour une souche hétérofermentaire obligatoire. Enfin l'extrapolation à l'échelle industrielle semble difficile.

4.3. - Métabolisme des bactéries lactiques

Les deux genres *Lactobacillus* spp. et *Bacillus* spp. sont mis en parallèle dans cette partie pour essayer de comprendre le fonctionnement de chacun. Les métabolismes carbonés, énergétiques et azotés sont développés, ainsi que les effets de sels, vitamines et autres composants du milieu de fermentation.

4.3.1. - Métabolisme carboné et énergétique

L'intérêt des bactéries lactiques, tant dans le domaine industriel que médical, réside dans leur capacité à fermenter rapidement les sucres en acide lactique. Les principales voies métaboliques des sucres sont les voies Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) et pentose-phosphocétolase (PPC) (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

4.3.1.1.- Sources de carbone

Les sources carbonées potentiellement utilisables pour la production de lactate à partir de *Lactobacillus* ou *Bacillus* sont très diversifiées, comme le montre le **Tableau I.4.3**. Les hydrates de carbone raffinés ou complexes sont des sources connues : saccharose (Heriban, et al., 1993b), lactose (Amrane et Prigent, 1994b), lactosérum (Aeschlimann et Stockar, 1991), mélasses (Monteagudo, et al., 1994), amidon (Zhang et Cheryan, 1994) ou même le bois (Parajo et al., 1995).

➡ Ces substrats ne peuvent pas être tous utilisés industriellement pour la production d'acide lactique. Seuls les sucres raffinés sont utilisés actuellement, en particulier le saccharose et le lactose. Des co-produits des industries sucrières, les mélasses, ou des industries laitières, le lactosérum, peuvent être utilisés pour substituer ces substrats coûteux (Monteagudo, et al., 1994).

Tableau I.4.3 : exemples de matières premières carbonées utilisées pour la production d'acide lactique par voie fermentaire (Litchfield, 1996).

Matières premières	Micro-organismes
Hydrates de carbone raffinés	
Glucose	<i>Lb. delbrueckii</i> NRRL B-445 <i>Lb. rhamnosus</i>
Lactose	<i>Lb. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Saccharose	<i>B. coagulans</i> <i>Lb. delbrueckii</i> (<i>Lb. rhamnosus</i>)
Amidon	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. lactis</i> (<i>S. lactis</i>)
Hydrates de carbone complexes et co-produits	
Cellulose	<i>Lb. delbrueckii</i>
Caséine de lait	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Lactosérum	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. casei</i> <i>Lb. helveticus</i>
Topinambours	<i>Bacillus dextralacticus</i>
Mélasses	<i>Lactobacillus</i> sp.
Mélasses, bois (pâte à papier, panneaux de fibres agglomérées)	Mélange de Lactobacilles et de levures
Déchets municipaux (acide hydrolysé)	<i>Lactobacillus pentosus</i>
Pommes de terre	<i>Lb. delbrueckii</i> NRRL B-445 <i>Lb. rhamnosus</i> <i>Lb. pentosus</i>
Liqueur de résidus sulfités	<i>Lb. pentosus</i>

4.3.1.2. - Mécanismes de transport des sucres

Il existe deux systèmes de transport majoritaires des sucres chez les bactéries lactiques qui très largement étudiés ont été de plus en plus affinés et observés chez de nombreuses espèces surtout chez *Lactococcus* et *Streptococcus*.

4.3.1.2.1.- Les systèmes de transport actif.

L'hypothèse chimiosmotique est maintenant admise très clairement. D'après ce concept, une enzyme membranaire, l'adénosine 5'-triphosphate-phosphorylase, activée par le complexe $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ (ATPase-BF0F1 ; EC 3.6.1.3), couple l'hydrolyse de l'ATP à la sortie de protons (2H^+) de la cellule. Lors de cette réaction, l'énergie chimique de l'ATP est transmise pour générer un potentiel électrochimique de proton à travers la membrane cytoplasmique. En réponse à cette force protomotrice, le sucre peut être assimilé grâce à un gradient de concentration (Thompson et Gentry-Weeks, 1994) (**Figure I.4.1**).

4.3.1.2.2.- les systèmes PEP-PT

Les systèmes de transport des sucres faisant intervenir des phosphotransférases, dépendantes du phosphoénolpyruvate (PEP-PT) ont été décrits chez des bactéries Gram négatif. Ces systèmes ont été très largement observés chez les bactéries Gram positif. En général, deux protéines cytoplasmiques, l'enzyme I et l'HPr, sont requises par tous les systèmes « phosphotransférase ». L'enzyme I est mono ou dimérique, bi-fonctionnelle, puisqu'elle est à la fois receveur d'un résidu histidyle et donneur de radicaux phosphoryle, du PEP vers Hpr. L'HPr est une protéine thermostable phosphorylée. La spécificité du sucre réside dans des protéines inductibles par le sucre, l'enzyme II membranaire et l'enzyme III cytoplasmique. Cette dernière protéine accepte le radical phosphoryle de l'HPr pour former l'EIII-P.

En final, l'enzyme III phosphorylée transfère son radical phosphoryle à EII qui va effectuer la reconnaissance, la liaison, la phosphorylation et la translocation simultanée du sucre à travers la membrane hydrophobe de la cellule. Pour le transport du lactose chez *Lactobacillus* des enzymes spécifiques ont été purifiées et caractérisées : EII^{lac} et $\text{EIII}^{\text{lac}}\text{-P}$. Pour le transport du saccharose, les enzymes sont de même type ; sac-P et EII^{sac} (**Figure I.4.1** et **Figure I.4.2**).

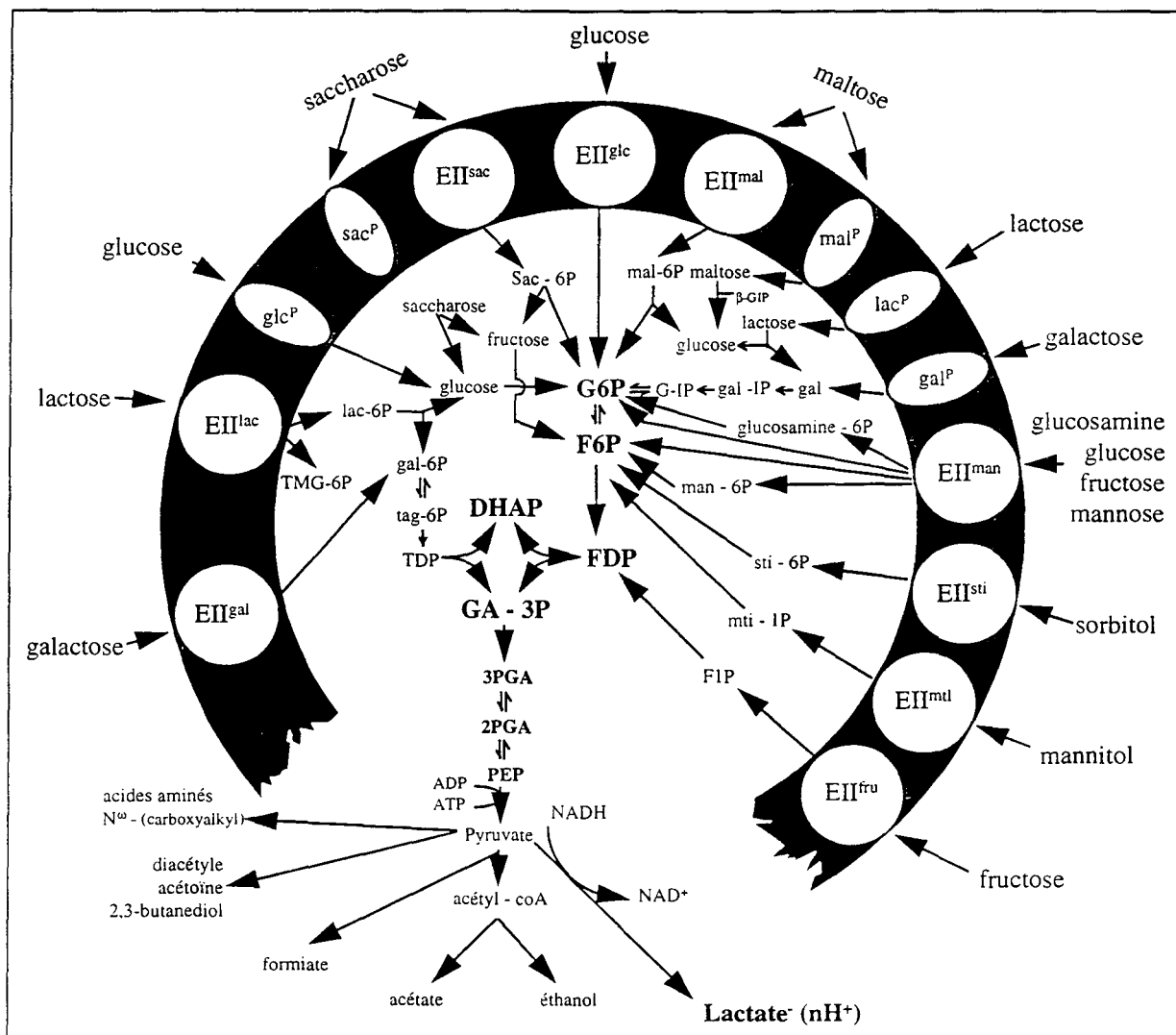


Figure I.4.1: Voies de transport et de métabolisme des glucides par les bactéries lactiques. La lettre (p) en exposant désigne les systèmes de transport actif ATP-dépendants (perméases). Le symbole (EII) désigne le composant des systèmes phosphotransférases PEP-dépendants (PEP-PT) localisés dans la membrane et spécifiques des sucres. La voie EMP est en gras.

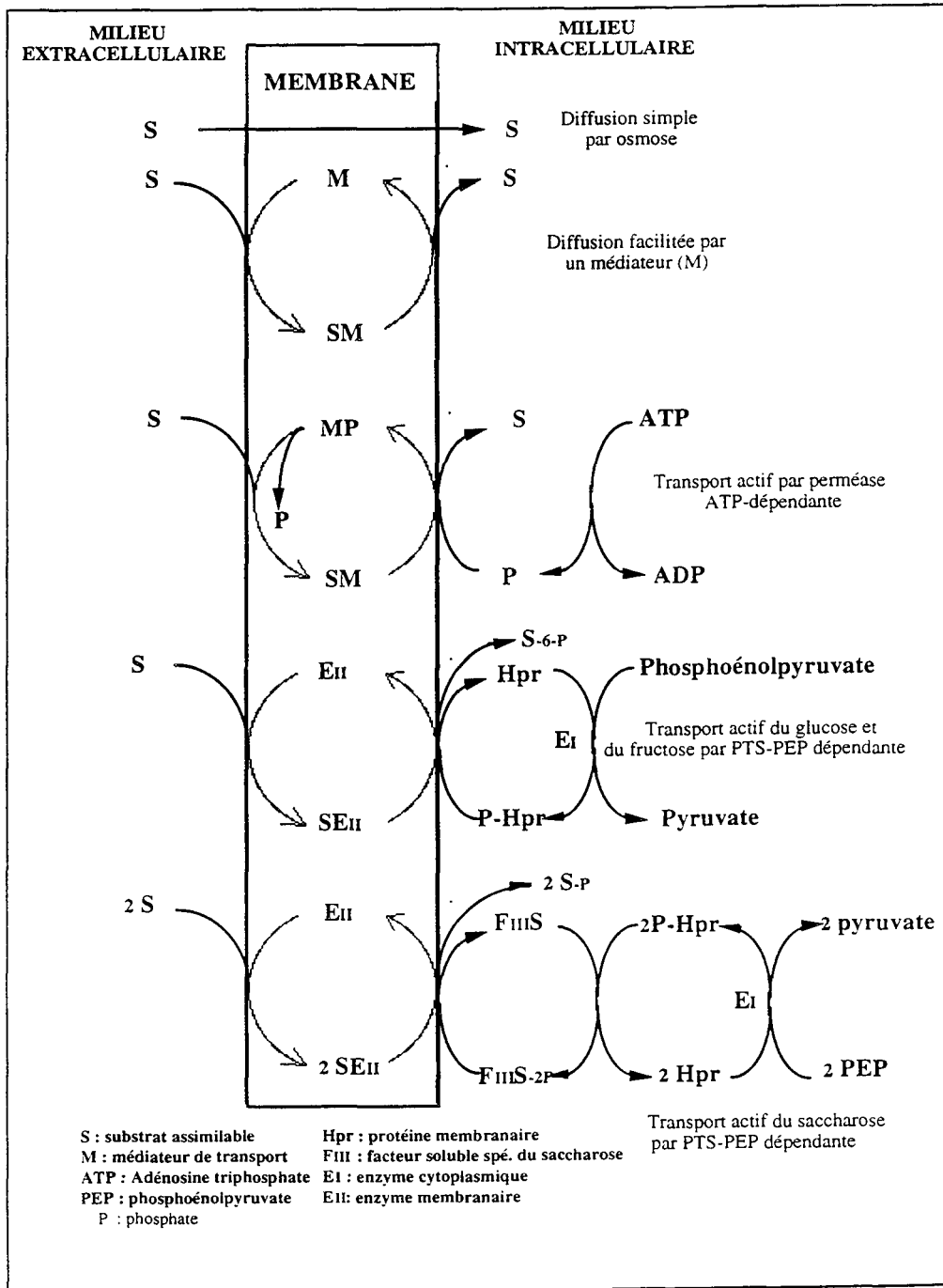


Figure I.4.2 : Transport du saccharose chez les bactéries lactiques

➔ Il existe a priori peu de différence entre les *Streptococci*, les *Lactobacilli* et les *Bacilli* pour le transport des sucres, mais ce transport chez *Bacilli* n'a jamais été étudié en détail (Thompson et Gentry-Weeks, 1994).

4.3.1.3. - Métabolisme des sucres

Il existe trois voies majeures du métabolisme des sucres chez les bactéries lactiques. Deux de ces voies sont communes à de nombreuses espèces, la dernière est spécifique des bifidobactéries et ne sera pas traitée.

4.3.1.3.1.- Voie homofermentaire ou EMP (Figure I.4.3)

Les lactobacilles homofermentaires (*Lb.casei*, *Lb plantarum*) convertissent presque quantitativement le glucose en excès en acide lactique (90-95%), même si cette définition n'est pas rigoureusement exacte. La fructose 1,6 diP aldolase est l'enzyme clé de la voie EMP, elle est présente dans toutes les bactéries homolactiques. La FDP aldolase catalyse la réaction menant, à partir du FDP, à deux fragments C3 (DHAP et GA-3P). La concentration en FDP est généralement élevée chez les bactéries homolactiques et cette molécule est très importante pour la régulation du métabolisme.

La FDP est un activateur de la synthèse des enzymes terminales de la voie glycolique, c'est à dire de la pyruvate kinase (EC 2.7.1.40) et de la lactate deshydrogénase (EC 1.1.1.27).

En dehors du glucose, les bactéries homolactiques ont la capacité de fermenter d'autres mono ou disaccharides. Ces molécules pénètrent dans la cellules par l'intermédiaire de systèmes phosphotranférases ou non, mais la voie de l'EMP est la voie principale de dégradation des dérivés phosphorylés. A l'exception du galactose-1P et du fructose-1P qui s'engagent dans la glycolyse au niveau du G6P et F6P.

Cependant, d'autres sources d'énergie, telles que galactose, maltose, fructose, etc., peuvent produire au cours de leurs fermentations, diverses quantités d'acétate, formiate, diacétyl, acétoïne et 2,3 butanediol, tout comme l'acide lactique (Thompson et Gentry-Weeks, 1994)

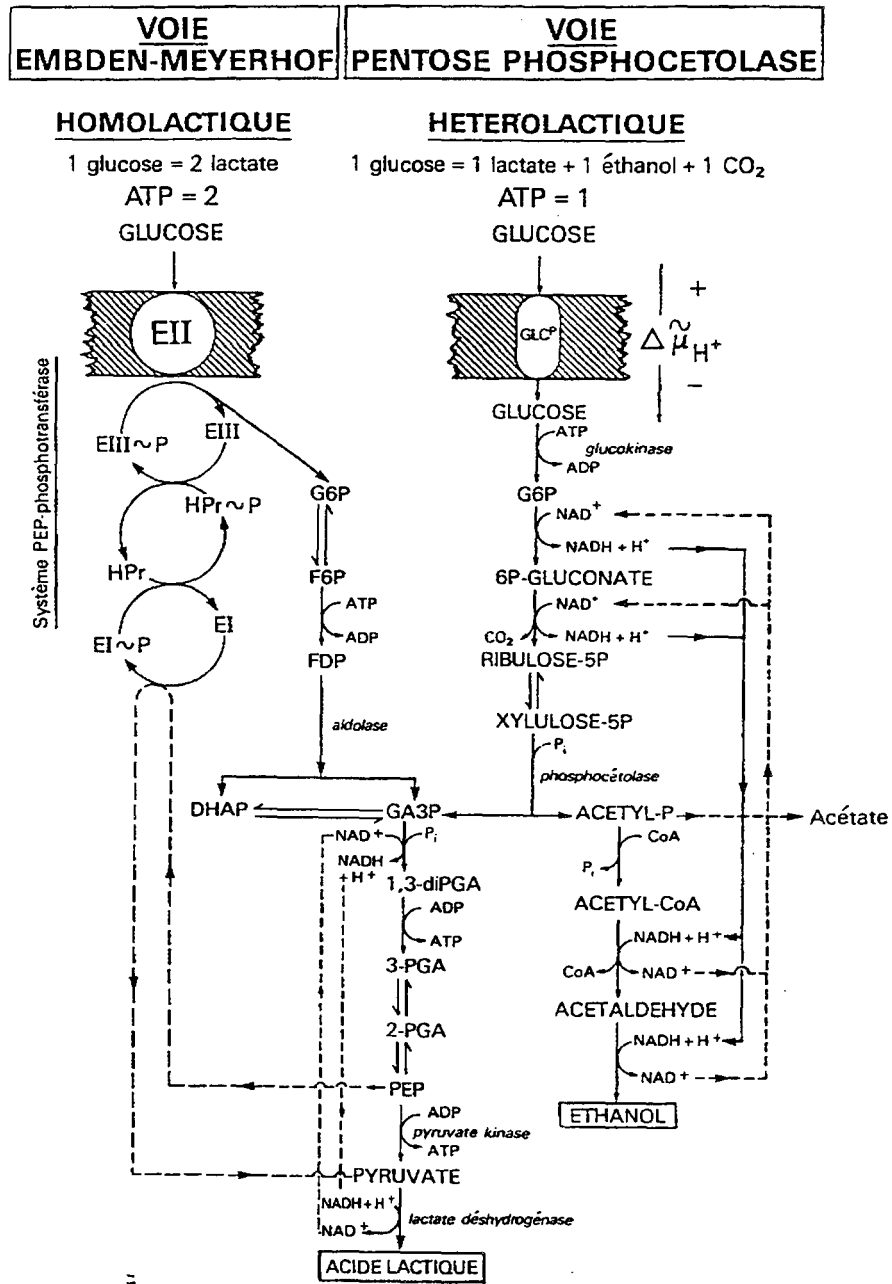
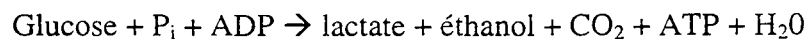


Figure I.4.3 : Principales voies assurant le transport et le métabolisme du glucose par les bactéries lactiques.

4.3.1.3.2.- Voie hétérofermentaire ou PPC

Les bactéries lactiques hétérofermentaires fermentent le glucose en produisant moins de 1,8 moles d'acide lactique/mole de glucose. Certains lactobacilles (*Lb. brevis*) appartiennent à cette classe. Les hétérofermentaires strictes ne possèdent pas de FDP aldolase ni de triose-phosphate isomérase, et elles sont également dépourvues d'un système phosphotransférase-PEP pour le glucose. Le glucose est accumulé intracellulairement par un transporteur actif, il est phosphorylé par une glucokinase ATP-dépendante (EC 2.7.1.2), puis oxydé en gluconate-6P; puis en D-ribulose-5P avec décarboxylation (**Figure I.4.3**). Ce pentose est transformé en D-xylulose-5P puis métabolisé en acétyl-P et glycéraldéhyde-P. l'acétyl-P est réduit en éthanol (mais peut également donner de l'acétate), et le glycéraldéhyde-P donnera de l'acide lactique par l'intermédiaire des dernières enzymes de la voie EMP. Le métabolisme du glucose par cette voie PPC ne donne que la moitié de l'ATP généré par la voie homolactique soit :



4.3.1.4.- Métabolisme du saccharose

Ce métabolisme a été bien décrit chez les lactocoques. Les points clés du métabolisme sont :

- ❶ l'existence d'un système de transport spécifique saccharose - phosphotransférase.
- ❷ la formation du glucose 6-P et du fructose à partir du saccharose phosphorylé, réaction réalisée par une saccharose 6-P hydrolase.
- ❸ la phosphorylation du fructose en fructose 6-P par une phosphofructokinase ATP-dépendante (EC 2.7.1.4) et souvent dépendante de métaux (Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} ou Mn^{2+}).

La régulation du métabolisme du saccharose est très complexe et décrite exclusivement chez *Sc. mutans*. Néanmoins, des faits intéressants ont été relevés :

- ❶ à forte concentration en saccharose, le dissaccharide réprime l'activité sac-PT des cellules en croissances.
- ❷ Des gènes codant pour des enzymes du métabolisme du saccharose seraient inductibles par exemple pour la saccharose-phosphotransférase ou la fructokinase. Ces gènes peuvent être portés par un ou plusieurs plasmides chez quelques espèces.

➤ Les bactéries hétérofermentaires facultatives comme beaucoup de *Bacillus*, utilisent les voies EMP et/ou PPC en fonction des conditions de culture, de substrat disponible, de l'inhibition et des paramètres physico-chimiques. Le saccharose est le substrat préférentiel de cette espèce alors que le lactose est préférentiellement utilisé par *Lactobacillus* spp.; cette spécificité est une différence majeure entre les deux genres.

4.3.1.5. - Métabolisme énergétique.

Le métabolisme énergétique (ou catabolisme) des bactéries chimiotrophes s'opère par une succession de réactions d'oxydoréduction. Pour les bactéries lactiques chimio-organotrophes, le donneur est un substrat organique hydrogéné et la réaction est donc une hydrogénation-déshydrogénation. L'accepteur final est généralement le lactate en condition anaérobie (fermentation). Le lactate est excrété conjointement avec des protons, créant ainsi un gradient de protons et donc une force protomotrice. L'entrée de proton ou « pompe à protons » est couplée à la production d'ATP.

Il existe donc deux sources principales d'énergie sous forme d'ATP en condition anaérobie (Teuber, 1993)(Figure I.4.4):

- ❶ synthèse d'ATP à partir du substrat
- ❷ entrée de protons couplées à la synthèse d'ATP.

Dans des conditions d'aérobiose, l'oxygène moléculaire peut servir d'accepteur d'hydrogène à partir du pyruvate et grâce à une NADH oxydase. La cellule forme de l'ATP surnuméraire résultant de la conversion de l'acétyl-phosphate en acétate.

Les bilans énergétiques en anaérobiose:

Fermentation homolactique : $\text{glucose} + 2 \text{ Pi} + 2 \text{ ADP} \rightarrow 2 \text{ lactate} + 2 \text{ ATP} + 2 \text{ H}_2\text{O}$

Fermentation hétérolactique : $\text{glucose} + \text{ Pi} + \text{ ADP} \rightarrow \text{ lactate} + \text{ ATP} + \text{ CO}_2 + \text{ éthanol} + \text{ H}_2\text{O}$

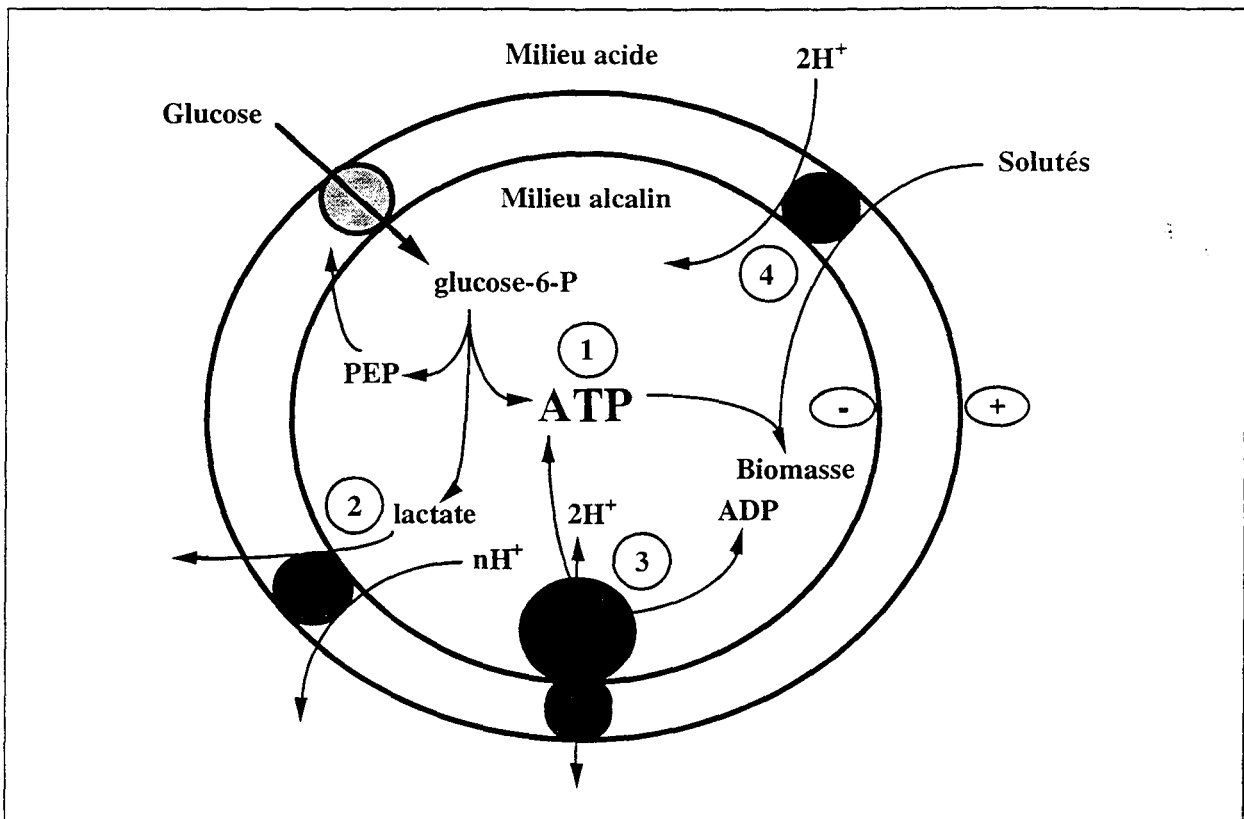


Figure I.4.4 : Processus de synthèse et d'utilisation de l'énergie chez les bactéries lactiques.

Quatre systèmes liés à la synthèse d'ATP sont visibles sur ce schéma. La synthèse d'ATP à partir du substrat (1), le couplage de la sortie d'ions H^+ avec la sortie d'ions lactate ($2H^+$ par lactate) (2) et le couplage de l'entrée de soluté avec une entrée de protons (4). La sortie de protons avec le système (2) couplée avec l'entrée de cet ion avec le système (3) aboutit à la synthèse d'ATP tant que la concentration en lactate interne est plus élevée que sa concentration externe.

4.3.2. - Métabolisme azoté

L'azote sous forme d'acides aminés ou de petits peptides est très important pour la croissance des bactéries lactiques car ces acides aminés sont difficilement synthétisés. Par exemple, les bactéries du lait hydrolysent la caséine β par un système protéolytique très développé (Juillard et al., 1995). Pour les fermentations ayant comme unique source de carbone le saccharose ou le lactose, il est indispensable de compléter le milieu de culture en sources azotés (Hujanen et Linko, 1996). Cet azote peptidique entre essentiellement dans la constitution de la biomasse.

Le mécanisme du catabolisme azoté est complexe, et sa description commence seulement à être connue. Chez *Lactococcus lactis*, il existerait 3 transports spécifiques d'oligopeptides allant de 3 à 18 résidus en plus du système force protomotrice dépendant pour l'assimilation des acides aminés (**Figure I.4.5**) (Juillard, et al., 1995). Le transporteur principal étant nommé « système OPP » de 5 sous-unités et chargé du transport de peptides de 3 à 8 résidus. Le système « DtpP » transporte spécifiquement les di ou tripeptides hydrophobes et le système « DtpT » les di ou tripeptides hydrophiles. Enfin des protéases extracellulaires et des peptidases intracellulaires terminent le système d'assimilation.

En général, 3 types de transport d'acides aminés et de peptides sont décrits (Teuber, 1993):

- ❶ Transport force protomotrice dépendant.
- ❷ Transport actif avec utilisation d'ATP pour glutamate, glutamine et asparagine.
- ❸ Transport et échange : arginine-ornithine antiport, assimilation due à un gradient de concentration résultant de l'excrétion de l'arginine et de l'ornithine.

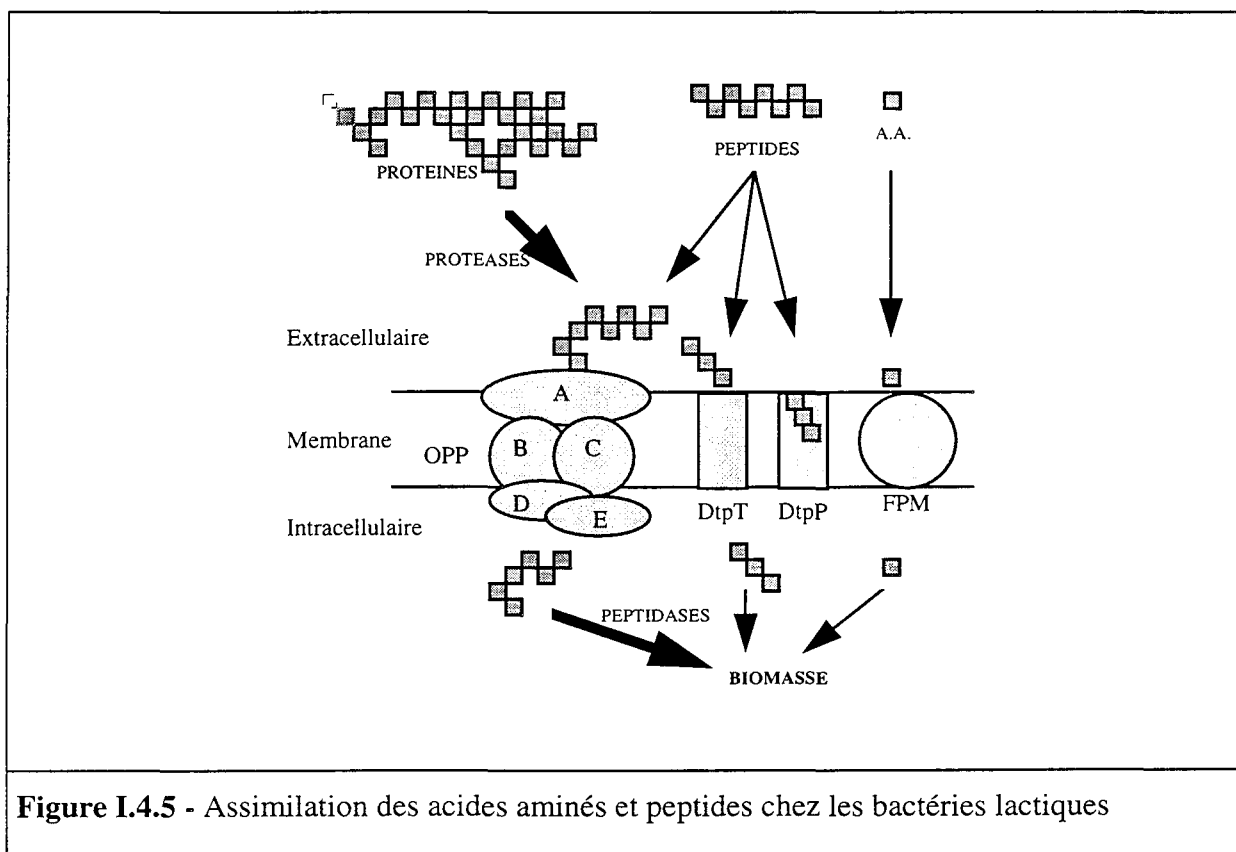


Figure I.4.5 - Assimilation des acides aminés et peptides chez les bactéries lactiques

Le **Tableau I 4.4** donne quelques exemples des différentes sources azotées utilisées en complément du substrat de fermentation.

Tableau I 4.4 : Sources azotées utilisées en complément de fermentation.

Source azotée	Souche utilisée	Références
Extrait de levure	<i>Lb. helveticus</i>	Aeschlimann et Stockar, 1990
	<i>Lb. helveticus</i>	Amrane et Prigent, 1993
	<i>Lb. acidophilus</i>	Taillandier et al., 1996
Peptone	<i>Lb. helveticus</i>	Amrane et Prigent, 1996
	<i>Bacillus spp.</i>	Ohara et Yahata, 1996
	<i>Lb. acidophilus</i>	Taillandier, et al., 1996
Tryptone	<i>Lb. helveticus</i>	Amrane et Prigent, 1996
Hydrolysats de protéines de lactosérum ou caséines	<i>Lactobacillus spp.</i>	Lund et al., 1992
	<i>Lb. helveticus</i>	Chiarini et al., 1991
	<i>Lb casei</i>	Hujanen et Linko, 1996
Extrait de soja	<i>Bacillus spp.</i>	Ohara et Yahata, 1996
Liqueur de « Corn steep »	<i>Lb.casei</i>	Hujanen et Linko, 1996
	<i>Lb. helveticus</i>	Amrane et Prigent, 1994a
		Amrane et Prigent, 1996
Germes de malt	<i>Lb.casei</i>	Hujanen et Linko, 1996
Sels d'ammonium	<i>Lb.casei</i>	Hujanen et Linko, 1996

➡ L'extrait de levure est la source d'azote la plus couramment employée et souvent la plus efficace pour la croissance (Hujanen et Linko, 1996), mais ce substrat est très onéreux en production industrielle. D'autres sources sont utilisées pour la fermentation de bactéries lactiques comme les hydrolysats de protéines de lactosérum ou de caséines, les extraits de germes de malt ou encore le « corn steep » (Amrane et Prigent, 1994a). Ces sources azotées sont souvent moins chères mais aussi moins efficaces. Pourtant les travaux réalisés sur la réduction d'apport d'extrait de levure sont nombreux (Norton et al., 1994b) et la substitution partielle par une autre source azotée semble la voie la plus réaliste (Hujanen et Linko, 1996). Les ions ammonium peuvent servir de source d'azote notamment chez *Bacillus spp.*(Priest, 1993).

4.3.3. - Exigences nutritionnelles.

Les Lactobacilli et les Bacilli ont des besoins nutritionnels très différents, notamment en azote et en vitamines. *Lactobacillus* spp. est souvent considéré comme un des groupes les plus exigeants nutritionnellement car il requiert non seulement des substrats complexes carbonés, azotés, phosphatés et soufrés, mais aussi des facteurs de croissance, des vitamines et des cations (Desmazeaud, 1983; Snell, 1989). *Bacillus* spp. est souvent beaucoup moins exigeant de ce point de vue (Heriban et al., 1993a).

4.3.3.1. - Exigences en vitamines.

Les vitamines jouent dans le métabolisme cellulaire le rôle de coenzyme. Très peu de bactéries sont capables de les synthétiser. Les vitamines étudiées que l'on retrouve le plus fréquemment sont au nombre de 8 (**Tableau I.4.5**):

❶ La pyridoxamine (vitamine B6) : connue pour être stimulante (Mulligan et Snell, 1976) chez *Lb. delbrueckii*.

❷ L'acide nicotinique (niacine ou vitamine B3) : nécessaire chez les lactobacilles (Desmazeaud et de Roissart, 1994).

❸ La riboflavine (vitamine B2) : fortement nécessaire chez les lactobacilles (Lambooy, 1983).

❹ L'acide pantothénique (vitamine B5) : nécessaire chez *Lactobacillus* spp.

❺ La biotine (vitamine B8) : nécessaire chez les lactobacilles (Snell, 1989).

❻ La thiamine (vitamine B1) : pas indispensable.

❼ La cyanocobalamine (vitamine B12) : influente chez certains lactobacilles.

❽ L'acide folique (vitamine Be) : pas indispensable (Desmazeaud et de Roissart, 1994).

Tableau I.4.5: Les exigences vitaminiques pour les lactobacilles et deux Bacilli.

Vitamines	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>
	<i>sp.</i> Desmazeaud et de Roissart, 1994	<i>caldotenax</i> Kuhn et al., 1979	<i>coagulans</i> Marshall et Beers, 1967
Cyanocobalamine	+/-	-	-
Biotine	+	+	+
Acide nicotinique	+	-	-
Pantothénate	+	-	-
Riboflavine	+	-	-
Thiamine	-	-	+
Pyridoxamine	+	-	-
Acide folique	+/-	-	+/-

➔ *Bacillus* spp. est beaucoup moins exigeant en vitamines que *Lactobacillus* spp., une seule vitamine serait réellement requise : la biotine. (Kuhn, et al., 1979).

4.3.3.2. - Exigences en bases azotées

➔ Ces exigences sont très variables chez les bactéries lactiques; quelques espèces de Lactobacilles sont stimulées par l'adénine, la guanine et l'uracile. Mais elles ne sont pas réellement indispensables à la croissance (Desmazeaud et de Roissart, 1994).

4.3.3.3. - Exigences en ions

Peu d'études ont été consacrées au rôle des ions chez les bactéries lactiques. Chez les lactobacilles, les ions Mn^{2+} , Mg^{2+} et Fe^{2+} ont un effet positif sur la croissance ou la production d'acide lactique (Ledesma et al., 1976). Certaines enzymes ont pour cofacteur ce type de métaux (Krischke et al., 1991), c'est le cas de la phosphofructokinase dans le métabolisme du saccharose (Cf. 4.3.1.4).

Le manganèse et le magnésium seraient stimulants à 4 niveaux sur (Desmazeaud et de Roissart, 1994):

- ❶ la structure et le fonctionnement des enzymes, en tant que coenzyme;
- ❷ la détoxification des cellules mises en présence d'oxygène. Mn^{2+} se substituerait à la superoxyde dismutase pour évacuer les radicaux O_2^- superoxyde;

③ la stabilisation des organites cellulaires, en particulier, Mn^{2+} participe à la stabilisation native des ribosomes;

④ enfin, la forme ionisée de Mg^{2+} est un activateur de la fermentation lactique par une meilleure utilisation des sucres.

Les ions ammonium ne sont pas assimilés par les Lactobacilles comme source d'azote contrairement à certaines souches de *Bacilli* (Priest, 1993).

➡ Les exigences en ions pour la croissance des bactéries lactiques ne sont pas à négliger. Beaucoup de cations stimulent le métabolisme. Les bacilles n'échappent pas à la règle, et il n'est pas rare de voir dans la composition des milieux: du magnésium, du manganèse, du fer et du potassium (Heriban, et al., 1993a).

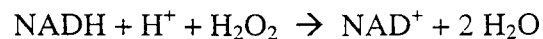
4.3.4. - Effet de l'oxygène

4.3.4.1.- Types métaboliques

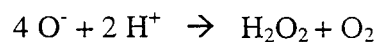
Les lactobacilles et bacilles utilisées dans la production d'acide lactique font partie des bactéries *aérotolérantes* qui tolèrent la concentration de l'oxygène de l'air (21%) mais n'utilisent pas l'oxygène dans leur métabolisme énergétique.

Ces bactéries lactiques sont aérotolérantes, pourtant elles ne possèdent pas de cytochrome ni de catalase (pour les lactobacilles), par contre pour *Bacillus* ce test est positif (Westhoff et Dougherty, 1981).

En général, ces bactéries possèdent toutes des peroxydases qui utilisent du $NADH_2$ comme réducteur et élimine ainsi l'eau oxygénée toxique:



Les radicaux libres O^- sont éliminés par une superoxyde dismutase à manganèse :



4.3.4.2.- Production d'énergie en aérobiose

La production d'énergie en aérobiose est beaucoup plus abondante (20 fois plus pour une molécule de glucose) qu'en anaérobiose (Desmazeaud et de Roissart, 1994). Le rendement en biomasse augmente chez *Lb.plantarum* (Desmazeaud, 1983) mais aussi chez *B.coagulans* (Ohara et Yahata, 1996).

4.3.4.3.-Conséquences du comportement aérobic des bactéries lactiques.

La principale conséquence est une altération du métabolisme glucidique, mais qui peut-être bénéfique. En effet, en présence d'oxygène, les NADH-péroxydases et NADH-oxydases génèrent un supplément de NAD⁺. Ces mécanismes ont pour effet d'économiser le pyruvate, l'acétyl-coA et l'acétaldéhyde (Desmazeaud et de Roissart, 1994). En aérobiose, l'acétyl-CoA a plus tendance à être converti en acétate qu'en éthanol.

➔ Ainsi, le métabolisme aérobic offre des avantages aux bactéries hétérofermentaires. Le catabolisme des sucres en acétate double la quantité d'ATP formée par phosphorylation. il en découle une production de biomasse supérieure et une accélération de la croissance, c'est le cas pour *Bacillus coagulans* (Ohara et Yahata, 1996).

4.3.5. - Influence de la température

Ce paramètre est très important en vue d'une extrapolation industrielle; en effet, plus la température est élevée, moins les souches contaminantes potentielles sont nombreuses. Ce paramètre est régulièrement étudié dans la littérature (Monteagudo, et al., 1994).

La vitesse des réactions enzymatiques est fonction de la température, deux phénomènes antagonistes interviennent (Desmazeaud et de Roissart, 1994):

- ① augmentation de la vitesse de réaction avec l'élévation de la température.
- ② diminution de l'activité de par la dénaturation de l'enzyme par la température.

➔ Les bactéries thermophiles ayant une température optimale de croissance entre 40°C et 45°C sont encore nombreuses surtout chez les lactobacilles (Aeschlimann et Stockar, 1991; Tuli et al., 1984). Par contre, la température optimale de croissance et de production d'acide lactique de quelques souches de *Bacilli* thermophiles se situe entre 50°C et 55°C (Heriban, et al., 1993b; Priest, 1993). Ces souches sont donc potentiellement très intéressantes pour la production d'acide lactique du point de vue technique.

4.3.6. Influence du pH

La membrane cellulaire est imperméable aux ions et aux protons, ceci est indispensable pour maintenir l'intégrité de la cellule. Si une trop forte baisse de pH intracellulaire survient, la croissance s'arrête, on parle alors de pH critique.

Cependant, le pH intracellulaire n'est pas constant et les bactéries lactiques tolèrent facilement des variations importantes de leur concentration intracellulaire en protons. Tout comme la température, il existe un pH optimum de fonctionnement du métabolisme. Le système H⁺ ATPase régule lui-même le pH interne des cellules. De part et d'autre de la valeur optimale, l'activité métabolique diminue fortement si l'on s'en éloigne (Teuber, 1993).

Le pH intervient doublement dans l'inhibition de la croissance des bactéries lactiques :

- ❶ diminution du pH intracellulaire due aux protons,
- ❷ changement dans l'équilibre acide lactique dissocié et non-dissocié. (cf paragraphe suivant).

➡ En fermentation, sans régulation de pH, il est difficile de dissocier l'effet des protons de l'effet de l'acide lactique produit. Il est préférable de réguler le pH de la fermentation pour améliorer la croissance et la production (Beal et al., 1989; Giraud et al., 1991; Norton et al., 1993).

4.3.7. - Influence de la concentration en acide lactique

L'acidification du cytoplasme résulte de l'accumulation intracellulaire de l'acide lactique (en majorité), malgré l'expulsion des protons. Cette expulsion n'est pas assez rapide pour réalcaliniser le cytoplasme, d'où diminution du pH. Mais l'acide lactique lui-même est inhibiteur en tant que molécule et notamment sous sa forme non-dissociée (Gätje et Gottschalk, 1991). Il est donc clair, que plus le pH diminue, plus la proportion de la forme non-dissociée de l'acide lactique augmente (pKa = 3,86 en condition standard) et donc, plus l'inhibition est importante. Taux de croissance, rendement et productivité sont affectés par la présence d'acide lactique (Giraud, et al., 1991).

L'équilibre chimique entre les formes dissociées et non-dissociées de l'acide lactique peut être modifié par la température et la présence de bases inorganiques (Keller et Gerhardt, 1975).

Enfin, de par la production de protons en fermentation lactique, l'interconnexion pH - métabolisme énergétique est très importante (Biketov et al., 1982). La cellule lutte contre l'acidification du pH du milieu intracellulaire en refoulant les protons par l'intermédiaire d'ATPase en consommant l'ATP, ce qui inhibe le métabolisme rapidement.

➔ pH, concentration en acide lactique et métabolisme énergétique sont très liés chez les bactéries lactiques. La régulation de pH semble être la meilleure alternative à la diminution de l'inhibition.

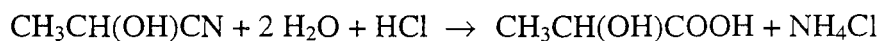
5. PROCÉDES DE PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE

5.1. - La production

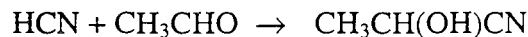
La production d'acide lactique est maintenant totalement réalisée par synthèse microbiologique, mais cela n'a pas toujours été le cas comme il a été décrit dans la partie historique. La voie chimique a été une voie très utilisée entre 1960 et 1990.

5.1.1. - La voie chimique

La voie chimique est intéressante car elle utilise des co-produits provenant d'autres voies synthétiques. Il existe de nombreuses méthodes pour la préparation synthétique de l'acide lactique, dont la principale est basée sur l'hydrolyse du lactonitrile par l'acide chlorhydrique :



Le lactonitrile provient de la réaction entre l'acétaldéhyde et l'acide cyanhydrique :



D'autres procédés de synthèse chimique sont disponibles comme la dégradation alcaline des sucres, l'hydrolyse de l'acide propionique ou l'oxydation du propylène par l'acide nitrique, procédé mis en oeuvre par RHONE-POULENC, mais rapidement stoppé pour des raisons de sécurité (Vick Roy, 1985).

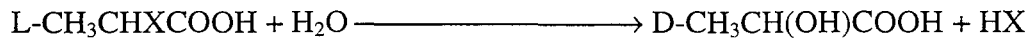
➡ L'acide lactique produit par voie chimique a l'avantage d'être thermostable, d'une haute pureté et incolore, mais l'inconvénient de produire un racémique, un mélange DL acide lactique, qui est inutilisable dans de nombreuses applications.

5.1.2. - La voie enzymatique

Il est possible de produire les deux énantiomères optiquement actifs de l'acide lactique à partir de l'acide 2 chloropropionique par l'action d'une enzyme : la 2-halo acide

déhalogénase (d'origine bactérienne) qui se présente sous deux formes : la L et la DL 2-halo acide déhalogénase. Ces enzymes sont obtenues par fermentation de *Pseudomonas*.

Les réactions catalysées par ces enzymes sont les suivantes :



L 2-halo acide déhalogénase



DL 2-halo acide déhalogénase

La 2-halo acide déhalogénase agit spécifiquement sur l'isomère L de l'acide 2 chloropropionique et produit le D acide lactique. La DL 2-halo acide déhalogénase catalyse la déhalogénéation des deux énantiomères de l'acide lactique sans distinction avec inversion de la configuration (Motosugi et al., 1984).

➔ Ce procédé enzymatique est rarissime dans la formation de produits optiquement actifs, même si la matière de départ, c'est à dire l'acide-2-halo-propionique est un produit bon marché dans les industries chimiques.

5.1.3. - La voie fermentaire

Dans la partie I.4, nous avons décrit les micro-organismes et substrats généralement employés en production. La mise en oeuvre de ces micro-organismes en fermenteur est souvent en mode discontinu ou continu (Ohleyer et al., 1985; Yoo, et al., 1997).

Le **Tableau I.5.1** résume les principaux modes de production et les performances obtenues.

5.1.3.1.- Réacteurs discontinus

Les fermentations en mode discontinu sont très développées en milieu industriel. Elles continuent à être étudiées par des équipes de recherches, mais plus comme un outil d'étude de la souche et des paramètres physico-chimiques que comme un mode performant de production. C'est le cas pour l'étude des sources azotées (Amrane et Prigent, 1994a), l'effet du pH ou de la concentration en acide lactique (Gätje et Gottschalk, 1991; Norton, et al., 1993), et pour des études comparatives avec les systèmes continus. La productivité est plus faible en réacteur discontinu qu'en culture continue, si le taux de dilution est optimal (Zayed et Winter, 1995).

Tableau I.5.1 : Modes de production, souches et performances relevés dans la littérature.

* RPA (Réacteur continu simple Parfaitement Agité); F.creuse (réacteur continu avec module de Fibres creuses); tubulaire (réacteur continu avec module de filtration tangentielle)
nd : non déterminé

Mode de culture	Micro-organisme	Substrat	Rendement (%)	Lactate (g/L)	Productivité (g/L.h)	Références
discontinu	<i>Bacillus coagulans</i>	Saccharose	90	50	1,4	Heriban, et al., 1993b
	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactose	86	115	4,4	Mehaia et Cheryan, 1987
Continu RPA*	<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	100	25	5,5	Krischke, et al., 1991
Continu RPA	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	90	25	9	Major et Bull, 1984
Continu RPA	<i>Sporolactob. cellulosolvens</i>	Saccharose	nd	12	3,2	Kanvar, et al., 1995
Continu tri-étagés	<i>St. cremoris</i>	Lactose	92	nd	5,4	Mulligan et Safi, 1991
Continu bi-étagés	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactose	95	38	5,7	Amrane et Prigent, 1996
Continu cellules immobilisées	<i>Lactobacillus casei</i>	Glucose	99	27	1,6	Guoqiang et al., 1991
Continu Agrégats	<i>Bacillus laevolacticus</i>	Glucose	94	27	13	deBoer J.P. et al., 1990
Continu cellules immobilisées	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactose	nd	nd	8	Boyaval et Goulet, 1988
Continu cellules immobilisées	<i>Sporolactob. cellulosolvens</i>	Saccharose	nd	25	5,6	Kanvar, et al., 1995
Continu cellules immobilisées	<i>Lactobacillus spp.</i>	Lactose	95	33	6	Zayed et Winter, 1995
Continu lit-fluidisé	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	100	5	0,37	Kaufman et al., 1994
Continu lit-fixe	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	87-97	46	3,3	Stenroos et al., 1982
Continu F.creuse*	<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	93	25	10	Krischke, et al., 1991
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	99	48	12	Bailey et al., 1987
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactose	70	15	16	Aeschlimann et Stockar, 1991
Continu F.creuse	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	99	40	12	Major et Bull, 1984
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	95	59	65	Ohleyer, et al., 1985
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Lactose	59	40	38	Ohleyer, et al., 1985
Continu F.creuse	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactose	99	117	84	Mehaia et Cheryan, 1987

De nombreuses équipes tentent de modéliser le procédé discontinu dans des conditions généralement très drastiques avec plus ou moins de succès (Amrane et Prigent, 1994b; Cachon et Divies, 1993; Ishizaki et al., 1992).

Bacillus coagulans a été étudié en mode batch à 55°C avec des performances relativement bonnes (rendement (90%), sucre résiduel (<1 g/L)) mais une productivité faible (1,4 g/L.h) (Heriban, et al., 1993b).

↳ Les rendements de fermentation sont généralement excellents pour les souches homofermentaires en mode discontinu (>90%) mais les productivités restent limitées. La publication de référence reste une publication sur la production d'acide à une concentration de 115 g/L, un rendement de 86% et une productivité avant extraction de 4,4 g/L.h (Mehaia et Cheryan, 1987).

5.1.3.2. - Réacteurs continus

La productivité des fermentations en mode discontinu n'est pas optimale d'un point de vue économique. En conséquence, de nombreuses recherches se sont concentrées sur le mode continu pour améliorer ce paramètre économique (Litchfield, 1996). Les bactéries lactiques du type Lactobacilles ont été les souches préférentiellement utilisées pour ces études. En général les études se font sur glucose, lactose (lactosérum) et beaucoup plus rarement sur saccharose, et il en sera de même pour tous les systèmes continus. Ce type de réacteur est également très utile pour l'expérimentation et l'optimisation de milieux de culture (Goldberg et Er-EL, 1981).

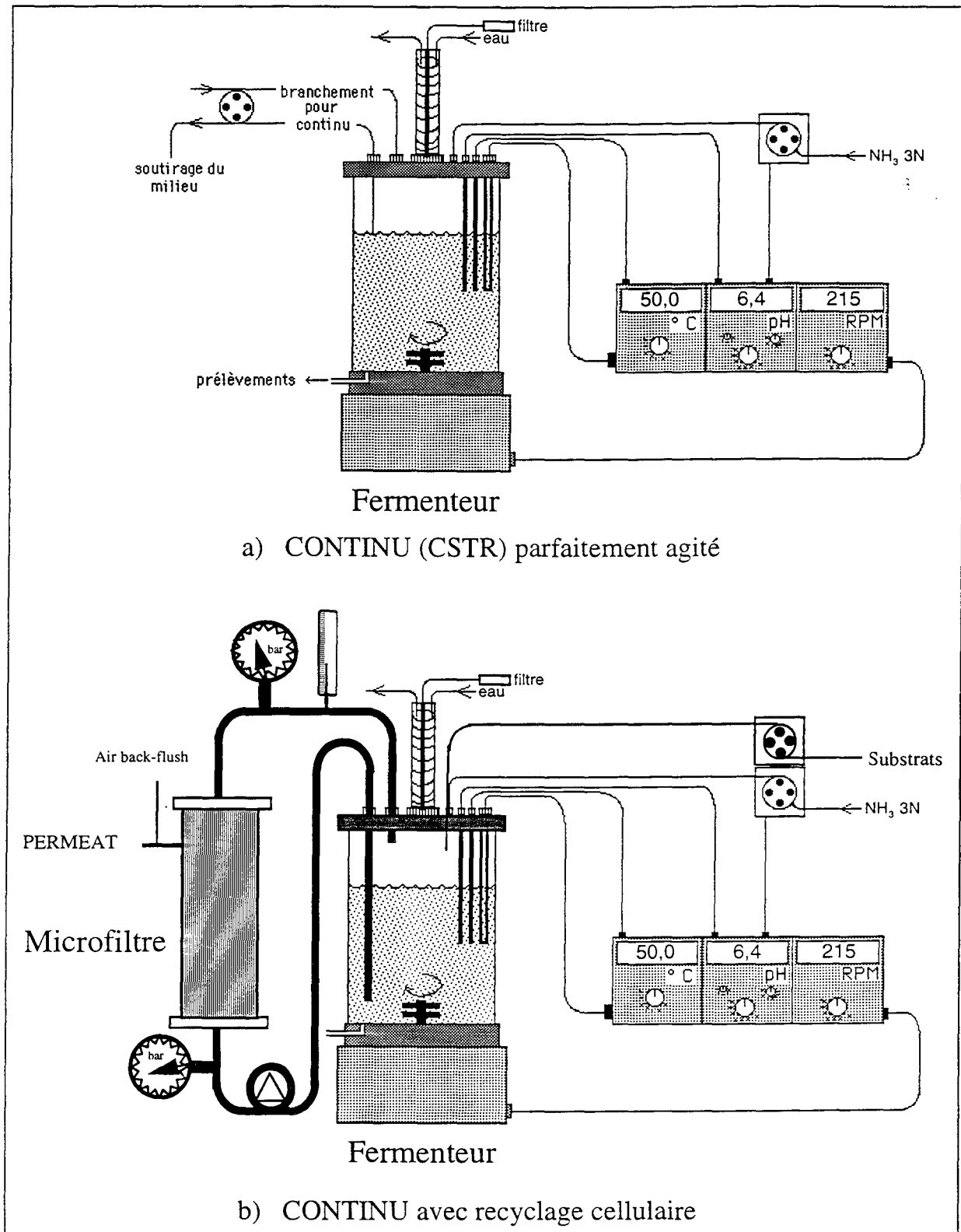


Figure I.5.1 : Production d'acide lactique par la voie fermentaire

a) Réacteur continu parfaitement agité (CSTR). (Major et Bull, 1984)

b) Réacteur continu à haute densité cellulaire.(Ohleyer, et al., 1985)

5.1.3.2.1.- Réacteur continu (CSTR) (Figure I.5.1a)

Les travaux en réacteur continu parfaitement agité sont nombreux dans la littérature, ce mode continu est le plus ancien. Les productivités obtenues peuvent être élevées (8 g/L.h) (Major et Bull, 1984) et les rendements de bioconversion proche de 95%. Il est également possible de coupler 2 ou 3 fermenteurs en série pour faire des multi-étagés et optimiser la biotransformation (Amrane et Prigent, 1996; Mulligan et Safi, 1991). Le principe du multi-étagés consiste à faire la croissance dans le premier réacteur avec des milieux spécifiques (en général riches en source azotée) puis de faire la phase de production dans les réacteurs suivants en alimentant par les cellules provenant du premier réacteur. Les productivités généralement observées pour la production d'acide lactique à partir de lactobacilles sont de l'ordre de 2 à 5 g/L.h (Amrane et Prigent, 1996).

5.1.3.2.2. - Réacteur continu avec recyclage cellulaire

La productivité peut être considérablement augmentée avec des systèmes à haute densité cellulaire (Litchfield, 1996). Il en existe de plusieurs types :

- ❶ couplage avec filtration frontale
- ❷ couplage avec filtration tangentielle (cross-flow)(Figure I.5.1b)
- ❸ couplage avec fibres creuses (CFBR)

Le principe est fondé sur le recyclage de la biomasse à l'intérieur du fermenteur en utilisant un système de filtration (recyclage total). Parallèlement, il est également possible de soutirer une partie de la biomasse avec une pompe à faible débit (recyclage partiel). Les productivités sont très largement supérieures à celles des autres systèmes continus (10 à 80 g/L.h) (Mehaia et Cheryan, 1987; Ohleyer, et al., 1985).

➡ Le couplage fermenteur - système de filtration permet un gain de performance considérable, malheureusement les membranes restaient fragiles et la prédiction des flux de perméat aléatoire, du fait de l'incertitude liée à leur durée de vie (Roychoudhury et al., 1995). Les productivités observées sont souvent importantes mais les membranes sont rapidement colmatées et la durée du procédé est courte (2 à 3 jours). Depuis quelques années, se développent des membranes pouvant résister aux traitements chimiques et thermiques, ayant des capacités de filtration, et une stabilité plus importante (Tanigushi et al., 1987).

5.1.3.2.3.- Réacteur continu avec cellules immobilisées

L'immobilisation des bactéries lactiques dans des polymères ou fixées sur des supports de différents types peut augmenter la productivité, sans avoir les inconvénients de colmatage des réacteurs à membranes (Litchfield, 1996). De nombreuses investigations ont été menées sur cette technique, avec des billes en agar (Tuli, et al., 1984), alginate de calcium ou de sodium (Boyaval et Goulet, 1988; Guoqiang, et al., 1991; Stenroos, et al., 1982), carraguenane (Norton et al., 1994a). Les cellules immobilisées peuvent être mises en oeuvre :

- ❶ En réacteur parfaitement agité (Kanvar, et al., 1995).
- ❷ En réacteur à lit fluidisé (Kanvar, et al., 1995).
- ❸ En réacteur à lit fixe (Stenroos, et al., 1982).

➡ Les performances sont généralement meilleures que pour un continu CSTR, mais beaucoup moins bonnes que pour les réacteurs à membranes. Les inconvénients de ce mode de fermentation sont importants surtout pour la production d'acide lactique :

- ❶ Les systèmes sont difficilement stérilisables, problèmes de contaminations (Champagne et al., 1988).
- ❷ Les supports résistent mal, notamment à l'acide lactique (ramollissement) (Litchfield, 1996).
- ❸ Problèmes de contrôles de pH et de transfert de matières (Guoqiang, et al., 1991)

Pour pallier ces problèmes, certains auteurs ont développé des techniques de micro-encapsulation (Groboillot et al., 1993), mais les techniques de préparation sont toxiques pour les cellules.

Les systèmes avec biofilm restent finalement les plus simples à mettre en oeuvre pour ce type de continu (Litchfield, 1996).

5.1.4. Conclusion

Le choix de la technique de production devant se faire sur des critères de performances technico-économiques et des impératifs découlant des autres partenaires du programme, le système en continu avec recyclage cellulaire semble offrir le meilleur compromis à cette synthèse. Les techniques membranaires ayant fait des progrès très importants en terme de performances et de coûts, ce choix s'en trouve renforcé.

5.2. - Extraction de l'acide lactique par membrane de filtration

L'étape d'extraction de l'acide lactique est réalisée soit simultanément, soit postérieurement à l'étape de fermentation, elle consiste à séparer les produits des cellules contenus dans le jus de fermentation (Boyaval et al., 1987).

5.2.1. - La microfiltration tangentielle et l'ultrafiltration

Les techniques de filtration tangentielle (micro et ultrafiltration) sont des procédés de séparation solide-liquide dans lesquels le diamètre des pores de la membrane varie de 0,005 à 5 μm . Ce procédé permet la rétention des particules en suspension, des bactéries et, industriellement, des colloïdes, des protéines, et de certains ions, après fixation de ces derniers sur de plus grosses particules.

5.2.1.1. - La microfiltration tangentielle

La microfiltration tangentielle (0,1 à 5 μm) est de plus en plus utilisée contrairement à la microfiltration frontale qui présente de gros problèmes de colmatage; le flux de filtration se fait perpendiculairement au flux principal. La microfiltration est utilisée pour la séparation de bactéries ou débris cellulaires d'un milieu de fermentation (Shimizu et al., 1993).

Plusieurs variantes existent au niveau du type de membrane utilisée et au niveau de l'emplacement de la membrane dans le procédé (Boyaval, et al., 1987; Shi et al., 1997). Ainsi, elle peut se situer à l'intérieur du fermenteur ou à l'extérieur du système. Mais un intérêt plus spécifique est trouvé pour les membranes externes, celles-ci étant plus facilement accessibles pour toutes interventions (Belfort, 1988).

La géométrie et la structure de ces membranes sont variables et il est possible de jouer sur une multitude de paramètres (Groot et al., 1993), comme par exemple:

- ❶ membranes organiques ou minérales,
- ❷ taille des pores,
- ❸ surface de filtration,
- ❹ diamètre et nombre de canaux,
- ❺ géométrie des canaux,
- ❻ de type tubulaire ou fibres creuses,
- ❼ le couplage de plusieurs membranes (en parallèle ou en série) (Groot, et al., 1993).

➡ La microfiltration seule ne peut être utilisée pour la purification de l'acide lactique, mais elle peut être une étape déterminante en vue de cette purification (Boyaval, et al., 1987). En effet, de nombreux auteurs ont choisi cette technique pour séparer et recycler les cellules à l'intérieur du fermenteur, tout en extrayant l'acide lactique inhibiteur du jus de fermentation (Groot, et al., 1993; Hjørleifsdóttir et al., 1991). Les principaux inconvénients de cette technique viennent du fait que ces membranes ont une durée de vie qui est difficile à prédire (Roychoudhury, et al., 1995).

5.2.1.2. - L'ultrafiltration tangentielle.

L'ultrafiltration (0,005 à 0,1 μm de porosité), pour sa part, permet de retenir, en plus des bactéries, des virus et de très grosses molécules telles que les protéines. Les degrés de libertés ou degrés de performance concernant les membranes sont les mêmes que pour la microfiltration, les flux de filtrats sont cependant plus faibles qu'en microfiltration, mais les risques de colmatage en profondeur sont moins importants.

➡ L'extraction de l'acide lactique par membrane est souvent à l'interface entre micro et ultrafiltration (0,05 à 1 μm) (Bibal et al., 1990; Hjørleifsdóttir, et al., 1991), la limite entre les deux filtrations demeurant floue dans la littérature, les deux termes se confondent souvent.

6. BREVETS ET PROCÉDES INDUSTRIELS

Le premier brevet déposé sur la production d'acide lactique par voie microbiologique date de 1887 (Waite, 1887) (voir Historique).

Régulièrement, des brevets ont été déposés dans les pays industrialisés depuis cette date, principalement aux Etats-Unis d'Amérique, en Allemagne, au Japon et en France.

6.1. - Micro-organismes

Les bactéries décrites dans la littérature, comme étant productrices d'acide lactique, sont principalement des lactobacilles (Baniel et al., 1994; Schneider et Lamonerie, 1989). Pourtant, les thermophiles et notamment les bacilles thermophiles sont présentés comme étant les mieux adaptés à la production d'acide lactique en milieu industriel (pas de stérilisation importante des installations, réduction des coûts de refroidissement, moins exigeantes nutritionnellement) (Kirkovits et Edlauer, 1990; Nispen et Jonker, 1989).

6.2. - Procédés brevetés

Comme dans la littérature, les procédés sont très divers. Ils sont généralement tous en mode discontinu ou continu et allient une opération de fermentation et une extraction-purification de l'acide lactique.

Par exemple, un brevet de 1989 décrit un procédé de production de lactate d'ammonium à partir de sirop de glucose et de « corn steep » et, une purification par de l'électrodialyse et échange d'ions (Glassner et Datta, 1989). La productivité obtenue est de 2,5 g/L.h en discontinu.

Plusieurs brevets mentionnent des procédés avec réacteurs à hautes densités cellulaires avec des membranes de micro ou d'ultrafiltrations (Bailey et al., 1988; Glassner et Datta, 1989), des systèmes en discontinu (Miura et Kumagai, 1994; Walkup et al., 1991) ou continu parfaitement agité (CSTR, Nispen et Jonker, 1989), ou couplé avec de l'électrodialyse (Prigent, 1983) (**Figure I.6.1**). Les substrats carbonés utilisés sont très variables, ainsi que les sources d'azotes (**Tableau I.6.1**).

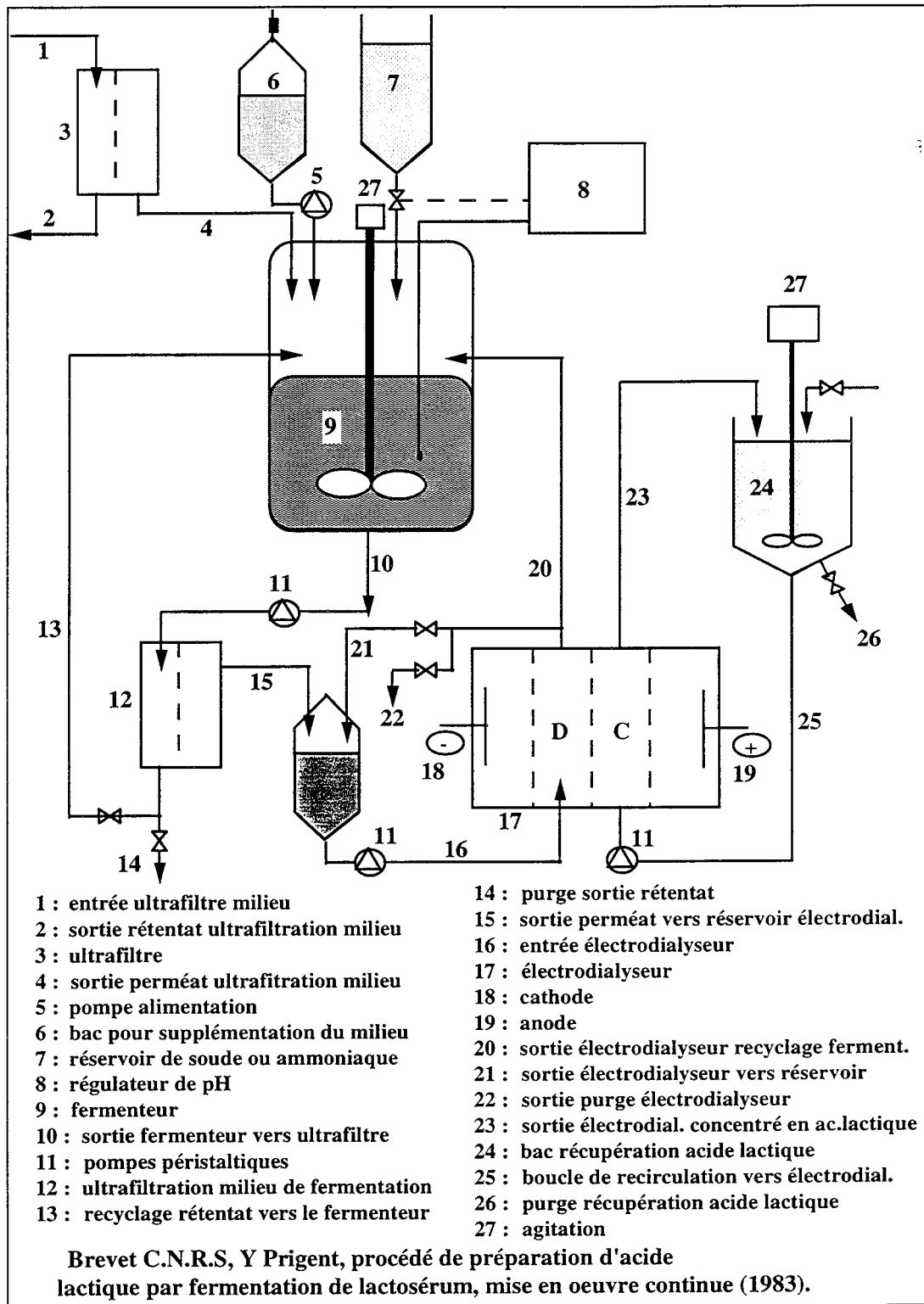


Figure I.6.1 : Brevet de 1983 sur la production d'acide lactique (Prigent, 1983).

Tableau I.6.1 : Brevets récents sur la production d'acide lactique

Souches utilisées	Substrats	Fermentation	Extraction purification	Date	Références
<i>Lactobacillus spp.</i>	lactosérum extraits de levure corn steep	continu à haute densité cellulaire	ultrafiltration - extraction liquide-liquide	1988	Bailey, et al., 1988
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	dextrose corn steep	continu à haute densité cellulaire	électrodialyse échange d'ions	1989	Glassner et Datta, 1989
<i>Lactobacillus spp.</i>	mélasses	discontinu	estérification distillation	1991	Walkup, et al., 1991
<i>Bacillus spp.</i>	glucose	continu CSTR	ultrafiltration osmose inverse électrodialyse	1989	Nispen et Jonker, 1989
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	amidon corn- steep	saccharification continu HDC	électrodialyse	1992	Tsai et al., 1992
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	glucose extrait de levure peptone	discontinu	électrodialyse	1994	Miura et Kumagai, 1994
<i>Lactobacillus plantarum</i>	graines de céréales et protéagineux	discontinu	-	1992	Heurtebise et al., 1992
<i>Lactobacillus spp.</i>	amidon, extrait de levure, corn steep	discontinu	estérification distillation	1993	Tsai et Millard, 1993
-	-	immobilisation, lit-fluidisé	adsorption	1993	Scott, 1993
<i>Lactobacillus spp.</i>	glucose, extrait de levure	semi-continu	échange d'ions	1995	Viljava et Koivikko, 1995
<i>Bacillus coagulans</i>	saccharose			1990	Kirkovits et Edlauer, 1990

➡ En général, les procédés brevetés restent très vagues pour couvrir un maximum du domaine de l'invention sans réellement donner d'informations sensibles. Quelques pistes et quelques détails sont néanmoins intéressants à relever : Abaissement des coûts de production avec des substrats moins chers (mélasses, corn steep), souches thermophiles et moins exigeantes nutritionnellement (bacilles), recherche de performances (haute densité cellulaire, immobilisation).

6.3. - Procédé industriel

Le ou les procédés industriels pour la production de l'acide lactique et de ses sels ne sont pas accessibles dans la littérature et les brevets, PURAC le numéro un mondial garde secret sa technique de fabrication, il en est de même pour les 3 autres principaux producteurs. Cependant, quelques certitudes ou fortes présomptions semblent acquises :

- ❶ Le sucre utilisé est le saccharose purifié
- ❷ Les sources d'azote proviennent des extraits de levure et du corn steep
- ❸ La ou les souches sont des thermophiles hautes (optimum >50°C) telles que les bacilles
- ❹ La ou les souches accumulent une forte concentration d'acide lactique (>140 g/L)
- ❺ Le procédé de fermentation est discontinu et régulé à la chaux
- ❻ L'extraction est réalisée en discontinu par filtration, estérification et distillation
- ❼ La concentration en sucre résiduelle est très faible (<5 g/L), rendement 95%
- ❽ Les productivités obtenues varient entre 8 et 12 g/L.h.

Avec ces informations, il est possible de reconstituer globalement ce procédé industriel (**Figure I.6.2**). La fermentation se déroule dans un tank avec régulation du pH et de la température. Le jus de fermentation est filtré pour éliminer les cellules. Le lactate de calcium est ensuite acidifié à l'acide sulfurique pour former de l'acide lactique et du carbonate de calcium (gypse). Ce dernier précipite et est séparé sur filtre à bande ou presse. L'acide lactique brut est ensuite estérifié en éthyl-lactate puis distillé pour former de l'acide lactique de différents degrés de pureté (pharmaceutique, alimentaire, technique).

➡ Le procédé industriel supposé est encore en mode discontinu, les techniques de séparations sont très simples à mettre en oeuvre et peu coûteuses. Les performances dépendent essentiellement de la souche microbienne qui peut accumuler des concentrations importantes d'acide lactique tout en consommant la quasi totalité des sucres. Enfin, la forme saline intermédiaire produite est le lactate de calcium.

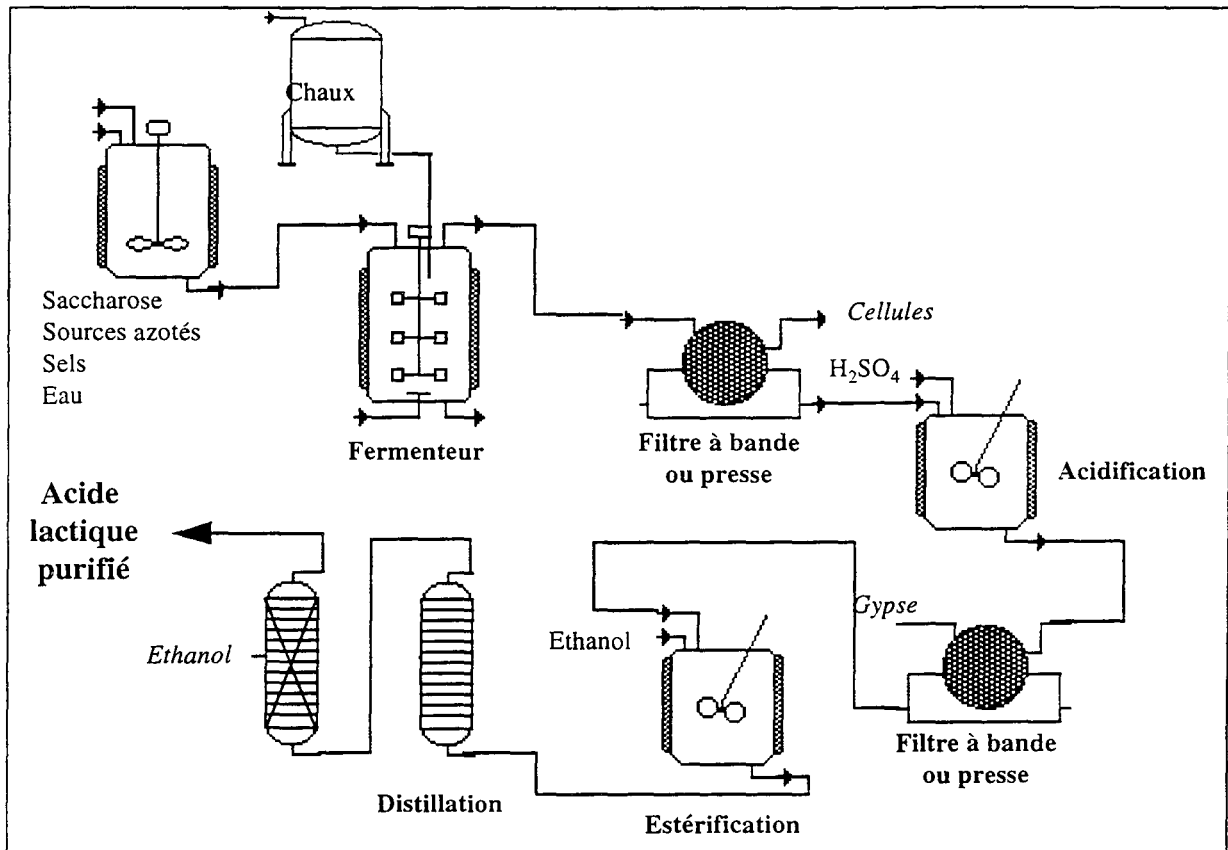


Figure I.6.2 : Procédé utilisé industriellement pour la production du lactate.

7. MODELISATION

7.1. - Modélisation de la fermentation lactique

Dans la littérature, il existait jusqu'à présent deux grands types de modèles :

- ❶ Les modèles de connaissances, qui sont établis après des études physiologiques, cinétiques et énergétiques. Ils regroupent les modèles cinétiques (non structurés) et les modèles physiologiques (structurés).
- ❷ Les modèles de comportement, ou « boîte noire » qui n'analysent pas les voies empruntées par les différents intermédiaires de fermentation.

Les modèles de comportement sont rares car la fermentation lactique est bien décrite. Les modèles cinétiques sont les plus répandus car ils utilisent les cinétiques connues pour exprimer les vitesses spécifiques de croissance, de consommation de substrat et de production en faisant abstraction de la structure interne de la cellule. Cette approche est idéale pour les fermentations à un substrat et un produit sans changement de métabolisme (Moser, 1984).

Les modèles structurés tiennent compte des voies métaboliques empruntées et de la régulation traductionnelle et transcriptionnelle des gènes. Ces modèles sont beaucoup plus difficiles à mettre en oeuvre car les connaissances préalables doivent être importantes. Une fois validé, le modèle est capable de prédire tout changement métabolique.

7.1.1. - La croissance

Les modèles de fermentation cherchent tout d'abord à décrire la croissance qui, en général pour le mode discontinu, suit une loi dérivée de celle de MONOD (Monod, 1942) (a):

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \quad (a)$$

μ est le taux de croissance (h^{-1})

μ_{\max} est le taux de croissance maximum (h^{-1})

S la concentration en substrat (g/L)

K_s la concentration à laquelle $\mu = \mu_{\max}/2$ (g/L)

Cette loi pour exprimer la croissance en fonction de la concentration en substrat est utilisée encore couramment, des termes supplémentaires peuvent être ajoutés pour tenir compte de phénomènes d'inhibition par le produit et/ou le substrat et un décès cellulaire. (Nielsen et al., 1990).

Ainsi, des modèles de croissance peuvent être proposés en fonction de la concentration en produit; c'est le modèle simple d'inhibition. (Ishizaki et al., 1991) (b):

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{K_i}{K_i + P} \right) \quad (b)$$

La loi de MONOD peut être combinée avec cette dernière expression pour donner un modèle dépendant à la fois de la concentration en substrat et en produit (c):

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + P} \right) \quad (c)$$

Un terme de décès cellulaire peut-être ajouté à cette dernière expression comme cela a été montré par Raucourt et al., 1989 (d) :

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + P} \right) - K_d \quad (d)$$

Il est également démontré qu'une constante de puissance d'inhibition est nécessaire au modèle notamment quand l'inhibition n'est observée qu'à partir d'une certaine concentration en produit (Kumar Dutta et al., 1996) (e) :

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_i} \right)^n} \right) \quad (e)$$

Prenons le cas d'une bactérie suivant une loi de MONOD avec une constante d'inhibition par le produit, une inhibition par le substrat et une constante de décès cellulaire, l'équation du modèle pourrait être du type (f):

$$\mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_{SI}}} \right) \cdot \left(\frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_i} \right)^n} \right) - K_d \quad (f)$$

7.1.2. - Consommation du substrat

La représentation la plus utilisée a été décrite par Keller et Gerhardt, 1975 Tanigushi, et al., 1987. La consommation en substrat est liée et non liée à la croissance (g), le terme m

peut être assimilé à un terme de maintenance qui correspond à une consommation de substrat nécessaire ni à la croissance, ni à la formation de produit :

$$\sigma = \frac{1}{Y_{X/S}} \cdot \mu + m \quad (\text{g})$$

7.1.3. - Production d'acide lactique

Le modèle de référence est le modèle de production lié et non lié à la croissance (Luedeking et Piret, 1959). Ce modèle est repris dans la littérature, mais possède le défaut de continuer à produire de l'acide lactique même quand il n'y a plus de substrat (h) :

$$\pi = k_2\mu + k_3 \quad (\text{h})$$

Le terme non associé à la croissance peut dépendre de la concentration en substrat, comme cela a été proposé par Keller et Gerhardt, 1975 et Rogers et Whittier, 1978 (i) :

$$\pi = k_2\mu + \left(k_3 \cdot \frac{S}{K_S + S} \right) \quad (\text{i})$$

7.1.4. Les modélisations récentes

Différentes souches bactériennes ont été modélisées en batch ou en continu:

❶ *Lactococcus lactis* (Cachon et Divies, 1993; Ishizaki, et al., 1992) avec un modèle à 3 états physiologiques,

❷ *Lactobacillus* spp. (Amrane et Prigent, 1994b) avec un modèle non structuré tenant compte de la variation de la vitesse spécifique de croissance et de la concentration en acide lactique en fonction du temps. Un autre modèle de l'acidification par *Lb.bulgaricus* a été décrit par Torrestiana et al., 1994.

Différents modes de cultures ont été modélisés et simulés :

❶ Discontinu : Ishizaki, et al., 1991; Ishizaki, et al., 1992

❷ Continu : Szewczyk, 1991

❸ Continu avec recyclage cellulaire : Monbouquette, 1991; Shimizu et al., 1994

Les phénomènes d'inhibition de la fermentation lactique sont généralement bien décrits (Kumar Dutta, et al., 1996; Yeh et al., 1991).

8. CONCLUSION DU CHAPITRE I

L'étude bibliographique montre l'étendue des connaissances sur la production d'acide lactique dans de nombreux domaines scientifiques et techniques. Il est clairement démontré qu'il existe un décalage entre le procédé industriel et les procédés proposés dans la littérature. L'amélioration du procédé industriel est réalisable par un passage progressif vers un mode continu global. Il est également possible de proposer un procédé qui permettrait d'augmenter de façon conséquente les performances et de diminuer les coûts de retraitement des co-produits. Le mode continu avec recyclage cellulaire par membrane semble le mieux adapté à remplir cet objectif car il permet d'augmenter les productivités tout en séparant les cellules du milieu contenant l'acide lactique (Mehaia et Cheryan, 1987). Il est cependant difficile de prévoir la longévité du procédé à cause des phénomènes de colmatage, il est donc nécessaire de comprendre comment ce paramètre clé évolue en fonction des autres paramètres et quels types de solutions techniques sont envisageables pour le contrôler (Roychoudhury, et al., 1995). Une étude bibliographique spécifique sur le réacteur à haute densité cellulaire s'avère donc indispensable en vue de sa conception et de son étude expérimentale.

~ CHAPITRE II ~

*Etude bibliographique :
Le réacteur à membrane*

- CHAPITRE II -

Etude bibliographique : Le réacteur à membrane

SOMMAIRE

1. PRINCIPE DU REACTEUR A HAUTE DENSITE CELLULAIRE	63
1.1. - LE REACTEUR A MEMBRANE	63
1.1.1. - Réacteur à recyclage cellulaire à membrane tubulaire.....	63
1.1.2. - Réacteur à fibres creuses	64
1.1.3. - Réacteur à membrane plane	65
1.1.4. - Réacteur à membrane hélicoïdale et rotative	65
1.2. - LES AVANTAGES DU REACTEUR A HAUTE DENSITE CELLULAIRE.....	66
1.3. - LES INCONVENIENTS MAJEURS RENCONTRES	66
2. LES PARAMETRES CLES DU REACTEUR A RECYCLAGE CELLULAIRE	67
2.1. - LES PARAMETRES FIXES PAR LA FERMENTATION.....	67
2.1.1. - La température.....	67
2.1.2. - Le pH.....	67
2.1.3. - Le milieu de culture	67
2.2. - LES PARAMETRES ISSUS DE LA MICROFILTRATION.....	68
2.2.1. - Débit de recyclage	68
2.2.2. - Pression transmembranaire.....	69
2.2.3. - Caractéristiques des membranes	71
2.2.4. - Décolmatage par « back-flush ».....	72
2.3. - PARAMETRES ISSUS DU COUPLAGE FERMENTATION - MICROFILTRATION.....	72
2.3.1. - Taux de dilution	72
2.3.2. - Taux de purge	72
3. PERFORMANCES DU RECYCLAGE CELLULAIRE	73
3.1. - MAITRISE DU COLMATAGE.....	73
3.2. - CRITERES DE PERFORMANCES.....	74
4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE II.....	75

FIGURES

Figure II.1.1 : Schéma d'un réacteur à recyclage cellulaire à membrane.	63
Figure II.1.2 : Schéma d'un réacteur à fibre creuse.....	64
Figure II.1.3 : Schéma d'un réacteur à recyclage cellulaire à membrane plane.....	65
Figure II.1.4 : Coupe longitudinale d'une membrane hélicoïdale.....	65
Figure II.2.1 : Evolution de la concentration en biomasse et de la concentration exocellulaire de lactate deshydrogénase en fonction du temps.	69

Figure II.2.2 : Evolution du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire	70
Figure II.2.3 : Evolution de la résistance hydraulique de la membrane en fonction du flux de perméat et de la pression transmembranaire	70
Figure II.2.4 : Coupe transversale d'une membrane tubulaire monocanal et multicanaux.	71
Figure II.3.1 : Schéma des phénomènes de colmatage dans une membrane de microfiltration.	73

TABLEAUX

Tableau II.2.1 : Membranes employées pour la production d'acide lactique.	71
Tableau II.3.1 : Principales performances obtenues pour la production d'acide lactique en réacteur à recyclage cellulaire par membrane.	74

1. PRINCIPE DU REACTEUR A HAUTE DENSITE CELLULAIRE

Pour obtenir de hautes productivités dans un procédé faisant intervenir des micro-organismes, il est désirable de travailler en haute densité cellulaire. Les moyens pour y parvenir sont variés : immobilisation, recyclage cellulaire par floculation, centrifugation, filtration directe ou procédé à membrane (Hjorleifsdottir et al., 1990). Le réacteur continu à membrane semble être la méthode la mieux adaptée pour travailler dans ces conditions (Ohleyer et al., 1985b)(cf. Chapitre I).

1.1. - Le réacteur à membrane

1.1.1. - Réacteur à recyclage cellulaire à membrane tubulaire

Le réacteur à recyclage cellulaire est généralement composé de deux unités couplées :

- ① Le fermenteur (Figure II.1.1)
- ② Le système de filtration ou microfiltre

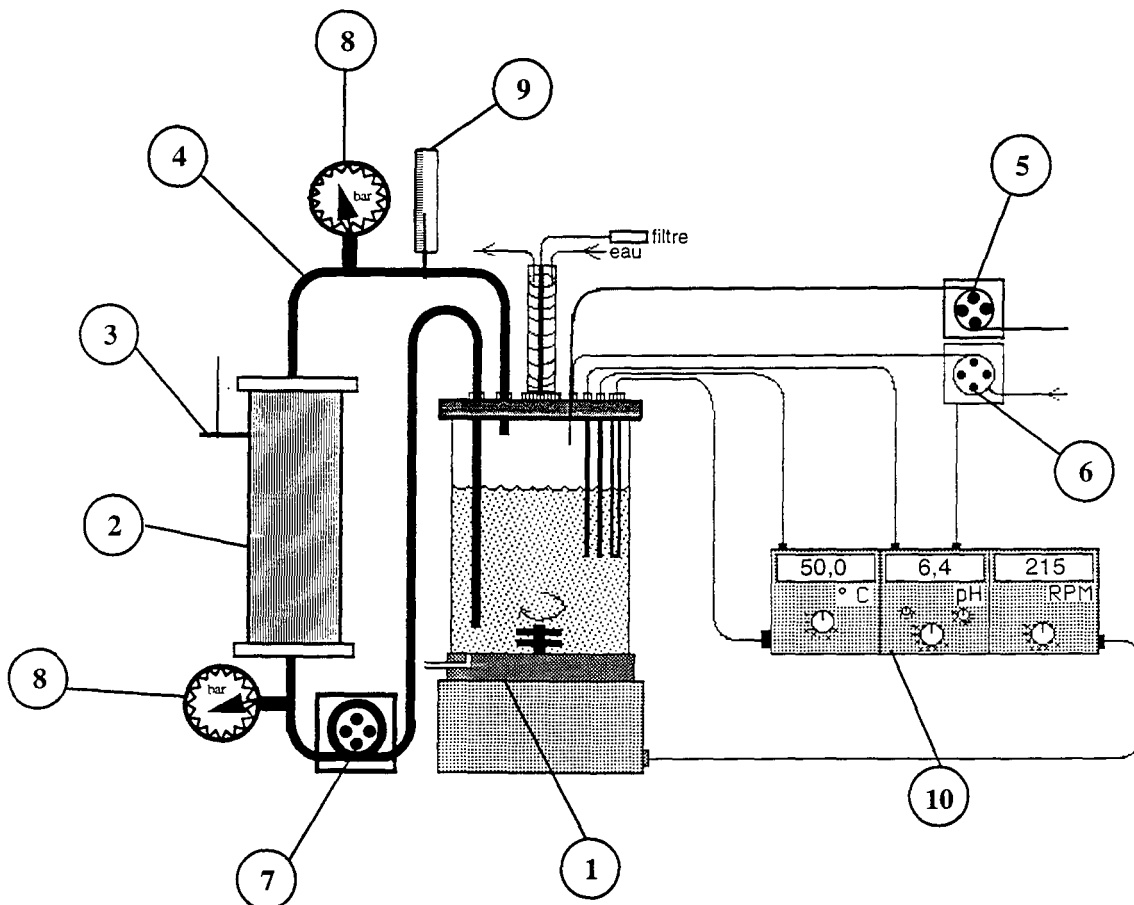


Figure II.1.1 : Schéma d'un réacteur à recyclage cellulaire à membrane.

La fermentation se déroule en continu avec alimentation en substrat⑤, le milieu est prélevé dans le fermenteur① et passe, par l'intermédiaire d'une pompe de recyclage⑦, dans un système de filtration② (microfiltre). Les cellules, et une grande partie du milieu, sont renvoyées dans le fermenteur par la sortie rétentat④. Une petite partie du milieu séparée des cellules, et contenant de l'acide lactique, est récupérée en sortie perméat③. Il est généralement nécessaire de contrôler le pH du fermenteur en ajoutant une base⑥ et de contrôler la température et la vitesse d'agitation⑩. Les paramètres suivis pour la partie filtration sont :

- la pression d'entrée et de sortie du microfiltre③ (pression transmembranaire),
- la température dans la boucle de recirculation⑨.

➔ C'est le type le plus rencontré de réacteur à haute densité cellulaire, la membrane se trouvant à l'extérieur, elle est facilement accessible pour toute manipulation (Litchfield, 1996). Ce type de procédé permet d'obtenir les productivités les plus élevées de tous les procédés de fermentation lactique (Cheryan et Mehaia, 1987).

1.1.2. - Réacteur à fibres creuses

Il existe d'autres types de réacteurs à membrane (Hjorleifsdottir et al., 1991), comme les réacteurs à fibres creuses (Shi et al., 1990). La différence fondamentale réside dans la conception de la membrane qui est obturée au bout de chaque fibre; le volume étant occupé par le micro-organisme alimenté en milieu (**Figure II.1.2**) ou par le milieu avec les micro-organismes, le flux se fait également tangentiellement au flux principal.

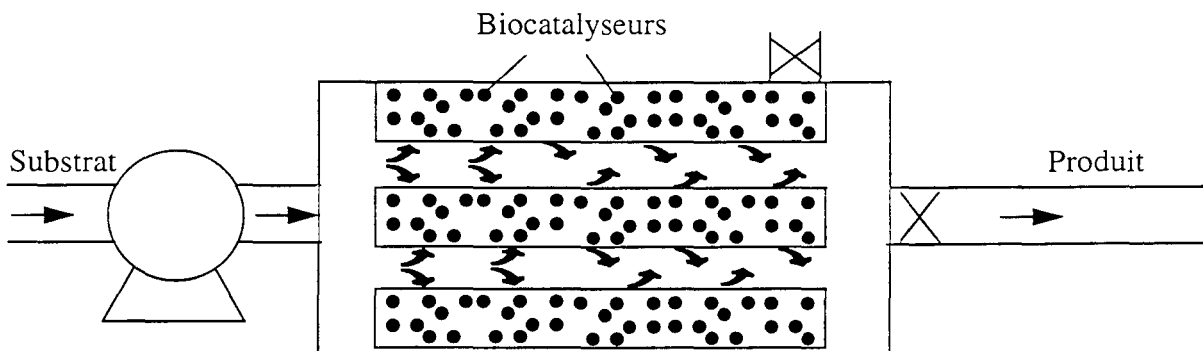


Figure II.1.2 : Schéma d'un réacteur à fibre creuse d'après Cheryan et Mehaia, 1987.

➔ Le décolmatage est difficile sur ce type de membrane et les productivités sont souvent plus faibles que celles obtenues avec un réacteur à recyclage cellulaire (Cheryan et Mehaia, 1987).

1.1.3. - Réacteur à membrane plane

Sur le même principe que les membranes tubulaires, cette membrane est plane et emprisonnée dans un module externe au fermenteur. Le flux de recirculation est toujours tangentiel au flux de perméat. Les membranes sont souvent organiques et résistent mal à une stérilisation ou à un décolmatage en place (Xavier et al., 1994) (**Figure II.1.3**).

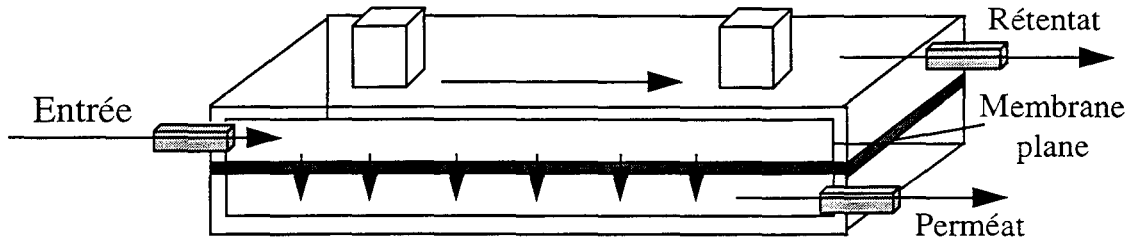


Figure II.1.3 : Schéma d'un réacteur à recyclage cellulaire à membrane plane.

1.1.4. - Réacteur à membrane hélicoïdale et rotative

Le principe est identique au réacteur à membrane tubulaire, seule la structure du système de filtration est différente. En effet, le flux de recyclage à l'intérieur de la membrane prend une forme hélicoïdale tout en étant tangentiel au flux de perméation. La force centrifuge créée augmente théoriquement le passage des petites molécules vers la sortie perméat (Belfort, 1988). Il est également possible de faire tourner la cartouche et la membrane de filtration selon son axe longitudinal pour encore augmenter cette force centrifuge, il s'agit alors d'une combinaison filtration - centrifugation. Un problème majeur : le coût.

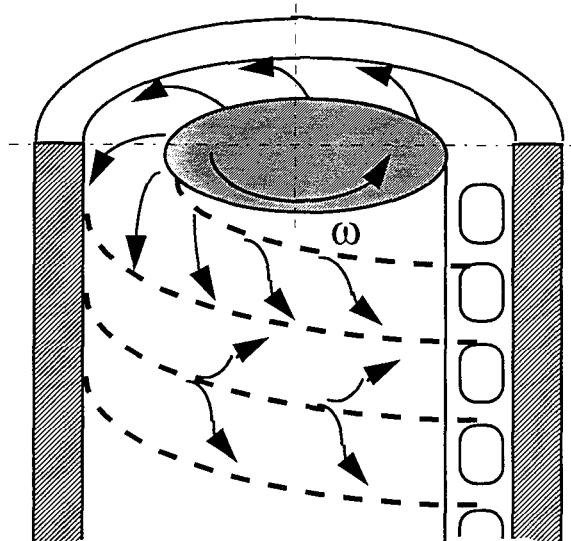


Figure II.1.4 : Coupe longitudinale d'une membrane hélicoïdale d'après Belfort, 1988.

1.2. - Les avantages du réacteur à haute densité cellulaire

Les auteurs insistent beaucoup sur l'aspect gain de productivité de ce type de procédé (Aeschlimann et Stockar, 1991; Bibal et al., 1990; Crespo et al., 1992). Cependant les autres avantages sont nombreux (Belfort, 1988). Les plus souvent cités sont résumés ci-dessous :

- ❶ augmentation de la concentration en cellules,
- ❷ séparation du produit de fermentation, fermentation extractive,
- ❸ augmentation de la productivité,
- ❹ découplage possible entre production de biomasse et de produit,
- ❺ membranes accessibles et stérilisables à la vapeur (pour membranes céramiques),
- ❻ possibilité de contrôle et supervision du procédé,
- ❼ nombreux paramètres contrôlables, nombreux degrés de liberté.

➡ Cette liste n'est pas exhaustive, néanmoins il conviendra d'être prudent car un avantage peu induire aussi des inconvénients. Par exemple, une trop forte concentration en biomasse induit des problèmes de transfert de matière, de viscosité, de retraitement des cellules et généralement une baisse de la productivité spécifique.

1.3. - Les inconvénients majeurs rencontrés

Le reproche le plus souvent retrouvé dans la littérature est le phénomène de colmatage des membranes; même s'il a été considérablement réduit par le passage de la filtration frontale à la filtration tangentielle (Boyaval et al., 1996b). Malheureusement, d'autres inconvénients existent et ils sont résumés ci-dessous :

- ❶ durée de vie des membranes difficilement prévisible,
- ❷ maîtrise des phénomènes de colmatage difficile,
- ❸ forces de cisaillement importantes qui nuisent à la viabilité cellulaire,
- ❹ augmentation de la viscosité due aux cellules qui nuit à la filtration,
- ❺ durée de vie globale du procédé assez courte,
- ❻ coût des membranes prohibitif.

➡ Il convient encore une fois de relativiser ces affirmations; s'il est généralement vrai que la maîtrise du colmatage est difficile (Roychoudhury et al., 1995), elle n'en

demeure pas moins possible. Ceci passe par une évaluation des paramètres influant le flux de perméat et la filtrabilité du milieu de culture.

Les observations de perte de viabilité ne font pas l'unanimité chez les auteurs (Boyaval, et al., 1996b), il semblerait que le type de pompe pour le recyclage a une grande importance. Enfin, le coût du mètre carré de membrane a considérablement baissé depuis dix ans et il n'est plus réellement excessif.

2. LES PARAMETRES CLES DU REACTEUR A RECYCLAGE CELLULAIRE

Le couplage de deux opérations unitaires nécessite une étude à la fois individuelle de chaque opération et une étude globale du procédé.

2.1. - Les paramètres fixés par la fermentation

La production d'acide lactique par des micro-organismes et la séparation par des membranes de micro ou d'ultrafiltration ont plusieurs paramètres en commun.

2.1.1. - La température

Il existe une température optimale de fermentation (cf. chapitre I). Cette valeur fixe donc la température à laquelle la filtration du milieu de culture va être réalisée. En effet, les débits de recyclage étant généralement élevés, il est difficile de changer la température du fluide pour la partie filtration. Ce paramètre température étant directement lié à la viscosité du milieu de culture, c'est un paramètre très influent sur le flux de perméat (Crespo, et al., 1992).

2.1.2. - Le pH

Comme pour le paramètre précédent, la valeur de pH est fixée par l'optimisation de la fermentation. Le pH a une influence sur la perméabilité de la membrane à cause des interactions entre les molécules chargées du milieu, et la charge globale de la membrane. Cette influence est néanmoins limitée en microfiltration de par la grosseur des pores, contrairement à des membranes de nanofiltration.

2.1.3. - Le milieu de culture

La composition du milieu de culture est un paramètre important du réacteur à recyclage cellulaire. Les milieux utilisés sont généralement complexes et il est difficile de caractériser l'influence de chaque molécule. Les auteurs utilisent souvent des paramètres

globaux caractérisant la rhéologie du fluide, tels que la viscosité (Crespo, et al., 1992). Cependant des études plus poussées ont été réalisées sur l'influence de la concentration en cellules ou en protéines sur la filtration.

2.1.3.1.- La biomasse

Outre l'effet de la concentration initiale en cellules sur la cinétique de filtration (Boyaval, et al., 1996b), il est démontré que les protéines issues du milieu de culture ou de la lyse des cellules sont des colmatants importants des membranes de microfiltration. De même, l'augmentation de la concentration en cellules augmente la viscosité du fluide et diminue la perméabilité de la membrane (Rodgers et Sparks, 1991). Il est donc important de pouvoir contrôler la concentration en biomasse (Yoo et al., 1997).

2.2. - Les paramètres issus de la microfiltration

Le module de microfiltration se trouve souvent à l'extérieur de l'unité de fermentation (**Figure II.1.1**). Cette configuration nécessite l'emploi d'une pompe à débit important, d'une cartouche contenant la membrane et d'un système de décolmatage.

2.2.1. - Débit de recyclage

La variation du débit de recyclage peut avoir plusieurs effets, parfois contradictoires, sur les performances du procédé.

3 effets ont été décrits par Crespo, et al., 1992, notamment sur les interactions biologie-physique. Premièrement, le recyclage provoque un changement dans les bilans de transfert de chaleur. L'échauffement causé par le recyclage n'est pas négligeable et la quantité d'énergie pour maintenir la température de fermentation est bien moindre, il est même parfois nécessaire de refroidir. Deuxièmement, La boucle de recyclage a un effet positif sur l'homogénéisation du milieu de culture, mais il faut que le temps de passage dans la boucle de recirculation soit bref. Enfin, l'augmentation du flux de recyclage a un effet positif sur le flux de perméat, donc sur le taux de dilution maximal.

Cette dernière observation est en accord avec des travaux de Boyaval et al., 1988 sur le passage d'un régime laminaire à un régime turbulent. Cette publication montre également que ni l'augmentation de la vitesse de recyclage, ni la pompe de recyclage n'augmente les bris cellulaires (Boyaval, et al., 1988). Ce bris cellulaire est suivi en mesurant la concentration en lactate deshydrogénase dans le milieu de culture. Il n'y a pas de lyse si la concentration en enzyme suit la concentration en biomasse, ce qui est le cas dans la **Figure II.2.1**. En fait, les

auteurs sont en désaccord, tout dépend du type de pompe et du type de souche microbienne employés.

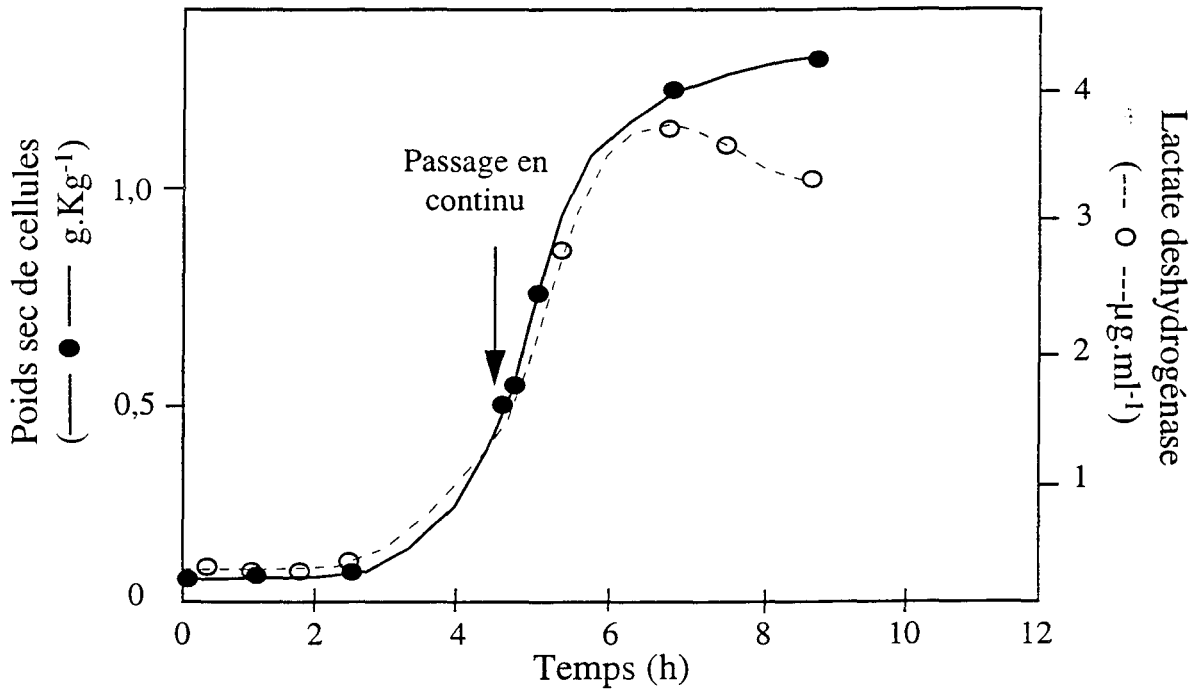


Figure II.2.1 : Evolution de la concentration en biomasse et de la concentration exocellulaire de lactate deshydrogénase en fonction du temps d'après Boyaval, et al., 1988.

2.2.2. - Pression transmembranaire

La pression transmembranaire a un effet sur le flux de perméat et sur le colmatage de la membrane (Boyaval, et al., 1996b). A faible pression (de 0,1 à 0,3 bar), il y a augmentation du flux de perméat jusqu'à une valeur maximale, puis la pression doit être augmentée pour maintenir le flux constant et aller à l'encontre du colmatage de la membrane (**Figure II.2.2**) (suivi par l'augmentation de la résistance hydraulique de la membrane). Quand la pression maximale de l'installation est atteinte, la pression transmembranaire est diminuée et suit linéairement la chute du flux de perméat jusqu'à une valeur nulle. Parallèlement, la résistance hydraulique diminue légèrement mais reste importante, traduisant ainsi le colmatage de la membrane (**Figure II.2.3**); les pressions de fonctionnement se situant en microfiltration vers 1,5 - 3 bar (Bibal, et al., 1990).

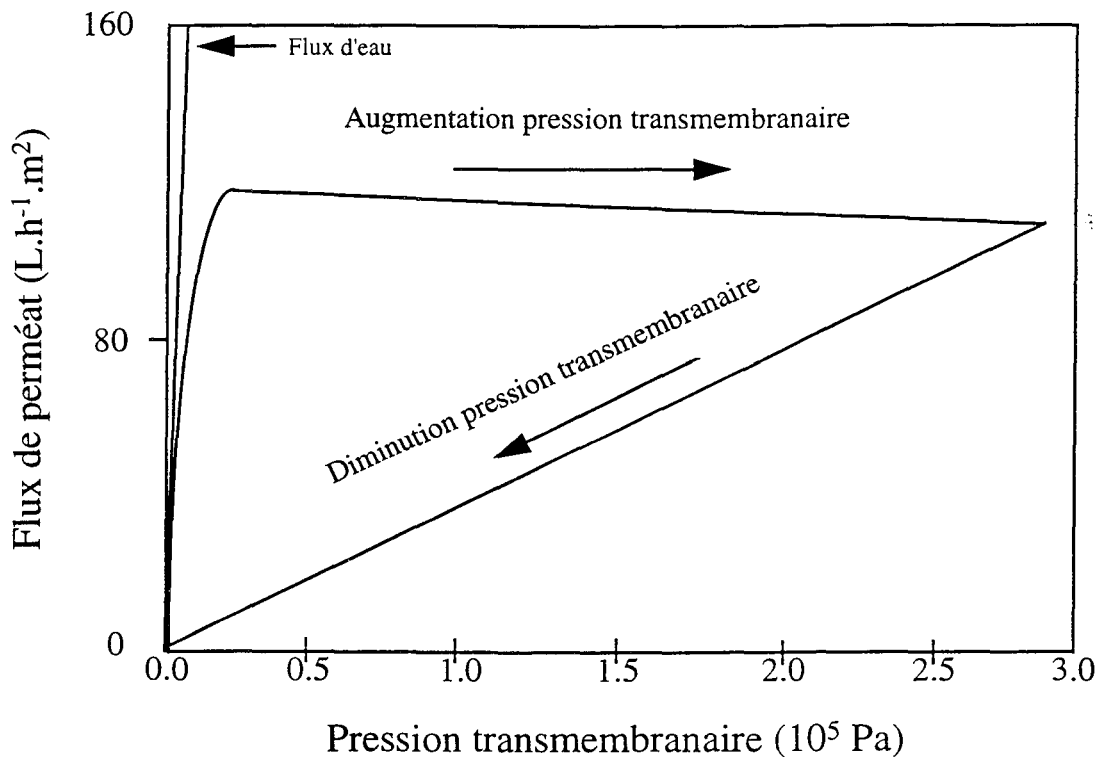


Figure II.2.2 : Evolution du flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire d'après Boyaval, et al., 1996b.

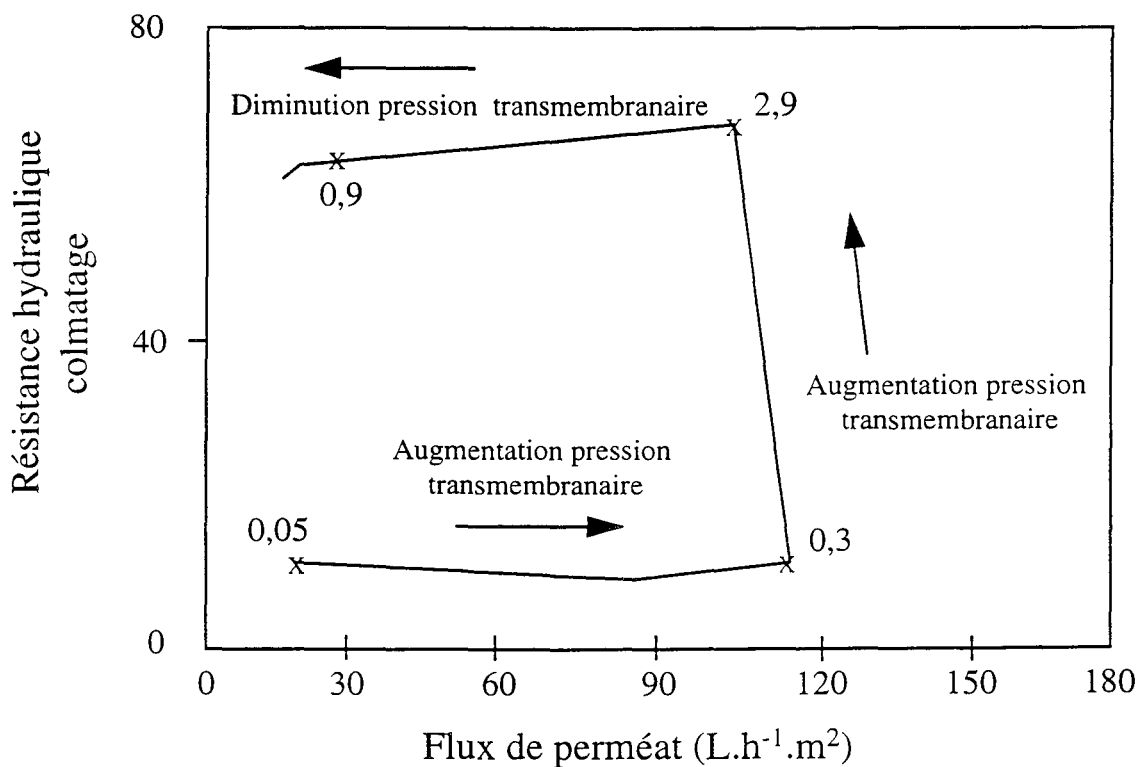


Figure II.2.3 : Evolution de la résistance hydraulique de la membrane en fonction du flux de perméat et de la pression transmembranaire (10⁵ Pa) d'après Boyaval, et al., 1996b.

2.2.3. - Caractéristiques des membranes

Les membranes à flux tangentiels sont généralement utilisées. Les membranes minérales remplacent progressivement les membranes organiques fragiles et difficilement stérilisables (Belfort, 1988). Les membranes organiques sont à base de cellulose ou de polysulfone en fonction de l'hydrophobicité souhaitée (Rodgers et Sparks, 1991). Les membranes minérales sont réalisées à base de carbone, de céramique ou autres matériaux composites avec, par exemple, une ou plusieurs couches d'oxyde d'alumine. Porosité et surface d'échange de la membrane sont deux autres paramètres fondamentaux (**Tableau II.2.1**). Les porosités utilisées pour la séparation des cellules de l'acide lactique sont situées entre la micro et l'ultrafiltration. Des membranes de porosité plus importante sont également testées : 0,45 μm (Kulozik et al., 1992), 0,8 μm (Boyaval et al., 1996a; Vick Roy et al., 1983).

Tableau II.2.1 : Membranes employées pour la production d'acide lactique.

Membrane	Organique / Minérale	Porosité	Surface	Références
Carbosep	M	0,2 μm	0,1 m^2	Boyaval, et al., 1988
Carbosep	M	0,14 μm	0,32 m^2	Hayakawa et al., 1990
Techsep	M	0,08 μm	0,1 m^2	Bibal, et al., 1990
Techsep	M	0,08 μm	0,1 m^2	Crespo, et al., 1992
Membralox	M	0,2 μm	0,154 m^2	Boyaval, et al., 1996b

La surface d'échange peut également changer en fonction de la configuration de la membrane, cette dernière peut être monocanal ou multicanaux (**Figure II.2.4**)([Tanaguchi, 1987 #521]).

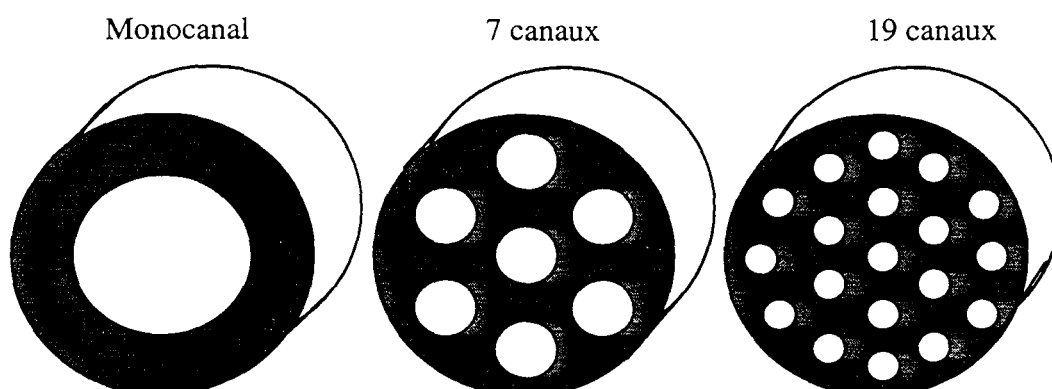


Figure II.2.4 : Coupe transversale d'une membrane tubulaire monocanal et multicanaux.

2.2.4. - Décolmatage par « back-flush »

Le décolmatage de la membrane par un flux inversé augmente de façon importante les performances du procédé (Kim et Chang, 1991). C'est un gaz externe sous pression (air, azote) qui sert de moteur à ce flux inverse par l'intermédiaire de vannes. En général, l'augmentation de la fréquence du « back-flush » augmente le niveau de flux de perméat (Rodgers et Sparks, 1991). Mais il peut exister une fréquence optimale de décolmatage, déterminée à $0,2 \text{ min}^{-1}$ dans l'étude réalisée par Kim et Chang, 1991.

2.3. - Paramètres issus du couplage fermentation - microfiltration

Certains paramètres ne peuvent être caractérisés et étudiés que sur la totalité du procédé. Ils affectent à la fois les performances de la fermentation, de la filtration et donc du procédé global.

2.3.1. - Taux de dilution

Techniquement, pour travailler en réacteur continu, il faut conserver le volume réactionnel constant. C'est donc le flux de perméat qui fixe le taux de dilution et le flux entrant de substrat. Un taux de dilution élevé permet d'augmenter les productivités du procédé (Boyaval, et al., 1988), d'éliminer le produit, les molécules inhibitrices et les substrats non consommés (Crespo, et al., 1992). En recyclage total, c'est à dire sans taux de purge, un taux de dilution élevé permet d'obtenir des concentrations en cellules et des productivités maximales très élevées (Xavier, et al., 1994). Mais ces performances sont généralement limitées dans le temps (Bibal, et al., 1990).

2.3.2. - Taux de purge

Le taux de purge a un effet important sur la concentration cellulaire, le système devient un recyclage cellulaire partiel. Une partie des cellules est éliminée par la purge, notamment celles qui sont en mauvais état physiologique (Boyaval, et al., 1988). Le taux de purge augmente la stabilité et la pérennité du procédé (Crespo, et al., 1992). Le taux de purge a, par conséquent à l'état d'équilibre, un effet sur la concentration en produit et la productivité globale du procédé (Xavier, et al., 1994).

3. PERFORMANCES DU RECYCLAGE CELLULAIRE

3.1. - Maîtrise du colmatage

La maîtrise du colmatage est la clé du procédé à membrane. Les auteurs considèrent généralement deux types de mécanismes (**Figure II.3.1**):

❶ Le **colmatage irréversible** est attribué simultanément à l'adsorption et à l'emprisonnement des composés de fermentation, tels que, protéines, sels minéraux, polysaccharides et débris cellulaires à l'intérieur de la membrane. Ces composés sont des colmatants connus des membranes céramiques (Boyaval, et al., 1996b).

❷ Le **colmatage réversible** est attribué à la couche de cellules accumulées à la surface de la membrane. Cette couche limite dépend du rapport entre le flux convectif à travers la membrane et les phénomènes d'érosion provoqués par le flux de recirculation (Boyaval, et al., 1996b).

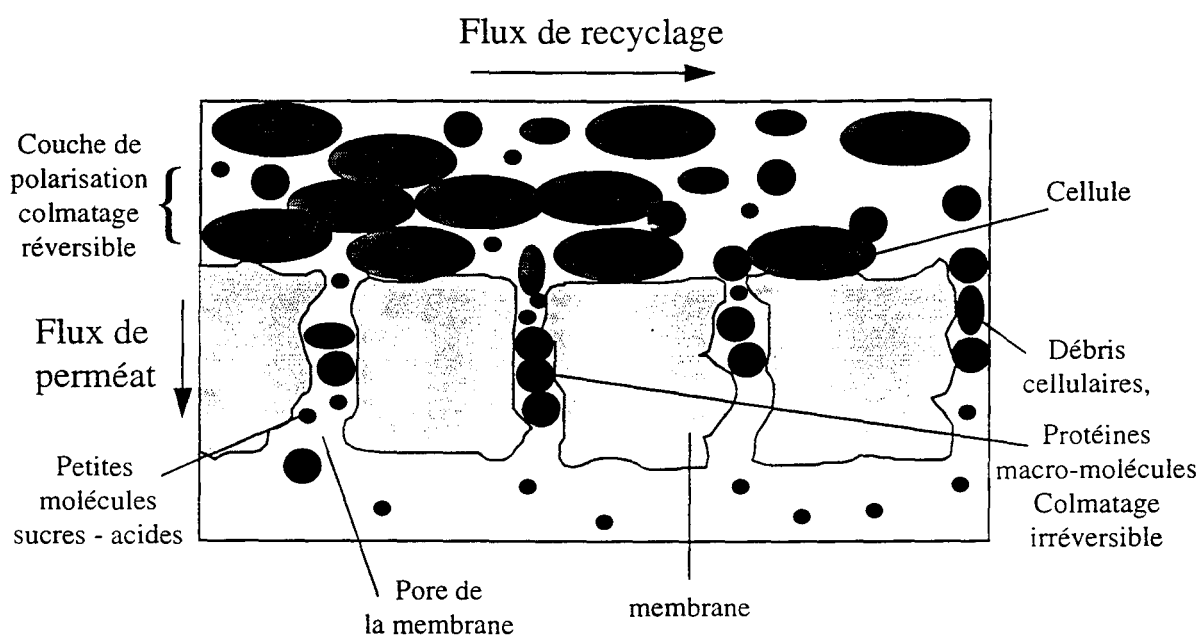


Figure II.3.1 : Schéma des phénomènes de colmatage dans une membrane de microfiltration.

➔ Il faut éviter au maximum le colmatage irréversible en limitant le relargage de protéines et la lyse cellulaire. L'extrait de levure est un colmatant important de par sa concentration en protéines et poly-peptides (Boyaval, et al., 1996b).

Le colmatage réversible peut être limité et contrôlé en utilisant un système de « back-flush » (Kim et Chang, 1991). L'effet de la pression transmembranaire sur le

colmatage peut être découplé de la vitesse de balayage du fluide en utilisant un vanne de contre-pression (Boyaval, et al., 1988).

3.2. - Critères de performances

Les critères généralement choisis pour estimer les performances du procédé à recyclage cellulaire sont :

- ❶ Les productivités (maximale, moyenne et spécifique).
- ❷ Les rendements (instantané et de bioconversion).
- ❸ La stabilité et la durée du procédé.
- ❹ Les concentrations (produits et biomasse).

Le **Tableau II.3.1** résume les performances décrites dans la littérature pour les réacteurs à recyclage cellulaire couplant fermentation et membrane de microfiltration ou ultrafiltration.

Tableau II.3.1 : Principales performances obtenues pour la production d'acide lactique en réacteur à recyclage cellulaire par membrane.

Acide lactique (g/L)	Taux de dilution (h ⁻¹)	Biomasse (g/L)	Productivité volumique (g/L.h)	Durée du procédé (h)	Rendement (g lactate / g glucose)	Type de membrane	Références
35	2,2	54	76	54	0,96	plane	Vick Roy, et al., 1983
59	1,1	118	65	52	0,95	plane	Ohleyer et al., 1985a
40	0,95	80	38	52	0,95	plane	Ohleyer, et al., 1985a
57	2,8	140	160	14	0,98	plane	Ohleyer, et al., 1985b
117	0,72	63	84	8	0,99	fibre creuse	Mehaia et Cheryan, 1987b
13	0,2	100	2,6	250	0,88	fibre creuse	Mehaia et Cheryan, 1987a
25	0,88	64	22	140	0,81	tubulaire	Boyaval et al., 1987
40	-	49	-	22	-	tubulaire	Tanigushi et al., 1987
40	0,3	8	12	220	0,76	fibre creuse	Major et Bull, 1988
90	0,4	136	36	90	0,82	tubulaire	Xavier, et al., 1994
45	0,5	40	22,5	125	0,89	fibre creuse	Tejayadi et Cheryan, 1995
52	0,23	87	12	120	0,63	fibre creuse	Yoo, et al., 1997

➤ Tous les travaux décrits dans ce tableau concernent des fermentations réalisées avec des bactéries lactiques du genre *Lactobacillus*. Il existe très peu de travaux sur d'autres genres en production d'acide lactique. Les productivités volumiques obtenues sont parfois très élevées (Ohleyer, et al., 1985b), mais la durée du procédé est considérablement raccourcie. En fait les productivités annoncées par les auteurs sont presque toujours des productivités volumiques maximales. De plus, quand la durée de l'opération semble élevée, les productivités volumiques sont faibles (Mehaia et Cheryan, 1987a).

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE II

Les procédés couplant fermentation et membrane de microfiltration ont de nombreux avantages surtout au niveau gain de productivité volumique. Cependant, le problème essentiel provient de la maîtrise du colmatage et de la stabilité du procédé sur une longue durée. Le choix de la membrane et de la pompe de recyclage est très important. Une étude précise, à la fois sur la composition du milieu de culture, et sur la partie microfiltration est nécessaire pour limiter les phénomènes de colmatage. Un système de décolmatage est à prévoir dans la conception d'un pilote, ainsi qu'une vanne de contre pression pour étudier de façon indépendante les effets de la pression transmembranaire et du flux de recyclage.

~ CHAPITRE III ~

Matériels et méthodes

- CHAPITRE III -
Matériels et méthodes

SOMMAIRE

1. MICRO-ORGANISMES	77
1.1. SELECTION DES SOUCHES	77
1.2. CONSERVATION DES SOUCHES.....	78
2. MILIEUX DE CULTURES	78
2.1. MILIEU DE REVIVIFICATION R1 ET R1 GELOSE	79
2.2. MILIEU DE PRECULTURE ET DE FERMENTATION INITIAL M1.....	79
2.3. STERILISATION DES MILIEUX DE CULTURE	79
2.3.1. <i>Protocole de stérilisation adapté à Bacillus</i>	80
2.3.2. <i>Protocole pour les milieux utilisés dans la journée</i>	80
3. TECHNIQUES DE CULTURE	80
3.1. LE TYPE DE REACTEUR	80
3.1.1. <i>Réacteur discontinu parfaitement mélangé</i>	80
3.1.2. <i>Réacteur continu parfaitement mélangé</i>	81
3.1.3. <i>Réacteur continu à recyclage cellulaire</i>	82
3.2. PROTOCOLE DES CULTURES EN MODE DISCONTINU	84
3.3. PROTOCOLE DES CULTURES EN MODE CONTINU PARFAITEMENT AGITE.....	86
3.4. PROTOCOLE DES CULTURES CONTINUES AVEC RECYCLAGE CELLULAIRE.....	87
3.4.1. <i>Stérilisation du pilote d'ultrafermentation</i>	87
4. METHODES ANALYTIQUES	88
4.1. ESTIMATION DE LA BIOMASSE	88
4.1.1. <i>Numération sur cellule de Thoma</i>	88
4.1.2. <i>Evaluation par densité optique</i>	88
4.2. ESTIMATION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE LACTIQUE.....	91
4.2.1. <i>Dosage par kit enzymatique</i>	91
4.2.2. <i>Dosage automatique par la lactate oxydase</i>	92
4.2.3. <i>Dosage du lactate d'ammonium par conductivité</i>	93
4.3. DOSAGE DES SUCRES ET DES AUTRES ACIDES ORGANIQUES.....	93
4.4. DOSAGE DE L'AZOTE TOTAL	94
5. LES EXTRAITS CELLULAIRES	95
5.1. LE PROTOCOLE.....	95
5.2. LES HYDROLYSES.....	95
5.3. LE BROYAGE	96
5.4. SEPARATION - NEUTRALISATION.....	96

5.5. L'ATOMISATION :	96
6. INTERPRETATIONS DES DONNEES.....	97
6.1. REACTEUR DISCONTINU	97
6.1.1. Vitesses de réaction.....	97
6.1.2. Vitesses spécifiques	97
6.1.3. Rendements	98
6.1.4. Productivités.....	98
6.2. REACTEUR CONTINU SIMPLE	99
6.2.1. Vitesses d'évolution des différents composés	99
6.2.2. Vitesses spécifiques et rendements	99
6.2.3. Détermination du taux de dilution critique	100
6.2.4. Productivités.....	100
6.3. REACTEUR CONTINU AVEC RECYCLAGE CELLULAIRE	101
6.3.1. Réalisation des bilans matières.....	101
6.4. PARAMETRE INDUSTRIEL.....	102
7. TRAITEMENT INFORMATIQUE ET MODELISATION.....	103
7.1. TRAITEMENT CINETIQUE	103
7.2. REALISATION ET TRAITEMENT DES PLANS D'EXPERIENCES	103
7.3. PROGRAMME D'ACQUISITION ET DE CONTROLE DU PILOTE.....	104
7.4. MODELISATION	104
8. APPAREILLAGE ET PRODUITS.....	105

FIGURES

Figure III.1.1 : Propagation initiale de la souche.....	77
Figure III.1.2 : Réisolation de la souche sous pression de sélection (taux de dilution)	78
Figure III.1.3 : Préparation d'un stock de souche sous forme lyophilisée.	78
Figure III.3.1 : Schéma d'un fermenteur discontinu SGI® de 2 litres.....	81
Figure III. 3.2 : Schéma d'un fermenteur continu SGI de 2 litres.....	81
Figure III. 3.3 : Schéma du pilote de fermentation avec recyclage cellulaire.....	82
Figure III.3.4 : Protocole de propagation de la souche pour réaliser une culture.	85
Figure III.3.5 : Protocole d'analyses lors de la réalisation d'une culture.	85
Figure III.3.6 : Schéma des techniques d'impulsions et d'échelons, évolution de la concentration de la molécule ajoutée dans le fermenteur.....	86
Figure III. 3.7 : Protocole de réalisation d'une fermentation avec recyclage cellulaire.....	87
Figure III.4.1 : Protocole de réalisation de la courbe D.O. = f (Poids sec).	89
Figure III.4.2 : Courbes Densité Optique en fonction du Poids Sec de cellules.	90
Figure III.6.1 : Schéma des bilans matières sur les 3 modes de fonctionnement utilisés.....	97

1. MICRO-ORGANISMES

La souche initiale utilisée lors de ce travail a été fournie sur gélose en piqure profonde par BRUSSELS BIOTECH s.a., Bruxelles, Belgique. Cette souche naturelle a été présentée comme un *Bacillus* thermophile atypique issu de broyats de canne à sucre du Gabon.

1.1. Sélection des souches

La souche initiale dénommée « BB/ZVHB-02 » a été réisolée (**Figure III.1.1**) sur milieu gélosé et caractérisée comme étant proche d'un *Bacillus coagulans* (**Annexe I**). La caractérisation de la souche a été faite à partir des techniques microbiologiques et biochimiques spécifiques des bacilles décrites par Westhoff et Dougherty, 1981.

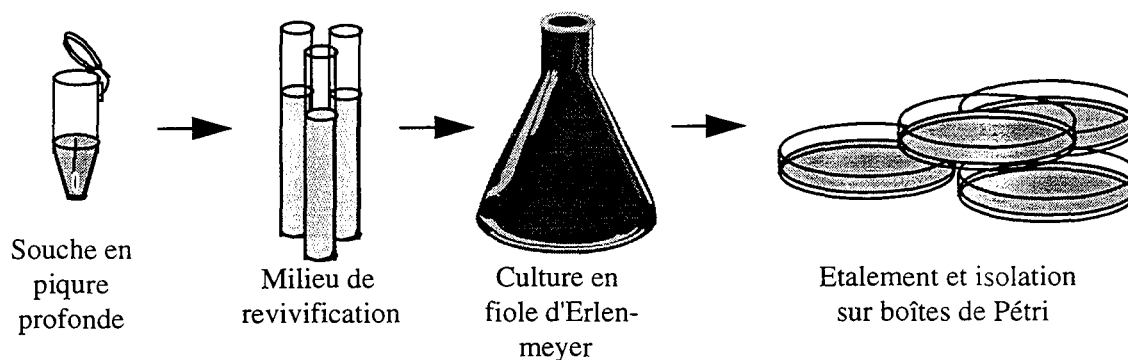


Figure III.1.1 : Propagation initiale de la souche.

Après remise en culture de la souche de départ, une deuxième sélection a été réalisée en réacteur continu à taux de dilution croissant jusqu'à lessivage du réacteur (**Figure III.1.2**). 4 isolats ont été prélevés à 4 taux de dilutions différents. Ces isolats ont été dénommés TB/01 à TB/04. Après identification selon la même méthode que celle citée pour la souche initiale, aucune différence au niveau des résultats des tests n'a été mise en évidence par rapport à la souche BB/ZVHB-02.

Cependant, après avoir mis en culture, en fioles d'Erlenmeyer, ces 4 souches et comparé le temps de reprise de croissance (latence), la quantité de biomasse et d'acide lactique produite, il semblerait que la souche TB/04 se détache légèrement des 3 autres souches en terme de performance. C'est essentiellement sur cette souche TB/04, ainsi que sur la souche initiale BB/ZVHB-02 que les expérimentations vont être réalisées lors de ce travail. Néanmoins toutes les souches seront conservées sous forme lyophilisée.

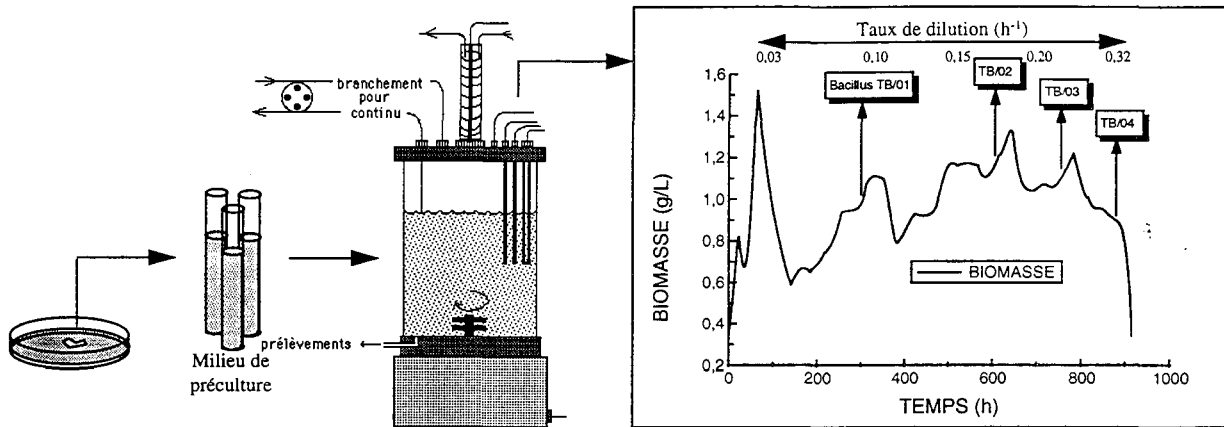


Figure III.1.2 : Réisolation de la souche sous pression de sélection (taux de dilution)

1.2. Conservation des souches

Après avoir réisolé les souches sur milieu gélosé sur boîtes striées, les différentes souches sont mises en préculture sur un milieu riche et mises en incubation 14 heures à 50°C pour arriver à la fin de la phase exponentielle de croissance. Les cellules sont ensuite séparées par centrifugation et lavées 3 fois à l'eau physiologique. Puis les cellules sont remises en suspension dans du milieu neuf et incubées 5 heures à 50°C. La réaction est bloquée par congélation en présence d'un cryoprotecteur. Puis les souches sont lyophilisées stérilement et placées dans des pipettes Pasteur stériles qui sont scellées à la flamme. Les cultures suivantes seront réalisées à partir du stock de souches lyophilisées (**Figure III.1.3**).

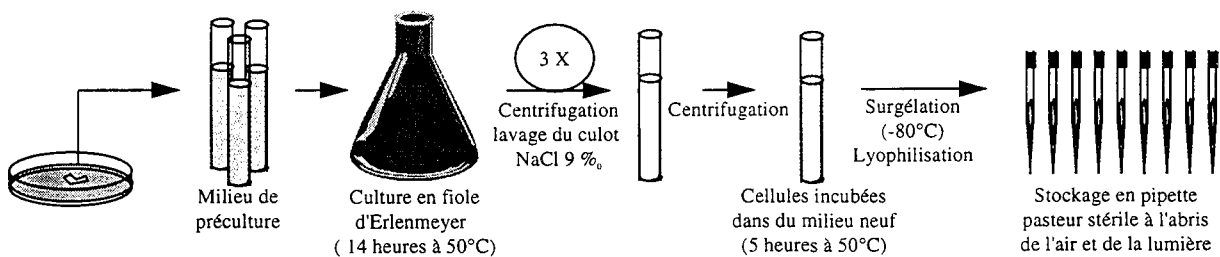


Figure III.1.3 : Préparation d'un stock de souche sous forme lyophilisée.

2. MILIEUX DE CULTURES

Différents milieux ont été testés au cours de cette étude.

2.1. Milieu de revivification R1 et R1 gélosé

Ce milieu a été défini par BRUSSELS BIOTECH s.a., pour la souche microbienne fournie. Ce milieu R1 riche contient une source de carbone, une source d'azote importante et du chlorure de sodium. Le milieu R1 gélosé a permis d'isoler les colonies sur boîte de Pétri et de conserver la souche sur gélose inclinée la première semaine.

Milieu R1 :

Saccharose	10 g/L
Tryptone	17 g/L
Extrait de levure	10 g/L
NaCl	5 g/L

Milieu R1 gélosé : en plus du milieu R1, il est ajouté 15 g d'agar-agar par litre de milieu.

2.2. Milieu de préculture et de fermentation initial M1

Comme précédemment, la composition du milieu M1 a été défini par nos partenaires. Ce milieu a servi de point de départ aux expérimentations, car il ne s'agit en aucun cas d'un milieu optimal pour la souche microbienne fournie.

Milieu M1 :

Saccharose	100 g/L
Extrait de levure	2 g/L
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,7 g/L

La composition de l'extrait de levure est donnée en **annexe II**

La composition de ce milieu variera en fonction des expériences réalisées : sources carbonées, azotées, de vitamines, d'acides aminées, de sels ou d'autres molécules.

2.3. Stérilisation des milieux de culture

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclavage, dans lequel les solutions sont soumises pendant 30 min à une température de 121°C (à une pression de 1,8 bar).

Les milieux stérilisés selon cette technique devront être utilisés rapidement (2 jours) pour éviter les contaminations due aux spores de *Bacillus coagulans* très résistantes.

Pour les milieux devant être conservés plus longtemps notamment pour une alimentation en continu d'un fermenteur, 2 possibilités ont été retenues:

- Adapter le mode de stérilisation pour éliminer ces spores.
- Changer la cuve d'alimentation tous les jours ou tous les deux jours.

2.3.1. Protocole de stérilisation adapté à *Bacillus*

La stérilisation se déroule en deux étapes. Premièrement, le milieu est chauffé à 90°C pendant une heure dans l'autoclave, puis il est laissé refroidir pendant plusieurs heures pour provoquer la germination des spores résiduelles jusqu'à la température normale de croissance qui se situe vers 50°C. Deuxièmement et sans sortir le milieu de l'autoclavage, la stérilisation est réalisée selon le protocole décrit plus haut.

Avec cette technique, les milieux peuvent être conservés jusqu'à 5 jours sans aucune contamination.

2.3.2. Protocole pour les milieux utilisés dans la journée

Sous certaines conditions, il est possible d'utiliser les milieux sans aucune stérilisation ou traitement particulier. C'est le cas pour les milieux d'alimentation utilisés dans la journée et quand la concentration en cellules dans le fermenteur est supérieure à 1 g/L. En effet, les conditions de fermentation et notamment de température (>50°C) sont telles que *Bacillus* ne craint pas les contaminations. Dans un souci de rigueur scientifique, ce protocole ne sera mis en place que dans des cas bien particuliers.

3. TECHNIQUES DE CULTURE

3.1. Le type de réacteur

Pour cette étude, deux modèles de fermenteurs ont été utilisés. Un fermenteur de 2 litres SGI®, principalement utilisé pour les cultures discontinues et continues parfaitement mélangées, et un fermenteur de 7 litres CHEMAP® couplé à un module de microfiltration pour les cultures en haute densité cellulaire.

3.1.1. Réacteur discontinu parfaitement mélangé

La **Figure III.3.1** décrit le réacteur SGI de 2 litres. La cuve ① contient le milieu de fermentation et est posé sur un socle ③ qui permet l'agitation du milieu par une turbine Rushton à entraînement magnétique ⑦. Le fermenteur est équipé d'un système de régulation de pH, de température et de vitesse d'agitation ②. La régulation de pH se fait par le biais d'une sonde pH ④ et d'une pompe ⑥ qui alimente le fermenteur en ammoniac. La

régulation de la température se fait par le biais d'une sonde de température, d'une résistance de chauffage ⑤ et d'une électrovanne permettant le passage d'eau froide. Enfin un bloc réfrigérant permet de recondenser le milieu qui s'évapore du fermenteur ③.

- sonde pH 405 DPAS-SC/K8S 225 (METTLER TOLEDO)

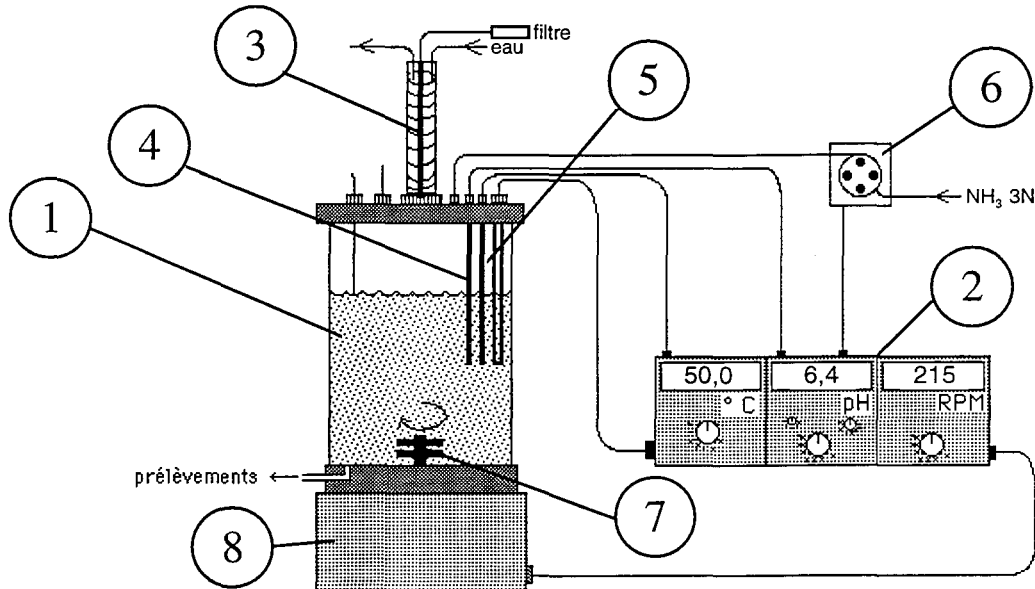


Figure III.3.1 : Schéma d'un fermenteur discontinu SGI® de 2 litres

3.1.2. Réacteur continu parfaitement mélangé

Le réacteur utilisé est le même que pour les cultures discontinues, avec en plus, un système d'alimentation et de soutirage ⑨ ayant des débits identiques (Figure III. 3.2).

- pompe Minipuls 2 (GILSON)

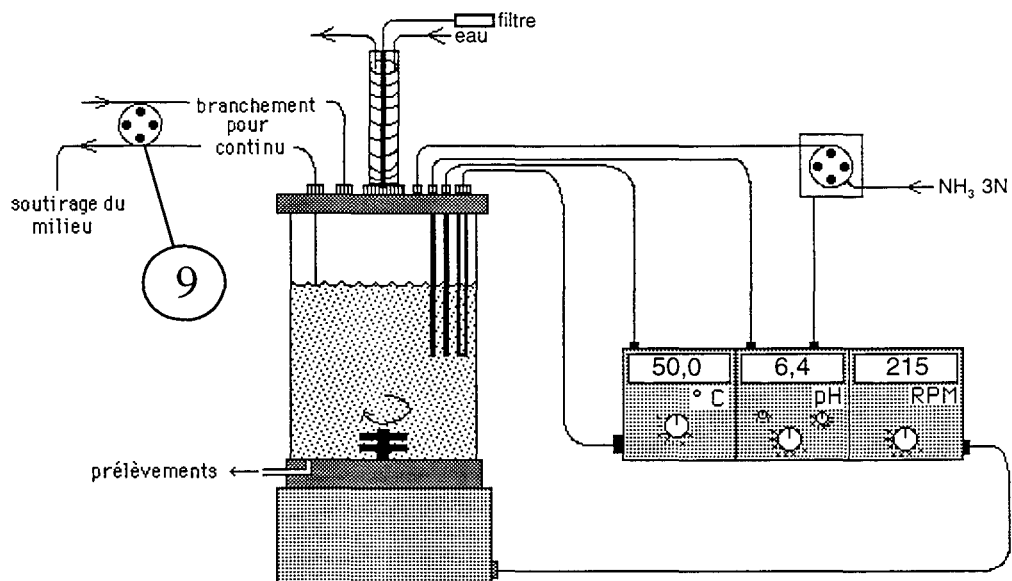


Figure III. 3.2 : Schéma d'un fermenteur continu SGI de 2 litres.

3.1.3. Réacteur continu à recyclage cellulaire

La réalisation du pilote pour les fermentations avec recyclage cellulaire a été faite à partir d'un fermenteur CHEMAP[®] de 7 litres sur lequel a été couplé un module de microfiltration TECH-SEP[®].

Description du pilote (Figure III. 3.3) :

Le fermenteur CHEMAP (Männedorf, Suisse) est équipé de:

- une sonde pH réf. 1.03.01170 (INGOLD)
- une sonde de température PT100 (CHEMAP)
- un système de régulation de pH avec pompe MSO1 (CHEMAP)
- un système de régulation de température et d'agitation type Rushton à 3 niveaux
- un bloc condenseur avec filtre pour prise d'air

Le module de microfiltration a été réalisé par AIR et EAU SYSTEMES, Frouard.

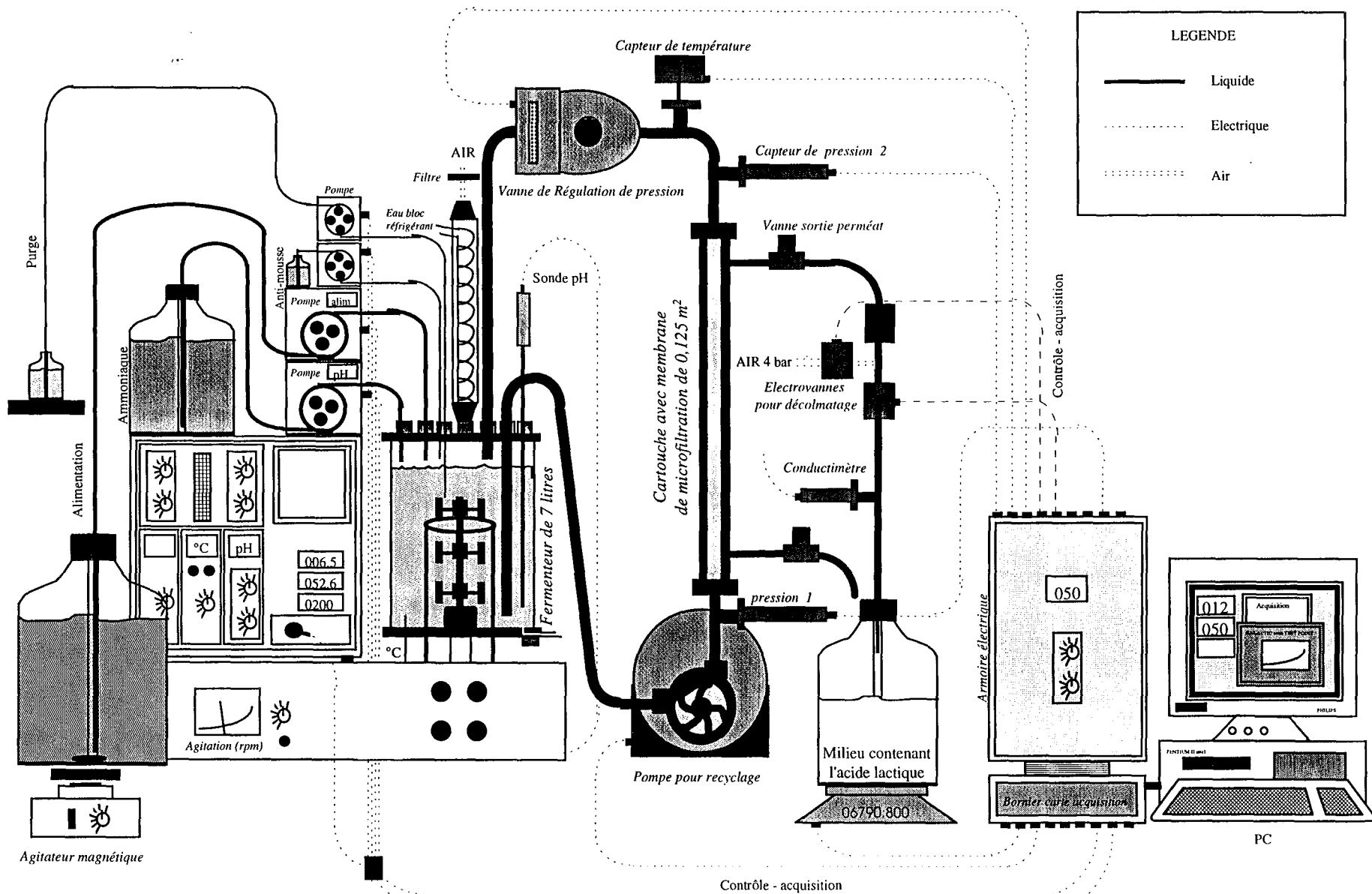
En plus, de la structure, raccords type CLAMP, et INOX 304L, le module est équipé de :

- une cartouche de filtration KERASEP[™] Type K01 INOX L943 (TECH-SEP)
- cinq membranes céramiques KERASEP[™] support monolithe Al₂O₃ - LiO₂ et membrane en TiO₂ ou ZrO₂ de porosité (0,2 ; 0,45 et 0,8 μm) et multicanaux (7 ou 19). type K01 AW 0,125 m² (TECH-SEP)
- une pompe JABSCO série 28220 (ABS) avec tête de pompe en néoprène.
- deux capteurs pression à transmetteur électronique. Modèle 84-NP-40 (VALCOM)
- un capteur thermométrique à résistance, électronique. T2FR180 (CARI-CONTROLE)
- une vanne à membrane motorisée type 968 (GEMU)
- deux vannes manuelles type 601 (GEMU)
- deux électrovannes type 214 Inox (PLASMO)
- une armoire électrique SPACIAL 3000 (SAREL)

L'ensemble des capteurs du pilote (fermenteur et microfiltre) est relié à un système d'acquisition et de contrôle qui comprend :

- deux cartes d'acquisition RTI 815 logique/numérique et série.
- une station d'acquisition et de pilotage PENTIUM 90, Cube System (ZMI)
- un logiciel d'acquisition et de pilotage sous TESTPOINT (KEITHLEY).

Figure III. 3.3 : Schéma du pilote de fermentation avec recyclage cellulaire.



Autres matériels couplés au pilote

❶ Systèmes sortie perméat :

- balance type F61S (SARTORIUS) couplée à l'acquisition pour mesure du débit *
- conductimètre LF 96 TETRACON (WTW) *
- pompe minipuls2 à 4 voies (GILSON)
- arrivée d'air 4 à 6 bars pour système de « back-flush » (AIR LIQUIDE) **

❷ Systèmes pour l'alimentation et le soutirage fermenteur :

- pompe alimentation substrat type 201U (WATSON-MARLOW) **
- pompe pour soutirage purge type Minipuls2 (GILSON)
- pompe pour alimentation anti-mousse type Minipuls2 (GILSON)
- pompe avec sonde à niveau (sécurité soutirage) type 501U (WATSON-MARLOW)
- pompe alimentation base régulation du pH type MSO 1 (CHEMAP)**
- agitateur pour milieu d'alimentation Ikamag Ret (IKA)
- balance type 1564 001 (SARTORIUS) mesure débit alimentation base.*

* acquisition automatique des mesures de l'appareil

** acquisition automatique des mesures et pilotage de l'appareil

3.2. Protocole des cultures en mode discontinu

Ce type d'expérience est réalisé avec un volume de 1 litre. Le volume de l'inoculum varie de 6 à 10% en fonction de la concentration en cellules dans l'inoculum. Les bactéries sont en phase exponentielle de croissance dans la préculture quand l'ensemencement du réacteur est réalisé. Les conditions de culture initiale ont été fixées à (**Figure III.3.4**):

- pH = 6,0
- Température 50°C
- Agitation faible pour faciliter l'anaérobiose (200 rpm)

La régulation du pH est effectuée par de l'ammoniaque 1 à 5N en fonction de la vitesse d'acidification de la souche et de manière à conserver le volume de fermentation constant. En effet, le volume d'ammoniaque ajouté doit correspondre environ au volume de milieu soutiré pour les dosages. Des échantillons de milieu sont prélevés dans un premier temps toutes les heures puis avec des fréquences de plus en plus faibles jusqu'à la fin de la fermentation qui dure 2 jours au maximum. Pour chaque échantillon, la quantité de biomasse est analysée immédiatement, puis l'échantillon est filtré sur filtre 0,2 µm réf. 16534 K (SARTORIUS). Le dosage de l'acide lactique L(+) est réalisé immédiatement, puis le filtrat est congelé en vue des analyses chimiques ultérieures (**Figure III.3.5**).

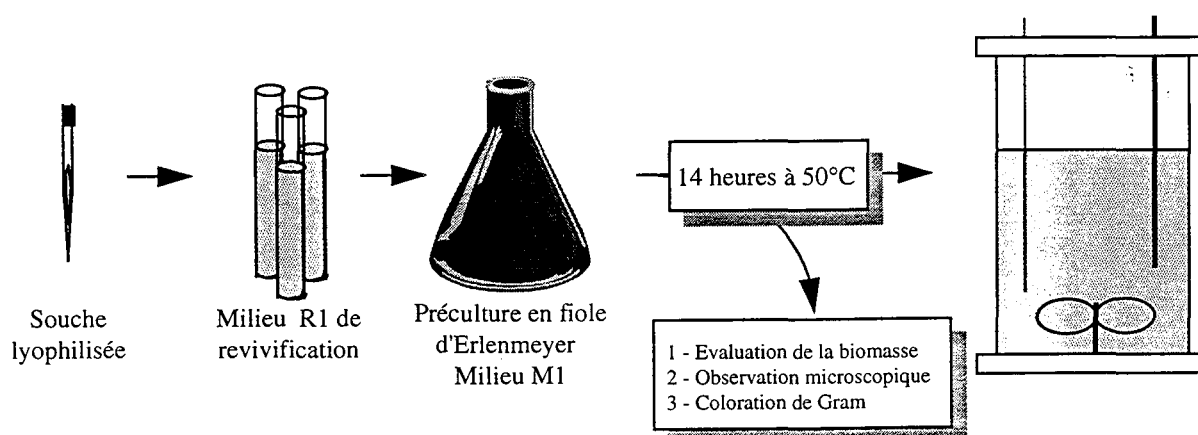


Figure III.3.4 : Protocole de propagation de la souche pour réaliser une culture.

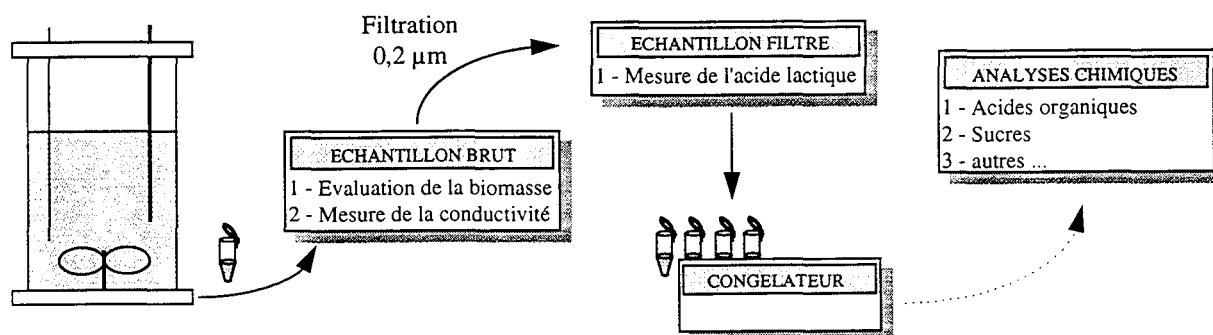


Figure III.3.5 : Protocole d'analyses lors de la réalisation d'une culture.

3.3. Protocole des cultures en mode continu parfaitement agité

La culture en mode continu commence toujours par une phase discontinue. Ceci permet d'augmenter rapidement la concentration en biomasse dans le fermenteur et d'avoir des cellules en phase exponentielle de croissance au début de la culture continue. En plus, de ce qui a été décrit précédemment pour la culture en mode discontinu, un système d'alimentation et de soutirage est mis en marche, le soutirage est réalisé par un tube à niveau plongeant dans le réacteur et relié à une pompe dont le débit est légèrement supérieur au débit de la pompe d'alimentation.

L'état stationnaire est atteint théoriquement après 5 fois le temps de passage, ou $5. \tau = \frac{5}{D}$

τ = temps de passage , D = taux de dilution

Les cultures en mode continu à l'état stationnaire sont adaptées pour tester les effets d'un paramètre sur la cinétique de la fermentation. Deux méthodes sont connues :

❶ L'impulsion, qui consiste à rajouter la molécule directement dans le fermenteur à l'état stationnaire et de suivre les effets pendant tout l'état transitoire qui suit, jusqu'au retour à l'équilibre initial (**Figure III.3.6**).

❷ L'échelon, qui consiste à ajouter la molécule dans le milieu d'alimentation, de changer sa composition ou de changer tout autre paramètre de la fermentation. Il s'en suit un passage progressif de l'état initial vers un nouvel état stationnaire.

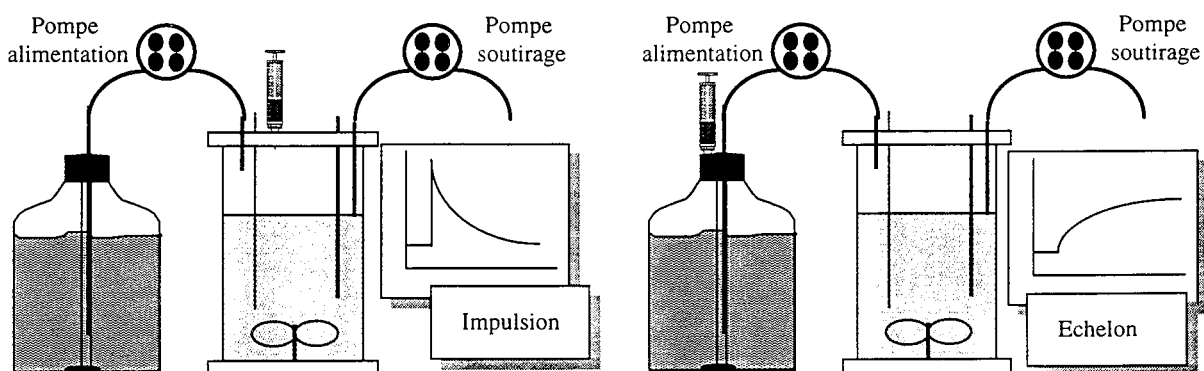


Figure III.3.6 : Schéma des techniques d'impulsions et d'échelons, évolution de la concentration de la molécule ajoutée dans le fermenteur.

Le fermenteur est stérilisé à l'autoclave selon des méthodes identiques à celles des milieux de culture, décrites plus haut.

3.4. Protocole des cultures continues avec recyclage cellulaire

Pour le continu simple, la fermentation démarrera par une phase discontinue. De plus une étape de préculture supplémentaire sera nécessaire compte tenu du volume utile du pilote. Cette étape est réalisée dans un fermenteur SGI de 2 litres qui sert alors de préculture. La souche est ensemencée dans le pilote quand les cellules sont en phase exponentielle de croissance (**Figure III. 3.7**).

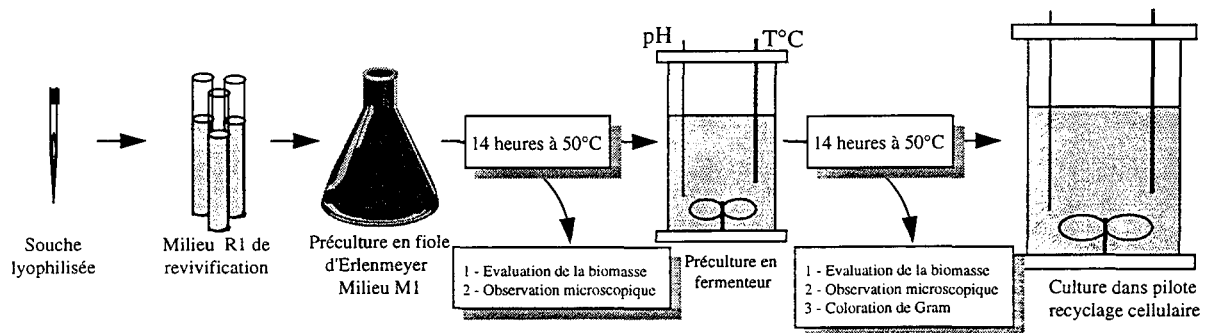


Figure III. 3.7 : Protocole de réalisation d'une fermentation avec recyclage cellulaire.

L'optimisation de ce protocole sera réalisée ultérieurement.

3.4.1. Stérilisation du pilote d'ultrafermentation

Un protocole classique de stérilisation à l'autoclave est impossible sur une telle installation. Une stérilisation à la vapeur directe semblait techniquement difficile et délicate d'un point de vue sécurité. C'est la stérilisation par voie chimique qui a été choisie par le biais de deux produits complémentaires utilisés séquentiellement :

- DIVOS 122 (DIVERSEY) : produit nettoyant, désagréant et décolmatant des membranes céramiques.

- DIVOSAN MEZZO (DIVERSEY) : produit stérilisant

Protocole :

- pré-lavage avec DIVOS 122 à 1% une demi-heure à 30°C
- rinçage 1 fois à l'eau du réseau
- lavage avec DIVOS 122 à 2% une heure à 60°C
- rinçage 3 fois à l'eau du réseau et contrôle du pH
- stérilisation à froid avec DIVOSAN MEZZO à 1,5% (1heure)
- rinçage 5 fois à l'eau pure et contrôle du pH.

4. METHODES ANALYTIQUES

4.1. Estimation de la biomasse

4.1.1. Numération sur cellule de Thoma

Une cellule de Thoma est une lame sur laquelle sont gravées des lignes délimitant des carreaux de surface connue ($0,0025 \text{ mm}^2$) au dessus de laquelle est placée une lamelle à une hauteur fixée (0,1 mm). Un échantillon dilué du milieu de culture est placé entre lame et lamelle. Les cellules sont comptées au microscope avec un grossissement de 400 fois. Le nombre de cellules est rapporté au volume soit (surface des carreaux x hauteur). Une étude de plusieurs champs est nécessaire, ainsi qu'une étude statistique des résultats.

Etude de l'erreur sur la numération :

Un échantillon dilué 10 000 fois placé sur cellule de Thoma :

TEST	Série de mesure 1	Série de mesure 2
Champs n°1	34	34
	32	37
	25	28
	38	33
Champs n°2	39	38
	35	33
	28	36
	22	22
Champs n°3	30	39
	23	29
	33	32
	34	28
Moyenne	31	32
Déviat ion standard	5,5	5
Erreur pure (%)	18	16

➔ *La précision de la numération sur cellule de Thoma est de 17%*

4.1.2. Evaluation par densité optique

La biomasse a été évaluée à partir de la lecture de la Densité Optique (D.O.) sur un spectrophotomètre NOVASPEC II (LKB) à une longueur d'onde de 570 nm réalisé après balayage à toutes les longueurs d'onde de l'appareil. Le protocole de détermination de la courbe D.O. en fonction du Poids Sec (P.S.) et du choix de la longueur d'onde est résumé sur la **Figure III.4.1.**

Une étude de la densité optique en fonction de l'état cellulaire a été entreprise. 3 échantillons cellulaires ont été prélevés lors d'une fermentation en discontinu à 3 temps différents (Figure III.4.2):

- ❶ en début de phase exponentielle de croissance (X1) : les cellules sont en chaînettes de 5 à 10 cellules.
- ❷ en fin de phase exponentielle de croissance (X2) : mélange de chaînettes et de bactéries individualisées gram positive et gram négative.
- ❸ en phase de décès cellulaire (X3) : cellules individualisées avec un rapport croissant de gram négative.

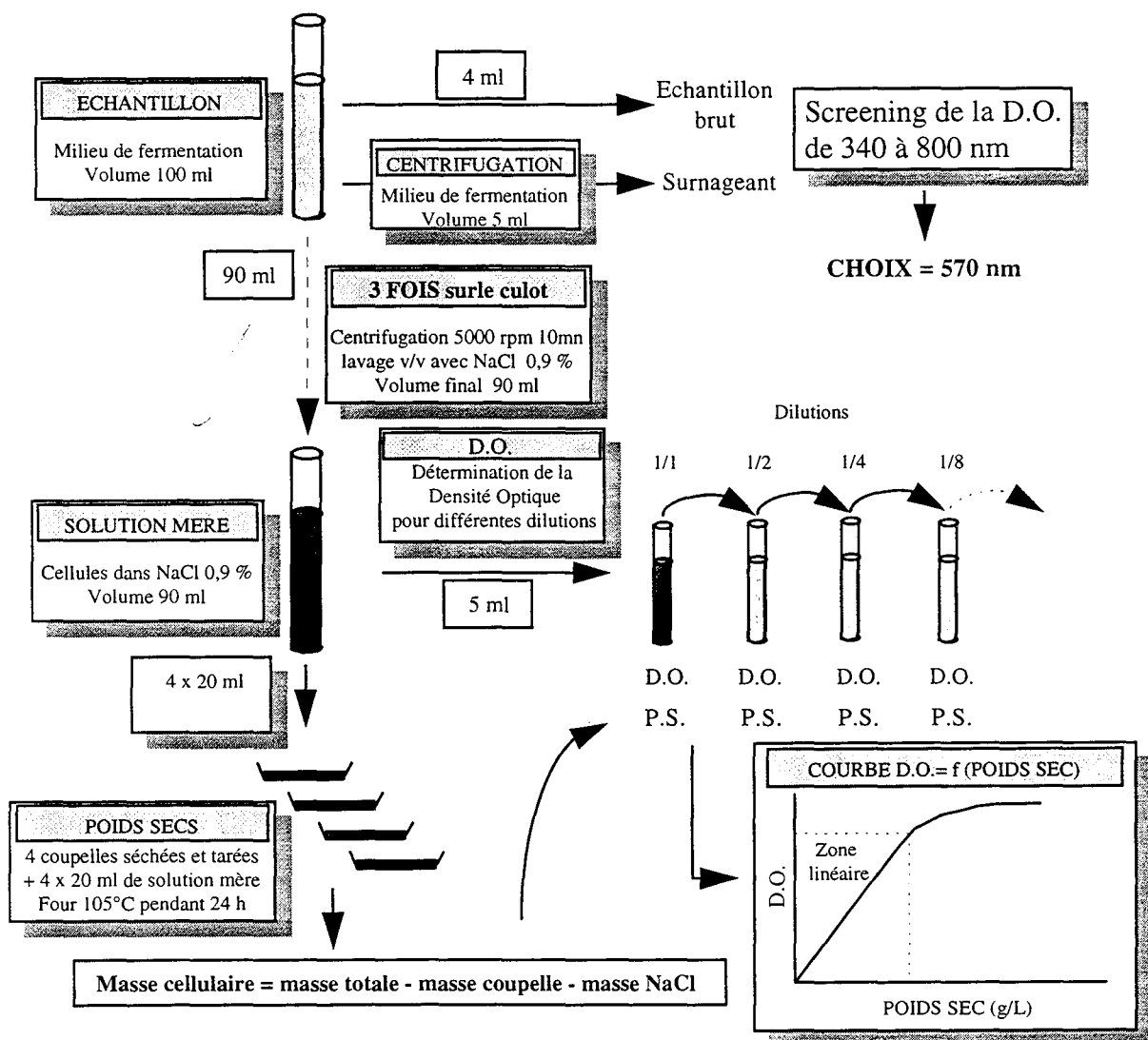


Figure III.4.1 : Protocole de réalisation de la courbe D.O. = f (Poids sec).

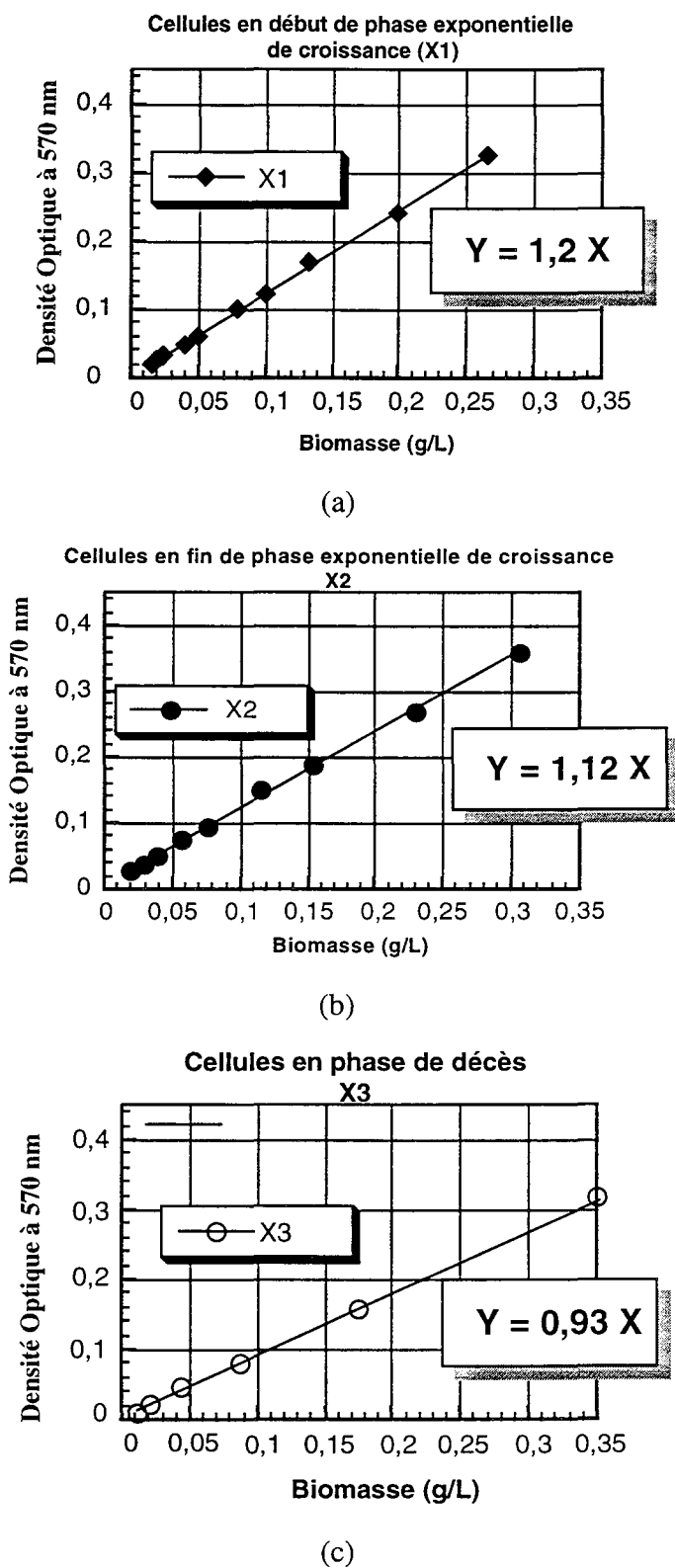


Figure III.4.2 : Courbes Densité Optique en fonction du Poids Sec de cellules.

Pour 3 états physiologiques différents :

- X1 : cellules en début de phase exponentielle de croissance.
- X2 : cellules en fin de phase exponentielle de croissance.
- X3 : cellules en phase de décès.

La corrélation entre la Densité Optique (D.O.) et la concentration en biomasse (g/L) est linéaire jusqu'à une valeur de 0,3 unité de D.O., au delà, il est indispensable de diluer les échantillons.

L'état physiologique et morphologique des cellules a une influence significative sur la corrélation entre D.O. et la concentration en biomasse. Plus les cellules sont âgées, individualisées et gram négative et plus elles absorbent à 570 nm. La précision est de 5%.

Cellules X1 : D.O. = 1,20 [biomasse] $R^2 = 0,999$

Cellules X2 : D.O. = 1,12 [biomasse] $R^2 = 0,998$

Cellules X3 : D.O. = 0,93 [biomasse] $R^2 = 0,999$

Pour faciliter les mesures de concentration en biomasse, sachant que nous allons travailler dans des conditions continues avec recyclage cellulaire où la perte de précision due aux dilutions successives est importante, la relation devient simplement (à 570 nm):

Concentration en biomasse (g/L) = 1,1 x (D.O.milieu - D.O. milieu sans cellules) x dilution
--

Etude de l'erreur de dosage de la biomasse :

Environ 10 g/L de cellules sont dosées par évaluation de la densité optique.

La dilution est au 40ième, la mesure est réalisée 5 fois pour chaque dilution et par deux manipulateurs (mani1 et mani2):

mani1					mani2					Moy.	Ecart.
10,3	11,9	10	11,9	10,3	9,8	9,2	10,2	11,3	9,2	10,41	0,987

La différence entre les deux manipulateurs est significative, l'erreur due au manipulateur et à la réalisation de la dilution est importante.

Pour les mesures de concentration en biomasse, l'essai sera répété systématiquement 3 fois.

➔ *La précision du dosage par spectrophotométrie est de 10 %*

4.2. Estimation de la concentration en acide lactique

4.2.1. Dosage par kit enzymatique

Deux kits commercialisés par BOEHRINGER (Mannheim) ont été utilisés pour le dosage du L(+)lactate et du DL lactate.

- kit L-lactic acid réf. 139084.

- kit D-L lactic acid réf. 1 112821

La souche ne produisant à 99% que de l'acide L(+) lactique, le premier kit a été utilisé couramment, alors que le second a été utilisé dans des cas particuliers.

Le principe de ces kits est l'oxydation de l'acide lactique en pyruvate en présence de NAD^+ et de la lactate deshydrogénase (L ou D-LDH).



En présence de L-glutamate, le pyruvate est transformé en L-alanine grâce à la glutamate pyruvate-transaminase (GPT), ceci afin d'éviter la reformation d'acide lactique. La formation de NADH est mesurée par absorbance à 340 ou 365 nm et la quantité de NADH mesurée est proportionnelle à la quantité d'acide lactique de départ.

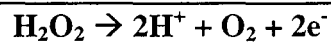
➔ Une étude de la précision des dosages a donné une erreur globale de 6% (acide L(+) lactique à 20 g/L, échantillon répété 10 fois) sur kit acide L(+) lactique.

4.2.2. Dosage automatique par la lactate oxydase

La technique de dosage est fondée sur le principe des membranes à enzymes immobilisées. La lactate oxydase est fixée sur une membrane contre une anode de platine : analyseur Yellow Spring Instrument 2000 (dosage directe entre 0,2 et 2 g/L d'acide lactique). L'échantillon préalablement séparé des bactéries, est pompé puis diffusé à la surface de la membrane. L'acide L(+) lactique entrant en contact avec la L(+) lactate oxydase est oxydé en peroxyde d'hydrogène et pyruvate:



Le peroxyde d'hydrogène est à son tour oxydé électrochimiquement par une anode de platine, libérant des électrons:



La quantité d'électrons produite est directement proportionnelle à la quantité d'acide L(+) lactique présente dans l'échantillon. Uniquement la forme L(+) de l'acide lactique est dosé compte tenu de la spécificité de la L-lactate oxydase pour son substrat.

➔ L'erreur globale de dosage est également de 6% (10 échantillons à 20 g/L d'acide L(+) lactique).

4.2.3. Dosage du lactate d'ammonium par conductivité

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Biotechnology Techniques* **11,1** pp 2-6 (voir **annexe III**).

Le lactate d'ammonium contenu dans un milieu de culture peut être dosé par conductivité. Il existe une relation linéaire entre conductivité et concentration en lactate d'ammonium. Ce dosage est d'une précision d'environ 10% sous certaines conditions :

- ❶ concentration en acide lactique > 10 g/L
- ❷ souche homofermentaire ne produisant que de l'acide lactique
- ❸ fermentation régulée en pH par de l'ammoniaque
- ❹ composition du milieu initial standardisé, type milieu M1.

4.3. Dosage des sucres et des autres acides organiques

Les sucres de la fermentation (saccharose, glucose, fructose) et les autres molécules tels que, acide pyruvique, formique, acétique et éthanol, sont tous dosés par Chromatographie Liquide de Haute Performance (CLHP) (WATERS). Le dosage des sucres et des acides est réalisé en une seule injection d'un échantillon filtré sur membrane. La séparation des différents composés est effectuée au sein de la colonne polypore H par un mécanisme mixte d'exclusion et d'échange d'ions. En sortie de colonne, deux détecteurs placés en série permettent le suivi des différents composés (réfractomètre différentiel pour le saccharose, spectrophotomètre UV à 210 nm pour les acides organiques). Les signaux issus des deux détecteurs sont reçus par une station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma (BIOSYSTEMS). Ce dosage est réalisé hors ligne avec un passeur automatique d'échantillons.

Les paramètres utilisés sont les suivants :

volume injecté : 10 µl	température du four : 65°C
éluant : H ₂ SO ₄ , 0,04 N	débit de la pompe : 0,9 ml/mn

Chromatographe liquide haute performance M.6000 A (Waters, Milford, E.U.A.)

- Réfractomètre différentiel R.410
- Spectrophotomètre Lambda-Max 481
- Injecteur automatique WISP
- Four pour colonne CLHP
- Pompe Spectraphysics P 1000 (TSP)
- Colonne Polypore H (PPH - 257) (Brownlee Lab)
- Station d'acquisition et de traitement des données équipée du logiciel Chroma (Biosystèmes)

L'étalonnage est réalisé avec une gamme de solutions aqueuses des acides purs et d'un mélange saccharose-glucose-fructose. La durée totale d'une analyse complète est voisine de 20 mn. La réponse est linéaire de 0 à 50 g/l pour le saccharose, glucose, fructose, l'acide lactique, et l'acide acétique, et, de 0 à 5 g/l pour l'acide pyruvique et l'acide formique.

➔ *l'étude des dosages CLHP a montrée une bonne précision d'analyse pour toutes les molécules entre 6 et 9%. Cependant, l'échantillon réalisé à partir de jus vert de betterave, et qui contient 78% de saccharose, a une précision de seulement 15%. (répété 10 fois)*

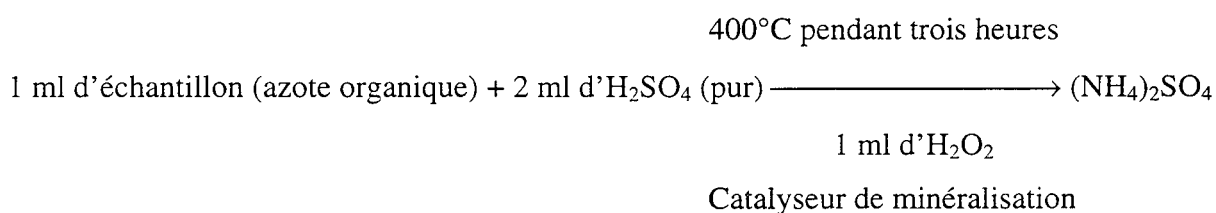
4.4. Dosage de l'azote total

L'azote total a été dosé grâce à la méthode de KJELDAHL. Ce dosage s'effectue en deux étapes. 3 ml d'échantillon sont nécessaires au minimum.

❶ Première étape : la minéralisation :

Dans cette étape l'ensemble de l'azote organique est transformé en azote minéral sous forme ammoniacal $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Ceci se fait par l'action oxydative de l'acide sulfurique bouillant sur la matière organique en présence d'un catalyseur et la réduction de l'azote organique en ammoniacque.

La minéralisation est une étape importante. Une attaque défectueuse peut entraîner des erreurs sur les résultats. Il est nécessaire d'apporter un soin particulier à cette phase du dosage. C'est pour cela que chaque échantillon sera répété trois fois, de la façon suivante :



Rq : Le peroxyde d'hydrogène sert à éviter la mousse.

De même, trois blancs sont réalisés (tubes ne contenant pas d'azote).

❷ La deuxième étape est le dosage :

L'ammoniacque du digestat est déplacé par une base forte (NaOH) que l'on ajoute en excès. Au cours de la distillation, il est entraîné par la vapeur et peut être titré en présence d'un réactif coloré soit en retour soit directement par récupération dans l'acide borique. Cette partie a été effectuée avec un doseur d'azote Kjeldahl automatique. Seule la partie

minéralisation reste manuelle. Grâce à cet appareil, on relève la quantité d'acide utilisée qui nous permet d'évaluer la concentration en azote total contenue dans les échantillons dosés. Lorsque l'on utilise de l' H_2SO_4 (N/100), on obtient la concentration d'azote en gramme par litre, par la formule suivante :

$$[\text{N}_{\text{tot.}}] = (\text{échantillon} - \text{blanc}) * 0.14 * \text{dilution}$$

A partir de ce dosage on peut approcher approximativement la concentration en protéines (g/l):

$$[\text{protéine}] = [\text{N}_{\text{tot.}}] * 6.25$$

5. LES EXTRAITS CELLULAIRES

En fin de procédé de production d'acide lactique, il existe une quantité importante de biomasse à retraiter. L'idée est de réutiliser cette biomasse comme extrait azoté pour substituer la totalité ou une partie des coûteux extraits de levures utilisés normalement. La réalisation de ces extraits azotés est proposée lors de cette étude. La base du travail a été réalisé à partir des travaux de quelques auteurs (Harrison et al., 1991, Kula, 1987, Schütte et al., 1983). Deux opérations sont généralement nécessaires à la réalisation de ces extraits : une lyse chimique ou autolyse et un traitement mécanique.

En fonction du protocole choisi, différents extraits ont pu être réalisés.

5.1. Le protocole

Deux cents grammes de culot de cellules ont été utilisés pour obtenir les quatre extraits cellulaires. Cent grammes ont subi une hydrolyse alcaline puis un passage dans le broyeur à bille et les autres cent grammes ont subi une hydrolyse acide avant le passage en broyeur à bille.

Le protocole est décrit en **annexe IV**

5.2. Les hydrolyses

Dans la littérature on trouve souvent un traitement chimique en pré-traitement d'un traitement physique. Deux types d'hydrolyses ont été utilisés en tant que pré-traitement du broyage mécanique : l'hydrolyse acide et alcaline.

L'hydrolyse acide : 100 g de bactéries + 100 ml d' H_2SO_4 6N (pH<1).

L'hydrolyse alcaline : 100 g de bactéries + 100 ml d' H_2O osmosée + 1.8 g de Na_2CO_3 (pH=10.5).

Ces solutions préparées en Erlenmeyer de 500 ml, fermées avec coton et papier aluminium, sont autoclavées à 100°C pendant 1h30.

5.3. Le broyage

Le broyage cellulaire est effectué avec un petit broyeur à billes de laboratoire qui dispose d'une chambre de broyage horizontale dans laquelle va être mis en agitation un flacon de verre, qui contient 10 ml d'hydrolysate cellulaire, 10 ml d'eau osmosée et 10 grammes de billes de verre d'un diamètre de 0.1 mm. Cette agitation va permettre aux billes de verre de désintégrer les bactéries. Le refroidissement de la chambre de broyage est effectué grâce à une bouteille de CO₂. Le broyage des cellules est effectué par l'alternance de cycles de broyages et de cycles de repos (30 secondes de broyage - 30 secondes d'arrêt ...etc...) pendant une durée totale de cinq minutes.

5.4. Séparation - neutralisation

Une fois le broyage effectué, il faut séparer la fraction soluble des insolubles et des billes de verre. Cette séparation a été effectuée par centrifugation à 10000 RPM pendant 10 minutes. D'autre part, les extraits bruts acides et alcalins seront neutralisés à pH 6.4 avant ou après centrifugation (surnageant). Pour les extraits bruts alcalins, la neutralisation est effectuée avec de l'acide sulfurique pur 36 N, tandis que pour les extraits bruts acides, elle est effectuée grâce à de l'ammoniaque 16 N à 32 % de pureté.

5.5. L'atomisation

Enfin, les extraits cellulaires obtenus vont être atomisés afin d'obtenir une poudre que l'on pourra conserver et utiliser comme de l'extrait de levure.

Le principe de l'atomisation : les extraits cellulaires liquides sont aspirés au moyen d'une pompe (250 ml/h) puis vaporisés dans une chambre en verre thermostatée à 100°C. Cette vaporisation est effectuée grâce à un débit d'air comprimé (5 bars) de 600 l/h. Dans cette chambre, la partie liquide est évaporée (la vapeur est évacuée grâce à un aspirateur); seule la fraction solide des extraits retombe dans un récipient en verre amovible.

6. INTERPRETATIONS DES DONNEES

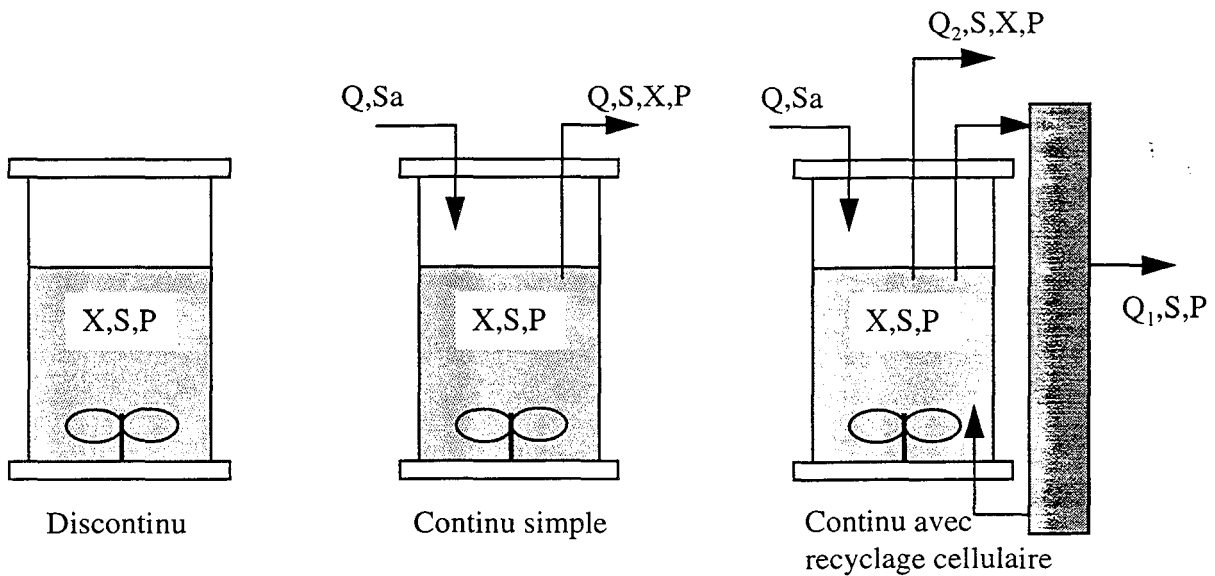


Figure III.6.1 : Schéma des bilans matières sur les 3 modes de fonctionnement utilisés

6.1. Réacteur discontinu

6.1.1. Vitesses de réaction

A partir des courbes de croissance ($X=f(t)$), d'accumulation de produit ($P=f(t)$) et d'assimilation du produit ($S=f(t)$), il est possible de calculer les différentes vitesses instantanées en déterminant les dérivés par rapport au temps (Figure III.6.1).

Les équations bilans donnent :

pour la biomasse :

$$r_X''' = \frac{dX}{dt}$$

pour le produit :

$$r_P''' = \frac{dP}{dt}$$

pour le substrat :

$$r_S''' = \frac{dS}{dt}$$

avec r_X''' vitesse de croissance ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
 r_P''' vitesse d'accumulation d'acide lactique ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
 r_S''' vitesse de consommation de saccharose ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

6.1.2. Vitesses spécifiques

Les vitesses spécifiques permettent d'évaluer les performances de 1 gramme de bactéries.

La vitesse spécifique de croissance μ est donnée par :

$$\mu = \frac{r_X''''}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

La vitesse spécifique de production d'acide lactique est donnée par :

$$\Pi_P = \frac{r_P''''}{X} = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

La vitesse spécifique de consommation de saccharose est donnée par :

$$q_S = \frac{r_S''''}{X} = -\frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt}$$

avec μ vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
 Π_P vitesse spécifique d'accumulation d'acide lactique ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 q_S vitesse spécifique de consommation de saccharose ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

6.1.3. Rendements

Rendements globaux

ils sont calculés par :

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S}$$

avec $Y_{X/S}$ rendement apparent de production de biomasse à partir du saccharose ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
 $Y_{P/S}$ rendement apparent de production d'acide lactique à partir du saccharose ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Rendement de bioconversion du saccharose en acide lactique

il est calculé par :

$$Y_{P/S_0} = \frac{P - P_0}{S_0}$$

avec Y_{P/S_0} rendement de bioconversion ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

6.1.4. Productivités

Productivité volumétrique : c'est la quantité de produit (acide lactique) par unité de temps et de volume du fermenteur.

$$\delta = \frac{P - P_0}{V} \cdot \frac{1}{d}$$

avec δ productivité volumétrique ($\text{g} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) d durée de la fermentation (h)

Productivité spécifique : c'est la quantité de produit (acide lactique) par unité de temps, de volume du fermenteur et par gramme par litre de bactéries.

$$\Delta = \frac{P - P_0}{X} \cdot \frac{1}{d}$$

avec Δ productivité spécifique ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 d durée de la fermentation (h)

6.2. Réacteur continu simple

6.2.1. Vitesses d'évolution des différents composés

A partir du bilan matière sur la biomasse (**Figure III.6.1**):

alimentation + réaction = soutirage + variation interne

$$0 + V \cdot r_X''' = Q \cdot X + V \cdot \frac{dX}{dt}$$

Le taux de dilution est donné par $D = \frac{Q}{V}$, donc

$$r_X''' = D \cdot X + \frac{dX}{dt}$$

Pour le substrat, le même raisonnement donne :

$$r_S''' = D \cdot (S_a - S) - \frac{dS}{dt}$$

Pour l'acide lactique :

$$r_P''' = D \cdot P + \frac{dP}{dt}$$

6.2.2. Vitesses spécifiques et rendements

Les cultures en mode continu permettent de contrôler directement la vitesse spécifique de croissance de la biomasse par le réglage du débit d'alimentation. En effet, la définition du taux de croissance est donné par :

$\mu = \frac{r_X'''}{X}$ donc, d'après l'expression de r_X''' à l'état stationnaire,

$$\mu = D$$

de même, à l'état stationnaire, pour le saccharose et l'acide lactique :

$$\sigma = \frac{D(S_a - S)}{X} \qquad \pi = \frac{DP}{X}$$

avec	μ	vitesse spécifique de croissance (h^{-1})
	π	vitesse spécifique d'accumulation d'acide lactique ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)
	σ	vitesse spécifique de consommation de saccharose ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)

A l'état stationnaire les rendements globaux de bioconversions sont donnés par :

$$Y_{X/S} = \frac{X}{S_a - S} \qquad Y_{P/S} = \frac{P}{S_a - S}$$

avec	$Y_{X/S}$	rendement apparent de production de biomasse à partir du saccharose ($g \cdot g^{-1}$)
	$Y_{P/S}$	rendement apparent de production d'acide lactique à partir du saccharose ($g \cdot g^{-1}$)

6.2.3. Détermination du taux de dilution critique

Le lessivage du réacteur correspond à un taux de dilution imposé supérieur aux taux de croissance des bactéries. Le taux de dilution est calculé comme suit, dans le cas d'une loi de MONOD simple (des constantes d'inhibition ou autres peuvent éventuellement être ajoutées) :

$$D_c = \mu_{\max} \cdot \frac{S_a}{K_s + S_a}$$

avec	D_c	taux de dilution critique (h^{-1})
	K_s	constante de Monod relative au substrat

K_s étant supérieur à zéro, μ_{\max} sera légèrement supérieur à D_c . Dans cette étude μ_{\max} étant assimilé à D_c , le bilan devient :

$$0 + V \cdot \mu_{\max} X = Q \cdot X + V \cdot \frac{dX}{dt}$$

Comme il s'agit d'un état transitoire, $\ln X = \ln X_0 + (\mu_{\max} - D) t$

d'où le graphe $\ln X = f(t)$ lors de la phase de lessivage donnera le μ_{\max}

6.2.4. Productivités

Productivité volumétrique : c'est la quantité de produit (acide lactique) par unité de temps et de volume du fermenteur. D'où en réacteur continu :

$$\delta = \frac{P}{V} \cdot D$$

avec	δ	productivité volumétrique ($g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$)
	D	taux de dilution (h^{-1})

Productivité spécifique : c'est la quantité de produit (acide lactique) par unité de temps, de volume du fermenteur et par gramme par litre de bactéries.

$$\Delta = \frac{P}{X} \cdot D$$

avec Δ productivité spécifique ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 D taux de dilution (h^{-1})

6.3. Réacteur continu avec recyclage cellulaire

6.3.1. Réalisation des bilans matières

Les débits : $Q = Q_1 + Q_2$ et $Q_1 > Q_2$

Pour la biomasse le bilan devient (Figure III.6.1):

$$0 + V \cdot r_X''' = Q_2 \cdot X + V \cdot \frac{dX}{dt}$$

avec Q_2 le débit de purge ($\text{l} \cdot \text{h}^{-1}$)

Pour le bilan en substrat c'est le même qu'en continu simple :

$$QS_a - V \cdot r_S''' = Q \cdot S + V \cdot \frac{dS}{dt}$$

De même pour l'acide lactique produit :

$$0 + V \cdot r_P''' = Q \cdot P + V \cdot \frac{dP}{dt}$$

Pour le réacteur en continu avec recyclage cellulaire, il y a découplage entre production de biomasse et de produit :

$$r_X''' = \frac{Q_2}{V} \cdot X + \frac{dX}{dt} \qquad r_P''' = D \cdot P + \frac{dP}{dt}$$

avec Q_2/V taux de purge (h^{-1})
 D taux de dilution (h^{-1})

Les vitesses spécifiques et les rendements se calculent de la même façon qu'en réacteur continu simple. Si l'acide lactique qui est dans la purge ne peut pas être récupéré pour la production, l'expression de la productivité volumétrique devient :

$$\delta = \frac{P - P_0}{V} \cdot \frac{Q_1}{V}$$

avec δ productivité volumétrique ($\text{g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
 Q_1 débit de perméat (l.h^{-1})

6.4. Paramètre industriel.

Un critère intéressant du point de vue industriel est la capacité spécifique de production d'acide lactique par un micro-organisme à l'état d'équilibre : ψ (g.g^{-1})

$$\psi = \frac{\overline{P}_{la} \cdot D_1 \cdot d}{\overline{X} \cdot D_2 \cdot d + \overline{X}}$$

\overline{P}_{la} = Concentration moyenne en acide lactique (g/L)

D_1 = Taux de dilution (h^{-1})

D_2 = Taux de purge (h^{-1})

d = Durée de la phase de production (h)

\overline{X} = Concentration moyenne en biomasse (poids sec) (g/L)

➡ Pour un procédé de production fonctionnant plus de 100 heures à l'état d'équilibre, la meilleure capacité spécifique de production a été déterminée pour Tejayadi et Cheryan, 1995 à 70 g.g^{-1} .

7. TRAITEMENT INFORMATIQUE ET MODELISATION

L'acquisition des données et les calculs ont été réalisés sur :

- PENTIUM 90Mhz Cube System (ZMI)
- 486 DX2 50 Mhz Kenitec (PCW)

Le traitement de la modélisation et la simulation ont été réalisés sur un :

- PENTIUM MMX 200 Mhz Highscreen (VOBIS)

Les logiciels utilisés pour la réalisation de ce travail sont :

- Word 6.0 de Microsoft® Office (traitement de texte)
- Excel 5.0 de Microsoft® Office (traitements et calculs)
- Power Point 4.0 de Microsoft® Office (dessins)
- Origin 3.5 de Microcal Software© (traitement graphique)
- Kaleidagraph 3.08 de Synergy Software© (traitement graphique)
- End Note 2.2 de Niles & Associates© (base de donnée publications)
- Statgraphics 2.0 de Statistical Graphics© (conception et traitement statistique

des plans d'expériences).

- Test Point 2.0 de Keithley® (logiciel d'acquisition et commande du pilote)
- Matlab 4.0 (programmation de la modélisation et simulation) The mathworks

inc.© avec les modules Simulink® et toolbox®.

7.1. Traitement cinétique

Le traitement des valeurs, notamment en fermentation, pour le lissage des courbes et la détermination des différents paramètres cinétiques, a été réalisé selon la méthode des moyennes glissantes. Un polynôme de degré 2 est calculé sur une fenêtre de 5 points minimum. C'est le cas pour les logiciels Origin© et Kaleidagraph©. Les calculs des vitesses, rendements et productivités sont réalisés selon cette méthode.

7.2. Réalisation et traitement des plans d'expériences

Deux types de plans ont été réalisés lors de ce travail :

- plans factoriels fractionnaires à deux niveaux. (Goupy, 1990), pour l'évaluation des effets de différents paramètres.

- plans d'expériences multi-niveaux et multi-critères (Montgomery, 1996), pour évaluer les effets des paramètres et de leurs interactions sur une ou plusieurs réponses.

Optimisation des conditions d'expérimentation et réalisation d'un modèle polynomial du type :

$$Y = \beta k_0 \sum_{i=1}^4 \beta \cdot k_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^4 \beta k_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta k_{ij} \cdot X_i X_j$$

Y est la réponse; X_i et X_j sont les variables indépendantes; βk_0 , βk_i , βk_{ii} et βk_{ij} sont des constantes.

La construction et le traitement des plans d'expériences ont été réalisés graphiquement et numériquement par le biais des logiciels Memrod© et Statgraphics 2.0 ©.

7.3. Programme d'acquisition et de contrôle du pilote

Le programme contrôlant le pilote d'ultrafermentation a été développé par nos soins directement sous Test Point©. La longueur du programme d'acquisition, de visualisation et de contrôle du pilote, ne nous permet pas de le faire figurer dans ce travail (60 pages), il existe un autre document qui décrit ce programme (**annexe V**).

7.4. Modélisation

Pour la partie fermentation, des essais de modélisation ont été entrepris par l'intermédiaire d'un logiciel de programmation Matlab 4.0 ©. Le programme est décrit en **annexe VI**.

Le modèle a été construit à partir d'une loi simple de Monod, puis affiné au fur et à mesure de l'expérimentation. Le modèle est testé pour les 3 modes de fermentation, discontinu, continu simple et continu avec recyclage cellulaire.

8. APPAREILLAGE ET PRODUITS

- **Microbiologie :**
 - hotte à flux laminaire Platex HPV 7607 (SIBM)
 - étuve bactériologique EBSS (JOUAN)
 - microscope (BH-2) (OLYMPUS)
 - bec bunsen
 - étuve B 5042 (HERAEUS)

- **Milieux :**
 - balance PRECISA (1000-3000D) (SARTORIUS)
 - balance de précision (AE240) (METTLER TOLEDO)*
 - pH-mètre (SGI système RAC)*
 - sonde pH 405 DPASS-SC-K8S/225 (METLER TOLEDO)*
 - autoclave (136X) (SMI)*

- **Centrifugation**
 - centrifugeuse avanti 30 (BECKMAN)
 - centrifugeuse MR 14.11 (JOUAN)

- **Fermenteur :**
 - réacteur préculture (500 ml) (WHEATON)
 - fermenteur de 2 litres avec bloc de régulation (SGI)*
 - fermenteur 7 litres* (CHEMAP)

- **Séchage :**
 - atomiseur Mini Spray Dryeur B-191 (BÜCHI)
 - lyophilisateur FTS RT 209 (FTS SYSTEM INC.)

- **Analyses :**
 - spectrophotomètre 2KB (biochrom Novaspec 4049)*
 - analyseur de glucose et d'acide lactique modèle YSI 2000 (BIOBLOCK)*
 - CLHP : système (MERCK)*
 - doseur automatique de l'azote KJELDAHL (VAPODEST) 4S couplé à un Multi dosimat de type 645.*
 - kits enzymatiques acide lactique (BOEHRINGER)*
Réf : 139084 et 1112821
 - chromatographe ionique DIONEX DX 300 à détection conductimétrique, colonne anionique AS4A-SC
 - integrateur intersmat ICR-1B (SHIMATZU)
 - MULTISKAN MCC/340 et imprimante EPSON LX800
 - sonde conductimétrique LF Tetracon 96 (WTW)*

- **Produits chimiques :**
 - acide folique réf. F7876 (SIGMA)
 - acide nicotinique réf.N0785 (SIGMA)
 - ammoniacque 32% A2825 (LABOSI)
 - ammonium sulfate réf.A4731401 (LABOSI)
 - corn steep en poudre Solulys A réf.624391 (ROQUETTE)
 - cyanocobalamine réf.V2876 (SIGMA)
 - D(+) saccharose réf. A 4885753 (LABOSI)
 - D(+) glucose réf.A4815188 (LABOSI)
 - D(-) fructose réf. 104007 (MERK)
 - D-acide panthoténique réf.3161 (SIGMA)

- Chapitre III -

- D-biotine réf. B4501 (SIGMA)
- diammonium hydrogenophosphate réf.A4729351 (LABOSI)
- dipotassium hydrogene réf. 60355 (FLUKA)
- extrait de levure en poudre réf. 112002 (BIOKAR)
- extrait de levure liquide réf 103022(BIOSPRINGER)
- jus vert de betterave (BRUSSELS BIOTECH)
- L-méthionine réf. 64319 (FLUKA)
- liqueur de corn steep Solulys L réf.624390 (ROQUETTE)
- magnesium sulfate réf.2516336 (PROLABO)
- polypropylene glycol 2000 réf. 81380 (FLUKA)
- potassium dihydrogene réf. 60230 (FLUKA)
- pyridoxine réf. P5669 (SIGMA)
- riboflavine réf. R4500 (SIGMA)
- sodium chlorure réf. A 4890903 (LABOSI)
- thiamine réf. T4625 (SIGMA)
- tryptone réf. 104001 (BIOKAR)

* appareils décrits et détaillés dans ce chapitre.

~ CHAPITRE IV ~

Etude de la souche modèle

- Chapitre IV -
Etude cinétique de la souche modèle

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	107
2. ETUDE MORPHOLOGIQUE DE LA SOUCHE MODELE.....	108
2.1. - OBJECTIFS DE L'ETUDE	108
2.2. - CONDITIONS EXPERIMENTALES	108
2.3. - OBSERVATIONS MACROSCOPIQUES	108
2.4. - OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES	110
2.4.1. - <i>Coloration de Gram</i>	110
2.4.2. - <i>Coloration des spores</i>	110
2.5. - CARACTERISATION DE LA SOUCHE MODELE	112
2.6. - CONCLUSIONS DE L'ETUDE	112
3. ETUDES PHYSIOLOGIQUES ET CINETIQUES.....	113
3.1. - CRITERES DE PERFORMANCES.....	113
3.2. - ETUDE SOMMAIRE DE LA SOUCHE EN CULTURE DISCONTINUE.....	115
3.2.1. - <i>Objectifs</i>	115
3.2.2. - <i>Conditions de fermentation</i>	115
3.2.3. - <i>Résultats de l'expérience (fermentation F1)</i>	115
3.2.4. - <i>Conclusions</i>	116
3.3. - ETUDE SOMMAIRE DE LA TEMPERATURE DE FERMENTATION	117
3.3.1. - <i>Objectifs</i>	117
3.3.2. - <i>Conditions de cultures</i>	117
3.3.3. - <i>Résultats des essais</i>	117
3.3.4. - <i>Conclusions</i>	118
3.4. - ETUDE DU PH DE FERMENTATION	119
3.4.1. - <i>Objectifs</i>	119
3.4.2. - <i>Conditions de fermentation</i>	119
3.4.3. - <i>Résultats des essais</i>	121
3.4.4. - <i>Conclusions</i>	122
3.5. - ETUDE DE LA SOURCE DE CARBONE	123
3.5.1. - <i>Objectifs</i>	123
3.5.2. - <i>Conditions expérimentales</i>	123
3.5.3. - <i>Conclusions sur l'étude des sucres</i>	133
3.6. - ETUDE DES SOURCES D'AZOTE.....	135
3.6.1. - <i>Objectifs</i>	135
3.6.2. - <i>Conditions expérimentales générales</i>	135

3.6.3. Conclusions sur l'étude des sources d'azote.....	161
3.7. - ETUDE D'UNE SUPPLEMENTATION EN SELS.....	163
3.7.1. - Objectifs.....	163
3.7.2. - Conditions expérimentales.....	163
3.7.3. - Résultats des impulsions.....	165
3.7.4. - Conclusions sur l'étude de la supplémentation en sels.....	166
3.8. - ETUDE D'UNE SUPPLEMENTATION EN VITAMINES.....	168
3.8.1. - Objectifs.....	168
3.8.2. - Démarche expérimentale.....	168
3.8.3. - Résultats des impulsions de vitamines.....	169
3.8.4. - Résultats sur l'effet des huit vitamines en culture discontinue.....	173
3.8.5. Conclusion de l'étude sur la supplémentation en vitamines.....	174
3.9. ETUDE SOMMAIRE DE L'EFFET DE L'OXYGENE.....	176
3.9.1. Objectifs.....	176
3.9.2. Démarche expérimentale.....	176
3.9.3. Résultats.....	176
3.9.4. Conclusions de l'étude.....	177
3.10. CONCLUSIONS DES ETUDES PHYSIOLOGIQUES ET CINETIQUES.....	180
4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV.....	182

FIGURES

Figure IV.3.1 : Protocole opératoire des fermentations F2, F3 et F4.....	121
Figure IV. 3.2 : Protocole des fermentations F8 à F11.....	129
Figure IV. 3.3 : Protocole général des impulsions d'extraits azotés en culture continue.....	149
Figure IV. 3.4 : Protocole général des impulsions de sels.....	163
Figure IV. 3.5 : Protocole général des impulsions de vitamines.....	168

TABLEAUX

Tableau IV. 3.1 : Principaux paramètres cinétiques de la fermentation F1.....	116
Tableau IV. 3.2 : Evolution de la concentration maximale en biomasse et du temps de latence en fonction de la température de fermentation.....	117
Tableau IV. 3.3 : Détermination des paramètres cinétiques des fermentation F2 à F4.....	122
Tableau IV. 3.4 : Détermination des paramètres cinétiques des fermentations F5 à F7.....	125
Tableau IV. 3.5 : Bilan carboné des fermentations F5, F6 et F7 (en mmoles de carbone).....	126
Tableau IV. 3.6 : Détermination des paramètres cinétiques des fermentations F8 à F11.....	129
Tableau IV. 3.7 : Effet de l'impulsion de 2 g/L d'extrait de levure.....	137
Tableau IV. 3.8 : Construction du plan d'expérience factoriel fractionnaire à 2 niveaux.....	141
Tableau IV. 3.9 : Tableau des paramètres testés à 2 niveaux.....	141
Tableau IV. 3.10 : Tableau des réponses.....	143

Tableau IV. 3.11 : Valeurs observées et calculées des réponses pour les fermentations.....	144
Tableau IV. 3.12 : Table des effets.	145
Tableau IV. 3.13 : Principales valeurs cinétiques de la fermentation n°31 (F31)	147
Tableau IV. 3.14 : Comparaison de 5 paramètres cinétiques avant et au moment des pics de biomasse et de production d'acide lactique.....	151
Tableau IV. 3.15 : Comparaison de paramètres cinétiques avant et après les impulsions des extraits cellulaires n°1 et 2.....	153
Tableau IV. 3.16 : Contenus azotés des 4 extraits cellulaires comparés aux contenus azotés de l'extrait de levure et du corn steep commercial.(se référer à l'annexe IV).....	154
Tableau IV. 3.17 : Principaux paramètres cinétiques estimés et calculés lors de l'étude comparative de la supplémentation par diverses sources azotées.	159
Tableau IV. 3.18 : Comparaison des performances entre les fermentations F1, F31, F34 et F40	162
Tableau IV. 3.19 : Résumé des principaux résultats sur l'effet des sels.	167
Tableau IV. 3.20 : Comparaison des paramètres cinétiques des fermentations F34, F40, F41 et F42.	174
Tableau IV. 3.21 : Comparaison des concentrations, des rendements et de la productivité entre les deux états stationnaires; sans ajout d'O ₂ et avec ajout d'O ₂	177
Tableau IV. 4.1 : Comparaison des performances entre cultures continues et discontinues sur la souche modèle. Les déviations standards sont précisées lors des études correspondantes.	183
Tableau IV. 4.2 : Résumé des paramètres cinétiques estimés lors de l'étude.....	184

PHOTOGRAPHIES

Photographie n° 1 : <i>Bacillus</i> spp. après coloration de Gram, début de culture sur milieu R1, observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.....	109
Photographie n° 2 : <i>Bacillus</i> spp. après coloration de Gram, fin de phase exponentielle sur milieu de culture R1, observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.	109
Photographie n° 3 : <i>Bacillus</i> spp. après coloration de Gram, culture sur milieu R1 gélosé observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.	111
Photographie n° 4 : <i>Bacillus</i> spp. après coloration au vert de malachite, apparition de spores après une semaine de culture, observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.....	111

1. INTRODUCTION

L'étude bibliographique a montré que les connaissances des souches thermophiles, productrices d'acide lactique et du genre *Bacillus* sont très limitées. Un travail important doit être entrepris pour acquérir des connaissances de base sur notre souche modèle, en vue d'une amélioration de ces performances de production.

Dans un premier temps, une étude morphologique de la souche en milieu liquide et solide va être réalisée afin de caractériser et de décrire le micro-organisme employé. Ces études se feront à un niveau macroscopique et à un niveau microscopique. Des tests biochimiques de routine seront utilisés pour parfaire cette étude.

Ensuite, la partie la plus importante de ce chapitre sera consacrée à l'étude physiologique et cinétique de la souche modèle. Les conditions de culture, paramètres physico-chimiques et composition du milieu vont être passés en revue et étudiés lors de fermentations en mode continu et discontinu. Les techniques d'expérimentations sont : des études comparatives, des impulsions et échelons lors de cultures discontinues et continues à l'état stationnaire et des plans d'expériences.

Ainsi, des expérimentations seront réalisées sur la régulation du pH et de la température de fermentation. La source de carbone, son assimilation et une ébauche des régulations éventuelles, va faire l'objet d'une étude particulière. La nutrition et la détermination des exigences nutritionnelles de notre micro-organisme fait partie des objectifs principaux de ce chapitre : apport de sources azotées, sels et vitamines.

Enfin, une étude spécifique du facteur oxygène sera également entreprise.

Pour chaque expérimentation, nous essayerons de décrire les paramètres cinétiques et leur précision; le plus souvent en alliant graphiques et tableaux.

Les différentes expériences et les résultats obtenus devraient ainsi permettre une amélioration importante des performances de notre souche en culture discontinue et continue simple.

2. ETUDE MORPHOLOGIQUE DE LA SOUCHE MODELE

2.1. - Objectifs de l'étude

- ❶ Description macroscopique de la souche mère BB/ZVHB-02 sur boîtes de Pétri.
- ❷ Description microscopique de cette souche à partir d'une colonie sur gélose et d'un prélèvement sur milieu liquide.
- ❸ Caractérisation de la souche par coloration de Gram.
- ❹ Mise en évidence de la sporulation de la souche modèle.
- ❺ Caractérisation biochimique et morphologique du micro-organisme.

2.2. - Conditions expérimentales

Les expérimentations ont été réalisées sur milieu R1 et R1 gélosé, avec régulation de la température à 50°C et sans régulation de pH, comme décrit dans le **chapitre III**.

Les boîtes sontensemencées à partir de 1 ml de milieu de culture dilué de 10^{-3} à 10^{-9} .

D'autres boîtes sontensemencées en stries à partir d'une öse plongée dans un tube de culture.

Des essais sur boîtes de Pétri ont été réalisés à partir d'un milieu minimum de composition :

Sucrose	20 g/L
Extrait de levure*	01 g/L
Agar-agar	20 g/L

* Sans extrait de levure, la souche ne se développe pas sur boîte de Pétri.

2.3. - Observations macroscopiques

La formation de colonies sur boîtes de Pétri se fait après une trentaine d'heures d'incubation à 50°C. La lecture de la boîte est réalisée 48 heures après ensemencement sur milieu R1 gélosé:

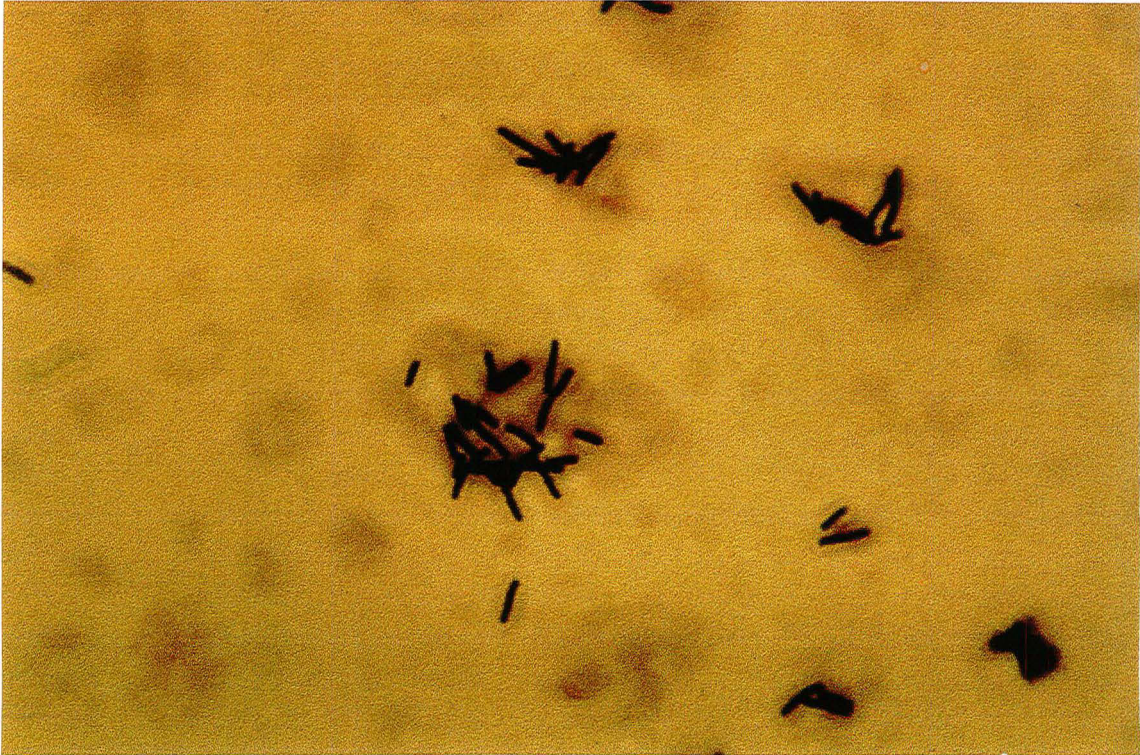
De la dilution 10^{-3} à 10^{-6} : observation d'un film translucide, très légèrement laiteux à blanc

A partir de 10^{-6} : film translucide avec quelques colonies (ufc) individualisées

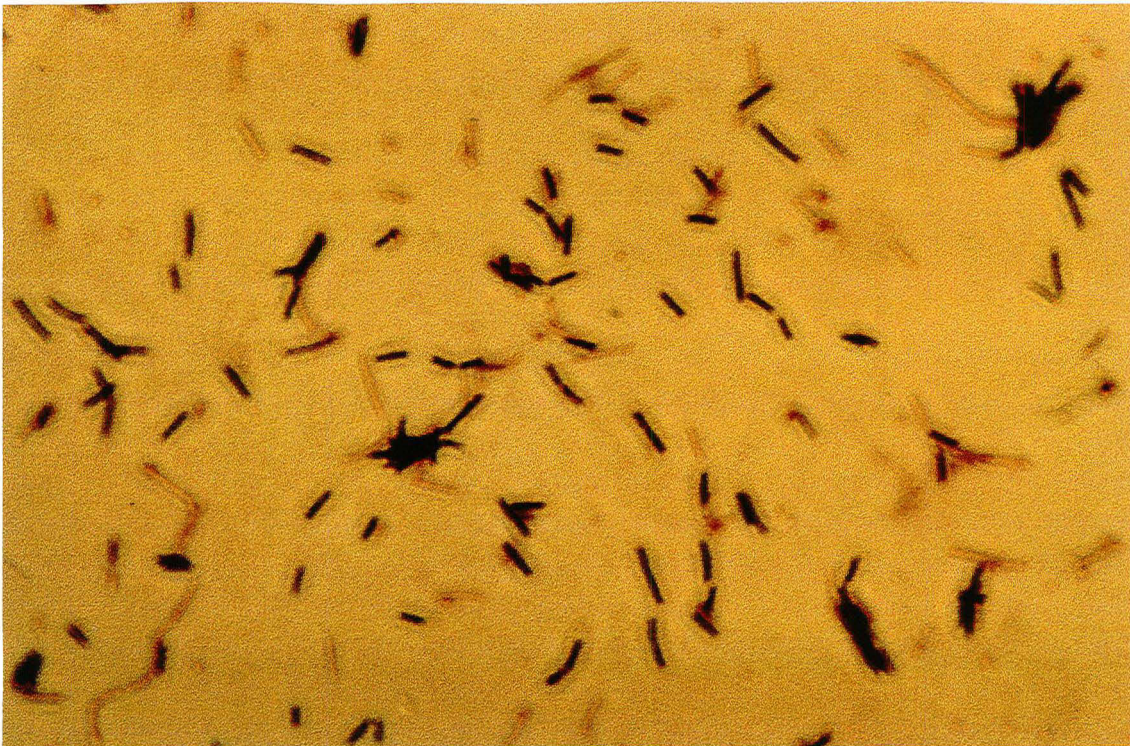
A la dilution 10^{-8} : présence d'une quarantaine d'ufc (unité formant colonie) bien individualisées.

➔ colonies légèrement laiteuses, translucides, plutôt mates et convexes. La taille des colonies est très variable de 1/10 de mm à 2 mm

A la dilution 10^{-9} : 5 ufc sont présentes.



Photographie n° 1 : *Bacillus* spp. après coloration de Gram, début de culture sur milieu R1, observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.



Photographie n° 2 : *Bacillus* spp. après coloration de Gram, fin de phase exponentielle sur milieu de culture R1, observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.

Sur milieu minimum, il n'y a pas de différences morphologiques fondamentales, le nombre de colonies est beaucoup moins important et la taille est souvent plus réduite.

2.4. - Observations microscopiques

Les observations sont faites sur les cellules sans coloration ou après coloration de Gram.

Les spores sont mises en évidence après coloration au vert de malachite.

Sans coloration, les cellules sont difficilement visibles sauf à l'objectif 100X du microscope sous immersion d'huile.

2.4.1. - Coloration de Gram

Pour des cellules issues d'un milieu liquide R1 et après coloration de Gram, les cellules apparaissent Gram positif et sont très facilement visibles sous forme de bâtonnets allongés parfois courbés de 1 à 2 μm de long pour 0,2 à 0,5 μm de diamètre (**Photographie n°1**).

Pour des cellules issues d'une colonie sur milieu gélosé, les cellules sont de coloration Gram positif avec des tailles plus importantes: bâtonnets de 2 à 4 μm de long (**Photographie n°3**).

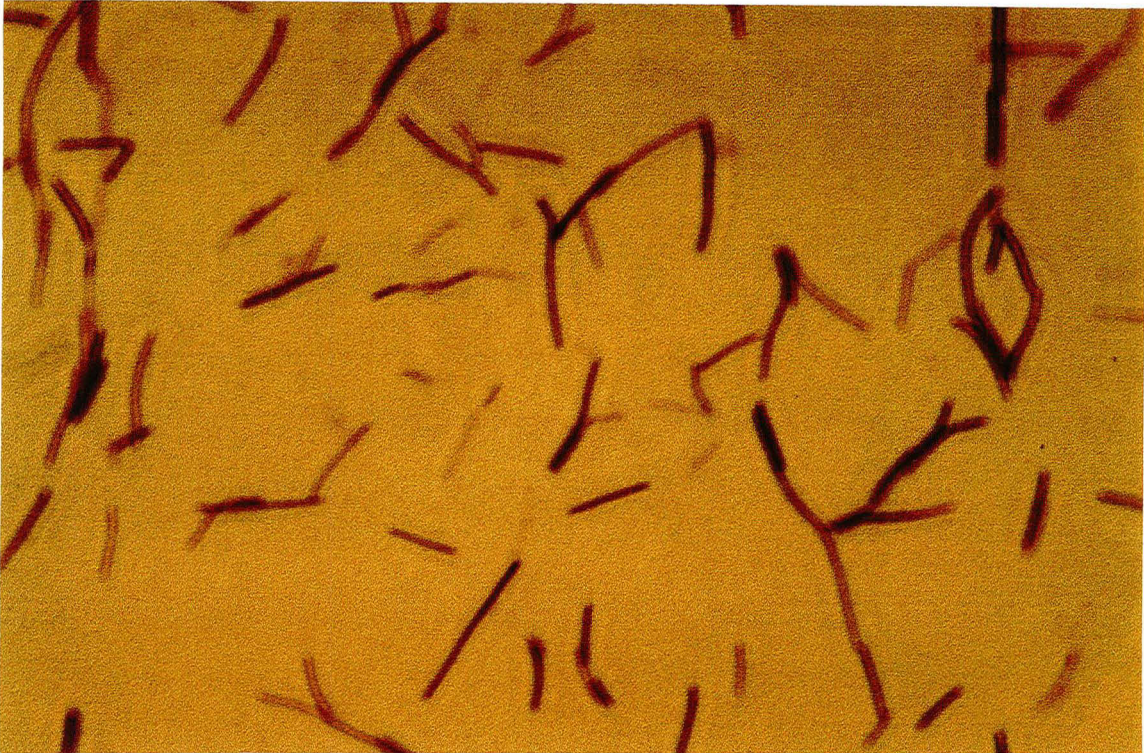
2.4.1.1.- En fermentation sur milieu M1

Un changement de coloration de Gram est souvent observé lors de la fermentation. Les cellules passent progressivement de la coloration Gram positif à Gram négatif. Les cellules sont préalablement toutes Gram positif individualisées, puis en chaînettes de 2 à 10 individus. La proportion de cellules colorées en rose (Gram négatif) augmente (**Photographie n°2**). Il arrive très souvent qu'une même chaînette ait les deux types de coloration. En fin de culture, les deux types de colorations coexistent mais dans des proportions très différentes (environ 99% de Gram négatif). Après avoir réisolé la souche et contrôlé la pureté de la culture, aucune colonie contaminante n'a été observée lors de ces expérimentations.

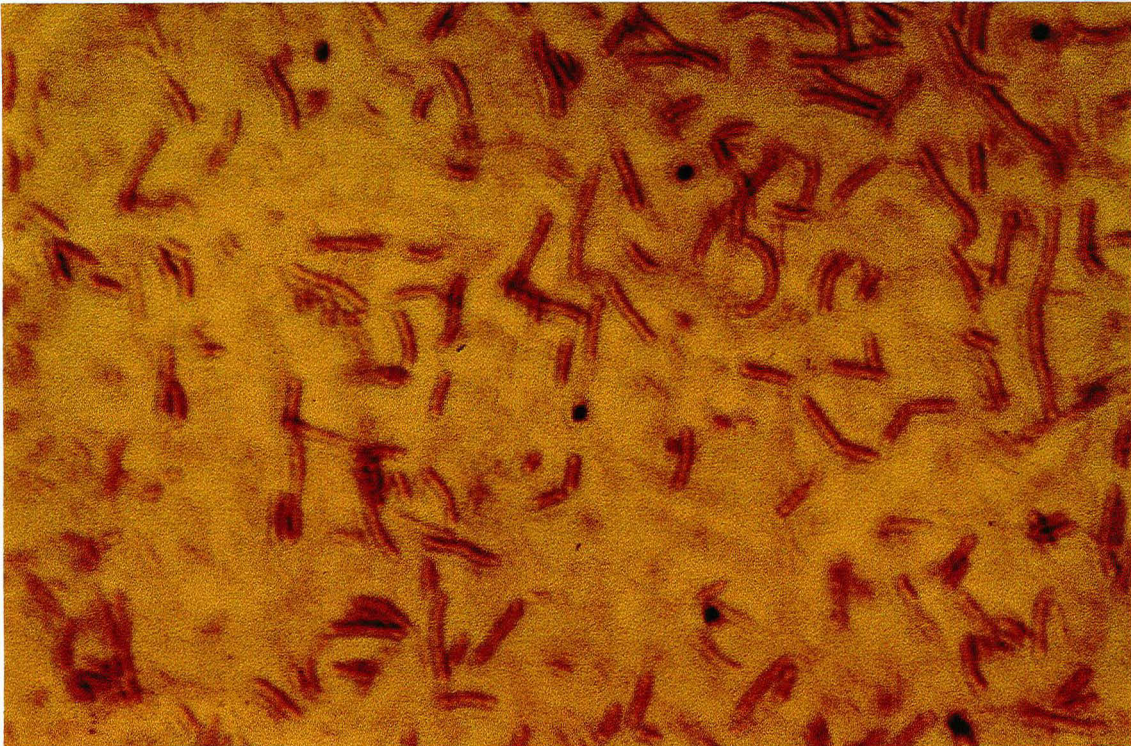
2.4.2. - Coloration des spores

Une coloration spécifique existe pour mettre en évidence les spores de bacilles : la coloration au vert de malachite. Pour ce faire, il suffit de chauffer un frottis sur lame recouvert de vert de malachite avec un coton imbibé d'alcool pendant 2 minutes, de rincer et de recouvrir de fuschine pendant quelques secondes. Après observation sous immersion au microscope, les spores apparaissent en vert et les bactéries en rose (**Photographie n°4**).

Sur milieu R1 et R1 gélosé, aucune spore n'a été détectée après 48 heures. En milieu liquide R1 et, seulement après 7 jours, sans régulation de température et de pH, quelques spores apparaissent à la coloration, plutôt ovoïdes qui peuvent déformer la cellule mère.



Photographie n° 3 : *Bacillus* spp. après coloration de Gram, culture sur milieu R1 gélosé observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.



Photographie n° 4 : *Bacillus* spp. après coloration au vert de malachite, apparition de spores après une semaine de culture, observation à l'objectif 100x sous immersion d'huile.

Une étude comparative avec la coloration de Gram a montré que les spores apparaissaient également à cette coloration, mais pouvaient être aisément confondues avec des coques ovoïdes Gram positif contaminantes.

2.5. - Caractérisation de la souche modèle

Comme décrit dans le **chapitre III** et en **annexe I**, la souche est relativement proche d'un *Bacillus coagulans* (Westhoff et Dougerthy, 1981). La série de tests biochimiques montrent néanmoins quelques différences, par exemple, dans la formation d'acide lactique à partir d'arabinose ou de sorbitol. Mais, les autres tests sont identiques.

Les observations microscopiques des cellules et des spores confirment les conclusions des tests biochimiques. En effet, *Bacillus coagulans* appartient au groupe des bâtonnets thermophiles formant des spores ovoïdes pouvant déformer la cellule mère.

2.6. - Conclusions de l'étude

- ① La souche modèle peut être considérée comme un *Bacillus coagulans* atypique.
- ② La souche est Gram positif en début de culture et sur milieu riche, mais un changement de coloration de Gram est observé au cours de la culture, surtout sur milieu M1.
- ③ Le caractère sporulant de la souche a été mis en évidence, mais uniquement dans des conditions très défavorables pour la bactérie.
- ④ La croissance bactérienne se fait par bourgeonnement en formant des chaînettes de 2 à 10 individus.

3. ETUDES PHYSIOLOGIQUES ET CINÉTIQUES

3.1. - Critères de performances

Des études préliminaires, réalisées en industrie, ont montré que la souche modèle est bien productrice d'acide lactique, mais que les conditions de culture n'étaient pas optimales.

Il est donc indispensable de redéfinir, puis d'améliorer ces conditions pour augmenter les performances du procédé.

Tout d'abord, une étude sommaire de la souche dans des conditions non optimales s'avère nécessaire pour évaluer les valeurs des paramètres cinétiques et déterminer les performances initiales. puis, une brève étude sur la température et le pH de fermentation doit être réalisée pour confirmer les choix faits précédemment.

Un travail important sur la composition du milieu de culture doit être entrepris : source de carbone, d'azote, sels minéraux et métalliques, vitamines.

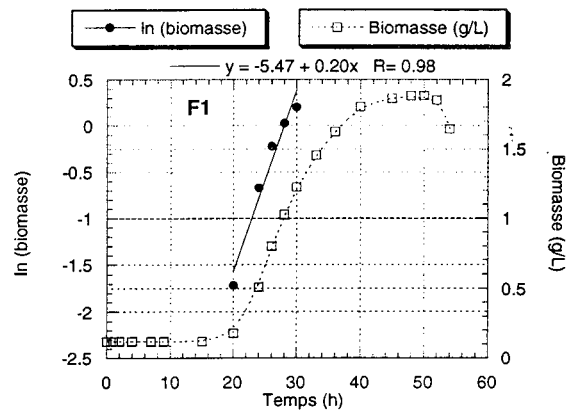
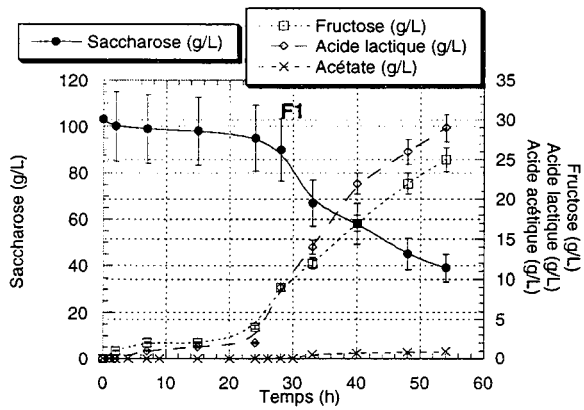
Le choix du mode de culture est important en comparant des fermentations discontinues et continues.

Toutes ces études doivent être comparables pour tenter d'améliorer la production d'acide lactique par la souche modèle. Nous verrons, dans le paragraphe suivant, que les 14 paramètres cinétiques décrits dans le **Tableau IV. 3.1** pourraient permettre de comparer les expérimentations entre elles. En réalité, six de ces paramètres sont des critères de performances pour la production d'acide lactique.

- ❶ Le rendement de production d'acide lactique, $Y_{P/S}$ (g.g^{-1}).
- ❷ La productivité, δ ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
- ❸ La productivité spécifique, Δ ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
- ❹ La vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique, Π_{pmax} ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).
- ❺ La concentration en sucre résiduel, S_f (g/L)
- ❻ La vitesse spécifique maximale de consommation du substrat, $q_{S\text{max}}$ ($\text{g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Tous ces critères doivent être les plus élevés possibles sauf pour la concentration en sucre résiduelle qui doit être la plus faible possible.

En plus, de ces six critères, il est important de rajouter le coût (F/Kg) comme critère principal de performance.



Graphe IV. 1 : Fermentation F1. Etude sommaire de la souche en culture discontinue. Evolution des concentrations en sucres et acides.

Graphe IV. 2 : Fermentation F1. Etude sommaire de la souche en culture discontinue. Evolution de la concentration en biomasse et détermination du μ_{max} .

3.2. - Etude sommaire de la souche en culture discontinue

3.2.1. - Objectifs

- ❶ Le but premier de cette expérience est d'observer le comportement de la souche sur milieu M1 liquide.
- ❷ Il est également souhaitable de démontrer l'efficacité et la précision des techniques d'analyses en fermentation et de les adapter, si cela s'avère nécessaire.
- ❸ Cette expérience doit être le témoin de départ des expérimentations futures et doit nous donner quelques valeurs de paramètres cinétiques de la souche.

3.2.2. - Conditions de fermentation

Les conditions sont celles décrites dans le **chapitre III**.

La préculture est réalisée sans régulation de pH sur milieu M1.

La culture est régulée à l'ammoniaque 2N. La fermentation est réalisée avec régulation de pH et de température respectivement à 6,4 et 50°C et sur le milieu M1.

3.2.3. - Résultats de l'expérience (fermentation F1)

Les **graphes IV.1 et IV.2** montrent l'évolution de la concentration en biomasse, en acide lactique, en sucre et en acide acétique en fonction du temps. Seule la biomasse a été suivie en ligne, par lecture spectrophotométrique.

Le premier graphe montre que le temps de latence est relativement long, 15 heures.

La phase exponentielle de croissance dure environ 25 heures, la biomasse atteint $1,8 \pm 0,2$ g/L.

Parallèlement, la consommation de saccharose augmente rapidement en même temps que la croissance, de même que la production d'acide lactique et l'accumulation de fructose.

Après 45 heures de culture, la croissance stoppe, mais la consommation de saccharose et la production d'acide lactique continuent. Le dosage de l'acétate, métabolite spécifique d'une bactérie hétérofermentaire, montre que ce métabolite n'est quasiment pas détecté (< 1 g/L).

Quelques paramètres cinétiques ont pu être calculés à partir de cette expérience, le **Tableau IV. 3.1** résume ces principaux paramètres.

La vitesse spécifique de croissance est de $0,20 \pm 0,02$ h⁻¹. La totalité du saccharose n'est pas consommée. Le rendement global de conversion du saccharose en acide lactique est faible moins de 70%. Mais, il faut tenir compte du fructose qui s'accumule et qui traduit la faible utilisation de ce sucre issu de l'hydrolyse du saccharose dans ces conditions de culture. Le

dosage des sucres a montré que le glucose était utilisé très rapidement, le pic de glucose n'apparaît pas lors de l'analyse CLHP. Le dosage de l'acide L(+) lactique par kit enzymatique est identique au dosage par CLHP, ce qui montre que la souche ne produit que cet isomère.

L'expérience a été stoppée prématurément, car la production d'acide lactique et la consommation de substrat continue après 54 heures.

Tableau IV. 3.1 : Principaux paramètres cinétiques de la fermentation F1.

X_f (g/L)	P_f (g/L)	S_f (g/L)	Fructose $_f$ (g/L)	Durée de latence (h)	Durée de culture (h)	μ_{max} (h ⁻¹)
1,9 ± 0,2	29 ± 2	40 ± 7	25 ± 2	14	54	0,20 ± 0,02
Π_{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{Smax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S0}$ (g.g ⁻¹)
2,1 ± 0,2	2,8 ± 0,6	0,03 ± 10 ⁻²	0,65 ± 0,15	0,54 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,28 ± 0,08

Rappel : les signes et lettres grecques employées sont présentées dans la nomenclature.

3.2.4. - Conclusions

- ① La souche étudiée est bien une souche productrice d'acide L(+)lactique, elle semble homofermentaire, car si l'on tient compte du fructose qui s'accumule, le rendement global est proche de 90%, ce qui est confirmé par l'analyse CLHP.
- ② L'accumulation du fructose est à confirmer lors de nouvelles expérimentations, ceci tendrait à montrer le caractère diauxique du micro-organisme.
- ③ Les conditions de culture ne sont pas optimales, comme le montre le temps de latence.
- ④ La production d'acide lactique semble associée et non-associée à la croissance.
- ⑤ Cette première fermentation nous donne les valeurs de différents paramètres cinétiques. Rendements et productivités sont faibles au regard des valeurs montrées dans le **chapitre I**.
- ⑥ Les techniques d'analyses semblent être bien adaptées au milieu de fermentation. Néanmoins, l'erreur pure de dosage par CLHP est importante pour le saccharose (≈ 15%), ce qui diminue la précision de certains paramètres cinétiques.

3.3. - Etude sommaire de la température de fermentation

Ce paramètre a un effet important sur le déroulement de la fermentation, il est important de vérifier si la température de régulation, définie sur la souche modèle au départ, correspond bien à la température optimale de croissance.

3.3.1. - Objectifs

- ❶ Evaluer l'effet de la température sur la phase de latence.
- ❷ Evaluer l'effet de la température sur la quantité maximale de biomasse produite.

3.3.2. - Conditions de cultures

Une série de fermentations en fioles d'Erlenmeyer sur milieu R1 a été réalisée à partir de la même quantité d'inoculum lyophilisé. La concentration en biomasse a été suivie pendant une cinquantaine d'heures; la phase de latence a été relevée. L'évaluation de la biomasse a été réalisée par dosage spectrophotométrique.

3.3.3. - Résultats des essais

Le **Tableau IV. 3.2** résume les résultats obtenus. La phase de latence s'arrête quand la concentration de biomasse devient significativement différente de la concentration à l'ensemencement. La concentration maximale de biomasse est une valeur estimée dans une fourchette de précision de 10%.

Tableau IV. 3.2 : Evolution de la concentration maximale en biomasse et du temps de latence en fonction de la température de fermentation.									
Température	20°C	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C	55°C	60°C
[Biomasse]	-	-	+	++	+++	+++	+++	++	-
Latence (h)	-	-	25	15	12	9	8	10	-

Légende :

- pas de croissance
- + biomasse faible < 0,5 g/L
- ++ biomasse entre 0,5 et 1 g/L
- +++ biomasse >1 g/L

La quantité maximale de biomasse (> 1 g/L) est obtenue pour des températures allant de 40°C à 50°C. La phase de latence la plus courte est obtenue à 50°C. Une étude de la température critique de croissance a montré que les cellules ne se développaient pas au delà de 58°C.

3.3.4. - Conclusions

- ① Il existe une température optimale de croissance située entre 40 et 55°C
 - ② La souche est thermophile, la température critique de croissance est située à $58 \pm 1^\circ\text{C}$.
 - ③ Cette étude confirme les résultats obtenus lors de la caractérisation de la souche et démontre que la souche puisse appartenir à l'espèce *Bacillus stearothermophilus* (cette espèce pousse à plus de 60°C, voir **annexe I**, Westhoff et Dougherty, 1981).
 - ④ La température de fermentation étant choisie dans un but industriel, où l'on doit réduire au maximum les problèmes de contamination : les températures de fermentation supérieures à 50°C sont intéressantes car la plupart des souches potentiellement contaminantes ne poussent au delà de 48°C.
- Le micro-organisme utilisé semble idéalement convenir, puisque c'est à 50°C que nous avons eu la croissance la plus rapide et la plus élevée.

3.4. - Etude du pH de fermentation

Afin de vérifier l'utilité d'une régulation de pH sur le déroulement de la fermentation, une étude comparative a été entreprise. En partant des travaux et des connaissances déjà énoncés dans le **chapitre I**, il nous a semblé important d'orienter nos recherches dans deux directions :

- ➔ l'état des cellules et le pH au moment de l'ensemencement de la culture,
- ➔ la régulation ou la non-régulation du pH de la fermentation.

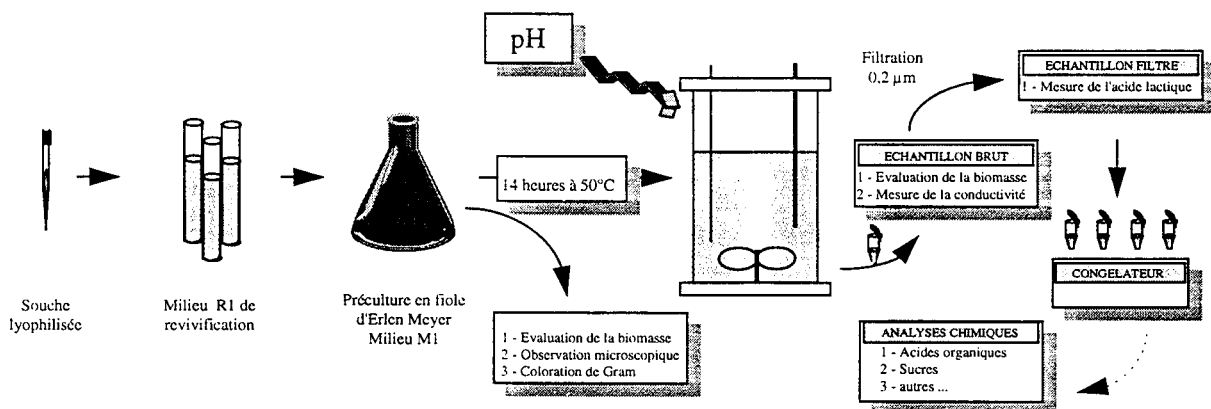
3.4.1. - Objectifs

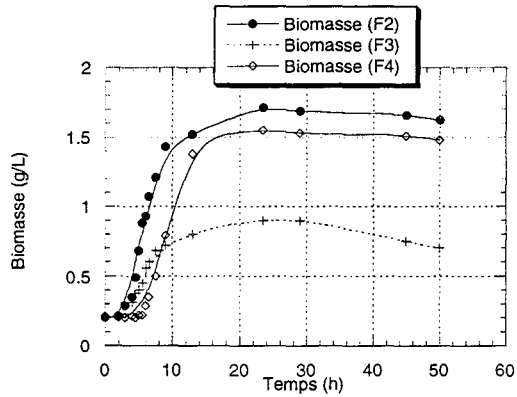
- ❶ Evaluer en terme de performance, la nécessité de réguler ou non le pH de la culture.
- ❷ Déterminer la nécessité de réguler ou non le pH de la préculture.
- ❸ Suivre une fermentation avec et sans régulation de pH.
- ❹ Faire un choix sur le type de base et la concentration à utiliser en cas de régulation.

3.4.2. - Conditions de fermentation

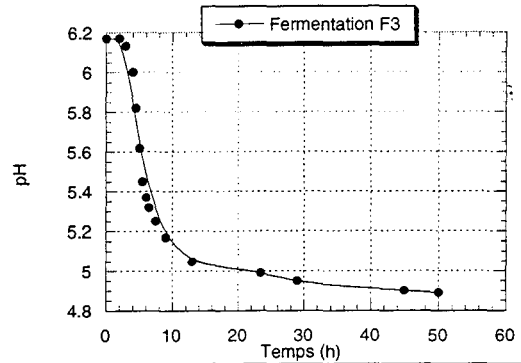
3 fermentations sur milieu M1 ont été réalisées simultanément à partir de deux précultures selon la **Figure IV.3.1**. La production de lactate d'ammonium étant la voie choisie pour notre travail, c'est avec de l'ammoniaque que nous régulerons le pH des fermentations. La première fermentation avait montré qu'une concentration d'ammoniaque de 2N suffisait pour la régulation du pH. Le milieu M1 permet visiblement de travailler en excès de saccharose.

Protocole général des fermentations pour l'étude du pH:

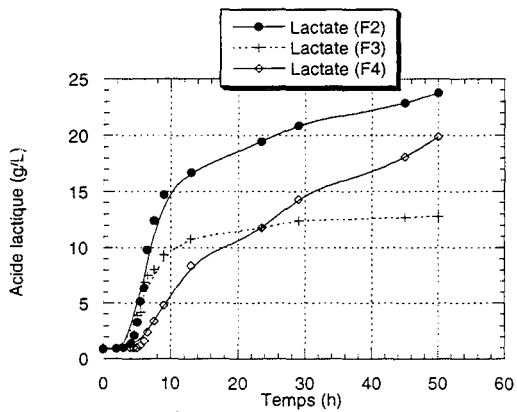




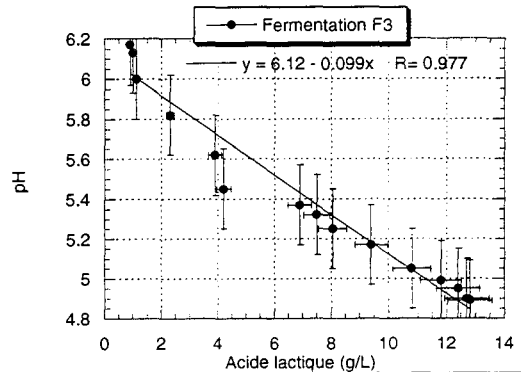
Graphe IV. 3 : Fermentations F2-4. Etude du pH de la culture et préculture. Evolution comparative des concentrations en biomasse.



Graphe IV. 4 : Fermentation F3. Etude du pH de la culture et préculture. Evolution du PH de la fermentation F3 non régulée.



Graphe IV. 5 : Fermentations F2-4. Etude du pH de la culture et préculture. Evolution comparative des concentrations en acide lactique.



Graphe IV. 6 : Fermentations F3. Etude du pH de la culture et préculture. Relation de linéarité entre la production de lactate et la diminution du pH

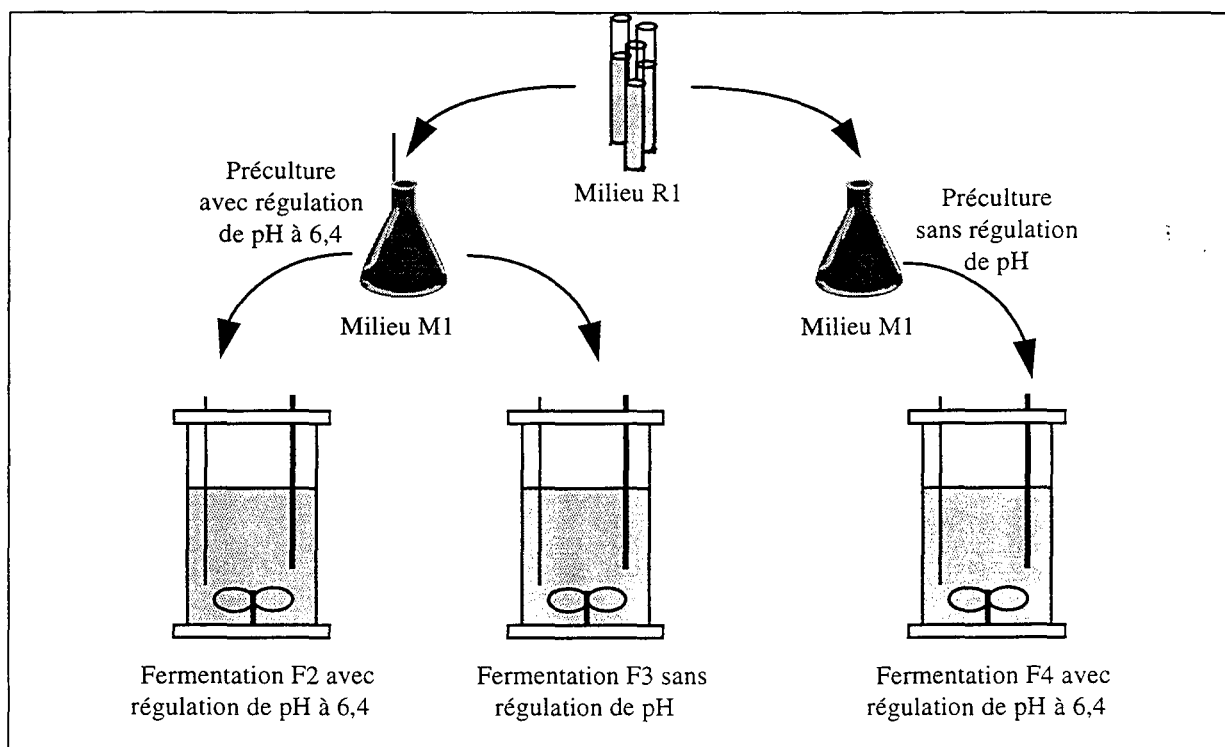


Figure IV.3.1 : Protocole opératoire des fermentations F2, F3 et F4.

3.4.3. - Résultats des essais

Pour les fermentations F2 et F3, la préculture était régulée. Les **graphes IV.3 et IV.5** montrent qu'il y a une différence importante de production de biomasse et d'acide lactique entre les deux fermentations. La fermentation F4 a été réalisée avec régulation de pH, mais à partir d'une préculture qui n'était pas régulée (**graphes IV.4 et IV.6**)

Quelques observations directes peuvent être faites :

- ➔ La quantité de biomasse et de lactate est plus importante pour la fermentation régulée (2 fois).
- ➔ Les phases de latence sont identiques pour les fermentations F2 et F3 (environ 2 heures), alors que le temps de latence est de 6 heures pour la fermentation F4.
- ➔ La production d'acide lactique stoppe beaucoup plus rapidement quand la fermentation n'est pas régulée.
- ➔ La phase de décès cellulaire est plus importante sans régulation de pH.
- ➔ La production d'acide lactique semble associée et non-associée à la croissance pour la fermentation régulée en pH.
- ➔ La diminution du pH pour la fermentation F3 suit linéairement la production d'acide lactique.

3.4.3.1.- Paramètres de fermentation : observés et calculés.

Tableau IV. 3.3 : Détermination des paramètres cinétiques des fermentation F2 à F4.

Fermentation	X_f (g/L)	P_f (g/L)	Durée de latence (h)	Π_{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
F2	1,8 ± 0,2	24 ± 2	2	2,3 ± 0,2	0,35 ± 0,03	0,48 ± 0,04	0,28 ± 0,04
F3	0,9 ± 0,1	13 ± 1	2	2,1 ± 0,2	0,20 ± 0,02	0,26 ± 0,03	0,29 ± 0,04
F4	1,6 ± 0,2	20 ± 2	6	1,7 ± 0,2	0,33 ± 0,03	0,40 ± 0,03	0,27 ± 0,04

La vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique est quasi identique pour les fermentations F2 et F3. Par contre, elle semble relativement plus faible pour la fermentation F4.

La vitesse spécifique maximale de croissance est diminuée quand il n'y a pas de régulation de pH. Enfin, les productivités spécifiques semblent identiques dans les 3 cas, mais l'incertitude de mesure est élevée.

3.4.4. - Conclusions

- ① La régulation de pH de la culture est indispensable, l'augmentation de la concentration en acide lactique non-dissocié et en proton semblent inhiber fortement à la fois la croissance et la production d'acide lactique. Ces résultats sont conformes à de nombreux travaux (Beal, et al., 1989; Giraud, et al., 1991; Norton, et al., 1993)
- ② Une régulation de pH au niveau de la préculture semble envisageable, elle permettrait de diminuer fortement la durée de la phase de latence due à l'inhibition lactique dans la préculture. Par conséquent, elle permettrait une amélioration de la productivité, comme cela a déjà été démontrée pour d'autres souches (Giraud, et al., 1991).
- ③ La production d'acide lactique semble associée et non-associée à la croissance.
- ④ Les essais avec l'ammoniaque comme base régulatrice se sont montrés concluants, l'ammoniaque peut dans le cas de *Bacillus coagulans* être assimilé comme source d'azote en plus de son effet neutralisant. Après les 4 premières fermentations, une concentration d'ammoniaque de 2 ou 3N semble idéale pour réguler la fermentation (optimum entre volume ajouté et l'écart de pH au niveau régulation, qui doivent être faibles).

3.5. - Etude de la source de carbone

La caractérisation de la souche modèle a montré que de l'acide lactique pouvait être produit à partir de saccharose, de glucose et même de lactose. Le jus vert que nous devons tester est composé à plus de 99% de saccharose. Le saccharose est hydrolysé en glucose et fructose puis ils sont assimilés par la cellule. Lors de la première expérience, nous avons relevé un possible caractère diauxique de la souche. Afin d'adapter la concentration de sucre et de tenter d'améliorer la consommation et la bioconversion du saccharose en acide lactique, il est indispensable de chercher à comprendre le mécanisme d'utilisation et de régulation des sucres.

3.5.1. - Objectifs

- ❶ Déterminer les cinétiques de croissance et de production dans différentes conditions.
- ❷ Comparer les cinétiques établies à partir du saccharose pur et du jus vert de betterave.
- ❸ Essayer de décrire le système global d'utilisation du saccharose chez *B.coagulans*.
- ❹ Tenter d'améliorer le rendement de conversion du sucre en acide lactique.

3.5.2. - Conditions expérimentales

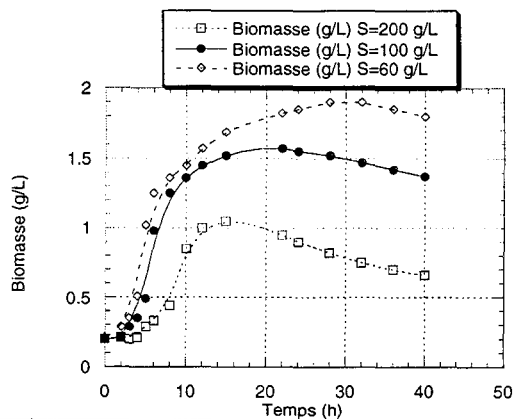
La température et le pH des cultures et des précultures sont régulés respectivement à 50°C et 6,4 avec de l'ammoniaque 2N. La composition du milieu de culture est conforme au milieu M1 mais avec une concentration supérieure en extrait de levure (3 g/L) pour favoriser la production de biomasse, comme cela est souvent décrit dans la littérature. Pour les conditions spécifiques, elles seront précisées lors de la description de chaque expérience.

3.5.2.1.- Etude de l'effet de la concentration initiale en saccharose.

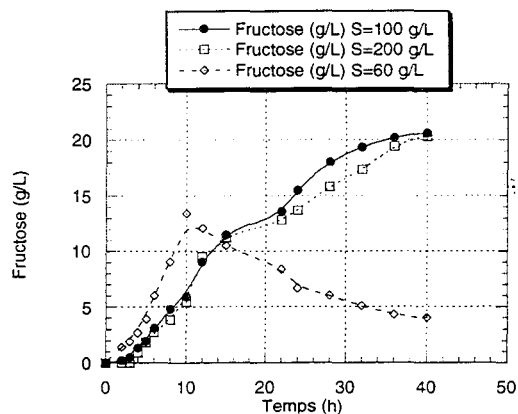
Trois fermentations (F5, F6 et F7) ont été menées en parallèle à partir de la même préculture régulée en température et en pH. Trois concentrations de saccharose pur ont été testées (200, 100 et 60 g/L)

La biomasse et l'acide L(+) lactique ont été suivis au cours de la fermentation, les autres composés (saccharose, glucose, fructose, acide acétique, acide pyruvique, acide formique, acide succinique, éthanol et acide D(-) lactique) ont été analysés par CLHP et kits enzymatiques spécifiques.

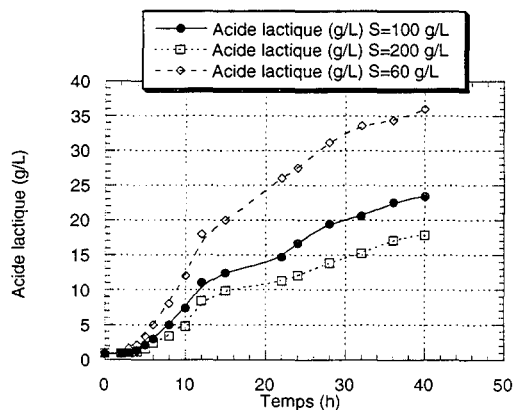
Les **graphes IV.7 à IV.11** montrent les évolutions des différentes concentrations pour les 3 fermentations : Saccharose de départ à 200 g/L (F5), S=100g/L (F6) et S=60 g/L (F7).



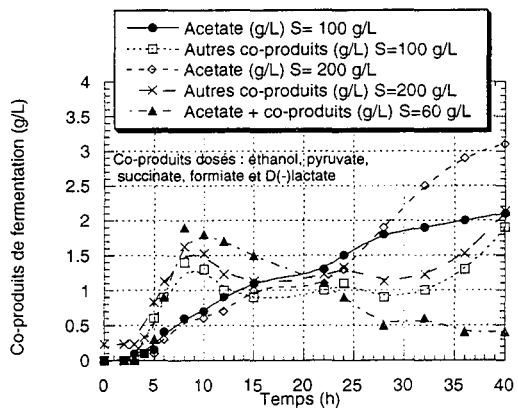
Graphe IV. 7 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en biomasse.



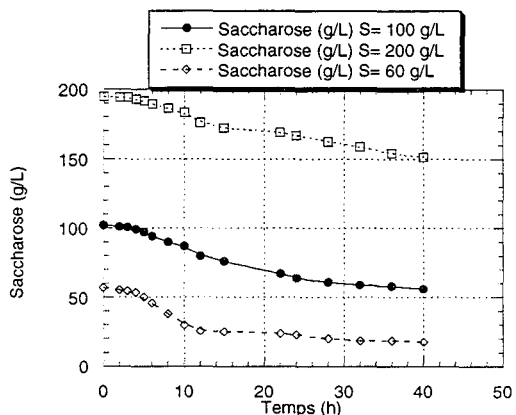
Graphe IV. 8 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en fructose.



Graphe IV. 9 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en acide lactique.



Graphe IV. 10 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en acétate et autres produits (total).



Graphe IV. 11 : Fermentations F5-7. Etude de la concentration en sucre initiale. Evolution comparative des concentrations en saccharose.

3.5.2.1.1.- Observations directes des graphes :

- ➔ Plus la concentration en sucre de départ est élevée :
 - plus la phase de latence est longue,
 - plus la croissance est faible,
 - plus la production d'acide lactique est faible (à temps de croissance égal),
 - plus la production de co-produits est élevée.
- ➔ En excès de saccharose, le fructose issu de l'hydrolyse s'accumule. Alors qu'il est consommé quand la concentration en saccharose retombe en dessous de 50 g/L.
- ➔ Le même phénomène est observé pour l'acétate, plus la concentration en sucre initiale est faible et moins il est produit.
- ➔ Le glucose n'est jamais détecté (non montré) soit < 0,1 g/L.

3.5.2.1.2. - Paramètres cinétiques observés et calculés

Tableau IV. 3.4 : Détermination des paramètres cinétiques des fermentations F5 à F7.							
Fermentation	X_f (g/L)	P_f (g/L)	Durée de latence (h)	Π_{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	μ_{max} (h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
S=200 g/L	1,1 ± 0,1	18 ± 1	5	1,6 ± 0,2	0,20 ± 0,02	0,43 ± 0,03	0,39 ± 0,04
S=100 g/L	1,6 ± 0,2	23 ± 1	2	1,7 ± 0,2	0,30 ± 0,03	0,58 ± 0,04	0,36 ± 0,04
S=60 g/L	1,9 ± 0,2	36 ± 2	0	2,2 ± 0,2	0,31 ± 0,03	0,90 ± 0,05	0,47 ± 0,04
Fermentation	S_f (g/L)	Prod _f (g/L)	Fructose _f (g/L)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	q_{Smax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S0}$ (g.g ⁻¹)
S=200 g/L	150 ± 22	5,2 ± 0,3	21 ± 1	0,02*	0,36 ± 0,1	2,2 ± 0,4	0,09 ± 0,05
S=100 g/L	59 ± 9	4,0 ± 0,2	22 ± 1	0,04	0,58 ± 0,1	2,4 ± 0,4	0,23 ± 0,04
S=60 g/L	17 ± 2,5	0,4 ± 0,05	4 ± 0,2	0,045	0,84 ± 0,1	3,9 ± 0,4	0,6 ± 0,04

Prod_f : concentration finale en co-produits (y compris l'acétate).

* l'incertitude est équivalente à la valeur du paramètre.

Une forte concentration en saccharose de départ a un effet très défavorable sur de nombreux paramètres cinétiques : taux de croissance maximal, vitesses spécifiques de production et de consommation, sur les rendements et les productivités. A une concentration de 60 g/L, les rendements sont proches des valeurs rencontrées pour une souche homofermentaire; pour les autres concentrations, il faut réaliser un bilan carboné, compte tenu du fructose accumulé.

3.5.2.1.3. - Bilan carboné final des fermentations :

Tableau IV. 3.5 : Bilan carboné des fermentations F5, F6 et F7 (en mmoles de carbone)

Métabolites (en mmoles de C)	S= 200 g/L F5	S= 100 g/L F6	S= 60 g/L F7
Saccharose (substrat)	165 ± 25	138 ± 21	145 ± 22
Glucose	0	0	0
Fructose	71 ± 3	73 ± 3	13
L(+) lactate	62 ± 4	76 ± 5	120 ± 7
D(-)lactate	1*	1	1
Acétate	11	5	2
Pyruvate	2	1	1
Succinate	3	1	1
Formiate	2	1	0
Ethanol	5	3	2
Ecart Substrat-Produits	+8	-23	+5

* : Pour les valeurs qui n'ont pas de fourchette de précision, la précision standard est inférieure à 1 mmole.

Le bilan carboné est exprimé et calculé en mmoles de carbone (sachant que le volume du fermenteur est de 1 litre). Plusieurs approximations ont été faites pour réaliser ce bilan :

- La quantité d'hydrates de carbone contenus dans l'extrait de levure est négligeable.
- La quantité de carbone issu du substrat et qui est présente dans la biomasse finale est négligeable.
- La quantité de carbone perdue sous forme de CO₂ est négligeable.

Le bilan carboné montre clairement que nous n'avons oublié aucun métabolite majeur, et que ce bilan peut être considéré comme « bouclé ». En effet, l'écart substrat - produits (en mmoles de C) est très largement inférieur à la somme des erreurs pures de dosage des différents métabolites.

Si l'on considère que le fructose est en fait un métabolite intermédiaire qui peut être consommé pour donner majoritairement de l'acide L(+) lactique (comme le montre l'expérience à 60 g/L de saccharose de départ), la souche transforme environ 80% du sucre en acide lactique pour S= 200 g/L et 90% pour S= 100 et 60 g/L. La souche étudiée est donc probablement hétérofermentaire facultative.

3.5.2.1.4. - Conclusion de l'étude.

- La souche étudiée est très probablement hétérofermentaire facultative.
- Le saccharose est inhibiteur à forte concentration (100 et 200 g/L), comme c'est le cas chez certaines souches de lactocoques (Holst, et al., 1985; Teuber, 1993).
- Le caractère diauxique de la souche a été mis en évidence; le glucose est consommé préférentiellement au fructose dans des conditions d'excès de saccharose.
- Il existe un mécanisme de régulation de la voie d'assimilation du fructose chez *B. coagulans*.
- Il est préférable de travailler à de plus faibles concentrations en saccharose pour diminuer l'effet inhibiteur du substrat sur les vitesses de production d'acide lactique et de consommation du saccharose. De plus, dans ces conditions, *B. coagulans* se comportera comme une souche homofermentaire et le fructose sera consommé.

3.5.2.2. - Etude de la voie d'assimilation du fructose

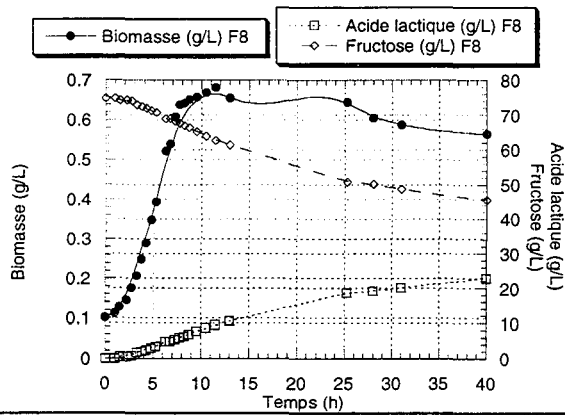
La voie de dégradation du saccharose utilise une saccharose 6-P hydrolase pour transformer le saccharose-P en glucose 6-P et fructose. Le fructose est ensuite phosphorylé par une phosphofructokinase ATP-dépendante et souvent dépendante de certains métaux (voir **chapitre I**). Les enzymes du métabolisme du saccharose peuvent être inductibles, ce qui est peut-être le cas pour la phosphofructokinase de *B. coagulans*. Une étude succincte des systèmes de régulation par dosages enzymatiques a été réalisée par le biais de quelques courtes expériences pour essayer de comprendre le mécanisme d'assimilation du fructose.

3.5.2.2.1.- Etude cinétique.

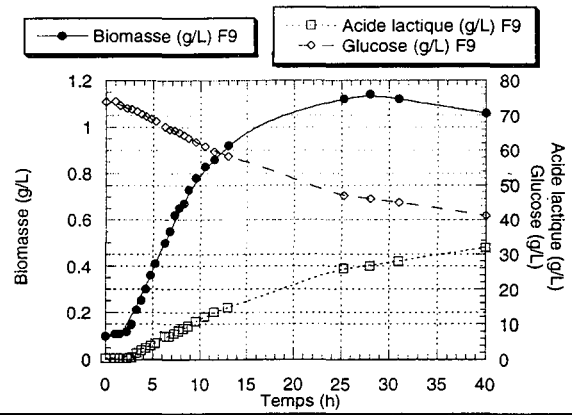
3.5.2.2.1.1. Conditions expérimentales (voir *Figure IV. 3.2*)

2 fermentations (F8 et F10) ont été réalisées parallèlement sur glucose pur et fructose pur. La composition du milieu de culture et de préculture sont identiques et de type M1 où le saccharose a été remplacé par 75 g/L de glucose ou 75 g/L de fructose. Pour le milieu contenant le fructose, une stérilisation à part, du sucre, a été faite pour diminuer le brunissement du milieu dû aux réactions de Maillard.

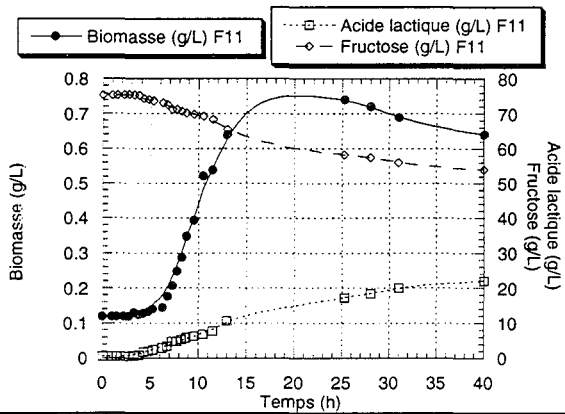
Deux autres fermentations ont été réalisées dans les mêmes conditions, mais avec une préculture sur glucose et une culture sur fructose et inversement (F9 et F11).



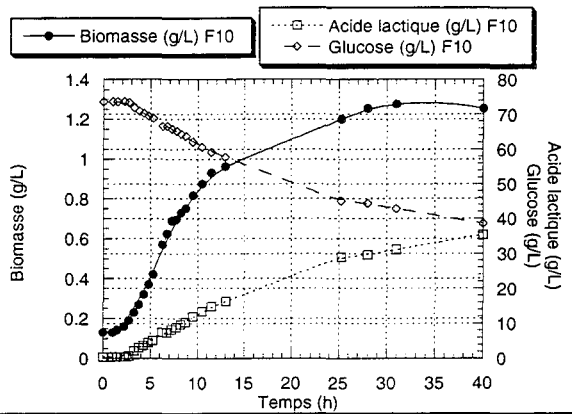
Graphe IV. 12 : Fermentation F8. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.



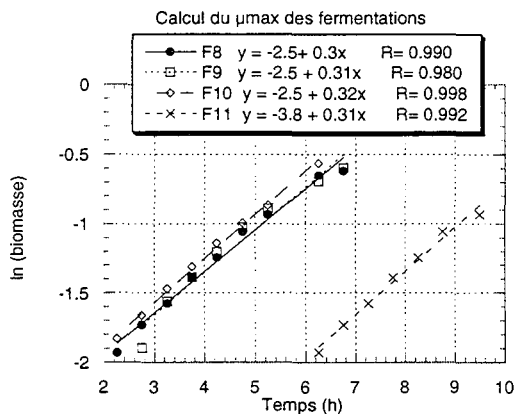
Graphe IV. 13 : Fermentation F9. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.



Graphe IV. 14 : Fermentation F11. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.



Graphe IV. 15 : Fermentation F10. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en biomasse, acide lactique et fructose.



Graphe IV. 16 : Fermentation F8-11. Etude de l'assimilation du fructose. Détermination comparative des μ_{max} .

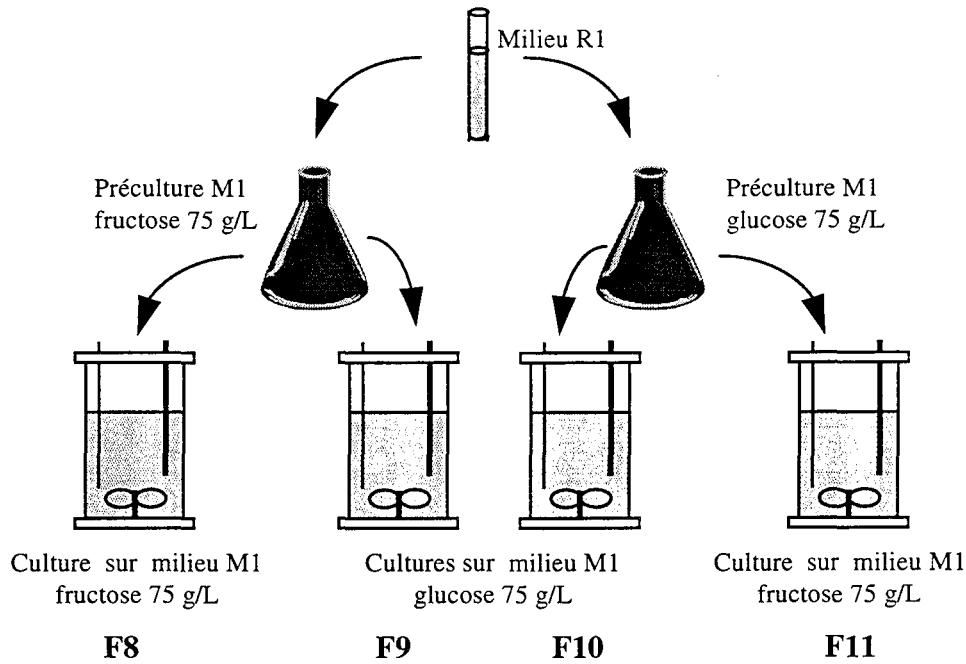


Figure IV. 3.2 : Protocole des fermentations F8 à F11.

Les concentrations en biomasse, acide L(+) lactique et fructose ont été suivies lors des 4 fermentations. Les **graphiques IV.12 à IV.15** montrent de façon comparative l'évolution de ces différentes concentrations. Le **graphe IV.16** montre le taux de croissance maximal des souches lors des 4 fermentations.

3.5.2.2.1.2. Observation directe des graphes

- Il y a une croissance de la souche dans tous les cas de figure.
- Il y a une phase de latence de 4 à 5 heures pour la fermentation F11.
- Les vitesses spécifiques de croissance sont identiques dans tous les cas.
- La production d'acide lactique et de biomasse est plus importante sur glucose.

3.5.2.2.1.3. Paramètres cinétiques observés et calculés

Tableau IV. 3.6 : Détermination des paramètres cinétiques des fermentations F8 à F11.

Fermentation	μ_{\max} (h ⁻¹)	$\Pi_{P_{\max}}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Durée de latence (h)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	$q_{S_{\max}}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
F8	0,30 ± 0,02	1,3 ± 0,2	1	0,02*	0,80 ± 0,1	1,4 ± 0,3	0,58 ± 0,03
F9	0,31 ± 0,03	1,7 ± 0,2	1	0,03	0,94 ± 0,1	2,1 ± 0,3	0,80 ± 0,04
F10	0,32 ± 0,03	1,8 ± 0,2	1	0,03	0,95 ± 0,1	2,1 ± 0,3	0,88 ± 0,05
F11	0,31 ± 0,03	1,2 ± 0,2	4	0,02	0,95 ± 0,1	1,3 ± 0,3	0,52 ± 0,05

Le **Tableau IV. 3.6** présente les paramètres intéressants observés lors de cette étude.

- ➔ Le taux de croissance semble identique sur glucose et sur fructose.
- ➔ La vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique est significativement supérieure sur glucose.
- ➔ La vitesse spécifique maximale de consommation du glucose est supérieure à celle du fructose (mais légèrement inférieure à celle du saccharose, cf. **Tableau IV. 3.6**)
- ➔ La productivité est supérieure sur glucose que sur fructose.
- ➔ La phase de latence est supérieure lors de la fermentation F11, la préculture était sur glucose et la culture sur fructose.

3.5.2.2.1.4. Conclusion de l'étude cinétique.

- Cette série de 4 fermentations montre clairement que les deux sucres sont consommés, mais que le glucose est préférentiellement utilisé par la souche, ce qui peut expliquer le phénomène de diauxie observé lors des expérimentations précédentes.

- Une phase d'adaptation est nécessaire pour que la souche consomme le fructose après croissance sur le glucose, ce qui peut s'expliquer par un mécanisme de régulation inductible de l'enzyme codant pour la phosphofructokinase (la seule enzyme supplémentaire dans la voie glycolytique d'assimilation du fructose) comme cela est décrit dans la revue sur les bactéries lactiques de Teuber (1993). Mais les résultats recueillis lors de ces 4 cultures discontinues ne nous donnent pas d'informations sur la nature du répresseur ou de l'inducteur de cette enzyme. Il faut alors revenir sur les résultats des cultures discontinues à forte concentration en saccharose pour émettre deux hypothèses:

- ❶ Le pool intracellulaire de saccharose est un répresseur de la voie de dégradation du fructose.
- ❷ Le pool intracellulaire de glucose est un répresseur de la voie de dégradation du fructose.

3.5.2.2.2.- Etude de la régulation.

Deux questions se posent principalement :

- La phosphofructokinase est-elle réprimée au niveau du gène (transcriptionnel) ou de la protéine (traductionnel) ?

- La levée de la répression ou induction est fonction de la concentration en saccharose ou en glucose intracellulaire et/ou extracellulaire.

Une fermentation supplémentaire a été entreprise pour essayer de répondre à ces questions.

3.5.2.2.1. Conditions expérimentales

La préculture a été faite sur milieu M1 et la culture sur milieu M1 également mais avec une concentration de 60 g/L de saccharose de manière identique à la fermentation F7 (voir l'étude de la concentration initiale en saccharose). Après 30 heures de culture, 20 g/L de glucose sont ajoutés directement dans le fermenteur. La concentration en biomasse, en sucres et en acide lactique a été suivies.

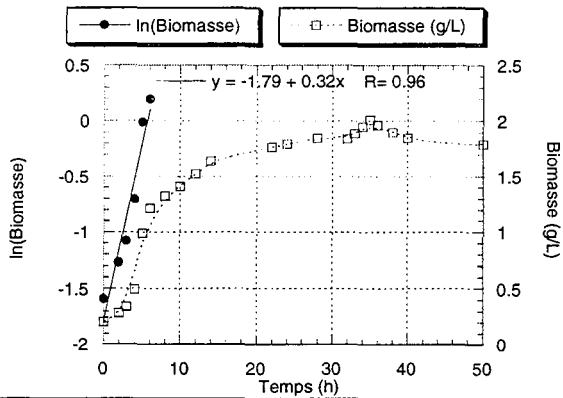
Les **graphes IV.17 et IV.18** montrent le taux de croissance maximal (pente $\ln(X)=f(t)$), les évolutions des concentrations en biomasse, acide lactique, saccharose, glucose et fructose.

3.5.2.2.2. Observations des graphes

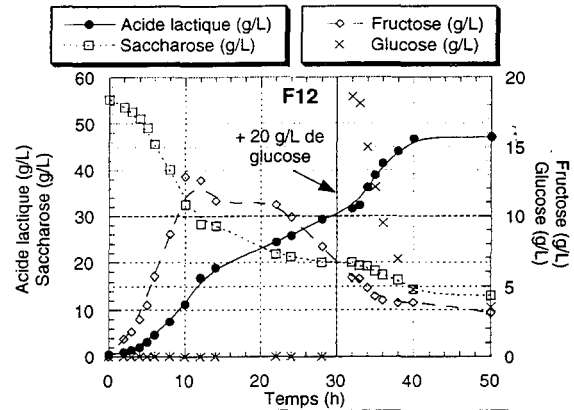
- ➔ Le glucose a bien été ajouté après que le fructose ait commencé à être consommé.
- ➔ Le glucose et le fructose sont consommés simultanément, le saccharose arrête d'être consommé très provisoirement. Puis les 3 sucres sont utilisés, il n'y a pas d'accumulation de fructose même transitoire.
- ➔ Entre la 40ème et la 50ème heure, les 3 sucres arrêtent d'être consommés et la croissance stoppe, la concentration d'acide lactique est proche de 50 g/L, ce qui n'avait jamais été obtenu.

3.5.2.2.3. Conclusions sur l'étude de la régulation de la voie d'assimilation du fructose.

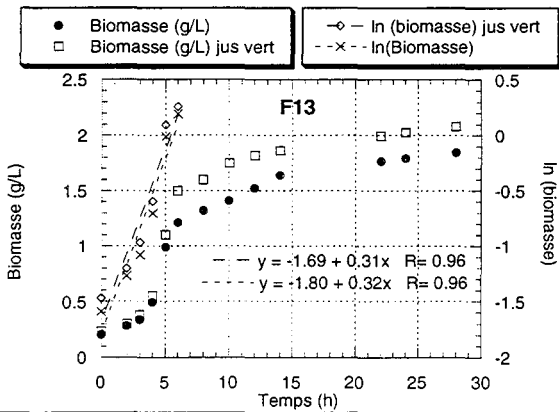
- Cette étude montre que sous certaines conditions tous les sucres peuvent être consommés simultanément. Une impulsion de glucose semble influencer faiblement la consommation du fructose. Ceci tend à démontrer que: soit le saccharose est le répresseur, soit la régulation de la phosphofructokinase est transcriptionnelle et qu'une fois que la production de cette enzyme est induite, elle continue à être efficace malgré la présence du répresseur.
- Cette étude montre également qu'à une concentration supérieure à 40 g/L, l'acide lactique semble être un inhibiteur du métabolisme fermentaire ou alors il y a une carence importante d'un co-substrat de la fermentation.



Graphe IV. 17 : Fermentation F12. Etude de l'assimilation du fructose. Pulse de 20 g/L de glucose. Evolution de la biomasse et détermination du μ_{max} .



Graphe IV. 18 : Fermentation F12. Etude de l'assimilation du fructose. Evolution des concentrations en sucres et acide L(+) lactique.



Graphe IV. 19 : Fermentation F13. Etude comparative de deux sources de saccharose. Evolution de la concentration en biomasse et détermination des taux de croissances maximum (μ_{max}).

3.5.2.3. - Etude de la croissance sur saccharose pur et sur jus vert

Une étude comparative entre les deux types de source de saccharose a également été réalisée. La fermentation F13 a été faite à partir de saccharose provenant de jus vert de betterave et à la même concentration et dans les mêmes conditions que lors de la fermentation F12, mais sans l'impulsion de glucose.

3.5.2.3.1.1. Résultats de l'expérimentation.

Il n'existe aucune différence significative entre les effets des deux sources de saccharose sur la production d'acide lactique et la consommation du substrat (non montré). Par contre, la quantité de biomasse produite est légèrement supérieure avec le jus vert (à la limite du significatif) (**graphe IV.19**). La vitesse spécifique de croissance n'est cependant pas différente: $0,31 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$ et $0,32 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$.

3.5.2.3.1.2. Conclusion de l'étude comparative.

- Le jus vert de betterave utilisé est un produit de première extraction des industries sucrières; il a finalement peu d'impuretés et est composé essentiellement de saccharose. L'effet positif (par rapport au saccharose pur) sur la production de biomasse est à la limite du significatif. Donc, soit les impuretés (cofacteur, sels...) favorisent la production de biomasse, soit cette différence n'est finalement pas significative. Des expériences de répétabilité seraient nécessaires pour conclure.

3.5.3. - Conclusions sur l'étude des sucres

① Saccharose, glucose et fructose sont tous utilisés par *B.coagulans* pour produire de l'acide lactique, conformément aux études d'Heriban, et al., 1993b.

② Le saccharose est inhibiteur à forte concentration ($> 80 \text{ g/L}$), la perturbation créée par cette inhibition engendre très vraisemblablement des changements métaboliques qui conduisent la cellule à produire moins de biomasse et d'acide lactique, mais plus de produits de la voie hétérofermentaire. La quantité de ces produits demeurant finalement relativement faible.

③ Comme pour certaines souches de lactocoques (Teuber, 1993), la voie de dégradation du fructose est essentiellement due à la *phosphofructokinase* qui transforme le fructose en fructose 6-P. Cette enzyme semble être inductible chez *B. coagulans* et la transcription du gène codant pour cette enzyme semble être réprimée par le pool intracellulaire de saccharose ou de glucose (**Figures 3.5.3.a et b**). Il est également possible que cette enzyme soit très dépendante de la quantité d'ATP disponible et de la présence de certains sels métalliques.

④ Le saccharose et le glucose semblent n'avoir aucun système de régulation particulier en dehors de l'effet de leur concentration respective, ils sont utilisés préférentiellement au fructose (si l'enzyme codant pour son assimilation est réprimée). Le taux de croissance est identique sur les 3 sucres ($0,31 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$), et la vitesse de consommation du glucose est très légèrement supérieure à celle du fructose.

Le transport et l'assimilation des sucres et du saccharose semblent être proche des lactocoques, lactobacilles et des streptocoques et ces études viennent compléter les travaux de Thompson et Gentry-Weeks, 1994.

⑤ Il n'existe pas de restriction quant à l'utilisation du jus vert de betterave (mélasses) à la place du saccharose pur en poudre.

⑥ L'utilisation d'une quantité importante de saccharose initial n'est pas recommandée pour les fermentations à venir. Avec 60 g/L de saccharose seulement, tous les paramètres cinétiques sont améliorés. La productivité est doublée par rapport au milieu M1, le fructose est consommé, les vitesses spécifiques de consommation et de production sont supérieures.

L'étude du substrat carboné a également montré la nécessité d'adapter le protocole futur pour les fermentations et notamment la concentration en sucre qui semble trop élevée dans la composition M1.

Un nouveau **milieu (M2)** est défini comme :

Saccharose (provenant du jus vert)	60 g/L
Extrait de levure	2 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	1 g/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,7 g/L

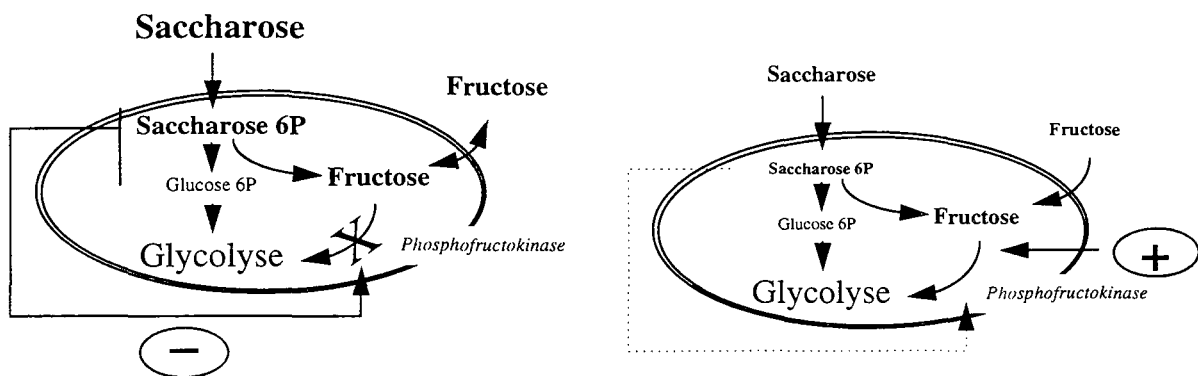


Figure 3.5.3.a. : Régulation de la voie d'assimilation du fructose. Répression catabolique du saccharose ou du glucose.

Figure 3.5.3.b. : Régulation de la voie d'assimilation du fructose. levée de la repression catabolique, la voie est induite.

3.6. - Etude des sources d'azote

Dans la littérature, la quasi totalité des auteurs utilisent des sources d'azote pour améliorer la production de biomasse (**chapitre I**). La composition du milieu M1 contient 2 g/L d'extrait de levure comme source d'azote. Même si *B.coagulans* semble moins exigeant du point de vue nutritionnel que la plupart des bactéries lactiques, il faut démontrer que cette supplémentation azotée est nécessaire pour améliorer les performances de la fermentation.

Plusieurs sources d'azote sont à notre disposition pour la réalisation de ce travail :

- ➔ l'extrait de levure,
- ➔ la liqueur de « corn steep »,
- ➔ les ions ammonium,
- ➔ des extraits cellulaires.

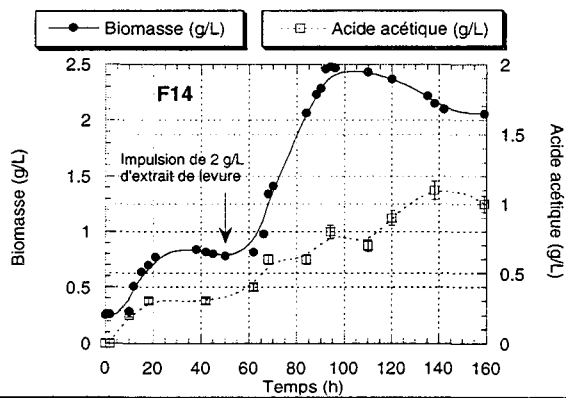
L'extrait de levure est la source la plus employée et souvent la plus efficace. Le « corn steep » est beaucoup moins cher que l'extrait de levure (de 5 à 10 fois). Les ions ammonium sont souvent utilisés comme source d'azote par les *Bacilli*, mais cette voie reste limitée. Enfin, et cette voie est plus novatrice, la biomasse d'une fermentation pourrait être récupérée et traitée pour être réinjectée comme source d'azote lors d'une nouvelle fermentation.

3.6.1. - Objectifs

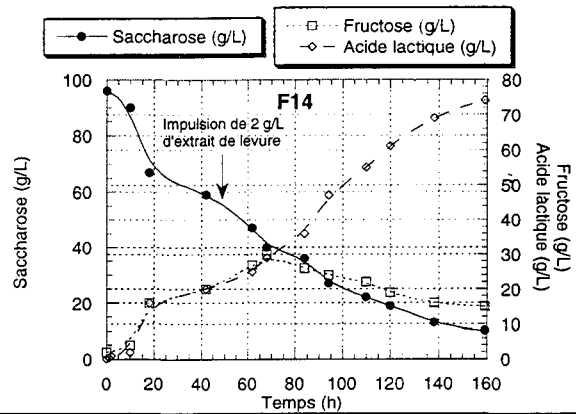
- ❶ Améliorer les performances de production d'acide lactique par *B. coagulans*.
- ❷ Diminuer au maximum les coûts liés à l'ajout de co-substrats.
- ❸ Tester différents types d'extraits azotés et déterminer leurs effets sur les performances des fermentations.
- ❹ Tenter de réutiliser la biomasse en tant que source d'azote en évaluant l'efficacité sur les performances du procédé.

3.6.2. - Conditions expérimentales générales

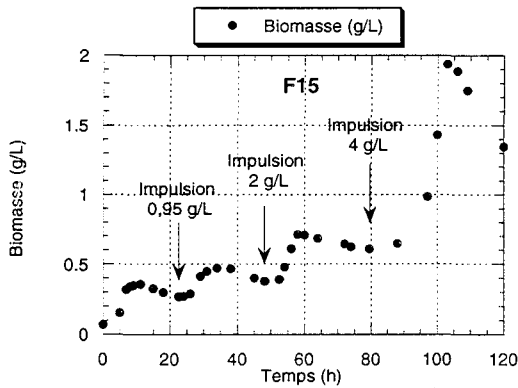
Plusieurs fermentations sont réalisées sur milieu M1 avec différents extraits azotés. La température et le pH des fermentations sont régulées respectivement à 50°C et 6,2. L'effet des extraits est testé en culture discontinue ou continue soit en changeant directement la concentration en extrait azoté dans le milieu de culture, soit en réalisant des impulsions de molécules azotées dans le fermenteur.



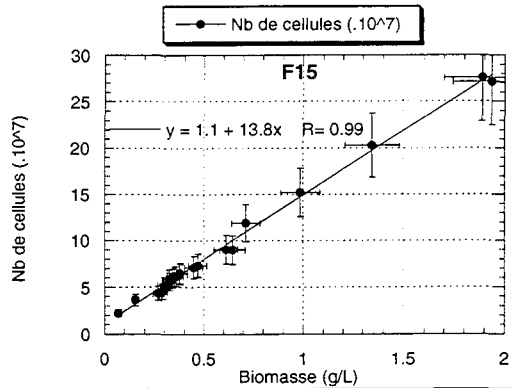
Graphe IV. 20 : Fermentation F14. Impulsion d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution des concentrations en biomasse et acide acétique.



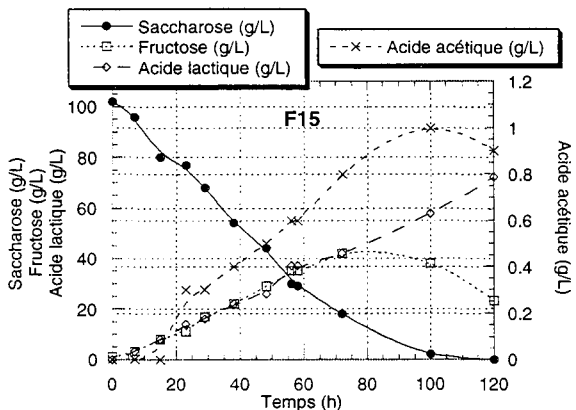
Graphe IV. 21 : Fermentation F14. Impulsion d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution des concentrations en sucres et acide lactique.



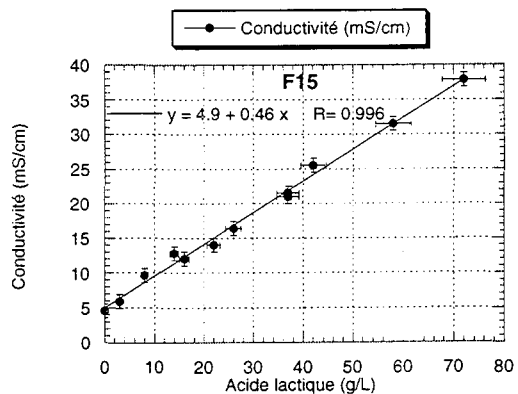
Graphe IV. 22 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 23 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu.. Linéarité entre concentration et nombre de cellules.



Graphe IV. 24 : Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu. Evolution des concentrations en sucres et acides.



Graphe IV. 25: Fermentation F15. 3 impulsions d'extrait de levure en mode discontinu. Linéarité entre la concentration en lactate et la conductivité.

Un plan d'expérience linéaire à deux niveaux a été mis en place, parallèlement à ces études, pour tenter de révéler des éléments d'information sur le comportement de la souche et sur les effets de certains composés du milieu de culture. Enfin, une étude comparative des différentes sources azotées sera réalisée en cultures discontinues.

3.6.2.1. - Etude de l'effet d'une impulsion d'extrait de levure en mode discontinu

L'extrait de levure utilisé est sous forme de poudre et a été fourni par Fould Springer®.

3.6.2.1.1. - Conditions expérimentales

Culture discontinue sur milieu M1 avec régulation du pH et de la température. La préculture est également régulée en température, mais pas en pH. Après la phase exponentielle de croissance, arrivé à la phase stationnaire, un ajout de 2 g/L d'extrait de levure (en solution dans 40 ml d'eau distillée et après stérilisation) est fait directement dans le fermenteur (volume total de 1 litre) dans des conditions stériles.

3.6.2.1.2. - Résultats

La phase de latence a une durée de 4 heures (**Graphes IV.20 et IV.21**). L'impulsion de 2 g/L d'extrait de levure en poudre provoque le redémarrage de la croissance. La concentration en biomasse passe de 0,8 à 2,4 g/L en moins de 30 heures. Le **Tableau IV. 3.7** résume les concentrations des différentes molécules dosées juste avant l'impulsion (A) et à la fin de l'expérimentation (B).

Tableau IV. 3.7 : Effet de l'impulsion de 2 g/L d'extrait de levure.

	Biomasse (g/L)	Acide lactique (g/L)	Saccharose (g/L)	Fructose (g/L)	Acide acétique (g/L)
A	0,8 ± 0,08	22 ± 1	58 ± 8	23 ± 2	0,4 ± 0,03
B	2,1 ± 0,2	75 ± 5	9 ± 1	15 ± 1	1 ± 0,06

Le fructose s'accumule dans un premier temps, puis est consommé quand la concentration en saccharose devient inférieure à 50 g/L.

3.6.2.1.3. - Conclusions de l'expérimentation

- ➔ La durée de la phase de latence dépend de l'état physiologique des cellules dans la préculture. La régulation du pH de la préculture est indispensable pour améliorer la productivité.

- ➔ Il existe un élément indispensable à la croissance dans l'extrait de levure. La disparition de cet élément a pour effet d'arrêter la croissance. Il est cependant difficile de conclure dans un système dynamique, car en plus de l'effet de l'extrait de levure, viennent s'ajouter les inhibitions par le substrat et par l'acide lactique, la régulation de l'assimilation du fructose et toutes les autres molécules que nous n'avons pas encore identifiées et testées.
- ➔ Une nouvelle fois, l'assimilation du fructose semble fortement liée à la concentration en saccharose.

3.6.2.2. - Effet cumulatif de plusieurs impulsions d'extrait de levure en système discontinu.

3.6.2.2.1. - Objectifs

- Il faut confirmer l'effet positif de l'extrait de levure sur la croissance et sur la production d'acide lactique.
- Il faudrait démontrer que c'est un des constituants de l'extrait de levure qui est limitant pour la croissance.
- Cette expérience va permettre de déterminer la linéarité éventuelle entre la concentration en cellules en g/L (évaluée par Densité Optique) et le nombre de cellules (comptage sur cellule de Thoma).
- Il serait également intéressant d'utiliser un conductimètre pour évaluer la concentration en acide lactique directement dans le fermenteur.

3.6.2.2.2. - Conditions expérimentales

Les milieux de précultures et de cultures sont de type M1, c'est à dire en excès de saccharose. Cependant la concentration en extrait de levure est limitée à 1 g/L dans la culture pour visualiser plus aisément l'effet des impulsions. Les impulsions d'extrait de levure se font dans les mêmes conditions que pour l'expérimentation précédente. Trois impulsions successives sont faites respectivement à des concentrations de 1, 2 et 4 g/L. La concentration en biomasse est suivie parallèlement par spectrophométrie et comptage sur cellule de Thoma. Les concentrations en acides et sucres sont suivies par CLHP, kits enzymatiques spécifiques et par conductivité.

3.6.2.2.3.- Résultats

Après chaque impulsion, la croissance reprend. Il semblerait que l'augmentation de la concentration en biomasse soit plus ou moins proportionnelle à la quantité d'extrait de levure ajoutée (**graphe IV.22**). La durée de la fermentation est très largement allongée par l'addition successive de l'extrait de levure. L'effet le plus important sur la biomasse est obtenu avec l'impulsion de 4 g/L. Mais la croissance est tout de même limitée, car à la fin de l'expérimentation la concentration en biomasse ne dépasse pas 2 g/L ce qui est plus faible que pour l'expérimentation précédente (2,5 g/L pour une seule impulsion de 2 g/L d'extrait de levure).

Par contre la consommation de saccharose et de fructose ne semble pas s'arrêter pendant toute la durée de la manipulation (**graphe IV.24**). Le saccharose est totalement consommé en fin de fermentation. La concentration en acide lactique maximale obtenue est de **76 g/L**.

Le **graphe IV.23** montre qu'il est possible de relier la concentration en biomasse au nombre de cellules par ml. Globalement, il existe une relation linéaire entre ces deux paramètres :

$$1 \text{ g/L de biomasse} \approx 1,4 \cdot 10^8 \text{ cellules/ml}$$

Dans le **chapitre III**, il a été montré que la concentration en lactate d'ammonium, donc en acide lactique pouvait être évaluée par une simple mesure de conductivité. La concentration en acide lactique et la conductivité a été suivie en parallèle lors de la fermentation n°15. Le **graphe IV.25** montre qu'il existe bien une relation linéaire entre ces deux mesures. La valeur à l'origine correspond à la conductivité du milieu avant ensemencement. L'augmentation de la conductivité est due principalement à la production de lactate d'ammonium.

$$1 \text{ g/L d'acide lactique} \approx 0,46 \text{ mS/cm}$$

3.6.2.2.4. - Conclusions

- L'acide lactique peut être évalué en ligne par le biais d'une mesure conductimétrique. Cette mesure est instantanée et se fait sans dilution du milieu de fermentation.
- Il existe une relation linéaire entre la concentration en cellules déterminées par densité optique et comptage des cellules par cellule de Thoma. Cette linéarité pourrait être très utile dans le cas où la concentration en biomasse ne pouvait être évaluée par mesure spectrophotométrique (trouble du à un autre composé du milieu).
- L'extrait de levure semble être une source de supplémentation indispensable pour la croissance et la production de lactate. Cette source d'azote contient un élément qui en disparaissant limite la croissance cellulaire. Lors des 3 impulsions successives, les cellules ont repris leur croissance jusqu'à limitation de la source de carbone ou inhibition par l'acide lactique. Cependant, l'effet des impulsions est indéniablement positif sur la croissance.

L'évolution de la croissance semble également être dépendante de l'état physiologique des cellules au moment de cette impulsion.

3.6.2.3.- Etude de plusieurs paramètres de la fermentation lors d'un plan d'expérience à deux niveaux.

Les difficultés d'interprétation rencontrées lors des expérimentations précédentes viennent essentiellement du mode de culture discontinu. Le système est dynamique et les effets d'une molécule lors d'une impulsion sont également dépendants de tous les autres paramètres. Pour cette raison, l'emploi d'un plan d'expérience est indiqué car il permet de visualiser de façon indépendante l'influence d'un paramètre.

3.6.2.3.1. - Objectifs

Le plan d'expérience choisi est un plan factoriel fractionnaire à deux niveaux. Ce plan est parfaitement indiqué pour la recherche de l'influence de paramètres sur une ou plusieurs réponses. Neuf paramètres vont être testés lors de ce plan.

- Influence de deux types d'extrait de levure et d'un extrait bactérien sur la production de biomasse et d'acide lactique.
- Influence de deux types de sels d'ammonium.
- Détermination de l'influence d'une forte concentration en saccharose.
- Test de deux températures de fermentation.
- Test de deux régulations de pH de la fermentation.
- Détermination de l'influence du Tween 80 sur la production d'acide lactique et la croissance.

3.6.2.3.2. - Plan factoriel fractionnaire 2^{9-5}_{IV}

a) Construction du plan : 1/32 ème de plan est réalisé soit 16 expériences, plus 2 expériences de répétabilité (**Tableau IV. 3.8**).

Le plan factoriel fractionnaire signifie que l'effet des interactions d'ordre 3 et d'ordre 4 entre les paramètres 1 à 4 est faible et qu'il est possible d'aliaser ces interactions à de nouveaux paramètres. Ainsi, les paramètres 5 à 9 étant aliasés, le plan s'écrit 2^{9-5} , soit 2^4 expériences. Les résultats du plan donneront l'influence de chaque paramètre, mais en contre partie toutes les informations sur les interactions entre les paramètres seront perdues. La valeur IV en indice signifie que le plan d'expérience est de résolution 4, c'est à dire que toutes les informations concernant les effets des 9 paramètres sont conservées mais que les informations des interactions d'ordre supérieur à 2 sont perdues.

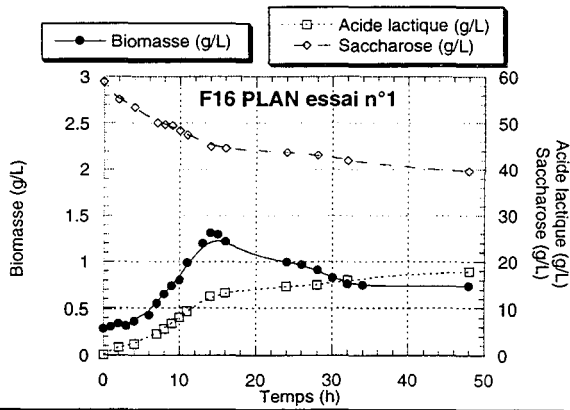
Tableau IV. 3.8 : Construction du plan d'expérience factoriel fractionnaire à 2 niveaux.

N° ESSAI	FACTEUR 1	FACTEUR 2	FACTEUR 3	FACTEUR 4	INTER 123	INTER 124	INTER 134	INTER 234	INTER 1234
	Saccharose	Ext.Levure Sol.	Ext.levure Liq.	Ext.Cellulaires	(NH ₄) ₂ SO ₄	(NH ₄) ₂ HPO ₄	pH	Température	Tween 80
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
4	1	1	-1	-1	-1	-1	1	1	1
5	-1	-1	1	-1	1	-1	1	1	-1
6	1	-1	1	-1	-1	1	-1	1	1
7	-1	1	1	-1	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	1	-1	1	1	1	-1
10	1	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1
11	-1	1	-1	1	1	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1
13	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	1
14	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	-1
15*	-1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
16	1	1	1	1	1	1	1	1	1
* L'expérience numéro 15 est réalisée 3 fois									
Paramètres aliésés →					5=123	6=124	7=134	8=234	9=1234

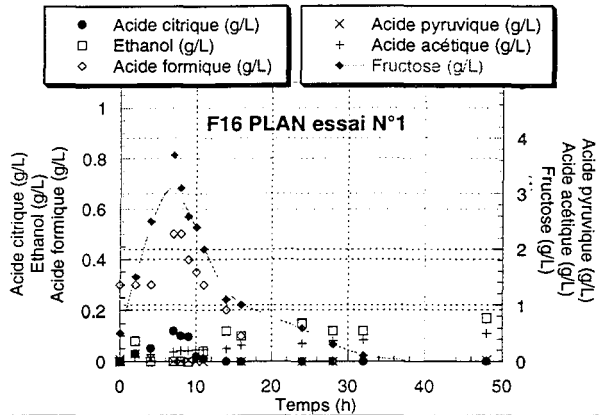
b) Paramètres étudiés et niveaux (**Tableau IV. 3.9**).

Tableau IV. 3.9 : Tableau des paramètres testés à 2 niveaux.

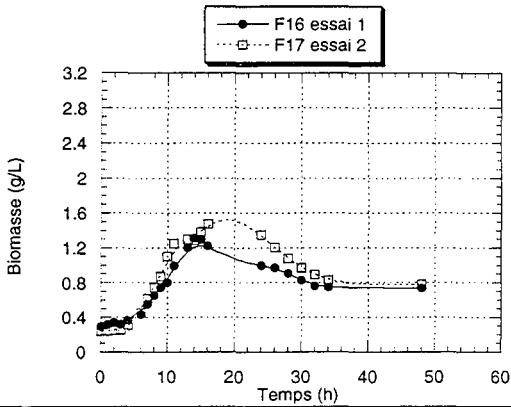
	Paramètres	Niveaux	
		-1	1
1	Mélasses (saccharose)	60 g/L	120 g/L
2	Extrait de levure solide.	0	2 g/L (poids sec)
3	Extrait de levure liquide.	0	2 g/L (poids sec)
4	Extrait cellulaire	0	2 g/L (poids sec)
5	(NH ₄) ₂ SO ₄	0	2 g/L
6	(NH ₄) ₂ HPO ₄	0	1 g/L
7	pH	6,1	6,4
8	Température	50°C	52°C
9	Tween80	0	1 ml/L



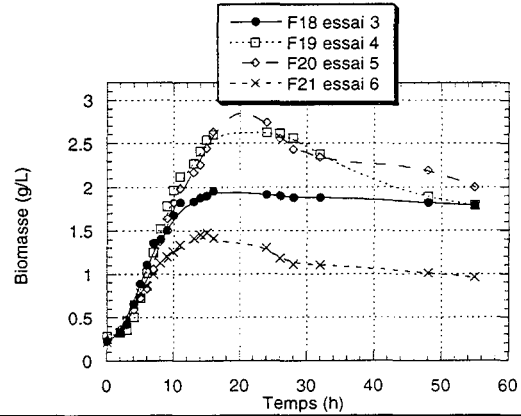
Graphe IV. 26: Fermentation F16. Plan d'expérience essai n°1. Evolution des concentrations en biomasse, saccharose et acide lactique.



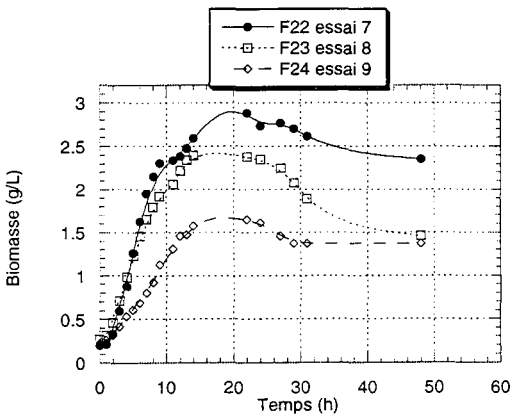
Graphe IV. 27 : Fermentation F16. Plan d'expérience essai n°1. Evolution des concentrations en fructose et autres co-produits du métabolisme.



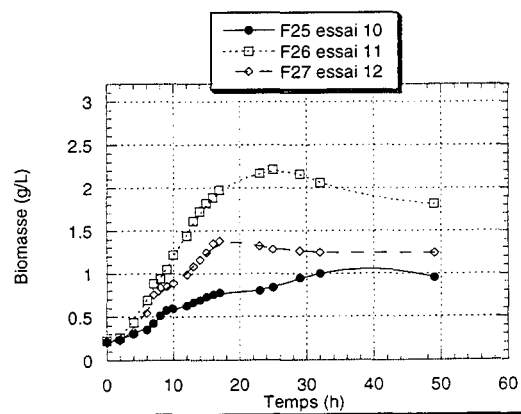
Graphe IV. 28 : Fermentations F16-17. Plan d'expérience essais n°1 et 2. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 29 : Fermentations F18-21. Plan d'expérience essais n°3 à 6. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 30 : Fermentations F22-24. Plan d'expérience essais n°7 à 9. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 31: Fermentations F25-27. Plan d'expérience essais n°10 à 12. Evolution de la concentration en biomasse..

c) Réponses observées

Les effets des 9 paramètres ont été suivis sur 6 réponses (**Tableau IV. 3.10**).

Tableau IV. 3.10 : Tableau des réponses.

$Y_{P/S}$ ($g \cdot g^{-1}$)	Rendement de production d'acide lactique.
Π_{pmax} ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)	Vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique.
q_{Smax} ($g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$)	Vitesse spécifique maximale de consommation du substrat.
μ_{max} (h^{-1})	Vitesse spécifique maximale de croissance.
X_{max} (g/L)	Concentration maximale en biomasse obtenue.
P_{max} (g/L)	Concentration maximale en acide lactique obtenu.

3.6.2.3.3. - Conditions expérimentales

La composition des milieux de culture est dictée par le plan d'expérience. Les 18 fermentations sont réalisées en mode discontinu dans 3 réacteurs de 2 litres avec régulations de pH et de température fixées par le plan. Les 3 fermentations de répétabilité sont faites simultanément à partir de la même préculture. Les conditions d'ensemencement et de préculture sont identiques pour toutes les fermentations. Les concentrations en biomasse et acide L(+) lactique sont évaluées à chaque prélèvement. Les autres concentrations sont déterminées à partir des échantillons filtrés et congelés.

3.6.2.3.3.1. préparation de l'extrait cellulaire

La récupération de la biomasse est une source d'azote potentielle. Afin d'observer l'influence d'une telle source, un extrait est préparé par le biais d'une hydrolyse acide.

L'extrait cellulaire est préparé à partir de la biomasse d'une fermentation précédente. Les cellules sont lavées à l'eau distillée sans NaCl puis centrifugées, séchées et remises en suspension dans une solution d'acide sulfurique 6N. La solution est chauffée à 90°C pendant 12 heures. L'hydrolyse acide est stoppée par centrifugation et lavage de l'hydrolysât à l'eau distillée. L'hydrolysât est ensuite concentré sous forme solide par atomisation.

3.6.2.3.4. - Résultats

Les **graphes IV.26 et IV.27** montrent les évolutions des concentrations en biomasse, acides, sucres et autres métabolites de la fermentation n°1 du plan d'expérience. Tous les paramètres cinétiques sont évalués de la même manière pour toutes les fermentations. L'interprétation de chaque fermentation de façon indépendante n'a que peu d'intérêt, cependant les **graphes IV.28 à IV.33** représentent l'évolution comparative de la concentration en biomasse pour

toutes les fermentations du plan d'expérience. Globalement, deux choses sont facilement observées :

- ➔ la croissance est très limitée en absence de source d'azote.
- ➔ la croissance est plus élevée avec une concentration en saccharose initiale réduite.

3.6.2.3.4.1. Valeurs des paramètres cinétiques calculées

Les paramètres sont tous évalués et calculés selon la même méthode. La déviation standard est très importante sur le calcul du rendement, ce qui est dû à l'incertitude de dosage sur le saccharose (**Tableau IV. 3.11**). Les valeurs du rendement seront très difficilement exploitables. Les résultats sont globalement très différents d'une fermentation à l'autre. La concentration en biomasse maximale varie de 1 à 3 g/L en fonction de la présence ou non d'extraits azotés. La concentration en acide lactique varie de 17 à 57 g/L, dans ce dernier cas le sucre est presque totalement consommé.

Tableau IV. 3.11 : Valeurs observées et calculées des réponses pour les fermentations.

Fermentation	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	$q_{S\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$\Pi_{p\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)%
1	1,3	18	0,15	2,9	1,5	109
2	1,5	24	0,16	2,5	1,5	94
3	1,95	41	0,27	2,1	2	98
4	2,6	33	0,25	5,6	1,6	97
5	2,8	32	0,26	4,8	1,6	78
6	1,5	24	0,3	4,2	1,3	78
7	2,85	50	0,26	3,7	1,3	102
8	2,4	31	0,32	1,9	1,4	97
9	1,7	20	0,31	3,9	0,9	87
10	1,1	17	0,19	2,8	0,8	78
11	2,25	25	0,32	4,9	1,9	96
12	1,4	20	0,32	4,1	1,6	91
13	2,95	48	0,30	4,4	1,4	104
14	2,75	38	0,28	4,2	2,8	95
15 a,b etc	3,05	57	0,28	8,5	5,1	92
16	2,45	55	0,29	6,6	4,6	92
Erreur standard	10%	6%	10%	15%	10%	15%

3.6.2.3.4.2. Les effets

Le tableau des effets (**Tableau IV. 3.12**) est calculé et déterminé après traitement numérique des valeurs cinétiques. Les signes + ou - montrent si le passage du niveau -1 à +1 pour le paramètre étudié est significativement positif ou significativement négatif sur la réponse observée.

Par exemple, pour la première ligne, les deux signes « moins » signifie que pour une concentration de 120 g/L de saccharose, la concentration maximale de biomasse et d'acide lactique obtenu lors des fermentations est significativement plus faible que pour une concentration en saccharose initiale de 60 g/L.

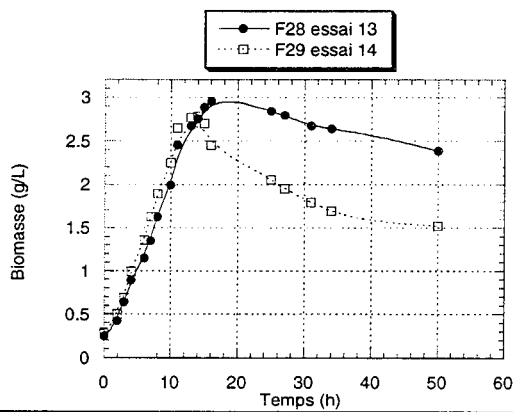
Par définition, l'effet observé est **significatif** lorsque la déviation standard à la moyenne (dû à l'effet du paramètre) est au moins une fois supérieure à l'erreur standard de la réponse (c'est à dire à la précision de la réponse).

Arbitrairement, nous avons fixé 3 niveaux pour les effets positifs qui correspondent à des effets de plus en plus élevés (+ : au moins une fois supérieur à l'erreur standard, ++ : au moins deux fois l'erreur standard, +++ au moins trois fois l'erreur standard).

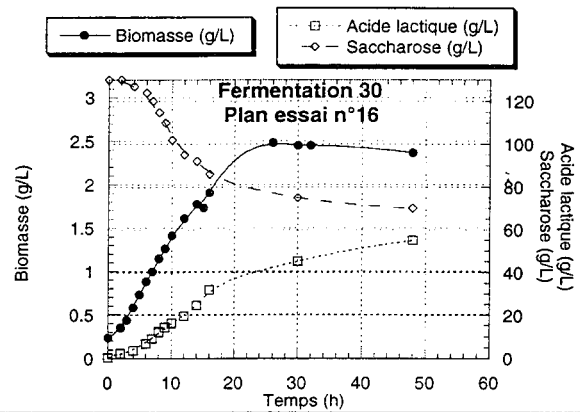
Tableau IV. 3.12 : Table des effets.

Paramètres	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	$q_{S\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$\Pi_{p\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)
Mélasses (saccharose)	-	-	ns	ns	ns	ns
Extrait de levure solide.	+	++	+	+	++	ns
Extrait de levure liquide.	++	+++	+	+	++	ns
Extrait cellulaire	ns	+	+	+	++	ns
(NH ₄) ₂ SO ₄	ns	ns	ns	-	ns	ns
(NH ₄) ₂ HPO ₄	ns	+	ns	ns	ns	ns
pH	+	ns	ns	ns	ns	ns
Température	ns	ns	ns	+	+	ns
Tween80	ns	ns	ns	ns	ns	ns

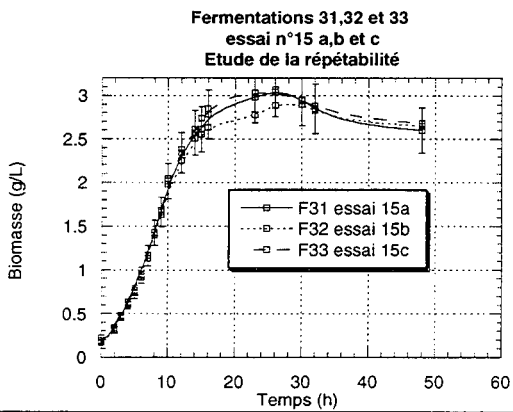
Légende :
 ns = effet non significatif
 + = effet significativement positif (moyenne + >1 fois l'erreur standard)
 ++ = effet significativement positif (moyenne + >2 fois l'erreur standard)
 +++ = effet significativement positif (moyenne + >3 fois l'erreur standard)
 - = effet significativement négatif



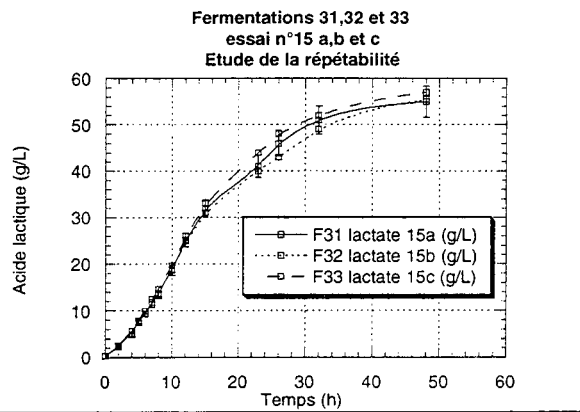
Grphe IV. 32: Fermentations F28-29. Plan d'expérience essais n°13 à 14. Evolution de la concentration en biomasse.



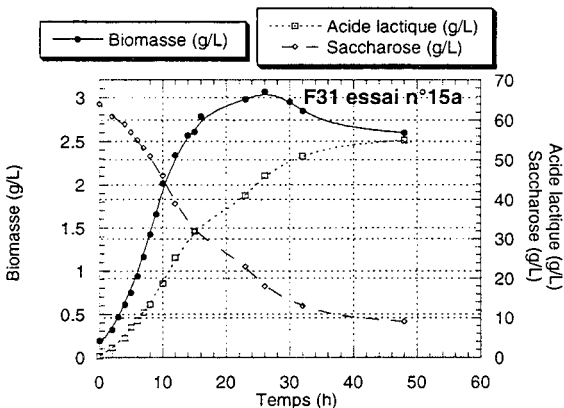
Grphe IV. 33 : Fermentation F30. Plan d'expérience essai n°16. Evolution des concentrations en biomasse, saccharose et acide lactique.



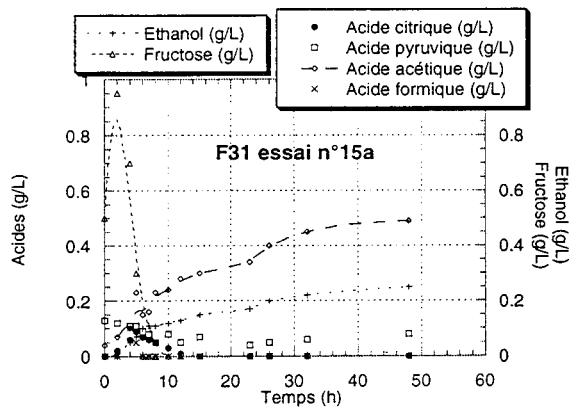
Grphe IV. 34 : Fermentations F31-33. Plan d'expérience essais n°15a à 15c. Evolution comparative de la concentration en biomasse.



Grphe IV. 35 : Fermentations F31-33. Plan d'expérience essais n°15a à 15c. Evolution comparative de la concentration en acide lactique.



Grphe IV. 36 : Fermentation F31. Plan d'exp. essais n°15a. Evolution de la concentration en biomasse, saccharose et acide lactique.



Grphe IV. 37: Fermentation F31. Plan d'exp. essais n°15a. Evolution des concentrations en fructose et des autres métabolites de la fermentation.

3.6.2.3.4.3. Etude de la répétabilité

La fermentation n°31 (essai 15a,b etc) a été réalisée 3 fois simultanément à partir de la même préculture. Les **graphes IV.34 et IV.35** ne montrent aucune différence significative entre les 3 fermentations pour ce qui concerne l'évolution des concentrations en biomasse et en: acide lactique. Les déviations standards entre les trois courbes sont inférieures aux déviations standards des deux dosages (montrés par les barres d'erreur). Les effets observés lors de la réalisation de ce plan d'expérience à deux niveaux peuvent être validés.

3.6.2.3.4.4. Cas de la fermentation n°31 (essai 15)

Le choix de cette fermentation pour l'étude de la répétabilité n'est pas le fruit du hasard. La composition du milieu, limitée en saccharose et riche en source azotée, laissait espérer de très bon résultats à la vue des études précédentes. C'est en effet avec cette fermentation que les meilleurs résultats ont été obtenus. Les quantités maximales de biomasse et d'acide lactique sont respectivement de 3,05 et 57 g/L en 48 heures et sans phase de latence.

Les autres paramètres de la fermentation sont résumés dans le **Tableau IV. 3.13**.

Tableau IV. 3.13 : Principales valeurs cinétiques de la fermentation n°31 (F31)

X_f (g/L)	P_f (g/L)	S_f (g/L)	Fructose _f (g/L)	Durée de latence (h)	Durée de culture (h)	μ_{max} (h ⁻¹)
3,05 ± 0,3	57 ± 3	9 ± 1	<0,1	<2	48	0,28 ± 0,02
Π_{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{Smax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S0}$ (g.g ⁻¹)
5,1 ± 0,5	8,5 ± 1,2	0,05 ± 10 ⁻²	0,95 ± 0,1	1,2 ± 0,1	0,39 ± 0,04	0,88 ± 0,1

Rappel : les signes et lettres grecques employées sont présentées dans la nomenclature.

Tous les paramètres sont améliorés par rapport à la fermentation n°1 (F1) (voir **Tableau IV. 3.1**). La souche croît plus vite et la population est trois fois plus importante, le sucre est presque totalement converti en acide lactique et plus rapidement. Le métabolisme est homofermentaire, la somme des concentrations finales de tous les autres métabolites dosés ne dépasse pas 1 g/L. En fin de fermentation, glucose et fructose ne sont pas détectés au dosage CLHP. Les concentrations des métabolites des voies secondaires et de la voie hétérofermentaire sont très limitées.

3.6.2.3.5. - Conclusions du plan d'expérience

- ➔ Une concentration de 120 g/L de saccharose est inhibant pour la croissance et la production d'acide lactique: Ceci confirme l'étude réalisé sur les sucres. Le mécanisme de cette inhibition demeure néanmoins inconnu car les vitesses spécifiques maximales de croissance, de production et de consommation du saccharose ne sont pas affectées.
- ➔ La souche semble perdre son caractère diauxique lors des fermentations avec 60 g/L de saccharose initial. L'accumulation de fructose est soit très transitoire, soit inexistante. Ceci confirme le rôle de la concentration en saccharose dans l'activation de cette voie.
- ➔ L'extrait de levure est un complément de fermentation indispensable pour augmenter les performances des cultures comme d'autres auteurs le préconisent (Hujanen et Linko, 1996). Les deux types d'extraits testés ont un effet positif sur toutes les réponses. L'extrait de levure liquide a un effet légèrement supérieur sur la quantité d'acide lactique produite. Ces extraits contiennent des facteurs de croissances et des vitamines indispensables à la souche microbiologique.
- ➔ L'extrait bactérien préparé à partir d'hydrolysats cellulaires donne des résultats encourageants en terme de cinétique. Cependant, l'augmentation de la concentration en biomasse est limitée et non significative. Le protocole d'obtention de tels extraits, qui est probablement mal adapté, sera étudié de façon indépendante lors d'une étude spécifique.
- ➔ L'effet des deux sels d'ammonium sur les différentes réponses n'est pas très important. Ceci n'est finalement pas étonnant, car au départ, ils servaient essentiellement à tamponner le milieu de culture. Même si l'on observe, un effet positif de l'hydrogénophosphate diammonium sur la quantité d'acide lactique produite, l'ajout de ces sels est très largement remis en question.
- ➔ Les variations de température et de pH testés n'ont pas d'effet important. Ceci est encourageant quant à la stabilité du procédé futur dans des réacteurs de gros volumes où ces deux paramètres sont difficiles à contrôler. Il est cependant intéressant de noter que la souche a une croissance un peu plus importante à pH 6,4. Les vitesses spécifiques de production de lactate et de consommation du saccharose sont un peu plus importantes à une température de 52°C.
- ➔ Le Tween 80 est connu pour améliorer les transferts de matières entre le milieu extra et intracellulaire (excrétion de l'acide lactique, entrée du sucre) et pour pallier le besoin en biotine de la cellule. Il avait été utilisé avec succès lors de l'étude d'une autre souche productrice d'acide lactique au laboratoire. Les effets du Tween 80 ne sont pas significatifs

pour notre souche, soit parce que la concentration utilisée n'était pas adaptée à notre souche, soit parce que les mécanismes de transfert ne sont pas limitants.

3.6.2.4. - Etude de plusieurs sources azotées de faibles coûts lors de cultures en mode continu.

Précédemment, nous avons confirmé l'efficacité de l'extrait de levure comme complément de fermentation, mais ce produit est onéreux en production industrielle et il serait intéressant de tester d'autres sources beaucoup plus économiques comme le « corn steep » ou les extraits cellulaires.

Lors de l'étude précédente, le protocole de préparation des extraits azotés bactériens ne faisait intervenir qu'un traitement chimique. De nouveaux extraits ont été préparés à partir du protocole décrit dans le **chapitre III** et en **annexe IV**. Les extraits cellulaires sont obtenus après combinaison de deux traitements : une hydrolyse acide ou alcaline et un broyage mécanique par un broyeur à bille. Quatre extraits bactériens sont obtenus et leur pouvoir azoté est testé, et comparé aux effets d'une supplémentation azotée par le « corn steep ».

3.6.2.4.1. Conditions expérimentales

Cette étude a été réalisée en mode continu simple par la méthode des impulsions.

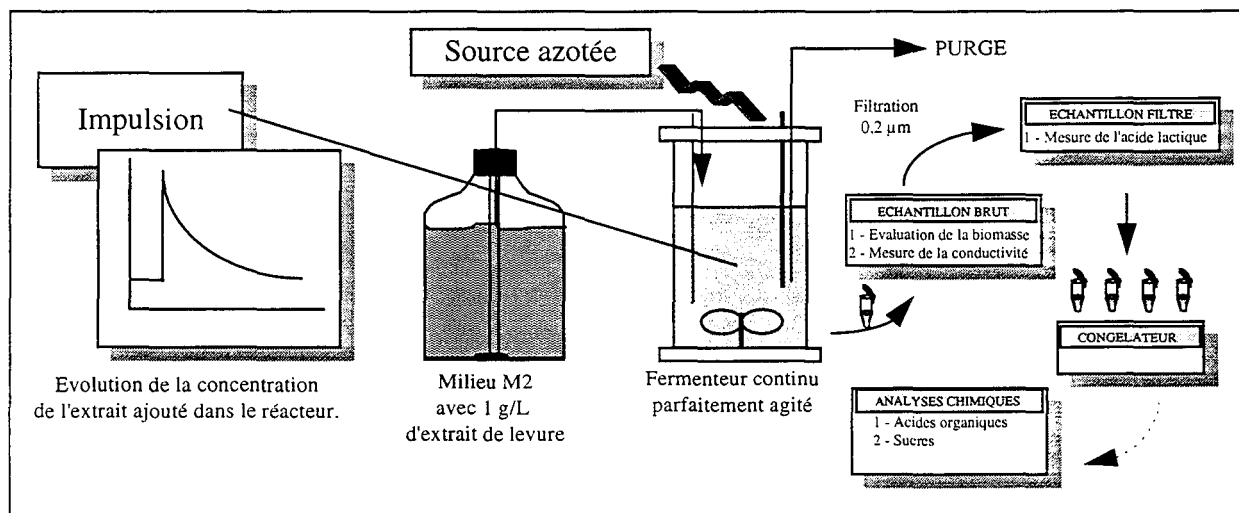


Figure IV. 3.3 : Protocole général des impulsions d'extraits azotés en culture continue.

Le milieu d'alimentation du réacteur continu est de type M2. La concentration d'extrait de levure dans l'alimentation est limitée à 1 ou 2 g/L pour permettre la croissance de *B.coagulans* à une concentration limitée dans le réacteur (**Figure IV. 3.3**). Le taux de dilution est égal au

taux de croissance quand le système est à l'état stationnaire. Le taux de dilution est fixé à $0,15 \text{ h}^{-1}$. Une bonne croissance à ce taux de dilution avait été obtenue lors d'études préliminaires de *B.coagulans* en culture continue avec variation du taux de dilution (voir **chapitre III** - sélection des souches).

L'impulsion de la source azotée dans le réacteur est faite, seulement, lorsque la fermentation est à l'état stationnaire. Cet état stationnaire est théoriquement atteint après cinq fois le temps de passage, soit pour un taux de dilution de $0,15 \text{ h}^{-1}$: **34 heures**. La stabilité de l'état stationnaire est vérifiée toutes les heures, 4 heures avant l'impulsion, par un dosage de la biomasse et une évaluation de la concentration en acide lactique par conductimétrie. L'impulsion est réalisée si ces deux paramètres sont stables à l'erreur de dosage près.

3.6.2.4.2. Impulsion de corn steep en poudre.

Cette manipulation a été conduite à partir du corn steep SOLULYS ® ROQUETTE.

Une culture continue C1 a été menée à partir de jus vert comme source de carbone, milieu M2, et de 2 g/L d'extrait de levure.

Les prélèvements ont été réalisés toutes les demi-heures suivant l'impulsion, puis toutes les heures et enfin de façon plus espacée.

A l'état stationnaire, 5 g de « corn steep » sont ajoutés dans le fermenteur.

3.6.2.4.2.1. Résultats

Le **graphe IV.38** montre l'efficacité de l'impulsion de la source azotée sur la croissance et la production d'acide lactique. L'effet est très largement significatif. Il y a un léger décalage entre le moment de l'impulsion et le pic de biomasse correspondant à un état transitoire de croissance. L'évolution des concentrations en biomasse et acide lactique semblent suivre l'évolution de la concentration en « corn steep », qui tend à revenir à l'état stationnaire précédent l'impulsion.

Cinq réponses ont été suivies lors de cette impulsion. Le **Tableau IV. 3.14** montre la variation des ces réponses entre le pic et l'état stationnaire précédant l'impulsion.

La concentration en biomasse augmente de 110% et la production d'acide lactique de 40% . Cependant, il faut noter que le corn steep ajouté n'était pas totalement soluble, et qu'une partie du trouble observé n'est pas dû à la biomasse de la fermentation. La concentration en biomasse est donc très largement surestimée. Le comptage sur cellule de Thoma n'a été réalisé que 3 heures après l'impulsion, le comptage donne environ 4.10^8 cellules/ml mais la précision est très faible.

Tableau IV. 3.14 : Comparaison de 5 paramètres cinétiques avant et au moment des pics de biomasse et de production d'acide lactique.

	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	S (g/L)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
Etat stationnaire	2 ± 0,2	11,5 ± 0,7	51 ± 8	1,7 ± 0,1	0,85 ± 0,09
Pic	4,2 ± 0,4	16,5 ± 1	41 ± 6	2,5 ± 0,15	0,60 ± 0,06
Variation	+ 110 %	+ 43 %	- 19 %	+ 45 %	-29 %

Néanmoins la conversion donne environ 3 g/L de biomasse, soit 1 g/L de moins que l'estimation donnée par la lecture spectrophotométrique. L'évolution de la biomasse ne serait donc que de + 50 %. La productivité spécifique au niveau du pic serait de 0,82 g.g⁻¹.h⁻¹ et finalement, ce paramètre ne varierait pas de façon significative.

3.6.2.4.2.2. Conclusions

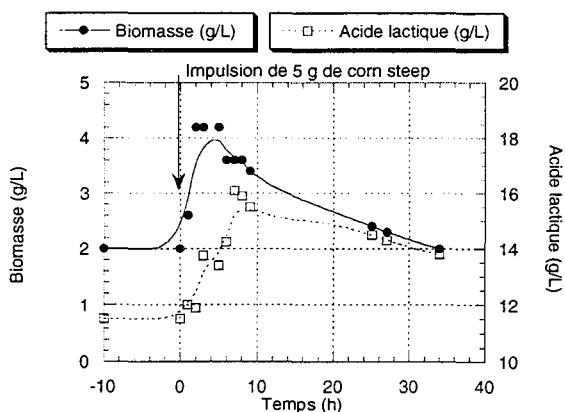
- Le comptage sur cellule de Thoma n'est pas d'une grande précision (>15%), heureusement l'effet de la liqueur de « corn steep » est suffisamment important pour ne pas remettre en cause les résultats.

Une impulsion de 2 g/L de « corn steep » filtré sur filtre 0,2 µm a également été faite, la solution avant ensemencement était bien transparente, mais les effets observés, même s'il sont positifs, sont à la limite du significatif (**graphe IV.39**). La filtration du corn steep a éliminé beaucoup trop de molécules importantes.

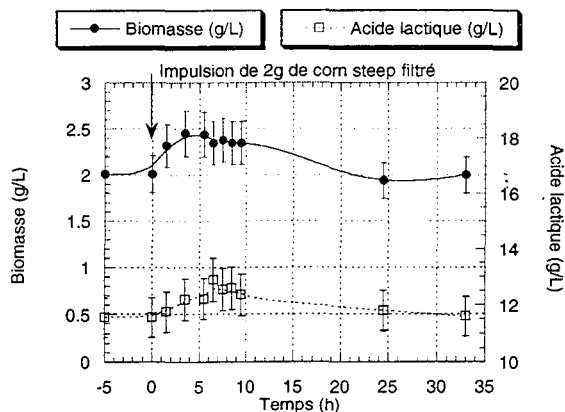
Cependant, le « orn steep » est bien un remplaçant potentiel de l'extrait de levure pour les fermentations lactiques. Il reste à réaliser une étude comparative des effets.

3.6.2.4.3. - Impulsions des extraits cellulaires

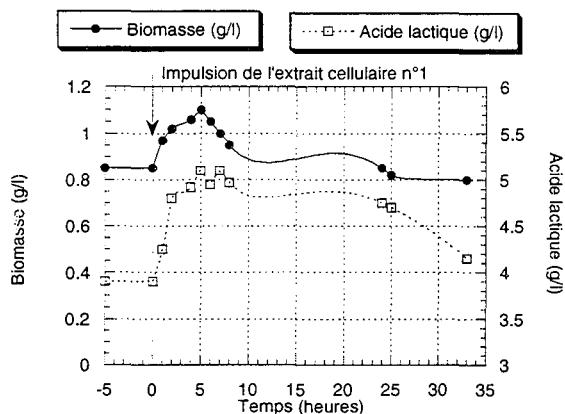
Les impulsions ont été faites à partir des 4 extraits cellulaires préparés au début de cette étude. Les extraits n°1 et 2 ont été obtenus par une hydrolyse alcaline et un broyage mécanique, alors que les extraits n°3 et 4 l'ont été par hydrolyse acide et broyage mécanique (voir **Annexe IV**). Une nouvelle culture en mode continu C2 a été menée, mais avec seulement une concentration de 1 g/L d'extrait de levure dans l'alimentation pour améliorer la visualisation des effets éventuels des extraits testés.



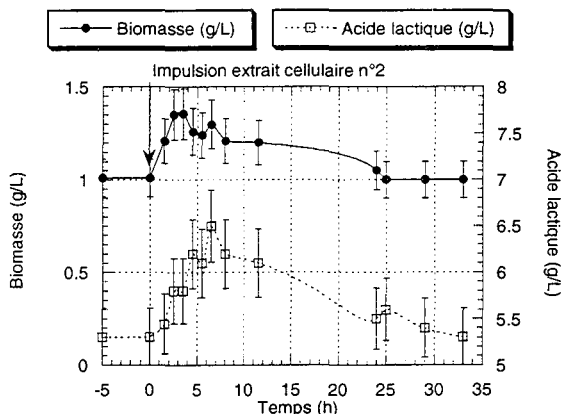
Graphe IV. 38 : Fermentation Continue 1 (C1). Impulsion de 5g de corn steep. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.



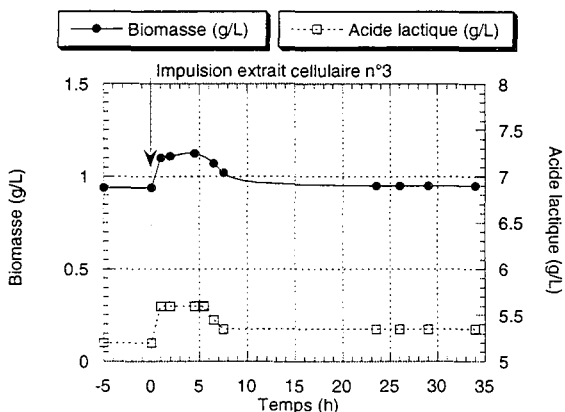
Graphe IV. 39 : Fermentation C1. Impulsion de 2g de corn steep filtré. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.



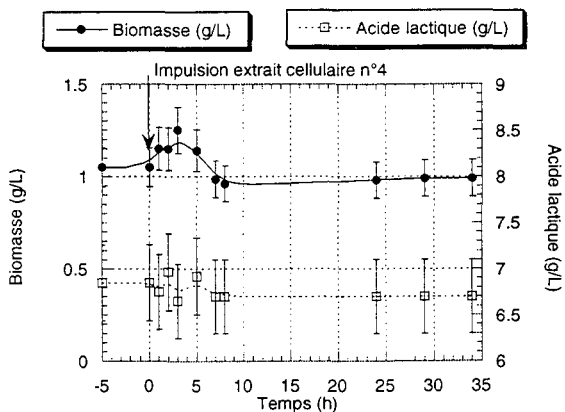
Graphe IV. 40 : Fermentation Continue 2 (C2). Impulsion de l'extrait cellulaire n°1. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 41 : Fermentation C2. Impulsion de l'extrait cellulaire n°2. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 42 : Fermentation C2. Impulsion de l'extrait cellulaire n°3. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 43: Fermentation C2. Impulsion de l'extrait cellulaire n°4. Evolution des concentrations de biomasse et d'acide lactique.

3.6.2.4.3.1. Résultats des extraits n°1 et 2

Les graphes IV.40 et IV.41 représentent l'évolution des concentrations en biomasse et en acide lactique pendant une phase transitoire provoquée par une impulsion d'extrait cellulaire. L'augmentation de la croissance et de la production d'acide est très significative. Les concentrations obtenues sont faibles au regard des concentrations observées lors d'expérimentations précédentes; il faut cependant rappeler que, d'une part l'apport d'extrait de levure par l'alimentation est faible, et d'autre part la fermentation est en mode continu.

Le Tableau IV. 3.15 permet la comparaison des concentrations en biomasse, acide lactique et saccharose, et des productivités avant et après les impulsions des extraits cellulaires. Globalement, il n'existe pas vraiment de différence entre les effets des deux extraits. L'ajout de ces extraits permet une augmentation significative de 30 % en concentrations de cellules et d'acide lactique.

Tableau IV. 3.15 : Comparaison de paramètres cinétiques avant et après les impulsions des extraits cellulaires n°1 et 2.

	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	S (g/L)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
Extrait n°1					
Etat Stationnaire	0,85 ± 0,08	3,95 ± 0,25	54 ± 8	0,59 ± 0,03	0,69
Pic	1,15 ± 0,11	5,15 ± 0,3	47 ± 7	0,77 ± 0,05	0,68
Variation	+ 35 %	+ 30 %	ns	+ 31 %	ns
Extrait n°2					
Etat Stationnaire	1 ± 0,1	5,3 ± 0,3	55 ± 8	0,79 ± 0,05	0,79
Pic	1,3 ± 0,13	6,5 ± 0,4	48 ± 7	0,98 ± 0,06	0,75
Variation	+ 30 %	+ 23 %	ns	+ 24 %	ns

3.6.2.4.3.2. Résultats des extraits n°3 et 4

Les effets obtenus avec ces extraits issus de l'hydrolyse acide sont faibles, les évolutions données par les graphes IV.42 et IV.43 montrent qu'il y a un effet positif, mais qu'il est impossible de conclure au vu des barres d'erreur. La préparation de ces extraits et le protocole employé n'étaient probablement pas adaptés à l'obtention de source d'azote d'origine peptidique, comme va le démontrer le paragraphe suivant.

Ces extraits cellulaires n°3 et 4 ne semblent pas présenter d'intérêt dans notre cas. Une baisse de la productivité spécifique a même été remarquée. Ce qui pourrait montrer une certaine difficulté pour les bactéries à utiliser cet extrait en tant que source d'azote

3.6.2.4.3.3. Bilans azotés sur les extraits cellulaires.

Au cours de la conception des extraits cellulaires, des prélèvements ont été effectués de façon à doser l'azote total disponible pour les cellules. La quantité d'azote total disponible par gramme d'extrait a ensuite été déterminée (**Tableau IV. 3.16**)

Tableau IV. 3.16 : Contenus azotés des 4 extraits cellulaires comparés aux contenus azotés de l'extrait de levure et du corn steep commercial. (se référer à l'annexe IV).

	Azote total (g d'Ntot. / g d'extrait)
Extrait cellulaire N°1	0.060
Extrait cellulaire N°2	0.053
Extrait cellulaire N°3	0.190
Extrait cellulaire N°4	0.190
Extrait de levure liquide Bio Springer® (g/g)	0.079
Corn steep liquide Roquette® (g/g)	0.065

➔ Les extraits cellulaires n°1 et 2 ont une teneur en azote total proche des extraits de levure et du corn steep commercial.

➔ Par contre, les extraits n°3 et 4 sont trois fois plus concentrés en azote total.

Paradoxalement, ce sont les extraits n°3 et 4 qui ont le moins d'effet sur la croissance et la production d'acide lactique lors des impulsions.

L'explication a été trouvée en analysant le protocole de préparation de ces extraits. L'hydrolyse a été beaucoup trop importante et la neutralisation des broyats acides a été réalisée par de l'ammoniaque 32%. Ces extraits contenaient, après analyses (à pH 6,5), environ 95% de sulfate diammonium. En conséquence, les impulsions n°3 et 4 n'ont pas été faites avec des extraits cellulaires, mais avec un sel d'ammonium. Ceci permet de mieux comprendre la teneur en azote total des extraits 3 et 4 donnée dans le tableau précédent, où plus de 90% de l'azote dosé viendrait de l'ammoniaque.

3.6.2.4.3.4. Conclusions sur les extraits cellulaires

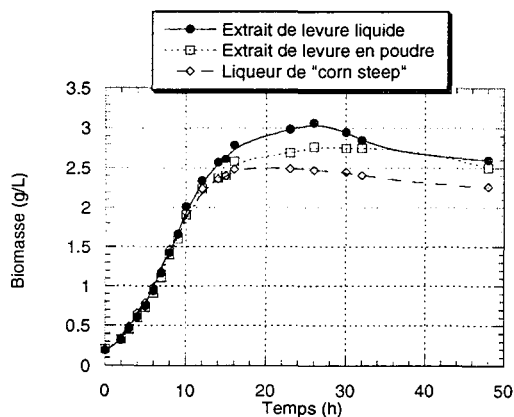
- Les résultats obtenus à partir des extraits cellulaires alcalins sont très intéressants. Ils montrent clairement que la biomasse peut être réutilisée comme source d'azote lors d'une nouvelle fermentation en remplaçant partiellement ou totalement l'extrait de levure. Cette possibilité permet d'envisager un recyclage systématique de la biomasse, le seul co-produit restant à retraiter dans le procédé.
- Il est impossible de conclure sur l'effet des extraits cellulaires acides car le protocole employé n'a pas permis d'obtenir ces extraits avec une pureté suffisante.
- Les sels d'ammonium majoritairement présents dans les extraits 3 et 4 ont une influence très faiblement positive sur la production de biomasse et d'acide lactique. Les effets obtenus ne sont pas significatifs. Ce qui tendrait à prouver que les ions ammonium sont difficilement assimilés comme source d'azote.

3.6.2.4.4. Conclusions sur l'étude en continu

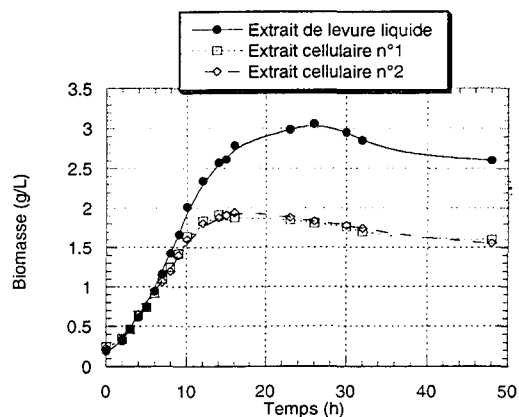
- La méthode des impulsions lors d'une culture continue à l'état stationnaire est une méthode très puissante pour détecter les effets d'une molécule ou d'un composé sur les paramètres de la fermentation.
- La liqueur de « corn steep » est potentiellement intéressante comme source d'azote bon marché, elle pourrait remplacer tout ou une partie de l'extrait de levure utilisé lors des fermentations lactiques.
- Le protocole de production d'extrait cellulaire est à optimiser, néanmoins, les résultats obtenus à partir des extraits cellulaires alcalins sont intéressants. Mais, nous n'avons pas de données comparatives avec les autres sources azotées.
- Les extraits cellulaires acides sont en fait composés à 90% de sulfate d'ammonium (qui est une source potentielle d'azote décrite chez *Bacillus*). Les effets sont faibles et non significatifs. Il faudrait réaliser une impulsion sur une culture alimentée par un milieu sans aucune source azotée. L'extrait de levure présent dans l'alimentation (1 g/L) masque peut-être l'effet des ions ammonium.

3.6.2.5. - Etude comparative des différentes sources azotées

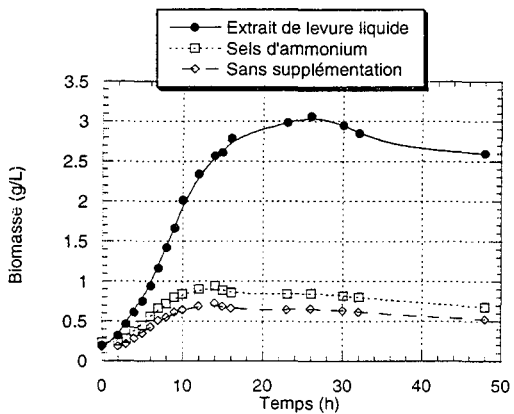
Plusieurs fermentations en mode discontinu sont mises en oeuvre dans les mêmes conditions de température et de pH. Six sources d'azote vont ainsi être testées en parallèle dans une série de 2x3 cultures. Cette étude va permettre de classer les sources d'azote en fonction de leur efficacité sur la production de biomasse et d'acide lactique.



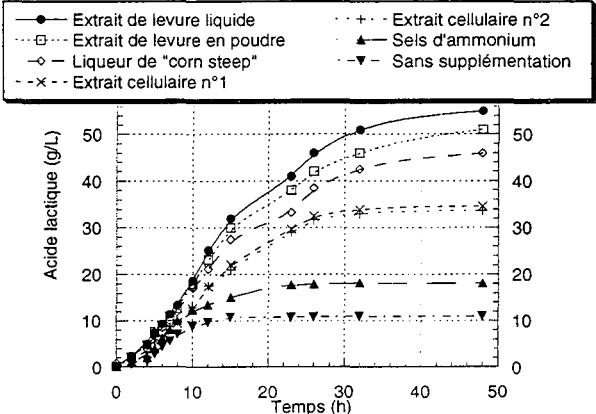
Graphe IV. 44 : Fermentations F34-F36 : Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 45 : Fermentations F34,F37,F38 : Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 46 : Fermentations F34,F39,F40 : Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en biomasse.



Graphe IV. 47 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution de la concentration en acide lactique.

3.6.2.5.1. Conditions expérimentales

7 fermentations notées F34 à F40 sont réalisées à partir de saccharose (60g/L) issu du jus vert et d'une source d'azote; respectivement :

Fermentation F34 = Extrait de levure liquide (E.L. liquide) industriel :	5 g/L
Fermentation F35 = Extrait de levure en poudre (E.L. en poudre) :	5 g/L
Fermentation F36 = Liqueur de « corn steep » :	5 g/L
Fermentation F37 = Extrait cellulaire n°1 (préparé précédemment) :	5 g/L
Fermentation F38 = Extrait cellulaire n°2 (préparé précédemment) :	5 g/L
Fermentation F39 = Sels d'ammonium (NH ₄) ₂ HPO ₄ et (NH ₄) ₂ SO ₄	1 g/L et 1,7 g/L
Fermentation F40 = Témoin négatif : saccharose seul à 60 g/L.	

Les cultures sont faites dans des fermenteurs SGI de 2 litres avec régulation du pH à 6,4 et de la température à 52°C.

3.6.2.5.2. Résultats

Les **graphes IV.44 à IV.46** montrent l'évolution des concentrations en biomasse lors des 6 cultures discontinues. La fermentation F34 qui a comme source d'azote l'extrait de levure liquide sert de témoin positif. C'est avec cette source azotée que les fermentations industrielles sont menées.

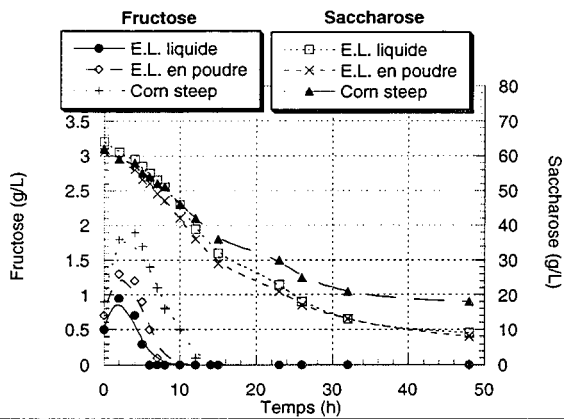
Le **graphe IV.47** représente l'évolution de la concentration en acide lactique analysée pour toutes les fermentations.

Les graphes **IV.48 à IV.50** décrivent les évolutions comparatives des concentrations en saccharose et fructose pour les 6 fermentations.

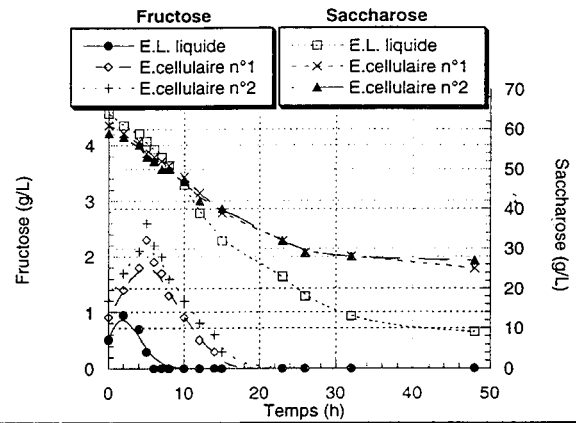
Enfin le **graphe IV.51** permet de déterminer les vitesses spécifiques maximales obtenues lors des différentes fermentations.

3.6.2.5.2.1. Observation des graphes

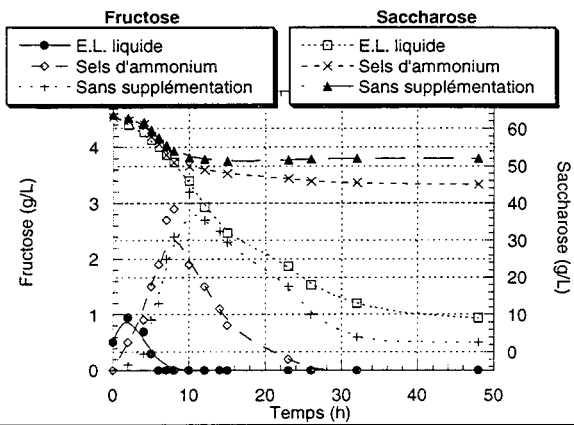
- ➡ L'extrait de levure liquide est la source azotée préférée de *B.coagulans*, la biomasse atteint 3 g/L et il y a moins de 10 g/L de saccharose résiduel à la fin de la fermentation.
- ➡ La liqueur de « corn steep » permet la production de 2,5 g/L de biomasse et 46 g/L d'acide lactique, ce qui est très intéressant.
- ➡ Les fermentations F34 à F38 n'ont pas de phase de latence, par contre les fermentations F39 sur sels d'ammonium et F40 témoin négatif ont une phase de latence, respectivement, de 2 et 3 heures.



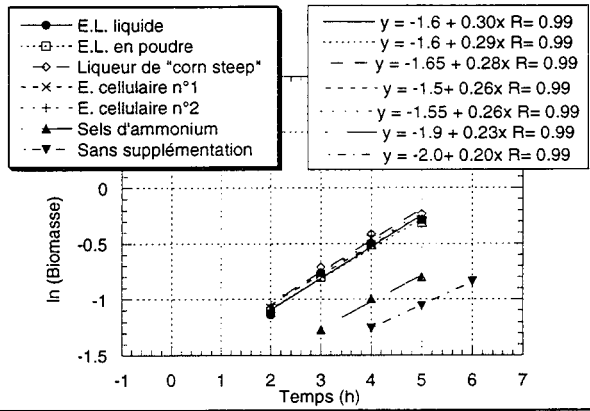
Graphe IV. 48 : Fermentations F34-F36: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution des concentration en sucres.



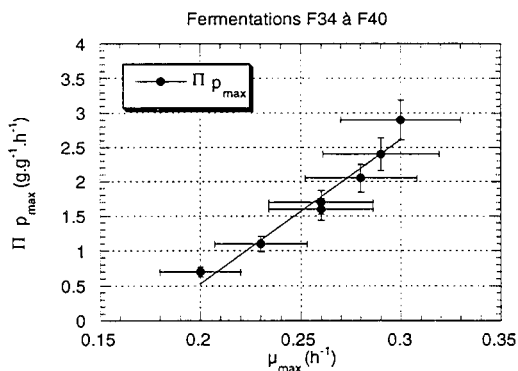
Graphe IV. 49: Fermentations F34,F37,F38: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution des concentration en sucres.



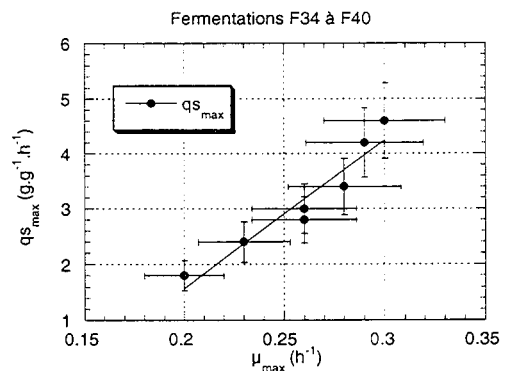
Graphe IV. 50 : Fermentations F34,F39,F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Evolution des concentration en sucres.



Graphe IV. 51 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Calcul des μ_{max} .



Graphe IV. 52 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. Πp_{max} en fonction de μ_{max} .



Graphe IV. 53 : Fermentations F34-F40: Etude comparative de différentes sources azotées. $q_{s_{max}}$ en fonction de μ_{max} .

- ➔ La production de biomasse et d'acide lactique est trois fois plus importante avec l'extrait de levure comme source azotée qu'avec les sels d'ammonium.
- ➔ Les deux extraits cellulaires montrent des effets identiques à la fois sur la production de biomasse et sur la production d'acide lactique.
- ➔ Le pic transitoire de fructose dépend de l'efficacité de la source azotée. Plus la source a un effet positif sur la croissance et la production de lactate, moins le pic de fructose est élevé et plus il a lieu tôt.

Globalement, il est possible de classer les sources d'azote testées en fonction de leur efficacité:

E.L.liquide > E.L. en poudre > « Corn steep » > Extraits cellulaires >> Sels d'ammonium

3.6.2.5.2.2. Observations des paramètres cinétiques

Tableau IV. 3.17 : Principaux paramètres cinétiques estimés et calculés lors de l'étude comparative de la supplémentation par diverses sources azotées.

Fermentation	X _f (g/L)	P _f (g/L)	S _f (g/L)	Fructose Pic (g/L)	Durée de latence (h)	Durée de culture (h)	μ _{max} (h ⁻¹)
F34	3,05 ± 0,3	56 ± 3	9 ± 1	0,9	0	48	0,30 ± 0,03
F35	2,8 ± 0,3	51 ± 3	8 ± 1	1,3	0	48	0,29 ± 0,03
F36	2,5 ± 0,2	46 ± 3	19 ± 3	1,9	0	48	0,28 ± 0,03
F37	1,95 ± 0,2	35 ± 2	25 ± 3	2,3	0	48	0,26 ± 0,03
F38	1,9 ± 0,2	34 ± 2	27 ± 4	2,6	0	48	0,26 ± 0,02
F39	0,95 ± 0,1	18 ± 1	44 ± 6	2,9	2	48	0,23 ± 0,02
F40	0,7 ± 0,1	10,5 ± 0,5	51 ± 7	3,5	3	48	0,20 ± 0,02
	Π _{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	q _{Smax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{X/S} (g.g ⁻¹)	Y _{P/S} (g.g ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	Y _{P/S0} (g.g ⁻¹)
F34	2,9 ± 0,2	4,6 ± 0,7	0,05	1	1,2 ± 0,1	0,4	0,87
F35	2,4 ± 0,2	4,2 ± 0,6	0,05	0,92	1,05	0,38	0,79
F36	2,05 ± 0,1	3,4 ± 0,5	0,05	1	0,96	0,38	0,71
F37	1,7 ± 0,1	3 ± 0,45	0,05	0,88	0,73	0,37	0,55
F38	1,6 ± 0,1	2,8 ± 0,4	0,05	0,89	0,71	0,38	0,55
F39	1,1 ± 0,05	2,4 ± 0,4	0,05	0,9	0,37	0,39	0,28
F40	0,7 ± 0,05	1,8 ± 0,3	0,04	0,75	0,22	0,31	0,17

Les paramètres cinétiques décrits dans le **Tableau IV. 3.17** permettent de confirmer les observations faites directement sur les graphes présentés précédemment. Les vitesses spécifiques maximales de consommation de saccharose et de production d'acide lactique ont été calculées par lissage selon la méthode des fenêtres glissantes. Ces deux paramètres semblent être affectés par la « qualité nutritionnelle » de la source azotée employée. $\dot{\Pi}_{pmax}$ varie de 1 à 3 $g.g^{-1}.h^{-1}$, alors que q_{Smax} varie de 2 à 4,5 $g.g^{-1}.h^{-1}$. L'extrait de levure est la source d'azote la plus efficace.

La productivité spécifique montre que l'état physiologique des cellules varie peu entre les fermentations F34 à F39 (la capacité de production d'une cellule est identique). Elle est plus faible en absence d'une source d'azote.

3.6.2.5.2.3. Conclusion de l'étude comparative

- En accord avec Hujanen et Linko (1996), une supplémentation azotée est indispensable pour un gain de performance, l'absence de cette source lors d'une fermentation affecte tous les paramètres de la fermentation : quantité de biomasse et d'acide lactique produite, vitesses et rendements.

- L'augmentation de la production d'acide lactique suit l'augmentation de la production de biomasse. Les vitesses maximales de consommation de saccharose et de production d'acide lactique suivent linéairement les vitesses spécifiques maximales de croissance comme le montrent les **graphes IV.52 et IV.53**. Les sources azotées ont un effet sur la production de biomasse. L'augmentation de la vitesse de production et de la quantité d'acide lactique produite est la conséquence de l'augmentation de la vitesse de production et de la quantité de catalyseur généré (biomasse).

- L'extrait de levure est la source d'azote la plus efficace sur la croissance de *B.coagulans*. Le rendement de bioconversion du saccharose en acide lactique atteint presque 90% et la productivité atteint 1,2 $g.l^{-1}.h^{-1}$ soit 4 à 5 fois plus que la valeur obtenue lors de la fermentation « témoin négatif ».

- La liqueur de « corn steep » est un substituant très intéressant des extraits de levures, car il est 4 à 5 fois moins cher que l'extrait de levure pour une efficacité légèrement plus faible.

- Les extraits cellulaires sont également très prometteurs pour la valorisation de la biomasse produite, notamment, lors des cultures avec recyclage cellulaire. Néanmoins, il est maintenant clair que ces extraits ne pourront être utilisés seuls pour améliorer les performances du procédé et qu'un mélange de plusieurs sources azotées est envisageable. Il n'existe aucune différence significative entre les extraits cellulaires n°1 et 2.

- Les ions ammonium sont en excès dans la fermentation n°39; il semble que cet ion ait un effet très faible sur la production de biomasse et d'acide lactique (comme l'avait déjà démontré l'étude précédente). Ceci confirmerait les travaux déjà réalisés sur les bacilles thermophiles qui démontreraient la possibilité d'utilisation limitée des ions ammonium comme source d'azote.

3.6.3. Conclusions sur l'étude des sources d'azote

① Une supplémentation azotée est nécessaire pour améliorer les performances des fermentations avec *B.coagulans* comme pour d'autres souches de bactéries lactiques (Aeschlimann et Von Stockar, 1990 ; Amrane et Prigent, 1993). Les vitesses de production, les rendements et les productivités sont améliorés d'un facteur de 2 à 6 fois en fonction du paramètre observé et de la source d'azote utilisée. Même si la souche modèle étudiée peut se développer sur milieu sans source azotée, la croissance est très faible. Le **Tableau IV.3.18** permet de comparer le gain de performance entre la première fermentation F1 et les fermentations complétement azotées. Après la première série d'étude, la productivité a été doublée et le rendement de bioconversion est passé de 0,28 à 0,90%.

② L'extrait de levure est le co-substrat le plus efficace, mais aussi le plus cher des sources azotées testées. Le « corn steep » et les extraits cellulaires sont des substituants possibles de l'extrait de levure, ils permettraient de diminuer les coûts liés à l'ajout des co-substrats ou de retraiter la biomasse produite lors de fermentations précédentes. Cependant, il est souhaitable de ne substituer qu'une partie de l'extrait de levure pour conserver une efficacité optimale comme le préconisait déjà Hujanen et Linko en 1996. En comparant les fermentations F31 du plan d'expérience (composé de 2g/L d'extrait de levure liquide + 2 g/L d'extrait de levure en poudre + 2 g/L d'extrait cellulaire) et la fermentation F34 (5 g/L d'extrait de levure liquide), il est clair que les résultats sont très proches (**Tableau IV.3.18**) et que la substitution partielle de l'extrait de levure est la bonne solution.

③ Les sources testées contiennent un ou plusieurs éléments limitants de la croissance de *B.coagulans*. La fermentation est relativement stable en présence d'extraits azotés. Mais, les expérimentations menées ne permettent pas de caractériser ces éléments limitants (peptides, oligo-éléments ou vitamines).

Tableau IV. 3.18 : Comparaison des performances entre les fermentations F1, F31, F34 et F40 (témoin sans source azotée).

Fermentation	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	$q_{S\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$\Pi_{p\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S0}$ (g.g ⁻¹)
1	1,9	29	0,2	2,8	2,1	0,54	0,28
31	3,05	57	0,28	8,5	5,1	1,2	0,91
34	3,05	56	0,3	4,6	2,9	1,2	0,87
40	0,7	10,5	0,2	1,8	0,7	0,22	0,22
déviatiion standard	10%	6%	10%	15%	10%	6%	15%

3.7. - Etude d'une supplémentation en sels

L'extrait de levure semi-pâteux (liquide) contient des vitamines, du potassium, sodium, zinc et des acides aminées comme le montre l'Annexe II. Cet extrait de levure est dessalé et à 65% d'extrait sec. L'analyse bibliographique a montré que certains ions sont utilisés comme cofacteurs de certaines enzymes du métabolisme des bactéries lactiques et surtout des lactobacilles. Six sels ont été retenus pour leurs effets positifs décrits dans la littérature sur la production de biomasse et d'acide lactique : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, KH_2PO_4 , MgSO_4 , MnSO_4 , FeSO_4 .

3.7.1. - Objectifs

- 1 L'étude doit permettre de décrire les effets éventuels des sels sur la croissance de *B.coagulans* et sur la production d'acide lactique.
- 2 Les expérimentations doivent être courtes et précises pour déterminer si une supplémentation en sels est réellement nécessaire pour la souche modèle.

3.7.2. - Conditions expérimentales

La méthode des impulsions lors d'une culture en mode continu à l'état stationnaire a été choisie. Le milieu d'alimentation est composé essentiellement de 60 g/L de saccharose et de 2 à 6 g/L d'extrait de levure liquide pour permettre une croissance à un taux de dilution de 0,15 h⁻¹ sans limitation de source azotée. La valeur de consigne du pH et de la température est fixée respectivement à 6,4 et 52°C. L'effet de l'impulsion est suivi pendant 7 fois le temps de passage, soit environ 50 heures pour tenir compte du décalage éventuel dû à une croissance. La quantité des sels ajoutés lors des impulsions est dictée par les valeurs les plus souvent rencontrées dans la littérature pour la composition des milieux de culture.

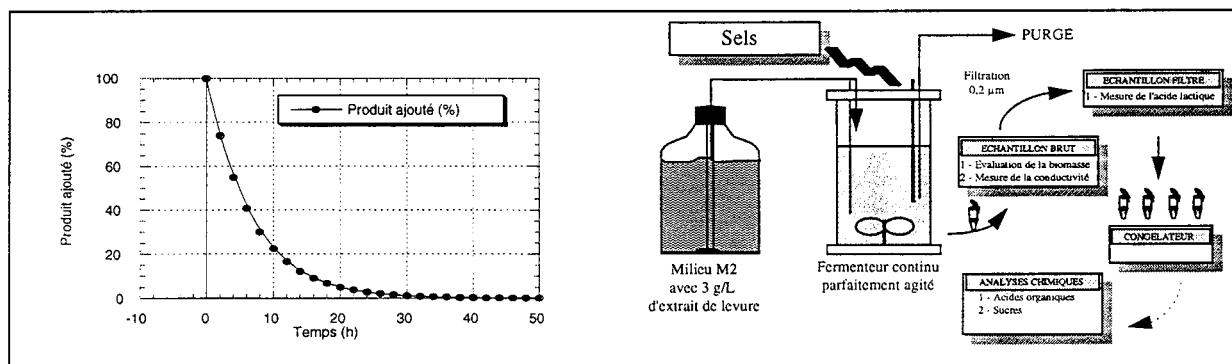
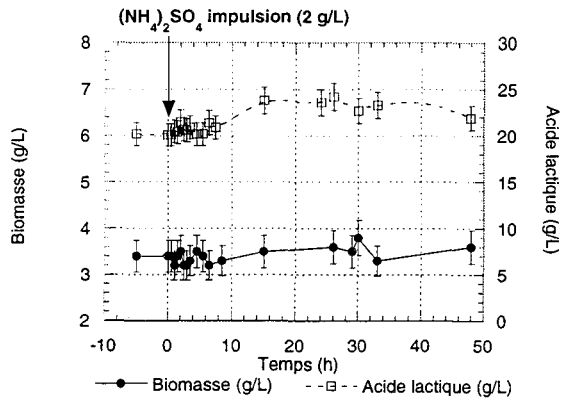
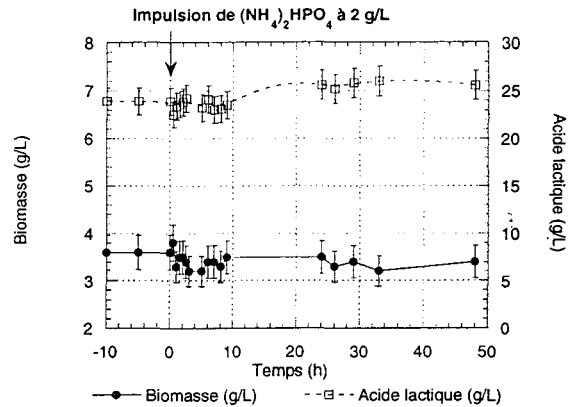


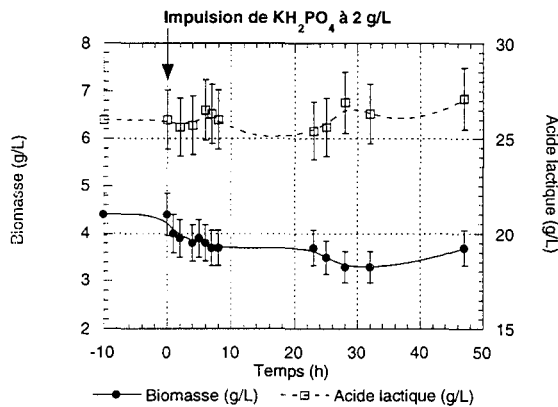
Figure IV. 3.4 : Protocole général des impulsions de sels, évolution de la concentration en molécule ajoutée en (%) en fonction du temps (h).



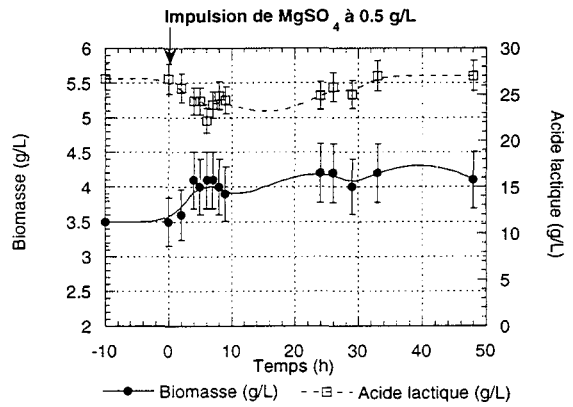
Graphe IV. 54 : Fermentation continue C3: Impulsion de 2 g/L de (NH₄)₂SO₄. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



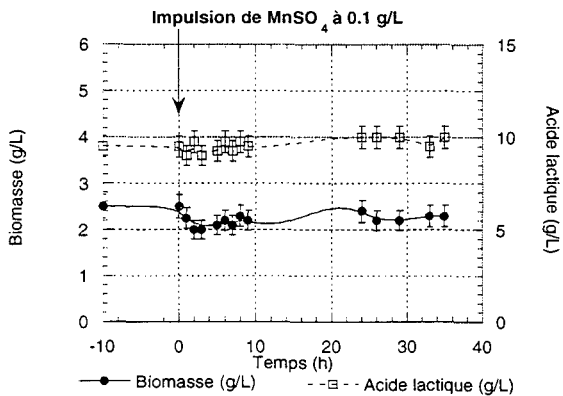
Graphe IV. 55: Fermentation continue C3: Impulsion de 2 g/L de (NH₄)₂HPO₄. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



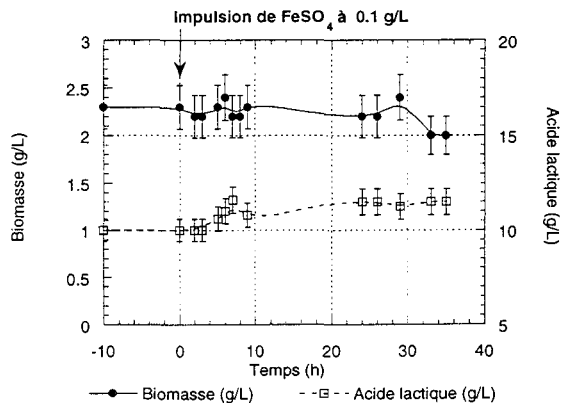
Graphe IV. 56 : Fermentation continue C3: Impulsion de 2 g/L de KH₂PO₄. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 57 : Fermentation continue C3: Impulsion de 0,5 g/L de MgSO₄. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 58 : Fermentation continue C4: Impulsion de 0,1 g/L de MnSO₄. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 59 : Fermentation continue C4: Impulsion de 0,1 g/L de FeSO₄. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.

L'évolution de la concentration en molécule ajoutée en (g/L) dans le réacteur suit une loi exponentielle du type :

$$Y = Y_0 \cdot e^{\left(-\frac{T}{\tau}\right)}$$

Y_0 = Concentration de la molécule au moment de l'impulsion (g/L)

T = Temps (h)

τ = Temps de passage (h)

3.7.3. - Résultats des impulsions

Les graphes IV.54 à IV.59 décrivent l'évolution des concentrations en acide lactique et en biomasse pour les 6 impulsions réalisées. Les 4 premières impulsions ont été réalisées lors d'une culture continue C3 avec une concentration en extrait de levure dans le milieu d'alimentation de 6 g/L. Par contre, l'impulsion avec le sulfate de fer et le sulfate de manganèse a été réalisée lors d'une culture continue C4 avec une concentration en extrait de levure limitée à 2 g/L.

3.7.3.1. - Impulsion de 2 g/L de $(NH_4)_2SO_4$

L'évolution de la concentration en biomasse est non significative (graphe IV.54), par contre, l'augmentation de la concentration en acide lactique est significative. La concentration passe de 20,1 g/L à l'état stationnaire à 24,5 g/L, 15 heures après l'impulsion. Il faut noter que le dosage de l'acide lactique a été réalisé par dosage enzymatique spécifique et non par conductivité car les ions ammonium ajoutés auraient pu interférer sur le dosage.

3.7.3.2. - Impulsion de 2 g/L de $(NH_4)_2HPO_4$

Le graphe IV.55 montre clairement que l'hydrogénophosphate diammonium n'a pas d'effet significatif à la concentration testée sur la croissance. Cependant, tous les dosages d'acide lactique réalisés 10 heures après l'impulsion sont systématiquement supérieurs à la valeur à l'état stationnaire, mais malheureusement, de façon non significative. Cette observation ne peut être qu'une tendance. L'effet de ce sel d'ammonium est peut être masqué par une supplémentation trop importante en source azotée dans l'alimentation. Les conditions de limitation en phosphate ne sont probablement pas réunies, compte tenu de sa présence dans l'extrait de levure. Enfin, les ions ammonium sont en excès à cause de la régulation par l'ammoniaque.

3.7.3.3. - Impulsion de 2 g/L de KH_2PO_4

Le dihydrogénophosphate de potassium ne présente pas d'intérêt comme complément de fermentation. Comme le décrit le **graphe IV.56**, la concentration en acide lactique n'évolue pas de façon significative. Parallèlement, la diminution de la concentration en biomasse est significative dès l'impulsion du sel.

3.7.3.4. - Impulsion de 0,5 g/L de $MgSO_4$

La concentration en biomasse augmente pendant la phase transitoire de façon significative (**graphe IV.57**). La concentration passe de 3,5 à 4,3 g/L en 20 heures. La concentration en acide lactique n'évolue pas de façon significative malgré la présence de cellules supplémentaires.

3.7.3.5. - Impulsion de 0,1 g/L de $MnSO_4$ et 0,1 g/L de $FeSO_4$

Les deux **graphes IV.58 et IV.59** ne montrent aucune évolution significative de la croissance ou de la production d'acide lactique. Ces deux expérimentations ont été menées lors de deux cultures continues différentes. Même si le pic, suivant l'impulsion de $FeSO_4$, semble significatif, l'effet est faible et de courte durée. L'intérêt pour ces deux sels est donc très limité.

3.7.4. - Conclusions sur l'étude de la supplémentation en sels

① Les sels testés lors de cette étude n'ont pas donné de résultats intéressants. Il n'est probablement pas nécessaire de supplémenter en sels des fermentations déjà riches en sources azotées. En effet, pour un milieu de culture composé avec 6 g/L d'extrait de levure, il y a 0,25 g/L de potassium inorganique (voir **Annexe II**). Par contre, certains de ces sels pourraient être utiles lors de conditions spécifiques de fermentation, par exemple, si l'on voulait privilégier la croissance par rapport à la production d'acide lactique ou inversement.

② Parmi les 6 expérimentations menées, seuls deux sels sont potentiellement intéressants : le sulfate diammonium qui permet une amélioration de la production de lactate sans produire plus de biomasse et, à l'inverse, le sulfate de magnésium qui favorise la croissance au dépend de la formation d'acide lactique. L'ion Mg^{2+} est connu des auteurs pour être un cofacteur de certaines réactions enzymatiques et notamment de la phosphorylation du fructose en fructose 6-P par une phosphofructokinase (Teuber, 1993).

③ Les cultures continues C3 et C4 à l'état stationnaire ont permis de déterminer deux paramètres cinétiques importants : le rendement de bioconversion et la productivité à l'état

stationnaire. Ces deux paramètres varient de façon très importante en fonction de la composition du milieu d'alimentation et notamment de la concentration en extrait de levure. Pour un même taux de dilution, le rendement et la productivité passent respectivement de 18 à 42 % et de 1,5 à 4 g.L⁻¹.h⁻¹ quand la teneur en source azotée passe de 2 à 6 g/L. Il est important de signaler que le rendement global de bioconversion $Y_{p/s0}$ (concentration en lactate produit sur saccharose dans l'alimentation) est beaucoup plus faible que lors des fermentations discontinues. Par contre, un calcul rapide du rendement instantané $Y_{p/s}$ (concentration en lactate produit/saccharose consommé) est proche de 95% à l'erreur près.

Tableau IV. 3.19 : Résumé des principaux résultats sur l'effet des sels.

Sel testé	Extrait de levure dans l'alimentation	Evolution de la biomasse	Evolution du lactate	Rendement de bioconversion $Y_{p/s0}$ (%)	Productivité maximale δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	6 g/L	ns	+ 22 %	41	3,7
(NH ₄) ₂ HPO ₄	6 g/L	ns	ns	43	3,9
KH ₂ PO ₄	6 g/L	- 20 %	ns	45	4,05
MgSO ₄	6 g/L	+ 23 %	ns	43	3,9
MnSO ₄	2 g/L	ns	ns	17	1,5
FeSO ₄	2 g/L	ns	ns	19	1,7

ns : effet non significatif

3.8. - Etude d'une supplémentation en vitamines

Quelques vitamines et acides aminés sont présents dans l'extrait de levure ou la liqueur de « corn steep » à des concentrations très variables (voir **annexes II**). L'étude bibliographique a démontré que les exigences nutritionnelles des lactobacilles étaient plus importantes que pour les bacilles notamment pour les vitamines. Huit vitamines sont connues comme stimulantes de la croissance ou de la production de lactate chez les bactéries lactiques: Thiamine, riboflavine, acide nicotinique, acide pantothénique, pyridoxal, biotine, acide folique et cyanocobalamine.

3.8.1. - Objectifs

- ❶ Déterminer si une supplémentation en vitamines est nécessaire pour améliorer la croissance et la production d'acide lactique de *B.coagulans*.
- ❷ Les vitamines présentes dans les sources d'azote testées sont-elles les facteurs principaux de l'amélioration des performances de la souche modèle?

3.8.2. - Démarche expérimentale

Deux méthodes ont été mises en oeuvre pour atteindre les deux principaux objectifs. Premièrement, chaque vitamine a été ajoutée individuellement selon la méthode des impulsions lors d'une culture continue C5 à un taux de dilution de $0,15 \text{ h}^{-1}$ appauvrie en source d'azote (2g/L). Cette série d'impulsion a été menée avec régulation du pH et de la température de fermentation respectivement à 6,4 et 52°C . Cette expérience permettra de déterminer l'auxotrophie éventuelle de la souche pour une, ou plusieurs vitamines.

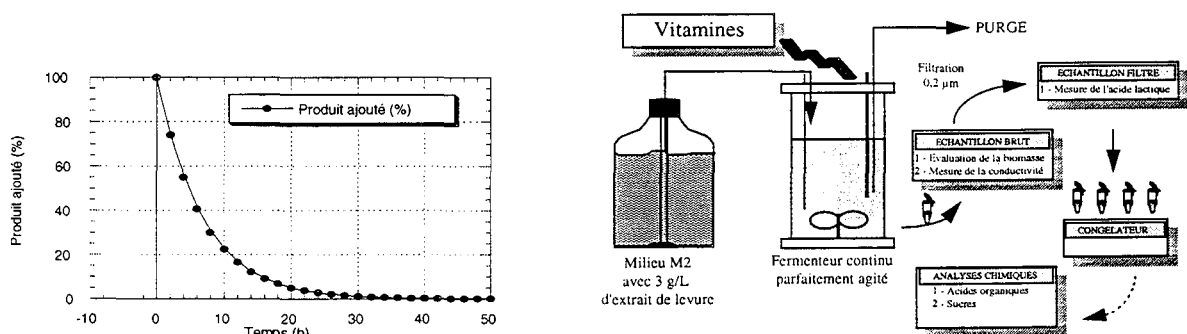


Figure IV. 3.5 : Protocole général des impulsions de vitamines, évolution de la concentration en molécule ajoutée en (%) en fonction du temps (h).

Le choix de la concentration de l'impulsion de chaque vitamine a été dicté par les travaux de Kuhn et al., 1979, qui avait défini les besoins minimum en vitamines pour une souche de *Bacillus caldotenax*. Les mêmes concentrations ont été reprises et adaptées à notre souche :

- Thiamine - HCl : 150 µg/L
- Riboflavine : 150 µg/L
- Acide nicotinique : 1500 µg/L
- Acide pantothénique : 1000 µg/L
- Pyridoxal : 75 µg/L
- Biotine : 30 µg/L
- Acide folique : 6 µg/L
- Cyanocobalamine : 100 µg/L

Deuxièmement, un mélange des huit vitamines (aux concentrations définies précédemment) a été réalisé et ajouté à deux milieux de culture de composition respective :

Fermentation F41	Fermentation F42
Saccharose 60g/L issu du jus vert	Saccharose 60g/L issu du jus vert
Extrait de levure liquide 5 g/L	
Mélange des huit vitamines	Mélange des huit vitamines

Ces deux fermentations ont été réalisées dans les mêmes conditions que les expérimentations sur les sources d'azote pour permettre une étude comparative.

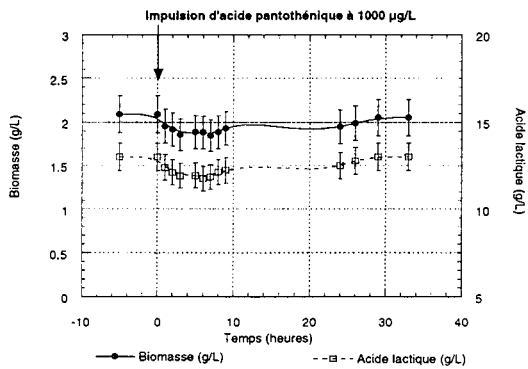
3.8.3. - Résultats des impulsions de vitamines

3.8.3.1. - Impulsion d'acide pantothénique

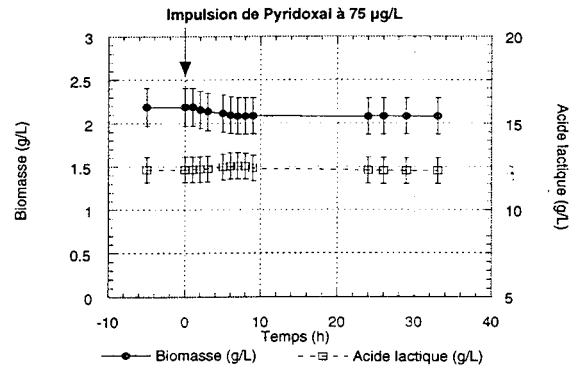
Lors de cette impulsion à 1 mg/L, aucune variation significative de concentration n'a été observée, aussi bien pour la biomasse que pour l'acide lactique (**graphe IV.60**). L'amplitude de la légère baisse que l'on peut observer juste après l'impulsion est largement inférieure à la déviation standard des valeurs des analyses spectrophotométriques et enzymatiques.

3.8.3.2. - Impulsion de pyridoxal

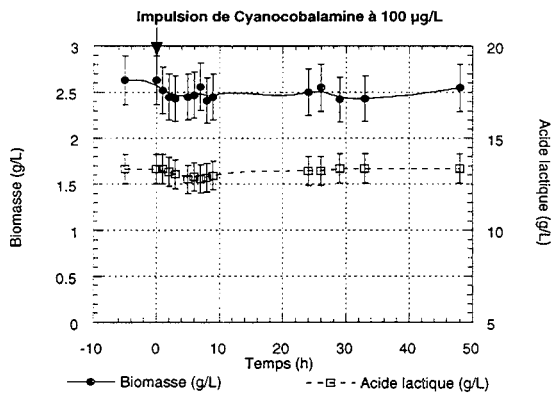
Comme avec le Pantothénate, cette impulsion à 75 µg/L n'a eu aucun effet significatif sur la croissance ou la production d'acide (**graphe IV.61**).



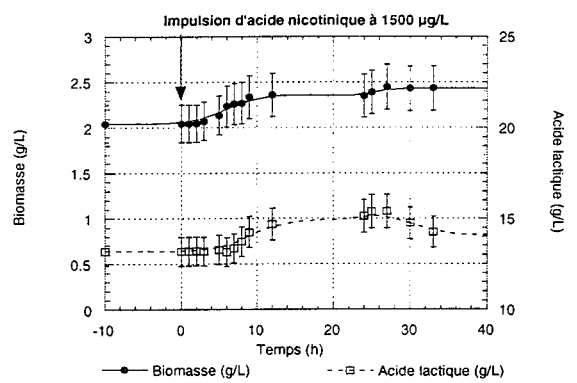
Graphe IV. 60 : Fermentation continue C5: Impulsion de 1 mg/L d'acide pantothénique. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



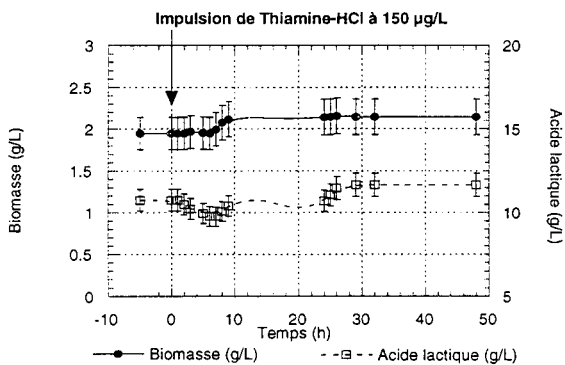
Graphe IV. 61: Fermentation continue C5: Impulsion de 75 µg/L de pyridoxal. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



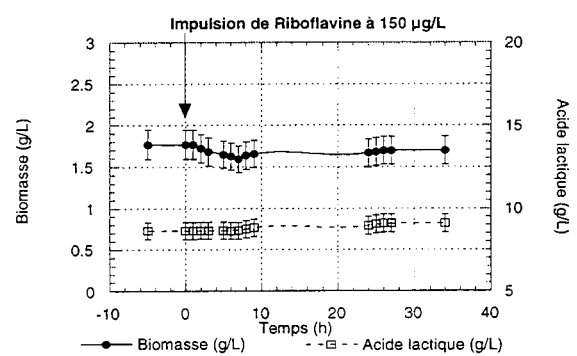
Graphe IV. 62 : Fermentation continue C5: Impulsion de 100 µg/L de cyanocobalamine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 63 : Fermentation continue C5: Impulsion de 1,5 mg/L d'acide nicotinique. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 64 : Fermentation continue C5: Impulsion de 150 µg/L de thiamine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 65 : Fermentation continue C5: Impulsion de 150 µg/L de riboflavine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.

3.8.3.3.- Impulsion de cyanocobalamine

Lors de cette impulsion à 100 µg/L aucun effet significatif n'a été noté pour la vitamine B12 (**graphe IV.62**).

3.8.3.4. - Impulsion d'acide nicotinique

L'impulsion a été réalisée à 1.5 mg/L. L'acide nicotinique permet d'augmenter la concentration en acide lactique de façon significative alors que la biomasse augmente légèrement mais de façon non significative (**graphe IV.63**). C'est la biomasse qui augmente la première au bout de la troisième heure de l'impulsion lorsque la concentration en vitamine théorique est de 950 µg/L. L'acide lactique commence à augmenter au bout de huit heures alors que la concentration en acide nicotinique est de 450 µg/L, mais le lactate atteint un plateau en même temps que la biomasse après la douzième heure suivant l'impulsion alors qu'il ne reste plus théoriquement que 200 µg/L de vitamine dans le réacteur.

L'acide nicotinique semble être une vitamine intéressante pour *Bacillus coagulans*, car il permet d'augmenter la productivité globale sans augmenter significativement la biomasse.

3.8.3.5. - Impulsion de thiamine-HCl

Lors de cette impulsion à 150 µg/L, les augmentations de concentrations en acide lactique et en biomasse ne sont pas significatives. La variation observée à partir de la vingtième heure suivant l'impulsion est entièrement due à un problème de taux de dilution provoqué par un colmatage transitoire du tuyau d'alimentation (**graphe IV.64**).

3.8.3.6. - Impulsion de riboflavine

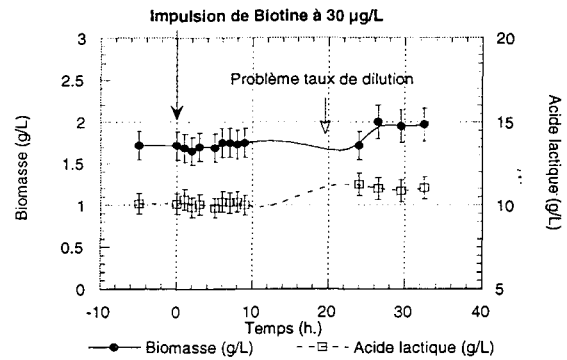
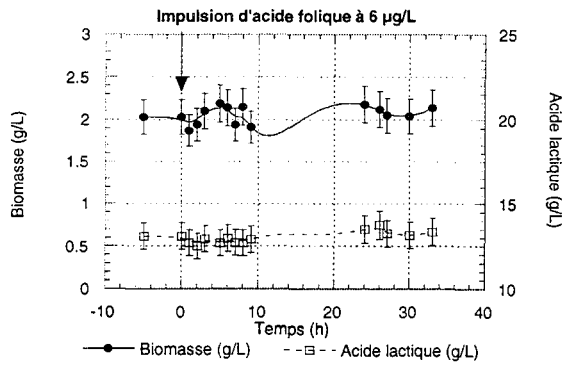
Le **graphe IV.65** montre clairement que la riboflavine n'a entraîné aucune variation significative des concentrations en cellules et en lactate d'ammonium, tout du moins à une concentration de 150 µg/L.

3.8.3.7. - Impulsion d'acide folique.

L'acide folique à une concentration de 6 µg/L, tout comme la riboflavine, n'entraîne aucune variation significative de la croissance ou de la production (**graphe IV.66**).

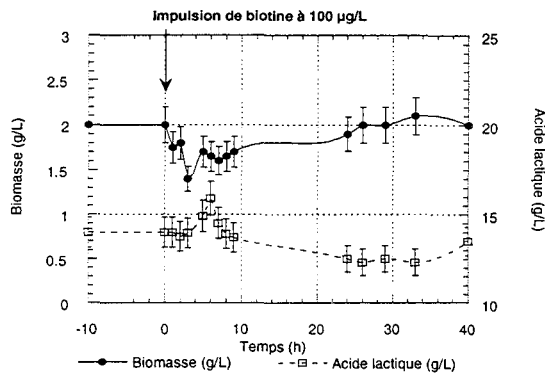
3.8.3.8. - Impulsion de 30 µg/L de biotine

Cette impulsion ne permet pas d'observer de variation significative de la croissance ou de la production d'acide pendant les vingt premières heures (**graphe IV.67**).

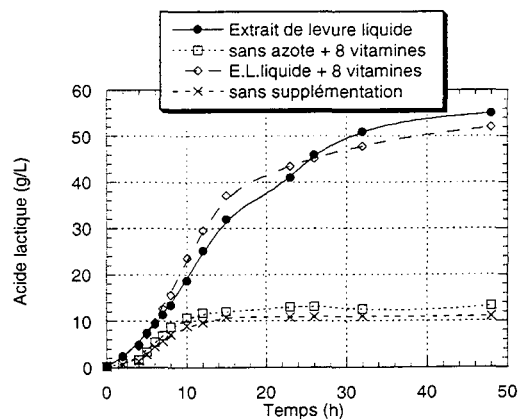
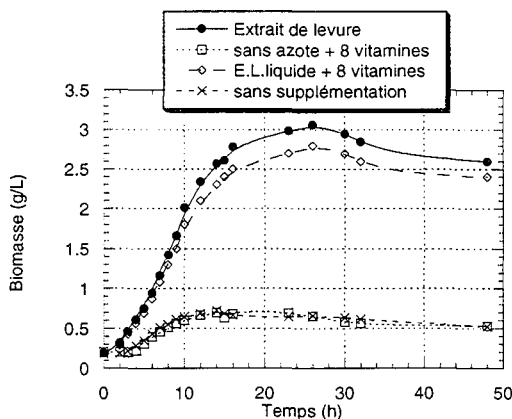


Graphe IV. 66 : Fermentation continue C5: Impulsion de 6 µg/L d'acide folique. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.

Graphe IV. 67: Fermentation continue C5: Impulsion de 30 µg/L de biotine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 68 : Fermentation continue C5: Impulsion de 100 µg/L de biotine. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 69 : Fermentations F34, F40, F41 et F42: Effet des vitamines en culture discontinue. Effet sur la production de biomasse.

Graphe IV. 70 : Fermentations F34, F40, F41 et F42: Effet des vitamines en culture discontinue. Effet sur la production d'acide lactique.

L'augmentation qui suit est due à un problème de pompe d'alimentation qui a fait varier sensiblement le taux de dilution. Il semblerait cependant que la biotine n'ait pas d'effet, à cette concentration.

3.8.3.9. - Impulsion de 100 µg/L de biotine

Pour terminer cette étude sur les impulsions de vitamines, une impulsion de biotine à 100 µg/L a été ajoutée à une culture à l'état stationnaire. Afin de vérifier l'absence d'effet de la biotine sur notre souche, la concentration d'impulsion est plus élevée. Le **graphe IV.68** montre que la biotine a un effet significatif de très courte durée sur la croissance et la production d'acide lactique. Il semble que les bactéries soient en partie lysées par une trop grande quantité de biotine; ce qui explique la chute rapide de densité optique suivant l'impulsion. De même, le pic d'acide lactique qui a lieu au même moment est très probablement dû au lactate intracellulaire s'échappant des cellules lysées.

3.8.4. - Résultats sur l'effet des huit vitamines en culture discontinue

Les deux fermentations nommées F41 et F42 ont été menées simultanément à partir de la même préculture et dans les mêmes conditions que lors de l'étude sur les sources azotées. C'est d'ailleurs avec deux des fermentations de l'étude des sources azotées que nous allons comparer ces deux nouvelles fermentations.

Fermentations déjà réalisées :

Fermentation F34 = Saccharose 60 g/L (jus vert) + Extrait de levure liquide 5 g/L

Fermentation F40 = Saccharose 60 g/L (jus vert)

Fermentations de cette étude :

Fermentation F41 = Saccharose 60 g/L (jus vert) + Extrait de levure liquide 5 g/L + Vitamines

Fermentation F42 = Saccharose 60 g/L (jus vert) + Vitamines

3.8.4.1. - Observation des graphes

Les **graphes IV.69 et IV.70** montrent les évolutions comparatives des concentrations en biomasse et en acide lactique pour les fermentations F34, F40, F41 et F42. Les prélèvements, les temps de précultures, le pH et la température de régulation ont été réalisés de manière identique. Il n'y a visiblement pas de différences significatives sur la croissance ou la production d'acide en présence ou en absence de vitamines. L'évolution des concentrations des fermentations F34 et F41 puis F40 et F42 sont pratiquement identiques.

3.8.4.2. - Observation des paramètres cinétiques

Le **Tableau IV. 3.20** confirme les observations faites précédemment.

Les concentrations finales, les vitesses spécifiques, la productivité et le rendement sont très comparables deux à deux. Lorsque le milieu de culture est supplémenté en vitamines, les performances ne sont pas améliorées en terme de gain de productivité globale et en terme de rendement (même lorsque la concentration en source d'azote est élevée).

En absence de supplémentation d'azote, la supplémentation en vitamines n'a aucun effet significatif. Les vitamines ne sont pas l'élément limitant principal de la croissance.

Avec 5 g/L d'extrait de levure liquide, les vitesses de consommation du saccharose et de production de lactate sont sensiblement meilleures, mais c'est à la limite du significatif. Par contre, les autres paramètres ne sont pas améliorés et parfois plus faibles.

Tableau IV. 3.20 : Comparaison des paramètres cinétiques des fermentations F34, F40, F41 et F42.

Fermentation	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	$q_{S\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$\Pi_{p\max}$ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S0}$ (g.g ⁻¹)
34	3,05	56	0,3	4,6	2,9	1,2	0,87
40	0,7	10,5	0,2	1,8	0,7	0,22	0,22
41	2,8	51	0,31	5,8	3,4	1,05	0,82
42	0,8	13	0,19	2,0	0,9	0,27	0,21
déviation standard	10%	6%	10%	15%	10%	6%	15%

3.8.5. Conclusion de l'étude sur la supplémentation en vitamines

① Aucune des 8 vitamines testées n'est indispensable à la croissance de *B.coagulans* dans les conditions dans lesquelles nous les avons ajoutées. Une supplémentation n'est donc pas nécessaire, notamment quand le milieu de culture est déjà riche en extraits azotés. En effet, la quantité de vitamines apportée par les extraits azotés est relativement faible (mais pas négligeable) par rapport aux ajouts réalisés lors de cette étude. Par exemple, pour un milieu composé de 4 g/L d'extrait de levure, la quantité apportée de Thiamine (vitamine B1) est de 50 µg, alors que l'impulsion est de 150 µg.

Les exigences en vitamines et en sels sont très faibles pour *Bacillus coagulans* par rapport à d'autres bactéries lactiques. Cela vient confirmer les études de Heriban, et al. (1993a).

- ② L'acide nicotinique pourrait être utile pour améliorer la productivité spécifique, donc la production d'acide lactique au détriment de la croissance.
- ③ La biotine semble avoir un effet sur notre souche, mais les conditions de fermentation n'étaient pas réunies pour être en limitation de biotine.
- ④ Au vu de cette étude, il est clair que les vitamines présentes dans les extraits azotés ne sont pas les facteurs de croissance principaux des *Bacilli*.
- ⑤ Les résultats obtenus confirment les faibles exigences nutritionnelles de *Bacillus* pour les vitamines par rapport aux lactobacilles. Kuhn et al., 1979 avaient démontré que seule la biotine était nécessaire à *Bacillus caldotenax*.

3.9. Etude sommaire de l'effet de l'oxygène

Bacillus coagulans fait partie de la classe des bactéries aérotolérantes. Les fermentations sont généralement réalisées sans aucune régulation de la teneur en oxygène ou en CO₂. L'oxygène n'est pas inhibiteur, mais il pourrait induire des changements métaboliques fondamentaux.

3.9.1. Objectifs

- ❶ Déterminer l'effet éventuel d'un ajout d'oxygène en continu sur la croissance et la production d'acide lactique.
- ❷ Déterminer et comparer les principaux paramètres cinétiques en présence, et en limitation d'oxygène de l'air.

3.9.2. Démarche expérimentale

C'est la technique dite de l'échelon qui a été choisie pour mener à bien cette étude sur l'oxygène, car elle allie rapidité et précision. Une culture continue nommée C6 (taux de dilution 0,15 h⁻¹) est réalisée sur milieu M2 avec une concentration en extrait de levure de 6 g/L dans l'alimentation. Quand l'état stationnaire est atteint, de l'air est introduit à un débit arbitraire d'environ 200 ml/mn dans le fermenteur (sous la pale d'agitation pour favoriser le mélange). Des prélèvements et des dosages sont faits régulièrement jusqu'à ce que la fermentation atteigne un nouvel état d'équilibre correspondant à l'effet de l'oxygène. Le pH et la température de la fermentation sont toujours régulés respectivement à 6,4 et 52°C.

La biomasse, l'acide L(+)-lactique, le saccharose, le fructose et de nombreux autres métabolites sont dosés pendant toute la durée de la fermentation.

3.9.3. Résultats

L'ouverture de la vanne d'air provoque un remous important dans le fermenteur avec formation de bulles de moins de 5 mm de diamètre.

La biomasse augmente rapidement et l'acide L(+)-lactique chute dans les premiers instants suivant l'ouverture de la vanne (**graphe IV.71**). L'acide D(-)-lactique est présent à une très faible concentration (<0,5 g/L) et n'évolue pas en présence d'oxygène.

Les concentrations en acide acétique, formique et en éthanol augmentent de façon très importante en présence d'oxygène (**graphe IV.72**). Vers 60 h, les différentes concentrations sont à peu près stabilisées; la souche a atteint un nouvel état stationnaire.

Les paramètres cinétiques montrent que la souche a subi un changement métabolique très important en présence d'O₂. Comme le montre le **Tableau IV. 3.21**, la chute de la production d'acide L(+)-lactique provoque une diminution importante de la productivité et des rendements de conversion. Le rendement $Y_{p/s0}$ (lactate produit / sucre dans l'alimentation) passe de 0,21 à 0,14 g.g⁻¹. Le rendement $Y_{p/s}$ qui tient compte seulement du sucre consommé, passe de 0,86 à 0,62 g.g⁻¹. Parallèlement, la concentration en cellules et le rendement de conversion du substrat en biomasse augmentent, respectivement, de 21% et 46%.

Des métabolites spécifiques de la voie hétérofermentaire sont produits.

La souche induit un changement de métabolisme de l'homofémentation vers l'hétérofermentation.

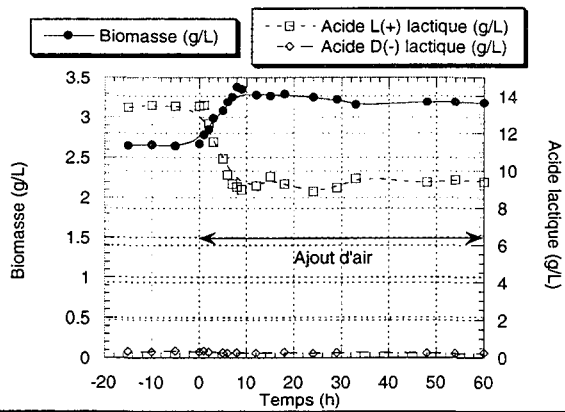
Tableau IV. 3.21 : Comparaison des concentrations, des rendements et de la productivité entre les deux états stationnaires; sans ajout d'O₂ et avec ajout d'O₂.

	Biomasse (g/L)	L - lactate (g/L)	D - lactate (g/L)	Saccharose (g/L)	Fructose (g/L)	Acétate (g/L)	Formiate (g/L)	Ethanol (g/L)
sans O ₂	2,65	13,5	0,32	49	0	0,2	0	0,1
avec O ₂	3,2	9,5	0,23	50	0	3,2	0,6	2,15
	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{p/s0}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g.g ⁻¹)				
sans O ₂	2	0,21	0,86	0,15				
avec O ₂	1,4	0,14	0,62	0,22				

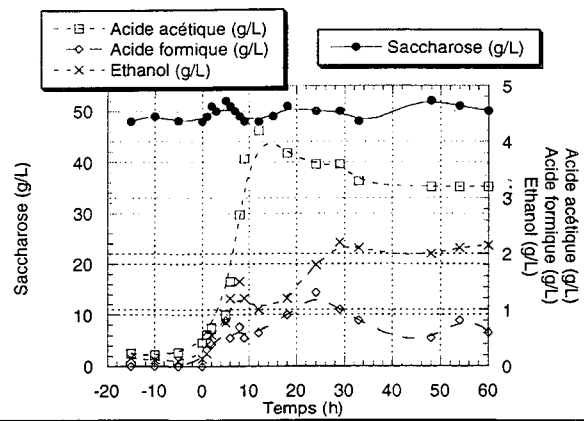
3.9.4. Conclusions de l'étude

① Ces observations confirment qu'en présence d'oxygène, il y a génération d'un supplément de NAD⁺ (Ohara, 1996). La voie lactate deshydrogénase qui sert justement à la régénération du coenzyme NAD réduit est moins nécessaire. La production d'acide lactique diminue au profit des voies hétérofermentaires. Le passage du catabolisme des sucres en acétate provoque une augmentation importante d'ATP et une augmentation de la croissance.

② Productivité et rendements en acide lactique diminuent en présence d'oxygène. Ces deux critères de performance ne sont pas en faveur de l'utilisation de l'oxygène en fermentation lorsque le but est justement de produire du lactate.



Graphe IV. 71 : Fermentation continue C6: Ajout d'oxygène de l'air. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.



Graphe IV. 72: Fermentation continue C6: Ajout d'oxygène de l'air. Effet sur la production de biomasse et d'acide lactique.

③ Par contre, l'utilisation de l'oxygène peut être très intéressante si l'on veut produire de la biomasse rapidement, en limitant la production d'acide lactique (inhibiteur), mais en favorisant la voie hétérofermentaire.

④ Encore une fois, la fermentation continue permet une augmentation de la productivité, mais au détriment du rendement de bioconversion.

3.10. Conclusions des études physiologiques et cinétiques

① La souche utilisée lors de cette étude est bien thermophile. La température optimale de croissance se situe vers 52°C. La régulation du pH de la fermentation est nécessaire (vers 6,4) pour améliorer la production. L'acide lactique produit est un inhibiteur de la croissance, ainsi qu'une concentration en saccharose trop importante (supérieure à 70 g/L).

② Il existe un système de régulation de la voie d'assimilation du fructose, probablement la phosphofructokinase qui serait inductible et dépendante de la concentration en saccharose. En dessous de 50 g/L de saccharose dans le milieu, la voie est induite et le fructose est consommé. Ceci est confirmé par les observations faites en mode continu, où le fructose n'est jamais détecté.

③ Le facteur limitant de la fermentation est incontestablement l'apport en source azotée. Les performances sont améliorées en présence des facteurs de croissance d'une source d'azote complexe (extrait de levure, « corn steep »). Ces facteurs de croissance ne sont ni des sels inorganiques, ni des vitamines, ni des acides aminés simples mais très probablement des petits peptides de 3 à 10 résidus. L'extrait de levure est la plus efficace, mais aussi la plus chère des sources testées. La liqueur de « corn steep » et surtout les extraits cellulaires (cannibalisme) sont des candidats intéressants pour une substitution partielle de l'extrait de levure.

④ Quelques molécules pourraient apporter des solutions intéressantes lors de conditions de fermentations spécifiques. Le sulfate diammonium favorise la production d'acide lactique, très probablement par son effet tampon. Le sulfate de magnésium au contraire favorise la production de biomasse; l'ion Mg^{2+} est un cofacteur connu du métabolisme des bactéries lactiques. L'acide nicotinique, et, dans une moindre mesure, la biotine pourraient être utiles. Enfin l'oxygène de l'air, ajouté à la culture, provoque un changement métabolique qui favorise la production de biomasse et des métabolites de la voie hétérofermentaire au détriment de la production de lactate.

⑤ Les études menées en continu et discontinu montrent que le choix du mode de culture est primordial. L'avantage du mode discontinu est principalement lié aux rendements obtenus (généralement élevés) en présence d'une source d'azote importante, mais le problème vient de la productivité qui est généralement faible. Pour le mode continu, ce serait plutôt l'inverse. La comparaison à ce stade de l'étude est difficile car ce mode de culture a plutôt été utilisé comme outil d'expérimentation que comme mode de fermentation performant.

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE IV

➔ La souche utilisée lors de cette étude n'est pas une souche de production industrielle. Elle a été choisie pour modéliser les bactéries thermophiles productrices d'acide lactique employées en industrie. La caractérisation physiologique et biochimique a montré que cette bactérie avait de fortes similitudes avec quelques espèces de bacilles thermophiles et notamment *Bacillus coagulans*.

➔ Les connaissances sur cette souche se limitaient à une température de croissance de 45 à 55°C et à un pH de régulation de 6 à 6,5. Deux milieux nommés R1 et M1 étaient associés à cette souche, l'un pour revivifier la souche, l'autre pour la fermentation. Mais aucune donnée n'était disponible sur la physiologie et les cinétiques de ce micro-organisme.

➔ La première étape a été consacrée à l'acquisition de connaissances de base et des profils de croissance et de production. La souche a très probablement un comportement hétérofermentaire facultatif (comme de nombreux Bacilli). Sur milieu M2, le micro-organisme se comporte comme un homofermentaire avec des rendements $Y_{p/s}$ souvent proches de 90%. Cette série d'études a permis de définir une zone optimale de fonctionnement pour les paramètres physico-chimiques : température optimale $\approx 52^\circ\text{C}$, pH optimal $\approx 6,4$. L'agitation a été fixée à 200 rpm pour toute la durée de l'étude.

➔ L'étude de la composition du milieu de fermentation a permis de décrire certains comportements de la souche :

- Inhibition du pH et de l'acide lactique si la culture n'est pas régulée en pH.
- Inhibition du saccharose à forte concentration et description d'un système de régulation de la voie d'assimilation du fructose (diauxie).
- Présence indispensable d'une source azotée complexe pour améliorer la croissance.
- Faibles exigences nutritionnelles en sels inorganiques et vitamines.
- Passage à un métabolisme hétérofermentaire en présence d'oxygène.
- Quelques molécules favorisent la production de biomasse : sulfate de magnésium et O_2 . D'autres améliorent la productivité spécifique : acide nicotinique et sulfate diammonium.

Enfin la biotine pourrait être utile pour améliorer les transferts intra-extracellulaires, notamment en haute densité cellulaire.

➔ Le protocole de fermentation a également été étudié. Afin de faire disparaître la phase de latence et donc d'améliorer la productivité, il est fortement conseillé de réguler le pH et la température de la préculture.

➔ Deux modes de fermentations ont été utilisés lors de cette étude : le discontinu et le chemostat. Les différentes fermentations ont permis d'évaluer la valeur de certains paramètres cinétiques. Le **Tableau IV. 4.1** montre les valeurs importantes relevées dans ce chapitre. La fermentation F1 est la fermentation discontinue servant de référence. Les trois meilleures fermentations discontinues sont résumées et comparées avec les performances de fermentations continues à l'état stationnaire.

La vitesse spécifique maximale de croissance a été déterminée en cultures discontinues et confirmée en mode continu par lessivage du réacteur.

En culture discontinue, les rendements obtenus peuvent être très élevés, mais la productivité ne dépasse pas $1,2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. Cette valeur a tout de même été améliorée d'un facteur 2.

Parallèlement, les cultures continues montrent qu'il est possible d'augmenter la productivité d'un facteur 8, mais les rendements restent faibles, et les concentrations en sucre résiduel élevées.

Tableau IV. 4.1 : Comparaison des performances entre cultures continues et discontinues sur la souche modèle. Les déviations standards sont précisées lors des études correspondantes.

	Source d'azote (g/L)	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	μ_{\max} (h^{-1})	δ ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)	$Y_{P/S0}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	$Y_{P/S}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
F1	2	1,9	29	0,20	0,54	0,28	0,65
F31	6	3,05	57	0,28	1,2	0,88	0,95
F34	5	3,05	56	0,30	1,2	0,87	0,99
F35	5	2,8	51	0,29	1,05	0,79	0,92
C3	6	2,2	27	-	4,1	0,45	-
C1	2	-	-	0,31	-	-	-

➔ D'autres paramètres ont été estimés lors de cette étude en mode discontinu, mais le peu d'expériences de répétabilité et la déviation standard de ces valeurs, souvent élevée, permettent seulement de donner une fourchette approximative (**Tableau IV. 4.2**). Cependant, ces valeurs pourront servir ultérieurement pour dimensionner l'étude en recyclage cellulaire et pour tenter de modéliser la souche de *Bacillus coagulans*.

Tableau IV. 4.2 : Résumé des paramètres cinétiques estimés lors de l'étude.

<i>La productivité spécifique maximale en mode discontinu, Δ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) = 0,3 à 0,5 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$</i>
<i>La vitesse spécifique maximale de production d'acide lactique, Π_{pmax} ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$): 3 à 5 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$</i>
<i>La concentration en sucre résiduel minimale, S_f (g/L) : 2 à 10 g/L</i>
<i>La vitesse spécifique maximale de consommation du substrat, q_{Smax} ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) : 5 à 8 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$</i>
<i>Constante d'affinité pour le substrat, K_s (g/L) : 0,2 à 0,6 g/L (estimée lors de l'étude sur les sucres).</i>
<i>Constante d'inhibition par l'acide lactique, K_i (g/L) : 30 à 40 g/L (estimée lors de l'étude sur le pH).</i>
<i>Rendement de conversion du saccharose en biomasse $Y_{x/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) : 0,04 à 0,05 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$</i>
<i>Rendement de conversion du saccharose en L(+) lactate $Y_{p/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) : 0,85 à 0,95 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$</i>
<i>Rendement de conversion du saccharose en D(-) lactate $Y_{p/s}$ ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) : < 0,01 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$</i>
<i>Pureté optique de l'acide lactique obtenu (en moyenne) (%) : 98-99 % (estimée par dosage enzymatique spécifique).</i>

~ CHAPITRE V ~

*Etude de la filtration
du milieu de culture*

- Chapitre V -

Étude de la filtration d'un milieu de culture

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	185
2. LES PARAMETRES DE LA MICROFILTRATION	186
2.1. - DETERMINATION DES PARAMETRES A ETUDIER	186
2.1.1. - Paramètres de la membrane	187
2.1.2. - Paramètres du fluide (milieu de fermentation)	187
2.1.3. - Variables dépendantes du système de filtration	188
2.1.4. - Paramètres dépendants du système de décolmatage	188
2.2. - ETUDE DE L'EFFET DE LA TEMPERATURE SUR LA FILTRATION	189
2.2.1. - Objectifs de l'étude	189
2.2.2. - Démarche et conditions expérimentales générales	189
2.2.3. - Résultats de la première série d'expérimentations	189
2.2.4. - Résultats de la deuxième série d'expérimentations	191
2.2.5. - Conclusions de l'étude	193
2.3. - ETUDE DU DEBIT DE PERMEAT	195
2.3.1. - Objectif	195
2.3.2. - Conditions expérimentales	195
2.3.3. - Résultat de l'expérimentation	195
2.3.4. - Conclusions de l'expérimentation	196
2.4. - ETUDE DU TYPE DE MEMBRANE	197
2.4.1. - Objectifs	197
2.4.2. - Conditions expérimentales	197
2.4.3. - Résultats de la série de mesure	197
2.4.4. - Conclusion de l'étude	199
2.5. - ETUDE DE LA FILTRATION D'UN MILIEU DE CULTURE	202
2.5.1. - Fermentation avec recyclage cellulaire	202
2.5.2. - Etude de la filtration d'un milieu de culture par un plan d'expériences non-linéaire	204
3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE V	222

TABLEAUX

Tableau V. 2.1 : Comparaison des flux de perméat et des valeurs de pression.	193
Tableau V. 2.2 : Calcul comparatif des vitesses du fluide dans des membranes de 19 et 7 canaux.	201
Tableau V. 2.3 : Combinaison des 3 plans d'expériences non linéaires.	205

FIGURES

Figure V. 2.1 : Détail de la partie microfiltration du réacteur à haute densité cellulaire.	186
Figure V. 2.2 : Schéma de fonctionnement du réacteur à recyclage cellulaire lors de la fermentation R1.....	203
Figure V. 2.3 : Choix des réponses simulant la cinétique de filtration.	207
Figure V. 2.4 : Schéma du mécanisme de filtration d'une membrane de 0,2 μm de porosité.....	214
Figure V. 2.5 : Schéma du mécanisme de filtration d'une membrane de 0,45 μm de porosité.....	219

1. INTRODUCTION

Les fermentations avec recyclage cellulaire sont le résultat d'un couplage entre un fermenteur et un système de microfiltration. L'amélioration des performances de production d'acide lactique passe donc par une compréhension et une optimisation des paramètres du système de filtration.

Dans un premier temps, il est nécessaire de caractériser et d'évaluer ces paramètres sur le pilote à partir des données de la littérature. Il faut choisir les paramètres qui vont être étudiés en fonction de leurs effets probables sur la réponse fondamentale du système de filtration qui est l'évolution du flux de perméat.

Une première série d'expérimentations sera réalisée en faisant varier une partie de ces paramètres avec un fluide simple. Ainsi, l'évolution du flux de perméat sera étudiée en fonction de la température, du débit de recyclage et des pressions transmembranaires.

La deuxième série de manipulations sera réalisée sur un fluide modèle dont la composition et les caractéristiques rhéologiques sont les plus proches possible du milieu de fermentation avec recyclage cellulaire. Pour obtenir ce fluide modèle, une fermentation va être réalisée sans aucune optimisation dont le but est de produire un volume de milieu important avec une concentration en biomasse élevée.

Un plan d'expériences non-linéaire à plusieurs niveaux va être construit et mis en place pour déterminer et comparer différentes membranes de microfiltration de porosité respective, 0,2 , 0,45 et 0,8 μm . L'évolution du flux de perméat est le critère qui va permettre de choisir le type de membrane qui sera utilisé en fermentation avec recyclage cellulaire. Sur ce critère, il est possible de visualiser plusieurs réponses possibles telles que : le flux de perméat à un temps de comparaison fixe ou le niveau de colmatage de la membrane.

Enfin, des mécanismes de filtration simplifiés seront proposés pour chaque type de membrane, si les données et les interprétations du plan d'expériences sont suffisantes, justifiant le choix de la membrane pour les expérimentations futures.

2. LES PARAMETRES DE LA MICROFILTRATION

2.1. - Détermination des paramètres à étudier

La conception du réacteur à haute densité cellulaire a nécessité le couplage entre un fermenteur et un système de microfiltration détaillé en **Figure V. 2.1**.

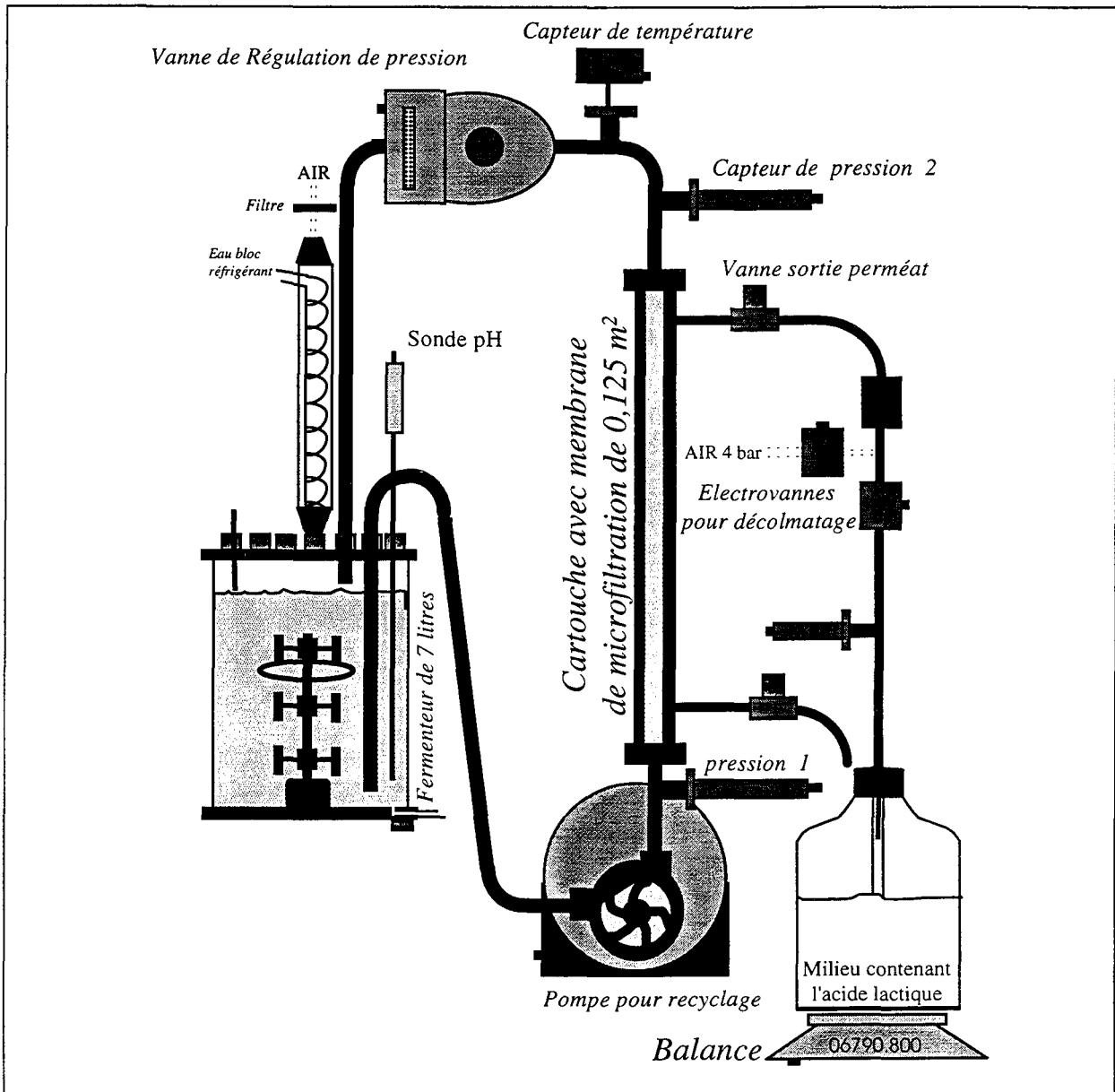


Figure V. 2.1 : Détail de la partie microfiltration du réacteur à haute densité cellulaire.

Plusieurs capteurs ont été disposés sur le système de filtration permettant d'accéder aux valeurs de certains paramètres.

D'autres paramètres sont fixés par les conditions opératoires ou par les constructeurs du pilote et des matériels utilisés.

2.1.1. - Paramètres de la membrane

Deux types de paramètre sont décrits pour les membranes de microfiltration. Les paramètres fixes et les paramètres variables. 5 membranes ont été testées lors de la réalisation de ce travail:

- membrane 0,2 μm de porosité, multicanaux (7),
- membrane 0,2 μm de porosité, multicanaux (19),
- membrane 0,45 μm de porosité, multicanaux (7),
- membrane 0,45 μm de porosité, multicanaux (19),
- membrane 0,8 μm de porosité, multicanaux (7).

La surface de toutes les membranes est de 0,125 m².

La composition est identique : membrane tubulaire minérale de type céramique support monolithe Al₂O₃ - LiO₂ et membrane en TiO₂ ou ZrO₂.

Les membranes résistent à une pression absolue inférieure à 3,5 bars, elles résistent aux solvants et acides (sauf acide fluorhydrique) et sont autoclavables à la vapeur (150°C).

➔ L'étude identifie donc deux variables :

❶ *la porosité (0,2 , 0,45 et 0,8 μm)*

❷ *le nombre de canaux des membranes (7 ou 19 canaux)*

2.1.2. - Paramètres du fluide (milieu de fermentation)

Ces paramètres sont liés à la partie fermentation du procédé et la filtration va dépendre totalement de l'évolution de la culture. Il est possible d'identifier les principaux paramètres liant fermentation et filtration:

- la composition et le type de fluide et notamment la concentration en biomasse,
- la température
- le pH
- la viscosité (liée à la composition et à la température du fluide)

Le pH et la température sont fixés par l'optimisation des conditions de fermentation. La viscosité est difficilement contrôlable et mesurable en ligne, elle est totalement dépendante de la composition et de la température du milieu de culture.

Le milieu est considéré comme un fluide newtonien dont la viscosité diminue avec l'élévation de la température. La fermentation se déroule sur une souche thermophile se développant à

50-52°C; il est clair que ceci est un avantage très important pour la filtration, car une amélioration des flux de filtration est certaines avec l'augmentation de la température.

➔ Deux paramètres sont donc intéressants à étudier et à faire varier :

③ *la température (25 à 50°C),*

④ *la concentration en biomasse dans le milieu (fixé ultérieurement).*

2.1.3. - Variables dépendantes du système de filtration

La pompe de recyclage et de filtration du milieu est équipée d'un variateur de puissance qui permet de travailler à des débits de recirculation de 0 à 1800 L/h (données constructeurs et vérifié expérimentalement). Ce paramètre est très important à étudier et facilement accessible. Le deuxième paramètre très important du système de filtration est la pression transmembranaire. Elle est accessible grâce aux 2 capteurs placés dans la boucle de recyclage. La vanne de contre pression (ou régulation de pression) va permettre de faire varier et d'étudier ce paramètre.

➔ Paramètres choisis :

⑤ *la pression (0 à 3 bars)*

⑥ *le débit de recyclage (0 à 1800 L/h)*

2.1.4. - Paramètres dépendants du système de décolmatage

Un système de décolmatage par « back-flush » a été ajouté au système de microfiltration. Trois paramètres découlent de l'utilisation du décolmatage:

- la pression de décolmatage
- la fréquence
- la durée

Les données constructeurs préconisent, pour un décolmatage efficace, une pression de 6 bars pendant un temps très court ($\approx 1s$). Nous nous conformerons à ces valeurs constructeurs. Il reste la fréquence de décolmatage à faire varier comme paramètre influençant les performances de la microfiltration.

➔ Paramètre choisi :

⑦ *temps entre deux « back-flush » (2 à 10 mn)*

2.2. - Etude de l'effet de la température sur la filtration

2.2.1. - Objectifs de l'étude

- ❶ Evaluer et démontrer que le fait de travailler à 50°C offre des avantages sur les performances de la microfiltration.
- ❷ Comparer les flux de perméat à différentes températures, vitesses de recyclage et pour différentes pressions.

2.2.2. - Démarche et conditions expérimentales générales

Il était tout d'abord nécessaire de relier l'affichage numérique arbitraire de la pompe de recyclage (0 à 50) et le débit réel de recyclage. La corrélation est faite à pression atmosphérique. Le débit est mesuré à la sortie de la pompe. Le fluide est de l'eau osmosée à 50°C (pH≈6,5). La corrélation est linéaire entre l'affichage et le débit de recyclage (**graphe V.1**):

$$\text{Débit de recyclage } Q_r \text{ (L/h)} = 36 * \text{Affichage pompe}$$

La température est régulée grâce au système de régulation du fermenteur. L'expérimentation est réalisée à l'eau pure, à différents débits de recirculation. La membrane choisie pour cette expérimentation est la membrane de 0,8 µm, 7 canaux.

La réponse choisie est le débit de perméat à l'état stationnaire Q_p (L/h). Les valeurs de débit ou de flux de perméat sont mesurées à l'état stationnaire pour des températures de 25 à 50°C et des débits de recyclage de 0 à 1800 L/h ainsi que pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de contre-pression.

Les températures ont été relevées et comparées à la fois dans le fermenteur et dans la boucle de recyclage. Enfin, toutes les valeurs de pression données sont des valeurs relatives.

2.2.3. - Résultats de la première série d'expérimentations

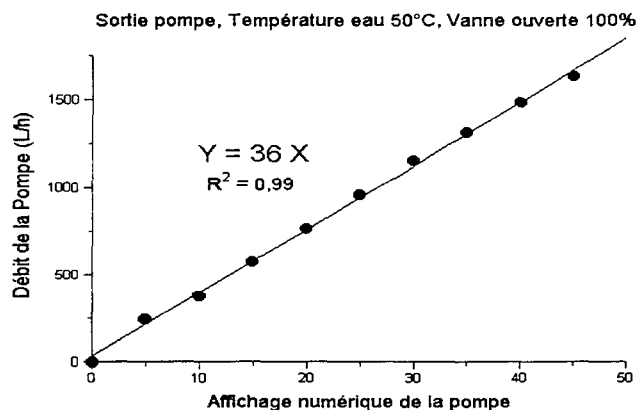
L'évolution du débit de perméat est représenté en 3 dimensions (**graphe V.2**) en fonction de la température de l'eau et du débit de recyclage. Le **graphe V.3** représente les mêmes résultats en 2 dimensions.

Fluide :

eau à 50°C

Pression :

1 bar



Graphe V. 1 : Corrélation entre l'affichage et le débit réel de la pompe.

Fluide :

eau à pH 6,5

Pression :

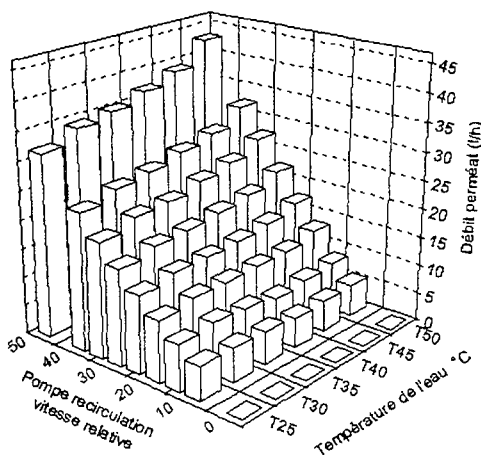
vanne ouverte

100%.

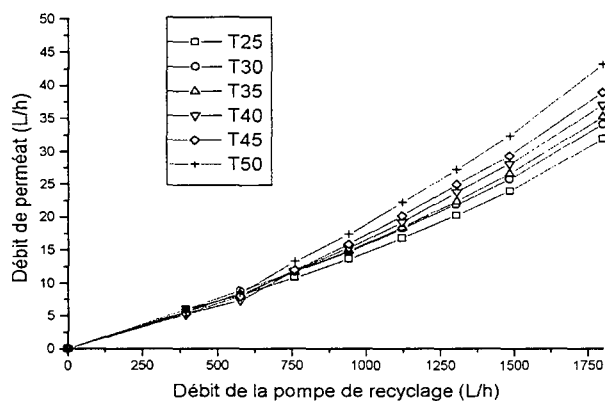
Membrane :

0,8 µm

7 canaux



Graphe V. 2 : Filtration S1- Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et de la température du fluide. Représentation en 3D.



Graphe V. 3 : Filtration S1- Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et de la température du fluide. Représentation en 2D.

2.2.3.1. - Observations

Le débit de perméat augmente avec le débit de recyclage et avec la température. Le débit de perméat le plus élevé (43 L/h) est obtenu à la température la plus élevée et avec un débit de recyclage élevé, soit, respectivement, 50°C et 1800 L/h. La température du fluide est donc un paramètre influent de l'évolution du débit de perméat.

Il y a globalement une augmentation de 30 à 40 % du débit de perméat entre 25°C et 50°C, ce qui correspond à peu près à une diminution de la viscosité de l'eau du même ordre.

Il faut également noter que les températures dans le fermenteur, et dans le système de microfiltration, étaient visiblement identiques à la régulation.

2.2.4. - Résultats de la deuxième série d'expérimentations

Pour comparer l'évolution des flux de perméat entre 25°C et 50°C, une même série d'expériences a été réalisée à ces deux températures en faisant varier le débit de recyclage et en ouvrant plus ou moins la vanne de contre pression à 100, 75, 60 et 50%. La fermeture de cette vanne permet d'augmenter la pression d'entrée de la membrane et donc, théoriquement, de favoriser le flux vers la sortie perméat.

Les **graphes V.4 et V.5** montrent l'évolution du débit de perméat respectivement à 25°C et 50°C.

Les **graphes V.6 et V.7** visualisent le flux de perméat en fonction de la pression transmembranaire.

2.2.4.1. - Observations

Les évolutions des deux graphes sont identiques. Le flux de perméat est augmenté à la fois par le débit de recyclage mais aussi par l'augmentation de la pression provoquée par la fermeture de la vanne de contre pression.

En comparant les graphes l'un à l'autre, il est clair que l'augmentation de la température est bénéfique au flux de perméat.

Les valeurs des pressions transmembranaires ont été mesurées aux moments de la lecture des flux de perméat. Il existe une relation linéaire entre ces deux paramètres, montrée ici dans deux conditions d'ouverture de la vanne de contre pression (75 et 60% d'ouverture).

- Chapitre V -

Fluide :

eau à pH 6,5

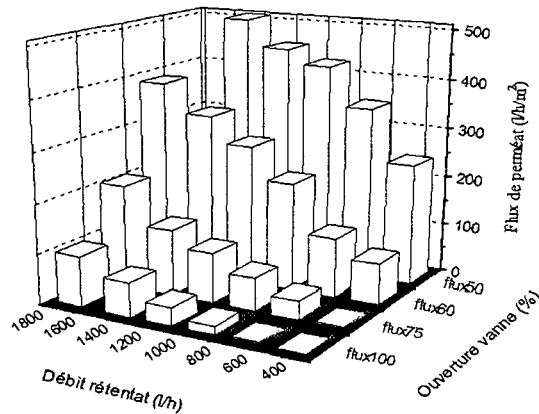
Température :

25°C

Membrane :

0,8 µm

7 canaux



Graphe V. 4 : Filtration S2- Evolution du flux de perméat en fonction du débit de recyclage et de l'ouverture de la vanne de contre pression à 25°C. Représentation en 3D

Fluide :

eau à pH 6,5

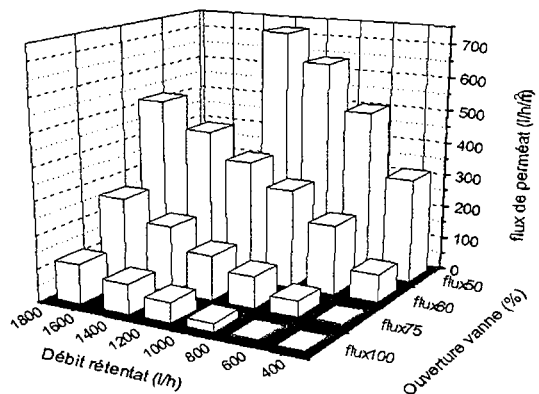
Température :

50°C

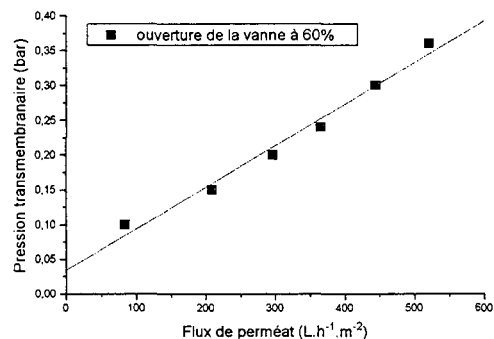
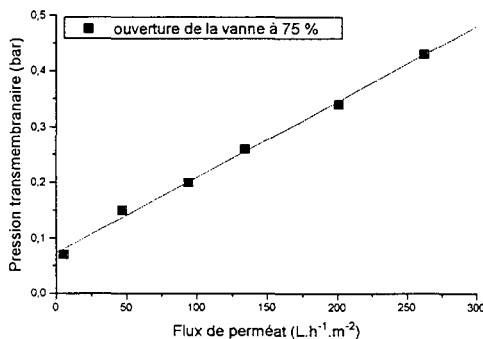
Membrane :

0,8 µm

7 canaux



Graphe V. 5 : Filtration S2- Evolution du flux de perméat en fonction du débit de recyclage et de l'ouverture de la vanne de contre pression à 50°C. Représentation en 3D



Graphe V. 6 : Filtration S2 - Pression en fonction du flux. vanne ouverte à 75 %.

Graphe V. 7 : Filtration S2 - - Pression en fonction du flux. vanne ouverte à 60 %.

2.2.5. - Conclusions de l'étude

① Travailler à 50°C en recyclage cellulaire est un avantage certain pour augmenter les flux de perméat. Ce paramètre clé est souvent le paramètre qui décide de la performance du procédé et notamment de l'augmentation de la productivité. Plus le flux de perméat sera élevé, plus la productivité sera élevée (à l'état stationnaire).

② A 50°C en recyclage, nous avons pu constater que les débits moyens relativement élevés de la pompe de recirculation provoquaient un échauffement dans la boucle de recyclage. L'énergie extérieure nécessaire pour maintenir le fluide à 50°C a considérablement baissé par rapport à un système discontinu ou continu simple. Pour l'expérience à 25°C, il a même été nécessaire de refroidir l'eau. Néanmoins, la régulation de la température n'a pas posé de problème particulier (précision 1°C).

③ Les valeurs de températures des expérimentations ont été relevées simultanément dans le réacteur et dans la boucle de recirculation. L'écart entre les mesures n'a pas été significatif (1 à 2°C), même aux débits de recyclage les plus faibles (500 L/h). Les cellules n'auront donc pas à souffrir d'un choc thermique important lors du passage dans la boucle de recyclage.

④ Le flux de perméat augmente de façon très importante avec le débit de recyclage: Le flux passe de 8 L/h à 43,5 L/h lorsque le recyclage passe entre 500 et 1800 L/h.

A 50°C, une relation polynomiale de degré 2 à été déterminée entre le débit de perméat (Q_p) et le débit de recyclage (Q_r):

$$Q_p = 5,17 \cdot 10^{-6} \cdot Q_r^2 + 0,015 Q_r - 0,42 \quad R^2 = 0,998$$

⑤ La vanne de contre pression permet, quand elle se referme, de favoriser le flux vers la sortie perméat, ceci en augmentant la pression transmembranaire et la pression d'entrée de la membrane. Il existe une relation linéaire entre le flux de perméat et la pression transmembranaire dont la pente dépend des conditions de filtration (débit de recyclage, ouverture de la vanne de régulation de pression, pression d'entrée P1) (**Tableau V. 2.1**).

Tableau V. 2.1 : Comparaison des flux de perméat et des valeurs de pression.

Q_r (L/h)	Vanne ouverte à 75%				Vanne ouverte à 60%			
	P1 (bar)	P2 (bar)	dP (bar)	J ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)	P1 (bar)	P2 (bar)	dP (bar)	J ($L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}$)
500	0,08	0,01	0,07	0,65	0,16	0,06	0,1	10,4
1800	0,59	0,16	0,43	32,8	1,17	0,81	0,36	65,1
pente	$J (L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}) = 735 \cdot dP - 50$				$J (L \cdot h^{-1} \cdot m^{-2}) = 1645 \cdot dP - 50$			

Fluide :

eau à pH 6,5

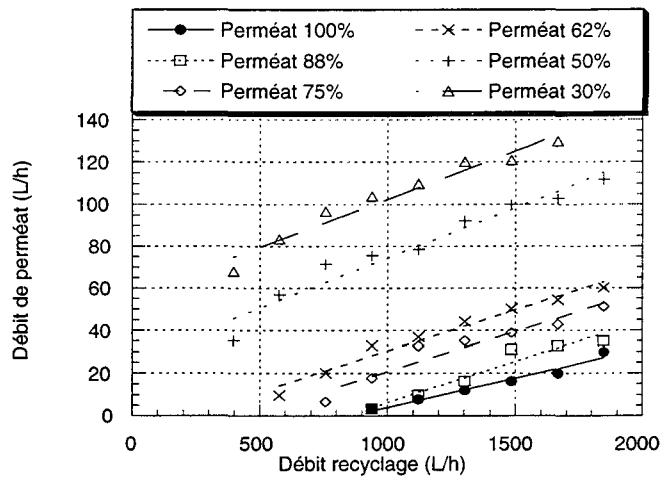
Température :

50°C

Membrane :

0,2 µm

7 canaux



Perméat

X %

=

Vanne

de

pression

ouverte

de X %

Graphe V. 8 : Filtration S3 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de contre pression.

Fluide :

eau à pH 6,5

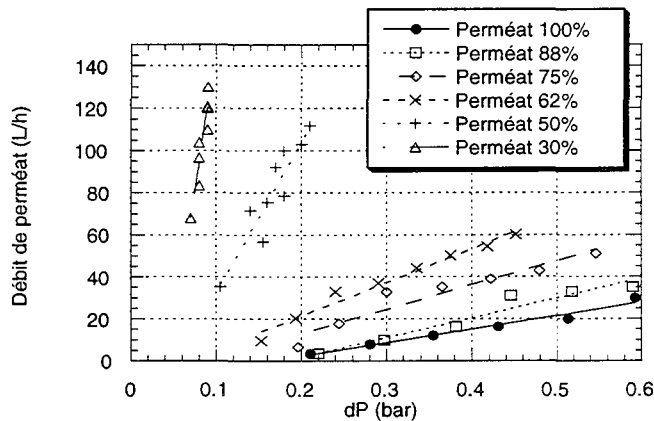
Température :

50°C

Membrane :

0,2 µm

7 canaux



Graphe V. 9 : Filtration S3 - Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de pression.

Fluide :

eau à pH 6,5

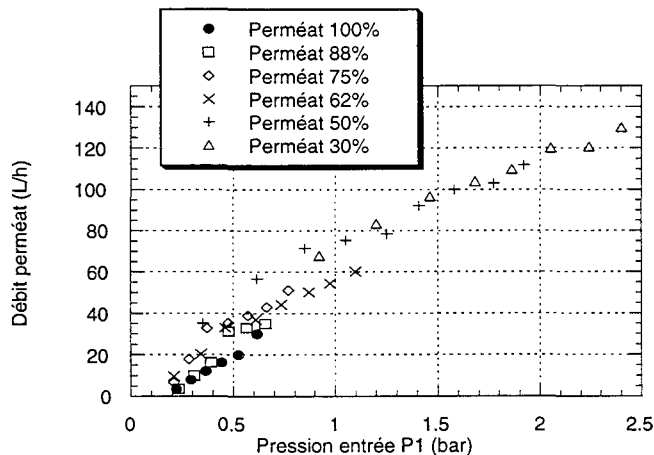
Température :

50°C

Membrane :

0,2 µm

7 canaux



Graphe V. 10 : Filtration S3 - Evolution du débit de perméat en fonction de la pression d'entrée P1 et pour différents pourcentages d'ouverture de la vanne de contre pression.

2.3. - Etude du débit de perméat

Le flux de perméat est une des réponses les plus importantes de la filtration. Le problème majeur rencontré dans la bibliographie est le colmatage des membranes qui entraîne une diminution du flux de perméat et donc une diminution des performances du procédé. Les mécanismes sont généralement bien décrits et expliqués. Néanmoins, nous n'avons aucune donnée concernant notre installation de filtration et il conviendra de vérifier et de caractériser les paramètres influençant l'évolution du flux de perméat avec de l'eau pure.

2.3.1. - Objectif

❶ Caractériser et déterminer les effets des paramètres influençant la filtration de l'eau pure

2.3.2. - Conditions expérimentales

Des mesures de flux de perméat ont été réalisées lors d'une série d'expériences à une température régulée de 50°C avec de l'eau pure. Deux paramètres ont été identifiés : le débit de recyclage et la pression de l'installation. Il est possible de faire varier ces deux paramètres de façon indépendante grâce à la vanne de contre pression. En fermant progressivement cette vanne, il est possible de faire varier la pression transmembranaire de l'installation sans modifier le débit de recyclage. Les valeurs de flux et de pression ont été relevées à l'état stationnaire par le biais de capteurs de pression et d'une balance numérique. Les valeurs des pressions sont des valeurs relatives.

2.3.3. - Résultat de l'expérimentation

La première représentation graphique (**graphe V.8**) montre que le débit de perméat (Q_p) augmente de façon quasi linéaire avec le débit de recirculation (Q_r). Q_p augmente également avec la fermeture de la vanne de contre pression. Les pentes des différentes droites semblent également augmenter légèrement avec la fermeture de la vanne.

Le **graphe V.9** décrit l'évolution du débit de perméat (Q_p) en fonction de la pression transmembranaire (dP) pour différentes positions de vanne. Encore une fois, une relation linéaire simple existe entre ces deux paramètres et décrit parfaitement le phénomène. De plus, la pente des droites augmente avec la fermeture de la vanne de pression. Pour visualiser ce phénomène, il suffit de se souvenir de l'effet de la vanne de contre pression (qui augmente les valeurs des pressions dans l'installation et notamment la pression P_1 , entrée de la membrane) et de tracer l'évolution du débit de perméat en fonction de la pression P_1 (bar) (**graphe V.10**).

Le nuage de point donne incontestablement l'allure d'une courbe qui permet de relier le débit de perméat à la pression d'entrée de la membrane. L'équation de ce polynôme du second degré a été calculée comme suit :

$$Q_p \text{ (L.h}^{-1}\text{)} = - 13,8 (P1)^2 + 91,5 P1 - 11,7 \quad R^2 = 0,96 \text{ et } P1 \text{ en bar}$$

2.3.4. - Conclusions de l'expérimentation

① Le débit de perméat est fixé par la pression transmembranaire et la pression d'entrée de la membrane (communément appelée « pression d'attaque de la membrane »). Il est possible de faire varier ces pressions et d'augmenter le flux de perméat en :

- augmentant la vitesse de recirculation dans la membrane,
- fermant progressivement la vanne de contre pression.

② Des relations simples (linéaires ou polynomiales de degré 2) existent entre le flux de perméat, les débits de recyclages et les pressions. Ce qui signifie qu'à l'état stationnaire et dans les conditions fixées, tous les paramètres influençant la filtrabilité ont bien été identifiés.

➤ *Pour augmenter la filtration de l'eau pure, il faut donc travailler à débits de recyclage élevés et à pressions élevés.*

2.4. - Etude du type de membrane

Le choix du type de membrane a été fait lors de la conception du pilote d'ultrafermentation et après synthèse des connaissances sur les membranes couramment utilisées dans la littérature. Les cellules de *Bacillus coagulans* sont des bactéries relativement importantes en taille. La porosité des membranes choisies sont 0,2 , 0,45 et 0,8 μm . Deux configurations des membranes sont possibles : 7 ou 19 canaux. La surface des membranes étant identique (0,125 m^2), le diamètre des canaux est différent entre les membranes à 7 et à 19 canaux.

2.4.1. - Objectifs

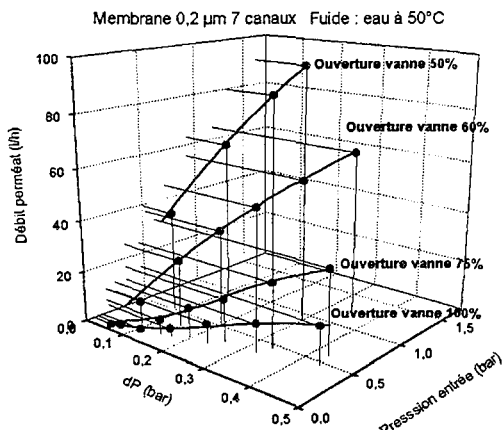
- ❶ Etudier de manière comparative les 5 membranes en fonction de la vitesse de recyclage et de la pression transmembranaire.
- ❷ Déterminer en fonction des conditions l'évolution du flux de perméat à l'état stationnaire.

2.4.2. - Conditions expérimentales

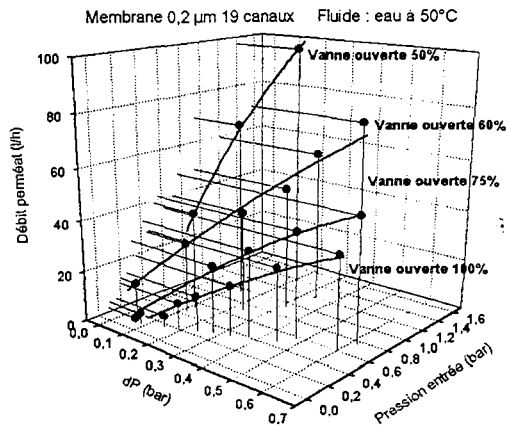
Le critère de comparaison choisi est encore une fois le débit de perméat à l'état stationnaire. Ce débit est suivi en fonction du débit de recyclage et de l'ouverture de la vanne de contre pression, ceci pour chaque type de membrane. Le fluide choisi est de l'eau pure régulée à une température de 50°C.

2.4.3. - Résultats de la série de mesure

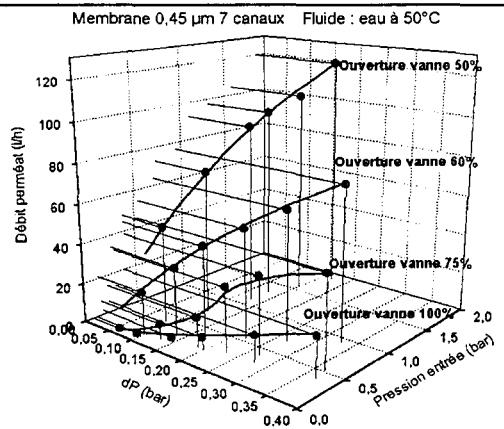
Les **graphes V.11 à V.15** représentent l'évolution du débit de perméat (Q_p , axe Y) en 3 dimensions en fonction de la pression transmembranaire (dP , axe X) et de la pression d'entrée de la membrane (P_1 , axe Z). Chaque courbe représente une configuration différente d'ouverture de la vanne de contre pression. Les droites partant de chaque point de mesure, et qui servent de référence en venant couper les plans YZ et XZ, permettent de mieux situer l'allure des 4 courbes dans l'espace tridimensionnel. Cette représentation, même si elle paraît complexe, permet de représenter l'évolution du flux de perméat en fonction de 3 paramètres simultanément. Sans chercher dans les détails, il suffit de relier les 4 courbes par une série de plans imaginaires pour s'apercevoir que cette série de plans évolue dans la même direction spatiale, et ceci, quelque soit le type de membrane testée. Ceci confirme les études précédemment réalisées sur l'influence de la fermeture de la vanne de contre-pression; sur la pression transmembranaire, sur la pression d'entrée P_1 et sur l'évolution du débit de perméat.



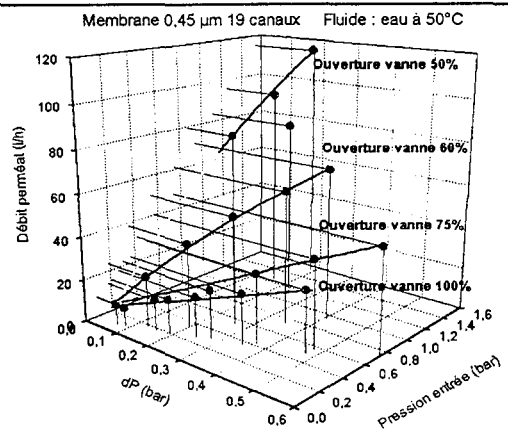
Graphe V. 11 : Filtration S4 - Membrane 0,2µm 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1



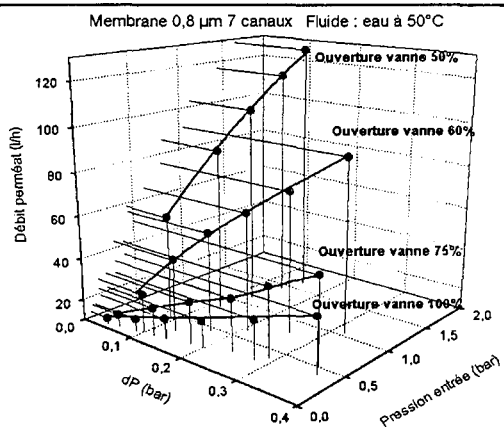
Graphe V. 12: Filtration S4 - Membrane 0,2µm 19 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1



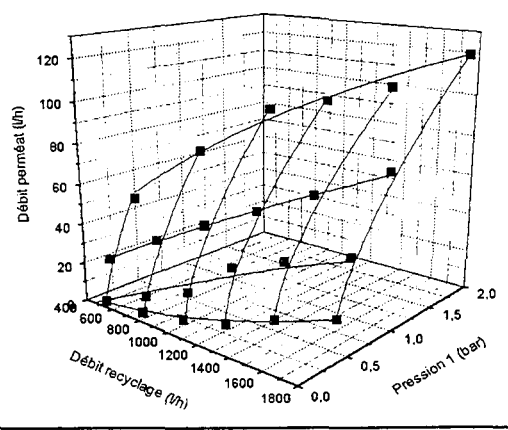
Graphe V. 13 : Filtration S4 - Membrane 0,45µm 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1



Graphe V. 14 : Filtration S4 - Membrane 0,45µm 19 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1



Graphe V. 15 : Filtration S4 - Membrane 0,8µm 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction de la pression transmembranaire et de la pression d'entrée P1



Graphe V. 16 : Filtration S4 - Membrane 0,8µm 7 canaux. Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et de la pression d'entrée P1

Pour illustrer, par un autre exemple, les avantages de la représentation 3D, nous avons tracé l'évolution du débit de perméat (Q_p , axe Y) en fonction du débit de recyclage (Q_r , axe X) et de la pression d'entrée (P_1 , axe Z). La surface placée dans l'espace tridimensionnel permet ainsi de représenter l'évolution des 2 paramètres (Q_p , et P_1) en fonction de la fermeture progressive de la vanne de contre pression (100%, 75%, 60% et à d'ouverture) et du débit de recyclage (Q_r) (**graphe V.16**).

- ➔ Quand la vanne se referme, dP , P_1 et Q_p augmentent.
- ➔ Quand Q_r augmente, dP , P_1 et Q_p augmentent également.

Les **graphes V.17 à V.20** représentent l'évolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane utilisée pour les 4 conditions d'ouverture de la vanne de régulation de pression. Les débits de perméat augmentent avec :

- ➔ la porosité de la membrane (pour chaque type de membrane),
- ➔ le nombre de canaux de la membrane,
- ➔ le débit de recyclage,
- ➔ la fermeture de la vanne de contre pression.

2.4.4. - Conclusion de l'étude

① Cette étude confirme le rôle de la vanne de contre pression qui permet d'augmenter la pression d'attaque de la membrane et, donc, la pression transmembranaire, et le flux de perméat. Cette vanne est très utile pour contrôler finement les pressions de l'installation et elle trouvera son rôle ultime dans le contrôle du colmatage de la membrane, pour tenter de maintenir un flux de perméat constant.

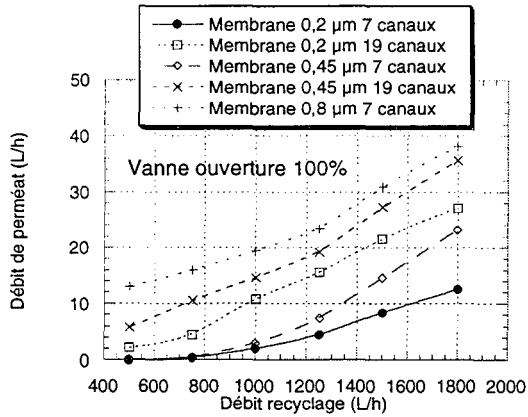
➔ *Pour de l'eau, il faut donc travailler à pression élevée (vanne la moins ouverte possible) pour augmenter la filtration.*

② Le choix de la membrane sera primordial pour le procédé final. C'est la membrane de porosité la plus importante (0,8 μm) qui donne le débit de perméat le plus important. Il est possible de classer les membranes selon leur porosité et selon le nombre de canaux avec le flux de perméat comme critère de sélection:

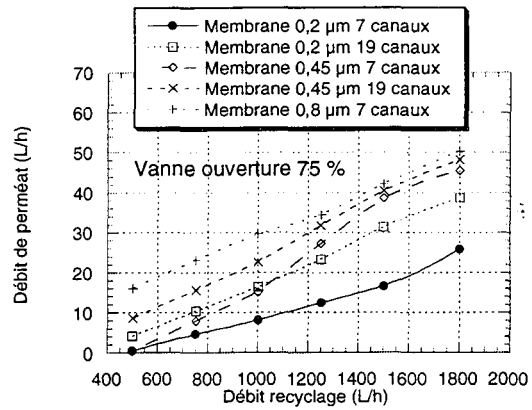
$$\text{Porosité } (\mu\text{m}) : 0,8 > 0,45 > 0,2$$

$$\text{Nombre de canaux} : 19 \text{ canaux} > 7 \text{ canaux}$$

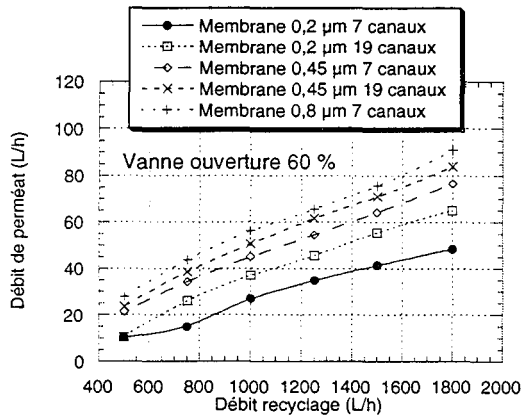
Physiquement, le gain de débit de perméat pour de l'eau pure avec la membrane 0,8 μm s'explique simplement par la taille des pores.



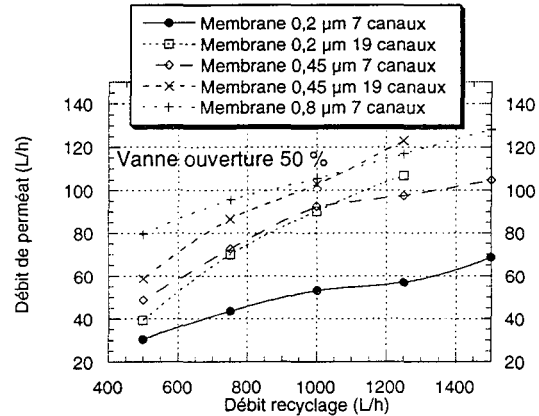
Grphe V. 17: Filtration S4 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 100%.



Grphe V. 18: Filtration S4 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 75%.



Grphe V. 19 : Filtration S4 - Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 60%.



Grphe V. 20 : Filtration S4- Evolution du débit de perméat en fonction du débit de recyclage et du type de membrane de microfiltration. Vanne ouverte à 50%.

Pour le nombre de canaux, c'est la vitesse du fluide dans chaque canal qui est la cause de l'augmentation du débit de perméat, car la surface de la membrane est identique pour les membranes à 19 et à 7 canaux.

Exemple : pour une membrane de 1 m longueur et de de $0,125 \text{ m}^2$ de surface d'échange, un fluide passe à un débit de $1 \text{ m}^3/\text{h}$; les vitesses dans chaque canal sont calculées dans le **Tableau V. 2.2**. La vitesse de l'eau est donc **2,7 fois** plus importante dans la membrane 19 canaux que dans la membrane 7 canaux. Le calcul du nombre de Reynolds montre que le fluide est en régime turbulent pour les deux types de membrane dans les conditions testées.

Tableau V. 2.2 : Calcul comparatif des vitesses du fluide dans des membranes de 19 et 7 canaux.

Canaux	Surface de la membrane (m^2)	Débit de recyclage (m^3/h)	Rayon d'un canal (m)	Section d'un canal (m^2)	Vitesse dans un canal (m/s)	Nombre de Reynolds
7	0,125	1	$2,84 \cdot 10^{-3}$	$2,54 \cdot 10^{-5}$	1,6	13960
19	0,125	1	$1,05 \cdot 10^{-3}$	$3,44 \cdot 10^{-6}$	4,2	13620

➔ Pour de l'eau, les membranes les plus intéressantes en filtrabilité sont donc :

- Membrane $0,8 \mu\text{m}$ 7 canaux
- Membrane $0,45 \mu\text{m}$ 19 canaux

2.5. - Etude de la filtration d'un milieu de culture

Pour réaliser cette étude, nous devons disposer d'un milieu de culture proche de ce que nous allons obtenir en recyclage cellulaire. Pour cela une fermentation continue avec recyclage des cellules (nommée R1) a été réalisée sans aucune optimisation. Le but était d'obtenir un volume de milieu de fermentation important avec une concentration en biomasse beaucoup plus élevée que ce que nous pouvions obtenir en culture discontinue ou continue simple.

Ensuite il sera possible d'utiliser ce milieu comme fluide modèle pour les expériences de filtration. Ces expérimentations sont réalisées dans le cadre d'un plan d'expériences non-linéaire multi-niveaux et multi-critères.

2.5.1. - Fermentation avec recyclage cellulaire

2.5.1.1. - Objectifs

- ❶ Réaliser une fermentation dans le réacteur à recyclage cellulaire qui pourra servir d'expérience de référence pour les expérimentations futures.
- ❷ Obtenir un volume de culture important qui servira à la réalisation des expériences de filtration.
- ❸ Obtenir un milieu de culture de concentration la plus élevée possible en biomasse.

2.5.1.2. - Démarche et conditions expérimentales

Cette expérimentation a été réalisée sur milieu M2 enrichi en extrait de levure liquide (10 g/L), car l'optimisation des conditions de culture, l'étude de la composition des milieux et les expériences de filtrations ont été menées en parallèle. Le protocole de fermentation est celui présenté dans le **chapitre III**. Les milieux de préculture en fioles d'Erlenmeyer et en fermenteur de 1 litre ont également été réalisés sur milieu M2. Le pH et la température sont régulés respectivement à 6,4 et 52°C (**Figure V. 2.2**).

La membrane utilisée est la 0,45 μm 19 canaux. La vanne de contre pression est ouverte à 80% dès le début du recyclage et le débit de recirculation est fixé arbitrairement à 1500 L/h.

Après ensemencement de la préculture à 6% dans le réacteur pilote, le volume total de milieu dans l'installation est de 7 litres. Une première phase en culture discontinue est faite pour permettre un démarrage de la croissance; puis le recyclage est enclenché, vanne de sortie perméat fermée. Après quelques minutes, l'alimentation de milieu (Milieu M2 enrichi) est mise en route à un taux de dilution de 0,31 h^{-1} (arbitraire). La vanne perméat est ouverte, mais une pompe extrait le même débit que le débit d'alimentation, le reste du perméat est renvoyé

dans le fermenteur. Les concentrations en biomasse et en acide lactique sont mesurées à chaque prélèvement. La manipulation est arrêtée quand la concentration en biomasse stoppe. Le milieu est récupéré et stocké en chambre froide dès la fin de l'expérience.

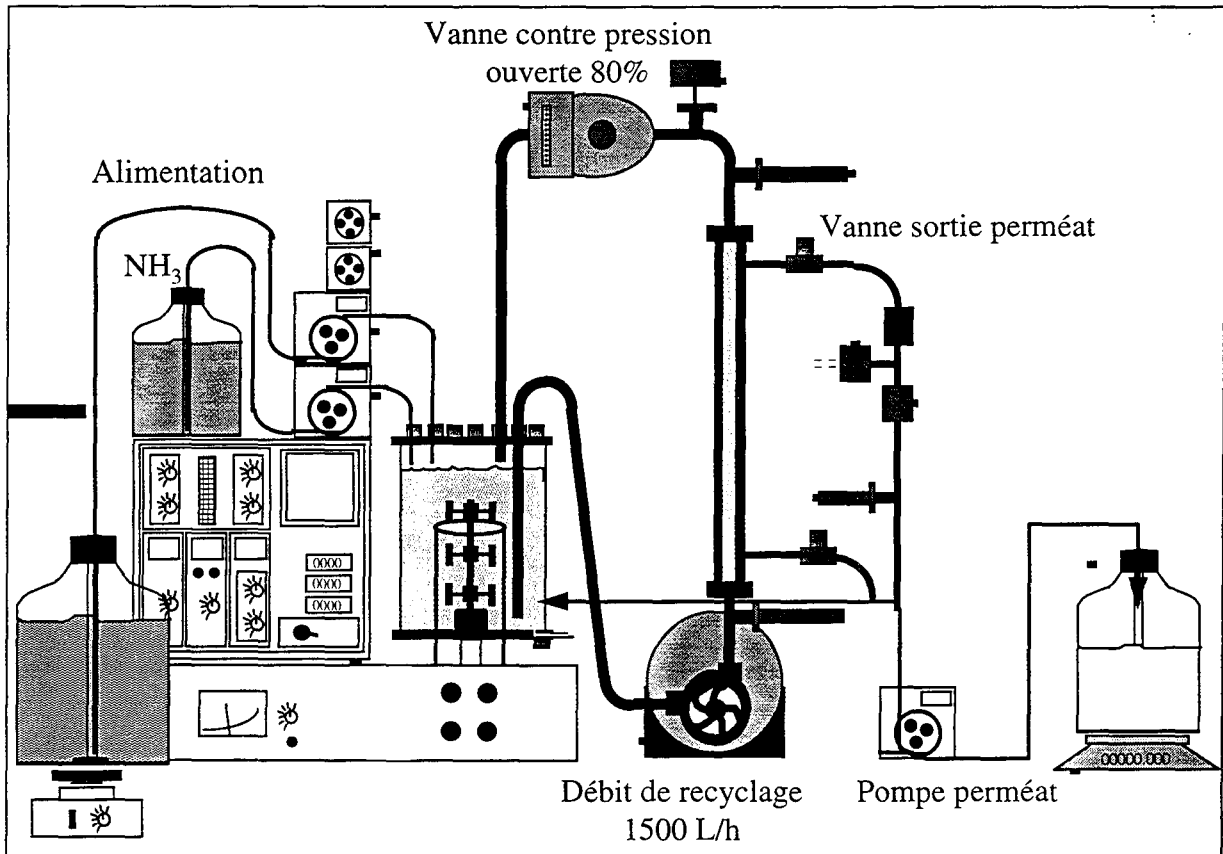


Figure V. 2.2 : Schéma de fonctionnement du réacteur à recyclage cellulaire lors de la fermentation R1.

2.5.1.3. - Résultats

Les évolutions cinétiques seront traitées dans le **chapitre VI**, consacré aux fermentations avec recyclage cellulaire.

2.5.1.4.- Conclusions de l'expérimentation

① L'expérimentation a permis d'obtenir 5,8 litres de milieu de culture composé de 15 g/L de cellules, 25 g/L d'acide lactique et environ 30 g/L de saccharose. Ce milieu est suffisant pour servir de fluide modèle aux expériences de filtrations. La concentration en biomasse obtenue est 5 fois plus importante que ce que nous avons obtenu en culture discontinue.

2.5.2. - Etude de la filtration d'un milieu de culture par un plan d'expériences non-linéaire.

Les influences des paramètres, tels que, le débit de recyclage, la pression transmembranaire ou le type de membrane, sont maintenant bien caractérisés pour un fluide comme l'eau pure. Ces premières expériences ont permis de décrire l'évolution du débit de perméat dans différentes conditions de recyclage, de pression et avec les 5 membranes. Ces études étaient nécessaires pour servir de référence à de nouvelles expérimentations et notamment pour accéder aux valeurs de colmatage d'un fluide chargé en bactéries. Le plan d'expériences choisi pour cette étude est en fait la combinaison de 3 plans d'expériences réalisés sur 3 types de membrane de porosité respective, 0,2 , 0,45 et 0,8 μm (toutes 7 canaux). La matrice d'expériences donnée par le programme statistique est présentée en **Annexe VII**.

2.5.2.1. - Objectifs de l'étude

- ❶ Déterminer les profils de filtration pour le fluide modèle pour les 3 porosités de membrane.
- ❷ Evaluer l'influence des paramètres de la microfiltration sur les débits de perméat obtenus et les niveaux de colmatage de la membrane.
- ❸ Optimiser les conditions de filtration et choisir la membrane qui servira à la réalisation des fermentations avec recyclage cellulaire.

2.5.2.2. - Conditions et démarche expérimentale

2.5.2.2.1. - Conception du plan d'expériences

Il s'agit en fait de trois plans, correspondant à chaque porosité de membrane, et qui pourront être comparées par la suite. Les 5 paramètres (variables) pour cette étude ont été choisis en fonction du résultat des expériences précédentes et de l'étude bibliographique :

- ❶ La porosité de la membrane (0,2 ; 0,45 ou 0,8 μm)
- ❷ Le débit de recyclage (fixé par le plan, domaine entre 500 et 1800 L/h)
- ❸ La pression d'entrée membrane (fixé par le plan, domaine entre 0,1 et 1,5 bar, en relatif)
- ❹ La concentration en biomasse (fixé par le plan, domaine: 1 à 15 g/L)
- ❺ Le temps entre deux décolmatages (fixé par le plan , domaine: 2 à 10 mn)

Le premier paramètre sera étudié par recoupement des 3 plans d'expériences; il est donc étudié à trois niveaux puisqu'il y a trois porosités.

Tableau V. 2.3 : Combinaison des 3 plans d'expériences non linéaires.

Essai N°	membrane	numéro	Débit recyclage	Pression	biomasse	Décolmatage
	Porosité	plan	(L/h)	(bar)	(g/L)	(mn)
1	0,2	15A	1150	0,8	15	2
2	0,45	15B	1150	0,8	15	2
3	0,8	15C	1150	0,8	15	2
4	0,2	6A	707	0,32	12,8	6,6
5	0,2	7A	1592	0,32	12,8	6,6
6	0,2	8A	707	1,28	12,8	6,6
7	0,2	9A	1592	1,28	12,8	6,6
8	0,45	6B	707	0,32	12,8	6,6
9	0,45	7B	1592	0,32	12,8	6,6
10	0,45	8B	707	1,28	12,8	6,6
11	0,45	9B	1592	1,28	12,8	6,6
12	0,8	6C	707	0,32	12,8	6,6
13	0,8	7C	1592	0,32	12,8	6,6
14	0,8	8C	707	1,28	12,8	6,6
15	0,8	9C	1592	1,28	12,8	6,6
16	0,2	1A	1150	0,8	8	10
17	0,2	10A	500	0,8	8	2
18	0,2	11A	1800	0,8	8	2
19	0,2	12A	1150	0,1	8	2
20	0,2	13A	1150	1,5	8	2
21	0,2	16A	1150	0,8	8	5
22	0,2	17A	1150	0,8	8	5
23	0,2	18A	1150	0,8	8	5
24	0,2	19A	1150	0,8	8	5
25	0,45	1B	1150	0,8	8	10
26	0,45	10B	500	0,8	8	2
27	0,45	11B	1800	0,8	8	2
28	0,45	12B	1150	0,1	8	2
29	0,45	13B	1150	1,5	8	2
30	0,45	16B	1150	0,8	8	5
31	0,45	17B	1150	0,8	8	5
32	0,45	18B	1150	0,8	8	5
33	0,45	19B	1150	0,8	8	5
34	0,8	1C	1150	0,8	8	10
35	0,8	10C	500	0,8	8	2
36	0,8	11C	1800	0,8	8	2
37	0,8	12C	1150	0,1	8	2
38	0,8	13C	1150	1,5	8	2
39	0,8	16C	1150	0,8	8	5
40	0,8	17C	1150	0,8	8	5
41	0,8	18C	1150	0,8	8	5
42	0,8	19C	1150	0,8	8	5
43	0,2	2A	707	0,32	3,2	6,6
44	0,2	3A	1592	0,32	3,2	6,6
45	0,2	4A	707	1,27	3,2	6,6
46	0,2	5A	1592	1,27	3,2	6,6
47	0,45	2B	707	0,32	3,2	6,6
48	0,45	3B	1592	0,32	3,2	6,6
49	0,45	4B	707	1,27	3,2	6,6
50	0,45	5B	1592	1,27	3,2	6,6
51	0,8	2C	707	0,32	3,2	6,6
52	0,8	3C	1592	0,32	3,2	6,6
53	0,8	4C	707	1,27	3,2	6,6
54	0,8	5C	1592	1,27	3,2	6,6
55	0,2	14A	1150	0,8	1	2
56	0,45	14B	1150	0,8	1	2
57	0,8	14C	1150	0,8	1	2

Les paramètres ②③ et ④ sont étudiés à 5 niveaux. Le débit de recyclage est contrôlé par la pompe, la bonne valeur pour la pression d'entrée sera obtenue grâce à la vanne de contre pression et la bonne concentration en biomasse sera obtenue en diluant le milieu modèle. Ces paramètres sont fixés par le plan et donnés sous forme d'une matrice (dérivée de celle d'Euler) appelée « matrice hybride ».

Le paramètre ⑤ sera étudié à 4 niveaux fixés par chaque plan.

Pour perdre le moins de temps possible en changement de membrane et pour ne pas perdre de milieu, l'ordre des essais ne se fait pas au hasard. Les trois plans sont mélangés sachant que l'on ne peut diluer le milieu puis le concentrer. Pour retrouver les trois plans et leurs essais respectifs, les expériences sont nommées par un chiffre et une lettre qui correspondent, respectivement, au numéro de l'expérience dans le plan, et au numéro du plan. Toutes les expériences sont également numérotées par un chiffre seul (sans lettre), qui correspond au numéro de l'essai dans l'ordre dans lequel la manipulation sera réalisée.

EXEMPLE : L'expérience n°1 du plan global (**Tableau V. 2.3**) porte bien le n°1, car c'est elle qui va être réalisée la première. Mais elle porte aussi le numéro 15A, ce qui veut dire que cette expérience est donnée par le plan A (c'est à dire pour la membrane 0,2 μm) et que c'est la 15ème expérience de ce plan.

Chaque plan donne 17 expériences plus 2 expériences de répétabilité. Soit pour les 3 membranes : **57 expériences à réaliser.**

Chaque expérience est réalisée dans les conditions fixées par le plan global. Pour les autres paramètres, ils sont toujours rigoureusement identiques. La température du fluide est de 50°C, le pH est réajusté à pH 6,4 avant le lancement de l'expérimentation. La membrane est préalablement hydratée plusieurs heures avec de l'eau pure. Entre chaque expérience, la membrane est lavée avec un détergent puissant et des anti-agglomérants puis elle est rincée abondamment à l'eau distillée. Quand le flux de perméat atteint sa valeur normale, celle-ci peut être réutilisée.

2.5.2.2.2. - Choix des réponses de filtration

Le critère principal est l'évolution cinétique du débit de perméat lors de chaque expérience. Il est difficile de représenter cette évolution avec une seule réponse. Pour trouver quelles réponses choisir, il suffit de tracer l'évolution « classique » d'un débit de perméat en

microfiltration ou en ultrafiltration soumis à un colmatage plus ou moins important (Figure V. 2.3).

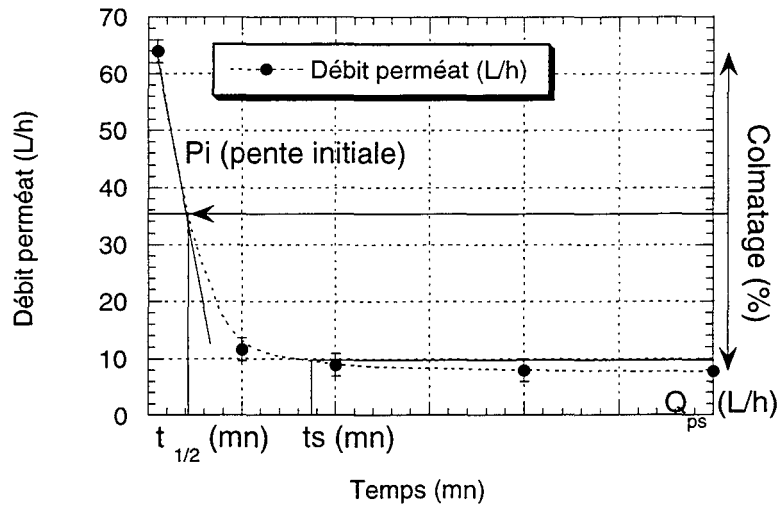


Figure V. 2.3 : Choix des réponses simulant la cinétique de filtration.

Les 5 réponses qui permettent de simuler l'allure de cette courbe sont, respectivement :

- Le débit obtenu à stabilisation ou au bout d'une durée fixe (Q_{ps} en L/h) qui permettra de comparer les valeurs des flux de perméat des différentes expériences à un temps donné.
- Le colmatage (%) = $(\text{Débit initial} - \text{Débit final} / \text{Débit initial}) \times 100$ qui correspond au pourcentage de perte de flux de perméat entre le début et la fin de l'expérimentation.
- Le temps pour arriver à stabilisation du débit (t_s en mn) qui est le temps nécessaire pour que le flux de perméat atteigne la valeur obtenue à la fin de l'expérimentation plus 10%.
- La pente initiale de diminution du débit (P_i en L/h²) qui est le paramètre qui permet de visualiser la vitesse maximale de perte de flux de perméat dans les premières minutes de l'expérimentation.
- Le temps nécessaire à la perte de la moitié du débit ($t_{1/2}$ en mn)

2.5.2.2.3. - Démarche expérimentale

Le suivi du débit de perméat sera réalisé pendant 24 heures pour chaque expérimentation. Les phénomènes sont généralement assez rapides, car la composition du fluide modèle ne doit pas évoluer, ce temps est donc théoriquement suffisant. Une expérience, préparation,

évoluer, ce temps est donc théoriquement suffisant. Une expérience, préparation, manipulation et lavage - rinçage prendra donc 48 heures, soit pour 57 expériences.

Les essais sont faits avec un volume de 4 litres de milieu. La conservation du fluide modèle est primordiale. Dès que les milieux sont dilués, la partie non utilisée est placée en chambre froide et pourra resservir 10 ou 20 semaines plus tard, sans altération importante.

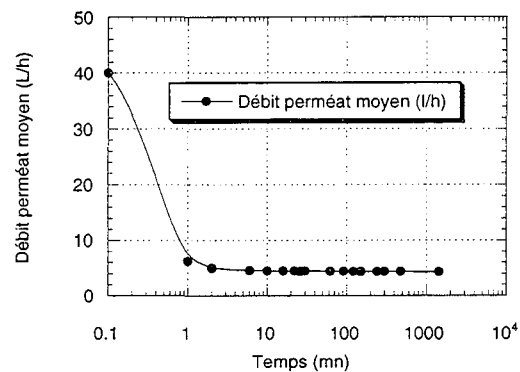
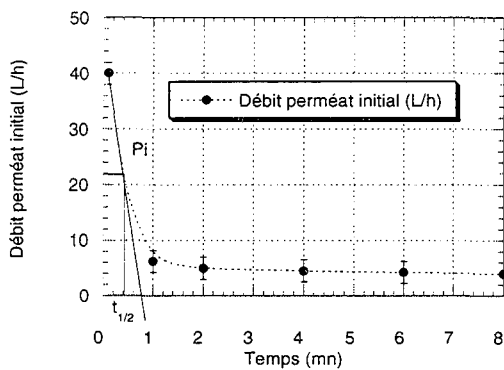
Pour contrôler l'intégrité des cellules, une coloration de Gram est réalisée régulièrement sur le milieu juste avant le recyclage.

Enfin, la pompe de recyclage a été étudiée et choisie spécialement pour limiter au maximum les contraintes de cisaillement sur les cellules. Il s'agit d'une pompe asymétrique à ailettes souples en Néoprène.

2.5.2.3.- Résultats des plans d'expériences

2.5.2.3.1. - Choix des représentations

Les graphiques d'évolution des débits de perméat (exemples **graphes a et b**), qui ont permis de déterminer toutes les réponses, ne sont pas représentés car ils ont peu d'intérêt intrinsèquement.



Grappe a : Evolution du débit de perméat dans les premières minutes et détermination de réponses.

Grappe b : Evolution du débit de perméat sur toute la durée de l'expérimentation - représentation Log.

Les résultats des plans d'expériences sont présentés en **Annexe VIII à X**. Les tableaux sont difficilement interprétables en l'état, néanmoins ils résument les valeurs des paramètres fixées par le plan et les valeurs de chaque réponse obtenue. D'autres valeurs sont également disponibles, telles que la pression transmembranaire, le flux initial (déduit des expériences précédentes), la pression de sortie (P2)...; mais elles ne sont pas présentées afin de ne pas alourdir le tableau.

Les graphiques d'évolution des débits de perméat qui ont permis de déterminer les réponses dans les 3 tableaux annexes ne sont pas représentés.

L'outil plan d'expérience permet de déterminer les effets de chaque paramètre sur chacune des réponses et de tracer les résultats sous forme de courbes de niveau ou en 3 D. Pour un plan d'expérience de ce type, il y a 30 combinaisons avec deux représentations possibles, soit 60 courbes à tracer pour chaque plan.

Nous nous bornerons à représenter les courbes les plus représentatives de l'effet de chaque paramètre. Les effets globaux et les conditions optimales seront résumés dans des tableaux ou sur des graphiques spécifiques.

2.5.2.3.2. - Résultats du plan A, membrane 0,2 μm

2.5.2.3.2.1. - Influence sur le débit final de perméat (Q_{ps})

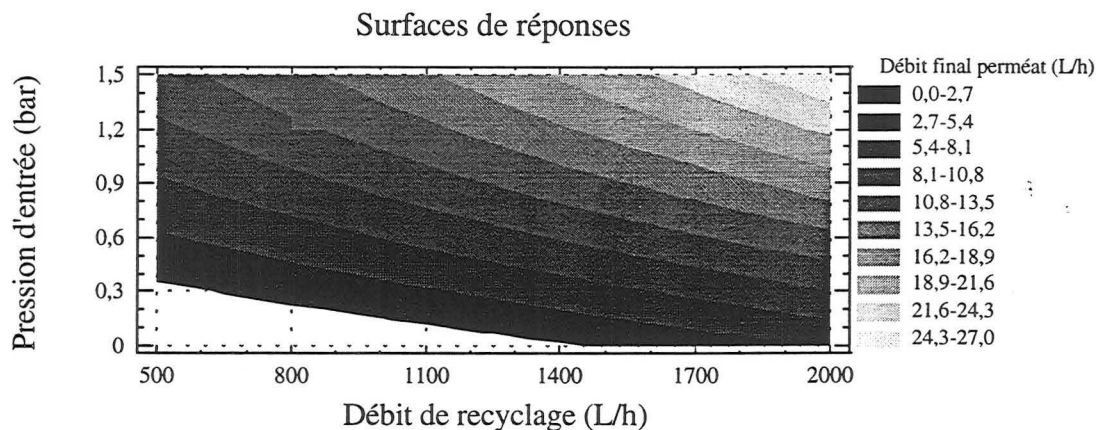
La première série de graphes (**graphes V.21 à V.23**) représente le débit de perméat à l'état stationnaire (ou à 24h, s'il n'y a pas d'état stationnaire) en fonction des paramètres de filtration. Les courbes de niveaux et leurs orientations permettent de décrire les effets de chaque paramètre sur le débit de perméat.

➡ **graphe V.21** : c'est la pression qui est le paramètre le plus important, plus elle est élevée, plus le débit de perméat est élevé. L'augmentation du débit de recyclage permet aussi une augmentation du débit de perméat, mais l'effet est beaucoup moins important.

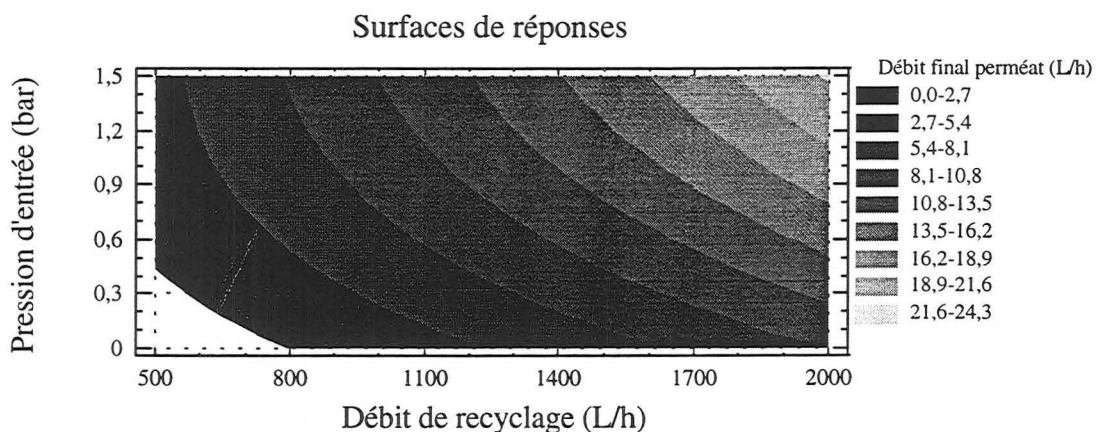
➡ **graphe V.22** : il s'agit de la même représentation que le graphe précédent, mais dans une autre partie du domaine (biomasse fixée à 15 g/L au lieu de 8 g/L). Plus la pression est élevée, plus son influence diminue sur le débit de perméat au profit de la vitesse de recyclage.

➡ **graphe V.23** : ce graphique montre l'évolution du débit de perméat final dans le domaine d'expérimentation en fonction de la concentration en biomasse et de la vitesse de recyclage (les deux autres paramètres sont fixés). L'allure des courbes de niveaux montrent clairement qu'aux faibles concentrations en biomasse, le débit de recyclage n'a pas d'effet sur l'évolution du débit de perméat. Par contre, à des concentrations supérieures à 10 g/L de biomasse, l'augmentation du flux n'est dépendante que du débit de recyclage.

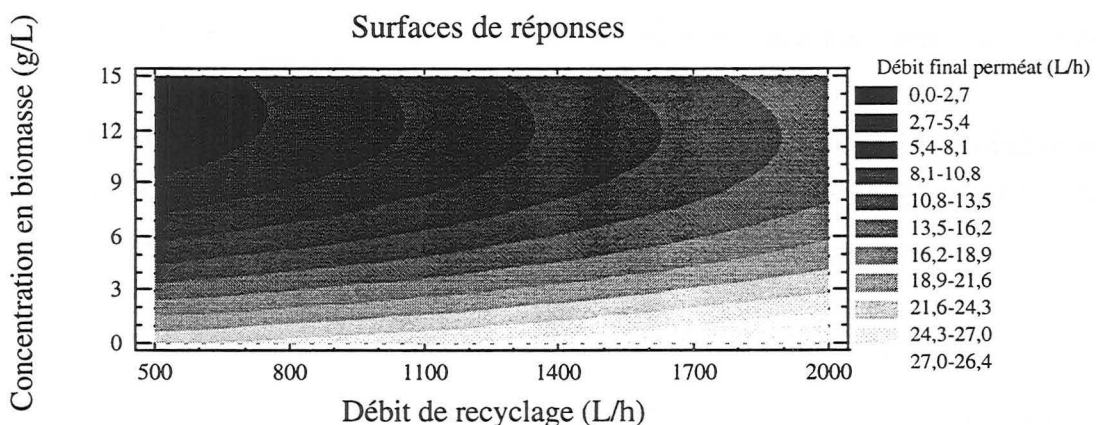
Il est donc fondamental de préciser le domaine d'expérimentation et dans quelle partie du domaine les effets sont observés.



Graphe V. 21 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la pression (P1) et du débit de recyclage (Q_r) pour une fréquence de décolmatage de $0,5 \text{ min}^{-1}$ et une concentration en biomasse de 8 g/L



Graphe V. 22 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la pression (P1) et du débit de recyclage (Q_r) pour une fréquence de décolmatage de $0,5 \text{ min}^{-1}$ et une concentration en biomasse de 15 g/L



Graphe V. 23 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la concentration en biomasse (X) et du débit de recyclage (Q_r) pour une fréquence de décolmatage de $0,5 \text{ min}^{-1}$ et une pression (P1) de $0,8 \text{ bar}$

Le **graphe V.24** résume les effets des paramètres sur le débit final de perméat observé. Ce débit va augmenter quand :

- ➔ la pression P1 est forte
- ➔ le débit de recyclage est élevé
- ➔ la concentration en biomasse est faible
- ➔ la fréquence de décolmatage est élevée (le temps entre 2 « back-flush » faible).

Les effets sont tous linéaires sauf pour la concentration en biomasse. Arrivé à une certaine concentration, ce paramètre n'a plus d'influence sur l'évolution du débit de perméat.

Le tableau des interactions et des effets quadratiques (non présenté) de chaque paramètre montre qu'il existe des interactions élevées entre les paramètres, qui peuvent expliquer la faible influence de certains paramètres par rapport à d'autres.

2.5.2.3.2.2. - Résumé des influences sur les autres réponses

Le **graphe V.25** décrit l'influence de chaque paramètre sur le colmatage de la membrane.

Le colmatage de la membrane est faible quand :

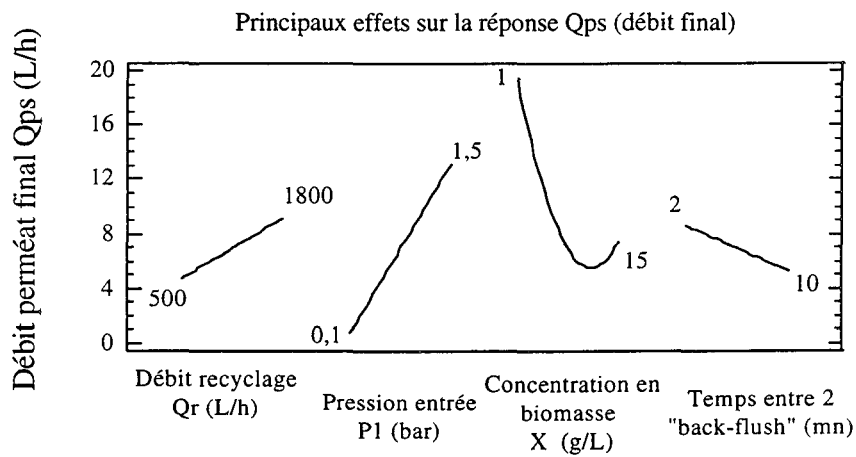
- ➔ le débit de recyclage est élevé
- ➔ la pression est faible
- ➔ la concentration en biomasse est faible (paramètre critique)

De même, en dessous d'un certain débit de recyclage, ce paramètre n'a plus d'effet. Au dessus d'une certaine concentration en biomasse, il n'y a pas d'effet non plus. Enfin, et c'est inattendu, le « back-flush » n'a pas d'effet sur le niveau de colmatage de la membrane. Mais il existe cependant une interaction forte entre la pression et le système de décolmatage, qui peut expliquer que ce paramètre soit masqué par cette interaction.

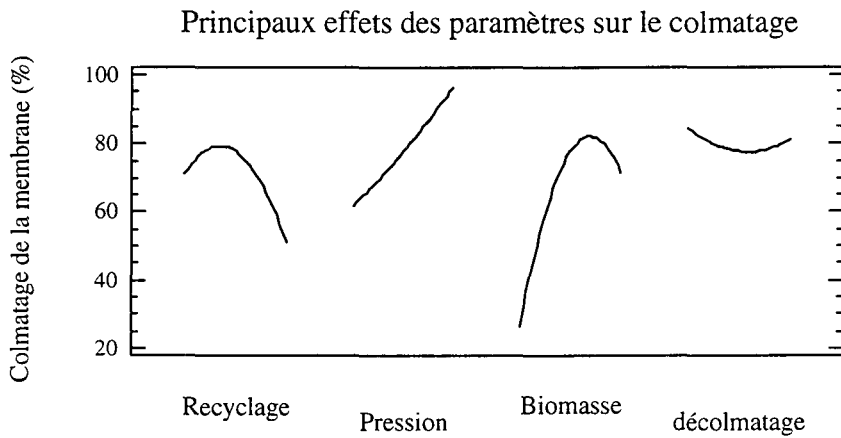
Le **graphe V.26** décrit l'influence de chaque paramètre sur la vitesse de stabilisation du flux de perméat (ts). Cette vitesse est élevée si :

- ➔ la pression est faible
- ➔ la concentration en biomasse est faible
- ➔ la fréquence de décolmatage est élevée (paramètre critique très influent)

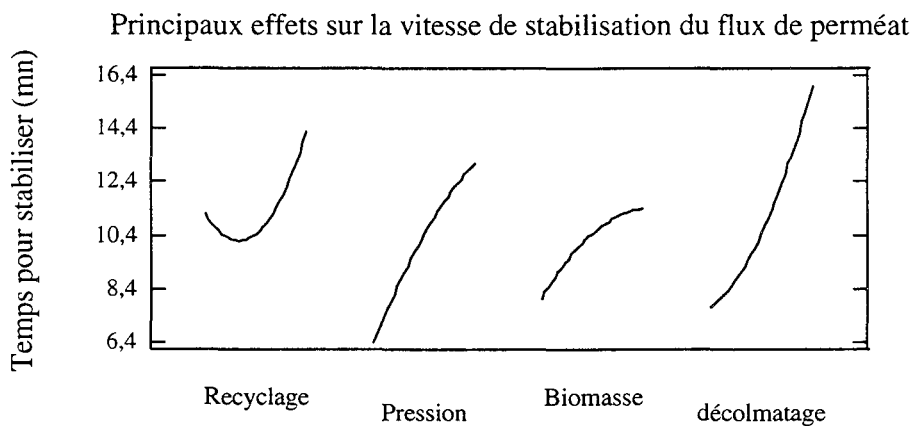
remarque : Le flux est considéré comme stable quand l'écart de flux observé entre le flux final et le flux à un temps t est inférieur à 5%.



Graphe V. 24 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) final en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)



Graphe V. 25 : Evolution du colmatage en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)



Graphe V. 26: Evolution du temps pour stabiliser le flux en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)

Le **graphe V.27** décrit l'influence de chaque paramètre sur l'évolution de la pente initiale de diminution du débit de perméat (P_i). Cette pente (vitesse négative) est élevée quand :

➔ la pression est élevée (paramètre critique, le plus important)

La fréquence de décolmatage n'a aucune influence, ce qui est normal puisque dans le meilleur des cas le décolmatage n'intervient que 2 minutes après le début de l'expérience, alors que la valeur de la pente initiale est déjà fixée.

Les valeurs de $t_{1/2}$ sont très faibles et ont peu d'amplitude (de 30 à 40 secondes, voir **Annexe VIII**), les erreurs d'estimation de ce paramètre sont très élevées, car les temps sont très courts par rapport à la durée totale de la manipulation. Les effets sont donc difficilement interprétables.

2.5.2.3.2.3. - Conclusions sur la membrane 0,2 μ m

- Le flux de perméat se stabilise quelles que soient les conditions expérimentales. Le flux de perméat au centre du domaine est de 60 L.h⁻¹.m⁻². La pression et la concentration en biomasse sont les principaux paramètres qui fixent la valeur finale du flux de perméat.

- C'est la concentration en biomasse qui est le paramètre fondamental du colmatage de la membrane. L'élévation de la pression augmente le colmatage, alors que des vitesses de recyclage élevées le diminuent.

➔ *Ces deux conclusions permettent de décrire le mécanisme supposé de filtration d'une membrane de 0,2 μ m de porosité. La biomasse se place à la surface de la membrane pour former une couche de polarisation (colmatage en surface), cette couche est plus ou moins compactée par la pression, alors que le débit de recirculation permet d'arracher des cellules (force d'érosion). Quand ces paramètres deviennent stables (en quelques minutes), le flux de perméat se stabilise, ce qui signifie qu'il n'y a pas de colmatage en profondeur de la membrane (ou alors le phénomène est très lent, état pseudo-stationnaire (**Figure V. 2.4**).*

Enfin, les prélèvements à la sortie perméat confirment que les cellules ne passent pas à travers des membranes puisque ces prélèvements ne contiennent aucune cellule : la membrane 0,2 μ m est stérilisante.

- La vitesse de stabilisation du flux est importante pour augmenter la productivité et la stabilité du procédé. Le « back-flush » permet d'arriver plus rapidement à l'état pseudo-stationnaire, même si visiblement il n'influence pas la valeur finale de flux de perméat obtenu.

- Le plan d'expérience est une mine d'informations très importantes, il permet d'optimiser la valeur des paramètres pour chaque réponse et de prédire l'évolution d'une réponse dans une

partie du domaine expérimental que nous n'avons pas étudiée. Cette finalité sera présentée dans un chapitre spécifique consacré à la modélisation de la microfiltration d'un milieu de culture. Néanmoins pour valider le plan d'expériences, il est nécessaire de connaître quelques paramètres statistiques. Un exemple de la détermination de ces paramètres statistiques est donné en **annexe XI**. Le paramètre statistique R^2 ajusté est dans tous les cas, pour tous les paramètres, et pour toutes les réponses, supérieur à 0,95 ; les effets observés sont significatifs.

- Les conditions optimales pour obtenir un flux de perméat maximal ont pu être déterminées grâce au plan d'expériences. Pour une concentration fixe de 15 g/L de biomasse (concentration que nous risquons d'obtenir en recyclage cellulaire), il faut un débit de recyclage, une pression d'attaque de la membrane et une fréquence de décolmatage les plus élevés possible. Car, même si la pression compacte la couche de polarisation (colmatage réversible), il ne faut pas oublier qu'elle favorise également le passage du milieu vers la sortie perméat sans colmatage en profondeur (irréversible).

Dans ces conditions et pour une concentration en biomasse de 15 g/L :

➔ $Q_r = 1800 \text{ L/h}$

➔ $P1 = 1,5 \text{ bar}$

➔ Temps entre 2 « back-flush » = 2 mn

➔ $Q_p = 20 \text{ L/h}$, d'où le flux de perméat maximum = $160 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$

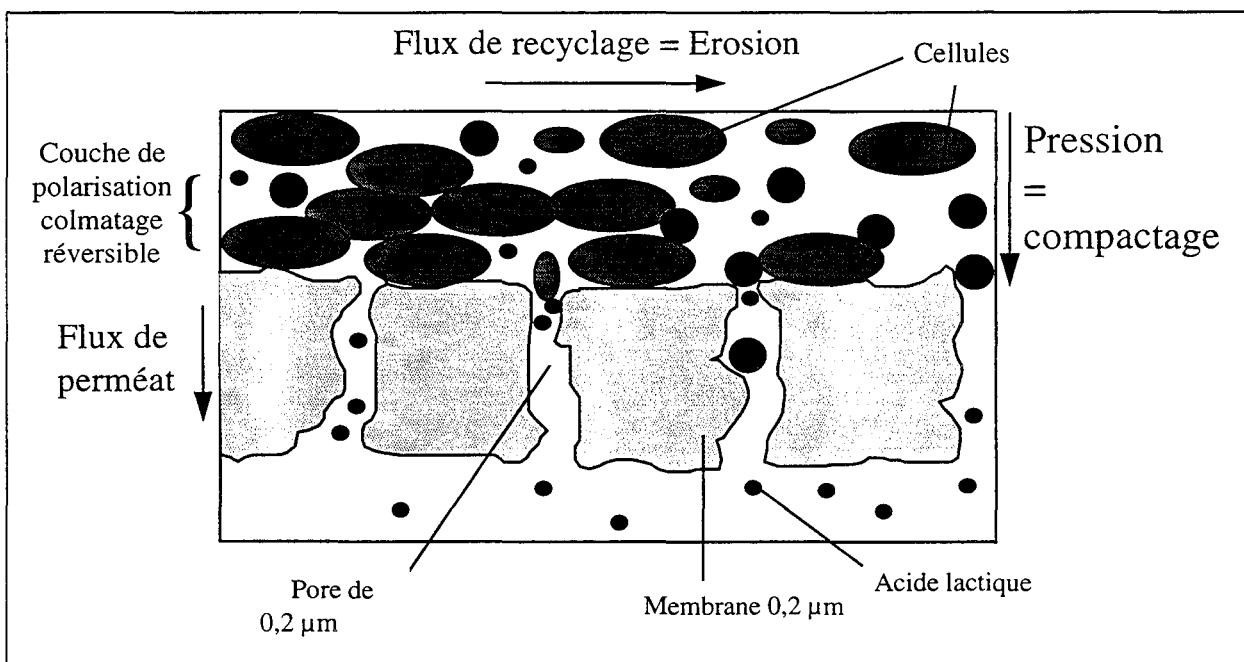


Figure V. 2.4 : Schéma du mécanisme de filtration d'une membrane de 0,2 µm de porosité.

2.5.2.3.3.- Résultats du plan B, membrane 0,45 μm

Le résultat du plan d'expériences est présenté en **Annexe IX**. Les valeurs des réponses ont été obtenues en traçant l'évolution du débit de perméat en fonction du temps. L'allure de cette courbe est identique à ce que nous avons obtenu avec la membrane de 0,2 μm . Deux différences majeures sont cependant visibles. Premièrement, il y a des conditions qui engendrent un colmatage total de la membrane. Deuxièmement, il y a des conditions qui ne permettent pas de stabilisation du flux de perméat.

Enfin, la détermination de la réponse $t_{1/2}$ reste aléatoire et, comme précédemment, il sera impossible de conclure sur cette réponse.

2.5.2.3.3.1. - Influence sur le débit de perméat à 24 h

Le **graphe V.28** montre que la concentration en biomasse a plus d'effet sur le débit de perméat que la pression d'entrée de la membrane. Il montre également qu'au dessus d'une certaine pression, il n'y a pas de gain de flux de perméat.

Ces observations sont confirmées par le **graphe V.29** où la concentration en biomasse est le principal obstacle à un gain du débit de perméat. La vitesse de recyclage et le système de décolmatage ne sont pas influents.

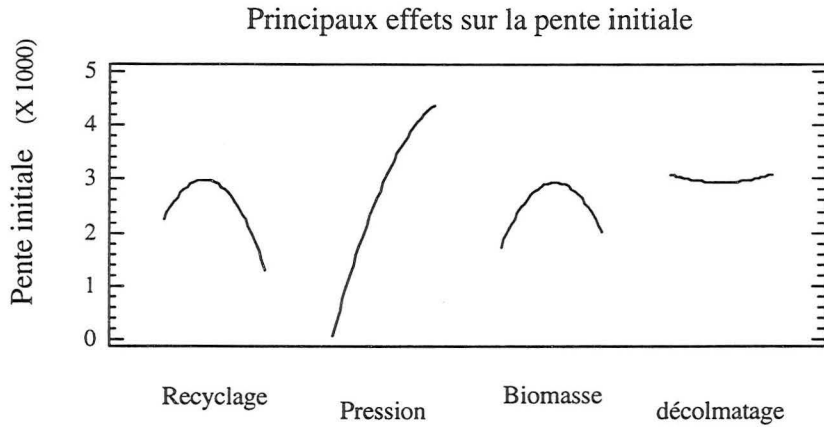
2.5.2.3.3.2. -Influence sur le colmatage de la membrane

Le colmatage est élevé quand la concentration en biomasse et la pression sont élevées. Par contre au dessus d'une certaine vitesse de recyclage, le colmatage diminue. Le système de « back-flush » n'a pas d'effet sur le niveau de colmatage de la membrane (**graphe V.30**).

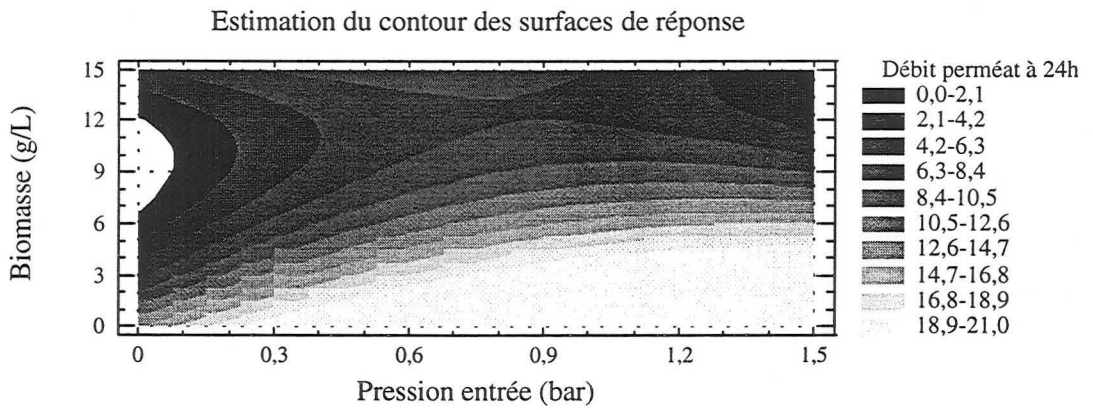
2.5.2.3.3.3. - Effets sur les autres réponses

L'analyse de la réponse $t_{1/2}$ n'est pas significative. De même, l'analyse statistique de t_s (temps pour stabiliser le flux) est impossible puisqu'il y a, parmi les réponses, 2 colmatages totaux et 3 flux non stabilisés. Il faut donc éviter de travailler dans cette partie du domaine d'expérimentation qui est lié à une concentration en biomasse relativement élevée et à une pression trop faible ou trop forte. Il y aura donc un optimum de pression à trouver, ce qui est très délicat au vu des graphes précédents.

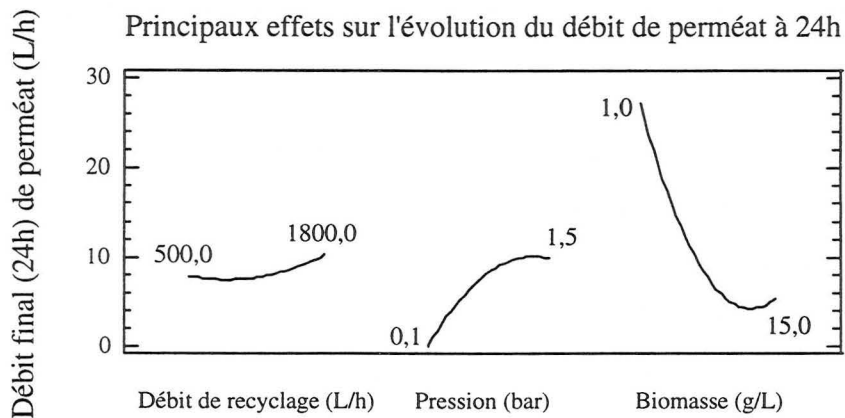
Le **graphe V.31** montre que la pente initiale de diminution du débit de perméat est influencée à la fois par P_1 et par Q_r .



Grphe V. 27 : Evolution de la pente initiale en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre)



Grphe V. 28 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) à 24h (final) en fonction de la pression (P_1) et de X (g/L) pour une fréquence de décolmatage de $0,5 \text{ mn}^{-1}$ et un débit de recyclage de 1500 L/h - Membrane $0,45 \mu\text{m}$



Grphe V. 29 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) final en fonction de 3 paramètres du plan d'expériences. Le paramètre 4 (décolmatage) n'ayant pas d'influence - Membrane $0,45 \mu\text{m}$.

2.5.2.3.3.4. - Conclusions sur la membrane 0,45 μm

- Certaines parties du domaine expérimental sont relativement floues; dans des conditions très diverses, il y a un risque de colmatage total de la membrane ou un risque de ne jamais atteindre d'état pseudo-stationnaire. Le flux de perméat au centre du domaine atteint $63 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, ce qui n'est significativement pas différent de la valeur observée pour la membrane à $0,2 \mu\text{m}$ de porosité. La concentration en biomasse joue un rôle plus important avec cette membrane à $0,45 \mu\text{m}$ qu'avec la membrane précédente. La pression a toujours un effet important sur le flux final et le colmatage. Un débit de recyclage élevé augmente le flux de perméat et diminue le colmatage, mais ces effets sont limités en amplitude. Enfin, le décolmatage n'est quasiment pas influent.

- L'augmentation de la biomasse a un effet négatif, à la fois, sur le flux final et le colmatage, ceci est un inconvénient majeur, car dans une fermentation avec recyclage cellulaire, c'est la concentration en biomasse élevée qui permet les gains de performance.

De plus, dans le meilleur des cas et, avec 15 g/L de biomasse, l'optimisation statistique des paramètres pour le débit de perméat donne une valeur de flux deux fois moins importante qu'avec la membrane $0,2 \mu\text{m}$:

$$\Rightarrow Q_r = 1800 \text{ L/h}$$

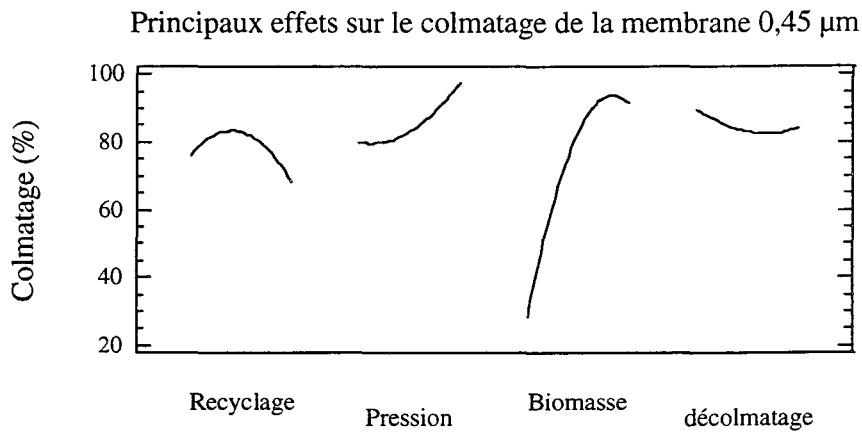
$$\Rightarrow P1 = 0,8 \text{ bar}$$

$$\Rightarrow \text{Temps entre 2 « back-flush »} = 2 \text{ mn}$$

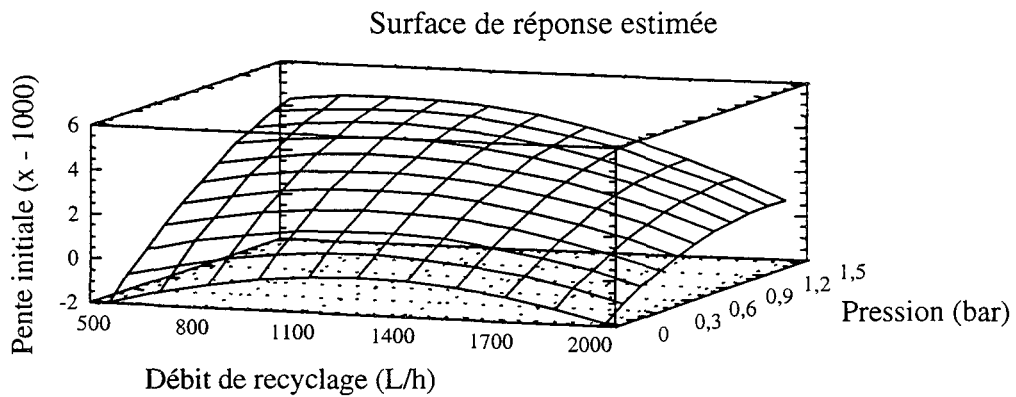
$$\Rightarrow Q_p = 10 \text{ L/h} , \text{ d'où le flux de perméat maximum} = 80 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$$

Cette différence entre les deux membranes va à l'encontre des travaux réalisés précédemment avec l'eau pure. L'influence de la composition du milieu de culture est primordiale et peut inverser l'évolution des réponses.

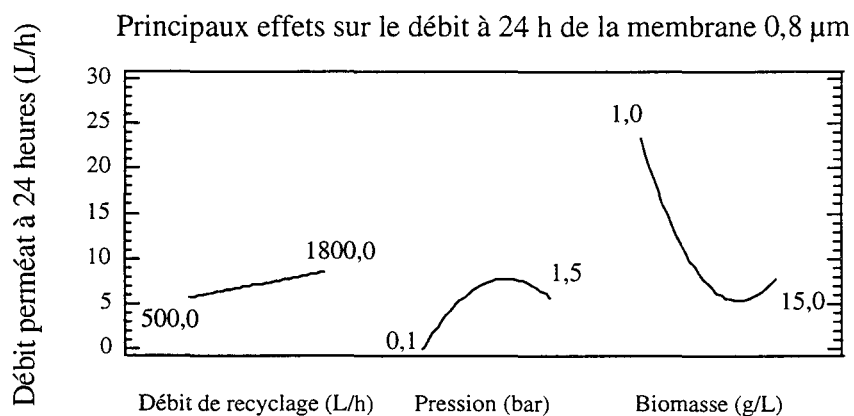
- Ces phénomènes s'expliquent par une augmentation du colmatage irréversible de la membrane ou du colmatage en profondeur. La porosité de la membrane est plus élevée, ce qui permet à des cellules de pénétrer dans la membrane avec le milieu, notamment à des pressions élevées. Les pores se bouchent avec l'avancement de la filtration et il n'y a pas de stabilisation du débit de perméat (**Figure V. 2.5**).



Graphe V. 30 : Evolution du colmatage en fonction des 4 paramètres du plan d'expériences. Chaque courbe se lit de la gauche vers la droite (valeur minimale vers valeur maximale du paramètre) - Membrane 0,45 μm



Graphe V. 31: Evolution de la pente initiale en fonction de la pression et du débit de recyclage pour la membrane 0,45 μm .



Graphe V. 32 : Evolution du débit de perméat (Q_{ps}) final en fonction de 3 paramètres du plan d'expériences. Le paramètre 4 (décolmatage) n'ayant pas d'influence - Membrane 0,8 μm .

A des pressions faibles et avec une concentration en biomasse supérieure à 8 g/L, il y a colmatage total de la membrane, l'hypothèse la plus vraisemblable est que la pression est insuffisante pour permettre au milieu de passer la couche de polarisation de cellules qui bouche l'entrée des pores de la membrane.

Même si les cellules semblent entrer dans la membrane, cette dernière demeure stérilisante jusqu'à la fin de toutes les expérimentations. Les micro-organismes restent coincées dans la membrane.

Enfin, le phénomène d'érosion créé par le débit de recyclage est inefficace sur des cellules qui se trouvent dans la membrane.

➔ *L'intérêt pour l'utilisation de cette membrane en recyclage cellulaire est donc limité.*

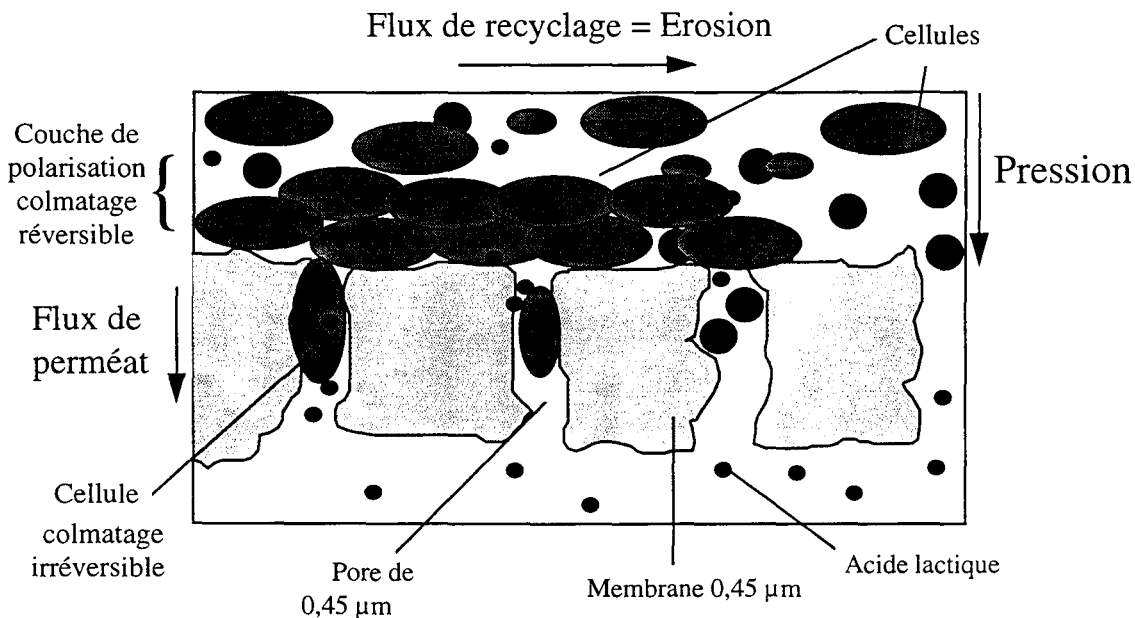


Figure V. 2.5 : Schéma du mécanisme de filtration d'une membrane de 0,45 µm de porosité.

2.5.2.3.4. - Résultats du plan C - Membrane 0,8 µm

Le résultat du plan d'expériences est présenté en **Annexe X**.

2.5.2.3.4.1. - Résumé des effets des paramètres

Les paramètres étudiés ont les mêmes effets sur les réponses que pour la membrane précédente, mais avec une influence encore plus importante de la biomasse. Par exemple, le

graphe V.32 montre une évolution identique du débit de perméat à 24 heures à celle observée pour le **graphe V.29** de la membrane 0,45 μm .

Ainsi le flux de perméat augmente et le colmatage diminue avec :

- ➔ une faible concentration en biomasse
- ➔ un débit de recyclage élevé
- ➔ une valeur de pression intermédiaire

2.5.2.3.4.2.- Conclusions sur la membrane 0,8 μm

- Le flux de perméat ne se stabilise dans aucune des expérimentations et le colmatage est encore plus élevé qu'avec la membrane 0,45. Les effets des paramètres évoluent de la même façon que pour la membrane 0,45. Le flux au centre du domaine d'expériences est de $54 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$, soit significativement plus faible que pour la membrane 0,2 μm .

- L'optimisation des paramètres de cette membrane a tout de même été faite pour une concentration en biomasse de 15 g/L, mais le flux obtenu est encore plus faible que pour la membrane 0,45 μm :

- ➔ $Q_r = 1800 \text{ L/h}$
- ➔ $P1 = 1,2 \text{ bar}$
- ➔ Temps entre 2 « back-flush » = 2 mn

➔ **$Q_p = 8 \text{ L/h}$, d'où le flux de perméat maximum = $65 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$**

- Les prélèvements faits à la sortie perméat montrent que la membrane n'est pas stérilisante et que quelques cellules passent. Le taux de rétention estimé est tout de même proche de 99,9%, mais les risques de contamination existent.

- Les mécanismes de filtration dans cette membrane ne sont pas différents de ceux observés dans la membrane 0,45, si ce n'est que la part du colmatage en profondeur augmente.

- Cette membrane donnait les meilleurs flux lors de l'étude avec de l'eau, mais quand le fluide est un milieu de culture chargé en cellules de *Bacillus coagulans*, elle devient la moins bonne des trois membranes testées.

➔ *Cette membrane n'a donc aucun intérêt pour les cultures avec recyclage cellulaire.*

2.5.2.4. - Conclusions de l'étude

① La membrane 0,2 μm permet d'obtenir des débits de perméat plus élevés que les deux autres membranes alors que la porosité est plus faible. Ce débit arrive rapidement dans un état pseudo-stationnaire, ce qui laisse espérer une longévité élevée du procédé et un contrôle du

colmatage possible lors de fermentations avec recyclage cellulaire. Comme pour Boyaval, 1988 et 1996, c'est cette porosité qui a été choisie pour la suite des études.

② Pour cette membrane 0,2 μm , l'augmentation du flux de perméat est possible en augmentant la pression d'attaque de la membrane et le débit de recyclage, ce qui confirme les travaux de Crespo, 1992 et Boyaval, 1996.

Contrairement aux travaux de Kim, 1991, le « back-flush » a un effet limité, par rapport aux autres paramètres, sur la valeur de flux obtenu; par contre il a un effet primordial sur la vitesse de stabilisation de ce flux.

Enfin, la biomasse est un paramètre très important, dont la valeur ne va dépendre que de la partie fermentation.

③ Les effets sur les deux autres membranes ont également été décrits, la valeur de la biomasse est plus importante encore, à cause des phénomènes de colmatage en profondeur. C'est ce colmatage irréversible qui est la cause du rejet de ces deux membranes. Les mécanismes décrits dans la littérature (Boyaval, 1996) s'appliquent tout à fait aux observations qui ont été faites lors de cette étude.

④ Le plan d'expériences est un outil très puissant, il a permis de déterminer les influences de chaque paramètres, des interactions, d'optimiser les conditions de filtration et, nous le verrons plus tard, de modéliser et de faire de la prédiction de l'évolution du flux de perméat.

3. CONCLUSIONS DU CHAPITRE V

L'étude du système de microfiltration a permis d'évaluer les paramètres limitants de cette opération unitaire dans un domaine expérimental relativement large.

Une température de fermentation de 50°C est un avantage incontestable pour l'amélioration des flux de perméat par rapport aux flux obtenus avec des souches mésophiles. *Bacillus coagulans* est donc une souche idéale du point de vue de la température pour sa mise en oeuvre dans un réacteur avec recyclage cellulaire.

Les autres paramètres ayant une influence sur le débit de perméat ont été caractérisés, et les mécanismes de leurs effets proposés. Ces mécanismes sont en accord avec ceux décrits dans la littérature (Boyaval, 1996). Une différence est observée uniquement sur l'effet du décolmatage par flux inversé. Il semble que ce paramètre ait une influence, mais relativement limitée, sur le niveau du flux de perméat au bout de 24 heures. Par contre, il a une influence importante sur la vitesse de stabilisation de ce flux. Il est possible que la durée du décolmatage soit trop courte ou que la pression de décolmatage soit trop faible.

La membrane de porosité 0,2 µm n'autorise pas d'adsorption forte ou de colmatage en profondeur des cellules, cette membrane est stérilisante. Le flux de perméat est à l'état pseudo-stationnaire même au bout de 24 heures de recyclage. La composition du milieu modèle pour la filtration n'a pas évolué, les observations microscopiques ont montré très peu de débris cellulaires tout au long des expérimentations. Ceci permet de dire que la pompe de recyclage engendre peu de contraintes de cisaillement.

Pour les membranes de porosités supérieures, le flux de perméat obtenu est deux à trois fois plus faible avec le fluide modèle. Alors qu'il était 1,5 à 2 fois plus élevé avec de l'eau. Les valeurs de colmatage de ces membranes sont très élevées, les risques d'un colmatage total et d'une chute du flux de perméat sont également élevés. Ceci est très probablement dû à l'augmentation de la part du colmatage irréversible dans ce type de membrane.

L'optimisation des paramètres de microfiltration a été déterminée pour des concentrations en biomasse de 15 g/L et pour la membrane de porosité 0,2 µm. Il semble que, même si la

concentration en biomasse augmente encore, il n'y ait pas de risques de colmatage irréversible. Le flux risque d'être plus faible à cause de la viscosité du milieu, mais il est probable qu'il y ait tout de même un état pseudo-stationnaire. Le résultat de l'optimisation du plan montre qu'il est préférable de travailler à un débit de recyclage, à une pression et à une fréquence de décolmatage élevés. Le flux maximal théorique dans ces conditions est de $160 \text{ L.h}^{-1}.\text{m}^{-2}$.

L'augmentation de la vitesse de recyclage dans les membranes de porosité $0,2 \mu\text{m}$, permet de limiter la formation et l'épaisseur de la couche de polarisation et d'augmenter le flux de perméat. La membrane à 19 canaux n'a pas été testée avec le fluide modèle, néanmoins, le flux de perméat sera théoriquement plus élevé avec cette membrane, car la vitesse est théoriquement 2,7 fois plus élevée que dans la membrane 7 canaux.

➔ *La membrane $0,2 \mu\text{m}$, 7 canaux servira à la modélisation de la filtration, car le plan d'expérience a permis d'accumuler une quantité importante de données sur cette membrane.*

➔ *La membrane $0,2 \mu\text{m}$, 19 canaux sera utilisée pour la réalisation des fermentations avec recyclage cellulaire, car c'est cette configuration de membrane qui semble la mieux adaptée à l'obtention de flux de perméat élevé et stable.*

~ CHAPITRE VI ~

Etude du réacteur pilote

- Chapitre VI -

Etude du pilote de fermentation à recyclage cellulaire

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	225
2. ETUDE DES PARAMETRES LIES A L'ULTRAFERMENTATION	227
2.1. - FERMENTATION ET PARAMETRES CINETIQUES DE REFERENCE.....	227
2.1.1. - <i>Objectifs</i>	227
2.1.2. - <i>Conditions expérimentales</i>	227
2.1.3. - <i>Résultats de la fermentation R1</i>	227
2.1.4. <i>Conclusions</i>	228
2.2. - INCIDENCE DE L'AMELIORATION DES MILIEUX DE CULTURES	229
2.2.1. - <i>Etude comparative finale des milieux de cultures</i>	230
2.2.2. - <i>Fermentation avec recyclage cellulaire sur milieux M3</i>	234
2.3. ETUDE DU TAUX DE DILUTION ET DU TAUX DE PURGE	238
2.3.1. <i>Objectifs</i>	239
2.3.2. <i>Conditions expérimentales</i>	239
2.3.3. - <i>Conclusions de l'étude</i>	247
3. RECHERCHE DE PERFORMANCES DU PROCEDE	249
3.1. - OPTIMISATION FINALE DU PROCEDE A RECYCLAGE CELLULAIRE	249
3.1.1. - <i>Objectifs</i>	249
3.1.2. - <i>Conditions expérimentales</i>	249
3.1.3. <i>Résultat de la fermentation</i>	251
3.1.4. <i>Conclusions de la fermentation</i>	257
3.2. COMPARAISON DES 3 MODES DE CULTURES	259
3.2.1. <i>Résultats</i>	259
3.2.2. <i>Conclusions</i>	259
3.3. COMPARAISON AVEC LA LITTERATURE.....	261
4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI	263

TABLEAUX

Tableau VI. 2.1 : Paramètres cinétiques obtenus lors de la première fermentation à recyclage cellulaire comparée avec les meilleures fermentations discontinues et continues.	228
Tableau VI. 2.2 : Résumé et comparaison des paramètres cinétiques des fermentations F34, F43 et F44.	231
Tableau VI. 2.3 : Valeurs et contrôles des principaux paramètres de filtration.	235
Tableau VI. 2.4 : Résumé des paramètres cinétiques de la fermentation R2.	237
Tableau VI. 2.5 : Valeurs et contrôles des principaux paramètres de filtration.	239
Tableau VI. 2.6 : Matrice du plan d'expériences pour le taux de dilution et le taux de purge.	241
Tableau VI. 2.7 : Table des réponses du plan d'expériences.	243
Tableau VI. 3.1 : Composition des milieux utilisés lors de la fermentation R12.	249
Tableau VI. 3.2 : Valeurs et contrôles des principaux paramètres de filtration.	251
Tableau VI. 3.3 : Paramètres cinétiques de la phase de production (phase 7).	256
Tableau VI. 3.4 : Tableau comparatif des valeurs cinétiques et des performances des 3 modes de culture étudiés (F pour discontinu, C pour continu et R pour recyclage cellulaire).	259
Tableau VI. 3.5 : Comparaison des performances obtenues avec celles de la littérature.	262

FIGURES

Figure VI. 2.1 : Protocole expérimental de la fermentation en haute densité cellulaire.	234
Figure VI. 2.2 : Protocole général de l'étude du taux de purge et du taux de dilution dans un réacteur à haute densité cellulaire.	240
Figure VI. 3.1 : Protocole expérimentale de la fermentation R12.	250
Figure VI. 3.2 : Protocole appliqué à la fermentation avec recyclage cellulaire.	251

1. INTRODUCTION

Le couplage entre le fermenteur et le module de microfiltration va être réalisé dans cette partie.

Après le rappel des performances obtenues lors de la première expérimentation en recyclage cellulaire (**Chapitre V**) et, qui serviront de base aux travaux de ce chapitre, l'amélioration finale de la composition des milieux de culture, adaptée au réacteur à recyclage cellulaire, va être discutée.

Les paramètres spécifiques à ce type de réacteur vont être étudiés et optimisés par le biais d'un nouveau plan d'expériences factoriel à 3 niveaux. Les deux paramètres les plus importants sont très vraisemblablement le taux de dilution et le taux de purge.

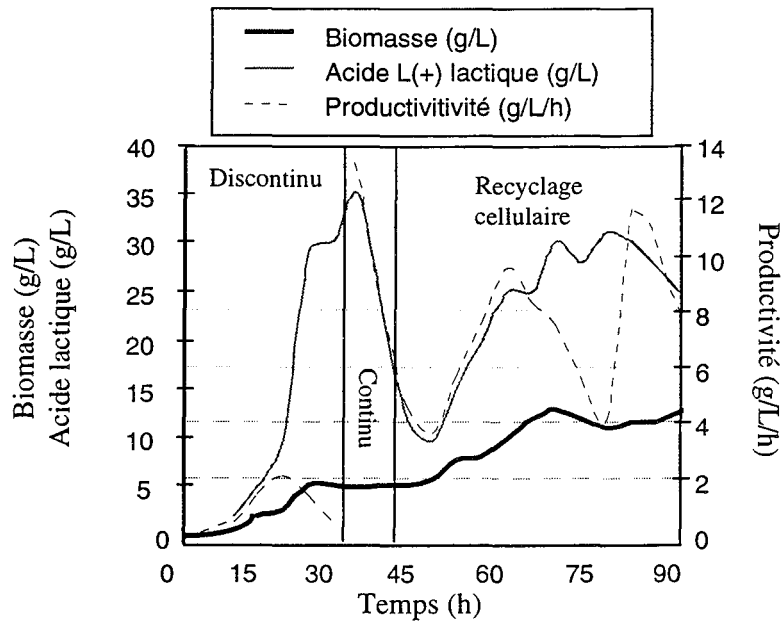
Le protocole général de la fermentation et sa mise en oeuvre vont être étudiés de manière à améliorer les temps de préparation et à minimiser les phases non productives.

Une fermentation réunissant toutes les optimisations et améliorations précédentes va être étudiée en détail.

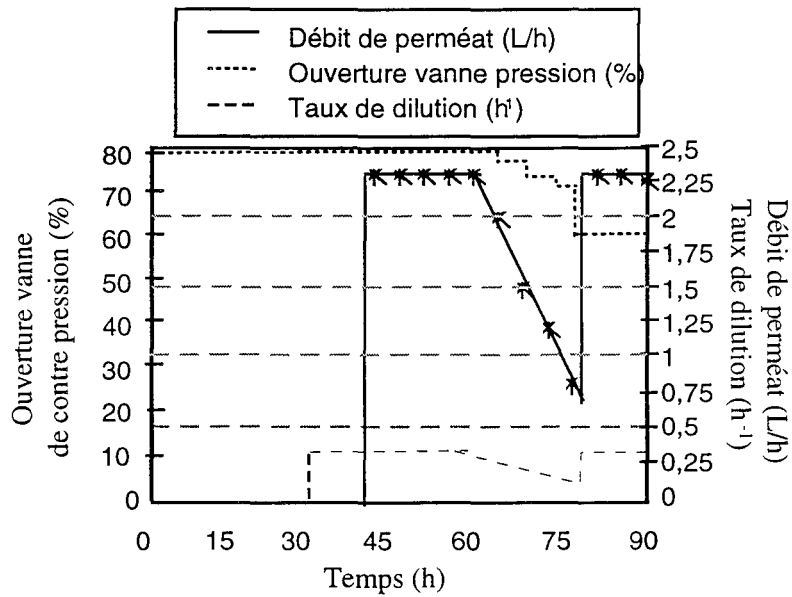
Les milieux spécifiques, le protocole des cultures, les conditions de fermentation et de microfiltration, étudiés précédemment, serviront à la mise en oeuvre de cette culture avec recyclage cellulaire. De nombreux paramètres vont être suivis en ligne et hors ligne, tels que les concentrations en acides, sucres, éthanol, acide D(-) lactique, conductivité, rendement et productivité.

Les performances obtenues lors de cette fermentation vont être ensuite comparées aux performances des autres fermentations réalisées au cours de cette étude, puis comparées aux autres cultures en mode discontinu et continu décrit dans la littérature.

Enfin, pour terminer ce chapitre, une étude technico-économique succincte permettra de fixer le prix de revient de l'acide lactique s'il était produit par le procédé que nous tentons de développer. Cette étude permettra de résumer les points forts et les points faibles du procédé à haute densité cellulaire, développé avec la souche *Bacillus coagulans*, lors de sa mise en oeuvre en conditions industrielles (« scale up ») et en comparaison avec un procédé décrit dans la littérature.



Graphe VI. 1 : Fermentation avec recyclage cellulaire R1 - Evolution de la productivité, des concentrations en biomasse et en acide L(+) lactique.



Graphe VI. 2 : Fermentation avec recyclage cellulaire R1 - Evolution du débit de perméat, du taux de dilution et de l'ouverture de la vanne de contre-pression.

2. ETUDE DES PARAMETRES LIES A L'ULTRAFERMENTATION

2.1. - Fermentation et paramètres cinétiques de référence

2.1.1. - Objectifs

❶ Réaliser une fermentation dans le réacteur à recyclage cellulaire qui pourra servir d'expérience de référence pour les expérimentations futures.

2.1.2. - Conditions expérimentales

La démarche et les conditions expérimentales sont décrites dans le Chapitre V section .2.5.1.2.

2.1.3. - Résultats de la fermentation R1

Le **graphe VI.1** montre l'évolution des concentrations en biomasse et en acide lactique et la productivité de la fermentation R1. Lors de la phase discontinue, la concentration en biomasse obtenue est très élevée (pratiquement 5 g/L), puis l'alimentation et le recyclage sont mis en fonctionnement. La concentration en biomasse augmente progressivement lors de la phase continue avec recyclage cellulaire pour se stabiliser vers 12,5 g/L. La concentration en acide lactique augmente rapidement pendant la phase discontinue (0 à 32 heures), puis diminue très rapidement dans les premières heures du recyclage (32 à 47 heures) et enfin augmente jusqu'à la 78ème heure pour atteindre 31 g/L. La productivité atteint un pic à la 80ème heure de 33 g.L⁻¹.h⁻¹ qui correspond à un débit élevé (fixé) et à une concentration maximale d'acide lactique. La concentration en saccharose a également été déterminée, mais elle n'a pas été représentée.

Le **graphe VI.2** décrit l'évolution du débit de perméat, du taux de dilution et de la fermeture de la vanne de régulation de pression.

Le taux de dilution a été fixé, arbitrairement, au μ_{\max} de la bactérie soit 0,31 h⁻¹. Le débit de perméat est fixé par le débit d'alimentation pour travailler à volume constant (le volume de NH₃ ajouté est négligeable). C'est un programme de régulation permettant le contrôle de la vanne de contre-pression qui va servir à maintenir le débit de perméat supérieur au débit de soutirage de la pompe (l'excédent étant renvoyé dans le fermenteur). La régulation fonctionne mais l'inertie et le pas de programme sont trop long à se mettre en place. Le débit de perméat diminue progressivement et contraint le débit d'alimentation à chuter (donc le taux de dilution chute également). C'est manuellement que nous avons fermé la vanne de contre pression à

60% à la 78ème heure. Le débit de perméat et d'alimentation sont redevenus identiques et fixés à 2,25 L/h.

La fermentation est stoppée à la 90ème heure car nous n'avons pas observé de reprise de croissance significative. Le recyclage continue à fonctionner sans alimentation pour concentrer les cellules dans le fermenteur en éliminant du milieu de culture. La pompe de recyclage est arrêtée lorsque la concentration en biomasse atteint 15 g/L et que le volume dans le fermenteur atteint 5,8 litres.

2.1.4. Conclusions

① Cette expérience permet de recenser quelques paramètres cinétiques de base qui pourront servir de référence lors des expérimentations futures en recyclage cellulaire. La fermentation a été réalisée sans purge pour favoriser l'accumulation de biomasse, mais la culture et le protocole sont loin d'être optimaux. Le **Tableau VI. 2.1** résume les principaux paramètres obtenus lors de la fermentation R1, comparés avec d'autres fermentations. La concentration en cellules est 5 fois plus importantes avec le recyclage. La productivité maximale est respectivement 10 fois et 2,8 fois plus importantes qu'en mode discontinu et continu simple. La productivité (δ) est la moyenne de la productivité sur toute la durée de la fermentation avec recyclage cellulaire. Elle est de 7 g/L/h, soit 7 fois plus importante qu'en culture discontinue. Par contre, la concentration en saccharose résiduel reste élevée, le rendement $Y_{p/s0}$ est faible. Enfin, Le rendement $Y_{p/s}$ montre que la souche reste homofermentaire dans les conditions de fermentation.

Tableau VI. 2.1 : Paramètres cinétiques obtenus lors de la première fermentation à recyclage cellulaire comparée avec les meilleures fermentations discontinues et continues.

Fermentation	X_{max} (g/L)	P_{max} (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g ⁻¹)	$Y_{p/s0}$ (g/g ⁻¹)	δ_{max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)
R1	12,5 ± 1,25	31 ± 2	0,94 ± 0,1	0,52	11,5 ± 0,7	7 ± 0,4
F34	3,05	56	0,92	0,87	1,2	1,2
C3	2,2	27	0,92	0,45	4,1	4,1

Deux autres paramètres ont été ajoutés pour servir de comparaison avec les fermentations futures. Ces deux paramètres sont très importants au niveau industriel car ils permettent d'accéder à la durée de la phase de production par rapport à la durée globale du procédé et à la capacité de production d'acide lactique par la biomasse.

t_r , est la durée de la partie recyclage cellulaire. ψ , a été défini comme la quantité totale d'acide lactique produite pendant la phase de recyclage divisée par la quantité totale de biomasse présente pendant cette phase ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) :

$$\psi = \frac{\overline{P}_{la} \cdot D_1 \cdot t_r}{\overline{X} \cdot D_2 \cdot t_r + \overline{X}}$$

\overline{P}_{la} = Concentration moyenne en acide lactique (g/L)

D_1 = Taux de dilution (h^{-1})

D_2 = Taux de purge (h^{-1})

t_r = Durée de la phase de production (h)

\overline{X} = Concentration moyenne en biomasse (poids sec) (g/L)

Pour la fermentation R1, ces deux paramètres sont respectivement :

$$t_r = 45 \text{ h}$$

$$\psi = 28 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$$

2.2. - Incidence de l'amélioration des milieux de cultures

Lors de l'étude de la composition du milieu de culture, les extraits azotés et notamment l'extrait de levure ont été au centre de l'amélioration des performances de la production d'acide lactique par *Bacillus coagulans*. D'autres sources, telles que la liqueur de « corn steep » et les extraits bactériens préparés à partir de cellules de *Bacilli*, ont montré qu'il était possible de substituer une partie de l'extrait de levure et de réduire ainsi les coûts de production ou de réutiliser la biomasse produite.

Avant de réaliser une fermentation avec recyclage cellulaire sur ce milieu, une nouvelle fermentation en culture discontinue a été réalisée sur un milieu contenant de l'extrait de levure, du « corn steep » et des extraits bactériens.

2.2.1. - Etude comparative finale des milieux de cultures

2.2.1.1. - Objectifs

- ❶ Substituer une partie de l'extrait de levure par du « corn steep » et des extraits bactériens, pour tenter d'améliorer les coûts et les performances de production.
- ❷ Définir le ou les milieux de cultures qui vont être utilisés dans les fermentations avec recyclage cellulaire.

2.2.1.2. - Conditions expérimentales

Les conditions expérimentales sont identiques à celles décrites dans le **Chapitre III** sur la comparaison des différents extraits cellulaires. Deux fermentations sont réalisées en parallèle à partir de la même préculture. Le pH et la température des fermentations sont régulés, respectivement, à 6,4 et 52°C. Les prélèvements ont été faits aux mêmes temps pour faciliter la comparaison avec la fermentation F34, qui sert de référence.

Composition des milieux testés :

Fermentation F43 : Saccharose (jus vert) 60 g/L, extrait de levure 2,5 g/L et corn steep 2,5 g/L.

Fermentation F44 : Saccharose (jus vert) 60 g/L, extrait de levure 2 g/L, corn steep 2 g/L et extrait bactérien 2 g/L.

Remarque : Le dosage du saccharose dans le milieu de fermentation a été évalué par un test enzymatique spécifique et non plus par C.L.H.P. La précision du dosage est de 8%.

2.2.1.3. - Résultats de l'étude

2.2.1.3.1. - Observation des graphiques

Le **graphe VI.3** décrit l'évolution comparative de la concentration en biomasse pour les fermentations F43, F44 et la fermentation F34 de référence. Il n'existe pas de différences significatives entre les fermentations F43 et F34. Seule la fermentation avec les extraits cellulaires mène à une production plus faible de biomasse.

Le **graphe VI.4** montre que la vitesse de production de l'acide lactique lors de la fermentation F44 est légèrement plus faible, mais la quantité finale d'acide L(+)-lactique produite n'est significativement pas différente entre les 3 fermentations.

Le **graphe VI.5** ne montre pas de différences significatives dans l'évolution de la consommation de saccharose entre les 3 fermentations.

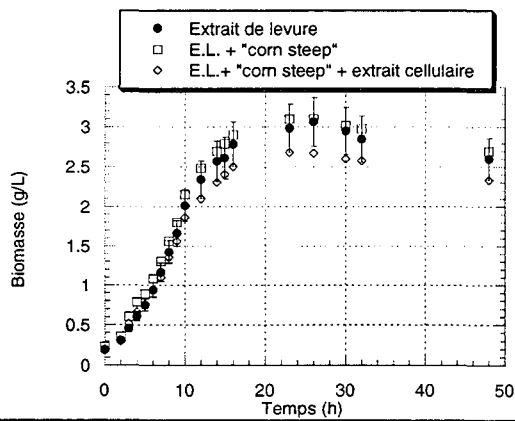
Le **graphe VI.6** décrit l'évolution de l'accumulation transitoire de fructose au démarrage de la croissance et de la production de l'acide lactique. L'accumulation de fructose est légèrement plus importante lors de la fermentation F44. Mais dans les 3 cas, le fructose est rapidement et totalement consommé par la suite.

2.2.1.3.2. - Observations des paramètres cinétiques

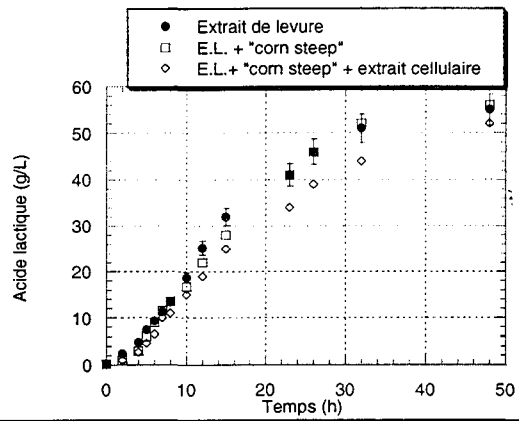
Le **Tableau VI. 2.2** : Résumé et comparaison des paramètres cinétiques des fermentations F34, F43 et F44. permet de comparer les paramètres cinétiques obtenus lors des trois fermentations F34, F43 et F44. Il n'y a pas de différences importantes entre ces paramètres. Les vitesses spécifiques de croissance sont identiques. Il n'y a pas de phase de latence. Les rendements ne sont pas significativement différents. Les vitesses spécifiques maximales de production de lactate, de consommation du saccharose et la productivité sont très légèrement plus faibles, à la limite du significatif, pour la fermentation F44.

Tableau VI. 2.2 : Résumé et comparaison des paramètres cinétiques des fermentations F34, F43 et F44.

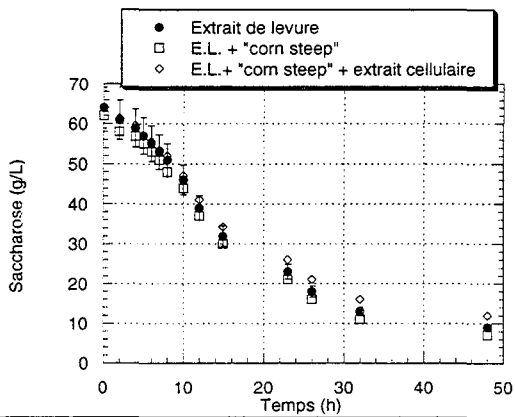
Fermentation	X_f (g/L)	P_f (g/L)	S_f (g/L)	Fructose Pic (g/L)	Durée de latence (h)	Durée de culture (h)	μ_{max} (h ⁻¹)
F34	3,05 ± 0,3	56 ± 3	9 ± 0,5	0,9	0	48	0,30 ± 0,03
F43	3 ± 0,3	55 ± 3	8 ± 0,5	1,1	0	48	0,28 ± 0,03
F44	2,7 ± 0,3	52 ± 3	12 ± 1	1,7	0	48	0,30 ± 0,03
	Π_{Pmax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	q_{Smax} (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{X/S}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{P/S}$ (g.g ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{P/S0}$ (g.g ⁻¹)
F34	2,9 ± 0,2	4,6 ± 0,4	0,05	1 ± 0,08	1,2 ± 0,1	0,4	0,87
F43	2,8 ± 0,2	4,4 ± 0,4	0,05	0,96 ± 0,08	1,15 ± 0,1	0,38	0,85
F44	2,4 ± 0,1	4,1 ± 0,3	0,05	0,98 ± 0,08	1,08 ± 0,1	0,4	0,81



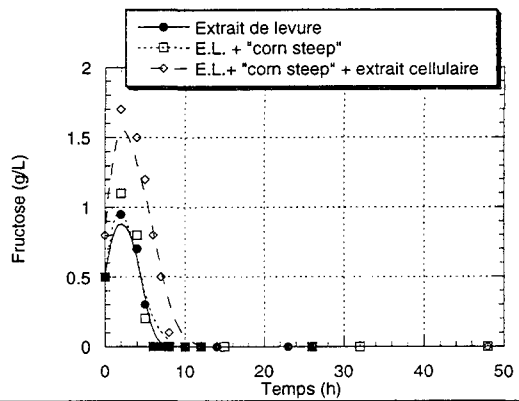
Graph VI. 3: Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des concentrations en biomasse.



Graph VI. 4 : Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des concentrations en acide lactique.



Graph VI. 5: Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des concentrations en saccharose.



Graph VI. 6: Fermentations F34, F43 et F44. Substitution de l'extrait de levure. Evolution comparative des pics de fructose.

2.2.1.4. - Conclusions

- ① Les résultats obtenus sont très importants, car ils montrent clairement que la substitution partielle de l'extrait de levure par le « corn steep » ou les extraits bactériens est un succès. Cela signifie que le coût de préparation des milieux de culture peut être abaissé sans diminuer de façon significative les performances du procédé.
- ② Cette dernière série d'expériences permet de terminer l'étude de l'amélioration de la composition du milieu de culture et d'acquérir des connaissances de base sur la nutrition complexe de *Bacillus coagulans* complémentaire aux travaux de Heriban et al. (1993).
- ③ La mise en oeuvre de ce micro-organisme en fermenteur avec recyclage cellulaire est maintenant possible. Mais, il faut définir les compositions des milieux de cultures à partir de toutes les connaissances acquises.

Différents milieux sont ainsi définis :

➔ **Milieu de préculture M_p3 :**

Saccharose (jus vert)	60 g/L
Extrait de levure	5 g/L
Mg SO ₄	0,2 g/L
Température 52°C, pH 6,4.	

➔ **Milieu de culture favorable à la production de biomasse M_x3 :**

Saccharose (jus vert)	40 g/L
Extrait de levure	5 g/L
Corn steep	5 g/L
Extrait cellulaire	5 g/L
Mg SO ₄	0,2 g/L
Température 52°C, pH 6,4.	

➔ **Milieu de culture favorable à la production d'acide lactique M_L3 :**

Saccharose (jus vert)	60 g/L
Extrait de levure	1 g/L
Corn steep	2 g/L
Extrait cellulaire	2 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,7 g/L
Acide nicotinique*	1,5 mg/L
Biotine*	30 µg/L

* A ajouter facultativement, Température 52°C, pH 6,4.

2.2.2. - Fermentation avec recyclage cellulaire sur milieux M3

La fermentation à haute densité cellulaire couplant fermentation et filtration peut être divisée en trois parties. Premièrement, la fermentation débute par une phase discontinue dans laquelle les cellules sont placées dans des conditions favorisant leur croissance. Deuxièmement, le système de recyclage est mis en route lorsque les cellules sont en phase exponentielle de croissance, provoquant une augmentation importante de la biomasse. Troisièmement, il est théoriquement possible de favoriser la production d'acide lactique dans des conditions où le catalyseur est en concentration importante. Cette production va dépendre, notamment, de l'état des cellules et de la quantité de substrat disponible.

2.2.2.1. - Objectif

❶ Déterminer si les milieux de culture, précédemment définis, sont adaptés et ont une incidence sur l'amélioration des performances en fermenteur en haute densité cellulaire.

2.2.2.2. - Démarche et conditions expérimentales

Le protocole expérimental de la fermentation est résumé dans la **Figure VI. 2.1**. A partir d'un lyophilisat, la souche est remise en suspension dans un milieu de revivification R1. Une première préculture de 250 ml est réalisée sur milieu M2. Puis, une seconde préculture est faite sur milieu M_p3 dans un volume de 1 litre. Cette préculture sert à l'ensemencement du pilote à recyclage cellulaire qui est réalisé dans un volume total de 5 litres sur milieu M_x3. Le fermenteur est ensuite alimenté lors de la phase recyclage par une bonbonne de milieu M_L3.

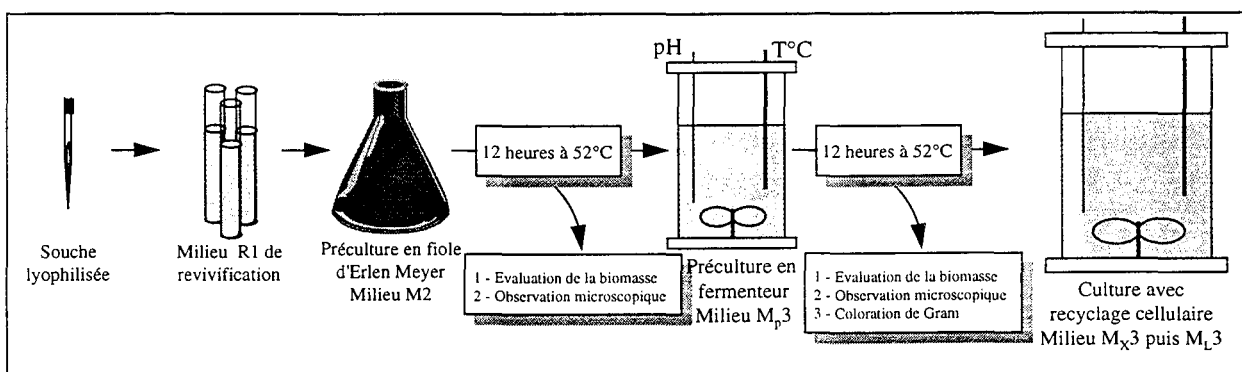


Figure VI. 2.1 : Protocole expérimental de la fermentation en haute densité cellulaire.

Le pH et la température de l'ultrafermenteur sont contrôlés respectivement à 6,4 et 52°C. Le pH est contrôlé par de l'ammoniaque 2N en début de fermentation, puis 5N quand la concentration en biomasse dépasse 5 g/L.

Les conditions de filtration n'étaient pas encore les conditions optimales, lors de la réalisation de cette expérimentation. Elles sont résumées dans un tableau spécifique qui pourra servir de comparaison lors des expérimentations futures (**Tableau VI. 2.3**).

La membrane a une porosité 0,45 μm , 19 canaux. Les débits de recyclage (Q_r), de perméat (Q_p) sont arbitrairement fixés. Le débit d'alimentation (Q_a) est fixé par le débit de perméat, ainsi que la fermeture de la vanne de contre - pression. C'est cette vanne, qui en se fermant, va permettre de maintenir le débit de perméat constant. Il n'y a pas de débit de purge de cellules (Q_x) et la fréquence de « back-flush » est fixée à 0,5 mn^{-1} pendant 1 seconde à 6 bars.

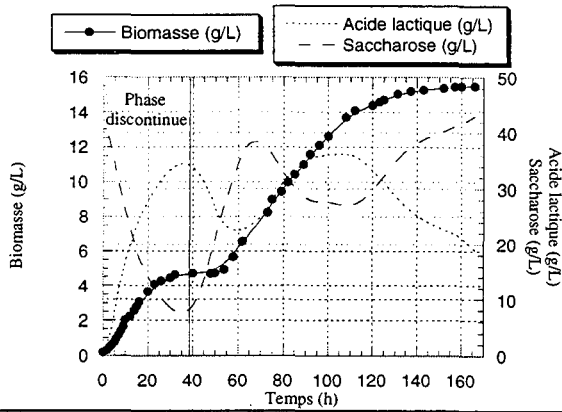
Tableau VI. 2.3 : Valeurs et contrôles des principaux paramètres de filtration.

Paramètres	Constante	Variable	Type de contrôle
Membrane	0,45 μm 19 canaux	-	-
Q_r	1500 L/h	-	manuel
Vanne pression	-	ouverture de 100% puis fermeture de 1% de pas.	automatique par le débit de perméat
Q_a	-	régulé	automatique et identique à Q_p
Q_p	2,5 L/h	-	automatique
Fréquence décolmatage	0,5 mn^{-1}	-	automatique
Q_x	-	-	-
Taux de dilution (D)	0,5 h^{-1}	-	
Taux de purge (D_x)	-	-	

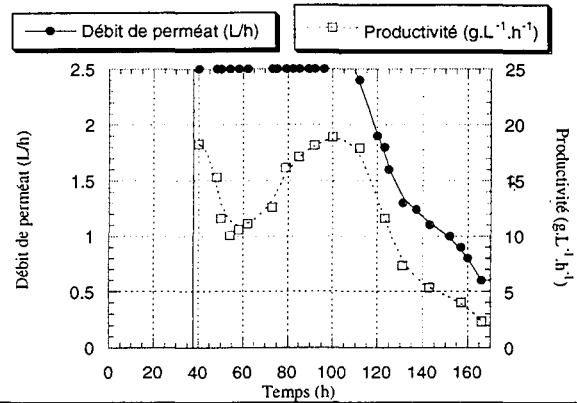
2.2.2.3. - Résultats de l'expérimentation

2.2.2.3.1. - Observation des graphiques

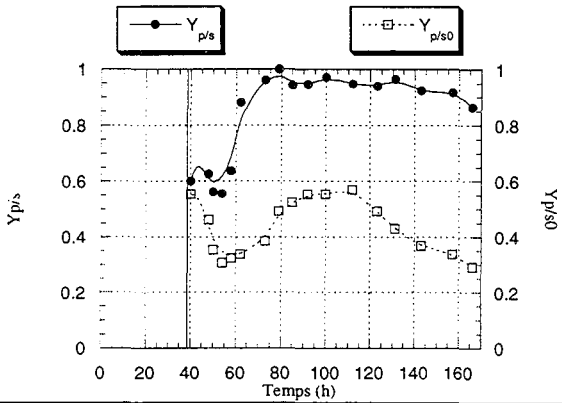
Les évolutions des concentrations en biomasse et en acide L(+) lactique sont représentées sur le **graphe VI.7**. La concentration en biomasse atteint 15,5 g/L à la fin de l'expérimentation. La croissance se déroule en deux parties, une partie pendant la phase discontinue, suivie d'une latence très courte, puis une deuxième croissance très importante qui atteint un nouveau plateau vers 140 heures. La production d'acide lactique suit la production de biomasse, elle chute quand la biomasse est stable. Ceci signifie, dans ce cas, que la vitesse d'extraction de l'acide est supérieure à la vitesse de production.



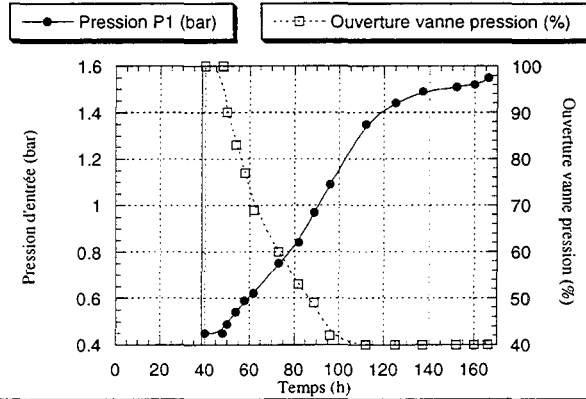
Graphe VI. 7 : Fermentation Recyclage 2 (R2) . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution des concentrations en biomasse et lactate.



Graphe VI. 8 : Fermentation R2 . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution du débit de perméat et de la productivité.



Graphe VI. 9: Fermentation R2 . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution des rendements de conversion.



Graphe VI. 10: Fermentation R2 . Etude de l'incidence des milieux M3. Evolution de la pression de l'installation et de la fermeture de la vanne de pression.

Le **graphe VI.8** montre l'évolution du débit de perméat et de la productivité dans la phase de recyclage cellulaire. La productivité atteint un « pic » vers 100 heures à $18,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Par contre, le débit de perméat était fixé à $2,5 \text{ L/h}$, mais il chute très rapidement à partir de la 110ème heure. L'explication se trouve dans l'évolution de la pression de l'installation et la fermeture automatique de la vanne de contre pression (**graphe VI.10**). En effet la 110ème heure est le moment où la fermeture de la vanne atteint 60% (cette fermeture est dictée par le débit de perméat qui ne peut se maintenir à $2,5 \text{ L/h}$), seulement pour protéger l'installation d'une surpression, il est impossible de descendre sous cette valeur. Ceci est très largement confirmé par l'évolution de la pression à l'entrée de la membrane qui est proche de $1,5 \text{ bar}$ en relatif soit une pression réelle de $2,5 \text{ bars}$ vers 110 heures. La vanne de régulation de pression ne pouvant plus se fermer pour contrôler le débit de perméat, ce dernier chute rapidement. Par conséquent, il entraîne une chute du débit d'alimentation, un arrêt de la croissance et une diminution de la production d'acide.

C'est le colmatage de la membrane qui provoque cette réaction en chaîne et compromet la suite de la fermentation.

Le **graphe VI.9** montre l'évolution des rendements de la fermentation.

2.2.2.3.2. Paramètres cinétiques de la fermentation

Les paramètres cinétiques et les performances de la fermentation R2 sont résumés dans le **Tableau VI. 2.4**. Ces concentrations maximales en biomasse et en acide lactique n'ont encore jamais été obtenues en fermentation avec recyclage cellulaire. Il en est de même pour les productivités, maximale et moyenne. La durée de la partie recyclage de la fermentation (t_r) dure plus de 5 jours.

Le taux de dilution de la fermentation a été fixé initialement vers $0,5 \text{ h}^{-1}$ et a chuté parallèlement à la diminution du débit de perméat.

Tableau VI. 2.4 : Résumé des paramètres cinétiques de la fermentation R2

X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g ⁻¹)	$Y_{p/s0}$ (g/g ⁻¹)	δ_{\max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	t_r (h)	ψ (g.g ⁻¹)
$15,5 \pm 1,5$	37 ± 2	$0,98 \pm 0,1$	0,56	$18,5 \pm 0,7$	$10 \pm 0,4$	127	110 ± 11

2.2.2.4. - Conclusions de la fermentation

① L'incidence de l'amélioration du milieu de culture sur les performances de la fermentation avec recyclage cellulaire est significativement positive. L'utilisation successive des milieux de

culture M_{x3} et M_{L3} semble ouvrir une nouvelle voie très intéressante et performante, pour la production d'acide lactique, en réacteur avec recyclage cellulaire sur *Bacillus coagulans*. Ces milieux ont permis d'améliorer les concentrations maximales en cellules, en acide lactique et les productivités. Mais, un milieu adapté ne sert à rien, si la filtration n'est pas optimale.

② L'utilisation de la membrane de porosité 0,45 μm confirme les études faites sur la filtration du milieu de culture. Le colmatage est important avec cette membrane; le débit de perméat est maintenu pendant 70 heures grâce à la fermeture progressive de la vanne de contre pression. Arrivé à la pression maximale, la régulation stoppe et les débits chutent. Le procédé est très sensible et la chute des performances est brutale.

③ La chute de la concentration en acide lactique est également très brutale à la fin de la fermentation; pourtant, la concentration en biomasse est encore élevée, le système n'extrait pratiquement plus et la concentration en saccharose est encore forte. Les cellules sont donc dans un état physiologique médiocre qui ne leur permet pas de produire. Le système ne disposant pas de purge, les cellules ne sont pas renouvelées et deviennent âgées, la capacité de production chute comme l'avait décrit Boyaval (1988) et Crespo (1992).

④ Le taux de dilution a été fixé arbitrairement pendant toute la durée de la fermentation, jusqu'à ce qu'il chute à cause du débit de perméat. L'acquisition de connaissances sur l'effet de ce paramètre devient indispensable.

⑤ La productivité maximale atteint une valeur élevée, mais ce niveau de production est difficile à maintenir en durée. Ce paramètre devient également un critère très important en vue d'améliorer les performances du procédé.

2.3. Etude du taux de dilution et du taux de purge

Ces deux paramètres ne pouvaient être étudiés que sur le procédé global. La construction du pilote et du programme de contrôle induisent un taux de dilution directement lié au débit de perméat obtenu. En effet, pour travailler à volume constant, le débit de la pompe d'alimentation est contrôlé par le débit de perméat. Par conséquent, la valeur maximale du taux de dilution est fixé par la capacité de filtration de la membrane. Quant à la valeur du taux de purge, elle est, en général, plus faible que le taux de dilution.

2.3.1. Objectifs

- ❶ Evaluer les effets du taux de dilution et du taux de purge sur les performances de la fermentation avec recyclage cellulaire.
- ❷ Déterminer les valeurs optimales des deux paramètres pour tenter d'améliorer les productions de biomasse, d'acide lactique, les productivités et surtout la longévité du procédé.

2.3.2. Conditions expérimentales

Les milieux de culture sont identiques à ceux de la fermentation R2 (**Figure VI. 2.1**). La première préculture estensemencée sur milieu M2; la seconde préculture est réalisée en fermenteur de 1 litre sur milieu M_p3. La phase discontinue se déroule sur 5 litres de milieu M_x3, alors que le milieu d'alimentation est de composition M_L3 (2 bonbonnes de 50 litres). Les conditions physico-chimiques sont identiques aux autres fermentations : pH 6,4 , température 52°C et vitesse d'agitation 200 rpm.

Les paramètres du système de filtration sont résumés dans le **Tableau VI. 2.5**. La membrane de porosité 0,2 µm 7 canaux est utilisée. Le débit de recyclage est fixé à 1500 L/h. La vanne de contre pression est ouverte de façon à obtenir une valeur de débit de perméat légèrement supérieure à la valeur souhaitée. Une pompe du côté perméat permet d'extraire l'acide lactique au débit dicté par le taux de dilution testé. L'excédent de perméat est renvoyé dans le fermenteur (**Figure VI. 2.2**).

Une pompe péristaltique reliée directement au fermenteur permet d'éliminer une partie du milieu de culture contenant les cellules. C'est cette pompe qui fixe le taux de purge.

Tableau VI. 2.5 : Valeurs et contrôles des principaux paramètres de filtration.

Paramètres	Constante	Variable	Type de contrôle
Membrane	0,2 µm 7 canaux	-	-
Q _r	1500 L/h	-	manuel
Vanne pression	ouverte à 60%		manuel
Q _a	-	-	automatique et identique à Q _p
Q _p	-	1 à 10 L/h	manuel
Fréquence décolmatage	0,5 mn ⁻¹	-	automatique
Q _x	-	0,1 à 0,5 L/h	manuel
Taux de dilution (D)	-	0,2 à 2 h ⁻¹	
Taux de purge (D _x)	-	0,02 à 0,1 h ⁻¹	

Pour réduire le nombre d'expérimentations (qui sont relativement lourdes en fermentation avec recyclage cellulaire) un nouveau plan d'expériences a été construit à partir des deux paramètres à tester. Neuf expériences sont nécessaires à la réalisation de ce plan à 3 niveaux (pour chaque paramètre) : Les deux extrémités et le centre du domaine sont testés.

Au début de la construction de ce plan et en accord avec les résultats obtenus en microfiltration du milieu de culture (**Chapitre V**), il était prévu de tester le taux de dilution entre 0,2 et 4 h⁻¹, mais la première expérience a dû être refaite car il était impossible d'atteindre ce taux de dilution dès que la concentration en biomasse dépassait 20 g/L. Les bornes du domaine d'expérimentation sont devenues : 0,2 à 2 h⁻¹.

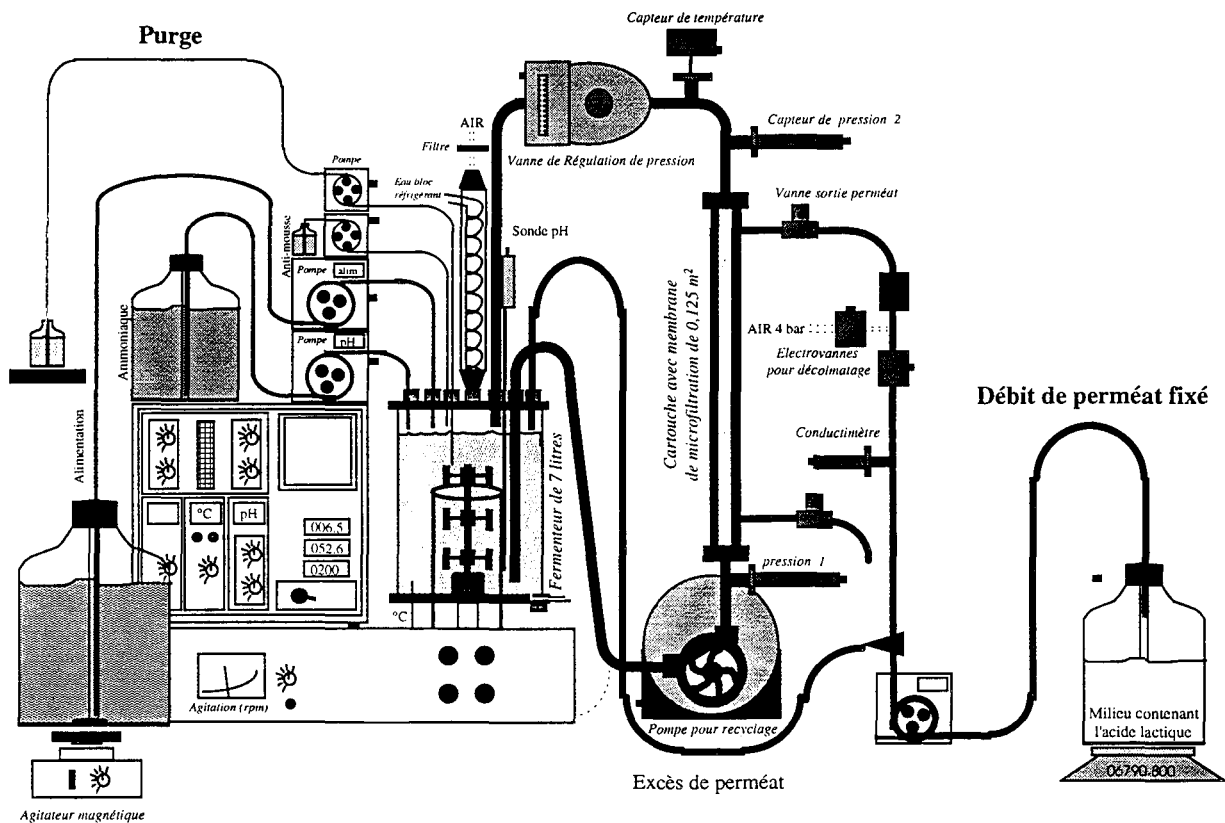


Figure VI. 2.2 : Protocole général de l'étude du taux de purge et du taux de dilution dans un réacteur à haute densité cellulaire.

2.3.2.1.1. - Matrice d'expériences

Le **Tableau VI.2.6** montre la matrice d'expérience fixé par le programme statistique.

Ce type de plan d'expériences est nommé : **plan d'expériences factoriel à 3 niveaux dans 3 blocs.**

Tableau VI. 2.6 : Matrice du plan d'expériences pour le taux de dilution et le taux de purge.

<i>Expérience n°</i>	<i>Taux de dilution (h⁻¹)</i>	<i>Taux de purge (h⁻¹)</i>
R3	2	0,1
R4	1,1	0,055
R5	0,2	0,01
R6	0,2	0,1
R7	2	0,055
R8	1,1	0,01
R9	2	0,01
R10	1,1	0,1
R11	0,2	0,055

2.3.2.1.2.- Choix des réponses

Plusieurs réponses ont été choisies pour visualiser les effets des deux paramètres testés. Par exemple, les deux premières réponses sont les suivantes:

➔ La concentration maximale en biomasse obtenue : X_{\max} (g/L)

➔ La productivité maximale obtenue : δ_{\max} (g.L⁻¹.h⁻¹)

la troisième réponse décrit la longévité du système :

➔ La durée de la phase recyclage cellulaire : t_r (h)

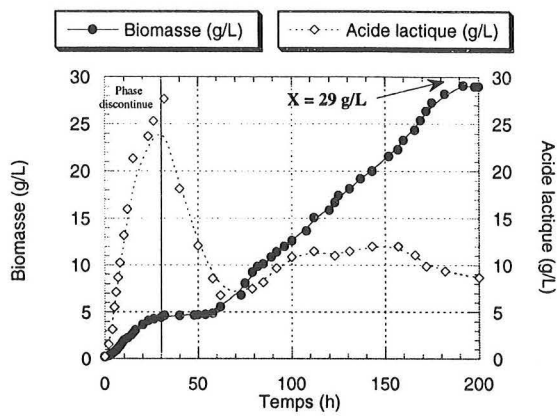
Remarque : La phase de recyclage cellulaire est stoppée quand la productivité chute de plus de 50% par rapport à la valeur maximale obtenue.

2.3.2.2. - Résultats du plan d'expériences factoriel

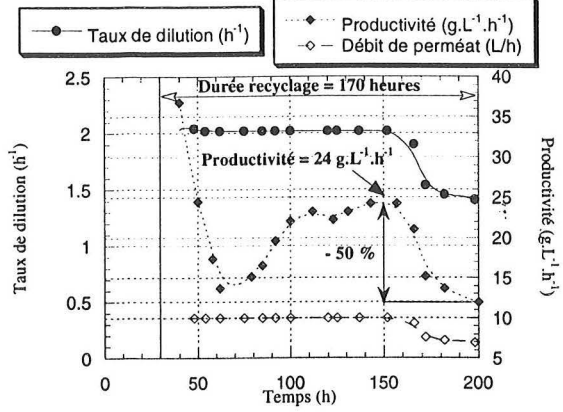
Chaque fermentation a été menée selon le même protocole dans les conditions fixées par la matrice d'expériences.

2.3.2.2.1. - Exemple d'une fermentation

Les **graphes VI.11 et VI.12** montrent un exemple des évolutions des concentrations et des productivités pour la fermentation avec recyclage cellulaire R3. Sur ces deux graphiques figurent, également, le moment où la lecture des différentes réponses a été faite. La concentration maximale en biomasse est de 29 g/L comme le montre le graphe VI.11. Le graphe suivant montre que la productivité maximale obtenue se situe vers 150 heures à une valeur de 24 g.L⁻¹.h⁻¹ pour un taux de dilution de 2 h⁻¹.

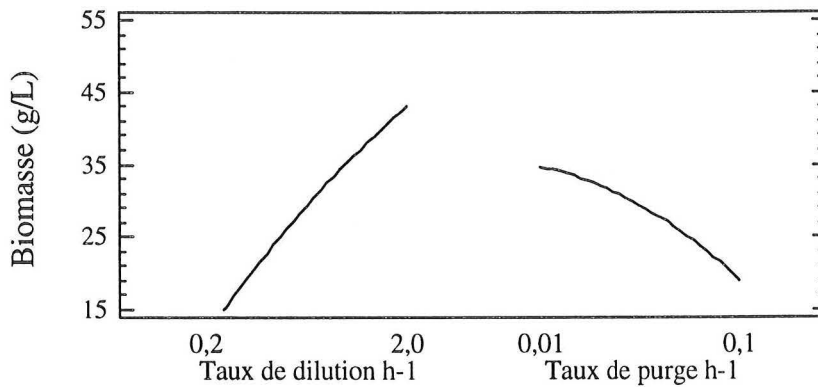


Graphe VI. 11: Fermentation R3 . Etude du taux de dilution et du taux de purge. Evolution des concentrations en biomasse et en acide lactique.



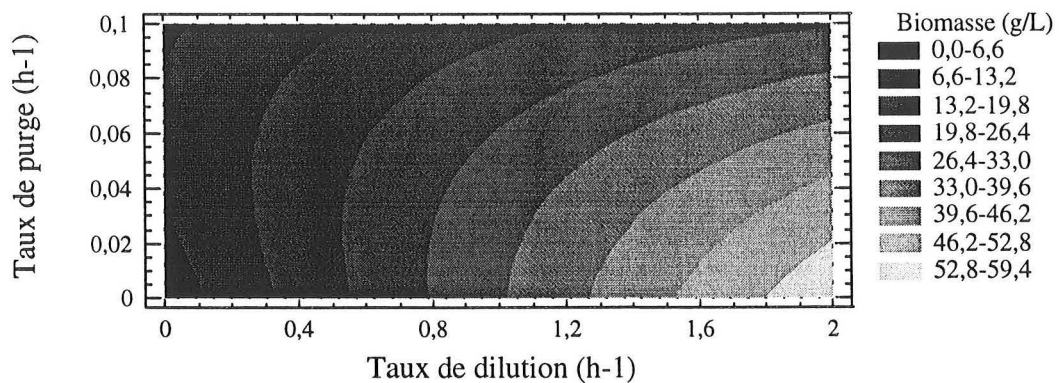
Graphe VI. 12: Fermentation R3. Etude du taux de dilution et du taux de purge.. Evolution de la productivité, du taux de dilution et du débit de perméat.

Principaux effets sur la concentration en biomasse



Graphe VI. 13 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la concentration maximale en biomasse obtenue.

Contours des surfaces de réponses



Graphe VI. 14 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge Principaux effets des deux paramètres sur la concentration maximale en biomasse obtenue.

Ensuite, la productivité diminue très rapidement à cause de la baisse du taux de dilution et de la concentration en acide lactique dans le fermenteur. La vanne de régulation est fermée à 60% et le débit de perméat continue à chuter, en conséquence, il n'est plus possible de maintenir le taux de dilution à 2 h^{-1} . Vers 200 heures de fermentation, la productivité est de moins de $12 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, soit plus de 50 % de baisse par rapport à la valeur maximale. La durée de la phase de production en recyclage cellulaire est donc de 170 heures.

2.3.2.2.2. - Résultats des fermentations

Les réponses obtenues pour les 9 fermentations sont résumées dans le **Tableau VI. 2.7**. La première colonne indique la référence de chaque fermentation, les deux colonnes suivantes indiquent les valeurs des paramètres fixés et les trois dernières colonnes, les valeurs des réponses obtenues. La dernière colonne montre le résultat du calcul de la zone optimale entre la productivité et de la durée de la fermentation. Ces valeurs sont les moyennes arithmétiques des valeurs normales centrées réduites de ces deux paramètres.

Tableau VI. 2.7 : Table des réponses du plan d'expériences

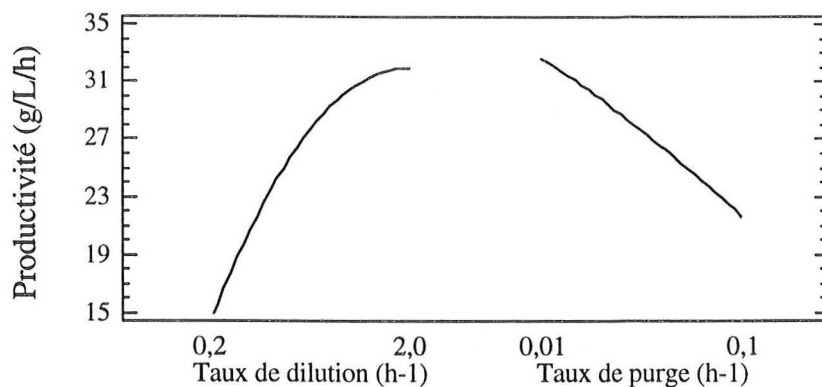
Fermentation	D (h^{-1})	D_x (h^{-1})	X (g/L)	δ_{max} ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)	t_r (h)	calcul zone optimale
R3	2	0,1	29	24	170	0,79
R4	1,1	0,055	33	29	165	0,88
R5	0,2	0,01	14	19	110	0,36
R6	0,2	0,1	6	10	175	0,50
R7	2	0,055	41	32	140	0,82
R8	1,1	0,01	32	31	90	0,53
R9	2	0,01	54	39	80	0,66
R10	1,1	0,1	18	22	168	0,74
R11	0,2	0,055	10	13	159	0,48

2.3.2.2.3.- Représentation des surfaces de réponses

- Effets sur la concentration maximale en biomasse.

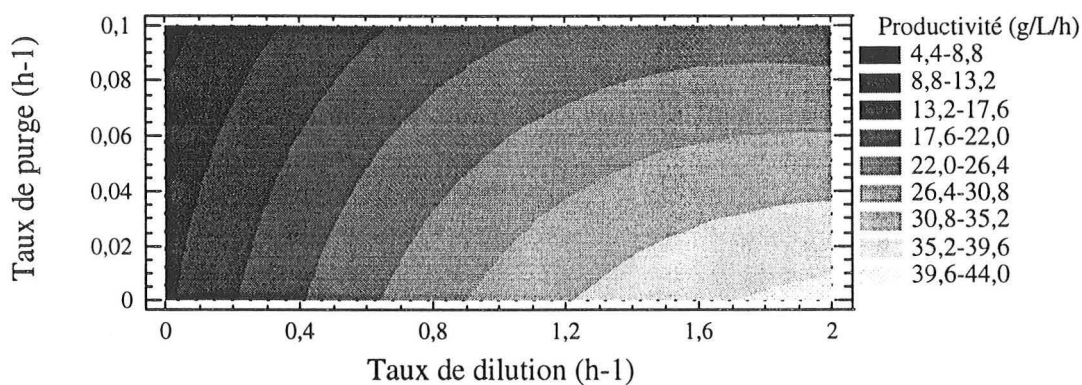
Le **graphe VI.15** montre les principaux effets de la variation du taux de dilution et du taux de purge sur la concentration maximale en biomasse obtenue.

Principaux effets sur la productivité



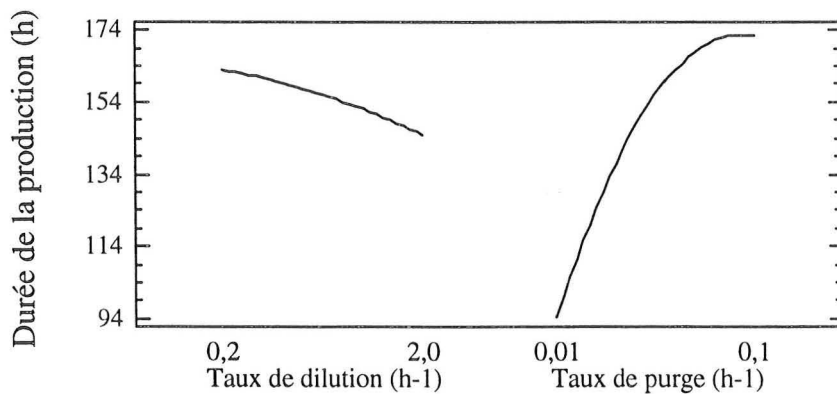
Graphe VI. 15 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la productivité maximale obtenue.

Contours des surfaces de réponses



Graphe VI. 16 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la productivité maximale obtenue.

Principaux effets sur la durée de la phase de production



Graphe VI. 17 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la durée de la phase de production en recyclage cellulaire.

Ces effets sont pratiquement linéaires. L'augmentation du taux de dilution et la baisse du taux de purge ont un effet positif sur la production d'acide lactique. Si l'évolution de la concentration maximale en biomasse est représentée sous forme de courbes de niveaux en fonction des deux paramètres (**graphe VI.16**), il est clair que le taux de purge est très influent sur la concentration en biomasse aux taux de dilution élevés. Pour avoir de fortes concentrations en biomasse, il faut donc travailler avec un fort taux de dilution et sans purge.

- Effets sur la productivité maximale.

L'évolution de la productivité maximale en fonction des deux paramètres est identique à ce qui a été obtenu pour la concentration en biomasse (**graphes VI.15 et VI.16**). La productivité est élevée si le taux de dilution est élevé et le taux de purge faible, voir nul.

- Effets sur la durée et la stabilité du procédé.

Ce critère permet de comparer les fermentations entre elles. Le moment de l'arrêt de la fermentation est arbitrairement choisi pour permettre cette comparaison. L'évolution de la chute de la productivité n'est pas prise en compte pour ne pas compliquer l'évaluation. Il s'agit d'atteindre une valeur seuil qui fixe l'arrêt de la fermentation.

Les graphes **VI.17 et VI.19** montrent que la stabilité du procédé augmente quand le taux de dilution est faible et le taux de purge élevé. C'est le taux de purge qui est le paramètre le plus important sur cette réponse.

- Essai d'optimisation des paramètres.

Un compromis est à trouver entre la productivité et la durée de la phase de « production », car les effets du taux de dilution et du taux de purge sont inversés pour ces deux réponses. Si les deux paramètres sont aussi importants l'un que l'autre, une approche d'optimisation simple consiste à faire la moyenne des valeurs normales centrées réduites des deux réponses et de tracer les courbes de niveaux en fonction des deux paramètres testés. Les résultats du calcul sont résumés dans le **Tableau VI. 2.7**.

Le **graphe VI.19** permet de visualiser ce compromis en fonction de la valeur des deux paramètres. Il s'agit d'une optimisation statistique simple où les deux paramètres ne sont pas pondérés, cependant, ce graphe permet de définir la zone dans laquelle il est préférable de fixer le taux de dilution et le taux de purge pour améliorer les performances du procédé.

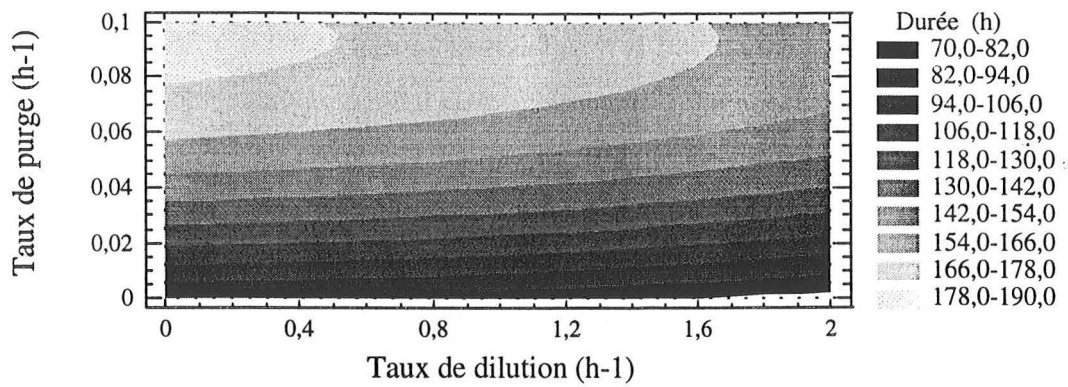
La même opération peut être répétée pour trouver l'optimum du taux de dilution et du taux de purge à partir des précédentes réponses, mais aussi en incluant de nouveaux critères :

Productivité spécifique (lignes pleines).

Rendement de bioconversion et productivité moyenne (lignes pointillées).

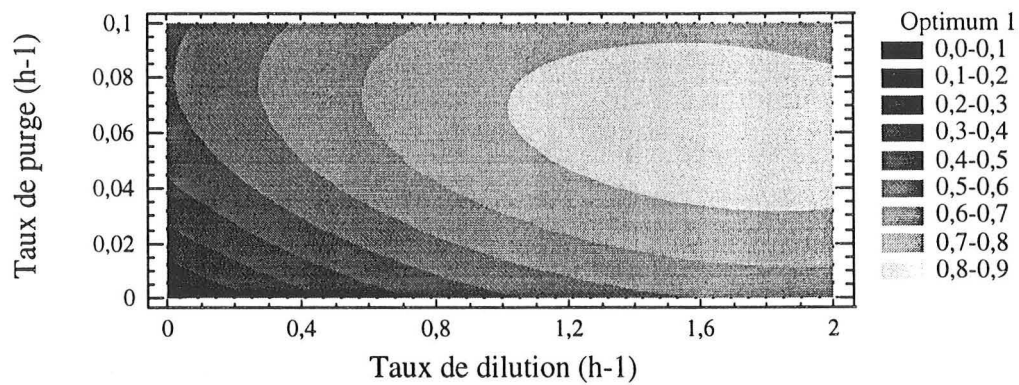
Productivité maximale et stabilité du procédé (surfaces grisées).

Contours des surfaces de réponses



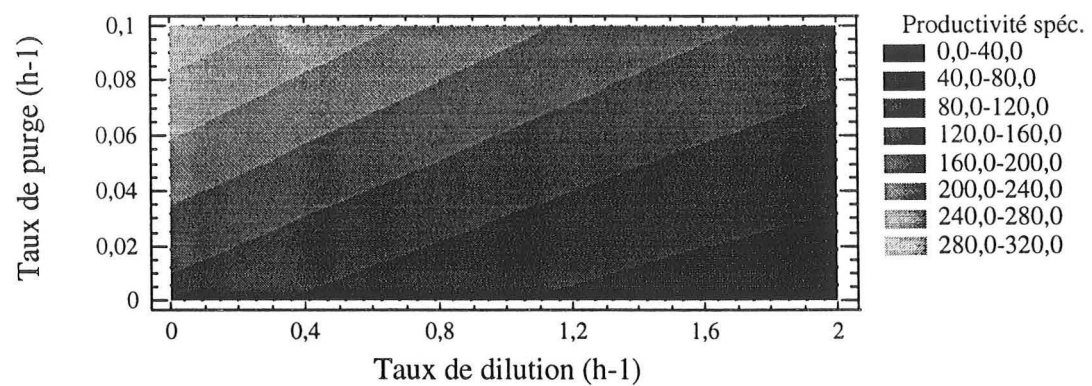
Graphe VI. 18 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Principaux effets des deux paramètres sur la durée de la phase de production en recyclage cellulaire.

Contours des surfaces de réponses



Graphe VI. 19 : Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Détermination de la zone optimale pour améliorer les performances du procédés - critères = productivité et durée.

Contours des surfaces de réponses



Graphe VI. 20: Plan d'expérience factoriel sur l'effet du taux de dilution et du taux de purge. Effets des paramètres sur la productivité spécifique ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$).

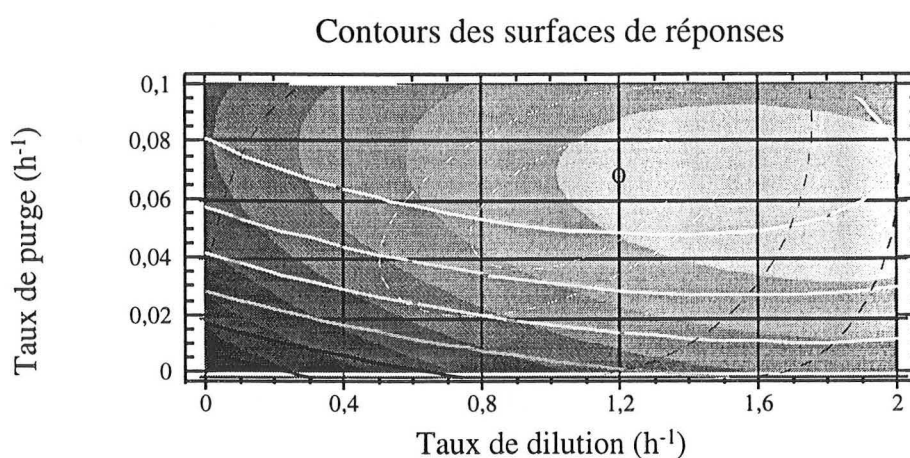
Le **graphe VI.21** décrit l'influence des deux paramètres sur tous les critères définis précédemment. L'augmentation des valeurs des différents critères ou groupes de critères se fait des couleurs les plus foncées vers les plus claires. Chaque critère ou groupe de critères a été calculé à partir de leurs valeurs normales, centrées, réduites et sans pondération.

La superposition de ces différentes zones permet de mettre à jour une zone marquée d'un « o » et qui est la zone optimale maximisant tous les critères.

Pour se trouver dans cette zone il faut fixer les paramètres :

➔ Taux de dilution entre 1 et 1,4 h⁻¹

➔ Taux de purge entre 0,05 et 0,08 h⁻¹



Graphe VI.21.: Détermination de la zone de Pareto pour le taux de purge et le taux de dilution.

2.3.3. - Conclusions de l'étude

① La concentration en biomasse et la productivité, dans la phase de recyclage cellulaire, sont fortement liées au taux de dilution et au taux de purge appliqués à la fermentation. Les valeurs maximales de ces deux critères sont obtenues quand le taux de dilution est élevé et le taux de purge très faible. Par contre la durée donc la stabilité du procédé est considérablement réduite quand le taux de purge est faible, conformément aux travaux de Crespo (1992). Quand c'est le cas, et dans 80% des cas, c'est une baisse de la concentration en acide lactique qui est la cause de la chute brutale de la productivité. Le taux de renouvellement des cellules est faible, les bactéries sont âgées et perdent leur capacité à produire. Dans 20% des cas, c'est une baisse conjointe de la production d'acide lactique et une diminution du débit de perméat qui provoque cette chute. Ces conditions sont réunies quand la concentration en biomasse et les pressions dans la membrane sont élevées.

② Une zone optimale de fonctionnement a été déterminée à partir des deux critères fondamentaux pour l'amélioration de la production d'acide lactique. Cette zone définit l'endroit du domaine où le meilleur compromis existe entre la productivité maximale et la stabilité du procédé. Le taux de dilution doit se situer entre 1 et 2 h⁻¹ et le taux de purge entre 0,04 et 0,09 h⁻¹: Soit un rapport entre les deux taux de 20 à 30.

③ Aux taux de dilution élevés, la phase de latence entre les deux phases de croissance (batch et recyclage) est plus importante. La quantité de substrat disponible est élevée et la quantité d'acide lactique produite est faible. Par la suite, la concentration finale en biomasse est beaucoup plus élevée aux forts taux de dilution. Ces conditions engendrent :

- ➔ plus de biomasse à retraiter,
- ➔ une perte importante de substrat non consommé, notamment en début de recyclage,
- ➔ une concentration faible en acide lactique en sortie perméat.
- ➔ un risque plus important de colmatage

Il serait peut être intéressant d'augmenter le taux de dilution progressivement, en respectant par exemple le rapport entre la quantité de substrat entrant et la concentration en biomasse.

④ Il est préférable d'avoir une concentration en biomasse plus faible mais plus efficace, donc une productivité spécifique plus importante. Cette productivité spécifique est importante quand la concentration en biomasse est faible, c'est à dire quand le taux de dilution est faible et le taux de purge élevé (**graphe VI.18**).

⑤ En ajoutant ces nouvelles contraintes et pour optimiser les valeurs des paramètres cinétiques, le plan d'expériences a permis la détermination d'une zone optimale de fonctionnement située dans le domaine expérimental entre un taux de dilution de 1 à 1,4 h⁻¹ et un taux de purge de 0,05 à 0,08 h⁻¹.

3. RECHERCHE DE PERFORMANCES DU PROCÉDE

3.1. - Optimisation finale du procédé à recyclage cellulaire

Tous les travaux et toutes les connaissances acquises précédemment vont être utilisés pour réaliser une nouvelle fermentation avec recyclage cellulaire n°R12 dans les conditions déterminées comme optimales.

3.1.1. - Objectifs

- ❶ Fixer les protocoles finaux de la fermentation et de la microfiltration.
- ❷ Déterminer les principaux paramètres cinétiques.
- ❸ Evaluer les performances de production du procédé intégré de fermentation extractive.
- ❹ Evaluer la stabilité de ce procédé.

3.1.2. - Conditions expérimentales

3.1.2.1. - Milieux de culture

L'amélioration de la composition des milieux de culture a été réalisée lors des études précédentes. La source azotée est le paramètre essentiel de l'augmentation de la concentration en biomasse. Quatre milieux adaptés à la fermentation avec recyclage cellulaire sont présentés dans le tableau suivant :

Tableau VI. 3.1 : Composition des milieux utilisés lors de la fermentation R12

<i>Milieu des précultures (M_{p3})</i>		<i>Milieu de la phase discontinue (M_{x4})</i>	
Saccharose (jus vert)	60 g/L	Saccharose (jus vert)	40 g/L
Extrait de levure	5 g/L	Extrait de levure	20 g/L
Mg SO ₄	0,2 g/L	Mg SO ₄	0,2 g/L
Température	52°C	Température	52°C
pH	6,4.	pH	6,4
		Aération	≈ 200 ml/mn
<i>Milieu phase de croissance (M_{x5})</i>		<i>Milieu phase de production de lactate (M_{L4})</i>	
Saccharose (jus vert)	40 g/L	Saccharose (jus vert)	60 g/L
Extrait de levure	10 g/L	Extrait de levure	01 g/L
Corn steep	06 g/L	Corn steep	02 g/L
Extrait cellulaire	04 g/L	Extrait cellulaire	02 g/L
Mg SO ₄	0,2 g/L	(NH ₄) ₂ SO ₄	01,7 g/L
Température	52°C	(NH ₄) ₂ HPO ₄	01 g/L
pH	6,4	Température	52°C
		pH	6,4

Le milieu M_p3 est utilisé lors de la première préculture en fiole d'Erlenmeyer (0,15 L) et lors de la seconde préculture (1L) dans le réacteur SGI avec régulation de la température et du pH par un ajout d'ammoniaque 2N. Après environ 12 heures de culture, les bactéries sont en fin de phase exponentielle de croissance. 4,5 litres de milieu M_x4 présents dans le pilote sont ensemencés par 500 ml de la préculture. Le milieu d'alimentation n°1 (M_x5) favorise la production de biomasse pendant le début de la phase en recyclage cellulaire (120 L sont préparés). Enfin, le milieu d'alimentation n°2 (M_L4) est utilisé pour favoriser la production d'acide lactique pendant la seconde phase de recyclage cellulaire.

3.1.2.2. - Protocole expérimental

La première partie du protocole est résumé dans la **Figure VI. 3.1**. Le passage de la souche lyophilisée au pilote n'a pratiquement pas évolué :

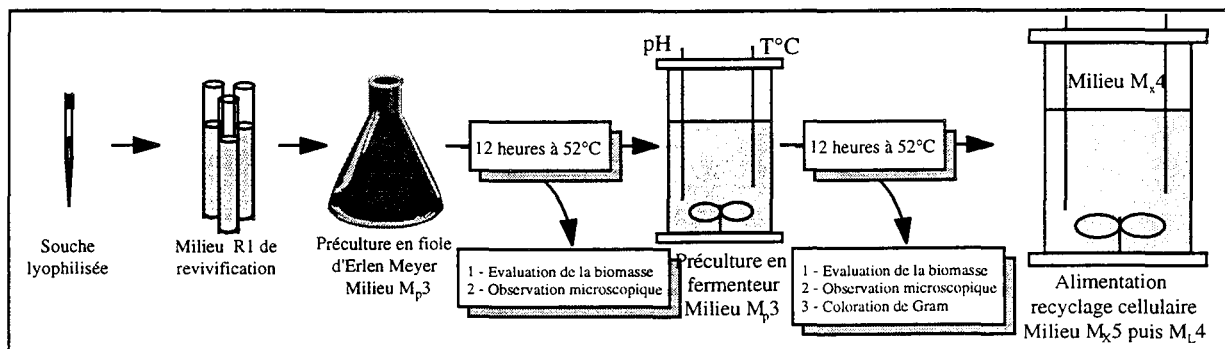


Figure VI. 3.1 : Protocole expérimentale de la fermentation R12.

Trois milieux sont nécessaires à la réalisation de la fermentation. Cela permet d'optimiser les effets des composants du milieu tout en réduisant les coûts.

La fermentation dans le pilote débute par une phase discontinue sur le milieu M_x4 , le milieu est aéré par une arrivée d'air à environ 200 ml/mn. En fin de phase exponentielle, la pompe de recyclage est enclenchée. Progressivement, la vanne de sortie perméat est ouverte et le taux de dilution fixé de manière à garder le rapport, quantité de substrat entrant et concentration en biomasse, constant. Cette opération est réalisée manuellement par palier. Puis la pompe de purge est mise en route à un taux de $0,06 \text{ h}^{-1}$, conformément aux résultats de l'étude précédente. Le passage au milieu M_L4 se fait quand la concentration en biomasse atteint un palier. Le flux de perméat est ensuite libéré pour travailler au taux de dilution maximal ou proche de $1,5 \text{ h}^{-1}$ (**Figure VI. 3.2**) (voir également graphes VI.23,24 et 25).

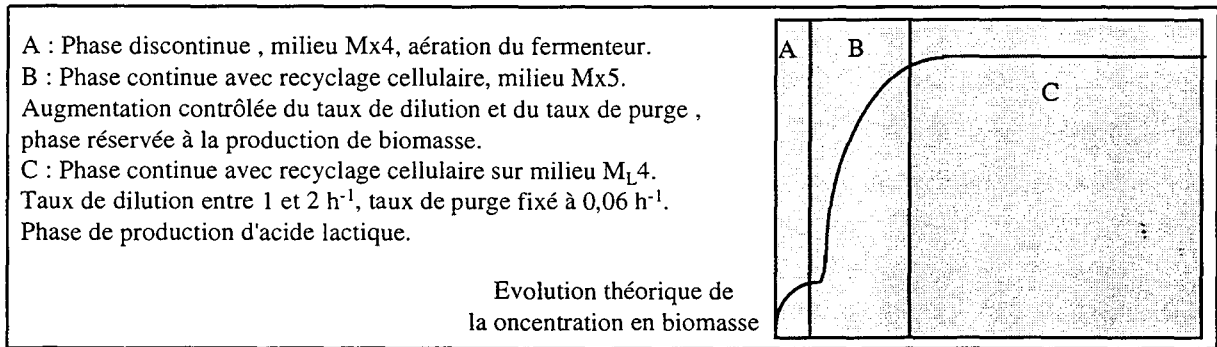


Figure VI. 3.2 : Protocole appliqué à la fermentation avec recyclage cellulaire.

3.1.2.3.- Conditions de filtration

La membrane utilisée est de porosité 0,2 µm avec 19 canaux. Les paramètres de filtration sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau VI. 3.2 : Valeurs et contrôles des principaux paramètres de filtration.

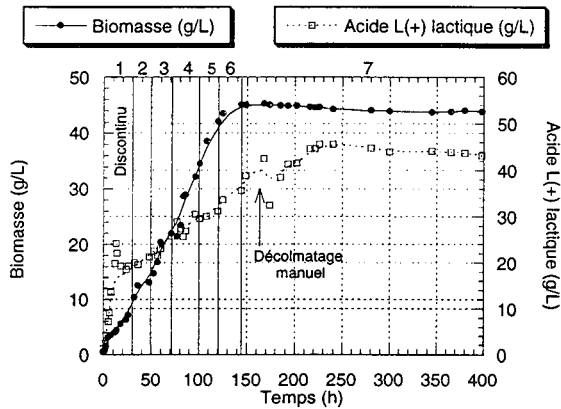
Paramètres	Constante	Variable	Type de contrôle
Membrane	0,2 µm 19 canaux	-	-
Q _r	1500 L/h	-	manuel
Vanne pression	-	60 à 40 % d'ouverture	automatique
Q _a	-	-	automatique ,identique Q _p
D	1 à 1,4 h ⁻¹	-	automatique
D _x	0,06 h ⁻¹	-	automatique
Fréquence décolmatage	0,5 mn ⁻¹	-	automatique

La pompe de recyclage est fixée à 83% de sa puissance, pour éviter un échauffement trop important, soit 1,5 m³/h. La vanne de régulation de pression est ouverte à 60% au départ et sa fermeture est contrôlée par une diminution du débit de perméat. Le temps entre 2 back-flush est fixé à 2 mn. L'évolution du taux de dilution et du taux de purge a été fixé précédemment.

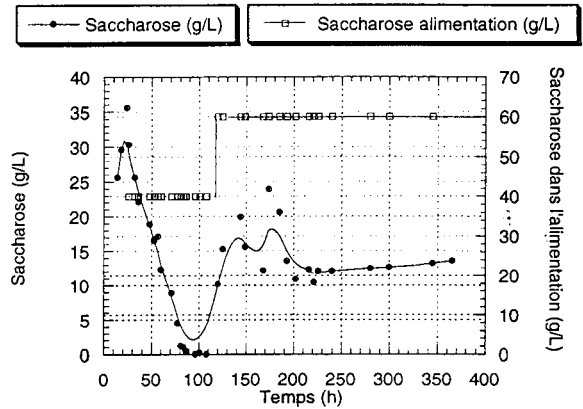
3.1.3. Résultat de la fermentation

La fermentation avec recyclage cellulaire s'est déroulée en 7 phases, comme le montre le **graphe VI.22**.

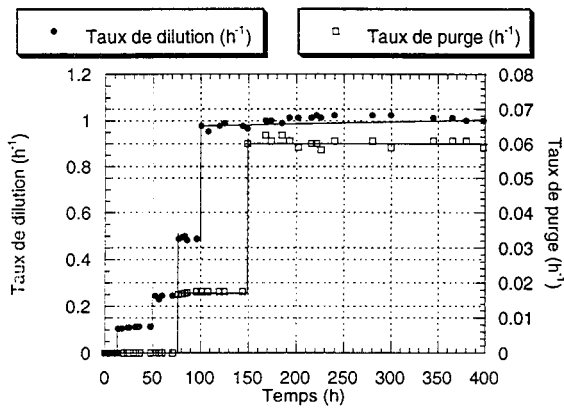
La phase 1 correspond à la partie discontinue aérée de la fermentation (Milieu M_x4). Cette phase est réduite à moins de 20 heures afin d'obtenir des bactéries en pleine phase exponentielle de croissance au moment du lancement du continu.



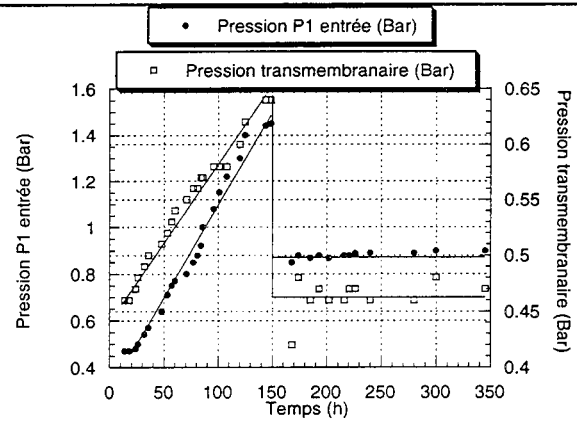
Graph VI. 21 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des concentrations en biomasse et en acide lactique.



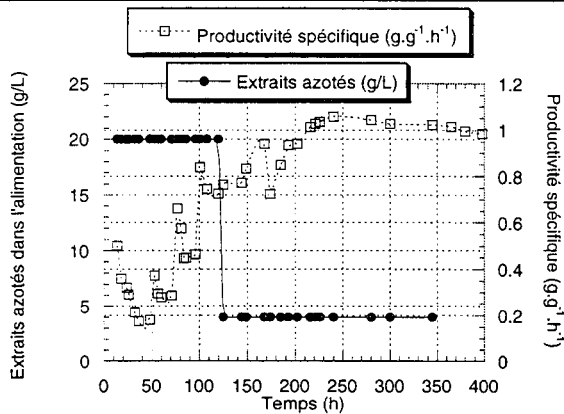
Graph VI. 22 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des concentrations en saccharose dans le fermenteur et dans l'alimentation.



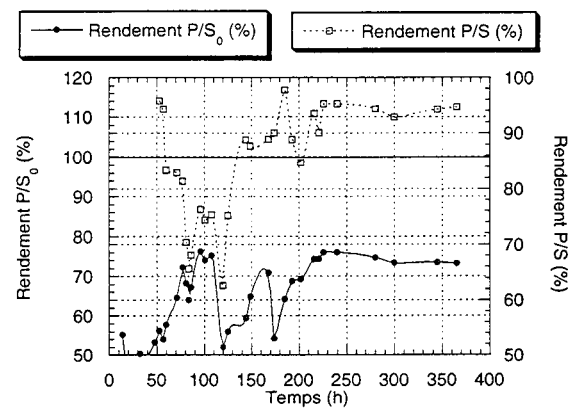
Graph VI. 23 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions du taux de dilution et du taux de purge.



Graph VI. 24 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions de la pression d'entrée P1 et transmembranaire.



Graph VI. 25 : Fermentation R12. Conditions optimales - Concentration en extraits azotés dans l'alimentation et productivité spécifique obtenue.



Graph VI. 26 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des rendements de conversion.

La phase 2 correspond au lancement du recyclage cellulaire vanne perméat fermée et taux de dilution $0,1 \text{ h}^{-1}$.

La phase 3 indique le début du lancement du continu avec recyclage cellulaire, taux de dilution fixé à $0,25 \text{ h}^{-1}$ et taux de purge nul. Le milieu d'alimentation est favorable à la production de bactéries, milieu M_x5 .

La phase 4 montre une augmentation par paliers du taux de dilution fixé à $0,5 \text{ h}^{-1}$, le taux de purge est toujours nul. Le milieu d'alimentation est favorable à la production de bactéries, milieu M_x5 .

La phase 5 marque le début de la mise en route du taux de purge à $0,02 \text{ h}^{-1}$. Le taux de dilution est libéré et atteint 1 h^{-1} . Le milieu d'alimentation est toujours favorable à la croissance, milieu M_x5 .

La phase 6 est le moment où la composition du milieu d'alimentation change au profit d'un milieu favorisant la production d'acide lactique. La composition en extrait azoté passe de 20 g/L à 4 g/L , milieu M_L4 .

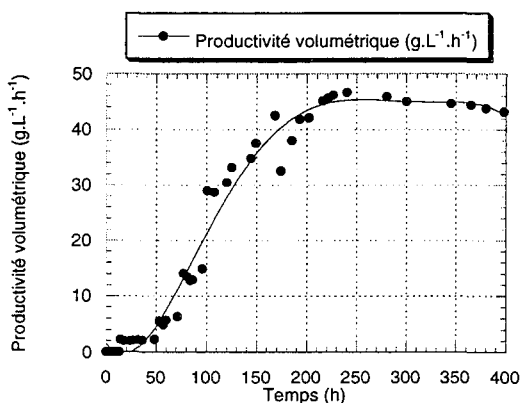
La phase 7 est la phase de production en recyclage cellulaire.

Remarque : le volume total de la fermentation initialement fixé à 5 litres en début de culture, s'est finalement déroulé très progressivement sur **4,2 litres**, à partir de la 50ème heure, le débit de la pompe d'alimentation en substrat ayant connu quelques problèmes de régulations. Par la suite, le volume est resté parfaitement stable.

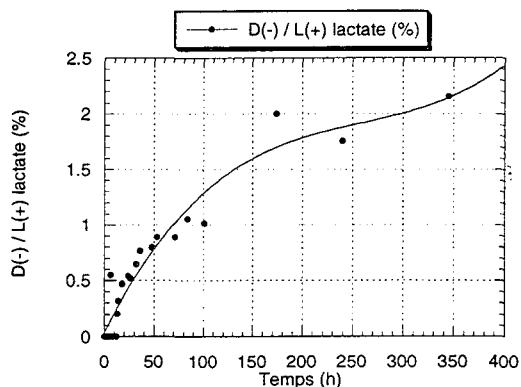
3.1.3.1.- Interprétations des graphes

Le **graphe VI.22** montre que la concentration en biomasse augmente très rapidement et sans arrêt jusqu'à 45 g/L . Il n'y a pas de phase de latence, ni au début, ni lors du passage en recyclage cellulaire. Le protocole et les compositions des milieux sont bien adaptés. La concentration en acide lactique ne cesse d'augmenter jusqu'à 44 g/L , ce qui n'avait jamais été obtenu auparavant. De plus, cette concentration est maintenue pendant près de 180 heures.

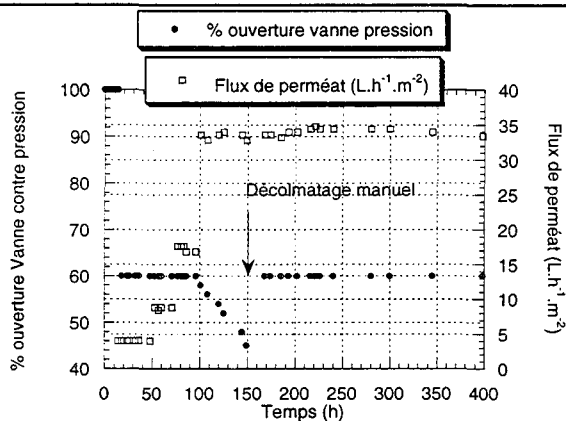
La concentration en saccharose atteint un pic (**graphe VI.23**) quand le recyclage commence (l'évolution du saccharose pendant la phase discontinue n'est pas représentée), le saccharose est ensuite consommé progressivement, puis, la concentration remonte pour se stabiliser vers 12 g/L . L'évolution de la concentration en saccharose dans l'alimentation est également représentée sur ce graphe, tout comme l'évolution des taux de dilution et de purge (**graphe V.24**). La concentration en extraits azotés dans l'alimentation est représentée **graphe VI.26**, pour illustrer les explications du paragraphe précédent.



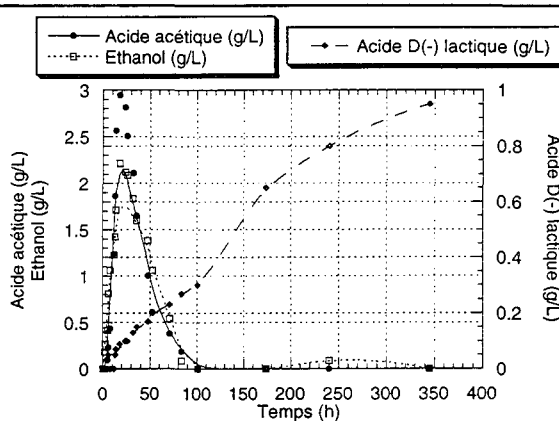
Graph VI. 27 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolution de la productivité volumétrique du procédé.



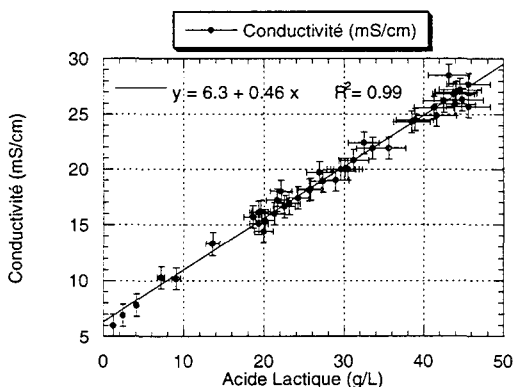
Graph VI. 28 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolution du rapport entre la quantité d'acide D(-) et L(+) lactique.



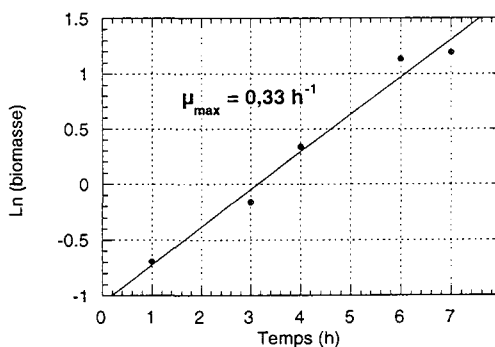
Graph VI. 29 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions du flux de perméat et de l'ouverture de la vanne de contre pression.



Graph VI. 30 : Fermentation R12. Conditions optimales - Evolutions des concentrations en métabolites de la voie hétérolactique et D(-) lactate.



Graph VI. 31 : Fermentation R12. Conditions optimales - Rapport entre la concentration de lactate dosé par C.L.H.P et la conductivité..



Graph VI. 32 : Fermentation R12. Conditions optimales - Détermination de la vitesse spécifique de croissance.

Même si le taux de dilution est resté constant grâce à la fermeture de la vanne de régulation de pression, la pression transmembranaire et la pression d'entrée ont augmenté de façon très importante (**graphe VI.25**), jusqu'aux pressions maximales de l'installation. A cet instant, la membrane fut démontée, décolmatée, nettoyée et remontée dans la boucle de recirculation (durée 10 mn). Cette opération manuelle a permis de diminuer les pressions qui sont restées quasiment stables tout au long de la fermentation. Ce changement inopiné de membrane s'est déroulé au moment du passage en phase 7 sans visiblement perturber l'évolution de la fermentation. Cette opération s'est effectuée en conditions non stériles et n'a eu aucune conséquence en terme de contamination du fermenteur, compte tenu de la température et de la concentration très élevée en cellules de *Bacillus coagulans*.

L'augmentation de la concentration en biomasse dans le pilote est importante. Même si les problèmes de transfert de matière augmentent, la productivité spécifique continue d'augmenter également (**graphe VI.26**), elle atteint un pic vers 240 heures à $1,05 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Il y a deux phénomènes qui expliquent cela; premièrement le milieu de culture M_{L4} favorise la production d'acide lactique au dépend de la croissance et, deuxièmement, l'augmentation du taux de purge réduit le temps de séjour de la cellule dans le fermenteur, et par la même, le phénomène de vieillissement. En conséquence, la productivité spécifique augmente jusqu'à $1 \text{ g.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ puis diminue très légèrement.

Le **graphe VI.27** montre clairement que la souche se comporte en hétérofermentaire en début de fermentation et en homofermentaire pendant la phase 7 de production de lactate. Pendant cette phase, 94% du saccharose consommé est transformé en acide lactique. Mais, seulement, 75% du saccharose disponible est converti.

La productivité volumétrique dans la phase 7 est également très importante et relativement stable (**graphe VI.28**). Elle atteint $45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ au bout de 200 heures de culture et reste à ce niveau pendant les 200 heures suivantes. Cette valeur n'avait jamais été obtenue auparavant avec cette souche dans les autres modes de culture.

Le **graphe VI.29** montre un effet très intéressant d'une augmentation importante de la concentration en biomasse dans un système à recyclage. Le rapport entre l'acide D et l'acide L lactique augmente de façon significative. Même si la proportion d'acide D(-) lactique demeure faible (moins de 2,5%), elle n'est plus négligeable. Nous n'avons pas trouvé d'explication sur cette augmentation de la proportion de D(-) lactate.

Le **graphe VI.30** décrit l'évolution de la fermeture de la vanne de contre pression qui permet de maintenir le flux de perméat constant avant le décolmatage manuel. La régulation est très efficace et très précise.

Afin de vérifier que la fuite de saccharose dans la première partie de la fermentation est bien due à un métabolisme hétérofermentaire, l'évolution des concentrations en acide acétique et en éthanol a été suivie. Les pics obtenus confirment l'hypothèse de la transition métabolique (**graphe VI.31**). Le milieu de culture et l'oxygène ajouté lors de la première phase de la fermentation favorise le passage en hétérofermentation et améliore la production de biomasse. le métabolisme aérobie offre des avantages aux bactéries hétérofermentaires. Le catabolisme des sucres en acétate double la quantité d'ATP formée par phosphorylation. il en découle une production de biomasse supérieure et une accélération de la croissance, c'est le cas pour *Bacillus coagulans* comme l'avaient démontré Ohara et Yahata (1996).

La concentration en lactate d'ammonium a été suivi en ligne grâce à une sonde de conductivité. Le dosage de l'acide lactique a également été fait par chromatographie liquide. La corrélation entre les deux courbes est très satisfaisante, confirmant ainsi les études publiées (**graphe VI.32, annexe III**).

La vitesse maximale de croissance a été évaluée dans la phase discontinue du recyclage cellulaire grâce à la méthode logarithmique (**graphe VI.33**). Elle est égale à $0,33 \text{ h}^{-1}$.

Enfin les **graphes VI.22, 23, 27 et 28** montrent que le procédé est totalement stable en débits, pressions, concentrations, rendements et productivité pendant plus de 8 jours de cultures, et peut être plus, si la fermentation n'avait pas été stoppée intentionnellement.

3.1.3.2. - Résumé des paramètres cinétiques obtenus

Les paramètres ont été évalués, ou calculés, à partir des graphes précédents. Ces paramètres ont été déterminés à partir de la phase 7 (production du lactate) (**Tableau VI. 3.3**).

Les valeurs obtenues sont toutes très élevées; seul le rendement global de bioconversion n'est que de 75%.

Tableau VI. 3.3 : Paramètres cinétiques de la phase de production (phase 7)

X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	$Y_{p/s}$ (g/g ⁻¹)	$Y_{p/s0}$ (g/g ⁻¹)	δ_{\max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	t_r (h)	ψ (g.g ⁻¹)
45 ± 4,5	44 ± 3	0,94 ± 0,1	0,75	45 ± 3	42 ± 3	250	19

D'autres paramètres plus généraux (sur la durée totale de la fermentation) ont été calculés :

- ➡ Productivité volumétrique globale : $34 \text{ g L}^{-1}.\text{h}^{-1}$
- ➡ Rendement global de bioconversion: 65%

3.1.4. Conclusions de la fermentation

① Par le biais de l'amélioration de la composition du milieu de culture, des conditions de fermentation et par l'optimisation des paramètres de filtration, les performances de la fermentation sont très largement améliorées. La productivité maximale atteint $45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ pour une concentration en biomasse de 45 g/L . Le rendement de bioconversion indique que la totalité du saccharose sert à la production d'acide lactique, même si la totalité du saccharose présent n'est pas consommé (75%).

② Le découplage de la composition du milieu de culture est très largement bénéfique à la croissance (milieu M_x) et la production d'acide lactique (milieu M_L). L'utilisation de deux ou trois milieux permet également de réduire les coûts en utilisant spécifiquement les milieux chers (riches en sources azotées) lors d'une phase de croissance réduite.

La première phase de croissance, lors de la phase discontinue, est améliorée par un ajout d'air en continu dans le fermenteur, le taux de croissance spécifique est maximal ($0,33 \text{ h}^{-1}$), le métabolisme est incontestablement hétérofermentaire comme l'indique les évolutions des concentrations en acide acétique et en éthanol. Ces métabolites disparaissent progressivement dès que l'alimentation en air est stoppée. Cette croissance rapide a permis de diminuer la phase discontinue à 16 heures.

③ L'augmentation progressive du taux de dilution, puis du taux de purge est une solution innovante et visiblement efficace pour améliorer la croissance lors du début du recyclage cellulaire. La quantité de substrat entrant, et disponible, doit être proportionnelle à la quantité de bactéries dans la culture.

④ L'augmentation de la concentration en cellules engendre une augmentation de la viscosité et du colmatage réversible de la membrane. Les pressions transmembranaires et P_1 augmentent, mais le flux de perméat reste stable grâce à la régulation de la vanne de contre pression. Il semble, par conséquent, que le colmatage irréversible de la membrane augmente également, alors que ce phénomène n'avait pas été démontré sur ce type de membrane avec le fluide modèle (**Chapitre V**). Les compositions des milieux de culture M_{x4} et M_{x5} sont très riches en extraits azotés, en protéines et peptides. Ces molécules sont de très bons colmatants des membranes de porosité $0,2 \mu\text{m}$. Le passage à un milieu 5 fois moins riche en extraits azotés et après décolmatage manuel de la membrane permet d'éliminer ce problème. Le couplage de deux membranes de microfiltration permettrait d'éliminer facilement cet inconvénient.

⑤ Le réacteur en haute densité cellulaire provoque une augmentation significative de la proportion d'acide D(-) lactique par rapport à l'acide L(+) lactique. Le rapport D(-) lactate sur

lactate total demeure néanmoins inférieur à 2% dans le pire des cas. Ceci pourrait être un avantage pour la préparation de polymères de lactate où une faible quantité d'acide D(-) est nécessaire.

⑥ Le taux de purge est l'un des paramètres les plus importants de la fermentation car il permet d'augmenter la productivité spécifique en abaissant le temps de séjour du micro-organisme dans le bioréacteur et en diminuant les effets du vieillissement. Ceci est la clé du système qui explique l'excellente stabilité du procédé pendant 250 heures. En effet, si la souche vieillit, la production d'acide chute, les cellules se lysent, les débris viennent colmater la membrane qui provoquent une augmentation de la pression puis une diminution du flux de perméat. La quantité de substrat entrant diminue et vient aggraver les problèmes de transfert de matière et de disponibilité du substrat. La productivité chute très rapidement et le système périclité.

⑦ La stabilité du procédé pendant la phase 7 est très probablement le fruit d'une combinaison de plusieurs facteurs :

- Le choix de la membrane et des conditions de filtration.
- Le décolmatage manuel de la membrane juste avant la phase de production.
- L'optimisation du taux de purge et du taux de dilution. Le rapport D/D_x est égal à 17.
- L'utilisation d'un milieu d'alimentation appauvri en extraits azotés pendant cette phase.
- La stabilisation de la concentration en biomasse (liée aux taux de dilution et de purge).

⑧ La productivité spécifique augmente parallèlement à la concentration en biomasse, alors que c'est l'inverse qui est généralement observé. Ceci est dû, conjointement à l'augmentation du taux de purge, et au passage vers un milieu de culture spécifique à la production de lactate.

⑨ La mesure en ligne de l'acide lactique par conductivité est possible en réacteur à recyclage cellulaire. Ceci permettrait d'intervenir instantanément sur les paramètres de la fermentation en cas de problème. Cette méthode en ligne est précise à 12 % dans les conditions de culture testées.

3.2. Comparaison des 3 modes de cultures

Ce paragraphe va permettre de comparer les valeurs des différents paramètres cinétiques et les performances des fermentations marquantes réalisées dans les 3 modes de cultures : discontinu, continu et continu avec recyclage cellulaire.

3.2.1. Résultats

Pour faciliter la comparaison, les valeurs sont présentées dans un tableau spécifique (**Tableau VI. 3.4**) :

Tableau VI. 3.4 : Tableau comparatif des valeurs cinétiques et des performances des 3 modes de culture étudiés (F pour discontinu, C pour continu et R pour recyclage cellulaire).

Fermentation	X_{\max} (g/L)	P_{\max} (g/L)	μ_{\max} (h ⁻¹)	δ (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	$Y_{p/s0}$ (g.g ⁻¹)	$Y_{p/s}$ (g.g ⁻¹)	Δ (g.g ⁻¹ .h ⁻¹)
F1	1,9	29	0,20	0,54	0,28	0,65	0,28
F31	3,05	57	0,28	1,2	0,88	0,95	0,39
C3	2,2	27	-	4,1	0,45	0,91	-
C6	3,25	14	0,31	2,1	0,25	0,91	0,64
R1	12,5	31	-	7	0,52	0,94	0,56
R12	45	44	0,33	42	0,75	0,94	0,94
Fermentation	δ_{\max} (g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	t_r (h)	S_f (g/L)	Rapport D(-)/L(+)	t (h)	P_{total} (g)	ψ (g.g ⁻¹)
F1	0,54	55	40	<1%	55	29	15*
F31	1,2	48	9	<1%	48	57	19*
C3	4,1	240	30	1%	240	980	12
C6	2,1	1300	41	1%	1300	2730	5
R1	11,5	45	25	-	90	3150	28
R12	44	250	11	<2,5%	398	58500	19

* Pour les cultures en mode discontinu, ψ se résume au rapport P/X.

3.2.2. Conclusions

① La fermentation F1 sert de référence, car c'est le point de départ de tous les travaux réalisés. Les meilleures fermentations discontinues et continues sont présentées.

L'amélioration du protocole de fermentation, des milieux de culture et des conditions physico-chimiques en culture discontinue, ont permis de multiplier la productivité (δ) par **2**. Le rendement global de bioconversion ($Y_{P/S0}$) est également passé de **0,28 à 0,88 g.g⁻¹**.

Le passage au mode continu n'a pas permis d'amélioration notable du rendement, mais la productivité a été multipliée par **4**.

La mise en oeuvre en réacteur à recyclage cellulaire a, dans un premier temps, permis d'obtenir une augmentation de la productivité globale d'un facteur **15** par rapport à la fermentation F1. Cette fermentation réalisée sans taux de purge et sans optimisation a été difficile à mettre en oeuvre et à contrôler. Après optimisation du protocole et des paramètres de la partie microfiltration, la fermentation réalisée en recyclage cellulaire a permis d'obtenir une productivité volumétrique maximale de **45 g.L⁻¹.h⁻¹**, soit **83 fois** la productivité de la fermentation F1. Cette fermentation a duré près de 400 heures avec 250 heures de production d'acide lactique.

La souche est toujours en conditions homofermentaires ($Y_{P/S} > 90\%$), sauf au début de la culture R12. Lors de cette culture, la phase hétérofermentaire a été volontairement provoquée pour améliorer la production de biomasse.

La productivité spécifique (Δ) a été améliorée lors du passage en mode continu et continu avec recyclage cellulaire, grâce au renouvellement des cellules et au développement d'un milieu spécifique favorisant la production d'acide lactique.

② La vitesse spécifique de croissance a été déterminée entre 0,3 et 0,33 h⁻¹. Les concentrations maximales en biomasse ont été de 3 g/L en discontinu et continu, et, environ **15 fois** plus en réacteur à haute densité cellulaire.

③ Quelque soit le mode de culture employé, il y a toujours une concentration résiduelle en saccharose. Ceci est un inconvénient pour les étapes de séparations ultérieures. Néanmoins, cette concentration, après améliorations des cultures discontinues et continues en haute densité cellulaire, a été limitée à **10 g/L**.

④ *Bacillus coagulans* produit essentiellement de l'acide L(+) lactique, la proportion de l'isomère D(-) est généralement inférieure à 1%, mais ce rapport peut augmenter dans le cas des cultures en recyclage cellulaire à moins de **2,5%**. Cette augmentation n'est cependant pas forcément néfaste pour la suite des opérations car la présence d'une faible quantité de l'isomère D(-) est nécessaire pour la polymérisation du lactate.

⑤ Le calcul de ψ permet de comparer le rapport : quantité d'acide produit par rapport à la quantité totale de biomasse produite. Il faut que ce rapport soit le plus élevé possible pour

minimiser la quantité de biomasse à retraiter. S'il est trop faible, cela signifie que la capacité globale de production de lactate par les cellules est affecté. Il est identique entre les fermentations discontinues optimales et la culture R12. La capacité de production n'est donc pas affectée lors du passage d'une culture discontinue à une culture continue avec recyclage cellulaire.

3.3. Comparaison avec la littérature

Les performances de la fermentation R12 peuvent être comparées avec les différentes fermentations présentées dans la littérature reprises à partir du **Tableau I.1.5 du Chapitre I**. Le **Tableau VI. 3.5** décrit les principales études réalisées sur la production d'acide lactique et les performances obtenues dans la littérature.

Les seules études sur *Bacillus coagulans* avaient été réalisées par Heriban et al. en 1993. Nos propres études en mode discontinu sont très proches en performance des études de cet auteur. Le passage de cette souche atypique en fermentation avec recyclage cellulaire a permis d'augmenter la productivité à $45 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Ceci est beaucoup plus important que les productivités obtenues lors des cultures en mode discontinu et continu (rpa, agrégats, cellules immobilisées et lit fixe) de souches typiques utilisées pour la production de l'acide lactique, tels que, par exemple, les travaux de Major et Bull (1984), Zayed et Winter (1995) ou Stenroos (1982).

La comparaison avec d'autres études sur des procédés avec recyclage cellulaire montre que le procédé développé sur *Bacillus coagulans* offre des possibilités intéressantes par rapport aux travaux de Aeschlimann et von Stockar (1991) ou Bailey, et al. (1987).

La souche thermophile utilisée lors de ce travail n'est finalement pas si éloignée en terme de performance à la souche de *Lactobacillus helveticus* utilisée dans les travaux de références de Ohleyer, et al. (1985) et Mehaia et Cheryan (1987).

Enfin, la concentration maximale d'acide lactique peut être beaucoup plus faible avec *Bacillus* qu'avec *Lactobacillus*, comme le montre les 117 g/L d'acide lactique produits par Mehaia et Cheryan (1987).

Tableau VI. 3.5 : Comparaison des performances obtenues avec celles de la littérature.

Mode de culture	Micro-organisme	Substrat	Rendement (%)	Lactate (g/L)	Productivité (g/L.h)	Références
discontinu	<i>Bacillus coagulans</i>	Saccharose	90	50	1,4	Heriban , et al., 1993b
Continu RPA	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	90	25	9	Major et Bull, 1984
Continu Agrégats	<i>Bacillus laevolacticus</i>	Glucose	94	27	13	deBoer, et al., 1990
Continu cellules immobilisées	<i>Lactobacillus spp.</i>	Lactose	95	33	6	Zayed and Winter, 1995
Continu lit-fixe	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	87-97	46	3,3	Stenroos, et al., 1982
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus casei</i>	Lactose	99	48	12	Bailey, et al., 1987
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Lactose	70	15	16	Aeschlimann et Von Stockar, 1991
Continu tubulaire	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Glucose	95	59	65	Ohleyer, et al., 1985
Continu F.creuse	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lactose	99	117	84	Mehaia and Cheryan, 1987
Discontinu	<i>Bacillus coagulans</i>	Saccharose (jus vert)	96	57	1,2	Ce travail
Continu tubulaire	<i>Bacillus coagulans</i>	Saccharose (jus vert)	94	44	45	Ce travail

4. CONCLUSIONS DU CHAPITRE VI

La mise en oeuvre de *Bacillus coagulans* en réacteur à haute densité cellulaire, pour la production d'acide lactique optiquement pur, a nécessité une adaptation de la composition des milieux de culture et du protocole de fermentation.

L'innovation de ce procédé réside dans le découplage de la composition des milieux de culture. Dans un premier temps, le but est de produire de la biomasse rapidement en limitant les problèmes d'inhibition. Puis, lorsque le recyclage cellulaire débute, la concentration en biomasse continue à augmenter rapidement. Un milieu spécifique de ces deux phases a ainsi été proposé. D'autre part, un autre milieu spécifique est utilisé pour la phase de production d'acide lactique. Ce milieu est considérablement appauvri en extraits azotés et surtout en extraits de levure.

Les effets du taux de purge et du taux de dilution ont montré que ces deux paramètres avaient une importance primordiale sur les performances et la stabilité du procédé, comme l'avait déjà démontré Crespo (1992). Pour notre souche est dans les conditions de fermentation et de microfiltration fixées, le taux de dilution doit être compris entre 1 et 1,4 h⁻¹ et le taux de purge à 0,06 h⁻¹. La méthode des surfaces de réponses (plan d'expériences) est un outil particulièrement efficace pour déterminer les effets et les interactions des paramètres. Elle permet une optimisation multicritères simplifiée et très précise.

La réalisation de la fermentation avec recyclage cellulaire dans des conditions optimales a permis d'améliorer les performances de production (rendements et productivités) ; ce qui avait déjà été démontré pour d'autres souches bactériennes par Mehaia et Cheryan (1987) ou Aeschlimann et Von Stockar (1991). La productivité obtenue, pour *Bacillus coagulans*, est de 45 g.L⁻¹.h⁻¹ en recyclage cellulaire alors qu'elle n'était que de 1,2 à 1,4 g.L⁻¹.h⁻¹ pour le réacteur discontinu (cette étude et Heriban et al., 1993b).

Les études montrent clairement que le procédé peut être stable et le colmatage contrôlé, contrairement aux affirmations de Roychoudhury et al., 1995, qui reproche à ce type de réacteur une absence de stabilité et de maîtrise du colmatage. La durée de vie et la stabilité de la fermentation R12 est supérieure à 8 jours, pour une productivité moyenne de 44 g.L⁻¹.h⁻¹ et un rendement de 94%, ce qui n'avait jamais été obtenu dans la littérature sur une souche thermophile productrice d'acide lactique.

Le gain de performances obtenu lors de cette dernière expérimentation est très important par rapport à la première fermentation. La productivité a été multipliée par 80 pour un rendement de 94%.

La souche modèle utilisée ne permet pas une consommation totale du saccharosé; dans les conditions de fermentation testées il reste toujours au moins 10 g/L. Une concentration en saccharose plus faible dans l'alimentation aurait peut-être permis d'atteindre cet objectif. De plus, les concentrations maximales en acide lactique obtenues sont généralement limitées par rapport aux souches de Lactobacilles. Enfin, le fait de travailler à 52°C est idéal pour limiter les problèmes de contamination et améliorer le flux de perméat.

L'étude technico-économique industrielle du procédé avec recyclage cellulaire sur *Bacillus coagulans* montre que le procédé n'est pas viable avec cette souche (**Annexe XII**), ce qui est logique, compte tenu des deux points faibles décrits ci-dessus; même si le coût de production n'est pas très éloigné (**6F/Kg**) des études réalisées par Tejayadi et Cheryan (1995). Néanmoins, un procédé réalisé à partir du même type de souche mais ayant des capacités de production supérieures, et, permettant une utilisation complète des sucres, a toutes les chances d'être compétitif.

Les principaux avantages et inconvénients de l'utilisation de *Bacillus coagulans* en réacteur à recyclage cellulaire sont résumés dans le tableau suivant à partir de toutes les études réalisées précédemment et des paragraphes **I.1.2** et **I.1.3** du **chapitre I**.

Avantages / Inconvénients	Oui	Non
Augmentation de la concentration en cellules,	x	
séparation du produit de fermentation, fermentation extractive,	x	
augmentation de la productivité,	x	
découplage possible entre production de biomasse et de produit,	x	
membranes accessibles et autoclavables (pour membranes céramiques),	x	
possibilité de contrôle et supervision du procédé,	x	
nombreux paramètres contrôlables, nombreux degrés de liberté.	x	
augmentation de la filtrabilité par la température	x	
diminution des problèmes de contamination	x	
durée de vie des membranes difficilement prévisible,	x	x
maîtrise des phénomènes de colmatage difficile,		x
forces de cisaillement importantes qui nuisent à la viabilité cellulaire,		x
augmentation de la viscosité due aux cellules qui nuit à la filtration,	x	
durée de vie globale du procédé assez courte,		x
coût des membranes excessif.		x

~ CHAPITRE VII ~

Essais de modélisation

- Chapitre VII -
Essais de modélisation

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION.....	265
2. MODELISATION DES FERMENTATIONS	266
2.1. BILANS CINETIQUES.....	267
2.1.1. - <i>Cinétique de croissance</i>	267
2.1.2. - <i>Cinétique de consommation du substrat</i>	267
2.1.3. - <i>Cinétique de production d'acide lactique</i>	267
2.2. - BILANS SUR LES REACTEURS.....	267
2.2.1. - <i>Bilan pour la biomasse</i>	267
2.2.2. - <i>Bilan pour le substrat</i>	267
2.2.3. - <i>Bilan pour le produit</i>	267
2.3. ESSAIS DE MODELISATION D'UNE CULTURE DISCONTINUE	268
2.3.1. <i>Programme de modélisation</i>	268
2.3.2. - <i>Valeur des paramètres et des constantes cinétiques</i>	268
2.3.3. <i>Choix des fermentations à modéliser</i>	268
2.3.4. <i>Résultat de la modélisation</i>	269
2.3.5. <i>Conclusion de la modélisation en mode discontinu</i>	270
2.4. - ESSAI DE MODELISATION D'UNE CULTURE CONTINUE.....	270
2.4.1. - <i>Choix de la fermentation à modéliser</i>	270
2.4.2. - <i>Résultat de la modélisation</i>	270
2.4.3. - <i>Conclusion de la modélisation en mode continu</i>	271
2.5. - ESSAI DE MODELISATION D'UN CULTURE CONTINUE AVEC RECYCLAGE CELLULAIRE	271
2.5.1. - <i>Choix de la fermentation à modéliser</i>	271
2.5.2. - <i>Résultat de la modélisation</i>	272
2.5.3. - <i>Conclusion de la modélisation en recyclage cellulaire</i>	272
2.6. - CONCLUSION SUR LA MODELISATION DES FERMENTATIONS	273
3. MODELISATION DE LA FILTRATION	274
3.1. - ESSAIS DE MODELISATION	274
3.1.1. - <i>Modélisation de Q_{ps}</i>	274
3.1.2. - <i>Modélisation du colmatage (col_m)</i>	275
3.1.3. - <i>Modélisation de l'évolution du flux ou du débit de perméat</i>	275
3.2. CONCLUSION SUR LA MODELISATION DE LA FILTRATION.....	277
4. CONCLUSIONS SUR LA MODELISATION.....	278

GRAPHIQUES

Graphe VII. 1 :Modélisation de l'évolution de la biomasse (g/L).....	269
Graphe VII. 2 : Modélisation des évolutions des concentrations en saccharose et en acide lactique (g/L) pour les cultures discontinues.....	269
Graphe VII. 3 :Modélisation de l'évolution de la biomasse (g/L).....	270
Graphe VII. 4 : Modélisation des concentrations en saccharose et en acide lactique (g/L) pour une culture continue à $0,15 \text{ h}^{-1}$	271
Graphe VII. 5 :Modélisation de l'évolution de la biomasse, de l'acide lactique et du saccharose (g/L) pour une culture continue avec recyclage cellulaire.....	272
Graphe VII. 6 : Modélisation du débit de perméat pour la membrane $0,2 \text{ }\mu\text{m}$	276
Graphe VII. 7 : Modélisation du flux de perméat pour la membrane $0,8 \text{ }\mu\text{m}$	276

1. INTRODUCTION

L'acquisition de connaissances sur la production d'acide lactique par une souche de *Bacillus coagulans* va permettre de réaliser la modélisation des fermentations à partir des trois modes de cultures utilisés. L'objectif est de décrire l'évolution des concentrations en biomasse, en acide lactique et en saccharose en utilisant une loi de Monod modifiée et les bilans cinétiques des différents modes de fermentations. Les paramètres intervenant dans le calcul du modèle devront être les plus proches possibles des valeurs rencontrées au cours des expérimentations.

La construction du modèle et les tests de confrontations avec les points expérimentaux sont réalisés numériquement à l'aide d'un logiciel de traitements mathématiques des données (MATLAB®).

Les études sur la microfiltration du milieu de culture ont été réalisées par le biais d'un logiciel de traitements statistiques des données. Les influences des paramètres sur une réponse sont structurées par l'intermédiaire d'un modèle polynomial faisant intervenir les effets des paramètres, leurs effets quadratiques respectifs et les effets des interactions. La combinaison des modèles décrivant l'évolution des réponses en fonction de tous les paramètres peut être réalisée pour simuler l'évolution du flux ou du débit de perméat, dans les conditions fixées par l'expérimentation. Ce modèle pourra alors être confronté aux expériences réalisées dans le **Chapitre V**; il permettra de confirmer ou d'infirmer les hypothèses faites sur les mécanismes intervenant dans la microfiltration d'un milieu de culture pour des membranes de porosités variables.

2. MODELISATION DES FERMENTATIONS

La modélisation est réalisée à partir des connaissances des cinétiques de croissance et des particularités de la souche mises en évidence lors des études expérimentales. Ces particularités sont :

- ➔ une production associée et non-associée à la croissance,
- ➔ une inhibition par le produit,
- ➔ une inhibition par le substrat,
- ➔ un décès cellulaire en fin de culture.

L'hypothèse de départ (la plus probable) est que la souche de *Bacillus coagulans* obéisse à la loi de Monod (1942):

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S}$$

Après description des particularités de la souche, il est possible d'ajouter à cette loi: un terme d'inhibition par le produit, un terme d'inhibition par le substrat et une constante de décès cellulaire, on obtient :

$$\mu = \frac{\mu_{\max} \cdot S}{K_S + S + \frac{S^2}{K_{is}}} \cdot \frac{1}{1 + \left(\frac{P}{K_{ip}}\right)^n} - K_d$$

avec : μ_{\max}	vitesse spécifique maximale de croissance (h^{-1})
S	concentration en substrat (g/L)
K_S	constante d'affinité pour le substrat (g/L)
K_{is}	constante d'inhibition par le substrat
P	concentration en produit (g/L)
K_{ip}	constante d'inhibition par le produit (g/L)
n	puissance d'inhibition (nombre adimensionnel)
K_d	constante de décès cellulaire (h^{-1})

2.1. Bilans cinétiques

2.1.1. - Cinétique de croissance

$$r_x''' = \mu \cdot X \quad \text{avec } r_x''' \text{ vitesse de croissance (g.L}^{-1}\text{.h}^{-1}\text{)}$$

2.1.2. - Cinétique de consommation du substrat

Un terme de maintenance (m) est associé à la consommation du substrat.

$$r_s''' = -\frac{1}{Y_{X/S}} \cdot r_x''' - m \cdot X$$

avec $Y_{X/S}$ rendement biomasse sur substrat consommé
 m maintenance

2.1.3. - Cinétique de production d'acide lactique

$$r_p''' = Y_{X/S} \cdot r_s'''$$

2.2. - Bilans sur les réacteurs

2.2.1. - Bilan pour la biomasse

$$\frac{dX}{dt} = -\frac{Q_1 X}{V} + r_x'''$$

2.2.2. - Bilan pour le substrat

$$\frac{dS}{dt} = \frac{(Q_1 + Q_2)}{V} \cdot (S_a - S) - r_s'''$$

2.2.3. - Bilan pour le produit

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{(Q_1 + Q_2)}{V} \cdot P + r_p'''$$

➔ Pour le discontinu : $Q_1 = Q_2 = 0$

- ➔ Pour le continu simple : $Q_2 = 0$ et $Q_1 \neq 0$; Q_1/V est le taux de dilution (Q/V ou D).
- ➔ Pour le continu avec recyclage cellulaire : $Q_1 \neq 0$ et $Q_2 \neq 0$; Q_1/V est le taux de purge (D_x) et Q_2/V est le taux de dilution (D).

2.3. Essais de modélisation d'une culture discontinue

2.3.1. Programme de modélisation

Le programme de modélisation a été réalisé sous le logiciel MATLAB[®], et présenté en **annexe VI**. Ce programme tient compte des modifications de la loi de Monod et des bilans.

2.3.2. - Valeur des paramètres et des constantes cinétiques

Ces valeurs ont été optimisées parallèlement sur les 3 modes de fermentation (discontinu, continu et continu avec recyclage cellulaire) par le programme de modélisation et à partir des connaissances déterminées expérimentalement sur la souche de *Bacillus coagulans* :

Constante d'affinité pour le substrat, K_s (g/L) : **0,2 à 0,6 g/L**

Constante d'inhibition par l'acide lactique, K_i (g/L) : **30 à 40 g/L**

Rendement de conversion du saccharose en biomasse $Y_{x/s}$ ($g \cdot g^{-1}$) : **0,04 à 0,05 $g \cdot g^{-1}$**

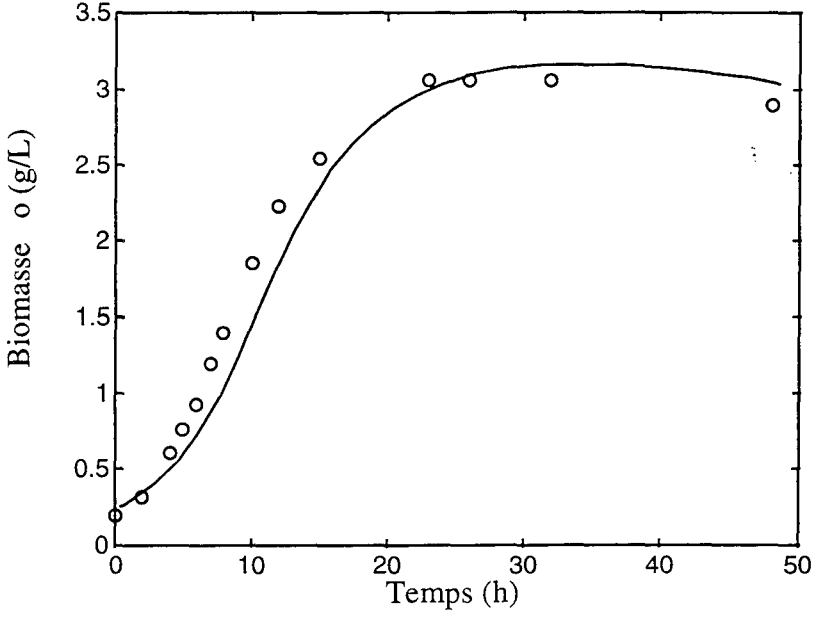
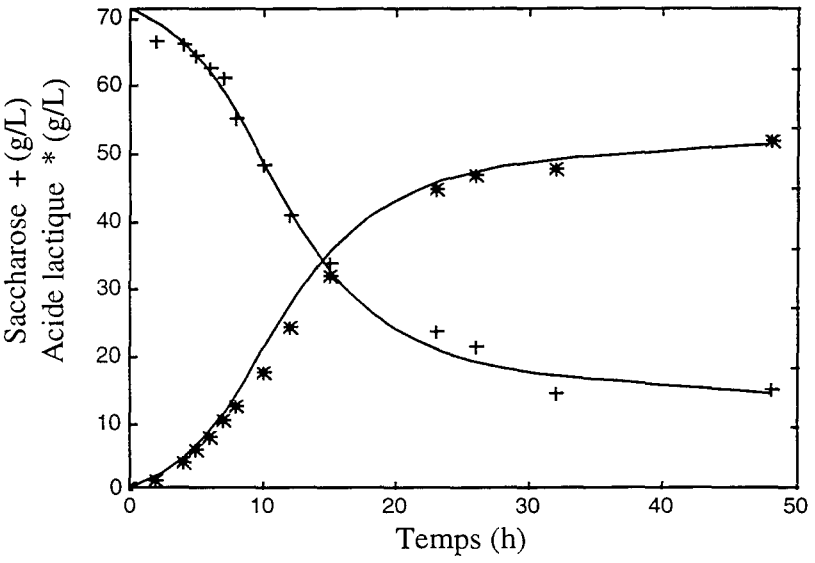
Rendement de conversion du saccharose en L(+) lactate $Y_{p/s}$ ($g \cdot g^{-1}$) : **0,85 à 0,95 $g \cdot g^{-1}$**

Par contre aucune donnée sur la maintenance et la constante de décès cellulaire n'était disponible.

2.3.3. Choix des fermentations à modéliser

Pour pouvoir comparer le résultat de la modélisation entre les différents modes de culture, les conditions de culture doivent être les plus proches possibles les unes des autres. Ainsi les cultures ayant au moins 3 à 5 g/L d'extraits azotés ont été prises en compte pour déterminer les points expérimentaux (points exp.). Il s'agit d'une moyenne des évolutions de la concentration en biomasse, en acide lactique et en saccharose pour les fermentations F31, F34, F37, F38 et F44.

2.3.4. Résultat de la modélisation

<p><u>Paramètres</u></p> <p>μ_{max} (h^{-1}) 0,34</p> <p>K_s (g/L) 0,5</p> <p>K_i (g/L) 34</p> <p>K_p (g/L) 500</p> <p>K_d (h^{-1}) 0,08</p> <p>m (h^{-1}) 0,06</p> <p>$Y_{x/s}$ ($g \cdot g^{-1}$) 0,052</p> <p>$Y_{p/s}$ ($g \cdot g^{-1}$) 0,87</p> <p>n 2,4</p> <p>Modèle _____</p> <p>Points exp. o</p>	 <p>Grphe VII. 1 :Modélisation de l'évolution de la biomasse (g/L) pour une culture discontinue.</p>
<p>Modèle _____</p> <p><u>Points exp.</u></p> <p>Lactate *</p> <p>Saccharose +</p>	 <p>Grphe VII. 2 : Modélisation des évolutions des concentrations en saccharose et en acide lactique (g/L) pour les cultures discontinues.</p>

2.3.5. Conclusion de la modélisation en mode discontinu

Les évolutions sont globalement bien décrites par le modèle, surtout pour la concentration en acide lactique et en saccharose. Le léger décalage observé pour la concentration en biomasse n'est pas significatif si l'on tient compte des 10% d'erreurs standards de chaque mesure expérimentale.

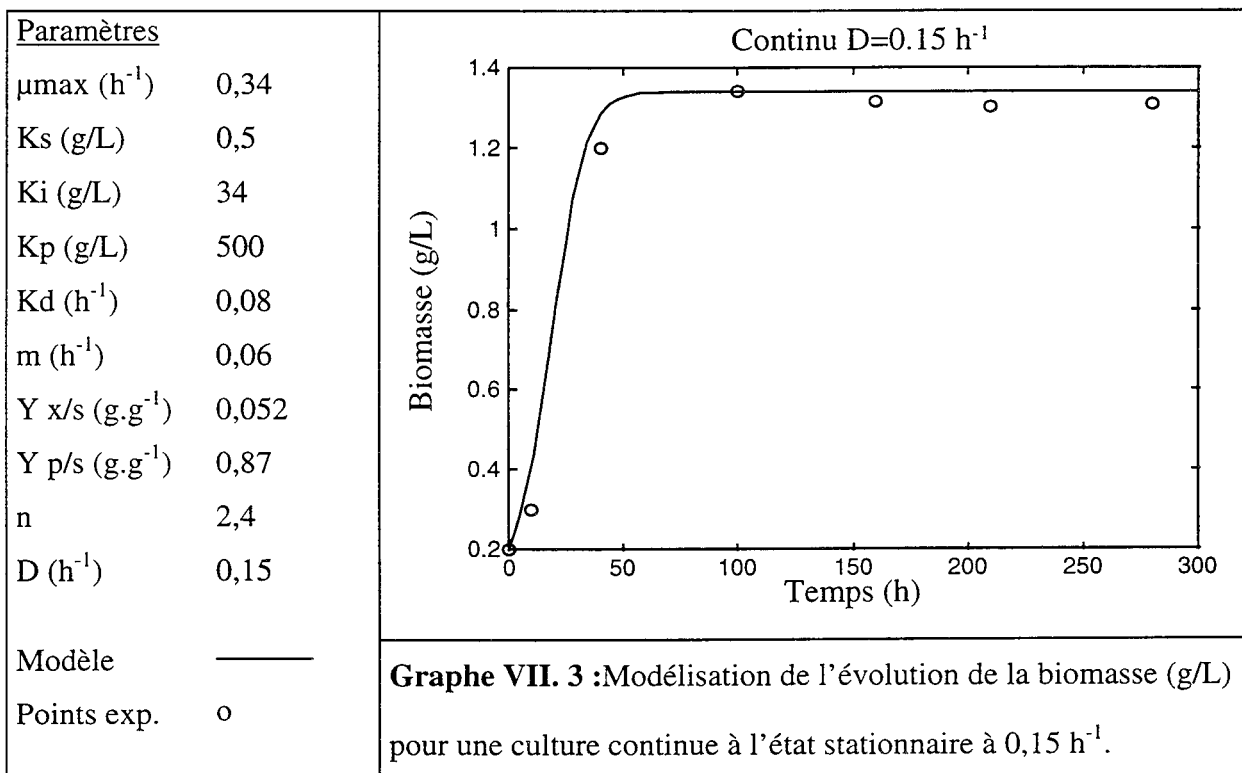
Le terme de maintenance et la constante de décès cellulaire ont été respectivement fixés à 0,06 h⁻¹ et 0,08 h⁻¹. La puissance d'inhibition est de 2,4, cette valeur avait déjà été obtenue lors de la modélisation au laboratoire d'une autre souche productrice d'acide lactique: *Lactobacillus rhamnosus*.

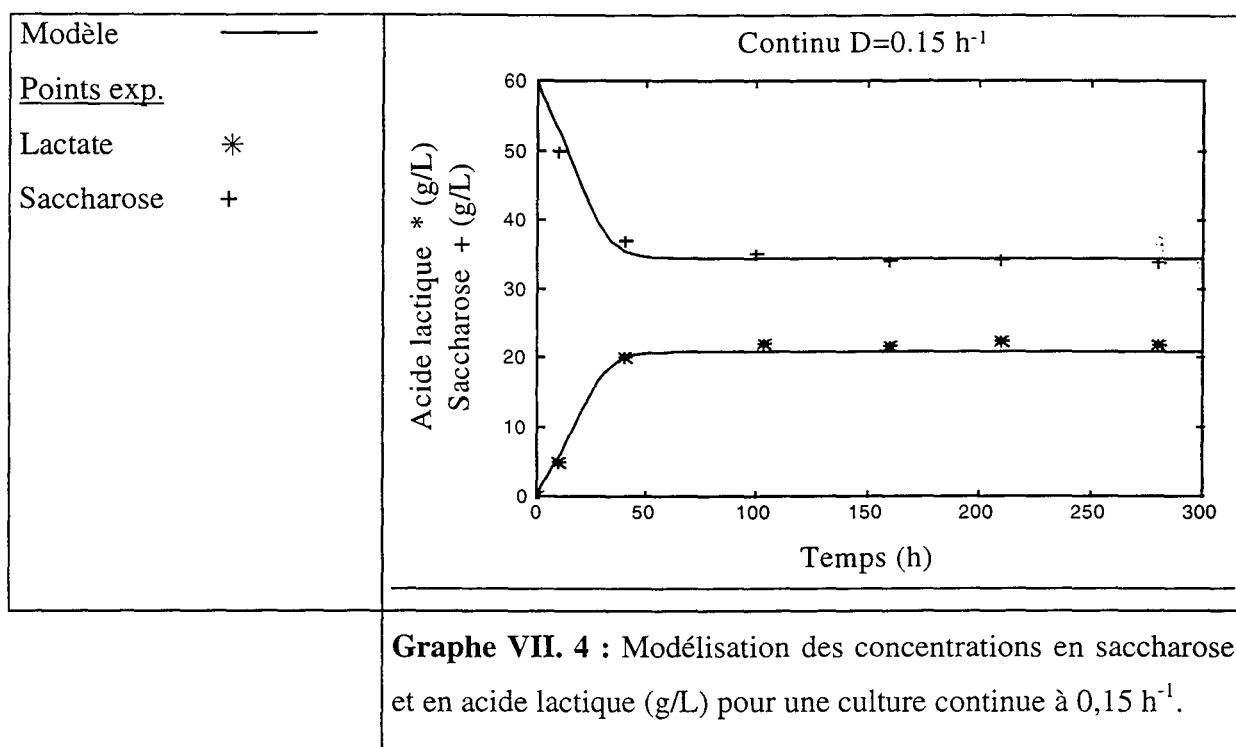
2.4. - Essai de modélisation d'une culture continue

2.4.1. - Choix de la fermentation à modéliser

La fin de la fermentation C5 a été réalisée sur un milieu de composition (60 g/L de saccharose, 3 g/L d'extraits azotés et 2,7 g/L de sels d'ammonium dans l'alimentation) relativement proche de ceux utilisés pour la modélisation en mode discontinu.

2.4.2. - Résultat de la modélisation





2.4.3. - Conclusion de la modélisation en mode continu

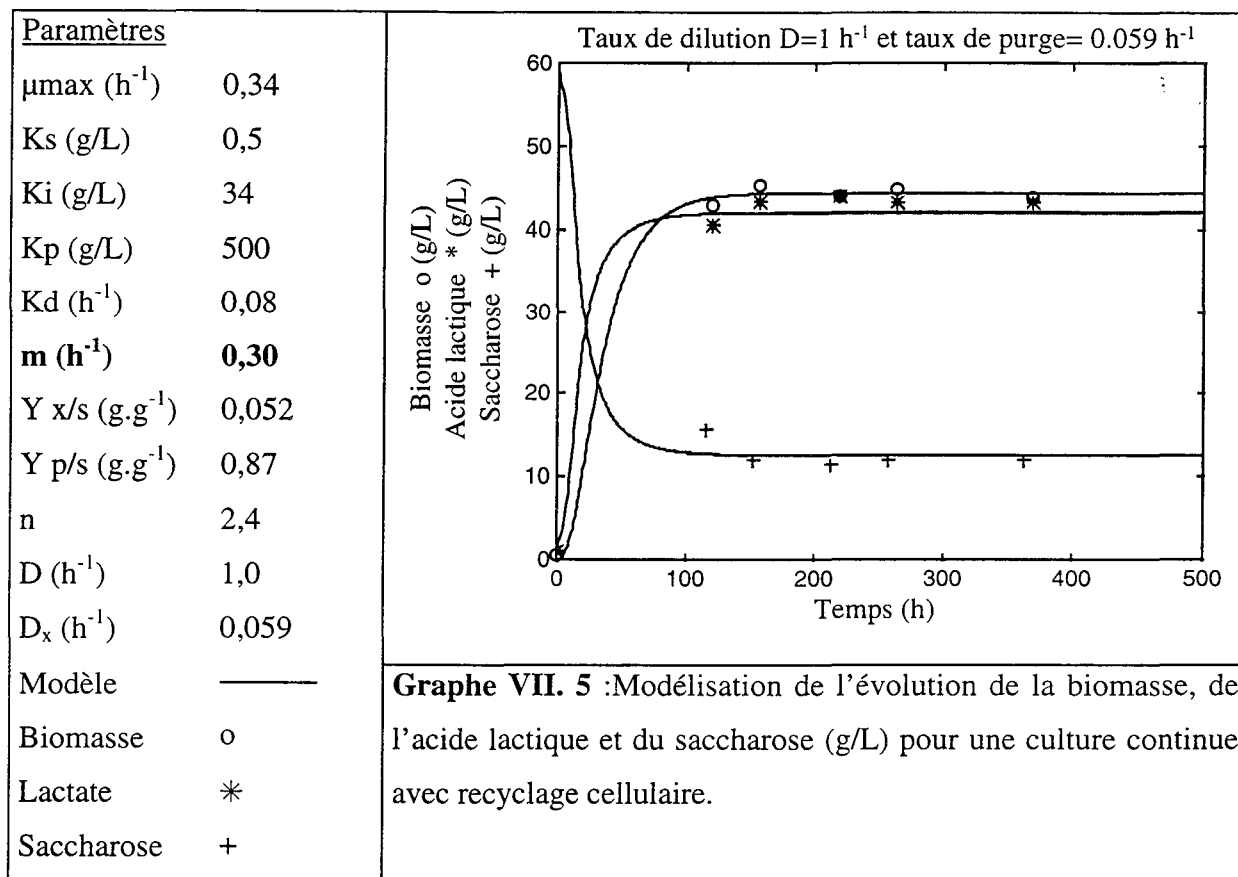
La première partie de la modélisation (50 premières heures) n'est pas comparable avec la réalité, car les fermentations continues débutent toujours par une phase discontinue. Par contre les valeurs à l'état stationnaire (à partir de la 50ème heure) sont bien simulées, pour cette fermentation. Le choix de la fermentation à modéliser a été délicat, car les données recueillies à l'état stationnaire ont été finalement peu nombreuses à cause des impulsions et des échelons; puisque ce mode de culture a surtout été un outil d'expérimentation.

2.5. - Essai de modélisation d'un culture continue avec recyclage cellulaire

2.5.1. - Choix de la fermentation à modéliser

Contrairement à la modélisation en continu, le choix des valeurs expérimentales pour confronter le modèle de la fermentation en recyclage cellulaire fut aisé. La dernière expérimentation R12 en conditions optimales est parfaitement adaptée à cette comparaison. Les valeurs expérimentales ont été prises lors de la phase de production d'acide lactique (phase 7) à l'état stationnaire.

2.5.2. - Résultat de la modélisation



2.5.3. - Conclusion de la modélisation en recyclage cellulaire

La modélisation est très satisfaisante, à condition de changer un des paramètres du modèle : le coefficient de maintenance. Cette constante passe de 0,06 à 0,3 h^{-1} .

Ceci peut s'expliquer par les conditions différentes rencontrées par les cellules dans ce mode de culture. En effet l'augmentation de la densité cellulaire engendre une augmentation de la viscosité et une baisse de la disponibilité des sucres. Le substrat est donc plus difficilement accessible aux bactéries.

➡ Nous avons choisi de représenter cette contrainte par un degré de maintenance plus élevé, même si cela n'a pas de réalité physiologique. Les autres paramètres sont identiques aux paramètres de la modélisation des cultures discontinues et continues simples.

Enfin seule la partie stationnaire du modèle (à partir de 200 heures) est exploitable, car pratiquement, la fermentation commence par une phase discontinue alors que le modèle calcule les valeurs directement en mode continu avec recyclage cellulaire.

2.6. - Conclusion sur la modélisation des fermentations

Partant des connaissances acquises pendant la partie expérimentale de ce travail, un modèle adapté de la loi de Monod a permis de modéliser correctement l'évolution des concentrations en biomasse, en acide lactique et en saccharose des 3 modes de culture. Une seule et même équation a été adaptée aux fermentations en mode discontinu, continu et continu avec recyclage cellulaire, à partir de leurs bilans respectifs. Les paramètres cinétiques déterminés pour ce modèle sont très proches des valeurs obtenues expérimentalement. De plus, la quasi totalité de ces valeurs restent identiques dans les 3 modes de fermentation, ce qui confirme la crédibilité de ce modèle. Cependant, le modèle développé nécessiterait une série de validations complémentaires sur les trois modes de culture.

L'augmentation de la constante de maintenance n'a peut-être pas de réalité physiologique en recyclage cellulaire, mais elle permet une modélisation correcte de ce réacteur. **l'hypothèse** de cette évolution serait l'augmentation de la densité cellulaire (45 g/L au lieu de 3 g/L en discontinu) qui entraverait les transferts de substrat, donc sa disponibilité. Chaque cellule auraient, peut-être, besoin de plus de substrat pour son maintien.

3. MODELISATION DE LA FILTRATION

Les modèles développés dans ce paragraphe ne sont pas des modèles de connaissances, même s'il font intervenir les valeurs des paramètres directement dans le calcul d'une réponse. Ce sont des modèles de type polynomial donnés par l'interprétation du plan d'expérience réalisé dans le **Chapitre V**. Ces modèles permettent de donner les valeurs d'une réponse Y à partir de l'effet de chaque paramètre influent, de l'effet quadratique et de l'effet dû aux interactions des différents paramètres. L'équation générale de ce type de polynôme décrit par Montgomery (1996) s'écrit :

$$Y = \beta k_0 \sum_{i=1}^4 \beta \cdot k_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^4 \beta k_{ii} \cdot X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^4 \beta k_{ij} \cdot X_i X_j$$

Y est la réponse; X_i et X_j sont les variables indépendantes (paramètres); βk_0 , βk_i , βk_{ii} et βk_{ij} sont des constantes.

Les valeurs données par ce type de modèle ne sont valables que dans le domaine d'expérimentation.

3.1. - Essais de modélisation

Pour chaque réponse étudiée lors du plan d'expérience, correspond un modèle qui donne les valeurs de ces réponses à partir de tous les paramètres influant sur ces réponses.

Par exemple, lors de l'étude de l'évolution du flux de perméat sur la membrane 0,2 μm , 7 canaux, 4 paramètres influençaient de façon significative la valeur du flux à l'état stationnaire (Q_{ps}) et le pourcentage de colmatage (colm,%) de la membrane :

- La vitesse de recyclage ($Q_r, \text{L/h}$)
- La pression d'entrée de la membrane (P_1, bar)
- La concentration en biomasse ($X, \text{g/L}$)
- Le temps entre deux « back-flush » (decolm, mn)

3.1.1. - Modélisation de Q_{ps}

L'analyse statistique permet de déterminer que 10 effets sont significativement différents et supérieurs à l'erreur expérimentale estimée. Les dix résidus (appelés valeur P) sont inférieurs à 0,05, ce qui signifie que leur effet respectif sont différents de zéro dans un intervalle de confiance de 95%. La valeur R^2 statistique du modèle indique que le modèle explique 98,7% de la variabilité de la réponse, ce qui est excellent. La valeur de R^2 ajustée (sorte de R^2 moyen

pour chaque paramètre) est significative si elle est supérieure à 70%, or, elle est de 97% pour le modèle. Enfin l'erreur standard de l'expérimentation a été déterminée à 1,1.

Les valeurs des constantes sont données par l'interprétation du plan. L'équation du modèle donne :

$$Q_{ps} = 4,62 + (0,006347 * Q_r) + (15,6 * P_1) - (2,64 * X) + (0,777 * \text{decolm}) + (0,004510 * Q_r * P_1) + (0,00109 * Q_r * \text{decolm}) - (0,943 * P_1 * X) - (0,729 * P_1 * \text{decolm}) + (0,128 * X^2) + (0,08 * X * \text{decolm})$$

3.1.2. - Modélisation du colmatage (colm)

Le modèle donné par le programme statistique permet de dire que les 14 effets sont significatifs. La valeur de R^2 statistique est de 99,7% expliquant ainsi 99,7% de la variabilité de la réponse. De même la valeur de R^2 ajustée est de 98,7%. L'erreur standard est de 2,5.

L'équation du modèle proposé est :

$$\text{colm} = 36,44 + (0,06 * Q_r) - (42,68 * P_1) + (14,4 * X) - (15,1 * \text{decolm}) - (0,00004 * Q_r^2) + (0,006 * Q_r * P_1) - (0,00035 * Q_r * X) + (0,0023 * Q_r * \text{decolm}) + (2,53 * P_1^2) - (1,32 * P_1 * X) + (11,2 * P_1 * X) - (0,587 * X^2) - (0,06 * X * \text{decolm}) + (0,33 * \text{decolm}^2).$$

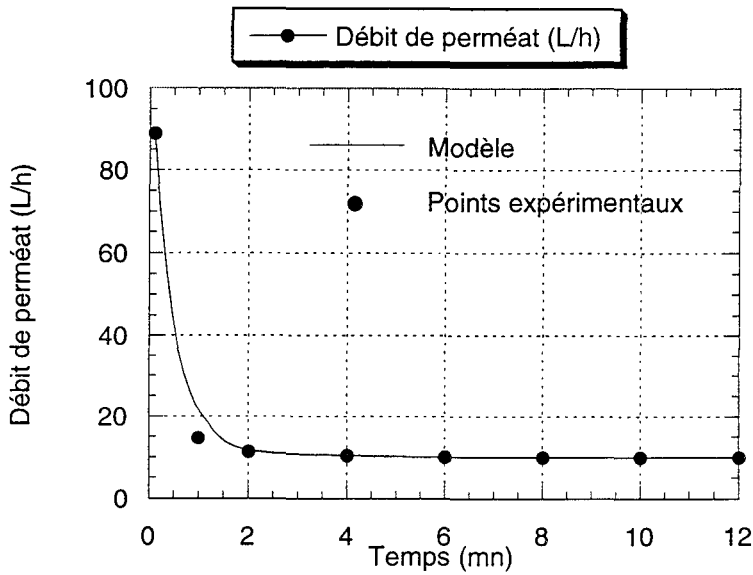
3.1.3. - Modélisation de l'évolution du flux ou du débit de perméat

Par la même méthode de modélisation, il est possible de déterminer un modèle pour chaque réponse, soit :

- Le débit obtenu à stabilisation ou au bout d'une durée fixe (Q_{ps} en L/h)
- Le colmatage (%) = $(\text{Débit initial} - \text{Débit final} / \text{Débit initial}) \times 100$
- Le temps pour arriver à stabilisation du débit (t_s en mn)
- La pente initiale de diminution du débit (P_i en L/h²)
- Le temps nécessaire à la perte de la moitié du débit ($t_{1/2}$ en mn)

La combinaison des cinq modèles obtenus va nous permettre de tracer l'évolution du flux théorique de perméat dans des conditions prédéterminées et de les comparer avec les valeurs expérimentales.

3.1.3.1. - Résultat pour la membrane 0,2 µm, 7 canaux

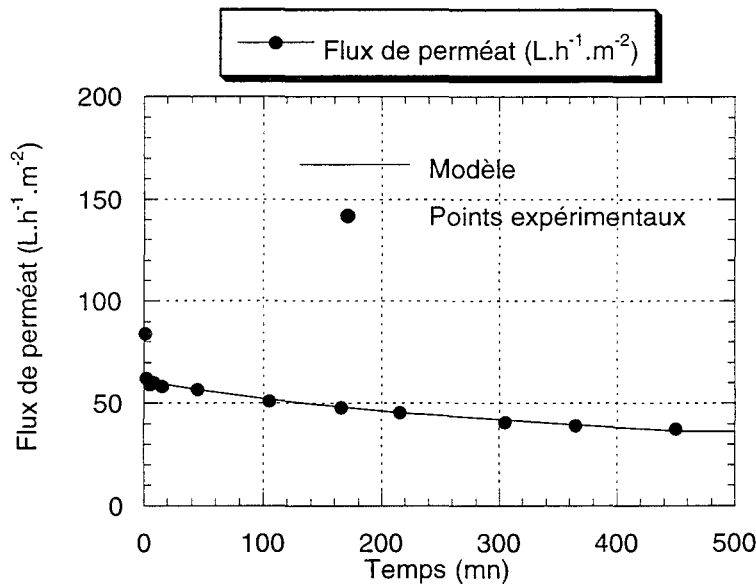


Paramètre
 $Q_r = 1596 \text{ L/h}$
 $P_1 = 1,28 \text{ bar}$
 $X = 12,8 \text{ g/L}$
 $\text{decolm} = 6,6 \text{ mn}$

Graph VII. 6 : Modélisation du débit de perméat pour la membrane 0,2 µm.

Le résultat de la modélisation (**Graph VII. 6**) traduit bien l'évolution du flux de perméat en fonction du temps, surtout pour la partie à l'état « pseudo-stationnaire ».

3.1.3.2. - Résultat pour la membrane à 0,8 µm, 7 canaux.



Paramètre
 $Q_r = 1150 \text{ L/h}$
 $P_1 = 0,8 \text{ bar}$
 $X = 15 \text{ g/L}$
 $\text{decolm} = 2 \text{ mn}$

Graph VII. 7 : Modélisation du flux de perméat pour la membrane 0,8 µm.

La première partie de la courbe ($x < 4 \text{ mn}$) n'a pu être tracée car le $t_{1/2}$ n'a pas pu donner de modèle de l'évolution de ce paramètre (**Graph VII. 7**). Néanmoins la chute du flux de

perméat est très bien simulée dans le reste de la représentation grâce notamment à la modélisation de la pente initiale et la valeur du flux à 24 h.

3.2. Conclusion sur la modélisation de la filtration

Le calcul de l'évolution du flux de perméat est long, car il fait intervenir 5 réponses et 5 paramètres, soit en moyenne 5 équations avec jusqu'à 15 effets (coefficients) par équation.

Néanmoins, la modélisation est très efficace et représente bien la réalité dans le domaine d'expérimentation, mais n'a malheureusement aucune valeur en dehors du domaine. Les deux courbes tracées confirment bien que la membrane 0,2 μm atteint un état pseudo-stationnaire, alors que le flux de la membrane 0,8 μm continue de diminuer, probablement à cause d'un colmatage irréversible.

4. CONCLUSIONS SUR LA MODELISATION

Les essais de modélisation de la partie fermentation sont très encourageants. Le modèle adapté de la loi de Monod est applicable dans les trois modes de cultures sans changer la majorité des paramètres cinétiques. De plus, les paramètres du modèle ne sont pas significativement différents des valeurs des paramètres déterminées expérimentalement. Ces deux raisons majeures renforcent la crédibilité du modèle dans le domaine d'expérimentation choisi. Cependant, une série de validations supplémentaire serait nécessaire pour tester ce modèle et conclure sur son efficacité dans d'autres parties du domaine expérimental. Ensuite, le modèle pourra être utilisé comme un outil de simulation pour réaliser des expériences dans une partie du domaine non testée.

Les essais de modélisation de la partie filtration sont également très intéressants. Cependant, ce type de modèle est rapidement limité si les conditions se trouvent en dehors du domaine d'expérimentation. Le modèle permet d'avoir la valeur d'une réponse en fonction de tous les paramètres influents, de leur effet quadratique respectif et de l'effet des interactions entre les paramètres. Ceci permet de déterminer les effets de certains paramètres sur une réponse et de les expliquer à l'aide de connaissances et d'hypothèses déjà émises dans la littérature.

Dans le domaine expérimental étudié, les modèles statistiques ont permis d'expliquer la plupart des variabilités observées sur chaque réponse. Ils ont permis également de choisir la membrane de faible porosité pour les expérimentations, car les mécanismes de colmatage irréversible y étaient faibles, autorisant ainsi, un état pseudo-stationnaire. Par contre, la diminution du flux de perméat sur toute la durée de l'expérimentation est également bien décrit par le modèle pour la membrane 0,8 μm .

~ CONCLUSIONS
PERSPECTIVES ~

CONCLUSION

➔ Le but de ce travail était de mettre au point un procédé innovant et performant de production d'acide L(+) lactique à partir d'une souche thermophile, atypique, et dégradant préférentiellement le saccharose.

- Les différentes étapes ont consisté à étudier séparément la partie fermentation de la partie séparation des cellules. Après avoir caractérisé et analysé le comportement de la souche dans différentes conditions de fermentation, une étude cinétique a été réalisée. Elle avait pour objet de décrypter les bases du métabolisme et d'améliorer les performances de production par le biais de l'amélioration de la composition des milieux de culture. Ces études ont permis la conception d'un réacteur pilote à haute densité cellulaire afin d'intensifier les performances de production du lactate.

Les paramètres de microfiltration du procédé ont été optimisés afin d'améliorer les productivités et la stabilité de fonctionnement du pilote.

Le couplage des études cinétiques des fermentations et de la microfiltration a permis la mise en oeuvre de la souche modèle en réacteur à haute densité cellulaire dans des conditions optimales de production.

L'analyse des fermentations et des paramètres de microfiltration ont permis le développement de modèles de connaissances ou polynomiaux qui ont tous été validés expérimentalement.

➔ Les contributions principales apportées par cette étude sont résumées ici. Nous tenterons d'apporter des réponses aux questions posées dans l'introduction de ce travail de recherche.

➔ La première partie du travail a essentiellement été basée sur l'acquisition de connaissances morphologiques, physiologiques et cinétiques du micro-organisme. Cette souche modèle a été caractérisée comme une souche atypique de *Bacillus coagulans* thermophile, hétérofermentaire facultative et aérotolérante. Les performances de production d'acide lactique sont relativement modestes comparativement aux souches de lactobacilles

décrites dans la littérature. Néanmoins, quelques caractères spécifiques ont pu être mis en évidence et décrits lors de ce travail, tels que :

- le caractère diauxique,
- la régulation de la voie d'assimilation du fructose,
- l'inhibition par une forte concentration en saccharose,
- l'inhibition par l'acide lactique
- l'amélioration de la croissance par un transfert métabolique vers l'hétérofermentation dans des conditions de présence d'oxygène.

Les techniques d'expérimentations ont été aussi variées que complémentaires. Des cultures discontinues, souvent dans le cadre de plans d'expériences, ont été mises en oeuvre et complétées par des cultures continues suivant les techniques des impulsions ou des échelons.

Les performances de *Bacillus coagulans* ont été améliorées par le biais de l'étude des effets de la composition des milieux de culture et, notamment, des sources azotées. Cependant, nous avons pu constater que cette souche était beaucoup moins exigeante nutritionnellement que la plupart des bactéries lactiques.

La compilation de ces différentes études a permis de classer et de définir les éléments nutritifs requis pour une amélioration de la croissance et de la production d'acide en vue des fermentations en recyclage cellulaire.

➔ La deuxième partie de l'étude a été consacrée à l'optimisation du système de microfiltration, permettant de séparer les cellules du milieu de culture. Un plan d'expériences non-linéaire a été construit et a permis d'évaluer l'influence des paramètres de filtration sur l'évolution du flux de perméat.

Il a été montré que le fait de travailler à plus de 50°C en fermentation était un avantage important pour augmenter le flux de perméat de la membrane.

L'importance de la composition du milieu de culture sur la filtration a été clairement démontrée; la membrane de porosité 0,8 µm, qui permettait d'atteindre les flux les plus élevés avec de l'eau, est en fait la membrane qui offre la plus mauvaise perméabilité avec le milieu de culture. Les mécanismes de filtration décrits dans la littérature ont été facilement adaptés aux expérimentations réalisées.

Finalement, c'est la membrane de porosité 0,2 µm qui a été choisie pour ses qualités de stabilité et de flux de perméat. Les paramètres de microfiltration ont été optimisés pour cette membrane dans l'optique d'une fermentation avec recyclage cellulaire.

➔ Une troisième partie a été consacrée à la mise en oeuvre du pilote de fermentation avec recyclage cellulaire, à partir des connaissances acquises précédemment. Le protocole de fermentation et les paramètres dépendant directement de ce type de réacteur ont été étudiés afin d'optimiser les performances de la fermentation. Un nouveau plan d'expériences factoriel a permis d'optimiser et de décrire les effets du taux de dilution et du taux de purge à partir de fermentations réalisées à haute densité cellulaire dans des conditions prédéterminées.

En plus des critères de productivité et de rendements, un critère de stabilité et de durée du procédé a été introduit pour optimiser conjointement les performances du procédé. Le découplage de la production de biomasse et de production d'acide lactique, par l'intermédiaire de l'alimentation séquentielle de milieux spécifiques, a permis d'obtenir des performances de production jamais atteintes pour ce type de souche: la productivité a été multipliée par un facteur 40 par rapport à la meilleure fermentation discontinue sur optimal.

Cependant, la réalisation de cette fermentation a montré qu'une forte concentration en extraits azotés était préjudiciable à la filtration. Il serait judicieux de changer de membrane au moment du passage en phase de production d'acide lactique, avec un milieu appauvri en extraits azotés.

Ce faisant, la stabilité et la durée du procédé sont importantes au regard du même type de procédé décrit dans la littérature. Deux autres facteurs expliquent également, ces bons résultats. Premièrement, la vanne de contre pression a été utilisée non seulement lors de l'étude scientifique pour découpler les effets de la vitesse de recyclage et les effets de la pression; mais, également pour contrôler finement la pression transmembranaire et la stabilité du flux de perméat. Deuxièmement, le taux de purge a joué un double rôle d'une importance primordiale pour la stabilité et les gains de performances. Il a permis d'éliminer les cellules en mauvais état (potentiellement colmatante en cas de lyse) et de diminuer le phénomène de vieillissement des cellules (perte de productivité spécifique).

Lors de ces études, dans les conditions optimales, il a été démontré que ce n'était plus le système de filtration qui était l'étape limitante du procédé mais bien les performances de la souche bactérienne utilisée. En effet, les concentrations en sucre ajouté et en acide lactique produit sont trop diluées par rapport à ce que d'autres souches de bactéries lactiques produisent. Enfin, le rendement de bioconversion global est en deçà des minimums acceptables pour une production industrielle. Ces raisons expliquent la non-rentabilité du procédé montrée par l'étude technico-économique, même si le prix de revient de l'acide lactique estimé par le procédé est acceptable.

↳ Lors d'une dernière partie, la modélisation des fermentations et de la filtration du milieu de culture a été réalisée grâce à, l'acquisition des paramètres de fermentations et, à l'interprétation des modèles donnés par les plans d'expériences. Le modèle de connaissances des fermentations, développé à partir de la loi de Monod, simule correctement les trois modes de cultures en ne changeant qu'un paramètre sur neuf. La combinaison des modèles polynomiaux donnés par l'interprétation des plans d'expériences ont également permis de simuler correctement et de valider l'évolution du flux de perméat dans des conditions données pour deux porosités de membrane différentes.

PERSPECTIVES

L'ensemble de ces résultats permet d'envisager une amélioration notable de nombreux procédés industriels produisant des biomolécules, qui sont encore très souvent réalisés en mode discontinu. Le procédé développé est particulièrement bien adapté à la production d'acide lactique en grande quantité, il pourra être utilisé pour faire face à la demande croissante en lactate pour le nouveau marché des polymères biodégradables. Cependant, certains points restent à comprendre et à optimiser en vue de cette perspective.

↳ La composition des milieux de culture devrait être optimisée et standardisée par l'intermédiaire de plans d'expériences ou de plans de mélanges. Il serait également important d'identifier les facteurs de croissance de *Bacillus coagulans* en caractérisant, et en testant séparément les molécules présentes dans les extraits azotés. Un travail important reste donc à faire sur les effets des peptides et des acides aminés présents dans le milieu de culture. Enfin, il faudrait évaluer les coûts de préparation des extraits cellulaires en vue d'une substitution partielle de l'extrait de levure.

↳ La dernière fermentation a montré une augmentation importante de la densité cellulaire; les conditions de microfiltration se sont trouvées ainsi en dehors du domaine

expérimental étudié. De nouvelles expérimentations de filtration devraient être mises en oeuvre pour étudier les effets de cette nouvelle caractéristique du fluide. L'effet de la concentration en biomasse et des extraits azotés devrait être étudié en parallèle, par le biais d'un nouveau plan d'expériences.

➡ L'utilisation d'une nouvelle souche de type industriel est envisagée pour rendre le procédé rentable. Cette souche devra, en plus du caractère thermophile (peu de risques de contaminations) et de faibles exigences nutritionnelles, avoir une capacité de production élevée et une forte résistance à l'acide lactique. Enfin la concentration en sucre résiduel doit être inférieure à 1 g/L.

➡ Une étude technico-économique beaucoup plus précise pourrait être entreprise sur cette souche en intégrant les dernières données du marché de l'acide lactique et des substrats. Les coûts de construction et de fonctionnement d'une installation à l'échelle industrielle doivent également être évalués.

➡ Après quelques études supplémentaires sur le réacteur pilote, la mise en oeuvre d'un procédé à recyclage cellulaire devrait être envisagée, sur une installation de taille plus importante, pour comparer les performances obtenues et déterminer les problèmes spécifiques au « scale-up ».

➡ Le modèle proposé pour les fermentations nécessiterait d'être validé dans d'autres parties du domaine d'expérimentation. Il pourrait, par la suite, être utilisé comme outil de simulation.

➡ Enfin il serait intéressant de modéliser les phénomènes intervenant dans la filtration d'un milieu de culture, par le biais de modèles structurés d'adsorption, ou d'érosion.

~ REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES ~

Références bibliographiques

- Aeschlimann, A. et U.V. Stockar (1990), The effect of yeast extract supplementation on the production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus*., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, pp 398-402
- Aeschlimann, A. et U.V. Stockar (1991), Continuous production of lactic acid from whey permeate by *Lactobacillus helveticus* in a cell-recycle reactor., *Enzyme and Microbial Technology*, **13**, pp 811-816
- Agrawal, C.M., J. Best, J.D. Heckman et B.D. Boyan (1995), Protein release kinetics of a biodegradable implant for fracture non-unions, *Biomaterials*, **16**, 16, pp 1255-1260
- Amrane, A. et Y. Prigent (1993), Influence of media composition on lactic acid production rate from whey by *Lactobacillus helveticus*., *Biotechnology Letters*, **15**, 3, pp 239-244
- Amrane, A. et Y. Prigent (1994a), Lactic Acid Production from Lactose in Batch Culture - Analysis of the Data with the Help of a Mathematical Model - Relevance for Nitrogen Source and Preculture Assessment, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **40**, 5, pp 644-649
- Amrane, A. et Y. Prigent (1994b), Mathematical Model for Lactic Acid Production from Lactose in Batch Culture - Model Development and Simulation, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **60**, 3, pp 241-246
- Amrane, A. et Y. Prigent (1996), A novel concept of bioreactor : Specilized function two-stage continuous reactor, and its application to lactose conversion into lactic acid., *Journal of Biotechnology*, **45**, pp 195-203
- Amrane, A. et Y. Prigent (1997), Growth and lactic acid production coupling for *Lactobacillus helveticus* cultivated on supplemented whey : influence of peptidic nitrogen deficiency, *Journal of Biotechnology*, **55**, pp 1-8
- Andreopoulos, A.G. et T. Theophanides (1994), Degradable Plastics - A Smart Approach to Various Applications, *Journal of Elastomers and Plastics*, **26**, 4, pp 308-326
- Bahner, B. (1994), *Chemical Marketing Reporter*, March 21 1994, pp 14
- Bailey, R.B., D.K. Joshi, S.L. Michaels et R.A. Wisdom (1987), Production of lactic acid by continuous fermentation using an inexpensive raw material and a simplified method of lactic acid purification., Engenics Inc., *United States Patent*, 14 pages

- Bailey, R.B., D.K. Joshi, S.L. Michaels et R.A. Wisdom (1988), Production of lactic acid by continuous fermentation using an inexpensive raw material and a simplified method of lactic acid purification., Neurex Corp., *United States Patent*, 15 pages
- Baniel, A., et al. (1994), Lactic acid production, separation and/or recovery process., /WO-95,24496/, CARGILL inc., *United States Patent*, , 26 pages
- Beal, C. et G. Corrieu (1994), Viability and Acidification Activity of Pure and Mixed Starters of *Streptococcus Salivarius Ssp Thermophilus* 404 and *Lactobacillus Delbrueckii Ssp Bulgaricus* 398 at the Different Steps of Their Production, *Food Science and Technology - Lebensmittel - Wissenschaft & Technologie*, **27**, 1, pp 86-92
- Beal, C., P. Louvet et G. Corrieu (1989), Influence of controlled pH and temperature on the growth and acidification of pure cultures of *Streptococcus thermophilus* 404 et *Lactobacillus bulgaricus* 398., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**, pp 148-154
- Belfort, G. (1988), Membranes and bioreactors : A technical Challenge in biotechnology., *Biotechnology and Bioengineering*, **33**, pp 1047-1066
- Benninga, H. (1990), A history of lactic acid making, Ed. Dodrecht, et al., pp 43-109, 157-170, 398-457
- Benthin, S. et J. Villadsen (1995), Production of optically pure D-lactate by *Lactobacillus bulgaricus* and purification by crystallisation and liquid/liquid extraction., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **42**, pp 826-829
- Bibal, B., Y. Vayssier, G. Goma et A. Pareilleux (1990), High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor., *Biotechnology and Bioengineering*, **37**, pp 746-754
- Biketov, S.F., et al. (1982), F1-like ATPase from anaerobic bacterium *Lactobacillus casei* contains six similar subunits., *Journal of Biochemistry*, **129**, pp 241-250
- Boyaval, P., P. Bhugalo-Vial, F. Duffes, M. de Vaal et D. Marrion (1996a), Continuous bacteriocin production with high cell density bioreactors., *Med.Fac.Landbouww.univ.Gent*, **61**, 4a, pp 1349-1356
- Boyaval, P., C. Corre et S. Terre (1987), Continuous lactic acid fermentation with concentrated product recovery by ultrafiltration and electro dialysis., *Biotechnology Techniques*, **9**, 3, pp 207-212
- Boyaval, P., C. Corre et S. Terre (1988), Production d'acide lactique à partir de perméat de lactosérum par fermentation continue en réacteur à membrane., *Le Lait*, **68**, 1, pp 65-84
- Boyaval, P. et J. Goulet (1988), Optimal condition for production of lactic acid from cheese whey by Ca-alginate entrapped *Lactobacillus helveticus*., *Enzyme and Microbial Technology*, **10**, 725-728, pp

- Boyaval, P., Lavenant C., Gésan G. et D. G. (1996b), Transient and stationary operating conditions on performance of lactic acid bacteria crossflow microfiltration., *Biotechnology and Bioengineering*, **49**, pp 78-86
- Cachon, R. et C. Divies (1993), Modeling of growth and lactate fermentation by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis* in batch culture., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **40**, pp 28-33
- Champagne, C.P., F. Girard et N. Morin (1988), Bacteriophage development in an immobilized lactic acid bacteria system, *Biotechnology Letters*, **10**, 7, pp 463-468
- Cheryan, M. et M.A. Mehaia (1987), Continuous fermentations with membrane bioreactors. Chap 28., *Food engineering and process applications*, Ed. Le Maguer, M., et al., **2**, pp 335-344
- Chiarini, L., L. Mara et S. Tabacchioni (1991), Influence of growth supplements on lactic acid production in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, pp 461-464
- Conn, R.E., et al. (1995), Safety assessment of polylactide (PLA) for use as a food-contact polymer., pp 273-283
- Crespo, J.P.S.G., et al. (1992), Tangential flow filtration for continuous cell recycle culture of acidogenic bacteria., *Chemical Engineering Science*, **47**, 1, pp 205-214
- Datta, R., S.-H. Tsai, P. Bonsignore, S.-H. Moon et J.R. Franck (1995), Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivative, *F.E.M.S Microbiology reviews*, **16**, pp 221-231
- Daridon, B. (1996), Analyse du marché de l'acide lactique biochimique et des matières premières de fermentation., PRABIL, Rapport.
- deBoer J.P., et al. (1993), PH and glucose profiles in aggregates of *Bacillus laevolacticus*, *Applied and Environmental Microbiology*, **59**, 8, pp 2474-2478
- deBoer J.P., Teixeira de Mattos M.J. et N. O.M. (1990), D(-) Lactic acid production by suspended and aggregated continuous cultures of *Bacillus laevolacticus*., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, pp 149-153
- Demirci, A. et A.L. Pometto III (1995), Repeated-batch fermentation in biofilm reactors with plastic-composite supports for lactic acid production., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, pp 585-589
- Desmazeaud, M. (1983), L'état des connaissances en matière de nutrition sur les bactéries lactiques., *Le Lait*, **63**, pp 286-316
- Desmazeaud, M.J. et H. de Roissart (1994), Métabolisme général des bactéries lactiques, *Bactéries lactiques*, Ed. de Roissart, H., et al., Lorica - Uriage, **1**, pp 169-206

- Domb, A.J., L. Turovsky et R. Nudelman (1994), Chemical interactions between drugs containing reactive amines with hydrolyzable insoluble biopolymers in aqueous solutions, *Pharmaceutical Research*, **11**, 6, pp 865-868
- EUREKA. (1997), Les fibres vertes, *EUREKA Information*, 36/37, pp 2-4
- Gätje, G. et G. Gottschalk (1991), Limitation of growth and lactic acid production in batch and continuous cultures of *Lactobacillus helveticus*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, pp 446-449
- Giraud, E., B. Lelong et M. Raimbault (1991), Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, pp 96-99
- Glassner, D. et R. Datta (1989), Process for production and purification of lactic acid., /EP-0,393,818/ Michigan Biotechnology Institute, *European Patent*, 11 pages
- Goldberg, I. et Z. Er-EL (1981), The chemostat - An efficient technique for medium optimization, *Process Biochemistry*, **11**, pp 2-8
- Goupy, R. (1990), La méthode des plans d'expériences - Optimisation du choix des essais & de l'interprétation des résultats, Ed. Dunod, 291 pp
- Groboillot, A.F., C.P. Champagne, G.D. Darling, D. Poncelet et R.J. Newfield (1993), Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*, *Biotechnology and Bioengineering*, **42**, pp 1157-1163
- Groot, W.J., R.G.J.M.v.d. Lans et K.C.A.M. Luyben (1993), Process engineering for a membrane recycle reactor., *Bioprocess Engineering*, **8**, pp 235-246
- Guoqiang, D., R. Kaul et B. Mattiasson (1991), Evaluation of alginate-immobilized *Lactobacillus casei* for lactate production., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **36**, pp 309-314
- Hakola, J.S. (1997), Industrial business opportunities for poly(lactic acid) biopolymers as non-food application of agricultural production in Europe, *Renewable Bioproducts- Industrial outlets and research for the 21st century, 1997*, **1997**, pp 8 pages
- Hamamci, H. et D.D.Y. Ryu (1994), Production of L(+)-lactic acid using immobilized *Rhizopus oryzae*. Reactor performance based on kinetic model and simulation., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **44**, pp 125-133
- Harrison, S.T.L., J.S. Dennis et H.A. Chase (1991), Combined chemical and mechanical processes for the disruption of bacteria, *Bioseparation*, **2**, pp 95-105
- Hayakawa, K., H. Sansawa, T. Nagamune et I. Endo (1990), High density culture of *Lactobacillus casei* by cross-flow culture method based on kinetic properties of the microorganism, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, pp 404-408

- Heriban, V., V. Sitkey, E. Sturdik et P. Matus (1993a), Nutrition and broth alterations in the lactic acid fermentation., *Acta. Biotechnol.*, **35**, 3, pp 283-288
- Heriban, V., E. Sturdik, L. Zalibera et P. Matus (1993b), Process and metabolic characteristics of bacillus coagulans as a lactic acid producer., *Letters in Applied Microbiology*, **16**, pp 243-246
- Heurtebise, L., P. Roudaut et J. O'neil (1992), Cuve mixte pour germination et fermentation lactique., /F-2,695,649/, *INPI*, 13 pages
- Hill, E.A. et K.D.J. Carter (1993), Using ethyl lactate for precision cleaning of metal surfaces, *Microcontamination*, November 1993, pp 27-31
- Hjorleifsdottir, S., O. Holst et B. Mattiasson (1991), Effect on product formation in *Lactococcus lactis* 65,1 in continuous culture with complete cell recycling., *Bioprocess Engineering*, **6**, pp 29-34
- Hjorleifsdottir, S., S. Seevaratnam, O. Holst et B. Mattiasson (1990), Effects of complete cell recycling on product formation by *Lactobacillus casei* subsp. rhamnosus in continuous culture., *Current Microbiology*, **20**, pp 287-292
- Holst, O., L. Hansson, A.C. Berg et B. Mattiasson (1985), Continuous culture with complete cell recycle to obtain high cell densities in product inhibited cultures : Cultivation of *Streptococcus Lactis* for production of superoxyde dismutase, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **23**, pp 10-14
- Holten, C.H., A. Müller et D. Reh binder (1971), Lactic Acid - Properties and chemistry of lactic acid and derivatives, Ed. VCH
- Hujanen, M. et Y.Y. Linko (1996), Effect of temperature and various nitrogen sources on L(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **45**, pp 307-313
- Ishisaki, A. et P. Vonkaveesuk (1996), Optimization of substrate feed for continuous production of lactic acid by *Lactococcus lactis* IO-1., *Biotechnology Letters*, **18**, 10, pp 1113-1118
- Ishizaki, A., T. Ohta et G. Kobayashi (1991), Batch culture growth model and computer simulation., *BFE*, **8**, 4, pp 186-195
- Ishizaki, A., T. Ohta et G. Kobayashi (1992), Computer simulation for L-lactate batch process employing *Lactococcus lactis* IO-1., *Journal of Biotechnology*, **24**, pp 85-107
- Juillard, V., C. Foucaud, M. Desmazeaud et J. Richard (1995), Utilisation des sources d'azote du lait par *Lactococcus Lactis*, *C.B.L. : 7ème colloque du club des Bactéries Lactiques*, Octobre 1995, PARIS
- Kandler, O. et N. Weiss (1986), Endospore-forming gram-positive rods and cocci, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 9th ed.*, Ed. Sneath P.H.A., M.N.S., Sharpe M.E. and J.G.Holt, Williams and Wilkins, Baltimore, **2**, pp 1208-1234

- Kanvar, S.S., B.S. Chadha, H.K. Tewari et V.K. Sharma (1995), Continuous production of lactic acid from molasses by free and immobilized sporolactobacillus cellulosolvens., *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **11**, pp 687-688
- Kaufman, E.N., S.P. Cooper et B.H. Davison (1994), Screening of Resins for Use in a Biparticle Fluidized-Bed Bioreactor for the Continuous Fermentation and Separation of Lactic Acid, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **45-6**, pp 545-554
- Keller, A.K. et P. Gerhardt (1975), Continuous lactic acid fermentation of whey to produce a ruminant feed supplement high in crude protein., *Biotechnology and Bioengineering*, **17**, pp 997-1018
- Kim, B.S. et H.N. Chang (1991), Effects of periodic backflushing on ultrafiltration performance., *Bioseparation*, **2**, pp 23-29
- Kirkovits, E. et H. Edlauer (1990), Micro-organismes de l'espèce *Bacillus coagulans* et procédé utilisant ce micro-organisme pour produire de l'acide lactique L(+) optiquement pur., /F-2,644,178/, Jungbunzlauer Aktiengesellschaft AT, *INPI, France*,
- Kosakai, Y., Y.S. Park et M. Okabe (1997), Enhancement of L(+)-lactic acid production using mycelia flocs of *Rhizopus oryzae*, *Biotechnology and Bioengineering*, **55**, 3, pp 461-470
- Krischke, W., M. Schröder et W. Trösch (1991), Continuous production of L-lactic acid from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**, pp 573-578
- Kuhn, H., U. Friederich et A.F. A. (1979), Defined minimal medium for a thermophilic *Bacillus* sp developed by chemostat pulse and shift technique., *European Journal of Applied Microbiology*, **6**, pp 341-349
- Kula, M.-R. (1987), Purification of proteins and the disruption of microbial cells, *Biotechnology Progress*, **3**, 1, pp 31-42
- Kulozik, U., B. Hammelehle, J. Pfeifer et H.G. Kessler (1992), High reaction rate continuous bioconversion process in a tubular reactor with narrow residence time distributions for production of lactic acid, *Journal of biotechnology*, **22**, pp 107-116
- Kumar Dutta, S., A. Mukherjee et P. Chakraborty (1996), Effect of product inhibition on lactic acid fermentation: simulation and modelling, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**, pp 410-413
- Lambooy, J.P. (1983), Riboflavins analogs utilized for metabolism by *Lactobacillus casei* mutant., *International Journal of Biochemistry*, **16**, 2, pp 231-234
- Ledesma, O.V., et al. (1976), A synthetic medium for comparative nutritional studies of lactobacilli., *Journal of Applied Bacteriology*, **42**, pp 123-133
- Lipinski, E.S. et R.G. Sinclair (1986), Is lactic acid a commodity chemical?, *Chemical Engineering Progress*, **82**, 8, pp 26-32

- Litchfield, J.H. (1996), Microbiological production of lactic acid, *Advances in Applied Microbiology*, **42**, pp 45-95
- Lockwood, T.B. (1979), Lactic acid, *Microbial Technology*, Ed. Pepler, H.J.a.P.D., Academic Press, **1**, pp 373-376,385
- Lofgren, A. et A.C. Albertsson (1994), Copolymers of 1,5-Dioxepan-2-One and L-Dilactide or D,L-Dilactide - Hydrolytic Degradation Behavior, *Journal of Applied Polymer Science*, **52**, 9, pp 1327-1338
- Luedeking, R. et E.L. Piret (1959), A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH., *Journal of Biochemical and Microbial Technology and Engineering*, **1**, 4, pp 393-412
- Lund, B., B. Norddahl et B. Ahring (1992), Production of lactic acid from whey using hydrolyzed whey protein as nitrogen source, *Biotechnology Letters*, **14**, 9, pp 851-856
- Major, N.C. et A.T. Bull (1984), Lactic acid productivity of a continuous culture of *Lactobacillus delbrueckii*., *Biotechnology Letters*, **7**, 6, pp 401-405
- Major, N.C. et A.T. Bull (1988), The physiology of lactate production by *Lactobacillus delbrueckii* in a chemostat with cell recycle, *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, pp 592-599
- Marshall, R. et R.J. Beers (1967), Growth of *Bacillus coagulans* in chemically defined media, *Journal of Bacteriology*, 09/**1967**, pp 517-521
- Mehaia, M.A. et M. Cheryan (1987a), Immobilization of *Lactobacillus bulgaricus* in a hollow fiber bioreactor for production of lactic acid from acid whey permeate, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **14**, pp 21-27
- Mehaia, M.A. et M. Cheryan (1987b), Production of lactic acid from sweet whey permeate concentrates., *Process Biochemistry*, **22**, pp 185-188
- Miura, S. et A. Kumagai (1994), Method for fermentative production of lactic acid., /EP-0,657,542/, Musashino Chemical Laboratory, *European Patent*, 15
- Monbouquette, H.G. (1991), Modeling High-Biomass-Density Cell Recycle Fermentors, *Biotechnology and Bioengineering*, **39**, pp 498-503
- Monod, J. (1942), Recherche sur la croissance des cultures bactériennes, Ed. Cie, H.e., PARIS
- Monteagudo, J.M., L. Rodriguez, J. Rincon et J. Fuertes (1994), Optimization of the Conditions of the Fermentation of Beet Molasses to Lactic Acid by *Lactobacillus delbrueckii*., *Acta Biotechnologica*, **14**, 3, pp 251-260
- Montgomery, D.C. (1996), Design and analysis of experiments, Ed. Wiley, J., et al., Arizona State University, **2**, **2**

- Moser, A. (1984), Kinetics of batch fermentation, Chap. 14, *Biotechnology*, Ed. Brouer, H., Verlog., 2, pp 243-284
- Motosugi, K., N. Esaki et K. Soda (1984), Enzymatic preparation of D and L lactic acid from racemique 2-chloropropionic acid, *Biotechnology and Bioengineering*, 26, pp 805-806
- Mulligan, C.N. et B.F. Safi (1991), Continuous production of ammonium lactate by streptococcus cremosis in a three-stage reactor., *Biotechnology and Bioengineering*, 38, pp 1173-1181
- Mulligan, J.H. et E. Snell (1976), Transport and metabolism of vitamine B6 in lactic acid bacteria., *Journal of Biological Chemistry*, 252, 3, pp 835-839
- Nielsen, J., K. Nikolajsen et J. Villadsen (1990), Structured modeling of a microbial system : I. A theoretical study of lactic acid fermentation., *Biotechnology and Bioengineering*, 38, pp 1-10
- Nispen, J.G.M. et R. Jonker (1989), A process for the fermentative preparation of organic acids., /EP-0,346,983/, Coöperateive Vereniging Suiker Unie U.A., *European Patent*, 1-4
- Norton, S., C. Lacroix et J.C. Vuilleumard (1993), Effect of pH on the morphology of Lactobacillus helveticus in free-cell batch and immobilized-cell continuous fermentation, *Food Biotechnology*, 7, 3, pp 235-251
- Norton, S., C. Lacroix et J.C. Vuilleumard (1994a), Kinetic study of continuous whey permeate fermentation by immobilized Lactobacillus helveticus for lactic acid production, *Enzyme and Microbial Technology*, 16, 6, pp 457-466
- Norton, S., C. Lacroix et J.C. Vuilleumard (1994b), Reduction of yeast extract supplementation in lactic acid fermentation of whey permeate by immobilized cell technology, *Journal of Dairy Science*, 77, 9, pp 2494-2508
- Ohara, H. et M. Yahata (1996), L-Lactic acid production by Bacillus sp. in anaerobic and aerobic culture, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 3, pp 272-274
- Ohara, H. et T. Yoshida (1993), A highter purity of L-lactic acid produced in Streptococcus faecalis., *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40, pp 258-260
- Ohleyer, E., H.W. Blanche et C.R. Wilke (1985a), Continuous production of lactic acid in a cell recycle reactor, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11, pp 317-331
- Ohleyer, E., C.R. Wilke et H.W. Blanch (1985b), Continuous production of lactic acid from glucose and lactose in a cell-recycle reactor., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 11, pp 457-463
- O'Marro, A. (1993), Lactic acid polymers, *Cargill News*, 58, 4, pp 21-25
- Parajo, J.C., A. J.L. et V. Santos (1995), Lactic acid from wood, *Process Biochemistry*, 31, 3, pp 271-280

- Payot, T. et M. Fick (1997), On-line estimation of lactic acid concentration by conductivity measurement in fermentation broth, *Biotechnology Techniques*, **11**, 1, pp 2-6
- Priest, F.G. (1993), *Bacillus*, Ed. pp 367-400
- Prigent, Y. (1983), Procédé de préparation d'acide lactique par fermentation de lactosérum et installation pour la mise en oeuvre en continu de ce procédé., /F-2,555,200/, CNRS, INPI France,
- Purac (1990), Purac - Natural Lactic Acid, *Information Purac* 1990.
- Raucourt, A.d., D. Girard, Y. Prigent et P. Boyaval (1989), Lactose continuous fermentation with cells recycled by ultrafiltration and lactate separation by electro dialysis : modelling and simulation, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **30**, pp 521-527
- Rodgers, V.G.J. et R.E. Sparks (1991), Reduction of membrane fouling in the ultrafiltration of binary protein mixtures., *AIChE Journal*, **37**, 10, pp 1517-1528
- Rogers, L.A. et E.O. Whittier (1978), Limiting factor in the lactic acid fermentation., *Journal of Bacteriology*, **16**, 4, pp 211-229
- Roychoudhury, P.K., Srivastava A. et S. V. (1995), Extractive bioconversion of lactic acid, *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, Ed. A.Ffiechter, Springer-Verlag Berlin, 23(s), **23**, pp 61-87
- Schneider, D. et H. Lamonerie (1989), Procédé de production d'acide lactique., /EP-0,354,828/, Rhône-Poulenc Chimie, *European Patent*,
- Schütte, H., K.H. Kroner, H. Hustedt et M.-R. Kula (1983), Experiences with a 20 litre industrial bead mill for the disruption of microorganisms, *Enzyme Microbiology Technology*, **5**, pp 143-148
- Scott, C.D. (1993), Biparticle fluidized bed reactor, /US-5,270,189/, Marietta M., Energy systems inc., *United States Patent*, 10 pages
- Seeley, R.S. (1992), *Chem. Business*, Feb., pp 28
- Shi, Y.F., F.X. Jin et Y.Y. Wu (1997), Microfiltration membrane bioreactor in stirred backflush operation for biotransformation using intact cells, *Process Biochemistry*, **32**, 5, pp 387-390
- Shi, Z., K. Shimizu, S. Iijima, T. Morisue et T. Kobayashi (1990), Adaptive on-line optimizing control for lactic acid fermentation., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **70**, 6, pp 415-419
- Shimizu, K., K. Furuya et M. Taniguchi (1994), Optimal operation derived by Green's theorem for the cell-recycle filter fermentation focusing on the efficient use of the medium, *Biotechnology Progress*, **10**, 3, pp 258-262
- Shimizu, Y., K.I. Shimodera et A. Watanabe (1993), Cross-flow microfiltration of bacterial cells., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **76**, 6, pp 493-500

- Siebold, M., et al. (1993), Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electro dialysis., *Process Biochemistry*, **30**, 1, pp 81-95
- Smith, B.R., R.D. McBean et G.C. Cox (1977), Separation of lactic acid from lactose fermentation liquors by reverse osmosis, *Australian Journal of Dairy Technology*, **march 77**, pp 23-25
- Snell, E.S. (1989), Nutrition Research with Lactic acid Bacteria : A retrospective view., *Annual Reviews of Nutrition*, **9**, pp 1-19
- Soccol, C.R., V.I. Stonoga et M. Raimbault (1994), Production of L-Lactic Acid by Rhizopus Species, *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, **10**, 4, pp 433-435
- Stenroos, S.L., Y.Y. Linko et P. Linko (1982), Lactic acid production using packed bed column and sodium alginate beads, *Biotechnology Letters*, **4**, pp 159-164
- Szewczyk, K.W. (1991), The effect of dilution rate variation on the performance of continuous fermentation., *Bioprocess Engineering*, **6**, pp 17-19
- Taillandier, P., F. Gilis, F.R. Portugal, P. Laforce et P. Strehaiano (1996), Influence of medium composition, pH and temperature on the growth and viability on the growth and viability of lactobacillus acidophilus., *Biotechnology Letters*, **18**, 7, pp 775-780
- Tanigushi, M., N. Kotani et T. Kobayashi (1987), High-concentration cultivation of lactic acid bacteria in fermentor with cross-flow filtration, *Journal of Fermentation and Technology*, **65**, 2, pp 179-184
- Tejayadi, S. et M. Cheryan (1995), Lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **43**, pp 242-248
- Teuber, M. (1993), Lactic acid bacteria, Ed. pp 325-366
- Thompson, J. et C.R. Gentry-Weeks (1994), Métabolisme des sucres par les bactéries lactiques, *Bactéries lactiques*, Ed. de Roissart, H., et al., Lorica - Uriage, **1**, pp 239-290
- Timmer, J.M.K. et J. Kromkamp (1994), Efficiency of lactic acid production by Lactobacillus helveticus in a membrane cell recycle reactor, *FEMS Microbiology Reviews*, **14**, 1, pp 29-38
- Torrestiana, B.S., E. Brito de la fuente, C. Lacroix et L. Choplin (1994), Modelling the acidifying activity profile of lactobacillus bulgaricus cultures., *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**, pp 192-196
- Tournois, B. (1997), Recent developments in application of raw materials in bioplastics, *Renewable Bioproducts- Industrial outlets and research for the 21st century, 1997*, **1997**, pp 9 pages

- Tsai, S., S.H. Moon et R. Coleman (1992), Fermentation and recovery process for lactic acid production., /US-5,464,760/, University of Chicago, *United States Patent*, 10
- Tsai, T.S. et C. Millard (1993), Improvement pre-treatment process for lactic acid production., /WO- 94/13826/, University of Chicago, 23 pages
- Tuli, A., R.P. Sethi, P.K. Khanna, S.S. Marwaha et J.F. Kennedy (1984), Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*., *Enzyme and Microbial Technology*, **7**, pp 164-168
- Van Gansberghe, F., M. Fick, R. Jerome, H. Kammerstetter et H.-G. Fritz (1995), Development of innovative biodegradable polylactide acid polymers, based on agricultural raw materials, for new industrial applications.
Cluster VI : Bioplastics, AIR Agriculture, Agro-Industry, Fisheries. Non Food projects., Ed. Mangan, C., et al., European Commission, EUR 16206(s), pp 219-221
- Vick Roy, T.B. (1985), Lactic Acid, *Comprehensive Biotechnology*, Ed. Moo Young, M., Pergamon Press, 3(s), **3**, pp 761-776
- Vick Roy, T.B., D.K. Mandel, D.K. Dea, H.W. Blanch et C.R. Wilke (1983), The application of cell recycle to continuous fermentative lactic acid production, *Biotechnology Letters*, **5**, 10, pp 665-670
- Viljava, T. et H. Koivikko (1995), Method for preparing pure lactic acid., .WO-97/04120., Cultor Oy, *Patent Cooperation Treaty (PCT)*, 15 pages
- Waite, C.N. (1887), Process of lactic fermentation, /US- 368,032/, Avery Lactate Company, 1, *United States patent*, 1 page
- Walkup, P.C., C. Rohrman, R. Hallen et D. Eakin (1991), Production of esters of lactic acid, esters of acylic acid, lactic acid and acrylic acid., /WO- 91/11527/, Battelle Memorial Institute, WO, 50, *United States patent*
- Westhoff, D.C. et S.L. Dougherty (1981), Characterization of *Bacillus* species isolated from spoiled ultrahigh temperature processed milk, *Journal of Dairy Science*, **64**, pp 572-580
- Xavier, A.M.R.B., L.M.D. Gonçalves, J.L. Moreira et M.J.T. Carrondo (1994), Operational patterns affecting lactic acid production in ultrafiltration cell recycle bioreactor, *Biotechnology and Bioengineering*, **45**, pp 320-327
- Yang, C.W., Z. Lu et G.T. Tsao (1995), Lactic acid production by pellet-form rhizopus oryzae in a submerged system., *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **51/52**, pp 57-71
- Ye, K., S. Jin et K. Shimizu (1996), Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation., *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **81**, 3, pp 240-246
- Yeh, P.L.-Y., R.K. Bajpai et E.L. Iannotti (1991), An improvement kinetic model for lactic acid fermentation, *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **71**, 1, pp 75-77

- Yoo, I.-K., H.N. Chang, Y.K. Chang et S.-H. Moon (1997), By-product formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*, *Biotechnology Letters*, **19**, 3, pp 237-240
- Yumoto, I. et K. Ikeda (1995), Direct fermentation of starch to L(+)lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*, *Biotechnology Letters*, **17**, 5, pp 543-546
- Zayed, G. et J. Winter (1995), Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized cultures of lactobacilli, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **44**, pp 362-366
- Zhang, D.X. et M. Cheryan (1994), Starch to Lactic Acid in a Continuous Membrane Bioreactor, *Process Biochemistry*, **29**, 2, pp 145-150

~ ANNEXES ~

ANNEXE 0

PUBLICATIONS

- 1 publication de 4 pages parue dans *Biotechnology techniques*, 11, 1, 17-20, « On-line estimation of lactic acid concentration by conductivity measurement in fermentation broth ».

- 1 publication de 10 pages acceptée dans *Enzyme Microbial and Technology*, « Lactic acid production by *bacillus coagulans* - kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations ».

- 1 publication soumise dans *Biotechnology letters*, « Influence of Tween 80 on growth and lactic acid production by *Lactobacillus rhamnosus* in continuous cultures on whey permeate medium ».

- 2 publications en écriture

- 3 rapports annuels et un rapport final sur le programme européen AIR3 CT 94-2285 (60 pages chacun) « Improvement of integrated process for the production and the separation of lactic acid using thermophilic bacillus ». Unit I : 1995, unit II : 1996 and unit III : 1997. Final report 1995-1997.

ANNEXE I

Caractérisation des souches utilisées

Selon WESTHOFF et DOUGHERTY, *Journal of Dairy Sciences*, 64, 572-580

Tests	BB	TB/04	B.coagulans	B.stearothermophilus.
	bâtonnet	bâtonnet	bâtonnet	bâtonnet
Morphologie				
Gram	+	+	+	+
Catalase	+	+	+	+
Oxydase	-	-	-	v
Anaérobie	+	+	+	v
AMC(Voges-Proskauer)	+	+	v	-
Rouge de méthyle	f	f	+	+
pH < 6 (5,7)	+	+	+	+
Gaz à partir de glucose	-	-	-	-
Acide lactique à partir de :				
- Arabinose	-	-	v	v
- Cellobiose	-	-	+	-
- Glucose	+	+	+	+
- Lactose	+	+	+	-
- Sorbitol	-	-	+	-
- Xylose	-	-	v	v
Hydrolyse de :				
- Caseine	-	-	v	v
- Gelatine	-	-	-	+
- Amidon	+	+	+	+
- Uree	-	-	-	-
Utilisation du citrate	-	-	v	v
Desamination de Phe	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	-
Réduction des nitrates	+	+	v	v
Production d' indole	-	-	-	-
Croissance en présence de NaCl (%)				
- 2	+	+	+	+
- 3	-	-	-	v
- 4	-	-	-	-
- 6,5	-	-	-	-
Croissance à la température de : (°C)				
- 5	-	-	-	-
- 30	+	+	+	-
- 40	+	+	+	+
- 50	+	+	+	+
- 55	+	+	+	+
- 65	-	-	-	+
Croissance en présence d'azide de Na 0,02% p/v	+	+	+	-

v: réaction variable

f : réaction faible

ANNEXE II

Composition des extraits de levure (autolysat pur) semi-pâteux sans sels (65% d'extrait sec)

COMPOSITION CHIMIQUE (pour 100 g de produit)

Extrait sec	62,5 - 67,5
Azote total	7,4 - 8,4
Azote aminé	3,4 - 5,0
Protéines (Nx6,25)	46,2 - 52,5
Hydrates de carbone	2,0 - 6,0
Cendres déchlorurées	7,0 - 11,0
Chlorures de sodium	<0,5

COMPOSITION VITAMINIQUE MOYENNE (mg par kg de matière sèche)

B1 (Thiamine)	10 - 15
B2 (Riboflavine)	70 - 90
B5 (Pantothénate de calcium)	80 - 110
B6 (Pyridoxine)	30 - 50
PP (Niacine)	300 - 500
B12 (Cyanocobalamine) (µg/kg)	3 - 10

COMPOSITION MOYENNE EN ACIDES AMINES TOTAUX

Alanine	8,8	Lysine	8,0
Arginine	5,1	Méthionine	1,4
Acide aspartique	9,9	Phénylalanine	3,7
Cystéine	0,9	Proline	4,0
Acide glutamique	16,3	Sérine	4,6
Glycine	4,8	Thréonine	4,3
Histidine	4,1	Tyrosine	2,4
Isoleucine	5,5	Tryptophane	1,3
Leucine	7,6	Valine	5,9

COMPOSITION EN METAUX LOURDS (en mg/kg de matière sèche ou ppm)

Arsenic	< 0,5
Cadmium	< 0,1
Mercurie	< 0,05
Plomb	< 0,2
Sélénium	< 0,1
Zinc	< 75

COMPOSITION EN MATIERES INORGANIQUES (en %)

Potassium	3,6 - 4,6
Sodium	0,2
Magnésium	< 0,1
Calcium	< 0,1
Phosphore	0,8 - 1,8

APPARENCE : Concentré semi-fluide de couleur jaune doré à brun

SOLUBILITE : Totale à 10% dans l'eau déminéralisée à température supérieure à 40°C

ANNEXE III

Publication sur l'évaluation de la concentration en lactate par conductivité.

ON-LINE ESTIMATION OF LACTIC ACID CONCENTRATION BY CONDUCTIVITY MEASUREMENT IN FERMENTATION BROTH

T.Payot* and M. Fick

Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS

E.N.S.A.I.A, B.P.172, 2 avenue de la Forêt de Haye 54505 Vandoeuvre-Cedex, France

SUMMARY

On-line estimation of lactic acid concentration in fermentation broth is very feasible with conductivity probe directly in fermenter. This paper shows that lactic acid is the most influent parameter of medium on the conductivity measurements. The precision and longevity of conductivity probe are excellent in normal conditions of lactic acid production by fermentation process.

INTRODUCTION

During industrial lactic acid fermentation, the evaluation of lactic acid concentration is essential, because this organic acid is a determining parameter for specific growth rate of strain and performance of process (Taniguchi et al.,1987 ; Bibal et al.,1988). The majority of analytical techniques actually used for lactic acid evaluation are off-line methods : enzymatic, chromatographic and spectrophotometric methods. The development of on-line method is very difficult and expensive, high performance liquid chromatography with an UV detector and sampling system are very complex to install and to optimize. Another method is to use an enzymatic probe with immobilized lactate oxidase (Mizutani et al.,1996), the precision is excellent but this method is very expensive and delicate. During this work, a simple technique was developed for lactic acid evaluation or, more precisely, for ammonium lactate analysis, because during fermentation, lactic acid produced is neutralized with ammonia (Vick Roy et al.,1983 ; Hongo et al.,1986). Lactic acid evaluation by conductivity measurements was developed 15 years ago, for specific application (Stieber and Gerhardt,1979). Ammonium lactate concentration in fermentation broth is a key parameter of conductivity (Boyaval et al.,1988). Conductivity of medium is a function of medium salinity, mobility and charge of each ion. For lactic fermentation, the conductivity depends essentially on lactate anion and ammonium cation concentrations (Belfares et al.,1993). Conductivity method is very easy to use and not expensive (contrary to HPLC). This method can indirectly evaluate other bio-parameters concentration (Acuna et al.,1994), but optimization of fermentation stability is long and uncertain. This work is realized to define an easy protocol and evaluate sensitivity of the conductivity technique in standard medium which contains yeast extract, salts, biomass, sugar and lactic acid. Validity and longevity of this method are demonstrated in batch and continuous fermentation for lactic acid production.

MATERIALS AND METHODS

Strain and medium : *Bacillus steaorothermophilus* BB/ZVHB-02. It is an atypical strain isolated by natural medium, this *Bacillus* is an homo-fermentative lactic acid bacteria which was grown on sucrose (6%), yeast extract (0.2%), diammonium hydrogenophosphate (0.1%) and diammonium sulfate (0.17%). Media are sterilized at 121°C during 20 mn.

Fermentation conditions : Lactic acid fermentation was carried out at 50°C, stirring speed 300 rpm; pH was maintained at 6.2 by automatic addition of 1.4 to 8N NH₃.

Fermentation protocol : 200 ml sterile preculture medium was inoculated with 15 ml wake-up medium and incubated 12h at 50°C in 250 ml WHEATON INSTRUMENT. Then 100 ml preculture was aseptically transferred into 900 ml culture medium in a 2l fermenter (SET 2M SGI, Toulouse) with INGOLD pH probe. For continuous fermentation, feed medium and stage probe are activated after batch phase with peristaltic pump (ISMATEC and MATON Lesquin TH 50LF52).

Sugar and organic acids analysis : Sugar and lactic acid concentration were determined by an off-line High Performance Liquid Chromatography (HPLC) WATERS ASSOCIATE.

Enzymatic techniques: sucrose/D-glucose diagnostic kit BOEHRINGER MANNHEIM 1113950, D-glucose/D-fructose diagnostic kit BOEHRINGER MANNHEIM 139106, L-lactic acid diagnostic kit BOEHRINGER MANNHEIM 139084, and L-lactic acid was measured by second enzymatic method with a glucose-lactate analyzer YSI 2000 (BIOBLOCK).

Conductivity measurements : Samples and on-line measurements were realized with a conductivity probe WTW (WISSENSCHAFTLICH-TECHNISCHE WERKSTÄTTEN GmbH D-8120 Weilheim) LF 96 with conductivity cell TETRACON 96. Aqueous solutions of media compounds were made with milli RO water (conductivity = 0.35 μ S/cm) to show their influence. Comparison between HPLC, enzymatic techniques and conductivity for lactate analyses were carried out on batch and chemostat fermentation.

RESULTS AND DISCUSSION

Standard aqueous solutions were made with the main compounds of fermentation broth. These standards were realized for sucrose (between 0 and 200 g/l), ammonium lactate (0 to 50 g/l), yeast extract (0 to 20 g/l), biomass(0 to 5 g/l) and other ammonium salts (5 g/l).

Sugar influence on conductivity measures is very low. Conductivity is a function of water and impurities which increase with sugar concentration. Conductivity of sugar solutions does not exceed 0.01 mS/cm.

Two types of yeast extract and ammonium salts were tested during this experiment. A very good correlation exists between conductivity values and concentrations of these compounds. Maximal concentration of these compounds are respectively 5 and 2 g/l in medium fermentation. The maximal responses are respectively 1 and 4 mS/cm for yeast extract and ammonium salts. Influences of yeast and salts are 100 and 400 folds more important than sugar influence in conductivity.

Measurements of conductivity for cell bacteria are very difficult, because cell composition is complex and bacteria are stable only in physiologic water (NaCl 0.9%). Consequently, two types of experiments were realized to test influence of this parameter. Firstly, conductivity was measured on bacterial cells washed 3 times with physiologic water. Results show that conductivity depends on sodium-chloride salt concentration and not on cell's concentration. Secondly, bacterial cells were washed 3 times with milliRO water; this treatment destroys cell's membrane, due to the difference of osmotic pressure between *Bacillus* and pure water. A correlation exists between conductivity values and cells, or more precisely between intracellular metabolites, cell fragments and conductivity. (data not shown) High concentration of cell fragments (5 g/l) does not exceed 0.8 mS/cm for standard medium conductivity (5 folds lower than ammonium salts).

A standard solution of ammonium lactate was made with lactic acid neutralized by ammonia 6N, final pH=6.4 (pH of fermentation regulation). After the first conductivity measurements to test conductance influence of ammonium lactate alone, other metabolites were added in the standard solution to approach real conditions of fermentation process. Standard fermentation media with different concentration of lactic acid were reconstituted with 2 g/l of yeast extract, 2.7 g/l of ammonium salts and 60 g/l of sucrose. A very good correlation was obtained between ammonium lactate in standard medium and conductivity.

Lactic acid concentration (g/L) is a function of conductivity measurements (mS/cm) for reconstituted culture medium. The origin of coordinates gives the conductivity of medium without ammonium lactate salt, the conductivity value is the individual conductivity sum of medium compounds (see **Figure 1** and **Table 1**).

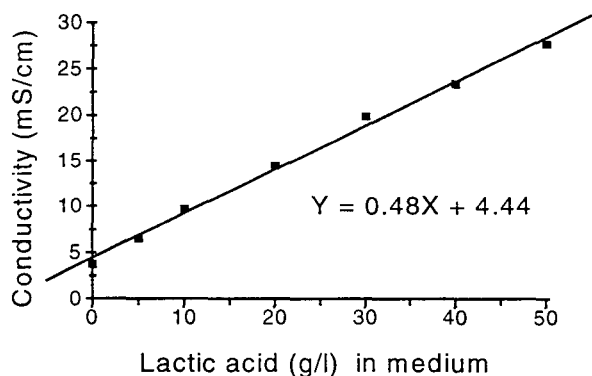


Figure 1 : Correlation between ammonium lactate concentration (converted in g/l of lactic acid added) and the conductivity (mS/cm) of reconstituted fermentation medium. The origin of coordinates gives the conductivity of medium without lactic acid. The composition of medium was defined as : sucrose 60 g/l, liquid yeast extract 2 g/l, diammonium hydrogénophosphate 1 g/l and diammonium sulfate 1.7 g/l.

Table 1 : Comparison between conductivity calculated by the sum of conductivity of medium compounds and the conductivity directly measured in standard medium.

Compounds added (g/L)	Conductivity (mS/cm)	Conductivity (mS/cm) gives by origin of coordinate	
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.7		2.72
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1.0		1.27
Liquid Yeast extract	2.0		0.35
Sucrose	60.0	0.01	
		4.35 mS/cm	4.44 mS/cm

Lactic acid is the most influent parameter of medium, because for industrial batch and chemostat processes the concentration of lactate rapidly increases to 20 g/L (< 10 hours). In fact, the conductivity of medium with only 10 g/l of lactic acid in standard conditions (pH 6.4 and 50°C) is 9.24 mS/cm. For 30 g/l, conductivity equals 18.9 mS/cm.

This method is efficient for lactic acid concentration evaluation in culture medium if some hypothesis are arise. Firstly, the concentration of other compounds are constant during the fermentation process; the conductivity of media without lactic acid is constant. This hypothesis is wrong, because sucrose and part of yeast extract are degraded, however for high concentration of lactic acid (>10 g/l), the conductivity of medium is low. Secondly, the strain used for lactic acid production must be homo-fermentative. Other metabolites influence conductivity : acetic acid, succinate, pyruvate. Industrial strains are always homo-fermentative. Thirdly, pH and temperature of the culture must be controlled.

Two batch and one chemostat culture were carried out to confirm previous hypotheses in standard conditions. On-line conductivity measurements were realized with conductivity probe directly in culture medium and samples were taken in culture for HPLC and enzymatic kit analyzes comparisons. Concentration of lactic acid determined by chromatographic techniques and enzymatic kit are correlated (5% error.data not shown). The linear fit calculated for this experiment gives the same slope as batch studies.

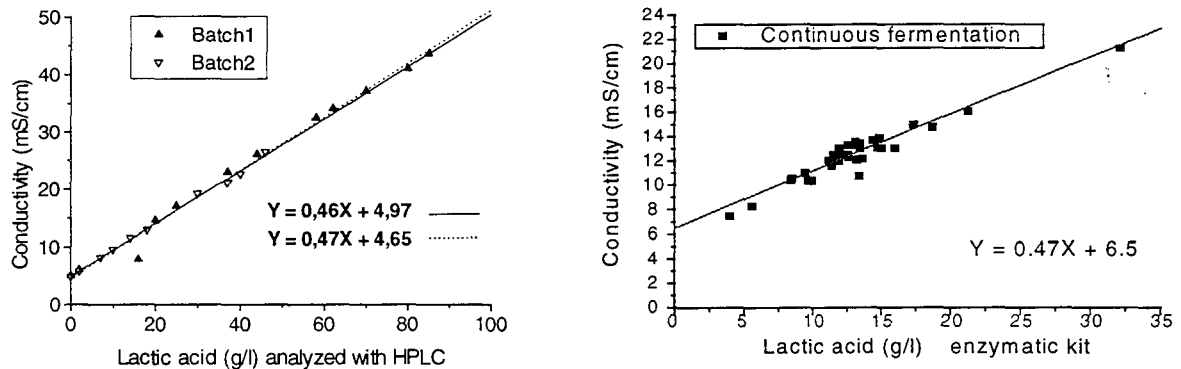
The origin of coordinate (on Y axis) and slope for comparison of lactic acid concentration are the same than the ones in reconstituted media (**Figure 2**).

Graph shows a very good correlation between different techniques with a good precision at low lactic acid concentration. Conductivity measurements are efficient at all lactic acid concentrations and confirms the first hypothesis of the low influence of other metabolites on conductivity. Moreover, the HPLC results confirm the homo-fermentative character of *Bacillus* strain.

A study was carried out in continuous fermentation process in standard conditions with only 6 g/l of yeast extract added in the medium to improve growth of *Bacillus*. A comparison between conductivity and enzymatic techniques were realized during this experiment (**Figure 3**).

This continuous fermentation confirms previous studies, the linear fit calculated from experimental plots gives the same slope for correlation between conductivity and lactic acid

concentration. Plot on Y axis shows the conductivity of medium without lactic acid. For continuous process, a lot of plots are in the same area at steady state, the linear fit calculated is less precise than for other experiments; nevertheless, slope is identical.



Figures 2 and 3: Comparison between lactic acid concentration analyzed with HPLC and conductivity method for 2 batches (same conditions). Comparison between lactic acid analyzed by enzymatic technique and on-line conductivity measures.

In conclusion, conductivity is a very good technique for on-line estimation of lactic acid in industrial fermentation. This method is easy (conductivity probe is directly in reactor), instantaneous and not expensive. Lactic acid is directly estimated without dilution between 2 and 100 g/l (higher concentrations were not tested). The bacterial strain used in industrial fermentation must be homo-fermentative, because extraction of lactic acid is the most expensive part of the process and the yield of production must be high. Medium composition must be standardized and simple, lactic acid estimation by conductivity measurements is efficient at low concentration (>2g/l). Ammonia is generally used in industrial production to neutralize lactic acid, it is not consumed by *Bacillus* BB/ZVHB-02 strain as nitrogen source. Consequently, it was very difficult to dissociate ammonium and lactate effects on conductivity: One mole of ammonium neutralizes one mole of lactate; conductivity is correlated, more precisely, with ammonium lactate and consequently with lactic acid. The precision of this technique is improved at high lactate concentrations (8%) and the minimum limit of detection was determined at 2 g/l of lactate.

Finally, a test was carried out for continuous fermentation during 1300 hours (data not shown) without variation of the probe sensitivity and with a very good reliability.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank European Union for the financial support of the AAIR PL94-2285 project. We thank all of partners implicated in this project and especially Brussels Biotech S.A, the project coordinator, for the supply of bacterial strain.

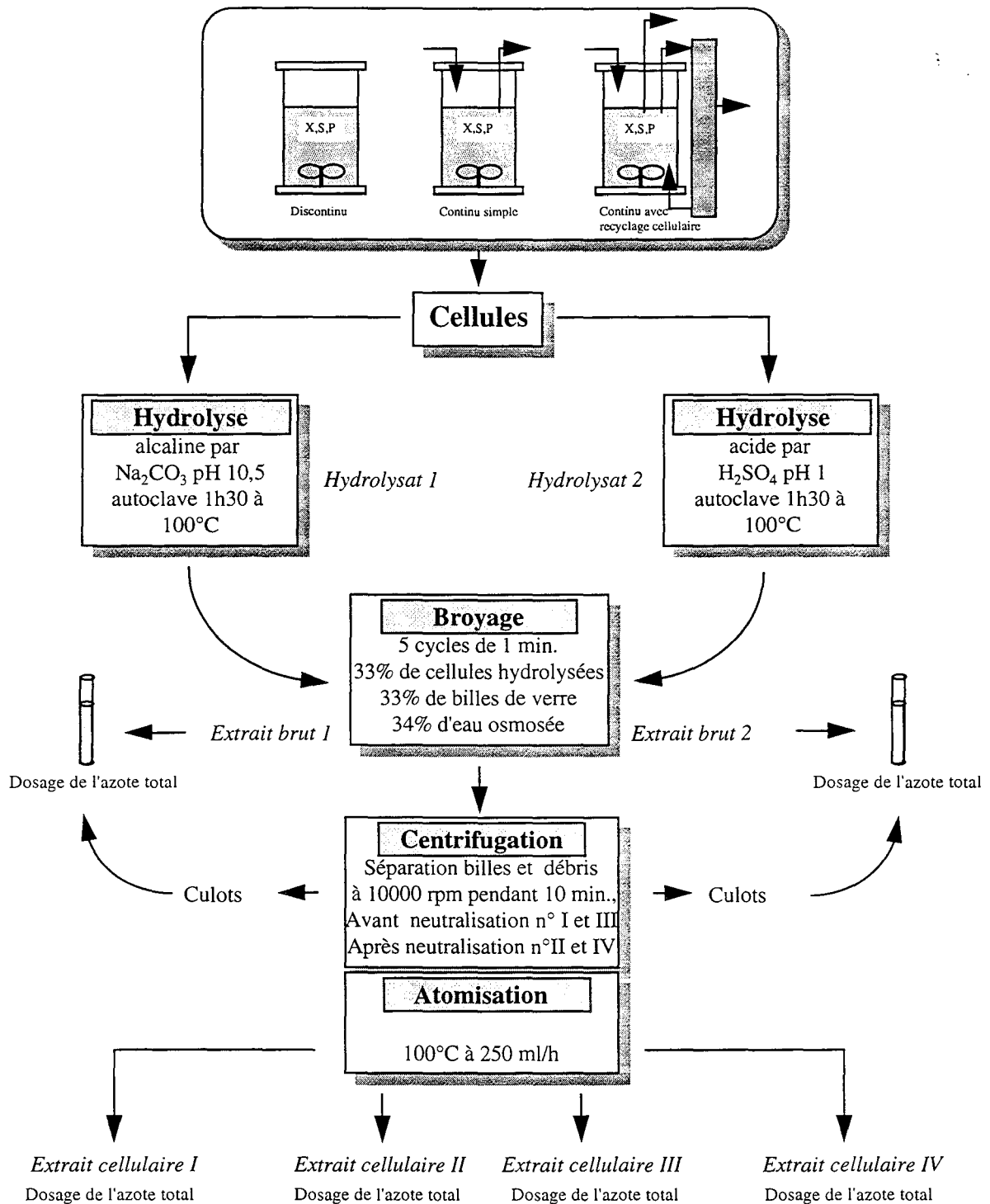
REFERENCES

- Acuna G., Latrille E., Beal C., Corrieu G. and Cheruy A. (1994) *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 10, 1168-1176.
- Belfares L., Altaba S., Pons M.N., Engasser J.M. and Fick M. (1993) *Bioproc. Eng.* **9**, 197-204.
- Bibal B., Goma G. Vaysier Y. and Pareilleux A. (1988) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**, 340-344.
- Boyaval P., Terre S. and Corre C. (1988) *Le Lait* **68**, 65-84.
- Hongo M., Nomura X. and Iwamura M. (1986) *Appl. Environm. Microbiol.* **53**, 314-319.
- Mizutani F., Yabuki S. and Hirata Y. (1996), *Anal. Chim. Acta.* **314**, 3233-3239
- Stieber R.W. and Gerhardt P. (1979) *Appl. Environm. Microbiol.* **37**, 487-495.
- Taniguchi M., Kotani N. and Kobayashi T. (1987) *J. Ferment. Technol.* **65**, 179-184.
- Vick Roy T.B., Mandel D.K., Dea D.K. Blanch H.W. and Wilke C.R. (1983) *Biotechnol. Lett.* **5**, 665-670.

ANNEXE IV

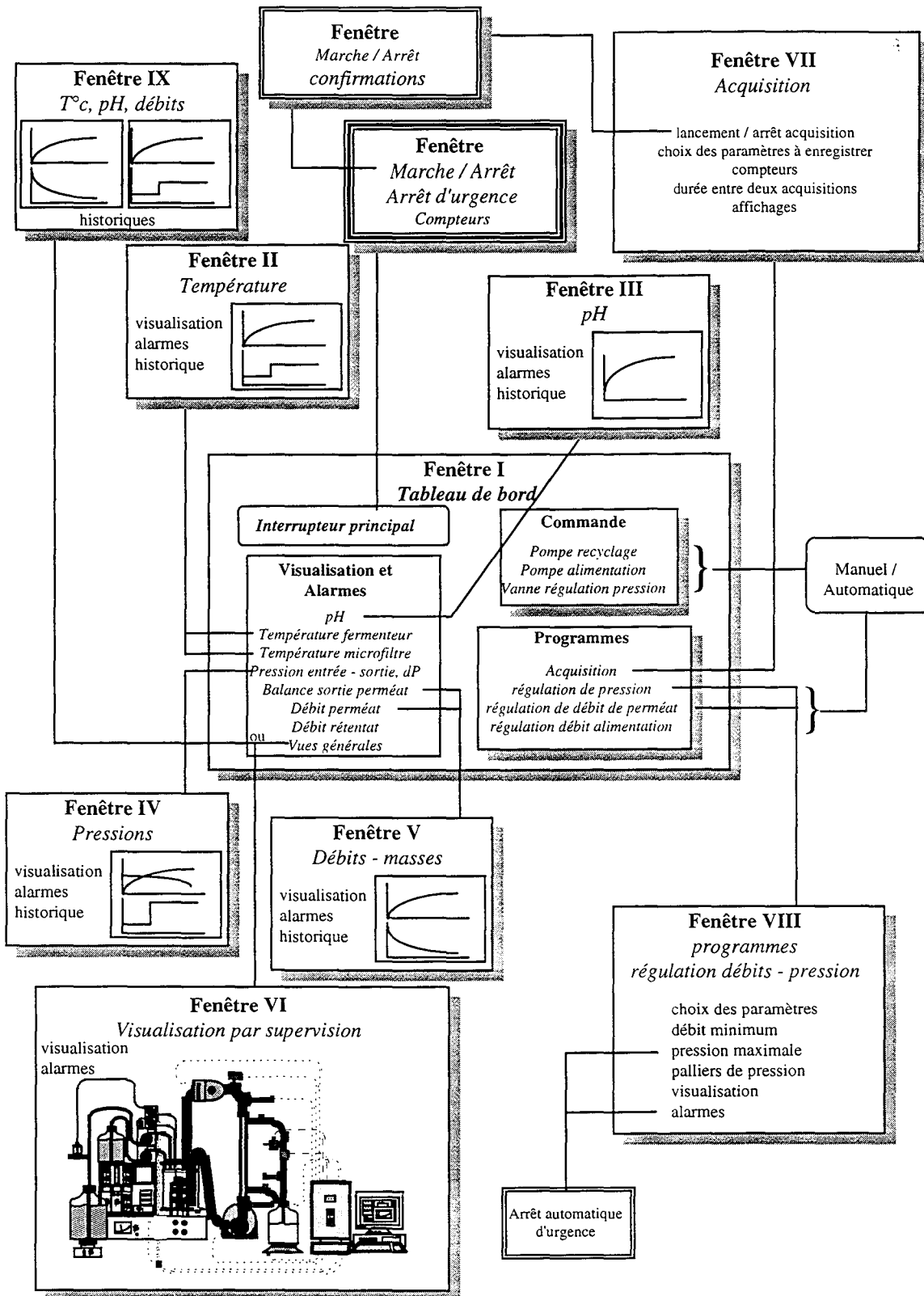
Protocole de préparation des extraits cellulaires

Fermentations



ANNEXE V

Structure du programme de contrôle et d'acquisition du pilote de fermentation extractive (développé sous Test Point ©)



ANNEXE VI

Programmes de modélisation développés sous Matlab®.

Programme pour culture discontinuë

Programme principal.

```
t0=0; tf=48; X0=[valeurs initiales]; [t,X]=ode23('fredbatc',t0,tf,X0); T=[valeurs
expérimentales]; B=[valeurs expérimentales]; L=[valeurs expérimentales]; S=[valeurs
expérimentales]; l=length(t); for i=1:l; Xt(i)=X(i); St(i)=X(i+1); Pt(i)=X(i+2.*l); end;
plot(t,St,'m',t,Pt,'b',T,L,'b*',T,S,'m+'); H = figure; plot(t,Xt,'r',T,B,'ro');
```

Entrée des constantes et des équations différentielles

```
function Xprime=fredbatc(t,X)
% definition des constantes
mumax= vitesse spécifique de croissance (h-1);
Ks= constante de Monod , affinité pour le substrat (g/L);
Ki= constante d'inhibition par le produit (g/L);
Kp= constante d'inhibition par le substrat g/L;
m= constante liée à la maintenance (g/L);
a= rendement biomasse/substrat (g/g);
b= rendement produit/substrat (g/g);
Kd= constante de décès cellulaire (h-1);
n=puissance d'inhibition;
mu=mumax.*(X(2)/(Ks+X(2)+(X(2)^2)/Kp)).*(1/(1+(X(3)/Ki)^n))-Kd;
if mu >= 0;
qu = mu;
else qu = 0;
end;
Xprime=[mu.*X(1);((-1/a).*qu.*X(1))-m.*X(1);((b/a).*qu.*X(1))+(b.*m.*X(1))];
```

Programme pour culture continue simple

Programme principal.

```
t0=0;tf=300;X0=[valeurs initiales];[t,X]=ode23('fredcont',t0,tf,X0);T=[valeurs
expérimentales];B=[valeurs expérimentales];S=[valeurs expérimentales];L=[valeurs
expérimentales];l=length(t);for
i=1:l;Xt(i)=X(i);St(i)=X(i+1);Pt(i)=X(i+2.*l);end;plot(t,St,t,Pt,T,S,'m+',T,L,'b*');xlabel('Temp
s (h)');ylabel('Concentrations (g/L)');title('Continu D=0.15 h-
1');H=figure;plot(t,Xt,T,B,'ro');xlabel('Temps (h)');ylabel('Biomasse (g/L)');title('Continu
D=0.15 h-1');X
```

Entrée des constantes et des équations différentielles

```
function Xprime=fredcont(t,X)
% definition des constantes
mumax= vitesse spécifique de croissance (h-1);
Ks= constante de Monod , affinité pour le substrat (g/L);
Ki= constante d'inhibition par le produit (g/L);
Kp= constante d'inhibition par le substrat g/L;
m= constante liée à la maintenance (g/L);
a= rendement biomasse/substrat (g/g);
b= rendement produit/substrat (g/g);
Kd= constante de décès cellulaire (h-1);
n=puissance d'inhibition;
D= taux de dilution (h-1);
mu=mumax.*(X(2)/(Ks+X(2)+(X(2)^2)/Kp)).*(1/(1+(X(3)/Ki)^n))-Kd;
if mu >= 0; qu = mu; else qu = 0;
end;
Xprime=[mu.*X(1)-D.*X(1);D.*(60-X(2))+((-1/a).*qu.*X(1))-m.*X(1);((b/a).*qu.*X(1))+(b.*m.*X(1))-
D.*X(3)];
```


Programme pour culture continue avec recyclage cellulaire

Programme principal.

```
t0=0; tf=500; X0=[ valeurs initiales]; [t,X]=ode23('fredrecy',t0,tf,X0); T valeurs  
expérimentales]; B=[ valeurs expérimentales]; S=[ valeurs expérimentales]; L valeurs  
expérimentales]; l=length(t);for i=1:l; Xt(i)=X(i); St(i)=X(i+1); Pt(i)=X(i+1.*2); end;  
plot(t,Xt,'r',t,St,'m',t,Pt,'b',T,B,'ro',T,S,'m+',T,L,'b*'); xlabel('Temps (h)');ylabel('Concentrations  
(g/L)');title('Recyclage D=1 h-1 et Purge= 0.04 h-1');X
```

Entrée des constantes et des équations différentielles

```
function Xprime=fredrecy(t,X)  
% definition des constantes  
mumax= vitesse spécifique de croissance (h-1);  
Ks= constante de Monod , affinité pour le substrat (g/L);  
Ki= constante d'inhibition par le produit (g/L);  
Kp= constante d'inhibition par le substrat g/L;  
m= constante liée à la maintenance (g/L);  
a= rendement biomasse/substrat (g/g);  
b= rendement produit/substrat (g/g);  
Kd= constante de décès cellulaire (h-1);  
n= puissance d'inhibition;  
D= taux de dilution (h-1);  
Dl= taux de purge;  
mu=mumax.*(X(2)/(Ks+X(2)+(X(2)^2)/Kp)).*(1/(1+(X(3)/Ki)^n))-Kd;  
if mu >= 0;  
qu = mu;  
else qu = 0;  
end;  
Xprime=[mu.*X(1)-Dl.*X(1);D.*(60-X(2))+((-1/a).*qu.*X(1))-m.*X(1);((b/a).*qu.*X(1))+(b.*m.*X(1))-  
D.*X(3)];
```


ANNEXE VII

Matrice d'expérience donnée par le programme statistique

Type : Matrice Hybride

Numéro de l'essai	Débit de recyclage	Pression	Concentration en biomasse	Fréquence de décolmatage
1	0	0	0	1,765
2	-1	-1	-1	0,568
3	1	-1	-1	0,568
4	-1	1	-1	0,568
5	1	1	-1	0,568
6	-1	-1	1	0,568
7	1	-1	1	0,568
8	-1	1	1	0,568
9	1	1	1	0,568
10	-1,47	0	0	-1,051
11	1,47	0	0	-1,051
12	0	-1,47	0	-1,051
13	0	1,47	0	-1,051
14	0	0	-1,47	-1,051
15	0	0	1,47	-1,051
16	0	0	0	0
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0

Annexe VIII

Résultats du plan d'expériences

Etude de la microfiltration d'un milieu de culture

Membrane 0,2 μm 7 canaux

Ordre des essais n°	Membrane Porosité	Plan A numéro	Paramètres				Réponses				
			Qr (L/h)	P1 (bar)	X (g/L)	décolmatage écart (mn)	Qps (L/h)	ts (mn)	Colmatage (%)	t1/2 (s)	Pi (L/h2)
16	0,2	1A	1150	0,8	8	10	6,4	11	82	30	3090
43	0,2	2A	707	0,32	3,2	6,6	7	8	33	37	155
44	0,2	3A	1592	0,32	3,2	6,6	7,5	11	16	36	65
45	0,2	4A	707	1,27	3,2	6,6	18,7	6	63	34	3720
46	0,2	5A	1592	1,27	3,2	6,6	20,4	9	58	34	1950
4	0,2	6A	707	0,32	12,8	6,6	3,5	10	67	30	205
5	0,2	7A	1592	0,32	12,8	6,6	4,05	13	54	35	75
6	0,2	8A	707	1,28	12,8	6,6	4,05	8	92	30	3825
7	0,2	9A	1592	1,28	12,8	6,6	11	11	77	30	2650
17	0,2	10A	500	0,8	8	2	4,2	4	84	32	1650
18	0,2	11A	1800	0,8	8	2	14,3	10	52	28	2205
19	0,2	12A	1150	0,1	8	2	0	8	100	45	112
20	0,2	13A	1150	1,5	8	2	16,5	4	72	33	4640
55	0,2	14A	1150	0,8	1	2	23,7	5	32	50	1990
1	0,2	15A	1150	0,8	15	2	7,1	8	80	30	2065
21	0,2	16A	1150	0,8	8	5	7,6	8	78	28	2930
22	0,2	17A	1150	0,8	8	5	7,4	7	79	29	3010
23	0,2	18A	1150	0,8	8	5	7,5	7	79	30	3000
24	0,2	19A	1150	0,8	8	5	7,35	8	79	29	2890

X = Concentration en biomasse
 P1 = Pression d'attaque de la membrane
 Décolmatage = Temps entre 2 back-flush
 Qr = Débit de recyclage

Plan d'expériences A

Annexe IX

Résultats du plan d'expériences

Etude de la microfiltration d'un milieu de culture

Membrane 0,45 µm 7 canaux

Ordre des essais n°	Membrane Porosité	Plan B numéro	Paramètres				Réponses				
			Qr (L/h)	P1 (bar)	X (g/L)	décolmatage écart (mn)	Qps (L/h)	ts (mn)	Colmatage (%)	t1/2 (s)	Pi (L/h2)
25	0,45	1B	1150	0,8	8	10	7,8	13	84	31	3925
47	0,45	2B	707	0,32	3,2	6,6	10,1	10	45	43	400
48	0,45	3B	1592	0,32	3,2	6,6	10,9	13	22	43	550
49	0,45	4B	707	1,27	3,2	6,6	24,5	8	64	40	3450
50	0,45	5B	1592	1,27	3,2	6,6	26,8	10	58	42	3100
8	0,45	6B	707	0,32	12,8	6,6	3,4	12	82	35	995
9	0,45	7B	1592	0,32	12,8	6,6	0	15*	100	30	970
10	0,45	8B	707	1,28	12,8	6,6	2	non stabilisé	97	30	5710
11	0,45	9B	1592	1,28	12,8	6,6	6,9	non stabilisé	89	30	4850
26	0,45	10B	500	0,8	8	2	5,1	6	87	30	3190
27	0,45	11B	1800	0,8	8	2	12,5	12	71	32	3440
28	0,45	12B	1150	0,1	8	2	0	10*	100	30	440
29	0,45	13B	1150	1,5	8	2	6,9	non stabilisé	91	31	5925
56	0,45	14B	1150	0,8	1	2	27,1	7	44	65	3400
2	0,45	15B	1150	0,8	15	2	5,1	10	89	30	3925
30	0,45	16B	1150	0,8	8	5	7,9	10	84	30	3840
31	0,45	17B	1150	0,8	8	5	7,6	9	84	33	3920
32	0,45	18B	1150	0,8	8	5	7,8	10	84	32	3860
33	0,45	19B	1150	0,8	8	5	7,75	10	84	31	3890

X = Concentration en biomasse
P1 = Pression d'attaque de la membrane
Décolmatage = Temps entre 2 back-flush
Qr = Débit de recyclage

Plan d'expériences B

* = Temps pour colmater totalement

Annexe X

Résultats du plan d'expériences

Etude de la microfiltration d'un milieu de culture

Membrane 0,8 µm 7 canaux

Ordre des essais n°	Membrane Porosité	Plan C numéro	Paramètres				Qps (L/h)	ts (mn)	Colmatage (%)	t1/2 (s)	Pi (L/h2)
			Qr (L/h)	PI (bar)	X (g/L)	décolmatage écart (mn)					
34	0,8	1C	1150	0,8	8	10	5,95	non stabilisé	92	30	7125
51	0,8	2C	707	0,32	3,2	6,6	9,2	non stabilisé	77	48	2840
52	0,8	3C	1592	0,32	3,2	6,6	10,3	non stabilisé	64	44	2190
53	0,8	4C	707	1,27	3,2	6,6	15,6	non stabilisé	83	46	7970
54	0,8	5C	1592	1,27	3,2	6,6	19,8	non stabilisé	78	50	6840
12	0,8	6C	707	0,32	12,8	6,6	3,7	non stabilisé	91	30	3050
13	0,8	7C	1592	0,32	12,8	6,6	0	19*	100	31	2270
14	0,8	8C	707	1,28	12,8	6,6	2,5	non stabilisé	97	31	8460
15	0,8	9C	1592	1,28	12,8	6,6	9,5	non stabilisé	89	29	7120
35	0,8	10C	500	0,8	8	2	7,8	non stabilisé	89	31	5060
36	0,8	11C	1800	0,8	8	2	9,95	non stabilisé	83	30	4400
37	0,8	12C	1150	0,1	8	2	0	14*	100	35	1225
38	0,8	13C	1150	1,5	8	2	4,2	non stabilisé	96	29	7200
57	0,8	14C	1150	0,8	1	2	27,8	non stabilisé	63	75	5995
3	0,8	15C	1150	0,8	15	2	3,5	non stabilisé	95	30	7100
39	0,8	16C	1150	0,8	8	5	6,8	non stabilisé	91	28	6625
40	0,8	17C	1150	0,8	8	5	6,7	non stabilisé	91	30	6875
41	0,8	18C	1150	0,8	8	5	6,9	non stabilisé	91	31	6750
42	0,8	19C	1150	0,8	8	5	6,85	non stabilisé	91	30	6800

X = Concentration en biomasse
 PI = Pression d'attaque de la membrane
 Décolmatage = Temps entre 2 back-flush
 Qr = Débit de recyclage

Plan d'expériences C

* = Temps pour colmater totalement

ANNEXE XI

Exemple de traitements statistiques

Analyses de variance pour le débit final

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P-Value
A:Recycl	22,7145	1	22,7145	26,59	0,0067
B:Pression	180,114	1	180,114	210,85	0,0001
C:Biomasse	170,254	1	170,254	199,31	0,0001
D:decolmat	6,66162	1	6,66162	7,80	0,0492
AA	0,0613349	1	0,0613349	0,07	0,8020
AB	7,22	1	7,22	8,45	0,0438
AC	3,51125	1	3,51125	4,11	0,1125
AD	13,8805	1	13,8805	16,25	0,0157
BB	1,35478	1	1,35478	1,59	0,2764
BC	36,5513	1	36,5513	42,79	0,0028
BD	7,1549	1	7,1549	8,38	0,0444
CC	79,7075	1	79,7075	93,31	0,0006
CD	8,79284	1	8,79284	10,29	0,0326
DD	1,04562	1	1,04562	1,22	0,3306
Total error	3,41688	4	0,854219		
Total (corr.)	735,121	18			

R-squared = 99,5352 percent
R-squared (adjusted for d.f.) = 97,9084 percent
Standard Error of Est. = 0,92424
Mean absolute error = 0,292105
Durbin-Watson statistic = 2,74707

Paramètres statistiques

Coefficients de régression

constant = 8,02926
A:Recycl = 0,00287657
B:Pression = 18,297
C:Biomasse = -3,01978
D:decolmat = 0,372195
AA = 4,15032E-7
AB = 0,00451028
AC = 0,000314533
AD = -0,0010932
BB = -1,68296
BC = -0,943392
BD = -0,729095
CC = 0,129089
CD = 0,0808252
DD = 0,0406104

Estimation des effets

average = 7,08422 +/- 0,453845
A:Recycl = 4,40117 +/- 0,853496
B:Pression = 12,4069 +/- 0,854422
C:Biomasse = -12,0625 +/- 0,854422
D:decolmat = -2,66148 +/- 0,953055
AA = 0,350702 +/- 1,30879
AB = 4,10435 +/- 1,41176
AC = 2,86225 +/- 1,41176
AD = -5,67041 +/- 1,40668
BB = -1,6493 +/- 1,30963
BC = -9,24524 +/- 1,41336
BD = -4,07273 +/- 1,40724
CC = 12,6507 +/- 1,30963
CD = 4,5149 +/- 1,40724
DD = 1,29304 +/- 1,16872

Modèle pour déterminer le débit final de perméat en fonction des autres paramètres

$$\text{debitfin} = 8,02926 + 0,00287657 \cdot \text{Recycl} + 18,297 \cdot \text{Pression} - 3,01978 \cdot \text{Biomasse} + 0,372195 \cdot \text{decolmat} + 4,15032 \text{E-}7 \cdot \text{Recycl}^2 + 0,00451028 \cdot \text{Recycl} \cdot \text{Pression} + 0,000314533 \cdot \text{Recycl} \cdot \text{Biomasse} - 0,0010932 \cdot \text{Recycl} \cdot \text{decolmat} - 1,68296 \cdot \text{Pression}^2 - 0,943392 \cdot \text{Pression} \cdot \text{Biomasse} - 0,729095 \cdot \text{Pression} \cdot \text{decolmat} + 0,129089 \cdot \text{Biomasse}^2 + 0,0808252 \cdot \text{Biomasse} \cdot \text{decolmat} + 0,0406104 \cdot \text{decolmat}^2$$

Modèle après élimination des effets quadratiques et des interactions non influents

$$\text{debitfin} = 4,62308 + 0,00634735 \cdot \text{Recycl} + 15,6042 \cdot \text{Pression} - 2,64223 \cdot \text{Biomasse} + 0,777397 \cdot \text{decolmat} + 0,00451028 \cdot \text{Recycl} \cdot \text{Pression} - 0,00109317 \cdot \text{Recycl} \cdot \text{decolmat} - 0,943392 \cdot \text{Pression} \cdot \text{Biomasse} - 0,729095 \cdot \text{Pression} \cdot \text{decolmat} + 0,128103 \cdot \text{Biomasse}^2 + 0,080791 \cdot \text{Biomasse} \cdot \text{decolmat}$$

ANNEXE XII

Etude technico-économique sommaire

Cette étude est entièrement réalisée à partir des données recueillies dans les travaux de Tejayadi et Cheryan (1995). Les prix de 1995 seront conservés pour faciliter les conversions et les calculs des coûts.

A.1.1. Investissements

Le premier tableau décrit l'investissement nécessaire à la réalisation de l'installation de fermentation en haute densité cellulaire. La base du calcul est réalisée sur une base de production d'acide lactique à $35 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans un réacteur à recyclage cellulaire de 25 m^3 (Tableau A.1).

Tableau A.1 : Calcul des coûts d'investissement de l'installation.

	Taille	(F/m ²)	Coût (KF)
Coûts directs			
<i>1 : Equipement</i>			
Tank de préculture	200 L		12
Tank de mélange	5000 L		66
Réacteur avec agitation	25000 L		330
Tank de stockage nutriments	3x 2500 L		90
Tank jus vert	1x10 ⁶ L		900
Membrane de microfiltration	625 m ²	5400	3375
Total équipement			4773
<i>2 : Tuyauterie, instrumentation, électricité (30% de 1)</i>			1432
<i>3 : Construction (10% de 1)</i>			477
<i>4 : Autres (5% de 1)</i>			238
5 : Total coûts directs			6920
Coûts indirects			
Imprévus, ingénieries et honoraires (27,5% de 5)			1903
Capital d'investissement fixe			8823
Capital de travail (15% du capital fixe)			1323
Investissement capital total			10146

Comparativement, l'installation décrite par Tejayadi et Cheryan couplant, fermentation, ultrafiltration et osmose inverse coûte environ 24800 KF.

L'investissement pour un réacteur discontinu de 72 m^3 pour notre souche sans membrane serait de l'ordre de 3550 KF.

A.1.2. Capacité de production

En réacteur à recyclage cellulaire, la productivité moyenne déterminée pour *Bacillus coagulans* est de 35 g.L⁻¹.h⁻¹, soit pour un réacteur de 25 m³, 21000 Kg de lactate produits par jour.

En réacteur discontinu, la productivité est de 1,2 g.L⁻¹.h⁻¹, soit pour le réacteur de 72 m³, 2100 Kg de lactate produits par jour.

A.1.3. Evaluation des coûts de fonctionnement

Ces coûts sont évalués dans le tableau suivant (**Tableau A.2**).

Tableau A.2 : Evaluation des coûts journaliers de production d'acide lactique par *Bacillus coagulans* en fermentation avec recyclage cellulaire

	Coût unitaire	Quantité par jour	Coût (F/jour)	% du coût total
Coûts opératoires				
1 : <i>Matières premières</i>				
Saccharose (jus vert)	1,5 F/Kg	37500 Kg	562500	32,4
Extrait de levure	23F/Kg	1250 Kg	28750	25
Corn steep	3 F/Kg	2500 Kg	7500	6,5
Autres nutriments (15% sucre + E.L.)				
2 : <i>Utilités</i>				
Eau	1,5F/m ³	600 m ³	900	0,78
Electricité	0,36F/ kW/h	1000 kWh	360	0,35
Vapeur	70F/1t	50000 Kg	3500	3
3 : <i>Personnel</i>	50 F/h	50 h	2500	2,2
4 : <i>Membranes</i> remplacement, lavage.	3600 F/m ²		18000	15,65
5 : <i>Maintenance et réparations</i> (6% du capital fixe/an)			1450	1,25
6 : <i>Fournitures</i> (2% du capital fixe/an)			490	0,45
7 : <i>Autres</i> (70% de 3, 5 et 6)			3100	2,7
Charges fixes				
1 : Usure (20% par an du capital fixe)			4850	4,25
2 : Assurance (1% par an du capital fixe)			250	0,25
Dépenses générales et administratives (5% du coût de fabrication)				
			6430	4,75
Coût de production F/jour			135000	100
Coût du lactate à 45 g/L à la sortie du fermenteur et sans cellules			6,0 F/Kg	

La production de 1 kilogramme d'acide lactique dilué revient à environ **6 francs** par le réacteur à haute densité cellulaire. Ce prix serait correct par rapport au marché actuel de l'acide organique si le fluide titrait au moins 85% de lactate (Tejayadi et Cheryan, 1995), cependant, c'est loin d'être le cas, car les étapes de séparations et de concentrations ne sont pas encore incluses dans le prix de revient.

A.1.4. Conclusions

① Cette étude sommaire a permis de déterminer le prix de revient de l'acide lactique, s'il était produit par *Bacillus coagulans*, dans un réacteur à haute densité cellulaire. Ce prix est élevé sans être exorbitant. Pour être compétitif, il faudrait que la souche puisse accumuler plus d'acide lactique et consommer tout le sucre présent. La souche modèle, que nous avons mise en oeuvre, ne permet pas d'atteindre ces objectifs industriels; ce qui est tout à fait normal, puisqu'il ne s'agit pas d'une souche industrielle. Néanmoins pour un micro-organisme atypique producteur d'acide lactique, les résultats sont très intéressants.

② La différence d'investissement entre un réacteur discontinu et continu avec recyclage cellulaire est très importante (x3). Avant de lancer un tel investissement, il faut être certain des performances de sa souche industrielle en recyclage cellulaire. Seul un travail de fond sur l'aspect nutritionnel de la souche, les milieux de culture, les paramètres physico-chimiques, la microfiltration, le mode de culture, plus, une étude de « scale up » peuvent permettre de conclure. Cette démarche avait, déjà, été réalisée par Tejayadi et Cheryan (1995) pour évaluer la productivité et les coûts de la production d'acide lactique, à partir de perméat de lactosérum, dans un réacteur à haute densité cellulaire.

③ Le calcul du prix de revient de l'acide lactique a également été calculé pour *Bacillus coagulans* en réacteur discontinu. Globalement le prix de revient est encore plus élevés (7,5 F/Kg contre 6 F/Kg), avec une capacité de production de 4,1 tonnes/jour pour un réacteur de 72 m³ alors que pour le recyclage cellulaire ces valeurs étaient de 21 tonnes/jour pour un réacteur de 25 m³. Théoriquement, il faudrait au moins 5 réacteurs de 72 m³ en discontinu pour produire autant qu'un réacteur de 25 m³ en continu avec recyclage cellulaire. Ceci permet de confirmer les avantages du réacteur à haute densité cellulaire dans ce type de bioconversion.

④ L'extrait de levure est très cher, il est responsable d'au moins 25% du prix de revient de l'acide lactique. L'intérêt financier de sa supplémentation par des extraits beaucoup moins onéreux est important.

Le prix de l'acide lactique pour le procédé décrit par Tejayadi et Cheryan est de 0,98\$ le Kg soit environ **6F/Kg**. Le coût de l'extrait de levure représente 38,3% du prix de revient de l'acide lactique dans ce procédé. La substitution de 66% de cet extrait de levure par du « corn steep » (environ 8 fois moins cher) permettrait de baisser le prix de revient à 0,72\$/Kg soit moins de **4,4 F/Kg** (pour une capacité de production et une productivité équivalente).

**AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE**

o o o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

**Monsieur DIVIES Charles, Professeur ENSBANA Dijon,
Monsieur GOMA Gérard, Professeur, INSA Toulouse.**

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur PAYOT Thierry

à soutenir devant l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Développement d'un procédé intégré de production et d'extraction
d'acide lactique par un bacille thermophile "**


en vue de l'obtention du titre de :


**DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE**

Spécialité : **"BIOTECHNOLOGIES & INDUSTRIES ALIMENTAIRES"**

Fait à Vandoeuvre le, **16 Mars 1998**

Le Président de l'I.N.P.L.,


J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Résumé

L'objectif de ce travail était de développer un procédé intégré de production et d'extraction d'acide lactique. Dans une première partie, des études cinétiques ont été réalisées sur une souche atypique de *Bacillus coagulans*. Des cultures en mode discontinu et en continu ont été réalisées avec un réacteur de 2 litres parfaitement agité afin d'optimiser la composition du milieu de culture et, d'étudier les besoins nutritionnels de la souche bactérienne. Ces études avaient pour objet de décrire les effets des sources carbonées, azotées, des sels et des vitamines sur la souche. Des milieux de cultures ont spécialement été développés pour le réacteur à haute densité cellulaire.

Dans une seconde partie, la microfiltration du milieu de fermentation a été étudiée et optimisée par le biais d'un plan d'expérience et de la méthode des surfaces de réponses. Ces travaux avaient pour objet de trouver les conditions optimales pour atteindre un flux de perméat le plus important possible à l'état stationnaire. C'est la membrane de faible porosité (0,2 µm) qui a donné les meilleurs résultats.

Dans une troisième partie, un bioréacteur à membrane de 8 litres a été conçu et dimensionné. Premièrement, des fermentations ont été réalisées avec ce bioréacteur à haute densité cellulaire pour étudier et optimiser le taux de dilution et le taux de purge. De plus, une fermentation a été réalisée dans les conditions optimales et comparée avec les autres modes de culture. La productivité du procédé (45 g.L⁻¹.h⁻¹) a considérablement été augmentée en comparaison avec le procédé discontinu (1,2 g.L⁻¹.h⁻¹). La stabilité et la durabilité du procédé ont également été augmentées.

Enfin, dans une dernière partie, un modèle basé sur la loi de Monod a été testé et validé pour la souche *Bacillus coagulans* lors de cultures discontinues, continues et continues avec recyclage cellulaire.

Titre

Improvement of an integrated process for the production and the separation of lactic acid using thermophilic bacillus. Kinetic studies, high cell density bioreactor engineering and modeling.

Abstract

The aim of this work was to develop an integrated process for the production and the extraction of lactic acid. In a first part, kinetic studies were carried out on an atypical strain of *Bacillus coagulans*. The batch and continuous cultures were realized in 2 liters stirred reactor to optimize culture media and to study the nutritional requirement of the strain. These studies have allowed to describe the effects of carbon substrate, nitrogen substrates, salts and vitamins. Culture media were especially proposed for high cell density bioreactor.

In a second part, the microfiltration of fermentation broth was studied and optimized using an experimental design and response surface methodology. These works have allowed to find the optimal conditions to attain the most important permeate flow rate at steady state. The low porosity membrane (0,2 µm, 19 channels) has given the best results.

In a third part, an 8 liters membrane bioreactor was worked and engineered. Firstly, fermentation with this high cell density bioreactor were carried out to study and to optimize the dilution rate and the cell bleeding rate. Moreover, a fermentation with optimal conditions were realized and compared with the other culture modes. The process productivity (45 g.L⁻¹.h⁻¹) was significantly improved in comparison with batch process (1,2 g.L⁻¹.h⁻¹). The stability and the duration of the process was increased too.

At least, a model based on Monod kinetics was tested and validated for *Bacillus coagulans* on batch, continuous and continuous with cell recycling cultures.

Discipline : Biotechnologies et Industries Alimentaires

Mots clés : Acide lactique, fermentation, microfiltration, procédé intégré, *Bacillus coagulans*