



**HAL**  
open science

# Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par *Trichoderma reesei* en utilisant l'approche “ scale-down ”

Nicolas Hardy

## ► To cite this version:

Nicolas Hardy. Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par *Trichoderma reesei* en utilisant l'approche “ scale-down ”. Biotechnologies. Université Paris Saclay (COmUE), 2016. Français. NNT : 2016SACLA017 . tel-01637274

**HAL Id: tel-01637274**

**<https://theses.hal.science/tel-01637274>**

Submitted on 17 Nov 2017

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

NNT : 2016SACLA017

THÈSE DE DOCTORAT  
DE  
L'UNIVERSITÉ PARIS-SACLAY  
PRÉPARÉE À  
AGROPARISTECH

ÉCOLE DOCTORALE N°581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIÉS)  
Spécialité de doctorat : Biotechnologies

Par

M. NICOLAS HARDY

Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases  
par *Trichoderma reesei* en utilisant l'approche « *scale-down* »

Thèse présentée et soutenue à Rueil-Malmaison, le 25 octobre 2016.

Composition du Jury :

Mme Pareau Dominique	Professeure à l'École CentraleSupélec	Présidente
M. Thibault Jules	Professeur à l'Université d'Ottawa	Rapporteur
M. Sigoillot Jean-Claude	Professeur à l'Université d'Aix-Marseille	Rapporteur
M. Nienow Alvin W.	Professeur à l'Université de Birmingham	Examineur
M. Augier Frédéric	Chercheur à IFP Energies nouvelles	Examineur
M. Ben Chaabane Fadhel	Chercheur à IFP Energies nouvelles	Examineur
M. Simon Jean-Luc	Directeur de la R&D d'Ingredia Group	Examineur
Mme Béal Catherine	Professeure à AgroParisTech	Directeur de thèse

## **Titre :** Identification des critères d'extrapolation du procédé de production de cellulases par *Trichoderma reesei* en utilisant l'approche « *scale-down* »

**Mots clés :** Analyse d'images, Cisaillement, Fermentation, Rhéologie, *Scale-down*, *Trichoderma reesei*

**Résumé :** Le procédé de production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique nécessite l'hydrolyse de cette dernière en sucres simples. Cette hydrolyse est le plus souvent réalisée par voie biologique grâce à des enzymes appelées cellulases. La production de ces enzymes représente cependant un verrou économique majeur au développement du procédé à grande échelle. Les cellulases sont généralement produites industriellement par le champignon filamentueux aérobic *Trichoderma reesei*, doté d'une forte capacité de sécrétion d'enzymes. Les cultures sont réalisées en bioréacteurs aérés et agités mécaniquement. Elles nécessitent de contrôler la concentration des substrats, ce qui requiert la maîtrise de conditions hydrodynamiques et physicochimiques. En effet, le milieu de culture de *T. reesei* devient une suspension de cellules de champignons associées en filaments, de structure complexe, dont la viscosité augmente avec la concentration microbienne selon un comportement rhéofluidifiant. La viscosité est fonction de la morphologie du microorganisme qui peut, elle-même, varier avec les conditions de cultures. Cet accroissement de viscosité est un critère clef de l'extrapolation du procédé, car il affecte le transfert d'oxygène. Afin de maintenir une concentration en oxygène dissous suffisante, l'agitation et l'aération sont en général augmentées, entraînant un accroissement du cisaillement. Cet accroissement impacte en retour la morphologie du champignon, ralentit sa croissance puis diminue la production de cellulases. Ainsi, les conditions hydrodynamiques et rhéologiques engendrées au sein du bioréacteur sont complexes et variables dans le temps. L'interrelation entre conditions opératoires, morphologie, croissance du champignon et viscosité du moût de fermentation impose l'intégration de tous ces phénomènes pour l'optimisation du procédé, notamment à grande échelle. L'objectif de la thèse

est de mettre en place une approche, visant à étudier au laboratoire la croissance de *T. reesei* et sa production d'enzymes, en reproduisant les contraintes hydrodynamiques associées aux conditions de fonctionnement des fermenteurs industriels. Pour ce faire, deux méthodologies originales ont été développées : une méthode de mesure de la viscosité du milieu, optimisée pour les champignons filamenteux, représentative des conditions rencontrées à grande échelle et qui s'appuie sur l'utilisation d'un rhéomètre rotatif équipé d'un rotor hélicoïdal ; une méthode d'analyse d'images associant un microscope motorisé et des algorithmes d'analyse d'images innovants, qui permet de générer des données sur la morphologie du champignon et d'identifier un critère morphologique pertinent basé sur le nombre de « trous » au sein d'un filament. Parallèlement à ces méthodes, différentes contraintes de cisaillement ont été mises en œuvre en fermentation, afin de reproduire, à l'échelle du laboratoire, les conditions rencontrées à l'échelle industrielle. Ces outils ont été utilisés conjointement et validés lors de cultures non conventionnelles mimant les conditions industrielles en termes de cisaillement. Ils ont permis d'identifier un critère représentatif du cisaillement (EDCF) et d'établir, à partir de ce critère, des corrélations capables de prédire la viscosité du moût de fermentation, le taux de croissance maximum du microorganisme ainsi que certains paramètres morphologiques de la souche. De façon originale, ces corrélations déterminées à l'échelle du laboratoire ont été validées par des mesures effectuées à l'échelle industrielle. Au final, l'approche développée permet d'identifier au plus tôt les contraintes d'extrapolation à ne pas dépasser, afin d'orienter les choix technologiques des fermenteurs industriels impliquant des champignons filamenteux.

**Title:** Identification of scale-up/scale-down criteria for cellulases production process by *Trichoderma reesei*

**Keywords:** Fermentation, Image analysis, Rheology, Shear stress, Scale-down, *Trichoderma reesei*

**Abstract:** Ethanol production from lignocellulosic biomass requires its transformation into fermentable sugars before the alcoholic fermentation. This step called hydrolysis is catalyzed by cellulases and is often considered as the major technical and economic challenge for the process development. Cellulases are industrially produced by the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, thanks to its high secretion capacity. This fungus is strictly aerobic and is thus cultivated in aerated and stirred bioreactors. The fermentation optimization requires control of physico-chemical conditions. Actually the growth of fungi induces an increase of the broth viscosity with shear thinning behavior because of the formation of three-dimensional mycelial structures (from micrometer to millimeter). This viscosity increase has a negative impact on the oxygen transfer. In order to keep the dissolved oxygen concentration higher than a critical limit, it is necessary to increase the power input thereby increasing the shear stress, which may affect the morphology of the fungus as well as its growth and cellulase production. Actually, physico-chemical conditions generated inside the bioreactor are complex and vary with time. These interrelations, between process conditions, morphology, growth and viscosity, require the integration of all these parameters to optimize the full-scale process.

The goal of the thesis work was to develop a scale-down approach at lab-scale to mimic hydrodynamic conditions of industrial bioreactors and to study their impact on *T. reesei* growth and cellulase production. For that purpose, two new tools were developed. The first one consists in a new rheological measurement set-up using a helical rotor dedicated to filamentous fungi preventing mycelium degradation during the measurements. The second one is an original image analyses method that uses specific algorithms. It was then possible to record various morphological data on fungi and to select the most relevant ones (like the number of holes). Meanwhile, a wide range of shear stress conditions were explored in the laboratory bioreactor to reproduce industrial conditions. The new tools we had developed, coupled to these unconventional cultures lead to identifying a shear stress relevant criterion (EDCF) and to establish correlations from this criterion. These correlations are able to predict the viscosity, the maximum specific growth rate and some morphological parameters dependent on the strain. The correlations were confirmed using data obtained at an industrial scale. Finally, this approach can be used to define early the extrapolation criteria needed to scale-up the process with a scientifically based methodology.







À Flavien né le 25 octobre 2015

---



# Remerciements

Ces quelques mots sont certes d'usage, mais ils sont surtout une belle occasion de regarder le chemin parcouru et de remercier qui de droit.

Je tiens à commencer avec ma directrice de thèse : le Professeur Catherine Béal. Tu as été la première personne à m'encourager à faire cette thèse et tu as eu mille fois raison. La pertinence de tes remarques, ta disponibilité (malgré un emploi du temps plus que chargé) et ta pédagogie font que je n'aurais simplement pas pu espérer un meilleur directeur de thèse.

Docteur Fadhel Ben Chaabane ! Mon encadrement quotidien c'était toi. Le quota de 20 jours dont tu disposais pour cette dure mission a été tout sauf respecté. Et c'est tant mieux pour moi. Ton enthousiasme contraste avec mon pessimisme dont tu aimais tellement te moquer. Ces moments où je te montrais mes résultats souvent qualifiés de « trucs pas mal » vont énormément me manquer.

Docteur Frédéric Augier. Merci de m'avoir fait découvrir ce monde étrange, pour moi, du génie chimique. Ton amour pour les corrélations a été d'une aide précieuse pour mener à bien mon projet de recherche. Dommage que tu n'aies pas eu le temps de me montrer comment réaliser des calculs de CFD. Nos conversations de PLUSIEURS HEURES sur différentes hypothèses du lien entre viscosité et morphologie de notre champignon étaient mémorables.

Cher Professeur Alvin W. Nienow, tu mérites bien des remerciements dans la langue de Shakespeare. *In my opinion, you are a "Monsieur" of science. The deep respect that I have for you, increased day by day. Our biannual meetings were every time the occasion for me to make big steps in the comprehension of my topic. We could just hope for every young scientists to follow your steps.*

Comme vous pouvez le constater, j'ai été un thésard plus que privilégié avec quatre HDR rien que pour moi.

Je souhaite remercier le Professeur Dominique Pareau d'avoir accepté la présidence du jury de thèse. Je remercie également, les Professeurs Jules Thibault et Jean-Claude Sigoillot d'être les rapporteurs pour mon travail, ainsi que le Docteur Jean-Luc Simon en sa qualité d'examineur.

Merci à Luc Nougier en sa qualité de directeur de la division R12 ainsi qu'à Cécile Barrère-Tricca et Philippe Maurel pour mon intégration au sein du département R124.

Frédéric Monot, merci pour ton accueil au sein de l'équipe de biotechnologie. Sans ton aide, je serais toujours sans laboratoire et sans bureau. Ta connaissance des arcanes d'IFPEN a été salvatrice à maintes reprises.

Je remercie l'ADEME et Bruno Gagnepain pour le financement et le suivi de mon doctorat.

Il est temps de faire une place dans ces remerciements (où ils méritent bien de paraître) à mes collègues les plus proches.

Il y a Bernard bien sûr. Lui qui m'a appris (entre autres) tout ce qu'il faut savoir sur les meilleurs fermenteurs du monde : les F2P. Nous formions avec Fadhel et toi le trio infernal de H\351. Pour un travail dans une bonne humeur garantie ! Lionel, que je remercie ici, en est le témoin.

Céline qui a été bien sûr mon premier « professeur de paillasse » dans l'équipe. Nous avons fait ces fameux tests d'activités enzymatiques qui marchent à coup sûr (ou pas). Je regrette de ne pas avoir eu plus souvent l'occasion de travailler avec toi.

Céline et Bernard, une « pléthore » de mercis pour toutes les fois où vous m'avez sorti de manipulations catastrophiques et pour toutes celles que je n'aurais pas eu le temps de faire sans votre aide.

Étienne, l'exemple à suivre. Je n'ai pas réussi à égaler le modèle, mais je suppose que ce n'est pas très grave (tant pis pour Excel). Merci pour ton aide précieuse et tes conseils avisés.

Je souhaite à Marion une très bonne thèse, je sais d'expérience que tu as l'environnement idéal pour cela.

Il y a Sabine aussi dans mon équipe et dans mon bureau. Merci de m'avoir accueilli dans une ambiance idéale pour rédiger ce manuscrit.

Je remercie chaleureusement Meredith et Julien pour leur application pendant leur stage et cette aide bien venue à mes travaux.

Après mon équipe viennent les collègues avec qui j'ai eu la chance de collaborer.

Pour l'analyse d'images, il y a Maxime et Denis. Sans Maxime, il n'y aurait pas d'analyse d'images. Je serais très probablement encore en train de faire des segmentations d'images sous ImageJ. Merci de m'avoir permis de mesurer sous toutes les coutures mon petit Tricho, avec une efficacité et une élégance des plus appréciables. Tes algorithmes ont quelque chose de spectaculaire pour moi. Sans Denis, pas de squelette et pas de comparaison avec la littérature. Voilà une collaboration sur le tas des plus efficaces. Merci à vous deux pour votre professionnalisme !

Mes remerciements vont également à Marc, Renaud et Georges pour leur secours indispensable au déploiement du DAQ maison sur les F2P. Mais aussi à Claudio qui a été l'intermédiaire *déontique* entre Actemium et moi.

J'ai également eu la chance de travailler avec :

Isabelle et Patrick pour mes premiers pas en rhéologie.

Jérôme pour l'analyse des protéines intracellulaires et pour les plus beaux gel-2D de la région parisienne (Yves ne soit pas jaloux, les tiens ne sont pas mal non plus).

Nicolas pour ses microsystèmes et rhéomètres capillaires.

Didier, en ses qualités de physicien, électronicien, musicologue, tourneur, fraiseur, ami, épistémologue (spécialité physiciens russes du vingtième siècle), sociologue et guitariste. Tu étais un libre consultant pour mes recherches.

Et Brigitte pour la relecture orthographique de mon manuscrit.

Je souhaite remercier collectivement (car trop nombreux) tous ceux qui, par leur bonne humeur, leurs conseils et leurs encouragements, ont également fortement comptés pendant ces trois ans.

Il y a dans une dénomination collective et faussement froide, mes collègues de génie des procédés à Solaize, mes collègues de bio à Rueil-Malmaison, les autres thésards d'IFPEN, le bureau H\354, la navette du matin, mes collègues du GMPA et mes anciens professeurs.

Enfin le plus important pour moi je remercie l'ensemble de ma famille et de mes amis.

Avec tout particulièrement :

Ma dame Coralie et mon fils Flavien qui ont été si patients avec moi et qui ont accepté que je passe du temps sur mes recherches à leur dépend.

Mes parents pour leur soutien. Je vous dois simplement tout.

Mon frère Pierre pour le temps qu'il a consacré à déboguer le fichier  $\LaTeX$  de mon mémoire et à mon initiation à la programmation. Je sais que je ne suis pas ton élève le plus brillant ni le plus patient.

Mes repères que sont mes grands-parents Lucette, Jeannine et Claude.

Ma gratitude pour les Mettons encore merci de (entre autres) votre soutien et vos petits plats.

Mes excuses pour les Lieberts surtout pour Victoria et Jules dont j'ai raté les anniversaires.

Merci, Madame Berthoux. Sans ton aide, j'aurais probablement arrêté mes études bien avant ce doctorat.

Ma gratitude pour Bruno D. qui m'a transmis une infime partie de son savoir sur la « biologie moléculaire de papa ».

Les moments de détente avec Benjamin/Charlotte et Yaniv méritent un grand merci également.

Juju plus forte que les produits à base de citron !

Élodie merci d'avoir pensé à un copain pour Flavien.

Monsieur Fisher que je remercie pour son omniprésence et son aide dans mes études bibliographiques.

Mes chers amis, j'espère avoir la chance de continuer à vous fréquenter et je vous souhaite de continuer votre chemin avec tout le bonheur que vous méritez.

Encore une fois un grand merci à vous tous ainsi qu'à ceux que j'aurais malencontreusement oubliés de citer.

Je conclurai ces quelques mots en affirmant qu'une thèse est avant tout un travail personnel qui nécessite cependant un engagement collectif.

Rueil-Malmaison le 25 Août 2016



# Table des matières

Remerciements	i
Table des figures	ix
Liste des tableaux	xiii
Nomenclature	xv
Introduction	1
<b>I Étude bibliographique</b>	<b>5</b>
<b>I.1 Le bioéthanol de deuxième génération : contexte et enjeux</b>	<b>7</b>
I.1.1 Place des biocarburants dans la consommation d'énergie pour le transport . . . . .	7
I.1.2 Enjeux du développement du bioéthanol deuxième génération . . . . .	9
I.1.3 L'hydrolyse enzymatique des lignocelluloses : une étape clé de la production d'éthanol-2G . . . . .	11
I.1.3.1 Composition de la lignocellulose . . . . .	11
I.1.3.2 Prétraitement et hydrolyse de la matière première lignocellulosique . . . . .	12
I.1.3.3 Les cellulases : une famille d'enzymes spécialisées dans la dégradation de la lignocellulose . . . . .	13
I.1.3.4 Les microorganismes producteurs de cellulases . . . . .	14
I.1.3.5 Le champignon filamenteux <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	15
I.1.3.6 Intégration des cellulases dans les procédés de production d'éthanol-2G . . . . .	16
<b>I.2 Le procédé de production de cellulases</b>	<b>17</b>
I.2.1 Les conditions de fermentation et cinétiques fermentaires de <i>T. reesei</i> . . . . .	18
I.2.1.1 Conditions de fermentation favorables à <i>T. reesei</i> . . . . .	18
I.2.1.2 Résultats caractéristiques des fermentations de <i>T. reesei</i> . . . . .	18
I.2.2 La complexité du moût de fermentation : un verrou pour la maîtrise des cultures industrielles . . . . .	20
I.2.2.1 Diversité morphologique de <i>T. reesei</i> . . . . .	20
I.2.2.2 Rhéologie des cultures de <i>T. reesei</i> . . . . .	22
I.2.2.3 Effet du cisaillement sur les cultures de <i>T. reesei</i> . . . . .	26
I.2.3 Description du procédé de production de cellulases d'IFPEN . . . . .	27
<b>I.3 Le changement d'échelle des bioprocédés</b>	<b>29</b>
I.3.1 Problématiques liées l'extrapolation d'un bioprocédé . . . . .	29
I.3.2 Les critères considérés pour l'extrapolation . . . . .	30



I.3.2.1	Critères classiques d'extrapolation . . . . .	30
I.3.2.2	Critères récents utilisés pour l'extrapolation . . . . .	33
I.3.2.3	Mise en œuvre de l'extrapolation de bioprocédés . . . . .	34
I.3.3	L'approche « <i>Scale-down</i> » . . . . .	35
I.3.4	Les particularités des procédés mettant en œuvre des champignons filamenteux .	36
<b>I.4</b>	<b>Synthèse des informations</b>	<b>39</b>
<b>II</b>	<b>Développement d'outils spécifiques</b>	<b>41</b>
<b>II.1</b>	<b>Mesure des propriétés rhéologiques des moûts de fermentation de <i>Trichoderma reesei</i></b>	<b>43</b>
II.1.1	Introduction . . . . .	43
II.1.2	Caractérisation du comportement rhéologique des moûts à l'aide de l'analogie de Couette. . . . .	44
II.1.2.1	Introduction . . . . .	44
II.1.2.2	Matériels et méthodes . . . . .	45
II.1.2.2.1	Mesures rhéologiques . . . . .	45
II.1.2.2.2	Souche et conditions de culture . . . . .	46
II.1.2.3	Résultats et discussion . . . . .	47
II.1.2.3.1	Validation de la méthode par mesure de la rhéologie du milieu mo- dèle . . . . .	47
II.1.2.3.2	Rhéologie du moût . . . . .	47
II.1.2.4	Conclusion et perspectives . . . . .	50
II.1.2.5	Remerciements . . . . .	51
II.1.3	Conclusion, commentaires et perspectives . . . . .	51
<b>II.2</b>	<b>Caractérisation de la morphologie des champignons filamenteux</b>	<b>53</b>
II.2.1	Introduction . . . . .	53
II.2.2	<i>Méthode d'analyse d'images dédiée à la caractérisation de la micro- et la macromor-     phologie</i> . . . . .	54
II.2.2.1	Introduction . . . . .	54
II.2.2.2	Material and methods . . . . .	57
II.2.2.2.1	Biological model . . . . .	57
II.2.2.2.2	Analytical follow-up . . . . .	58
II.2.2.2.3	Experimental design . . . . .	59
II.2.2.3	Development of the image analysis method . . . . .	59
II.2.2.3.1	Data acquisition . . . . .	59
II.2.2.3.2	Creation of sharp images at all pixels: FACE algorithm . . . . .	60
II.2.2.3.3	Fungus segmentation . . . . .	62
II.2.2.3.4	Morphological analysis . . . . .	64
II.2.2.4	Application of the image analysis method to experimental data . . . . .	69

II.2.2.4.1	Validation of the image analysis procedure . . . . .	69
II.2.2.4.2	Impact of shear stress on fungus morphology . . . . .	70
II.2.2.5	Discussion . . . . .	74
II.2.2.6	Conclusion and perspectives . . . . .	75
II.2.2.7	Acknowledgments . . . . .	75
II.2.3	Conclusion, commentaires et perspectives . . . . .	76
<b>III</b>	<b>Mise en œuvre d'une approche <i>scale-down</i> pour évaluer l'impact du cisaillement sur le procédé de production de cellulases</b>	<b>79</b>
<b>III.1</b>	<b>Étude de l'impact des forts cisaillements sur la croissance de <i>Trichoderma reesei</i></b>	<b>83</b>
III.1.1	Introduction . . . . .	83
III.1.2	Évaluation de l'impact des paramètres d'extrapolation du cisaillement sur la croissance . . . . .	83
III.1.2.1	Introduction . . . . .	84
III.1.2.2	Materials and methods . . . . .	86
III.1.2.2.1	Biological Model . . . . .	86
III.1.2.2.2	Analytical Follow-up . . . . .	88
III.1.2.3	Results . . . . .	90
III.1.2.3.1	Influence of stirring conditions on characteristics of <i>T. reesei</i> cultures	90
III.1.2.3.2	Correlations to explain the effect of stirring conditions on culture parameters . . . . .	93
III.1.2.3.3	Prediction of culture parameters at large scale . . . . .	95
III.1.2.4	Discussion . . . . .	95
III.1.2.4.1	Stirring conditions induced various shear stress . . . . .	95
III.1.2.4.2	Shear stress affected the growth of <i>T. reesei</i> . . . . .	95
III.1.2.4.3	Shear stress affected the viscosity of <i>T. reesei</i> fermentation medium	96
III.1.2.4.4	Shear stress affected the morphology of <i>T. reesei</i> . . . . .	96
III.1.2.4.5	Use of shear stress criteria to predict <i>T. reesei</i> culture parameters .	96
III.1.2.5	Conclusions and perspectives . . . . .	97
III.1.2.6	Acknowledgments . . . . .	98
III.1.3	Commentaires et perspectives . . . . .	98
<b>III.2</b>	<b>Étude de l'impact des forts cisaillements sur la production de cellulases par <i>T. reesei</i></b>	<b>103</b>
III.2.1	Introduction . . . . .	103
III.2.2	Matériels et méthodes . . . . .	103
III.2.2.1	Souches . . . . .	103
III.2.2.2	Milieu de culture . . . . .	104
III.2.2.3	Culture en bioréacteur . . . . .	105
III.2.2.3.1	Précultures . . . . .	105
III.2.2.3.2	Cultures <i>fed-batch</i> . . . . .	105

III.2.2.3.3 Cultures Continues . . . . .	106
III.2.2.4 Évaluation de la concentration en biomasse . . . . .	107
III.2.2.5 Dosage des sucres résiduels . . . . .	107
III.2.2.6 Dosage de la concentration en protéines et de l'activité du cocktail enzymatique	107
III.2.2.7 Exploration des protéines intracellulaires par électrophorèse bidimension-	
nelle couplée à la spectrométrie de masse . . . . .	108
III.2.2.7.1 Extraction des protéines . . . . .	108
III.2.2.7.2 Électrophorèse deux dimensions sur gel SDS Page . . . . .	108
III.2.2.7.3 Identification des protéines . . . . .	109
III.2.3 Résultats . . . . .	109
III.2.3.1 Effet du cisaillement sur la production de cellulases en fermentations <i>fed-batch</i>	109
III.2.3.2 Effet du cisaillement sur la production de cellulases en fermentations continues	113
III.2.3.3 Effet du cisaillement sur le protéome intracellulaire de <i>T. reesei</i> en fermen-	
tations continue . . . . .	115
III.2.4 Synthèse des résultats . . . . .	118
<b>IV Discussion et conclusion générale</b>	<b>119</b>
IV.1 Discussion générale	121
IV.2 Conclusions et perspectives	127
<b>Références et compléments</b>	<b>129</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>131</b>
<b>Annexes</b>	<b>143</b>

# Table des figures

I.1.a	Représentation schématique du procédé de production d'éthanol-2G . . . . .	8
I.1.b	Investissements mondiaux dans de nouvelles unités biocarburants . . . . .	9
I.1.c	Structure de la lignocellulose . . . . .	12
I.1.d	Représentation schématique de l'action des différentes familles de cellulases sur de la cellulose . . . . .	13
I.2.a	Schéma et photographie d'un bioréacteur . . . . .	17
I.2.b	Photographie d'un mycélium de <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	21
I.2.c	Classification des différentes morphologies du mycélium . . . . .	21
I.2.d	Représentation d'un cisaillement laminaire . . . . .	23
I.2.e	Exemple de rhéogrammes pour différents types de comportement rhéologique . . . . .	25
I.2.f	Représentation schématique du procédé de production de cellulases . . . . .	28
I.3.a	Nombre de puissance ( $N_p$ ) en fonction du Nombre de Reynolds (Re) pour un mobile Rushton traditionnel . . . . .	31
I.3.b	Interrelations entre les différents processus d'un procédé mettant en œuvre un champignon filamenteux . . . . .	37
I.3.c	Diagramme des relations entre une suspension visqueuse et des processus rencontrés dans un bioréacteur mécaniquement agité . . . . .	37
II.1.a	Hélice large utilisée comme rotor sur le rhéomètre . . . . .	46
II.1.b	Comparaison de la viscosité obtenue avec le mobile plan/plan strié et le mobile hélice large . . . . .	47
II.1.c	Comparaison de la viscosité obtenue avec le mobile plan/plan strié et le mobile hélice large . . . . .	48
II.1.d	Suivi de la concentration en biomasse dans le bioréacteur . . . . .	48
II.1.e	Évolution du comportement rhéologique du moût pour différentes valeurs de concentration en biomasse . . . . .	49
II.1.f	Évolution de la viscosité prédite en fonction de la concentration en biomasse . . . . .	50
II.1.g	Mise en évidence d'un seuil d'écoulement pour les moûts de <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	52
II.2.a	<i>Synthesis scheme of the new image analysis method . . . . .</i>	60
II.2.b	<i>Creation of sharp images of a T. reesei fungus, using different extended depth of field methods . . . . .</i>	63
II.2.c	<i>Results of segmentation process in the case of an image of T. reesei fungus obtained with FACE algorithm and showing both fibrous and clustered fungi. . . . .</i>	64
II.2.d	<i>Skeleton of a T. reesei fungus image. . . . .</i>	66
II.2.e	<i>Topological analysis of a T. reesei clump. . . . .</i>	67

II.2.f	<i>Cumulative distribution functions of the projected area of fungi images, when acquisition was done after 1, 7, 24 and 48 h.</i>	69
II.2.g	<i>Impact of the number of fungi on quantification of two morphological criteria: (A) projected area and (B) hyphal growth unit (HGU).</i>	70
II.2.h	<i>Time course of biomass and glucose concentrations during batch fermentations of <i>T. reesei</i></i>	70
II.2.i	<i>Dynamic viscosity versus shear rates for culture samples of unsheared <i>T. reesei</i> fungi following fermentation and fungi submitted to a subsequent high shear stress</i>	71
II.2.j	<i>Cumulative distribution functions of six morphological criteria comparing unsheared samples and those obtained after applying a high shear stress</i>	72
II.2.k	<i>Schéma de l'évolution de la viscosité en fonction de la concentration d'une solution de polymères branchés.</i>	77
II.2.l	<i>Observation d'un réseau de filaments de <i>T. reesei</i></i>	78
III.1.a	<i>Pictures of the impellers used in the study, with associated symbols</i>	87
III.1.b	<i>Growth curves characterizing batch fermentations of <i>T. reesei</i> under two stirring conditions</i>	92
III.1.c	<i>Dynamic viscosity versus shear rates for culture samples of <i>T. reesei</i> fungi.</i>	92
III.1.d	<i>Representative pictures of <i>T. reesei</i> morphology after cultures conducted at 800 rpm (A and B) and 1700 rpm (C and D)</i>	92
III.1.e	<i>Comparison of growth, rheological and morphological parameters obtained from predictions based on three extrapolation criteria</i>	94
III.1.f	<i>Effet négatif d'une agitation insuffisante sur l'aspect du moût de fermentation de <i>T. reesei</i></i>	99
III.1.g	<i>Photographies des souches de <i>T. reesei</i> Tr3002 et PC3-7 présentant des morphologies différentes</i>	100
III.1.h	<i>Comparaison des viscosités mesurées à différents taux de cisaillement avec deux souches de <i>T. reesei</i></i>	100
III.1.i	<i>Comparaison de l'évolution des concentrations en biomasse au cours de cultures de <i>T. reesei</i> à différents taux de cisaillement</i>	101
III.2.a	<i>Série de manipulations en <i>Fed-batch</i> avec 5 g.L<sup>-1</sup> de biomasse.</i>	111
III.2.b	<i>Comparaison des concentrations en biomasse, en protéines et de l'activité cellulytique globale (FP) lors de fermentations en <i>fed-batch</i> de <i>Trichoderma reesei</i> en fonction du cisaillement généré par l'utilisation de deux mobiles différents</i>	112
III.2.c	<i>Évolution de la concentration en protéines lors d'une culture en continue de <i>Trichoderma reesei</i> soumises à deux vitesses d'agitation 800 rpm et 1700 rpm</i>	114
III.2.d	<i>Protéomes caractéristiques de <i>T. reesei</i> à l'issue de cultures réalisées dans des conditions d'agitation différentes</i>	115
IV.2.a	<i>Impact de la structure des polymères sur l'évolution de la viscosité en fonction de leur concentration</i>	144
IV.2.b	<i>Représentation schématique de la structure des polymères utilisés par Graessley</i>	144

---

IV.2.c Impact de la structure des champignons sur l'évolution de la viscosité en fonction de leur concentration . . . . .	145
IV.2.d Photographies des morphologies de deux souches de <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	145



# Liste des tableaux

I.1.i	Classification biologique de <i>Trichoderma reesei</i> . . . . .	15
I.2.i	Valeurs de vitesses spécifiques de croissance et de rendement en biomasse sur différents substrats . . . . .	19
I.2.ii	Comparaison de caractéristiques liées à la production de cellulases entre différentes souches de <i>T. reesei</i> . . . . .	19
I.2.iii	Comparaison des activités de cellulases produites par différentes souches de <i>T. reesei</i>	20
I.2.iv	Exemples de critères retenus pour décrire la morphologie . . . . .	22
I.3.i	Effet de l'extrapolation en fonction des critères . . . . .	35
I.3.ii	Interdépendance des paramètres d'extrapolation d'après (Liu, 2013) . . . . .	35
II.1.i	Valeurs de viscosité de l'huile N4000 . . . . .	46
II.1.ii	Coefficients de consistance et indices de comportement . . . . .	50
II.2.i	<i>Recognition of all ambiguous patterns according to weights.</i> . . . . .	65
II.2.ii	<i>List of morphological criteria obtained by both skeleton and topological analyses.</i> . .	68
II.2.iii	<i>Comparison of cumulative distribution functions of unsheared samples compared to those obtained after applying a high shear stress, according to two-sample Kolmogorov-Smirnov tests</i> . . . . .	73
III.1.i	<i>Mixing and geometric characteristics of the impellers used in the study.</i> . . . . .	88
III.2.i	Composition du milieu de culture 4N . . . . .	104
III.2.ii	Composition de la solution d'oligoéléments . . . . .	104
III.2.iii	Caractéristiques des mobiles utilisés lors des fermentations fed-batch, et contraintes de cisaillement associées . . . . .	106
III.2.iv	Données caractéristiques des fermentations de <i>T. reesei</i> réalisées pour la production de cellulases . . . . .	110
III.2.v	Données caractéristiques des états stationnaires obtenus lors des fermentations continues de <i>T. reesei</i> conduites à deux vitesses d'agitation . . . . .	113
III.2.vi	Protéines nouvellement synthétisées après l'augmentation du cisaillement . . . . .	116
III.2.vii	Protéines sous synthétisées après l'augmentation du cisaillement . . . . .	116
III.2.viii	Protéines sur-synthétisées après l'augmentation du cisaillement . . . . .	117





# Nomenclature

<i>Symboles</i>	<i>Unité</i>	<i>Definition</i>	<i>Définition</i>
<b><i>Lettres latines</i></b>			
A	m <sup>2</sup>	<i>Area</i>	Surface
B		<i>Geometric Factor</i>	Facteur géométrique
C	m	<i>Impellers clearance</i>	Hauteur du mobile (fond de la cuve)
C*		<i>Overlap Concentration</i>	Concentration critique de recouvrement
C**		<i>Entanglement Concentration</i>	Concentration critique d'enchevêtrement
C <sub>L</sub>	kg.m <sup>-3</sup>	<i>Oxygene Concentration (in liquid phase)</i>	Concentration en oxygène (dans le liquide)
C <sub>L</sub> *	kg.m <sup>-3</sup>	<i>Oxygene Saturation Concentration (in liquid phase)</i>	Concentration en oxygène à saturation (dans le liquide)
D	m	<i>Impeller Diameter</i>	Diamètre du mobile d'agitation
D <sub>c</sub>	m	<i>Cavern Diameter</i>	Diamètre de la caverne
EDCF	W.m <sup>-3</sup> .s <sup>-1</sup>	<i>Energy Dissipation /Circulation Function</i>	Fonction énergie de dissipation et de circulation
F	N	<i>Shear Force</i>	Force de cisaillement
H	m	<i>Liquid Height</i>	Hauteur de liquide
I <sub>n</sub>		<i>Image at position n in the stack</i>	n <sup>ième</sup> image de la pile
K	Pa.s <sup>n</sup>	<i>Consistency Index</i>	Coefficient de consistance
N	s <sup>-1</sup>	<i>Impeller Rotational Speed</i>	Vitesse d'agitation du mobile
N <sub>f</sub>		<i>Flow Number</i>	Nombre de pompage (du mobile)
N <sub>pg</sub>		<i>Power Number (under gassed conditions)</i>	Nombre de puissance (avec aération)
N <sub>p</sub>		<i>Power Number</i>	Nombre de puissance
P	W	<i>Power Draw</i>	Puissance dissipée
Q <sub>g</sub>	m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup>	<i>Gas Flow Rate</i>	Débit volumique de gaz

$Q_l$	$m^3 \cdot s^{-1}$	<i>Liquid Flow Rate</i>	Débit de pompage du liquide
Re		<i>Reynolds Number</i>	Nombre de Reynolds
T	m	<i>Tank Diameter</i>	Diamètre de la cuve
V	$m^3$	<i>Volume of Fluid</i>	Volume de liquide
$V_{tip}$	$m \cdot s^{-1}$	<i>Impeller Tip Speed</i>	Vitesse en bout de pale
W	m	<i>Impeller Blade Width</i>	La largeur des pales du mobile
X	$g \cdot kg^{-1}$	<i>Biomass Concentration</i>	Concentration en biomasse
$Y_{A/B}$	$g_A \cdot g_B^{-1}$	<i>Yield of A against B</i>	Rendement de A par rapport à B
t	s	<i>Time</i>	Le temps
$t_c$	s	<i>Circulation Time</i>	Le temps de circulation
d $\boxtimes$		<i>Differential of “<math>\boxtimes</math>”variable</i>	Différentielle de la variable « $\boxtimes$ »
k		<i>Constant Related to Impeller Volume</i>	Constante géométrique du mobile
$k_{L,a}$	$s^{-1}$	<i>Volumetric Oxygen Mass Transfer Coefficient</i>	Coefficient volumique de transfert d'oxygène
$k_c$		<i>Constante (as a function of the cavern aspect ratio)</i>	Constante (fonction du ratio d'aspect de la caverne)
n		<i>Flow Behaviour Index</i>	Indice de comportement
nH		<i>Number of Holes</i>	Nombre de boucles
q90		<i>Quantile 90</i>	Quantile 90
$q_{\boxtimes}$	$g_{\boxtimes} \cdot g_X^{-1} \cdot h^{-1}$	<i>Specific uptake/Production rate of “<math>\boxtimes</math>”</i>	Vitesse spécifique de consommation/production de « $\boxtimes$ »
$r_{\boxtimes}$	$g_{\boxtimes} \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$	<i>Uptake/Production rate of “<math>\boxtimes</math>”</i>	Vitesse de consommation/production de « $\boxtimes$ »
$v_s$	$m \cdot s^{-1}$	<i>Superficial Gas Velocity</i>	Vitesse d'ascension des bulles de gaz
vvm	$min^{-1}$	<i>Volumetric flow of gas per liquid volume per minute</i>	Volume d'air par volume de milieu et par minute
$\boxtimes_0$		<i>At the initial time</i>	À l'instant initial
$\boxtimes_p$		<i>Concerning Proteins</i>	Relatif aux protéines

$\boxtimes_S$	<i>Concerning Substrate</i>	Relatif au substrat
$\boxtimes_X$	<i>Concerning Biomass</i>	Relatif à la biomasse
$\boxtimes_t$	<i>At t time</i>	À l'instant $t$

### ***Lettres grecques***

$\dot{\gamma}$ s <sup>-1</sup>	<i>Shear Rate</i>	Taux de cisaillement
$\bar{\gamma}$ s <sup>-1</sup>	<i>Average Shear Rate</i>	Taux de cisaillement moyen
$\bar{\varepsilon}$ W.kg <sup>-1</sup>	<i>Mean Local Energy Dissipation</i>	Énergie moyenne dissipée localement
$\varepsilon$ W.kg <sup>-1</sup>	<i>Local Energy Dissipation</i>	Énergie dissipée localement
$\varepsilon_{\max}$ W.kg <sup>-1</sup>	<i>Maximum Local Energy Dissipation</i>	Énergie maximale dissipée localement
$\eta$ Pa.s	<i>(Shear) Viscosity</i>	Viscosité
$\theta_m$ s	<i>Mixing Time</i>	Le temps de mélange
$\lambda$ m	<i>Size of the Kolmogorov Microscale</i>	Taille de la microéchelle de Kolmogorov
$\mu$ h <sup>-1</sup>	<i>(Specific) Growth Rate</i>	Taux de croissance (spécifique)
$\mu_{\max}$ h <sup>-1</sup>	<i>Maximum (Specific) Growth Rate</i>	Taux de croissance (spécifique) maximal
$\nu$ m <sup>3</sup> .s <sup>-1</sup>	<i>Kinematic Viscosity</i>	Viscosité cinématique
$\rho$ kg.m <sup>-3</sup>	<i>Density</i>	Masse volumique
$\tau$ Pa	<i>Shear Stress</i>	Contrainte de cisaillement
$\tau_s$ Pa	<i>Yield Stress</i>	Seuil d'écoulement

### ***Acronymes***

Éthanol-1G	<i>First-generation Bioethanol</i>	Bioéthnaol de première génération
Éthanol-2G	<i>Second-generation Bioethanol</i>	Bioéthanol de seconde génération
A.T.C.C.	<i>American Type Culture Collection</i>	
ADEME	<i>The French Environment and Energy Management Agency</i>	Agence de l'environnement et de la maîtrise de l'énergie
BGL	<i><math>\beta</math>-Glucosidases</i>	$\beta$ -glucosidases
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>	Albumine sérique bovine

C.B.M.	<i>Carbohydrate Binding Module</i>	Domaine de liaison aux polysaccharides
C.D.	<i>Catalytic Domain</i>	Domaine catalytique
CBH	<i>Cellobiohydrolase</i>	Cellobiohydrolase
CBP	<i>Consolidated Bioprocessing</i>	Bioprocédé unifié
CFD	<i>Computational Fluid Dynamics</i>	
D.O.	<i>Dissolved Oxygen</i>	Oxygène dissous
EG	<i>Endoglucanases</i>	Endoglucanases
FACE	<i>Fast mean Absolute difference with Confidence propagation for Extended depth of field</i>	
FBF	<i>(or FlowingBF) Flowing Bilateral Filter</i>	
FP	<i>Filter Paper Assay</i>	Méthode du papier filtre
FPU	<i>Filter Paper Units</i>	Unité papier filtre
HB		Hershel-Bulkley
HGU	<i>Hyphal Growth Unit</i>	Longueur unitaire de croissance
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i>	Chromatographie liquide à haute performance
I.E.A.	<i>International Energy Agency</i>	Agence internationale de l'énergie
I.U.P.A.C.	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>	Union internationale de chimie pure et appliquée
IAM	<i>Image Analysis Methods</i>	Méthode d'analyse d'images
IFPEN	<i>IFP Energies nouvelles</i>	IFP Energies nouvelles
INRA	<i>(French) National Institute of Agricultural Research</i>	Institut national de la recherche agronomique
KS		Kolmogorov-Smirnov
L.F.B.		Longueur de formation d'une branche
OTR	<i>Oxygen Transfer Rate</i>	Vitesse de transfert d'oxygène dans le réacteur
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i>	Vitesse de consommation d'oxygène

---

RPD	<i>Relative Power Demand</i>	Demande de puissance relative
S.H.F.	<i>Separate Hydrolysis and Fermentation</i>	Hydrolyse et fermentation séparée
S.S.F.	<i>Simultaneous Saccharification and Fermentation</i>	Scharification et fermentation simultanée
TEP	<i>Tonne of Oil Equivalent</i>	Tonnes équivalent pétrole



# Introduction

La production de carburants renouvelables est aujourd'hui une exigence quasiment incontournable au regard des besoins énergétiques dans le monde. En effet, bien que les progrès technologiques (récupération assistée du pétrole, production d'huile de schiste, etc.) permettent d'accéder à de nouvelles sources d'hydrocarbures, cette ressource reste limitée. En conséquence, son flux de renouvellement est négligeable face à son flux d'exploitation. De plus, la lutte contre le réchauffement climatique impose l'utilisation d'une énergie moins carbonée, afin de limiter les émissions de gaz à effet de serre. Ces deux raisons motivent le développement d'énergies alternatives qui se doivent d'être renouvelables avec une faible production de gaz à effet de serre, afin de s'inscrire dans une logique de durabilité. Les biocarburants, et plus spécifiquement l'éthanol issu de ressources lignocellulosiques dit de deuxième génération (éthanol-2G), correspondent à des énergies alternatives particulièrement prometteuses pour un usage dans le transport.

La production d'éthanol à partir de matières premières lignocellulosiques nécessite leur conversion préalable en sucres fermentescibles qui pourront être ensuite biotransformés en éthanol. Cette conversion est un point clé du procédé global, car elle représente entre 15 et 30 % du coût de production de l'éthanol. Elle était historiquement réalisée par voie thermochimique, mais cette dernière est remplacée par des procédés enzymatiques qui sont moins coûteux, plus efficaces et présentent un impact environnemental réduit. Cette hydrolyse enzymatique met en œuvre des biocatalyseurs nommés cellulases, qui sont naturellement produits par certaines espèces de microorganismes (champignons filamenteux et bactéries). L'espèce utilisée pour la production industrielle de cellulases est le champignon filamenteux aérobique *Trichoderma reesei*. Ce choix est principalement motivé par la forte capacité sécrétoire de ce dernier, qui permet d'atteindre des concentrations de plusieurs dizaines de grammes d'enzymes par litre en fin de culture.

Toutefois, la culture de ces champignons filamenteux s'accompagne de contraintes spécifiques, liées à leurs besoins en oxygène et à leur sensibilité au cisaillement. En effet, ces microorganismes développent de fins filaments qui forment des structures tridimensionnelles complexes d'une taille allant de quelques dizaines de micromètres à quelques millimètres. Les interactions entre les filaments de champignons modifient la viscosité du milieu de culture. Ces structures formées par les filaments sont sensibles au cisaillement en raison de leur taille. De plus, lors des cultures, la concentration en biomasse augmente ce qui a deux effets majeurs. D'une part, la viscosité du milieu augmente ce qui impacte négativement le transfert en oxygène. D'autre part, les besoins en oxygène de la population de microorganisme augmentent. Il est donc nécessaire, pour subvenir aux besoins en oxygène des microorganismes, d'accroître le transfert de masse en augmentant l'aération et l'agitation, ce qui impose des contraintes de cisaillement plus importantes qui peuvent impacter négativement le champignon. Ces phénomènes sont d'autant plus critiques que les volumes de production sont importants, car des difficultés de transfert sont rencontrées à grande échelle.

Ces contradictions font des cultures de microorganismes filamenteux aérobiques un système complexe qui nécessite d'être finement caractérisé afin d'être bien maîtrisé et optimisé. Idéalement, cette



caractérisation devrait être réalisée lors des cultures industrielles c'est-à-dire dans des cuves d'un volume de plusieurs dizaines de mètres cubes. Cependant, cela entraînerait des coûts de mise en œuvre beaucoup trop importants. Pour cette raison, la mise au point des bioprocédés dédiés à la production de cellulases est réalisée aux échelles du laboratoire et pilote, avec des cuves d'un volume de quelques litres à quelques centaines de litres. Classiquement, des expériences sont menées dans des conditions idéales pour le développement du microorganisme, afin d'évaluer les effets des paramètres de conduite du procédé. Ces informations sont ensuite utilisées pour concevoir les fermenteurs de grande taille qui serviront à la production industrielle. Néanmoins, les conditions hydrodynamiques (type d'écoulement, temps de mélange, etc.) sont, pour des conditions de mise en œuvre pourtant similaires, très différentes entre les échelles laboratoire et industrielle, générant des hétérogénéités qui peuvent impacter les performances du bioprocédé. Ces différences faussent alors l'extrapolation des résultats d'une échelle à une autre. Afin de se soustraire à ces problèmes de non-similarité entre les échelles, une approche alternative est mise en œuvre. Elle consiste à mimer, à l'échelle du laboratoire et dans différentes conditions, l'hydrodynamique hétérogène rencontrée dans les cuves industrielles. Ce type de méthode d'extrapolation inverse est appelée « *scale-down* » par opposition aux approches d'extrapolation classiques dites « *scale-up* ». Ces méthodes d'extrapolation par approche inverse nécessitent l'utilisation d'outils spécifiques pour évaluer leur pertinence. Il est ainsi nécessaire de savoir mesurer la viscosité des milieux de fermentation et de pouvoir caractériser la morphologie du champignon en fonction des contraintes appliquées. Il faut également être capable de soumettre les champignons à des cisaillements représentatifs de ceux rencontrés à l'échelle industrielle et d'identifier les impacts du stress lié au cisaillement sur la croissance du champignon et la production du produit d'intérêt (les cellulases).

Les travaux effectués pendant cette thèse s'inscrivent pleinement dans cette problématique. Ils correspondent au développement d'une approche originale visant à étudier, au laboratoire, les réponses d'un champignon filamenteux producteur de cellulases (*Trichoderma reesei*) en présence de contraintes hydrodynamiques représentatives des conditions de fonctionnement des fermenteurs industriels. La finalité de ce travail est donc le développement d'outils permettant d'optimiser le procédé industriel, tout en minimisant le nombre et la taille des équipements, pour assurer un coût de l'éthanol produit bien maîtrisé. Ces outils permettront de générer, à petite échelle, des cisaillements variables représentatifs de ceux rencontrés à grande échelle, et de caractériser leurs effets sur la viscosité des moûts de fermentation, sur la morphologie du champignon filamenteux et sur sa capacité à se développer et à produire les enzymes d'intérêt. Cette approche nécessite l'identification préalable des contraintes d'extrapolation à respecter, afin d'assurer des transferts de matières (notamment d'oxygène) et un mélange suffisant pour la croissance et la production d'enzymes, tout en n'atteignant pas un niveau de cisaillement délétère pour le microorganisme.

La première partie de ce manuscrit est consacrée à une synthèse bibliographique sur la production et les enjeux sociétaux du bioéthanol de deuxième génération. Les spécificités liées à la mise en œuvre de fermentations de champignons filamenteux sont ensuite présentées au travers de la description du procédé de production de cellulases. Les critères d'extrapolation de ce type de bioprocédé sont enfin recensés.

Dans la seconde partie de la thèse, la conception de deux méthodologies spécifiques à l'étude des bioprocédés mettant en œuvre des champignons filamenteux est exposée. La première permet de déterminer la viscosité du moût de fermentation dans des conditions proches de celles du bioréacteur, tout en limitant l'altération de l'échantillon (homogénéisation couplée à la mesure). La seconde méthodologie vise la caractérisation de la morphologie du champignon, par la mise en œuvre d'une nouvelle méthode d'analyse d'images capable de rendre compte de la structure tridimensionnelle des champignons filamenteux par projection de cette dernière dans un plan.

La troisième partie de ce manuscrit s'attache à décrire la mise en œuvre de ces méthodologies en vue de leur validation, dans un contexte de production d'enzymes cellulolytiques. Ainsi, elles sont utilisées dans l'étude de l'impact de différents cisaillements sur la croissance de *Trichoderma reesei* et la production de cellulases. Différentes méthodes sont mises en œuvre. Elles consistent à générer des cisaillements représentatifs de l'échelle industrielle à l'aide de différentes configurations de fermentation (*batch*, *fed-batch* et continues).



**Première partie**

**Étude bibliographique**



# I.1. Le bioéthanol de deuxième génération : contexte et enjeux

## I.1.1. Place des biocarburants dans la consommation d'énergie pour le transport

La loi française définit un biocarburant comme étant « un combustible liquide ou gazeux utilisé pour le transport et produit à partir de la biomasse ». La biomasse correspond ici à « la fraction biodégradable des produits, déchets et résidus provenant de l'agriculture, y compris les substances végétales et animales issues de la terre et de la mer, de la sylviculture et des industries connexes, ainsi que la fraction biodégradable des déchets industriels et ménagers »<sup>1</sup>. Les biocarburants viennent donc en complément ou en substitution des carburants fossiles. Cette biomasse constitue une source d'énergie renouvelable (Gusakov, 2011 ; Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006 ; Lynd *et al.*, 2002) qui se distingue des autres énergies renouvelables (solaire, hydroélectricité, éolien et géothermie) par sa capacité à être stockée (Rubin, 2008). Cette caractéristique est essentielle pour une énergie utilisée dans le transport qui dépend à plus de 90 % du pétrole.

En 2013, les biocarburants représentaient 3,3 % de la consommation mondiale d'énergie dans le secteur des transports routiers sur un total de 1,92 GTEP<sup>2</sup>. La proportion de biocarburants dans la consommation mondiale est en augmentation avec une croissance de +4,7 % entre 2011 et 2012, +4,5 % entre 2012 et 2013 et +6 % entre 2013 et 2014<sup>3</sup>.

Deux principaux biocarburants liquides sont destinés aux transports routiers : le diester pour les moteurs diesel, et le bioéthanol pour les moteurs à essence. L'éthanol ou bioéthanol est le plus utilisé (74 % du total en TEP). Il est majoritairement consommé en Amérique du Nord et en Amérique latine (environ 90 % de la consommation mondiale en 2013) alors que la consommation européenne atteint 6,5 % la même année (Simbolotti, 2007).

La production de bioéthanol dit de première génération ou éthanol-1G correspond à l'utilisation de matières premières amylacées (blé, maïs, pomme de terre, notamment) après conversion par voie enzymatique (saccharification) de l'amidon en sucres à six carbones (glucose) ou à l'utilisation directe de biomasses sucrières (betterave à sucre, canne à sucre, mélasses ou sous-produits de sucrerie). Ces sucres sont ensuite fermentés par des microorganismes (le plus souvent des levures du type *Saccharomyces cerevisiae*) pour produire de l'éthanol qui est purifié par distillation et déshydratation avant d'être utilisé comme carburant. La matière première utilisée pour la production de bioéthanol est assez variée (Gagnepain, 2016).

---

<sup>1</sup>Article L661-1 et Article L211-2 du Code de l'énergie

<sup>2</sup>Définition proposée par l'INSEE : « La tonne d'équivalent pétrole (TEP) représente la quantité d'énergie contenue dans une tonne de pétrole brut, soit 41,868 gigajoules. Cette unité est utilisée pour exprimer dans une unité commune, la valeur énergétique des diverses sources d'énergie. Selon les conventions internationales, une tonne d'équivalent pétrole équivaut 954 kg d'essence moteur. »

<sup>3</sup>Source : IFP Energies nouvelles (IFPEN) et FO Lichts 2014 *World Ethanol and Biofuels*

La production de bioéthanol, dit de seconde génération ou éthanol-2G, utilise comme matière première des lignocelluloses (Figure I.1.a). Ce composé peut être issu de coproduits à valoriser (tiges de maïs, pailles, déchets des industries alimentaires, papetière, forestière...) ou de cultures dédiées (peuplier, panic érigé, canne de Provence, Miscanthus...) (Eisentraut, 2010). Cette matière lignocellulosique est plus difficile à transformer en éthanol que l'amidon ou les sucres fermentescibles. Elle nécessite un prétraitement pour rendre accessibles la cellulose et l'hémicellulose (procédés physiques, chimiques, thermo-chimiques), suivi d'une hydrolyse (le plus souvent enzymatique) permettant la conversion de ces polymères en sucres simples à 5 ou 6 carbones. Ces sucres simples peuvent alors être transformés en éthanol à l'instar de la production d'éthanol-1G (Rubin, 2008 ; Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). Les performances globales des procédés de fermentation d'éthanol-2G sont inférieures à celles observées pour l'éthanol-1G. Deux facteurs limitants principaux en sont la cause : les étapes de prétraitement, qui s'accompagnent de la formation de composés inhibiteurs de la fermentation ; les performances plus faibles en fermentation des microorganismes capables d'utiliser les pentoses par rapport à ceux utilisant les hexoses.

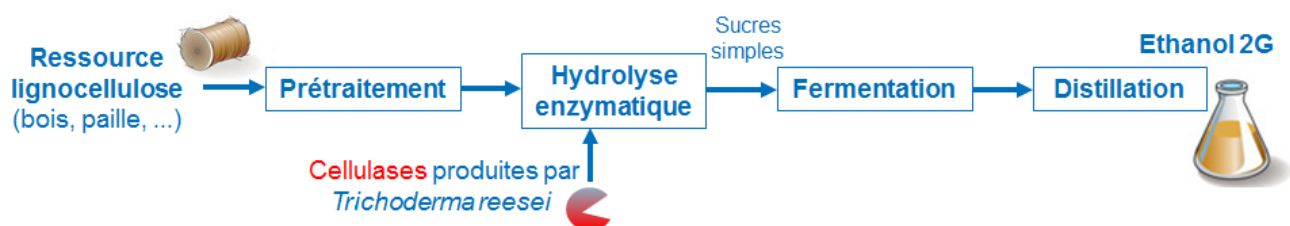


FIG. I.1.a. : Représentation schématique du procédé de production d'éthanol-2G.

Les investissements mondiaux dans le secteur des biocarburants entre 2010 et 2016 montrent des différences importantes en fonction de l'année considérée (Figure I.1.b). Cependant, deux tendances se dégagent. La première correspond à la diminution des investissements sur des unités de production de biocarburants de première génération, avec une diminution d'un facteur quatre en six ans. La seconde correspond à une relative stabilité des investissements dans des unités de production d'éthanol-2G avec des niveaux d'investissements comparables en 2010 et en 2016. Les variations observées dans les investissements peuvent aussi être conjoncturelles. C'est le cas des niveaux d'investissement très bas pour les deux types de biocarburant en 2015, qui s'expliquent en partie par la chute du cours du baril de pétrole.

L'évolution des investissements des différents acteurs de l'industrie de l'énergie, couplée à l'analyse éco-environnementale des deux approches, amène un questionnement sur les enjeux et les avantages de l'éthanol-2G par rapport à la première génération.

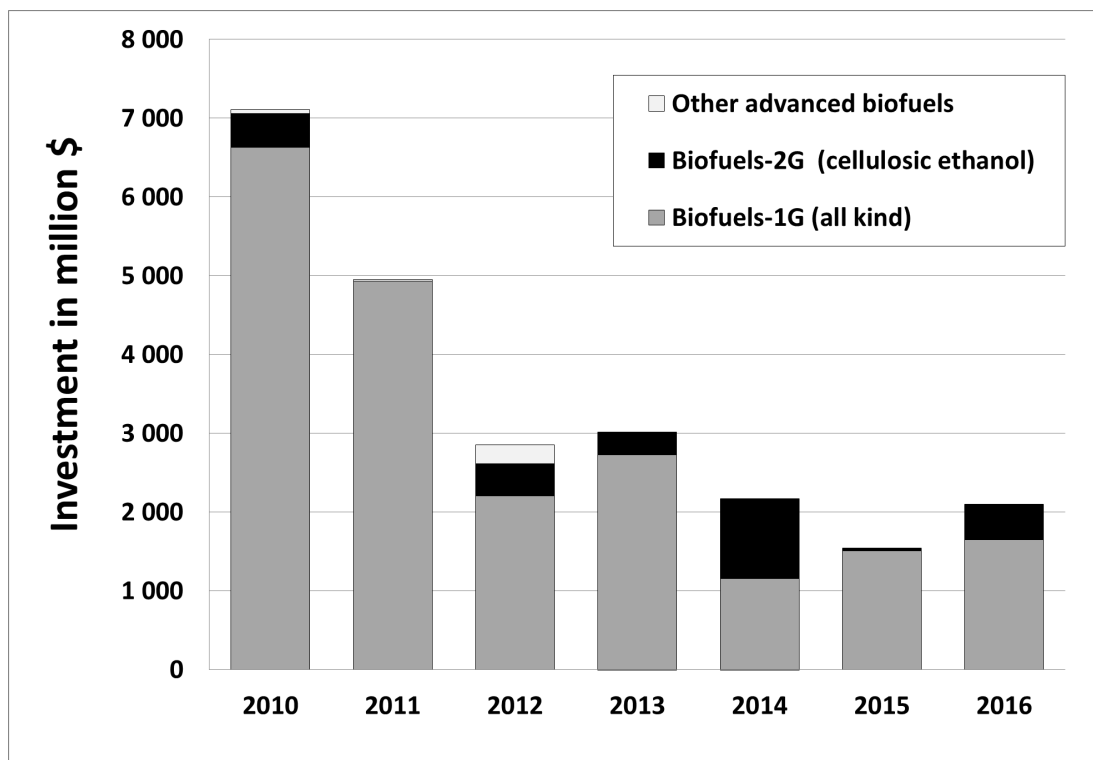


FIG. I.1.b. : Investissements mondiaux dans de nouvelles unités biocarburants, en million de \$  
(Source : IFPEN / Licht Interactive Data 2016).

## I.1.2. Enjeux du développement du bioéthanol deuxième génération

Un (bio)carburant idéal se doit d'être issu d'une ressource abondante, peu coûteuse, avec une forte densité énergétique, facile à stocker et un faible impact environnemental.

Dans la pratique, l'utilisation de biocarburants est principalement motivée par cette dernière propriété, avec la possibilité de diminuer la production de gaz à effet de serre. Cependant, les procédés de production de biocarburants et la production des matières premières associées peuvent nécessiter l'utilisation des énergies fossiles et entraîner de ce fait une émission significative de gaz à effet de serre. La consommation d'énergie fossile et le niveau d'émission de gaz liée à la production de biocarburants dépendent du procédé de production, des matières premières utilisées et des conditions locales de production. La production d'éthanol-1G permet une réduction variable, selon la matière première utilisée, des émissions de gaz à effet de serre (Simbolotti, 2007). Le cas le plus favorable correspond à l'utilisation de la canne à sucre qui permet des émissions comprises entre 0,2 et 0,3 kg de CO<sub>2</sub> par litre (contre 2,8 kg de CO<sub>2</sub> par litre pour la production du carburant essence), à condition d'utiliser les bagasses comme source d'énergie pour le procédé. Cela correspond à une réduction de 90 % des émissions. La production d'éthanol-1G à partir de betteraves est moins favorable, avec une réduction des émissions de 50 à 60 %. La production à partir de maïs correspond à la plus faible réduction des émissions, avec seulement 15 et 25 %. La production d'éthanol-2G permet de réduire les émissions nettes de CO<sub>2</sub> de 70 % (Simbolotti, 2007). De plus, si l'électricité nécessaire au procédé est co-générée par la biomasse, il est possible d'approcher une réduction de 100 % des émissions par



rapport à l'essence (Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). L'éthanol-2G a donc un bon potentiel pour la réduction des gaz à effet de serre.

En termes de capacité de production, le potentiel de production d'éthanol-1G est limité par la surface de terres arables disponibles, ce qui entraîne une concurrence avec un usage pour des productions alimentaires. Cette concurrence peut conduire à une augmentation simultanée des prix de l'éthanol et des denrées alimentaires, et dans certains cas, à une raréfaction des surfaces destinées à l'alimentation. Une autre limite à la production de bioéthanol-1G est la difficulté à transporter la biomasse. Ce fait limite la taille des usines de production, ce qui réduit la possibilité de réaliser des économies d'échelle. Dans le cadre de la production d'éthanol-2G, la matière première utilisée est la biomasse lignocellulosique, ressource abondante qui correspond à environ 50 % de la biomasse terrestre avec une production annuelle évaluée entre 10 à 100 milliards de tonnes de matière sèche selon les auteurs (Kumar, Singh et Singh, 2008 ; Sánchez et Cardona, 2008 ; Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). Le développement d'un procédé économiquement viable de production d'éthanol-2G permettrait donc d'augmenter la diversité et la quantité de matières premières disponibles pour la production de bioéthanol. De plus, cette matière première peut être produite sur des sols non arables ce qui permet d'éviter la concurrence directe avec l'alimentation humaine (Eisentraut, 2010).

L'éthanol est un carburant avec un indice d'octane<sup>4</sup> fort, ce qui est recherché pour le bon fonctionnement d'un moteur à essence. Les atomes d'oxygène présents dans l'éthanol permettent, de plus, une combustion à faible température, qui s'accompagne d'une réduction des émissions de monoxyde de carbone et d'oxydes d'azote qui sont des polluants atmosphériques. Cependant, l'éthanol utilisé comme carburant présente aussi des désavantages. En effet, l'éthanol et l'eau sont des composés miscibles ce qui entraîne des difficultés logistiques, car l'éthanol utilisé en incorporation directe avec l'essence doit être anhydre (Rubin, 2008 ; Sánchez et Cardona, 2008). Enfin, l'éthanol a une densité énergétique inférieure à celle de l'essence, correspondant à environ un tiers d'énergie en moins que celle contenue dans la même quantité d'essence (Simbolotti, 2007). Finalement, l'éthanol présente des propriétés techniques intéressantes comme carburant, malgré une densité énergétique relativement faible.

Le prix des biocarburants est fonction d'un grand nombre de facteurs. Ces facteurs incluent les coûts de la matière première, du procédé, de l'exploitation agricole, le prix de revente des coproduits, le niveau des subventions et le prix des marchés des carburants et des produits alimentaires (notamment celui du sucre et des céréales). Il est toutefois possible d'évaluer et de comparer le prix de l'éthanol-1G et de l'éthanol-2G, en raisonnant en équivalent d'un litre d'essence ou « lge » (pour « litre gasoline equivalent »). Sur cette base, l'éthanol-1G produit à partir de sucre de canne coûte entre 0,3 \$/lge et 0,5 \$/lge, alors que le prix de l'essence est de 0,4 \$/lge pour un baril à 50 \$. L'éthanol-1G produit à partir de maïs, de betterave ou de céréales coûte entre 0,4 \$/lge et 0,6 \$/lge. Aujourd'hui, l'éthanol-2G coûte entre 0,5 \$/lge et 1 \$/lge (Simbolotti, 2007). L'éthanol-2G présente donc un coût de production trop important comparé à celui l'essence, il est donc impératif de réduire ses coûts de production.

En résumé, le développement d'un procédé économiquement viable de production de bioéth-

---

<sup>4</sup>Définition proposée par IFPEN : L'indice d'octane caractérise l'aptitude de l'essence à résister à l'auto-inflammation afin de se préserver de combustions non contrôlées par l'étincelle électrique (combustions anormales, « cliquetis »).

nol, à partir de matières premières lignocellulosiques, pourra permettre d'augmenter le potentiel de production d'éthanol en élargissant le potentiel de ressources renouvelables et en réduisant la concurrence sur les surfaces cultivables, tout en diminuant la production de gaz à effet de serre, mais à condition de réduire significativement les coûts de production.

### I.1.3. L'hydrolyse enzymatique des lignocelluloses : une étape clé de la production d'éthanol-2G

#### I.1.3.1. Composition de la lignocellulose

La lignocellulose est principalement composée de trois molécules : la cellulose, l'hémicellulose et la lignine (Gusakov, 2011 ; Kumar, Singh et Singh, 2008 ; Rubin, 2008) dans des proportions variables selon les plantes considérées. Par exemple, le bois des angiospermes est composé de 42 % à 50 % de cellulose, de 25 % à 30 % d'hémicellulose, de 20 % à 25 % de lignine et entre 5 % et 8 % de résidus. Son organisation est représentée sur la Figure I.1.c.

Le composant principal de la lignocellulose est la cellulose, un polymère de molécules de glucose (ou  $\beta$ -D-glucopyranose) avec des liaisons glycosidiques  $\beta(1-4)$ . Des liaisons hydrogène et des interactions de Van Der Waals, entre les différentes couches de ces polysaccharides, sont impliquées dans la résistance de la cellulose, alors qualifiée de cellulose cristalline (Rubin, 2008 ; Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). L'hémicellulose, le deuxième composé le plus abondant dans la lignocellulose est composé de divers sucres à 5 carbones (D-xylose, D-arabinose) et 6 carbones (D-galactose, D-glucose, D-mannose) (Kumar, Singh et Singh, 2008 ; Rubin, 2008). Ce sont les sucres qui composent la cellulose et l'hémicellulose qui sont recherchées pour la fermentation alcoolique.

Le troisième composé, la lignine, est un polymère de composés phénoliques. Ces composés sont principalement l'alcool p-coumarylique, l'alcool coniférylique et l'alcool sinapylique. Leurs proportions respectives dépendent du type de plante, de l'organe de la plante considéré et même de la couche de la paroi considérée.

Les trois constituants de la lignocellulose forment des structures appelées microfibrilles. L'organisation de ces microfibrilles est à l'origine de la stabilité de la paroi cellulaire végétale (Rubin, 2008). La lignine a un rôle de « ciment » pour la paroi cellulaire végétale en apportant de la rigidité au réseau de fibres ainsi qu'une résistance aux insectes et aux pathogènes (Rubin, 2008). Elle ne peut en revanche pas être convertie en sucres, c'est donc un coproduit qui est à l'heure actuelle valorisé comme combustible même si d'autres voies de valorisation sont explorées au stade recherche (Ragauskas, A. *et al.*, 2014). Cependant, la lignine et ses dérivés peuvent être un problème, car ils peuvent inhiber des réactions biochimiques et fermentaires lorsqu'ils sont libérés sous forme de monomères après l'étape de prétraitement de la biomasse (Ben Chaabane et Marchal, 2013 ; Kumar, Singh et Singh, 2008).

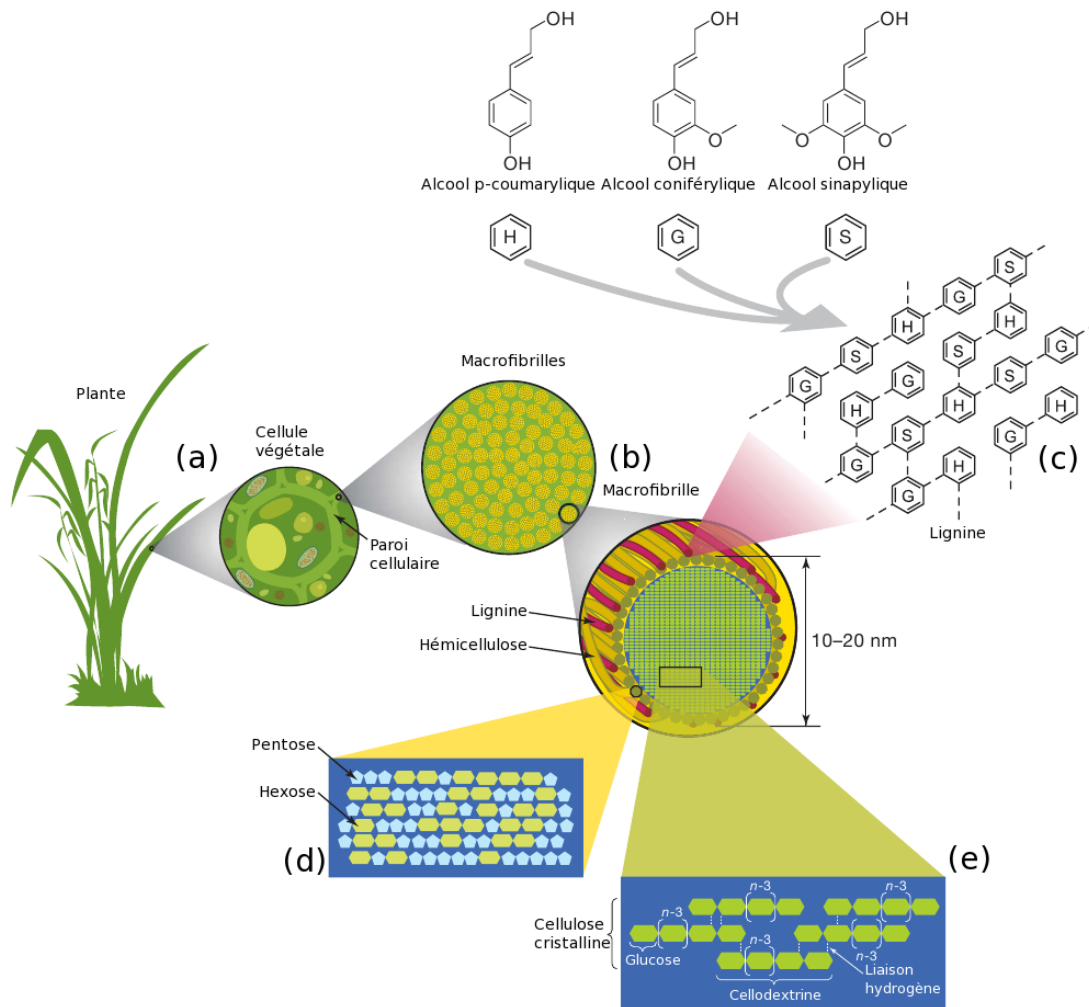


FIG. I.1.c. : Structure de la lignocellulose adaptée avec la permission de Macmillan Publishers Ltd : NATURE d'après (Rubin, 2008), copyright (2008).

(a) plante, (b) macrofibrille, (c) lignine, (d) hémicellulose, (e) cellulose (cristalline), (H) alcool p-coumarylique, (G) alcool coniférylique, (S) alcool sinapylique.

### I.1.3.2. Prétraitement et hydrolyse de la matière première lignocellulosique

Du fait de leur structure complexe, la valorisation des lignocelluloses pour la production d'éthanol-2G implique la mise en œuvre d'un prétraitement de la matière première. Ce prétraitement a pour objectif de déstructurer la lignocellulose afin d'augmenter la surface spécifique et de diminuer la cristallinité de la cellulose, afin d'accélérer le processus d'hydrolyse. Les prétraitements peuvent être effectués par des procédés physiques, chimiques, biologiques ou une combinaison de ces méthodes (Zhao, Zhang et Liu, 2012). Les prétraitements les plus utilisés à l'échelle industrielle sont de nature physicochimique.

L'hydrolyse de la cellulose (et de l'hémicellulose) est le goulot d'étranglement majeur dans les procédés de production de biocarburants à partir de matières cellulosiques (Coradetti *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2009). Les procédés chimiques historiquement utilisés pour dégrader la lignocellulose nécessitent des conditions réactionnelles avec une forte acidité et en présence de hautes températures (Kumar, Singh et Singh, 2008). Ces conditions drastiques ont un coût de mise en œuvre élevé, elles entraînent la production d'inhibiteurs de la fermentation alcoolique (tel que le furfural et ses

dérivés), elles sont relativement lentes et inefficaces et ont un impact environnemental négatif fort. Pour ces différentes raisons, il est plus intéressant de dégrader la lignocellulose avec un procédé enzymatique qui permet une mise en œuvre dans des conditions de température et de pH plus douces, bien que l'étape de prétraitement soit toujours nécessaire (Marten *et al.*, 1996 ; Rubin, 2008).

### I.1.3.3. Les cellulases : une famille d'enzymes spécialisées dans la dégradation de la lignocellulose

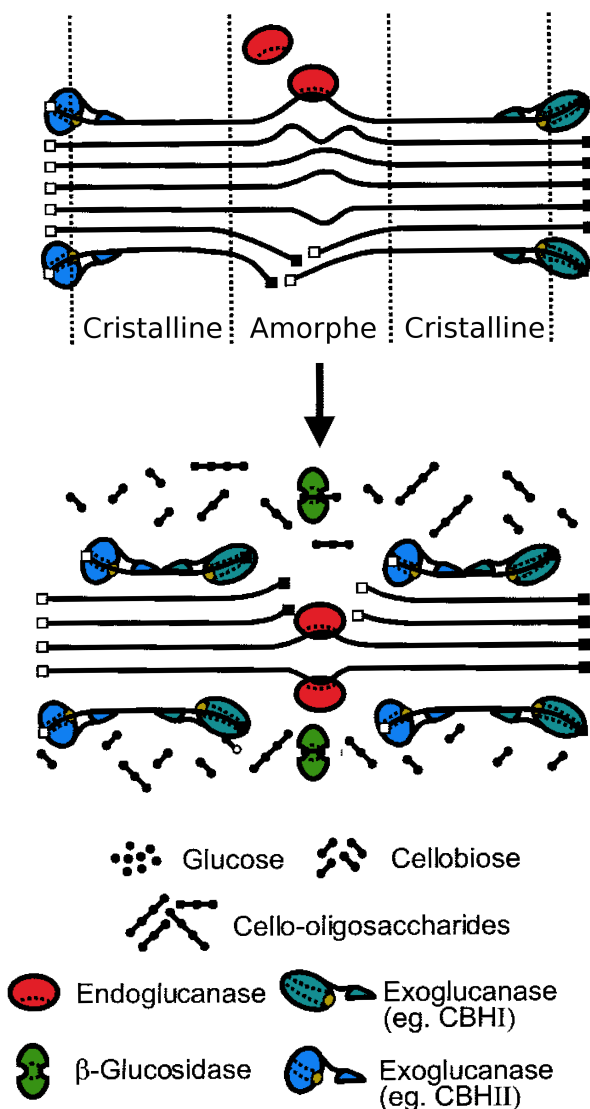


FIG. I.1.d. : Représentation schématique de l'action des différentes familles de cellulases sur de la cellulose adaptée d'après (Lynd *et al.*, 2002) Copyright © 2002, American Society for Microbiology.

*Les carrés pleins représentent les extrémités réductrices et les carrés vides les extrémités non réductrices des polysaccharides. Les régions cristallines et amorphes sont indiquées. Ce schéma n'est pas à l'échelle.*

Les enzymes utilisées pour dégrader la lignocellulose sont appelées cellulases. Ces protéines sont généralement composées d'une structure modulaire (Figure I.1.d) avec un domaine catalytique C.D.

pour « *Catalytic Domain* » et un domaine de liaison au substrat nommé C.B.M. pour « *Carbohydrate Binding Modules* ». Les deux domaines sont attachés l'un l'autre par une séquence protéique appelée lieur pour « *linker* » (Gusakov, 2011 ; Lynd *et al.*, 2002). Le mécanisme d'hydrolyse enzymatique de la cellulose implique l'action en synergie de différents types d'enzymes : les endoglucanases (EC 3.2.14), les exoglucanases ou cellobiohydrolases (EC 3.2.191) et les  $\beta$ -glucosidases (EC 3.2.121) (Coradetti *et al.*, 2012 ; Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). Par synergie, il faut entendre que l'ensemble de ces enzymes (ou cocktail enzymatique) présente une activité globale supérieure à la somme des activités individuelles de ces mêmes enzymes (Gusakov, 2011). Chaque type d'enzyme catalyse des réactions différentes. Les endoglucanases hydrolysent les liaisons glycosidiques  $\beta$ 1-4 accessibles (dans les zones amorphes) de façon aléatoire ce qui permet de générer de nouvelles extrémités. Les exoglucanases ou cellobiohydrolases (CBH) coupent progressivement les chaînes de cellulose à partir des extrémités formées. Ce clivage libère des molécules de cellobiose ou de glucose. Enfin, les  $\beta$ -glucosidases hydrolysent le cellobiose (ou les cello-oligosaccharides) pour former du glucose, ce qui permet d'éviter l'inhibition des CBH par le cellobiose. Ces trois réactions (Figure I.1.d) se déroulent simultanément (Kumar, Singh et Singh, 2008 ; Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006).

#### I.1.3.4. Les microorganismes producteurs de cellulases

Les cellulases sont produites dans la nature par une grande variété de microorganismes (Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). Parmi ces microorganismes se trouvent les champignons filamenteux cellulolytiques, qui démontrent un potentiel élevé pour la production de ces enzymes. Ces champignons ont la capacité de pénétrer dans la biomasse lignocellulosique en développant une forme cellulaire linéaire appelée hyphe (Chapitre. I.2.2.1). Les hyphes forment alors des cavités où sont confinées les cellulases excrétées. La production de ces cellulases libres dans un volume restreint permet une hydrolyse efficace. Ce phénomène est décrit sous le terme de système de cellulases « non complexées » (Lynd *et al.*, 2002). Ces champignons appartiennent à plusieurs genres dont les plus étudiés sont les *Aspergillus*, les *Penicillium* et les *Trichoderma*. Les espèces d'*Aspergillus* ont un répertoire enzymatique principalement efficace pour dégrader l'hémicellulose et le cellobiose. Cependant, ce répertoire est moins efficace en ce qui concerne la dégradation des autres composants de la lignocellulose. Les espèces de *Penicillium* sont, quant à elles, recherchées pour leurs fortes activités  $\beta$ -glucosidases et cellobiohydrolases extracellulaires (Gusakov, 2011). De plus, des études montrent que leurs enzymes sont moins sujettes à être inhibées par adsorption sur la lignine, comparé à celles des *Trichoderma* (Berlin *et al.*, 2006). Enfin, les *Trichoderma*, et plus spécifiquement *Trichoderma reesei*, restent les champignons filamenteux les plus utilisés pour la production de cellulases (Gusakov, 2011). Cela s'explique par le fait que les souches industrielles sécrètent un cocktail enzymatique qui a été optimisé et complété avec des gènes d'autres espèces de champignons (Ayrinhac *et al.*, 2011).

Les systèmes de cellulases « non complexées » s'opposent aux systèmes « complexés » ou cellulosomes. Les cellulosomes correspondent à un assemblage complexe de protéines permettant un regroupement spatial des cellulases. Ils sont synthétisés par certains microorganismes à cellules isolées, comme certaines bactéries. Celles-ci appartiennent à différentes espèces, aérobies ou anaéro-

bies, à Gram positif ou à Gram négatif : *Ruminococcus*, *Clostridium*, *Acetivibrio*, etc. Certaines espèces sont thermophiles et représentent une source de cellulases thermostables qui pourrait permettre de réaliser une hydrolyse enzymatique à une plus haute température que celle réalisée avec des cellulases produites par les espèces mésophiles, et donc conduire à une meilleure productivité (Lynd *et al.*, 2002). Cependant, malgré un vaste répertoire d'enzymes, les microorganismes unicellulaires sont peu utilisés pour la production de cellulases, car leur niveau de sécrétion d'enzymes ne rivalise pas avec celui des champignons filamenteux (Gusakov, 2011).

Au regard de ces informations, dans le cadre des procédés de production d'éthanol-2G, les cellulases mises en œuvre actuellement correspondent à des systèmes non complexés, ce qui permet de collecter plus facilement les enzymes produites et donc de dissocier la production des cellulases de leur utilisation pour l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique. En outre, c'est le champignon filamenteux *Trichoderma reesei* qui est principalement valorisé dans ces procédés.

### I.1.3.5. Le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*

Les productions industrielles de cellulases sont majoritairement réalisées par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei* (Marten *et al.*, 1996). Ce choix est motivé par des considérations technologiques et économiques, liées à la forte capacité sécrétoire d'enzymes de cette espèce, mais aussi par des considérations scientifiques liées à la grande quantité d'études disponibles. L'utilisation de *T. reesei* a commencé lors de sa découverte pendant la Seconde Guerre mondiale sur les îles Salomon (Ma *et al.*, 2013 ; Peterson et Nevalainen, 2012 ; Ahamed et Vermette, 2009 ; Ferreira *et al.*, 2009 ; Patel *et al.*, 2009). *T. reesei* a été initialement appelé *Trichoderma viride* puis rebaptisé en l'honneur de E.T. REESE, un des premiers scientifiques ayant travaillé sur ce champignon (Peterson et Nevalainen, 2012 ; Gusakov, 2011 ; Lynd *et al.*, 2002). Il est également possible de retrouver l'appellation *Hypocrea jecorina* qui correspond à l'appellation du stade téléomorphe, c'est-à-dire la forme de la reproduction sexuée.

TAB. I.1.i. : Classification biologique de *Trichoderma reesei* :

<b>Règne :</b>	<i>Fungi</i>
<b>Division :</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Sous-division :</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>Classe :</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>Sous-Classe :</b>	<i>Hypocreomycetidae</i>
<b>Ordre :</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Famille :</b>	<i>Hyproceaceae</i>
<b>Genre :</b>	<i>Trichoderma</i>

En termes de potentiel de production de cellulases, le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*

sécrète et produit majoritairement deux exoglucanases CBHI et CBHII, cinq endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV et EGV) et deux  $\beta$ -glucosidases (BGLI et BGLII) (Lynd *et al.*, 2002). Les seules enzymes CBH I, CBH II, EG I et EG II représentent 90 à 95 % du total des protéines sécrétées par *T. reesei* (Gusakov, 2011). L'importance du nombre de travaux effectués sur le cocktail enzymatique de *T. reesei* (Ayrinhac *et al.*, 2011 ; Durand, Clanet et Tiraby, 1988) et l'expérience accumulée sur la mise en œuvre de ce champignon en fermentation (Ben Chaabane et Marchal, 2013 ; Ogier *et al.*, 1999 ; Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1983) font de ce microorganisme le candidat préféré pour la production industrielle de ces enzymes.

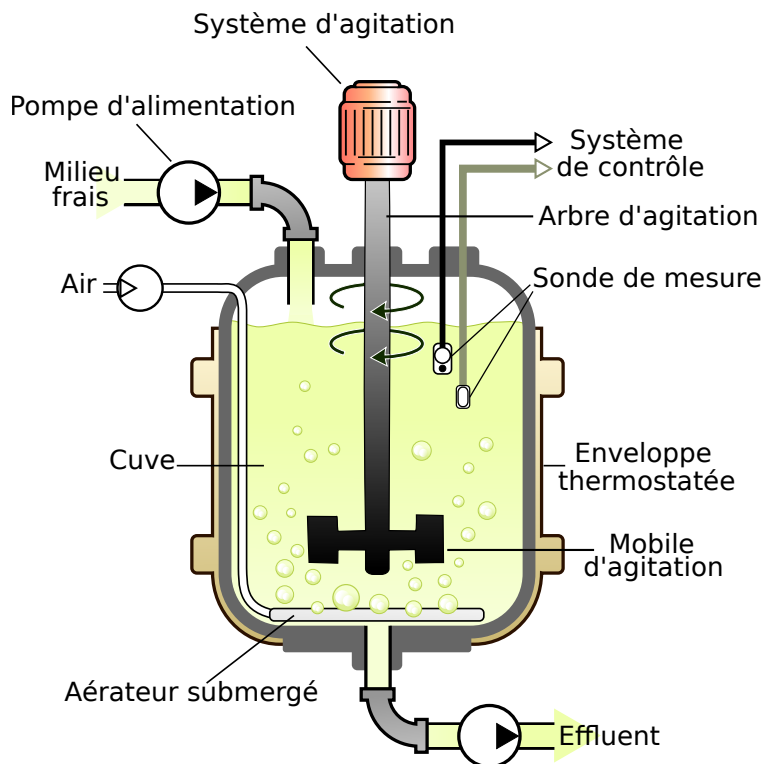
### I.1.3.6. Intégration des cellulases dans les procédés de production d'éthanol-2G

Le niveau d'intégration des différentes étapes de la production d'éthanol-2G est variable. Le système le moins intégré correspond au procédé dit S.H.F. pour « *Separate Hydrolysis and Fermentation* », dans lequel la production de cellulases, l'hydrolyse et la fermentation sont des étapes distinctes du procédé. Si la fermentation et l'hydrolyse sont réalisées en une seule et même étape, il s'agit alors de procédé S.S.F. pour « *Simultaneous Saccharification and Fermentation* ». Ces deux catégories de procédés sont celles qui se retrouvent dans les procédés industrialisés ou en cours d'industrialisation. Cependant une troisième alternative commence à émerger. Elle est appelée CBP pour « *Consolidated Bioprocessing* » ou D.M.C. pour « *Direct Microbial Conversion* » et correspond à l'utilisation d'un unique microorganisme capable d'hydrolyser la lignocellulose et de produire l'éthanol par fermentation (Lynd *et al.*, 2002). L'utilisation de souches modifiées de *Saccharomyces cerevisiae* capables d'hydrolyser la lignocellulose illustre ce type de démarche (Bischof, Ramoni et Seiboth, 2016 ; Hasunuma et Kondo, 2012 ; Van Zyl *et al.*, 2007). Dans une approche opposée à celle des CBP, l'utilisation de co-cultures microbiennes est aussi explorée (Taha *et al.*, 2015). Bien que prometteuses, ces deux types de technologies ne sont cependant pas industrialisées pour le moment. Pour réduire le coût de l'éthanol-2G, différentes stratégies sont mises en œuvre. Les plus prometteuses se focalisent sur l'étape de production des cellulases, car celle-ci représente une part importante (entre 15 et 30 %) du coût de production de l'éthanol, équivalente à celle du prétraitement de la matière première lignocellulosique (Kazi, F. *et al.*, 2010).

Pour diminuer le coût des cellulases, deux approches sont possibles. La première s'inscrit dans le domaine de la biologie et vise l'amélioration des performances des enzymes et des souches productrices, tandis que la seconde consiste à optimiser et extrapoler le procédé de production de cellulases (Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). Si IFPEN explore en parallèle les deux stratégies, le travail réalisé au cours de cette thèse se focalise sur l'extrapolation du procédé de production de cellulases, ce qui oriente la suite de cette présentation.

## I.2. Le procédé de production de cellulases

La production de cellulases par le champignon *T. reesei* est peut-être réalisée par fermentation en milieu liquide (moût de fermentation) ou en milieu solide. Les fermentations en milieu solide sont moins coûteuses en énergie que celles en milieu liquide (Ortiz *et al.*, 2015). Cependant, elles sont limitées aux faibles tonnages du fait de la difficulté de réguler les conditions de culture telle que la température (Behera et Ray, 2016 ; Singhania *et al.*, 2009 ; Bhargav *et al.*, 2008). En pratique, les plus grands producteurs d'enzyme (Novozymes, DSM, DuPont, etc.) utilisent la fermentation en milieu liquide.



(a) Schéma de la structure d'un bioréacteur modifié d'après une création de YassineMrabet publié sous licence Creative Commons (CC-BY-SA)



(b) Photographie d'un bioréacteur Technfors par Infors HT (Bottmingen, Suisse) avec une capacité de 30 L en acier inoxydable

FIG. I.2.a. : Schéma et photographie d'un bioréacteur

Les fermentations en milieu liquide sont mises en œuvre à l'aide d'un dispositif appelé bioréacteur ou fermenteur (figure I.2.a). Ce type de dispositif, développé pour la première fois dans les années 40, est constitué d'une cuve en verre ou en acier inoxydable (le premier étant principalement retrouvé pour les fermenteurs de moins de 10 L et le second pour des tailles supérieures). Ces cuves peuvent être mécaniquement agitées et elles disposent d'un nombre important de sondes, de régulateurs et d'actionneurs permettant de contrôler les conditions de culture (paramètres physico-chimiques). Généralement, l'ensemble se doit d'être stérilisable, étanche pour éviter les contaminations et la dissémination des souches en culture, résistant aux vibrations (liées à l'agitation), à la corrosion (lors des



opérations de nettoyage désinfection), à la pression et aux températures élevées (lors des traitements thermiques). Il comprend également un système permettant de réaliser une prise d'échantillons dans des conditions d'asepsie (Stanbury, Whitaker et Hall, 1995).

## I.2.1. Les conditions de fermentation et cinétiques fermentaires de *T. reesei*

La mise en culture de *T. reesei* nécessite la mise en œuvre de conditions nutritionnelles et environnementales favorables, afin de lui permettre d'une part de se développer et d'autre part de produire efficacement les cellulases.

### I.2.1.1. Conditions de fermentation favorables à *T. reesei*

La production de cellulases est dissociée de la croissance, ce qui en fait un métabolite secondaire. Elle intervient en condition de limitation de substrat et en présence d'inducteurs (Jourdié *et al.*, 2013). Les inducteurs naturels sont les produits de la dégradation de la cellulose (cellobiose) (Carle-Urioste *et al.*, 1997). Cependant des oligosaccharides tels que le lactose ou le sophorose sont également des inducteurs forts (Jourdié *et al.*, 2013). *T. reesei* est capable d'utiliser différentes sources de carbone, cependant c'est le glucose qui est principalement utilisé pour sa croissance. Une source d'azote est également importante pour la croissance et la production de cellulases. Lors des cultures industrielles, l'azote est apporté en début de culture sous forme de *corn steep* (issu de la macération de maïs) puis, en fin de culture, sous forme d'ammoniac qui sert également à réguler le pH (Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1988). *T. reesei* nécessite aussi la présence d'oligo-éléments (sels minéraux) à faible concentration. Ces besoins ont été évalués par une approche d'analyse compositionnelle de la biomasse (Jourdié, 2012).

Des conditions d'environnement favorables au champignon doivent également être établies. *T. reesei* supporte des pH relativement acides ; ainsi, le pH optimal de croissance pour la souche QM9414 est d'environ 4,5 (Lejeune, Nielsen et Baron, 1995b). Il s'agit d'un microorganisme mésophile (Dimarogona, Topakas et Christakopoulos, 2012) qui est généralement cultivé à des températures comprises entre 25 et 30 °C. Il est aérobic strict. La concentration en oxygène dissous (D.O.) dans le milieu de culture est donc un paramètre très important pour sa culture (Neubauer et Junne, 2010 ; Kar *et al.*, 2011). Elle correspond au pourcentage de saturation du milieu liquide en oxygène. Une D.O. critique est d'ailleurs définie pour les organismes aérobies, elle correspond à la valeur de D.O. minimale pour laquelle la cinétique de croissance n'est pas ralentie dans des conditions de culture standard. Cette valeur est d'environ 15 % chez *T. reesei* pour une pression légèrement supérieure (1,14 bar) à la pression atmosphérique (ce qui correspond à 0,0375 mmol.L<sup>-1</sup> d'O<sub>2</sub>) (Marten *et al.*, 1996).

### I.2.1.2. Résultats caractéristiques des fermentations de *T. reesei*

Le tableau Tab. I.2.i synthétise, pour différentes souches et différents substrats carbonés, les taux de croissance maximums, les rendements de croissance et les conditions de cultures associées. Le taux

de croissance maximum varie ainsi de 0,06 à 0,15 h<sup>-1</sup>, et est plus élevé sur substrat glucose que sur lactose ou galactose. Le rendement de croissance est, pour sa part, compris entre 0,44 et 0,74 g<sub>X</sub>.g<sub>S</sub><sup>-1</sup>, avec des différences selon les souches et le substrat, le glucose semblant là encore plus favorable. En conséquence, le temps de doublement de *T. reesei* est dépendant de la souche considérée. Il est généralement compris entre 6 h et 16 h. Une culture en batch dure alors de 2 à 3 jours, une culture en *fed-batch* dure généralement entre 15 et 20 jours.

TAB. I.2.i : Valeurs de vitesses spécifiques de croissance ( $\bar{\mu}$ ) et de rendement en biomasse ( $Y_{X/S}$ ) sur différents substrats d'après (Lo *et al.*, 2010)

Substrat	$\bar{\mu}$ (h <sup>-1</sup> )	$Y_{X/S}$	Souche	Conditions de cultures	Référence
Lactose	0,070	0,58	C5	30°C ; pH 5,0	(Chaudhuri et Sahai, 1994)
	0,066	0,63	C5	30°C ; pH 5,0	(Chaudhuri et Sahai, 1993)
	0,10	0,44	MCG 77	32°C (2 stages)	(Ryu, D. <i>et al.</i> , 1979)
	0,076	0,60	Rut C30	30°C ; pH 4,8	(Pakula <i>et al.</i> , 2005)
	>0,10	-	Rut C30	28°C ; pH 5,0	(Castillo, Blanch et Wilke, 1984)
	>0,12	0,61	Rut C30	25°C ; pH 5,0 ; D.O.70 %	(Lo <i>et al.</i> , 2010)
Glucose	0,15	0,53	<i>T. viride</i> QM 9123	30°C ; pH 4,0	(Brown et Zainudeen, 1977)
	0,13	0,74	<i>Trichoderma</i> sp.	30°C ; pH 4,0	(Nagai, Onodera et Aiba, 1976)
	0,13	0,61	Rut C30	25°C ; pH 5,0 ; D.O.70 %	(Lo <i>et al.</i> , 2010)
Galactose	0,075	~0,5	QM 9414	30°C ; pH 5,0	(Fekete <i>et al.</i> , 2007)
	0,060	0,59	Rut C30	25°C ; pH 5,0 ; D.O.70 %	(Lo <i>et al.</i> , 2010)

Le tableau (Tab. I.2.ii) établi par Jourdiier *et al.* (2012) présente des données relatives à la production de cellulases pour trois souches de *T. reesei*. Le rendement théorique maximum de production de cellulases ( $Y_{P/S}$ ) se situe autour de 0,6 g<sub>P</sub>.g<sub>S</sub><sup>-1</sup>, le rendement théorique maximum de production de biomasse ( $Y_{X/S}$ ) autour de 0,6 g<sub>X</sub>.g<sub>S</sub><sup>-1</sup> et la vitesse spécifique de production de cellulases ( $q_P$ ) autour de 15 mg<sub>P</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

TAB. I.2.ii : Comparaison de caractéristiques liées à la production de cellulases entre différentes souches de *Trichoderma reesei* d'après (Jourdiier *et al.*, 2012)

Souche	Type de culture	$Y_{P/S}$	m	$q_P$	Référence
MG80	continu	0,60	10,8	16,9	Nicholson cité par (Jourdiier <i>et al.</i> , 2012)
VTT D-99676	continu	0,60	8,3	19,9	(Bailey et Tähtiharju, 2003)
CL 847	<i>fed-batch</i>	0,58 - 0,62	8 - 12	12 - 18	(Jourdiier <i>et al.</i> , 2012 ; Jourdiier <i>et al.</i> , 2012)

avec m le coefficient de maintenance en milligramme de substrat par gramme de biomasse et par heure (mg<sub>S</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) et  $q_{pen}$  mg<sub>P</sub>.g<sub>X</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>.

Le tableau (Tab. I.2.iii) établi par Peterson et Nevalainen (2012) présente des données relatives aux activités de cellulases produites par différentes souches de *T. reesei* : la souche sauvage QM6a et quatre souches mutantes. Après 14 jours de culture en *fed-batch* sur un substrat constitué de coton

(6 % poids/volume), le titre final en enzymes se situe entre 7 et 21 g.L<sup>-1</sup>. L'activité globale du cocktail enzymatique, déterminée avec la méthode du papier filtre (FP) recommandée par l'Union internationale de chimie pure et appliquée (I.U.P.A.C) (Ghose, 1987), est exprimée en unité papier filtre (FPU). Elle varie ici entre 5 et 15 U.mL<sup>-1</sup>, une unité enzymatique (U) correspondant à la production d'une micromole de glucose par minute dans des conditions de réaction standardisées. Plus spécifiquement, l'activité  $\beta$ -glucosidase (BGL) varie entre 0,3 et 0,9 U.mL<sup>-1</sup>.

TAB. I.2.iii. : **Comparaison des activités de cellulases produites par différentes souches de *T. reesei* d'après (Peterson et Nevalainen, 2012)**

Souche	Protéines solubles (g.L <sup>-1</sup> )	FPU (U.mL <sup>-1</sup> )	BGL (U.mL <sup>-1</sup> )
QM6a	7	5	0,3
QM9414	14	10	0,6
MCG77	16	11	0,9
NG-14	21	15	0,6
RUT-C30	19	14	0,3

## I.2.2. La complexité du moût de fermentation : un verrou pour la maîtrise des cultures industrielles

Lors des fermentations de *T. reesei*, le développement du microorganisme génère des changements importants dans le milieu de culture. Ces changements portent d'une part, sur la morphologie du champignon et d'autre part sur la viscosité du milieu qui augmente avec la concentration en biomasse (Malouf *et al.*, 2013 ; Gabelle *et al.*, 2012).

### I.2.2.1. Diversité morphologique de *T. reesei*

Les champignons filamenteux, et en particulier *T. reesei*, se développent en filaments ou hyphes (figure I.2.b) et ils forment des structures tridimensionnelles (macromorphologie) allant du micromètre au millimètre. L'ensemble des hyphes, appelé également mycélium, correspond à la forme végétative du champignon. Les structures formées par le mycélium ont été décrites et classées par Paul et Thomas (1998). Les champignons filamenteux peuvent présenter deux types morphologiques distincts. Il peut s'agir de petites boulettes (ou *pellets* en anglais) d'un diamètre allant d'une centaine de micromètre au millimètre ou de formes dispersées (Metz, Kossen et van Suijdam, 1979).

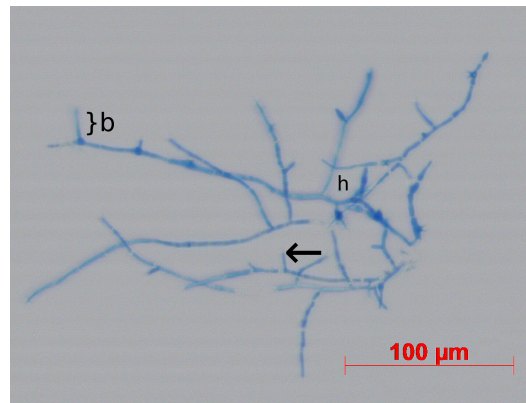


FIG. I.2.b. : Photographie d'un mycélium de *Trichoderma reesei*.

Observation réalisée au microscope optique (Axioimager M2P) en champs clairs avec un grossissement de 200 et une caméra (AxioColor105). Le mycélium est préalablement coloré avec une solution de bleu de lactophénol. (b) représente une branche d'hyphe, (h) un trou et la flèche noire un bout. Les nombres de branches et de trous permettent de définir la morphologie du mycélium. Ici le mycélium est de type enchevêtré.

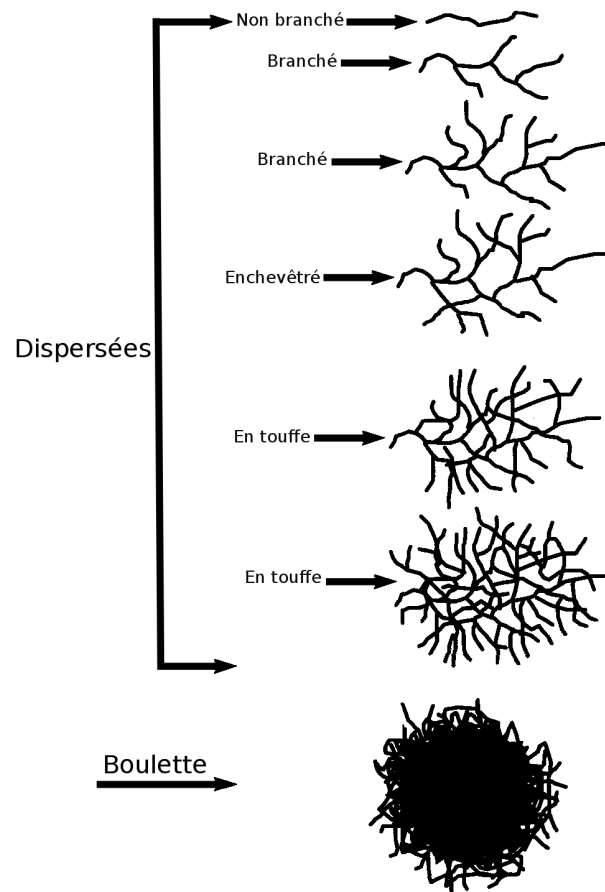


FIG. I.2.c. : Classification des différentes morphologies du mycélium modifié d'après (Paul et Thomas, 1998) avec la permission de Springer.

En milieu liquide et dans les conditions de cultures habituelles, le champignon *T. reesei* est majoritairement présent sous des formes dispersées. Les formes dispersées se subdivisent en quatre classes correspondant respectivement au mycélium non branché (*unbranched*), au mycélium branché (*branched*) formant des hyphes, au mycélium enchevêtré (*entanglements*) ou au mycélium en

TAB. I.2.iv. : Liste des critères morphologiques retenus par (Posch, Spadiut et Herwig, 2012) pour décrire la morphologie d'un champignon filamenteux

Classe (Français)	Class (English)	Critères morphologiques
non branché	<i>unbranched</i>	Surface, longueur et épaisseur moyenne
branché	<i>branched</i>	Surface, longueur, épaisseur moyenne, longueur euclidienne extrême, nombre de bouts et longueur unitaire de croissance (HGU)
enchevêtré	<i>entanglements</i>	Surface, longueur, épaisseur moyenne, longueur euclidienne extrême, nombre de bouts, longueur unitaire de croissance (HGU), circularité et densité surfacique
touffe	<i>clumps</i>	Surface, longueur euclidienne extrême, circularité et densité surfacique
boulette	<i>pellets</i>	Surface, longueur euclidienne extrême, circularité, densité surfacique, diamètre, et ce pour deux zones le cœur et la périphérie de la boulette

HGU se calcule en divisant la longueur totale par le nombre de bouts; longueur euclidienne extrême correspond à la distance rectiligne entre les deux points les plus éloignés de l'objet; la circularité correspond à l'écart entre le contour de l'objet et un cercle; la densité surfacique correspond au rapport entre la surface de l'objet et celle de la forme qui le contient.

touffe (*clumps*). Ces différentes formes sont représentées sur la figure I.2.c (Paul et Thomas, 1998). La morphologie du mycélium est fonction du temps de fermentation et des conditions de culture (Malouf *et al.*, 2013). Ce fait est observable au sein d'une population de champignons où la proportion relative des individus selon les différentes formes varie (Patel *et al.*, 2009; Paul et Thomas, 1998).

Cette diversité de morphologies peut être décrite à l'aide de descripteurs ou critères morphologiques. Ceux retenus varient selon les auteurs et les microorganismes considérés. Le tableau Tab. I.2.iv donne un exemple de leur diversité en synthétisant les critères sélectionnés par Posch, Spadiut et Herwig (2012) pour décrire la morphologie de *Penicillium chrysogenum*.

En lien avec sa morphologie, la présence du mycélium dans le milieu de culture modifie fortement la viscosité de ce dernier (Malouf *et al.*, 2013; Gabelle *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2009; Lejeune, Nielsen et Baron, 1995c; Marten *et al.*, 1995).

### I.2.2.2. Rhéologie des cultures de *T. reesei*

La rhéologie est l'étude du comportement lors de l'écoulement (ou de la déformation) des matériaux sous l'effet d'une contrainte (Mezger, 2014). La connaissance du comportement rhéologique d'un matériau est importante pour qui souhaite agir mécaniquement sur ce dernier. Appliquée à un moût de fermentation, la caractérisation de la rhéologie est nécessaire pour définir les conditions d'agitation et le mélange dans la cuve qui sont des prérequis pour dimensionner un fermenteur industriel (Harnby, Edwards et Nienow, 1997).

Une mesure de rhéologie consiste à quantifier la résistance à la déformation ou à l'écoulement d'un matériau soumis à un cisaillement. Le modèle deux plaques (figure I.2.d) est généralement utilisé pour définir les paramètres rhéologiques. Dans ce dernier, un échantillon de matériau est entouré par une surface fixe et une surface mobile avec une vitesse  $V_{max}$ . Le matériau peut être assimilé à une superposition de couches infiniment minces sans échange de matière si deux conditions sont rencontrées : le mouvement du matériau doit être laminaire (non turbulent) ; l'échantillon considéré doit montrer une adhérence aux deux plaques sans glissement de surface. Il est alors possible de définir trois paramètres clés en rhéologie : la contrainte de cisaillement ( $\tau$ ), le taux de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ) et la viscosité de cisaillement ( $\eta$ ) également appelée viscosité dynamique ou simplement viscosité (Mezger, 2014).

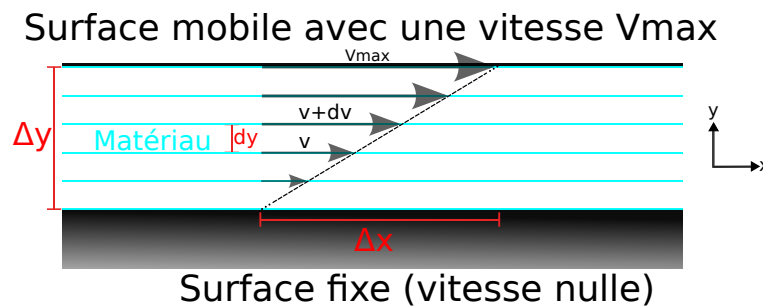


FIG. I.2.d. : Représentation graphique du modèle deux plaques illustrant les distributions de vitesses d'un fluide en écoulement entre le rotor et le stator (cisaillement laminaire).

Le déplacement d'une couche par rapport à l'autre est lié aux forces de frottements ( $F$ ) parallèles aux couches. L'intensité de ces forces rapportée à la surface de la couche considérée ( $A$ ) définit la contrainte de cisaillement, exprimée en Pa :

$$\tau = \frac{F}{A} \quad (I.2.1)$$

Le taux de cisaillement ( $s^{-1}$ ) est défini par le rapport entre  $V_{max}$  et la distance entre les plaques  $\Delta Y$ , qui peut également s'écrire :

$$\dot{\gamma} = \frac{dv}{dy} \quad (I.2.2)$$

Pour tout fluide en écoulement, les molécules qui le composent sont en mouvement les unes par rapport aux autres. Ceci s'accompagne de forces de friction interne qui s'opposent à l'écoulement. Cette résistance à l'écoulement correspond à la viscosité du fluide ( $\eta$ , en Pa.s) (Mezger, 2014). Elle peut être définie, pour un fluide idéalement visqueux et pour une température donnée, par le rapport de la contrainte de cisaillement sur le taux de cisaillement :

$$\eta = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (I.2.3)$$

Enfin, en divisant la viscosité de cisaillement par la masse volumique du fluide ( $\rho$  en  $kg.m^{-3}$ ), il est possible de calculer la viscosité cinématique ( $\nu$ , en  $m^2.s^{-1}$ ) :

$$v = \frac{\eta}{\rho} \quad (\text{I.2.4})$$

Les grandeurs définies avec le modèle à deux plaques sont transposées pour des géométries plus complexes (mais symétriques). Ce sont ces géométries, qualifiées de conventionnelles, qui sont utilisées sur les appareils de mesure tels que les rhéomètres rotatifs. Cependant, le fait que l'espace entre le rotor et le stator soit réduit permet de vérifier les hypothèses du modèle à deux plaques (Mezger, 2014).

Différentes géométries existent en rhéologie de cisaillement. Il existe des géométries dites conventionnelles et d'autres, non conventionnelles. Les géométries conventionnelles sont les suivantes :

- géométrie à cylindres coaxiaux (rotation d'un des deux cylindres, l'autre étant fixe) ;
- géométrie cône-plateau (rotation du cône, le plateau étant fixe) ;
- géométrie plateau-plateau ou plan/plan (rotation du plateau supérieur, le plateau inférieur étant fixe).

Les géométries non conventionnelles sont utilisées lorsqu'il y a présence de grosses particules, car pour avoir des mesures correctes l'entrefer doit être au moins dix fois supérieur aux structures les plus grandes. Il s'agit par exemple du ruban hélicoïdal, l'ancre ou la géométrie vanne. Ces géométries nécessitent une calibration au préalable.

La viscosité permet de rendre compte du comportement de différents types de fluide par rapport à l'écoulement. Un fluide est dit newtonien si  $\eta$  est constante, c'est-à-dire qu'elle ne dépend pas de  $\dot{\gamma}$ . La contrainte de cisaillement est alors proportionnelle au taux de cisaillement comme représenté sur la figure I.2.e. Pour les fluides non-newtoniens, il existe une relation entre la viscosité et le taux de cisaillement, de ce fait la relation entre la contrainte et le taux de cisaillement n'est pas linéaire. Le type de relation définit le comportement rhéologique du matériau comme résumé sur la figure I.2.e. Il est ainsi possible de différencier les fluides rhéoépaississants, rhéofluidifiants (ou pseudoplastiques) et les fluides à seuil.

Les moûts de fermentation de *T. reesei* correspondent à une suspension de particules solides (la biomasse) dans un liquide (le milieu de culture), et en début de fermentation, le mélange se comporte comme un fluide newtonien. Cependant, sous l'effet de l'aération et de l'agitation, les particules de biomasse sont en mouvement les unes par rapport aux autres ce qui entraîne l'apparition de forces de friction modifiant la viscosité du mélange lorsque la concentration en biomasse augmente. Le moût de fermentation d'une culture de *T. reesei* développe alors un comportement rhéofluidifiant (Wucherpfennig *et al.*, 2010), ce qui signifie que la viscosité du milieu diminue quand le taux de cisaillement augmente. Ce comportement rhéologique s'explique par le fait que les filaments de champignons enchevêtrés constituent un réseau capable de se rompre et de se reformer sous l'effet des conditions de cisaillement (Marten *et al.*, 1996 ; Metz, Kossen et van Suijdam, 1979).

La rhéologie des moûts de fermentation de *T. reesei* est également décrite comme présentant un seuil d'écoulement ( $\tau_s$ ) (Malouf *et al.*, 2013 ; Marten *et al.*, 1996). La présence de ce seuil signifie qu'il n'y a pas d'écoulement si la contrainte subie par le fluide n'atteint pas au moins la valeur de

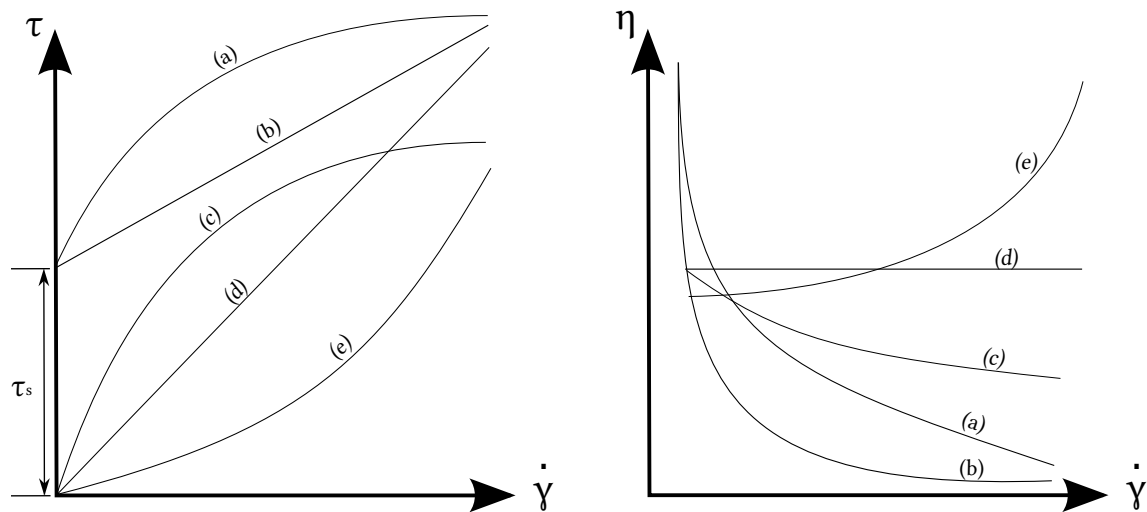


FIG. I.2.e. : Exemple de rhéogrammes pour différents types de comportement rhéologique (avec une échelle linéaire).

(a) fluide rhéofluidifiant à seuil (Herschel-Bulkley), (b) fluide à seuil, (c) fluide rhéofluidifiant, (d) fluides newtonien et (e) fluide rhéoépaississant.  $\tau_s$  correspond au seuil d'écoulement c'est-à-dire la contrainte de cisaillement minimale nécessaire pour déformer le matériau.

ce seuil. Dans une cuve de bioréacteur mécaniquement agité, il s'établit dans ce cas un gradient de cisaillement entre l'extrémité du mobile d'agitation et la paroi de la cuve. Si une partie importante de ce gradient correspond à une contrainte de cisaillement inférieure au seuil, alors une zone où le moût est stagnant peut se former (Stocks, 2013). La zone agitée entourée d'une zone stagnante est appelée « caverne ». Pour s'assurer que tout le moût dans un bioréacteur est bien mis en mouvement par l'agitation, il est possible de calculer le diamètre de la caverne ( $D_c$ ) et de le comparer à celui de la cuve ( $D$ ) (Elson, Cheesman et Nienow, 1986). Si  $D_c$  est supérieur à  $D$ , alors il n'y aura pas de formation de caverne et le moût sera correctement agité (Stocks, 2013). À l'échelle industrielle, la formation de caverne est défavorisée par l'aération (Gabelle *et al.*, 2012). Il reste important de vérifier que le phénomène n'apparaît pas lors d'expériences à petite échelle. Plusieurs formules de calcul de  $D_c$  ont été proposées en fonction de la forme de la caverne. L'équation déterminée par Elson, Cheesman et Nienow (1986) considère la caverne comme un cylindre centré sur le mobile d'agitation (eq. I.2.5).

$$\left(\frac{D_c}{D}\right)^3 = \left(\frac{k_c \times N_p}{\pi^2}\right) \left(\frac{\rho \times N^2 \times D^2}{\tau_s}\right) \quad (\text{I.2.5})$$

avec  $N$  la vitesse d'agitation en  $s^{-1}$ ,  $N_p$  le nombre de puissance du mobile (sans unité) et  $k_c$  une constante qui est fonction de la forme de la caverne, qui dépend du type de mobile. Pour un mobile de type Rushton,  $k_c$  vaut 1,36 (Stocks, 2013 ; Elson, Cheesman et Nienow, 1986). La valeur de cette constante n'ayant que peu d'influence sur le calcul de  $D_c$ , elle est approchée par celle du mobile Rushton décrit par Elson, Cheesman et Nienow (1986).

Lors des cultures de *T. reesei*, la concentration en biomasse augmente avec le temps, ce qui entraîne une augmentation de la viscosité qui devient maximale à la fin de la phase de croissance (Patel *et al.*, 2009). Ce changement de rhéologie, en modifiant les conditions hydrodynamiques régnant au sein du bioréacteur, a une influence forte sur la conduite du procédé, car il génère une diminution des transferts de matière, de chaleur et de mouvement (Metz, Kossen et van Suijdam, 1979). Or, c'est



précisément à ce moment de la culture que les besoins en oxygène du microorganisme sont les plus grands (Marten *et al.*, 1996 ; Patel *et al.*, 2009). Pour résoudre ce problème, différentes solutions sont disponibles. Un accroissement du débit d'air peut être instauré, dans les limites techniques imposées par les compresseurs et le réacteur. Des problèmes dus à la rétention de l'air dans le liquide entraîne un accroissement du volume de milieu dans le fermenteur (phénomène de *hold-up*) ce qui réduit le volume utilisable pour un fermenteur donné (Hofmeester, 1988). De plus, si la vitesse d'agitation est insuffisante par rapport au débit de gaz, des phénomènes d'engorgement des mobiles d'agitation c'est-à-dire de formation de poches de gaz au niveau des pales peuvent avoir lieu (Middleton, John et Smith, John, 2004 ; Paglianti, Pintus et Giona, 2000). Ces derniers ont pour conséquence une mauvaise dispersion du gaz et donc une diminution du transfert d'oxygène. Il est également possible d'améliorer la solubilité de l'oxygène dans le milieu, soit en augmentant la pression à l'intérieur du réacteur, mais cela augmente également la concentration en dioxyde de carbone dissous qui peut être toxique pour le microorganisme, soit en alimentant le réacteur avec un air enrichi en oxygène, ce qui est très coûteux, notamment à grande échelle (Kar *et al.*, 2011). Il est enfin possible d'améliorer le transfert d'oxygène en augmentant l'agitation, ce qui est l'action la plus couramment mise en œuvre.

Cet accroissement de la vitesse d'agitation permet également, pour une géométrie de bioréacteur donnée, de prévenir la formation de caverne et de maintenir un bon niveau de transfert. Cependant, cette action génère aussi une augmentation des taux de cisaillement présents dans la cuve, qui peut avoir un effet délétère pour le microorganisme.

### I.2.2.3. Effet du cisaillement sur les cultures de *T. reesei*

Plus les cellules d'un microorganisme sont de grandes tailles, plus celui-ci est sensible au cisaillement (Serrano-Carreón *et al.*, 2015). Toutefois, d'autres facteurs rentrent en compte, tels que la structure du microorganisme (présence ou absence de paroi cellulaire) (Serrano-Carreón *et al.*, 2015) ou son état physiologique (Patel *et al.*, 2009 ; Lejeune et Baron, 1995a).

Pour qu'un microorganisme soit impacté par les conditions hydrodynamiques présentes dans un bioréacteur, il faut que sa taille soit comparable à celle des plus petits tourbillons formés dans le bioréacteur, c'est-à-dire la plus petite échelle où est dissipée l'énergie (Kar *et al.*, 2011 ; Amanullah, Buckland et Nienow, 2004). Cette taille est déterminée en utilisant la microéchelle de Kolmogorov  $\lambda$ , qui est souvent exprimée en  $\mu\text{m}$  (eq I.2.6).  $\varepsilon$  correspond à l'énergie dissipée localement par la masse du fluide ( $\text{W}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) (Serrano-Carreón *et al.*, 2015).

$$\lambda = \left( \frac{\eta}{\varepsilon} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (\text{I.2.6})$$

Un calcul approximatif, considérant la viscosité de l'eau pour  $\eta$  et une valeur  $\varepsilon$  comprise entre 0,1 et  $100 \text{ W}\cdot\text{kg}^{-1}$ , donne un ordre de grandeur des microéchelles de Kolmogorov. Elles sont généralement comprises entre 10 et  $50 \mu\text{m}$ . Du fait de la taille de ses filaments ( $> 100 \mu\text{m}$ ), *T. reesei* est donc proche de ces microéchelles. Il est donc susceptible d'être impacté par l'hydrodynamisme rencontré des bioréacteurs.

Pour calculer plus précisément la microéchelle de Kolmogorov d'un moût, il faut connaître la viscosité apparente du milieu. Pour cela il faut déterminer le cisaillement moyen en  $s^{-1}$  ( $\bar{\gamma}$ ) dans la cuve. Plusieurs relations existent dans la littérature pour cela. La plus connue est celle de Metzner et Otto (1956) qui postule que le cisaillement moyen est proportionnel à la vitesse de rotation de mobile. Or cette méthode est controversée car elle est basée sur des mesures en écoulement laminaire or l'écoulement dans les bioréacteurs est turbulent ou intermédiaire. D'autres équations ont été développées dans la littérature pour les écoulements turbulents comme celle proposée par Sánchez Pérez *et al.* (2006) (eq I.2.7) :

$$\bar{\gamma} = \left( \frac{4 \times N_p \times \rho \times D^2}{\pi \times 3^3 \times K} \right)^{\frac{1}{1+n}} \times N^{\frac{3}{(1+n)}} \quad (I.2.7)$$

avec les paramètres de la loi d'Ostwald, K coefficient de consistance en  $Pa \cdot s^n$  et n l'indice de comportement sans dimension (eq II.1.1) et les paramètres définis dans l'équation I.3.2.

Quelques auteurs ont étudié l'impact de l'agitation sur les cultures de *T. reesei*. et montrent que le stress induit par le cisaillement affecte la rhéologie de ces cultures (Malouf *et al.*, 2013 ; Patel *et al.*, 2009 ; Marten *et al.*, 1996 ; Lejeune et Baron, 1995a). Cependant, il n'y a pas de corrélation établie entre le cisaillement et la productivité en enzymes ou la morphologie du champignon lors de sa croissance (Quintanilla *et al.*, 2015). Par contre, Patel *et al.* (2009) montrent que lorsque *T. reesei* est cultivé en limitation de source de carbone, l'intensité de l'agitation influence la morphologie, avec notamment une fragmentation du mycélium. Il apparaît donc important d'étudier les relations entre le cisaillement et les performances du procédé.

### I.2.3. Description du procédé de production de cellulases d'IFPEN

L'entreprise IFPEN a commencé à développer, dans les années 80, un procédé efficace de production de cellulases qui est conduit en deux phases (figure I.2.f). Une première phase de croissance en mode *batch* où le champignon est cultivé en présence d'un excès de sucre. Cette phase de croissance peut être réalisée en plusieurs étapes dans des fermenteurs de capacités croissantes jusqu'à pouvoir inoculer le fermenteur de production (montée en échelle). La deuxième phase qui correspond à la production de cellulases est conduite en mode *fed-batch*. Celle-ci consiste à cultiver le champignon dans des conditions de limitation en sucre (c'est-à-dire avec un flux d'alimentation en solution sucrée faible, mais constant) afin d'induire la production et la sécrétion des cellulases (Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1988 ; Ben Chaabane *et al.*, 2013). À la fin de l'étape de production, la biomasse et les cellulases sont séparées par filtration frontale. La figure I.2.f illustre de façon schématique la succession de ces deux phases.

Depuis 2015, ce procédé est en cours d'industrialisation avec des tests de production dans des fermenteurs de capacités totales comprises entre 100 et 220  $m^3$ . Dans ce contexte, IFPEN cherche à optimiser ce procédé avec pour objectifs, d'accroître le titre en produit et d'augmenter la productivité volumétrique (unité de produit formé par unité de volume de réacteur sur le temps de production) (Formenti *et al.*, 2014). Cette optimisation est le plus souvent réalisée à l'échelle du laboratoire ou

sur des unités pilotes. La transposition de ces résultats vers l'échelle industrielle est une procédure complexe appelée extrapolation. L'enjeu majeur de cette dernière est de bien dimensionner les bioreacteurs industriels (taille et technologie) afin de réussir à reproduire les productivités obtenues à petite échelle et de minimiser les coûts de production.

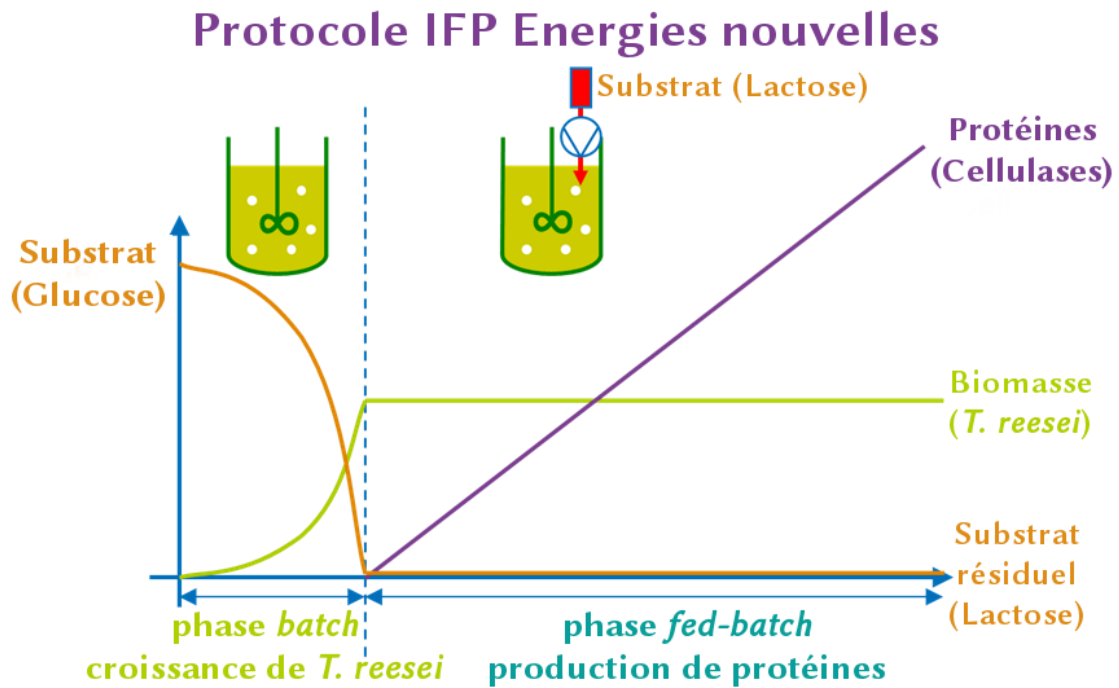


FIG. I.2.f. : Représentation schématique du procédé de production de cellulases extrait de (Jourdiar, 2012).

## I.3. Le changement d'échelle des bioprocédés

Le changement d'échelle d'un bioprocédé consiste à transférer les conditions mises en œuvre à petite échelle (laboratoire ou pilote), vers une échelle plus grande (industrielle), tout en maintenant les performances du procédé (Formenti *et al.*, 2014 ; Gabelle *et al.*, 2012 ; Takors, 2012 ; Kar *et al.*, 2011). Cette opération est le plus souvent réalisée par extrapolation (ou « *scale-up* »), mais les approches « *scale-down* », présentent également un intérêt.

### I.3.1. Problématiques liées l'extrapolation d'un bioprocédé

En fermentation, l'extrapolation génère un accroissement de volume d'un ordre de grandeur du décimètre cube aux centaines de mètres cubes. Cette opération ne se limite pas à une simple « homothétie » géométrique puisqu'il faut assurer à grande échelle toutes les fonctions efficaces à petite échelle pour que les microorganismes expriment au mieux leurs fonctionnalités. Ainsi, des problèmes liés au mélange, tels que l'apparition de gradients de substrats ou de neutralisants, une aération insuffisante ou l'amplification de cisaillements délétères pour les microorganismes sont souvent des points critiques lors de l'extrapolation (Gabelle *et al.*, 2012 ; Kar *et al.*, 2011 ; Neubauer et Junne, 2010). Ces points critiques sont liés à des impacts biologiques, chimiques et physiques (Takors, 2012).

Sur le plan des facteurs d'ordre biologique, en considérant un ensemencement identique entre deux fermenteurs, il est nécessaire de réaliser un nombre de divisions cellulaires d'autant plus grand que le volume final est important, pour atteindre une même concentration en biomasse. Il est donc primordial d'évaluer la capacité des souches utilisées dans l'industrie à subir un grand nombre de divisions cellulaires sans voir leur productivité décroître (Takors, 2012). De plus, si ces souches ont été modifiées par des méthodes de biologie moléculaire leur stabilité génétique est primordiale pour assurer la production souhaitée (Reisman, 1993).

En industrie, les produits utilisés pour les cultures (eau, substrats, minéraux, neutralisants, anti-mousses...) sont souvent moins purs que ceux disponibles au laboratoire. Considérant cette différence de qualité, il est préconisé de travailler au laboratoire avec des produits de qualité industrielle. De plus, à grande échelle les gaz sont plus solubilisés (pression hydrostatique), ce qui entraîne une augmentation de la concentration en dioxyde de carbone, ce qui peut être délétère pour les microorganismes. La production de mousse peut également être un problème à grande échelle. Elle est contrôlée via l'utilisation d'anti-mousse dont l'ajout est contrôlé par des sondes de détection de niveau. Ces produits peuvent être coûteux et la toxicité de certains d'entre eux induire des contraintes d'utilisation encadrées par la loi. Des systèmes de gestion mécanique de la mousse existent aussi, mais ils nécessitent là encore une dépense énergétique. L'impact de ces moyens de lutte anti-mousse nécessite lui aussi d'être évalué au laboratoire (Takors, 2012 ; Kar *et al.*, 2011).

Enfin, la montée en échelle influence différents paramètres physiques. La hauteur des cuves industrielles entraîne la présence d'une pression hydrostatique supérieure à la base des bioréacteurs (loi de Henry-Dalton). Les transferts de chaleur après stérilisation sont plus longs, le milieu subit

donc une plus longue période à haute température après stérilisation. Ce phénomène doit être pris en compte lors de la formulation du milieu de culture, car il génère une perte plus importante des composés thermolabiles (Takors, 2012). Le temps de mélange à l'échelle industrielle est également plus important qu'à l'échelle du laboratoire, puisqu'il passe d'un ordre de grandeur de la seconde à la minute (Formenti *et al.*, 2014). Cette augmentation peut induire, pour les procédés aérobies (si le temps caractéristique de consommation d'oxygène est de l'ordre de grandeur du temps de mélange), la présence de zones dans le réacteur sans ou avec peu d'oxygène dissous disponible pour les microorganismes. Des phénomènes identiques peuvent se poser pour la régulation du pH, l'alimentation en substrats, etc. Par conséquent, le microenvironnement varie dans le temps pour le microorganisme cultivé (Takors, 2012 ; Kar *et al.*, 2011 ; Neubauer et Junne, 2010).

Pour limiter l'impact de ces différents phénomènes, différents critères sont pris en compte lors de l'extrapolation d'un procédé.

### I.3.2. Les critères considérés pour l'extrapolation

La littérature propose un nombre important de critères d'extrapolation qui servent de guide pour réussir un changement d'échelle en fermentation. Le choix de ces critères est motivé par la volonté de garder des paramètres similaires entre les échelles pour minimiser l'influence du changement.

La géométrie des bioréacteurs, c'est-à-dire les proportions du système d'agitation et de la cuve du fermenteur (H/T, D/T, C/T... avec T le diamètre de la cuve du bioréacteur en m, H la hauteur de liquide en m, D le diamètre du mobile en m et C la hauteur du mobile par rapport au fond de la cuve en m), est souvent conservée entre les échelles.

D'autres paramètres peuvent être soit maintenus soit déterminés afin d'anticiper le comportement lors de l'extrapolation. Certains de ces paramètres ont été décrits dans la littérature depuis de nombreuses années (critères qualifiés ici de classiques), d'autres, plus récents, prennent mieux en compte les comportements spécifiques des microorganismes.

#### I.3.2.1. Critères classiques d'extrapolation

En considérant d'abord les notions de mélange et d'hydrodynamisme dans les réacteurs, il est possible de déterminer le régime d'écoulement régnant au sein d'un bioréacteur mécaniquement agité, en effectuant le calcul du Nombre de Reynolds (Re) adapté, sans dimension, présenté dans l'équation eq I.3.1 (Stocks, 2013 ; Kar *et al.*, 2011). Ce dernier correspond au rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité.

$$\text{Re} = \frac{\rho \times N \times D^2}{\eta} \quad (\text{I.3.1})$$

Dans cette équation,  $\rho$  représente la masse volumique en  $\text{kg.m}^{-3}$ ,  $\eta$ , la viscosité en Pa.s, N la vitesse d'agitation exprimée en rotation par seconde et D le diamètre du mobile d'agitation en mètre. Il est communément admis que pour  $\text{Re} > 10^4$ , le régime d'écoulement est turbulent, alors que pour  $\text{Re} < 10$ , le régime d'écoulement est laminaire et que pour les autres valeurs de Re le régime d'écoulement

est qualifié d'intermédiaire (Stanbury, Whitaker et Hall, 1995).

La puissance dissipée  $P$  (en W) peut être calculée avec l'équation eq I.3.2 où  $N_p$  est le nombre de puissance, un paramètre sans dimension dont la valeur est constante, pour un régime d'écoulement turbulent et pour un mobile d'agitation donné (Stocks, 2013 ; Kar *et al.*, 2011). Si un autre régime d'écoulement est établi, la valeur de  $N_p$  est fonction de  $Re$  et du mobile considéré (figure I.3.a).

$$P = N_p \times \rho \times N^3 \times D^5 \quad (I.3.2)$$

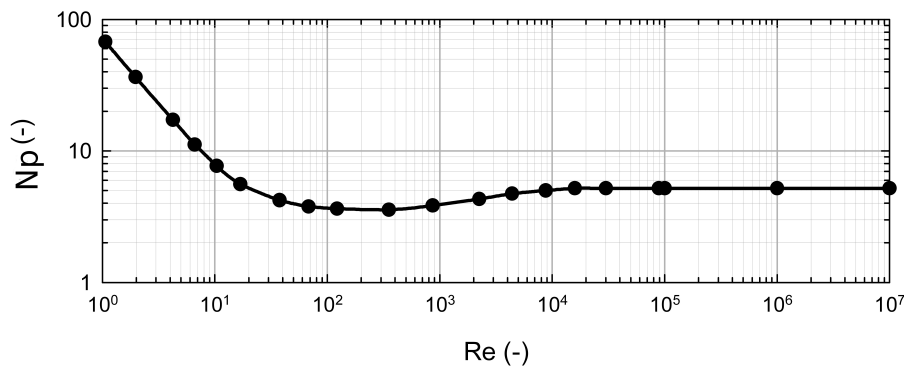


FIG. I.3.a. : Nombre de puissance ( $N_p$ ) en fonction du Nombre de Reynolds ( $Re$ ) pour un mobile Rushton traditionnel extrait de (Stocks, 2013) Copyright (2013), avec la permission d'Elsevier.

Le nombre de puissance  $N_p$  en régime turbulent est une donnée fournie par les fabricants de mobiles, en l'absence d'aération. Or la présence de gaz dans les milieux de fermentation tend à diminuer la valeur du nombre de puissance ( $N_{pg}$ , en milieu aéré), à cause de la diminution de la densité apparente du fluide. Cette nouvelle valeur  $N_{pg}$  est alors utilisée pour calculer la puissance dissipée. Le rapport  $N_{pg}/N_p$  qui correspond au rapport entre la puissance dissipée avec gaz et sans gaz, appelé RPD pour (*Relative Power Demand*), est fonction du type de mobile utilisé et du niveau d'aération (Stocks, 2013). De nombreuses corrélations sont proposées dans la littérature pour estimer  $N_{pg}$  et une sélection de ces dernières peut être trouvée dans Amanullah, Buckland et Nienow (2004). À titre d'exemple, la RPD pour un mobile de type Rushton peut avoir une valeur inférieure à 0,5 (Stocks, 2013) alors que pour d'autres mobiles, ce rapport peut prendre une valeur comprise entre 0,8 et 0,9 (Stocks, 2013 ; Albaek, M., Germaey, K. et Stocks, S., 2008). Du fait de l'hydrodynamique des systèmes gaz/liquide agités, il n'existe pas de méthode satisfaisante pour prédire avec précision  $N_{pg}$ . L'imprécision de ces méthodes est encore plus importante pour les systèmes avec une rhéologie complexe (Amanullah, Buckland et Nienow, 2004). Cependant, des études récentes montrent que dans la gamme de viscosité des moûts de fermentation de *T. reesei* étudiés, la RPD est similaire à celle de l'eau (Gabelle *et al.*, 2012). En pratique,  $N_{pg}$  est souvent approché par  $N_p$  pour le calcul de la puissance dissipée  $P$ .

Il est intéressant de noter que pour un même moût ( $\rho$  et  $\eta$ ), une même géométrie ( $D/T$ ) et une même puissance dissipée ( $P$ ), la comparaison de la valeur du  $Re$  entre l'échelle industrielle et l'échelle laboratoire permet de mettre en évidence qu'il est possible de rencontrer un régime d'écoulement turbulent à grande échelle alors qu'au laboratoire, le régime d'écoulement peut être transitoire ou laminaire (Formenti *et al.*, 2014) et notamment pour les milieux visqueux. Cette observation est liée

au simple accroissement du diamètre du mobile d'agitation ( $D$ ). Pour l'extrapolation, ce n'est pas la puissance dissipée ( $P$ ) qui est utilisée, mais la puissance dissipée par unité de volume de moût ( $V$ ).  $P/V$  est exprimée en  $W.m^{-3}$ .

L'intensité de l'agitation peut également être représentée par la vitesse en bout de pale ( $V_{tip}$ , en  $m.s^{-1}$ ) :

$$V_{tip} = \pi \times N \times D \quad (I.3.3)$$

Cette vitesse en bout de pale est fortement liée au cisaillement ressenti par les cellules de microorganismes, lorsqu'elles sont à proximité des mobiles (là où le cisaillement est maximal).

Ces notions ( $Re$ ,  $P/V$ ,  $V_{tip}$ ), en rapport avec l'énergie et l'action mécanique du mélange, sont importantes si la sensibilité au stress mécanique (cisaillement subi par le microorganisme lors du passage au niveau de l'agitateur) est considérée avec la notion de microéchelle de Kolmogorov. Cependant, un transfert de matière important est nécessaire au sein du réacteur pour éviter, par exemple, la formation de gradients. Un gradient de pH ou un gradient de substrat peut par exemple apparaître lors de l'alimentation des bioréacteurs industriels (mélange faible et alimentation avec une solution concentrée) (Neubauer et Junne, 2010). La réduction de ces phénomènes d'hétérogénéité peut être un enjeu important du *scale-up* si cela affecte le microorganisme et les performances du procédé. Dans un procédé aérobique, l'agitation a également pour objectif de permettre une bonne dispersion des gaz injectés dans la culture. Cette dispersion a pour but de favoriser les transferts de gaz entre la phase gazeuse et la phase liquide, et les microorganismes, afin de maintenir la concentration en oxygène dissous dans le milieu de culture. Le pourcentage d'oxygène dissous (D.O.) se définit comme le rapport de la concentration en oxygène dissous à un instant donné ( $C_L$  en  $kg.m^{-3}$ ) sur la concentration saturante en oxygène ( $C_L^*$  en  $kg.m^{-3}$ ) (eq I.3.4) :

$$D.O. = \frac{C_L}{C_L^*} \quad (I.3.4)$$

L'oxygène est très peu soluble en milieu aqueux. En effet, il présente une concentration à saturation ( $C_L^*$ ) de l'ordre de  $7,6 mg.L^{-1}$  à la pression normale et pour une température de  $30^\circ C$ .  $C_L^*$  est également dépendant de la salinité de la solution. La vitesse de transfert de l'oxygène (OTR, en  $kg.m^{-3}.s^{-1}$ ) de la phase gazeuse vers la phase liquide est donc à prendre en compte. Cette grandeur peut être calculée avec l'équation eq I.3.5 en l'absence de microorganismes. Dans cette équation,  $k_L a$  est le coefficient volumique de transfert d'oxygène en  $s^{-1}$ .

Dans les bioréacteurs, les microorganismes aérobies consomment de l'oxygène avec une vitesse de consommation ( $r_{O_2}$ , en  $kg.m^{-3}.s^{-1}$ ) appelée OUR pour *Oxygen Uptake Rate*. L'OUR est égal à OTR lorsque la concentration en oxygène dissous est constante.

$$OTR = k_L a \times (C_L^* - C_L) \quad (I.3.5)$$

En fermentation, l'OUR augmente en fonction de l'accroissement de la concentration en microorganismes et de leur vitesse spécifique de respiration. En conséquence, pour maintenir la D.O. constante, il est nécessaire d'accroître le coefficient volumique de transfert d'oxygène ( $k_L a$  en  $s^{-1}$ )

pour ajuster l'OTR à l'OUR. Pour modifier le  $k_L a$  en cours de culture, il faut augmenter la vitesse d'agitation et le débit d'aération tout en évitant les phénomènes d'engorgement des mobiles d'agitation par des cavités gazeuses (coalescence). Plusieurs auteurs ont proposé des corrélations pour relier le  $k_L a$  à ces variables, selon des équations dimensionnelles spécifiques des conditions d'étude. À titre d'exemple, l'équation (eq I.3.6) proposée par van't Riet en 1979 pour une solution saline (Amanullah *et al.*, 2002).

$$k_L a \propto \left( \frac{P_g}{V} \right)^{0,7} \times v_s^{0,2} \quad (\text{I.3.6})$$

Le débit d'aération est exprimé par le vvm qui représente le volume d'air injecté par volume de milieu et par minute, ou par  $Q_g$  le débit volumique de gaz en  $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ . Ce débit est relié à la vitesse d'ascension des bulles de gaz (ou la vitesse surfacique de gaz) qui est donnée par  $v_s$  et exprimée en  $\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ , comme le rapport du débit d'air sur la section du bioréacteur. Pour certains microorganismes (cellules animales) une  $v_s$  trop importante peut les endommager (Zhu *et al.*, 2008).

### I.3.2.2. Critères récents utilisés pour l'extrapolation

En complément des critères classiquement utilisés pour extrapoler les bioprocédés et présentés ci-dessus, certains auteurs ont développé des corrélations cherchant à intégrer la présence du microorganisme et la dynamique du mélange dans la cuve (Stocks, 2013 ; Nienow, 2009). Ces corrélations sont les suivantes :

La fonction énergie de dissipation et de circulation (EDCF, en  $\text{W} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$ ) (équation I.3.7), définie par Smith, Lilly et Fox (1990) en se basant sur les travaux de van Suijdam et Metz (1981) et Reuß (1988), permet de corréliser l'influence de l'agitation et la fréquence de passage du microorganisme au niveau du mobile d'agitation (Serrano-Carreón *et al.*, 2015).

$$\text{EDCF} = (\varepsilon_{\max} \times \rho) \times \left( \frac{1}{t_c} \right) \quad (\text{I.3.7})$$

Dans l'équation I.3.7,  $t_c$  correspond au temps de circulation en seconde,  $\rho$  est la masse volumique en  $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$ , et  $\varepsilon_{\max}$  correspond à l'énergie dissipée la plus importante au niveau du mobile d'agitation ( $\text{W} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). La variable  $t_c$  peut être exprimée par l'équation I.3.8.

$$t_c \simeq \frac{V}{Q_1} = \frac{V}{N_f \times N \times D^3} \quad (\text{I.3.8})$$

Dans la première version conduisant au calcul de l'EDCF, l'énergie dissipée était estimée par la puissance dissipée multipliée par  $D^3$  (Smith, Lilly et Fox, 1990). Cette première version ne prenait pas en compte le fait que l'énergie dissipée dépend du mobile d'agitation considéré. Une deuxième version (eq I.3.9), est alors proposée par Jüsten *et al.* (1996). Elle permet de comparer différents mobiles en intégrant la puissance dissipée ( $P$ ), le diamètre du mobile ( $D$ , en m) et un terme correcteur  $k$  qui peut être estimé par  $\frac{\pi}{4} \times \frac{W}{D}$  avec  $W$  la largeur des pales du mobile (en m) (Stocks, 2013). Dans cette deuxième version, le volume du mobile est intégré, mais pas la forme et le nombre de pales du mobile. Pour les intégrer, une troisième version également proposée par Jüsten *et al.* (1996) utilise



une correction du terme  $k$  en fonction de nombre de vortex théoriquement formés par les pales.

$$\text{EDCF} = \left( \frac{P}{k \times D^3} \right) \times \left( \frac{1}{t_c} \right) \quad (\text{I.3.9})$$

Par ailleurs, des corrélations permettent d'évaluer directement  $\epsilon_{\max}$  (Grenville *et al.*, 2008 ; Grenville et Brown, 2012) :

$$\epsilon_{\max} = 1,04 \times N_p^{\frac{3}{4}} \times N^3 \times D^2 \quad (\text{I.3.10})$$

Selon Nienow (2009), le temps de mélange  $\theta_m$  en s, (eq I.3.11) est caractérisé par une corrélation qui peut être comparée aux temps caractéristiques des réactions chimiques ou microbiologiques présentes dans le réacteur. L'extrapolation peut alors chercher à maintenir un  $\theta_m$  inférieur aux temps caractéristiques du réacteur.

$$\theta_m = 5,9 \times T^{\frac{2}{3}} \times \epsilon^{-\frac{1}{3}} \times \left( \frac{D}{T} \right)^{-\frac{1}{3}} \quad (\text{I.3.11})$$

### I.3.2.3. Mise en œuvre de l'extrapolation de bioprocédés

L'extrapolation d'un procédé microbien a pour objectif de maintenir à grande échelle des conditions suffisamment favorables au microorganisme pour obtenir le ou les produits d'intérêt avec la quantité attendue. Pour les procédés aérobies, l'un des facteurs principaux à maintenir est la D.O., car en deçà de la valeur critique les performances du microorganisme sont dégradées. Afin de maintenir cette D.O., l'extrapolation peut être abordée de différentes manières. La première consiste à faire varier des paramètres du procédé ( $N$ ,  $Q$ , type de mobile, etc.) pour maintenir constants certains critères considérés comme importants (Kar *et al.*, 2011). C'est l'approche qui est la plus répandue, et dont les principaux critères sont présentés de façon synthétique dans le tableau I.3.i, en lien avec leurs conséquences.

Sur cette base, quatre exemples d'extrapolation sont proposés dans le tableau I.3.ii. Ils montrent que le maintien du nombre de Reynolds génère une réduction de la vitesse d'agitation. La puissance dissipée est alors réduite, les transferts de matière et de gaz sont alors fortement affectés, rendant cette approche peu compatible avec les procédés aérobies. Le maintien du rapport  $P/V$  (souvent associé au maintien de la  $v_{vm}$ ) induit un accroissement important de la puissance dissipée, proportionnelle à l'augmentation du volume, et du cisaillement. Le maintien de la vitesse d'agitation  $N$  provoque une augmentation démesurée de la puissance dissipée, le plus souvent incompatible avec les moyens techniques disponibles, et de la vitesse en bout de pale, donc du cisaillement. Enfin, le maintien de  $V_{tip}$  engendre une diminution importante de la puissance dissipée par unité de volume, en lien avec la diminution de la vitesse d'agitation, pouvant entraîner une limitation de la D.O..

Certains auteurs proposent de ne pas se préoccuper du choix des paramètres opératoires à maintenir, mais de s'appuyer sur les paramètres physiologiques du microorganisme pour contrôler les conditions opératoires du procédé (Díaz *et al.*, 2010 ; Deckwer *et al.*, 2006), afin d'engendrer le moins de stress possible chez le microorganisme. Le stress d'un microorganisme peut être défini comme une adaptation du métabolisme et des cinétiques de croissance et de production à un changement

TAB. I.3.i. : Effet de l'extrapolation en fonction des critères maintenus constant (Amanullah, Buckland et Nienow, 2004)

Critère		Conséquence
Nombre de Reynolds	Re	P / V est réduit d'un facteur $10^4$ ⇒ Dégradation du transfert dans le fermenteur
Puissance dissipée	P / V	Augmentation de $V_{tip}$ , $k_L a$ (si la vvm est fixée), $t_c$ ⇒ Effet délétère du cisaillement possible
Vitesse en bout de pale	$V_{tip}$	P / V est réduit d'un facteur 10 et $k_L a$ diminué ⇒ Problèmes de transfert et d'hétérogénéité possibles
Coefficient volumique de transfert d'oxygène	$k_L a$	Difficile pour les champignons filamenteux car impacte de la rhéologie (variable) sur le $k_L a$
Fonction énergie de dissipation et de circulation	EDCF	Fonction du mobile (peu d'études disponibles) ⇒ Complexe
Temps de mélange	$\theta_m$	Consommation d'énergie irréaliste ⇒ Économiquement impossible (Stanbury, Whitaker et Hall, 1995)

avec des fermenteurs aux géométries semblables,  $Re > 10^4$  et une augmentation de la taille par un facteur 10.

TAB. I.3.ii. : Interdépendance des paramètres d'extrapolation d'après (Liu, 2013)

Critère d'extrapolation	Petite échelle (80 L)	Échelle industrielle (10000 L) paramètre maintenu constant :			
		P / V	N	$V_{tip}$	Re
P	1,0	125	3125	25	0,2
P / V	1,0	1,0	25,0	0,2	0,0016
N	1,0	0,34	1,0	0,2	0,04
$V_{tip}$	1,0	0,34	5,0	1,0	0,2
Re	1,0	8,5	25,0	5,0	1,0

Extrapolations de 75 L à 10000 L d'un fermenteur en maintenant constants les ratios suivants : le diamètre du mobile sur le diamètre du fermenteur et de la hauteur sur le diamètre du fermenteur.

environnemental (osmotique, thermique, nutritionnel, oxydatif, cisaillement, etc.). Ces changements sont caractérisés par leur intensité, leur fréquence et leur cinétique (Kar *et al.*, 2011). Pour *Trichoderma reesei*, cette approche est cependant difficile à appliquer, car les outils nécessaires à la caractérisation des effets des stress ne sont que peu développés chez les champignons filamenteux, principalement du fait de la taille importante et de la complexité des structures cellulaires.

### I.3.3. L'approche « Scale-down »

Comme il est impossible de reproduire parfaitement à grande échelle toutes les conditions rencontrées lors des études laboratoires ou pilotes, les conditions de culture sont généralement dégradées, ce qui diminue les performances attendues des bioprocédés. Afin de limiter ces dégradations, le « scale-down » est une approche alternative à considérer.

Le « scale-down » consiste à reproduire, à l'échelle du laboratoire, les conditions rencontrées à

l'échelle industrielle, mais qui ne sont pas habituellement retrouvées avec des bioréacteurs de petite taille (Formenti *et al.*, 2014 ; Takors, 2012). Les principales conditions sont la présence d'hétérogénéités (déjà discutée dans un paragraphe précédent) et le cisaillement, pour les simuler différents dispositifs ont été imaginés (Takors, 2012 ; Neubauer et Junne, 2010 ; Amanullah, Buckland et Niennow, 2004). Il peut s'agir de connecter deux réacteurs (réacteur bizones) ou plus où règnent des conditions de culture différentes avec un système de circulation du milieu de culture. D'autres auteurs proposent de coupler un réacteur avec une boucle de recirculation extérieure. Il peut également s'agir de compartimenter un réacteur avec des plaques percées pour limiter les échanges entre les différentes zones. La conduite du procédé peut aussi mimer le comportement d'un réacteur industriel ; par exemple il est possible de simuler une hétérogénéité de concentration en substrat lors de la phase du *fed-batch* en alimentant le bioréacteur de façon discontinue au lieu d'une alimentation continue. Des vitesses en bout de pale proches de celles rencontrées à l'échelle industrielle peuvent être appliquées pour mimer les cisaillements maximum rencontrés dans un bioréacteur industriel.

Le « *scale-down* », pour être efficace, doit être réalisé à partir de données les plus complètes et fiables possibles relatives aux conditions industrielles. Ces données peuvent provenir soit de simulations (*Computational fluid dynamics* ou CFD) soit de productions à l'échelle commerciale.

#### I.3.4. Les particularités des procédés mettant en œuvre des champignons filamenteux

Comme cela a déjà été remarqué par Neubauer et Junne (2010), la plupart des publications qui traitent des problématiques d'extrapolation se basent sur des données provenant de cultures de bactéries et en particulier de la bactérie *Escherichia coli*. Or les microorganismes filamenteux comme *T. reesei* génèrent des conditions particulières, notamment en termes d'accroissement de la viscosité, en lien avec la morphologie du champignon, modifiant ainsi les caractéristiques hydrodynamiques des milieux, et donc les transferts dans le bioréacteur (chaleur, matière, mouvement). Des interrelations complexes ont alors été établies entre la viscosité et le procédé mis en œuvre (Formenti *et al.*, 2014 ; Posch, Herwig et Spadiut, 2013 ; Patel *et al.*, 2009 ; Metz, Kossen et van Suijdam, 1979). Ces interrelations sont représentées sur la figure I.3.b.

Les conditions opératoires favorables (substrats, oxygène, environnement, agitation...) favorisent la multiplication cellulaire lors de la phase de croissance qui est une étape critique pour la productivité finale en cellulases, car elle détermine la quantité de microorganismes actifs disponible pour la phase de production (Gabelle *et al.*, 2012). Cette multiplication cellulaire s'accompagne, chez les champignons filamenteux, du développement d'hyphes, longs filaments capables de former des branches qui peuvent à leur tour, par association, former des structures tridimensionnelles complexes. Cette modification de la morphologie cellulaire, couplée à l'accroissement de la concentration microbienne, est à l'origine d'une augmentation la viscosité du milieu de culture. De plus, la quantité de biomasse étant plus importante, les besoins en oxygène augmentent également (Papagianni, 2004). Cependant, l'augmentation de la viscosité du moût de fermentation a tendance à s'opposer à la dispersion de l'air dans le réacteur et à générer une coalescence des bulles de gaz dans le milieu

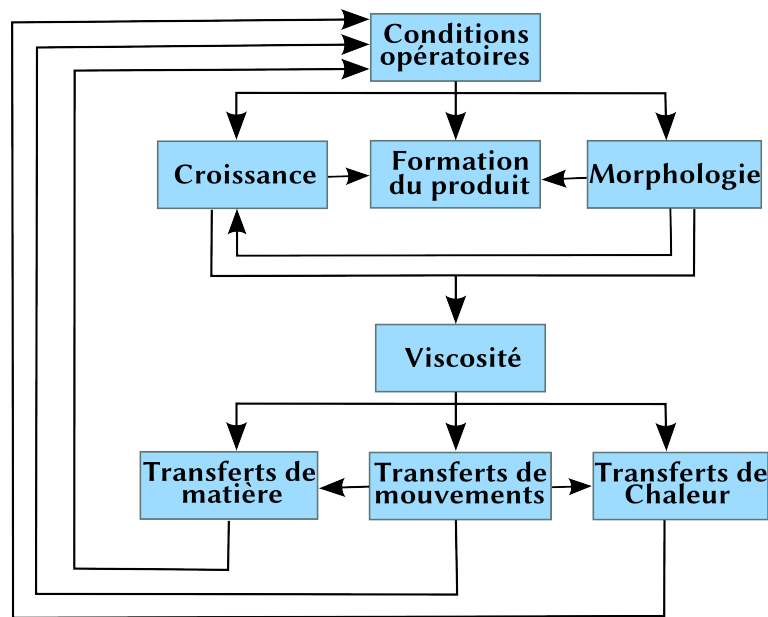


FIG. I.3.b. : Interrelations entre les différents processus d'un procédé mettant en œuvre un champignon filamenteux adaptée d'après (Metz, Kossen et van Suijdam, 1979).

de culture (figure I.3.c). Ces deux facteurs diminuent la surface d'échange entre la phase gazeuse et liquide et donc la vitesse de transfert de l'oxygène (OTR). De plus, le milieu étant plus visqueux, le mélange dans la cuve est moins efficace, pour une même énergie dépensée. Tous ces facteurs ont un effet négatif sur le transfert en oxygène (Schügerl, 1981), et en conséquence sur les réactions biologiques, ce qui impacte la croissance du microorganisme et peut modifier à nouveau la viscosité.

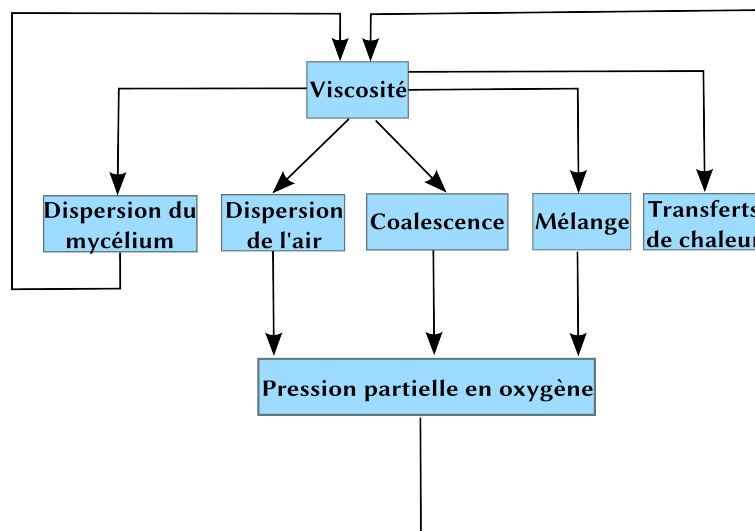


FIG. I.3.c. : Diagramme des relations entre une suspension visqueuse et des processus rencontrés dans un bioréacteur mécaniquement agité adapté d'après (Metz, Kossen et van Suijdam, 1979).

Augmenter l'agitation dans le bioréacteur permet de compenser la diminution du transfert en oxygène. Cependant, certains auteurs rapportent qu'une agitation trop importante peut causer des dommages cellulaires chez les organismes filamenteux (Neubauer et Junne, 2010) ou encore, que l'activité des cellulases diminue avec l'augmentation de la vitesse d'agitation (Patel *et al.*, 2009). Les

interrelations entre les différents paramètres de culture et les contradictions entre les besoins du microorganisme et les conditions de culture sont donc complexes. Cette complexité est à l'origine de stratégies d'extrapolation par étapes, basées sur des approches empiriques et laborieuses (Posch, Herwig et Spadiut, 2013). Pour ces raisons, il est nécessaire d'améliorer les connaissances sur les effets de l'action mécanique du système d'agitation et de la présence d'hétérogénéités au sein du bioréacteur, lors de cultures de microorganismes filamenteux tels que *T. reesei*.

## I.4. Synthèse des informations

La production d'éthanol-2G s'inscrit dans une logique de valorisation des matières premières lignocellulosiques et de diminution de la production de gaz à effet de serre liée aux transports. S'agissant d'un substitut aux hydrocarbures, ce biocarburant doit s'intégrer dans un marché à fort tonnage de produits à faible valeur ajoutée. Cette situation nécessite un coût de production le plus bas possible afin d'être compétitive. Un des leviers les plus prometteurs pour diminuer le coût de l'éthanol-2G est l'optimisation de l'étape de production des cellulases. Cette dernière est assurée par le microorganisme *Trichoderma reesei*, un champignon filamenteux à la morphologie cellulaire complexe et en trois dimensions, qui est à l'origine du comportement rhéologique singulier des cultures, caractérisé par un accroissement de la viscosité des milieux. Pour limiter l'impact de cette viscosité sur les transferts de matière, notamment d'oxygène, de chaleur et de mouvement, et donc sur les performances de production, une action sur l'agitation est généralement réalisée. Cependant, celle-ci affecte en retour la croissance du microorganisme à cause des cisaillements qu'elle induit, notamment à l'échelle industrielle.

Les problématiques de viscosité des milieux de culture, couplées à celles de la morphologie cellulaire des champignons et de leurs réponses au cisaillement sont donc au cœur des travaux visant à mieux comprendre et à améliorer les productions industrielles de cellulases.

Pour y répondre efficacement, le développement de deux outils spécifiques s'impose à ce jour. En premier lieu, il convient de disposer d'une méthode de mesure de la rhéologie, capable d'acquérir des données sur un fluide complexe, de viscosité variable, contenant des particules macroscopiques en suspension (les champignons dans leur milieu de culture). En second lieu, il est nécessaire d'élaborer une méthode permettant l'acquisition de données morphologiques sur des structures tridimensionnelles. Cette méthode doit présenter une résolution suffisante pour quantifier des détails de l'ordre de quelques micromètres (épaisseur des filaments) tout en considérant des objets de plusieurs centaines de micromètres (réseau de filaments).

Ces deux outils seront utilisés, lors de fermentations réalisées à petite échelle (fermenteurs de laboratoire), dans différentes conditions de cisaillement, choisies de façon à représenter celles rencontrées à échelle industrielle, selon une approche de « *scale-down* ». Les résultats obtenus permettront de caractériser l'influence de ces différents cisaillements sur la morphologie cellulaire de *Trichoderma reesei* et sur la viscosité des moûts de fermentation. Ils permettront également d'identifier les effets de ces facteurs sur les cinétiques de croissance et de production de cellulases, dans le but de mieux comprendre les liens existant entre toutes ces variables : viscosité des moûts, morphologie cellulaire, croissance du microorganisme, production d'enzymes cellulolytiques et de formuler des recommandations pour l'optimisation de la production industrielle de cellulases par le champignon filamenteux *T. reesei*.



## **Deuxième partie**

### **Développement d'outils spécifiques**





# II.1. Mesure des propriétés rhéologiques des moûts de fermentation de *Trichoderma reesei*

## II.1.1. Introduction

Lorsqu'ils se développent, les microorganismes filamenteux génèrent une augmentation de la viscosité du milieu de culture, due à l'existence d'une suspension de filaments de microorganismes. Or, la connaissance de la viscosité est essentielle pour extrapoler correctement un procédé. La viscosité est généralement obtenue à l'aide de rhéomètres rotatifs. L'utilisation de ces appareils consiste à placer le produit entre deux pièces (le rotor et le stator) et d'évaluer l'impact du produit sur la transmission du couple et de la vitesse de rotation. L'un de ces deux paramètres est fixé et le second est mesuré (Mezger, 2014). Le rapport entre les deux permet ensuite de calculer la viscosité du produit connaissant la géométrie de l'ensemble (Mezger, 2014). Cependant, l'utilisation de pièces de géométrie standard pour caractériser des moûts de fermentation intégrant des filaments de champignons induit un biais, lié à la formation de structures particulières en réorganisant les filaments, sous l'effet du cisaillement. La présence de ces structures biaise la mesure de la viscosité (Henaut *et al.*, 2013). Une mesure fiable nécessite donc de disposer d'outils capables d'éviter d'induire la formation de ces structures.

Dans ce but, une méthode de mesure des propriétés rhéologiques de suspensions de champignons filamenteux, constituées par des moûts de fermentation de *Trichoderma reesei*, a été mise au point. Elle consiste à utiliser un rhéomètre rotatif équipé d'un rotor spécifique permettant, par son mouvement, de mesurer la viscosité des moûts tout en maintenant en suspension les particules constituées par les filaments de champignon, et sans entraîner de modifications dans la structure des moûts.

Cette partie du travail a été publiée en 2015 dans la revue *Rhéologie* ; elle est présentée ci-dessous dans la forme de l'article. Celui-ci décrit la méthode mise au point, ses spécificités, ainsi que les résultats obtenus sur un milieu modèle (solution de xanthane) et sur des moûts de fermentation. La nouvelle géométrie est comparée à la géométrie conventionnelle de type plan/plan.

## II.1.2. Caractérisation du comportement rhéologique des moûts à l'aide de l'analogie de Couette.

Hardy et al., *Rhéologie*, Vol. 27, 43-48 (2015)

43

### Rhéologie des champignons filamenteux : un outil pour la compréhension d'un procédé de production de biocatalyseurs utilisés pour la production de bioéthanol

N. Hardy<sup>1,2,3</sup>, I. Henaut<sup>1</sup>, F. Augier<sup>2</sup>, C. Béal<sup>3</sup> et F. Ben Chaabane<sup>1</sup><sup>1</sup>IFP Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison, France<sup>2</sup>IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP3, 69360 Solaize, France<sup>3</sup>UMR 782 AgroParisTech INRA, 1 avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon, FranceReçu le 5 novembre 2014 - Version finale acceptée le 1<sup>er</sup> juin 2015

**Résumé :** La production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique nécessite la transformation préalable de cette biomasse en sucres fermentescibles. Cette transformation est réalisée par voie biologique grâce à des biocatalyseurs appelés cellulases. La production de ces dernières représente un verrou économique majeur au développement du procédé. Les cellulases sont généralement produites industriellement par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*, doué d'une forte capacité sécrétoire. Ces cultures sont réalisées en bioréacteurs aérés et agités mécaniquement qui impliquent la maîtrise des conditions physico-chimiques pour être optimisés. Or, la culture correspond à une suspension de champignon dont la viscosité augmente lors de la croissance, avec un comportement rhéofluidifiant. Les champignons se développent en filaments et forment des structures tridimensionnelles, allant du micromètre au millimètre, rendant la mesure avec un rhéomètre rotatif à mobile de type plan/plan ou Couette difficile. Pour contourner ces difficultés, une méthode de mesure de la viscosité avec un mobile hélicoïdal a été développée. Elle a été validée avec l'utilisation de solutions modèles (xanthane 0,25% et 0,5%) puis mise en œuvre avec des milieux de fermentation réels. L'utilisation d'un tel mobile hélicoïdal permet une mesure de la viscosité du milieu de culture pour une gamme de cisaillements correspondant à ceux rencontrés lors du procédé réel, tout en évitant la décantation des suspensions. Cependant, ce dispositif ne permet cette mesure que lorsque la viscosité apparente du milieu de culture est suffisante (environ 0,1 Pa.s), correspondant à une forte concentration en champignons rencontrée en fin de croissance. Une façon de pallier cette restriction serait de compléter cette mesure avec d'autres méthodes (outils microfluidiques), pour les faibles concentrations en biomasse, c'est-à-dire lorsque les structures formées par les champignons sont de plus petites tailles.

**Mots-clé :** Rhéologie, Champignons filamenteux, Procédé, Fermentation, Fluides non-newtoniens

### II.1.2.1. Introduction

Le 30 juillet 2014, la ministre de l'Écologie, du Développement Durable et de l'Énergie a présenté en Conseil des ministres un projet de loi relatif à la transition énergétique. Dans ce dernier, il est question de « biocarburants avancés » dont fait partie l'éthanol produit à partir de biomasse lignocellulosique (éthanol-2G). L'obtention de l'éthanol-2G nécessite la transformation préalable de la biomasse en sucres fermentescibles avec des biocatalyseurs appelés cellulases. Ces dernières représentent un verrou économique majeur pour le développement de la filière éthanol-2G (Barta *et al.*, 2010 ; Gabelle *et al.*, 2012 ; Kazi *et al.*, 2010 ; Klein-Marcuschamer *et al.*, 2012). Il apparaît donc comme essentiel de maîtriser la production de cellulases.

Les cellulases sont généralement produites industriellement par le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*, doué d'une forte capacité sécrétoire (Ahamed et Vermette, 2009 ; Ferreira *et al.*, 2009 ; Gusakov, 2011 ; Ma *et al.*, 2013 ; Patel *et al.*, 2009). La production industrielle de cellulases est réalisée en bioréacteurs aérés et mécaniquement agités ce qui implique la maîtrise des conditions physicochimiques pour être optimisée (Ma *et al.*, 2013). IFP Energies nouvelles a développé dans les années 80 un procédé efficace de production qui a été validé à l'échelle 30 m<sup>3</sup> (Ballerini *et al.*, 1994 ; Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1988). Ce procédé est conduit en deux phases. Une première phase de croissance en mode *batch* où le champignon est cultivé en présence d'un excès de sucre. Une deuxième phase de production de cellulases en mode *fed-batch*. Cette phase consiste à cultiver le

champignon dans des conditions de limitation en sucre afin d'induire la production et la sécrétion des cellulases (Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1988).

La phase de croissance est critique pour la productivité finale en cellulases, car elle détermine la quantité de microorganismes actifs disponible pour la phase de production (Gabelle *et al.*, 2012). Cette multiplication cellulaire se traduit par une augmentation des besoins en oxygène des microorganismes ainsi qu'une augmentation de la viscosité du milieu de culture (Gabelle *et al.*, 2012; Papagianni, 2004). Cependant, l'augmentation de la viscosité du moût a un effet négatif sur le transfert en oxygène (Gabelle *et al.*, 2012; Papagianni, 2004; Schügerl, 1981) alors que *Trichoderma reesei* est aérobie strict, c'est-à-dire qu'il ne peut pas se développer en absence d'oxygène. Cette contradiction entre l'évolution du comportement du milieu de culture et les besoins du microorganisme rend nécessaire, pour optimiser le procédé industriel, la mise au point d'une méthode robuste de mesure de la viscosité du moût.

La mesure de la viscosité peut être réalisée « hors-ligne » à l'aide d'un rhéomètre rotatif. Des études préliminaires à ces travaux ont montré que le moût de fermentation présente un comportement rhéofluidifiant et hétérogène. En effet, les champignons se développent en filaments et forment des structures tridimensionnelles allant du micromètre au millimètre. La présence des filaments de champignons rend la mesure avec un rhéomètre rotatif à mobile de type plan/plan ou Couette difficile (éjection de particules au cours de la mesure, formation de nouvelles structures organisées dans le sens de l'écoulement, sédimentation) (Henaut *et al.*, 2013).

Afin de pallier ce problème, l'utilisation d'un rhéomètre équipé d'un mobile non conventionnel est évaluée dans cette étude, selon une approche similaire à celle proposée par Aït-Kadi *et al.* (2002).

## II.1.2.2. Matériels et méthodes

### II.1.2.2.1. Mesures rhéologiques

Dans cette étude, un rhéomètre à contrainte imposée est utilisé. Il s'agit d'un AR2000 rheometer de la société TA Instruments (New Castle, États-Unis d'Amérique).

Deux mobiles différents sont utilisés comme rotor du rhéomètre AR2000. Un premier, servant de référence, est de type Plan/plan strié en acier inoxydable d'un diamètre de 40 mm (n°950136 cross-hatch, TA Instruments). Le second, non conventionnel, correspond à une hélice large ou Ruban en acier inoxydable d'un diamètre de 38 mm, d'une hauteur de 32 mm, d'un pas de 29 mm et avec un ruban de 8 mm de largeur (figure II.1.a). Cette hélice est utilisée avec un godet de 45 mm de diamètre intérieur et un espace entre mobile et support de 500  $\mu\text{m}$ .

Les mesures de viscosité sont réalisées par un balayage logarithmique de taux de cisaillements compris entre 10 et 100  $\text{s}^{-1}$ , sur une période de 4 minutes, à une température de 27 °C. Cette gamme correspond au taux de cisaillement moyen attendu à l'échelle industrielle. Le balayage est réalisé à deux reprises en aller et retour (10 à 100  $\text{s}^{-1}$  puis 100 à 10  $\text{s}^{-1}$ ).

L'hélice est assimilée à un cylindre de Couette d'un rayon 14 mm. Ce rayon est obtenu empiriquement en utilisant une huile de viscosité standard Poulten Selfe & Lee (Burnham, Royaume-Uni) N4000 à différentes températures. À titre d'exemple, les viscosités obtenues avec cette huile sont

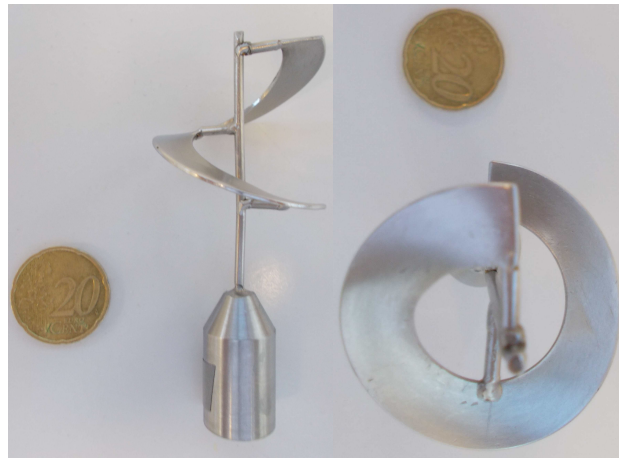


FIG. II.1.a. : Hélice large utilisée comme rotor sur le rhéomètre (vue de profile et de dessous).

reportées au tableau II.1.i :

TAB. II.1.i. : Valeurs de viscosité de l'huile N4000

Température	Viscosité théorique (Pa.s)	Viscosité obtenue (Pa.s)
25 °C	11	11,4 ± 1
80 °C	0,238	0,288 ± 0,007

Un milieu synthétique est utilisé pour mimer le comportement rhéologique du moût. Il s'agit de la gomme xanthane à une concentration de 0,25 et 0,5 % (m/v) qui correspond à un comportement rhéofluidifiant proche de celui du moût (Gabelle *et al.*, 2012).

#### II.1.2.2.2. Souche et conditions de culture

La souche utilisée est la souche industrielle *Trichoderma reesei* Tr3002 issue de la souche QM9414 (Durand, Clanet et Tiraby, 1988). Les cultures sont réalisées en bioréacteur de 3 L selon le protocole classique d'IFP Energies nouvelles décrit précédemment (Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1988 ; Jour-dier *et al.*, 2013). Des prélèvements de 70 mL sont réalisés avec un espacement compris entre 7 h ou 17 h afin de mesurer l'évolution de la viscosité au rhéomètre.

### II.1.2.3. Résultats et discussion

#### II.1.2.3.1. Validation de la méthode par mesure de la rhéologie du milieu modèle

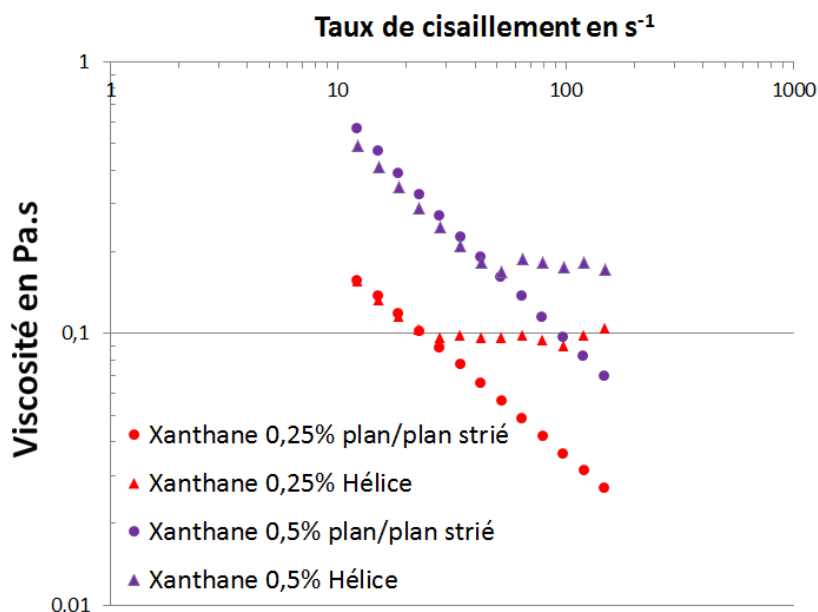


FIG. II.1.b. : Comparaison de la viscosité obtenue avec le mobile plan/plan strié (disques) et le mobile hélice large (triangles) à différents taux de cisaillement. Pour deux concentrations de milieu modèle (0,25 % en rouge ; 0,5 % en violet)

Afin de valider l'utilisation du mobile hélice sur le rhéomètre, une mesure comparative de la viscosité du milieu modèle gomme de xanthane (à 0,25 et 0,5 %) est réalisée avec ce mobile et le mobile de référence. Les résultats de cette comparaison sont représentés sur la figure II.1.b.

Cette comparaison montre que le mobile non conventionnel permet de mesurer la viscosité d'un milieu présentant un comportement similaire à celui du moût. Cependant cette équivalence entre les mobiles n'est valable que pour une plage restreinte en taux de cisaillement. En effet, pour la solution de gomme de xanthane à 0,25 % les courbes divergent à partir de  $20 \text{ s}^{-1}$  et pour la solution de gomme de xanthane à 0,5 %, elles divergent à partir de  $50 \text{ s}^{-1}$ . Ce phénomène semble correspondre à deux phénomènes. Un changement de régime d'écoulement (de laminaire à intermédiaire / turbulent) ou l'apparition d'écoulements secondaires associés au développement de contraintes normales au sein de la cuve du rhéomètre. Il convient donc de considérer uniquement la partie laminaire de ces courbes dans la suite de l'étude.

#### II.1.2.3.2. Rhéologie du moût

Des mesures de viscosité en fonction du taux de cisaillement sont réalisées avec du moût de fermentation, selon deux séries de mesures consécutives avec l'hélice large et avec le mobile plan/plan strié (figure II.1.c).

Ces mesures illustrent deux choses. D'abord, le mobile de type hélice donne pour un milieu réel des résultats plus reproductibles que le mobile plan/plan strié. L'utilisation du mobile plan/plan ne donne pas des résultats similaires au sein d'une même série de mesures et au sein de deux séries de

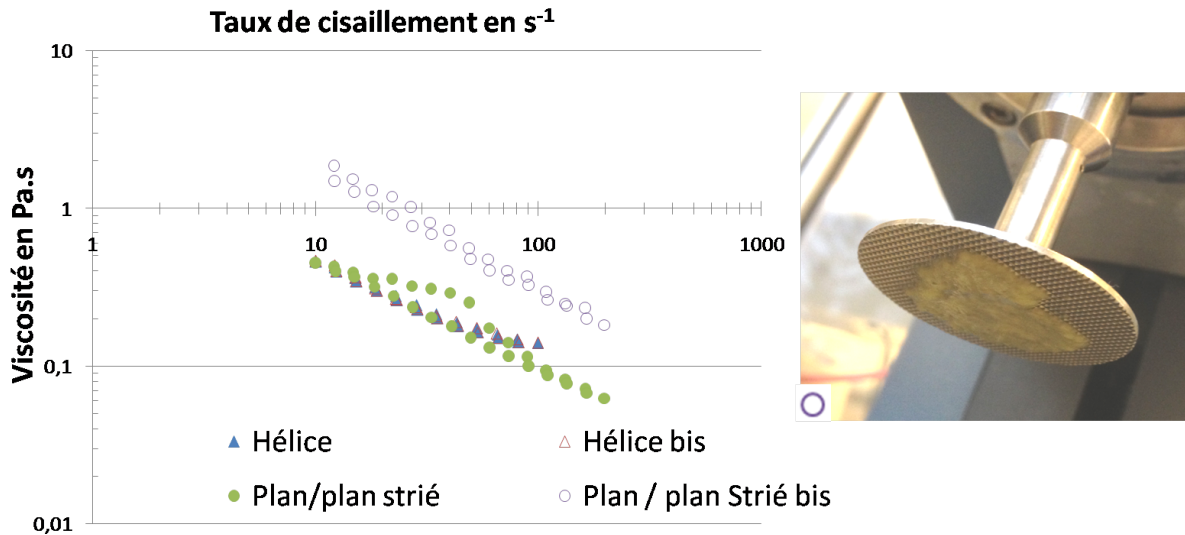


FIG. II.1.c. : Comparaison de la viscosité obtenue avec le mobile plan/plan (●/○) strié et le mobile hélice large (▲/▲).

Chaque série de mesures est réalisée avec un taux de cisaillement variable croissant puis décroissant. Une photographie du mobile conventionnel à la fin des deux séries est présentée à droite.

mesures consécutives. Cette variation est explicable par le fait que le mobile modifie l'organisation des structures de mycélium (filaments de champignon) présent dans le moût et fait apparaître une hétérogénéité caractérisée par des agglomérats solides de champignon collés sur le mobile (photographie, figure II.1.c).

Une culture de *T. reesei* est effectuée (figure II.1.d) et des mesures de viscosité sont réalisées en cours de culture avec le mobile non conventionnel (figure II.1.e).

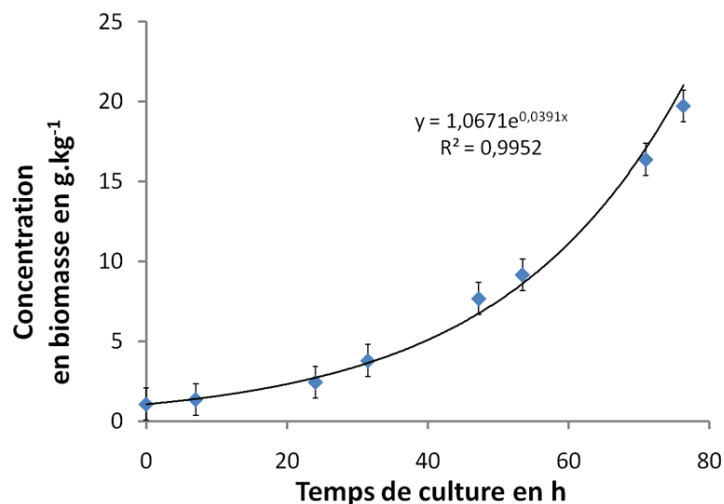


FIG. II.1.d. : Suivi de la concentration en biomasse dans le bioréacteur pendant la culture (croissance exponentielle).

Les mesures permettent de confirmer que la viscosité du milieu de culture augmente au fur et à mesure de la croissance avec un comportement rhéofluidifiant. La plage de taux de cisaillement où

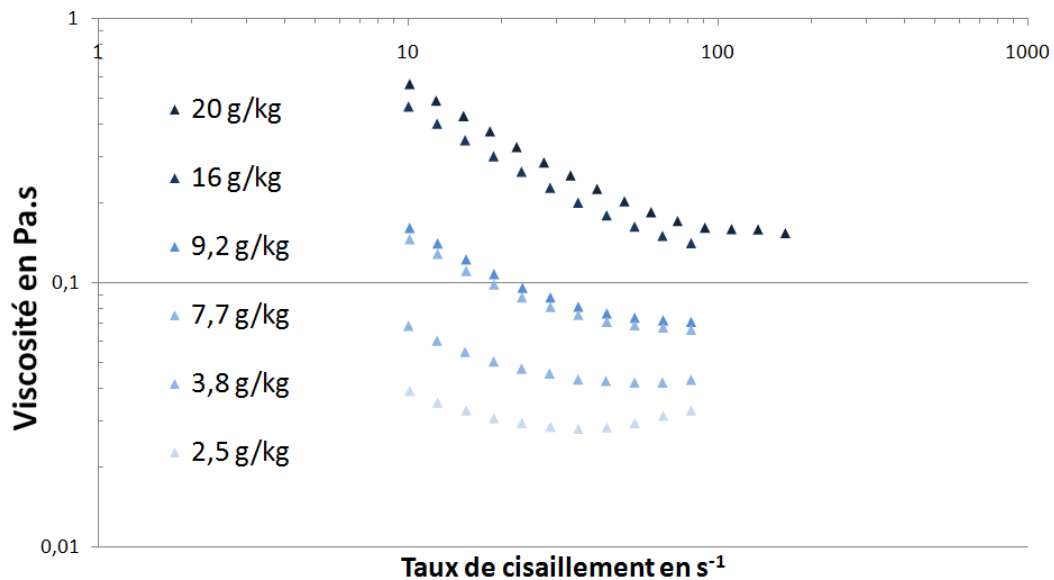


FIG. II.1.e. : Évolution du comportement rhéologique du moût pour différentes valeurs de concentration en biomasse.

la mesure est réalisable avec la géométrie hélice (absence de turbulence) est d'autant plus étendue que la concentration en biomasse est importante (figures II.1.d et II.1.e). À très faible concentration en biomasse ( $< 2,5 \text{ g.kg}^{-1}$ ), la mesure avec cette méthode n'est pas possible (données non montrées). L'ajustement de ces données au modèle d'Ostwald (ou loi puissance) (eq. II.1.1) permet de déterminer, pour les différentes concentrations en biomasse, des coefficients de consistance ( $K$ ) et des indices de comportement ( $n$ ) du milieu. Ces derniers sont résumés dans le tableau II.1.ii.

$$\eta = K \times \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{II.1.1})$$

Ensuite, l'utilisation de la corrélation de Metzner et Otto (eq. II.1.2) permet de déterminer que le taux de cisaillement moyen ( $\bar{\gamma}$ ) dans la cuve de fermentation avec le mobile de la marque VMI Rayneri (Montaigu, France) de type disques fermés à pâles courbes à double flux : centrifuge (haut) et centripète (bas) (facteur géométrique  $B$  d'une valeur de 11 dans cette étude) et à l'agitation fixée  $N$ , est de  $220 \text{ s}^{-1}$ . Cette valeur obtenue dans un bioréacteur de 3 L, à forte vitesse d'agitation, est supérieure à celles rencontrées dans un fermenteur industriel où les vitesses d'agitation sont plus faibles.

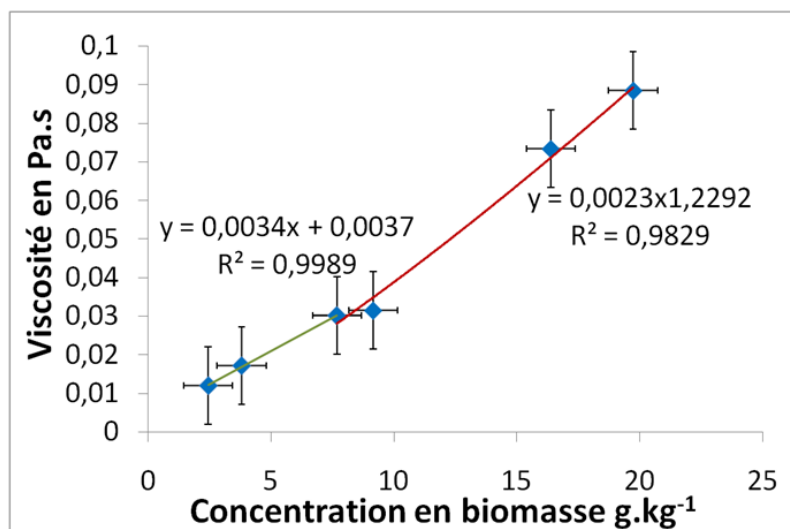
$$\bar{\gamma} = B \times N \quad (\text{II.1.2})$$

Ces données rendent possible la détermination, pour cette valeur de taux de cisaillement moyen, de la valeur de viscosité du milieu à l'aide du modèle (1) et des coefficients du tableau II.1.ii. Cette viscosité correspond à la valeur théoriquement rencontrée au sein de la cuve du bioréacteur dans les conditions de culture utilisées. Elle peut être corrélée à la concentration en biomasse (figure II.1.f).



TAB. II.1.ii. : Coefficients de consistance et indices de comportement obtenus pour les différentes concentrations en biomasse testées

Biomasse (g.kg <sup>-1</sup> )	K (Pa.s <sup>n</sup> )	n (sans unité)	Domaine de taux de cisaillement (s <sup>-1</sup> ) utilisé
2,5	0,09	0,61	10 - 19
3,8	0,19	0,56	10 - 23
7,7	0,44	0,50	10 - 43
9,2	0,51	0,48	10 - 43
16	1,8	0,42	10 - 82
20	2,1	0,42	10 - 91

FIG. II.1.f. : Évolution de la viscosité prédite à un taux de cisaillement moyen de 220 s<sup>-1</sup> dans le fermenteur en fonction de la concentration en biomasse.

La figure II.1.f montre que la viscosité du milieu de culture est corrélée à la concentration en biomasse pour la gamme explorée dans cette étude, selon deux phases distinctes (représentées par les courbes rouge et verte sur la figure II.1.f) : (1) une première phase où la relation entre biomasse et viscosité paraît linéaire, ce qui pourrait traduire que la viscosité du moût est due à des interactions entre les champignons et le milieu ; (2) une seconde phase caractérisée par une relation de type puissance qui pourrait s'expliquer par des interactions au sein de la biomasse. La zone de rupture entre les deux phases correspond à une concentration en biomasse de 7 g.kg<sup>-1</sup>, en cohérence avec la valeur précédemment rapportée par Gabelle *et al.* (2012). Le nombre de points expérimentaux étant toutefois insuffisant, des essais complémentaires sont nécessaires pour valider ces hypothèses.

#### II.1.2.4. Conclusion et perspectives

Une méthode de mesure de la viscosité du moût de fermentation d'un champignon filamentueux, impliquant un mobile non conventionnel, a été mise au point. Cette méthode est plus adaptée à l'application concernant *T. reesei* que les mesures utilisant des mobiles conventionnels. En effet, elle est robuste puisque différentes itérations de la mesure donnent des résultats plus reproductibles

que ceux obtenus en utilisant un dispositif de type plan/plan. De plus, elle permet d'homogénéiser le milieu alors que les autres méthodes ont tendance à modifier par agrégation ou exclusion la rhéologie du moût.

Cependant, cette méthode n'est applicable que sur une plage de mesures restreinte en termes de taux de cisaillement. Cette plage de mesures est d'autant plus restreinte que le milieu est peu visqueux. De ce fait, cette méthode ne peut pas être utilisée pour déterminer la viscosité du moût en début de culture (Viscosité  $< 0,1 \text{ Pa}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Pour cette raison, nous étudions actuellement la possibilité d'utiliser un dispositif de microfluidique pour accéder aux propriétés rhéologiques du moût en début de culture.

La valeur de viscosité à retenir pour dimensionner la puissance du moteur d'agitation d'un fermenteur industriel est celle qui correspond au pic de viscosité. Ce pic est atteint à la fin de la phase exponentielle de croissance (concentration en biomasse maximale) juste avant le début de la phase de production où la viscosité chute du fait de l'auto-fragmentation du champignon (Gabelle *et al.*, 2012 ; Henaut *et al.*, 2013). Il est donc important d'avoir des mesures précises pour les fortes viscosités (forte biomasse). Ces dernières sont à présent accessibles grâce à l'utilisation du dispositif validé dans cette étude.

#### II.1.2.5. Remerciements

Les auteurs remercient l'ADEME qui participe au financement de la thèse de monsieur HARDY.

### II.1.3. Conclusion, commentaires et perspectives

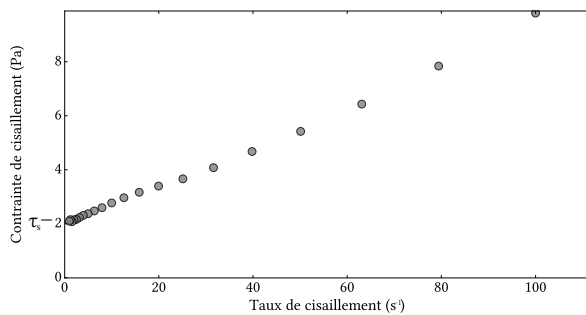
Une méthode de mesure de la viscosité des moûts utilisant un rotor hélicoïdal a été mise au point. Elle n'est applicable que sur une plage restreinte de cisaillement, mais elle est plus robuste que les méthodes conventionnelles pour caractériser la viscosité de suspensions de champignons filamenteux. Cette partie du travail amène à quelques commentaires et perspectives complémentaires à ceux présentés dans l'article, et qui seront pris en compte pour la suite de l'étude.

La méthode décrite dans Hardy *et al.* (2015) utilise un mobile à ruban hélicoïdal. Ce dernier permet un mélange de la solution pendant la mesure, évitant ainsi la formation de structures entraînant des artefacts de mesure. D'autres auteurs utilisent une géométrie différente, constituée d'un mobile avec quatre palettes droites (« Vane ») (Malouf *et al.*, 2013 ; Marten *et al.*, 1996), qu'ils indiquent comme capables de maintenir les champignons en suspension. Cependant, le mélange provoqué par un rotor à palettes est différent (débit radial) de celui induit par un rotor hélicoïdal (débit axial). Dans le futur, il serait intéressant de comparer les résultats des mesures de rhéologie obtenues avec les rhéomètres équipés de ces deux géométries.

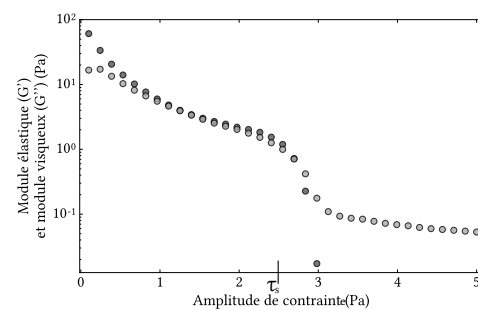
Lors de la prise de mesure telle que décrite ci-dessous, le taux de cisaillement varie de 10 à 100  $\text{s}^{-1}$ . Afin de comparer les résultats obtenus sur des moûts de fermentation différents, la mesure est effectuée sur une grande plage de taux de cisaillement. Les rhéomètres modernes permettent de réaliser des mesures à l'état stationnaire, nécessitant d'attendre un état d'équilibre à un taux de cisaillement donné, avant d'effectuer la mesure. Les résultats de viscosité, rapportés dans la suite de ce

document, utiliseront cette option. Le taux de cisaillement est fixé pour un point dans la plage de mesures et la mesure n'est enregistrée que lorsque l'écart entre trois mesures consécutives espacées de dix secondes pour ce taux de cisaillement est inférieur à 5 %.

Le comportement rhéofluidifiant du moût de champignon filamentueux peut être modélisé par différentes fonctions mathématiques (Malouf *et al.*, 2013 ; Reuß, 1988 ; Marten *et al.*, 1995 ; Metz, Kossen et van Suijdam, 1979). Le modèle le plus simple est celui de la loi puissance (eq II.1.1), il permet de bien décrire la rhéologie du moût. Cependant, les mesures des propriétés rhéologiques réalisées en équilibre et en dynamique montrent que le moût de fermentation de *T. reesei* présente un seuil d'écoulement (figure II.1.g). Le modèle d'Hershel-Bulkley (Mezger, 2014) (eq II.1.3) semble donc plus approprié que le modèle loi puissance. Il correspond à la même équation que la loi puissance avec en plus un seuil qui permet un meilleur ajustement aux données.



(a) Rheogramme sur des mesures à équilibre. Un seuil d'écoulement  $\tau_s$  est observé (entre 2 et 3 Pa).



(b) Rheogramme sur des mesures dynamiques.  $G'$  correspond au module élastique (gris foncé) et  $G''$  correspond au module de viscosité (gris clair). Le passage de l'état gel à l'état liquide se fait lors que  $G'' > G'$  et correspond à une amplitude de contrainte critique égale au seuil d'écoulement  $\tau_s$  (entre 2 et 3 Pa) (Mezger, 2014).

FIG. II.1.g : Mise en évidence d'un seuil d'écoulement pour les moûts de *Trichoderma reesei*

$$\eta = \frac{\tau_s}{\dot{\gamma}} + K \times \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{II.1.3})$$

Finalement, les futures mesures des propriétés rhéologiques des moûts de fermentation de *T. reesei* seront réalisées en couplant au rhéomètre le ruban hélicoïdal, et en effectuant la mesure à l'état stationnaire. De plus, les courbes seront modélisées avec le modèle Hershel-Bulkley (eq II.1.3) afin de pouvoir comparer les différentes conditions étudiées.

## II.2. Caractérisation de la morphologie des champignons filamenteux par microscopie en trois dimensions couplée à l'analyse d'images

### II.2.1. Introduction

Pour les cultures de champignons filamenteux, la capacité des cellules à produire des molécules d'intérêt, telles que des cellulases chez *Trichoderma reesei*, ainsi que le comportement rhéologique des moûts de fermentation sont très fortement liés à la morphologie des champignons (Quintanilla *et al.*, 2015 ; Metz, Kossen et van Suijdam, 1979). La caractérisation de cette morphologie est donc particulièrement utile, pour bien maîtriser les fermentations et pour atteindre les performances visées. Or, celle-ci est complexe, car les champignons se composent de fins filaments de quelques micromètres de diamètre se déployant dans les trois dimensions de l'espace, et ce sur des longueurs de l'ordre de la centaine de micromètres. La caractérisation de cette morphologie particulière nécessite donc une méthodologie dédiée capable de travailler en trois dimensions, impliquant un grand champ de prise de vue et associant une résolution importante. Elle doit permettre d'extraire des informations sur une large population de champignons, ce qui implique l'analyse d'un grand nombre d'objets.

Afin de répondre à ces exigences, un outil spécifique a été mis au point. Ce dernier couple l'utilisation d'un microscope optique motorisé en trois dimensions (x-y-z) à différents traitements d'analyse d'images.

Cette partie de la thèse fait l'objet d'une publication, actuellement soumise au journal *Journal of Microscopy*, et présentée ci-dessous dans la forme de l'article. Celui-ci décrit la méthode mise au point, ses spécificités, ainsi que les résultats obtenus à partir de moûts de fermentations fortement cisailés ou non fortement cisailés.

## II.2.2. Méthode d'analyse d'images dédiée à la caractérisation de la micro- et la macromorphologie de *Trichoderma reesei*

Journal of Microscopy



### Advanced digital image analysis method dedicated to the characterisation of the morphology of filamentous fungus

Journal:	<i>Journal of Microscopy</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	HARDY, Nicolas; IFP Energies nouvelles; IFP Energies nouvelles; AgroParisTech Moreaud, Maxime; IFP, Direction Technologie, Informatique et Mathématiques Appliquées Guillaume, Denis; IFP Energies nouvelles Solaize Augier, Frédéric; IFP Energies nouvelles Solaize Nienow, Alvin; University of Birmingham Béal, Catherine; AgroParisTech Ben Chaabane, Fadhel; IFP Energies nouvelles
Keywords:	fermentation, filamentous fungus, morphology, shear stress, <i>Trichoderma reesei</i>, automated image analysis

**Summary** Filamentous fungi have a complex morphology that induces fermentation process development issues, as a consequence of viscosity increase and diffusion limitations. In order to better understand the relationship between viscosity changes and fungus morphology during fermentations of *Trichoderma reesei*, an accurate image analysis method has been developed to provide quantitative and representative data for morphological analysis. This method consisted in a new algorithm called FACE that allowed sharp images to be created at all positions, segmentation of fungus, and morphological analysis using skeleton and topological approaches. It was applied and validated by characterising samples of an industrial strain of *Trichoderma reesei* that had or had not been exposed to an extreme shear stress. This method allowed many morphological characteristics to be identified, among which nine relevant criteria were extracted, regarding the impact of shear stress on the fungus and on the viscosity of the fermentation medium.

### II.2.2.1. Introduction

Fungi are widely used in many modern industrial fields for more than fifty years. In particular, they are valued in the pharmaceutical industry for the production of antibiotics (Barry et Williams, 2011) and in the energy industry with the development of second-generation biofuel technology. In this area, some key microorganisms are employed for the production of cellulases to degrade lignocellulosic biomass (Gusakov, 2011). They mainly belong to *Trichoderma reesei* species, which is the most used fungus for cellulase biosynthesis at industrial scale (Gusakov, 2011). However, the complex morphology of filamentous fungi, compared to unicellular organisms, induces process development

issues because of interactions between expanded fungus particles such as clumps that induce an increase in viscosity and the formation of compact pellets, which cause diffusion limitations. Carrying out fermentations with these microorganisms is then complicated as the fungus morphology impacts process parameters, whereas process conditions affect in return the morphology genesis (Quintanilla *et al.*, 2015; Wucherpennig *et al.*, 2010). Even if these interrelations have been known for a long time (Metz, Kossen et van Suijdam, 1979) and significant advances in understanding were made more recently (Amanullah *et al.*, 2000; Jüsten *et al.*, 1996), their impact on industrial processes is still not fully understood or controllable (Quintanilla *et al.*, 2015). To overcome those difficulties, it is necessary to have accurate tools providing quantitative and representative data for morphological analysis (Posch, Herwig et Spadiut, 2013). In this context, this work aims at developing an improved image analysis method to characterize the fungus morphology within various conditions, in order to increase knowledge and to improve procedures about fungi fermentation processes.

Image analysis methods (IAM) dedicated to filamentous fungi have been developed since the nineties (Papagianni, 2014; Barry et Williams, 2011; Paul et Thomas, 1998). One of the first fully automatic method was described by Tucker *et al.* (1992) who included, for the first time, an analysis by skeletonization of the clumps. The study of Paul & Thomas (1998) is a key reference in IAM applied to fungi, as it defines the main morphological parameters and introduces a classification of mycelial morphology, which is now adopted by the scientific community. Automated methods are available but most studies describe methodologies where some steps remain manual (Barry et Williams, 2011).

The major barriers and bottleneck with IAM of the morphology of filamentous microorganisms concern first, data acquisition about micro-morphology of the fungi (width of the cells, number of tips, unbranched fungus areas, etc.) and macro-morphology (clumps' or pellets' sizes and surfaces) at the same time. The capacity of acquiring the morphological characteristics of three-dimensional objects in two-dimensional images represents a second barrier to be removed. This problem is particularly important in the case of fungi with "spreadable morphology" as they are mainly composed of long and thin hyphae spread out over the three dimensions, thus differing from fungi with "compact morphology" that form small pellets. A compromise between the magnitude (resolution) and the quality of the focus in all areas of the object has to be found. To overcome those difficulties, some authors force fungi to growth in two dimensions using membrane immobilization (Barry, Chan et Williams, 2009), which is not representative of real fermentation conditions in the bioreactors in which they are grown commercially. The use of an automated adjustment of the z-axis at an optimal focus was proposed by Posch, Spadiut & Herwig (2012) but it is only applicable to "compact morphology".

For observation of fungus, bright field microscopes with low depth of field provide good magnification and image quality. However, samples generally have a thickness greater than the depth of field, thus being not entirely observable within the viewing distances intervals and preventing the creation of sharp images. It is possible to gradually vary the observation distance to create an image stack where all areas of the image can appear sharp, but all these areas are not on the same image. To allow observation of a complete sample, it is then necessary to process this stack of images to create

a new and unique image where the sample appears clear at all points. This process is commonly called extended depth-of-field method.

Image analysis procedure applied to filamentous fungi can be divided into three steps: creation of a sharp image at all pixels; detection and segmentation of fungus; and morphological analysis. Concerning creation of sharp image at all pixels, literature proposes methods using local sharpness estimators (Osibote *et al.*, 2010; Valdecasas *et al.*, 2001). At each pixel, local sharpness estimation is carried out, and the pixel of the stack image having the highest sharpness is retained. The main interest of this method is its very low computational cost. The problem can also be solved by means of inverse problem approach (Aguet, van de Ville et Unser, 2008). The observed image is modelled as a relief with a texture for the sample, and an optical transfer function for the microscope. The solution of the inverse problem consists of estimating the relief and texture of the sample that lead to the formation of the observed image. However, solving this problem is complex and requires addition of a priori knowledge on the sample to be reconstructed. In addition, it is quite expensive in terms of computing time, and convenient only for samples with low height variations (Aguet, van de Ville et Unser, 2008); thus, it is not suitable for thin objects with sharp edges.

The segmentation of fungus is fairly well addressed in the literature. Manual histogram segmentation thresholds are proposed by Barry, Chan & Williams (2009) and Tucker *et al.* (1992), automatic segmentation thresholds using histogram or using global image statistics are proposed by Lecault, Patel & Thibault (2007). Paul & Thomas (1998) used a mathematical morphology operator like TopHat, but in this case, it cannot properly manage the detection of fungus with balling morphology. Some papers proposed to suppress local drifts illumination by band pass filtering in the Fourier domain (Barry, Chan et Williams, 2009). Removal of residual noise or objects without interest (too small or incompletely in the image field) by mathematical morphology operators has been proposed by Lecault, Patel & Thibault (2007), Paul & Thomas (1998) or Tucker *et al.* (1992).

Concerning morphological analysis of fungus, a lot of papers suggest simplifying the detected objects by means of calculation of their skeleton and to perform analysis thereof (Barry, Chan et Williams, 2009; Lecault, Patel et Thibault, 2007; Paul et Thomas, 1998; Tucker *et al.*, 1992). This analysis consists of counting the number of branches, the number of nodes, measuring the lengths of the branches, in order to categorize the fungi structures in different classes. A fairly complete review of such features can be found in Barry & Williams (2011). Some papers are interested in morphological measurements directly on objects (Paul et Thomas, 1998; Posch, Spadiut et Herwig, 2012; Papagianni, 2014).

By considering the need to have an efficient method for three-dimensional morphological analysis of filamentous fungi, this work aims at developing a dedicated method including an original extended depth-of-field approach, a specific segmentation and skeleton and topological analyses. Cultures of *T. reesei* in a bioreactor will be carried out to test and validate the method. *T. reesei* was chosen because of its industrial interest and morphological diversity, from unbranched to clumped mycelia, and sometimes even pellets. However, its morphological diversity has not yet been evaluated by a fully automatic method (Choy, Patel et Thibault, 2011). Stirring with an associated induced shear stress is a process condition that is well known to affect the morphology of fungi (Krull *et*

Bley, 2015; Choy, Patel et Thibault, 2011; Amanullah *et al.*, 2000; Jüsten *et al.*, 1996). That is why this method will be used on samples submitted to two different conditions of shear stress in order to discriminate the fungus morphologies as a function of these different conditions.

## II.2.2.2. Material and methods

### II.2.2.2.1. Biological model

**Industrial fungus strain** *T. reesei* strain Tr3002 was obtained from IFPEN culture collection and derived from *T. reesei* strain CL847 by classical and molecular genetics (Durand, Clanet et Tiraby, 1988). As main characteristics, it is glucose-derepressed and cellulases hyperproducing, with an improved  $\beta$ -glucosidase gene (Ayrinhac *et al.*, 2011). Spores were conserved at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  in water added with 50 % glycerol, at concentration of  $2 \times 10^7$  colony forming units per millilitre.

**Culture media** The preculture medium was composed of corn steep solid  $2\text{ g.L}^{-1}$ ; KOH  $1.33\text{ g.L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 %  $2.4\text{ mL.L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $2.24\text{ g.L}^{-1}$ ;  $(\text{MgSO}_4, 7\text{ H}_2\text{O})$   $0.48\text{ g.L}^{-1}$ ;  $(\text{CaCl}_2, 2\text{ H}_2\text{O})$   $0.48\text{ g.L}^{-1}$ ;  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{ H}_2\text{O})$   $92\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{FeSO}_4, 7\text{ H}_2\text{O})$   $24\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{Co}(\text{NO}_3)_2, 6\text{ H}_2\text{O})$   $7.2\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O})$   $5.12\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{ZnSO}_4, 7\text{ H}_2\text{O})$   $6.72\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{CuSO}_4, 5\text{ H}_2\text{O})$   $2.4\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{ H}_2\text{O})$   $1.25\text{ mg.L}^{-1}$ ; di-potassium phthalate  $0.02\text{ mol.L}^{-1}$ . pH was adjusted to 5.25 with NaOH  $7\text{ mol.L}^{-1}$ .

For bioreactor cultivation, the culture medium included corn steep solid  $2\text{ g.L}^{-1}$ ; KOH  $1.66\text{ g.L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 %  $3\text{ mL.L}^{-1}$ ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $2.8\text{ g.L}^{-1}$ ;  $(\text{MgSO}_4, 7\text{ H}_2\text{O})$   $0.6\text{ g.L}^{-1}$ ;  $(\text{CaCl}_2, 2\text{ H}_2\text{O})$   $0.6\text{ g.L}^{-1}$ ;  $(\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{ H}_2\text{O})$   $115\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{FeSO}_4, 7\text{ H}_2\text{O})$   $30\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{Co}(\text{NO}_3)_2, 6\text{ H}_2\text{O})$   $9\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O})$   $6.4\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{ZnSO}_4, 7\text{ H}_2\text{O})$   $8.4\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{CuSO}_4, 5\text{ H}_2\text{O})$   $3.0\text{ mg.L}^{-1}$ ;  $(\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{ H}_2\text{O})$   $1\text{ mg.L}^{-1}$ . Antifoam SB2121 from Strucktol (Hamburg, Deutschland) was added at 1 % (v/v) and pH was adjusted to 4.8 with  $\text{NH}_3$  10.25 % (v/v). All media were sterilized by autoclaving at  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$  during 20 min.

**Precultures** Precultures were prepared with 225 mL of preculture medium and 25 mL of a sterile glucose solution at  $250\text{ g.L}^{-1}$  in 2 L Fernbach flasks. After mixing, the flasks were seeded with 1 mL of thawed spore's solution and incubated at  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  for 70 h. They were agitated at 180 rpm with an orbital of 50 mm in a shaker Multitron II (Infors, Bottmingen, Switzerland).

**Cultivation** Fermentations were performed in batch culture in a homemade bioreactor F2P, as previously described by Gabelle *et al.* (2012). The preculture (250 mL) was transferred to the bioreactor F2P containing 1.75 L of culture medium, together with 500 mL of sterile glucose solution at  $250\text{ g.L}^{-1}$ , thus resulting in a final working volume of 2.5 L. Agitation was carried out at 800 rpm (in order to avoid foaming), with a Rayneri impeller (VMI-mixing, Montaigu, France) of 80 mm diameter. During batch cultures, the temperature was set at  $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pH was maintained at 4.8 with  $\text{NH}_3$  (10.25 %, v/v) and air flow rate was fixed at  $2.5\text{ L.min}^{-1}$ . Dissolved oxygen (D.O.) concentration was recorded with an InPro 6860i optical oxygen sensor (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) and air flow rate was controlled by a gas flow mass controller EL-FLOW F-201CV (Bronkhorst, Ruurlo, The Netherlands). Fermentations were stopped at the end of the exponential growth phase, at a residual glucose concentration of  $20 (\pm 1)\text{ g.L}^{-1}$ . Samples were collected for biomass and glucose concentration analyses,



rheological measurements and image analysis.

#### II.2.2.2.2. Analytical follow-up

**Rheological measurements** Rheological measurements were carried out offline, using a rotational rheometer AR2000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, the United States) equipped with a helical rotor, as already described (Hardy *et al.*, 2015). They were realized at cultivation temperature (27 °C) under controlled shear rates in the range of 1 to 100 s<sup>-1</sup>. Increasing logarithmic shear rate sweeps (from 1 to 100 s<sup>-1</sup>) were applied, followed by subsequent decreasing shear rate sweeps (from 100 to 1 s<sup>-1</sup>). Two cycles were performed during which shear rate (in s<sup>-1</sup>) was increased and decreased according to 20 steps. Measurements of dynamic viscosity (in Pa.s) were recorded when a steady state had been reached at each step (tolerance of 5 % between 3 consecutive values in a sampling period of 10). In order to exclude possible errors due to secondary flow effects (Mezger, 2014), only rheological results with Taylor numbers less than 41.2 and Reynolds number less than 1000 were considered as significant. Results were considered with an uncertainty of 5 % due to Couette analogy (Hardy *et al.*, 2015) and were given in Pa.s, together with 95 % confidence intervals.

**Biomass concentration determination** The biomass concentration was quantified by the dry weight method. A weighed sample of the culture broth was filtered through a dried and weighed glass microfiber filter with a particle retention of 1.2 µm (Whatman GF/C filters). One volume of the sample was washed with three volumes of distilled water and oven-dried at 105 °C until constant weight. The sample was weighed after cooling, thus allowing calculation of biomass concentration (in g.kg<sup>-1</sup>) together with standard error.

**Glucose concentration analysis** Glucose concentration was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) from Waters Corporation (Milford, Massachusetts, the United States). Separation of compounds was carried out using a Varian Metacarb87P column 300 x 7.8 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, California, the United States), at 80 °C and 31 bar. Mobile phase was composed of milliQ water at 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. Detection was achieved with a refractive index detector (Waters 2414) and quantification of glucose concentration (in g.L<sup>-1</sup>) was done using a range of calibration, and associated to the standard error.

**Preparation of samples for image analysis** In order to minimize artefacts caused by overlapping of hyphae, samples were diluted in 50 mmol.L<sup>-1</sup> phosphate-citrate buffer (pH 4.8) to a final biomass concentration of 2 to 5 g.L<sup>-1</sup> included into the range proposed by Lecault, Patel & Thibault (2007). They were stained with a commercial lactophenol-blue solution (Merck, Darmstadt, Germany) that was diluted to half with a solution of lactophenol-blue without cotton blue and without phenol. One volume of the diluted samples was mixed to four volumes of this diluted lactophenol-blue solution. This staining procedure aims at stopping the growth (Haack *et al.*, 2006), colouring healthy regions of the fungi (Lecault, Patel et Thibault, 2009) and improving contrast between fungi and background. Stained samples were fixed and sealed with nail varnish between a slide and a cover slip.

### II.2.2.2.3. Experimental design

**Production of differentiated samples** Two different samples were generated by applying two shear stress conditions. Samples were collected at the end of exponential growth phase and split into two parts. The first one was used without any further stress being applied as the control (samples U); the other one was submitted to a very high shear stress (samples S) by agitation using an Ultra-Turrax TP18/10 170 W disperser (Ika, Staufen, Deutschland). The conditions in the disperser were the following: sample volume of 250 mL, tip speed ( $V_{\text{tip}}$ ) of  $12.6 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  in a gap of 0.4 mm, room temperature, duration of 2 min. A non-significant temperature increase ( $2.1 \text{ }^\circ\text{C}$ ) was observed during the treatment. Because of foaming during the shearing, pauses were made when necessary to reduce foam in the samples. All samples were duplicated.

**Kolmogorov-Smirnov test (KS test)** Two-sample Kolmogorov-Smirnov tests (KS test) were applied to compare distributions of morphological criteria, as they appeared normal or non-normal. They allow the largest absolute difference between the two cumulative distribution functions as a measure of disagreement to be defined (Lopes, Hobson et Reid, 2008). A  $p$ -value lower than 0.05 indicated that the hypothesis of equality of the distributions of the two samples could be rejected. The KS tests were implemented by using SciPy software (Van Der Walt, Colbert et Varoquaux, 2011).

### II.2.2.3. Development of the image analysis method

Image analysis of filamentous fungi relies on four particularities: thin objects (fungus cells and filaments, except for Pellets morphology), sharp objects-background transitions, important number of images (typically 60 images par stack), and images of important size (typically mosaic images of size 70 million pixels). These constraints determine the need for very fast processing and analysis algorithms able to manage segmentation of fine objects with some big objects, all with sharp edges. In order to make a compromise between magnitude (resolution) and the quality of the focus on all areas of the object, we developed a method based on mosaics, combined with a projection of a stack composed of two-dimensional images in the third dimension. It was included in a new algorithm called 'Fast mean Absolute difference with Confidence propagation for Extended depth of field' (FACE algorithm). The method comprised three phases: creation of a sharp image at all pixels, segmentation of fungus, and morphological analysis of fungus (Fig. II.2.a).

#### II.2.2.3.1. Data acquisition

Data acquisition was achieved by placing the slides containing the stained and fixed samples on a bright field microscope AxioImager M2p Carl Zeiss AG (Oberkochen, Germany) bearing an N-Achroplan 20X objective (Carl Zeiss). The microscope was equipped with a motorized stage in X-Y axis (steps of  $0.1 \mu\text{m}$ ) and in Z axis (steps of  $25 \text{ nm}$ ). The microscope was supervised by the Carl Zeiss software AxioVision SE64 rel 4.9.1. Sixty stacks in Z axis of sixty mosaics separated by  $2 \mu\text{m}$  were recorded with a colour camera 5 megapixels Axicam 105 Colour through a video adapter 60N-C 2/3" 0.5x (Carl Zeiss). Acquisitions were done after white balance and normalization of light intensity to

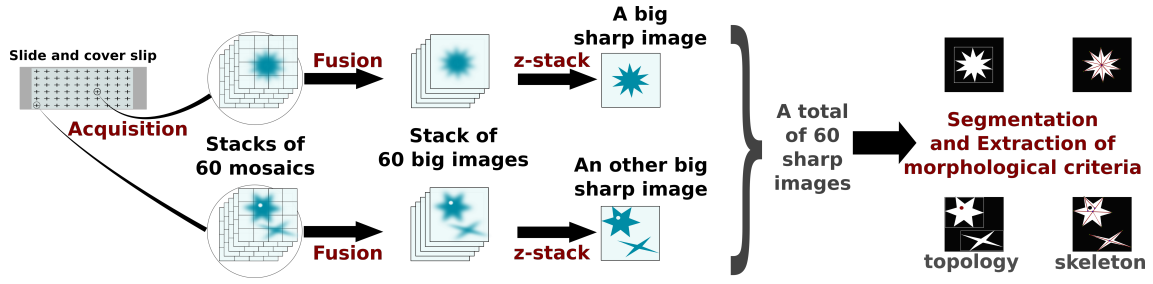


Figure II.2.a.: Synthesis scheme of the new image analysis method.

Each slice was divided into 60 spots. In each spot, a stack of 60 big images composed of mosaics of 16 sub-images were made. The 60 stacks of big images were transformed into a single big sharp image, on which segmentation and extraction of morphological criteria was performed.

have around 190 on 255 grey levels (8-bit camera) with an exposure time of 0.3 ms for the background. A calibration value is set to permit the conversion of pixels into micrometres. Each mosaic was composed of 16 pictures with a size corresponding to 560  $\mu\text{m}$  per 419  $\mu\text{m}$ . All pictures correspond to a mosaic with a surface of around 3.7  $\text{mm}^2$ . To take and saved all 57,600 pictures (60 mosaics), 8 hours were needed.

### II.2.2.3.2. Creation of sharp images at all pixels: FACE algorithm

**Definition of a new sharpness estimator** The first phase consisted of creating a sharp image at all pixels. We proposed to use a local sharpness estimator as fast as local variance but more robust to noise, combined with two fast post processing steps.

Let us consider a list of T images  $I_a$  obtained for different observation distances. Creation of image O, sharp image at all points x, using a local sharpness estimator was obtained by:

$$O(x) = I_a(x) \mid \max_{0 \leq a \leq T} S_{N_x} [I_a] \quad (\text{II.2.1})$$

with  $N_x$  local neighbourhood of point x and S a local sharpness operator. It was also possible to compute an estimate of the height Z of the sample at point x by:

$$Z(x) = z(a) \mid \max_{0 \leq a \leq T} S_{N_x} [I_a] \quad (\text{II.2.2})$$

with  $z(a)$  function returning correspondence between the image number a and real height of the sample.

In the case of estimation by means of local variance estimator,  $S = V$  was written with the local mean M:

$$V_a(x) = \frac{1}{\text{card}(N_x)} \sum_{i \in N_x} (I_a(i) - M_{N_x} [I_a])^2 \text{ with } M_{N_x} [I_a] = \frac{1}{\text{card}(N_x)} \sum I_a(i) \quad (\text{II.2.3})$$

The local variance can also be written as:

$$V_a(x) = (M_{N_x} [I_a^2] - M_{N_x} [I_a])^2 \quad (\text{II.2.4})$$

The advantage of this formulation is to only involve local mean operator for calculations on neigh-

bourhood. This local mean, also called box filter, can be computed very quickly using a summation table, regardless the size of the neighbourhood  $N_x$  (Crow, 1984). We proposed to use a different local sharpness estimation operator  $S = R$ , which is a compromise between computation time and robustness to noise, by using absolute difference in replacement of squared difference:

$$R_a(x) = M_{N_x} [|M_{N_x} [I_a] - I_a|] \quad (\text{II.2.5})$$

Two post processing methods were applied.

**Propagation of reliable estimates of sharpness to less reliable areas** The first one allowed areas where local sharpness estimates were considered reliable to be separated from unreliable ones. Consider the example of a branch of a fungus and the background all around it. Pixels belonging to the branch were generally well estimated because of the contour of the branch that brought a maximum with significant value for the local sharpness estimator. In that case, we considered that the value of the estimates were reliable. However, pixels situated in the background of the fungus never provided a significant maximum, because these maxima were generally obtained when the nearest branch appeared blurred in this area. This fact implied the formation of artefacts in the background. However, in the image  $I_a$  where pixels of the branch were sharp, nearest pixels belonging to the background were not contaminated by blur from this branch, even if the sharpness estimates of these pixels were not at maximum. A reduction of the artefacts was obtained by propagating the sharpness information from pixels where the sharpness estimator was considered as reliable to pixels where it was not reliable. To determine the gap between reliable and unreliable estimates, we used a threshold on the value of the sharpness estimates. This threshold was automatically estimated by considering the maximum sharpness image estimates  $P$  and calculating a threshold  $p$  on this image by maximizing the interclass variance (Otsu, 1979):

$$P(x) = \max_{0 \leq a \leq T} S_{N_x} [I_a], \quad p = MVI [P] \quad (\text{II.2.6})$$

Reliable pixels of  $O$  (i.e.  $P(x) > p$ ) were not modified. For each unreliable pixel  $x$  (i.e.  $P(x) \leq p$ ), we affected the value of the closest reliable pixel  $y$ . This post processing was written as:

$$\text{if } P(x) < p, \text{ then } O'(x) = O(x) \quad (\text{II.2.7})$$

$$\text{else } O'(x) = I_b(x) \text{ with } b \mid \max_{0 \leq b \leq T} R_{N_y} [I_b] \quad (\text{II.2.8})$$

The search for the nearest reliable point was done effectively with a low computational cost, by means of geodesic distance calculation with propagating from source points (Ikonen, 2007).

**Suppression of residual noise by using fast local adaptive filter** The second post-processing method involved applying an adaptive filter to reduce the residual noise without changing the contours of the reconstructed objects. We used the Flowing Bilateral Filter (Moreaud et Cokelaer, 2015), which unlike the conventional bilateral filter, did not create halos by the presence of contrasting

fine patterns, here the branches of fungus. The final image was obtained by:

$$O'' = \text{FlowingBF} [O'] \quad (\text{II.2.9})$$

**Application to a set of data** The three previous steps composed the new algorithm named FACE (Fast mean Absolute difference with Confidence propagation for Extended depth of field). The FACE algorithm involved three parameters settings: the neighbourhood size parameter for defining N; and two parameters, FBFf and FBFg, for Flowing Bilateral Filter. Parameter FBFf was linked to a smoothing intensity, and FBFg was linked to a minimum contrast to retain. In the following section we used a neighbourhood size of 10×10 pixels for N, 5 for FBFf and 10 for FBFg.

To summarize, the FACE algorithm developed in this work proposed a local sharpness estimator which offered a compromise between speed and robustness to noise by the use of calculation of absolute differences and local means. It also allowed propagating the estimated sharpness information points where index sharpness was reliable, towards the points where the index was less reliable. It has been completed by an adaptive filter preventing the creation of halos by using Flowing Bilateral Filter (FlowingBF).

Fig. II.2.b illustrates the result of this approach compared to others. Images (A) and (B) were obtained at different viewing distances, without any image analysis. Different areas of these images were sharp while other were not, depending on the distance. Images (C) and (F) in Fig. II.2.b were obtained from the FACE algorithm developed in this work. For these tests, 30 images of size 2500×1900 pixels were used, and presented on a region of interest of size 500×400 pixels Fig. II.2.b (D) and (E) present the results obtained with two other algorithms. All calculations were performed with Intel Xeon QuadCore 2.8 Ghz CPU and 16 Go of RAM. Fig. II.2.b (D) shows that the method of Aguet, van de Ville & Unser (2008) provided results with many artefacts due to regularisation function that was not well adapted to fine objects. Computing time was also important (over 10 minutes). The results obtained from Zerene Stacker method (Brecko *et al.*, 2014) (Fig. II.2.b (E)) were pretty good and obtained rapidly (less than one minute), but residual artefacts were present around some branches of fungus, thus being problematic for the segmentation step. Finally, the FACE algorithm provided results with very few artefacts and a short computing time (less than one minute). Application of FACE algorithm to a 57,600 pictures set take 5 hours.

### II.2.2.3.3. Fungus segmentation

The second phase of image analysis covered segmentation of fungus. It was achieved by combining an automatic segmentation threshold using histogram to detect fungus in pellets, and a TopHat operator to detect filamentous fungus with other morphology (Serra, 1983). Openings by morphological criteria were performed to remove the residual noise and objects without interest.

The height of the TopHat operator was determined automatically by calculating a threshold by maximizing the interclass variance (Otsu, 1979) on the image of residues obtained from the initial image and its morphological opening by a disc of diameter D. The value of D had to be greater than the diameter of filamentous branches. However, if the value of D was too high, local illumination

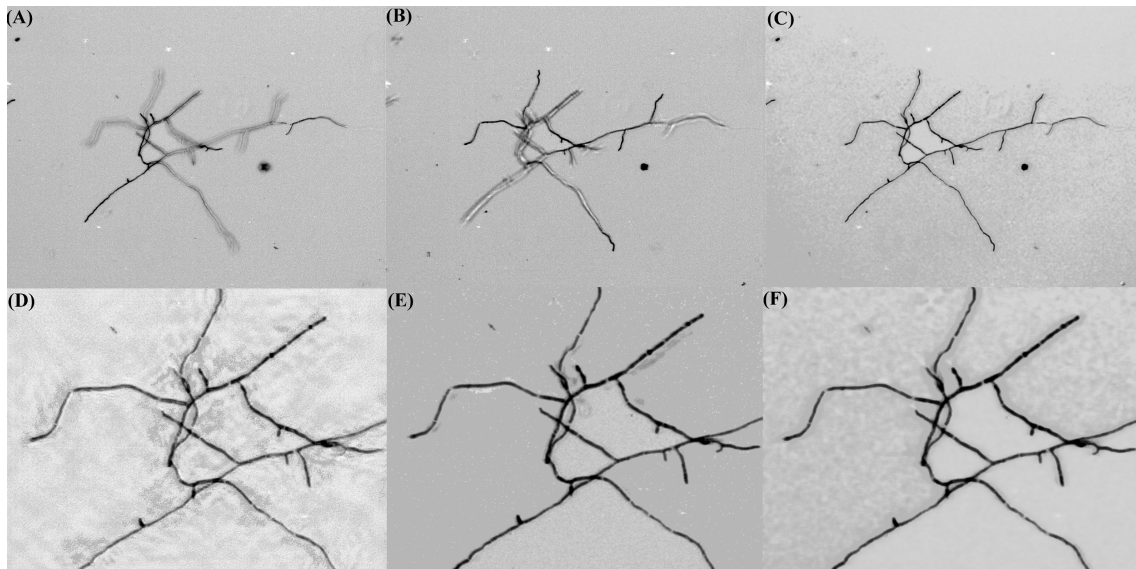


Figure II.2.b.: Creation of sharp images of a *T. reesei* fungus, using different extended depth of field methods

*A* and *B* correspond to images of the same sample obtained at two different viewing distances, before any treatment. *C* and *F* correspond to sharp images produced with FACE algorithm, at two different magnifications. *D* was obtained with algorithm of Aguet, van de Ville et Unser (2008) implemented into a ImageJ software module and *E* was obtained with a Zerene Stacker software (Brecko et al., 2014). Width of images *A*, *B*, *C* is 550  $\mu\text{m}$ , Width of images *D*, *E*, *F* is 110  $\mu\text{m}$ .

variations were detected simultaneously with the filaments. In practice,  $D$  was taken equal to three times the diameter of a branch. Image  $O_F$  was obtained by:

$$O_{TH} = O'' - \gamma_D [O''] \quad (\text{II.2.10})$$

$$s_F = MVI [O_{TH}] \quad (\text{II.2.11})$$

$$O_F = 1 \text{ if } O_{TH}(x) \geq s_F, 0 \text{ otherwise} \quad (\text{II.2.12})$$

Fungus was also observed with pellets morphology. As TopHat operator could not detect these objects larger than the parameter  $D$ , segmentation using threshold calculated by k-means (Diday, 1971) on histogram of image  $O''$  was a good choice:

$$s_P = \text{k-means} [O''] \quad (\text{II.2.13})$$

$$O_P(x) = 1 \text{ if } O''(x) \geq s_P, 0 \text{ otherwise} \quad (\text{II.2.14})$$

This detection method was problematic when no fungus was present on the image or when only fibrous fungus was observable. However, proportion of pixels designating fungus was always very low (fungi are highly diluted for observations). Consequently, we fixed in practice this proportion under  $p_{\max}=0.1$ . If  $s_P$  or  $s_F$  led to an image with proportion of pixels designating fungus greater than  $p_{\max}$ , we considered that the result was aberrant. The final image  $O_S$  was thus obtained by:

$$O_{s1}(x) = O_F(x) \text{ if } \frac{\text{card}(O_F(x) = 1)}{\text{card}(O_F)} < p_{\max}, 0 \text{ otherwise} \quad (\text{II.2.15})$$

$$O_{s2}(x) = O_P(x) \text{ if } \frac{\text{card}(O_P(x) = 1)}{\text{card}(O_P)} < p_{\max}, 0 \text{ otherwise} \quad (\text{II.2.16})$$

$$O_s(x) = 1 \text{ if } O_{s1}(x) = 1 \text{ or } O_{s2}(x) = 1, 0 \text{ otherwise} \quad (\text{II.2.17})$$

Finally, the image was cleaned from unrepresentative small objects or objects touching the border of the image (Fig. II.2.c). In order to do this, connected components (corresponding to groups of pixels into which they are all connected) were filtered by means of morphological openings, on the basis of criteria such as surface area or length (Walter, 2003).

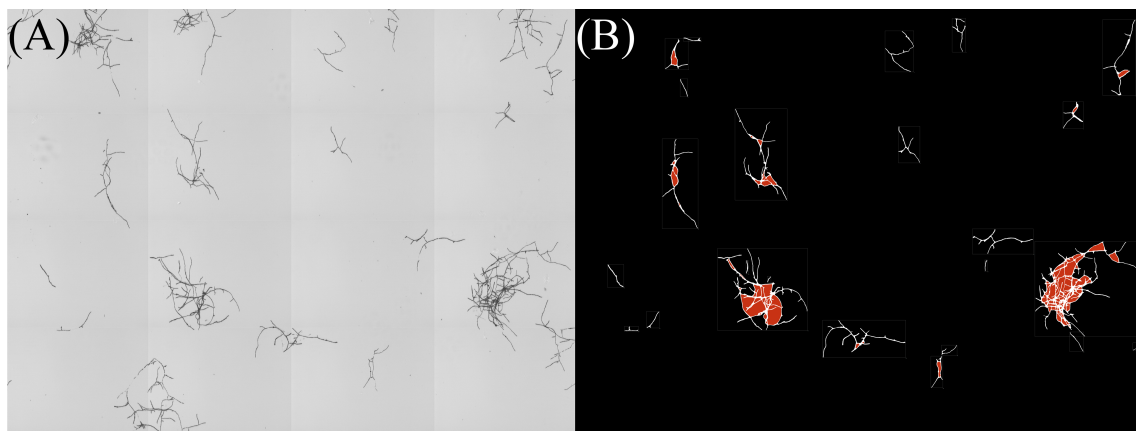


Figure II.2.c.: Results of segmentation process in the case of an image of *T. reesei* fungus obtained with FACE algorithm and showing both fibrous and clustered fungi.

The images are composed of mosaics of 16 sub-images, with a size of 10,098 per 7,538 pixels. (A) before segmentation; (B) after segmentation. Width of images is 2 mm.

#### II.2.2.3.4. Morphological analysis

The last phase allowed morphological analysis of fungus to be undertaken. It was performed firstly by a standard analysis using a skeleton in order to be comparable to the existing methods (Paul et Thomas, 1998), and secondly, by a topological analysis of the shape of the fungus without the use of skeleton, which was faster.

**Skeleton image analysis** Segmented images  $O_s$  were analysed by calculating skeletons of their connected components (Zhang et Wang, 1988). Skeleton of fungus can be seen as a graph made of tips, nodes, branches, segments and chains. Tips were defined as points of the skeleton with no neighbours, similar to dead ends on a map. Nodes were defined as points of the skeleton with several neighbours belonging to different branches or segments, such as crossroads or intersections. Segments corresponded to paths between two nodes, and branches to paths between two tips or between one tip and a node. Pixels of branches and segments that are neither tips nor nodes were defined as chains. The objective of this phase was to estimate the mean lengths and the mean widths

of branches and segments.

The skeleton was processed in several steps: creation of a list of the tips (primary tips) of the skeleton, detection of the nodes, creation and work on a copy of the picture, deletion of the nodes, identification of secondary tips, scan of “new” branches, computation of properties. Looking at the configurations that lead to tips and nodes, a finite number of patterns that are invariant by rotation and symmetry was obtained. These invariant numbers were selected to differentiate pixels of the skeleton, in agreement with some principles of the approach of Barry, Chan & Williams (2009). Each pixel of the current fungus and its closest neighbourhood (surrounding pixels) was examined and two identifiers were computed: First, the weight of the neighbourhood, which was equal to the sum of the distances from the pixel under consideration to the pixels of its neighbourhood belonging to the fungus (+1 if it belonged to the axis,  $+\sqrt{2}$  if it belonged to the corner); secondly, the number of 2-blocks, that were groups of 2 successive pixels (only 2) that belonged to the neighbourhood. The first identifier allowed most of the patterns to be sorted, but sometimes the same value was attributed to two different configurations of pixels and thus the second identifier allowed discrimination between them. This second identifier was computed only if the value of the first could lead to a mistake. Ambiguous patterns according to their weight and 2-blocks numbers are illustrated in Table II.2.i.

Table II.2.i.: Recognition of all ambiguous patterns according to weights.

Pattern	weight	2-blocks	nature	Pattern	weight	2-blocks	nature
	$1 + \sqrt{2}$	1	tip		$1 + 2 \times \sqrt{2}$	0	node
	$1 + \sqrt{2}$	0	chain		$3 + \sqrt{2}$	1	node
	$2 + \sqrt{2}$	1	chain		$2 + 2 \times \sqrt{2}$	2	chain
	$1 + 2 \times \sqrt{2}$	1	chain		$2 + 2 \times \sqrt{2}$	0	node

Once tips, nodes and chains were identified, the initial skeleton was modified by suppressing the nodes and the closest pixels (did they belong to the skeleton or not?), i.e. the value of 8-connected



pixels of the neighbourhood was set to the value of the background. The skeleton obtained was then composed of branches only. New tips, considered as ‘secondary’ tips, were then detected, applying the same algorithm as at the previous step (detection of the “primary” tips) and listed into the collection of connected components. Branches and segments of the original skeleton were defined by the branches of this new image. In order to define the branches and segments of the initial image, the branches of the new image was processed, first by starting from a primary tip and then by eliminating starting and final tips of the list. The length of the branches and segment was incremented depending on the link between one pixel of the skeleton and the next one in the walk (1 or  $\sqrt{2}$ ). In case of final secondary tips, the closest node was detected and the length of the branches and segments was corrected according to the link between tip and node. This correction was done until no tip was left in the list. Doing this, the branches and segments of the initial image were fully characterized by the nature of the tips and nodes that limited them (Fig. II.2.dB). That means, if there was at least one primary tip, a branch was defined, if there was no primary tip, a segment was defined. In order to estimate the width of the branches and segments, the initial image of the fungus was inverted. The algorithm filled the fungus with the minimal distance value, from a pixel of the fungus to its edge. This was done in several steps by propagation. The first row of connected neighbours are numbered 1, the second row of neighbours numbered 2, and so on, until there was no more pixel without value. The width along the skeleton was then estimated as being twice the distance allocated to this pixel of the skeleton. The mean width was then computed for each branch and segment longer than a threshold (30 pixels). This value was arbitrarily fixed in order to avoid artefacts due to unrepresentative branches (For example, the width of the fungus on Fig. II.2.dA, which was estimated to be equal to 10 pixels (2.2  $\mu\text{m}$ )).

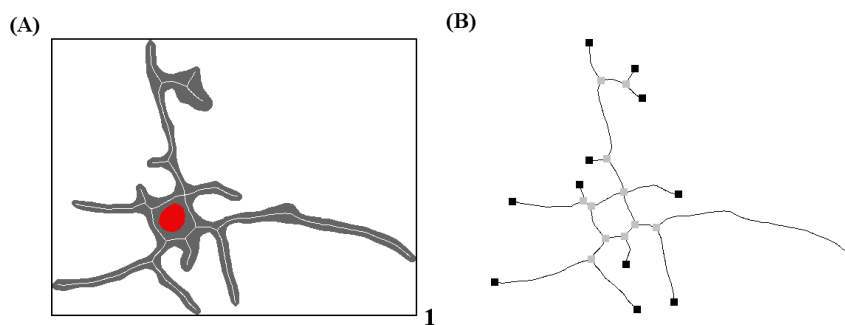


Figure II.2.d.: Skeleton of a *T. reesei* fungus image.

(A) Skeleton into a *T. reesei* fungus, surrounded by its bounding box, identified by tag “1” and showing a hole in red; (B) The same skeleton after decomposition with nodes (grey) and tips (black). Width of images is 150  $\mu\text{m}$ .

**Topological analysis** The morphological analysis using a skeleton allowed very detailed characterization, but it was very sensitive to noise and unstable, even for small changes of morphology. To become independent from skeleton calculations, segmented images can be used directly in order to perform topological analysis. Paul & Thomas (1998) proposed this kind of analysis, but using skeleton, which is not necessary. For 2D data, this type of analysis focused on the number of connected components, their length, their surface area, the number of holes... This approach has been used recently with success in several domains, with low or high dimensional data and very complex shapes

(Lum *et al.*, 2013; Carlsson, 2009). In the context of *T. reesei* morphological analysis, we propose the following criteria for each connected component: surface area, filled surface area, geodesic length, and number and surface area of holes (Fig.II.2.e). Intuitively, these features can help to classify fungi into different morphological classes, as previously done by Paul & Thomas (1998), which will be discussed below.

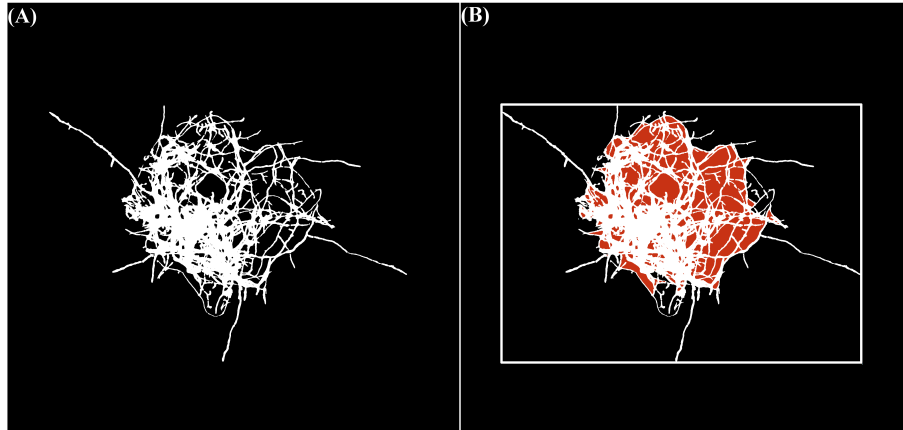


Figure II.2.e.: Topological analysis of a *T. reesei* clump.

Image of a *T. reesei* fungus showing the connected components obtained by segmentation before (A) and after (B) holes detection in red and bounding box creation. Width of image represents 550  $\mu\text{m}$ .

Surface area measurements were obtained by counting the number of pixels of connected components. The holes were extracted by morphological operations on binary sets (Serra, 1983). To calculate the length of a filled connected component (connected component where all holes are filled), we computed geodesic distance (Ikonen, 2007) from the centre of inertia. To estimate mean, standard deviation, minimum or maximum radius, pixels on the contours of the connected components were inspected. The calculation of the extreme geodesic length of a connected component, which can be defined as the maximum geodesic distance between two points belonging to the connected component, was a bit more complex. First, geodesic distance was calculated from a random point on the connected component. The position of the pixel on the contour which had the maximum distance value was searched, which was described as the first extreme point. Then, a second geodesic distance was calculated from that point by searching for the point on the contour with maximum distance value. This new point was the second extreme point, and its distance value was the extreme geodesic length of the connected component. From these two points, it was also possible to calculate the Euclidean length between them and a tortuosity by taking into account the ratio between geodesic length and Euclidean length.

**Morphological criteria based on skeleton and topological analysis** 23 raw morphological characteristics, which were extracted with skeleton and topological analyses, are summarized in Table 2. Their extraction from data obtained with FACE algorithm took around 16 minutes per image. In addition, seven morphological characteristics were calculated from the raw ones. Among the 31 criteria, eight were not commonly used in filamentous fungi morphological studies.

Table II.2.ii.: List of morphological criteria obtained by both skeleton and topological analyses.

Criteria	Units	Obtained by	Calculation	Description
nbtips	-	Skeleton		number of tips
nbnodes	-	Skeleton		number of nodes
lbmean	$\mu\text{m}$	Skeleton		mean branch length
<b>lbmin</b>	$\mu\text{m}$	Skeleton		minimum branch length
<b>lbmax</b>	$\mu\text{m}$	Skeleton		maximum branch length
limean	$\mu\text{m}$	Skeleton		mean internodal length
<b>limin</b>	$\mu\text{m}$	Skeleton		minimum internodal length
<b>limax</b>	$\mu\text{m}$	Skeleton		maximum internodal length
tlbs	$\mu\text{m}$	Skeleton	$\sum$ internodal and branch lengths	total length
HGU	$\mu\text{m}$	Skeleton	$\frac{\text{tlbs}}{\text{nbtips}}$	hyphal growth unit
v	$\mu\text{m}^3$	Skeleton	$\frac{\pi \times w^2 \times \text{tlbs}}{4}$	Fungus' volume
a	$\mu\text{m}^2$	Topology		surface area
aH	$\mu\text{m}^2$	Topology		surface area of holes
nH	-	Topology		number of hole
aF	$\mu\text{m}^2$	Topology		surface area of filled CC
maH	$\mu\text{m}^2$	Topology		mean surface area of holes
saH	$\mu\text{m}^2$	Topology		standard deviation of holes' area
<b>lg</b>	$\mu\text{m}$	Topology		extreme geodesic length
<b>le</b>	$\mu\text{m}$	Topology		extreme Euclidian length
<b>t</b>	-	Topology	$\frac{\text{lg}}{\text{le}}$	extreme tortuosity
rmax	$\mu\text{m}$	Topology		maximum radius of filled CC
rmin	$\mu\text{m}$	Topology		minimum radius of filled CC
rmean	$\mu\text{m}$	Topology		mean radius of filled CC
rstd	$\mu\text{m}$	Topology		standard deviation of radius of filled CC
bw	$\mu\text{m}$	Topology		width of bounding box
bh	$\mu\text{m}$	Topology		height of bounding box
<b>gr</b>	-	Topology	$\frac{a}{\text{lg}}$	geometric ratio
sr	-	Topology	$\frac{a}{(\text{bw} \times \text{bh})}$	surface ratio
rr	-	Topology	$\frac{\text{rmax}}{\text{rmin}}$	radius of filled CC ratio
fr	-	Topology	$\frac{\text{aH}}{a}$	filling ratio
w	$\mu\text{m}$	Topology and Skeleton		width

CC is for connected component; criteriain bold correspond to uncommon criteria for fungus characterization.

### II.2.2.4. Application of the image analysis method to experimental data

In a first approach, *T. reesei* images were collected in order to define the approach required in order to obtain accurate data. In a second stage, the image analysis method as used to discriminate morphologies of *T. reesei* submitted to different shear stress.

#### II.2.2.4.1. Validation of the image analysis procedure

As a first important assessment, the effect of acquisition time on the image analysis method had to be checked. A small number of fields including 11 mosaics corresponding to less than 500 objects, were observed 1, 7, 24 and 48 hours after preparation of the slide. Fig. II.2.f shows the quantiles corresponding to the cumulative distribution functions of the projected area of fungi. No significant variation was observed during the acquisition time. In order to confirm this observation, KS tests were done to compare all pairs of data. As they led to high  $p$ -values (always higher than 0.05) for all criteria, this experiment confirmed that acquisition time did not affect the quality of the results.

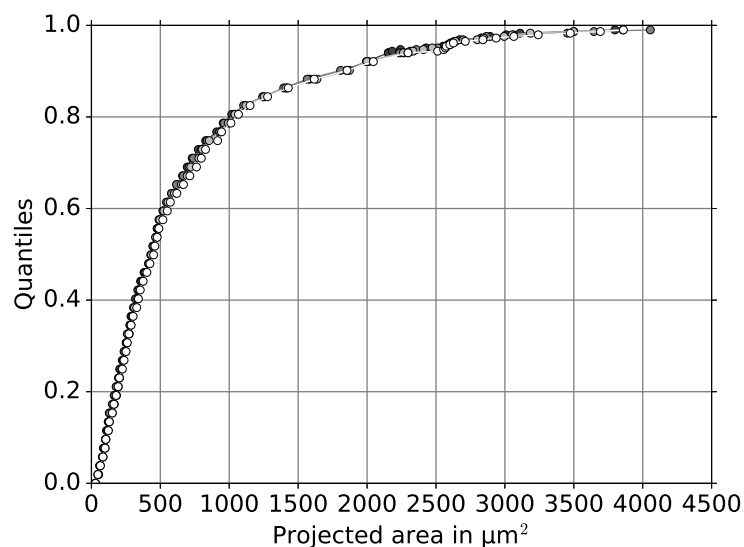


Figure II.2.f.: Cumulative distribution functions of the projected area of fungi images, when acquisition was done after 1, 7, 24 and 48 h.

1 h: black circles, 7 h: dark grey, 24 h: light grey and 48 h: white.

Another important question dealt with the minimal number of fungi that has to be considered to obtain accurate morphological data. To answer this question, a large sample was formed with 500 different subpopulations that were taken randomly, with replacement. They were submitted to the image analysis method, by increasing the size of subpopulations from 0 to 2,000 fungi, with a step of 10 for each sub-sample. The minimum, the average, the maximum values of the median and the quantile 90 were determined. As shown in Fig. II.2.g, the accuracy of the criteria evaluation not only depended on the number of objects, but also on the criteria itself. For example, with 1,000 fungi, q50 and q90 the projected area were given with a variation of 20 %, whereas for the HGU, the variation was less than 10 %.

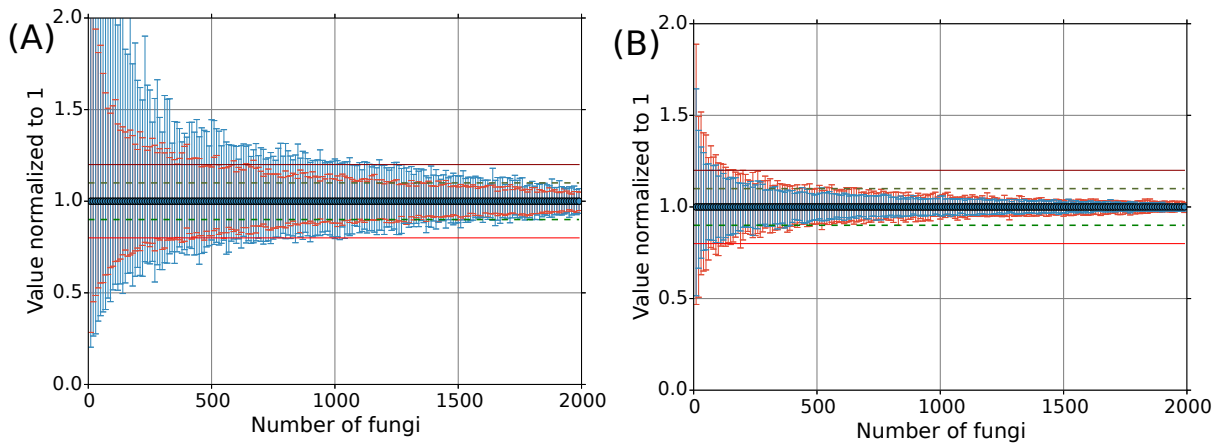


Figure II.2.g: Impact of the number of fungi on quantification of two morphological criteria: (A) projected area and (B) hyphal growth unit (HGU).

(A): Projected area; (B): HGU; in red: quantiles 50; in blue: quantiles 90; maximum and minimum values are respectively represented by upper and lower bars; continuous lines: 20% gap from the mean value; dashed lines: 10% gap from the mean value. All data are normalized with corresponding mean values.

#### II.2.2.4.2. Impact of shear stress on fungus morphology

**Growth kinetics** According to the experimental design, two batch cultures of *T. reesei* (cultures 1 and 2) were conducted under the same conditions in order to quantify the repeatability of this image analysis method. Biological replicates were similar in terms of kinetics of growth and glucose consumption (Fig. II.2.h). Within 43 hours of cultivation, biomass concentration increased from  $0.82 (\pm 0.02) \text{ g.kg}^{-1}$  to  $13.5 (\pm 0.3) \text{ g.kg}^{-1}$ , whereas glucose concentration decreased from  $51.1 (\pm 0.5) \text{ g.L}^{-1}$  to  $19.9 (\pm 0.9) \text{ g.L}^{-1}$ . The maximum specific growth rates were also similar, at  $0.065 (\pm 0.0005) \text{ h}^{-1}$ . These data thus confirmed that the two cultures were close, thus allowing further comparison of the morphology.

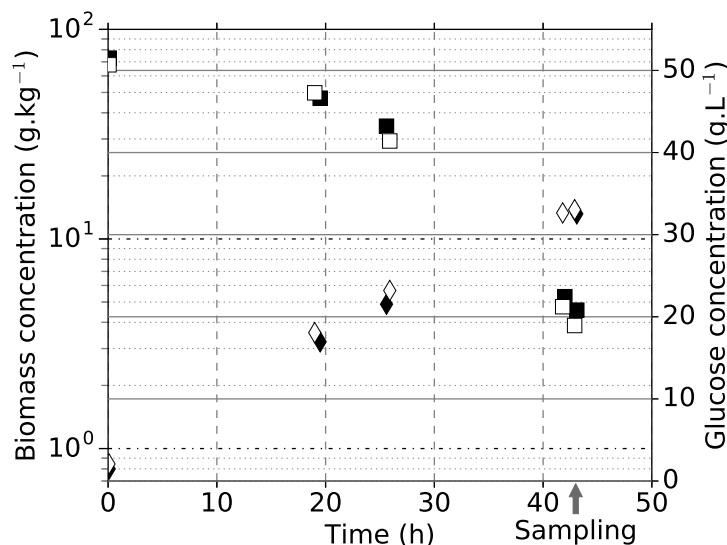


Figure II.2.h.: Time course of biomass and glucose concentrations during batch fermentations of *T. reesei*.

Biomass concentration (diamonds); glucose concentration (squares); white and black marks refer to two replicates.

**Influence of shear stress on rheological properties** Culture samples were recovered after 43 h and submitted to a high shear stress with Ultra-Turrax (samples S), or remained unsheared (samples U). The rheological properties of these two kinds of samples were affected by these treatments, as shown on Fig. II.2.i The dynamic viscosity of high-sheared samples was significantly lower compared to that of the control samples. At a shear rate of  $10 \text{ s}^{-1}$ , the dynamic viscosity of the sheared samples (S) was equal to  $0.19 (\pm 0.03) \text{ Pa}\cdot\text{s}$  and  $0.29 (\pm 0.05) \text{ Pa}\cdot\text{s}$ , whereas it was equal to  $0.85 (\pm 0.11) \text{ Pa}\cdot\text{s}$  and  $0.70 (\pm 0.10) \text{ Pa}\cdot\text{s}$  for the unsheared samples (U). Even if the repeatability of viscosity data between the two batches was limited, a significant difference was obtained between the two kinds of samples. As confidence intervals overlapped, the unsheared samples were considered as repeatable. The larger gap that concerned the sheared samples was explained by the difficulty to control the time during which the disperser was used to apply the shear stress, as a consequence of foaming. Consequently, for further analyses, unsheared samples will be considered as similar whereas sheared samples will not.

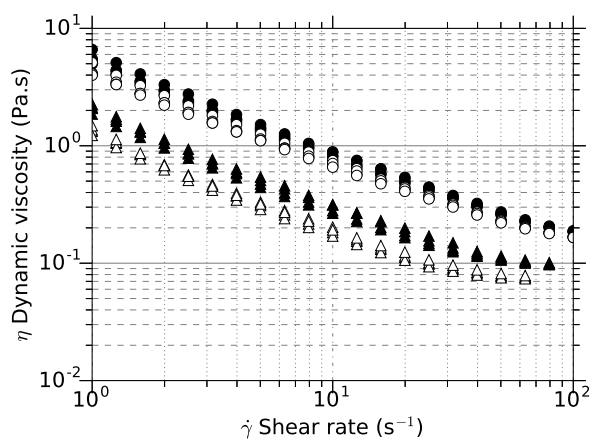


Figure II.2.i.: Dynamic viscosity versus shear rates for culture samples of unsheared *T. reesei* fungi following fermentation and fungi submitted to a subsequent high shear stress.

Sheared samples (triangles); unsheared samples (circles); white and black marks refer to two replicates, from two different cultures.

**Influence of shear stress on morphological criteria** In order to identify morphological parameters which are able to discriminate between fungi submitted to the two different shearing conditions, various morphological criteria were quantified and submitted to statistical treatments. To be relevant, criteria had to exhibit significant differences between samples S and U, but not significant difference between replicates of samples U. As replicates of samples S were not sufficiently repeatable, they were not compared in this study.

The cumulative distribution functions of six selected morphological criteria are shown on Fig. II.2.j. Their behaviour changed according to the criteria under consideration and to whether or not a subsequent shear stress was applied. By considering the number of holes (Fig. II.2.j A and B), the hyphal growth unit (Fig. II.2.j D) and the maximum internodal length (Fig. II.2.j E), the cumulative distribution functions were lowered when a high shear stress was applied. On the contrary, the parameter mean branch length (Fig. II.2.j F) was unaffected and the parameter minimum branch length (Fig. II.2.j C) was increased by the shear stress.

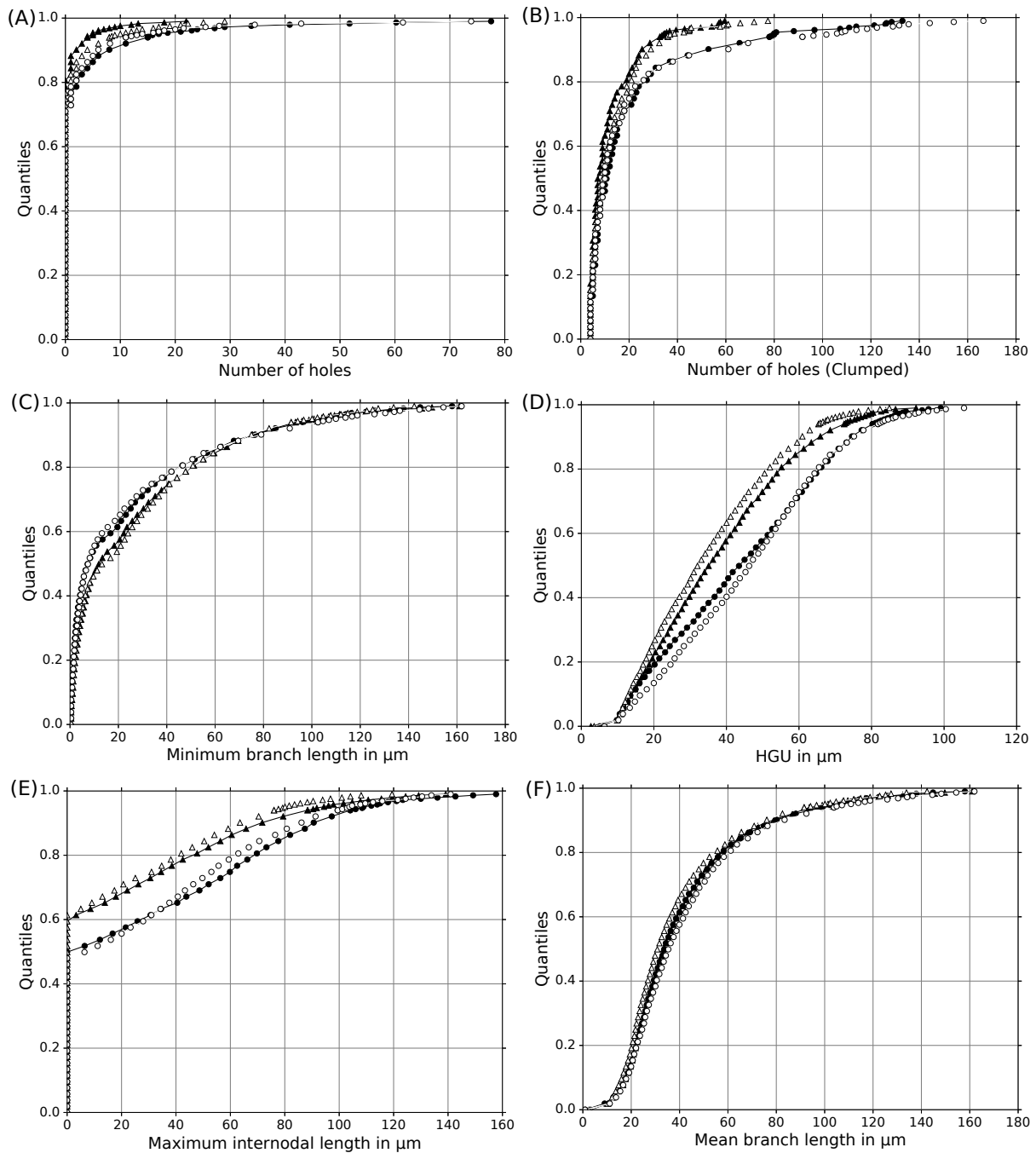


Figure II.2.j: Cumulative distribution functions of six morphological criteria comparing un-sheared samples and those obtained after applying a high shear stress.

Sheared samples (triangles); un-sheared samples (circles); (A): number of holes per fungus for the total population; (B): number of holes per fungus for clumped fungi; (C): minimum branch length per fungus considering total population; (D): hyphal growth unit (HGU) of total population; (E): maximum internodal length of total population; (F): mean branch length of total population; white and black marks refer to two replicates, from two different cultures.

Table II.2.iii.: Comparison of cumulative distribution functions of unsheared samples compared to those obtained after applying a high shear stress, according to two-sample Kolmogorov-Smirnov tests.

Criteria	<i>p</i> -value of KS test				
	Sample 1.U vs 2.U	Sample 1.S vs 1.U	Sample 2.S vs 1.U	Sample 2.S vs 2.U	Sample 1.S vs 2.U
number of holes	<b>0.808</b>	$4.32 \times 10^{-11}$	$2.59 \times 10^{-5}$	$3.36 \times 10^{-4}$	$3.38 \times 10^{-11}$
minimum internodal length	<b>0.634</b>	$1.24 \times 10^{-11}$	$1.95 \times 10^{-24}$	$1.91 \times 10^{-21}$	$6.87 \times 10^{-17}$
filling ratio	<b>0.553</b>	$1.46 \times 10^{-12}$	$2.36 \times 10^{-4}$	$9.65 \times 10^{-6}$	$7.59 \times 10^{-12}$
minimum branch length	<b>0.410</b>	$3.51 \times 10^{-10}$	$1.35 \times 10^{-12}$	$1.47 \times 10^{-7}$	$3.47 \times 10^{-9}$
geometric ratio	<b>0.291</b>	$4.79 \times 10^{-13}$	$7.19 \times 10^{-11}$	$2.08 \times 10^{-11}$	$1.87 \times 10^{-13}$
standard deviation of holes' area	<b>0.256</b>	$6.17 \times 10^{-12}$	$1.19 \times 10^{-2}$	$8.28 \times 10^{-6}$	$9.58 \times 10^{-9}$
mean surface area of holes	<b>0.247</b>	$5.44 \times 10^{-13}$	$1.17 \times 10^{-4}$	$6.68 \times 10^{-7}$	$4.51 \times 10^{-12}$
maximum internodal length	<b>0.058</b>	$3.83 \times 10^{-14}$	$2.28 \times 10^{-24}$	$8.73 \times 10^{-22}$	$3.17 \times 10^{-16}$
minimum radius of filled CC	<b>0.054</b>	$4.76 \times 10^{-14}$	$3.31 \times 10^{-19}$	$1.32 \times 10^{-9}$	$4.60 \times 10^{-14}$
mean branch length	<b>0.050</b>	<b>0.998</b>	$9.42 \times 10^{-6}$	$4.54 \times 10^{-11}$	$2.87 \times 10^{-2}$
number of nodes	0.014	$9.35 \times 10^{-13}$	$1.44 \times 10^{-21}$	$5.39 \times 10^{-12}$	$1.60 \times 10^{-18}$
number of tips	0.007	$3.39 \times 10^{-14}$	$2.69 \times 10^{-22}$	$2.16 \times 10^{-13}$	$8.71 \times 10^{-17}$
surface area	0.002	$1.56 \times 10^{-19}$	$1.61 \times 10^{-49}$	$4.21 \times 10^{-27}$	$1.18 \times 10^{-27}$
hyphal growth Unit	0.001	$9.52 \times 10^{-24}$	$5.06 \times 10^{-61}$	$1.66 \times 10^{-41}$	$8.16 \times 10^{-35}$
total length	$1.30 \times 10^{-4}$	$4.66 \times 10^{-21}$	$1.76 \times 10^{-57}$	$2.16 \times 10^{-28}$	$2.47 \times 10^{-32}$

*S* refers to sheared sample; *U* refers to unsheared samples; data in bold correspond to *p*-value of KS tests higher than 0.05.

As these distribution functions seemed to be non-normal, KS tests were conducted to select relevant criteria without subjectivity (Table II.2.iii). Among the 31 morphological criteria that were measured with the FACE algorithm and calculated, only 10 had a *p*-value higher than 0.05 for the KS tests applied to the cumulative distribution functions of the two unsheared samples (samples U). This comparison indicated that these duplicates could be considered as similar, according to these 10 criteria. In addition, the minimum branch length and the maximum intermodal length were the only criteria that did not exhibit difference between the two sheared samples (1.S and 2.S), confirming that they were not similar. The other 21 criteria, in contrast, displayed significantly different values for the two unsheared samples, thus indicating that they were not relevant to recognise a duplicate sample. KS tests were also carried out to compare the cumulative distribution functions of these criteria, applied to unsheared and sheared samples. As the *p*-value were lower than 0.05 for all criteria (except for the parameter 'mean branch length' with samples 1.S and 1.U), the samples U and S were considered as different, as a consequence of the dissimilar shear stress they suffered.

Finally, from this statistical analysis, nine relevant morphological criteria were kept: number of holes, minimum internodal length, filling ratio, minimum branch length, geometric ratio, standard deviation of holes' area, mean surface area of holes, maximum internodal length and minimum radius of filled connected components. By considering the parameter HGU that is often used in the literature to characterize the morphology of fungi, the KS test applied to unsheared samples revealed a significant difference of HGU distribution functions between replicates (Fig. II.2.j D). However, this difference was mainly seen for the low values of HGU (<40  $\mu\text{m}$ ) of the fungi. Consequently, this



parameter was not further retained to differentiate between unsheared and sheared samples.

Finally, the shear stress also impacted on the relative proportion of each morphological class of fungus. The average percentages of entangled fungi were lower in sheared samples ( $10.9\% \pm 0.2\%$ ) than in unsheared samples ( $13.0\% \pm 1.1\%$ ). Clumped fungi were also less represented in sheared samples ( $8.8\% \pm 2.1\%$  instead of  $15.1\% \pm 1.1\%$ ), but unsheared samples displayed a higher proportion of unbranched fungi ( $42.8\% \pm 1.7\%$ ) instead of  $33.0\% \pm 2.8\%$ . Only the proportion of branched fungi was not affected by the shear stress ( $37.6\% \pm 4\%$  vs.  $38.8\% \pm 2.7\%$ ).

### II.2.2.5. Discussion

From the results obtained in this study, an efficient image analysis method was developed. By combining experimental data with statistical analyses, it was possible to discriminate samples of fungi previously submitted to different shear stress conditions, and to recognise similarities in fungi obtained under similar conditions. However, the majority of morphological parameters was not normally distributed (e.g. Fig. II.2.j), thus preventing the utilisation of averages to sum up data, as previously expressed by Posch, Spadiut & Herwig (2012). Consequently, the use of median or other quantiles have been shown to be more appropriate.

The statistical Kolmogorov-Smirnov test was used in this work to statistically identify morphological parameters that permit discrimination between different fungi. The KS test permitted nine morphological parameters to be selected from the 31 parameters extracted by the skeleton approach (4 parameters) and the topological approach (5 parameters). This result brought to light the importance of considering these two kinds of morphological parameters to well characterise the fungus morphology.

The parameter 'hyphal growth unit' that is considered as relevant by numerous authors (Barry et Williams, 2011; Choy, Patel et Thibault, 2011), was not selected by the KS test because of the differences exhibited between the two replicates of unsheared conditions. However, that was only true for low HGU values ( $<40\ \mu\text{m}$ ). As HGU is an important morphological parameter in a lot of literature studies, it is suggested, from the distribution shown in Fig. II.2.j D, that the quantile 70 (q70) could be a good candidate to sum up HGU data. Other morphological parameters were pointed out by Jüsten et al. (1996) (total hyphal length and projected area) and Krull & Bley (2015) (pellet diameter equivalent to the mean radius of filled CC) but were not significant from the KS tests, which could be explained by the different shapes of the two fungus strains.

This proposal has to be confirmed by morphological analysis of new samples, obtained from other shearing conditions.

A negative impact of shear stress was demonstrated on the relative proportions of entangled or clumped fungi. This difference was confirmed by considering morphological parameters corresponding to holes that characterised those fungus classes. Holes linked criteria refer indirectly to the span of a fungus. As fungi are foldable objects, the more important size of these objects was related to their complex fold and consequently to their high number of holes. Nevertheless, for more compact morphologies, other criteria may be more relevant to describe the span of fungus. Holes were due to fungus overlapping during the acquisition of the image, but they seemed to be informative cri-

teria. Consequently, these holes linked criteria, together with the parameters geometric ratio, the minimum radius of filled connected components and the maximum intermodal length corresponded to the expression of the span of the fungi. This observation is in agreement with polymer rheology theory, which explains how the radius of gyration of an object (such as a polymer) is important to explain the viscosity of a solution at the overlap concentration (Teraoka, 2002).

Counter intuitively, the minimal branch length of fungus was bigger for unsheared samples than for sheared ones (Fig. II.2.j C), whereas the mean branch length was unchanged and the maximum intermodal length was lowered. This result could be explained by the fact that shear stress not only cut fungus but also stripped small branches off the longer fungi branches since the mean length does not change much.

### II.2.2.6. Conclusion and perspectives

The new image analysis method developed in this work allowed samples of fungi that had experienced different levels of shear stress to be distinguished. The FACE algorithm allowed extended depth of field images of fungi with “spreadable morphology” to be created. Because this new method is fully automated, a higher number of objects than that commonly encountered in this kind of analysis could be included in the data analysis. In addition, many morphological characteristics were extracted using a skeleton approach and a topological analysis. Nine of these morphological characteristics were shown to be statistically different when data from sheared and unsheared samples were confirmed. A similar difference was observed in the rheological properties of the medium from a fermentation (unsheared) and the same medium when exposed to subsequent high shear stress (sheared), indicating that this difference was a result of these modifications to the fungus morphology.

In the future, this image analysis method will be applied to the biomass obtained from a wide range of fermentation conditions. In addition, rheological properties from the same fermentations will be measured along with a variety of biological parameters such as productivity and nutrient utilisation. A combination of all this information is required in order to establish correlations between morphological and rheological property data; and more importantly, to aid understanding of these mycelial fermentation processes and agitation intensity (shear stress). The end goal is to allow more scientifically-based scale-up from the laboratory to the industrial scale that still cannot be undertaken with confidence.

### II.2.2.7. Acknowledgments

The authors acknowledge the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME, Angers, France) for financial support of PhD of Nicolas Hardy and Dr. Abdelaziz Faraj for precious advices in statistics.

### II.2.3. Conclusion, commentaires et perspectives

Une méthode automatisée permettant l'obtention des critères caractérisant la morphologie d'une population de *T. reesei* en culture a été développée. Elle combine l'utilisation de mosaïques d'images (axes x et y) et de projection de piles d'images à deux dimensions dans une troisième dimension (axe z). Elle se divise en trois phases de réalisation : (1) création d'une image nette en tous points à l'aide d'un algorithme innovant appelé FACE (Fast mean Absolute difference with Confidence propagation for Extended depth of field) ; (2) segmentation des champignons afin de discriminer les objets de l'image du bruit de fond ; (3) extraction de critères morphologiques à l'aide d'une analyse par squelette qui permet d'accéder aux grandeurs rencontrées dans la littérature (nombre de branches, nombre de nœuds...) et d'une analyse typologique qui permet d'accéder à des grandeurs de type surface et géométrie (plus rares).

La capacité de la méthode à discriminer des échantillons ayant subi des contraintes de cisaillement différentes a été évaluée. Sur les 31 critères évalués, neuf permettent, après validation statistique, une bonne discrimination des échantillons ayant subi, ou non, un fort cisaillement. Parmi eux, quatre ont un rapport avec les « holes » c'est-à-dire les boucles formées par le chevauchement des hyphes d'un même champignon. Ainsi, les échantillons les plus cisailés sont ceux qui comportent le moins de « holes ». C'est la première fois qu'un lien entre le comportement rhéologique rhéofluidifiant d'un moût de fermentation de *T. reesei* et ces critères morphologiques est rapporté.

Ces résultats obtenus conduisent à proposer une analyse et des perspectives complémentaires à celles présentées dans l'article. Une analogie avec la rhéologie des solutions de polymères permet de proposer une explication à l'existence des liens observés.

La viscosité d'une solution de polymères augmente avec la concentration de ces derniers (Figschepoly). La fonction qui relie la viscosité à la concentration d'un polymère définit des domaines correspondant, respectivement, à une solution diluée, semi-diluée ou concentrée (Teraoka, 2002). Ces domaines sont identifiés par les notions de concentration critique de recouvrement ( $C^*$ ) ou de concentration critique d'enchevêtrement ( $C^{**}$ ) (Teraoka, 2002). L'évolution de la viscosité en fonction de la concentration en polymère pour une solution diluée évoluant vers un régime semi-diluée est la plus décrite. Elle est gouvernée par la notion de rayon de giration qui caractérise des pelotes statistiques fournissant chacune leur contribution à la viscosité de la solution (Poinot, 2013). Lorsque la concentration est augmentée pour atteindre une valeur proche de  $C^*$ , les pelotes formées par les polymères se touchent et la viscosité est principalement gouvernée par ces contacts (Teraoka, 2002). Quand la concentration est encore augmentée pour devenir concentrée, les pelotes s'interpénètrent davantage et, au-delà de  $C^*$ , forment un réseau (Gillet *et al.*, 2014 ; Teraoka, 2002). Dans ce dernier cas, à masses égales, la viscosité de la solution de polymère est pilotée par leur structure s'ils sont branchés (Graessley, 1977). De plus, Graessley W. précise que pour une solution polydispersée, l'effet des plus petites chaînes est négligeable face à celui des plus grandes (Graessley, 1974). L'évolution de la viscosité de polymères branchés de structures différentes est schématisée sur la figure II.2.k.

À l'échelle près (micrométrique pour les champignons et nanométrique pour les polymères), les filaments de *T. reesei* en solution peuvent être rapprochés par analogie (Annexes) à une solution concentrée de polymères polydispersés à chaînes branchées (figure II.2.l). L'organisation des ré-

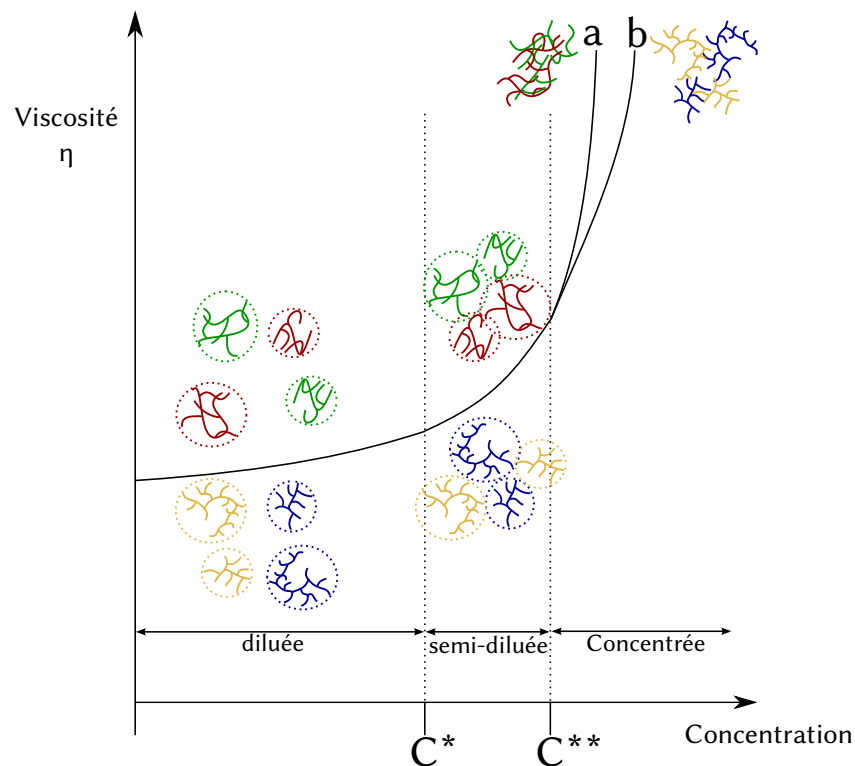


FIG. II.2.k : Schéma de l'évolution de la viscosité en fonction de la concentration d'une solution de polymères branchés.

$C^*$  : concentration critique de recouvrement,  $C^{**}$  : concentration critique d'enchevêtrement. Les polymères représentés par les courbes (a) et (b) ont la même masse moléculaire. Les polymères de la courbe (a) ont moins de branches donc des branches plus longues (polymères verts et rouges) que ceux de la courbe (b) (polymères bleus et jaunes).

seaux de polymère ou de champignon n'est pas directement accessible. Cependant, ils dépendent de la structure des unités les composant (Clasen et Kulicke, 2001). Or cette structure individuelle est maintenant accessible avec la méthode d'analyse d'images nouvellement développée.

La comparaison entre polymère et champignon invite à s'intéresser aux plus gros objets de la population et à chercher à caractériser la structure (ou morphologie) des champignons. Nous pensions initialement que la longueur des branches et les longueurs extrêmes (géodésiques et euclidiennes) seraient pertinentes pour expliquer la viscosité. Cela ne semble pas être le cas pour la souche de champignon étudiée. Cela peut s'expliquer par le phénomène suivant, plus le champignon a une grande taille, plus il est susceptible de se replier sur lui-même et donc de former un grand nombre de boucles. De plus, l'observation de ces boucles est favorisée par la méthode d'analyse d'images utilisée, car elle nécessite la mise de l'objet entre lame et lamelle ainsi que la projection en deux dimensions de sa structure 3D. De ce fait, les critères relatifs à la surface de toutes les boucles, au nombre de boucles, au rapport entre la surface de champignon et la surface des boucles pourraient donc indirectement rendre compte de la taille caractéristique de l'objet en suspension qui n'est pas accessible du fait du repliement du champignon sur lui-même. Cela expliquerait le fait que, plus le nombre de boucles est important, plus le moût est visqueux ce qui, pour les polymères, correspond à l'effet de l'augmentation de la masse moléculaire. De plus, cette hypothèse est cohérente avec le comportement rhéofluidifiant des moûts qui serait induit par des phénomènes d'enchevêtrement

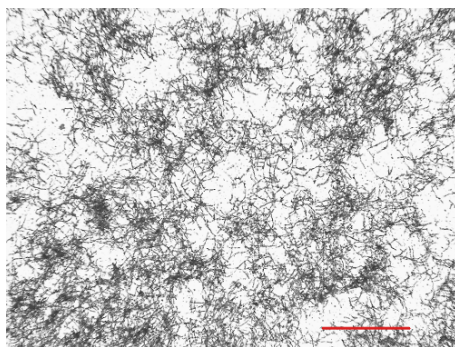


FIG. II.2.1. : Observation d'un réseau de filaments de *T. reesei*.

Réalisée avec un microscope optique inversé (Motic AE21, Xiamen, Chine) sur un moût de fermentation avec une concentration en biomasse de  $2 \text{ g.L}^{-1}$ . La barre rouge correspond à  $100 \mu\text{m}$

et de rupture de cet enchevêtrement entre les champignons (Marten *et al.*, 1996 ; Metz, Kossen et van Suijdam, 1979). En effet, la capacité des champignons à se replier, et donc à former des boucles, pourrait favoriser l'enchevêtrement avec un filament voisin et donc la formation d'un réseau.

Il convient cependant de limiter l'application des critères morphologiques en rapport avec les boucles à la souche de *T. reesei* utilisée (souche Tr3002), car cette dernière a tendance à former des filaments plus longs que d'autres souches testées dans notre laboratoire (notamment les souches PC3-7 et PC1-4). Il serait donc intéressant de vérifier, pour ces autres souches, si la taille caractéristique expliquant la viscosité correspond à la longueur euclidienne ou à la longueur géodésique extrême. L'étude comparative de l'évolution de la viscosité en fonction de la fraction volumique (concentration) a été initiée (Annexes) pour comparer des souches présentant des morphologies différentes.

L'accès à des mesures fiables de la morphologie des champignons, couplé à un outil adapté pour caractériser le comportement rhéologique des moûts de fermentation était un prérequis nécessaire aux études permettant de comprendre le lien entre les conditions hydrodynamiques présentes dans le bioréacteur et les phénomènes de croissance et de production d'enzymes cellulolytiques par *T. reesei*. Cette compréhension, qui est elle-même indispensable à l'extrapolation du procédé de production de cellulases, fera l'objet de la suite du travail de thèse.

## Troisième partie

Mise en œuvre d'une approche *scale-down*  
pour évaluer l'impact du cisaillement sur le  
procédé de production de cellulases



L'objectif de cette partie de l'étude est de mieux comprendre les interactions entre le microorganisme et son environnement, notamment lors de sa mise en œuvre industrielle. La démarche retenue consiste à reproduire au laboratoire les contraintes de cisaillement rencontrées dans l'environnement industriel afin d'étudier leur impact sur la croissance du microorganisme, sa morphologie, sa capacité à produire des enzymes ainsi que sur la rhéologie des milieux.





# III.1. Étude de l'impact des forts cisaillements sur la croissance de *Trichoderma reesei*

## III.1.1. Introduction

Dans un premier temps, l'impact de forts cisaillements a été évalué sur la phase de croissance du champignon filamenteux, réalisée en procédé batch à l'échelle du laboratoire. Pour ce faire, différents mobiles d'agitation sont mis en œuvre, à différentes vitesses d'agitation, afin de générer des contraintes de cisaillements variées. Les résultats obtenus sous ces différentes contraintes permettent ensuite de définir des critères pertinents pour décrire le cisaillement dans le bioréacteur, et de relier ces critères aux variables d'intérêt du procédé. Une comparaison de ces critères est finalement présentée, dans un objectif d'extrapolation du bioprocédé en considérant le cisaillement, et validée à l'aide de données issues d'une production réalisée à l'échelle industrielle.

Cette partie de la thèse étant destinée à être publiée, elle est présentée sous la forme d'un article scientifique en anglais, non encore soumis.

## III.1.2. Évaluation de l'impact des paramètres d'extrapolation du cisaillement sur la croissance de *T. reesei*

### Scale-up parameters for growth of *Trichoderma reesei* in stirred tank bioreactor

Nicolas Hardy<sup>1-2-3</sup>, Frédéric Augier<sup>2</sup>, Alvin Nienow<sup>4</sup>, Catherine Béal<sup>3</sup>, Fadhel Ben Chaabane<sup>1</sup>

<sup>1</sup>IFP Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison, France

<sup>2</sup>IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP3, 69360 Solaize, France

<sup>3</sup>UMR 782, AgroParisTech INRA, 1 avenue Lucien Brétignières, 78850 Thiverval-Grignon, France

<sup>4</sup>School of Chemical Engineering University of Birmingham, Edgbaston, Birmingham B15 2TT, United Kingdom

**Summary** Extrapolation of fermentation processes involving aerobic filamentous fungi remains a challenging issue for the biotechnology industry. These microorganisms are shear sensitive, whereas they grow in the form of filaments that modify the viscosity of the broth thus reducing mass transfers, which have to be compensated by increased agitation conditions. In order to better understand the impact of shear stress on the fungus *Trichoderma reesei* used for cellulases production, a wide range of shearing conditions (including high shear stress) were explored during lab-scale cultures. This approach has resulted in the calculation of three different shear stress criteria: tip speed, power draw per unit of volume and Energy Dissipation/Circulation Function (EDCF). These criteria were used to define correlations in order to estimate the viscosity of the broth, as well the maximum growth rate and a morphological parameter of the fungus. EDCF appeared to be the best criterion for the process extrapolation, as it allowed obtaining better estimations when using correlations, thus permitting important variables to be predict at large scale.

### III.1.2.1. Introduction

Biofuels are candidates to substitute oil with a lower carbon footprint. Among them, bioethanol is the most consumed biofuel in the world (Simbolotti, 2007) and bioethanol from lignocellulosic resources (also called second generation bioethanol) appears to be a good candidate to reduce CO<sub>2</sub> production (Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006). The biotransformation of lignocellulosic biomass involves the utilization of specific enzymes named cellulases (Bischof, Ramoni et Seiboth, 2016), which are needed to degrade cellulose into simple and fermentable sugars. However, the cost of these enzymes is one of the limiting factor of bioethanol production from cellulolytic materials. A rough calculation, considering a world consumption of 1 billion tons of gasoline per year (985 Mtep in 2013 from IFPEN (2016)), a cellulases consumption around 3 % (w/w) of the produced bioethanol (Humbird *et al.*, 2011) and an energetic density ratio of 0.7 for ethanol against gasoline, leads to an impressive world consumption of 27 Mtons of cellulases per year in order to substitute gasoline by second generation bioethanol. Of course, replacing all gasoline by second generation bioethanol is unrealistic but this calculation shows that cellulases requirements will increase considerably in the future. To tackle this challenge, two things must be done. Firstly, the efficiency of the enzymatic cocktail has to be improved in order to reduce the amount of enzymes needed during the hydrolysis (Ayrinhac *et al.*, 2011). Secondly, the production capacity has to be developed by means of an efficient process optimization and scale-up strategy (Percival Zhang, Himmel et Mielenz, 2006).

Nowadays, cellulases production is mainly performed with the filamentous fungus *Trichoderma reesei* (Gusakov, 2011). This microorganism is known for its high cellulases secretion capacity and productivity (Gusakov, 2011). An efficient protocol of cellulases production (Warzywoda, Ferre et Pourquie, 1988) consists in two phases: a batch phase and a fed-batch phase. The fungus first grows during the batch phase, with sugar and nutrients in excess, in order to produce a large concentration of cellular biomass. In the subsequent fed-batch phase, a limiting rate of sugar is fed continuously to the bioreactor to favour the enzyme synthesis.

Despite their high productivity, *T. reesei* fermentations are difficult to scale-up due to the complex rheology of the broth (Amanullah, Buckland et Nienow, 2004). The hyphal development induces an increase of the broth viscosity with a shear thinning behavior (Hardy *et al.*, 2015; Gabelle *et al.*, 2012; Malouf *et al.*, 2013). This behavior induces changes in the hydrodynamic of the broth that may lead to heterogeneities and caverns formation in the bioreactor (Amanullah, Buckland et Nienow, 2004; Stocks, 2013; Marten *et al.*, 1996). The increase of viscosity also strongly affects mass transfers (Gabelle *et al.*, 2012) whereas *T. reesei* is strictly aerobic. To ensure a sufficient oxygen transfer, the power input and/or the gas velocity have to be increased, which will result in an increase of the shear stress. However, because of their sizes, filamentous fungi are shear sensitive (Serrano-Carreón *et al.*, 2015). So the fungus morphology impacts process parameters, whereas process conditions affect in return the fungus morphology.

Despite significant advances in understanding these interrelations were made in the past (Amanullah, Buckland et Nienow, 2004; Jüsten *et al.*, 1996), their impact on industrial processes is still not fully understood, especially because shearing conditions change with production scale (Stocks, 2013). All those elements show that the scale-up of the process is complex and that shearing condi-

tions have to be included to scale-up process involving filamentous fungus as *T. reesei*.

The shear stress that affects the microorganism morphology and possibly its productivity in a bioreactor is an unclear concept. Depending on the author, this parameter can be defined either by the maximum shear stress, by the mean shear stress in the vessel or by a the concept of “energy dissipation/circulation function” EDCF (Gabelle *et al.*, 2012; Sánchez Pérez *et al.*, 2006).

A simple rule of thumb commonly used in biology considers that the maximum shear stress is fairly described by the tip speed of the impeller ( $V_{\text{tip}}$ , in  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ).  $V_{\text{tip}}$  is given by (Eq. III.1.1):

$$V_{\text{tip}} = \pi \times N \times D \quad (\text{III.1.1})$$

With  $D$  the diameter of the impeller (in  $\text{m}$ ) and  $N$  the rotation speed (in  $\text{s}^{-1}$ ).

Otherwise, one can consider that the average shear rate is a relevant criteria. In that case, in laminar flow the famous Metzner-Otto approach (Metzner, A. et Otto, R., 1957) can be used, but in the turbulent regime, the average shear rate is linked to dissipation rate and viscosity of the liquid. The power draw per unit of volume ( $P/V$ , in  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$ ) is generally considered as a good marker of the average shear rate (Sánchez Pérez *et al.*, 2006). The  $P/V$  is calculated with the power draw ( $P$ , in  $\text{W}$ ) (Eq. III.1.2)(Stocks, 2013):

$$P = N_p \times \rho \times N^3 \times D^5 \quad (\text{III.1.2})$$

With  $N_p$  the power number of the impeller (dimensionless) and  $\rho$  the density (in  $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$ ).

Alternatively to these previous simple approaches, the concept of EDCF was proposed by Smith *et al.* (1990) to express agitation intensity that impacts fungus morphology. This concept depends on the energy dissipated in the region of the impellers and the frequency of the passage of the mycelium through the impeller area (Serrano-Carreón *et al.*, 2015). However, this function allows the evaluation of the hydrodynamic effect of Rushton turbines only. Jüsten *et al.* (1996) modified EDCF to include an additional geometrical factor ( $k$ ) that allows different kinds of impellers to be compared, in addition to the effect of the specific energy dissipation in the impeller swept volume (Eq. III.1.3):

$$\text{EDCF} = \left( \frac{P}{k \times D^3} \right) \times \left( \frac{1}{t_c} \right) \quad (\text{III.1.3})$$

With EDCF (in  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ ),  $k$  a constant (dimensionless) that depends on the geometry of the impeller and  $t_c$  the circulation time (in  $\text{s}$ ) that is obtained from (Eq. III.1.4):

$$t_c \simeq \frac{V}{N_f \times N \times D^3} \quad (\text{III.1.4})$$

With  $V$  the liquid volume (in  $\text{m}^3$ ) and  $N_f$  the Flow number of the impeller (dimensionless).

The power draw in the swept volume is used in Eq. III.1.3 to represent the energy ‘perceived’ by the fungus during its passage through the impeller. From Amanullah *et al.* (2000) and Jüsten *et al.* (1996), the EDCF concept is very pertinent to describe the impact of shear stress on the morphology of filamentous fungi, but one difficulty is to determine the value of the parameter  $k$  for complex impellers.

The EDCF concept can then be applied by using the ratio between the maximal dissipation rate ( $\epsilon_{\max}$ ) and the circulation time ( $t_c$ , in s), thus leading to the concept of  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  (in  $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ ) (Eq. III.1.5):

$$\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}} = (\epsilon_{\max} \times \rho) \times \left(\frac{1}{t_c}\right) \quad (\text{III.1.5})$$

The maximum local energy dissipation ( $\epsilon_{\max}$ ) was calculated using the correlation of Grenville and Brown (2012) (Eq. III.1.6):

$$\epsilon_{\max} = 1,04 \times N_p^{\frac{3}{4}} \times N^3 \times D^2 \quad (\text{III.1.6})$$

In this work, these three representations of shear stress will be considered from a wide range of fermentation conditions at laboratory scale, in order to develop relevant correlations to describe rheological properties of the broth, growth kinetics and morphological parameters of *T. reesei*. Some studies have already explored the relationships between *T. reesei* morphology, rheology and biomass concentration as a function of rotation speed (Malouf *et al.*, 2013). Other studies are focused on the impact of agitation intensity and agitation devices on cellulases production (Patel *et al.*, 2009; Marten *et al.*, 1996). But to our knowledge, there are no studies available on the extrapolation of *T. reesei* cultures from the laboratory scale to the industrial scale. In addition, as Quintanilla *et al.* (2015) underlined, most of published studies on filamentous fermentation were done under conditions that are quite different from industrial ones (low-producing strains, growth with substrate and/or oxygen limitations, utilization of pure substrates, not optimized processes,...).

The goal of this work is to allow more scientifically based scale-up of filamentous fungi fermentations, by studying the impact of shear stress on *T. reesei* growth and by characterizing the links between fungus morphology, rheology of the broth and process conditions. To be as significant as possible for scaling up, it will be this carried out under industrial conditions.

### III.1.2.2. Materials and methods

#### III.1.2.2.1. Biological Model

**Fungus strain** The industrial strain of *Trichoderma reesei* Tr3002 (IFPEN culture collection) was used. It derived from the strain *T. reesei* CL847 obtained by classical and molecular genetics (Durand, Clanet et Tiraby, 1988). It displayed an improved  $\beta$ -glucosidase gene, a hyperproducing cellulases capacity and was glucose-derepressed (Ayrinhac *et al.*, 2011). Conservation was made in spores form at a concentration of  $2 \times 10^7$  colony forming units per milliliter. Spores were stored on frozen form in water added with 50 % glycerol, at  $-80^\circ\text{C}$ .

**Culture media** The preculture medium was composed of di-potassium phthalate  $0.02 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ ,  $2 \text{ H}_2\text{O}$ )  $1.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{CuSO}_4$ ,  $5 \text{ H}_2\text{O}$ )  $2.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ )  $5.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{ZnSO}_4$ ,  $7 \text{ H}_2\text{O}$ )  $6.72 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ ,  $6 \text{ H}_2\text{O}$ )  $7.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{FeSO}_4$ ,  $7 \text{ H}_2\text{O}$ )  $24 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $12 \text{ H}_2\text{O}$ )  $92 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{CaCl}_2$ ,  $2 \text{ H}_2\text{O}$ )  $0.48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{MgSO}_4$ ,  $7 \text{ H}_2\text{O}$ )  $0.48 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ; ( $\text{NH}_4$ )<sub>2</sub> $\text{SO}_4$   $2.24 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 %  $2.4 \text{ mL}\cdot\text{L}^{-1}$ ;  $\text{KOH}$   $1.33 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  and corn steep solid  $2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ . pH was adjusted to 5.25 with  $\text{NaOH}$   $7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ .

For bioreactor cultivation, the culture medium included ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2 \text{H}_2\text{O}$ )  $1 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{CuSO}_4, 5 \text{H}_2\text{O}$ )  $3.0 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{ZnSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ )  $8.4 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ )  $6.4 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{Co}(\text{NO}_3)_2, 6 \text{H}_2\text{O}$ )  $9 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{FeSO}_4, 7 \text{H}_2\text{O}$ )  $30 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$ )  $115 \text{ mg.L}^{-1}$ ; ( $\text{CaCl}_2, 2 \text{H}_2\text{O}$ )  $0.6 \text{ g.L}^{-1}$ ; ( $\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   $2.8 \text{ g.L}^{-1}$ ;  $\text{H}_3\text{PO}_4$  85 %  $3 \text{ mL.L}^{-1}$ ;  $\text{KOH}$   $1.66 \text{ g.L}^{-1}$ ; corn steep solid  $2 \text{ g.L}^{-1}$ . Antifoam SB2121 from Strucktol (Hamburg, Deutschland) was added at 1‰ (v/v) and pH was adjusted with  $\text{NH}_3$  10.25 % (v/v) to 4.8.

All media were sterilized by autoclaving at  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  during 20 min.

**Precultures** A volume of 250 mL of preculture medium was prepared in a 2 L Fernbach flask by mixing 225 mL of preculture medium and 25 mL of a sterile glucose solution at  $250 \text{ g.L}^{-1}$ . The flasks were seeded with 1 mL of thawed spores and incubated in a shaker Multitron II (Infors, Bottmingen, Switzerland) at  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  for 70 h. The agitation was set to 180 rpm with an orbital of 50 mm.

**Cultivation at lab-scale** The preculture was used to inoculate a 3,5 L bioreactor (IFPEN, Rueil-Malmaison, France) containing 2.5 L culture medium (1.75 L of culture medium and 500 mL of sterile industrial grade glucose solution at  $250 \text{ g.L}^{-1}$ ) as previously described by Gabelle et al. (2012). Fermentations were performed in batch culture mode. Temperature was set at  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH was maintained at 4.8 with  $\text{NH}_3$  (10.25 %, v/v) and gas flow rate was fixed at  $2.5 \text{ L.min}^{-1}$ . Agitation was carried out by using four different kinds of impellers (Fig. III.1.a) that were characterized by their shape, their dimension, their number of blades, their Power number and their Flow number (Table III.1.i). They were set in motion by an asynchronous electric motor 1LA7063 4AB12 (Siemens, Munich, Germany) controlled by a variable speed drive ATV31C018M2 (Schneider, Rueil-Malmaison, France) at four different stirring rates:  $800 \text{ min}^{-1}$ ,  $935 \text{ min}^{-1}$ ,  $1250 \text{ min}^{-1}$  and  $1700 \text{ min}^{-1}$ . Dissolved oxygen (D.O.) concentration was measured with an InPro 6860i optical oxygen sensor (Mettler-Toledo, Greifensee, Switzerland) and controlled by the admission of a gas mix composed of nitrogen and compressed air. The gas mix was achieved by two gas flow mass controllers EL-FLOW F-201CV (Bronkhorst, Ruurlo, The Netherlands) that permitted the bioreactor gas flow rate to be kept constant. D.O. was set at 40 % to be higher than the critical dissolved oxygen concentration of ~15 % at atmospheric pressure (Marten *et al.*, 1996).

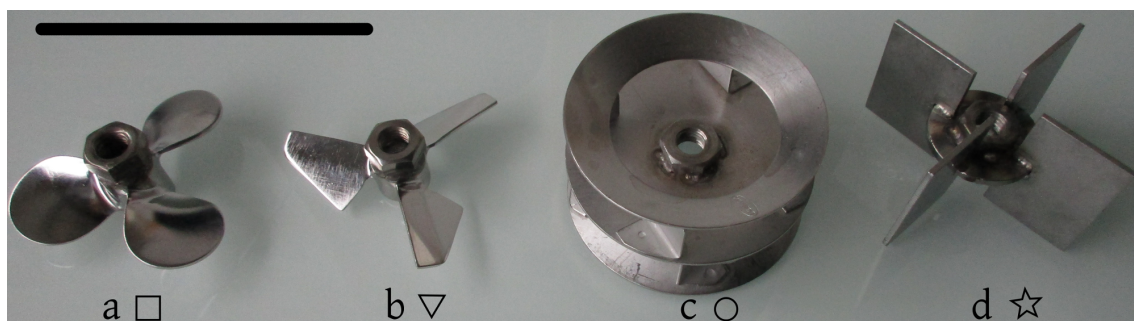


Figure III.1.a.: Pictures of the impellers used in the study, with associated symbols.

(a) Water propeller; (b) Profiled triblade; (c) Centripetal turbine; (d) Paddle; The scale bar in the upper-left corner represents 10 cm.

Fermentations were stopped before the end of the exponential growth phase, with residual glucose concentration greater than  $1 \text{ g.L}^{-1}$ . Samples were collected at least twice every 24 h for biomass

Table III.1.i.: Mixing and geometric characteristics of the impellers used in the study.

Impeller	Main Flow	Impeller diameter (m)	Blade width (m)	Number of blades	Power number (unreated) ( $N_p$ )	Flow number ( $N_f$ )
Water propeller (Rayneri VMI, B00002447)	Axial	0.08	0.011	3	0.28 <sup>(1)</sup>	0.58 <sup>(1)</sup>
Profiled triblade (Rayneri VMI, B00007148)	Axial	0.08	0.013	3	0.6 <sup>(1)</sup>	0.87 <sup>(1)</sup>
Centripetal turbine (Rayneri VMI, B00000043)	Radial	0.08	0.045	8	2 <sup>(1)</sup>	1.3 <sup>(1)</sup>
Paddle (IFPEN, homemade)	Radial	0.08	0.045	4	12 <sup>(2)</sup>	1.6 <sup>(2)</sup>

(1) Data from VMI the Mixing Company Rayneri (Montaigu, France);

(2) Data obtained by Computational Fluid Dynamics at IFPEN (Rueil-Malmaison, France) with the software ANSYS CFD from Ansys (Cecil Township, Pennsylvania, U.S.A.) using the Moving Reference Frame method

and glucose concentration analyses. Rheological measurements and image analyses were made on samples collected with a biomass concentration comprised between 4 and 8 g.kg<sup>-1</sup>.

**Cultivation at industrial scale** An experiment was completed at commercial scale with the same strain and the same conditions, except for the volume of the bioreactor that was 220 m<sup>3</sup> (total volume) and variable liquid volume (between 80 et 130 m<sup>3</sup>). Stirring was carried out by using a multiple impeller device, involving a high power-dissipation impeller at the bottom and several down-pumping hydrofoil impellers of same diameter. The tip speed is 4 m.s<sup>-1</sup>. Geometry was characterized by the same ratio between impellers diameter and bioreactor vessels than at laboratory scale. However, for confidential reasons, the exact geometry of the industrial scale bioreactor cannot be detailed in this paper. The circulation time  $t_c$  (in s) was evaluated from an empirically defined mixing time determined by pH pulse.

Data obtained from these culture were used to calculate prediction errors (in %), by dividing the absolute value of the difference between experimental and estimated data by the experimental data values.

#### III.1.2.2.2. Analytical Follow-up

**Rheological measurements** A rotational rheometer AR2000 (TA Instruments, New Castle, Delaware, the United States) equipped with a helical rotor, was used to carry out rheological measurements (Hardy *et al.*, 2015). Measurements were realized at 27 °C under controlled shear rates of 1 to 100 s<sup>-1</sup>.

Two cycles were performed during which shear rate was increased (from 1 to 100 s<sup>-1</sup>) and decreased (from 100 to 1 s<sup>-1</sup>) according to 20 steps. Measurements of dynamic viscosity ( $\eta$ , in Pa.s) were

recorded when a steady state was achieved, that meant when 3 consecutive values with less than 5 % of variation were reached at each step. Results were considered with a method's incertitude of 5 % due to Couette analogy (Hardy *et al.*, 2015).

In order to exclude possible errors due to secondary flow effects (Mezger, 2014), only rheological results with Taylor numbers fewer than 41 and Reynolds numbers fewer than 1000 were retained. Then, the Hershel-Bulkley (HB) model (Mezger, 2014) was used to fit data of fermentation broth viscosity (Eq. III.1.7).

$$\eta = \frac{\tau_s}{\dot{\gamma}} + K \times \dot{\gamma}^{n-1} \quad (\text{III.1.7})$$

With  $\eta$  the dynamic viscosity (in Pa.s),  $\tau_s$  the yield stress (in Pa),  $\dot{\gamma}$  the shear rate (in  $s^{-1}$ ),  $K$  the consistency index (in  $\text{Pa.s}^n$ ), and  $n$  the flow index. The parameter  $\tau_s$  was used to compare the putative cavern diameter to the diameter of the tank (Elson, Cheesman et Nienow, 1986). For all experiments, the predicted size of the cavern was higher than the size of the tank, thus no cavern formation issues were expected (Stocks, 2013).

**Biomass concentration determination** The dry weight method was used to quantify the biomass concentration. A weighed glass microfiber filter (Whatman GF/C filters) was used to filter a weighed sample of the culture broth with a particle retention of 1.2  $\mu\text{m}$ . One volume of the sample was washed with three volumes of distilled water and oven-dried at 105 °C until constant weight. The sample was weighted after cooling in a desiccator to reach room temperature, thus allowing calculation of biomass concentration ( $X$ , in  $\text{g.kg}^{-1}$ ). The maximum specific growth rate was determined during exponential phase by fitting (Eq. III.1.8) with weighted least squares method.

$$X_t = X_0 \times e^{\mu_{\max} \times t} \quad (\text{III.1.8})$$

With  $X_t$  the biomass concentration at  $t$  time (in  $\text{g.kg}^{-1}$ ),  $X_0$  the initial biomass concentration (in  $\text{g.kg}^{-1}$ ),  $\mu_{\max}$  the maximum specific growth rate (in  $\text{h}^{-1}$ ) and  $t$  the considered time (in h).

**Glucose concentration analyses** Glucose concentration was measured by high performance liquid chromatography (HPLC) from Waters Corporation (Milford, Massachusetts, the United States). Separation was carried out using a Varian Metacarb87P column 300  $\times$  7.8 mm (Agilent Technologies, Santa Clara, California, the United States), at 31 bar and 80 °C. Mobile phase was composed of ultra-pure water with a flow rate of 0.4  $\text{mL.min}^{-1}$ . Detection was achieved with a refractive index detector (Waters 2414) and glucose concentration (in  $\text{g.L}^{-1}$ ) was quantified using a range of calibration.

**Staining and microscopy analyses** Samples were diluted in 50  $\text{mmol.L}^{-1}$  phosphate-citrate buffer (pH 4.8) to reach a final biomass concentration of 2 to 5  $\text{g.L}^{-1}$  (see II.2.2). They were stained at a ratio 1:4 (v:v) with a commercial lactophenol-blue solution (Merck, Darmstadt, Germany) that was half-diluted with a solution of lactophenol-bleu without cotton blue and without phenol. Stained samples were fixed and sealed with nail varnish between a slide and a cover slip before microscopic observations. A bright field microscope AxioImager M2p Carl Zeiss AG (Oberkochen, Germany) bearing



an N-Achroplan 20X objective (Carl Zeiss) was used. It was equipped with a motorized stage in X-Y-Z axis (steps: 0.1  $\mu\text{m}$ , 0.1  $\mu\text{m}$  and 25 nm), with a color camera 5 megapixels Axicam 105 Color through a video adapter 60N-C 2/3" 0.5 $\times$  (Carl Zeiss). After white balance, normalization of light intensity and calibration, stacks of 60 mosaics corresponding to a surface of 3.7  $\text{mm}^2$  and separated by 2  $\mu\text{m}$ , were acquired (see II.2.2).

**Characterization of fungus morphology by image analysis** Image analysis was carried out using a dedicated method previously described (see II.2.2). This method included an original extended depth-of-field approach, a specific segmentation and both skeleton and topological analyses. It led to the determination of 31 morphological criteria, from acquisition of about one thousand fungi images per sample. Among these 31 criteria, the number of holes (nH), the hyphal growth unit (HGU, in  $\mu\text{m}$ ), the surface area (a, in  $\mu\text{m}^3$ ) and the total length (tlbs in  $\mu\text{m}$ ) were retained. The nH appeared to be the most relevant parameter to evaluate shear stress impact on fungus morphology (see II.2.2). These holes were formed by overlapping of the fungus in itself. They referred indirectly to the span of fungi which are foldable objects. The more important size of the fungi was related to their complex fold and consequently to their high number of holes (see II.2.2). The nH was determined by considering the quantiles 90 (q90), whose uncertainty was lower than 20 %.

### III.1.2.3. Results

#### III.1.2.3.1. Influence of stirring conditions on characteristics of *T. reesei* cultures

In a first approach, fermentations of *T. reesei* were conducted with the centripetal turbine (Fig. III.1.a (c)) at two stirring rates (800 rpm and 1700 rpm) to generate strongly different shear stress conditions. These conditions respectively corresponded to a tip speed ( $V_{\text{tip}}$ ) of 3.4 and 7.1  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ , a power draw per volume (P/V) of 6.2 and 59.5  $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$  and an energy dissipation circulation function considering the maximum specific energy dissipation rate near the impeller ( $\text{EDCF}_{\varepsilon_{\text{max}}}$ ) of 94.2 and 1920.7  $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ . The impact of these different conditions was explored on *T. reesei* growth kinetics, on fermentation broth viscosity and on the fungus morphology.

Fig. III.1.b shows the growth curves of *T. reesei* by considering the two stirring conditions. At a stirring rate of 800 rpm, the maximum specific growth rate was equal to 0.082 ( $\pm 0.003$ )  $\text{h}^{-1}$  whereas it was equal to 0.065 ( $\pm 0.004$ )  $\text{h}^{-1}$  at 1700 rpm. This result accounted for a 20 % reduction of  $\mu_{\text{max}}$  between 800 and 1700 rpm.

The viscosity of samples collected at the end of exponential phase, for a biomass concentration around 8  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , was determined and compared (Fig. 3). Whatever the shear rate, it was reduced by a factor of three when the stirring rate increased from 800 to 1700 rpm. At shear rate of 10  $\text{s}^{-1}$ , the viscosity changed from  $0.534 \pm 0.053$  at 800 rpm to  $0.128 \pm 0.001$  at 1700 rpm.

The morphology of *T. reesei* was characterized by considering samples recovered in the same conditions than for rheological measurements (Fig. III.1.d). At 800 rpm, the quantile value of the number of holes  $q90_{\text{nH}}$  was equal to 14.3 ( $\pm 1.3$ ) while at 1700 rpm, it was equal to 3.5 ( $\pm 0.5$ ). This result corresponded to a diminution of 75 % of the number of holes at high stirring rate.

From these results, the stirring rate affected the growth kinetic of *T. reesei*, as a result of changes in the morphology of the fungus and in the viscosity of the fermentation medium.

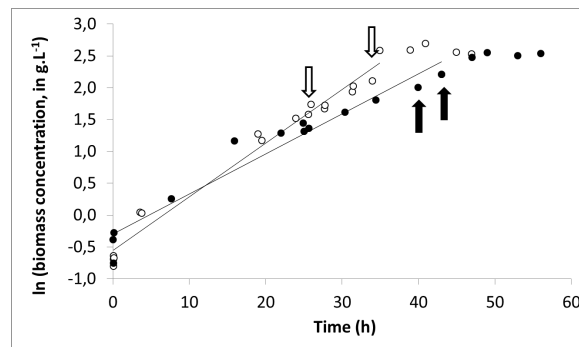


Figure III.1.b.: Growth curves characterizing batch fermentations of *T. reesei* under two stirring conditions.

The centripetal turbine is used at a speed rate of 800 rpm (white) and 1700 rpm (black). Arrows point samples used for viscosity and image analysis measurements.

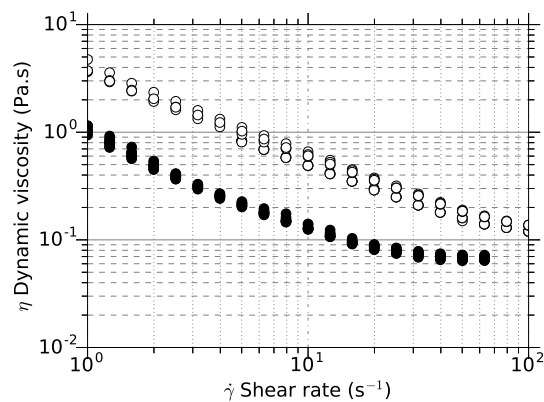


Figure III.1.c.: Dynamic viscosity versus shear rates for culture samples of *T. reesei* fungi.

Samples were collected after fermentation at 800 rpm (white) and 1700 rpm (black). Duplicates with two cycles per sample are presented for each condition.

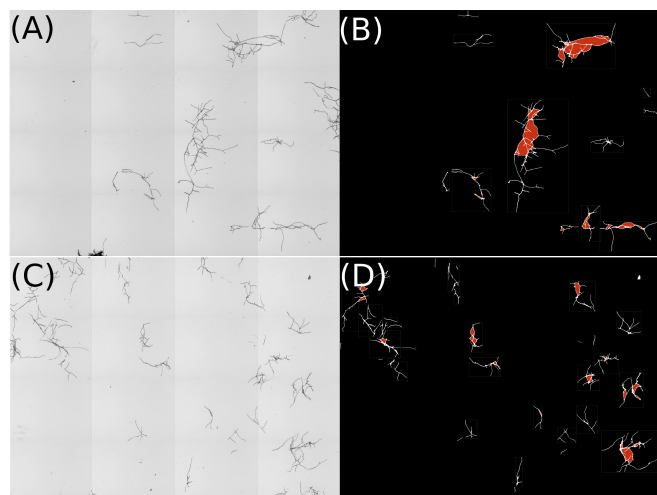


Figure III.1.d.: Representative pictures of *T. reesei* morphology after cultures conducted at 800 rpm (A and B) and 1700 rpm (C and D).

The images are composed of mosaics of 16 subimages, with a size of 10098 per 7538 pixels. They were obtained before segmentation (A and C) or after segmentation (B and D). Holes are shown in red in the segmented images. Width of images is 2 mm.

### III.1.2.3.2. Correlations to explain the effect of stirring conditions on culture parameters

In a second approach, *T. reesei* cultures were carried out at lab-scale with the four impellers shown on (Fig. III.1.a), at four different stirring rates (800, 935, 1250 and 1700 rpm). These conditions corresponded to four  $V_{\text{tip}}$  values (3.5, 3.9, 5.2 and 7.1  $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), six levels of the ratio P/V (6.2, 8.4, 17.9, 23.7, 59.5 and 59.6  $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}$ ) and six levels of the parameter  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$  (94.2, 196.1, 521, 561.4, 829.3 and 1920.7  $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ ).

Using these data, linear models were elaborated to evaluate the correlation power of three different shear stress indicators ( $V_{\text{tip}}$ , P/V and  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$ ). These correlations included  $\ln(X)$  as the independent variable to characterize the dependent variable (Y), with the help of two constant parameters a and b (Eq. III.1.9):

$$Y = a \times \ln(X) + b \quad (\text{III.1.9})$$

The variable X was either the  $V_{\text{tip}}$ , the P/V ratio or the parameter  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$ . Fig. III.1.e shows the linear models obtained by considering three dependant variables (Y): the maximum specific growth rate ( $\mu_{\text{max}}$ , in  $\text{h}^{-1}$ ), the dynamic viscosity at 10  $\text{s}^{-1}$  with HB model ( $\eta$ , in Pa.s) and the quantiles 90 of the number of holes ( $q_{90_{\text{nH}}}$ ) as a morphological parameter. The models were powered with the experimental data obtained at lab-scale with the different impellers and agitation rates.

In order to compare the fitting models obtained with the three independent variables ( $\ln(X)$ ), correlation coefficients ( $r^2$ ) were identified. From Fig. III.1.e, the  $r^2$  was lower when the  $V_{\text{tip}}$  was used as the independent variable, but it was higher when  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$  was retained to explain the effect of shear stress. This result was achieved whatever the dependent variable under consideration.

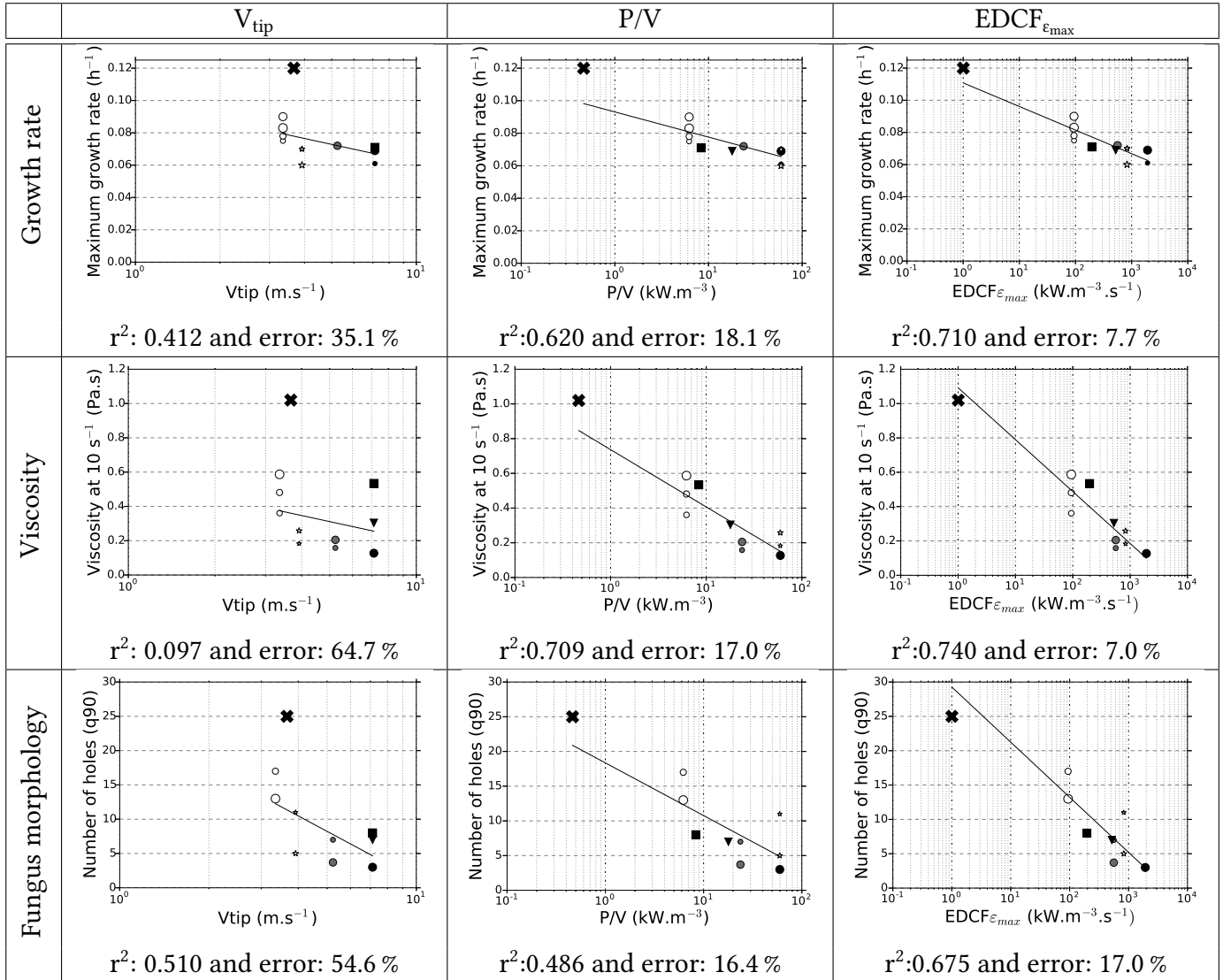


Figure III.1.e.: Comparison of growth, rheological and morphological parameters obtained from predictions based on three extrapolation criteria.

$V_{tip}$ : tip speed (in  $m.s^{-1}$ ); P/V: power input per volume (in  $kW.m^{-3}$ );  $EDCF_{\epsilon_{max}}$ : EDCF considering the maximum specific energy dissipation (in  $kW.m^{-3}.s^{-1}$ ). Marker's sizes are proportional to biomass concentrations. Water propeller (square); Profiled triblade (inverted triangle); Centripetal turbine (circle); Paddle (star); Commercial scale (black cross). 800 rpm (white); 935 rpm (light-grey); 1250 rpm (dark-grey); 1700 rpm (black).  $r^2$  are the correlation coefficients for the linear models in logarithmic scale; errors represent the gaps (in %) between predictions and measurements at commercial scale.

### III.1.2.3.3. Prediction of culture parameters at large scale

These linear models were used to predict the behavior of the culture at a commercial scale, by considering the maximum specific growth rate, the dynamic viscosity of the broth at  $10\text{ s}^{-1}$  and the number of holes as a morphological parameter of the fungus. The differences between the predicted values and the experimental data were calculated as prediction errors. The correlations obtained on the basis of  $V_{\text{tip}}$  exhibited the most important error (35 % to 65 %) for all criteria. By considering the maximum specific growth rate and the dynamic viscosity, the variable  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$  exhibited the lower error, with respectively 7.7 % and 7.0 % against 18.1 % and 17.0 % for the parameter P/V. However, the prediction error of the morphological parameter  $q_{90_{\text{NH}}}$  was similar when the P/V was used as an independent variable, with 16.4 % instead of 17.0 % with  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$ .

### III.1.2.4. Discussion

#### III.1.2.4.1. Stirring conditions induced various shear stress

The different stirring conditions (geometry of the impellers and stirring rates) established in this study allowed obtaining very different shear stress, that were characterized by three main parameters:  $V_{\text{tip}}$ , P/V and  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$ . In the literature, the ranges of  $V_{\text{tip}}$  were limited to 0.9 to  $2.7\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  (Malouf *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2009; Marten *et al.*, 1996; Lejeune et Baron, 1995a) whereas we obtained a wider range of  $3.5$  to  $7.1\text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ , together with higher values of  $V_{\text{tip}}$ . For the parameters P/V and  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$ , no information is still available by considering *T. reesei*. However, similar ranges of EDCF and P/V were explored with other filamentous fungi. With *Penicillium chrysogenum* and *Aspergillus oryzae*, Amanullah *et al.* (2004) reported EDCF values comprised between 2 and  $1000\text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$  and Jüsten *et al.* (1996) with *Penicillium chrysogenum* indicated EDCF values ranging from 2 to  $2000\text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$  and P/V values from 0.5 and  $10\text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ . In this study, we displayed higher P/V values ( $6.2$  to  $59.5\text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$ ) and  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\text{max}}}$  values ( $94.2$  to  $1920.7\text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ ), corresponding to an EDCF (swept volume) of 244 to  $4971\text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ ), as a result of the relative small volume of liquid used, which allowed more important shear stress to be explored.

#### III.1.2.4.2. Shear stress affected the growth of *T. reesei*

Comparison of the results obtained with the different shear stress conditions permitted to report shear stress levels that negatively impacted the maximum specific growth rate of *T. reesei*. This result confirms the observation of Lejeune and Baron (1995) who showed that an augmentation of agitation speed reduced the growth of *T. reesei*, as seen by the augmentation of the lag phase. However, it is in opposition with those obtained by other authors (Malouf *et al.*, 2013; Patel *et al.*, 2009; Marten *et al.*, 1996) who observed a positive impact of high shear stress on growth of *T. reesei*. This difference can be probably explained by the presence of some limitation issues (oxygen, substrates...) during their cultures, which were then compensated by the elevated agitation speed. In our study, these problems were avoided by carrying out conditions that prevented these limitations.

#### III.1.2.4.3. Shear stress affected the viscosity of *T. reesei* fermentation medium

The viscosity of the fermentation media was reduced by increasing the shear stress. This result was in agreement with results in part II.2.2. However, it was in contradiction with other previous results Marten et al. (1996) observed an increased viscosity at higher agitation speed and Patel et al. (2009) indicated that agitation speed did not affect the fermentation broth viscosity, except for the lowest agitation speed that led to a lower viscosity. These differences may be ascribed to the lower shear stress levels explored in these works. But they are more probably due to the fact that, at low agitation rates, oxygen limitations occurred in the work of Patel et al. (2009), which reduced the growth of the fungus, and substrate limitations took place in the work of Marten et al. (1996). Indeed, substrate limitations induce fungus fragmentation and a reduction of the viscosity, as observed by Henaut et al. (2013). To avoid this problem, in our work, all experiments were performed without carbon limitation, by using directly fermentable substrates (lactose instead of cellulose), and at a constant D.O. level of 40 %, thus avoiding these limitations. In addition, the mixing conditions were well controlled by using a gas mix at a constant flow rate. These conditions permitted to dissociate the impact of shearing conditions from the effect of substrate and oxygen limitations, thus achieving conditions that more closely resembled those encountered at large scale.

#### III.1.2.4.4. Shear stress affected the morphology of *T. reesei*

The shear stress conditions modified the morphological parameters that characterized the fungus during the growth phase. Notably, a decrease of 75 % of the number of holes inside the fungus was demonstrated when the shear stress was more elevated. The number of holes inside the fungus was retained as a relevant criterion to compare the effect of different shear stress conditions for this strain of *T. reesei*, as already suggested (see II.2.2). We explained that this morphological criterion referred indirectly to the span of the fungus. They also related the more important size of the fungi to their complex fold and consequently to their high number of holes. This indicates that, in this work, the high shear stress also induced a reduction of the size of *T. reesei* cellular structures. This result is in agreement with those of Patel et al. (2009), but it was obtained in conditions that avoided carbon and oxygen limitations, thus being closer to those encountered at industrial scale.

#### III.1.2.4.5. Use of shear stress criteria to predict *T. reesei* culture parameters

In order to relate the maximum specific growth rate, the viscosity of the broth and the morphological characteristics of the fungus, correlations were proposed by considering three different criteria reflecting the shear stress. However, the morphology of the fungus and the rheological properties of the fermentation broth also depend on biomass concentration, in addition to shear stress (Hardy et al., 2015; Malouf et al., 2013). So, to dissociate their respective effects, the correlations were established by considering a narrow range of biomass concentrations (4 to 8 g.L<sup>-1</sup>). This approach was complementary to that implemented by Malouf et al. (2013) who proposed correlations between rheological and morphological parameters that directly integrated the biomass concentration.

By comparing the results obtained with the three criteria of shear stress, our study demonstrated

that the criterion  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  was the most suitable to describe the growth of *T. reesei*, the viscosity of the broth and the morphology of the fungus, as compared to power input per unit volume or tip speed. Considering the fungus morphology, this result is in agreement with those of Jüsten et al. (1996) who indicate that the EDCF concept gives better correlations for morphological parameters than the other extrapolation criteria. The present correlations should however be improved by including a larger number of data, particularly at low  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  values (between 1 and  $100 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ ). In addition, to our knowledge, it is the first time that the EDCF concept was used to explain fermentation variables such as the maximum specific growth rate and the viscosity of the broth. These interconnections between all these variables can be explained by the fact that they are all dependent on the operating conditions (Quintanilla et al., 2015). The good result obtained with EDCF as independent variable can be explained by the fact that it integrates more phenomena than the other representations of shear stress. Notably, as introduced by Smith et al. (1990) and Jüsten et al. (1996), it includes the notion of passage frequency of the fungi near the impeller, coupled with the intensity of the shear stress, which together are important factors to describe the shear stress 'perceived' by the fungus in the bioreactor. According to Stocks (2013), these two phenomena (frequency and intensity) may change in an opposite way during scale-up: frequency decreases at large scale, whereas shear stress intensity could increase. Consequently, the  $V_{\text{tip}}$  independent variable that mainly reflected shear intensity, and the  $P/V$  parameter that correspond to a mean shear and change a lot with scale, did not represent so well the effect of shear stress as compared to the parameter EDCF, which was then less scale dependent.

The predictions made with  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  as the independent variable to explain the viscosity of the fermented medium and the maximum specific growth rate of *T. reesei* at large scale led to error values lower than 10 %, whereas the error reached 20 % for the morphological criterion. Considering this information, the predictions of the viscosity and the specific growth rate seemed good, thus validating the use of the shear stress parameter  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  as the best extrapolation factor for *T. reesei* cultures. The higher error value in assessing the morphology of the fungus could be explained by the fact that the morphological criterion was indirectly linked to the size of the fungi, as explained in part II.2.2. For other strains showing a more compact morphology, with less overlapping, other morphological criteria than the number of holes may better reflect their span in a network of fungi and hence, correlation of morphology with  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  as a shear stress parameter will be probably more accurate.

### III.1.2.5. Conclusions and perspectives

During *Trichoderma reesei* batch cultures, a deleterious effect of shear stress was pointed out on the viscosity of the broth, the maximum specific growth rate and the morphology of the fungus. Correlations were proposed to relate three extrapolation criteria with specific growth rates and morphological parameters of *T. reesei*, as well as with rheological properties of fermented broth. They revealed that  $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  was the best parameter to predict these variables, as compared to tip speed or to power draw per volume. Good predictions of broth viscosity, maximum specific growth rate and fungus morphology were obtained with this criterion as an extrapolation factor, in cultures



completed at industrial scale. Consequently, this work demonstrated that it was possible to make a scientifically based scale-up at commercial scale, using results generated with experiments done at laboratory scale.

In the future, these correlations have to be improved by taking account the effect of biomass concentration or by expanding the range of  $EDCF_{\epsilon_{\max}}$  values used to reach lower shear stress. In addition, as the industrial strain used in this work exhibited an unusual morphology, it will be interesting to expand this study by considering a well-known strain such as *T. reesei* RUT-C30, to facilitate the comparison with previous works. Finally, the correlations established in this work will be applied to the cellulases production phase of the process.

### III.1.2.6. Acknowledgments

The authors acknowledge the Agence de l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME, Angers, France) for financial support of PhD of Nicolas Hardy and Dr. Claudio Pereira Da Fonte for Computational fluid dynamics characterization of the paddle impeller (Power number, Pumping number).

### III.1.3. Commentaires et perspectives

En intégrant les résultats obtenus à l'aide des méthodes de mesure de la viscosité et de la morphologie de *T. reesei*, développées dans les deux premières parties de la thèse, ce travail a permis de mettre en évidence un effet négatif des forts cisaillements induits par l'agitation des bioréacteurs sur la croissance et la morphologie du champignon, ainsi que sur la viscosité du moût. Ces résultats ont été obtenus grâce à deux précautions essentielles : tout d'abord, par la prise en compte d'une large gamme de contraintes de cisaillements, générant des valeurs très diverses et élevées des critères  $V_{\text{tip}}$ ,  $EDCF$  et  $P/V$ . Ensuite, par des choix techniques judicieux (utilisation d'un mélange de gaz pour ne pas modifier les conditions d'agitation lors de l'avancement de la fermentation et d'un substrat directement fermentescible pour éviter les problèmes de limitation en substrat carboné), les effets du cisaillement ont pu être dissociés de ceux liés aux conditions de cultures (concentrations en oxygène dissous et en substrat).

L'utilisation de quatre types de mobiles d'agitation différents (hélice marine, turbine centripète, tripale profilée et mobile à palettes) a montré que le critère d'extrapolation le plus pertinent est le paramètre  $EDCF_{\epsilon_{\max}}$ . Il permet de corrélérer le « cisaillement » à la viscosité du milieu, au taux de croissance maximum et à la morphologie des champignons. Les corrélations, qui correspondent à des fonctions logarithmiques (eq. III.1.9), ont été établies pour des valeurs de  $EDCF_{\epsilon_{\max}}$  comprises entre 94 et 1921  $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ . Elles présentent des coefficients de corrélation compris entre 0,675 et 0,740. À l'aide de ces corrélations, des prédictions ont été réalisées pour une valeur d' $EDCF_{\epsilon_{\max}}$  de 1  $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$  puis comparées à des données issues d'une production réalisée dans un fermenteur industriel. Les écarts entre les prédictions et les données expérimentales sont de 8 % pour le taux de croissance maximum, 7 % pour la viscosité mesurée à  $10 \text{ s}^{-1}$  et 17 % pour le quantile 90 du critère morphologique nombre de boucles. Ces écarts sont d'autant plus acceptables que les valeurs d' $EDCF_{\epsilon_{\max}}$

utilisées pour réaliser les corrélations sont éloignées d'un facteur  $10^2$  par rapport à celles rencontrées à l'échelle industrielle et utilisées pour la prédiction.

En résumé, ces expériences ont permis de définir un critère d'extrapolation pertinent pour la production de cellulases par le champignon filamentueux *T. reesei* à l'échelle industrielle, à l'aide d'expériences réalisées à petite échelle, ce qui correspond pleinement à une approche *scale-down*.

À l'issue de ce travail, deux perspectives principales sont ouvertes.

En premier lieu, les corrélations établies dans cette étude portent sur une gamme de valeurs d' $EDCF_{\epsilon_{max}}$  qu'il conviendrait d'élargir en explorant des valeurs d' $EDCF_{\epsilon_{max}}$  plus faibles. Cela nécessitera probablement l'utilisation d'équipements de taille supérieure à ceux utilisés dans ces manipulations. En effet, pour réduire la valeur d' $EDCF_{\epsilon_{max}}$  dans les fermenteurs de petite capacité utilisés dans cette étude, il est nécessaire de mettre en œuvre des vitesses d'agitation plus faibles (inférieures à 400 rpm), ce qui entraînera deux types de problèmes. Le premier se traduira par un trop faible coefficient de transfert d'oxygène ( $k_La$ ) qui ne permettra plus de subvenir aux besoins du microorganisme. À l'échelle industrielle, ce problème est contrebalancé par la pression hydrostatique liée au volume du milieu, qui augmente la solubilité de l'oxygène dans le milieu de culture. À plus petite échelle, nous proposons alors de résoudre le problème de transfert d'oxygène rencontré aux faibles vitesses d'agitation, en réalisant la fermentation sous pression ou en utilisant de l'air enrichi en oxygène. Le second problème est que l'agitation peut devenir insuffisante pour assurer un bon transfert de matière. Cela pourra se traduire par un phénomène de décantation des champignons filamenteux, qui pourront former des structures macroscopiques en fond de cuve au sein desquelles des limitations pourront apparaître (figure III.1.f). Ce type de problème n'est pas observé à grande échelle, ce qui peut s'expliquer par le fait que l'aération à grande échelle assure une mise en mouvement minimale du moût. Ce problème peut être résolu en travaillant à des échelles intermédiaires (pilote) ou avec des fermenteurs hybrides entre une colonne à bulles et un bioréacteur mécaniquement agité.

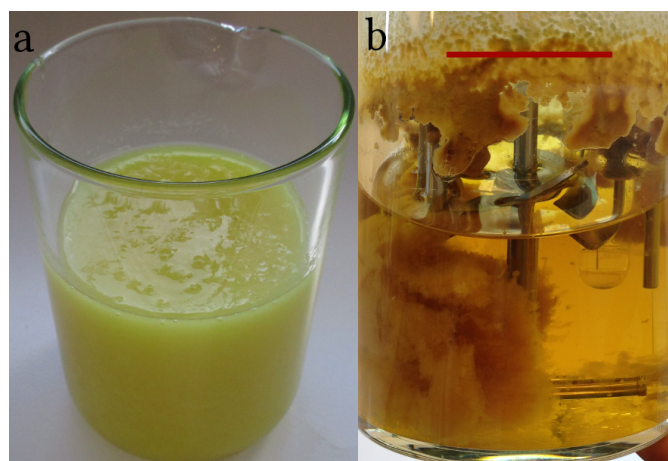


FIG. III.1.f. : Effet négatif d'une agitation insuffisante sur l'aspect du moût de fermentation de *T. reesei*.

(a) Culture réalisée sous agitation suffisante pour disperser le champignon (800 rpm); (b) Culture réalisée sous agitation insuffisante (200 rpm). La barre rouge correspond à 4,5 cm.

La souche industrielle de *T. reesei* utilisée dans cette étude présente une morphologie inhabituelle, car très « étalée » (figure III.1.g Souche Tr3002). Il faudrait donc réaliser ce même type d'étude sur une

souche présentant une morphologie plus compacte telle que la souche *T. reesei* PC3-7 (figure III.1.g Souche PC3-7). Cette étude sera d'autant plus intéressante que cette souche présente pour une même concentration en biomasse une viscosité inférieure d'un facteur 3 à celle de la souche industrielle (figure III.1.h).

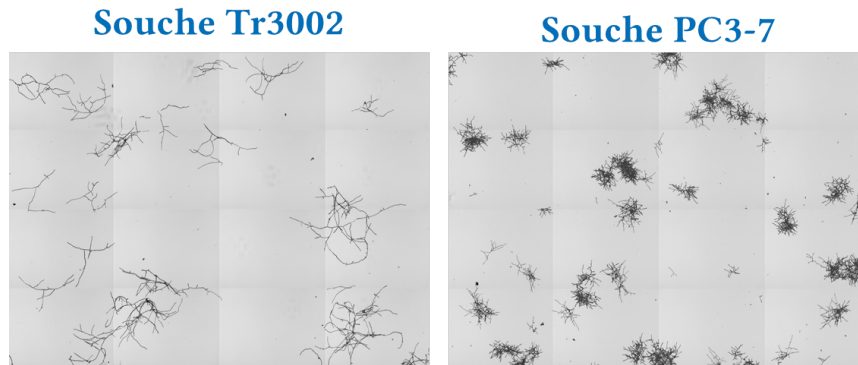


FIG. III.1.g. : Photographies des souches de *T. reesei* Tr3002 et PC3-7 présentant des morphologies différentes.

Les images sont réalisées avec le même grossissement ; la largeur des images correspond à 2 mm.

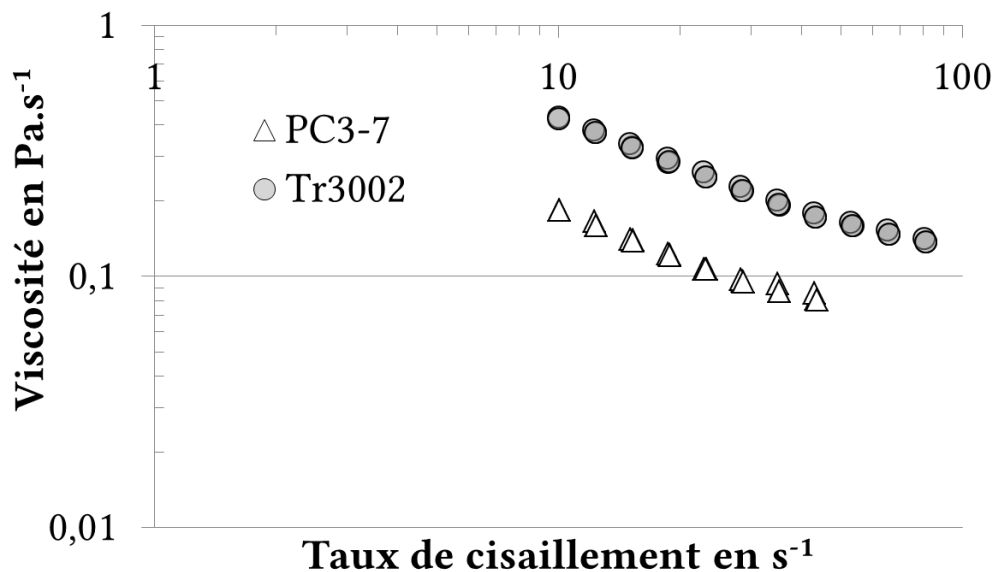


FIG. III.1.h. : Comparaison des viscosités mesurées à différents taux de cisaillement avec deux souches de *T. reesei*.

Souche Tr3002 (disques gris) ; souche PC3-7 (triangles blancs). Les deux séries de mesures sont réalisées pour une même concentration en biomasse ( $14 \text{ g.kg}^{-1}$ ) ; les cultures sont réalisées dans les mêmes conditions d'agitation (mobile centripète à 900 rpm).

Cette étude a été démarrée et présente déjà des résultats intéressants tels qu'un effet différent du cisaillement en fonction de la morphologie des souches considérées (figure III.1.i). Le taux de croissance de la souche PC3-7 ne semble pas être modifié entre les deux conditions de vitesse d'agitation (800 rpm et 1700 rpm) contrairement à la souche Tr3002. Cette différence est très probablement due à la morphologie des souches.

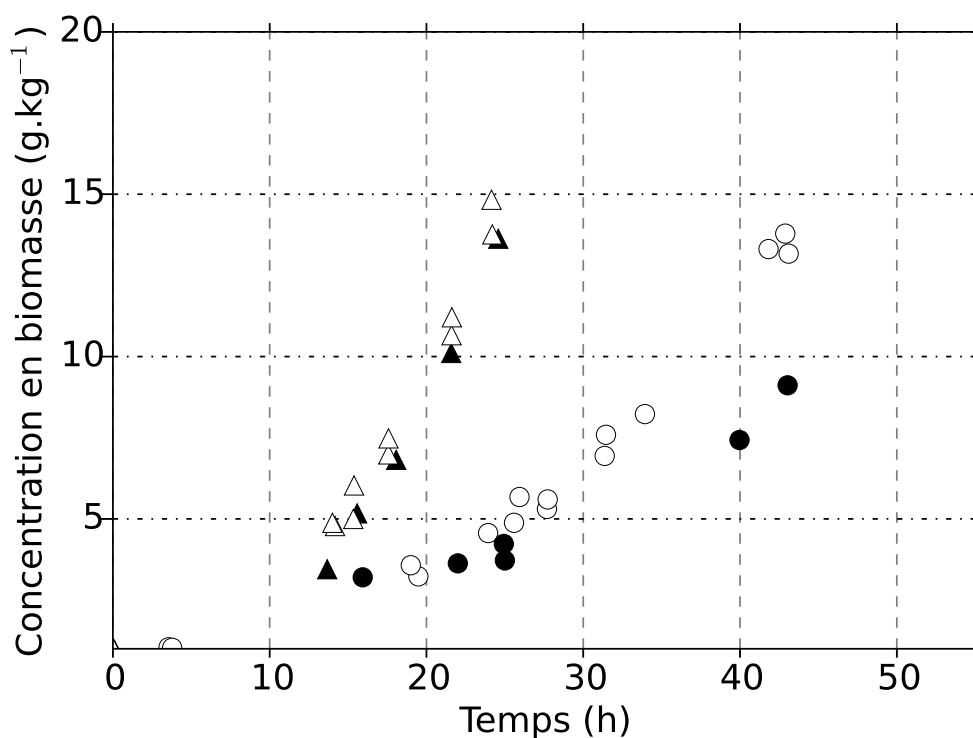


FIG. III.1.i. : Comparaison de l'évolution des concentrations en biomasse au cours de cultures de *T. reesei* à différents taux de cisaillement.

Souche *T. reesei* Tr3002 (cercles); Souche *T. reesei* PC3-7 (triangles); Vitesse d'agitation de 800 rpm (marques blanches); Vitesse d'agitation de 1700 rpm (marques noires).

Cette partie du travail s'est intéressée à la première phase du procédé, c'est-à-dire la croissance du champignon *T. reesei* en *batch*. Ce type de fermentation étant destiné à la production d'enzymes cellulolytiques, il est maintenant nécessaire de s'intéresser à la deuxième phase du procédé, qui correspond à la production de cellulases en mode fed-batch.



## III.2. Étude de l'impact des forts cisaillements sur la production de cellulases par *Trichoderma reesei*

### III.2.1. Introduction

Si les conditions de cisaillement affectent négativement la croissance des champignons filamenteux comme *T. reesei*, elles sont également susceptibles d'impacter la production de cellulases. Dans cette partie de la thèse, l'impact du cisaillement a été étudié sur la production d'enzymes, réalisée à la suite de la phase de croissance, en mode *fed-batch* selon le protocole industriel conventionnel d'IFPEN et en mode continu.

L'étude en mode *fed-batch* a été réalisée à deux concentrations en biomasse différentes (stabilisées à 5 et 15 g.kg<sup>-1</sup>) avec différents mobiles d'agitation, afin de générer dans la cuve différents régimes d'écoulement ( $1000 < Re < 7000$ ) encadrant ceux rencontrés à l'échelle industrielle. Lors de chaque expérience, la croissance ainsi que les concentrations en protéines et les activités enzymatiques ont été déterminées au cours du temps.

L'étude en mode continu a été effectuée afin d'évaluer et de quantifier l'impact des changements des contraintes de cisaillement sur les vitesses spécifiques de production d'enzymes. Ce mode de culture permet en effet d'atteindre des états stationnaires où le taux de croissance est fixé par le taux de dilution. C'est la modification de ces états stationnaires consécutive à un changement du cisaillement qui permet de conclure sur un effet éventuel de celui-ci. Enfin, afin de compléter cette étude, une analyse du protéome intracellulaire a été réalisée dans deux conditions de cisaillement afin d'identifier l'impact du cisaillement sur les synthèses protéiques de *T. reesei*.

### III.2.2. Matériels et méthodes

#### III.2.2.1. Souches

Deux souches de *T. reesei* sont utilisées, une souche industrielle appelée Tr3002, propriété d'IFPEN et une souche disponible à l'American Type Culture Collection (ATCC) nommée PC3-7. Les souches Tr3002 et PC3-7 ont subi plusieurs mutagenèses aléatoires couplées avec des étapes de sélection sur le critère de production de cellulases. La souche industrielle Tr3002 (Ayrinhac *et al.*, 2011) est une descendante de la souche QM9414 (Durand, Clanet et Tiraby, 1988), elle a été améliorée génétiquement par le département Biotechnologie d'IFPEN en collaboration avec la société Proteus (Longjumeau, France).

### III.2.2.2. Milieu de culture

La composition du milieu de culture utilisé est détaillée dans le tableau III.2.i. Il a été défini dans des études antérieures (Jourdiar, 2012). Dans les cultures réalisées pour cette étude, le milieu 4N est utilisé dilué au demi et complété avec du *cornsteep* et du glucose comme source de carbone. Le *cornsteep* désigne le produit obtenu après trempage du maïs dans l'eau lors de la première étape d'extraction de l'amidon en amidonnerie humide. Cette trempage permet de gonfler les grains de maïs et d'éliminer les matières solubles contenues dans ces grains. Il s'agit d'une source d'azote organique et de vitamines qui est beaucoup moins chère que les extraits de levure (Roquette, 2016).

TAB. III.2.i. : Composition du milieu de culture 4N.

Composé	Concentration
H <sub>3</sub> PO <sub>3</sub> 85 % (v/v)	6 mL.L <sup>-1</sup>
KOH	3,3 g.L <sup>-1</sup>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,6 g.L <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	1,12 g.L <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1,12 g.L <sup>-1</sup>
Solution d'oligoéléments (tableau III.2.ii)	2 mL.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12 H <sub>2</sub> O	0,23 g.L <sup>-1</sup>
pH baissé à 2,0 avec H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 94 % (v/v)	-

Le milieu utilisé pour les précultures est tamponné avec de l'acide phtalique (sel dipotassique).

Le pH du milieu utilisé dans les bioréacteurs est ajusté extemporanément à pH 4,8 avec de l'ammoniaque à 5,5 N.

Un anti-mousse est ajouté dans le milieu afin d'éviter les débordements éventuels. Pour les fermentations *fed-batch*, l'anti-mousse EROL ACF 922KF (PMC Ouvrie, Carvin, France) est apporté à une concentration de 1 mL.L<sup>-1</sup>. Pour les fermentations continues, l'anti-mousse SB2121 (Strucktol, Hambourg, Allemagne) est injecté par l'alimentation à une concentration de 1 mL.L<sup>-1</sup>. Ce dernier est

TAB. III.2.ii. : Composition de la solution d'oligoéléments.

Composé	Concentration
FeSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	30 g.L <sup>-1</sup>
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 6 H <sub>2</sub> O	9,0 g.L <sup>-1</sup>
MnSO <sub>4</sub> , 1 H <sub>2</sub> O	6,4 g.L <sup>-1</sup>
ZnSO <sub>4</sub> , 7 H <sub>2</sub> O	8,4 g.L <sup>-1</sup>
CuSO <sub>4</sub> , 5 H <sub>2</sub> O	3,0 g.L <sup>-1</sup>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,4 g.L <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> , 2 H <sub>2</sub> O	1,0 g.L <sup>-1</sup>
pH baissé à 1,8 avec H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85 % (v/v)	-

soluble dans l'eau contrairement à l'EROL ACF 922KF.

### III.2.2.3. Culture en bioréacteur

#### III.2.2.3.1. Précultures

Les précultures sont réalisées dans des fioles de type Fernbach, d'un volume de 250 mL ou 150 mL. Elles sont inoculées avec un cryotube contenant environ  $2 \times 10^7$  spores. Elles sont incubées à 30 °C pendant 72 h, sur une table d'agitation Multitron II avec une agitation orbitale de 50 mm à 180 rpm (Infors, Bottmingen, Suisse). À l'issue de la préculture, l'inoculum est transféré stérilement dans le bioréacteur avec un taux d'ensemencement de 10 % (v/v).

#### III.2.2.3.2. Cultures *fed-batch*

Les cultures en *fed-batch* de *T. reesei* sont réalisées en bioréacteur de 3,5 L (bioréacteur F2P, IFPEN) avec un volume initial en début de culture de 2,5 L. La phase de croissance est réalisée en batch, à 27 °C et à pH 4,8 grâce à l'ajout d'ammoniaque (5,5 N), pendant le temps nécessaire à la consommation de la quantité de sucre initialement introduite (10 ou 30 g.L<sup>-1</sup>) par le microorganisme. Cela correspond à environ 24 h de culture pour une concentration en sucre initiale de 10 g.L<sup>-1</sup>, et à environ 48 h de culture pour une concentration en sucre initiale de 30 g.L<sup>-1</sup>. À la suite du *batch* nécessaire pour assurer la croissance du champignon, le *fed-batch* qui correspond à la phase de production, est réalisé à 25 °C pendant environ 180 h. Le *fed-batch* est assuré en injectant du lactose à 210 g.L<sup>-1</sup> avec un débit de 4 - 5 mL.h<sup>-1</sup>. Le pH est régulé à 4,0 en injectant de l'ammoniaque à 5,5 N. L'agitation est fixée à 800 rpm pour la phase de croissance puis à 1000 rpm pour la phase de production. Cette différence de vitesse d'agitation permet d'imposer le fort cisaillement uniquement pendant la phase de production. L'aération est assurée par injection d'air, à un débit variable selon l'avancement de la culture afin de maintenir une teneur en oxygène dissous minimum de 40 %. La composition des gaz en sortie du fermenteur est déterminée et enregistrée avec un analyseur Duet (System C Industrie, Saint Paul Trois Châteaux, France). L'oxygène est détecté avec un capteur galvanique électrochimique et le dioxyde de carbone avec capteur infrarouge.

Deux mobiles d'agitation sont utilisés au cours de ces essais. Il s'agit d'un mobile de type palette (IFPEN) et d'un mobile de type turbine centripète (Rayneri), dont les caractéristiques sont données au tableau III.1.i. Ils permettent de générer des régimes d'écoulement variés, caractérisés par leur Nombre de Reynolds  $Re$  compris entre 1000 et 7000. La puissance dissipée en régime turbulent est proportionnelle au nombre de puissance  $N_p$ . Cela permet par exemple, dans une série d'expériences réalisée à même vitesse d'agitation, mais avec deux mobiles différents, de produire la même vitesse en bout de pale, mais une puissance dissipée environ six fois supérieure.

Au sein d'une même série de manipulations, des mobiles d'agitation différents sont utilisés. La conduite (vitesse d'agitation et débit d'aération) est réalisée à l'identique sur les deux fermenteurs. Ces derniers ont le même diamètre, ce qui impose des vitesses en bout de pale ( $V_{tip}$ ) similaires, car les vitesses d'agitation utilisées sont les mêmes, mais des caractéristiques différentes en termes de puissance et de mélange. Ces caractéristiques sont reportées au tableau III.2.iii.



TAB. III.2.iii. : Caractéristiques des mobiles utilisés lors des fermentations fed-batch, et contraintes de cisaillement associées.

Caractéristiques	Mobile de type palette (IFPEN)	Mobile centripète (Rayneri)
Diamètre (cm)	8	8
Hauteur (cm)	4,5	4,5
Nombre de puissance ( $N_p$ )	12	2
Nombre de pompage ( $N_f$ )	1,6	1,3
$V_{tip}$ à 800 rpm ( $m.s^{-1}$ )	3,4	3,4
$V_{tip}$ à 1000 rpm ( $m.s^{-1}$ )	4,2	4,2
P/V à 800 rpm ( $kW.m^{-3}$ )	37	6
P/V à 1000 rpm ( $kW.m^{-3}$ )	73	12
EDCF $_{\epsilon_{max}}$ à 800 rpm ( $kW.m^{-3}.s^{-1}$ )	440	94
EDCF $_{\epsilon_{max}}$ à 1000 rpm ( $kW.m^{-3}.s^{-1}$ )	1085	230

### III.2.2.3.3. Cultures Continues

Les cultures en continu de *T. reesei* sont réalisées dans un bioréacteur ezControl BioBundles de 3 L de volume total (Applikon Biotechnology, Foster City, États-Unis d'Amérique). L'état stationnaire est assuré par un contrôle du poids du milieu de culture à l'aide d'une pompe péristaltique de soutirage contrôlée par ordinateur. L'alimentation est assurée par une pompe volumétrique P920 (GE Healthcare, Fairfield, États-Unis d'Amérique) à un débit de  $45 mL.h^{-1}$  vérifié par le suivi des masses des deux sources de l'alimentation. La solution d'alimentation stérile correspond à un mélange d'une solution de lactose à  $180 g.L^{-1}$  apportée à un débit de  $6 mL.h^{-1}$  et d'une solution de milieu 4N diluée au demi, sans *cornsteep*, mais additionnée de  $0,83 g.L^{-1}$  d'extrait de levure et de  $1 mL.L^{-1}$  d'antimousse SB2121, apportée à un débit de  $39 mL.h^{-1}$ . L'extrait de levure et l'antimousse utilisés sont solubles dans l'eau et sont, de ce fait, plus faciles à mettre en œuvre pour des cultures en mode continu. La phase de croissance et la culture continue sont réalisées à  $27\text{ }^{\circ}C$  avec un pH régulé à 4,8. Le fermenteur est équipé d'un mobile de type turbine centripète (Rayneri) identique à celui utilisé dans les fermenteurs F2P conduits en *fed-batch*. La concentration en oxygène dissous est maintenue constante à 70 % avec un mélange d'air et d'azote. La composition des gaz en sortie du fermenteur est déterminée et enregistrée avec un analyseur Duet (System C Industrie)

L'objectif de l'expérience étant de caractériser l'effet de deux niveaux de cisaillement sur l'état physiologique du champignon et sa capacité à produire des cellulases, deux niveaux d'agitation sont utilisés. Le moteur d'agitation utilisé lors de ces cultures continues a permis d'atteindre des puissances dissipées et des EDCF $_{\epsilon_{max}}$  bien supérieures à celles explorées lors des cultures en mode *fed-batch*. Une vitesse de 800 rpm est tout d'abord appliquée pendant 220 h puis elle est accrue à 1700 rpm pendant 220 h. Ces conditions correspondent à des contraintes de cisaillement caractérisées, respectivement, par une vitesse en bout de pale  $V_{tip}$  de 3,4 et  $7,1 m.s^{-1}$ , un rapport de la puissance injectée sur le volume P/V de 10 et  $99 kW.m^{-3}$  et des valeurs du critère EDCF $_{\epsilon_{max}}$  de 157 et  $3200 kW.m^{-3}.s^{-1}$ .

### III.2.2.4. Évaluation de la concentration en biomasse

La concentration en biomasse est évaluée par la méthode du poids sec. Il s'agit de peser précisément une quantité de moût correspondant à environ 10 mL. L'échantillon est ensuite filtré sur un papier-filtre en fibre de verre, d'une porosité de 1,2  $\mu\text{m}$  et d'un diamètre de 47 mm. Ce filtre a été préalablement pesé précisément dans une coupelle en aluminium annotée, après déshydratation en étuve à 105 °C et refroidissement dans un dessiccateur. La filtration de l'échantillon est réalisée sous pression. Le filtrat est collecté pour réaliser les dosages enzymatiques et des sucres résiduels. Après la filtration, le « gâteau » de biomasse est rincé dans le dispositif de filtration par pression avec un volume d'eau distillée au moins égale à deux fois le volume initial de l'échantillon. Après cela, le filtre est soigneusement déposé sur sa coupelle en aluminium et déshydraté pendant 24 h dans une étuve à 105 °C. Il est ensuite refroidi dans un dessiccateur puis sa masse est mesurée. Enfin, la concentration en biomasse X est déterminée à partir de la différence des masses des filtres, à l'aide de la formule (eq. III.2.1). Elle est exprimée en gramme de biomasse par kilogramme de moût.

$$X = \frac{Masse_{(coupelle+filtre+biomasse\ sèche)} - Masse_{(coupelle+filtre)}}{Masse_{(moût\ filtré)}} \quad (\text{III.2.1})$$

### III.2.2.5. Dosage des sucres résiduels

Le dosage du glucose est réalisé au cours de chaque manipulation à l'aide d'un automate GM10 (Analox Instruments, London, Royaume-Uni) dont le principe est basé sur une réaction enzymatique faisant intervenir la glucose oxydase. Celle-ci réagit en présence de glucose dont l'intensité est proportionnelle à la consommation d'oxygène détectée à l'aide d'une sonde à oxygène dissous. Ce dosage permet de disposer rapidement d'une valeur de concentration en glucose mais avec une incertitude d'environ 10 %.

En fin de manipulation, le dosage du glucose est confirmé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) sur les filtrats qui ont été préalablement bouillis et filtrés pour protéger la colonne de la chaîne HPLC. Cette chaîne se compose d'une colonne Varian Metacarb 87P (Agilent Technologies, Santa Clara, États-Unis d'Amérique) avec de l'eau ultrapure comme phase mobile à un débit de 0,4 mL.min<sup>-1</sup>, une température de 80 °C et une pression d'environ 32 bar. La détection est réalisée à l'aide d'un réfractomètre Waters 2414 (Milford, États-Unis d'Amérique). Cette technologie permet non seulement de doser le glucose, mais également les autres sucres dont le lactose.

### III.2.2.6. Dosage de la concentration en protéines et de l'activité du cocktail enzymatique

Le dosage de la concentration en protéines est réalisé sur les surnageants (filtrats). Le dosage est réalisé avec le kit DCTM Protein Assay (Biorad, Hercules, États-Unis d'Amérique) et s'appuie sur une gamme de sérum-albumine bovine (BSA, 0 - 1,5 g.L<sup>-1</sup>) selon la méthode de Lowry *et al.* (1951) qui est recommandée par l'International Union of Pure and Applied Chemistry (I.U.P.A.C.) (Ghose, 1987).

L'activité du cocktail enzymatique est déterminée globalement avec la méthode du papier filtre recommandée par l'I.U.P.A.C. (Ghose, 1987). Cette méthode a été miniaturisée pour pouvoir être réalisée en tubes Eppendorf de 2 mL (Jourdir *et al.*, 2013). Le test est réalisé avec 4 dilutions d'enzyme afin d'encadrer la valeur cible, correspondant à un taux de conversion de 4 %.

### III.2.2.7. Exploration des protéines intracellulaires par électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectrométrie de masse

#### III.2.2.7.1. Extraction des protéines

Les protéines cytoplasmiques sont extraites des champignons par broyage cellulaire. Les culots de biomasse (0,2 g) sont lavés trois fois dans du tampon tris HCl pH 8,8 à 50 mM (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Allemagne) puis centrifugés 30 min à 24 000 g à 4 °C. Ils sont ensuite resuspendus dans 1 mL de tampon Tris-EDTA 50-1 mM, pH 8,8 (Sigma-Aldrich) et lysés avec 0,6 g de billes de verre (0,1 mm de diamètre, Biospec Products, Bartlesville, États-Unis d'Amérique) dans un appareil FastPrep FP 120 (Bio 101, Savant Instruments, Holbrook, États-Unis d'Amérique) pendant 30 s à une intensité de 6,5. Après centrifugation (15 min à 24 000 g à 4 °C), les protéines cytoplasmiques solubilisées sont purifiées avec 60 U d'endonucléase (Biorad, Hercules, États-Unis d'Amérique) et précipitées avec de l'acétone 10 : 1 v/v (Prolabo, Paris, France). La concentration en protéines est dosée par la méthode de Bradford avec de la sérum-albumine bovine comme standard (Wang *et al.*, 2012).

#### III.2.2.7.2. Électrophorèse deux dimensions sur gel SDS Page

Les échantillons contenant 300 µg de protéines sont dilués dans 350 µL de tampon d'extraction (7 M urée, 2 M thiourée, 5 g.L<sup>-1</sup> Triton X100, 3 g.L<sup>-1</sup> Biolyte 4/6, 3 g.L<sup>-1</sup> Biolyte 5/7, 3 g.L<sup>-1</sup> dithiothréitol) (Biorad) puis chargés sur le gel de séparation Immobiline DryStrips 17 cm (pI 4-7, Biorad) afin de séparer les protéines selon le pH isoélectrique (première dimension). La focalisation isoélectrique est réalisée dans une cuve IEF cell (Biorad) maintenue à 20 °C pour atteindre 38 000 Wh. L'équilibre est atteint au bout de 35 minutes après utilisation de deux tampons successifs de tris pH 8,8 50 mM, 360 g.L<sup>-1</sup> urée, 20 g.L<sup>-1</sup> SDS, 300 g.L<sup>-1</sup> glycérol. Le premier est supplémenté avec 10 g.L<sup>-1</sup> dithiothréitol (15 min) et le second avec 50 g.L<sup>-1</sup> iodoacétamide (Biorad) (20 min). La seconde séparation dimensionnelle est réalisée sur gel SDS-polyacrylamide contenant 12,5 % acrylamide (Biorad), à l'aide de tampon Tris 0,35 M pH 8,8, de SDS 10 g.L<sup>-1</sup> et de traces de persulfate d'ammonium (Biorad). Elle permet de séparer les protéines selon leur masse moléculaire. L'électrophorèse est réalisée à 14 °C avec un système d'électrophorèse de protéines 2D (PROTEAN II xi Cell, Biorad) sous 10 mA par gel et en utilisant un colorant pour le suivi du front de migration (Bromophenol blue, Sigma). Un marqueur de masses moléculaires Precision Plus Protein™ Standards, 10 – 250 kDa (Biorad) est également chargé (200 ng) (Wang *et al.*, 2012).

Après migration, les protéines sont colorées avec une solution de Bleu de Coomassie colloïdal (Biorad). Les gels sont ensuite numérisés à l'aide d'un densitomètre (GS800 TM, Biorad). L'analyse de l'image du protéome est réalisée avec le logiciel PDQuest 2-D (Biorad). Il permet de détecter les positions des protéines qui sont identiques entre les gels et de quantifier l'intensité de la coloration

afin de comparer des conditions différentes. Les masses moléculaires et les points isoélectriques sont interpolés à partir du marqueur de masse ayant migré en même temps que les échantillons. L'analyse du protéome est réalisée pour chaque échantillon en triple à partir de trois extractions différentes (Wang *et al.*, 2012).

L'analyse comparative se base sur la différence d'intensité des *spots* entre les conditions. Les *spots* présentant une différence de densité supérieure ou inférieure à un facteur 2 sont considérés comme différents entre deux conditions et sont retenus pour identification. Les *spots* absents dans une condition, mais présents dans l'autre sont également retenus (Wang *et al.*, 2012).

### III.2.2.7.3. Identification des protéines

Les *spots* correspondant aux protéines différentiellement synthétisées sont prélevés et identifiés par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS). Le spectrophotomètre de masse LTQ-XL (ThermoFinnigan, Waltham, Massachusetts, États-Unis d'Amérique) de la Plateforme d'Analyse Protéomique de Paris Sud-Ouest (PAPPSO, INRA, Gif-sur-Yvette, France) est utilisé. Les séquences sont comparées aux bases de données du Joint Genome Institute (JGI, Walnut Creek, États-Unis d'Amérique) pour être identifiées (Wang *et al.*, 2012).

## III.2.3. Résultats

Les dosages et la conduite des fermentations sont validés après avoir réalisé des bilans matières et des bilans élémentaires (carbone dans cette étude) qui bouclent entre 85 %<sup>1</sup> et 105 % (Villadsen, Nielsen et Lidén, 2011).

### III.2.3.1. Effet du cisaillement sur la production de cellulases en fermentations *fed-batch*

Les profils d'évolution de la concentration en biomasse sont conformes au protocole d'IFPEN (figure I.2.f). La phase de croissance réalisée en *batch* a permis d'atteindre des concentrations en biomasse proches de celles attendues, et le taux de croissance maximum est en accord avec les résultats obtenus dans les parties précédentes de la thèse. Ensuite, la phase de production conduite en *fed-batch* se caractérise, respectivement, par une stabilisation de la concentration en biomasse ainsi que par une concentration résiduelle en lactose non détectable en HPLC. De plus, les cultures sont bien reproductibles, comme le montrent les figures III.2.aa et III.2.ba qui présentent des cinétiques de croissance similaires pour chaque condition étudiée, et ce, sans différence entre les mobiles d'agitation. Les résultats quantitatifs de ces fermentations sont présentés au tableau III.2.iv.

En ce qui concerne la production de cellulases, les résultats obtenus à l'issue des fermentations à faible concentration en biomasse, présentés sur la figure III.2.ab, montrent que le type de mobile

---

<sup>1</sup>Les bilans réalisés avec les champignons filamenteux sont faussés du fait de la non-vérification de l'hypothèse d'homogénéité du bioréacteur. En effet, lors de la culture une partie des filaments s'accroche sur le bioréacteur (arbre d'agitation, canules, diffuseur d'air...). Cependant, les bilans bouclent suffisamment dans cette étude pour avoir confiance dans les dosages.

TAB. III.2.iv. : Données caractéristiques des fermentations de *T. reesei* réalisées pour la production de cellulases.

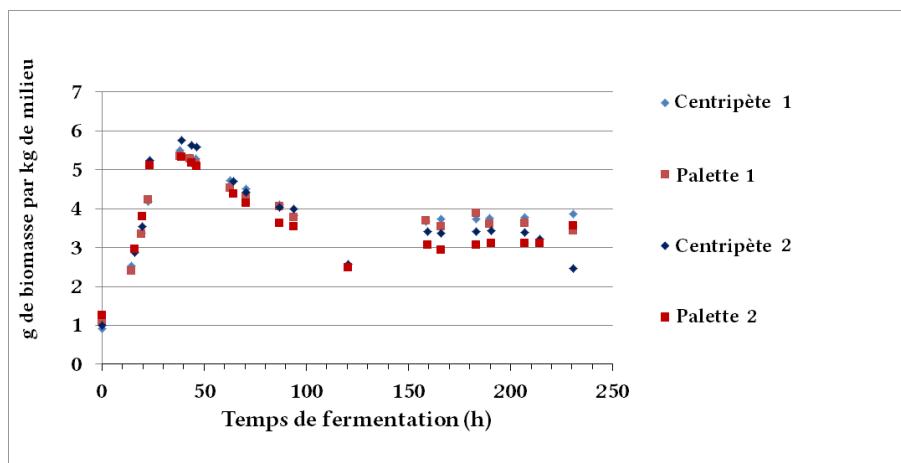
	Fermentation à faible concentration en biomasse	Fermentation à forte concentration en biomasse
Concentration initiale en glucose (g.L <sup>-1</sup> )	10	30
Durée de la phase de croissance (h)	30	45
Taux de croissance maximum (h <sup>-1</sup> )	0,063 ± 0,006	0,059 ± 0,003
Concentration en biomasse (g.kg <sup>-1</sup> )	3,5	12

d'agitation n'influence pas la production des protéines. Ainsi, la vitesse spécifique de production de l'enzyme ( $q_p$ ) moyenne des expériences est similaire, quel que soit le type de mobile utilisé (tableau III.2.iv) et la vitesse agitation appliquée. En effet, le  $q_p$  moyen (pour les manipulations à 5 et 15 g.kg<sup>-1</sup> de concentration en biomasse) est de  $0,0120 \pm 0,0030$  g.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour le mobile centripète et de  $0,0119 \pm 0,0033$  g.gX<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> pour le mobile palette. Cette observation est valable pour des valeurs de P/V allant de 6 et 73 kW.m<sup>-3</sup> et des valeurs d'EDCF<sub>ε<sub>max</sub></sub> de 94 à 1085 kW.m<sup>-3</sup>.s<sup>-1</sup>.

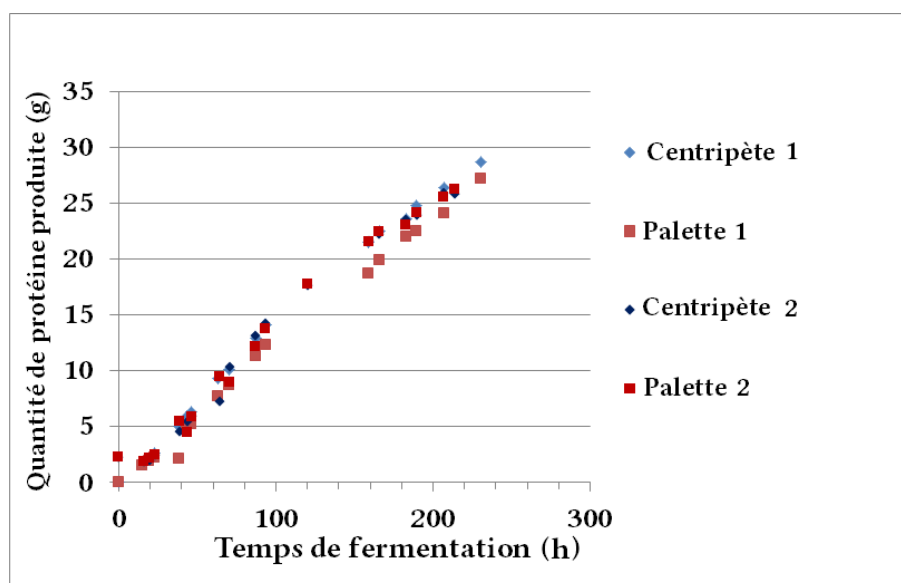
La figure III.2.ac montre que les cocktails enzymatiques, dans ces mêmes conditions, ont la même activité enzymatique, que la culture soit réalisée avec le mobile de type palette ou avec celui de type centripète. Il y a plus d'écart entre les répétitions d'une même condition qu'entre les deux conditions d'une même série.

Ces résultats sont confirmés avec les expériences réalisées à forte concentration en biomasse. En effet, sur la figure III.2.bb il y a une différence sur la vitesse de production de cellulases lorsque le flux de sucre inducteur est modifié de 20 % (débit de 5 mL.h<sup>-1</sup> au lieu de 4 mL.h<sup>-1</sup>), alors qu'il n'y a pas de différence avec les deux mobiles d'agitation. Un résultat similaire est retrouvé pour l'activité enzymatique.

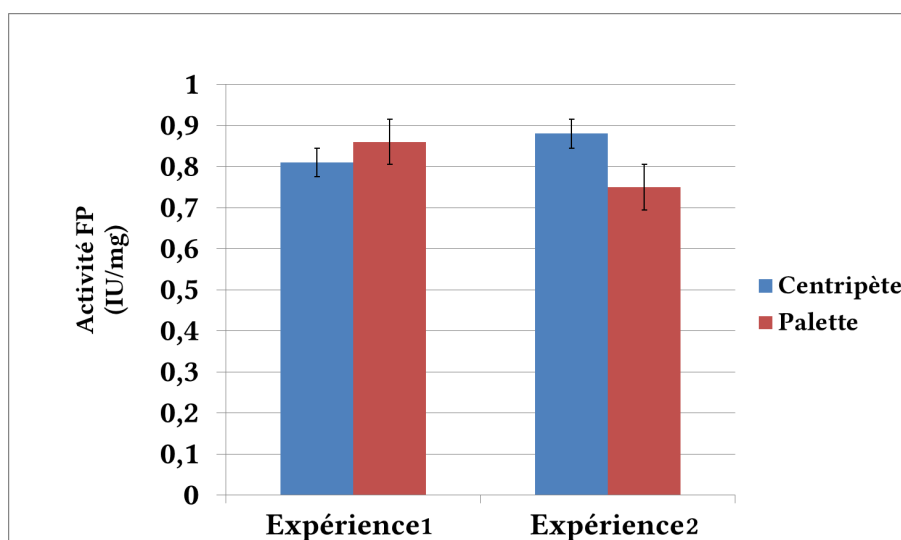
Au final, aucun effet du cisaillement n'a pu être mis en évidence dans cette série d'expériences. Cependant, la gamme d'EDCF<sub>ε<sub>max</sub></sub> explorée est relativement restreinte (deux fois moins grande que celle explorée pour l'étude sur la croissance). C'est pourquoi des expériences avec une gamme plus importante de cisaillement ont été réalisées, d'abord en culture continue puis en *fed-batch*.



(a) Évolution de concentration en la biomasse au cours du temps.



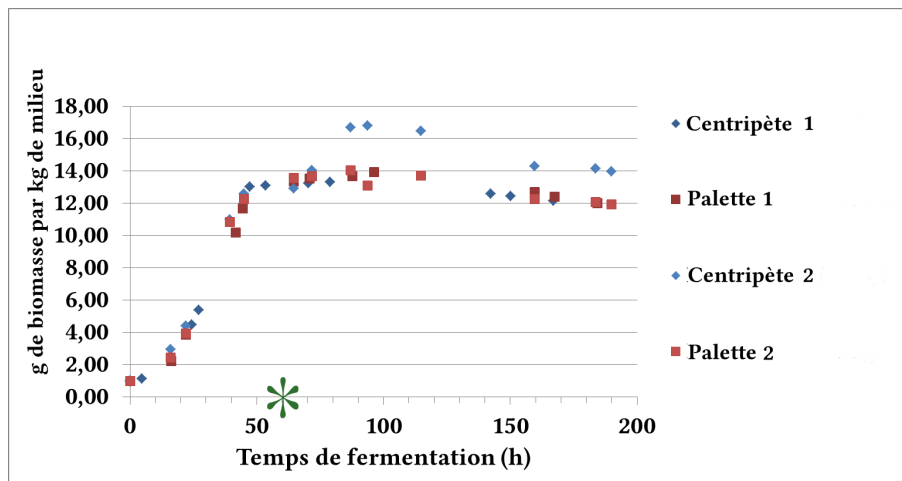
(b) Évolution de la quantité de protéines cumulée en fonction du temps.



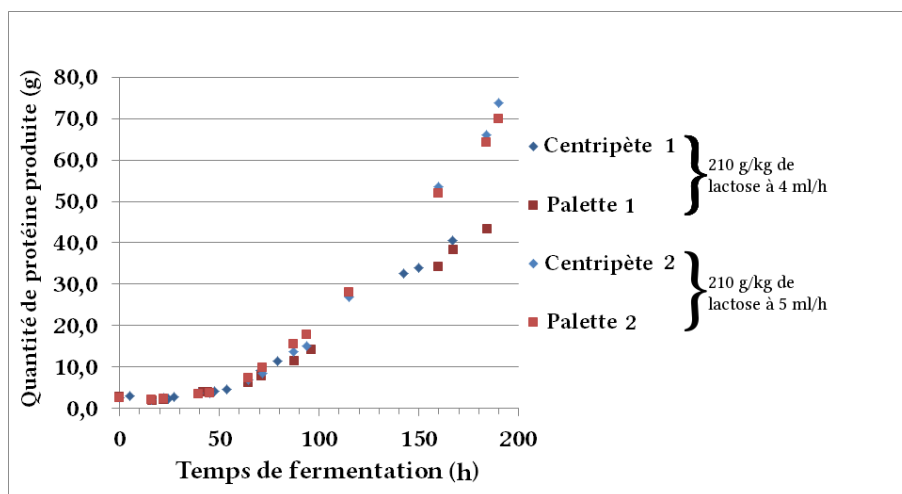
(c) Activité FP en fin de production.

FIG. III.2.a. : Comparaison des concentrations en biomasse, en protéines et de l'activité cellulolytique globale (FP) lors de fermentations en *fed-batch* de *Trichoderma reesei* en fonction du cisaillement généré par l'utilisation de deux mobiles différents.

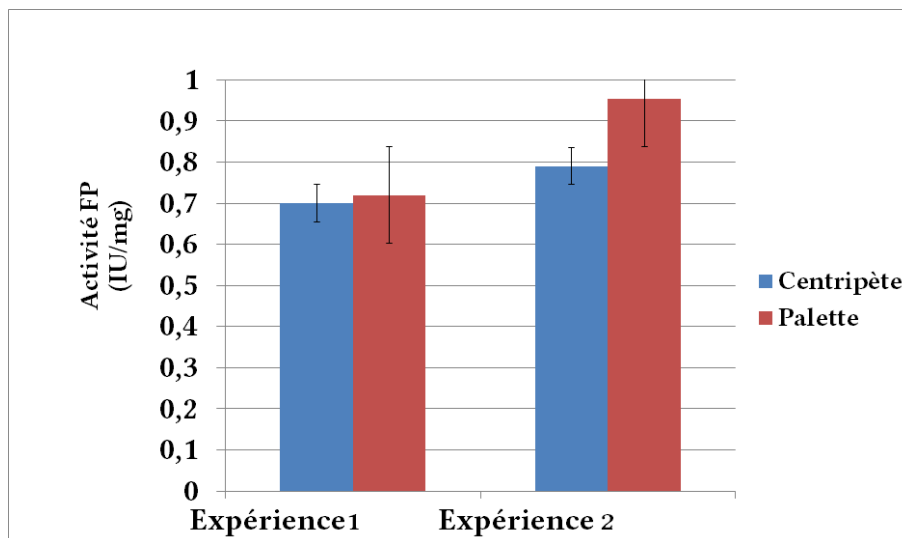
Essais réalisés à une concentration en biomasse à  $5 \text{ g.kg}^{-1}$  et dupliqués.



(a) Évolution de la concentration en biomasse au cours du temps.



(b) Évolution de la quantité de protéines cumulée en fonction du temps.



(c) Activité FP en fin de production.

FIG. III.2.b. : Comparaison des concentrations en biomasse, en protéines et de l'activité cellulolytique globale (FP) lors de fermentations en *fed-batch* de *Trichoderma reesei* en fonction du cisaillement généré par l'utilisation de deux mobiles différents.

Essais réalisés à une concentration en biomasse à  $15 \text{ g.kg}^{-1}$  et dupliqués. L'étoile verte correspond à un ajout de lactose accidentel durant la manipulation expérience 1 à  $15 \text{ g.kg}^{-1}$  de biomasse c'est-à-dire avec le mobile centripète.

### III.2.3.2. Effet du cisaillement sur la production de cellulases en fermentations continues

Afin de générer un cisaillement plus fort que celui obtenu précédemment, des fermentations ont été réalisées en continu, en appliquant une vitesse d'agitation de 800 rpm jusqu'à obtention d'un premier état stationnaire stable (environ 200 h), puis une vitesse d'agitation de 1700 rpm jusqu'à obtention du second état stationnaire stable (environ 400 h). Lors du changement de vitesse d'agitation, il y a alors augmentation transitoire de la concentration en biomasse, qui est probablement le fait du ravalement d'une partie de celle-ci accumulée sur les parois du bioréacteur pendant les premières 200 h de culture. Les données caractéristiques de ces deux états stationnaires sont regroupées au tableau III.2.v.

TAB. III.2.v. : Données caractéristiques des états stationnaires obtenus lors des fermentations continues de *T. reesei* conduites à deux vitesses d'agitation.

	Agitation 800 rpm	Agitation 1700 rpm
Cisaillement $EDCF_{\epsilon_{\max}}$ ( $\text{kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ )	157	3200
Concentration en biomasse ( $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ )	7,1	7,4
Concentration en protéines ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )	4,4	3,6
Vitesse spécifique de production de protéines ( $\text{g}\cdot\text{g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )	0,018	0,014

Les résultats présentés au tableau III.2.v et la figure III.2.c montrent que le cisaillement influence peu la croissance du microorganisme dont la concentration reste autour de  $7,25 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ . En revanche, la production de protéines est négativement affectée sous un fort cisaillement (1700 rpm), tant au niveau de sa concentration que de sa vitesse spécifique de production qui sont environ inférieures de 20 % à celles obtenues sous faible cisaillement (800 rpm).

Les vitesses spécifiques de production obtenues lors de ces cultures continues sont supérieures à celles obtenues en mode *fed-batch* ( $0,012 \text{ g}\cdot\text{g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Cela s'explique très probablement par les différentes conditions mises en œuvre : source d'azote (extrait de levure en continu et *cornsteep* en *fed-batch*), antimousse (SB2111 et non l'EROL ACF), conditions de cultures (pH 4,8 et 27 °C en continu et pH 4,0 et 25 °C en *fed-batch*). Ces choix expérimentaux différents ont été imposés du fait de la faible solubilité du *cornsteep* et de l'antimousse EROL ACF.

Différentes répétitions de cette expérience en continu ont permis de confirmer cette baisse de la vitesse spécifique de production lorsque le cisaillement, caractérisé par le paramètre  $EDCF_{\epsilon_{\max}}$ , est augmenté de 157 à  $3200 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Ces résultats ont été confirmés lors de deux cultures réalisées en *fed-batch* à une concentration en biomasse de  $15 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , à des vitesses d'agitation constantes de 800 rpm et 1700 rpm, avec un mobile d'agitation identique centripète. Lors de la phase de production, le pH est contrôlé à 4,0 et la température à 25 °C. Les conditions d'agitation appliquées génèrent des valeurs d' $EDCF_{\epsilon_{\max}}$  de 94 et  $1920 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ .

Comme précédemment, les résultats obtenus en termes de production de cellulases diffèrent selon le cisaillement appliqué : la vitesse spécifique de production de cellulases moyenne est de  $0,013 \text{ g}\cdot\text{g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$



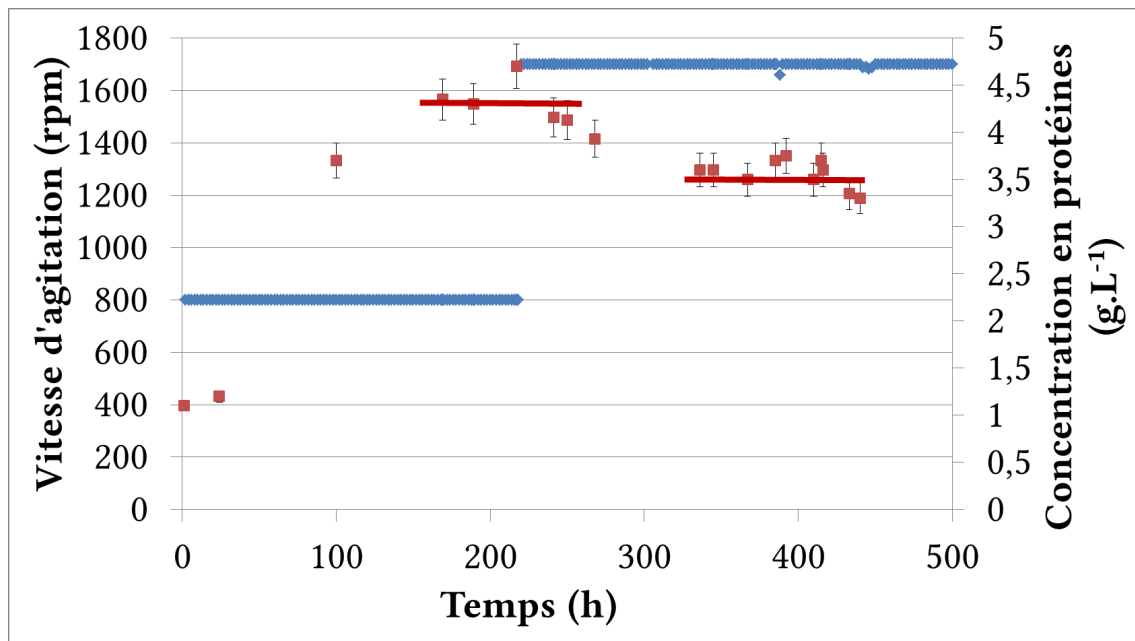


FIG. III.2.c. : Évolution de la concentration en protéines (rouge) lors d'une culture en continue de *Trichoderma reesei* soumises à deux vitesses d'agitation (bleu) 800 rpm et 1700 rpm

à 800 rpm et de  $0,010 \text{ g.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$  à 1700 rpm. Ce résultat confirme ceux obtenus en culture continue, c'est-à-dire qu'un cisaillement fort induit une baisse d'environ 20 % de la vitesse de production d'enzymes.

### III.2.3.3. Effet du cisaillement sur le protéome intracellulaire de *T. reesei* en fermentations continue

Le protéome intracellulaire des champignons a été caractérisé dans ces deux conditions de cisaillement, à l'issue de fermentations continues. Les culots cellulaires ont été prélevés à l'état d'équilibre à 800 rpm et à 1700 rpm et ont conduit à l'obtention des gels présentés à la figure III.2.d. Les gels présentent des différences importantes qui ont été traitées par analyse d'images afin d'identifier les protéines synthétisées différemment dans les deux conditions. Ont été retenues les protéines synthétisées dans une seule des deux conditions ainsi que celles dont la synthèse est accrue ou réduite d'un facteur supérieur ou égal à 2. Au total, 37 protéines voient leur synthèse modifiée lorsque le cisaillement est différent.

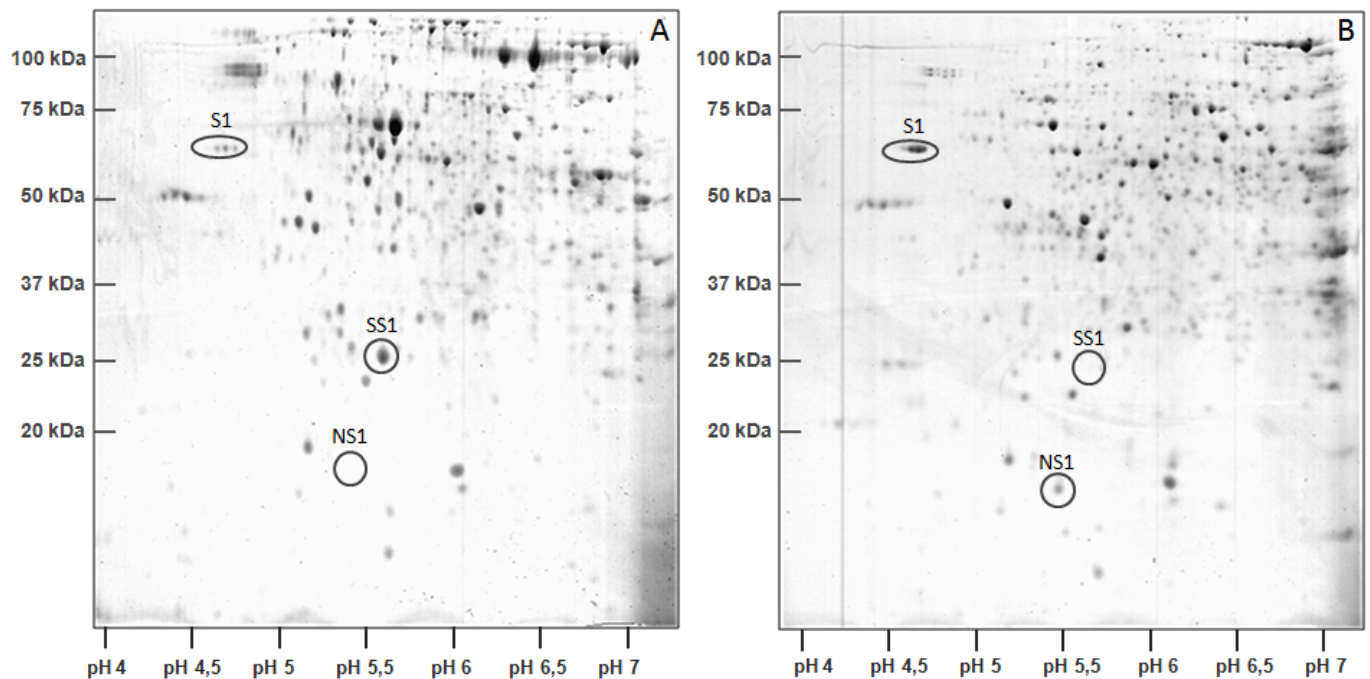


FIG. III.2.d. : Protéomes caractéristiques de *T. reesei* à l'issue de cultures réalisées dans des conditions d'agitation différentes.

(a) 800 rpm ; (b) 1700 rpm ; S1 correspond à des protéines sur-synthétisées après l'augmentation du cisaillement ; NS correspond à des protéines nouvellement synthétisées après l'augmentation du cisaillement ; SS1 correspond à des protéines sous synthétisées après l'augmentation du cisaillement.

Les protéines différemment synthétisées ont été prélevées puis identifiées par spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie liquide (LC-MS/MS) et comparaison avec les données *in silico* des banques de séquences. L'analyse des différences entre les deux conditions est synthétisée dans les tableaux III.2.vi, III.2.vii et III.2.viii.

TAB. III.2.vi. : Protéines nouvellement synthétisées après l'augmentation du cisaillement.

N°	Protéine	Classe d'activité
B5	<i>Mitochondrial chaperonin, Cpn60/Hsp60p</i>	<i>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</i>
C8	<i>Fructose 1,6-bisphosphate aldolase</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
C9	<i>Uroporphyrinogen decarboxylase</i>	<i>Coenzyme transport and metabolism</i>
C10	<i>20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA2/PRE8</i>	<i>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</i>
C11	<i>20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA2/PRE8</i>	<i>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</i>
C12	<i>20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA6/SCL1</i>	<i>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</i>
C16	<i>6-phosphogluconolactonase - like protein</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
C21	<i>Molecular chaperones GRP78/BiP/KAR2, HSP70 superfamily</i>	<i>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</i>
C25	<i>Phosphoglycerate mutase</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
C45	<i>UDP-galactopyranose mutase</i>	<i>Electron transport</i>
C49	<i>Glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenases</i>	<i>Amino acid transport and metabolism</i>
C63	<i>NAD-dependent malate dehydrogenase</i>	<i>Energy production and conversion</i>
C64	<i>NAD-dependent malate dehydrogenase</i>	<i>Energy production and conversion</i>

TAB. III.2.vii. : Protéines sous synthétisées après l'augmentation du cisaillement.

N°	Protéine	Classe d'activité
A1	<i>Beta-glucosidase, lactase phlorizinhydrolase, and related proteins</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
A2	<i>1,4-beta- cellobiohydrolase (Precursor)</i>	<i>Carbohydrate metabolism</i>
A3	<i>Glucosidase I</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
A5	<i>Ca<sup>2+</sup>-modulated nonselective cation channel polycystin</i>	<i>Carbohydrate metabolism</i>
A7	<i>Putative agmatine deiminase</i>	<i>Nucleoside metabolism</i>
A8	<i>putative agmatine deiminase (Metarhizium anisopliae ARSEF 23)</i>	<i>Nucleoside metabolism</i>
A11	<i>Ca<sup>2+</sup>-binding protein Regucalcin/SMP30</i>	<i>Inorganic ion transport and metabolism</i>
A12	<i>20S proteasome, regulatory subunit alpha type PSMA3/PRE10</i>	<i>Posttranslational modification, protein turnover, chaperones</i>
A15	<i>Mevalonate pyrophosphate decarboxylase</i>	<i>Lipid transport and metabolism</i>
A17	<i>UDP-glucose 4-epimerase/UDP-sulfoquinovose synthase</i>	<i>Cell wall/membrane/envelope biogenesis</i>
A18	<i>endo-beta-1,4-glucanase</i>	<i>Polysaccharide catabolism</i>
A22	<i>Armadillo/beta-Catenin/plakoglobin</i>	<i>Nucleoside metabolism</i>
A25	<i>beta-D-glucoside glucohydrolase</i>	<i>Carbohydrate metabolism</i>
A28	<i>beta-D-glucoside glucohydrolase</i>	<i>Carbohydrate metabolism</i>
A29	<i>beta-D-glucoside glucohydrolase</i>	<i>Carbohydrate metabolism</i>
A30	<i>beta-D-glucoside glucohydrolase</i>	<i>Carbohydrate metabolism</i>

TAB. III.2.viii. : Protéines sur-synthétisées après l'augmentation du cisaillement.

N°	Protéine	Classe d'activité
B4	<i>Glucosidase I</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
B6	<i>6-phosphogluconate dehydrogenase</i>	<i>Carbohydrate transport and metabolism</i>
C3	<i>Inorganic pyrophosphatase/Nucleosome remodeling factor subunit NURF38</i>	<i>Energy production and conversion</i>
C4	<i>Ca<sup>2+</sup>-binding protein Regucalcin/SMP30</i>	<i>Inorganic ion transport and metabolism</i>
C35	<i>Metalloexopeptidases</i>	<i>Amino acid transport and metabolism</i>
C50	<i>Predicted oxidoreductase</i>	<i>General function</i>
C51	<i>Acetate kinase</i>	<i>Phosphotransferase activity, carboxyl group as acceptor</i>
C52	<i>S-adenosylhomocysteine hydrolase</i>	<i>Coenzyme transport and metabolism</i>

L'augmentation d'intensité du cisaillement s'accompagne d'une production de 13 nouvelles protéines (tableau III.2.vi). Parmi elles, cinq sont des protéines chaperonnes, dont le rôle est d'assister les autres protéines dans leur maturation en facilitant leur repliement et de corriger les dommages causés par une perte de fonction protéique due à un mauvais repliement tridimensionnel. Leur présence en forte condition de cisaillement indique que celui-ci génère un stress cellulaire auquel les cellules répondent par cette synthèse.

D'autres protéines sont, soit nouvellement synthétisées (tableau III.2.vi), soit sur-synthétisées (tableau III.2.viii) en conditions de cisaillement fort. Elles appartiennent au métabolisme central de la cellule : cinq protéines impliquées dans le métabolisme carboné, quatre protéines liées à la production d'énergie intracellulaire, cinq protéines engagées dans les transports d'électrons et d'ions, et une protéine utilisée pour le métabolisme protéique. L'accroissement de ces synthèses protéiques indique que, sous fort cisaillement, les cellules s'adaptent en favorisant leur métabolisme central, au détriment des autres fonctions moins essentielles.

Certaines protéines (16) ont un niveau de synthèse inférieur en conditions de forte agitation (tableau III.2.vii). Neuf sont liées au métabolisme des carbohydrates (glucohydrolases, glucosidases, cellobiohydrolases) et donc à la production de cellulases. Cela signifie que, dans cette condition de fort cisaillement, la production d'enzymes est négativement affectée, confirmant ainsi les résultats obtenus précédemment à l'échelle macroscopique dans le bioréacteur. La synthèse de sept autres protéines est réduite, dont deux protéines impliquées dans le métabolisme des nucléotides, deux autres liées à la synthèse de polysaccharides et des enveloppes cellulaires.

Ces résultats, obtenus dans les derniers jours de la thèse, ne sont pas encore complètement exploités, mais ils feront l'objet d'un travail approfondi d'analyse et de comparaison avec la littérature.

### III.2.4. Synthèse des résultats

L'exploration de l'effet du cisaillement a d'abord été réalisée lors de cultures *fed-batch* en considérant une faible gamme de cisaillement, et ce avec deux concentrations en biomasse différentes afin de générer deux régimes d'écoulement différents. Dans les conditions explorées, aucun effet notable du cisaillement n'a été observé, même pour des valeurs d' $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  allant jusqu'à  $1085 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ , valeurs supérieures (d'un facteur  $10^2$  à  $10^3$ ) à celles rencontrées à l'échelle industrielle.

Ensuite, des fermentations continues ont été mises en œuvre selon deux conditions de cisaillement très éloignées l'une de l'autre, et plus fortes que celles explorées lors des cultures *fed-batch* ( $\text{EDCF}_{\epsilon_{\max}}$  environ 3 fois supérieur). Un effet délétère du fort cisaillement a été observé, avec une diminution de 20 % de la vitesse spécifique de production de cellulases et de la concentration en enzymes dans les surnageants de milieu de culture. Ce résultat a été confirmé sur des expériences en *fed-batch* dans des conditions similaires.

L'analyse du protéome intracellulaire confirme ces résultats. Elle démontre une diminution de la production de cellulases intracellulaires confirmant la baisse observée dans le milieu de culture. Cette diminution est associée à l'apparition des marqueurs du stress tels que des protéines chaperonnes, induits par des conditions de cisaillement extrêmes. L'analyse préliminaire du protéome présentée dans cette étude n'est pas complète, car les données ont été obtenues très tardivement. Il reste encore à vérifier l'identification et l'annotation automatique des protéines avant d'émettre des hypothèses sur les phénomènes d'adaptation au stress.

En résumé, un effet du cisaillement sur la production de cellulases a été mis en évidence dans cette étude, lors de très forts cisaillements. Cependant, cet effet est négligeable dans des conditions de cisaillement faibles et modérées, comparables à celles rencontrées dans l'industrie.

## Quatrième partie

### Discussion et conclusion générale



## IV.1. Discussion générale

L'extrapolation d'un procédé mettant en œuvre un champignon filamenteux aérobique nécessite de maintenir un transfert en oxygène suffisant pour répondre aux besoins du microorganisme afin de le mettre dans des conditions permettant une bonne croissance et une production performante. Par ailleurs, le développement des filaments de champignon tend à augmenter la viscosité du milieu de culture. Cela limite le transfert de masse alors que la demande en oxygène augmente proportionnellement à la concentration en biomasse. La demande en oxygène augmentant en même temps que la viscosité du moût fermentaire, le maintien du transfert est réalisé grâce à l'augmentation de l'agitation et l'aération. Ceci augmente le cisaillement au sein du bioréacteur et affecte la morphologie du champignon et donc la viscosité du milieu. Pour assister l'extrapolation de ce type de bioprocédé, les travaux menés au cours de cette thèse ont cherché à établir les liens entre les éléments du « triptyque » morphologie, viscosité et productivité. Dans ce but, des outils ont été développés pour accéder à la viscosité et la morphologie des suspensions de champignons. Ces outils ont ensuite servi conjointement à étudier les paramètres du procédé liés à l'agitation afin de définir le cisaillement et à caractériser leurs effets sur le taux de croissance du microorganisme et la vitesse spécifique de production de protéines, qui sont deux paramètres importants, indépendants (dans le cas de *Trichoderma reesei*) l'un de l'autre, et reflètent de la physiologie du microorganisme.

Une méthode de mesure de la viscosité des moûts a été mise au point. Cette dernière est basée sur l'utilisation d'un rhéomètre rotatif équipé d'un ruban hélicoïdal avec l'analogie de Couette. Cela a été rendu nécessaire, car les méthodologies disponibles étaient insuffisantes. Les mesures réalisées par exemple, avec la géométrie plan-plan avec de fortes concentrations en biomasse, aboutissaient soit à une surestimation de la viscosité, car le mycélium était écrasé au niveau de l'entrefer, soit à une sous-estimation de celle-ci à cause de la formation de structures parallèles qui s'organisaient dans le sens de l'écoulement (Henaut *et al.*, 2013). La nouvelle méthode de mesure de la viscosité est mieux adaptée aux échantillons hétérogènes tels que les moûts de fermentation de *T. reesei*. Cependant, malgré ces avantages, elle ne peut être appliquée que dans un domaine restreint de taux de cisaillement correspondant à un écoulement laminaire. L'étendue de ce dernier étant proportionnelle à la viscosité de la solution, ceci la rend inutilisable à faible concentration en biomasse. Pour les faibles concentrations en biomasse, il est possible d'utiliser, comme évoqué précédemment, d'autres outils que le rhéomètre rotatif. Il est également possible d'utiliser un rhéomètre rotatif équipé d'une géométrie conventionnelle puis de changer de géométrie quand la biomasse augmente comme l'a proposé (Malouf *et al.*, 2013). Dans notre étude, nous n'avons pas cherché à accéder aux faibles valeurs de viscosité. Nous avons considéré qu'il était nécessaire de caractériser la viscosité du moût aux fortes concentrations en biomasse, c'est-à-dire au moment où la viscosité et les besoins en oxygène sont les plus importants, car il s'agit des données critiques pour le dimensionnement des fermenteurs industriels. D'autres auteurs proposent d'obtenir la viscosité en ligne avec des boucles de recirculation (Olsvik et Kristiansen, 1992) ou en utilisant l'arbre d'agitation et le mobile comme un rotor dans un rhéomètre rotatif (Quintanilla *et al.*, 2015). La mesure en ligne de la viscosité pourrait être



un atout pour la conduite du procédé. Cependant, l'utilisation du système d'agitation du bioréacteur semble compromise par le fait que le régime d'écoulement à grande échelle est turbulent ou intermédiaire alors qu'une mesure de viscosité nécessite un régime d'écoulement laminaire. La boucle de recirculation avec deux capteurs de pression situés à deux endroits différents, est une alternative intéressante, car elle permet de remonter à la viscosité du milieu par la mesure de la perte de charge (Manon, 2012). Cependant, l'impact du temps de séjour dans des conditions non contrôlées, différentes de celles du bioréacteur (pH, D.O., température), doit bien être pris en compte dans ce type de dispositif afin de ne pas impacter la culture.

La méthodologie développée pour caractériser la morphologie de la souche *T. reesei* Tr3002 met en œuvre un microscope optique motorisé couplé à de l'analyse d'images, capables de représenter efficacement les structures tridimensionnelles du champignon. L'outil développé dans cette étude utilise une projection dans un plan des objets considérés en trois dimensions. Cette étape permet de travailler à un fort grossissement ( $\mu\text{m}$ ) tout en observant l'intégralité d'un objet de grande taille (mm). Les champignons sont alors observés isolément alors que la rhéologie du moût est imposée par le réseau formé par plusieurs individus. Un lien fort entre ces interactions et la structure des champignons isolés a pu être observé. La mise au point d'une méthode fiable et répétable de mesure de la morphologie s'est avérée une tâche complexe, car de nombreuses difficultés sont apparues lors du développement. Ainsi, pour avoir un nombre d'objets suffisant, il a été nécessaire de traiter un plus grand nombre d'images qu'initialement prévu (nous sommes par exemple, passé d'une surface de lamelle analysée de  $0,944 \text{ mm}^2$  lors de la première version, à  $3,776 \text{ mm}^2$  dans la version finale). Il a fallu également optimiser la dilution du colorant bleu pour limiter la saturation du canal bleu de la caméra et optimiser les algorithmes utilisés pour l'analyse d'images. Il est apparu aussi que ces réglages étaient dépendants de la souche utilisée. Ainsi, l'utilisation d'une souche différente, connue dans la littérature pour être peu visqueuse (*T. reesei* PC3-7) a nécessité de les réadapter. Le facteur limitant de la méthode reste le temps d'acquisition et de transfert des données qui est proche de 12 heures pour un échantillon ce qui a limité le nombre d'échantillons qu'il était possible d'analyser au cours d'une même expérience. Les résultats obtenus ont néanmoins permis de définir des critères morphologiques pertinents pour caractériser ce champignon, intégrant le nombre de boucles présentes dans les images des champignons. Ils démontrent aussi que les critères morphologiques liés à la viscosité de la souche Tr3002 sont différents de ceux de la PC3-7. Ces différences s'expliquent par la morphologie étalée de Tr3002 qui lui confère une forte proportion à s'entremêler sur elle-même et à générer une forte viscosité alors que la souche PC3-7 a une morphologie plus compacte qui la rend peu visqueuse et qui permet d'accéder à une longueur caractéristique des enchevêtrements plus simplement que le nombre de boucles retrouvé chez Tr3002.

La comparaison de l'évolution de la concentration en biomasse au cours du temps des deux souches (figure III.1.i), à 800 et 1700 rpm, a permis de mettre en évidence, une différence importante au niveau de l'impact du cisaillement sur le taux de croissance. Le taux de croissance de la souche PC3-7 est le même à ces deux vitesses d'agitation contrairement à la souche Tr3002 pour laquelle on observe une diminution de 20 % à 1700 rpm par rapport à 800 rpm. Cela nous amène à poser l'hypothèse suivante : sachant que lors qu'un hyphes atteint une certaine longueur (longueur de formation d'une

branche L.F.B.), une branche est alors formée latéralement sur la branche mère (Barry et Williams, 2011). Il est possible que la longueur de formation des branches de Tr3002 soit supérieure à celle de PC3-7. Cela expliquerait la différence morphologique entre les deux souches. Si cette hypothèse est vérifiée, des comportements différents de ses souches face à un cisaillement pourraient être induits. En effet, si les filaments d'un champignon sont coupés avant que ce dernier ait eu le temps de former une branche ( $L.F.B. > \lambda$ ), alors la croissance de ce dernier peut être ralentie. Dans le cas contraire ( $L.F.B. < \lambda$ ), la morphologie du champignon peut être modifiée sans ralentissement de la croissance. Ces scénarios méritent d'être évalués en comparant l'effet de différentes intensités de cisaillement sur deux souches d'un même microorganisme aux morphologies éloignées. Il serait également intéressant de réaliser les analyses morphologiques à différents moments de la culture et de comparer ces longueurs caractéristiques à la microéchelle de Kolmogorov ( $\lambda$ ). Ceci pourrait se faire en analogie des travaux réalisés dans le domaine des émulsions, dans lequel un lien est généralement considéré entre la taille maximale des gouttelettes et l'échelle de Kolmogorov représentative des plus petits tourbillons présents dans l'écoulement, qui donnent lieu aux cisaillements les plus intenses (Paul, Atiemo-Obeng et Kresta, 2004). La difficulté est ici de prendre en compte l'hétérogénéité spatiale et temporelle de l'échelle de Kolmogorov dans une cuve agitée, alors que seule sa valeur moyenne est a priori accessible via la mesure ou le calcul de la puissance dissipée.

L'accès à la morphologie et à la viscosité des cultures de *Trichoderma reesei* a permis d'étudier l'effet du cisaillement sur le taux de croissance du microorganisme et sa vitesse spécifique de production d'enzymes. Le cisaillement est une notion qui peut être considérée de différentes manières. Il peut s'agir du cisaillement maximal, souvent considéré comme proportionnel à la vitesse en bout de pale ( $V_{tip}$ ), d'un cisaillement moyen que certains auteurs (Sánchez Pérez *et al.*, 2006) relient à la puissance dissipée par unité de volume ( $P/V$ ) ou de l'historique des cisaillements subis par le champignon (EDCF) qui tient compte du temps de recirculation dans la cuve. Le premier critère considéré dans cette étude était le cisaillement maximal avec l'utilisation de disperseurs et la réalisation de cultures à forte vitesse d'agitation. Des  $V_{tip}$  similaires à celles rencontrées à l'échelle industrielle ont été reproduites au laboratoire grâce à l'utilisation de moteurs surdimensionnés et ont démontré qu'il ne s'agit pas d'un critère pertinent pour traduire l'effet du cisaillement rencontré à l'échelle industrielle. En effet, ces intensités d'agitation, inhabituelles à petite échelle, correspondent à des valeurs de  $P/V$  et EDCF très supérieures à celles attendues à l'échelle industrielle. L'utilisation de fermenteurs de laboratoire plus classiques ne permet tout de même pas d'atteindre des EDCF ou  $P/V$  similaires à ceux attendus à grande échelle et les tentatives de reproduction à petite échelle restent infructueuses pour le moment. En effet, les faibles niveaux d'agitation correspondants entraînent des problèmes de limitation en oxygène et une croissance en « amas » (figure III.1.f). Ces expériences montrent qu'il est difficile, voire impossible, de reproduire au laboratoire toutes les conditions rencontrées dans un fermenteur industriel. L'acquisition de données pertinentes pour l'extrapolation passe donc par la réalisation de plusieurs manipulations dans des conditions différentes, suivie d'un recoupement des informations obtenues. Ainsi, dans cette étude, il a été nécessaire de réaliser des manipulations avec un niveau de concentration en biomasse plus faible afin d'obtenir un régime d'écoulement identique à ceux des cultures industrielles, et des essais avec la même concentration

en biomasse que celle rencontrée dans le procédé industriel.

Les expériences réalisées correspondent à l'exploration de conditions différentes et également des modes de cultures différents. Les cultures industrielles sont réalisées en mode *fed-batch*, mais la mise en œuvre de cultures continues présente des avantages pour l'étude de l'impact du cisaillement sur les vitesses spécifiques de production. Elles permettent en effet d'imposer le taux de croissance grâce au taux de dilution et d'atteindre des états stationnaires qui permettent de calculer précisément la vitesse spécifique de production en protéines. Les calculs de cette vitesse en *fed-batch* sont réalisés en dynamique et comportent une incertitude plus importante. Ces expérimentations ont permis de mettre en évidence un impact du cisaillement sur la vitesse de production d'enzymes, mais à des EDCF bien supérieurs à ceux rencontrés à l'échelle industrielle. Toutefois, ces cultures sont plus difficiles à mettre en œuvre. Les phénomènes de moussage suffisent à déstabiliser la culture et à retarder l'atteinte d'un état d'équilibre. Ce problème a pu être réglé dans cette étude avec l'utilisation d'un anti-mousse soluble (plus coûteux que celui utilisé dans le procédé industriel). Cette solution est efficace, mais nécessite de valider au préalable que l'antimousse n'ait pas un effet inattendu sur le microorganisme capable de biaiser les résultats de l'expérience. En outre, les cultures en mode continu durent beaucoup plus longtemps que celles en mode *batch* ou *fed-batch* (généralement plus de 500 h), ce qui augmente la probabilité de rencontrer un accident de culture (bouchage d'une pompe, contamination, panne électrique, etc.). Ces caractéristiques font que l'utilisation de ce type de culture continue est réservée à la réalisation d'études de compréhension du comportement physiologique des microorganismes, plus que pour l'optimisation d'un procédé mettant en œuvre un champignon filamentueux. Dans cette étude, l'utilisation de cultures en mode continu a permis de mettre en évidence un effet négatif (mais assez modéré) d'une augmentation importante de la vitesse d'agitation sur la vitesse spécifique de production de cellulases. Elle a permis également de caractériser le protéome intracellulaire de cellules obtenues sous faible (800 rpm) et fort (1700 rpm) cisaillement. Ces essais ont permis d'identifier qualitativement les protéines impactées par l'effet du cisaillement, confirmant la diminution de la synthèse des enzymes cellulolytiques associée à une production de protéines de stress. Ces résultats confirment, au niveau cellulaire, que le cisaillement génère des états physiologiques différents.

Cette étude a permis de comparer l'efficacité de différentes représentations du cisaillement. La plus pertinente est l' $EDCF_{\epsilon_{max}}$ . Cette dernière intègre la fréquence de passage du microorganisme près du mobile d'agitation et le cisaillement maximal local. Des corrélations ont pu être établies entre l' $EDCF_{\epsilon_{max}}$  et différentes variables du procédé (viscosité du milieu, morphologie du champignon et taux maximal de croissance). Ces corrélations ont été définies à partir d'expériences réalisées à petite échelle (3,5 L) et avec une faible gamme de concentrations en biomasse. Ces conditions d'expérience sont motivées par la volonté de dissocier l'effet de la concentration en biomasse de celui du cisaillement. Par ailleurs, Malouf *et al.* (2013) a corrélié des paramètres de modèle de la viscosité du moût à la morphologie en intégrant la concentration en biomasse et les conditions de cisaillement. L'intégration de la concentration en biomasse est un élément qui permettrait d'enrichir ces corrélations, car elles ne sont valables que dans la gamme de concentrations en biomasse ayant servi à les établir.

Finalement, cette étude a permis de montrer que les conditions de cisaillement rencontrées à l'échelle industrielle sont favorables, dans les conditions testées, à l'extrapolation des procédés de production d'enzymes par *Trichoderma reesei*, que ce soit pour sa croissance ou pour sa production. Cependant, ces conditions entraînent le développement d'une morphologie induisant une forte viscosité. La viscosité des cultures de champignon filamenteux est problématique, mais elle peut également être considérée comme un avantage pour l'ingénieur ou le chercheur souhaitant suivre ce type de culture. La viscosité peut en effet être considérée comme un marqueur de l'historique du cisaillement subi par le microorganisme. Ce type de marqueur fait défaut, par exemple, aux cultures de cellules de mammifère qui sont, elles aussi, très sensibles au stress induit par le cisaillement.



## IV.2. Conclusions et perspectives

Ces travaux se sont intéressés à l'extrapolation du procédé de production de cellulases par le champignon *Trichoderma reesei*, selon une approche *scale-down*. L'optimisation et l'extrapolation de ce procédé ont un intérêt majeur pour le développement de biocarburants de seconde génération à partir de matières premières lignocellulosiques, afin de permettre une production économiquement viable contribuant à la lutte contre le réchauffement climatique. Ce bioprocédé aérobie met en œuvre des bioréacteurs mécaniquement agités opérés avec un fluide (moût de fermentation) de rhéologie non-newtonienne. Ce moût correspond à une suspension de mycélium de champignons microscopiques formant un maillage de macrostructures complexe (filaments). Cet enchevêtrement, à l'origine du comportement rhéofluidifiant du moût, est sensible aux conditions hydrodynamiques régnant dans la cuve du bioréacteur. Il influence également le mélange dans la cuve industrielle en modifiant la viscosité du moût. Ces interrelations entre conditions opératoires, viscosité et morphologie ont nécessité une approche multi-échelles rendue possible par le développement et la validation d'outils dédiés à l'étude de l'impact des conditions de culture sur le champignon. Ces outils permettent d'obtenir des informations à l'échelle macroscopique (méthode de mesure de la rhéologie du moût) et microscopique (méthode de mesure de la morphologie des champignons). L'impact de différents types de cisaillement (maximal, moyen et local) sur la croissance de *T. reesei* et la production de cellulases ont pu être étudiés. Un critère représentatif du cisaillement ( $EDCF_{\epsilon_{max}}$ ) a été identifié comme étant très pertinent pour l'extrapolation du procédé. En effet, ce dernier permet de réaliser des prédictions vers l'échelle industrielle, partir de données obtenues au laboratoire, des grandeurs caractéristiques de la morphologie des champignons, la viscosité du milieu et le taux de croissance maximum de la biomasse. Grâce à ces travaux, l'effet de l'évolution du cisaillement pendant la montée en échelle est maintenant mieux maîtrisé pour le champignon filamenteux *T. reesei*. De plus, contrairement à ce qui était initialement imaginé, la diminution du cisaillement (caractérisé par le critère EDCF) avec la montée en échelle est favorable au développement du champignon. et dans une moindre mesure à la production d'enzymes par *T. reesei*. Cependant, elle entraîne également une augmentation de la viscosité du moût, défavorable aux transferts de masse.

Au vu des résultats obtenus dans ce travail, le problème de l'extrapolation du procédé de production de cellulases par le champignon filamenteux *T. reesei* peut donc être réduit à deux sous-problèmes. Le premier problème consiste en la maîtrise de la viscosité des milieux. Cette viscosité pourrait être réduite en modifiant génétiquement le champignon pour altérer sa morphologie ou en appliquant des contraintes de cisaillement assez importantes, tout en restant dans les limites acceptables définies pendant ces travaux. Le second problème est le maintien de conditions d'environnement favorables pour le microorganisme, qui pourraient être évaluées avec une approche analogue à celle utilisée ici pour le cisaillement.

Ces conclusions doivent cependant être limitées au champignon filamenteux étudié *Trichoderma reesei* et à son produit d'intérêt, les cellulases. Cependant, une étude similaire pourrait être mise en œuvre avec des microorganismes différents pour soutenir d'autres bioprocédés utilisant des microorganismes filamenteux.



## Références et compléments





# Bibliographie

Aguet, F., van de Ville, D. et Unser, M. (2008) Model-based 2.5-D deconvolution for extended depth of field in brightfield microscopy. *IEEE Transactions on Image Processing*. vol. 17 n° 7, pp. 1144–1153.

Ahamed, A. et Vermette, P. (2009) Effect of culture medium composition on *Trichoderma reesei*'s morphology and cellulase production. *Bioresource Technology*. vol. 100 n° 23, pp. 5979–5987.

Aït-Kadi, A., Marchal, P., Choplin, L., Chrissemant, A.-S. et Bousmina, M. (2002) Quantitative analysis of mixer-type rheometers using the couette analogy. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. vol. 80 n° 6, pp. 1166–1174.

Albaek, M., O., Gernaey, K., V. et Stocks, S., M. (2008) Gassed and ungassed power draw in a pilot scale 550 litre fermentor retrofitted with up-pumping hydrofoil B2 impellers in media of different viscosity and with very high power draw. *Chemical Engineering Science*. vol. 63 n° 24, pp. 5813–5820.

Amanullah, A., Jüsten, P., Davies, A., Paul, G.C., Nienow, A.W. et Thomas, C.R. (2000) Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal*. vol. 5 n° 2, pp. 109–114.

Amanullah, A., Christensen, L.H., Hansen, K., Nienow, A.W. et Thomas, C.R. (2002) Dependence of morphology on agitation intensity in fed-batch cultures of *Aspergillus oryzae* and its implications for recombinant protein production. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 77 n° 7, pp. 815–826.

Amanullah, A., Buckland, B.C. et Nienow, A.W. (2004) Mixing in the Fermentation and Cell Culture Industries. In Paul, E. (éd). *Handbook of Industrial Mixing*. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc., pp. 1071–1170. ISBN 9780471451457

Ayrinhac, C., Margeot, A., Ferreira, N.L., Chaabane, F.B., Monot, F., Ravot, G., Sonet, J.-M. et Fourage, L. (2011) Improved saccharification of wheat straw for biofuel production using an engineered secretome of *Trichoderma reesei*. *Organic Process Research and Development*. vol. 15 n° 1, pp. 275–278.

Bailey, M.J. et Tähtiharju, J. (2003) Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 62 n° 2-3, pp. 156–162.

Ballerini, D., Desmarquest, J.P., Pourquie, J., Nativel, F. et Rebeller, M. (1994) Ethanol production from lignocellulosics : Large scale experimentation and economics. *Bioresource Technology*. vol. 50 n° 1, pp. 17–23.

Barry, D.J., Chan, C. et Williams, G.A. (2009) Morphological quantification of filamentous fungal development using membrane immobilization and automatic image analysis. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. vol. 36 n° 6, pp. 787–800.

- Barry, D.J. et Williams, G.A. (2011) Microscopic characterisation of filamentous microbes : Towards fully automated morphological quantification through image analysis. *Journal of Microscopy*. vol. 244 n° 1, pp. 1–20.
- Barta, Z., Kovacs, K., Reczey, K. et Zacchi, G. (2010) Process design and economics of on-site cellulase production on various carbon sources in a softwood-based ethanol plant. *Enzyme Research*. vol. 2010, pp. 1–8.
- Behera, S.S. et Ray, R.C. (2016) Solid state fermentation for production of microbial cellulases : Recent advances and improvement strategies. *International Journal of Biological Macromolecules*. vol. 86, pp. 656–669.
- Ben Chaabane, F., Jourdier, É., Cohen, C. et Chaussepied, B.. (2013) Procédé de production de cellulases par un champignon filamenteux adapté à un fermenteur ayant un faible coefficient de transfert volumétrique d'oxygène kla. Brevet WO2013026964. feb 2013
- Ben Chaabane, F. et Marchal, R. (2013) Upgrading the hemicellulosic fraction of biomass into biofuel [Valorisation de la fraction hémicellulosique de la biomasse en biocarburants]. *Oil and Gas Science and Technology*. vol. 68 n° 4, pp. 663–680.
- Berlin, A., Balakshin, M., Gilkes, N., Kadla, J., Maximenko, V., Kubo, S. et Saddler, J. (2006) Inhibition of cellulase, xylanase and  $\beta$ -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*. vol. 125 n° 2, pp. 198–209.
- Bhargav, S., Panda, B.P., Ali, M. et Javed, S. (2008) Solid-state fermentation : An overview. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*. vol. 22 n° 1, pp. 49–70.
- Bischof, R.H., Ramoni, J. et Seiboth, B. (2016) Cellulases and beyond : The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microbial Cell Factories*. vol. 15 n° 1, pp. 1–13.
- Brecko, J., Mathys, A., Dekoninck, W., Leponce, M., VandenSpiegel, D. et Semal, P. (2014) Focus stacking : Comparing commercial top-end set-ups with a semi-automatic low budget approach. A possible solution for mass digitization of type specimens. *ZooKeys*. n° 464, pp. 1–23.
- Brown, D.E. et Zainudeen, M.A. (1977) Growth kinetics and cellulase biosynthesis in the continuous culture of *Trichoderma viride*. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 19 n° 7, pp. 941–958.
- Carle-Urioste, J.C., Escobar-Vera, J., El-Gogary, S., Henrique-Silva, F., Torigoi, E., Crivellaro, O., Herrera-Estrella, A. et El-Dorry, H. (1997) Cellulase induction in *Trichoderma reesei* by cellulose requires its own basal expression. *Journal of Biological Chemistry*. vol. 272 n° 15, pp. 10169–10174.
- Carlsson, G. (2009) Topology and data. *Bulletin of the American Mathematical Society*. vol. 46 n° 2, pp. 255–308.
- Castillo, F.J., Blanch, H.W. et Wilke, C.R. (1984) Lactase production in continuous culture by *Trichoderma reesei* Rut-C30. *Biotechnology Letters*. vol. 6 n° 9, pp. 593–596.

- Chaudhuri, B.K. et Sahai, V. (1993) Production of cellulase enzyme from lactose in batch and continuous cultures by a partially constitutive strain of *Trichoderma reesei*. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 15 n° 6, pp. 513–518.
- Chaudhuri, B.K. et Sahai, V. (1994) Comparison of growth and maintenance parameters for cellulase biosynthesis by *Trichoderma reesei*-C5 with some published data. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 16 n° 12, pp. 1079–1083.
- Choy, V., Patel, N. et Thibault, J. (2011) Application of image analysis in the fungal fermentation of *Trichoderma reesei* RUT-C30. *Biotechnology Progress*. vol. 27 n° 6, pp. 1544–1553.
- Clasen, C. et Kulicke, W.-M. (2001) Determination of viscoelastic and rheo-optical material functions of water-soluble cellulose derivatives. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. vol. 26 n° 9, pp. 1839–1919.
- Coradetti, S.T., Craig, J.P., Xiong, Y., Shock, T., Tian, C. et Glass, N.L. (2012) Conserved and essential transcription factors for cellulase gene expression in ascomycete fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. vol. 109 n° 19, pp. 7397–7402.
- Crow, Franklin (1984) Summed-area tables for texture mapping. *Computer Graphics (ACM)*. vol. 18 n° 3, pp. 207–212.
- Deckwer, W.-D., Jahn, D., Hempel, D. et Zeng, A.-P. (2006) Systems biology approaches to bioprocess development. *Engineering in Life Sciences*. vol. 6 n° 5, pp. 455–469.
- Díaz, M., Herrero, M., García, L.A. et Quirós, C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. vol. 48 n° 3, pp. 385–407.
- Diday, E. (1971) Une nouvelle méthode en classification automatique et reconnaissance des formes la méthode des nuées dynamiques. *Revue de Statistique Appliquée*. vol. 19 n° 2, pp. 19–33.
- Dimarogona, M., Topakas, E. et Christakopoulos, P. (2012) Cellulose degradation by oxidative enzymes. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. vol. 2 n° 3, pp. 1–8.
- Durand, H., Clanet, M. et Tiraby, G. (1988) Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology*. vol. 10 n° 6, pp. 341–346.
- Eisentraut, A. (2010) Sustainable Production of Second-Generation Biofuels : Potential and perspectives in major economies and developing countries. *International energy Agency*. 1–221.
- Elson, T.P., Cheesman, D.J. et Nienow, A.W. (1986) X-Ray studies of cavern sizes and mixing performance with fluids possessing a yield stress. *Chemical Engineering Science*. vol. 41 n° 10, pp. 2555–2562.
- Fekete, E., Karaffa, L., Kubicek, C.P., Szentirmai, A. et Seiboth, B. (2007) Induction of extracellular  $\beta$ -galactosidase (Bga1) formation by D-galactose in *Hypocrea jecorina* is mediated by galactitol. *Microbiology*. vol. 153 n° 2, pp. 507–512.

Ferreira, S.M.P., Duarte, A.P., Queiroz, J.A. et Domingues, F.C. (2009) Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production. *Electronic Journal of Biotechnology*. vol. 12 n° 3, pp. 1–9.

Formenti, Luca *et al.* (2014) Challenges in industrial fermentation technology research. *Biotechnology Journal*. , pp. 1–12.

Gabelle, J.-C., Jourdier, E., Licht, R.B., Ben Chaabane, F., Henaut, I., Morchain, J. et Augier, F. (2012) Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors. *Chemical Engineering Science*. vol. 75, pp. 408–417.

Gagnepain, B. (2016) Biocarburants. *Techniques de l'ingénieur Bioprocédés dans les domaines de l'énergie et de l'environnement*. vol. TIB161DUO. n° be8550, pp. 1–22.

Ghose, T.K. (1987) Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. vol. 59, pp. 257–268.

Gillet, S., Blecker, C., Paquot, M. et Richel, A. (2014) Relationship between chemical structure and physical properties in carob galactomannans [La relation structure chimique-propriétés physiques des galactomannanes extraits de la caroube]. *Comptes Rendus Chimie*. vol. 17 n° 4, pp. 386–401.

Graessley, W. (1974) *The entanglement concept in polymer rheology*. Berlin - New York : Springer-Verlag, 179 p. ISBN 9783540069300

Graessley, W.W. (1977) Effect of long branches on the flow properties of polymers. *Accounts of Chemical Research*. vol. 10 n° 9, pp. 332–339.

Grenville, R.K., Tilton, J.N., Simpson, T.A., Brown, D.A.R., Padron, G.A. et Etchells III, A.W. (2008) Flow and shear in agitated vessels. In Conference : *AIChE Annual Meeting*. Philadelphia, Pennsylvania, USA.

Grenville, R.K. et Brown, D.A.R. (2012) A method for comparing impellers' generation of turbulence and flow. In Conference : *MIXING XXIII*. Mayan Riviera, Cancun, Mexico.

Gusakov, A.V. (2011) Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production. *Trends in Biotechnology*. vol. 29 n° 9, pp. 419–425.

Haack, M.B., Olsson, L., Hansen, K. et Lantz, A.E. (2006) Change in hyphal morphology of *Aspergillus oryzae* during fed-batch cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 70 n° 4, pp. 482–487.

Hardy, N., Henaut, I., Augier, F., Béal, C. et Ben Chaabane, F. (2015) Rheology of filamentous fungi : a tool for the comprehension of 2G-bioethanol production. *Rhéologie*. vol. 27, pp. 43–48.

Harnby, N., Edwards, M.F. et Nienow, A.W. (1997) *Mixing in the process industries*. 2 Ed. Oxford Boston : Butterworth-Heinemann, 375 p. ISBN 9780750637602

- Hasunuma, T. et Kondo, A. (2012) Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*. vol. 30 n° 6, pp. 1207–1218.
- Henaut, I., Ben Chaabane, F., Lopes Ferreira, N. et Augier, F. (2013) Experimental Guidelines to Optimize Two Crucial Steps of Lignocellulosic Bioethanol Production. *Journal of Sustainable Energy Engineering*. vol. 1 n° 4, pp. 311–321.
- Hofmeester, J.J.M. (1988) Gas hold-up measurements in bioreactors. *Trends in Biotechnology*. vol. 6 n° 1, pp. 19–22.
- Humbird, D. *et al.* (2011) Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol : Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover. Office of Scientific and Technical Information (OSTI). may 147 p.
- IFPEN IFP - Innovation, Énergie, Environnement [ en ligne ]. Rueil-Malmaison, France, 2016 Disponible sur : <<http://www.ifpenergiesnouvelles.fr/>> (consulté le 01-09-2016)
- Ikonen, L. (2007) Priority pixel queue algorithm for geodesic distance transforms. *Image and Vision Computing*. vol. 25 n° 10, pp. 1520–1529.
- Jourdier, É., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F. et Ben Chaabane, F. (2012) A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains : application to cellulase hyper-producing *Trichoderma reesei* strains. *Microbial Cell Factories*. vol. 11, pp. 1–11.
- Jourdier, É., Ben Chaabane, F., Poughon, L., Larroche, C. et Monot, F. (2012) Simple kinetic model of cellulase production by *Trichoderma reesei* for productivity or yield maximization. *Chemical Engineering Transactions*. vol. 27, pp. 313–318.
- Jourdier, É.. (2012) *Modélisation et optimisation de la production de cellulases par Trichoderma reesei pour les bioraffineries lignocellulosiques*. Thèse de doctorat : Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 218 p.
- Jourdier, É., Cohen, C., Poughon, L., Larroche, C., Monot, F. et Ben Chaabane, F. (2013) Cellulase activity mapping of *Trichoderma reesei* cultivated in sugar mixtures under fed-batch conditions. *Biotechnology for Biofuels*. vol. 6 n° 1, pp. 1–12.
- Jüsten, P., Paul, G.C., Nienow, A.W. et Thomas, C.R. (1996) Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 52 n° 6, pp. 672–684.
- Kar, T., Delvigne, F., Destain, J. et Thonart, P. (2011) Bioreactor scale-up and design on the basis of physiologically relevant parameters : Application to the production of lipase by *yarrowia lipolytica* [Dimensionnement et extrapolation des bioréacteurs sur base de paramètres physiologiques : Cas de la production de lipase par *yarrowia lipolytica*]. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*. vol. 15 n° 4, pp. 585–595.

- Kazi, F.K., Fortman, J.A., Anex, R.P., Hsu, D.D., Aden, A., Dutta, A. et Kothandaraman, G. (2010) Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*. vol. 89 n° SUPPL. 1, pp. S20–S28.
- Kazi, F., K., Fortman, J., Anex, R., Kothandaraman, G., Hsu, D., Aden, A. et Dutta, A. (2010) Techno-Economic Analysis of Biochemical Scenarios for Production of Cellulosic Ethanol. Office of Scientific and Technical Information (OSTI). jun 102 p.
- Klein-Marcuschamer, D., Oleskowicz-Popiel, P., Simmons, B.A. et Blanch, H.W. (2012) The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 109 n° 4, pp. 1083–1087.
- Krull, R. et Bley, T. (2015) *Filaments in Bioprocesses*. New York : Springer International Publishing, 370 p. (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology 149). ISBN 9783319205106
- Kumar, R., Singh, S. et Singh, O.V. (2008) Bioconversion of lignocellulosic biomass : Biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. vol. 35 n° 5, pp. 377–391.
- Lecault, V., Patel, N. et Thibault, J. (2007) Morphological characterization and viability assessment of *Trichoderma reesei* by image analysis. *Biotechnology Progress*. vol. 23 n° 3, pp. 734–740.
- Lecault, V., Patel, N. et Thibault, J. (2009) An image analysis technique to estimate the cell density and biomass concentration of *Trichoderma reesei*. *Letters in Applied Microbiology*. vol. 48 n° 4, pp. 402–407.
- Lejeune, R. et Baron, G.V. (1995a) Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. vol. 43 n° 2, pp. 249–258.
- Lejeune, R., Nielsen, J. et Baron, G.V. (1995b) Influence of pH on the morphology of *Trichoderma reesei* QM 9414 in submerged culture. *Biotechnology Letters*. vol. 17 n° 3, pp. 341–344.
- Lejeune, R., Nielsen, J. et Baron, G.V. (1995c) Morphology of *Trichoderma reesei* QM 9414 in submerged cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 47 n° 5, pp. 609–615.
- Liu, S. (2013) *Bioprocess engineering kinetics, biosystems, sustainability, and reactor design*. Amsterdam : Elsevier, 984 p. ISBN 9780444595256
- Lo, C.-M., Zhang, Q., Callow, N.V. et Ju, L.-K. (2010) Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate. *Process Biochemistry*. vol. 45 n° 9, pp. 1494–1503.
- Lopes, R.H.C., Hobson, P.R. et Reid, I.D. (2008) Computationally efficient algorithms for the two-dimensional Kolmogorov-Smirnov test. *Journal of Physics : Conference Series*. vol. 119 n° 4, pp. 1–9.

- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. et RANDALL, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent.. *The Journal of biological chemistry*. vol. 193 n° 1, pp. 265–275.
- Lum, P., Singh, G., Lehman, A., Ishkanov, T., Vejdemo-Johansson, M., Alagappan, M., Carlsson, J. et Carlsson, G. (2013) Extracting insights from the shape of complex data using topology. *Scientific Reports*. vol. 3, pp. 1–8.
- Lynd, L.R., Weimer, P.J., Van Zyl, W.H. et Pretorius, I.S. (2002) Microbial cellulose utilization : Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. vol. 66 n° 3, pp. 506–577.
- Ma, L., Li, C., Yang, Z., Jia, W., Zhang, D. et Chen, S. (2013) Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *Journal of Biotechnology*. vol. 166 n° 4, pp. 192–197.
- Malouf, P., Patel, N., Rodrigue, D. et Thibault, J. (2013) Relationship between morphology and rheology during *Trichoderma reesei* RUT-30 fermentation. In Mitchell, G. (éd). *Rheology : Theory, Properties and Practical Applications*. New York : Nova Science Publishers, Inc., pp. 191–223. ISBN 9781626189997
- Manon, Y.. (2012) *Etude de milieux de culture complexes et évolutifs par développement de mesures physiques en ligne*. Thèse de doctorat : Université de Toulouse, 448 p.
- Marten, M.R., Velkovska, S., Khan, S.A. et Ollis, D.F. (1995) Steady and dynamic shear characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. 51-52 n° 1, pp. 319–328.
- Marten, M.R., Velkovska, S., Khan, S.A. et Ollis, D.F. (1996) Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase- producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnology Progress*. vol. 12 n° 5, pp. 602–611.
- Metz, B., Kossen, N.W.F. et van Suijdam, J.C. (1979) *The rheology of mould suspensions*. Springer Berlin Heidelberg, 103-156 p. (Advances in Biochemical Engineering, Volume 11 ; 11) ISBN 978-3-540-08990-2
- Metzner, A., B. et Otto, R., E. (1957) Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE Journal*. vol. 3 n° 1, pp. 3–10.
- Mezger, T. (2014) *The rheology handbook : for users of rotational and oscillatory rheometers*. 4 Ed. Hannover : Vincentz Network, 432 p. ISBN 9783866308428
- Middleton, John, C. et Smith, John, M. (2004) Gas-Liquid Mixing in Turbulent Systems. In Paul, E. (éd). *Handbook of Industrial Mixing*. Hoboken : John Wiley & Sons, Inc., pp. 585–638. ISBN 9780471451457
- Moreaud, M. et Cokelaer, F. (2015) Flowing bilateral filter : Definition and implementations. *Image Analysis & Stereology*. vol. 34 n° 2, pp. 101–110.



- Nagai, S., Onodera, M. et Aiba, S. (1976) Kinetics of extracellular cellulase and amylase production from *Trichoderma* sp. *European Journal Of Applied Microbiology*. vol. 3 n° 1, pp. 9–18.
- Neubauer, P. et Junne, S. (2010) Scale-down simulators for metabolic analysis of large-scale bioprocesses. *Current Opinion in Biotechnology*. vol. 21 n° 1, pp. 114–121.
- Nienow, A.W. (2009) Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors. *Journal of Chemical Engineering of Japan*. vol. 42 n° 11, pp. 789–796.
- Ogier, J.-C., Ballerini, D., Leygue, J.-P., Rigal, L. et Pourquié, J. (1999) Ethanol production from lignocellulosic biomass [Production d'éthanol à partir de biomasse lignocellulosique]. *Oil and Gas Science and Technology*. vol. 54 n° 1, pp. 67–94.
- Olsvik, E.S. et Kristiansen, B. (1992) On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 40 n° 3, pp. 375–387.
- Ortiz, G.E., Guitart, M.E., Cavalitto, S.F., Albertó, E.O., Fernández-Lahore, M. et Blasco, M. (2015) Characterization, optimization, and scale-up of cellulases production by *Trichoderma reesei* cbs 836.91 in solid-state fermentation using agro-industrial products. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. vol. 38 n° 11, pp. 2117–2128.
- Osibote, O., Dendere, R., Krishnan, S. et Douglas, T. (2010) Automated focusing in bright-field microscopy for tuberculosis detection. *Journal of Microscopy*. vol. 240 n° 2, pp. 155–163.
- Otsu, Nobuyuki (1979) Threshold selection method from gray-Level histograms. *IEEE Trans Syst Man Cybern*. vol. SMC-9 n° 1, pp. 62–66.
- Paglianti, A., Pintus, S. et Giona, M. (2000) Time-series analysis approach for the identification of flooding/loading transition in gas-liquid stirred tank reactors. *Chemical Engineering Science*. vol. 55 n° 23, pp. 5793–5802.
- Pakula, T.M., Salonen, K., Uusitalo, J. et Penttilä, M. (2005) The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *Microbiology*. vol. 151 n° 1, pp. 135–143.
- Papagianni, M. (2004) Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances*. vol. 22 n° 3, pp. 189–259.
- Papagianni, M. (2014) Characterization of fungal morphology using digital image analysis techniques. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. vol. 6 n° 4, pp. 189–194.
- Patel, N., Choy, V., Malouf, P. et Thibault, J. (2009) Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. *Process Biochemistry*. vol. 44 n° 10, pp. 1164–1171.
- Paul, G.C. et Thomas, C.R. (1998) Characterisation of mycelial morphology using image analysis. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. vol. 60, pp. 1–59.

- Paul, E., Atiemo-Obeng, V. et Kresta, S. (2004) *Handbook of industrial mixing : science and practice*. Hoboken, N.J : Wiley-Interscience, 1377 p. ISBN 9780471269190
- Percival Zhang, Y.-H., Himmel, M.E. et Mielenz, J.R. (2006) Outlook for cellulase improvement : Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. vol. 24 n° 5, pp. 452–481.
- Peterson, R. et Nevalainen, H. (2012) *Trichoderma reesei* RUT-C30 - Thirty years of strain improvement. *Microbiology*. vol. 158 n° 1, pp. 58–68.
- Poinot, T.. (2013) *Influence des hydroxypropylguars sur les propriétés des mortiers de ciment a l'état frais*. Thèse de doctorat : École Nationale Supérieure des Mines de Saint-Étienne, 256 p.
- Posch, A.E., Spadiut, O. et Herwig, C. (2012) A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*. vol. 49 n° 7, pp. 499–510.
- Posch, A.E., Herwig, C. et Spadiut, O. (2013) Science-based bioprocess design for filamentous fungi. *Trends in Biotechnology*. vol. 31 n° 1, pp. 37–44.
- Quintanilla, D., Hagemann, T., Hansen, K. et Gernaey, K.V. (2015) Fungal morphology in industrial enzyme Production Modelling and monitoring. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 149, pp. 29–54.
- Ragauskas, A., J. *et al.* (2014) Lignin Valorization : Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science*. vol. 344 n° 6185, pp. 1–10.
- Reisman, H.B. (1993) Problems in scale-up of biotechnology production processes. *Critical Reviews in Biotechnology*. vol. 13 n° 3, pp. 195–253.
- Reuß, M. (1988) Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chemical Engineering and Technology*. vol. 11 n° 3, pp. 178–187.
- Roquette Roquette Chemicals & Bio-industries [ en ligne ]. Lestrem, France, 2016 Disponible sur : <<http://www.roquette-chemicalbioindustry.com/>> (consulté le 05-09-2016)
- Rubin, E.M. (2008) Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. vol. 454 n° 7206, pp. 841–845.
- Ryu, D., D., Andereotti, R., Mandels, M., Gallo, B. et Reese, E., T. (1979) Studies on quantitative physiology of *Trichoderma reesei* with two-stage continuous culture for cellulose production. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 21 n° 11, pp. 1887–1903.
- Sánchez, O.J. et Cardona, C.A. (2008) Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*. vol. 99 n° 13, pp. 5270–5295.
- Sánchez Pérez, A., Rodríguez Porcel, M., Casas López, L., Fernández Sevilla, M. et Chisti, Y. (2006) Shear rate in stirred tank and bubble column bioreactors. *Chemical Engineering Journal*. vol. 124 n° 1-3, pp. 1–5.

- Schügerl, K. (1981) *Oxygen transfer into highly viscous media*. Springer Berlin Heidelberg, 71-174 p. (Reactors and Reactions ; 19) ISBN 9783540104643
- Serra, J. (1983) *Image Analysis and Mathematical Morphology*. Orlando, USA : Academic Press, Inc, 610 p. ISBN 9780126372403
- Serrano-Carreón, L., Galindo, E., Rocha-Valadéz, J.A., Holguín-Salas, A. et Corkidi, G. (2015) Hydrodynamics, fungal physiology, and morphology. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 149, pp. 55–90.
- Simbolotti, G. (2007) IEA Energy Technology Essentials : Biofuel Production. *International energy Agency*. 1–4.
- Singhania, R.R., Patel, A.K., Soccol, C.R. et Pandey, A. (2009) Recent advances in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*. vol. 44 n° 1, pp. 13–18.
- Smith, J.J., Lilly, M.D. et Fox, R.I. (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 35 n° 10, pp. 1011–1023.
- Stanbury, P., Whitaker, A. et Hall, S. (1995) *Principles of fermentation technology*. 2 Ed. Tarrytown : Pergamon, 357 p. ISBN 9780750645010
- Stocks, S.M. (2013) Industrial enzyme production for the food and beverage industries : Process scale up and scale down. In McNeil, B. (éd). *Microbial Production of Food Ingredients, Enzymes and Nutraceuticals*. Sawston : Elsevier Ltd., pp. 144–172. ISBN 9780857093431
- Taha, M., Shahsavari, E., Al-Hothaly, K., Mouradov, A., Smith, A.T., Ball, A.S. et Adetutu, E.M. (2015) Enhanced Biological Straw Saccharification Through Coculturing of Lignocellulose-Degrading Microorganisms. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. vol. 175 n° 8, pp. 3709–3728.
- Takors, R. (2012) Scale-up of microbial processes : Impacts, tools and open questions. *Journal of Biotechnology*. vol. 160 n° 1-2, pp. 3–9.
- Teraoka, I. (2002) *Polymer solutions : an introduction to physical properties*. New York : Wiley, 360 p. ISBN 9780471224510
- Tucker, K.G., Kelly, T., Delgrazia, P. et Thomas, C.R. (1992) Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnology Progress*. vol. 8 n° 4, pp. 353–359.
- Valdecasas, A., Marshall, D., Becerra, J. et Terrero, J. (2001) On the extended depth of focus algorithms for bright field microscopy. *Micron*. vol. 32 n° 6, pp. 559–569.
- Van Der Walt, S., Colbert, S.C. et Varoquaux, G. (2011) The NumPy array : A structure for efficient numerical computation. *Computing in Science and Engineering*. vol. 13 n° 2, pp. 22–30.

- van Suijdam, C. et Metz, B. (1981) Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 23 n° 1, pp. 111–148.
- Van Zyl, W.H., Lynd, L.R., Den Haan, R. et McBride, J.E. (2007) Consolidated bioprocessing for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. vol. 108, pp. 205–235.
- Villadsen, J., Nielsen, J. et Lidén, G. (2011) *Bioreaction engineering principles*. 3 Ed. New York : Springer, 561 p. ISBN 9781441996879
- Walter, T.. (2003) *Application de la morphologie mathématique au diagnostic de la rétinopathie diabétique à partir d'images couleur*. Thèse de doctorat : Paris, ENMP, 240 p.
- Wang, Y., Delettre, J., Corrieu, G. et Béal, C. (2012) Starvation induces physiological changes that act on the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus* RD758. *Biotechnology Progress*. vol. 27 n° 2, pp. 342–350.
- Warzywoda, M., Ferre, V. et Pourquie, J. (1983) Development of a culture medium for large-scale production of cellulolytic enzymes by *Trichoderma reesei*. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 25 n° 12, pp. 3005–3011.
- Warzywoda, M., Ferre, V. et Pourquie, J.. (1988) Process for producing cellulolytic enzymes. Brevet 4,762,788. aug 1988
- Wucherpfennig, T., Kiep, K.A., Driouch, H., Wittmann, C. et Krull, R. (2010) Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Advances in Applied Microbiology*. vol. 72 n° C, pp. 89–136.
- Zhang, Y. et Wang, P.S.P. (1988) Modified parallel thinning algorithm. *Proceedings - International Conference on Pattern Recognition*. , pp. 1023–1025.
- Zhao, X., Zhang, L. et Liu, D. (2012) Biomass recalcitrance. Part II : Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. vol. 6 n° 5, pp. 561–579.
- Zhu, Y., Cuenca, J.V., Zhou, W. et Varma, A. (2008) NS0 cell damage by high gas velocity sparging in protein-free and cholesterol-free cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. vol. 101 n° 4, pp. 751–760.



# Annexes

## Illustrations de l'analogie entre la viscosité des polymères et la viscosité des champignons

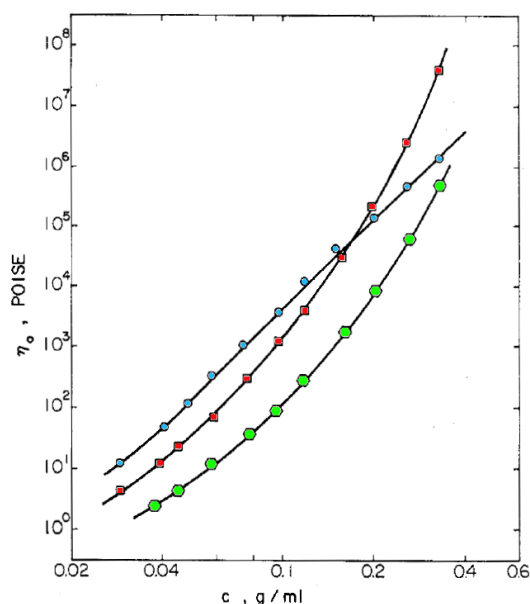


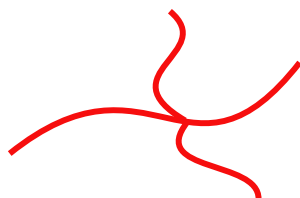
FIG. IV.2.a. : Impact de la structure des polymères sur l'évolution de la viscosité en fonction de leur concentration (Graessley, 1977).

Les disques bleus correspondent à un polymère linéaire, les carrés rouges correspondent à un polymère branché à branches longues et les hexagones verts à un polymère branché à branches courtes. La viscosité est donnée pour un taux de cisaillement proche de zéro, les trois polymères ont une masse moléculaire similaire et sont en solution dans du tétradécane à 25°C.

### Polymère linéaire



### Polymère branché à branches longues



### Polymère branché à branches courtes



FIG. IV.2.b. : Représentation schématique de la structure des polymères utilisés par Graessley.

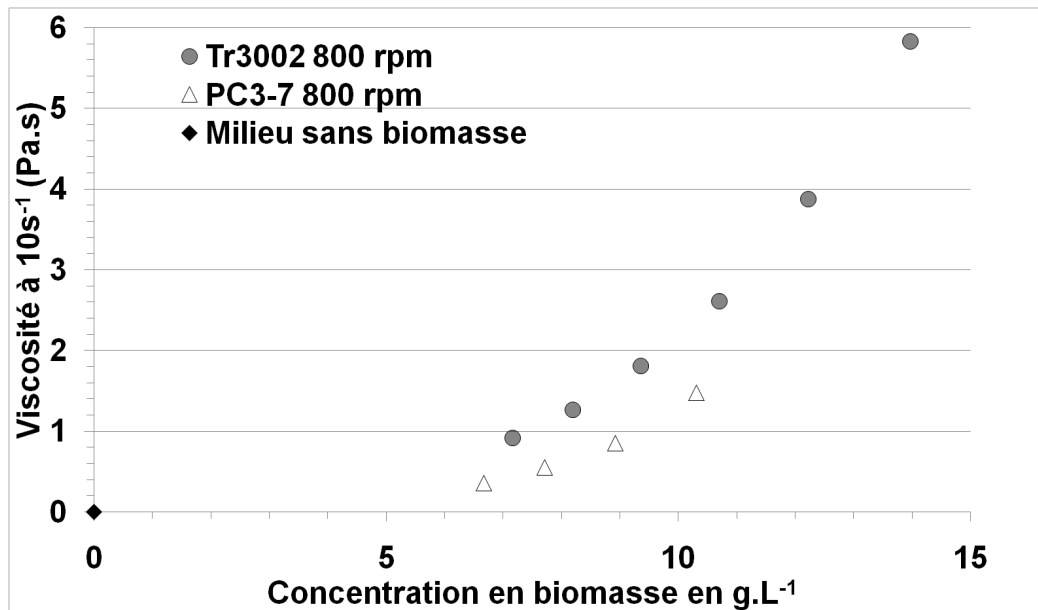


FIG. IV.2.c. : Impact de la structure des champignons sur l'évolution de la viscosité en fonction de leur concentration.

Les disques gris correspondent à une souche à branches longues (Tr3002) et les triangles blancs à un souche à branches courtes (PC3-7). La viscosité est donnée pour un taux de cisaillement de  $10\text{ s}^{-1}$ , les champignons sont en solution aqueuse à  $27^{\circ}\text{C}$ .

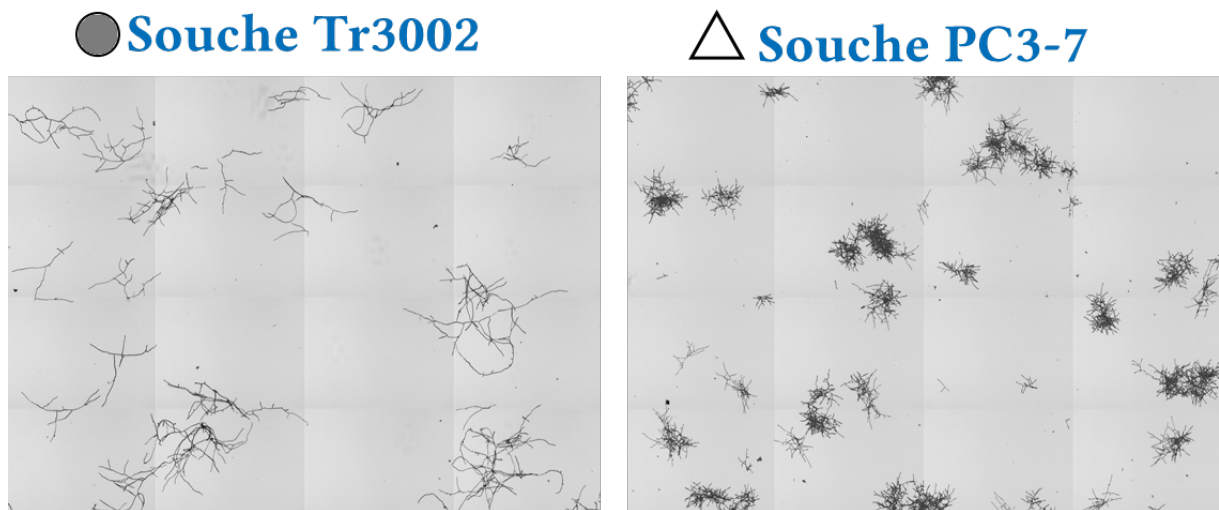


FIG. IV.2.d. : Photographies des morphologies de deux souches de *Trichoderma reesei*.

Les disques gris correspondent à une souche à branches longues (Tr3002) et les triangles blancs à un souche à branches courtes (PC3-7). Les images sont réalisées avec le même grossissement, la largeur des images correspond à 2 mm.