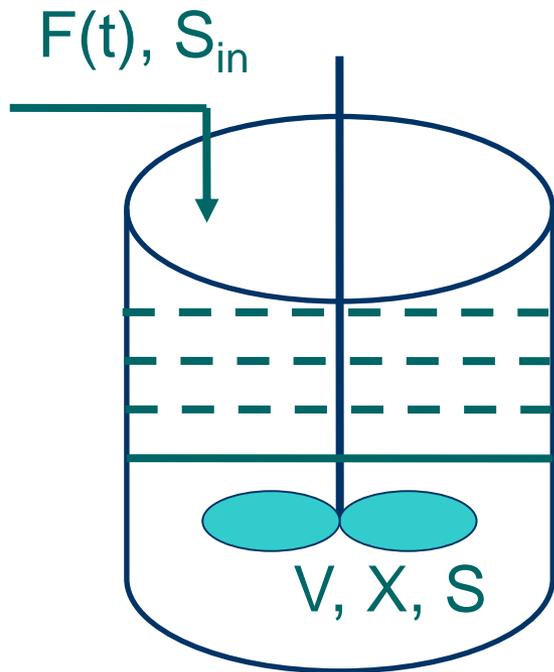


Cuvée alimentée (Fed-batch)



- Alimentation seulement
- Régime transitoire
- À $t = 0$, $V = V_0$, $X = X_0$, $S = S_0$
- F sera contrôlé de manière à maintenir S constant, $S = S_0 = S_c$
- Si S est constant, μ le sera aussi, $\mu = \mu_c$

Fermentation en continu-discontinu, dite de type fed-batch

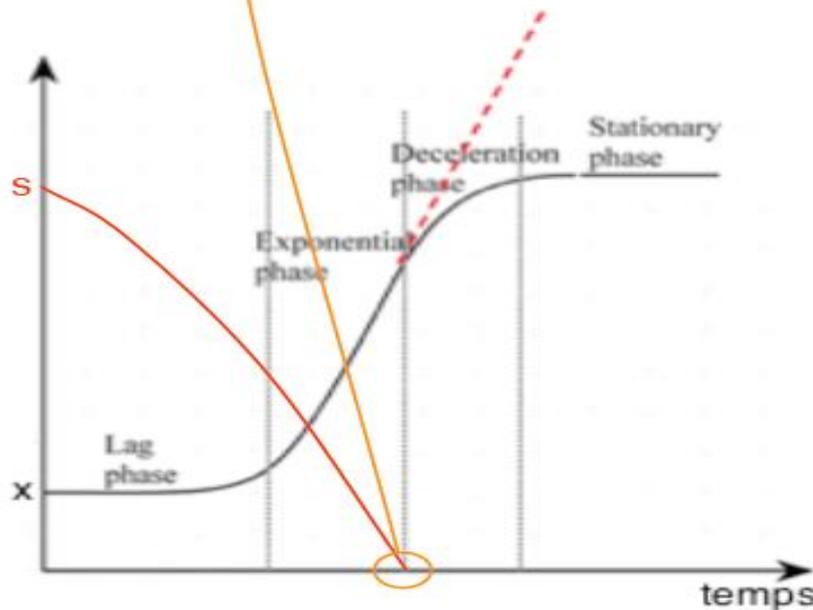
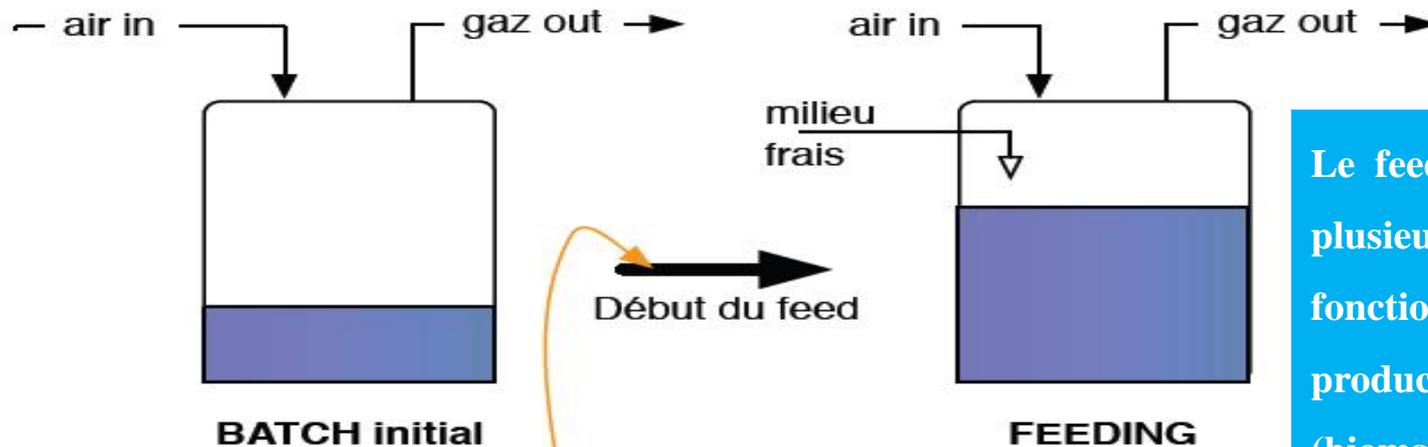
Introduction

Culture dite discontinue alimentée, le Fed-Batch est caractérisé par un **volume variable**. La fermentation se fait dans un premier temps sous forme d'un batch normal dans un volume réduit (pied de cuve). Du milieu frais est ensuite ajouté pour maintenir les cellules dans l'état souhaité (phase exponentielle, phase stationnaire).

Cette stratégie est très utile pour les cas de **répression de croissance ou de production du au substrat (ou toxicité de ce dernier)**. En effet il est possible d'adapter le feed pour ne jamais dépasser les valeurs limites.

Le feed peut être linéaire ou exponentielle. Pour déterminer la meilleure stratégie il faut connaître la cinétique de la souche utilisée. C'est pour cela qu'on utilise le plus souvent cette méthode avec des souches caractérisées telles qu'*Escherichia coli*.

Fermentation en continu-discontinu, dite de type fed-batch



Le feed peut être démarré à plusieurs moments, en fonction du type de production envisagée (biomasse ou produit du métabolisme secondaire).

Si le but est de maintenir les cellules dans leur phase exponentielle, on attend généralement que le substrat devienne limitant avant d'en introduire du frais.

Avantages

- Coûts opérationnels inférieurs à ceux du batch mais supérieurs à ceux d'une culture continue
- Il est possible de combiner 2 ou plus réacteurs pour obtenir une culture plus ou moins continue
- Taux de croissance et de production plus élevée qu'en batch tout en maintenant un niveau de substrat bas (proche de 0), **1 fed-batch est plus ou moins égal à 2 batchs**
- Moins de risque d'inhibition due au substrat, de toxicité d'un produit accumulé ou de stress osmotique car il est possible d'adapter les stratégies de feed en conséquence.
- **Il est possible de séparer les phases de croissance et de production**, des précurseurs peuvent être ajoutés
- Moins de risque de limitations due à l'oxygène (taux de croissance = OUR maintenu en dessous de l'OTR)

Désavantages

- Coûts d'installation supérieurs à ceux d'un batch
- Grande quantité de milieu nécessaire ce qui implique sa stérilisation en continu
- La souche utilisée doit être totalement caractérisée (cinétique, physiologie) pour pouvoir développer une stratégie de feeding.
- Des capteurs sophistiqués et un ordinateur sont nécessaires pour contrôler le feed et maximiser la productivité.

Exemples

- Pour la **production d'un métabolite secondaire (ex : protéine recombinante)**, il faut garder la culture en phase stationnaire. Pour se faire il est intéressant d'ajouter continuellement du substrat tout en restant à un niveau presque limitant. Cela force la cellule à utiliser son métabolisme secondaire qui est très souvent inhibé par une trop grosse concentration de substrat.
- La production de ***S. cerevisiae*** se fait en fed-batch pour augmenter la productivité tout en évitant l'effet Crabtree

- **Production de protéines recombinantes à l'aide d'hybridomas** : si la concentration de glucose dépasse les 4 g/l, les enzymes respiratoires sont inhibées. Même en ayant une pO₂ élevée, du lactate se forme. Il faut donc maintenir le glucose à une concentration inférieure à 4 g/l (feed contrôlé par analyse de gaz : O₂, CO₂, RQ, sonde à glucose) et un RQ entre 0.95 et 1 (c'est à dire que la production de CO₂ soit similaire à la consommation d'O₂ (signe d'une respiration cellulaire normale))

- **La production d'hormones recombinantes** se fait en 2 étapes :

- La première partie sert à optimiser la croissance pour atteindre une densité cellulaire optimale. On contrôle le feed en mesurant l'OUR et le pH (formation de lactate et/ou accumulation d'ammonium)

- La production est ensuite induite avec un agent chimique ou un choc thermique. Cette partie de la fermentation n'est contrôlée qu'avec la mesure de l'OUR

Fermentation continue des micro-organismes

Une culture continue est caractérisée par un volume constant (après la phase initiale) et un flux entrant qui est égal au flux sortant. Ainsi l'excès (cellules, produit, déchets, etc..) quitte le système à la même vitesse que le milieu frais y est introduit.

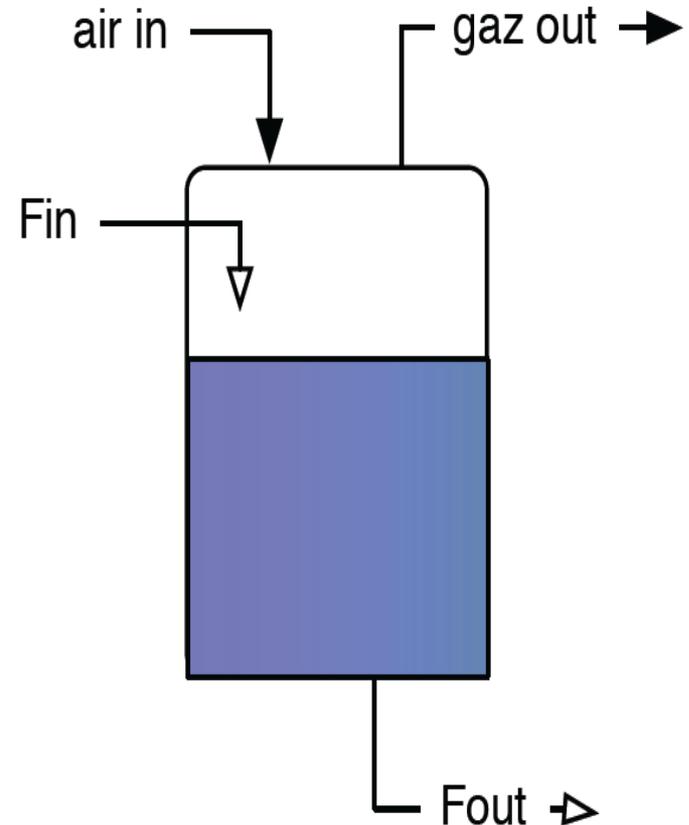
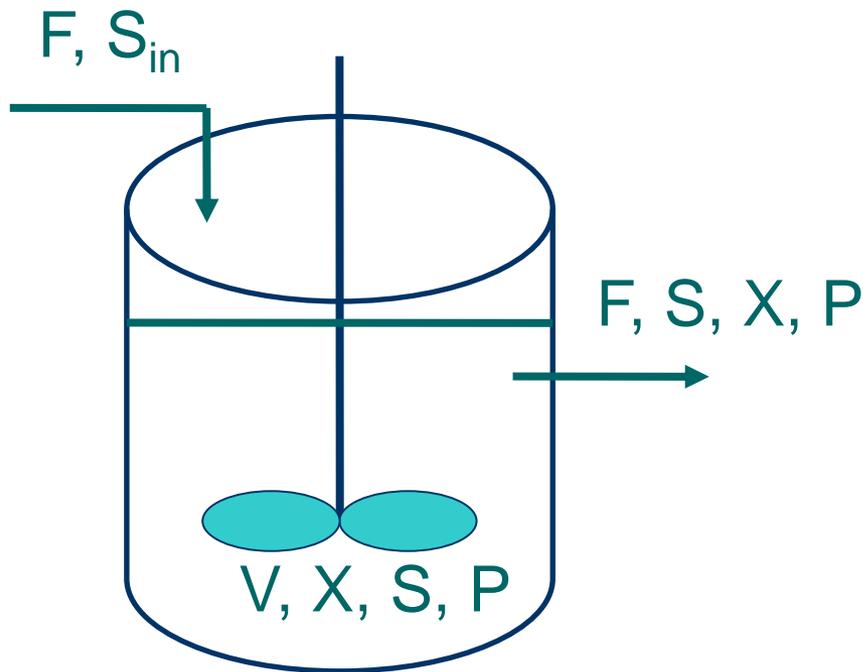


Figure : Stratégie de la fermentation continue

Chemostat (continu, CSTR)



- Une entrée, une sortie

- Mélange idéal:

$$X_{out} = X, S_{out} = S, P_{out} = P$$

- Après une période initiale d'adaptation, ce système atteindra un régime permanent:

$$V = \text{cst}, X = \text{cst}, S = \text{cst}, P = \text{cst}$$

Les avantages de cette méthode sont :

- Cultures de longue durées (production d'anticorps 3-4 mois), peu de temps morts
- Les coûts opérationnels et de main d'oeuvre sont faibles (car il faut seulement prendre environ 1 échantillon par jour et un peu d'étapes de nettoyage et de stérilisation)
- Il est possible de maintenir la culture à un taux de croissance constant mais également d'avoir un rendement, une productivité et un facteur de conversion constants
- A productivité équivalente, le volume est plus faible que pour les procédés batchs
- Possibilité d'avoir une productivité très élevée
- Le milieu est changé continuellement, éliminant le risque d'accumulation de composés toxiques pour la cellule.

Les inconvénients de cette méthode sont :

- Équipement très cher, car il faut une installation fiable et de haute qualité (pas seulement le réacteur mais toute l'infrastructure)
- De grandes réserves de milieu sont nécessaires et ce dernier a besoin d'être continuellement stérilisé. De plus le produit doit être isolé et purifié en continu
- Risque de contamination important (à cause de la longue durée du procédé)
- Des mutations peuvent apparaître (risque d'avoir des non-producteurs) à cause de la longue durée de fermentation
- Instabilité des plasmides
- La conversion totale du substrat nécessite souvent l'utilisation d'un système "multi-stage", l'immobilisation des cellules ou encore leur recyclage (particulièrement utile pour cellules animales car la densité maximale est relativement faible)
- Le produit obtenu n'est pas très concentré, ce qui implique des étapes supplémentaires lors de la purification
- La validation d'un tel système est très compliquée.

Stratégie

On peut débiter la culture continue à plusieurs points différents du batch initial. Néanmoins on choisit en général le milieu de la phase exponentielle de la croissance.

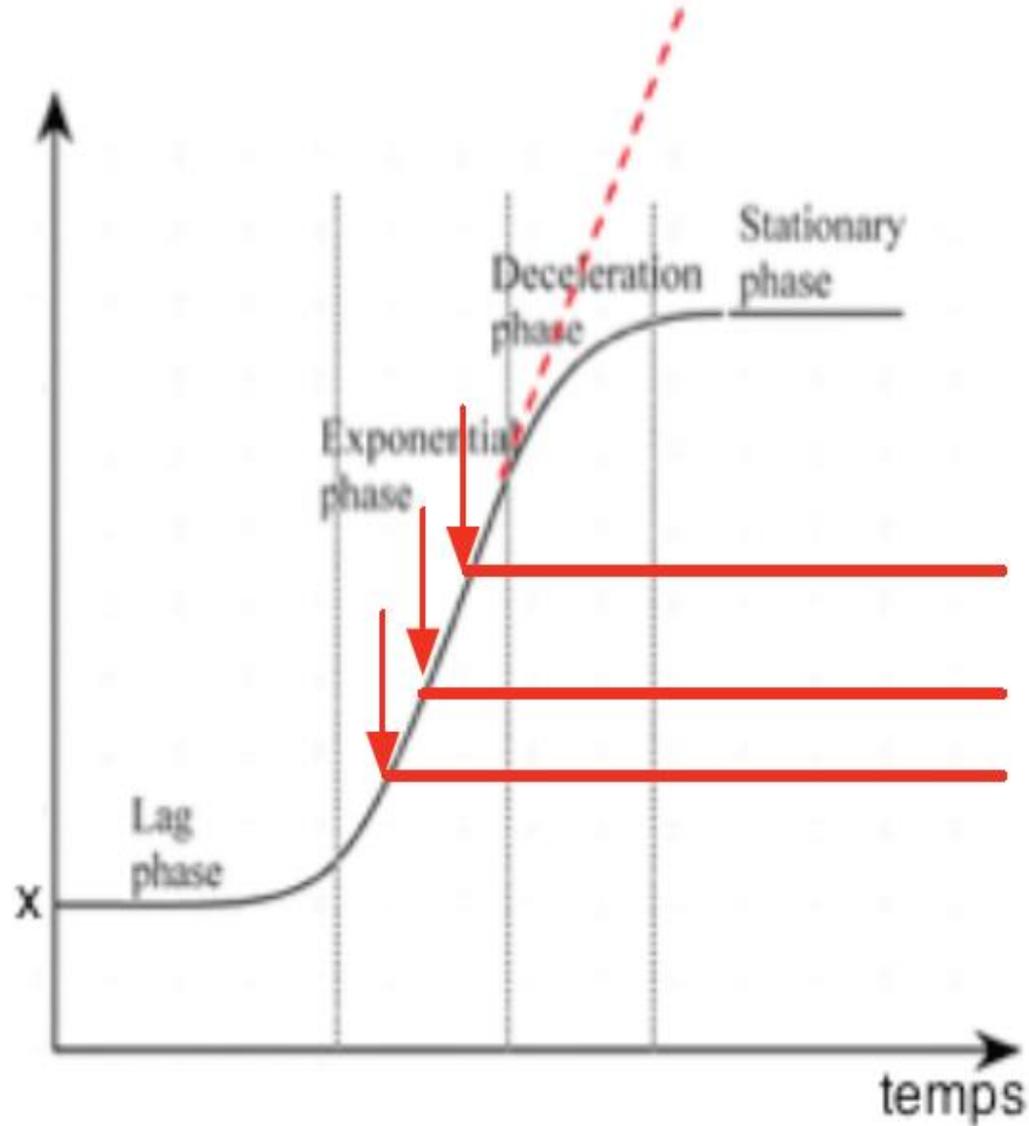


Figure : Début de l'alimentation pendant la fermentation continue

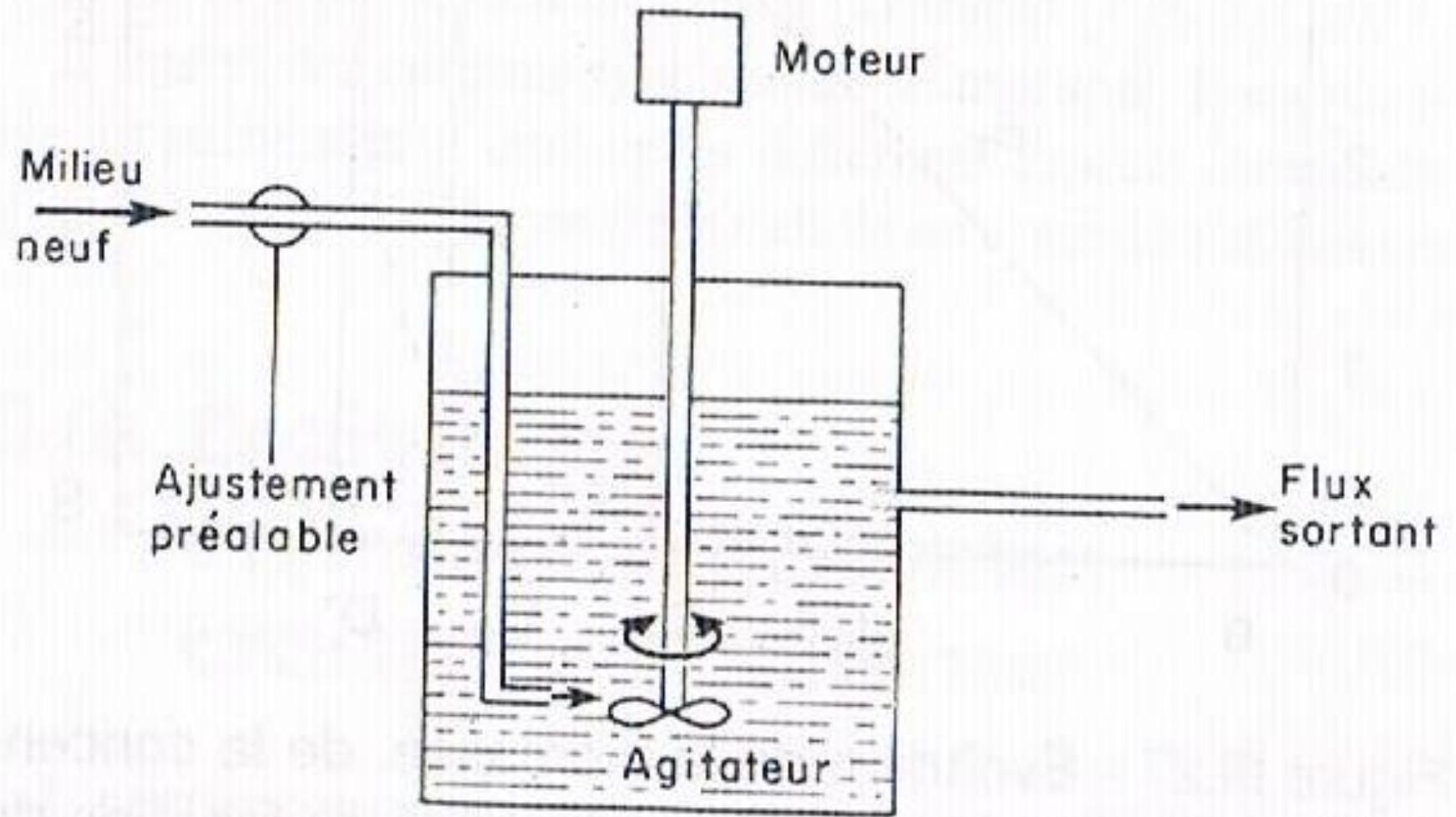
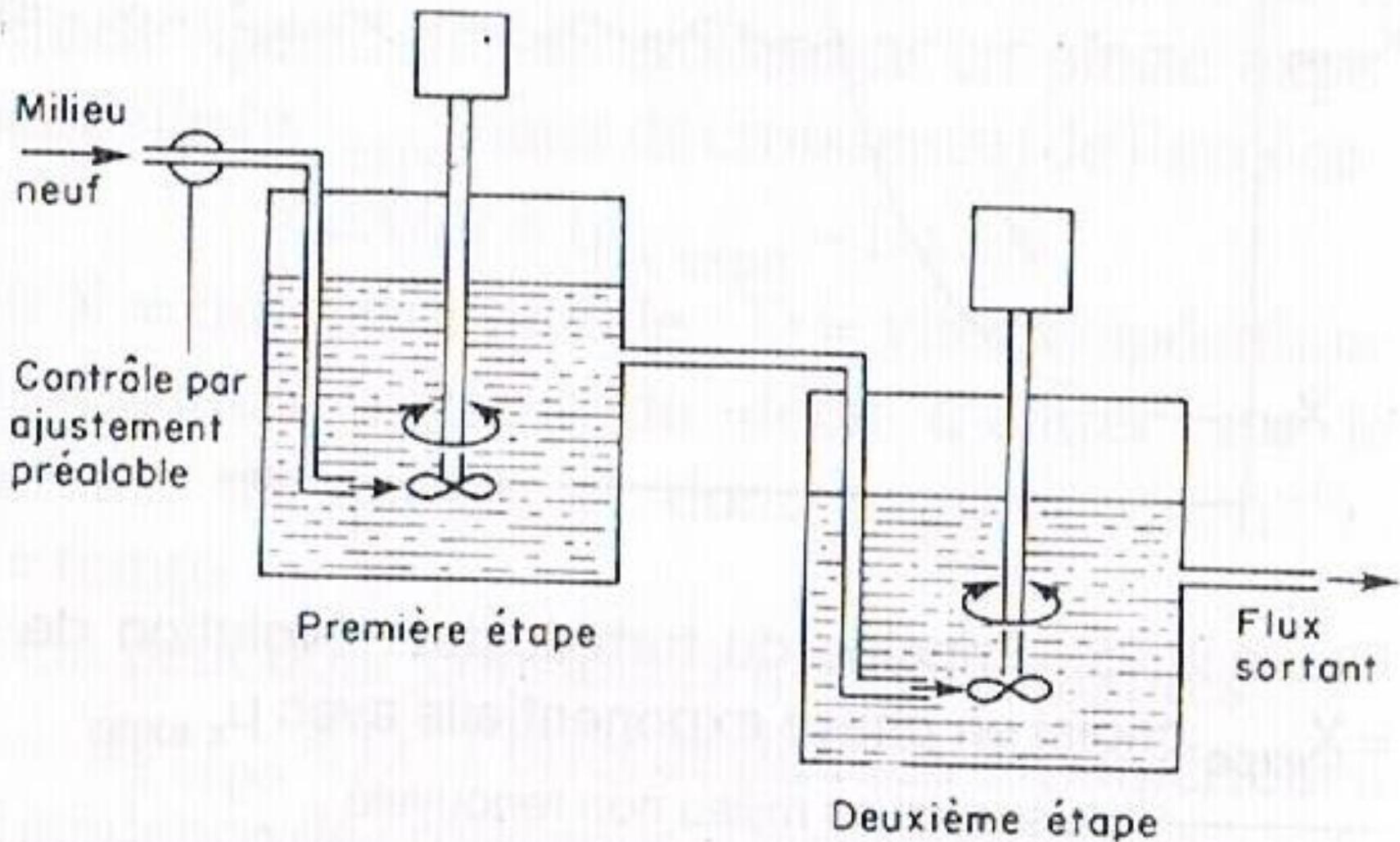


Figure – Chémostat.



Figure

- Fermenteur en continu multi-étages.

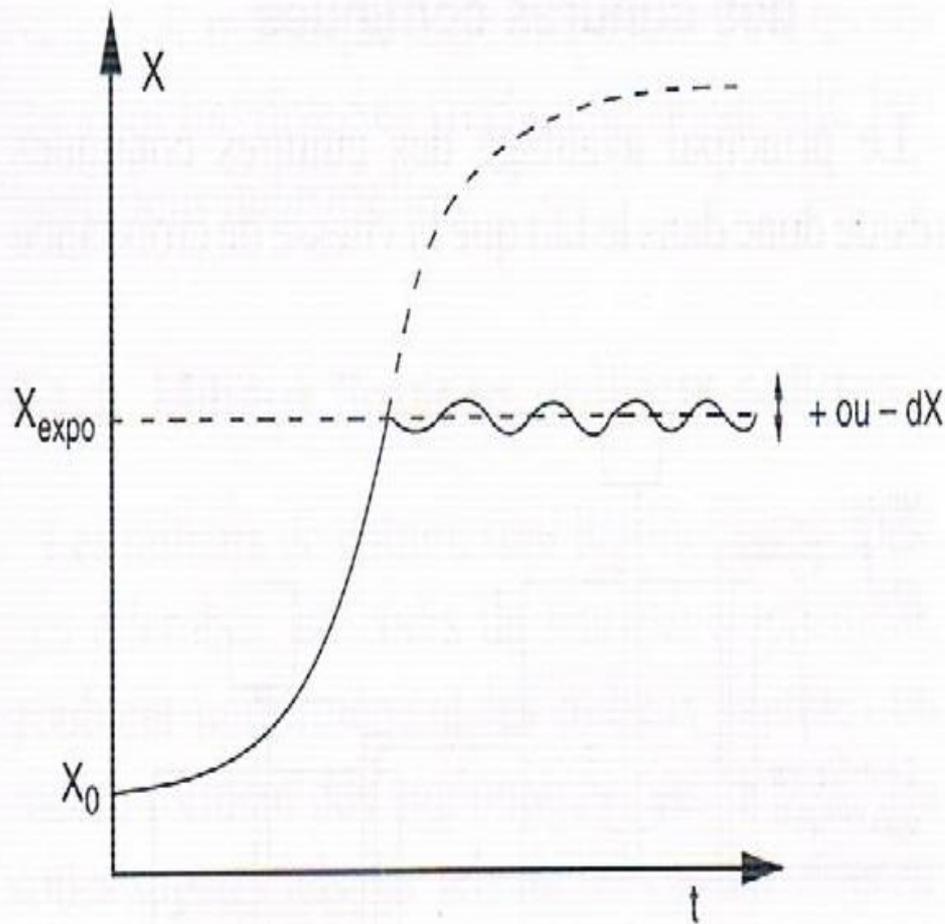


Figure - Principe du turbidostat : évolution de $X = X_{\text{expo}}$ choisi en phase exponentielle avec $\mu_{X \text{ expo}}$
 ----- croissance en milieu non renouvelé ;
 ——— croissance continue selon le principe de turbidostat :
 X varie de + ou - dX .

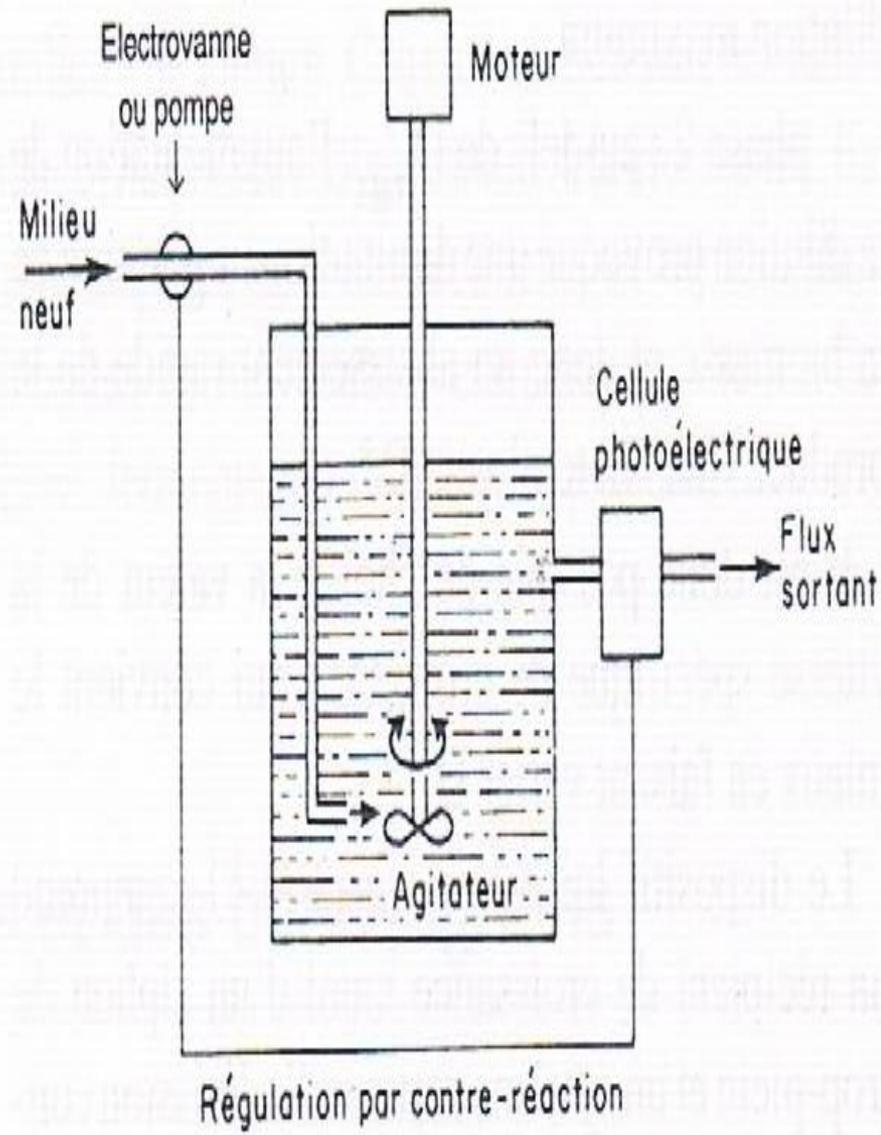
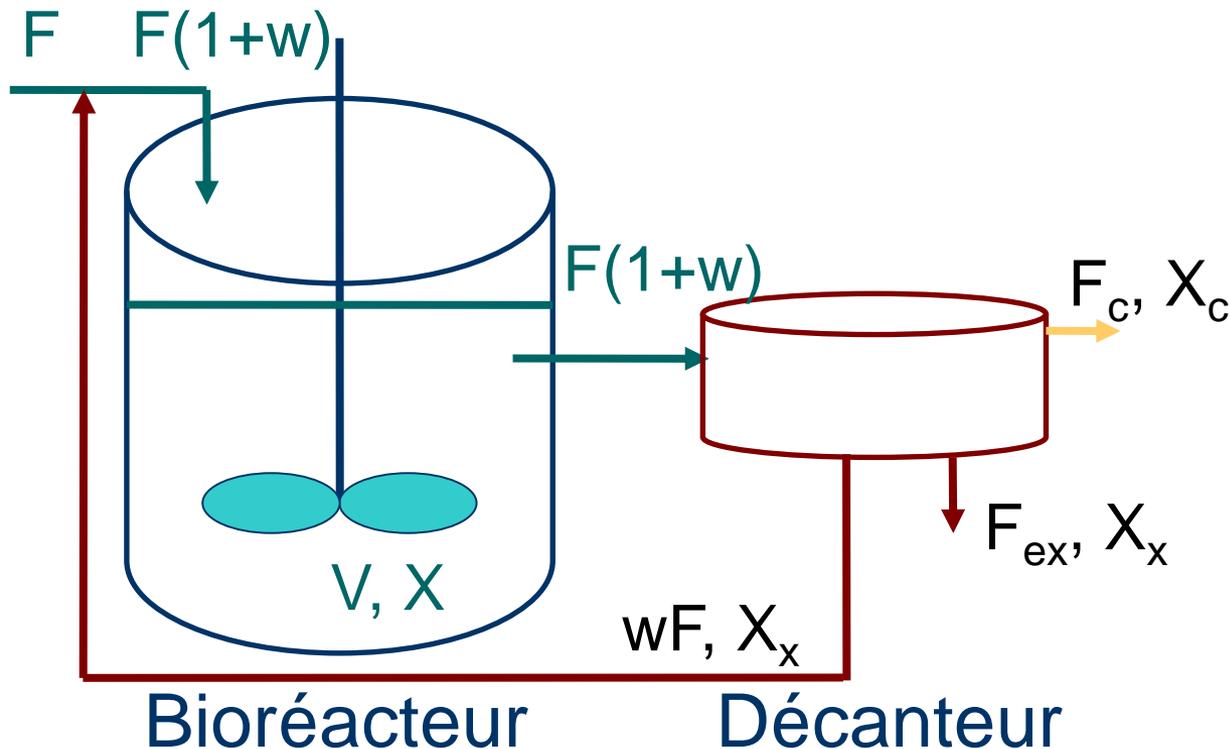


Figure - Turbidostat.

Chemostat avec recirculation



- Permet de concentrer les cellules dans le bioréacteur
- Permet de repousser le lavage
- Développement pour X seulement

Références bibliographiques

- ❖ **Bourat, G. (1992).** Fermentations Propriétés des micro-organismes. Journal de Techniques de l'Ingénieur, Paris. Doc. J 6 004, 12p.
- ❖ **Chillet, P. (2011).** Opérations unitaires en génie biologique Volume 3, La fermentation. Edition CRDP d'Aquitaine, Bordeaux. 111p.
- ❖ **Deneuvill, F. (1991).** Génie fermentaire, travaux pratiques. Edition Doin. 307p.
- ❖ **Duchiron F., Legin-Copinet E. (2019).** Fermentation en milieu solide (FMS). Journal de Techniques de l'Ingénieur, Paris. Réf. BIO620 v2.
- ❖ **Eyer, K., Dubuis, P. (2008).** «Development of an Industrial Biotechnology Process : Nutritional strategies», HES-SO Valais.Sion. In Jaccard, N. (2008). Comptage de cellules.
- ❖ **Meyer, A., Bernard, A. Deiana, J. (2004).** Cours de microbiologie générale avec problèmes et exercices corrigés. 2ème Edition Doin, Paris. 430p.

