

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

Université Akli Mohand Oulhadj - Bouira -

X•⊙V•EX •K||E C:K:|A :||K•Z - X:⊙E⊙÷t -



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة أكلي محمد أوحاج
- البويرة -

Faculté des Sciences et des Sciences Appliquées

كلية العلوم والعلوم التطبيقية

Département de Génie des procédés

Polycopié de cours

En: Génie de l'environnement

Niveau : Master



Bioprocédés

Par Arbia Leila

Année : 2020/2021

Sommaire

1. Réacteurs enzymatiques et fermenteurs.....	1
1.1.Généralités.....	1
1.2. Principaux types de bioréacteurs	1
1.2.1.Cuve mécaniquement agitée	2
1.2.1.1.Mobiles d'agitation	2
1.2.1.2.Temps de mélange	4
1.2.1.3Transfert thermique	5
1.2.2.Cuves mécaniquement agitées aérées.....	5
1.2.2.1. Cuves et mobiles d'agitation.....	5
1.2.2.2. Régimes hydrodynamiques. Puissance consommée	6
1.2.2.3.Coefficient volumique de transfert de matière gaz-liquide	7
1.2.2.4.Rétention de gaz.....	8
1.2.3. Colonne à bulles et réacteur airlift	8
1.2.4. Réacteurs à lit fixe ou fluidisé.....	9
1.3. Réacteurs enzymatiques.....	10
1.3.1. La cinétique des réactions enzymatiques.....	11
1.3.1.1. La vitesse initiale de réaction.....	11
1.3.2. Le site actif des enzymes.....	14
1.3.3.Les facteurs influençant la réaction enzymatique	15
1.3.2.1.Les facteurs physicochimiques.....	15
1.3.2.2.Les effecteurs chimiques.....	16
1.3.4.Enzymes immobilisées.....	18
1.3.4.1. Couplage entre réaction biochimique et transfert de matière liquide- solide.....	18
1.3.2.3.Couplage entre réaction biochimique et diffusion à l'intérieur d'un support solide poreux.....	20
1.4. Fermenteurs.....	23
1.4.1. Mesures, Contrôles Régulation.....	23
1.4.2. Cinétiques des réactions de croissance cellulaire et de production.....	25
1.4.3.Echange gazeux d'oxygène.....	30
1.4.3.1. Capacité de transfert.....	30
1.4.4.Equation du bilan massique sur le fermenteur.....	31
1.4.5. Fermentation discontinu non alimenté ou Batch.....	31
1.4.6. Fermentation discontinue alimentée ou Fed Batch.....	32
1.4.7. Fermentation continue.....	34
1.4.8. Le fermenteur à gradient de concentration.....	34
1.4.9. Fermentation avec recyclage de la biomasse.....	35
1.4.10. Phases et mise à l'échelle d'une fermentation.....	36
1.4.11. Processus de mise à l'échelle (ou extrapolation) : <i>scale up</i>.....	36

1.4.12. Les souches microbiennes et leurs milieux de culture.....	38
1.4.12.1. Caractéristiques des milieux de culture en industrie.....	38
1.4.12.2. Nettoyage sur place et stérilisation du bioréacteur.....	41
1.4.13. Souches microbiennes et préparation de l'inoculum.....	41
1.4.13.1. Critères et sélection des souches.....	41
1.4.13.2. Amélioration des souches.....	42
1.4.13.3. Conservation des souches.....	42
1.4.13.4. Caractéristiques de l'inoculum.....	42
1.4.13.5. Bioréacteurs et ses équipements.....	43
1.4.13.6. Extraction et purification des produits.....	47
2. Traitement des eaux usées par lagunage.....	49
2.1. Définition de la DBO ₅ et la DCO.....	50
2.2. Différents types de lagunage.....	51
2.2.1. Lagunage naturel.....	51
2.2.2. Lagunage aéré.....	53
2.2.3. Lagunage anaérobie.....	54
2.3. Dimensionnement d'une installation de lagunage.....	55
2.3.2. Dimensionnement des bassins facultatifs.....	55
2.3.3. Dimensionnement des bassins de maturation.....	55
3. Biofixation du CO ₂ par les microalgues.....	56
3.1. Origines du CO ₂	56
3.2. Voies de valorisation du CO ₂	57
3.3. Biofixation du CO ₂ par les microalgues.....	58
3.4. Croissance des micro-organismes photosynthétiques.....	58
3.4.1. Besoins généraux des micro-organismes photosynthétiques.....	58
3.4.2. Sélection de l'espèce de microalgue.....	58
3.4.3. Activité photosynthétique.....	58
3.5. Systèmes de culture des micro-organismes photosynthétiques.....	60
3.6. Modélisation de la vitesse de croissance.....	60
3.6.1. Modèle portant sur l'influence de la lumière.....	62
3.6.2. Modèle de bilan de matière.....	63
3.4. Dispositif expérimental.....	65
Références bibliographiques.....	66

Réacteurs enzymatiques et fermenteurs

1.1. Généralités

Les procédés de préparation de plusieurs produits alimentaires de grande consommation comportent au moins une étape mettant en jeu des microorganismes ou des enzymes :

- Lorsque cette étape est une réaction biochimique catalysée par des enzymes transformant un substrat en produit, elle est réalisée dans un **réacteur enzymatique**.

Les technologies de construction de ces deux types de réacteurs sont donc différents, en effet, les fermenteurs nécessitent l'emploi de matériaux résistant à la stérilisation par la chaleur (ils mettent en jeu de la matière vivante) et doivent être absolument étanche.

- Si cette étape fait appel à des microorganismes qui se développent en consommant une partie d'un réactif appelé substrat et en transformant l'autre en divers produits, le réacteur employé est un **fermenteur**.

Le choix du type de bioréacteur à utiliser dépend du nombre de phases à mettre en présence pour effectuer la bioréaction : une seule phase liquide (les microorganismes ayant une taille inférieure à 20 μm) ou une phase gaz dispersée dans une phase liquide (cas de culture aérobie et une densité très proche de celle de milieu de culture) ou encore une phase solide dispersée dans une phase liquide (ex : enzyme immobilisée).

Le choix du type de bioréacteur effectué, son dimensionnement et son mode de conduite reposent sur la connaissance des vitesses des réactions biochimiques ou biologiques et de leur couplage avec les vitesses de transferts de substrats, lorsque ceux-ci se trouvent dans une autre phase.

Les bioréacteurs sont conçus tel qu'ils doivent assurer 4 grandes fonctions :

- Bon transfert de matière
- Bon transfert de chaleur
- Maintien de la stérilité
- Suivi des paramètres et conduite de régulation

1.2. Principaux types de bioréacteurs

Les bioréactions s'effectuent toujours dans un solvant, l'eau, et les concentrations en substrats et produits, ainsi que les vitesses de réactions, sont faibles. Pour obtenir des productions convenables, il est nécessaire de recourir à des volumes réactionnels et des temps de séjour importants.

1.2.1. Cuve mécaniquement agitée

Elle est employée pour effectuer des réactions enzymatiques en solution ou encore des fermentations anaérobies.

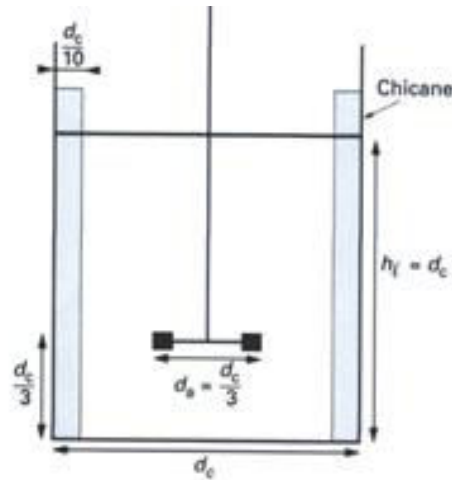


Figure 01 : Schéma représente une cuve mécaniquement agitée standard

1.2.1.1. Mobiles d'agitation

On distingue deux grandes familles d'agitateurs :

- Les agitateurs à mélange radial (cisailant) : le fluide est aspiré axialement et sort du mobile d'agitation radialement, il est donc propulsé avec changement de direction vers les parois d'où il est renvoyé vers le centre.
- Les agitateurs à mélange axial (non cisailant) : le fluide sort verticalement du mobile d'agitation qui agit comme une pompe, il est donc aspiré le long de son axe avant d'être rejeté vers le bas.

▪ Régime hydrodynamique

Le mouvement d'un liquide newtonien dans une cuve agitée est caractérisé par le nombre de Reynolds qui représente le rapport entre les forces d'inertie et de viscosité.

$$Re = \frac{d_a^2 N \rho_l}{\mu_l}$$

Avec :

d_a^2 (m) : diamètre de l'agitateur, ρ_l (kg/m³) : masse volumique du liquide






N (tr/s) : vitesse de rotation, μ_l : viscosité du liquide





Pour des nombres de Reynolds inférieurs à 10, le régime d'écoulement est laminaire et au-dessous d'un nombre de Reynolds de 10 000, le régime d'écoulement est turbulent.

La puissance mécanique P (W) consommée se calcul par l'intermédiaire du nombre de puissance qui représente le rapport entre les forces externes et la force d'inertie.

$$N_p = \frac{P(\text{watt})}{\rho_l N^3 d_a^5}$$

Tableau 01: Caractéristiques et utilisation des différents types de mobiles d'agitation

Mobile d'agitation		Caractéristiques	Utilisation
Débit radial	Turbines à pales radiales dite turbine Rushton	 (vue de profil) Vue de dessus) Vue plongeante)	Pales droites et étroites placées perpendiculairement sur un disque Utilisation à vitesse élevée
	Turbine à pales incurvées	 (vue de dessus)	Pales incurvées placées perpendiculairement sur un disque Grande efficacité de mélange, bon transfert de dioxygène
	Agitateur à pales rectangulaires	 (vue de profil)	Pales rectangulaires larges et longues placées au bout de l'arbre d'agitation
	Agitateur à ancre	 (vue de profil)	Pale rectangulaire large, longue et incurvée en forme d'ancre placée au bout de l'arbre d'agitation et dont la forme est adaptée au contour du bioréacteur
	Agitateur SPIN		Pales verticales disposées parallèlement à l'arbre et

		(vue de profil)	en libre rotation sur elles-mêmes	visqueux
Débit axial	Hélice type marine	 (vue de dessus)		Peu adaptées au transfert de dioxygène
	Hélice double flux	 (vue de profil)	Hélice munie à l'extrémité de chaque pale	Peu de turbulences Peu de cisaillement Utilisables pour les microorganismes fragiles
	Hélice à grandes pales minces	 (vue de dessus)	Hélice à grandes pales fines inclinées à 45°	Pour les fluides visqueux
	Agitateur à ruban hélicoïdal	 (Vue de profil)	Ruban en forme d'hélice dont l'axe est l'arbre d'agitation	

1.2.1.2. Temps de mélange

Le temps de mélange t_M est le temps nécessaire pour rendre la phase liquide homogène en concentration à la suite d'une perturbation, par exemple l'introduction d'un réactif.

En régime turbulent t_M est donné par les relations :

- ✓ Pour une hélice marine

$$t_M = \frac{6\left(\frac{d_c}{d_a}\right)^2}{N}$$

- ✓ Pour une turbine

$$t_M = \frac{4\left(\frac{d_c}{d_a}\right)^2}{N}$$

Avec :

d_c (m) : Diamètre de la cuve

Lorsqu'une cuve agitée est utilisée pour effectuer une réaction, on admet que ce réacteur est parfaitement mélangé si le temps de mélange est supérieur au temps de demi-réaction.

Les vitesses des réactions biologiques étant faibles, un temps de mélange de l'ordre de la minute est largement suffisant pour considérer la phase liquide parfaitement mélangée. En configuration standard, ce temps est atteint dès 55 tr/mn avec une hélice et dès 35 tr/mn avec une turbine.

1.2.1.3. Transfert thermique

Les bioréacteurs ont des vitesses lentes et des effets thermiques faibles, par conséquent, une double enveloppe suffit le plus souvent à réguler la température de la phase liquide. La plus grande résistance au transfert de chaleur se situe entre le liquide contenu dans la cuve et la paroi. La relation suivante permet de calculer le coefficient de transfert thermique dans le film liquide, du côté intérieur de la cuve

$$\frac{hd_c}{K} = 0,74 \left(\frac{d_a^2 N \rho_l}{\mu_l} \right)^{\frac{2}{3}} \left(\frac{C_p \mu_l}{K} \right)^{1/3}$$

h (W.m⁻².k⁻¹) coefficient de transfert thermique

c_p (J. Kg⁻¹.k⁻¹) capacité thermique massique du liquide

k (W. m⁻¹. K⁻¹) conductivité thermique du liquide

1.2.2. Cuves mécaniquement agitées aérées

Elle est utilisée pour la production de microorganismes en aérobiose. L'oxygène qui est très peu soluble dans les milieux de fermentation (8 mg/l à 25°C dans l'eau) est alors le substrat limitant. La vitesse globale de formation des microorganismes est la résultante du couplage entre leur vitesse propre de croissance et la vitesse de transfert de l'oxygène de la phase gaz dispersée vers le milieu de fermentation. La puissance mécanique consommée sert à la fois à mélanger la phase liquide et à générer une aire interfaciale importante entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation.

1.2.2.1. Cuves et mobiles d'agitation

La figure représente la configuration standard. Il existe des cuves multiagitateurs de hauteur égale à plusieurs fois leur diamètre pour augmenter le temps de séjour du gaz. Le gaz est injecté dans la cuve sous le mobile d'agitation par un anneau perforé.

Le mobile d'agitation a un double rôle :

- Mélanger la phase liquide
- Disperser les bulles d'air injectées dans la cuve et éviter leur coalescence
- Les mobiles cisailants sont les seuls utilisés pour casser les bulles de gaz.

Les mobiles cisailants sont les seuls utilisés, car les contraintes mécaniques qu'ils génèrent permettent, en cassant les bulles de gaz, d'obtenir des bulles de petites tailles et donc une aire d'échange interfaciale gaz-liquide importante :

$$a = \frac{6 \varepsilon_g}{d_b}$$

Avec a (m^2/m^3) : aire spécifique volumique d'échange

d_b (m) : diamètre des bulles

ε_g : rétention de gaz

$$\varepsilon_g = \frac{\text{Volume du gaz}}{\text{volume de la suspension}}$$

1.2.2.2. Régimes hydrodynamiques. Puissance consommée

Il existe 3 régimes hydrodynamiques dépendant de la vitesse de rotation du mobile et du débit de gaz injecté dans le réacteur :

- Engorgement (les bulles de gaz ne sont pas affectées par l'agitation)
- Charge (les bulles de gaz sont mélangées au-dessus de l'agitateur)
- Dispersion (les bulles de gaz sont cassées et mélangées dans toute la cuve)

Les transitions entre ces régimes sont caractérisées par les valeurs de deux nombres sans dimension :

- ✓ Le nombre d'aération :

$$N_a = \frac{G}{N d_a^3}$$

- ✓ Le nombre de Froude :

$$Fr = \frac{N^2 d_a}{g}$$

G (m^3/s) débit volumique du gaz

g ($9,81 \text{ m/s}^2$) accélération de la pesanteur

Fr permet de prédire la formation d'un vortex

Si $Fr \leq 1$ (pas de vortex)

Si $Fr \geq 3$ (vortex)

Le régime de dispersion est le plus efficace et c'est celui que l'on choisira. Il correspond, si le liquide est de l'eau, à des nombres d'aération N_a inférieurs à la limite :

$$N_{a_{dc}} = 0,2 \left(\frac{d_a}{d_c}\right)^{0,5} Fr^{0,5}$$

Dans ce régime la dispersion du gaz est assurée par la formation de cavités à l'arrière des pales de la turbine. La meilleure efficacité est obtenue lorsque les cavités adhèrent sur toute la surface des pales, situation observée pour $Na > 0,1$.

Dans le domaine de génie biochimique, l'aération est souvent caractérisée par le taux d'aération qui s'exprime en volume de gaz introduit par volume de liquide [VVM (volume de gaz par volume de liquide et par minute)].

La puissance mécanique P_g (W) consommée par une cuve aérée est inférieure à la puissance consommée par une cuve non aérée. Ce phénomène s'explique par la présence des cavités de gaz qui diminuent la trainée des pales dans le liquide.

Le rapport P_g / P diminue régulièrement avec le nombre d'aération et devient constant pour $Na > 0,1$, il vaut alors

$$\frac{P_g}{P} = 0,27 + \frac{0,022}{FR}$$

A côté de cette relation récente, la relation empirique de Michel et Miller est couramment utilisée dans les industries de fermentation, y compris pour des milieux faiblement non newtonien :

$$P_g = 0,34 \sqrt{N_p} \left(\frac{P^2 N d_a^3}{G^{0,56}} \right)^{0,45}$$

1.2.2.3. Coefficient volumique de transfert de matière gaz-liquide

En cuve mécaniquement agitée aérée, le coefficient volumique de transfert ($k_l a$) est un paramètre essentiel, car sa valeur doit être suffisante pour que les besoins en oxygène du microorganisme soient satisfaits.

- Pour l'eau (milieu coalescent)

$$K_l a = 2,6 \cdot 10^{-2} \left(\frac{P_g}{V_l} \right)^{0,4} U_g^{0,5}$$

V_l (m³): volume du liquide

$U_g = G/A$ (m/s) : vitesse superficielle du gaz

A (m²) : aire de section droite de la cuve

- Pour les solutions salines (milieux non coalescents)

$$K_l a = 2,0 \cdot 10^{-3} \left(\frac{P_g}{V_l} \right)^{0,7} U_g^{0,2}$$

1.2.2.4. Rétention de gaz

La fraction du gaz dans la dispersion peut être estimée par deux relations, l'une établie pour de l'eau (milieu coalescent) et l'autre pour des solutions salines (milieux non coalescent).

Pour l'eau :

$$\frac{\varepsilon_g}{1 - \varepsilon_g} = 0,206 \left(\frac{P_g}{V_l}\right)^{0,36} U_g^{0,72} \left(\frac{d_a}{d_c}\right)^{0,36}$$

Dans le domaine :

$$500 \text{ W/m}^3 < \frac{P_g}{V_l} < 3000 \text{ W/m}^3$$

Pour les solutions salines :

$$\frac{\varepsilon_g}{1 - \varepsilon_g} = 0,0051 \left(\frac{P_g}{V_l}\right)^{0,57} U_g^{0,24}$$

Dans le domaine :

$$100 \frac{\text{W}}{\text{m}^3} < \frac{P_g}{V_l} < 10000 \text{ W/m}^3$$

1.2.2.5. Temps de mélange et transfert thermique

En cuve mécaniquement agitée aérée, les vitesses de rotation des mobiles étant plus élevées, pour disperser la phase gaz, il en est a fortiori de même qu'en cuve mécaniquement agitée.

Lorsque la rétention de gaz ε_g est inférieure à 15%, il a été montré que le coefficient de transfert thermique dans le film liquide, du côté intérieur de la cuve, n'est pratiquement pas affecté par la présence de gaz. On utilisera donc la relation précédente pour calculer ce coefficient.

Cuves multiagitateurs : pour n agitateurs, la puissance mécanique est égale à n fois la puissance consommée par une cuve standard.

1.2.3. Colonne à bulles et réacteur airlift

Comparativement à la cuve mécaniquement agitée aérée, la colonne à bulles ne comporte pas de pièces en mouvement et ne consomme pas de puissance mécanique d'agitation. Sa fiabilité est plus grande et son coût en investissement et en fonctionnement plus faible. Par contre, ses performances de transfert d'oxygène sont nettement moins bonnes, car aucun effet mécanique ne vient s'opposer à la coalescence des bulles de gaz, phénomène qui diminue l'aire interfaciale entre les bulles de gaz et le milieu de fermentation.

La colonne à bulles est aussi employée lors des fermentations anaérobies, l'agitation pneumatique étant alors réalisée par les bulles de gaz carbonique dégagées *in situ* pendant la fermentation, ex : les cuves de vinification.

Le réacteur airlift est un appareil dérivé de la colonne à bulles et est utilisé pour les seules cultures aérobies.

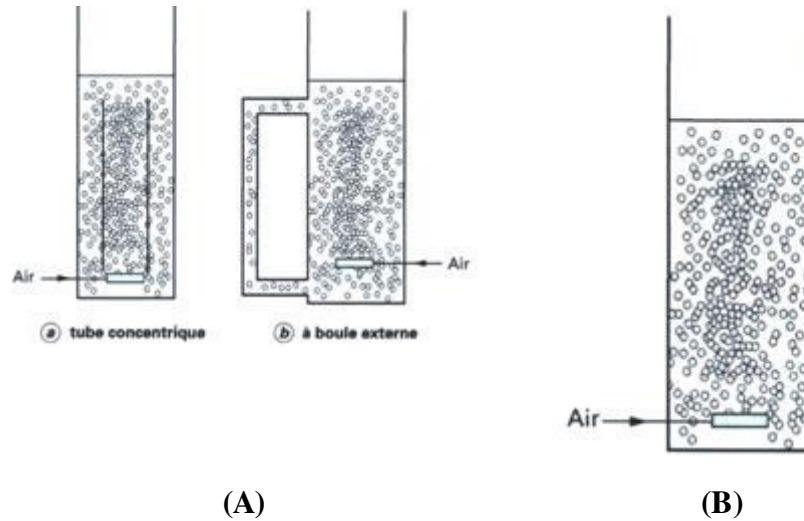


Figure 02 : schéma représentatif du réacteur airlift (A) et de la colonne à bulles (B)

1.2.4. Réacteurs à lit fixe ou fluidisé

Un bioréacteur à lit fixe est constitué d'un tube de section circulaire rempli de particules solides rendues actives par fixation de microorganismes ou d'enzymes et dont les extrémités sont fermées par des grilles ou des plaques perforées et permettant la percolation d'une phase liquide, mais empêchant tout mouvement de la phase solide dispersée. Si les particules sont de forme sphérique la fraction de réacteur occupée par la phase solide est de l'ordre de 0,6, celle occupée par la phase liquide étant alors 0,4.

$$\frac{\Delta P}{H} = \frac{150 \mu_l U_l}{d_p^2} \frac{(1 - \epsilon_l)^2}{\epsilon_l^3} + \frac{1,75 \rho_l U_l^2}{d_p} \frac{(1 - \epsilon_l)}{\epsilon_l^3}$$

ΔP (Pa) perte de charge, d_p (m) diamètre de particules, ϵ_l fraction de lit occupée par la phase liquide (rétention de liquide), H (m) hauteur de lit, U_l (m/s) vitesse superficielle du liquide,

μ (Pa.s) viscosité du liquide.

Un bioréacteur à lit fluidisé est aussi constitué d'un tube de section circulaire rempli de particules solides actives, mais forcément placé verticalement et dont seule l'extrémité inférieure est fermée par une grille ou une plaque perforée.

La phase liquide traverse le réacteur de bas en haut et comme les particules solides ne sont pas confinées, dès que la vitesse superficielle du liquide dépasse la valeur U_{Imf} appelée vitesse minimale de fluidisation, le lit s'expande et les particules solides se déplacent librement à l'intérieur de la suspension liquide-solide. On dit alors que le lit est fluidisé.

1.3. Réacteurs enzymatiques

Les enzymes sont des protéines qui ont, en raison de leur structure spatiale, la propriété de catalyser des bioréactions de manière très spécifique et très efficace. On connaît actuellement plus de 2000 enzymes.

Tableau 02: Enzymes utilisées en industrie alimentaire

Enzymes	Produits	Emploi
α -amylase	Sirops de sucres Bière Pain, biscuits	Liquéfaction de l'amidon Elimination de l'amidon Complémentation de farine
Amyloglucosidase	Edulcorants Bière et jus de fruits Pain	Saccharification Elimination de l'amidon Amélioration de la couleur de la croûte
β -galactosidase	Produits laitiers à faible teneur En lactose Crèmes glacées	Elimination du lactose Conservation de la texture
Chymosine	Fromages	Coagulation des protéines
Glucose isomérase	Sirops à teneur en fructose élevée	Conversion du glucose en fructose
Glucose oxydase	Jus de fruits	Elimination de l'oxygène
Invertase	Sirops de sucre	Liquéfaction du saccharose
Lipases	Fromages Arômes	Développement d'arômes Synthèse d'esters
Papaine	Bière	Elimination des protéines
Pectinases	Vins et jus de fruits	Clarification
Protéases	Produits laitiers Pain, biscuit Viande	Modification des protéines de lait Diminution de la teneur en gluten Attendrissement, séparation des os

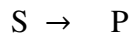
Tableau 03 : microorganismes utilisés en industrie alimentaire

Microorganismes		Produits
Bactéries	Bactéries lactiques : lactobacillus, streptococcus Leuconostoc Bactéries acétiques Corynébactérie	Yaourts, fromages ; salaisons, choucroute, pain Fermentation malo-lactique Vinaigre fromages
Levures	Saccharomyces cerevisiae	Pain, vin, bière, alcool
Moisissures	Pénicillium Aspergillus Mucor	Fromages Saké Présure pour fromagerie

1.3.1. La cinétique des réactions enzymatiques

1.3.1.1. La vitesse initiale de réaction

Soit la réaction catalysée par l'enzyme E qui transforme le substrat S en produit P :



La vitesse instantanée est la quantité de S disparue par unité de temps ou la quantité de P apparue par unité de temps : elle est proportionnelle à la concentration du substrat :

$$V = - \frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt} = K \cdot C$$

Pour des concentrations de [E] et de [S] données, on mesure la quantité de P formé en fonction du temps :

La courbe [P]=f(t) est : Dès que l'on met l'enzyme en contact avec une solution contenant le substrat, on observe la formation du produit en fonction du temps.

- ✓ D'abord linéaire ascendante : l'enzyme est saturé par son substrat, la vitesse est constante
- ✓ Puis s'infléchit : l'enzyme n'est plus saturé par son substrat, la vitesse décroît
- ✓ Et enfin devient horizontale : l'équilibre de la réaction est atteint et la vitesse est nulle.

A l'instant t, $v = t \tan \alpha$. A l'instant t_0 , v est maximale, c'est la vitesse initiale V_i de la réaction : $V_i = t_0 \tan \alpha$.

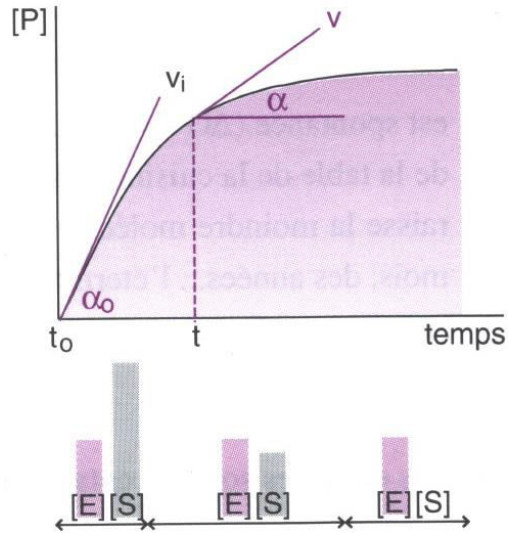


Figure 03 : Courbe de la formation du produit en fonction du temps

✓ **Influence de la concentration du substrat sur la vitesse initiale**

A $[E]$ constant, on répète la mesure de V_i à des concentrations croissantes de S . La courbe $V_i = f([S])$ est une hyperbole équilatère qui tend asymptotiquement vers une valeur limite, la vitesse maximale ou V_{max} .

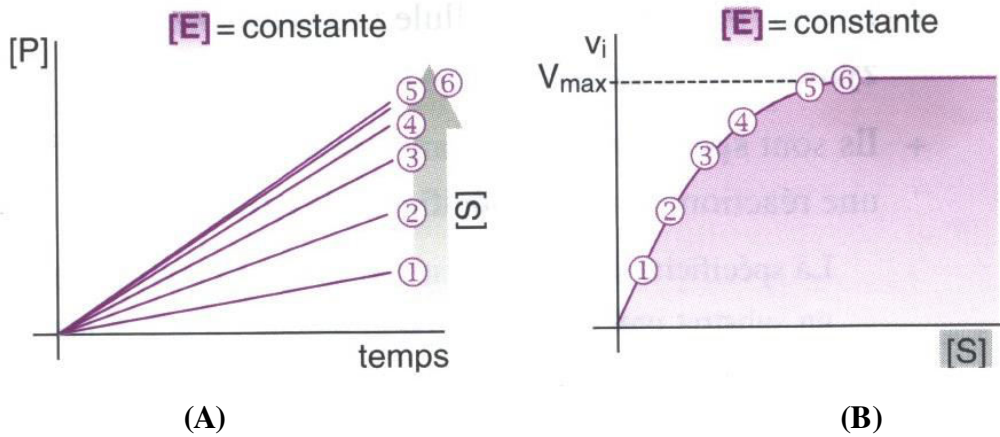


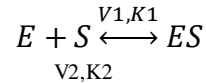
Figure 04 : Graphe de la formation du produit en fonction du temps et de la concentration du substrat (A), courbe de la vitesse de la réaction en fonction de la concentration du substrat (B)

✓ **Le modèle de Michaelis-Menten**

L'équation de Michaelis-Menten

La réaction $S \xrightarrow[E]{} P$ se décompose en 2 temps :

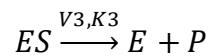
1- La formation du complexe enzyme-substrat, étape rapide et réversible :



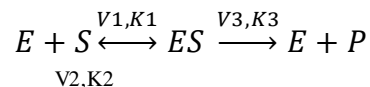
V_1 et K_1 sont la vitesse et constante de formation du complexe ; V_2 et K_2 sont la vitesse et constante de dissociation du complexe ES

2- Formation du produit P à partir du complexe enzyme-substrat, étape plus lente :

V_3 et K_3 sont la vitesse et la constante de formation du produit



La réaction globale devient :



La vitesse de disparition de S est égale à la vitesse d'apparition de P = $-\frac{dS}{dt} = \frac{dP}{dt}$

or : $-\frac{dS}{dt} = V_1 - V_2 = K_1[E][S] - K_2[ES]$ et $\frac{dP}{dt} = V_3 = K_3[ES]$

donc: $K_1[E][S] - K_2[ES] = K_3[ES]$

D'où : $\frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{K_2 + K_3}{K_1} = KM$ est la constante de Michaelis

L'enzyme est soit sous forme libre E, soit sous complexée au ES :

$$[E]_T = [E] + [ES]$$

$[E]_T$ étant la concentration totale de l'enzyme

Donc: $KM = \frac{([E]_T - [ES])[S]}{[ES]} = \frac{[E]_T [S]}{[ES]} - [S]$

D'où : $[ES] = \frac{[E]_T [S]}{KM + [S]}$

La vitesse de la réaction V_i est égale à V_3 , vitesse de l'étape la plus lente :

$$V_i = V_3 = K_3[ES] \quad \text{D'où : } V_i = \frac{K_3 [E]_T [S]}{KM + [S]}$$

Or : $V_{\max} = K_3 [E]_T$

Donc :
$$V_i = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$$

C'est l'équation de Michaelis-Menten. La courbe $V_i=f([S])$ de l'équation de Michaelis-Menten est une branche d'hyperbole équilatère qui passe par l'origine et dont l'asymptote, lorsque $[S]$ tend vers l'infini, vaut $V_i=V_{max}$. On calcule que, pour $V_i=V_{max}/2$, lorsque $[S] = K_M$:

$$V_i = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]} = \frac{V_{max}}{2}, \quad 2[S] = K_M + [S], \quad [S] = K_M$$

La constante de Michaelis- Menten, pour une réaction à un substrat, est égale à la concentration de S correspondant à $V_{max}/2$

✓ Quand $[S] \ll K_M$, $V_i = \frac{V_{max}[S]}{K_M} = Cste [S]$

V_i est fonction linéaire de la concentration du substrat. C'est donc en excès d'enzyme que l'on dose un substrat.

- ✓ Quand $[S] \gg K_M$, $V_i = V_{max} = K_3 [E_T]$ V_i est fonction linéaire de la concentration de l'enzyme. C'est donc en excès d'enzyme que l'on dose une enzyme.
- ✓ **Signification des paramètres cinétiques**
- ✓ La V_{max} est la vitesse de la réaction lorsque l'enzyme est à saturation c'est-à-dire lorsque la moitié des molécules de l'enzyme sont complexés au substrat. Quand K_3 est très petit devant K_1 .

$$K_M = \frac{K_2}{K_3}$$

K_M est donc inversement proportionnel à l'affinité de l'enzyme pour le substrat. Quand K_3 n'est pas négligeable, c'est moins simple, mais il reste que K_M et affinité varient en sens inverse.

1.3.2. Le site actif des enzymes

Le site actif d'une enzyme est la région où se fixe les substrats et le coenzyme, et où lieu de réaction. Il joue un double rôle : celui de site de fixation du substrat et celui de site catalytique. Le site actif est localisé au fond d'une poche de la zone interne hydrophobe de la protéine.

Les liaisons entre enzyme et substrat ne sont pas de nature covalente. La spécificité de l'enzyme pour son substrat est l'une des caractéristiques de la catalyse enzymatique.

Modèle de la clé et de la serrure : la forme du substrat (clé) est complémentaire de celle du site actif de l'enzyme (serrure).

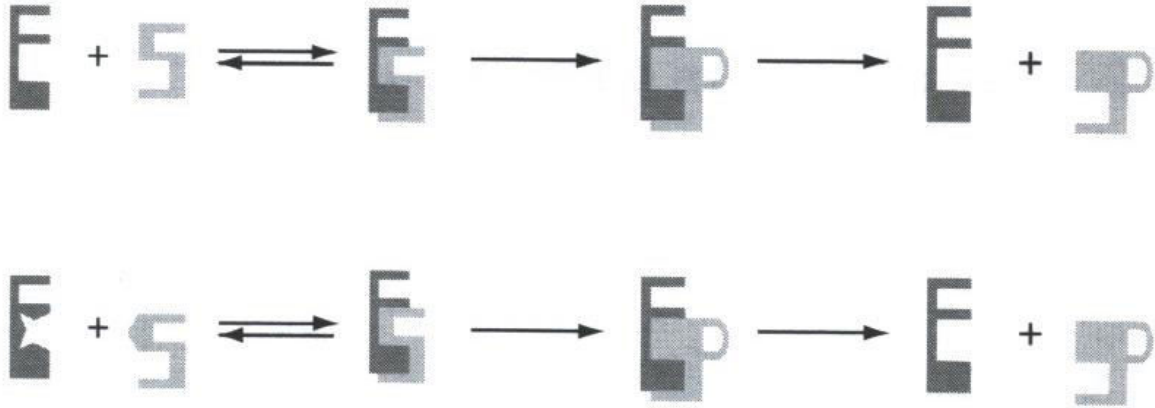


Figure 05 : schéma illustrant la spécificité de l'enzyme envers son substrat (modèle de la clé et la serrure)

1.3.3. Les facteurs influençant la réaction enzymatique

1.3.3.1. Les facteurs physicochimiques

✓ **La température** : elle a deux effets sur la réaction enzymatique : elle l'accélère comme toutes réactions chimiques et elle entraîne progressivement la dénaturation de la protéine.

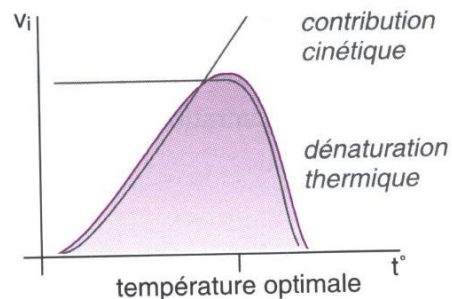


Figure 06 : courbe de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction de la température

✓ **Le pH** : il a 2 effets sur la réaction enzymatique : aux valeurs extrêmes il dénature donc désactive la protéine en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés. Aux valeurs intermédiaires, il influe sur l'activité en modifiant l'état d'ionisation des chaînes latérales des acides aminés du site actif et celui du substrat.

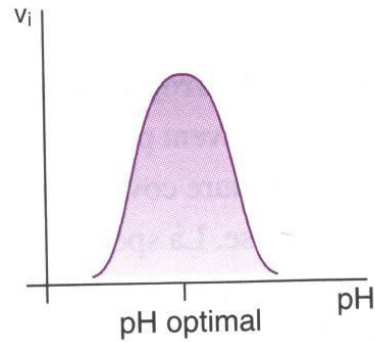


Figure 07 : Courbe de la vitesse de la réaction enzymatique en fonction du pH

1.3.3.2. Les effecteurs chimiques

On distingue les inhibiteurs, qui diminuent l'activité enzymatique, et les activateurs ; qui l'augmentent.

✓ Les inhibiteurs

Les inhibiteurs spécifiques ralentissent la vitesse de la réaction enzymatique, jusqu'à la stopper. Cette inhibition peut être levée dans des conditions réactionnelles particulières (inhibiteurs réversibles) ou ne pas l'être (inhibiteurs irréversibles).

Les inhibiteurs réversibles

On distingue 3 modes d'inhibition : compétitive, non compétitive et mixte.

✓ Inhibiteurs compétitifs

Analogues structuraux du substrat : ils se fixent de façon non covalente au site actif de l'enzyme à la place du substrat. Ils diminuent l'affinité de l'enzyme pour le substrat, donc augmentent la K_M , mais ne modifient pas la V_{max} puisque l'inhibiteur peut être déplacé du complexe ES par un excès de substrat.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{KM + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right) + 1}$$

✓ Inhibiteurs non compétitifs

Non analogues structuraux du substrat, les inhibiteurs non compétitifs se fixent de façon non covalente en un site différent du site actif de l'enzyme, à la fois sur l'enzyme et sur le complexe enzyme-substrat. Ils ne diminuent pas l'affinité de l'enzyme pour le substrat, donc ne modifient pas la K_M , mais diminuent la V_{max} puisque l'inhibiteur ne peut être déplacé du complexe ternaire ESI par un excès de substrat.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)(KM + [S])}$$

✓ **Inhibiteurs incompétitifs**

C'est un mode assez fréquent, combinant inhibitions compétitive et non compétitive. Il en résulte que les K_M et V_{max} sont modifiés.

Ils se fixent uniquement sur le complexe enzyme-substrat et n'ont aucune affinité pour l'enzyme lui-même.

$$V = \frac{V_{max}[S]}{KM + \left(1 + \frac{[I]}{K_I}\right)[S]}$$

Enfin une concentration élevée en substrat peut entraîner, pour certaines réactions, un phénomène d'inhibition. Cette inhibition par le substrat conduit à la loi de vitesse

$$V = \frac{V_{max}[S]}{KM + [S] + \frac{[S]^2}{K_s}}$$

✓ **Les inhibiteurs irréversibles**

Ils se lient de façon covalente à un groupement fonctionnel indispensable à l'activité catalytique.

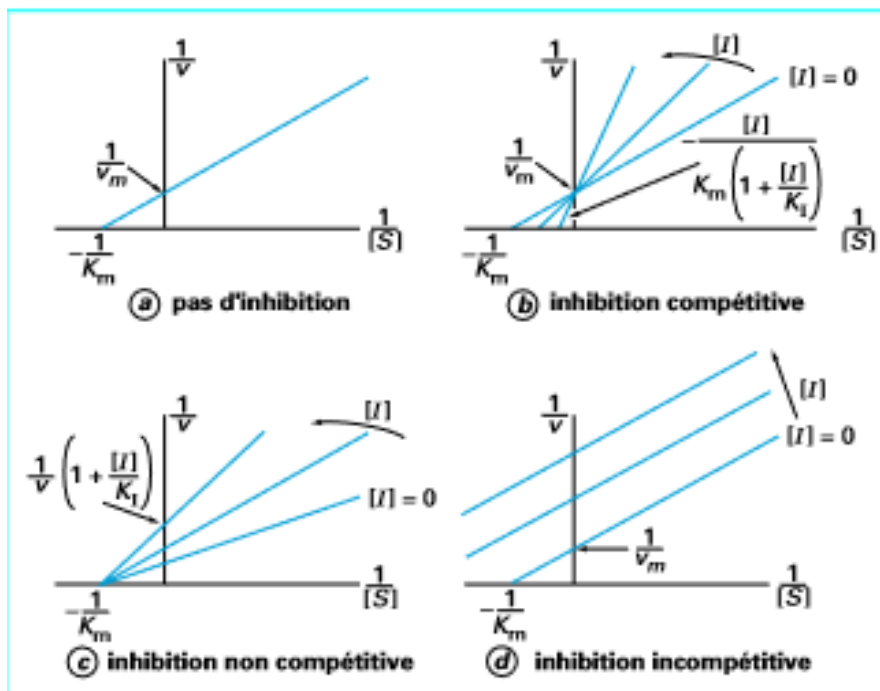


Figure 08 : Graphes représentatifs des différents types d'inhibition des réactions enzymatiques

✓ Les activateurs

Ils sont de natures diverses :

Activation par les ions métalliques : ils peuvent favoriser une bonne conformation de l'enzyme, la fixation du substrat sur l'enzyme ou participer directement à la catalyse, ex : Mg^{2+} .

1.3.4. Enzymes immobilisées

Pour séparer facilement les enzymes des milieux liquides après réactions, on peut les fixer soit à la surface de particules non poreuses, soit à l'intérieure de particules poreuses.

Les lois de vitesse sont de la même forme, mais les vitesses V et V_m s'expriment, lors d'une fixation en surface, en $mol/m^2.s$ de surface de contact liquide-solide ou encore en $mol/kg.s$ de support.

Si l'enzyme est incluse dans des particules poreuses, les vitesses V et V_m s'expriment en $mol/m^3.s$ de phase solide ou en $mol/kg.s$ de support.

Les concentrations en substrat et produit à prendre en compte dans les équations cinétiques sont alors les concentrations à l'interface liquide-solide, dans le cas d'une immobilisation en surface, ou les concentrations dans la phase liquide qui imbibe les pores des particules solides, dans le cas d'une inclusion.

1.3.4.1. Couplage entre réaction biochimique et transfert de matière liquide-solide

Ce couplage est observé lorsqu'un substrat réagit à la surface de particules solides sur lesquelles sont fixés une enzyme ou des microorganismes. Le substrat se déplace du cœur de la phase liquide à l'interface liquide-solide où il est consommé par bioréaction. Un régime quasi-stationnaire est rapidement atteint, et la concentration en substrat à l'interface $[S_i]$ s'établit à une valeur telle que la vitesse de transfert de matière soit égale à la vitesse de la bioréaction.

En choisissant ici, pour illustrer ce couplage, une réaction enzymatique obéissant à la loi cinétique simple de Michaelis et Menten, l'égalité des vitesses permet alors d'écrire :

$$K_l a' ([S] - [S_i]) = \frac{V'_m [S_i]}{K_m + [S_i]}$$

Avec K_l (m/s) coefficient de transfert de matière liquide-solide ;

a' (m^2/Kg) aire spécifique massique du solide ;

V'_m ($mol. S^{-1}.Kg^{-1}$) vitesse spécifique maximale de bioréaction par unité de masse de support solide ;

$[S]$ (mol/m^3) concentration en substrat au cœur du liquide ;

$[S_i]$ (mol/m^3) concentration en substrat à l'interface liquide-solide ;

K_m (mol/m³) constante de Michaelis et Menten

En transformant cette relation pour la mettre sous forme adimensionnelle, on obtient :

$$\left(\frac{K_m}{[S]} + \frac{[S_i]}{[S]}\right) \left(1 - \frac{[S_i]}{[S]}\right) = Da \frac{[S_i]}{[S]}$$

$Da = \frac{V'_m}{K_1 a' [S]}$ est le nombre de Damkohler qui représente le rapport entre la vitesse maximale de réaction et vitesse maximale de transfert de matière.

Phénomène est donc limitant. La relation précédente montre alors que $[S_i]$ est très petit devant $[S]$ et la vitesse du processus est égale à $K_1 a' [S]$.

Au contraire, lorsque le nombre de Damkohler est très petit devant 1, c'est la réaction biochimique qui est le phénomène limitant, $[S]$ et la vitesse du processus est donc égale à $\frac{V'_m [S_i]}{K_m + [S_i]}$.

Quand le nombre de Damkohler n'est ni très grand, ni très petit devant 1, la réaction ci-dessus, du second degré par rapport à $[S_i]$ permet le calcul de $\frac{[S_i]}{[S]}$:

$$\frac{[S_i]}{[S]} = \frac{1}{2} \left(Da + \frac{K_m}{[S]} - 1 \right) \left(\pm \sqrt{1 + \frac{4 \frac{K_m}{[S]}}{\left(Da + \frac{K_m}{[S]} - 1 \right)^2}} - 1 \right)$$

Le signe à choisir devant la racine carrée est le signe de $Da + \frac{K_m}{[S]} - 1$ de manière à ce que le rapport $\frac{[S_i]}{[S]}$ soit positif.

La concentration à l'interface en substrat $[S_i]$ permet alors le calcul du facteur d'efficacité η_e , défini classiquement comme le rapport entre la vitesse observée du processus et la vitesse maximale de réaction. Ce facteur vaut ici :

$$\eta_e = \frac{\left(\frac{[S_i]}{[S]}\right) \left(1 + \frac{K_m}{[S]}\right)}{\left(\frac{[S_i]}{[S]}\right) + \left(\frac{K_m}{[S]}\right)}$$

La figure suivante montre les variations du facteur d'efficacité η_e en fonction du Da pour différentes valeurs du rapport $\frac{K_m}{[S]}$.

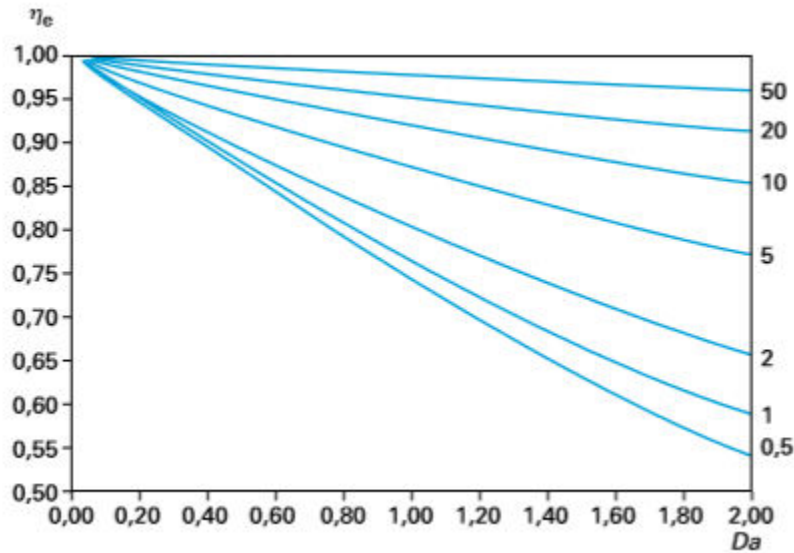


Figure 09 : Facteur d'efficacité pour un transfert de matière liquide-solide

On a toujours intérêt à travailler avec un facteur d'efficacité proche de 1 (Da très inférieur à 1).

1.3.4.2. Couplage entre réaction biochimique et diffusion à l'intérieur d'un support solide poreux

Ce couplage est observé lorsque des enzymes ou des microorganismes sont inclus à l'intérieur de particules poreuses ou de gel ; on le rencontre aussi lors du développement de films microbiens.

A l'intérieur de la particule, il existe un gradient de concentration en substrat et donc de vitesse de consommation de celui-ci.

En régime quasi-stationnaire, un bilan de matière différentiel sur le substrat conduit aux équations différentielles suivantes :

_ en configuration sphérique : $D_{eff} \left(\frac{d^2[S]}{dr^2} + \frac{2}{r} \frac{d[S]}{dr} \right) = v''$

_ en configuration film plan : $D_{eff} \left(\frac{d^2[S]}{(dx)^2} \right) = v''$ avec les conditions aux limites suivantes :

- (1) $[S] = [S_i]$ pour $x = L$ ou $r = R$; continuité de la concentration en substrat à l'interface liquide-solide ;
- (2) $\frac{d[S]}{dr} = 0$ ou $\frac{d[S]}{dx} = 0$ pour $r = 0$ ou $x = 0$; arrêt de la diffusion au centre de particule ou l'extrémité du film.

Dans ces relations, L (m) représente l'épaisseur du film, R (m) le rayon de la particule, r et x les coordonnées courantes, $[S]$ (Kg/m^3) la concentration en substrat dans la phase liquide qui imbibe le milieu solide poreux, $[S_i]$ (Kg/m^3) la concentration en substrat dans la phase liquide à la surface de la particule, V'' ($\text{mol.S}^{-1}.\text{m}^3$) la vitesse spécifique de bioréaction par unité de volume de support solide et D_{eff} (m^2/S) le coefficient de diffusion effectif du substrat dans le milieu poreux.

Ce coefficient D_{eff} dépend de la diffusivité du substrat ainsi que de la tortuosité et de la porosité du solide.

A partir de la connaissance de la loi de vitesse : $V'' = V''([S])$,

La résolution des équations ci-dessus conduit au facteur d'efficacité η_i , défini comme le rapport entre la vitesse observée et la vitesse $V''([S_i])$ qu'aurait la réaction biochimique en l'absence de gradient de concentration intraparticulaire en substrat.

Lorsque la vitesse de la réaction est d'ordre 1 par rapport au substrat, ce qui est rarement le cas des réactions biochimiques ou biologiques, il existe une expression analytique du facteur d'efficacité.

Dans le cas d'une bioréaction obéissant à la loi cinétique de Michaelis et Menten :

$$V'' = \frac{V''_m [S]}{K_m + [S]}$$

Ces équations différentielles ont été résolues numériquement,

Le facteur d'efficacité η_i est alors fonction du rapport $\frac{K_m}{[S_i]}$ et d'un module de Thiele ici défini :

- En configuration sphérique, par : $\phi = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{V''_m}{D_{\text{eff}} K_m}}$
- En configuration plane, par : $\phi = L \sqrt{\frac{V''_m}{D_{\text{eff}} K_m}}$

La figure suivante montre les variations du facteur d'efficacité η_i en fonction du module de Thiele (configuration sphérique) pour différentes valeurs du rapport $\frac{K_m}{[S_i]}$.

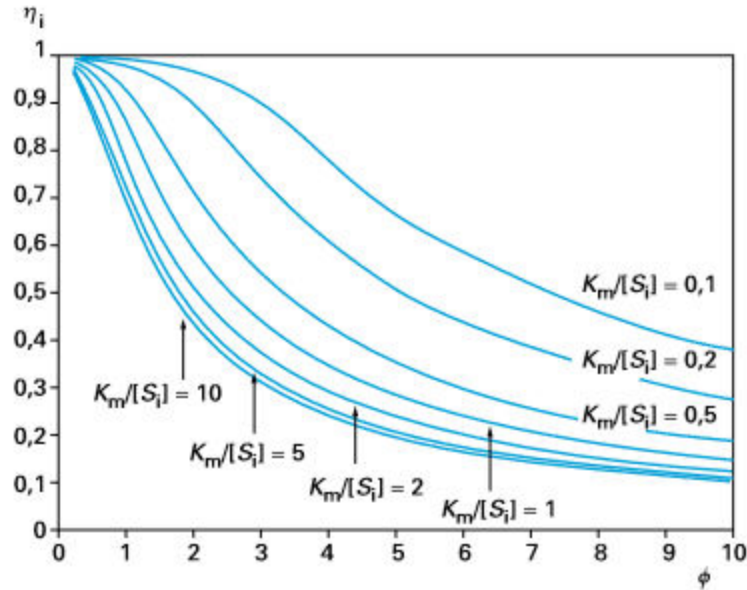


Figure 10 : Facteur d'efficacité pour un transfert de matière intraparticulaire ; cas de particules sphériques

Les paramètres intrinsèques V'' et K_m de la bioréaction sont difficiles à déduire d'expériences de laboratoire, car les phénomènes de diffusion et de réaction ne peuvent jamais être découplés ; un traitement numérique est nécessaire pour les extraire des variations de la vitesse observée V''_{obs} en fonction de la concentration en substrat $[S_i]$.

En pratique, cependant, il suffit souvent de savoir si, pour des conditions de travail données, la diffusion intraparticulaire affecte ou non la vitesse de la bioréaction. A cette fin, il a été défini, à partir de la vitesse expérimentalement observée, un autre module de Thiele :

- En configuration sphérique :
$$\phi = \frac{V''_{obs} R^2}{9D_{eff} [S_i]}$$

- En configuration plane :
$$\phi = \frac{V''_{obs} L^2}{D_{eff} [S_i]}$$

Lorsque $\phi < 0,3$, la diffusion n'affecte pas la réaction ; $\eta_i=1$ et la vitesse observée est la vitesse de la bioréaction.

Si $\phi > 0,3$, la conception précise du bioréacteur passe par la détermination des paramètres intrinsèques de la bioréaction.

La relation de Monod étant formellement identique à la relation de Michaelis et Menten, les résultats ci-dessus sont transposables à la croissance de microorganismes en biofilm ou inclus dans des particules.

1.4. Fermenteurs

1.4.1. Mesures, Contrôles Régulation

A l'image de nombreux procédés chimiques, l'automatisation et l'informatisation sont aujourd'hui très développées sur les sites de production. Les mesures courantes effectuées sont les suivantes :

- Vitesse d'agitation
- Aération (volume d'air injecté dans le réacteur par unité de temps)
- Température
- pH
- Pression
- Détection de mousse
- Oxygène dissout
- Gaz carbonique dissout
- Oxygène dans la phase gazeuse en sortie du fermenteur
- Gaz carbonique dans la phase gazeuse en sortie du fermenteur
- Masse

Des mesures plus spécifiques peuvent être rencontrées

- Turbidimétrie
- Boucle de filtration avec analyse en ligne Glucose-Acides organiques HPCL
- Méthane hydrogène (méthanisation Plusieurs particularités sont à mentionner compte tenu de la spécificité des cultures des microorganismes
- Maitrise des phénomènes de moussage
- Evolution des gaz dissout dans le milieu de fermentation

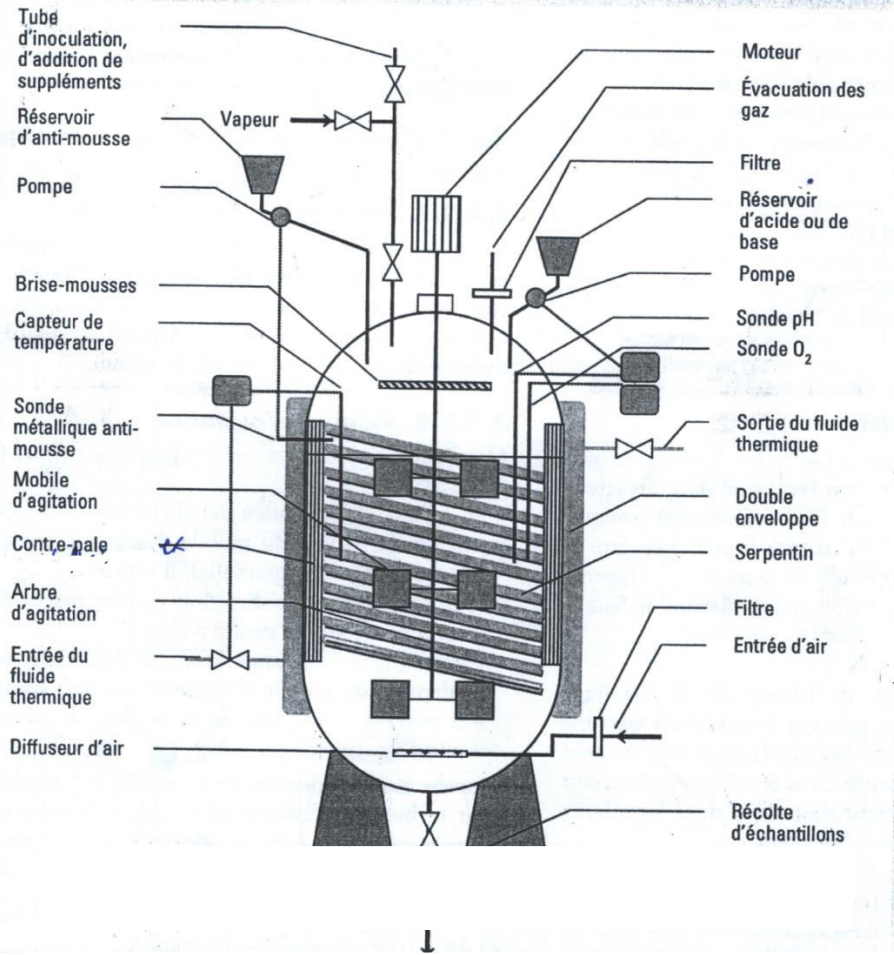


Figure 11 : Schéma d'un fermenteur et ses accessoires

1.4.2. Cinétiques des réactions de croissance cellulaire et de production

- La courbe de croissance

Si on trace la courbe représentant le nombre de cellules en fonction du temps, $X = f(t)$, on obtient :

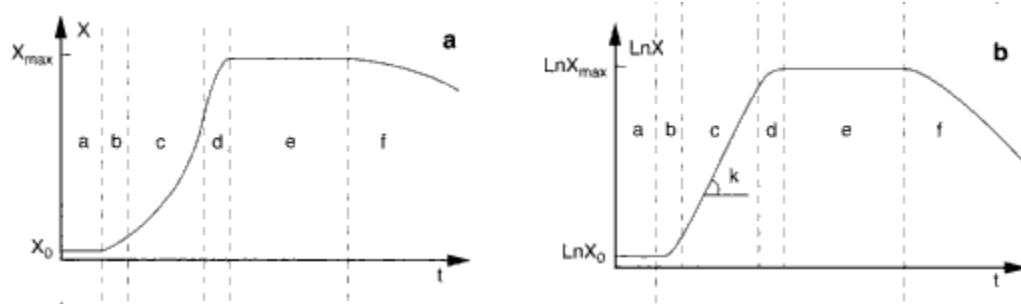


Figure 12: Courbes de croissance microbienne en fonction du temps ($X=f(t)$ (a), $\text{Ln}X=f(t)$ (b))

En tout point de la courbe $X = f(t)$, l'accroissement de biomasse peut donc être exprimé en termes de vitesse. La vitesse volumique de croissance est définie selon la relation : $r_x = dX/dt = X \cdot \mu_x$ et exprimée en biomasse / unité de volume. Unité de temps ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) ou en nombre de cellule / unité de volume. Unité de temps.

Dans cette expression de la vitesse, μ_x est un facteur dépendant du germe et des conditions de culture. Ce facteur représente la vitesse spécifique de croissance. En effet, $\mu_x = 1 / X \cdot dX / dt$ (unité h^{-1}).

- Phases de la croissance, paramètres d'état

Sur la courbe, différentes phases de la croissance peuvent être définies.

- La phase « a » où X reste identique à X_0 . C'est la phase de latence caractérisée par $dX/dt = 0$ et donc $\mu_x = 0$
- La phase « b » où phase d'accélération : X augmente de plus en plus rapidement ; dX/dt devient supérieur à 0 et augmente de plus en plus de même que μ_x
- La « c » où X augmente de façon exponentielle ; dX/dt augmente proportionnellement à la biomasse et va arriver à un maximum en fin de phase. La courbe $\text{Ln} X = f(t)$ présente une partie linéaire où $\text{Ln} X$ est proportionnel à t . C'est la phase exponentielle où μ_x est constante et atteint sa valeur maximale.

- La phase « d » dite de décélération : l'augmentation de X ralentit, celle de la vitesse dX/dt aussi et μ_x diminue.
- La phase « e » où X est à son maximum et constant, dX/dt est alors = 0. Cela ne veut pas dire qu'il n'y a plus de division cellulaire, en fait le taux de division est alors égal au taux de mortalité. C'est la phase stationnaire avec $\mu_x = 0$.
- La phase « f » où X diminue. La mortalité cellulaire devient plus importante que la division cellulaire. Elle est appelée phase de déclin.

- **Physiologie des phases**

1) **Phase de latence**

C'est la phase pendant laquelle la vitesse spécifique de croissance est nulle, la biomasse n'augmente pas. Elle dure plus ou moins longtemps selon le cas et parfois même n'existe pas, la culture démarrant immédiatement en phase exponentielle.

Plus l'inoculum est important, plus la phase de latence est réduite :

L'âge des bactéries semble également avoir une influence : lorsque des cellules jeunes, de quelques heures, sont introduites dans un milieu neuf, la phase de latence peut être extrêmement courte ; elle est au contraire prolongée avec des bactéries provenant d'une culture en phase stationnaire ou en phase de déclin qui contient plus de cellules mortes que cellules vivantes. De plus, ces dernières sont aussi dans un état physiologique peu favorable, il leur faut le temps nécessaire pour restaurer tous leurs systèmes enzymatiques mis en sommeil pendant leur maintien à l'état non proliférant.

Autre facteur : la composition du milieu. Un inoculum cellulaire prélevé en phase exponentielle de croissance et introduit dans un milieu neuf de composition chimique identique se multiplie instantanément sans aucune phase de latence. En revanche, si les constituants nutritifs (source de carbone, d'azote) sont différents, on observe à nouveau une phase de latence. Celle-ci traduit l'absence d'enzymes nécessaires à l'utilisation de ces nouveaux substrats et la nécessité pour la cellule de les synthétiser. Une période d'adaptation enzymatique est nécessaire pour induire la synthèse de ces nouvelles enzymes.

2) **Phase exponentielle**

C'est la phase physiologique par excellence : les bactéries se multiplient sans entrave. Pendant cette phase, on assiste à la libération de métabolites primaires d'intérêt industriel.

Expression mathématique de la croissance

Où μ_x est constante et atteint sa valeur maximale dans les conditions expérimentales données.

Remarque : on appelait taux de croissance de coefficient directeur k de la phase exponentielle de la courbe $\text{Ln}(X)=f(t)$ et on la note alors $\mu_{x \text{ exp}}$ entre deux valeurs X_1 et X_2 durant cette phase, on obtient :

$$X_2 = X_1 \cdot e^{[\mu_{x \text{ exp}}(t_2 - t_1)]} \quad (1)$$

$$\text{Et donc : } \text{Ln}X_2 = \text{Ln}X_1 + [\mu_{x \text{ exp}}(t_2 - t_1)] \quad (2)$$

$$\text{Soit : } \mu_{x \text{ exp}} = \frac{(\text{Ln}X_2 - \text{Ln}X_1)}{(t_2 - t_1)}$$

L'expression mathématique de $\mu_{x \text{ exp}}$ permet de déterminer expérimentalement la valeur du taux de croissance (ou taux de croissance népérien). Pendant cette même phase, on définit le temps de doublement de population, noté t_D , qui exprime le temps correspondant à un doublement de la biomasse (ou à un doublement de population).

On peut l'exprimer mathématiquement. D'après la relation 2, on peut écrire, X passant de X à $2X$ et avec $t_2 - t_1 = t_D$: $\text{Ln}2X = \text{Ln}X + \mu_{x \text{ exp}} \cdot t_D$

$$\text{Et } t_D = (\text{Ln}2X - \text{Ln}X) / \mu_{x \text{ exp}}$$

$$\text{Soit : } t_D = \text{Ln}2 / \mu_{x \text{ exp}}$$

Souvent, il est improprement assimilé à G . temps de génération, qui exprime, lui, le temps nécessaire à la division cellulaire. Le nombre de divisions (générations) par unités de temps est défini comme égal à $1/G$.

$\mu_{x \text{ exp}}$ et t_D sont les paramètres d'état permettant de caractériser une croissance dans des conditions expérimentales déterminés.

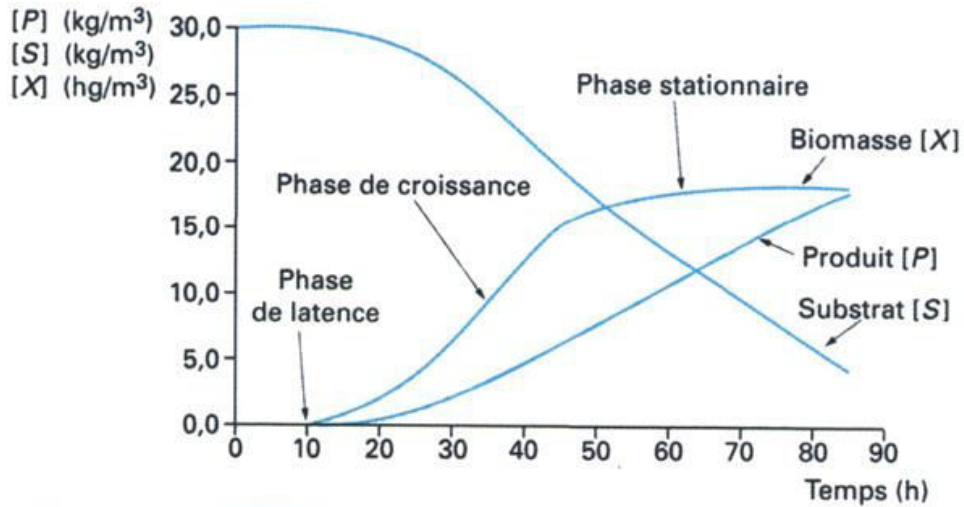


Figure 13 : Courbes de l'évolution des concentrations de la biomasse, du substrat et du produit en fonction du temps

La figure montre l'allure des variations dans le temps des concentrations en biomasse [X] (Kg/m^3), substrat [S] (Kg/m^3) et produit [P] (Kg/m^3) durant une culture de type micro-organismes.

Sur un intervalle de temps Δt , ΔS de substrats sont consommés pour former ΔX de biomasse et ΔP de produit.

On définit donc les rendements :

- De formation de biomasse par rapport au substrat : $Y_{x,s} = -\Delta X / \Delta S$
- De formation du produit par rapport au substrat : $Y_{p,s} = -\Delta P / \Delta S$

La vitesse de consommation de substrat r_s ($\text{kg.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$) et les vitesses de formation de biomasse r_x et de produit r_p suivent les relations :

$$r_s = -r_x / Y_{x/s} = -r_p / Y_{p/s}$$

Il s'agit de rendements observés, directement calculables à partir des données expérimentales; Ces rendements varient selon les phases de la culture.

Pour définir des rendements vrais, indépendants de la phase de la culture considérée, il faut analyser plus finement la quantité de substrat ΔS consommée pendant l'intervalle de temps Δt . Cette quantité ΔS est en réalité la somme des quantités de substrat nécessaires à la formation de la biomasse ΔS_x , à la formation du produit ΔS_p et la maintenance de la biomasse ΔS_M :

$$\Delta S = \Delta S_x + \Delta S_p + \Delta S_M$$

Les rendements vrais sont alors définis par :

$$Y'_{x/s} = -\Delta X / \Delta S_x, \quad Y'_{p/s} = -\Delta P / \Delta S_p$$

Le coefficient de maintenance m_s par rapport au substrat est lui défini par la :

$$\Delta S_m = m_s \cdot X \cdot dt$$

La relation :

$$r_s = -\left(\frac{r_x}{Y'_{X/S}} + \frac{r_p}{Y'_{P/S}} + m_s X\right)$$

La détermination de ces rendements vrais est expérimentalement plus complexe que celle des rendements observés.

✓ **Cinétique de croissance limitée par un substrat**

Selon les conditions de culture, il se peut qu'un substrat soit limitant c'est-à-dire qu'une augmentation de la concentration en ce substrat entraîne un accroissement de la vitesse de croissance.

- En culture anaérobie, il peut s'agir du substrat carboné ou de la source azotée, lorsqu'en fin de culture ces substrats sont épuisés.
- En culture aérobie, c'est en général l'oxygène faiblement soluble dans les milieux de fermentation et apporté en continu qui est le substrat limitant.
- La relation cinétique la plus connue, traduisant l'effet de la concentration en substrat limitant sur la vitesse de croissance d'un microorganisme, est la relation de Monod :

$$\mu = \frac{r_x}{x} = \frac{\mu_{max} S}{K_M + S}$$

Avec μ (s^{-1}) taux de croissance

μ_{max} (s^{-1}) taux de croissance maximal

K_M (Kg/m^3)

Cette relation est parfois justifiée en disant que la croissance cellulaire repose sur un grand nombre de réactions enzymatiques et qu'il est donc logique que la forme de la relation de Monod soit identique à celle de Michaelis et Menten.

Plusieurs variantes de cette relation ont été proposées pour tenir comptes des différents phénomènes d'inhibition usuellement rencontrés. Une des plus récentes (Han et Levenspiel) suppose que la croissance s'arrête dès que la concentration en inhibiteur devient égale à une valeur critique $[I_c]$ et que la constante de Monod dépend de la concentration en inhibiteur :

$$\mu = \frac{r_x}{X} = K' \left(1 - \frac{I}{I_c}\right)^n \frac{S}{S + K_M \left(1 - \frac{I}{I_c}\right)^m}$$

K' constante de vitesse, m et n exposants

✓ Cinétique de croissance non limitée par un substrat

Lorsque les concentrations en substrat sont élevées, on peut observer un arrêt de la croissance du microorganisme avant que les substrats soient épuisés.

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}} \right)$$

Cette relation différentielle présente l'avantage de s'intégrer

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu_{\max} t)}{1 - \frac{X_0}{X_{\max}} (1 - \exp(\mu_{\max} t))}$$

1.4.3. Echange gazeux d'oxygène

L'objectif est de satisfaire les besoins des cultures au niveau des échanges gazeux. Les microorganismes utilisent l'oxygène dissout et rejettent le CO₂ en équilibre avec la phase gazeuse. Deux notions essentielles apparaissent :

- La capacité de transfert du réacteur OTR
- La demande en oxygène de la culture

1.4.3.1. Capacité de transfert

Elle est définie par la relation suivante qui exprime la quantité d'oxygène transférée par unité de temps OTR (oxygen Transfer Rate) ou vitesse de transfert (r_{O_2}) exprimée en moles de O₂/l h:

$$OTR = \frac{DC_L}{dt} = K_{LA} (C^* - C_L)$$

Avec

CL : concentration en oxygène dans la phase liquide (mol/l)

C* : concentration en oxygène à saturation (mol/l)

KL a (s⁻¹) coefficient volumétrique de transfert,

Notons que (C* - CL) ne dépend pas de l'agitation, mais de la nature du milieu, de la température et de la pression partielle du constituant à dissoudre.

La capacité de transfert des réacteurs va dépendre de plusieurs variables :

- La puissance d'agitation et l'efficacité du système d'agitation (la dispersion)
- La solubilité du gaz dépendant de la pression, du débit, de la composition, de la température et de la composition du milieu liquide

Plusieurs critères sont aussi à définir :

- Le volume d'expansion du liquide lié au gaz

- Le débit gazeux qui peut être exprimé sous plusieurs formes :
 - ✓ VL : volume d'air (m³) par heures dans les CNTP
 - ✓ VVM : volume d'air par volume de liquide par minute
 - ✓ VVH : volume d'air par volume de liquide et par heure

La croissance est limitée par le transfert d'oxygène, la vitesse de croissance est constante et égale à : $r_X = Y_{X/O_2} k_{La} / [O_2^*]$.

1.4.4. Equation du bilan massique sur le fermenteur

Entrée + Production = Sortie + Accumulation

Equation du bilan massique par rapport au substrat

$$Q_E \cdot S_0 - r_S \cdot V = Q_S \cdot S + \frac{d(VS)}{dt}$$

Equation du bilan massique par rapport à la biomasse

$$Q_E \cdot X_0 + r_X \cdot V = Q_S \cdot X + \frac{d(VX)}{dt}$$

Equation du bilan massique par rapport au produit

$$Q_E \cdot P_0 + r_P \cdot V = Q_S \cdot P + \frac{d(VP)}{dt}$$

Avec

V : volume du liquide

Q : débit volumique

S₀, X₀ et P₀ concentration initiale respectives du substrat de la biomasse et du produit.

S, X et P concentration respectives à l'instant t du substrat de la biomasse et du produit.

1.4.5. Fermentation discontinu non alimenté ou Batch

Bilan sur le fermenteur batch

Le réacteur ne possède ni entrée ni sortie $Q_E = Q_S = 0$ et le volume est constant

Bilan sur le substrat $-r_S = \frac{d(S)}{dt}$

Bilan sur la biomasse $r_X = \frac{d(X)}{dt}$

Bilan sur le produit $r_P = \frac{d(P)}{dt}$

La souche microbienne doit posséder un comportement cinétique connu, pendant la fermentation on introduit aucun milieu de culture sauf pour les réactifs de neutralisation, ou pour l'antimousse introduit en quantité très faible. De même façon, on ne soutire pas de la culture tant qu'elle n'est pas terminée. Le volume dans la cuve de fermentation est donc constant. La concentration en biomasse (X) augmente inversement par rapport à celle du substrat (S) qui lui est consommé. Le produit recherché (P) apparaît et sa concentration augmente. Le temps nécessaire pour passer de la concentration en substrat S_0 à la concentration S, après consommation par le processus de fermentation est donné par la formule suivante :

$$t = - \int_{S_0}^S \frac{dS}{r_s}$$

r_s étant la vitesse de la réaction de fermentation souvent modélisé par l'équation de Monod.

Le temps nécessaire pour passer de la concentration cellulaire X_0 , à la concentration X est donné par la formule suivante :

$$t = \int_{X_0}^X \frac{dX}{r_X}$$

r_X désigne la vitesse de croissance cellulaire.

Par le même raisonnement on peut écrire, si r_p est la vitesse d'apparition du métabolite recherché, le temps nécessaire pour obtenir une concentration finale P de produit est donné par la relation suivante:

$$t = \int_{P_0}^P \frac{dP}{r_p}$$

1.4.6. Fermentation discontinue alimentée ou Fed Batch

Après une phase rapide de démarrage, correspondant à la fermentation discontinue, on introduit le milieu de culture on dit qu'on a atteint la phase exponentielle de croissance (2^{ème} phase). Le débit d'alimentation Q est réglé de façon à ce que la concentration en substrat soit constante dans le fermenteur $\frac{dS}{dt} = 0$ et corresponde à une étape de la phase logarithmique de croissance cellulaire. Le fermenteur est alimenté sans soutirage.

Bilan massique par rapport au substrat

$$Q_E \cdot S_0 - r_s \cdot V = + \frac{d(VS)}{dt}$$

$$Q_E \cdot S_0 - \frac{r_X}{Y_X/S} \cdot V = + \frac{d(VS)}{dt} = \frac{SdV}{dt}$$

Bilan massique par rapport à la biomasse

$$r_X \cdot V = \frac{d(VX)}{dt}$$

Bilan massique par rapport au produit

$$r_P \cdot V = \frac{d(VP)}{dt}$$

L'augmentation du volume du liquide dans la cuve est donnée par l'expression suivante :

$$dV = Q dt$$

Dans ces conditions, le volume de milieu en fermentation augmente ainsi que celui de la biomasse (XV), selon l'expression :

$$\frac{d(XV)}{dt} = r_X V = \mu XV = V \frac{dX}{dt} + X \frac{dV}{dt}$$

$$\frac{d(XV)}{XV} = \mu dt \quad \longrightarrow \quad XV = X_0 V_0 e^{\mu t}$$

L'équation de bilan sur le substrat devient :

$$Q_E \cdot S_0 - \frac{r_X}{Y_X} \cdot V = + \frac{d(VS)}{dt} = \frac{S dV}{dt} = Q \cdot S$$

$$Q(S_0 - S) = \frac{r_X}{Y_X} V = \frac{\mu X}{Y_X} V$$

$$1- Q = \frac{\mu XV}{Y_X(S_0 - S)} = \frac{\mu X_0 V_0}{Y_X(S_0 - S)} e^{\mu t}$$

$$2- V = V_0 + \int_0^t Q dt$$

$$3- V = V_0 + \frac{\mu X_0 V_0}{Y_X(S_0 - S)} \int_0^t e^{\mu t} dt$$

En combinant les 3 équations, on déduit la concentration en biomasse à l'instant t: $X =$

$$X = \frac{X_0 e^{\mu t}}{1 + \frac{X_0}{Y_X(S_0 - S)} (e^{\mu t} - 1)}$$

La variation de la concentration en biomasse au cours du temps dans le milieu de culture est exprimée par :

$$\frac{dX}{dt} = X \left(\mu - \frac{Q}{V} \right)$$

Si $\frac{dX}{dt} = 0 \quad \Rightarrow \mu = \frac{Q}{V}$ La concentration en biomasse dans la cuve reste constante, on dit que le microorganisme est maintenu en phase exponentielle de croissance dans le fermenteur et $\frac{dV}{dt} = \mu_{max} dt$

Cette expression donne la loi d'évolution du volume de milieu en fermentation ou d'évolution dans le temps du débit d'alimentation. A la fin de cette phase on coupe l'alimentation et la culture évolue en phase de décroissance ou dite de ralentissement puis en phase stationnaire au cours desquelles on assiste à l'épuisement en substrat du milieu.

1.4.7. Fermentation continue

Fermenteur continu infiniment (parfaitement) mélangé.

La suspension microbienne en fermentation est homogène en tout point du réacteur. En pratique on commence à ensemencer la cuve contenant un volume V de liquide. L'alimentation et le soutirage se pratiquent aux mêmes débits $Q_E = Q_S = Q$

Bilan massique par rapport au substrat

$$Q \cdot S_0 - r_s \cdot V = Q \cdot S + \frac{d(VS)}{dt}$$

Bilan massique par rapport à la biomasse

$$Q \cdot X_0 + r_x \cdot V = QX + \frac{d(VX)}{dt}$$

Bilan massique par rapport au produit

$$Q \cdot P_0 + r_p \cdot V = Q \cdot P + \frac{d(VP)}{dt}$$

Lorsque l'état d'équilibre pour ce qui est de la biomasse est établi, l'équation de bilan devient:

$$Q \cdot X_0 + r_x \cdot V = QX$$

Soit $D = \frac{Q}{V}$ le taux de dilution $D = (X - X_0) = r_x = \mu X$

Le temps de séjour moyen pour que le taux de dilution soit égal au taux de croissance est :

$$\tau = \frac{1}{D} = \frac{X}{r_x} \text{ avec } X=0$$

1.4.8. Le fermenteur à gradient de concentration

Le concept du réacteur piston peut être appliqué à la fermentation. C'est un réacteur tubulaire dans lequel le milieu de culture ensemencé (X_0) se déplace en même temps que la fermentation

se déroule. La concentration en biomasse et produit augmente progressivement le long du réacteur alors que la concentration en substrat diminue.

Bilan sur la biomasse :

$$QX + r_X dV = Q(X + dX) \rightarrow r_X dV = Q dX$$

Le temps nécessaire pour passer d'une concentration X_0 biomasse à une concentration X est donné par l'expression:

$$t = \frac{V}{Q} = \int_{X_0}^X \frac{dX}{r_X}$$

1.4.9. Fermentation avec recyclage de la biomasse

Le fermenteur parfaitement mélangé est limité dans son fonctionnement par un taux de dilution maximal : D_{max}

$$D_{max} = \frac{\mu_{max} S_0}{K_S + S_0}$$

Bilan massique par rapport à la biomasse sur le réacteur continu avec recyclage Bilan

$$Q_E \cdot X_0 + r_X \cdot V = Q_S X + Q_R X_R + \frac{d(VX)}{dt}$$

La variation de la quantité de biomasse dans la cuve :

$$\frac{VdX}{dt} = \mu VX + QX_0 + Q_R X_R - X(Q + Q_R)$$

Le taux de recyclage est lié à deux paramètres

- ✓ le rapport des débits $\alpha = \frac{Q_R}{Q}$
- ✓ le rapport de concentrations cellulaire : $\beta = \frac{X_R}{X}$

En remplaçant on obtient :

$$\frac{dX}{dt} = \mu X + \alpha \beta DX - (1 + \alpha)DX$$

En posant : $y = 1 + \alpha - \alpha \beta$

on obtient : $\frac{dX}{dt} (\mu - yD)X$

On voit que pour que la biomasse soit constante dans la cuve, la condition est que $\mu = yD$

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

On distingue cinq étapes importantes dans tout procédé de fermentation :

- La fabrication du milieu de culture,
- La stérilisation du bioréacteur et de ses équipements ainsi que du milieu de culture,
- La préparation de l'inoculum,
- La production en bioréacteur,
- L'extraction du produit et sa purification.

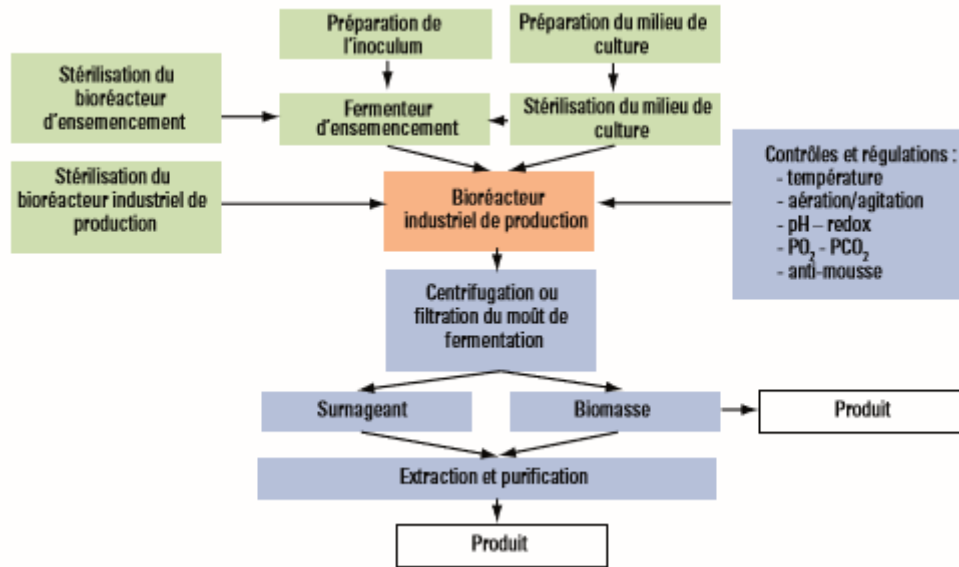
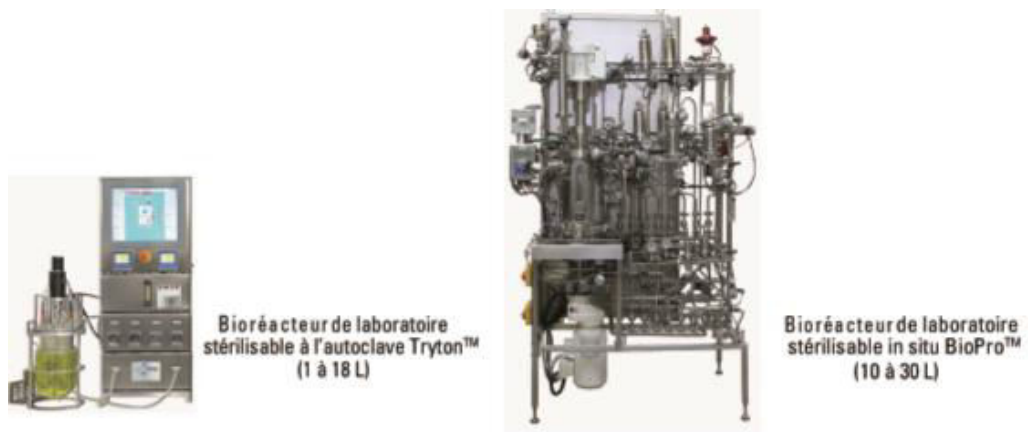


Figure 14 : Etapes du procédé de fermentation

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

On classe les bioréacteurs en fonction de leur volume maximal :

- les bioréacteurs de laboratoire stérilisables à l'autoclave jusqu'à 18L ;
- les bioréacteurs de laboratoires stérilisables *in situ* jusqu'à 30L ;
- les bioréacteurs pilotes jusqu'à 300L ;
- les bioréacteurs industriels jusqu'à 500000L.



(A)



(B)



(C)

Figure 15 : Bioréacteurs de laboratoire (A), bioréacteur pilote (B) et bioréacteur industriel (C)

Le *scale up* est le transfert du procédé d'un bioréacteur de laboratoire de petit volume à celui d'un bioréacteur industriel à grande échelle.

Le *scale up* s'effectue en plusieurs étapes : de la fiole d'Erlenmeyer au bioréacteur de paillasse, du bioréacteur de paillasse au bioréacteur pilote de laboratoire et du bioréacteur pilote de laboratoire au bioréacteur industriel. Il est impossible de conserver l'ensemble des paramètres identiques ou proportionnels au changement d'échelle. Chaque transfert à une plus grande échelle est complexe car divers paramètres tels que le barème de stérilisation, l'aération et l'agitation sont modifiés lorsqu'on augmente le volume, le diamètre et la hauteur du bioréacteur. Des conditions physicochimiques similaires doivent être maintenues dans l'environnement de chaque cellule malgré l'augmentation du volume de culture. A chaque étape de *scale up*, divers paramètres sont analysés puis modifiés car les réactions physicochimiques et enzymatiques se produisant à l'intérieur du bioréacteur varient en fonction du volume du réacteur utilisé.

1.4.12. Les souches microbiennes et leurs milieux de culture

1.4.12.1. Caractéristiques des milieux de culture en industrie

Les milieux contiennent de l'eau, des sources de carbone, d'énergie et d'azote, des éléments minéraux et des facteurs de croissance. Le milieu de culture le plus adapté en industrie doit répondre aux critères suivants :

- rendement maximum de produit ou de biomasse par masse de substrat et concentration maximale de produit ou de biomasse ;
- production la plus faible de métabolites indésirables ;
- facilité de fabrication du milieu de culture ;
- prix d'achat et de stockage, disponibilité des ingrédients, constance de la qualité, stabilité au stockage ;
- absence de problèmes technologiques tels que stérilisation, agitation, aération, extraction et purification des produits.

Dans les procédés industriels, on utilise le plus souvent des composants peu coûteux et disponibles en grande quantité. Il s'agit souvent de déchets carbonés provenant d'autres industries comme les mélasses et les tourteaux.

Le pH : les phosphates sont utilisés comme systèmes tampons s'il n'y a pas de régulation externe de pH. Le carbonate de calcium permet de tamponner les milieux de culture à pH 7.

Anti-mousse : la formation de la mousse est liée à la présence des protéines qui sont dénaturées à l'interface air-milieu de culture lorsque l'agitation et l'aération deviennent importantes.

La mousse provoque :

- Un dépôt des microorganismes sur les parties supérieures du bioréacteur
- Une diminution du volume du milieu de culture
- Une perturbation des éléments de contrôle et de régulation....

Les antimousses sont des agents actifs de surface réduisant la tension de surface de la mousse et déstabilisant les films protéiques. Ex. d'antimousse : alcools (stéaryl et octyl décanol), les esters, les acides gras et dérivés contenus dans les huiles végétales et le saindoux, les silicones, les sulfonates, le polypropylène...

Milieu de culture

Tableau 04 : exemples de quelques milieux de culture utilisés dans l'industrie

Milieu de culture pour la production de pénicilline par <i>Penicillium chrysogenum</i>	Milieu de culture pour la production de pectinase par <i>Aspergillus spp</i>	Milieu de culture pour la production de glycérol par <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Mélasses Corn-steep liquor Acide phénylacétique Eau	Pulpe de betterave Corn-steep liquor Extrait de levure Gélatine ou caséine Sels inorganiques Agent anti-mousse Eau	Mélasses noires Sulfate d'ammonium Agent anti-mousse Eau

Stérilisation de milieu de culture

Le milieu de culture, l'eau et le matériel contiennent une certaine quantité de microorganismes sous forme végétative ou sporulée. Ils doivent être éliminés avant l'inoculation sans modifier les composants du milieu.

On distingue deux types de procédés de stérilisation :

- le procédé de stérilisation en batch,
- le procédé de stérilisation en continu

Les composés thermolabiles comme les protéines et les vitamines peuvent être dénaturés par la chaleur. En choisissant un barème adéquat de stérilisation pour éviter ce problème.

Les groupements carbonyles des glucides réducteurs réagissent avec les groupements aminés des acides aminés et des protéines au cours des réactions de type Maillard qui provoquent une décoloration du milieu et une diminution de sa qualité nutritionnelle. On stérilise les glucides séparément du reste du milieu pour éviter ce problème.

Procédé de stérilisation en batch

La température de stérilisation en batch est de 121°C. La durée de stérilisation dépend de la nature du milieu de culture et de son volume. Deux types de stérilisation du milieu de culture :

Avantage de stérilisation en batch :

- un gain de temps lié à la possibilité de stériliser le milieu pendant que le bioréacteur est nettoyé pour la fermentation suivante ;

- le bioréacteur n'est pas soumis à de hautes températures favorisant la corrosion ;
- la stérilisation de milieux concentrés est possible.

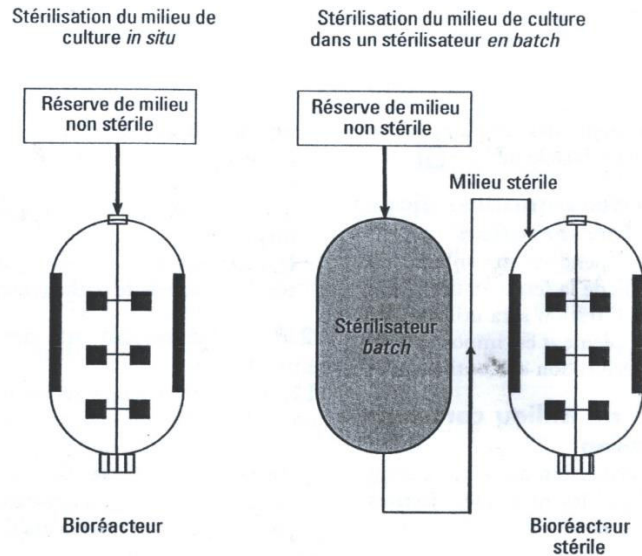


Figure 16 : Schéma de principe de la stérilisation *in situ* (A) et de la stérilisation en stérilisateur *en batch* (B)

Procédé de stérilisation *en batch*

Il est possible d'atteindre des températures plus élevées que 121°C afin de diminuer le temps de stérilisation, les nutriments thermosensibles ne sont pas dénaturés car le temps de stérilisation est plus faible. Ce temps bref limite la production de composés de la réaction de Maillard.

Il existe deux types de stérilisation en continu :

Stérilisation en continu indirecte à l'aide d'échangeurs de chaleur à spirale

Les échangeurs de chaleur à spirale sont formés de deux canaux en acier inoxydable enroulés en spirale dans lesquels le milieu de culture et les fluides thermiques circulent à contre-courant.

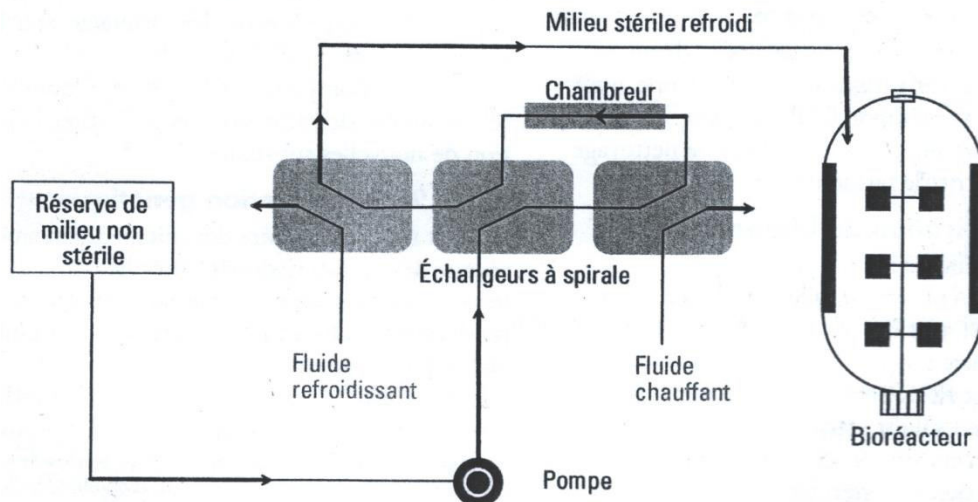


Figure 17: Schéma de stérilisation en continu indirecte à l'aide d'échangeurs de chaleur à spirale

Stérilisation en continu au moyen d'injection directe de vapeur

De la vapeur est injectée directement dans le milieu de culture à stériliser

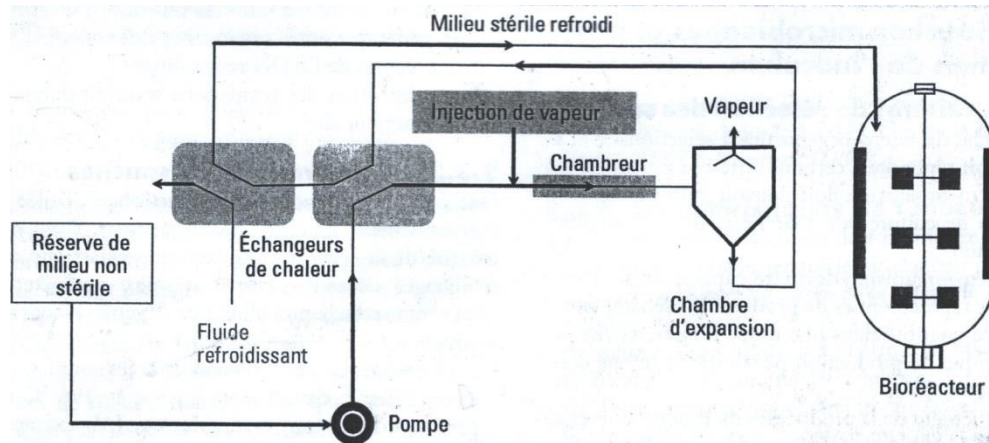


Figure 18 : Schéma de stérilisation en continu au moyen d'injection directe de vapeur

Stérilisation des composés ajoutés au cours de la fermentation : si le volume est faible alors la filtration sera utilisée.

Si le volume de supplément est important, on utilisera la méthode de stérilisation en continu.

Stérilisation du milieu contaminé après fermentation : stérilisation en batch ou stérilisation en continu.

1.4.12.2. Nettoyage sur place et stérilisation du bioréacteur

Nettoyage sur place les fermenteurs industriels nécessitent d'être nettoyés sur place après utilisation et avant une nouvelle stérilisation (méthode CIP).

Stérilisation du bioréacteur

Il existe deux cas :

- si le milieu de culture est stérilisé in situ, le bioréacteur est stérilisé en même temps que le milieu de culture,
- si le milieu de culture est stérilisé dans un stérilisateur en batch ou en continu, le bioréacteur doit être stérilisé avant l'addition du milieu de culture stérile. Cette stérilisation est réalisée à la vapeur sous une pression de 1 bar pendant 20mn.

1.4.13. Souches microbiennes et préparation de l'inoculum

1.4.13.1. Critères et sélection des souches

Les souches doivent répondre aux critères suivants

- Le microorganisme doit pouvoir cultiver dans un milieu de culture bon marché et de disponibilité constante
- Il doit être capable de se développer rapidement et de produire le métabolite en grande quantité dans une durée limitée, sa vitesse spécifique de production par unité de temps doit être élevée
- Le rendement de la production doit être élevé
- Il ne doit pas produire de substances indésirables
- Le produit doit être facilement récupérable du milieu de culture
- Il peut être génétiquement modifié
- Il doit être stable génétiquement
- Il ne doit pas contenir de caractères de pathogénicité

1.4.13.2. Amélioration des souches

- **Bioprospection**

Rechercher des souches possédant des caractéristiques nouvelles dans les matières naturelles : sol, eau, les végétaux, ...

- **Manipulation génétique**

Il s'agit de produire des souches possédant des caractéristiques nouvelles :

- ✓ La mutation
- ✓ La formation d'hybrides par fusion des protoplastes
- ✓ Insertion d'oligonucléotides par mutagenèse dirigée afin de modifier la structure et la fonction des protéines...

1.4.13.3. Conservation des souches

Il est nécessaire de conserver les souches nouvellement obtenues par les techniques suivantes :

- ✓ La congélation dans l'azote liquide à -196°C en présence d'un agent cryoprotecteur (glycérol)
- ✓ La lyophilisation qui consiste à déshydrater par sublimation sous faible pression une suspension congelée de microorganismes

Ces techniques permettent de conserver les cultures viables, stables et pures pendant des durées longues.

Les souches d'intérêts sont conservées soit dans des laboratoires industriels, soit dans les organismes de collections nationales ex : Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Pasteur (CR-BIP) en France ou American Type Culture Collection (ATCC) aux Etats Unis qui fournissent les souches à la demande des industriels.

1.4.13.4. Caractéristiques de l'inoculum

La préparation de l'inoculum doit permettre d'obtenir une phase de latence dans le bioréacteur pilote la plus courte possible. Cette durée dépend :

✓ Du volume de l'inoculum (10% V/V)

L'inoculum doit être exempt de contaminations microbiennes

1.4.13.5. Bioréacteurs et ses équipements

Système d'aération

Diffusion de l'air

Notion de $K_L a$

Le transfert du dioxygène dans une culture

On distingue cinq étapes lors du transfert du dioxygène de la bulle gazeuse au cytoplasme de la cellule.

- Etape 1 : transfert d' O_2 à travers le film gazeux de la bulle gazeuse à l'interface air-liquide
- Etape 2 : transfert d' O_2 à travers le film liquide
- Etape 3 : diffusion de gaz vers les cellules
- Etape 4 : transfert d' O_2 à travers le film liquide
- Etape 5 : diffusion d' O_2 dans la cellule vers le site d'utilisation par le métabolisme

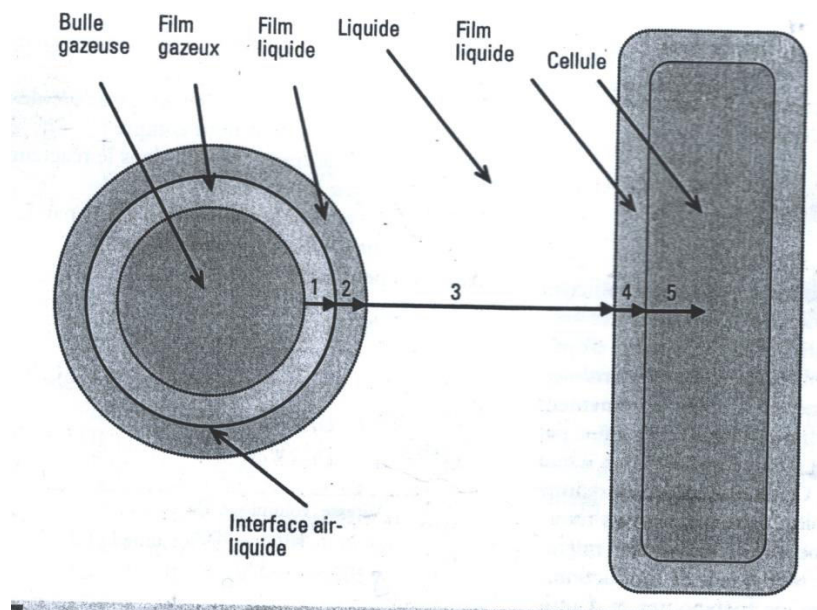


Figure 19 : Les cinq étapes de transfert d' O_2

Le transfert d'oxygène de la bulle d'air à la phase liquide est décrit :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

$\frac{dC_L}{dt}$: vitesse de transfert d'O₂ (mmol/L.h)

K_L : Coefficient de transfert de masse par rapport au film liquide (cm/h)

A : surface totale d'échange par unité de volume (cm²/cm³)

C_L^* : Concentration saturante en O₂ dissous en équilibre avec la pression partielle d'O₂ dans la phase gazeuse

C_L : Concentration en O₂ dissous dans le milieu de culture

Détermination de $K_L a$

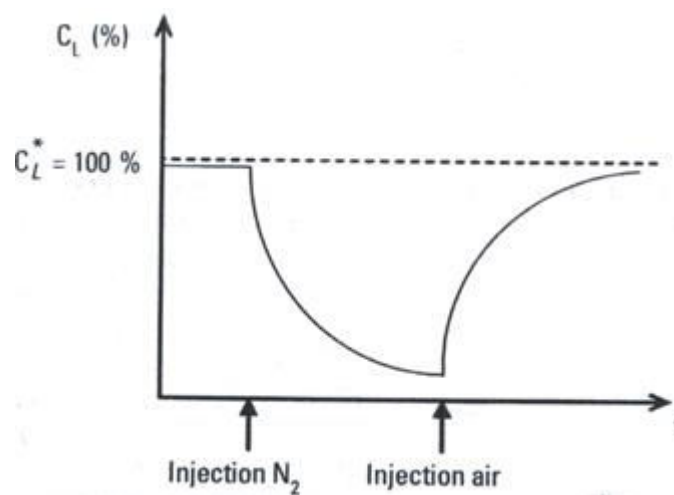
Méthode statique

Le milieu de culture ne contient pas de microorganisme. O₂ est éliminé par injection de gaz N₂. Le milieu désoxygéné est alors aéré et agité, l'augmentation de la concentration en oxygène dissous est mesurée à l'aide d'une sonde à oxygène. Cette augmentation est décrite par l'équation :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a (C_L^* - C_L)$$

Sachant qu'à $t=0$, donc la reprise de l'aération et de l'agitation, $C_L=0$, cette équation s'intègre :

$\ln \frac{C_L^* - C_L}{C_L^*} = -K_L a \cdot t$ ainsi, la pente de la droite $\ln \frac{C_L^* - C_L}{C_L^*} = f(t)$ prend pour valeur $-K_L a$



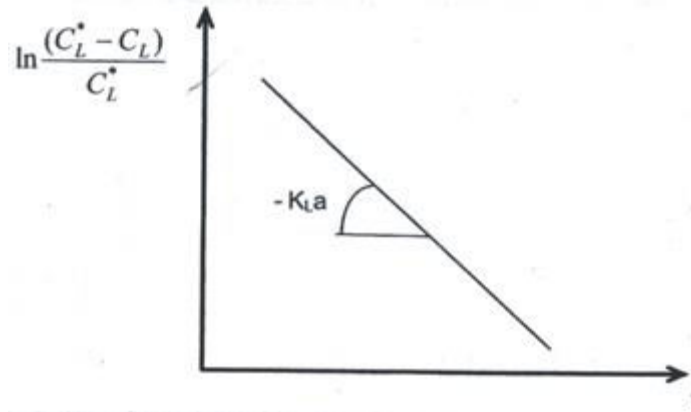


Figure 20: Détermination de $K_L a$ par la méthode statique

Méthode dynamique

Le milieu de culture contient des microorganismes, c'est l'activité respiratoire des cellules dans le bioréacteur qui abaisse le taux d' O_2 avant de reprendre l'aération.

L'équation globale de transfert en présence des cellules dans le fermenteur tient compte :

- De la vitesse de transfert d' O_2 dans le réacteur, soit OTR

De la vitesse de consommation d' O_2 par la biomasse soit OUR On peut écrire :

$$\frac{dC_L}{dt} = OTR - OUR$$

Avec : $OTR = K_L a(C_L^* - C_L)$ et $OUR = Q_{O_2} \cdot X$

OTR : vitesse volumique de consommation d' O_2 (mmol d' O_2 /L.h)

Q_{O_2} : vitesse spécifique de respiration (mmol d' O_2 /g de biomasse. h)

X : concentration en biomasse (g de biomasse/L)

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

La méthode dynamique comporte trois temps :

On réalise l'équilibre entre OTR et OUR. La concentration en O_2 dissous est constante :

$$\frac{dC_L}{dt} = K_L a(C_L^* - C_L) - Q_{O_2} \cdot X = 0 \text{ donc } OUR = K_L a(C_L^* - C_L) = Q_{O_2} \cdot X$$

- L'aération et l'agitation sont arrêtées (on peut maintenir une faible agitation à 30ts/mn pour éviter la sédimentation des microorganismes)

$$OTR = 0$$

La biomasse consomme le dioxygène présent, le taux d'oxygène dissous dans la phase liquide diminue de manière linéaire

$$\frac{dC_L}{dt} = -Q_{O_2} \cdot X$$

La pente de la droite $C_L=f(t)$ permet de déterminer la vitesse de consommation d' O_2 par la biomasse : la valeur de cette pente est $-Q_{O_2} \cdot X$

- L'aération et l'agitation sont reprises dans les conditions initiales avant que le taux d' O_2 dissous n'atteigne une valeur minimale critique pour la culture. C'est au cours de ce troisième temps que $K_L a$ peut être estimé par diverses constructions graphiques.

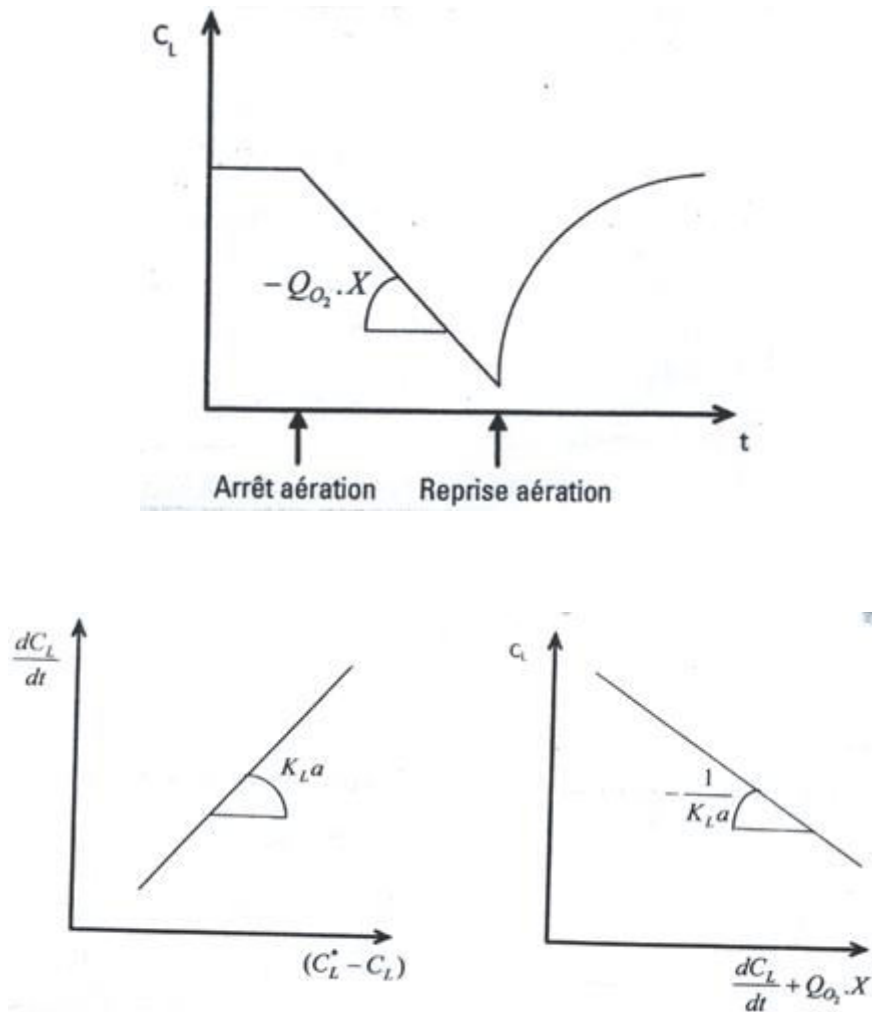


Figure 21 : Détermination de $K_L a$ par la méthode dynamique

1.4.13.6. Extraction et purification des produits

Objectif et choix des méthodes

L'objectif de ses méthodes est d'obtenir le produit le plus pur possible, sans perte d'activité biologique en un minimum d'étapes.

Elles seront choisies en fonction :

- La localisation du produit : intracellulaire ou extracellulaire
- Des propriétés physicochimiques du produit et de sa concentration dans le milieu
- De la nature et de la quantité des impuretés présentes dans le milieu
- Du degré de pureté visé
- De leur rendement

De leur coût Trois étapes nécessaires pour obtenir le produit pur :

- La séparation des particules et des microorganismes du milieu de culture
- L'extraction du produit
- La concentration et la purification du produit

Méthodes de séparation des particules et des microorganismes du milieu de culture

Filtration ou centrifugation

Filtration

Méthode la plus utilisée pour séparer les particules et les microorganismes de milieu de culture

Les techniques de filtration dépendent de la taille des particules et des microorganismes à retenir, de la viscosité du filtrat, de la nécessité de travailler aseptiquement ou pas.

Centrifugation

Elle s'opère dans le cas où la filtration est impossible (débit trop lent).

Extraction du produit

Extraction cellulaire

Pour extraire un produit intracellulaire, il est nécessaire de lyser les microorganismes. Elle est souvent réalisée par un homogénéiseur à haute pression.

Extraction liquide-liquide

Elle est basée sur le fait que le produit à extraire est plus soluble dans un des deux liquides non miscibles mis en contact. Les deux liquides mis en contact sont appelés :

- La solution d'alimentation : moût de fermentation, filtrat ou SN

- Le solvant : liquide ajouté pour lequel le soluté a le plus d'affinité
Après extraction on obtient deux liquides :
- L'extrait correspondant au solvant contenant le soluté
- Le raffinat correspondant à la solution d'alimentation dépourvue du soluté extrait

Concentration et purification du produit

Chromatographie Sont les plus utilisées

Procédés membranaires osmose inverse et ultrafiltration

Précipitation agents précipitants : acides, bases, sels (sulfate d'ammonium)

Séchage il facilite la manipulation du produit et son conditionnement. Il s'effectue par vaporisation et lyophilisation

Cristallisation dernière étape de purification. Formation des cristaux de produit

Exemples de bioprocédés

2. Traitement des eaux usées par lagunage

L'Algérie est l'un des pays les plus affecté par la rareté des ressources en eau, et la mauvaise répartition des précipitations. De plus, on ajoute le problème de pollution des ressources en eau. Les procédés d'épuration les plus utilisés en Algérie sont les stations des boues activées et les stations de lagunage naturel. Ce dernier se présente comme la meilleure solution, il n'exige que des efforts minimaux d'entretien, d'opération et de maintenance, la mécanisation est presque absente.

Le nombre de station d'épuration en exploitation est de 102 (52 STEP et 50 lagunes) pour une capacité installée actuelle de 570 hm³/an, donc le lagunage couvre presque la moitié des systèmes d'épuration utilisée en Algérie.

L'intérêt de l'épuration des eaux usées en Algérie n'est pas seulement de lutter contre la pollution, mais aussi d'assurer une nouvelle ressource en eau, qui va soulager la crise de pénurie d'eau, surtout dans le domaine de l'irrigation agricole.



Figure 22 : Photo de bassins de lagunage

Il s'agit de faire circuler des effluents dans une série de bassins pendant un temps suffisamment long pour réaliser les processus naturels de l'autoépuration. Cette dernière est réalisée par un équilibre biologique auquel participent des bactéries, du zooplancton, des algues et parfois des plantes aquatiques.

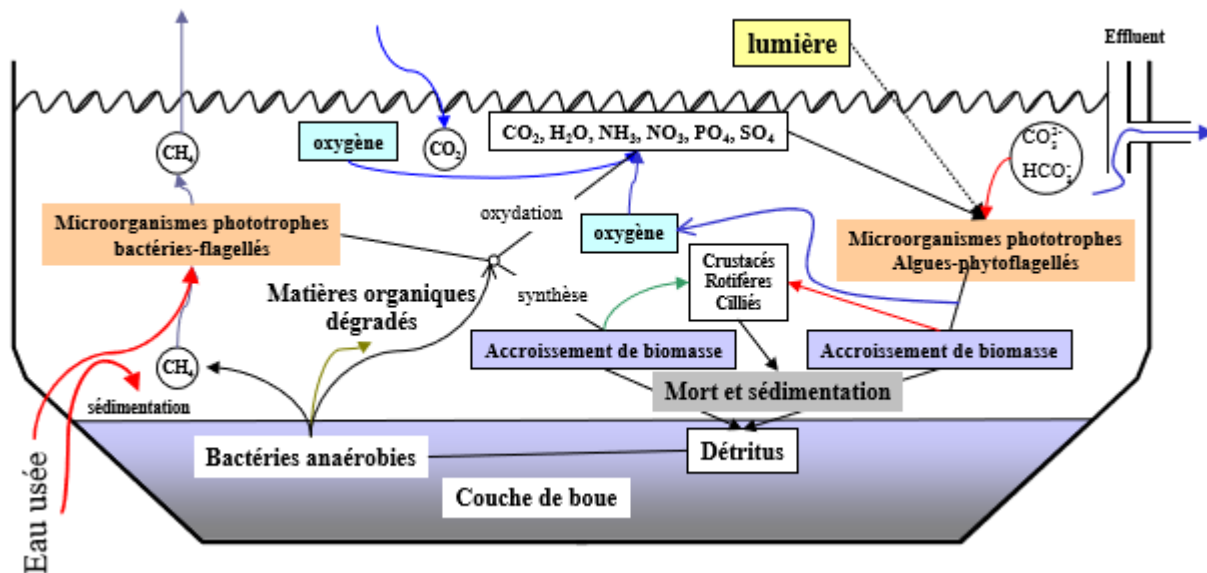


Figure 23: Cycle biologique d'une lagune

Le dioxygène de l'eau permet aux bactéries de vivre afin qu'elles participent à la minéralisation. Les bactéries minéralisent la matière organique par les réactions chimiques ci-dessous.



Les composés minéraux ainsi produits (phosphates, sels d'ammonium par exemple) permettent le développement de micro-algues (le phytoplancton) et de vie animale (le zooplancton). Les micro-algues comme les euglènes oxygènent le milieu par la photosynthèse et sont broutées par des animaux (daphnies), constituant le point de départ d'une chaîne alimentaire. Le temps de séjour dans les six bassins (environ quatre mois) est suffisamment long pour permettre une élimination des bactéries, dont certaines sont pathogènes, par les rayons ultra-violets du soleil. L'ensemble du processus, contrôlé quotidiennement, permet d'atteindre une qualité d'eau rejetée dans le milieu de niveau "eau de baignade".

2.1. Définition de la DBO₅ et la DCO

La DBO₅ est la Demande Biochimique en Oxygène. Cela correspond à la quantité de dioxygène nécessaire aux micro-organismes aérobies de l'eau pour oxyder les matières organiques, dissoutes ou en suspension dans l'eau. C'est une consommation de dioxygène par voie biologique et elle permet de quantifier la teneur en matières organiques biodégradables d'une eau. Cette mesure se fait en comparant la concentration en dioxygène d'un échantillon avec celle du même échantillon 5 jours plus tard (l'échantillon ayant été maintenu à une température

constante, afin de favoriser l'activité des micro-organismes, et à l'obscurité pour éviter toute photosynthèse parasite).

La DCO est la Demande Chimique en Oxygène, elle quantifie la consommation en dioxygène par les oxydants chimiques forts pour oxyder les substances organiques et minérales de l'eau. La DCO et la DBO5 caractérisent donc la pollution carbonée. NTK désigne l'azote total et inclut globalement l'azote organique et ammoniacal.

Le tableau 2, résumant ces différentes valeurs, est donné ci-dessous (valeurs de la station de Biskra, valeur maximale à ne pas dépasser à la sortie du bassin et le rendement de la station pour les paramètres suivants MES, DBO5, DCO et NTK).

2.2. Différents types de lagunage

2.2.1. Lagunage naturel

Le système d'épuration des eaux usées domestiques par lagunage naturel demeure parmi les procédés les plus utilisés dans les pays à climats chauds arides à semi arides.

C'est un procédé efficace, écologique, rustique, fiable et peu onéreux du fait de son fonctionnement non mécanisé, avec des résultats hautement satisfaisants en matière de décontamination. Ce qui rend le lagunage particulièrement adapté pour la réutilisation des eaux épurées en agriculture.

Le lagunage naturel est constitué de bassins artificiels formés de digues, imperméabilisés (le fond est recouvert par un film de plastique ou d'une couche de bentonite pour ne pas polluer la nappe souterraine), dans lesquels les eaux usées urbaines brutes sont déversées. Ils sont de trois types : Anaérobies, Facultatifs et de Maturation.

Différents assemblages de ces bassins sont possibles en fonction des conditions locales, des exigences sur la qualité de l'effluent final, du débit à traiter, ... Par exemple, si l'on souhaite un degré de réduction plus élevé des organismes pathogènes, l'aménagement optimal est l'enchaînement des bassins : anaérobie - facultatif - maturation en série.

Le premier bassin est anaérobie (absence d'oxygène) ; il reçoit des charges de pollution relativement élevées qui sont exprimées en Demande Biochimique en Oxygène (DBO) par unité de volume. Celle-ci est réduite par sédimentation et digestion anaérobie à des profondeurs de 2 à 5 mètres en un temps de séjour court (un jour et plus). Des bulles apparaissent ainsi à la surface du bassin avec dégagement de biogaz (gaz composé de 70% méthane et 30 % de dioxyde de carbone).

Ce processus est particulièrement actif pour des températures supérieures à 15°C et a l'avantage de réduire près de 60% de la charge en DBO initiale. En plus, ce type de bassin, placé en tête du traitement, permet d'économiser la surface totale requise pour l'épuration.

En aval du bassin anaérobie, se trouve un bassin de grande dimension, dit bassin facultatif. Dans ce dernier, les microorganismes hétérotrophes aérobies colonisent la tranche d'eau supérieure et dans les dépôts de sédiments on assiste à la prolifération de bactéries anaérobies.

A la surface du bassin, la DBO est oxydée par les bactéries aérobies, l'oxygène qui leur est nécessaire est fourni par les échanges gazeux entre l'eau et l'atmosphère ainsi que par l'activité photosynthétique des microalgues : utilisant le dioxyde de carbone (CO_2) produit par les bactéries qu'elles convertissent en hydrates de carbone.

Toutefois, pour préserver les conditions d'aérobiose, la charge de pollution entrante ne devra pas être trop élevée, de même que la profondeur ne devrait pas dépasser les 2 mètres (**CHAIB, 2004**).

La profondeur de ces bassins est de 1.2 à 1.5 m au maximum et de 0.8 m au minimum (afin d'éviter le développement de macrophytes), avec un temps de séjour de l'ordre du mois, ces bassins fonctionnent naturellement grâce à l'énergie solaire. On peut obtenir un rendement d'épuration de 90 %. Ces procédés sont très sensibles à la température et sont peu applicables aux régions froides.

Leur dimensionnement est généralement basé, pour un climat tempéré, sur une charge journalière de 50kg de DBO5/ha j, soit environ 10 m² par habitant.

La teneur en matière en suspension dans l'effluent traité reste élevée (de 50 à 150 mg L⁻¹). Aussi la DBO5 en sortie est souvent supérieure à 50 mg L⁻¹. (UVT-FSM Procédés Biologiques d'épuration.

Il existe également des lagunes à macrophytes qui se situent généralement en position finale d'un système d'épuration par lagunage. Leur profondeur est de 0,3 à 0,6m. Les macrophytes permettent une élimination des sels nutritifs assimilés et elles réduisent les algues microscopiques.

Les lagunes composites ou mixtes sont constituées de bassins où les macrophytes et les microphytes sont associés. Aucune recirculation de l'effluent ne s'avère nécessaire. L'oxygénation du milieu résulte des échanges eau-air et surtout de l'activité photosynthétique des végétaux. La profondeur de ces lagunes est généralement de 0,3 à 0,5 m.

Enfin, les bassins de maturation reçoivent les effluents du bassin facultatif ; ce sont des bassins entièrement aérobies et de profondeur relativement faible (1 à 1,5 mètre la limite de pénétration de la lumière).

Leur taille et leur nombre sont déterminés principalement par la qualité bactériologique requise des eaux épurées. Les taux de réduction des germes fécaux sont très élevés, aussi, l'usage de ces bassins est en général réservé aux applications de réutilisation agricole non restrictive.

2.2.2. Lagunage aéré

L'apport d'oxygène est essentiellement assuré de façon artificielle: aérateurs mécaniques flottants ou fixes, insufflation d'air. En l'absence d'un compartimentage bien délimité le réacteur biologique peut se rapprocher d'un système à mélange intégral. Les lagunes aérées sont souvent suivies de vastes lagunes de décantation (éventuellement équipées de systèmes d'évacuation des boues). Le brassage provoqué par les aérateurs dans la partie aérée (puissance 2 à 5 W par m³ de lagune) réduit fortement la présence des dépôts par rapport aux lagunes naturelles.

Le processus d'épuration biologique en lagunes aérées est comparable à celui qui se déroule dans un cours d'eau chargé. À la différence des installations à boues activées, la biomasse active se présente sous la forme d'une végétation fixe (sessile) dans le fond du bassin. Les conditions nécessaires à une dégradation biologique poussée de la pollution dissoute et de la stabilisation suffisante des boues décantées par voie aérobie sont les suivantes :

- Un apport suffisant d'oxygène
- Une circulation efficace de la masse d'eau
- Une homogénéisation des eaux usées dans le bassin

Ceci afin d'éviter les « zones mortes » et assurer un échange entre les eaux à traiter et le film biologique du fond du bassin. La majeure partie des substances organiques est déjà dégradée biologiquement dans le bassin primaire. Une quantité correspondante de boues excédentaires s'y dépose avec les boues décantées au fond du bassin.

Les lagunes aérées peuvent présenter des profondeurs pouvant atteindre 2,5 à 3 m. La profondeur maximale admissible est dépendante de la puissance de brassage du système d'aération.

Le lagunage aéré se caractérise par un bassin de traitement dans lequel la charge biodégradable d'un effluent est détruite par voie bactérienne, une partie au moins de ce traitement étant réalisée en aérobie grâce à un apport d'oxygène dissous dans l'eau artificiellement (aérateurs mécaniques, insufflation d'air, etc.). Il n'y a pas de recirculation de la culture bactérienne. Pour les installations de faible taille, le traitement secondaire se compose généralement de deux lagunes :

- la lagune d'aération : dans laquelle se réalisent l'aération, la croissance et la stabilisation partielle de la culture bactérienne et l'essentiel de l'attaque de la charge biodégradable,
- la lagune de décantation : dans laquelle les matières décantables (qui forment les boues) se séparent physiquement de l'eau épurée.

On distingue classiquement deux types de lagunes d'aération définissant ainsi :

- le lagunage aéré aérobie (ou lagunage aéré stricto sensu) : dans la lagune d'aération l'énergie de brassage est suffisante pour qu'aucun dépôt ne se forme,
- le lagunage aéré aérobie - anaérobie « facultatif » : la puissance de brassage de la lagune d'aération est insuffisante pour former les dépôts. Théoriquement, un équilibre du niveau des

boues en chaque point se réalise. Ces dépôts sont évidemment en anaérobiose. De fait, l'équilibre du niveau des boues est instable, divers phénomènes intervenant (remontée de boues due à une accélération de la production de gaz, resolubilisation d'une partie des dépôts,...).

Le dimensionnement des lagunes aérées de traitement d'eaux résiduaires se calcule au moyen de la charge volumique et du temps de séjour. Il est considéré qu'une charge volumique en DBO5 $\leq 25 \text{ g/m}^3 \text{ jour}$ correspondant à un volume spécifique $\geq 2,4 \text{ m}^3/\text{EH}$. En phase d'aération, même avec un apport important d'eaux étrangères, le temps de séjour ne doit pas être inférieur à 5 jours. D'autre part, le besoin spécifique brut en oxygène pour dégrader les substances polluantes est basé à $1,5 \text{ kg O}_2/\text{kg DBO5}$. En pratique, suivant les études, on atteint de bons résultats en disposant les aérateurs dans la lagune primaire de telle sorte que l'ensemble de l'apport d'oxygène s'effectue dans la zone la plus chargée. Concernant la circulation et l'homogénéisation, une puissance volumique de $1 \text{ à } 3 \text{ W/m}^3$ est nécessaire. La puissance varie en fonction du système d'aération et de la forme du bassin. Il est conseillé de fractionner le volume à aérer. La première étape correspondant à 60 % et la seconde de 40 % du volume total. Cette solution est plus efficace qu'en abaissant la charge volumique. Le temps de séjour favorise une biocénose avec un meilleur rendement. D'autre part, cette répartition de la puissance d'aération permettra de ne pas rendre obsolète les qualités épuratoires de la station lors de la vidange de lagune. Les installations à une seule étape aérée sont réalisables dans le cas d'un nombre de raccordements réduits et alimentés par un réseau unitaire. Dans ce cas précis, la charge volumique à considérer ne dépasse pas $20 \text{ g DBO5/m}^3 \text{ jour}$. Le temps de séjour en bassins de finition varie de 1 à 2 jours, correspondant à un volume spécifique de $0,3 \text{ à } 0,5 \text{ m}^3/\text{EH}$. En station équipée d'une seule lagune aérée, il faut dimensionner d'une manière un peu plus importante le bassin de finition. À noter que le temps de séjour trop long en bassin de finition peut favoriser la prolifération d'algues.

2.2.3. Lagunage anaérobie

Il n'est applicable que sur des effluents très concentrés et, le plus souvent comme prétraitement avant un étage aérobic. La couverture de ces lagunes et le traitement des gaz produits sont nécessaires vu les risques de nuisances élevés (odeurs).

Les risques de nuisance sont particulièrement importants et ces lagunes deviennent inefficaces par basse température. Elles ne sont donc utilisables que dans des zones suffisamment isolées et avec des conditions climatiques favorables. Des dispositifs de couverture de ces lagunes, permettant de récupérer le gaz de digestion et de réduire les inconvénients propres au système, ont été mis en œuvre sur certains effluents industriels.

Les temps de séjour sont souvent supérieurs à 50 jours. Les charges organiques appliquées sont de l'ordre de $0,01 \text{ Kg de DBO5 /m}^3 \cdot \text{j}$. Une profondeur importante (5 à 6 m) est en principe un élément favorable au processus.

2.3. Dimensionnement d'une installation de lagunage

2.3.1. Dimensionnement des bassins anaérobies

- Volume utile = (charge en DBO5 * 103)/charge volumique
- Volume plus tranche morte d'environ 30% = $V_u (1 + 30\%)$
- Charge volumique = $20 * T (^{\circ}\text{C}) - 100$ (température de l'hiver)
- temps de séjour = $V_u / \text{débit journalier}$
- nombre des bassins anaérobies :
- profondeur d'eau comprise entre 3 et 4 mètres
- surface des bassins = V_u / P
- rapport longueur largeur : $l=L$
- rendement épuratoire 40%

2.3.2. Dimensionnement des bassins facultatifs

- Surface = (charge en DBO5 * (100% - rendement épuratoire)/ charge surfacique
- Charge surfacique = $20 * T (^{\circ}\text{C}) - 60$ (température de l'hiver)
- Temps de séjour = (surface * profondeur) / débit
- Nombre des bassins facultatifs
- Profondeur d'eau comprise entre 1 et 1,5 mètre
- Volume = surface * profondeur
- Rapport longueur largeur $L=2l$
- Rendement épuratoire 80%

2.3.3. Dimensionnement des bassins de maturation

- Constante $k = 2,6 (1,19) (T-20)$ température du printemps
- Charge surfacique = $20 * T (^{\circ}\text{C}) - 60$
- Nombre de bassins= 2
- Profondeur d'eau 1,2m
- Surface = charge polluante / charge surfacique
- Volume = surface * profondeur
- Rapport longueur largeur $L=2l$
- temps de séjour ($T_{m1}= 5j ; T_{m2}=3j$)
- Coliformes fécaux à l'entrée = 107 CF/ 100 ml
- Abattement $(\text{CF entrée} / \text{CF sortie}) = 1 / ((1+K * T_a) (1+K * T_f)(1+K * T_m))^n$

T_a : temps de séjour pour le bassin anaérobie

T_f : temps de séjour pour le bassin facultatif

T_m : temps de séjour pour le bassin de maturation

N : nombre des bassins

3. Biofixation du CO₂ par les microalgues

3.1. Origines du CO₂

Le groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) définit les flux de CO₂ sur la base de son origine : anthropique si le flux est le résultat d'une activité humaine ou naturelle si le flux est généré hors du contrôle humain.

L'homme exploite des ressources fossiles carbonées, dites « non renouvelables » (pétrole, gaz naturel, charbon...) dans des secteurs variés tels que l'énergie, le transport, la chimie... pour aboutir, en fin de cycle, à la production de CO₂, principal gaz à effet de serre (GES) d'origine anthropique.

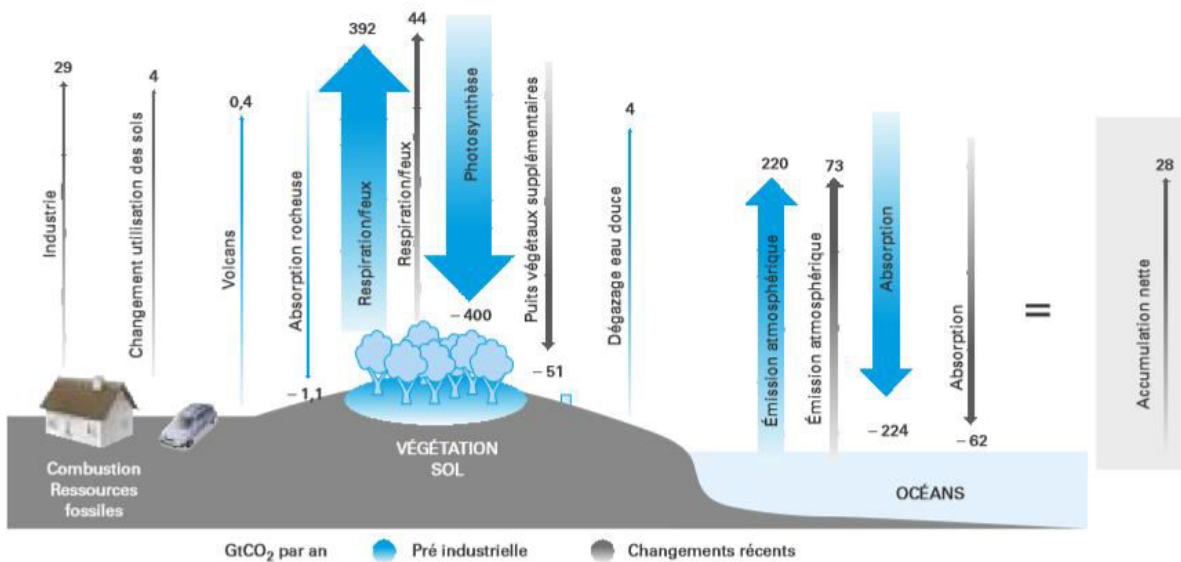


Figure 24: Bilan annuel des flux atmosphériques de CO₂

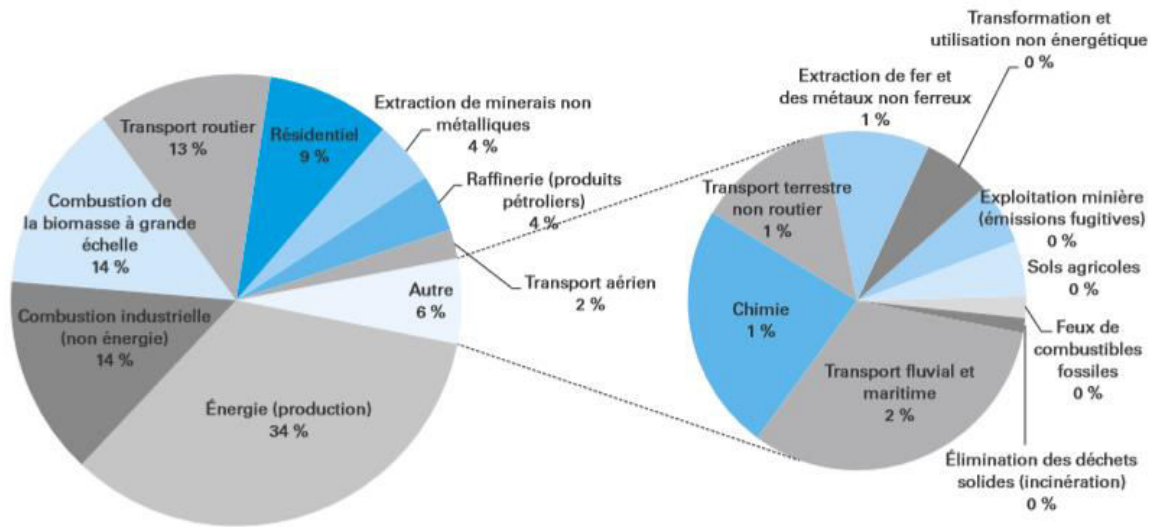


Figure 25 : Répartition des émissions atmosphériques anthropiques de CO₂ au niveau mondial (33 GtCO₂ en 2010)

Les émissions mondiales de CO₂ répertoriées d'origine anthropique (de l'ordre de 36 GtCO₂ en 2013 contre 20 GtCO₂ en 1970) proviennent principalement de l'exploitation de ressources fossiles : production d'énergie (35 %), construction et fabrication manufacturière (25,8 %), transport (17,3 %), etc.

Cette répartition, en accord avec les comptabilités du type « Nation unies », « GIEC », ou « protocole de Kyoto », exclut les émissions de CO₂ liées aux modifications de sols d'origine humaine : déforestation, exploitation forestière, feux de tourbe et de forêt, décomposition de la biomasse aérienne postcombustion, décomposition du carbone organique des tourbes asséchées. Ces émissions augmenteraient les émissions annuelles de CO₂ de l'ordre de 10 à 20 %.

3.2. Voies de valorisation du CO₂

Les voies de valorisation du CO₂ peuvent être catégorisées en trois groupes :

- la valorisation sans transformation qui utilise le CO₂ directement pour ses propriétés physiques ;
- la valorisation par transformation chimique qui utilise le CO₂ comme réactif chimique afin de générer un produit valorisable ou à valeur énergétique ;
- la valorisation par transformation biologique qui utilise le CO₂ comme nutriment permettant de développer de la biomasse source de produits d'intérêts (lipides, glucides, composés celluliques...).
-

3.3. Biofixation du CO₂ par les microalgues

Les micro-organismes photosynthétiques de type microalgues et cyanobactéries tendent à s'imposer dans de nombreux secteurs applicatifs. De par leur croissance photosynthétique rapide en milieu aqueux, ces microorganismes offrent également la possibilité d'associer à leur croissance la fixation de CO₂ d'origine industrielle. Cependant, les micro-organismes photosynthétiques n'ont pas la capacité d'assimiler le carbone sous forme gazeuse (CO_{2,g}). Le CO_{2,g} doit préalablement être transféré dans la phase liquide sous forme de carbone inorganique dissous (CID) pour ensuite être assimilé et ainsi biofixé.

3.4. Croissance des micro-organismes photosynthétiques

3.4.1. Besoins généraux des micro-organismes photosynthétiques

Les microalgues se développent en milieu aqueux, la lumière leur permettant de croître par absorption des minéraux nécessaires et du carbone inorganique en phase liquide. Les systèmes de culture nécessitent un maintien de conditions physico-chimiques adéquates (pH, température, force ionique...) et les apports suivants :

- lumière solaire ou artificielle, dans la gamme de longueurs d'onde actives pour la photosynthèse : 0,4-0,7 μm ;
- carbone inorganique dissous (en mode de production autotrophe) ;
- nutriments minéraux : azote sous forme nitrate ou ammonium, sulfate, phosphate, éléments métalliques à l'état de traces (Mg, Ca, Mn, Fe, etc.).

3.4.2. Sélection de l'espèce de microalgue

La sélection d'une souche de microalgues ayant une capacité importante de fixation de CO₂ est basée sur les paramètres suivants :

- _ Tolérance vis-à-vis de concentrations élevées de CO₂ ;
- _ Vitesse de croissance importante en présence de forte concentration cellulaire ;
- _ Tolérance vis-à-vis des gaz toxiques tels que le monoxyde d'azote et le monoxyde de soufre ;
- _ Tolérance vis-à-vis des températures élevées.

3.4.3. Activité photosynthétique

Elle se compose d'une série de réactions complexes d'oxydoréduction durant laquelle l'énergie lumineuse, sous forme d'énergie électromagnétique, est absorbée par des pigments (chlorophylle), et est convertie en énergie chimique entraînant la production d'oxygène et des sucres ainsi que d'autres métabolites secondaires. Ce phénomène est régi par l'équation suivante :



La photosynthèse se décompose essentiellement en deux étapes : Une première réaction dite phase claire durant laquelle une réaction photochimique d'oxydation par fractionnement de l'eau se produit ; la seconde la phase sombre, décrite par la fixation du carbone selon le cycle de Calvin.

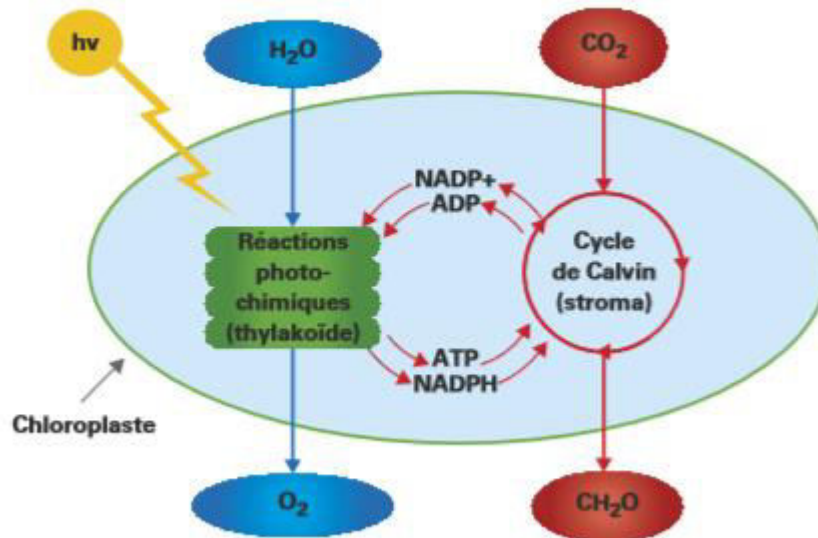


Figure 26 : Représentation schématique de la photosynthèse dont le principe mène à la création de biomasse par assimilation de CO_2 grâce à l'énergie lumineuse captée

-Mécanisme de concentration de CO_2 « MCC »

Les micro-organismes photosynthétiques sont dans l'incapacité d'utiliser le dioxyde de carbone sous forme gazeuse. Celui-ci doit être préalablement transféré à la phase liquide sous forme de carbone inorganique dissous pouvant être assimilé. Or, le coefficient de diffusion du CO_2 dans l'eau est 10 000 fois inférieur à celui observé dans l'air (à 20 °C : $1,73 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ contre $1,59 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$). Les micro-organismes photosynthétiques ont par conséquent développé des mécanismes de concentration du carbone (MCC) basés notamment sur le transport actif de bicarbonate (HCO_3^-) pour compléter la diffusion naturelle du CO_2 à travers la cellule. Dans le cas où l'apport est insuffisant, comme cela est usuellement rencontré dans la nature. Le HCO_3^- diffuse par transport actif dans la cellule grâce à l'anhydrase carbonique extracellulaire, située sur la paroi des cellules, et ensuite déshydraté, entraînant une augmentation de la concentration de CO_2 au niveau cellulaire.

Le CO_2 accumulé subit une biotransformation par l'enzyme RuBisCO en glycéraldéhyde 3-phosphates selon le cycle de Calvin à l'intérieur du chloroplaste. Ces glycéraldéhydes 3-

phosphates seront utilisés par la suite pour la synthèse de matières organiques qui sont essentiellement des glucides.

3.5. Systèmes de culture des micro-organismes photosynthétiques

La particularité de la culture des microalgues réside dans l'activité photosynthétique et donc l'apport nécessaire d'une énergie lumineuse suffisante. Il existe trois modes de fonctionnement : mode batch, mode *fed*-batch et le mode continu.

La culture de micro-organismes photosynthétiques pouvant aller de quelques litres (en laboratoire notamment) à plusieurs dizaines ou centaines de mètres cubes. Ceci, combiné avec le besoin d'apport en lumière, amène à distinguer les systèmes utilisant le rayonnement solaire des systèmes basés sur une source de lumière artificielle (tubes fluorescents, lampes à décharge, LED) que l'on rencontre plus particulièrement dans les productions à petite échelle (jusqu'à quelques centaines de litres en général).

Un second choix majeur consiste en l'utilisation de systèmes ouverts (mode continu) à l'ambient ou clos (photobioréacteurs). Les systèmes ouverts (raceways, lagunes) apportent par principe un niveau réduit de contrôle, en particulier au niveau bactériologique.

Les systèmes clos possèdent deux avantages majeurs face aux systèmes ouverts ; ils permettent de réduire les risques de contamination mais aussi de mieux contrôler tous les paramètres de culture à savoir le pH, la température et l'apport de nutriments au sens large. Ils limitent également fortement l'évaporation. Cependant, ces avantages nécessitent la mise en place de nombreux appareils de contrôle engendrant un coût supplémentaire non négligeable ainsi que des compétences et une demande en maintenance plus importantes.

Quels que soient les systèmes de culture, l'agitation apparaît souvent comme un point clé pour éviter les zones mortes, le dépôt de biofilm et permettre une bonne accessibilité des nutriments aux micro-organismes photosynthétiques. L'agitation des photobioréacteurs est donc généralement assurée de façon mécanique (hélices marines, pales) ou par un bullage de gaz (colonne à bulles, gzosiphon). Le choix de l'agitation devra avant tout prendre en compte le micro-organisme photosynthétique étudié, et en particulier sa fragilité aux cisaillements hydrodynamiques.

Le choix du système de culture dépend donc principalement des contraintes d'exploitation (niveau de contrôle, production visée, ressources disponibles en eau, gestion du CO₂...), et des caractéristiques du micro-organisme photosynthétique étudié/produit en termes de besoins physiologiques de la souche (milieu, température, pH, robustesse) et son comportement (sédimentation, biofilms).

3.6. Modélisation de la vitesse de croissance

La croissance des microalgues est décrite via le taux spécifique de croissance, noté μ (h^{-1}), défini par (mode batch) :

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

X : la concentration en biomasse,

$\frac{dX}{dt}$: La variation de la concentration en fonction du temps

Modèles généraux

Tableau 05 : Différents modèles de la vitesse de croissance des microalgues

Modèles	Taux spécifique	Caractéristiques
Monod	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$	Utilisé pour modéliser l'effet limitant d'un substrat sur la vitesse de croissance d'un microorganisme
Haldane	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S + \frac{S^2}{K_1}}$	Il complète le modèle de Monod. Il permet de mettre en évidence l'effet d'inhibition du même substrat sur la cinétique de croissance
Contois	$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s X + S}$	Il permet de mettre en évidence l'effet simultané de la limitation par le substrat et de l'impact de la concentration cellulaire sur la cinétique de croissance
Droop	$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{Q_{\min}}{Q}\right)$	Il caractérise l'influence de la concentration d'azote sur la vitesse de croissance des microalgues. Il exprime la cinétique de croissance en fonction des composés intracellulaires. Il fait intervenir la notion de quota cellulaire interne, qui représente la masse d'élément limitant intracellulaire par unité de biomasse.

Avec

μ : taux spécifique de croissance (h^{-1})

μ_{\max} : vitesse spécifique maximale de croissance (h^{-1})

S : concentration du substrat limitant (g/L ou mol/L)

K_S : constante de demi-saturation en substrat limitant (g/L ou mol/L)

K_I : constante d'inhibition. Elle représente la concentration du substrat à partir de laquelle il devient inhibiteur de la croissance cellulaire (g/L ou mol/L)

Q_{\min} : quota intracellulaire minimum pouvant être atteint pour l'élément limitant (g de substrat limitant/ g de biomasse)

Q : quota intracellulaire du substrat limitant (g de substrat limitant/ g de biomasse)

3.6.1. Modèle portant sur l'influence de la lumière

La croissance est déterminée en fonction de l'intensité de lumière incidente. Ce modèle suppose que la lumière incidente est d'intensité constante ou avec de faibles variations.

Cas de *Chlorella vulgaris* :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{I}{K_{SI} + I + \frac{I^2}{K_t}}$$

Avec :

K_t : constante de photo-inhibition ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)

K_{SI} : constante de saturation relative à la lumière ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)

I : intensité lumineuse incidente ($\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$)

Modèle portant sur l'influence du carbone

Dans les conditions de faibles concentrations de CO_2 , la capacité d'adaptation des cellules algales dépend de leurs préférences *vis-à-vis* de l'une ou l'autre des formes du carbone inorganique présentes dans le milieu liquide.

Le modèle de Monod permet de tenir compte de l'effet de limitation par CO_2 et par CIT. Une modélisation de l'influence de deux sources de carbone (CO_2 et bicarbonate) sur la vitesse de croissance est représentée par la relation suivante :

$$\mu = \mu_{\max} \frac{[\text{HCO}_3^-] K_{S,\text{CO}_2}}{K_{S,\text{HCO}_3^-} + [\text{HCO}_3^-] K_{S,\text{CO}_2} + [\text{CO}_2]}$$

Avec

$[\text{HCO}_3^-]$: Concentration de bicarbonate dissous (mol/L)

$[\text{CO}_2]$: Concentration de dioxyde de carbone dissous (mol/L)

K_{S,HCO_3^-} : Constante de demi-saturation relative au bicarbonate (mol/L)

K_{S,CO_2} : Constante de demi-saturation relative au dioxyde de carbone dissous (mol/L)

Modèle portant sur l'influence simultanée de plusieurs paramètres

Des modèles de la cinétique plus complets combinent des lois de cinétiques qui considèrent plusieurs substrats. Ex : lumière et azote modèle de Droop pour l'azote et modèle de Monod pour la lumière)...

Le choix du modèle dépend des caractéristiques de la microalgue et des conditions opératoires.
Cas de *Chlorella vulgaris*

$$\mu = \mu_{max} \left(1 - \frac{Q_{min}}{Q} \right) \frac{(I_{in} - I_{out}) A / (VX)}{K_E + (I_{in} - I_{out}) A / (VX)}$$

Avec

Q : quota intracellulaire d'azote (gN cellule⁻¹)

Q_{min} : quota intracellulaire minimum d'azote (gN cellule⁻¹)

I_{in} I_{out} : lumière incidente et sortante (μEm⁻²s⁻¹)

A, V : aire et volume du PBR

K_E : constante de saturation relative à la lumière (μEm⁻²s⁻¹)

X : concentration cellulaire (10⁹ cellules/L)

Choix du modèle de croissance

Ces différents modèles permettent donc de décrire la vitesse de croissance des microalgues en fonctions des conditions opératoires. Le choix d'une structure de modèle à considérer dépend de la microalgue mise en culture, des conditions opératoires, de la géométrie du photobioréacteur et de la finalité de la modélisation.

On peut utiliser un modèle mis au point pour une espèce de microalgue, pour l'étude d'une autre microalgue, sous réserve qu'elles présentent un comportement similaire vis-à-vis d'un substrat donné (limitation/inhibition pour un substrat donné par exemple).

3.6.2. Modèle de bilan de matière

Avec l'hypothèse d'un réacteur continu parfaitement agité, il est alors possible de décrire l'évolution des concentrations des composants dans la phase liquide du réacteur à partir des bilans de matière. Un modèle général est donné par :

$$\frac{d\mathcal{E}}{dt} = Kr(\mathcal{E}, t) - D\mathcal{E} - Q_{out} + Q_{in}$$

Avec :

ℰ : vecteur contenant les concentrations des composants dans la phase liquide dans le réacteur

K : matrice contenant les coefficients pseudo-stœchiométriques (avec l'ajout du signe « + » si le composant est produit et d'un signe « - » s'il est consommé)

r : vecteur des vitesses de réaction

Le terme $Kr(\mathcal{E}, t)$ décrit la cinétique des réactions biochimiques

Le terme $-D\mathcal{E} - Q_{out} + Q_{in}$ décrit la dynamique associée aux phénomènes de transport des composants

D : taux de dilution, définit par le rapport du débit d'alimentation et du volume utile du réacteur

Q_{out} : débit massique par unité de volume de sortie des composants ℰ sous forme gazeuse

Q_{in} : débit massique volumique d'entrée des composants ℰ sous formes gazeuse et liquide

Le transfert gaz-liquide est modélisé *via* le modèle de la couche limite. Le flux de transfert de la phase gazeuse vers la phase liquide d'un composant est donné par l'expression :

$$N_i = K_L(\mathcal{E}_i^* - \mathcal{E}_i)$$

Avec

K_L : Coefficient de transfert global du composé considéré relatif à la phase liquide

\mathcal{E}_i : Concentration du corps i dans le cœur de la phase liquide

\mathcal{E}_i^* : Concentration qu'aurait la phase liquide si elle était en équilibre avec la phase gazeuse, l'équilibre étant donné par la loi de Henry

Le flux est exprimé en g ou en nombre de mol transférés par unité de temps et unité de surface perpendiculaire au transfert.

Pour calculer le débit transféré par unité de volume de liquide, il faut donc multiplier le flux par l'aire interfaciale par unité de volume disponible entre les deux phases, notée a . il vient donc :

$$Q_i = K_L a (\mathcal{E}_i^* - \mathcal{E}_i)$$

Le produit $K_L a$ (appelé coefficient de transfert volumique) dépend des conditions opératoires et notamment de l'hydrodynamique du réacteur.

3.7. Dispositif expérimental

Cas : *Chlorella vulgaris*

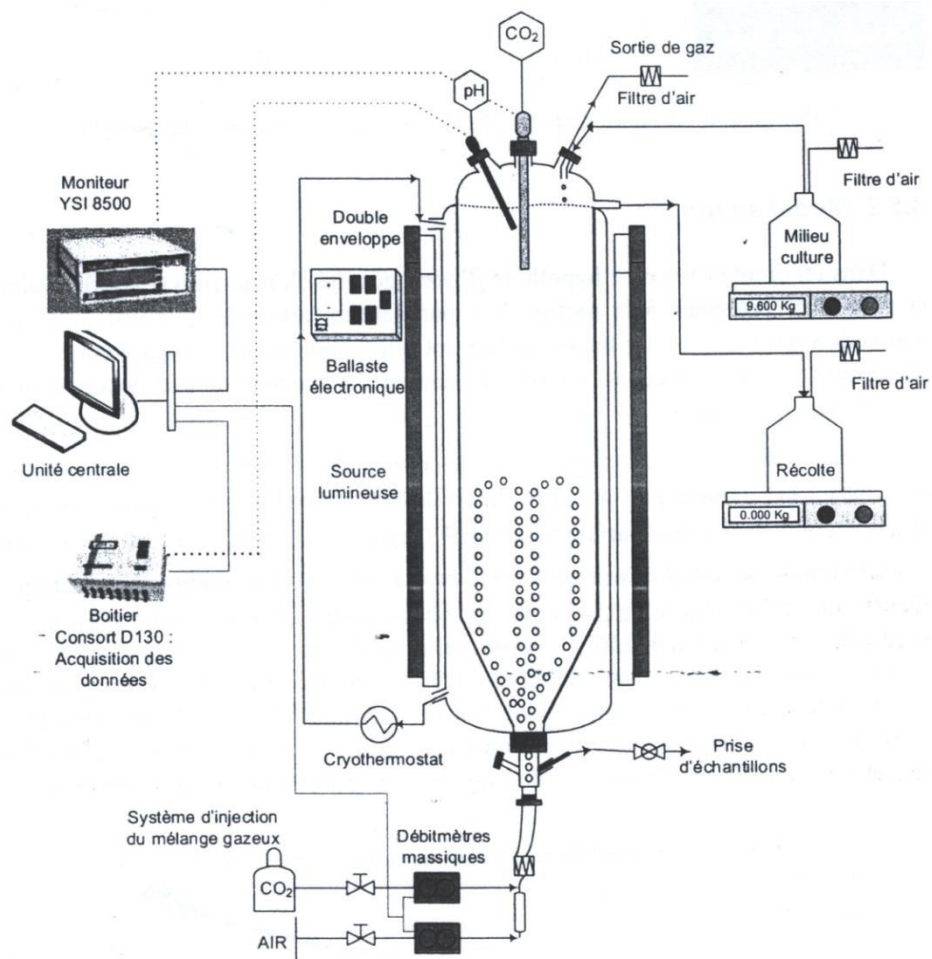


Figure 27 : Représentation schématique du photobioréacteur pour la culture *Chlorella vulgaris*

Références bibliographiques

- 1- **A. CHAIB, 2004.** Bioépuration par lagunage naturel. Bulletin des Energies Renouvelables, n°5.
- 2- **A. Klutse and B. Baleux, 1995.** Élimination des œufs de nématodes et des kystes de protozoaires des eaux usées domestiques par lagunage à microphytes en zone soudano-sahélienne. Revue des sciences de l'eau. Volume 8, Number 4.
- 3- **Benalia Ouanouk, 2014.** Gestion de l'environnement. Traitement des eaux usées. Cours biens illustrés. Exercices corrigés.
- 4- **Félix Marsault, Bruno Naylor, Antoine Reigue, 2013.** Traitement et valorisation des eaux usées : l'exemple de la station de lagunage de Rochefort. ATELIER L'EAU - Qualité vs Quantité. Centre d'Enseignement et de Recherches sur l'Environnement et la Société Environmental Research and Teaching Institute (CERES-ERTI). Ecole Normale Supérieure.
- 5- **Hatem Dhaouadi.** Traitement des Eaux Usées Urbaines. Les procédés biologiques d'épuration. Université Virtuelle de Tunis. Cours
- 6- **Jean-Pierre Riba.** Réacteurs enzymatiques et fermenteurs F-3600. Techniques de l'ingénieur. Traité Génie des procédés.
- 7- **Jérémy Pruvost , Benjamin Legouic, Jean-François Cornet et Christophe Lombard, 2017.** Biofixation du CO2 par microalgues. Techniques de l'ingénieur CHV7005.
- 8- **Mohammed Boutayeba, Abdelhamid Bouzidia, 2013.** Epuration des eaux usées domestiques par lagunage naturel dans cinq stations d'épuration de la région de la Chaouia Ouardigha-Maroc. Revue « Nature & Technologie ». C- Sciences de l'Environnement, n° 08. Pages 49 à 53.
- 9- **Mounira CHACHOUA et Abdelali SEDDINI, 2013.** Étude de la qualité des eaux épurées par le lagunage naturel en Algérie. Afrique SCIENCE 09(3) (2013) 113 – 121 113.
- 10- **Moussard, 2010.** Biochimie et biologie moléculaire. de boeck.

- 11- **Pascal-Chillet, 2011.** La fermentation. Opérations unitaires en génie biologique. BioTech.
- 12- **René Scriban.** Biotechnologies. Tec et Doc.
- 13- **Siham Tebbani, Fillipa Lopes, Rayen Filali, Didier Dumur et Dominique Pareau, 2016.** Biofixation de CO₂ par les microalgues. Modélisation, estimation et commande. ISTE Editions.
- 14- **Sophia Bouzit et Zineb Taalibi, 2012.** Dimensionnement de la station d'épuration de type lagunage de la ville de Chemaia (Province d'El Youssoufia). Mémoire de licence en ès Sciences et Techniques. Office nationale de l'eau potable. Direction de l'assainissement et de l'environnement, Rabat. Faculté des sciences et techniques.
- 15- [https://elearning.univ-bejaia.dz/pluginfile.php/157230/mod](https://elearning.univ-bejaia.dz/pluginfile.php/157230/mod_resource/content/1/Chapitre%204.pdf)
- 16- [_resource/content/1/Chapitre%204.pdf](https://elearning.univ-bejaia.dz/pluginfile.php/157230/mod_resource/content/1/Chapitre%204.pdf)