



HAL
open science

Modélisation et optimisation de la production de cellulases par *Trichoderma reesei* pour les bioraffineries lignocellulosiques

Etienne Jourdier

► **To cite this version:**

Etienne Jourdier. Modélisation et optimisation de la production de cellulases par *Trichoderma reesei* pour les bioraffineries lignocellulosiques. Autre. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2012. Français. NNT : 2012CLF22264 . tel-04034248

HAL Id: tel-04034248

<https://theses.hal.science/tel-04034248>

Submitted on 17 Mar 2023

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.

N° d'ordre D.U. : 2264
EDSPIC : 569



Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II
École doctorale Sciences pour l'Ingénieur

THESE

présentée par

Etienne Jourdier

pour obtenir le grade de

Docteur d'Université

Spécialité : Génie des procédés

Modélisation et optimisation de la production de cellulases par *Trichoderma reesei* pour les bioraffineries lignocellulosiques

directeur de thèse : Christian LARROCHE

Soutenue le 19 septembre 2012 devant le jury composé de :

Mme Carole Molina-Jouve, INSA Toulouse	Rapporteur
M. Jean-Marc Engasser, ENSAIA - INP Lorraine, Nancy	Rapporteur
M. Christian Larroche, Université Blaise Pascal, Clermont-Ferrand	Directeur de thèse
M. Sévastianos Roussos, Université Paul Cézanne, Marseille	Examineur
M. Anthony Brésin, ARD, Pomacle-Bazancourt	Examineur
M. Fadhel Ben Chaabane, IFP Energies nouvelles, Rueil-Malmaison	Examineur

"Les biocarburants s'appuient sur le champignon"

Direction des relations institutionnelles et de la communication - IFP Energies nouvelles

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à vivement remercier Christian Larroche, mon directeur de thèse, ainsi que Laurent Poughon, qui ont suivi mon travail durant ces trois années. A chaque réunion d'avancement, vous avez apporté un nécessaire point de vue extérieur sur ces résultats et les méthodes utilisées, indispensable pour prendre du recul. Comme vous l'avez justement remarqué à la soutenance, cela n'était pas facile car vous étiez en dehors du laboratoire d'accueil et en dehors du projet Futurol, je vous en remercie d'autant plus. Enfin, votre expérience de la rédaction scientifique m'ont été d'une grande aide pour améliorer les présentations à congrès et les articles.

Je remercie aussi Carole Molina-Jouve et Jean-Marc Engasser d'avoir accepté de rapporter ce travail et de l'intérêt qu'ils y ont porté, ainsi que Sevastianos Roussos et Anthony Brésin d'avoir participé au jury de thèse.

Je voudrais surtout remercier Fadhel Ben Chaabane, mon encadrant chez IFP Energies nouvelles, pour m'avoir tout appris sur *Trichoderma reesei* et sur sa culture en fermenteur ! Ta bonne humeur permanente a été une grande source de motivation voire de réconfort parfois, et ça a été un réel plaisir de travailler tous les jours avec toi, merci !

Un grand merci aussi à toute l'équipe production d'enzymes, à Sabine pour m'avoir montré ma première fermentation dans les historiques F2P, à Bernard le roi du bricolage pour avoir toujours trouvé une solution à mes problèmes matériels, et à Céline pour son efficacité légendaire à chaque fois que j'ai eu besoin de son aide !

Je remercie le projet Futurol d'avoir financé mes travaux et toutes les personnes impliquées dans ce projet avec qui j'ai pu échanger au cours des réunions de module et des séminaires annuels. En particulier je remercie Gilles Ferschneider d'avoir suivi mes travaux avec attention et d'avoir toujours su arranger les choses pour obtenir l'accord de Futurol en un délai record !

Je remercie les deux stagiaires qui m'ont bien aidé. D'une part Rachel Licht pour la partie étude cinétique et modélisation. D'autre part Claire Derlot pour la très complète étude des inhibiteurs. Merci à vous deux, ça a été un bonheur d'avoir des stagiaires aussi sérieuses et motivées, et un vrai plaisir de travailler avec vous. Je remercie aussi Boris Pousse pour avoir réalisé les microhydrolyses entre deux arrêts de travail.

Je remercie l'équipe "génie chimique" d'IFP Energies nouvelles, en particulier Jean-Christophe Gabelle et Frédéric Augier. Leurs connaissances du scale-up et de ses contraintes m'ont beaucoup éclairé et les travaux que nous avons réalisé ensemble ont été très enrichissants.

Je voudrais aussi remercier grandement tous mes collègues du département de Biotechnologies, ça a été formidable de travailler dans une telle ambiance décontractée mais sérieuse, et je me réjouis de continuer à travailler avec vous tous !

Je remercie toutes les personnes de l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand que j'ai eu l'occasion de rencontrer, en particulier Françoise Paladian de l'Ecole Doctorale SPI pour avoir toujours facilement arrangé les formalités administratives.

Enfin, un grand merci à Lucie qui a attendu 48h après la fin de ce manuscrit pour pointer le bout de son nez ! Et un très grand merci à Ségolène de m'avoir soutenu pendant ces 3 ans dont 9 mois pas évident sur la fin !!

Table des matières

INDEX DES FIGURES	11
INDEX DES TABLEAUX	15
GLOSSAIRE ET ABBRÉVIATIONS	17
NOMENCLATURE	19
LISTE DES COMMUNICATIONS	21
INTRODUCTION.....	23
I. VALORISATION ENZYMATIQUE DE LA BIOMASSE LIGNOCELLULOSIQUE.....	25
1 CONTEXTE DU PROJET FUTUROL.....	25
1.1 Les énergies renouvelables.....	25
1.1.1 Contexte énergétique et climatique mondial.....	25
1.1.2 Ressources renouvelables d'énergie.....	25
1.1.3 Contraintes liées au stockage de l'énergie.....	27
1.2 Les biocarburants.....	28
1.2.1 Première génération.....	28
1.2.2 Deuxième génération.....	28
1.2.3 Filières du futur.....	29
1.3 Valorisation biochimique de la biomasse lignocellulosique.....	30
1.3.1 La biomasse lignocellulosique.....	30
1.3.2 Les enzymes cellulolytiques.....	30
1.3.3 Le champignon filamenteux <i>Trichoderma reesei</i>	31
1.4 Le procédé bioéthanol 2G.....	32
1.4.1 Description du procédé.....	32
1.4.2 Analyse en masse.....	33
1.4.3 Évaluation technico-économique.....	34
1.5 Projets industriels pour le bioéthanol 2G.....	34
1.5.1 L'expérience d'IFP Energies nouvelles.....	34
1.5.2 Le projet Futurol.....	35
1.5.3 Bioraffineries lignocellulosiques.....	35
2 PRODUCTION INDUSTRIELLE DE CELLULASES PAR <i>T. REESEI</i>	36
2.1 Protocoles de production	36
2.1.1 Schéma général	36
2.1.2 Grandeurs dimensionnantes d'un protocole de production de cellulases	37
2.1.3 Historique des protocoles de production de cellulases.....	39
2.2 Étude cinétique et modélisation de <i>T. reesei</i>	42
2.2.1 Modélisation de la croissance	42
2.2.2 Modélisation de la production de métabolites.....	42
2.2.3 Modélisation de la consommation du substrat	43
2.3 Choix du substrat.....	43
2.3.1 Intégration de la production au procédé bioéthanol 2G	43
2.3.2 Expérience de l'utilisation des substrats industriels	47
2.3.3 Investigation d'autres composés inducteurs	48
2.4 Extrapolation du protocole à l'échelle industrielle.....	49
2.4.1 Consignes de conduite.....	49
2.4.2 Temps de mélange.....	50
2.4.3 Transfert gaz-liquide	50
3 ENJEUX DU SUJET DE RECHERCHE	52
II. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	55
1 SOUCHES ET PRODUITS	55
1.1 Souches.....	55
1.2 Produits.....	55

1.2.1	Composés synthétiques	55
1.2.2	Biomasse lignocellulosique.....	55
1.2.3	Sophorolipides.....	56
1.3	Milieux de culture.....	56
2	ANALYSES	57
2.1	Massiques et élémentaires	57
2.1.1	Poids sec.....	57
2.1.2	Analyses élémentaires	57
2.2	Colorimétriques	57
2.2.1	Concentration en protéines.....	57
2.2.2	Sucres réducteurs.....	57
2.3	Chromatographie liquide	58
2.3.1	Sucres	58
2.3.2	Ions	58
2.3.3	Acides et furanes	58
2.4	Analyse des gaz	58
2.4.1	Analyse en ligne.....	58
2.4.2	Analyse hors ligne.....	59
2.5	Activités enzymatiques.....	59
2.5.1	Cellulase FP	59
2.5.2	β -glucosidase.....	60
2.5.3	Xylanase.....	60
2.6	Microhydrolyses	61
3	PROTOCOLES DE CULTURE	61
3.1	En fiole	61
3.1.1	Préculture en fiole Fernbach	61
3.1.2	Fioles fermées	62
3.1.3	Respiromètre Sapromat.....	62
3.1.4	Fioles pour tests d'induction.....	63
3.1.5	Fioles alimentées.....	63
3.2	En bioréacteur.....	64
3.2.1	Schéma général	64
3.2.2	Dasgip	65
3.2.3	Applikon.....	65
	III. MÉTABOLISME DE <i>T.REESEI</i> SUR LACTOSE PUR.....	67
1	ÉTUDE STœCHIOMÉTRIQUE DE LA PRODUCTION	67
1.1	Composition élémentaire.....	67
1.1.1	Biomasse	67
1.1.2	Cocktail de protéines.....	68
1.2	Approche par équations stœchiométriques.....	69
1.2.1	Écriture des équations	69
1.2.2	Utilisation pour le calcul des rendements O ₂ et CO ₂	70
1.2.3	Utilisation pour la définition des milieux de culture.....	72
1.2.4	Utilisation pour la miniaturisation du protocole fed-batch	74
1.3	Simulation du pH.....	74
1.3.1	Principe du simulateur de pH.....	74
1.3.2	Validation du simulateur de pH	76
1.3.3	Utilisation pour les précultures en fioles.....	79
1.3.4	Utilisation pour les cultures en bioréacteur.....	80
1.4	Conclusion sur l'étude de la stœchiométrie	83
2	ÉTUDE CINÉTIQUE ET MODÉLISATION DU MÉTABOLISME EN PRODUCTION	84
2.1	Étude détaillée du protocole industriel en fed-batch	84
2.1.1	Protocole de culture.....	84
2.1.2	Suivi des concentrations et bilans globaux.....	84
2.1.3	Calcul des vitesses spécifiques instantanées	86
2.1.4	Validation du protocole d'étude.....	89
2.2	Modèle pour la consommation du substrat.....	90

2.2.1	Choix du modèle de Pirt.....	90
2.2.2	Identification paramétrique	90
2.2.3	Validation des valeurs des paramètres	92
2.3	Modèle cinétique complet de la production.....	93
2.3.1	Description du modèle	93
2.3.2	Validation du modèle en dynamique.....	95
2.4	Conclusion sur l'étude cinétique et la modélisation.....	96
3	SIMULATION DES PROTOCOLES DE CONDUITE	98
3.1	Hypothèses	98
3.1.1	Phase de croissance	98
3.1.2	Besoin en oxygène	98
3.2	Protocole fed-batch.....	99
3.2.1	Évolution du système	99
3.2.2	Comparaison des grandeurs dimensionnantes.....	101
3.3	Protocole continu.....	105
3.3.1	Etat stationnaire.....	105
3.3.2	Prise en compte de l'état transitoire.....	106
3.4	Comparaison des protocoles fed-batch et continu	110
3.4.1	Contraintes	110
3.4.2	Grandeurs dimensionnantes	110
3.5	Conclusion sur la simulation des protocoles de conduite.....	114
IV. INTÉGRATION DU PROTOCOLE DE PRODUCTION À L'ÉCHELLE INDUSTRIELLE		115
1	IMPACT DES COMPOSÉS DE DÉGRADATION	115
1.1	En phase de croissance	115
1.1.1	Effet du pH sur les témoins.....	115
1.1.2	Cas particulier de l'acide acétique	116
1.1.3	Étude des composés de dégradation pris individuellement.....	122
1.1.4	Étude des composés inhibiteurs en mélange	124
1.1.5	Effet cinétique des effets inhibiteurs en bioréacteur	128
1.1.6	Recommandations pour la croissance	130
1.2	En phase de production.....	131
1.3	Conclusion sur les composés de dégradation	132
2	IMPACT DES MÉLANGES DE SUCRES	134
2.1	Remplacement de l'inducteur par des substrats industriels.....	134
2.1.1	Sucres principaux: mélanges inducteur/xylose/glucose	134
2.1.2	Sucres secondaires: effet de l'arabinose et du mannose	141
2.1.3	Test des cocktails produits en hydrolyse.....	143
2.1.4	Conclusion sur le remplacement de l'inducteur.....	148
2.2	Recherche de nouveaux inducteurs	150
2.2.1	Synthèse enzymatique d'oligosaccharides.....	150
2.2.2	Valorisation des sophorolipides	156
2.2.3	Conclusion sur la recherche de nouveaux inducteurs	160
3	CONTRAINTES LIÉES AU CHANGEMENT D'ÉCHELLE.....	161
3.1	Effet du pH de consigne	161
3.2	Effet de la teneur en CO ₂ du gaz de sortie.....	163
3.2.1	Expérience au laboratoire.....	163
3.2.2	Extrapolation	164
3.3	Effet de la concentration en oxygène dissous.....	165
3.3.1	Expérience au laboratoire.....	165
3.3.2	Extrapolation	166
3.4	Effet du cisaillement dû à l'agitation	167
3.4.1	Expérience.....	167
3.4.2	Extrapolation	168
3.5	Conclusion sur le changement d'échelle.....	169
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....		171
RÉFÉRENCES.....		175

Index des figures

Figure I-1 : Réservoirs, destruction et flux d'exergie à l'échelle planétaire.....	25
Figure I-2 : Filières de production des biocarburants de 1ère génération.	28
Figure I-3 : Filières de production des biocarburants de 2 ^e génération.	29
Figure I-4 : Vue schématique de la dégradation enzymatique de la cellulose et des hémicelluloses....	31
Figure I-5 : Ordres de grandeur en masse du procédé bioéthanol 2G.	33
Figure I-6 : Partenaires du projet Futurol.....	35
Figure I-7 : Schéma simplifié d'un réacteur en génie microbiologique.....	36
Figure I-8 : Grandeurs dimensionnantes d'un protocole de production et coûts associés.	38
Figure I-9 : Schéma de principe du protocole développé par IFP Energies nouvelles.....	41
Figure I-10 : Flux de sucre disponibles dans une unité bioéthanol 2G.	44
Figure I-11 : Composés furaniques, phénoliques et acides faibles issus de la dégradation physico-chimique de la biomasse lors du prétraitement et potentiellement inhibiteurs.....	46
Figure I-12 : Synthèse de l'expérience IFP Energies nouvelles sur l'utilisation de substrats industriels.	48
Figure II-1 : Protocole d'hydrolyse basique des sophorolipides.....	56
Figure II-2 : Protocole pour le dosage de l'activité cellulase FP.	59
Figure II-3 : Protocole pour le dosage de l'activité β -glucosidase.....	60
Figure II-4: Protocole pour le dosage de l'activité xylanase.....	61
Figure II-5 : Protocole pour les microhydrolyses.....	61
Figure II-6 : Respiromètre Sapromat.....	63
Figure II-7 : Protocole de production de protéines en fioles alimentées.	64
Figure II-8 : schéma de principe des bioréacteurs utilisés et de leur instrumentation.....	64
Figure III-1 : Rendements apparents théoriques de consommation d'O ₂ et de production de CO ₂ , et quotient respiratoire.....	71
Figure III-2 : Principe de calcul du simulateur de pH.	76
Figure III-3 : Validation du simulateur de pH pour solutions simples.....	77
Figure III-4 : Validation du simulateur en dynamique pour 4 milieux.	79
Figure III-5 : Simulation de croissance en fiole pour différents choix de tampon de pH.	80
Figure III-6 : Suivi des concentrations en espèces ioniques au cours d'une culture en fed-batch.....	81
Figure III-7 : Simulations des concentrations ioniques pour différentes stratégies d'alimentation.....	82
Figure III-8 : Suivi des concentrations en espèces ioniques au cours d'une culture en fed-batch avec solution acidifiée.	83
Figure III-9 : Étude du métabolisme en fed-batch : (a) débits d'alimentation et suivi des concentrations.	85
Figure III-10 : Étude du métabolisme en fed-batch : (b) bilans des volumes.	85
Figure III-11 : Principe pour le calcul des vitesses spécifiques.	87
Figure III-12: Étude du métabolisme en fed-batch : (d) vitesses spécifiques.....	88
Figure III-13 : Étude du métabolisme en fed-batch :(e) rendements instantanés.....	90
Figure III-14 : Débits d'alimentation et suivi des concentrations pour les cultures FB3 et FB4.....	92
Figure III-15: Validation du modèle de Pirt par simulation de (Bailey and Tahtiharju, 2003) et de (Nicholson et al., 1989).	93
Figure III-16 : Schéma du métabolisme de <i>T. reesei</i> (à forte induction).....	94
Figure III-17: Validation en dynamique du modèle cinétique de <i>T. reesei</i> en production.....	95
Figure III-18 : Cinétique de croissance utilisée pour le calcul de la productivité globale.	98
Figure III-19 : Simulation d'une production en fed-batch avec débit constant.	100
Figure III-20 : Simulation d'une production en fed-batch avec débit exponentiel.	101
Figure III-21 : Productivité et rendement (à 240 h) d'une phase de production en fed-batch.	102
Figure III-22 : Variation de volume et besoin en oxygène maximal lors d'une phase de production en fed-batch de 240 h.	102
Figure III-23 : Influence de la concentration en biomasse sur la productivité à 240 h et la demande maximale en oxygène.	103
Figure III-24: Influence de la durée totale sur les performances du protocole fed-batch.....	103

Figure III-25 : Simulations du protocole continu à l'état stationnaire.	106
Figure III-26 : Exemple de simulation du régime transitoire en protocole continu.	107
Figure III-27 : Conditions et rendement instantané pour le protocole continu à faible taux de dilution.	108
Figure III-28 : Influence de la durée totale sur les performances du protocole continu à faible taux de dilution.	109
Figure III-29 : Bilan des simulations : (a) contraintes.....	111
Figure III-30 : Bilan des simulations : (b) productivité et rendement.....	112
Figure III-31 : Bilan des simulations : (c) besoin en oxygène et concentration finale en protéines....	113
Figure IV-1 : Influence du pH sur la croissance de <i>T. reesei</i> sur glucose.	115
Figure IV-2 : Conditions initiales pour tester l'effet de l'acide acétique sur la croissance de <i>T. reesei</i>	116
Figure IV-3 : Effet de l'acide acétique sur la production de CO ₂ par <i>T. reesei</i> en croissance.....	117
Figure IV-4 : Effet de l'acide acétique sur le métabolisme de <i>T. reesei</i> en croissance.....	118
Figure IV-5 : Effet de l'acide acétique sur les rendements.....	118
Figure IV-6 : Culture continue en présence d'acide acétique : suivi des concentrations.....	120
Figure IV-7 : Suivi de la croissance en batch sur glucose en présence d'acide acétique.....	121
Figure IV-8 : Mesure du taux de croissance sur glucose en présence d'acide acétique.....	121
Figure IV-9 : pH minimal permettant une croissance correcte de <i>T. reesei</i> sur glucose en présence d'acide acétique.	122
Figure IV-10 : Inhibition de la croissance de <i>T. reesei</i> par les acides faibles à 2 pH initiaux.....	123
Figure IV-11 : Effets des composés phénoliques acides (pris individuellement) sur la croissance de <i>T. reesei</i>	123
Figure IV-12 : Effets des composés phénoliques alcool, aldéhyde et cétone (pris individuellement) sur la croissance de <i>T. reesei</i>	124
Figure IV-13 : Effets principaux sur la croissance de <i>T. reesei</i> des composés de dégradation en mélange.	126
Figure IV-14 : Effet du pool non inhibiteur sur la croissance de <i>T. reesei</i>	126
Figure IV-15 : Résultats du plan d'expérience en surface de réponse pour modéliser l'effet des inhibiteurs en mélange sur la croissance de <i>T. reesei</i>	128
Figure IV-16 : Croissance sur glucose en bioréacteur en présence d'inhibiteurs.	128
Figure IV-17 : Suivi du furfural et de l'acide furoïque pendant la croissance de <i>T. reesei</i> sur glucose.	129
Figure IV-18 : Effet des inhibiteurs en phase de production en fed-batch.....	132
Figure IV-19 : Plan de mélange utilisé pour tester l'effet des mélanges de sucres.....	135
Figure IV-20 : Analyse des corrélations entre les 4 réponses étudiées.	136
Figure IV-21 : Effet des mélanges de sucres sur la vitesse spécifique de production de cellulases. ..	138
Figure IV-22 : Cartographie des activités spécifiques (en IU mg _p ⁻¹) sur mélanges de sucres.....	139
Figure IV-23 : Validation des modèles par comparaison avec culture en bioréacteur.....	141
Figure IV-24 : Plan de mélange utilisé pour le test de l'arabinose et du mannose.	142
Figure IV-25 : Effet du mannose et de l'arabinose sur la vitesse spécifique de production de protéines.	142
Figure IV-26 : Effet du mannose et de l'arabinose sur les activités enzymatiques.	143
Figure IV-27 : Cinétiques d'hydrolyses de 3 biomasses lignocellulosique différentes par les cocktails produits lors du plan de mélange lactose/xylose/glucose.....	145
Figure IV-28: Influence de l'activité xylanase sur la libération initiale de glucose.....	147
Figure IV-29 : Influence des activités cellulase FP et β-glucosidase sur l'hydrolyse enzymatique. ...	147
Figure IV-30 :Modélisation de la libération de glucose en hydrolyse en fonction du mélange de fed-batch utilisé pour produire le cocktail enzymatique.....	148
Figure IV-31 : Chromatogramme HPLC des composés formés par hydrolyse enzymatique inversée.	151
Figure IV-32 : Influence de la dose d'enzyme sur le taux de conversion à 16h.	151
Figure IV-33 : Test de production en fioles alimentées avec induction par différents oligosaccharides.	152
Figure IV-34 : Productions de protéines en bioréacteur avec induction par un mélange de glucose et d'oligosaccharides produits par la souche TR3012.	153

Figure IV-35 : Schémas de procédé avec intégration de l'étape de synthèse enzymatique d'oligosaccharides inducteurs.	154
Figure IV-36 : Synthèse des différentes formes de sophorolipides.	156
Figure IV-37 : Test d'induction par les sophorolipides.	157
Figure IV-38 : Effet de la dose d'acide sur l'hydrolyse acide ménagée du sophorolipide.	158
Figure IV-39 : Chromatogramme HPLC de l'hydrolysate acide ménagé de sophorolipides.	158
Figure IV-40 : Suivi de l'hydrolyse acide ménagée au reflux de sophorolipides.	159
Figure IV-41 : Test de production en fioles alimentées avec induction par un hydrolysate acide ménagé de sophorolipides.	160
Figure IV-42 : Effet du pH de consigne sur le protocole de culture en fed-batch.	161
Figure IV-43 : Effet du pH de consigne sur les activités enzymatiques spécifiques finales.	162
Figure IV-44 : Suivi de la teneur en CO ₂ du gaz de sortie au cours d'une culture.	163
Figure IV-45 : Contraintes liée à la teneur en CO ₂ pour l'extrapolation de l'aération.	164
Figure IV-46 : Effet de la concentration en oxygène dissous sur le protocole fed-batch.	166
Figure IV-47 : Effet du cisaillement sur la production de protéines en protocole continu.	168

Index des tableaux

Tableau I-1 : Potentiels des ressources mondiales d'énergie renouvelable (en TW).....	27
Tableau I-2 : Capacité des dispositifs de stockage de l'énergie (exemples).....	27
Tableau I-3 : Principe général du bilan matière et application au schéma de réacteur.	37
Tableau I-4 : Compositions moyennes en sucres potentiels de 5 biomasses brutes.....	44
Tableau I-5 : Composition moyenne théorique des hydrolysats disponibles dans une bioraffinerie lignocellulosique.	45
Tableau I-6 : Concentrations en composés potentiellement inhibiteurs dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique.....	46
Tableau II-1: composition du milieu de culture IFP Energies nouvelles	56
Tableau III-1 : Composition élémentaire des cellules de <i>T. reesei</i>	67
Tableau III-2 : Composition élémentaire moyenne de la biomasse.	68
Tableau III-3 : Composition élémentaire et teneur massique théorique des principales cellulases et du cocktail moyen produit par <i>T. reesei</i>	68
Tableau III-4 : Composition élémentaire moyenne du cocktail de protéines produit par <i>T. reesei</i>	69
Tableau III-5 : Validation de l'équation stœchiométrique pour la croissance sur glucose.	70
Tableau III-6 : Comparaison des rendements en gaz et du quotient respiratoire entre croissance et production sur lactose pour le même rendement.	71
Tableau III-7 : Synthèse des milieux de cultures utilisés dans la littérature pour les essais en fiole. ...	72
Tableau III-8 : Besoins en espèces ioniques pour former 10g/L de produit, concentrations dans les milieux de culture, et calcul de l'élément limitant.....	73
Tableau III-9 : Comparaison des pH simulés et mesurés lors de la préparation de 2 milieux de culture.	77
Tableau III-10 : Étude du métabolisme en fed-batch : (c) calcul des bilans carbone.....	86
Tableau III-11 : Identification paramétrique selon le modèle de Pirt.....	91
Tableau III-12 : Identification paramétrique selon le modèle de Pirt (suite).	92
Tableau III-13 : Calcul des vitesses spécifiques selon le modèle cinétique de <i>T. reesei</i>	94
Tableau III-14 : Étude de sensibilité du modèle cinétique.	96
Tableau III-15 : Bilan du modèle cinétique de <i>T. reesei</i> en production de protéines.....	97
Tableau III-16 : Bilan des performances du protocole fed-batch complet.	104
Tableau IV-1 : Bilans par phases de la culture continue sur glucose en présence d'acide acétique. ...	120
Tableau IV-2 : Conditions expérimentales du plan factoriel fractionnaire.	125
Tableau IV-3 : Matrice expérimentale du second plan d'expérience.....	127
Tableau IV-4 : Bilan des concentrations maximales en inhibiteurs pour la croissance de <i>T. reesei</i> sur glucose à pH 5.5.....	130
Tableau IV-5: Répétabilité du protocole d'étude en fioles alimentées.	136
Tableau IV-6 : Modèles quadratiques résultant des plans de mélange.....	137
Tableau IV-7 : Activités enzymatiques spécifiques des cocktails utilisés pour les tests d'hydrolyse.	144
Tableau IV-8 : Estimation du coût du substrat pour différentes options d'inducteur et de conduite... ..	155

Glossaire et abréviations

Biomasse	cellules de <i>T. reesei</i> (à ne pas confondre avec "biomasse lignocellulosique")
BLC	biomasse lignocellulosique : appellation générale des matières organiques composées d'un assemblage de cellulose, d'hémicelluloses et de lignine.
C5	pentoses (xylose et arabinose)
C6	hexoses (glucose, mannose, galactose)
EC	Enzyme Commission : nomenclature pour la classification numérique des enzymes selon leurs activités et leurs substrats.
Exergie	grandeur permettant de calculer le travail maximal que peut fournir un système à l'extérieur lorsqu'il se met à l'équilibre thermodynamique avec son environnement. Contrairement à l'énergie qui se conserve, l'exergie ne peut que diminuer lors des transformations.
Fioles alimentées	protocole (développé au cours de cette thèse) de production de cellulases en fiole avec alimentation par un mélange stœchiométrique de substrat carboné et de base NH ₃ , ce qui permet de stabiliser le pH de la culture dans système de contrôle du pH.
Hydrolysats	solution de sucres obtenue par hydrolyse chimique (par exemple lors du prétraitement) ou enzymatique (par des cellulases) de biomasse lignocellulosique
<i>in-situ</i>	intégré dans une bioraffinerie lignocellulosique
IU	International Unit : = 1 $\mu\text{mol}/\text{min}$ dans le cas des mesures d'activité enzymatique
katal	unité de mesure de l'activité enzymatique. 1 katal = 1 mol/s
Poids sec	méthode pour la mesure de la concentration en biomasse, avec lavage des cellules pour supprimer les composés solubles.
Procédé	désigne ici le schéma global de transformation de biomasse lignocellulosique en produit chimique d'intérêt, ici du bioéthanol.
Productivité	critère pour la comparaison de protocoles de production, donne la masse de produit récupéré par volume de réacteur et par heure. Ici, la productivité est calculée par rapport au volume utile de liquide dans le réacteur (volume final en mode fed-batch, volume de culture en mode continu)
Protocole de production	désigne ici le mode de conduite pour l'étape de production des cellulases par <i>Trichoderma reesei</i> (afin d'éviter les confusions avec "procédé")
Rendement	critère pour la comparaison de protocoles de production, donne la masse de produit récupéré rapportée à la masse totale de substrat consommé. Ici, le rendement et le taux de conversion (rapport au substrat apporté) sont identiques car tout le substrat apporté est consommé.
SSF	Simultaneous Saccharification and Fermentation : procédé dans lequel l'hydrolyse enzymatique de la cellulose en glucose, et la fermentation du glucose en éthanol sont réalisées en une seule étape. (à ne pas confondre avec Solid State Fermentation, non utilisée ici)

VTT

Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus : Centre national de la recherche
technique de Finlande.

Nomenclature

Notation	Unité	Description
μ	h^{-1}	Vitesse spécifique de croissance de la biomasse (cellules de <i>T. reesei</i>), aussi appelée taux de croissance.
μ_{max}	h^{-1}	Taux de croissance maximal
γ_i	$L \text{ mol}^{-1}$	Coefficient d'activité de l'espèce <i>i</i> en solution
a_i	-	Activité de l'espèce <i>i</i> en solution
C_i	mol L^{-1}	Concentration de l'espèce <i>i</i> en solution
D	h^{-1}	Taux de dilution imposé en protocole continu
F_{in}	$L \text{ h}^{-1}$	Débit liquide d'alimentation du réacteur
F_{out}	$L \text{ h}^{-1}$	Débit liquide de soutirage du réacteur
FI	mol L^{-1}	Force ionique
I	mol L^{-1}	Concentration en inhibiteur dans le milieu de culture
K_{La}	h^{-1}	Coefficient de transfert d'oxygène
K_{La}^{min}	h^{-1}	Coefficient de transfert d'oxygène minimum du réacteur pour maintenir une concentration en oxygène dissous égale à 20% de la saturation
m	$g_S g_X^{-1} h^{-1}$	Coefficient de maintenance
P	$g_P L^{-1}$	Concentration en protéines dans le réacteur
P_{in}	$g_P L^{-1}$	Concentration en protéines dans l'alimentation du réacteur
P_{out}	$g_P L^{-1}$	Concentration en protéines dans le soutirage du réacteur
q_{CO_2}	$g_{CO_2} g_X^{-1} h^{-1}$	Vitesse spécifique de production de CO_2
q_{O_2}	$g_{O_2} g_X^{-1} h^{-1}$	Vitesse spécifique de consommation d' O_2
q_P	$g_P g_X^{-1} h^{-1}$	Vitesse spécifique de production de protéines
q_S	$g_S g_X^{-1} h^{-1}$	Vitesse spécifique de consommation de substrat
QR	-	Quotient respiratoire
r_{CO_2}	$g_{CO_2} L^{-1} h^{-1}$	Vitesse volumique de production de CO_2
r_{O_2}	$g_{O_2} L^{-1} h^{-1}$	Vitesse volumique de consommation d' O_2
r_P	$g_P L^{-1} h^{-1}$	Vitesse volumique de production de protéines
r_S	$g_S L^{-1} h^{-1}$	Vitesse volumique de consommation de substrat carboné
r_X	$g_X L^{-1} h^{-1}$	Vitesse volumique de production de biomasse (cellules)
S	$g_S L^{-1}$	Concentration en substrat carboné dans le réacteur
S_{in}	$g_S L^{-1}$	Concentration en substrat carboné dans l'alimentation du réacteur
S_{out}	$g_S L^{-1}$	Concentration en substrat carboné dans le soutirage du réacteur
V	L	Volume de liquide dans le réacteur
VVM	$L L^{-1} \text{ min}^{-1}$	Débit d'aération dans le réacteur
X	$g_X L^{-1}$	Concentration en biomasse (cellules) dans le réacteur

X_{in}	$g_X L^{-1}$	Concentration en biomasse (cellules) dans l'alimentation du réacteur
X_{out}	$g_X L^{-1}$	Concentration en biomasse (cellules) dans le soutirage du réacteur
$Y_{CO_2/S}$	$mmol g_S^{-1}$	Rendement instantané de production de CO_2 rapporté au substrat carboné consommé
$Y_{CO_2/X}$	$mmol g_X^{-1}$	Rendement instantané de production de CO_2 rapporté à la biomasse produite
$Y_{O_2/S}$	$mmol g_S^{-1}$	Rendement instantané de consommation d' O_2 rapporté au substrat carboné consommé
$Y_{O_2/S}^m$	$mmol g_S^{-1}$	Rendement théorique de consommation d' O_2 rapporté au substrat carboné consommé, pour le compartiment maintenance
$Y_{O_2/S}^P$	$mmol g_S^{-1}$	Rendement théorique de consommation d' O_2 rapporté au substrat carboné consommé, pour le compartiment production de protéines
$Y_{O_2/S}^X$	$mmol g_S^{-1}$	Rendement théorique de consommation d' O_2 rapporté au substrat carboné consommé, pour le compartiment croissance de la biomasse
$Y_{O_2/X}$	$mmol g_X^{-1}$	Rendement instantané de consommation d' O_2 rapporté à la biomasse produite
$Y_{P/S}$	$g_P g_S^{-1}$	Rendement instantané de production de protéine rapporté au substrat carboné consommé
Y_P°	$g_P g_S^{-1}$	Rendement théorique maximal de production de protéines
$Y_{X/S}$	$g_X g_S^{-1}$	Rendement instantané de production de biomasse rapporté au substrat carboné consommé
Y_X°	$g_X g_S^{-1}$	Rendement théorique maximal de production de biomasse
z_i	-	Charge de l'espèce i en solution

Liste des communications

Articles dans des revues à comité de lecture

Jourdier E, Poughon L, Larroche C, Monot F, and 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 11, 70.

Jourdier E, Ben Chaabane F, Poughon L, Larroche C and Monot F (2012) **Simple Kinetic Model of Cellulase Production by *Trichoderma reesei* for Productivity or Yield Maximization.** Chemical Engineering Transactions 27, 313-318.

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

Ben Chaabane F, Jourdier E, Licht R, Cohen C and Monot F (2012) **Kinetic characterization of *Trichoderma reesei* CL847 TR3002: an engineered strain producing highly improved cellulolytic cocktail,** Journal of Chemistry and Chemical Engineering 6 (2), 109-117.

Jourdier E, Poughon L, Larroche C, Monot F, and Ben Chaabane F (à soumettre) **Accurate measurement of *Trichoderma reesei* specific rates reveals an unexpected carbon overflow metabolism from protein production to biomass growth.**

Jourdier E, Poughon L, Larroche C, Monot F, and Ben Chaabane F (à soumettre) **Cartography of cellulases cocktails produced by *Trichoderma reesei* on sugar mixtures in industrial-like fed-batch conditions.**

Communications à congrès

Poster

Ben Chaabane F, Jourdier E, Licht R, Margeot A, Lopes-Ferreira N, Fourage L, Ravot G and Monot F (2012) **Kinetic characterization of *Trichoderma reesei* CL847 TR3002: an engineered strain producing highly improved cellulolytic cocktail,** 33rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals, 2-5 May 2011, Seattle, USA.

Présentation orale

Jourdier E, Ben Chaabane F, Poughon L, Larroche C and Monot F (2012) **Simple Kinetic Model of Cellulase Production by *Trichoderma reesei* for Productivity or Yield Maximization.** 3rd International Conference on Industrial Biotechnology, 24-27 June 2012, Palermo, Italy

Brevets

Jourdier E, Aymard C and Ben Chaabane F (12/2012) **Procédé de production d'oligosaccharides à partir de biomasse lignocellulosique.**

Jourdier E and Ben Chaabane F (29/10/2012) **Procédé de production de sophorose à partir de sophorolipides.**

Jourdier E and Ben Chaabane F (13/04/2012) **Procédé de sélection de clones de souches microbiennes ou de cellules animales, notamment pour la production de protéines**

Cohen C, Chaussepied B, Jourdier E and Ben Chaabane F (19/08/2011) **Procédé de production de cellulases par un champignon filamenteux adapté a un fermenteur ayant un faible coefficient de transfert volumétrique d'oxygène K_La .**

Introduction

Dans le contexte climatique et énergétique mondial, un nouveau concept se développe pour diversifier les ressources en énergie et en composés chimiques pour les activités humaines : les bioraffineries lignocellulosiques. Sur le modèle des raffineries pétrolières, elles permettraient la production de nombreux composés pour les carburants ou les industries chimiques, mais à partir de ressources renouvelables, à savoir des végétaux, et de préférence la fraction majoritaire non comestible appelée biomasse lignocellulosique.

Dans la plupart des schémas de bioraffineries, des enzymes appelées cellulases sont nécessaires pour hydrolyser la biomasse lignocellulosique en sucres monomères. Ces enzymes sont naturellement produites par de nombreux microorganismes dont des souches du champignon filamenteux *Trichoderma reesei* sélectionnées pour leur capacité à être utilisées industriellement. En raison du fort besoin en cellulases pour l'hydrolyse enzymatique, l'étape de production des enzymes est un point clé pour le développement des bioraffineries lignocellulosiques.

Le travail réalisé au cours de cette thèse se propose d'étudier en détail cette étape de production des enzymes cellulases, avec d'une part le métabolisme du micro-organisme producteur, et d'autre part l'intégration du protocole de production dans une bioraffinerie lignocellulosique. Ce travail vise à développer des modèles prédictifs qui pourront être utilisés pour réaliser des simulations de cette étape à des fins d'optimisation. Pour une meilleure compréhension des mécanismes étudiés, le choix a été fait de réaliser cette étude uniquement avec des mélanges synthétiques représentatifs des mélanges réels qui seront disponibles dans une bioraffinerie lignocellulosique.

La première partie de ce document décrit le contexte de cette étude et du projet Futurol dans lequel elle s'inscrit, avec les concepts généraux de la transformation biochimique de la biomasse lignocellulosique et de son application aux biocarburants de 2^e génération. Puis une étude bibliographique de l'étape de production des cellulases par *T. reesei* est proposée, avec les différents protocoles de production et les connaissances actuelles du métabolisme de ce micro-organisme, ainsi que les contraintes liées à l'intégration de cette étape dans une bioraffinerie lignocellulosique.

La deuxième partie présente les matériels et les méthodes utilisés pour réaliser cette étude, avec les différentes souches et produits, les protocoles de cultures et les analyses réalisées.

La troisième partie présente les résultats de l'analyse du métabolisme de *T. reesei* lors de la production d'enzymes sur lactose pur. Tout d'abord, la stœchiométrie des réactions biologiques a été établie et utilisée pour améliorer les protocoles de culture, leur conduite, et leur analyse. L'analyse précise de nombreuses cultures a permis de caractériser le métabolisme dans des conditions non étudiées dans la littérature. Puis un modèle cinétique a été développé, validé, et utilisé pour comparer par simulation les différents protocoles de production possibles.

La quatrième partie présente les résultats concernant l'effet sur le métabolisme de l'intégration de cette étape de production dans une bioraffinerie lignocellulosique. Tout d'abord, l'inhibition potentielle de *T. reesei* par des composés de dégradation de la biomasse lignocellulosique a été investiguée, puis l'effet de l'utilisation de sucres issus de la biomasse lignocellulosique sur le métabolisme de production d'enzymes a été mesuré et modélisé. Par ailleurs, plusieurs voies ont été explorées pour synthétiser à faible coût des composés inducteurs nécessaires à une production maximisée. Enfin les effets sur le métabolisme liés au changement d'échelle entre le laboratoire et la bioraffinerie ont été étudiés.

Finalement, des voies d'amélioration et des études complémentaires seront proposées, aussi bien pour les méthodes développées au cours de cette thèse que pour le protocole de production et son intégration dans les bioraffineries lignocellulosiques.

Cette étude a été financée par le projet Futurol (projet-futurol.com), soutenu par Oséo Innovation.

I. Valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique

1 Contexte du projet Futurol

1.1 Les énergies renouvelables

1.1.1 Contexte énergétique et climatique mondial

Depuis quelques décennies, la Terre fait face à un réchauffement climatique sans précédent par son ampleur et sa vitesse, dû principalement à l'augmentation de la concentration dans l'atmosphère des gaz à effet de serre, en particulier le CO₂. L'activité humaine est à l'origine de cette augmentation, par l'utilisation massive de ressources fossiles (charbon, pétrole, gaz) comme source d'énergie (Puget et al., 2010).

Par ailleurs, ces mêmes ressources fossiles sont limitées et ne pourront pas répondre à la demande énergétique croissante dans les prochaines décennies. Il apparaît donc indispensable de diversifier les ressources en énergie, en développant des filières de production à la fois illimitées en quantité, et à faible impact sur le climat.

1.1.2 Ressources renouvelables d'énergie

La Figure I-1 présente les réservoirs et les flux d'exergie disponibles sur Terre, séparés en fonction de leur nature et des conversions entre ces flux (Hermann, 2006). L'exergie est la fraction utile de l'énergie, valorisable par l'homme. Au contraire de l'énergie qui se conserve, l'exergie se détruit lors des conversions. Ces flux sont à comparer avec la consommation totale d'énergie sur Terre, de l'ordre de 15 TW (dont 11.8 TW d'énergie fossile). Ils donnent un bon aperçu du potentiel de chaque énergie renouvelable ou fossile.

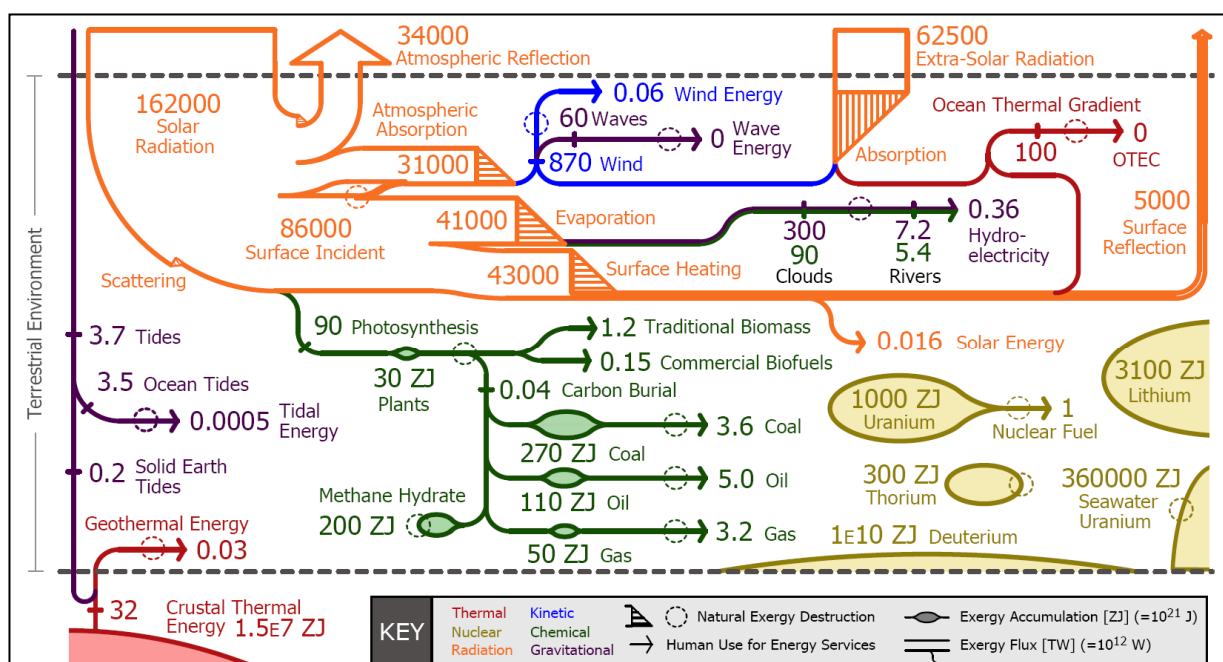


Figure I-1 : Réservoirs, destruction et flux d'exergie à l'échelle planétaire.

Carte réalisée par le Global Climate and Energy Project de l'Université de Stanford (<http://gcep.stanford.edu>).

- I. Valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique -

Ces flux représentent le potentiel théorique maximal que chacune des énergies, et sont donc à compléter avec une étude de faisabilité technique voire économique (UNDP et al., 2000) :

- L'énergie gravitationnelle (en violet Figure I-1) forme les marées, avec un flux de 3.7 TW d'énergie cinétique totale, dont 2.5 TW sont dissipés sur les côtes (potentiel maximal théorique). En pratique seuls quelques sites dans le monde se prêtent à l'extraction d'une telle énergie, comme l'estuaire de la Rance en France.
- L'énergie thermique du noyau terrestre (en rouge Figure I-1) se dissipe à travers toute la surface de la croûte terrestre, avec un flux d'environ 32 TW à l'interface entre le noyau et la croûte à 40 km de profondeur (potentiel théorique maximal).
- L'énergie nucléaire (en jaune Figure I-1) présente dans certains éléments est valorisée actuellement par fission de noyaux d'uranium à hauteur de 1 TW. Les autres techniques (extraction de l'uranium présent dans l'eau de mer, fusion à partir de deutérium) nécessitent encore plusieurs décennies de recherche.
- L'énergie des radiations solaires et extra-solaires (en orange) forme de loin le principal flux d'énergie sur Terre, elle est transformée en énergie sous différentes natures:
 - L'énergie cinétique du vent (bleu) représente un flux d'environ 870 TW :
 - 190 TW sont extractibles avec des éoliennes à environ 50 m de hauteur (potentiel maximal théorique), ce qui nécessiterait de couvrir d'éoliennes les 27% de terres mondiales présentant les bonnes caractéristiques de vent. En pratique, on estime que 4 à 10 % de ces terres pourraient être utilisées, soit un potentiel technique de 8 à 20 TW, qui permettrait de produire 2.5 à 6 TW électriques (rendement d'extraction de 0.3).
 - 60 TW sont transmis à l'océan et forment les vagues. Entre 2 et 3 TW se dissipent sur les côtes (potentiel maximal théorique, non valorisé actuellement)
 - L'évaporation de l'eau de mer forme les nuages et les pluies, et l'énergie associée est transférée aux rivières, sous 2 natures différentes:
 - la partie chimique (due à la différence de salinité entre l'eau douce et l'eau de mer) représente un flux de 3 à 5 TW (potentiel théorique maximal), et n'est pas valorisée actuellement.
 - la partie gravitationnelle (due à la différence de hauteur entre les terres et l'océan), représente un flux de 4.6 à 7.2 TW. Elle est valorisée par l'utilisation de barrages hydroélectriques, avec un potentiel technique de 1.6 TW et économique de 0.8 TW. L'Europe de l'ouest valorise déjà 65% des sites possibles, et les Etats-Unis 76%. La production mondiale est de l'ordre de 0.4 TW.
 - Le réchauffement de l'eau en surface des océans forme un gradient thermique avec les eaux en profondeur (d'où les grands courants océaniques), pour un flux d'exergie de l'ordre de 100 TW. En raison de la faible différence de température entre surface et profondeurs, il n'existe pas actuellement de technique d'extraction.
 - Par la photosynthèse, les plantes et algues stockent l'énergie solaire sous forme de composés chimiques, tout en fixant le CO₂ atmosphérique, pour un flux de 90 TW (65 et 25 respectivement).
 - L'homme utilise actuellement 16 TW pour l'alimentation, le bois énergie (1.2 TW consommation finale) et les biocarburants de 1^{ère} génération (0.2 TW).
 - L'enfouissement très lent de la biomasse pendant des millions d'années a permis la formation de réservoirs de pétrole, de gaz et de charbon, consommés aujourd'hui avec un flux de 11.8 TW
 - Enfin, l'énergie solaire peut être extraite directement, sous forme de chaleur (solaire thermique) ou d'électricité (solaire photovoltaïque). Le flux moyen arrivant sur les terres est de l'ordre de 25000 TW, dont 50 à 1000 sont valorisables.

La Tableau I-1 résume le potentiel de chaque ressource mondiale d'énergie renouvelable. L'énergie solaire présente le plus fort potentiel, mais seule la biomasse permet de stocker l'énergie sous une forme chimique comparable à celle des énergies fossiles.

Tableau I-1 : Potentiels des ressources mondiales d'énergie renouvelable (en TW).

Potentiel théorique maximal, potentiel technique ou économique, et valorisation actuelle des différentes ressources mondiales d'énergie renouvelable, comparé à la consommation actuelle d'énergies non renouvelables Synthèse de (Hermann, 2006; UNDP et al., 2000).

		Potentiel théorique maximal	Potentiel technique/économique	Valorisation actuelle	Forme finale
Manteau Océans	Géothermie	32		0.03	Chaleur
	Marées	2.5		0.0005	Electrique
	Vagues	2 à 3			
Rivières	Thermique	100			
	Hydroélectrique	5 à 7	0.8 à 1.6	0.4	Electrique
	Gradient de sel	3 à 5			
Atmosphère Terres	Eolien	190	8 à 20	0.06	Electrique
	Solaire	25000	50 à 1000	0.01	Chaleur/Elec
	Biomasse	65+25		16	Chimique
	<i>Energies fossiles</i>			<i>11.6</i>	<i>Chimique</i>
	<i>Nucléaire</i>			<i>1</i>	<i>Electrique</i>

1.1.3 Contraintes liées au stockage de l'énergie

Pour le développement à grande échelle des énergies renouvelables, la question du stockage est cruciale pour permettre une fourniture d'énergie désynchronisée de la production. Le Tableau I-2 présente différents dispositifs de stockage de l'énergie et leurs capacités. L'énergie électrique peut être stockée dans des condensateurs ou batteries qui stockent l'énergie à raison d'environ 0.1 MJ/kg. Le stockage de l'énergie sous forme chimique permet une bien meilleure densité, de l'ordre de 40 MJ/kg dans les carburants liquides issus du pétrole ou de la biomasse.

L'hydrogène, souvent présenté comme l'énergie du futur, présente une forte densité massique, mais doit être stocké à de très fortes pressions pour diminuer son volume. Au contraire, les carburants liquides présentent une forte densité énergétique à pression atmosphérique et température ambiante.

Tableau I-2 : Capacité des dispositifs de stockage de l'énergie (exemples).

		MJ/kg	MJ/L
Gravitation	Eau de barrage	0.001	0.001
Electrique	Condensateurs	0.01 à 0.02	
	Batteries	0.1 à 0.6	
Chimie	Biomasse	15 à 20	
	Carburants liquides	40	32
	Hydrogène	143	5.6 (à 700 bar)

Finalement, la biomasse ne présente certes pas le plus fort potentiel de développement parmi les énergies renouvelables, mais elle présente l'énorme avantage de fournir une énergie sous une forme chimique facilement stockable. De plus, les techniques agricoles et sylvicoles de culture et d'extraction sont déjà très développées.

La biomasse peut être valorisée sous deux formes pour la production d'énergie : soit directement pour la production de chaleur (bois énergie), soit après transformation chimique sous forme de carburant liquide appelé biocarburant.

1.2 Les biocarburants

Les biocarburants, ou plus rigoureusement agrocarburants, sont des carburants liquides semblables à ceux issus du pétrole, mais produits à partir des composés chimiques présents dans la biomasse végétale.

1.2.1 Première génération

Les biocarburants actuels, dits de 1^{ère} génération, n'utilisent qu'une très faible partie de la plante, qui est aussi la partie déjà valorisée pour l'alimentation (Figure I-2). Les huiles végétales (colza, tournesol) sont modifiées chimiquement afin d'être mélangées au gazole. Les sucres de la betterave et de la canne à sucre, ou extraits de l'amidon du blé, du maïs ou de la pomme de terre, sont fermentés par des levures en éthanol, qui peut alors être mélangé à l'essence après purification par distillation. Ces biocarburants entrent donc en compétition avec la filière alimentaire, et pourraient influencer le prix des matières premières alimentaires sur les marchés.

L'utilisation de biocarburants, plus chers à produire que les carburants classiques, est soutenue fiscalement par différentes politiques favorisant les énergies renouvelables. Pour l'Europe, la directive 2009/28/CE fixe pour 2020 des objectifs de 20% d'énergies renouvelables pour la consommation énergétique totale et de 10% dans les transports. De plus, des critères de durabilité sont appliqués aux biocarburants, avec un objectif de réduction des émissions de gaz à effet de serre pour 2017 (du puits à la roue) qui doit être d'au moins 50% par rapport à un carburant classique.

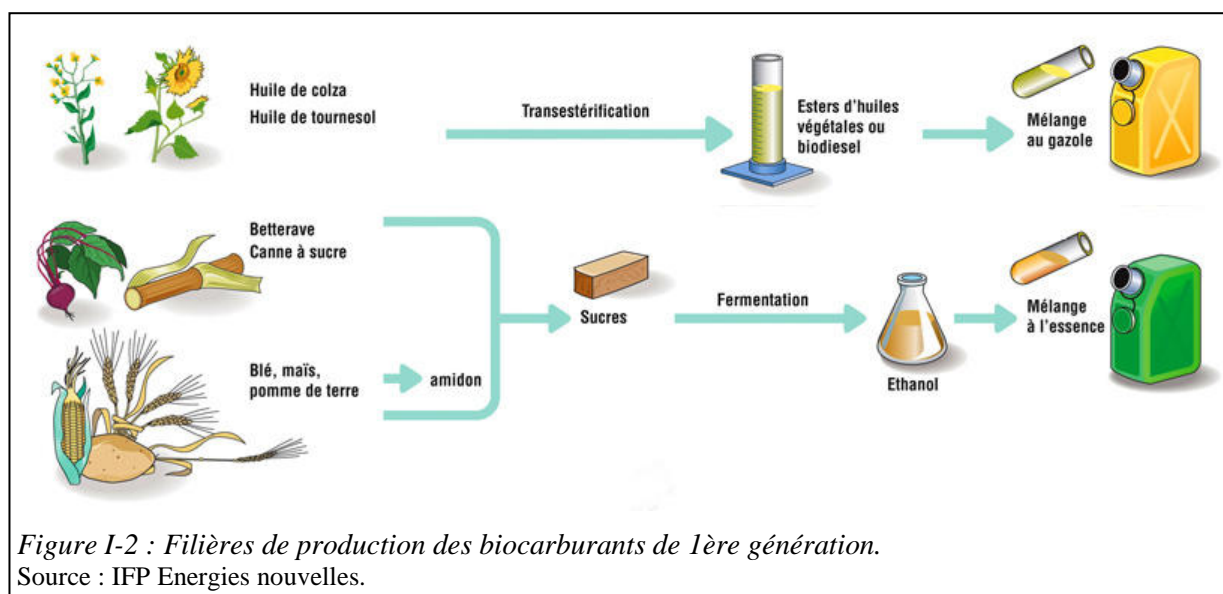


Figure I-2 : Filières de production des biocarburants de 1^{ère} génération.

Source : IFP Energies nouvelles.

1.2.2 Deuxième génération

Les biocarburants de 2^e génération visent à valoriser la lignocellulose, fraction non alimentaire de la plante, et constituant largement majoritaire de la biomasse végétale. En pratique, on peut utiliser des résidus agricoles (paille de blé, tiges de maïs) ou forestiers, ou des sous-produits de la transformation du bois ou de l'industrie papetière.

Deux filières sont possibles pour la transformation de la biomasse lignocellulosique (Figure I-3) :

- la voie thermochimique procède par gazéification de la biomasse puis recondensation du gaz produit sous forme d'hydrocarbures, pour mélange avec le gazole,
- la voie biochimique extrait les sucres présents dans la biomasse lignocellulosique par hydrolyse enzymatique, sucres qui sont ensuite fermentés en éthanol comme pour la 1^{ère} génération.

Ainsi, les biocarburants de 2^e génération n'entrent pas en compétition avec la filière alimentaire, même si ils peuvent occuper de la surface cultivable dans le cas de cultures dédiées. De plus, ils présentent un bien meilleur bilan en termes d'émissions de gaz à effet de serre : 70% de baisse des émissions par rapport aux carburants fossiles contre 30% pour la 1^{ère} génération environ (Edwards et al., 2006)

La voie biochimique permet de récupérer des sucres, entités énergétiques de base pour les procédés biologiques, qui peuvent donc être utilisés pour d'autres transformations. Ceci ouvre la voie à d'autres débouchés que les biocarburants, et permettrait le remplacement du pétrole utilisé à grande échelle dans l'industrie chimique.

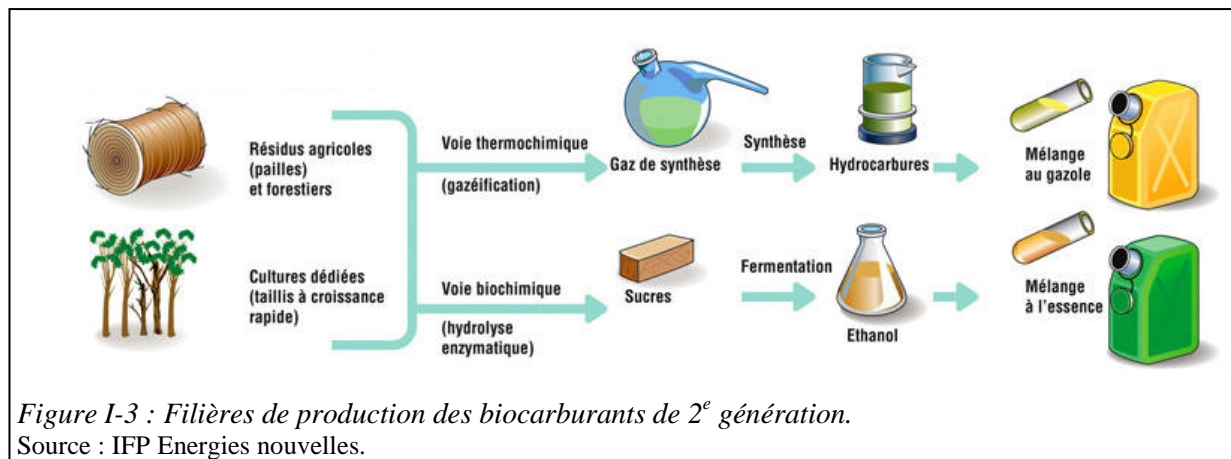


Figure I-3 : Filières de production des biocarburants de 2^e génération.
Source : IFP Energies nouvelles.

1.2.3 Filières du futur

Les algues sont présentées comme la potentielle 3^e génération pour la production de biocarburants ou de composés chimiques. Comme les plantes terrestres, elles utilisent la photosynthèse pour fixer le CO₂, elles ont donc des compositions chimiques semblables, et seront valorisées par les mêmes transformations chimiques que pour la 1^{ère} ou la 2^e génération (sucre en bioéthanol, lipides en biodiesel). Leur principal avantage est une croissance plus rapide que celle des plantes terrestres, même si ce point est à nuancer car souvent grossièrement exagéré à des fins commerciales (Tredici, 2010). Leur principal verrou est l'étape de séparation, car la concentration des algues dans la phase liquide est très faible (de l'ordre de 1 g/L de masse sèche pour des microalgues cultivées dans des photobioréacteurs standard).

A plus long terme, de nombreuses équipes étudient le fonctionnement de la photosynthèse à l'échelle moléculaire, dans le but de mettre au point une photosynthèse artificielle. Ceci permettrait de récupérer directement l'énergie solaire, soit sous forme électrique, soit sous forme de dihydrogène après électrolyse de l'eau. Comme l'énergie solaire n'est pas utilisée pour stocker du CO₂ mais directement récupérée, on peut espérer dépasser largement les rendements des plantes terrestres (0.5 à 1%). Le système final serait comparable à des panneaux photovoltaïques (avec les mêmes problématiques de stockage d'énergie), mais n'utiliserait pas de métaux rares pour sa fabrication.

Finalement, les biocarburants de 2^e génération proposent de valoriser chimiquement la partie lignocellulosique de la plante et pas uniquement la partie déjà utilisée pour l'alimentation. Les techniques développées pour extraire les sucres seront applicables à d'autres débouchés, et extrapolables aux algues dont la composition chimique est semblable.

1.3 Valorisation biochimique de la biomasse lignocellulosique

1.3.1 La biomasse lignocellulosique

Les végétaux terrestres sont constitués de 3 polymères principaux :

- la cellulose (35 à 50%) est un polymère linéaire de D-glucose anhydre, reliés par des liaisons osidiques β -1,4.
- l'hémicellulose (10 à 30%) est un polymère branché contenant majoritairement du xylose, mais aussi de l'arabinose, du mannose, du galactose, etc.
- les lignines (20 à 30%) sont des polymères phénoliques complexes et extrêmement résistants. Elles jouent un grand rôle dans la structure macroscopique de la plante, en lui conférant sa rigidité et son hydrophobicité.

La teneur en ces polymères et leur composition moyenne va fortement dépendre du type de biomasse végétale (1.2.3.1, page 43).

1.3.2 Les enzymes cellulolytiques

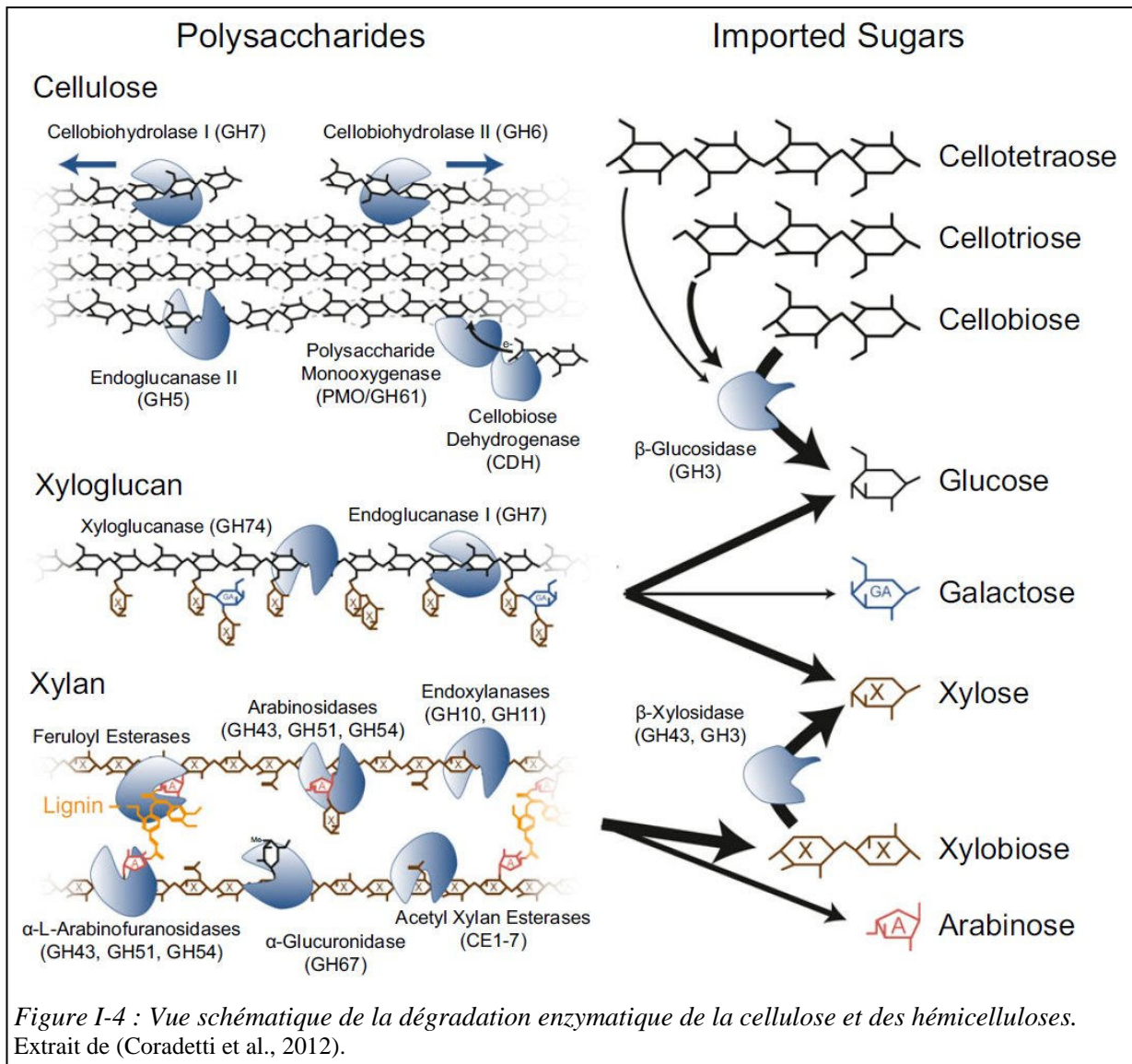
La valorisation de la biomasse lignocellulosique par voie biochimique nécessite de réaliser l'hydrolyse des polymères de cellulose et d'hémicellulose en sucres monomères. Dans la nature, cette hydrolyse est réalisée par les enzymes sécrétées par exemple par les microorganismes parasites des végétaux, ou ceux de la flore intestinale des animaux herbivores.

L'hydrolyse complète de la cellulose, et à plus forte raison l'hydrolyse d'un végétal complexe associant cellulose, hémicellulose et lignine, nécessite l'action conjointe de nombreuses enzymes, aux activités diverses (Figure I-4), et regroupées sous le terme général d'enzymes cellulolytiques, généralement simplifié en cellulases.

On distingue en général 3 grandes familles, selon le polymère visé par l'enzyme :

- les cellulases sont précisément les enzymes réalisant l'hydrolyse de la cellulose :
 - les endoglucanases (EC 3.2.1.4) coupent les chaînes de cellulose aléatoirement,
 - les cellobiohydrolases (EC 3.2.1.91) libèrent des unités cellobiose aux extrémités des chaînes de cellulose,
 - les β -glucosidases (EC 3.2.1.21) hydrolysent le cellobiose en 2 unités glucose,
- les hémicellulases réalisent l'hydrolyse des hémicelluloses, par exemple :
 - les endoxylanases (EC 3.2.1.8) coupent aléatoirement les chaînes de xylose,
 - les β -xylosidases (EC 3.2.1.37) hydrolysent le xylobiose en 2 xyloses,
 - les arabinofuranosidases (EC 3.2.1.55) coupent la liaison entre un xylose et un arabinose,
 - les galactosidases (EC 3.2.1.22) coupent la liaison entre un arabinose et un galactose,
- la famille des "enzymes helper" regroupe d'autres enzymes ou protéines dont les activités peuvent améliorer l'hydrolyse des végétaux, par exemple :
 - des ligninases, qui lysent certaines liaisons dans les lignines,
 - des expansines (swollenin), qui rendraient les fibres de celluloses plus accessibles,

La distinction entre ces 3 familles est cependant floue puisque d'une part certaines enzymes hydrolysent des liaisons entre polymères de natures différentes, et d'autre part des enzymes peuvent présenter plusieurs activités distinctes sur des substrats différents. Pour un résumé complet de ces enzymes et leurs modes de régulation, on se reportera à la synthèse réalisée par le Centre National de la Recherche Technique de Finlande (VTT) (Aro et al., 2005).



Bien que depuis 1999, le système SI impose le katal comme unité de mesure des activités enzymatiques (1 katal = 1 mol/s), la plupart des publications sur les cellulases expriment par habitude les activités en IU/mL (pour μ mole de produit libéré par minute et par mL de solution enzymatique mise en œuvre). Pour réaliser la conversion entre les deux unités, on peut retenir : 1 nkat = 0.06 IU.

Les méthodes de dosage d'activité sont nombreuses, selon le substrat utilisé, et la famille d'enzymes à caractériser (Dashtban et al., 2010). Dans cette thèse, 3 mesures d'activité sont utilisées en routine :

- l'activité cellulase papier filtre (FP) mesure l'activité globale d'un cocktail de cellulases pour l'hydrolyse d'un filtre de papier en glucose ;
- l'activité β -glucosidase mesure spécifiquement l'activité de l'enzyme β -glucosidase sur *p*NPG, substrat qui mime son substrat naturel le cellobiose ;
- l'activité xylanase mesure l'activité globale des hémicelluloses présentes dans le cocktail pour l'hydrolyse de xylanes en xylose.

1.3.3 Le champignon filamenteux *Trichoderma reesei*

1.3.3.1 Taxonomie et cycle de développement

Trichoderma est un genre de l'embranchement des ascomycètes, qui regroupe l'ensemble des organismes dont les spores sont formées dans des asques, et dont les principales classes sont les

eurotiomycètes (dont le genre *Aspergillus* fait partie), les saccharomycètes (dont les genres *Saccharomyces* et *Candida*) et les sordariomycètes (dont *Trichoderma*). Cette dernière comprend plus de 3000 espèces dont un grand nombre possède la capacité de dégrader des polysaccharides végétaux.

Les espèces du genre *Trichoderma* sont saprophytes, et se retrouvent sur les végétaux et les bois en décomposition, en particulier dans la litière des forêts humides de feuillus. Longtemps basée sur une simple identification morphologique, la taxonomie du genre a connu de nombreuses avancées grâce aux analyses génétiques. En particulier *Trichoderma reesei* est la forme reproductrice asexuée (anamorphe) de l'espèce *Hypocrea jecorina* (Kuhls et al., 1996).

Les souches de *Trichoderma* sont identifiables par leurs pigments conidiens vert clair ou blancs, et par leur structure de conidiophore embranchée. La plupart ne présentent pas de cycle sexuel, leur cycle de développement se compose uniquement de phases de multiplication végétative par mitoses, avec des sporulations abondantes. Pour la production industrielle de cellulases, la croissance en mycélium doit être privilégiée.

1.3.3.2 Intérêt industriel

Initialement rattaché par erreur à l'espèce *Trichoderma viride*, *Trichoderma reesei* a ensuite été considéré comme une espèce à part entière. Il a été nommé ainsi en l'honneur de son découvreur Elwyn T. Reese, chercheur au sein de l'US Army, qui travailla après guerre sur les problèmes de dégradation des tentes et vêtements en coton pendant la campagne du Pacifique. Il découvrit alors que ce microorganisme sécrétait des enzymes capables de dégrader la cellulose, et dès 1956 son équipe s'intéressa à augmenter les taux de sécrétion de ces enzymes.

Dans les années 1970, de nombreux mutants hyperproducteurs ont été obtenus par différentes équipes de recherche, ce qui a permis les premières productions commerciales, principalement pour les marchés du blanchiment des jeans et de l'alimentation animale. La production mondiale de cellulases était en 1999 d'environ 23 000 tonnes par an, représentant 10% du marché mondial des enzymes (Tolan and Foody, 1999)

Bien que de nombreux autres microorganismes produisent des cellulases (Gusakov, 2011), *Trichoderma reesei* est aujourd'hui considéré comme le seul micro-organisme capable de répondre aux besoins en cellulases pour les procédés de valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique, en raison de sa très forte capacité de production. Son cocktail enzymatique contient l'ensemble des principales familles présentées Figure I-4, mais est moins riche que d'autres organismes en activités annexes comme l'a montré récemment le séquençage des génomes de la souche mère et des mutants hyperproducteurs (Le Crom et al., 2009; Martinez et al., 2008).

1.4 Le procédé bioéthanol 2G

1.4.1 Description du procédé

Le procédé de base de transformation de la biomasse lignocellulosique en éthanol comprend 4 étapes principales successives (Figure I-5) :

- Le **prétraitement** vise à éclater la structure primaire de la plante pour rendre accessibles les fibres de cellulose.
- L'**hydrolyse enzymatique** met en jeu l'action des enzymes cellulolytiques pour hydrolyser les fibres de cellulose et d'hémicellulose en sucres monomères.
- La **fermentation éthanolique** met en jeu l'action de levures pour fermenter les sucres en éthanol.
- La **distillation** permet de séparer l'éthanol du milieu de culture.

Ce procédé est appelé SHF pour Separate Hydrolysis and Fermentation.

A l'inverse, le procédé dit SSF (pour Simultaneous Saccharification and Fermentation) consiste à réaliser l'hydrolyse et la fermentation en une seule étape. Dans ce cas là, on réalise au préalable une

pré-hydrolyse appelée liquéfaction pendant quelques heures pour fluidifier le milieu avant d'ajouter la levure. Le principal avantage de la SSF est de tirer la réaction d'hydrolyse car le glucose, inhibiteur de la β -glucosidase, est directement transformé en éthanol par la levure. En revanche, il y a un compromis à trouver puisque les températures optimales ne sont pas les mêmes pour les enzymes et pour la levure.

Dans le cas où on souhaite produire les enzymes sur site pour réduire les coûts, il faut rajouter une étape supplémentaire :

- La **production d'enzymes** met en jeu l'action de micro-organismes (par exemple *Trichoderma reesei*) pour produire des enzymes cellulolytiques à partir de sucres monomères.

1.4.2 Analyse en masse

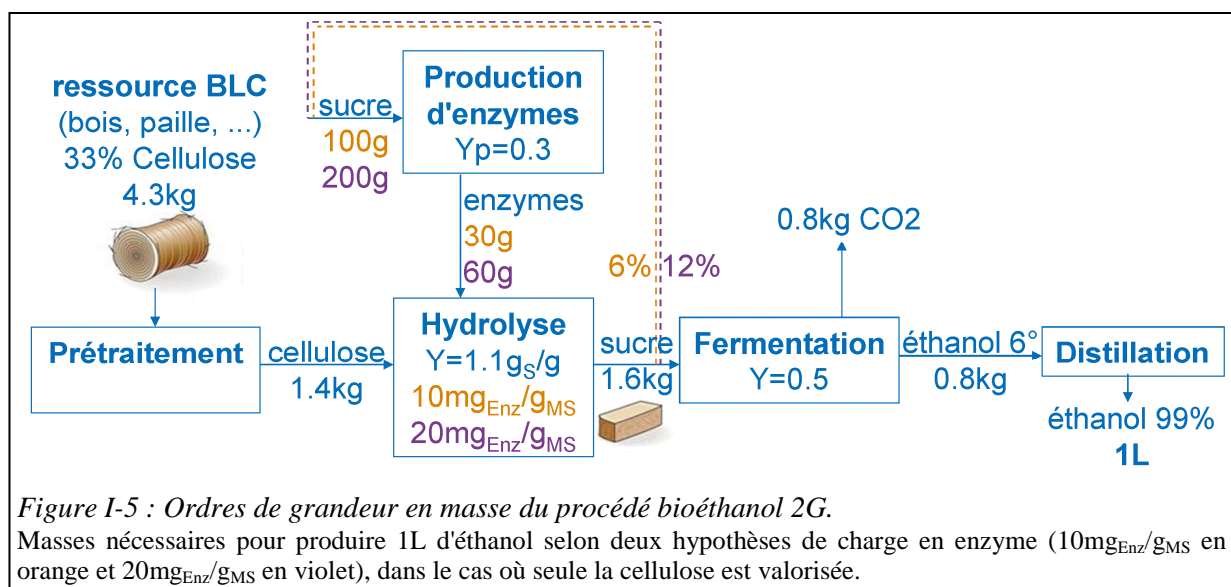
Le procédé bioéthanol 2G est présenté Figure I-5, avec une analyse en ordre de grandeur de l'étape de production d'enzyme in-situ, pour deux hypothèses de dosage en enzyme pour l'hydrolyse. Pour produire 1 L d'éthanol (790 g), on a besoin dans la chaîne principale (cas où seule la cellulose est valorisée) :

- pour la fermentation (rendement théorique 0.51), de 1.58 kg de glucose ;
- soit 1.42 kg de cellulose avant hydrolyse (rendement de $1.1 \text{ g}_{\text{Glucose}}/\text{g}_{\text{Cellulose}}$) ;
- soit en entrée, d'au minimum 4.3 kg de biomasse lignocellulosique (à 33% de cellulose).

Pour l'étape d'hydrolyse de la cellulose, on met en jeu (cas orange de la Figure I-5) environ 10mg d'enzymes par g de matière sèche (qui contient environ 50% de cellulose après hydrolyse des hémicelluloses lors du prétraitement), soit pour 1 L d'éthanol :

- 28 g d'enzymes pour l'hydrolyse.

En considérant un rendement moyen de $0.3 \text{ g}_{\text{Enz}}/\text{g}_S$ pour l'étape de production d'enzymes, le besoin en sucres en entrée est de 100 g environ, soit 6% du flux de sucre résultant de l'hydrolyse. Ce résultat est important si on souhaite utiliser le sucre issu du procédé pour produire les enzymes (boucles en pointillés sur la Figure I-5). En effet cela diminuera de 6% le rendement global en éthanol, voire de 12% pour le cas pessimiste où on utiliserait une dose d'enzyme supérieure (en violet Figure I-5).



Dans tous les cas, la masse d'enzymes nécessaire est très élevée, beaucoup plus par exemple que pour les amylases utilisées pour hydrolyser l'amidon dans les procédés de 1^{ère} génération, et ce en raison d'une part de la bien plus faible activité spécifique des cellulases comparées aux amylases, d'autre part de leurs températures d'utilisation qui favorise thermodynamiquement les amylases

(utilisées à environ 80°C contre 50°C pour les cellulases). Par exemple, le producteur d'enzymes Novozymes conseille un dosage moyen de 0.03% pour son amylase Spirizyme® Fuel HS contre 3% pour ses cellulases Cellic Ctec3 (en masse de produit brut par masse de matière sèche). En supposant que ces produits sont à des concentrations comparables, les cellulases seraient environ 100 fois moins actives que les amylases.

Le coût relatif à l'achat ou à la production in-situ des enzymes impacte donc directement et fortement le coût de production de l'éthanol dans les procédés de 2^e génération.

1.4.3 Évaluation technico-économique

Des études technico-économiques sont réalisées et régulièrement mises à jour par le NREL (National Renewable Energy Laboratory), une unité du département américain à l'énergie (DOE). Dans leur dernière étude (Kazi et al., 2010), qui concerne la production d'éthanol à partir de tiges de maïs, le coût associé à la production d'enzymes sur site est estimé à 5 \$/kg d'enzymes. Ce coût se répartit pour 2/3 dans l'investissement initial (coût des fermenteurs), et pour 1/3 dans les coûts opératoires (énergie pour l'agitation et l'aération, produits chimiques, post-traitement).

Surtout, leur analyse de sensibilité montre que les 3 principaux leviers pour diminuer le coût de production d'éthanol sont dans l'ordre : le coût de la biomasse lignocellulosique, le coût de production des enzymes, puis la teneur en enzymes lors de l'hydrolyse.

Plus récemment, une autre étude américaine calcule le prix des enzymes à environ 10 \$/kg d'enzymes (Klein-Marcuschamer et al., 2012)

Ainsi, le coût relatif aux enzymes, de l'ordre de 0.20 € par litre d'éthanol, est toujours considéré actuellement comme le verrou économique du procédé. Pour réduire ce coût, on peut jouer sur 2 facteurs indépendants :

- d'une part la teneur en enzymes lors de l'hydrolyse :
 - en améliorant le prétraitement pour faciliter l'accès des enzymes à la cellulose
 - en améliorant l'activité spécifique des enzymes
- d'autre part le coût de production des enzymes
 - en améliorant la productivité et le rendement de l'étape de production d'enzymes

Dans le cadre de cette thèse, seule sera étudiée l'étape de production d'enzymes, dans le but de réduire son coût au maximum.

1.5 Projets industriels pour le bioéthanol 2G

1.5.1 L'expérience d'IFP Energies nouvelles

IFP Energies nouvelles travaille depuis 1980 sur le développement d'un protocole industriel de production de cellulases. Ces travaux ont abouti à la sélection d'une souche hyperproductrice *T. reesei* CL847 obtenue par plusieurs étapes de mutagenèse aléatoire (Durand et al., 1988b). En parallèle, un protocole de culture en fed-batch a été défini, qui utilise du lactose comme source de carbone et inducteur de la production, ce qui est un substrat plus facile à utiliser que la cellulose, inducteur naturel mais insoluble (Pourquoi et al., 1988). Ce protocole a été validé en scale-up jusqu'à un volume de 30m³, et exploité sous licence par la société SAFISIS depuis 1989.

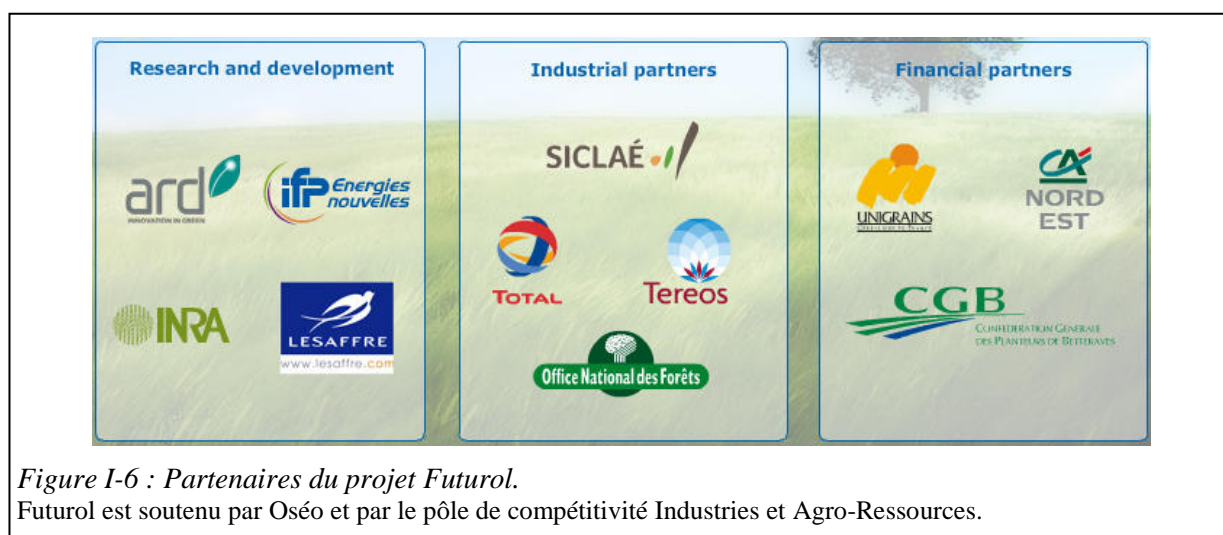
Par ailleurs, IFP Energies nouvelles a travaillé dans les mêmes années sur le procédé complet de production de biocarburants à partir de lignocellulose (avec une fermentation finale Acétone-Butanol-Ethanol), avec des expérimentations jusqu'à l'échelle pilote (Ballerini et al., 1994). Pour ceci, le protocole de production de cellulases a été adapté afin d'utiliser comme substrat les sucres industriels provenant des différentes étapes de traitement de la biomasse lignocellulosique (Warzywoda et al., 1992).

Récemment, IFP Energies nouvelles s'investit de nouveau fortement dans la production de biocarburant, avec notamment sa forte implication dans le projet Futurol. Le département Biotechnologie travaille par exemple en génétique pour l'étude du génome de *Trichoderma reesei*, en enzymologie pour la compréhension des mécanismes d'action des cellulases, et en fermentation pour l'optimisation du protocole de production.

1.5.2 Le projet Futurol

Démarré en 2008 et prévu sur 8 ans, le projet Futurol vise à développer et à mettre sur le marché un procédé, des technologies et des produits (enzymes et micro-organismes) pour assurer la production de bioéthanol de 2^e génération à partir de biomasse lignocellulosique par voie biochimique (déchets agricoles ou forestiers, ou plantes dédiées).

Soutenu par Oseo et par le pôle de compétitivité Industries et Agro-Ressources (IAR), il est doté d'un budget de 75 millions d'euros, et regroupe 11 partenaires financiers, industriels et centres de R&D (Figure I-6), associés dans la structure Procéthol 2G, qui est chargée plus particulièrement des études menées sur l'usine pilote de Pomacle-Bazancourt (Marne) depuis l'automne 2011.



1.5.3 Bioraffineries lignocellulosiques

D'une manière plus générale, on parle de bioraffinerie lignocellulosique pour désigner les futures unités de valorisation de la biomasse lignocellulosique, qui produiront non seulement de l'éthanol mais aussi d'autres produits (solvants, acides, bio-plastiques, ...), comme le font actuellement les raffineries classiques à partir de pétrole.

Quel que soit le produit final, tous les procédés biochimiques utiliseront des cellulases pour hydrolyser les polymères végétaux, donc toute amélioration du protocole de production de cellulases obtenue pour le cas de l'éthanol de 2^e génération restera valable pour d'autres produits. De plus, comme le prix de revient de l'éthanol est très faible, ce cas là est le plus contraignant pour l'optimisation de toutes les étapes du procédé.

2 Production industrielle de cellulases par *T. reesei*

2.1 Protocoles de production

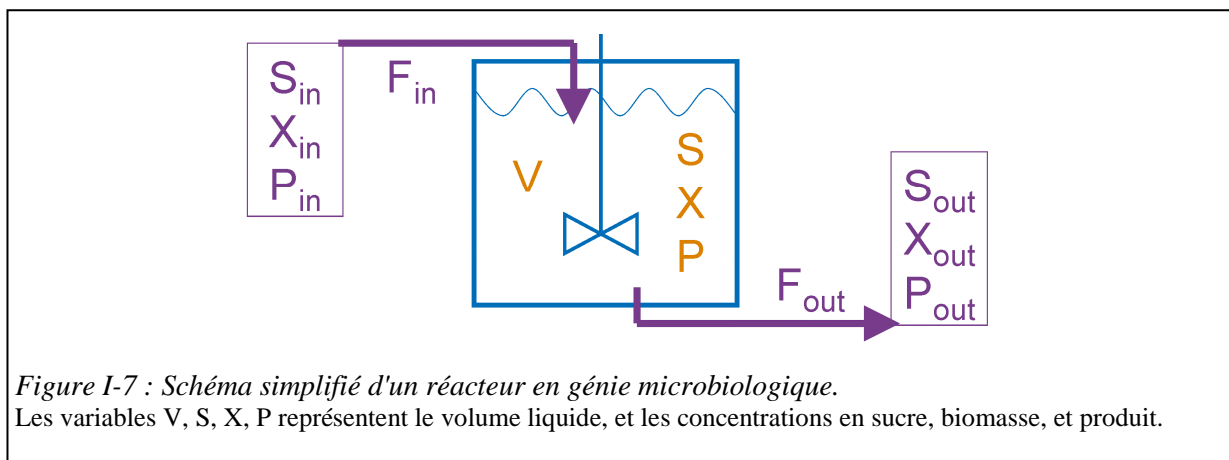
Dans toute la suite, on désignera le mode de conduite de l'étape de production d'enzymes par le terme "protocole de production", afin de bien faire la distinction avec le "procédé" de production d'éthanol de 2^e génération.

2.1.1 Schéma général

2.1.1.1 Réacteur en génie microbiologique

Le schéma général d'un réacteur en génie microbiologique est présenté Figure I-7, pour le cas d'une culture en milieu liquide. Le volume liquide V (en L) contient des cellules de microorganisme (appelées par habitude biomasse, mais à ne pas confondre avec la biomasse végétale, appelée par la suite biomasse lignocellulosique) à concentration X , du substrat à concentration S , et un produit d'intérêt à concentration P . Le réacteur peut être alimenté à débit F_{in} (en L/h) par du liquide contenant éventuellement lui aussi de la biomasse cellulaire à concentration X_{in} , du substrat à concentration S_{in} , et un produit à concentration P_{in} . De même, une partie du volume du réacteur peut être soutirée à vitesse F_{out} .

Par la suite, pour faciliter la distinction entre les différentes variables, on notera en indice le nom de la variable dans les unités : g_x pour la biomasse, g_s pour le substrat, et g_p pour le produit.



2.1.1.2 Bilans matière

A partir du schéma de réacteur ci-dessus, et en supposant qu'il est parfaitement mélangé, on peut écrire les bilans matière pour les 4 variables, sur le volume liquide total du bioréacteur (Tableau I-3), en utilisant les vitesses volumiques de consommation de substrat r_s , de création de biomasse r_x et de création de produit r_p , exprimées en $g L^{-1} h^{-1}$.

Afin d'obtenir des grandeurs qui soient caractéristiques du microorganisme étudié et pas de sa mise en œuvre, on normalise ces vitesses volumiques par la concentration de biomasse mise en jeu dans le réacteur, afin de calculer les vitesses spécifiques de création ou consommation, q_s , q_x et q_p , exprimées en $g g_x^{-1} h^{-1}$. La vitesse spécifique de création de biomasse q_x est par habitude appelée taux de croissance et notée μ .

Tableau I-3 : Principe général du bilan matière et application au schéma de réacteur.

r_S , r_X et r_P sont les vitesses volumiques de création ou consommation liées à l'activité biologique.

Principe général	Accumulation = alimentation – soutirage + (création – consommation)	Écriture en vitesses spécifiques
Volume	$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}$	
Substrat	$\frac{dSV}{dt} = F_{in}S_{in} - F_{out}S_{out} + r_S \cdot V$	$q_S = r_S / X$
Biomasse (cellules)	$\frac{dXV}{dt} = F_{in}X_{in} - F_{out}X_{out} + r_X \cdot V$	$q_X = \mu = r_X / X$
Produit	$\frac{dPV}{dt} = F_{in}P_{in} - F_{out}P_{out} + r_P \cdot V$	$q_P = r_P / X$

Dans le cas d'un réacteur aéré, on peut étendre le principe général des bilans matière à la consommation ou production d'espèces sous forme gazeuse. Il est alors parfois nécessaire de distinguer ces espèces sous forme gazeuse et sous forme dissoute dans la phase liquide.

Par ailleurs, on appelle rendement instantané le ratio d'une vitesse par une autre. Par exemple le rendement instantané de production de biomasse rapportée au substrat s'écrit : $Y_{X/S} = \frac{r_X}{r_S}$. Les rendements instantanés, qui varient dans le temps, ne doivent pas être confondus avec les rendements globaux, calculés sur la durée totale de la culture.

2.1.1.3 Modes de conduite

Les modes de conduite classiques en génie microbiologique sont :

- mode batch : pas d'alimentation ni de soutirage ($F_{in} = F_{out} = 0$),
- mode fed-batch : alimentation sans soutirage ($F_{in} \neq 0$ et $F_{out} = 0$),
- mode continu : alimentation et soutirage à même débit ($F_{in} = F_{out} \neq 0$) afin de garder un volume constant.

2.1.2 Grandeurs dimensionnantes d'un protocole de production de cellulases

2.1.2.1 Productivité

La productivité d'un protocole pour la production d'un produit d'intérêt est définie par la masse de ce produit créée par litre de réacteur et par heure (s'exprime en $g_P L^{-1} h^{-1}$). Ce paramètre donne donc le volume de réacteur et la durée d'occupation nécessaire pour produire une masse de produit donnée. Il est directement lié au nombre de réacteurs à intégrer dans une bioraffinerie.

Dans le cas de la production de cellulases par *T. reesei*, en raison de la faible productivité du protocole, les études technico-économiques du NREL montrent que les 2/3 du coût de production des cellulases in-situ sont dus au coût des réacteurs (Kazi et al., 2010). Augmenter la productivité du protocole est donc le levier principal pour diminuer le coût de production des cellulases.

2.1.2.2 Rendement global

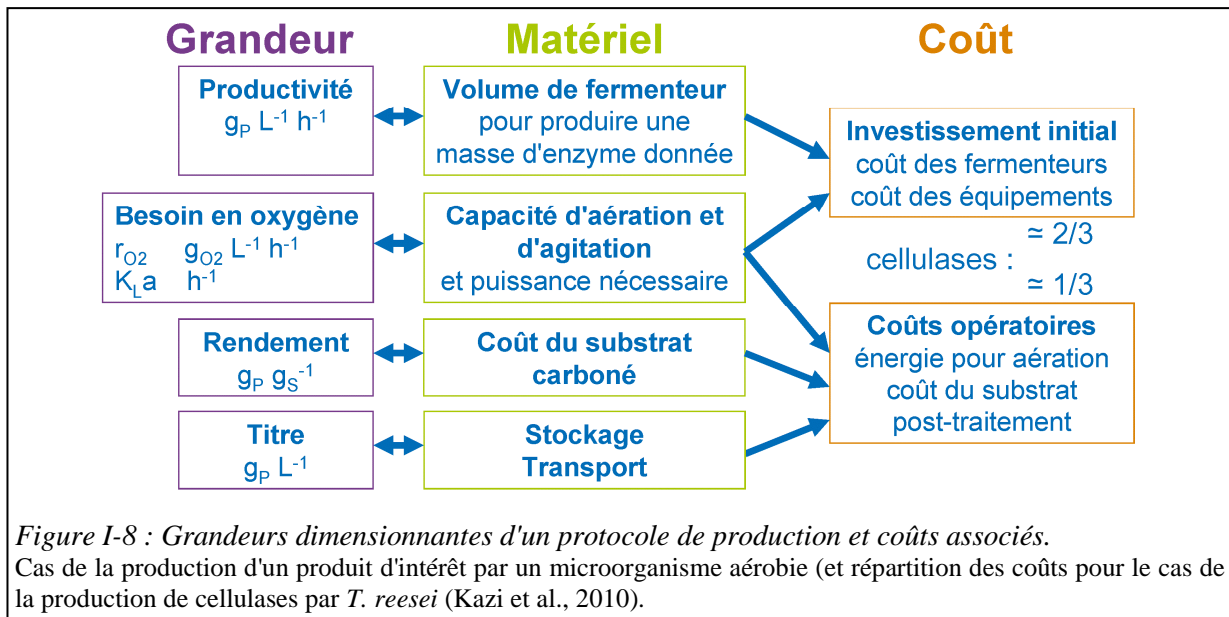
Le rendement global en produit (en g_P/g_S) est défini par le ratio entre la masse de produit récupérée sur la masse totale de substrat carboné utilisée par le microorganisme. Dans le cas présent où tout le substrat fourni est consommé par le microorganisme, le rendement est équivalent au taux de conversion, qui calcule la masse de produit rapportée à la masse de substrat fourni (qu'il ait été consommé ou non).

- I. Valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique -

Le rendement global est donc relié au coût du sucre utilisé dans le protocole de production, qui peut devenir le coût principal s'il s'agit d'un sucre purifié acheté à un fournisseur.

Dans le cas d'une production de cellulases intégrée dans une bioraffinerie lignocellulosique, le substrat carboné est un mélange de sucres industriels, issu du procédé de transformation de la biomasse lignocellulosique, donc son coût sera potentiellement plus faible. Néanmoins des traitements (concentration, détoxification) peuvent être nécessaires avant utilisation par *T. reesei*, ce qui pourrait augmenter le coût associé. Le rendement peut donc être ou non un paramètre important selon le coût du sucre utilisé comme substrat.

Par ailleurs, les autres nutriments peuvent représenter un coût important dans les procédés biologiques, par exemple l'extrait de levure pour apporter des vitamines, ou la glutamine utilisée comme source d'azote pour les cultures de cellules animales. Dans le cas de *T. reesei*, la source d'azote sous forme d'ammoniaque est peu coûteuse, et il n'y a pas de vitamines ou autres composés complexes qui ont été identifiés comme nécessaires pour la mise en culture.



2.1.2.3 Besoin en oxygène

Dans un procédé aérobic en phase liquide, le coût relatif à l'apport d'oxygène peut s'avérer très important. Il impacte d'une part les investissements initiaux (capacité des moteurs et des compresseurs) et les coûts opératoires (énergie nécessaire à l'agitation et à l'aération).

La vitesse de consommation d'oxygène r_{O_2} (en $g_{O_2} L^{-1} h^{-1}$) correspond au besoin en oxygène du micro-organisme pour le protocole étudié. Pour fournir cet oxygène, de l'oxygène doit être transféré de la phase gazeuse à la phase liquide. Ce transfert est caractérisé par le coefficient de transfert d'oxygène $K_L a$, en h^{-1} . Le transfert d'oxygène est alors défini par la loi de Fick, et l'évolution de la concentration en oxygène dissous s'écrit (avec consommation d'oxygène selon une vitesse notée r_{O_2}) :

$$\frac{d[O_{2dissous}]}{dt} \cdot V = K_L a \cdot ([O_{2dissous}^{saturation}] - [O_{2dissous}]) \cdot V - r_{O_2} \cdot V$$

En général, l'agitation est réglée de manière à maintenir une concentration en oxygène dissous non nulle, exprimée en pourcentage de la saturation.

Le coefficient de transfert d'oxygène $K_L a$ d'un réacteur est un paramètre clé, mais dépend de nombreux paramètres : puissance dissipée par l'agitation, viscosité du milieu, flux de gaz dans le réacteur, etc. Pour le cas de *T. reesei*, cet aspect a été étudié en détail dans la thèse de Jean-Christophe Gabelle, réalisée en parallèle de celle-ci (Gabelle, 2012).

2.1.2.4 Titre final en protéines

Le titre final d'un produit est très souvent un paramètre clé dans les procédés biologiques. Par exemple, le coût associé à la distillation de l'éthanol est d'autant plus faible que le titre alcoolique est élevé après la fermentation.

Cependant, dans le cas d'une production de cellulases intégrée dans une bioraffinerie lignocellulosique, il n'y a pas de contraintes de transport qui oblige à concentrer les enzymes produites, donc ce critère n'est pas primordial. Cependant, trois critères peuvent imposer un fort titre en protéines : d'une part si on ne dispose pas d'une capacité de stockage suffisante, d'autre part si l'ajout des enzymes entraîne une dilution trop forte du milieu d'hydrolyse, enfin si la gestion de l'eau (recyclages, traitement des effluents) impose de réduire la quantité d'eau utilisée.

Par exemple, dans le cas d'une hydrolyse à 20%MS avec un dosage en enzyme de 10mg_p/g_{MS}, l'utilisation d'une solution enzymatique à 20 g_p/L entraîne une dilution de 10% du milieu de l'hydrolyse. Et encore, cette "dilution" n'a pas lieu si le substrat en sortie de prétraitement est à une teneur massique supérieure à 20%MS donc si un apport de liquide est de toute façon nécessaire pour l'hydrolyse.

Le titre final en protéines n'est donc *a priori* pas un paramètre primordial pour le choix du protocole de production, dans la mesure où il atteint des niveaux ne nécessitant pas une concentration post-fermentaire.

2.1.3 Historique des protocoles de production de cellulases

2.1.3.1 Aspects communs

A l'état naturel, le microorganisme sécrète des cellulases pour digérer la cellulose en glucose, utilisé comme source d'énergie et de carbone. La production de cellulases a lieu en temps normal à un niveau très faible, et est très fortement augmentée en présence de cellulose. La cellulose étant insoluble, cette induction s'effectue par l'intermédiaire de composés inducteurs assimilables, en général des oligomères de sucres provenant de la digestion de la cellulose. Cependant, en présence de glucose, le mécanisme de répression catabolique bloque totalement la synthèse des cellulases pour favoriser la croissance (Suto and Tomita, 2001).

Dans les souches industrielles actuelles, la répression catabolique de la machinerie cellulaire de production de cellulases a été supprimée, mais la production réelle de cellulases reste très faible tant que des sucres simples sont présents. Une production maximale de cellulases nécessite donc 2 facteurs : la présence d'un inducteur et une limitation en sucres simples.

Bien que la fermentation sur substrat solide soit également possible (Singhanian et al., 2010), la majorité des procédés industriels de production de cellulases sont des fermentations en milieu liquide, qui permettent un suivi, une extrapolation et un contrôle plus facile, et qui sont classiquement utilisées pour la production d'enzymes, d'anticorps ou d'antibiotiques. Le milieu de culture contient une source de carbone inductrice de la production, des nutriments sous forme ionique (potassium, sodium, ammonium, nitrate, phosphate, sulfate, calcium, magnésium, ...) (Gaunt et al., 1984), éventuellement des nutriments complexes sous forme d'extrait de levure ou de cornsteep, et un surfactant pour limiter la formation de mousse.

T. reesei étant un champignon aérobic strict, il est impératif d'aérer et d'agiter en continu le fermenteur pour fournir l'oxygène nécessaire à son métabolisme, ce qui représente une part importante des coûts opératoires. Pour éviter les contaminations, il est nécessaire de stériliser le fermenteur, le milieu de culture et les milieux d'alimentation, et de filtrer l'air injecté.

La majeure partie du travail de mise au point des protocoles de production de cellulases a eu lieu entre les années 1977 et 1987, avec une grosse concurrence entre les laboratoires, à peu près la même chronologie d'étude, et des conclusions semblables (Philippidis, 1994). Les différents travaux réalisés à IFP Energies nouvelles sont typiques des recherches sur le sujet et ont été résumés par (Pourquoié et al., 1988).

2.1.3.2 Protocole batch

Dans un premier temps, le protocole batch a été investigué car c'est le protocole le plus facile à mettre en œuvre : tous les substrats et nutriments sont fournis dès le début. Le substrat testé initialement a été la cellulose, substrat naturel de *T. reesei*, sous plusieurs formes possibles : cellulose purifiée (Whatman CC41 ou Solka Floc), pulpe papetière, paille de blé, copeaux de bois, coton, etc. Avec ce protocole, IFP Energies nouvelles a obtenu une concentration finale en protéines de 22 g/L, avec une productivité de $0.16 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sur cellulose purifiée, et 13.6 g_P/L avec une productivité de $0.10 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ sur pulpe de rayonne (Pourquié et al., 1988). Cependant ce protocole n'était pas adapté à une échelle industrielle car les fortes concentrations initiales de cellulose donnent un milieu très visqueux, ce qui entraîne de gros problèmes pour le mélange et l'aération du réacteur.

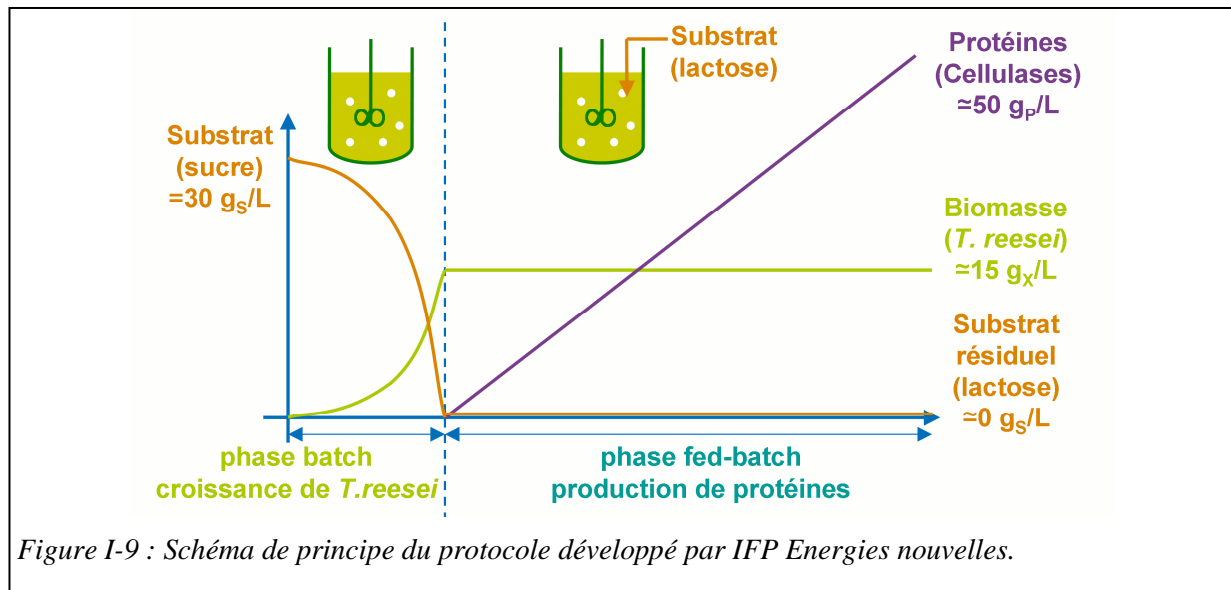
2.1.3.3 Protocole fed-batch

Pour résoudre ce problème de viscosité, plusieurs laboratoires ont proposé d'ajouter la cellulose progressivement au cours de la fermentation, soit un protocole de type fed-batch (alimentation sans soutirage). Avec ce protocole, Hendy et al. rapportent un titre final de 22.4 IU/mL avec une productivité globale de $133 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (environ $0.2 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour une activité spécifique de 0.67 IU/mg_P) sur cellulose purifiée Solka Floc (Hendy et al., 1984). Watson et al. rapportent un titre final de 57 IU/mL, avec une productivité globale de $201 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (soit environ $0.3 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) sur de la cellulose issue de bois de feuillu (Watson et al., 1984). Cependant, ce protocole n'est toujours pas facilement transposable à grande échelle, en raison de la difficulté à apporter de la cellulose insoluble en continu dans le réacteur, et de la difficulté à stériliser ce substrat (les fermentations citées ci-dessus ont été réalisées dans 14 L et 20 L respectivement).

Parallèlement, on s'est aperçu que le lactose, un sucre simple (dimère de glucose et de galactose) présent naturellement dans le lait, est un inducteur de la production de cellulases chez *T. reesei*. Cependant, son utilisation en protocole batch conduit à des résultats moins bons que sur cellulose, avec un titre final de 10 g_P/L contre 22 g_P/L, à cause de la répression catabolique (Pourquié et al., 1988). En effet sur cellulose, le sucre est libéré petit à petit par l'action des cellulases, donc il n'y a pas de répression de la production de cellulases par les sucres simples, comme c'est le cas pour le lactose.

Le lactose a donc été testé comme substrat en protocole fed-batch. Premiers à proposer la méthode, Allen et Andreotti obtiennent une productivité de $100 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (environ $0.15 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) (Allen and Andreotti, 1982). A IFP Energies nouvelles, les études ont montré tout d'abord qu'il est important de maintenir une concentration résiduelle nulle en lactose dans le réacteur, ce qui permet de ne plus utiliser du tout d'inducteur cellulosique au départ. Puis, le protocole a été séparé en 2 phases : une première phase de croissance sans limitation, puis, quand le sucre initial est consommé, une phase de production en fed-batch, avec alimentation par une solution de lactose concentré (Figure I-9).

Le scale-up à 3 m^3 a permis d'obtenir 32 g_P/L de protéines, avec une productivité globale de $0.23 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Pourquié et al., 1988). Ce protocole en deux étapes a ensuite été exploité sous licence par Safisis et le scale-up à 30 m^3 a donné des résultats équivalents. Industriellement, d'après les brevets qu'ils ont déposés, il semble que le même type de protocole soit utilisé par Iogen (Edwards et al., 2009) et par Novozymes (Smith and Coward-Kelly, 2008).



2.1.3.4 Protocole continu

Dans le même temps, plusieurs laboratoires ont testé le protocole de production en continu (soutirage au même débit que l'alimentation), connu pour optimiser la productivité, et système classique pour l'étude du métabolisme d'un micro-organisme. En effet on peut montrer que le système tend vers un état stationnaire dans lequel toutes les vitesses et concentrations sont constantes. En particulier le taux de croissance μ est égal au taux de dilution $D=F_{in}/V$ imposé par le protocole.

(Allen and Andreotti, 1982) caractérisent le métabolisme de la souche pour des taux de dilution compris entre 0.02 et 0.07 h^{-1} , puis, avec une solution d'alimentation de lactose à 50 g/L , obtiennent une productivité de $0.3 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour un taux de dilution de 0.028 h^{-1} . Les meilleures productivités en continu, et globalement tous protocoles confondus, ont été publiées en 1988. Dans un réacteur de 20 L , à un taux de dilution de 0.018 h^{-1} et avec une solution d'alimentation à 180 g/L , Nicholson et al. obtiennent un titre de $40 \text{ g}_P/\text{L}$ de protéines, soit une productivité de $0,7 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Nicholson et al., 1989, cité par Tolan and Foody, 1999). Cependant leur protocole n'est pas extrapolable à grande échelle en raison de la forte densité cellulaire et du fort besoin en oxygène. A IFP Energies nouvelles, Dalal teste le protocole en continu dans sa thèse (Dalal, 1989), mais ses travaux visent l'étude du métabolisme de la souche et non la performance.

2.1.3.5 Bilan

Les records de titre et de productivité obtenus dans les années 1980 n'ont pas été dépassés depuis. En fed-batch, il semble qu'une productivité de l'ordre de $0.25 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ soit un maximum commun à plusieurs laboratoires. Vu le travail considérable effectué dans ces années, certaines publications récentes sont surprenantes de naïveté. Par exemple en 2008 Ahamed and Vermette testent 4 milieux de production et annoncent avoir atteint une productivité record de $70 \text{ IU L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Ahamed and Vermette, 2008a), soit un résultat déjà atteint en 1981.

Des mises en œuvre ou des modes de conduite alternatifs ont aussi été proposés. Ahamed and Vermette proposent une co-culture de *T. reesei* et *A. niger* en fed-batch (Ahamed and Vermette, 2008b). Bailey and Tähtiharju, du VTT, proposent, en protocole continu, une stratégie de contrôle du débit d'alimentation par le suivi de la consommation de base pour la régulation du pH. Leurs résultats sont bons (Bailey and Tähtiharju, 2003) mais par forcément meilleurs qu'un protocole équivalent sans stratégie de contrôle.

Par la suite, les études ont alors plutôt porté sur l'intégration du protocole de production dans une bioraffinerie lignocellulosique.

2.2 Étude cinétique et modélisation de *T. reesei*

Afin de comprendre les limites des différents protocoles de production, il est nécessaire d'étudier précisément le métabolisme de *T. reesei* dans différentes conditions de culture, par la mesure des vitesses spécifiques de consommation et de production. Par la suite, on peut modéliser ces vitesses spécifiques par différentes expressions mathématiques, ce qui permet la réalisation de simulations des différents protocoles de production.

2.2.1 Modélisation de la croissance

La loi de Monod (1942) traduit à l'origine le ralentissement de la croissance d'un micro-organisme quand la concentration en substrat devient faible, et s'écrit $\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$, où K_s (g L^{-1}) est la constante de saturation, et μ_{\max} le taux de croissance maximum.

Elle est très souvent utilisée, avec de légères modifications pour l'appliquer par exemple à l'inhibition par un produit, ou la production d'un métabolite.

Cependant, si elle fonctionne très bien pour les bactéries, elle est peu adaptée à la modélisation de la croissance des champignons filamenteux. En effet leur mode de croissance fait que seules les cellules situées aux extrémités des mycelia participent à la croissance, contrairement aux bactéries où toutes les cellules peuvent se dupliquer. Un modèle complet de la croissance des champignons filamenteux a été développé par Jens Nielsen, et appliqué avec succès à différents champignons, à différentes étapes de leur croissance (Nielsen, 1993).

2.2.2 Modélisation de la production de métabolites

Le modèle de Luedeking-Piret (1959) est le plus classique pour l'expression de la vitesse spécifique de production d'un métabolite, puisqu'il prend en compte aussi bien les synthèses couplées à la croissance que découplées : $q_p = \alpha \cdot \mu + \beta$.

Pour la modélisation de la production de cellulases par *T. reesei*, ce modèle est utilisé tel quel par Muthuvelayudham et Tholudur dans le cas de fermentations batch sur différents substrats (Muthuvelayudham and Viruthagiri, 2006; Tholudur et al., 1999). Velkovska et al. ne conservent que la partie correspondant à une synthèse découplée de la croissance $q_p = \beta$, en ajoutant un terme modélisant la perte d'activité des enzymes, qui s'avère être nul lors de l'identification des paramètres (Velkovska et al., 1997).

Dans le cas de fermentations en protocole continu, Lo et al. ne conservent eux aussi que la partie exprimant une synthèse découplée, et y ajoute un terme de type Monod pour exprimer la limitation par le substrat (Lo et al., 2010a; Lo et al., 2010b).

Tolan et Foody ne proposent pas d'expression mathématique de la vitesse spécifique de production de protéines q_p , mais utilisent les mesures réalisées par Allen et Andreotti à différents taux de croissance (Allen and Andreotti, 1982). Ceux-ci estiment que cette vitesse est constante et maximisée pour des taux de croissance μ compris entre 0 et 60% du taux de croissance maximal μ_{\max} , puis baisse progressivement jusqu'à être nul quand le taux de croissance est maximal. Tolan et Foody appliquent cette relation pour des simulations simplifiées de cultures en batch, fed-batch ou continu (Tolan and Foody, 1999).

Les mesures réalisées par Pakula et al. montrent un profil légèrement différent, avec un changement brutal de régime : ils observent un taux de croissance limite (environ $\mu_{\max}/2$) en dessous duquel la vitesse spécifique de production de protéines q_p est effectivement constante et maximum, mais au-dessus duquel elle est toujours constante mais faible (Pakula et al., 2005).

Aucune modélisation n'a été proposée dans le cas de fermentations en fed-batch, et les taux de croissance testés en fermentation continue sont toujours plus élevés que ceux observés en fed-batch. En effet les études en chemostat ont toujours été réalisées à des taux de dilution supérieurs à 0.02 h^{-1}

car sinon la durée nécessaire pour obtenir un état stationnaire serait trop élevée (250 h pour 0.02 h^{-1} , 500 h pour 0.01 h^{-1}), alors que les taux de croissance observés dans le cas du protocole fed-batch sont justement compris entre 0 et 0.02 h^{-1} .

2.2.3 Modélisation de la consommation du substrat

En 1965, pour expliquer la différence de rendement observée à différents taux de croissance, Pirt introduit la notion de maintenance, et propose la loi suivante pour séparer fictivement le substrat consommé pour la croissance (et proportionnel à la croissance) du substrat consommé pour la maintenance de la cellule (et constant) : $q_s = \frac{\mu}{Y_x^o} + m$. La notation Y_x^o indique qu'il s'agit d'un rendement théorique limite, constant, à bien différencier du rendement apparent $Y_{x/s} = \mu/q_s$.

Pour la modélisation de la production de cellulases par *T. reesei*, Bader et al. ne tiennent pas compte de la maintenance, et utilisent une forme très simplifiée, avec le rendement apparent :

$$q_s = \frac{\mu}{Y_x} \text{ (Bader et al., 1993).}$$

La loi de Pirt est utilisée telle quelle par Lo et Pakula (Lo et al., 2010a; Pakula et al., 2005), sans prendre en compte la part de substrat utilisée pour la production de protéines. Celle-ci est alors assimilée à une maintenance.

Pour prendre en compte la production de protéines, Tolan et Foody modifient la loi de Pirt pour y ajouter le q_p , sur le même modèle que pour la croissance, mais négligent la part de substrat utilisée pour la maintenance (Tolan and Foody, 1999) : $q_s = \frac{\mu}{Y_x^o} + \frac{q_p}{Y_p^o}$.

Muthvelayudham et al. utilisent la forme globale, qui sépare donc fictivement la consommation de substrat en 3 parties : pour la croissance, pour la production de protéines, et pour la maintenance :

$$q_s = \frac{\mu}{Y_x^o} + \frac{q_p}{Y_p^o} + m \text{ (Muthvelayudham and Viruthagiri, 2007).}$$

2.3 Choix du substrat

2.3.1 Intégration de la production au procédé bioéthanol 2G

Afin de minimiser les coûts, l'étape de production d'enzymes devra à terme s'intégrer in-situ dans une bioraffinerie lignocellulosique. On pourra alors utiliser comme substrat des sucres issus de l'hydrolyse de la biomasse lignocellulosique, ce qui sera probablement moins coûteux que si on devait acheter le substrat à un fournisseur.

2.3.1.1 Teneur en sucres

La composition des hydrolysats sucrés disponibles dans une bioraffinerie va dépendre en premier lieu de la biomasse lignocellulosique utilisée en entrée du procédé. Le Tableau I-4 donne les compositions moyennes en sucres potentiels (sous forme de polysaccharides) pour 5 types de biomasse brute, calculées à partir de la base de données du département américain à l'énergie (US DOE, 2012). Le glucose représente la majeure partie des sucres potentiels, mais on va chercher à optimiser le procédé pour maximiser sa transformation en éthanol car c'est le substrat préférentiel des levures utilisées en fermentation. Les teneurs en arabinose et galactose sont assez faibles dans toutes les biomasses. En revanche le mannose remplace majoritairement le xylose dans les conifères.

Tableau I-4: Compositions moyennes en sucres potentiels de 5 biomasses brutes.

Données moyennes du département américain à l'énergie (US DOE, 2012), exprimées en pourcentage des sucres potentiels totaux (total 100%).

	paille de blé	peuplier	eucalyptus	switchgrass	pin
glucane	59 %	64 %	76 %	56 %	67 %
xylane	35 %	29 %	20 %	37 %	9.7 %
arabinane	4.3 %	1.2 %	0.7 %	4.7 %	2.4 %
mannane	0.6 %	6.0 %	1.6 %	0.7 %	17 %
galactane	1.3 %	0.3 %	1.6 %	1.7 %	3.9 %

Comme indiqué au paragraphe I.2.1.3.3 (page 40), l'utilisation de sucres sous forme polymère insoluble (biomasse prétraitée) n'est pas adaptée à la production de cellulases, car ils induisent une forte viscosité du milieu et sont peu pompables donc difficiles à apporter en continu de manière stérile pour réaliser un fed-batch ou un continu. De plus, les cellulases s'adsorbent facilement sur les résidus solides, donc seraient perdues en cas de filtration finale de la culture. Ainsi seuls les flux contenant des sucres solubles, sont facilement valorisables pour la production de cellulases

Au long du procédé de transformation de la biomasse lignocellulosique, plusieurs flux de sucres solubles sont disponibles (Figure I-10). Ils sont légèrement différents suivant le schéma global du procédé : avec (en violet) ou sans (en orange) séparation solide/liquide après prétraitement.

En effet, durant l'étape de prétraitement, la majorité des hémicelluloses sont hydrolysées chimiquement car plus fragiles que la cellulose. Ces hydrolysats liquides contiennent majoritairement des pentoses (C5) libres mais aussi du mannose, un peu de glucose, et éventuellement des oligosaccharides. Ils peuvent être séparés du résidu solide contenant la cellulose (cas violet) ou envoyés à l'étape d'hydrolyse avec la cellulose (cas orange).

Ainsi, à l'issue de l'hydrolyse enzymatique, on obtient un hydrolysats qui contient soit uniquement du glucose (cas avec séparation, en violet), soit un mélange d'hexoses (C6) et de pentoses (cas sans séparation, en orange). Comme évoqué précédemment Figure I-5, une partie de ce flux, de l'ordre de 5% à 10%, peut être prélevée pour fournir le substrat nécessaire à la production d'enzymes.

Enfin, après distillation, les vinasses contiennent la lignine et les sucres qui n'ont pas été fermentés en éthanol, qui seront donc différents suivant la composition de l'hydrolysats et suivant la levure utilisée pour la fermentation.

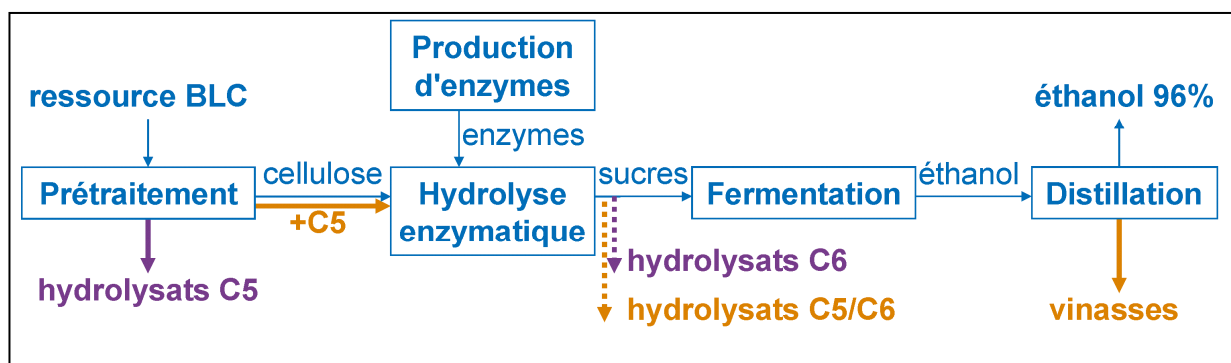


Figure I-10 : Flux de sucre disponibles dans une unité bioéthanol 2G.

2 schémas de procédé sont présentés: avec séparation des hydrolysats d'hémicellulose (violet) ou sans (orange).
hydrolysats C5 = hydrolysats chimique contenant majoritairement le pentose xylose mais aussi d'autres monomères issus des hémicelluloses.

hydrolysats C6 = hydrolysats enzymatique contenant majoritairement l'hexose glucose issu de la cellulose.

hydrolysats C5/C6 = mélange d'hexoses et de pentoses provenant de l'hydrolyse chimique des hémicelluloses et enzymatique de la cellulose.

Le Tableau I-5 présente les compositions moyennes théoriques pour les trois types d'hydrolysats de biomasse lignocellulosique. Cependant, ces hydrolysats ne contiennent a priori pas de composés inducteurs de la production de cellulases. Pour une utilisation comme substrat pour *T. reesei*, on devra les mélanger avec un inducteur, par exemple du lactose, ce qui modifiera leur composition relative.

Tableau I-5 : Composition moyenne théorique des hydrolysats disponibles dans une bioraffinerie lignocellulosique.

Valeurs calculées à partir des données moyennes du Tableau I-4 (avec cas particulier des conifères entre parenthèses), et exprimées en pourcentage des sucres totaux présents (total 100%).

	cas sans séparation	cas avec séparation	
	hydrolysats C5/C6	hydrolysats C5	hydrolysats C6
glucose	55%-75%	10%-20%	90%-100%
xylose	20%-35% (10%)	70%-85% (30%)	0%-10%
arabinose	0%-4%	0%-10%	0%
mannose	0%-6% (17%)	0%-15% (50%)	0% (0%-10%)
galactose	0%-2% (4%)	0%-6% (11%)	0%

Au delà de la teneur relative en sucres, la concentration totale en sucres dans les hydrolysats disponibles est un facteur important qui peut orienter le choix du protocole de production. En général les opérations de prétraitement ou d'hydrolyse sont réalisées avec des teneurs en matières sèches entre 10 % et 20 %. Donc en supposant que la biomasse contient en masse environ 50 % de sucres potentiels, la concentration moyenne des hydrolysats sera de l'ordre de 50 à 100 g_s/L, alors que le protocole classique d'IFP Energies nouvelles pour la production de cellulases utilise des solutions de fed-batch concentrées à 250 g_s/L. Il sera donc nécessaire soit de concentrer les hydrolysats disponibles par évaporation, soit d'étudier l'impact de l'utilisation de telles solutions diluées sur l'efficacité du protocole de production de cellulases.

2.3.1.2 Composés potentiellement inhibiteurs

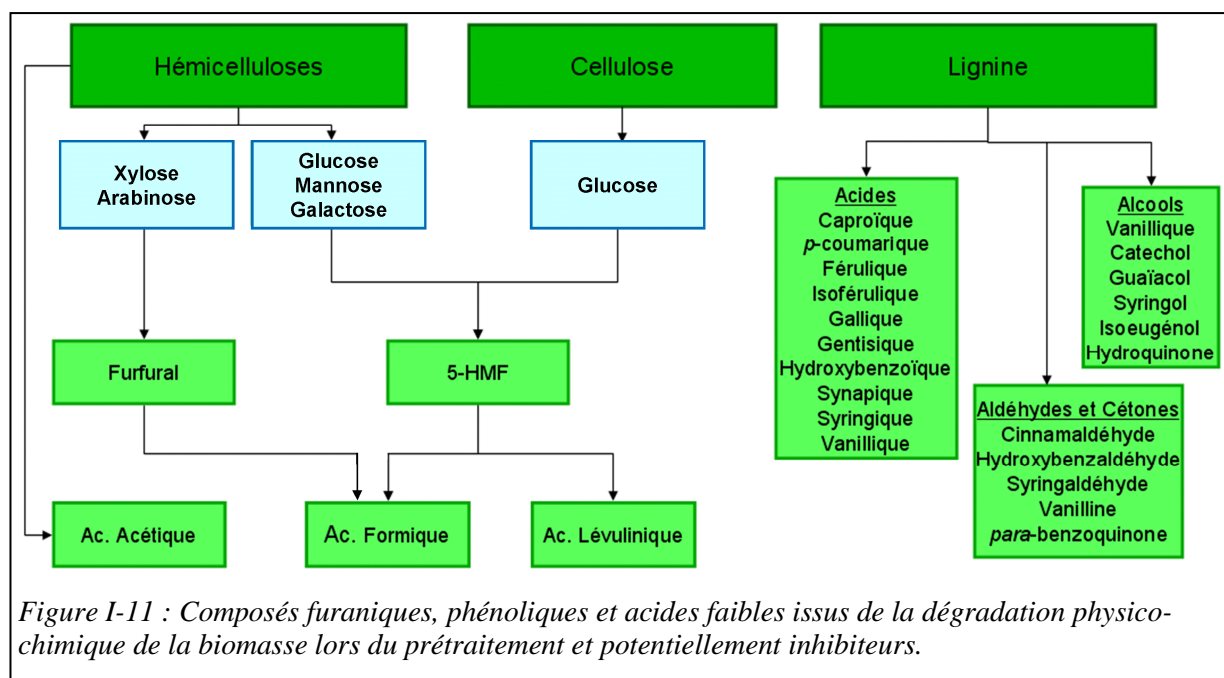
a Nature

Les hydrolysats décrits précédemment contiennent aussi d'autres composés issus de la dégradation physico-chimique de la biomasse lignocellulosique, et qui sont potentiellement inhibiteurs pour l'hydrolyse enzymatique, ainsi que pour les micro-organismes mis en œuvre comme *Trichoderma reesei* ou *Saccharomyces cerevisiae* (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000a; Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000b).

Ces composés, présentés Figure I-11, sont de 3 familles différentes:

- les composés furaniques (Furfural et 5-HMF) proviennent de la dégradation des sucres ;
- les acides faibles proviennent :
 - de l'hydrolyse des résidus acétyl présents sur les hémicelluloses pour l'acide acétique ;
 - de la dégradation des composés furaniques pour les acides formique et lévulinique ;
- les composés phénoliques et associés proviennent de l'hydrolyse et de la dégradation de la lignine, et peuvent être classés en 3 familles :
 - soit selon leurs fonctions chimiques: alcools, aldéhydes ou cétones, acides ;
 - soit selon leur structure et le nombre de méthylations du noyau aromatique: hydroxyphényl (pas de O-méthylation), guaiacyl (1) ou syringyl (2).

- I. Valorisation enzymatique de la biomasse lignocellulosique -



Les concentrations de chacun de ces composés dans les hydrolysats disponibles dans une bioraffinerie sont très variables selon la biomasse, le type de prétraitement et sa sévérité, et la charge en matière sèche lors du prétraitement. De plus leur dosage à faible concentration dans une matrice complexe est une tâche difficile. Les données bibliographiques sur les concentrations attendues dans une bioraffinerie sont donc peu nombreuses et synthétisées dans le Tableau I-6 (Almeida et al., 2007; Alriksson et al., 2011; Larsson et al., 1999).

Tableau I-6 : Concentrations en composés potentiellement inhibiteurs dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique.

Synthèse des données de (Almeida et al., 2007; Alriksson et al., 2011; Larsson et al., 1999).

	Teneur minimale	Teneur moyenne	Teneur maximale
Composés phénoliques	concentration (mg/L)		
Vanilline	120	250	430
Acide <i>para</i> -coumarique	22	140	370
Syringaldéhyde	38	68	107
Guaïacol	20	30	45
Acide <i>para</i> -hydroxybenzoïque	4	20	40
<i>para</i> -hydroxybenzaldéhyde	21	68	150
Acide syringique	22	30	40
Acide vanillique	34	100	200
<i>para</i> -benzoquinone		30	
acide férulique			
acide isoférulique			
hydroquinone	13	21	35
Acides faibles et dérivés furaniques	concentration (mg/L)		
5-Hydroxyméthylfurfural (5HMF)	140	300	540
Furfural	120	300	540
Acide formique	420	400	840
Acide acétique	4500	5500	7000
Acide lévulinique	150	550	920

b Mécanismes d'inhibition

L'hypothèse majoritairement admise pour l'effet des acides faibles est que la forme protonée neutre peut traverser la membrane des cellules par diffusion libre et s'accumuler dans le cytoplasme, où elle se dissocie à nouveau, entraînant une libération de protons (Herrero et al., 1985). L'effet d'un acide faible va donc dépendre d'une part du pH de la culture par rapport à son pKa, et d'autre part de son encombrement stérique.

La toxicité des composés phénoliques est directement due à la présence de groupements benzènes, et va varier en fonction des différents groupements fonctionnels, avec une action toxique qui serait plus importante pour les composés de faible poids moléculaire. Ils agiraient en perturbant l'intégrité des membranes (Heipieper et al., 1994).

Les principaux inhibiteurs et leurs mécanismes d'action ont été résumés pour le cas de la fermentation des hydrolysats cellulosiques par (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000b). Concernant *T. reesei*, une seule étude a été réalisée pour les effets de l'acide acétique et du furfural (Szengyel and Zacchi, 2000), mais le seul critère étudié était la production d'enzymes en fioles, et pas la croissance de la biomasse, donc cette étude n'est pas généralisable. Les auteurs notent cependant une consommation de l'acide acétique, et une oxydation du furfural en acide furoïque.

2.3.2 Expérience de l'utilisation des substrats industriels

Comme expliqué précédemment (I.2.1.3.2, page 40), historiquement la production de cellulases a été d'abord réalisée sur des substrats "réels" pour bénéficier de l'induction par la cellulose et ses dérivés, qui contenaient probablement plusieurs sucres différents ainsi que des composés inhibiteurs. De plus ces composés sont aussi présents dans les substrats traditionnels rencontrés par *Trichoderma reesei* dans la nature. On peut donc espérer que les souches hyperproductrices obtenues au laboratoire à partir de souches naturelles soient encore capables de consommer différentes sources de sucre et de lutter contre les inhibiteurs.

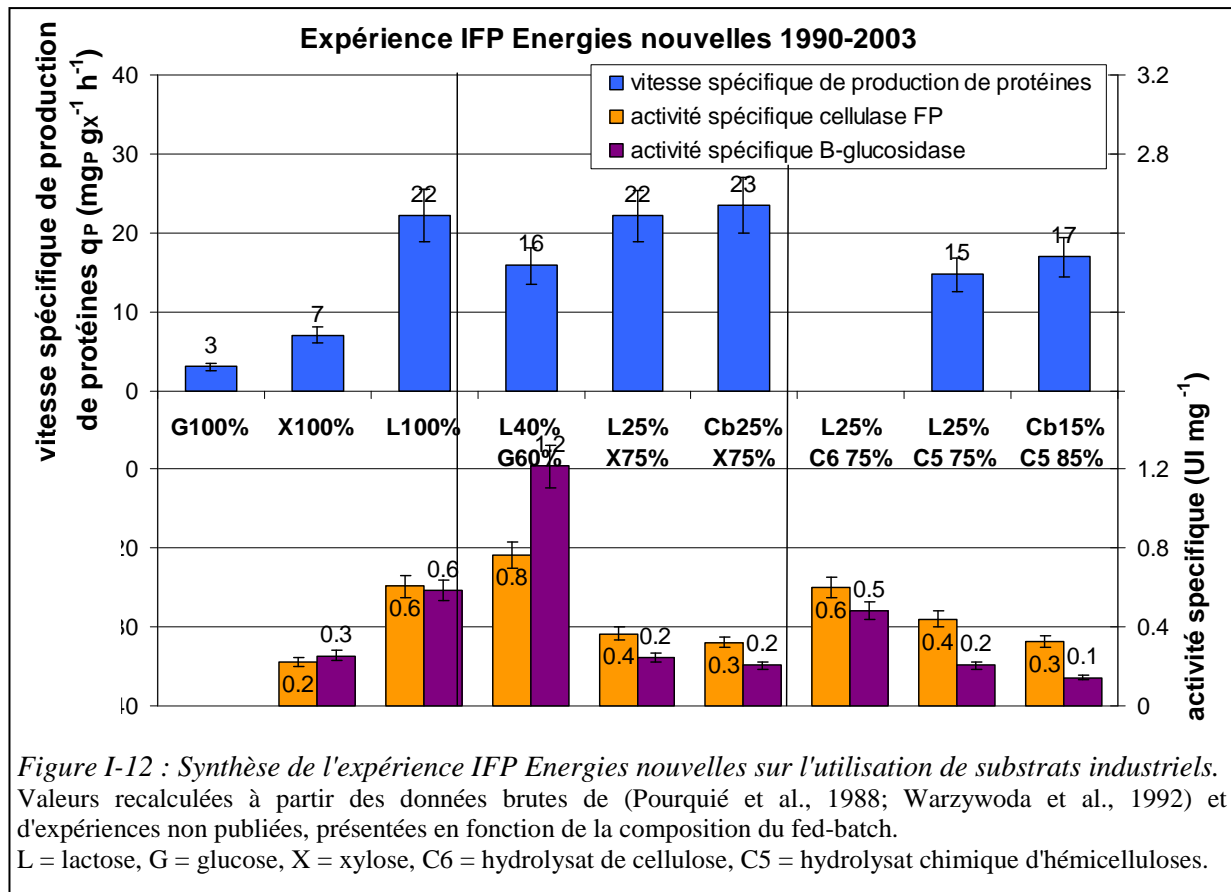
C'est seulement par la suite, pour augmenter la productivité et le rendement, et faciliter l'extrapolation, qu'a été développé le protocole sur lactose soluble avec limitation par le substrat (conduite en fed-batch ou en continu). Comme le mode batch ne permet pas d'atteindre des productivités suffisantes pour l'industrialisation, la littérature abondante sur l'utilisation de substrats réels avec ce protocole ne sera pas détaillée, et seuls les essais de production en mode fed-batch ou continu utilisant des hydrolysats réels solubles seront présentés ici.

Dès 1988, IFP Energies nouvelles montre, avec la souche CL847, que le lactose de l'alimentation fed-batch peut être remplacé en partie par du glucose, jusqu'à 60%, sans perte de productivité (Pourquié et al., 1988). Puis, qu'il peut être remplacé jusqu'à 75% environ par du xylose ou par des substrats industriels issus du procédé de transformation de la biomasse lignocellulosique (hydrolysats C5 issus du prétraitement ou hydrolysats C6 issus de l'hydrolyse enzymatique, voir I.2.3.1.1, page 43) tout en conservant une bonne productivité et une bonne activité enzymatique (Warzywoda et al., 1992).

La Figure I-12 présente un résumé de l'expérience d'IFP Energies nouvelles sur le sujet, réalisé à partir des données utilisées pour ces deux publications, ainsi que d'autres expériences non publiées.

On note que :

- le glucose pur ou le xylose pur en fed-batch n'induisent pas la production de cellulases ;
- le cellobiose et le lactose donnent une induction équivalente ;
- ces inducteurs peuvent être remplacés jusqu'à 75% environ sans perte de productivité :
 - par du glucose pur ou du xylose pur,
 - par des substrats réels : hydrolysats C5 ou hydrolysats C6/C5 ;
- en revanche, les activités spécifiques cellulase FP et β -glucosidase sont:
 - plus faibles quand le substrat utilisé contient du xylose (pur ou dans des hydrolysats)
 - plus élevées dans le cas d'un mélange de lactose et de glucose purs.



Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans le brevet déposé en 2007 par la société IOGEN qui revendique l'utilisation de sucres inducteurs des cellulases en faible proportion dans un mélange de sucres issus d'hémicellulose (Edwards et al., 2009). Leurs exemples, aussi bien en fed-batch qu'en continu à 0.025 h⁻¹, montrent que le xylose pur ou l'arabinose pur ne sont pas inducteurs, mais l'induction peut être rétablie en ajoutant soit 10% de cellobiose, soit 5% d'un cocktail d'inducteurs contenant notamment du gentiobiose et du sophorose.

En 2006, IFP Energies nouvelles a déposé un brevet sur l'utilisation de la fraction liquide des vinasses comme substrat pour la production d'enzymes (Warzywoda et al., 2006). En 2009, Lo et al. proposent l'utilisation d'un hydrolysate préparé spécialement pour conserver de nombreux oligosaccharides (Lo et al., 2010a).

Il est d'ailleurs intéressant de noter que certaines expériences comme cette dernière ou d'autres réalisées à IFP Energies nouvelles avec des hydrolysats réels sans ajout de lactose ont quand même permis d'induire la production de cellulases, au contraire de solutions synthétiques de glucose ou xylose. Mais l'induction varie fortement d'un hydrolysate à l'autre, sans qu'on ait pu établir de lien avec sa composition. Dans le cas d'hydrolysats C6, l'induction peut s'expliquer par la présence de cellobiose, voire d'oligosaccharides dérivés de la cellulose. Mais dans le cas des hydrolysats C5, il n'y a pas aujourd'hui de connaissance précise des composés présents qui pourraient engendrer l'induction observée.

2.3.3 Investigation d'autres composés inducteurs

Dans les années 50, Mandels et Reese pensaient que *T. reesei* produisait des cellulases quand il était cultivé même sur glucose seul, mais en réalité l'induction était due à des traces (0.006%) de sophorose (dimère de glucose en β,1-2) dans le glucose utilisé (Mandels et al., 1962). Ces impuretés ont été identifiées quand les cultures sur glucose ont cessé de produire des cellulases. Il s'agissait en réalité d'un changement dans le procédé utilisé pour l'hydrolyse de l'amidon en glucose, avec le passage d'un procédé chimique à un procédé enzymatique qui lui ne formait plus d'impuretés. Le

sophorose est encore aujourd'hui connu pour être le meilleur inducteur des cellulases, avec un pouvoir inducteur 2500 fois supérieur au cellobiose (Mandels et al., 1962).

Dans les années 70, il a été identifié dans des hydrolysats de cellulose, avec d'autres dimères de glucose comme le gentiobiose ou le laminaribiose, et il a été montré que ces produits sont formés par l'activité annexe de transglycosylation de la β -glucosidase (Vaehri et al., 1979). En 1987, Ajisaka et al. montrent qu'il est possible d'inverser la réaction d'hydrolyse de la β -glucosidase en se plaçant à de très fortes teneurs en glucose et à forte température, ce qui a pour résultat la formation d'un mélange de dimères de glucose (Ajisaka et al., 1987). Ce résultat avait déjà été entrevu en 1981 lors de bons résultats d'induction obtenus par l'utilisation comme substrat de fed-batch d'un "synthetic reversion syrup" réalisé en incubant 500 g/L de glucose avec 200 IU/mL de β -glucosidase (Allen and Mortensen, 1981).

Pour toutes ces raisons, le sophorose a souvent été proposé comme le véritable inducteur des cellulases (Suto and Tomita, 2001) mais cela a été démenti par la suite, en particulier car son mode d'induction est différent de celui du lactose. Les mécanismes génétiques de la régulation des cellulases ne sont d'ailleurs toujours pas clairement identifiés aujourd'hui et il est probable que plusieurs circuits d'induction soient possibles, en lien avec plusieurs composés inducteurs (Stricker et al., 2008).

Le prix exorbitant du sophorose (700 €/g contre 50 à 100 €/g pour la cocaïne) fait qu'il est utilisé aujourd'hui uniquement pour des expériences de génétique nécessitant une très forte induction.

En revanche, l'idée de synthétiser des inducteurs par inversion de la réaction de la β -glucosidase a été brevetée par Genencor (England et al., 2002) suite à un projet en partenariat avec le NREL, qui prend ce schéma comme hypothèse pour sa dernière étude technico-économique (Humbird et al., 2011).

2.4 Extrapolation du protocole à l'échelle industrielle

Le transfert d'un protocole de production de l'échelle labo à l'échelle industrielle est une étape clé du développement, en raison des nombreuses contraintes dues au dimensionnement des fermenteurs industriels.

2.4.1 Consignes de conduite

2.4.1.1 Température

Le contrôle de la température est un paramètre important lors de l'extrapolation, car il est relié à la quantité d'énergie nécessaire pour le chauffage ou le refroidissement. Dans le cas d'un procédé biologique aérobie, la réaction est exothermique, avec un dégagement d'énergie classiquement estimé à 460 KJ par mole de dioxygène consommé. Dans le cas du protocole IFP Energies nouvelles, l'énergie nécessaire pour le refroidissement sera forte pendant la phase de croissance sans limitation, et plus faible pendant la phase de production en raison de la limitation carbone imposée. De plus, le refroidissement sera d'autant plus efficace que la différence de température sera grande entre le milieu de culture et le fluide utilisé pour le refroidissement, en général de l'eau à environ 20°C.

L'impact de la température de culture sur le métabolisme de *T. reesei* a été étudiée par IFP Energies nouvelles au moment de la mise au point du protocole en fed-batch sur lactose (Pourquie et al., 1988). Si la productivité n'est pas affectée par une température de 31°C, les activités cellulase FP et β -glucosidase diminuent quand la température augmente. Il a donc été décidé de ne pas dépasser une température de 27°C pendant la phase de production, ce qui ne pose pas trop de problème car le dégagement de chaleur est faible pendant cette phase.

Quant à la phase de croissance elle peut se dérouler à une température allant jusqu'à 31°C, ce qui permet un refroidissement plus efficace pendant cette phase plus exothermique.

Pour cette thèse, le profil de température initial a été conservé, avec croissance à 27°C et production à 25°C.

2.4.1.2 pH de consigne

Les champignons filamenteux tolèrent de larges plages de pH, et des pH plus faibles que tous les autres microorganismes. Ce point peut être valorisé pour éviter les contaminations à l'échelle industrielle, en choisissant un pH de culture qui inhibe les contaminants, tout en permettant un métabolisme correct pour *T. reesei*.

Le protocole IFP Energies nouvelles est réalisé à pH 4.8 pour la croissance puis à pH 4.0 pour la production. Ces valeurs sont encore un peu élevées pour lutter contre les contaminants, car elles sont tolérées par les bactéries lactiques.

2.4.2 Temps de mélange

Le temps de mélange a été étudié en détail dans la thèse de Jean-Christophe Gabelle, pour le cas de fluides visqueux représentatifs des moûts de fermentation, et a donné lieu à une publication dédiée (Gabelle et al., 2011). Parmi les principaux résultats, le temps de mélange des milieux visqueux aux faibles vitesses d'agitation est nettement diminué grâce à l'aération, qui induit plus de mouvement turbulent du fluide. Aux fortes vitesses d'agitation, le temps de mélange est plus long avec aération que sans, en raison de la perte de puissance dissipée due à l'aération.

Dans tous les cas, le temps de mélange à l'échelle industrielle est de l'ordre de la minute (pour un réacteur de 100 m³), soit du même ordre de grandeur que le temps caractéristique de transfert et consommation d'oxygène ($K_{La} \approx 60 \text{ h}^{-1} \rightarrow \tau_{O_2} \approx 1 \text{ min}$). Ceci peut entraîner des concentrations en oxygène dissous et en substrat non homogènes dans les réacteurs industriels (le substrat, injecté localement, est soumis au temps de mélange du fluide).

A l'inverse, le temps caractéristique de la croissance est de l'ordre de 1000 minutes (à $\mu = 0.06 \text{ h}^{-1}$) donc la concentration en biomasse sera homogène dans tout le volume des réacteurs industriels.

2.4.3 Transfert gaz-liquide

2.4.3.1 Concentrations en gaz dissous

Pour la mise en culture liquide de microorganismes aérobies, il est nécessaire de transférer dans la phase liquide la quantité d'oxygène nécessaire au métabolisme. Dans le cas d'un métabolisme aérobie strict (cas de *T. reesei*), le microorganisme ne risque pas de passer en métabolisme fermentaire, mais son métabolisme aérobie risque d'être ralenti si le transfert d'oxygène n'est pas suffisant pour satisfaire son besoin. Pour cela on régule en général l'aération et l'agitation du liquide pour maintenir une concentration en oxygène dissous au dessus d'une concentration critique dans le réacteur. Comme l'agitation et l'aération sont deux actions coûteuses, il convient de choisir finement la concentration en oxygène dissous critique utilisée comme consigne, afin de ne pas induire de limitation par le transfert d'oxygène.

Par ailleurs, les microorganismes aérobie stricts peuvent être sensibles à la teneur en CO₂ dissous dans la phase liquide, liée à la teneur en CO₂ dans la phase gazeuse. Pour diminuer les coûts à l'échelle industrielle, le débit d'aération est souvent plus faible qu'au laboratoire, ce qui peut augmenter la teneur en CO₂ dans la phase gaz, et inhiber le métabolisme du micro-organisme.

De plus, les fermenteurs industriels peuvent être de grande hauteur, 10 m par exemple pour un fermenteur classique de 100 m³. Il va donc y avoir une surpression dans le fluide en bas du réacteur. D'un côté cette surpression va être favorable pour le métabolisme puisqu'elle va augmenter la concentration en oxygène dissous à saturation et le transfert d'oxygène. D'un autre côté elle va être défavorable puisqu'elle va aussi augmenter la concentration en CO₂ dissous.

2.4.3.2 Transfert d'oxygène

Le coefficient de transfert d'oxygène K_{La} dans un réacteur dépend de la puissance dissipée par l'agitation, du débit de gaz imposé, ainsi que de la viscosité du fluide, comme cela a été étudié en

détail par Jean-Christophe Gabelle (Gabelle et al., 2011). Dans le cas de *T. reesei*, la viscosité induite par la nature filamenteuse du champignon a un fort effet négatif sur le transfert d'oxygène, avec un coefficient de transfert qui peut être divisé par 2 par rapport à la valeur obtenue sur de l'eau dans les mêmes conditions d'agitation et d'aération (Gabelle et al., 2012). Il ne sera donc pas possible de proposer des protocoles de production nécessitant un fort besoin en oxygène, car cela serait trop coûteux en énergie pour l'aération et l'agitation et difficile à extrapoler.

2.4.3.3 Cisaillement

La mise en mouvement du fluide par l'agitation entraîne un cisaillement du fluide qui peut s'avérer très fort localement (à proximité immédiate du mobile), et détruire les cellules de microorganisme. La mesure locale du cisaillement en fluides visqueux a été réalisée par Jean-Christophe Gabelle (Gabelle, 2012). Parmi les principaux résultats, le cisaillement maximal à proximité du mobile semble dépendre uniquement de la puissance dissipée, et pas de la forme du mobile, même quand celui-ci est réputé "peu cisailant". De plus, la plage de variation du cisaillement va être très grande entre son maximum (près du mobile) et sa valeur moyenne dans le réacteur.

Le cisaillement est donc un point difficile à appréhender pour l'extrapolation, selon que l'on regarde le cisaillement maximum (souvent appréhendé par la vitesse en bout de pale) ou le cisaillement moyen dans le réacteur, puisqu'on ne sait pas quel critère est important pour l'extrapolation. Cependant, comme le cisaillement moyen est plus faible à l'échelle industrielle qu'au laboratoire, il suffit de valider le critère du cisaillement maximum pour que le procédé développé au laboratoire soit extrapolable à l'échelle industrielle. Ceci peut se faire au laboratoire en utilisant de très fortes vitesses de rotations, donnant des vitesses en bout de pale comparables à celles obtenues à l'échelle industrielle.

3 Enjeux du sujet de recherche

Les enzymes cellulolytiques représentent un coût important dans les procédés de transformation enzymatique de la biomasse lignocellulosique, par exemple pour la production d'éthanol biocarburant. Pour développer des procédés viables économiquement, il est nécessaire, entre autres, d'optimiser au maximum l'étape de production d'enzymes afin de minimiser son coût. Cela passe d'une part par le choix d'un protocole de production économique, et d'autre part par l'intégration de ce protocole dans la bioraffinerie lignocellulosique.

Les protocoles de production de cellulases ont été étudiés dans les années 1980 par différents laboratoires. Ils ont abouti à la sélection de souches de *Trichoderma reesei* hyperproductrices de cellulases, et à un protocole de production utilisant un inducteur soluble (lactose), et imposant une limitation par le substrat afin de maximiser l'induction de la production (en général en protocole fed-batch). Ce protocole, bien que déjà très performant, montre pourtant des limites, en termes de concentration finale et de productivité, dont les origines n'ont pas été élucidées.

Pour comprendre ces limites, il est nécessaire d'étudier précisément le métabolisme de la souche afin de pouvoir modéliser son comportement. Des modèles cinétiques ont été proposés dans la littérature pour optimiser le protocole de production, mais ils ont été appliqués plutôt à des protocoles batch ou continu. Dans le même temps, des études du métabolisme ont été menées grâce au protocole de culture en continu, mais les taux de croissance étudiés ne correspondent pas à ceux observés lors d'une fermentation en fed-batch. Nous proposons donc d'étudier le métabolisme de la souche directement dans les conditions du protocole industriel de type fed-batch, aussi bien d'un point de vue stœchiométrique (*III.1 Étude stœchiométrique de la production*, page 67) que cinétique (*III.2 Étude cinétique et modélisation du métabolisme en production*, page 84). Nous aurons alors une connaissance plus complète du micro-organisme qui pourra être utilisée pour comparer les performances des différents protocoles de culture en termes de productivité, de rendement global, et de besoin en oxygène, et ainsi fournir des pistes pour le choix du protocole de production le plus économique (*III.3 Simulation des protocoles de conduite*, page 98).

Ensuite, une des options les plus prometteuses pour diminuer très sensiblement le coût des enzymes consiste à les produire *in situ* pour éviter le transport et les étapes de purification, et surtout utiliser les sucres issus de la biomasse lignocellulosique, moins coûteux que le lactose. L'étude bibliographique a montré avec quelques exemples que l'utilisation de sucres autres que le lactose a un impact sur l'induction, aussi bien en termes de vitesse de production que de composition du cocktail sécrété, mais qu'elle n'est possible que dans certaines conditions. Nous proposons de compléter ces études dans le but de couvrir tous les hydrolysats sucrés disponibles dans une bioraffinerie lignocellulosique (*IV.2 Impact des mélanges de sucres*, page 134). De plus, les hydrolysats réels contiennent des composés issus de la dégradation de la biomasse, potentiellement inhibiteurs pour *T. reesei*, et dont les impacts n'ont quasiment pas été étudiés. Nous avons donc entrepris une étude systématique de l'effet de ces composés pris individuellement et en mélange, afin de quantifier leur toxicité pour *T. reesei* (*IV.1 Impact des composés de dégradation*, page 115).

Par ailleurs, plusieurs sucres ou oligosaccharides ont été identifiés dans la littérature comme inducteurs de la production de cellulases, mais plutôt pour des études de laboratoire et non à grande échelle. Nous étudierons deux méthodes pour synthétiser des composés inducteurs et testerons s'ils peuvent être utilisés à l'échelle industrielle en remplacement du lactose (*IV.2.2 Recherche de nouveaux inducteurs*, page 150).

Enfin, pour bénéficier des effets d'échelles et répondre à la demande de masse, la production de cellulases devra être effectuée dans des fermenteurs de plusieurs dizaines de m³. Cela a déjà été réalisé par des industriels, mais aucune étude visant à appréhender les limitations qui peuvent se produire dans de telles conditions et leurs conséquences sur les performances du protocole retenu, n'a été publiée. Nous proposons donc de réaliser des études en laboratoire pour mimer les conditions industrielles, afin de définir les limites acceptables pour le design de fermenteurs industriels (*IV.3 Contraintes liées au changement d'échelle*, page 161).

- 3. Enjeux du sujet de recherche -

Pour tous ces travaux, le choix a été fait de travailler uniquement avec des composés synthétiques représentatifs des compositions attendues dans les substrats réels. En effet, les substrats réels sont complexes et difficilement analysables, donc de caractérisation lacunaire, et ceux disponibles actuellement ne sont pas forcément représentatifs de tous les substrats envisageables. Aussi, l'utilisation de composés synthétiques permet une meilleure précision des études, avec la vérification des différents bilans. Il est alors possible de séparer les effets de chacun des composés (sucres, inhibiteurs), ce qui n'aurait pas été possible en utilisant des substrats réels.

II. Matériels et méthodes

1 Souches et produits

1.1 Souches

La souche *T. reesei* CL847 est une souche hyperproductrice de cellulases, obtenue après plusieurs étapes de mutagenèse aléatoire et sélection (Durand et al., 1988b).

La souche *T. reesei* CL847 i β a été obtenue à partir de la précédente par génie génétique. D'une part le gène codant pour l'invertase de *S. cerevisiae* a été inséré dans le génome avec un promoteur constitutif pour permettre l'utilisation du saccharose comme substrat carboné. D'autre part, des copies supplémentaires du gène codant pour la β -glucosidase native de *T. reesei* ont été insérées, sous contrôle d'un promoteur constitutif, afin d'augmenter son expression (Durand et al., 1988a).

Enfin, la souche *T. reesei* TR3012 a été obtenue par génie génétique à partir de la précédente par insertion dans le génome d'un gène codant pour une β -glucosidase améliorée (meilleure activité spécifique) obtenue par L-shuffling (Ayrinhac et al., 2011).

Pour créer un lot de spores, la souche est étalée sur boîtes PDA à partir d'un cryotube, puis les boîtes sont mises en culture à 30°C dans une enceinte saturée en eau jusqu'à sporulation. Les spores sont récupérées par lavage des boîtes avec une solution d'eau physiologique stérile complétée en glycerol (25% concentration finale) puis stockées en cryotubes à -80°C.

Pour chaque expérience, un cryotube est utilisé pour ensemercer une préculture en fiole Fernbach (II.3.1.1, page 61).

1.2 Produits

1.2.1 Composés synthétiques

Les différents sucres utilisés (glucose, lactose, xylose, arabinose, mannose, cellobiose) ainsi que les sels et les composés de dégradation potentiellement inhibiteurs ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich ou Prolabo et sont tous de pureté supérieure ou égale à 98%.

1.2.2 Biomasse lignocellulosique

Trois biomasses lignocellulosiques ont été utilisées pour réaliser des microhydrolyses (II.2.6, page 61).

La 1^{ère} est une paille de blé Apache, prétraitée par la société Saf-Isif par explosion à la vapeur pendant 2min30 à 19bar, après imprégnation par de l'acide sulfurique à 0.5 %. Le produit résultant a été pressé, puis lavé plusieurs fois pour supprimer les sucres libres, et enfin séché.

La 2^e est une paille de blé, prétraitée par cuisson acide par le pilote Futurol. La biomasse, à 10% de matière sèche (MS), est mélangée avec 8% d'acide sulfurique (rapporté à la MS), puis portée à 160°C pendant 20 minutes. Le produit résultant est neutralisé par de la soude à 30% puis séparé par décantation, mais non lavé ni séché.

La 3^e est du peuplier TTCR (Taillis à très courte rotation), broyé puis prétraité par cuisson acide par le pilote Futurol dans des conditions similaires, mais à 15% MS. Le produit résultant est neutralisé puis pressé, mais non lavé ni séché.

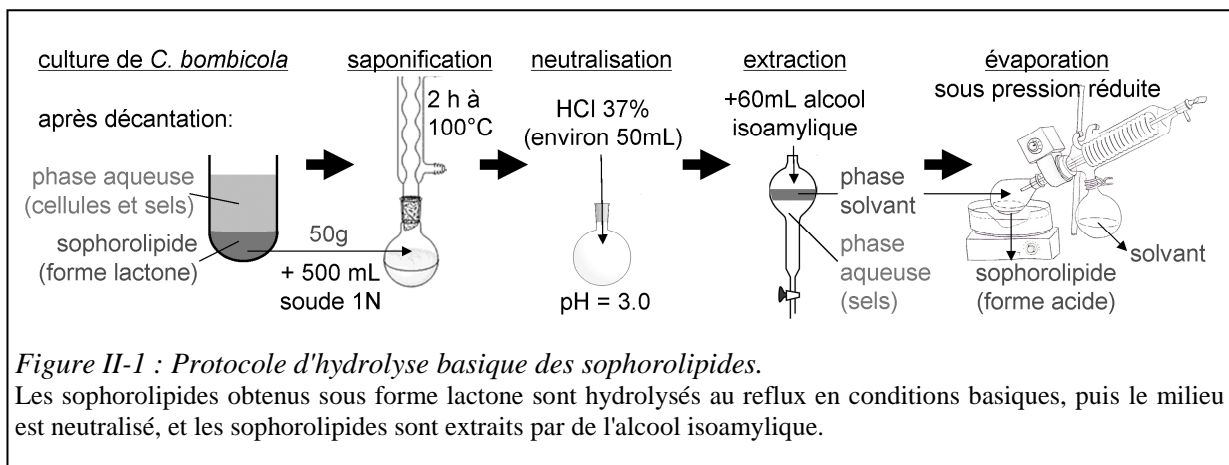
1.2.3 Sophorolipides

Les sophorolipides utilisés ont été produits par *Candida bombicola* selon un protocole développé à IFP Energies nouvelles (Davila, 1993), dans des conditions favorisant la forme lactone acétylée, qui est facile à extraire car elle forme une 2^e phase séparée du milieu de culture contenant les levures.

Pour obtenir la forme déacétylée acide des sophorolipides, une hydrolyse basique est réalisée (Figure II-1). 50g de sophorolipide est dissous dans 500 mL de soude 1N, puis chauffé au reflux à 100°C pendant 2 h. Puis le milieu est neutralisé et acidifié (jusqu'à pH 3.0) par ajout d'acide chlorhydrique fumant (environ 50mL).

Le sophorolipide acide est extrait par de l'alcool isoamylique (60mL de solvant pour 500mL de milieu) grâce à une ampoule à décanter. La phase aqueuse est traitée une 2^e fois avec du solvant pur pour maximiser l'extraction. Les phases solvant sont regroupées et le solvant est évaporé à 50°C sous pression réduite, en 3 étapes avec lavages intermédiaires par de l'eau.

La phase aqueuse finale contient le sophorolipide sous forme acide et déacétylée.



1.3 Milieux de culture

Le milieu de culture classiquement utilisé à IFP Energies nouvelles (Tableau II-1) est appelé 4N car 4 fois plus concentré que le milieu d'origine (Mandels and Weber, 1969).

Dans toutes les cultures réalisées pour cette étude, le milieu 4N a été utilisé à 50% v/v et complémenté par du cornsteep entre 1 et 2 g/L.

Dans le cas des cultures en fioles, un tampon de pH est ajouté sous forme de dipotassium phtalate, puis le pH est remonté avec de la soude. Dans le cas des cultures en bioréacteur, le milieu est stérilisé tel quel puis le pH est remonté avec l'ammoniaque (à 5.5 N) utilisé pour la régulation du pH.

Tableau II-1: composition du milieu de culture IFP Energies nouvelles

milieu 4N IFP Energies nouvelles		solution d'oligoéléments	
H ₃ PO ₄ 85%	5.0 mL/L	FeSO ₄ , 7H ₂ O	30.0 g/L
KOH	3.3 g/L	Co(NO ₃) ₂ , 6H ₂ O	9.0 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	5.6 g/L	MnSO ₄ , 1H ₂ O	6.4 g/L
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1.2 g/L	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.4 g/L
CaCl ₂ , 2H ₂ O	1.2 g/L	CuSO ₄ , 5H ₂ O	3.0 g/L
solution d'oligoéléments	4.0 mL/L	H ₃ BO ₃	0.4 g/L
		Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	1.0 g/L
		pH baissé à 1.8 avec H ₃ PO ₄ 85%	

2 Analyses

2.1 Massiques et élémentaires

2.1.1 Poids sec

Pour mesurer la concentration en biomasse dans une culture de *T. reesei*, un échantillon est prélevé dans la culture (4 à 15 mL environ) puis filtré à 0.2 µm (filtre Whatman G/C préalablement séché et taré). Le gâteau est rincé sur le filtre par un volume au moins égal à 3 fois le volume de prélèvement, puis le filtre et le gâteau sont mis à sécher à 105°C jusqu'à poids constant. La masse de poids sec du gâteau sur le filtre rapporté au volume du prélèvement donne la concentration en biomasse dans l'échantillon.

Par habitude à IFP Energies nouvelles, ce protocole est appelé poids sec pour ne pas être confondu avec la masse sèche qui consiste à mesurer tous les produits présents dans un échantillon de culture (biomasse, protéines, sels) par séchage direct sans lavage de la biomasse.

Dans le cas d'un échantillon visqueux contenant de nombreuses bulles, il est préférable de rapporter la masse de poids sec à la masse d'échantillon filtré et non à son volume. La concentration est alors exprimée en g/kg.

2.1.2 Analyses élémentaires

Les analyses compositionnelles de la biomasse (cellules de *T. reesei*) et des protéines ont été réalisées par SGS France (Evry). Les dosages du carbone, de l'hydrogène et de l'azote sont réalisés par conductibilité thermique. Le dosage de l'oxygène et du soufre sont réalisés par infrarouge.

Pour la biomasse, les échantillons ont été traités comme pour la mesure du poids sec, l'analyse étant réalisée sur le gâteau après séchage à 105°C.

Pour les protéines, les échantillons ont été dessalés par passage sur une colonne Hitrap (FPLC Akta, GE Healthcare), avec comme phase mobile du tampon acétate de sodium 10mM pH 4.8. Le suivi de l'éluant par conductimétrie et absorbance UV permet de séparer les fractions contenant les sels d'un côté et les protéines d'un autre côté. Les fractions contenant les protéines ont ensuite été rassemblées et lyophilisées avant analyse.

2.2 Colorimétriques

2.2.1 Concentration en protéines

La concentration en protéines est mesurée par la méthode de (Lowry et al., 1951), avec étalonnage par une gamme de BSA comprise entre 0.25 et 1.5 g/L, en utilisant le kit DC Protein Assay (Biorad). Une régression polynomiale d'ordre 2 forcée par 0 est utilisée pour modéliser la réponse des standards BSA.

2.2.2 Sucres réducteurs

La concentration en sucres réducteurs est mesurée par la méthode DNS, avec étalonnage par une gamme de glucose ou de xylose selon le type d'échantillon.

Le réactif DNS est préparé comme suit : pour 1 L de solution, dissoudre dans l'ordre dans 500 mL d'eau distillée 10 g de soude NaOH, 10 g d'acide 3,5 dinitrosalicylique, 0.5 g de sulfite de sodium, 2 g de phénol, 200 g de tartrate double de sodium et potassium, puis compléter à 1L par de l'eau distillée. La solution est stockée est 4°C.

Pour la mesure, un volume d'échantillon contenant environ 1 g/L de sucres est mélangé avec environ 2 volumes de réactif DNS, puis porté à ébullition pendant 5 minutes. La lecture est réalisée avec étalonnage par une gamme de sucres synthétiques (0.5, 1, 1.5 et 2 g/L), par absorbance à 550nm

pour le glucose, et à 540nm pour le xylose, après dilution de tous les échantillons par de l'eau pour être dans la gamme de linéarité du spectrophotomètre.

2.3 Chromatographie liquide

Avant analyse, les échantillons filtrés sont dilués dans de l'eau milliQ de manière à être dans la gamme du standard correspondant, mis à bouillir en tubes fermés pendant 5 minutes pour précipiter les protéines, puis filtrés à 0.2 µm (après refroidissement).

2.3.1 Sucres

Pour l'analyse des sucres par HPLC, la séparation est réalisée par une colonne Metacarb 87P (Varian) à 80°C, avec comme phase mobile de l'eau milliQ (débit 0.4 mL/min, pression 32 bar). La détection est réalisée par un réfractomètre Waters 2414.

L'intégration des pics du chromatogramme et le calcul des concentrations sont réalisés par le logiciel Breeze 2.0 (Waters), avec étalonnage par une gamme de quatre standards contenant respectivement 1, 2, 5 et 10 g/L des sept sucres suivants : cellobiose, lactose, glucose, galactose, mannose, arabinose et xylose.

2.3.2 Ions

Pour la mesure de la concentration en ammonium par HPLC, la séparation est réalisée par une colonne IonPac CS12A (4x250 mm, Dionex réf. 046073), précédée d'une précolonne IonPac CG12A (4x50 mm, Dionex réf. 046074) à 30°C. La phase mobile est de l'acide méthanesulfonique à 20 mM (débit 1 mL/min, pression 2000 psi).

Pour la mesure des concentrations en phosphate et sulfate par HPLC, la séparation est réalisée par une colonne IonPac AS9-HC (4x250 mm, Dionex, réf. 051786), munie d'une précolonne IonPac AG9-HC (4x50 mm, Dionex réf. 051791) à 30°C. La phase mobile est de la potasse : à 20mM entre 0 à 10 minutes après l'injection, puis un gradient de 20 à 45 mM entre 10 et 25 minutes, puis 20 mM entre 25 et 30 minutes. Le débit est constant à 1 mL/min et la pression est de 2000 psi.

Dans les deux cas, la détection est réalisée par conductimétrie (détecteur Dionex CD) à 35°C. L'intégration des pics du chromatogramme et le calcul des concentrations sont réalisés par le logiciel Chromeleon 6.80 SP2 (Dionex). L'étalonnage est réalisé soit avec une gamme d'ammonium à 8, 18, 33, 52 mg/L (avec régression polynomiale d'ordre 2), soit avec une gamme de phosphate et sulfate à 25, 50, 75 et 100 mg/L (avec régression linéaire).

2.3.3 Acides et furanes

Pour la mesure des acides organiques (acide acétique, acide furoïque) et des composés furaniques (furfural, 5-HMF) par HPLC, la séparation est réalisée par une colonne Aminex HPX-87H (Biorad) à 60°C, avec comme phase mobile de l'acide sulfurique à 10mM (débit 0.6 mL/min, pression 15 bar).

La détection est réalisée par un réfractomètre pour les acides (à 50°C), monté en série avec un spectromètre UV ($\lambda = 210$ nm) pour les composés furaniques.

L'intégration des pics du chromatogramme et le calcul des concentrations sont réalisés par le logiciel Borwin. L'étalonnage est réalisé par des standards à 1 g/L.

2.4 Analyse des gaz

2.4.1 Analyse en ligne

La teneur en O₂ et CO₂ des gaz en sortie de bioréacteur est mesurée en ligne respectivement par galvanométrie et par absorbance infrarouge, par un analyseur Duet (Advanced Biosystems Ltd.) pour le réacteur Applikon, ou un analyseur GA4 (Dasgip) pour les réacteurs Dasgip.

2.4.2 Analyse hors ligne

Pour le dosage hors ligne du CO₂ accumulé dans le ciel gazeux des cultures en fioles fermées, un échantillon de gaz (250 µL) est prélevé avec une seringue dans le ciel de la fiole à travers le bouchon hermétique. La séparation est réalisée sur un chromatographe gaz Varian 3800 équipé d'une colonne capillaire et d'un détecteur à conductivité thermique (catharomètre). Le gaz vecteur est de l'hélium.

L'intégration des pics du chromatogramme est réalisée par le logiciel Borwin. Le calcul des teneurs en CO₂ est réalisé manuellement sous Excel, à partir de la réponse obtenue pour un gaz étalon à 4,5 % en volume (Air Liquide).

2.5 Activités enzymatiques

2.5.1 Cellulase FP

L'activité enzymatique cellulase FP est mesurée selon le protocole standardisé par l'IUPAC (Ghose, 1987) après une miniaturisation qui conserve les paramètres clés conseillés par l'IUPAC, à savoir de rechercher la quantité d'enzymes nécessaire pour réaliser en une heure 4% d'avancement de la réaction d'hydrolyse d'un filtre en papier. Ce protocole miniaturisé a été validé par comparaison avec le protocole standard IUPAC.

Les solutions enzymatiques à doser sont diluées dans du tampon citrate 50mM pH 4.8 afin d'avoir environ 0.2 g/L de concentration en protéines. Puis une gamme de dilutions enzymatiques est préparée avec 25, 50, 75 et 100 µL de solution à doser diluée dans du tampon citrate (volume final 100 µL) dans des eppendorf 2 mL.

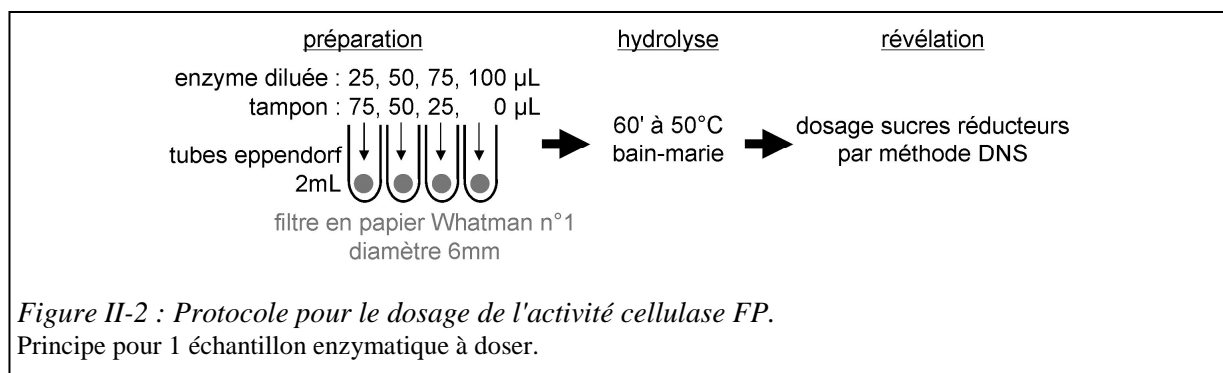
Pour l'hydrolyse, un disque en papier Whatman N°1 de 6mm de diamètre (préparé avec une perforatrice de bureau) est ajouté dans chaque tube eppendorf, puis ceux-ci sont placés au bain-marie à 50°C pendant 1 h.

Les sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse sont dosés au DNS (II.2.2.2), avec 200µL de réactif DNS. Après ébullition, l'échantillon est dilué avec 1.7 mL d'eau distillée.

Pour la lecture, le liquide total est transféré dans une cuve de lecture, puis laissé reposer 20 minutes pour que les résidus solides de filtre décantent. L'absorbance est mesurée à 540 nm au spectrophotomètre (lecture contre l'air avec zéro réalisé sur témoin contenant uniquement du tampon citrate (sans enzyme ni filtre)).

Le calcul des concentrations équivalentes en glucose est réalisé grâce à une gamme de glucose de 0.5, 1 et 1.5 g/L réalisée en parallèle des échantillons, avec soustraction de la concentration en glucose mesurée dans un témoin avec substrat papier filtre mais sans enzyme.

Pour le calcul de l'activité, la gamme de 4 dilutions enzymatiques est modélisée par régression polynomiale d'ordre 2 pour rechercher la dilution enzymatique théorique qui aurait réalisé 4% d'avancement (soit 1.04g/L de glucose pour 4% d'hydrolyse d'un filtre de 2.6 mg dans un volume de 100µL). Pour cette dilution théorique, on peut alors calculer l'activité enzymatique du cocktail, en µmol min⁻¹ mL⁻¹ (ou IU/mL).



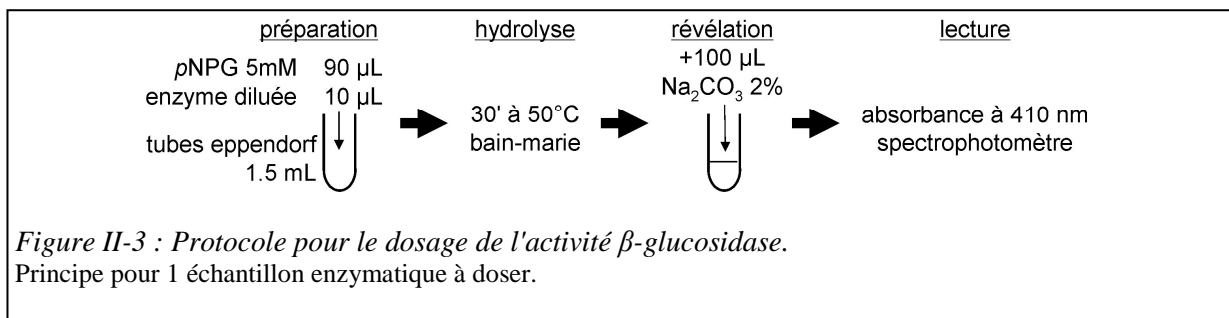
2.5.2 β -glucosidase

L'activité enzymatique de la β -glucosidase est mesurée par hydrolyse de *p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (pNPG), qui libère du *p*-nitrophénol, dosé en milieu alcalin par absorbance à 410 nm.

Les échantillons à doser sont dilués dans du tampon citrate 50 mM pour avoir une concentration en protéines de l'ordre de 50 à 100 mg/L (pour des productions avec souche CL847).

Pour l'hydrolyse, dans des tubes eppendorf 1.5 mL sont ajoutés 10 μ L de dilution enzymatique et 90 μ L de substrat pNPG préparé à 5mM dans du tampon citrate 50mM pH 4.8. Puis les tubes sont placés 30 minutes au bain marie à 50°C.

Pour la révélation sont ajoutés 100 μ L de Na_2CO_3 2%. Après 20 minutes l'absorbance est mesurée à 410 nm, et la concentration équivalente en *p*-nitrophénol est calculée contre une gamme à 25, 50, 100 et 200 μ M.



2.5.3 Xylanase

En l'absence de méthode standardisée, la méthode utilisée pour le dosage de l'activité xylanase a été mise au point sur une base classique, en prenant soin de vérifier que les conditions choisies soient dans une zone de linéarité de la réaction d'hydrolyse (en fonction du temps et de la dose d'enzymes ajoutée)

En pratique, les échantillons à doser sont dilués dans du tampon citrate 50mM, afin d'avoir environ 5 mg/L de concentration en protéines, puis 100 μ L de dilution sont placés dans des tubes eppendorf 2 mL.

Le substrat de l'hydrolyse est préparé à l'avance et stocké à -20°C. 2 g de xylane (Oat Spelt Xylan) sont dissous dans 40 mL de soude 1N, puis sont ajoutés 50 mL d'eau et 960 mg d'acide citrique. Puis le pH est ajusté à 4.8 avec de l'acide chlorhydrique fumant (afin d'obtenir un milieu tampon citrate 50mM), et enfin le volume est complété à 100 mL avec de l'eau distillée.

Pour l'hydrolyse, 100 μ L de substrat xylane (décongelé au chaud et bien remis en suspension) est ajouté dans chaque eppendorf puis ceux-ci sont placés à 50°C et 600 rpm dans un Thermomixer pendant 10 minutes.

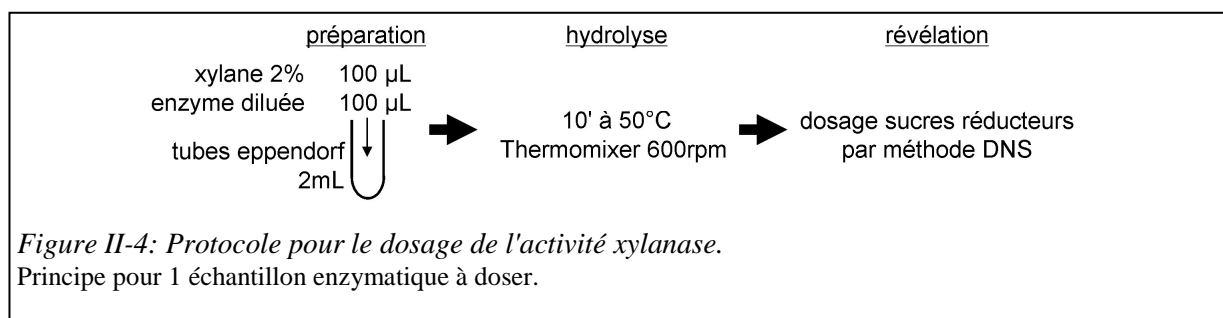
Les sucres réducteurs libérés lors de l'hydrolyse sont dosés au DNS (II.2.2.2), avec 300 μ L de réactif DNS. Après ébullition, l'échantillon est dilué avec 1.5 mL d'eau distillée.

Pour la lecture, le liquide total est transféré dans une cuve de lecture, puis laissé reposer 20 minutes pour que les résidus solides décantent. L'absorbance est mesurée à 540 nm au spectrophotomètre (lecture contre l'air avec zéro réalisé sur témoin contenant uniquement du tampon citrate (sans enzyme ni substrat)).

Le calcul des concentrations équivalentes en xylose est réalisé grâce à une gamme de xylose de 0.4, 0.6 et 0.8 g/L réalisée en parallèle des échantillons, avec soustraction de la concentration en xylose mesurée dans un témoin avec substrat xylane mais sans enzyme.

Pour le calcul de l'activité, on utilise la formule suivante :

$$\text{activité (IU/mL)} = (\text{dilution}/100(\mu\text{L})) * (200(\mu\text{L}) * [\text{xylose}(\text{mg/L})]) / 150 (\text{g/mol}) / 10 (\text{min})$$



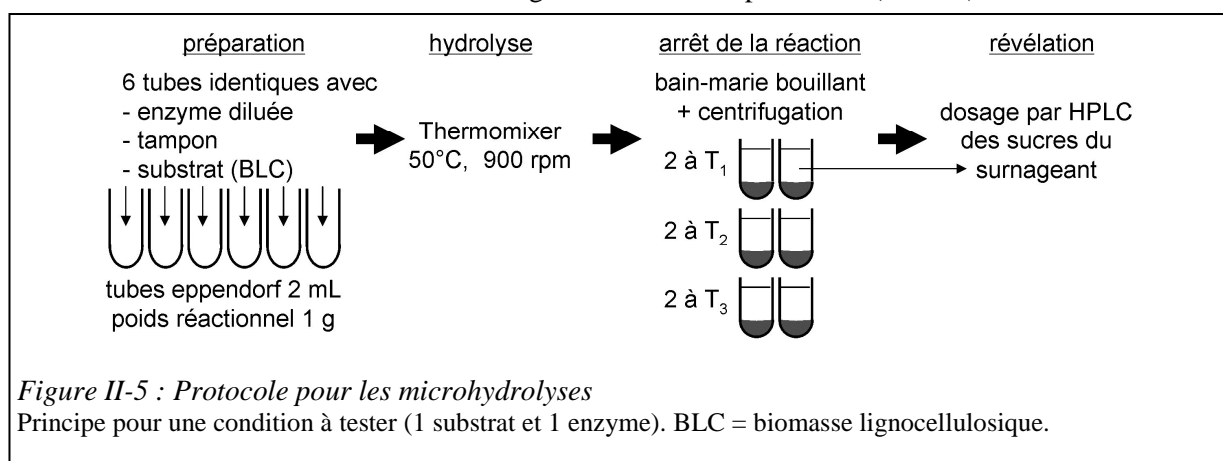
2.6 Microhydrolyses

Les microhydrolyses sont réalisées en eppendorf 2 mL avec un poids réactionnel de 1 g.

Le substrat (biomasse lignocellulosique prétraitée) est ajouté par pesée, après détermination de son taux d'humidité par séchage d'un échantillon juste avant la préparation. Puis l'enzyme est ajoutée après dilution dans un volume adéquat de tampon acétate 50mM pH 4.8, afin d'avoir un poids réactionnel de 1 g dans tous les tubes.

Pour chaque condition testée (substrat et enzyme), 6 tubes identiques sont réalisés puis placés dans un Thermomixer à 50°C et 900 rpm. Deux tubes sont sacrifiés à chaque temps d'échantillonnage (à 24, 48 et 72 h) : ils sont placés 5 minutes au bain-marie bouillant puis centrifugés pour récupérer le surnageant.

La concentration en sucres dans le surnageant est mesurée par HPLC (II.2.3.1).



3 Protocoles de culture

3.1 En fiole

3.1.1 Préculture en fiole Fernbach

Ce protocole est réalisé dans tous les cas pour la préculture (germination des spores).

Une fiole Fernbach contenant 250 mL de milieu de culture est stérilisée à l'autoclave (avec glucose stérilisé à part et ajouté sous hotte), puis estensemencée par un cryotube de spores de la souche choisie pour l'étude.

L'incubation est réalisée pendant environ 72 h à 30°C et 150 rpm en incubateur rotatif Infors. Avant utilisation, le pH final et la concentration résiduelle en glucose sont mesurés pour vérifier le bon déroulement de la culture. La couleur et l'aspect macroscopique de la culture sont aussi de bons indicateurs, mais certes plus subjectifs.

3.1.2 Fioles fermées

Ce protocole facile à mettre en œuvre a été utilisé pour cribler un grand nombre de conditions expérimentales au détriment d'une grande précision, toujours pour des tests de phase de croissance de la biomasse sur glucose (paragraphe IV.1.1, page 115).

En pratique, des fioles de pénicilline de 160 mL sont remplies avec 20mL de milieu de culture. Le milieu de culture a été stérilisé 20 minutes à 121°C à l'autoclave, ou par filtration s'il contenait des composés volatils. Après inoculation à partir d'une préculture en fiole Fernbach (à 5% v/v), les fioles sont fermées avec un bouchon hermétique aux gaz et mises à incuber à 30°C et 150 rpm dans un incubateur rotatif Infors.

Le suivi de la croissance est effectué par dosage du CO₂ qui s'accumule dans la phase gazeuse de la fiole (II.2.4.2). En fin de culture, le pH final est vérifié, puis sont mesurés : la consommation de substrats (II.2.3.1) et la production de biomasse (II.2.1.1).

En raison de la limitation de la croissance par la quantité initiale de dioxygène piégé dans la fiole, ce protocole permet de suivre uniquement la vitesse initiale de croissance. En effet seulement 5 g/L de glucose environ peuvent être consommés au maximum, et de plus la cinétique pourrait être ralentie par l'accumulation de CO₂.

En général, on réalise des témoins sans inhibiteurs, et on rapporte la production de CO₂ obtenue dans une condition à la production obtenue pour le témoin.

3.1.3 Respiromètre Sapromat

Le respiromètre Sapromat (Figure II-6) permet de mesurer avec une grande précision la consommation d'oxygène associée au métabolisme aérobie d'un microorganisme. Il a été utilisé pour vérifier la stœchiométrie de la réaction de croissance sur glucose (III.1.2.1.2, page 70).

Chaque cellule de mesure est fermée hermétiquement et est constituée de 3 parties :

- un réacteur contenant d'une part la culture biologique aérobie et d'autre part un piège à CO₂ (chaux sodée) qui fixe le CO₂ produit par les microorganismes,
- un manomètre détectant la baisse de pression due à la consommation d'oxygène (le CO₂ est piégé donc ne s'accumule pas dans le réacteur) par rapport à un compartiment témoin hermétique,
- un générateur d'oxygène électrochimique (réduction du sulfate de cuivre en Cu(0) et oxydation de l'eau en oxygène).

La production d'oxygène nécessaire pour garder une pression constante dans le réacteur est enregistrée au cours du temps (connaissant la quantité d'électricité injectée), et correspond donc à la quantité d'oxygène consommée par la réaction biologique.

En pratique, le réacteur est une fiole de 500 mL, contenant 50 mL de milieu de culture. L'agitation est réalisée par un barreau aimanté, et le contrôle de la température par un bain marie fermé (par un couvercle).

La fiole est stérilisée à l'autoclave avec le milieu de culture. La chaux sodée est stérilisée à part à l'autoclave à sec puis transférée dans le piège sous hotte stérile. L'ensemencement est réalisé sous hotte stérile à partir d'une préculture en fiole Fernbach.

En fin de culture, le pH final est vérifié, puis sont mesurées la consommation de substrat (II.2.3.1) et la production de biomasse (II.2.1.1).

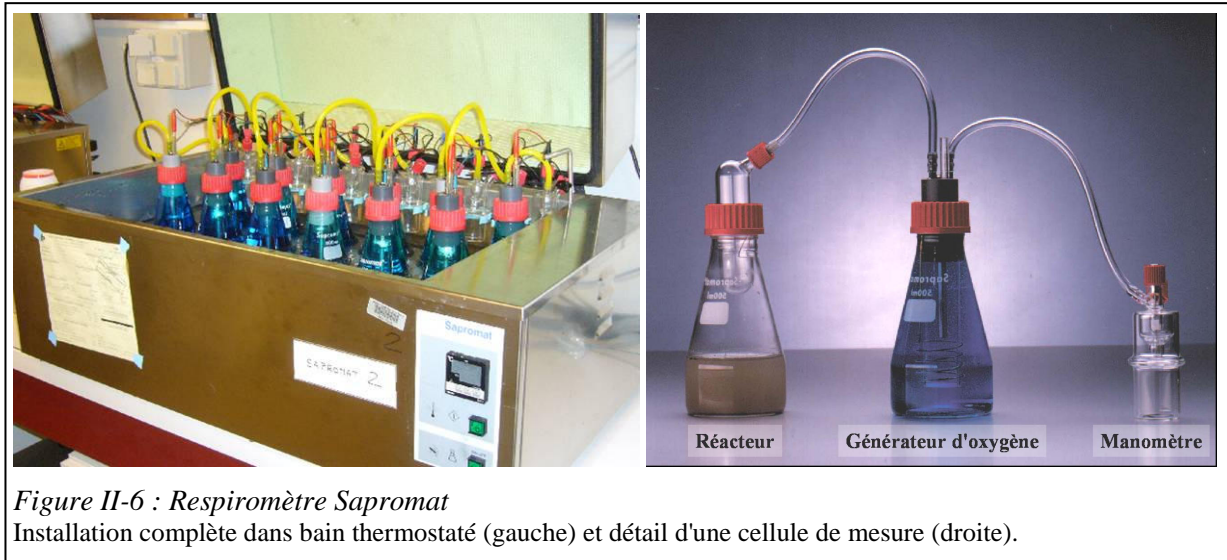


Figure II-6 : Respiromètre Sapromat

Installation complète dans bain thermostaté (gauche) et détail d'une cellule de mesure (droite).

3.1.4 Fioles pour tests d'induction

Un protocole spécifique a été utilisé pour mener des tests d'induction en fiole avec différents substrats. Il consiste à réaliser un pulse de sucre dans un milieu contenant beaucoup de biomasse et limité en substrat, afin de se situer dans des conditions proches de la limitation en substrat, nécessaires pour tester l'induction de la production de protéines (paragraphe IV.2.2.2.1, page 156)

En pratique, on peut utiliser des fioles de pénicilline (160 mL, volume liquide 20 mL) ou des fioles Erlenmeyer (250 mL, volume liquide 50 mL).

Une préculture en fiole Fernbach est suivie et son pH remonté pour permettre une consommation totale du glucose, puis séparée dans différentes fioles à l'identique. La concentration en biomasse est alors d'environ 5 g_x/L.

Un pulse de substrat, suffisamment concentré pour ne pas trop diluer la biomasse, et stérilisé par filtration, est réalisé sous hotte. Classiquement, on réalise un pulse d'une solution de 50g/L de sucre à 10% v/v afin d'avoir une concentration du substrat d'environ 5 g_S/L. Les fioles sont ensuite mises en incubateur rotatif Infors pendant 24h à 30°C et 150 rpm.

A l'issue, les concentrations de biomasse et de protéines sont mesurées et la production est calculée par rapport à la concentration initiale (mesurée sur un témoin avec pulse d'eau distillée).

3.1.5 Fioles alimentées

Le protocole en fioles alimentées a été mis au point suite à l'étude stœchiométrique (III.1.2.4, page 74) et utilisé pour réaliser des productions en limitation de carbone plus facilement qu'en bioréacteur (IV.2, page 134).

En pratique, une préculture/croissance est réalisée en fiole Fernbach pendant 72 h à 30°C et 150 rpm. Le milieu de culture est légèrement modifié pour lever la limitation en azote et diminuer la quantité de sels et de substrats complexes : 0.8 mL/L H₃PO₄ 85%, 4.2 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.3 g/L MgSO₄·7H₂O, 0.15 g/L CaCl₂, 1mL/L solution d'oligoéléments, 1.5 g/L cornsteep, 6g/L di-potassium phtalate. Le pH du milieu est remonté à 6 avec environ 1mL/L de soude 30%.

A l'issue de la préculture, le pH est remonté à 5.0 environ et le volume de préculture est réparti en 50 mL dans des fioles Erlenmeyer 250 mL, puis mis à incuber à 27°C et 150 rpm en incubateur Infors. Chaque fiole est alimentée par le système de pompe FedBatchPro (Dasgip) à 0.3 mL/h avec une solution contenant 50 g/L de sucres totaux, 0.8 g/L de (NH₄)₂SO₄, (stérilisé par filtration) et 160 mM NH₃ (ajouté sous hotte).

Pendant la culture, des prélèvements sont réalisés pour mesurer le pH et la concentration en protéines (toutes les 24 h, prélèvement de 2mL), et concentration en biomasse (toutes les 48 h, prélèvement total 4mL)

Après 160 h de culture, le volume final de culture est mesuré, ainsi que le volume total de solution de substrat injecté. La différence entre le volume total théorique et mesuré permet de calculer le débit d'évaporation puis le volume réel au cours du temps. Puis avec les concentrations, on peut calculer les masses au cours du temps, puis la vitesse spécifique de production de protéines.

Sur les point finaux sont mesurées les activités cellulase FP, β -glucosidase, et xylanase.

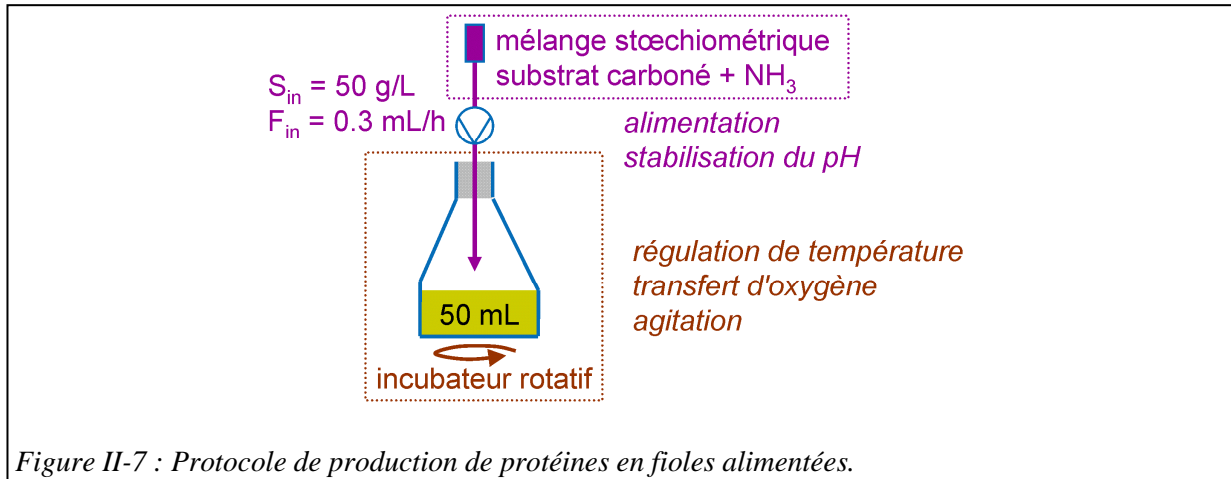


Figure II-7 : Protocole de production de protéines en fioles alimentées.

3.2 En bioréacteur

3.2.1 Schéma général

Le schéma général des bioréacteurs utilisés pour cette étude est présenté Figure II-8. Les réacteurs sont équipés avec un système de régulation de la température, un système de régulation du pH, et un système d'aération, d'agitation et de contrôle de la concentration en oxygène dissous. Pour la conduite en protocole fed-batch ou continu, du substrat carboné peut être alimenté par une pompe dédiée. Les teneurs en O_2 et CO_2 dans le gaz de sortie sont mesurées en ligne. Des prélèvements sont réalisés pour des mesures hors ligne : concentrations en biomasse, protéines, sucres, ions, et activités enzymatiques.

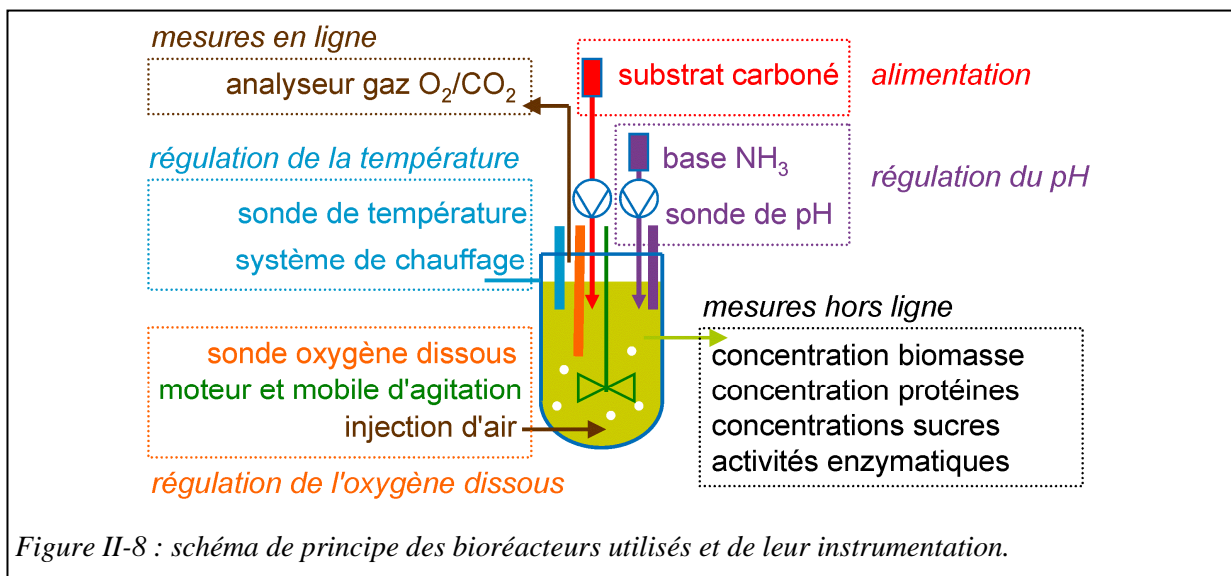


Figure II-8 : schéma de principe des bioréacteurs utilisés et de leur instrumentation.

3.2.2 Dasgip

Le système Fed-batch Pro (Dasgip) est un module de quatre réacteurs en parallèle, de volume 1.5 L (0.75 L utile).

Les réacteurs sont préparés avec des sondes étalonnées de température, de pH et d'oxygène dissous, et avec des piquages pour les différents ajouts. L'étanchéité est vérifiée, puis le réacteur est rempli avec 375mL (50%v/v) de milieu 4N IFP Energies nouvelles, et stérilisé à l'autoclave 20 minutes à 121°C.

Une solution contenant 11.25g de glucose (pour la phase de croissance en batch) dans 300mL est stérilisée à part, puis ajoutée dans le réacteur (donnant une concentration de 15g_S/L). Puis l'ensemencement du réacteur est réalisé avec 75 mL de préculture.

La phase initiale de croissance est réalisée en batch jusqu'à consommation complète du glucose (en pratique jusqu'à une concentration en glucose inférieure à 5 g_S/L, durée environ 24 à 30 h), avec régulation du pH à 4.8, de la température à 27°C, et de l'oxygène dissous à 40% de la saturation (par l'agitation avec aération fixe à environ 30 sL/h).

Puis la phase de production est réalisée en fed-batch avec alimentation à 2 mL/h avec une solution de sucre (dont un sucre inducteur comme le lactose) à 250 g/L. La température de régulation est passée à 25°C et le pH à 4.0, selon une rampe de 12h pour éviter une modification brusque.

Pendant toute la culture, le pH est régulé automatiquement par ajout d'une solution d'ammoniaque à environ 5N (la concentration précise est mesurée par dosage acide/base).

Au cours de la culture, des prélèvements sont réalisés pour mesurer la concentration en biomasse, la concentration en protéines, et la concentration résiduelle en sucres.

3.2.3 Applikon

Le système eZ-control (Applikon) comporte un réacteur de 6L (3L utile) et un système de contrôle et d'enregistrement associé.

Le réacteur est préparé de la même manière que les réacteurs Dasgip, avec des volumes de milieu, masses et débits multipliés par 4.

III. Métabolisme de *T.reesei* sur lactose pur

1 Étude stœchiométrique de la production

1.1 Composition élémentaire

Afin de pouvoir calculer les bilans matière lors des différentes cultures, il est nécessaire de connaître la composition élémentaire des substrats et des produits, donc en particulier de la biomasse et des protéines.

1.1.1 Biomasse

Le Tableau III-1 présente un bilan des mesures de composition élémentaire de cellules de *T. reesei*, trouvées dans la littérature ou réalisées à IFP Energies nouvelles. Les mesures réalisées sur la souche QM9414 semblent légèrement différentes des mesures réalisées à IFP Energies nouvelles sur la souche CL847. Pour cette souche, on observe une bonne cohérence entre les mesures réalisées dans les années 1980 et celles réalisées au cours de cette thèse. De plus, les 3 mesures les plus récentes montrent qu'il n'y a pas de différence significative de composition élémentaire de la biomasse entre la phase de croissance (expérience K706) et la phase de production d'enzymes (K646 et K649).

Concernant les éléments contenus dans les cendres, les teneurs en éléments Fe et Mg mesurées au cours de cette thèse sont cohérentes avec les mesures réalisées par (Gaunt et al., 1984). Les teneurs en éléments soufre et phosphore ont été comparées à des mesures par HPLC (II.2.3.2, page 58) de la consommation des ions sulfates SO_4^{2-} et phosphates PO_4^{3-} pendant la phase de croissance :

- PO_4^{3-} : 45 $\text{mg}_{\text{PO}_4}/\text{g}_X$ ($\pm 5\%$), soit une teneur massique en phosphore P de $14.2 \pm 0.7 \text{ mg}_P/\text{g}_X$, cohérente avec la mesure réalisée sur les cendres ;
- SO_4^{2-} : la consommation mesurée est inférieure à l'incertitude de mesure, de l'ordre de 10 $\text{mg}_{\text{SO}_4}/\text{g}_X$, soit une teneur massique en soufre S inférieure à 3 mg_S/g_X . La teneur en soufre très faible mesurée sur les cendres pourrait s'expliquer par un stripping lors du séchage de la biomasse à 500°C.

Tableau III-1 : Composition élémentaire des cellules de *T. reesei*.

La composition élémentaire en éléments CHON et en cendres est présentée en pourcentage massique pour la biomasse sèche. Le détail de la composition des cendres est présenté en mg par g de biomasse sèche.

C	H	O	N	cendres	Fe	Mg	K	S	P	références
%w/w					mg/g					
43.6	6.2	42.1	6.7	1.3						QM9414 (Harima and Humphrey, 1980)
				6.2	0.29	1.2	25			(Gaunt et al., 1984)
46.3			6.9							(Lonchamp and Thery, 1985)
42.6	6.5	32.8	7.3	10.8						(Lonchamp and Thery, 1987)
44.4			8.1							(Dalal, 1989)
44.0	6.7	33.7	7.9	7.8						IFPEN K646 (production)
44.6	6.8	34.1	8.1	6.6						IFPEN K649 (production)
44.1	6.01	36.43	8.35	5.11	0.40	1.25		<0.1	16.9	IFPEN K706 (croissance)

- III. Métabolisme de *T.reesei* sur lactose pur -

Le Tableau III-2 présente la composition moyenne des cellules de *T. reesei*, calculée à partir des mesures réalisées à IFP Energies nouvelles (ou par (Gaunt et al., 1984) pour les ions métalliques), et retenue pour la suite de cette thèse, pour la définition des milieux de culture et le calcul des bilans matière.

Pour le sodium (non analysé) et le soufre (valeur mesurée incohérente), les données choisies sont celles retenues pour *S. cerevisiae* (Lange and Heijnen, 2001). On remarque que le total des éléments des cendres donne 46 mg/g au lieu des 77 attendus d'après la teneur en cendres de la biomasse. Il reste donc 31 mg/g d'éléments non identifiés dans la composition élémentaire moyenne présentée ci-dessous.

Tableau III-2 : Composition élémentaire moyenne de la biomasse.
¹données pour *S.cerevisiae* (Lange and Heijnen, 2001).

	C	H	O	N	cendres						
teneur massique	44.0%	6.6%	33.6%	8.0%	7.7%	donne:					
incertitude absolue	± 0.7%	± 0.3%	± 1.7%	± 0.3%	± 1.4%	MM=27.25 g/mol					
incertitude relative	1.6%	4.5%	5.2%	3.8%	18%	degré réduction = 4.19					
composition molaire	1	1.800	0.573	0.156	0.1	(avec MM _{cendres} =21 g/mol)					
		P	S	Fe	Mg	K	Zn	Ca	Cu	Mn	Na
teneur massique (mg/g)	15	2.5¹	0.4	1.2	25	0.14	0.22	0.03	0.016	0.6¹	
incertitude absolue	± 3		±0.2	±0.2	±5	±0.02	±0.02	±0.03	±0.01		
composition molaire	0.013				0.017						

1.1.2 Cocktail de protéines

1.1.2.1 Composition théorique

La connaissance des gènes codant pour les 4 principales cellulases du cocktail produit par *T. reesei* permet, à partir de la composition en acides aminés, de calculer leur composition théorique en éléments CHONS. Puis en utilisant une composition moyenne pour ces 4 cellulases principales dans un cocktail de *T. reesei* (Herpoel-Gimbert et al., 2008), on peut calculer la teneur massique moyenne attendue pour le cocktail de cellulases.

Tableau III-3 : Composition élémentaire et teneur massique théorique des principales cellulases et du cocktail moyen produit par T. reesei.

	composition théorique	C	H	O	N	S
CBH1 - 55% w/w	C ₂₂₃₈ H ₃₃₇₄ O ₇₇₇ N ₆₁₂ S ₃₀	51.5%	6.5%	23.8%	16.4%	1.8%
CBH2 - 25% w/w	C ₂₀₈₃ H ₃₁₆₁ O ₆₅₈ N ₅₆₇ S ₁₆	53.0%	6.7%	22.3%	16.8%	1.1%
EG1 - 10% w/w	C ₁₉₅₃ H ₂₉₇₀ O ₆₈₄ N ₅₄₄ S ₃₁	51.0%	6.5%	23.8%	16.6%	2.2%
EG2 - 10% w/w	C ₁₈₃₆ H ₂₇₉₃ O ₆₀₂ N ₅₀₉ S ₁₆	52.3%	6.6%	22.9%	16.9%	1.2%
moyenne pondérée		51.9%	6.5%	23.4%	16.6%	1.6%

Cependant, il est connu que les cellulases sécrétées par *T. reesei* sont fortement glycosylées (Hui et al., 2002; Maras et al., 1997), ce qui va modifier leur composition élémentaire. Il est donc nécessaire de procéder à des mesures sur des échantillons réels.

1.1.2.2 Mesures

Pour cela, 3 cocktails de protéines, produits en fed-batch par des souches différentes et avec des solutions d'alimentation de compositions différentes, ont été sélectionnés pour une analyse de composition élémentaire. Pour éviter la mesure simultanée des ions présents dans le milieu de culture (en particulier NH₄⁺, SO₄²⁻ et PO₄³⁻) un dessalage préalable des échantillons est nécessaire (II.2.1.2).

Cependant, le dessalage est réalisé dans du tampon acétate de sodium, donc les mesures brutes de composition élémentaire correspondent au total des protéines et de l'acétate. Comme les protéines ne contiennent pas de sodium, on peut se baser sur la teneur en sodium dans les échantillons (mesurée simultanément) pour recalculer la teneur en acetate des échantillons et corriger les mesures CHONS brutes de la présence d'acétate. Le Tableau III-4 présente les résultats finaux (après correction) pour la composition élémentaire moyenne du cocktail de protéines produit par *T. reesei*.

Tableau III-4 : Composition élémentaire moyenne du cocktail de protéines produit par *T. reesei*.

Analyse élémentaire réalisée sur échantillons déssalés pour supprimer les ions issus du milieu de culture.

réf.	souche	fed-batch	C	H	O	N	S	somme
K609	CL847	lactose	47.2%	6.84%	31.1%	13.2%	1.04%	99.4%
K616	CL847 iβ		47.4%	6.86%	32.6%	12.6%	1.01%	100.5%
K734			lac+glu+xyl	47.1%	6.78%	32.3%	12.2%	0.95%
composition moyenne			47.3%	6.83%	32.0%	12.7%	1.00%	99.7%
incertitude absolue			± 0.1%	± 0.04%	± 0.8%	± 0.5%	± 0.05%	0.6%
incertitude relative			0.29%	0.64%	2.44%	4.06%	4.56%	0.64%
composition molaire			1	1.733	0.508	0.230	0.008	

Ces résultats montrent que les incertitudes sont très faibles, alors qu'il s'agit de cocktails produits par des souches différentes et sur des substrats différents. Alors que la composition relative des enzymes présentes dans le cocktail peut être très variable, la teneur CHONS semble peu dépendre des conditions de culture.

La teneur en soufre des cellulases de *T. reesei* est assez forte, en raison notamment de la forte teneur en cystéines. La teneur en éléments CHO est semblable dans la biomasse et dans les protéines. La teneur en azote est bien plus faible dans la biomasse (8.0%) que dans les protéines (12.7%), ce qui est logique car la biomasse contient des protéines mais aussi des carbohydrates non azotés.

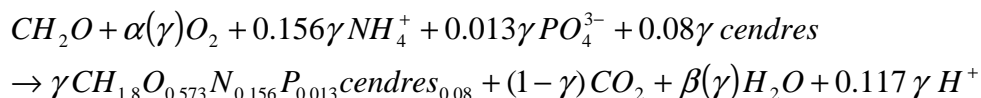
Cependant les teneurs massiques en azote N et soufre S sont bien plus faibles que les teneurs théoriques calculées précédemment (Tableau III-3), en raison des glycosylations nombreuses sur les cellulases (les mesures donnent 12.7% au lieu de 16.6% pour l'azote, et 1.0% au lieu de 1.6% pour le soufre). Pour que les cellulases glycosylées contiennent si peu de ces éléments, il est nécessaire que les glycosylations représentent environ 20 à 35% des cellulases en masse. Ce résultat est cohérent avec la littérature : (Hui et al., 2002) mesurent jusqu'à 25% en masse de glycosylations.

1.2 Approche par équations stœchiométriques

1.2.1 Écriture des équations

1.2.1.1 Principe

Grâce aux compositions élémentaires mesurées précédemment, les réactions de croissance ou de production peuvent être écrites sous la forme d'équations-bilans stœchiométriques. Par exemple la réaction de croissance sur glucose s'écrit :



où $\alpha(\gamma)$ et $\beta(\gamma)$ sont des fonctions linéaires du rendement en biomasse γ . Ces fonctions peuvent être calculées grâce aux bilans en éléments O et H (les bilans en éléments C, N, P et en charges sont déjà respectés dans l'écriture ci-dessus).

On peut alors calculer le rendement apparent théorique de consommation ou production d'un métabolite, à condition de faire une hypothèse sur un des rendements. On choisit en général le rendement apparent de biomasse par rapport au sucre substrat $Y_{X/S}$.

1.2.1.2 Validation

Une expérience a été réalisée dans le but de valider l'écriture de l'équation stœchiométrique pour la réaction de croissance, et son utilisation pour le calcul des rendements.

Pour cela, des tests de croissance en fiole ont été réalisés pour différentes concentrations initiales en glucose (0, 5, 10, 15, 20 g/L), avec suivi de la consommation d'oxygène grâce au respiromètre Sapromat (II.3.1.3, page 62). A la fin de la croissance (repérée par l'arrêt de la consommation d'oxygène), les quantités de glucose consommé et de biomasse produite ont été mesurées.

Les rendements mesurés pour la consommation d'oxygène (rapportée à la quantité de glucose ou de biomasse) sont parfaitement cohérents avec les rendements calculés grâce à l'équation-bilan ci-dessus (en prenant comme hypothèse le rendement de biomasse $Y_{X/S}$ mesuré) (Tableau III-5). Ceci valide l'écriture de l'équation-bilan stœchiométrique, utilisant la composition élémentaire mesurée précédemment.

Tableau III-5 : Validation de l'équation stœchiométrique pour la croissance sur glucose.

La mesure de la consommation d'oxygène par le respiromètre Sapromat permet de mesurer les rendements de consommation d'oxygène $Y_{O_2/S}$ et $Y_{O_2/X}$, et de les comparer aux rendements théoriques calculés par l'équation stœchiométrique pour un même rendement de formation de biomasse $Y_{X/S}$.

rendement	théorique	mesuré
$Y_{X/S}$ (g _X g _S ⁻¹)	↓	0.38 ± 0.01
$Y_{O_2/S}$ (g _{O2} g _S ⁻¹)	0.60 ± 0.01	0.60 ± 0.02
$Y_{O_2/X}$ (g _{O2} g _X ⁻¹)	1.55 ± 0.05	1.56 ± 0.10

1.2.2 Utilisation pour le calcul des rendements O₂ et CO₂

L'analyse des gaz est d'une grande information dans un procédé biologique, et la mesure en ligne de sa composition peut être un indicateur du métabolisme instantané du microorganisme.

1.2.2.1 En croissance sur glucose

Dans un procédé aérobie, la consommation d'oxygène est un paramètre clé, car l'oxygène est très peu soluble dans l'eau et le transfert de l'oxygène de la phase gaz à la phase aqueuse est un phénomène lent, qui peut se retrouver limitant pour le métabolisme, si la demande est plus forte que le transfert par diffusion. En l'occurrence, le besoin en oxygène pour la croissance s'écrit:

$$r_{O_2} = Y_{O_2/X} r_X = Y_{O_2/X} \mu X$$

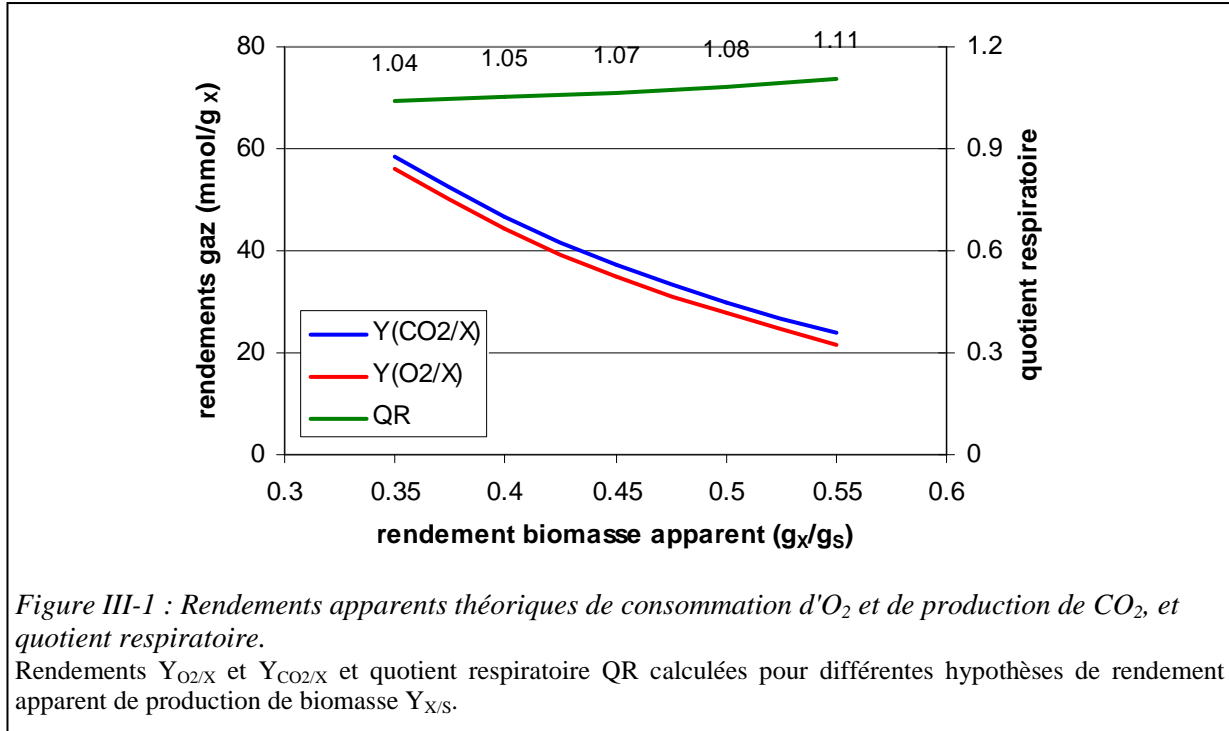
où $Y_{O_2/X}$ peut être calculé par l'équation-bilan stœchiométrique (pour un rendement apparent en biomasse $Y_{X/S}$ donné).

Par ailleurs, le quotient respiratoire $QR = r_{CO_2} / r_{O_2}$ (moles de CO₂ produites rapportées aux moles d'O₂ consommées) est une mesure classique en génie microbiologique car elle est instantanée (par la mesure en ligne de la composition du gaz en sortie du réacteur), et peut donner en direct des informations sur le métabolisme du micro-organisme.

L'équation-bilan ci-dessus a été utilisée pour simuler les rendements en O₂ et CO₂, ainsi que le quotient respiratoire, pour différentes hypothèses de rendement en biomasse $Y_{X/S}$ (Figure III-1). En l'occurrence, les valeurs limites de rendement apparent ont été choisies à 0.35 g_X/g_S (minimum mesuré Tableau III-5 ci-dessus) et 0.55 g_X/g_S (maximum classiquement admis).

Les résultats montrent que les rendements $Y_{O_2/X}$ et $Y_{CO_2/X}$ varient quasiment du simple au triple sur la plage étudiée, avec un besoin en oxygène qui augmente très fortement quand le rendement en biomasse diminue. Il y aura donc un double avantage à réaliser la croissance dans des conditions qui permettent de maximiser le rendement en biomasse, d'une part pour diminuer la quantité de substrat nécessaire, d'autre part pour minimiser le besoin en oxygène et donc le transfert nécessaire.

En revanche, on remarque que le quotient respiratoire est quasiment constant, avec des valeurs comprises entre 1.04 et 1.11. Donc l'utilisation de ce paramètre comme indicateur du métabolisme instantané nécessitera des mesures très précises de la teneur en O₂ et CO₂ dans le gaz de sortie. Ceci n'est pas forcément chose facile en raison de l'évaporation du milieu de culture qui va diluer le gaz de sortie (à saturation à 30°C, la teneur volumique en la vapeur d'eau dans l'air est de 4.2%). Il sera donc nécessaire de parfaitement sécher les gaz de sortie avant analyse (sans que cela ne modifie leur composition) si on veut utiliser ce paramètre pour du suivi voire de la conduite.



1.2.2.2 En phase de production sur lactose

De même que pour la croissance sur glucose, on peut écrire les équations stœchiométriques globales pour les 2 réactions de croissance et de production de protéines, les deux sur substrat lactose. Puis, on peut calculer les rendements théoriques des gaz et le quotient respiratoire afin de comparer croissance et production (sur un même substrat lactose)

Les résultats (Tableau III-6) montrent que pour O₂ et CO₂ les différences sont minimes entre croissance et production. Ce résultat découle du fait que la teneur en élément C H et O est semblable dans la biomasse et les protéines, et que le microorganisme étudié est aérobic strict. Comme pour le cas de la croissance sur glucose, on ne pourra pas utiliser la mesure en ligne du quotient respiratoire pour savoir si les cellules sont en métabolisme de croissance ou de production de protéines.

Tableau III-6 : Comparaison des rendements en gaz et du quotient respiratoire entre croissance et production sur lactose pour le même rendement.

	croissance	production
rendement Y _{X/S} ou Y _{P/S} (g/g _S)	0.40	
rendement Y _{CO₂/S} (mmol/g _S)	20.4	19.3
rendement Y _{O₂/S} (mmol/g _S)	19.5	19.0
quotient respiratoire	1.05	1.02

A l'inverse, on a noté au paragraphe III.1.1.2.2 (page 68) que la teneur en azote est très différente dans la biomasse et dans les protéines. On pourrait donc différencier croissance et production si on était capable de mesurer en ligne la consommation de l'azote. Dans le protocole IFP Energies nouvelles, on peut facilement suivre la consommation d'ammoniaque, mais celle-ci est utilisée comme source d'azote ainsi que pour la régulation du pH, donc n'est pas directement proportionnelle à la quantité d'azote consommée par les cellules (cf. III.1.3.4, page 80)

1.2.3 Utilisation pour la définition des milieux de culture

1.2.3.1 Calcul de l'élément limitant

Le milieu liquide dans lequel le microorganisme est cultivé doit fournir tous les éléments nécessaires à son métabolisme sans limitation. La connaissance de la composition élémentaire de la biomasse ou des protéines permet de calculer les éléments nécessaires à fournir dans le milieu de culture.

Les milieux de culture utilisés dans la littérature dérivent tous du milieu initial décrit par (Mandels and Weber, 1969) et sont résumés dans le Tableau III-7. Les milieux notés B et C sont quasiment identiques au milieu de Mandels. Dans les milieux D et E, la quantité de chaque sel a été augmentée de 33%. Le milieu F est enrichi en azote et en phosphate. Le milieu 4N d'IFP Energies nouvelles correspond au milieu de Mandels doublé, et enrichi en oligoéléments.

Tableau III-7 : Synthèse des milieux de cultures utilisés dans la littérature pour les essais en fiole.

A (Gaunt et al., 1984; Mandels and Weber, 1969) - B (Juhasz et al., 2004; Juhasz et al., 2005b) - C (Ferreira et al., 2009) - D (Juhasz et al., 2005a) - E (Sipos et al., 2010) - F milieu utilisé par le VTT (Domingues et al., 2000) IFPEN : milieu IFP Energies nouvelles "4N" contenant 4mL/L de solution d'oligoéléments et utilisé à 50%v/v.

¹ajouté sous forme H₃PO₄ + KOH, équivalent à environ 4 à 5 g/L de KH₂PO₄.

²sous forme de CoNO₃·6H₂O 9g/L.

		A	B	C	D	E	F	IFPEN
sucre eq-glucose g/L		5	10	30	10	10	10	
Eléments principaux g/L	KH ₂ PO ₄	2.0			2.7		15	4 à 5 ¹
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1.4			1.9		5.0	2.8
	urée	0.3			0.4			
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.3		0.6	0.4	0.8	1.2	0.6
	CaCl ₂ ·2H ₂ O			0.4	0.5		0.8	0.6
	CaCl ₂	0.3						
oligoéléments mg/L	FeSO ₄ ·7H ₂ O	5		2.7	7		2.7	60
	MnSO ₄ ·H ₂ O		1.6		2		1.6	13
	MnSO ₄ ·4H ₂ O	2.1						
	ZnSO ₄ ·H ₂ O		1.4		2		1.4	
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.4						17
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	3.7	20	3.7	20	27	3.6	18 ²
autres g/L	Tween 80	?		2			0.5	
	extrait levure		0.25	0.3	0.3		0.3	
	peptone	?	0.75		1.0		0.75	
	cornsteep							1 à 2
	EDTA	0.025						

A partir de ces compositions, on peut calculer les concentrations des espèces ioniques présentes dans le milieu de culture, et les comparer au besoin pour produire de la biomasse et des protéines, afin de calculer quel est l'élément limitant du milieu et ainsi vérifier que les milieux sont corrects (Tableau III-8).

On remarque que:

- Les milieux décrits ne contiennent pas de sodium. Cependant, la soude est souvent utilisée pour ajuster le pH, et l'eau du robinet contient en elle-même une quantité suffisante de sodium.
- Tous les milieux apportent une source de calcium, ce qui est inutile si on utilise de l'eau du robinet (Le quantité de calcium dans l'eau du robinet peut être variable mais le besoin pour *T. reesei* est très faible). De plus les fortes concentrations en calcium entraînent la formation de précipités de phosphate de calcium lors de la stérilisation à chaud.
- Les milieux A à F n'apportent pas de cuivre, et des quantités limites de fer et de zinc. Ceci a été corrigé dans le milieu IFP dit 4N.
- Les éléments K, S, P, Mn, Mg sont apportés en quantité suffisante dans tous les milieux.
- L'élément limitant est l'azote, qui limite la croissance à 5.5 g/L de biomasse dans le milieu de Mandels, voire à 3.7 g/L dans le milieu IFP Energies nouvelles 4N si il est utilisé à 25% v/v. De plus ces valeurs sont calculées sans production de protéines associée, qui nécessite encore plus d'azote que la biomasse.

Par ailleurs, les fortes concentrations en sels pourraient ralentir le métabolisme des cellules, en raison de la force ionique du milieu de culture.

Tableau III-8 : Besoins en espèces ioniques pour former 10g/L de produit, concentrations dans les milieux de culture, et calcul de l'élément limitant.

	concentrations des espèces (mM)							concentration maximale de biomasse g/L				
	besoin pour 10g/L		eau du robinet ¹	milieux salins				ER	ABC	DE	F	IFP
	biomasse	protéines		ABC	DE	F	IFP					
N(urée)	57	91		10	13				5.5	7.4	13	7.4
N(NH4)				21	29	76	42					
K	6.4		0.05	15	20	110	30		23	31	172	46
P	4.8			15	20	110	37		31	41	230	77
S	0.8	3.1	0.31	12	18	43	24	4	150	230	550	300
Na	0.3		0.43				0.02	17				1
Mg	0.5		0.25	1.2	3.2	4.9	2.4	5	25	66	99	49
Fe(II)	0.07			0.02	0.03	0.01	0.22		3	4	1	30
Ca	0.05		2.25	2.7	3.4	5.4	4.1	410	490	620	990	740
Zn	0.02			0.00	0.01	0.01	0.06		2	5	4	27
Cu	5.10 ⁻³						0.02					51
Mn	5.10 ⁻³			0.01	0.12	0.09	0.06		32	410	320	220
Cl	?		0.56	5.4	7.0	10.9	8.2					

¹Teneur moyenne de l'eau du robinet à Paris (source: eaudeparis.fr).

Cependant, sans composé tampon pour stabiliser le pH, le métabolisme des cellules lors de cultures en fioles est avant tout limité par la baisse de pH due à la libération d'ions H⁺ associée à la consommation de l'azote sous forme ammonium. Le choix de ce composé tampon est donc primordial. Pour faciliter ce choix, il serait très pratique de pouvoir simuler l'évolution du pH au cours de la culture, selon la nature du composé tampon, la composition du milieu de culture, et le pH initial.

De plus, en bioréacteur, de l'azote est apporté en continu par la base utilisée pour la régulation du pH. Il est donc probable que l'azote ne sera pas limitant dans ce cas là. Pour vérifier cette hypothèse, et calculer quel est l'élément limitant, il est nécessaire de prendre en compte la régulation du pH au cours de la culture. Ceci nécessite aussi d'être capable de simuler le pH, afin de pouvoir calculer la quantité de base azotée utilisée pour la régulation, donc la quantité d'azote apportée au milieu.

Le mise en œuvre des simulations de pH et les résultats associés seront présentés au paragraphe III.1.3 (page 74).

1.2.4 Utilisation pour la miniaturisation du protocole fed-batch

L'équation stœchiométrique de la production sur lactose a été utilisée pour réaliser la miniaturisation du protocole de culture fed-batch dans des fioles plutôt qu'en bioréacteur. Ce sujet a fait l'objet d'une publication (Jourdié et al., 2012, disponible en Annexe, page 181).

Pendant la phase de production, la consommation de sucre est limitée par le débit d'alimentation. Comme la consommation d'azote est proportionnelle à la consommation de sucre, on peut utiliser l'équation-bilan stœchiométrique pour calculer la quantité d'azote nécessaire et l'ajouter avec le sucre dans l'alimentation.

On peut alors choisir une source d'azote neutre, en l'occurrence NH_3 , pour que sa consommation se fasse sans libération d'ions H^+ , ce qui permet une production de protéines en fed-batch sans acidification du milieu de culture. Ainsi, cette stratégie permet une stabilisation du pH sur de longues périodes lors de cultures en fioles, sans utiliser de système de contrôle du pH (ni sonde de pH, ni pompe supplémentaire pour la base).

La comparaison avec des cultures réalisées en bioréacteur (protocole classique IFP Energies nouvelles) a montré que ce nouveau protocole (fioles alimentées par un mélange stœchiométrique de lactose et d'ammoniaque) permet de retrouver en fiole des vitesses spécifiques de production de protéines aussi bonnes qu'en réacteur, grâce à la limitation en carbone et à la stabilisation du pH.

Ce nouveau protocole (par la suite nommé "fioles alimentées") peut donc être utilisé pour comparer soit différentes souches génétiquement modifiées sur un même substrat, soit différentes compositions de substrats avec une même souche (voir paragraphe IV.2 *Impact des mélanges de sucres*, page 134).

1.3 Simulation du pH

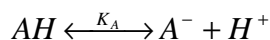
L'approche stœchiométrique pure par écriture des équations bilans ne suffit pas pour prendre en compte certains phénomènes liés au pH (limitation par l'acidification en fiole, ajout de nutriments par régulation du pH en réacteur). Un outil de simulation du pH a donc été mis au point, avec des hypothèses semblables à celles de (Akin, 2008).

1.3.1 Principe du simulateur de pH

1.3.1.1 Equations mathématiques

a *Équations d'équilibres des couples acide/base*

En solution, 2 espèces formant un couple acide/base AH/A^- sont en équilibre selon l'équation :



dont la constante d'équilibre K_A est régie par l'équation :

$$K_A = \frac{a_{\text{A}^-} \cdot a_{\text{H}^+}}{a_{\text{AH}}}$$

dans laquelle a_i est l'activité de l'espèce en solution i et s'écrit :

$$a_i = \gamma_i \cdot C_i$$

avec γ_i le coefficient d'activité de l'espèce i (en L/mol) et C_i sa molarité (en mol/L).

b *Force ionique*

Le coefficient d'activité γ_i traduit l'écart à l'idéalité en raison des interactions entre les différentes espèces en solution. Pour leur calcul, on utilise comme recommandé par l'IUPAC l'équation de Davies (Davies, 1962):

- 1. Étude stœchiométrique de la production -

$$\log(\gamma_i) = -0.509 z_i^2 \left(\frac{\sqrt{FI}}{1 + \sqrt{FI}} - 0.3 FI \right)$$

dans laquelle z_i est la charge de l'espèce i et FI est la force ionique de la solution :

$$FI = \frac{1}{2} \sum_i C_i z_i^2.$$

c Electroneutralité

La somme des charges de toutes les espèces en solution est obligatoirement nulle, donc :

$$\sum_i C_i z_i = 0$$

d Conservation de la matière

Le nombre de moles de toutes les formes acide/base d'une même espèce chimique en solution est égal au nombre de moles ajoutées initialement diminué du nombre de moles consommées par les réactions biologiques.

$$\sum_{Ai} n_{Ai}^{solution} = \sum_{Ai} n_{Ai}^{initiales} - \sum_{Ai} n_{Ai}^{consommées}$$

Alors, pour un couple acide base AH/A^- dont la somme des molarités vaut S , on a alors la relation suivante qui donne l'activité de AH en fonction de S :

$$a_{AH} = \frac{S}{\left(\frac{1}{\gamma_{AH}} + \frac{K_a}{a_{H^+}} \cdot \frac{1}{\gamma_{A^-}} \right)}$$

et la relation suivante dans le cas d'un di-acide $AH_2/AH^-/A^{2-}$ dont la somme des molarités vaut S

$$a_{AH_2} = \frac{S}{\left(\frac{1}{\gamma_{AH_2}} + \frac{K_{a1}}{a_{H^+}} \left(\frac{1}{\gamma_{AH^-}} + \frac{1}{\gamma_{A^{2-}}} \cdot \frac{K_{a2}}{a_{H^+}} \right) \right)}$$

et ainsi de suite pour les tri-acides voire quadri-acides, avec dans tous les cas :

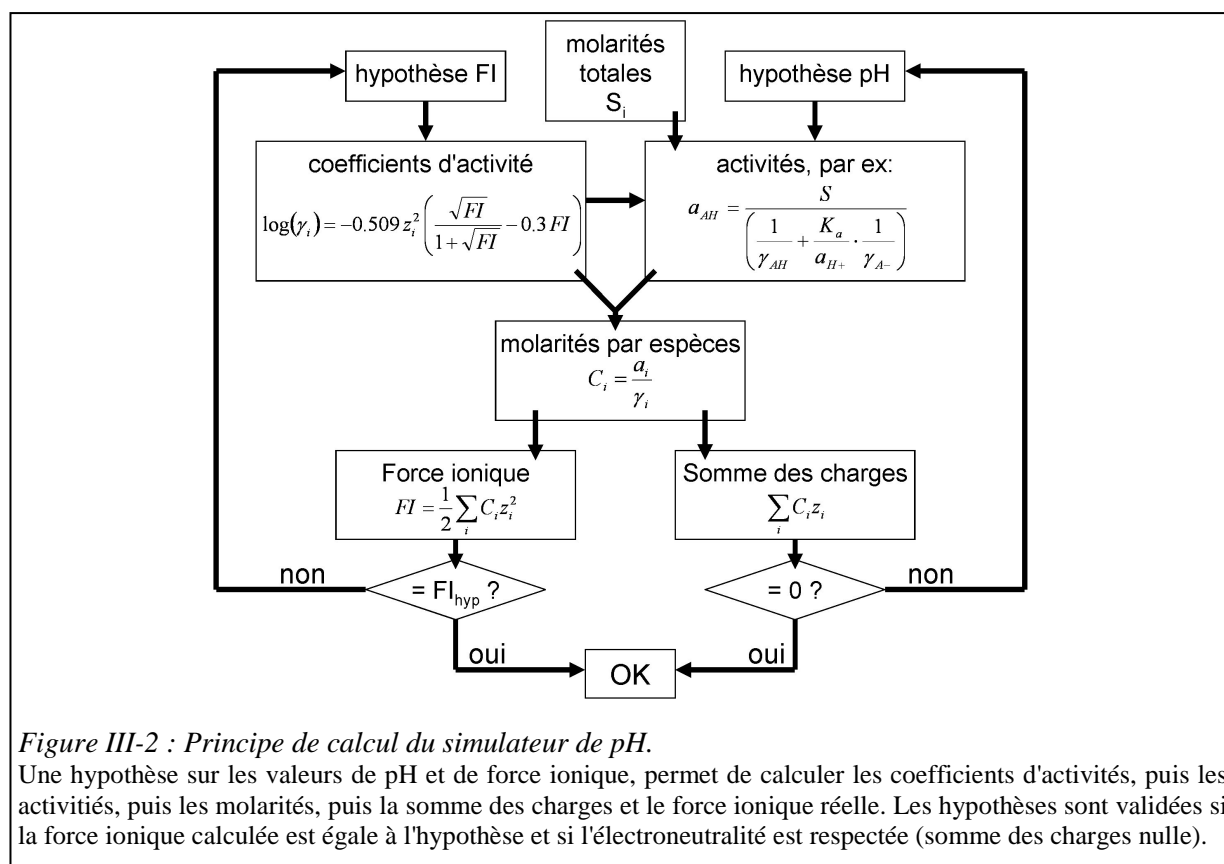
$$a_{H^+} = 10^{-pH} \text{ et } a_{OH^-} = 10^{pH - pK_e}$$

où K_e est la constante de dissociation de l'eau.

1.3.1.2 Méthode de calcul

Les étapes de calcul réalisées par le simulateur de pH sont schématisées Figure III-2, pour le cas standard où on cherche à calculer le pH d'une solution contenant des espèces acide/base dont la molarité totale est connue.

A partir d'une hypothèse sur la force ionique, on calcule les coefficients d'activités de chaque espèce (qui dépendent uniquement de la charge et non de l'espèce chimique). Puis, en rajoutant une hypothèse sur le pH, on peut calculer les activités des différentes espèces en solution, grâce aux pKa des couples acides-bases et à la molarité totale ajoutée au milieu. On calcule alors la concentration de chaque espèce des couples acide/base. Enfin, on peut calculer la somme des charges, et recalculer la force ionique. La valeur de pH est validée si l'électroneutralité est respectée et si la force ionique recalculée est égale à l'hypothèse initiale.



En pratique, le solveur de Excel (Microsoft) est utilisé pour résoudre le problème en faisant varier les hypothèses de force ionique et de pH. L'objectif est de minimiser la somme des charges pour valider l'équation d'électroneutralité. De plus, une contrainte est ajoutée pour que la force ionique recalculée soit égale à l'hypothèse initiale.

1.3.2 Validation du simulateur de pH

1.3.2.1 Sur solutions simples

Afin de valider le simulateur de pH, 24 solutions ont été préparées, contenant une seule espèce chimique en solution et parfaitement dissociée. Puis leur pH a été mesuré et comparé au pH simulé.

Trois espèces chimiques différentes (phosphate, phtalate, acétate) ont été utilisées, à 4 concentrations différentes (10, 20, 50 et 100 mM), d'une part sous forme acide majoritaire et d'autre part en mélange équimolaire forme acide / forme basique.

La précision de l'étape de préparation a été estimée à ± 0.01 unité de pH (par simulation pour une erreur de 5% sur les concentrations). Puis la précision de la mesure de pH a été mesurée à ± 0.02 unité de pH (par mesures répétées des tampons).

Les valeurs de pH mesurées pour ces 24 solutions ont été comparées aux valeurs simulées (Figure III-3). On observe un très bon accord entre simulation et mesure, avec une valeur moyenne des résidus à 0.00 ± 0.05 , pour des valeurs de pH comprises entre 3 et 7. La distribution des résidus est homogène en fonction du pH ainsi que du pouvoir tampon¹ des solutions mesurées.

¹ Le pouvoir tampon d'une solution représente sa capacité à lutter contre les changements de pH. Il peut être appréhendé comme la quantité théorique d'ions H⁺ à ajouter ou supprimer pour faire varier le pH de la solution de 1 unité. Il est calculé en dérivant la fonction pH=f([H⁺]), et en inversant la valeur de la dérivée obtenue au pH de la solution.

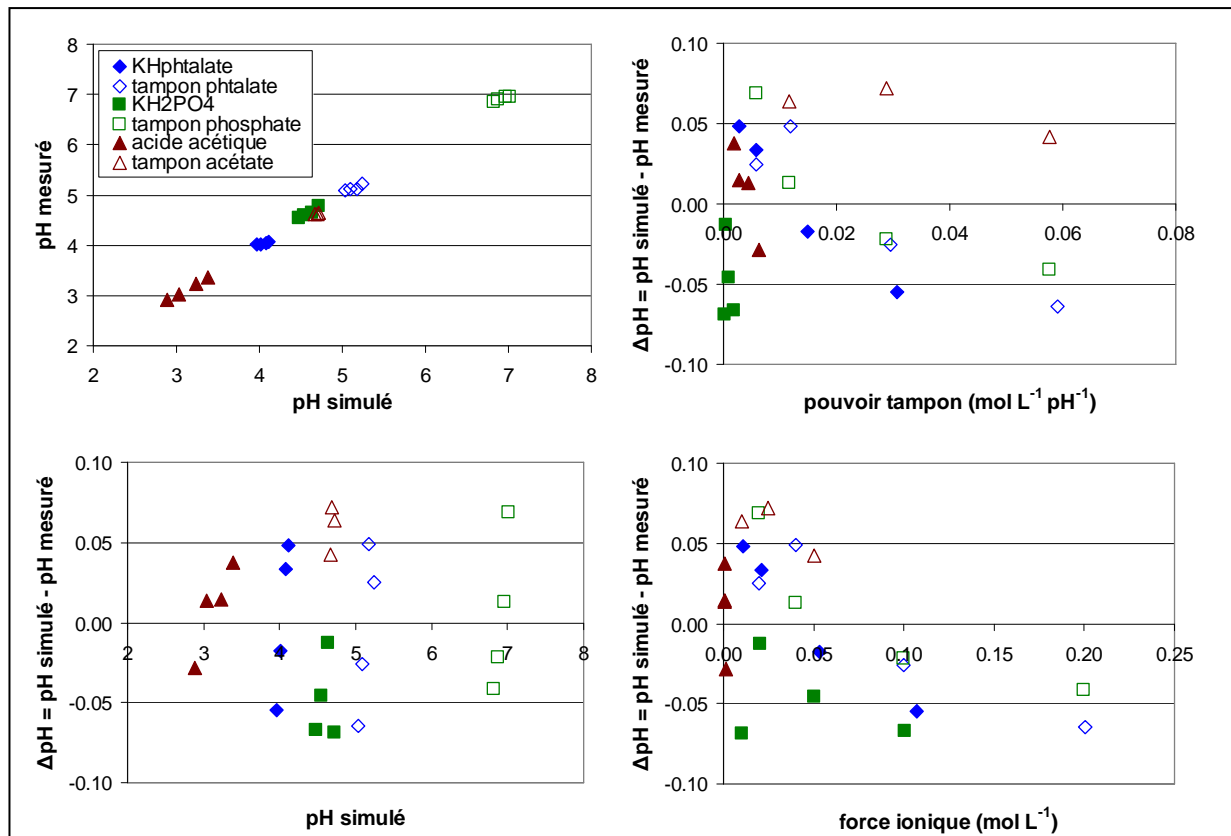


Figure III-3 : Validation du simulateur de pH pour solutions simples.

24 solutions de 3 espèces chimiques, à 4 concentrations différentes, et sous 2 répartitions acide/base ont été préparées, puis leur pH a été mesuré, et comparé au pH théorique calculé par le simulateur.

En revanche, on remarque une dérive des résidus vers des valeurs négatives pour une force ionique supérieure à 0.1, et ce quelle que soit le pH de la solution. Ceci peut être dû aux limites de l'approximation de Davies utilisée pour le calcul des coefficients d'activité.

1.3.2.2 Pour le pH initial des milieux de culture

Puis le pH simulé a été comparé au pH mesuré lors de la préparation de 2 milieux de culture classiques (Tableau III-9). Concernant la dissolution des sels, on observe un écart maximum de 0.1 unité de pH, en raison de l'accumulation des erreurs de préparation et de la dérive due à la force ionique supérieure à 0.2. Ensuite, l'ajout d'urée ne modifie pas le pH mais sa dégradation en CO_2 et NH_3 lors de la stérilisation ou par des uréases lors de la culture risque d'augmenter le pH. Enfin les composés complexes comme la peptone ou l'extrait de levure modifient beaucoup le pH, et ne peuvent pas être pris en compte dans les simulations.

Tableau III-9 : Comparaison des pH simulés et mesurés lors de la préparation de 2 milieux de culture. milieu B (Juhasz et al., 2004; Juhasz et al., 2005b) – milieu F (Domingues et al., 2000).

composé ajouté	milieu B			milieu F (VTT)		
	pH simulé	pH mesuré	écart	pH simulé	pH mesuré	écart
KH_2PO_4	4.67	4.66	0.01	4.48	4.47	0.01
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	4.65	4.62	0.03	4.46	4.44	0.02
MgSO_4	4.65	4.59	0.06	4.46	4.41	0.05
CaCl_2	4.64	4.55	0.09	4.46	4.38	0.08
urée	4.64	4.55	0.09			
peptone	ND	4.97		ND	4.84	
extrait de levure	ND	5.08				

De plus, les fortes concentrations de calcium et de phosphate entraînent la formation de précipités lors de la stérilisation à l'autoclave, et ce d'autant plus que le pH du milieu est élevé (phosphate sous forme PO_4^{3-}). (Gaunt et al., 1984) ont montré que la formation de précipité ne modifie pas la croissance. En revanche, ils peuvent modifier la valeur de pH.

1.3.2.3 En dynamique

a Hypothèse

Pour la simulation du pH au cours d'une culture, il n'y a pas forcément besoin d'une simulation parfaite d'une mesure brute du pH, du moment que le simulateur donne correctement l'évolution du pH au cours de la culture.

Ainsi, il est possible de modifier fictivement la définition du milieu de culture pour que le pH initial simulé corresponde au pH initial mesuré, en ajoutant :

- des cations (représentés par Na^+) si le pH initial simulé est inférieur au pH initial mesuré,
- des anions (représentés par Cl^-) si le pH initial simulé est supérieur au pH initial mesuré,

puis la simulation est réalisée en supposant que ces ions sont inchangés au cours de la culture (Akin, 2008).

Ces ions représentent à la fois les espèces présentes dans la peptone ou l'extrait de levure, les espèces qui forment des précipités, et l'erreur du simulateur due à la force ionique supérieure à 0.2.

b Comparaison des milieux

Afin de comparer mesure et simulation en dynamique, des croissances sur glucose ont été réalisées en fiole pour 4 milieux différents : les milieux B, F, et IFPEN déjà décrit précédemment, ainsi qu'un nouveau milieu nommé X20 car apportant tous les nutriments pour permettre une production de 20 g/L de biomasse (7.6 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.8g/L KH_2PO_4 , 0.24 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans de l'eau du robinet).

Pour n'observer que l'effet du milieu (et de ses composés complexes comme la peptone, l'extrait de levure et l'urée), ces 4 milieux contiennent la même quantité de tampon (phtalate 25mM) ainsi que d'oligoéléments (2mL/L de solution d'oligoéléments IFPEN)

Après ensemencement, chaque milieu a été séparé dans 7 fioles identiques, placées dans un incubateur rotatif à 150 rpm et 30°C. Des mesures du pH, de la biomasse produite, et des protéines produites (production non significative en l'absence de composé inducteur) ont été effectués toutes les 24 h en sacrifiant une fiole pour chaque milieu. Aucune évolution significative n'a été observée après 96 h de culture.

En parallèle, le simulateur de pH a été utilisé pour simuler l'évolution du pH en fonction de la concentration de biomasse produite, en utilisant la composition en sels des milieux (les éléments complexes ne peuvent pas être pris en compte), le pH initial des cultures, et la composition élémentaire de la biomasse décrite Tableau III-3 (page 68).

La comparaison des valeurs mesurées et simulées (Figure III-4) montre un bon accord pour les milieux purement salins (milieux IFPEN ou milieu X20, en bas), car l'évolution du pH par la consommation des ions NH_4^+ et PO_4^{3-} (principalement) est parfaitement prise en compte par le simulateur. En revanche, dès que le milieu contient une autre source d'azote (urée : milieu B), ou des composés complexes (extrait de levure : milieu B ; peptone : milieux B et F), la simulation du pH (basée uniquement sur les sels) ne permet pas une bonne prédiction de l'évolution réelle du pH, et ce même si on a calé le pH initial du simulateur avec la valeur de pH mesurée expérimentalement. En effet, le simulateur considère que tout l'azote est consommé sous forme ammonium, alors que dans ces milieux, il peut être consommé sous forme d'urée ou de peptone, sans baisse de pH associée. De plus, l'urée peut être dégradée par des uréases sécrétées, indépendamment de sa consommation.

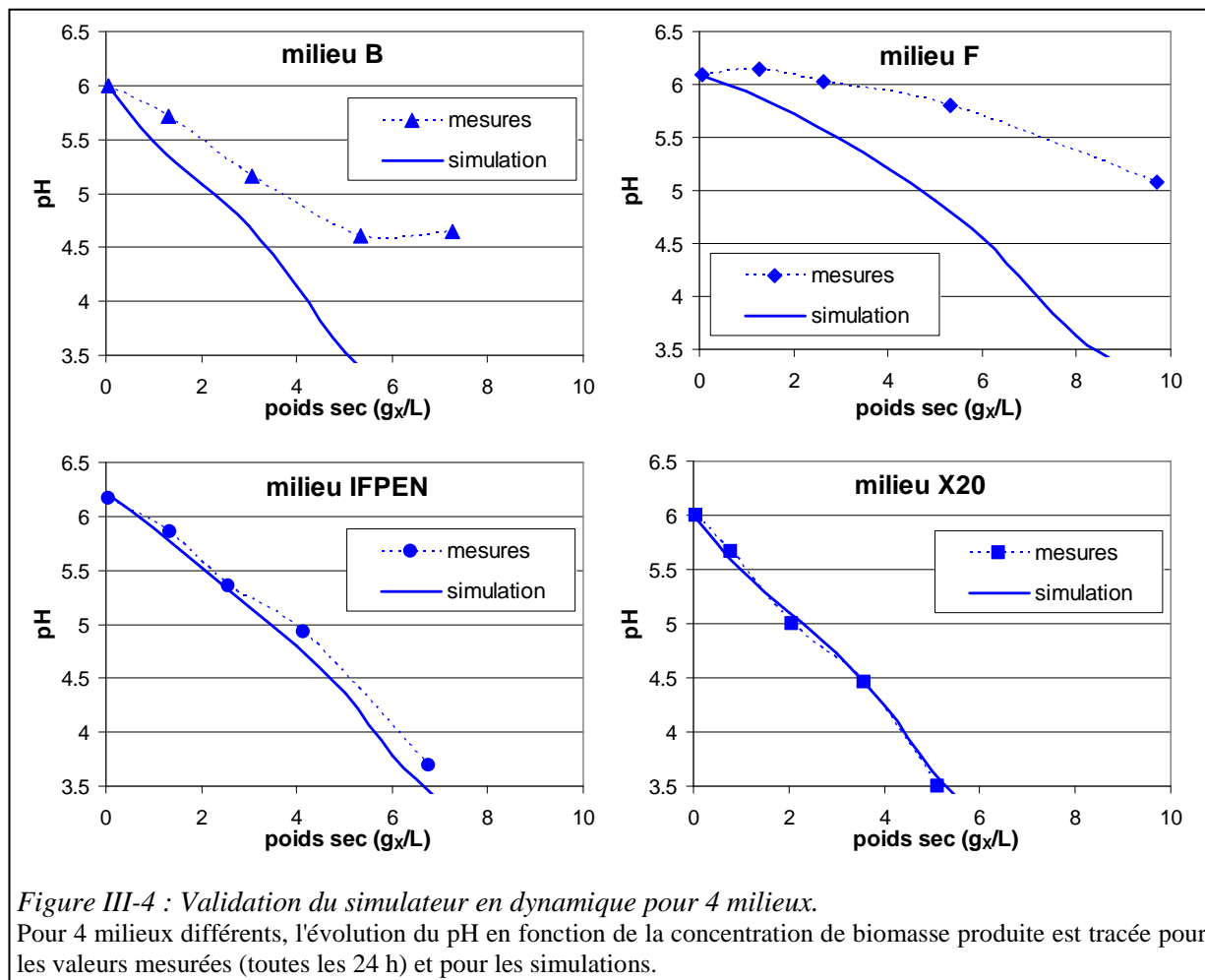


Figure III-4 : Validation du simulateur en dynamique pour 4 milieux.

Pour 4 milieux différents, l'évolution du pH en fonction de la concentration de biomasse produite est tracée pour les valeurs mesurées (toutes les 24 h) et pour les simulations.

Finalement, les expériences précédentes permettent de valider l'outil de simulation, pour des milieux de culture ne contenant pas de composés complexes, et une seule source d'azote sous la forme ammonium.

1.3.3 Utilisation pour les précultures en fioles

Le simulateur de pH peut être utilisé, dans le cas d'un milieu non complexe (milieu de culture IFPEN, Tableau III-7), pour simuler l'effet du tampon choisi pour stabiliser le pH, par exemple lorsqu'on réalise une préculture en fiole.

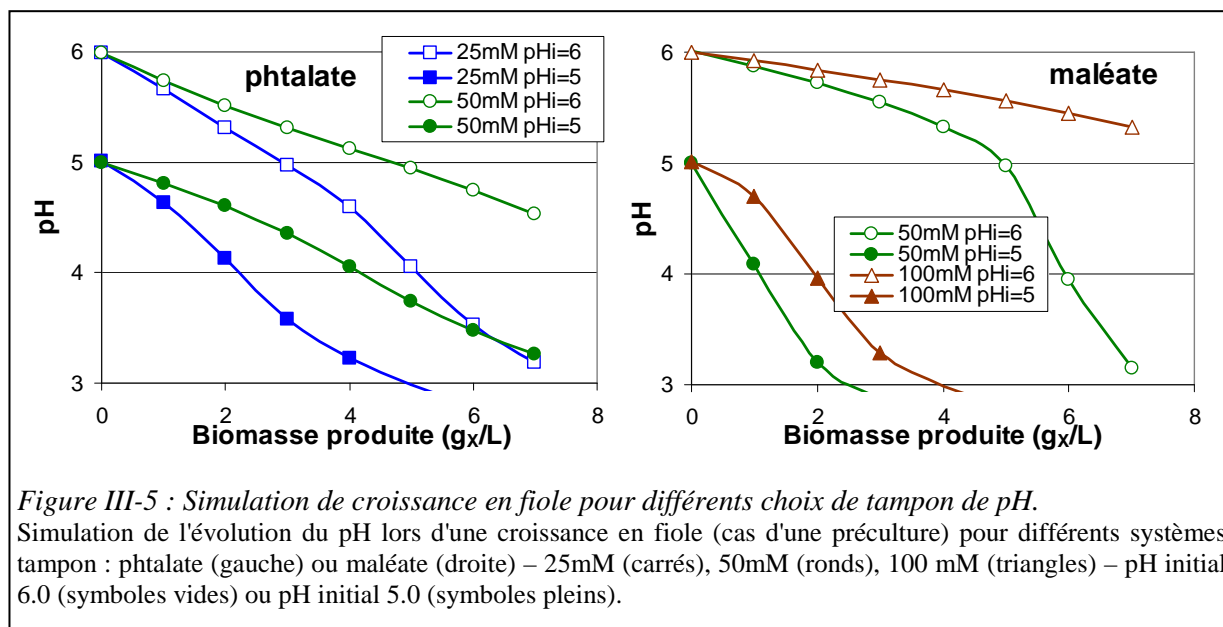
En effet, IFP Energies nouvelles utilise par habitude du phtalate à 25 mM, alors que dans la littérature le meilleur tampon reporté pour *T. reesei* est le maléate à 100 mM (Juhasz et al., 2004). Or on a remarqué que, même en présence de tampon, le pH baisse sensiblement pendant la préculture, en raison de l'acidification associée à la consommation d'ammonium NH_4^+ .

Les simulations de différentes options de tampon (nature, concentration, pH initial, Figure III-5) montrent que le maléate a un bon pouvoir tampon uniquement s'il est utilisé à 100 mM comme conseillé par Juhasz et al. (2004), et avec un pH initial à 6.0. Sinon le pH chute très rapidement, ce qui risque d'inhiber la croissance. Dans tout les cas, il permet de stabiliser le pH uniquement entre 5.0 et 6.0 et pas en dessous. Ceci est cohérent avec le fait que les pKa de l'acide maléique sont de 1.91 et 6.33.

L'acide phtalique, dont les pKa sont de 2.95 et 5.40, permet une meilleure stabilisation du pH entre 4.0 et 5.0, valeurs semblables à la consigne utilisée pour les cultures en fermenteur. Cependant à 25 mM et pH initial 5.0 (cas classique à IFP Energies nouvelles), la croissance va s'arrêter à environ

5 g_x/L (à pH 3.0), alors que la quantité d'azote présente permet en théorie 7.4 g_x/L. On aura donc intérêt à démarrer la préculture avec un pH initial de 6.0 si on veut améliorer la croissance, mais cela peut augmenter les risques de contamination.

D'autre part, d'autres effets doivent être pris en compte pour les précultures. En effet il a été remarqué que les cellules ont tendance à sporuler lorsqu'elles se retrouvent en limitation en azote et à haut pH (supérieur à 5.0). Il peut donc être utile de choisir un milieu de préculture dans lequel la croissance va s'arrêter avant la limitation en azote, à cause du pH bas, pour éviter que les cellules ne sporulent pendant la préculture.



1.3.4 Utilisation pour les cultures en bioréacteur

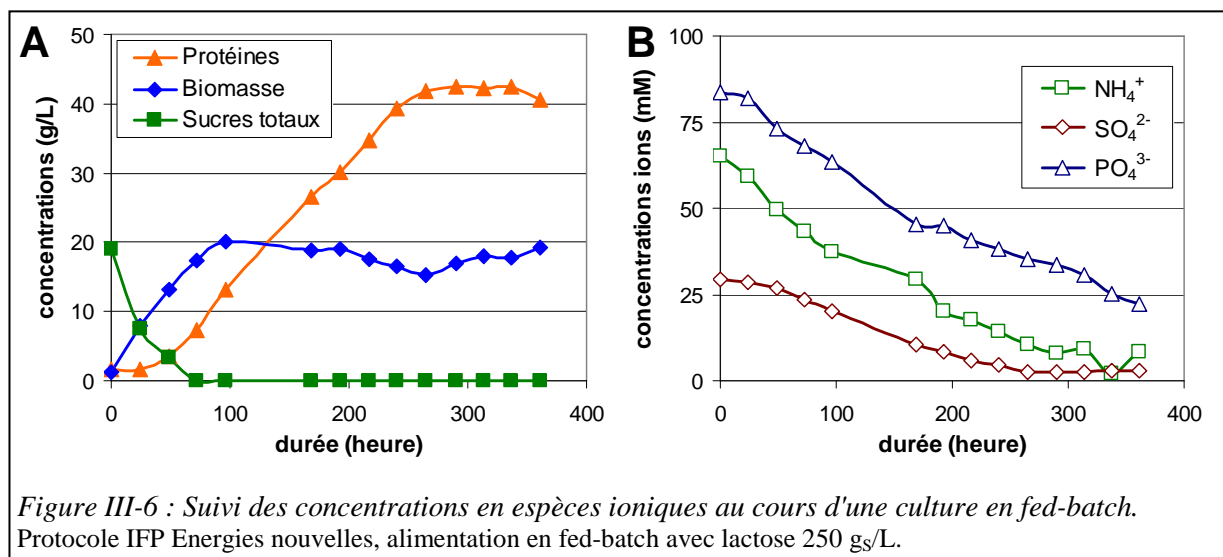
1.3.4.1 Problème de carences

Lors de certaines productions en fed-batch de longue durée, il a été observé que les concentrations en ammonium NH₄⁺ et sulfates SO₄²⁻ deviennent très faibles en fin de culture.

Dans l'exemple présenté Figure III-6, on observe même un arrêt de la production de protéines après 265 h, simultanément à la carence en sulfate. Alors, le sucre apporté par l'alimentation du fed-batch est toujours consommé (la concentration résiduelle reste nulle), mais pour faire de la croissance et non des protéines. Ceci est possible car la teneur en soufre dans la biomasse est bien plus faible que celle dans les protéines, et il est aussi possible que la composition de la biomasse change durant cette phase.

Comme le pH est contrôlé par ajout d'ammoniaque, le fait que la teneur en ammonium baisse n'est pas intuitif. En réalité, comme les teneurs en anions SO₄²⁻ et H₂PO₄⁻ (formes majoritaires à pH 4.0) baissent par dilution du milieu (par la solution d'alimentation) et par consommation (du soufre pour former les protéines et du phosphore pour former la biomasse), la concentration en cations doit elle aussi nécessairement baisser pour maintenir l'électroneutralité du milieu.

Dans tous les cas, la carence en soufre ou en azote est à proscrire pour éviter que la production ne s'arrête faute de nutriments essentiels. Ces carences pourraient aussi entraîner la production de protéases afin de reconsommer les protéines produites, ce qui n'est pas souhaitable pour la qualité du cocktail.



1.3.4.2 Étude des stratégies par simulation

Pour le cas d'une culture en bioréacteur, on peut utiliser le simulateur de pH pour calculer la quantité de base nécessaire pour le contrôle du pH, ainsi que l'évolution des concentrations des différentes espèces ioniques. Ceci a été réalisé pour le protocole IFP Energies nouvelles classique (comme présenté ci-dessus), afin de tester différentes stratégies pour empêcher les carences en fin de culture.

Pour une solution d'alimentation non complétée (Figure III-7 A), on retrouve bien une baisse de la concentration en ammonium et sulfate.

La première stratégie testée est d'acidifier la solution d'alimentation avec de l'acide chlorhydrique à hauteur de 0.1M (Figure III-7 B). Alors le système de contrôle de pH doit ajouter de la base en plus pour neutraliser la solution d'alimentation (environ 10% de base en plus). Comme la base utilisée est de l'ammoniaque, cette stratégie permet de stabiliser la concentration en ammonium. En revanche la concentration en sulfate conserve le même profil, car il est consommé pour satisfaire la demande en soufre pour les protéines.

On peut alors proposer de compléter la solution d'alimentation avec du sulfate pour satisfaire le besoin stœchiométrique en soufre pour les protéines. Pour une solution d'alimentation à 250 g_s/L, le besoin en soufre est de 33.4 mM. Si cette quantité est apportée sous forme de Na₂SO₄ (Figure III-7 C), cela permet de maintenir une bonne quantité de sulfate dans le milieu (la concentration baisse uniquement à cause de la dilution du milieu par la solution d'alimentation), mais la quantité d'ammonium suit le même profil que dans le cas de base, et pourrait se retrouver limitant.

Finalement, la meilleure stratégie consiste à compléter la solution d'alimentation avec du sulfate (toujours dans les proportions stœchiométriques pour les protéines), soit sous forme acide H₂SO₄, soit sous forme (NH₄)₂SO₄ (Figure III-7 D). Ceci revient strictement au même puisque dans le cas où on acidifie la solution par H₂SO₄, le système de contrôle du pH neutralise la solution par ajout de NH₃ une fois qu'elle est injectée dans le milieu. Ces deux options permettent de maintenir des concentrations en sulfate et en ammonium non limitantes.

Dans une optique procédé, on préférera l'option acide car la solution a alors un pH de l'ordre de 1.5, donc elle ne risque pas de se contaminer. A l'inverse, apporter de l'azote et du soufre dans une solution de sucre à pH neutre favoriserait énormément le développement de contaminants. De plus, le cas acide correspond aux hydrolysats chimiques issus de prétraitements acides, classiquement réalisés avec de l'acide sulfurique. Dans ce cas, il faut utiliser l'hydrolysats tel quel sans le neutraliser auparavant (sinon cela reviendrait au cas Na₂SO₄ Figure III-7 B).

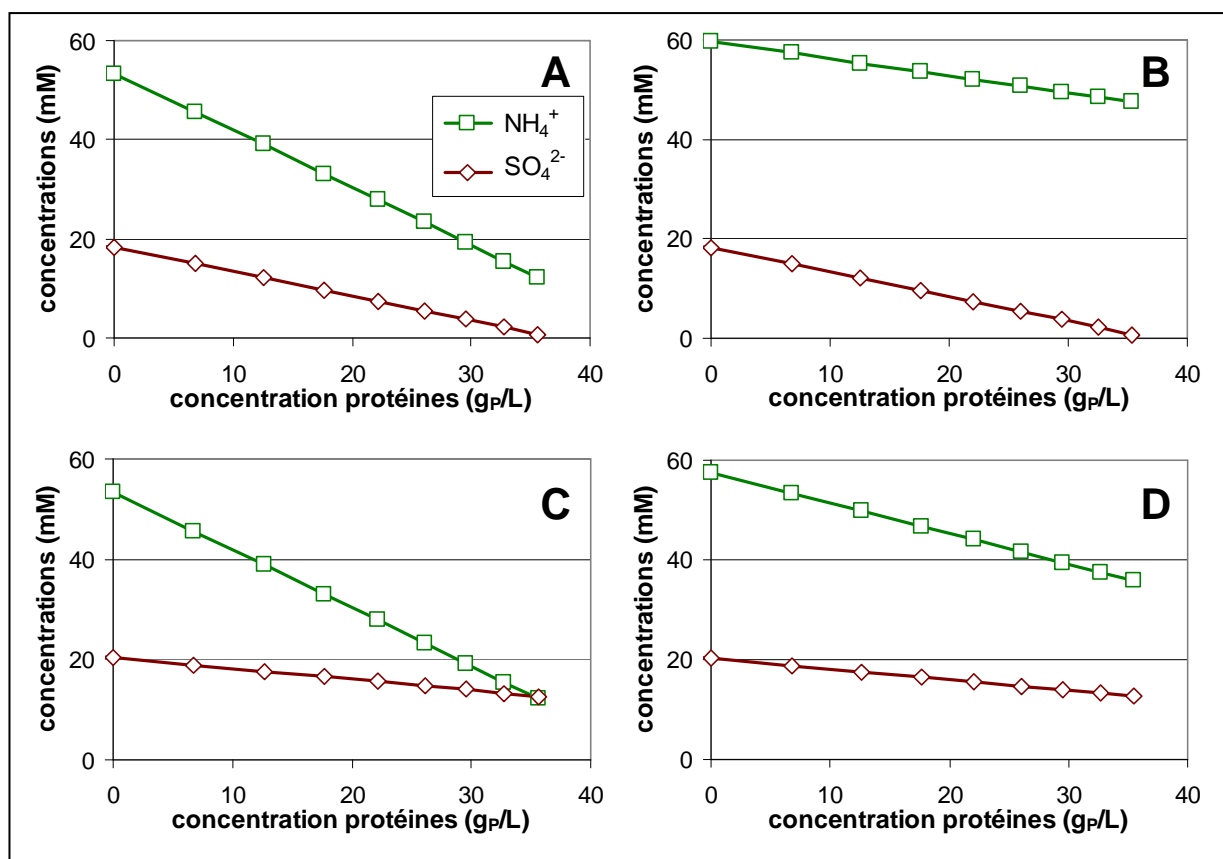


Figure III-7 : Simulations des concentrations ioniques pour différentes stratégies d'alimentation pour une production de protéines en fed-batch selon le protocole IFP Energies nouvelles, avec contrôle du pH à 4.0 par une solution d'ammoniaque 5M, et alimentation par une solution de lactose à 250 g_S/L :

A : non complétée

B : acidifiée par 0.1 M HCl

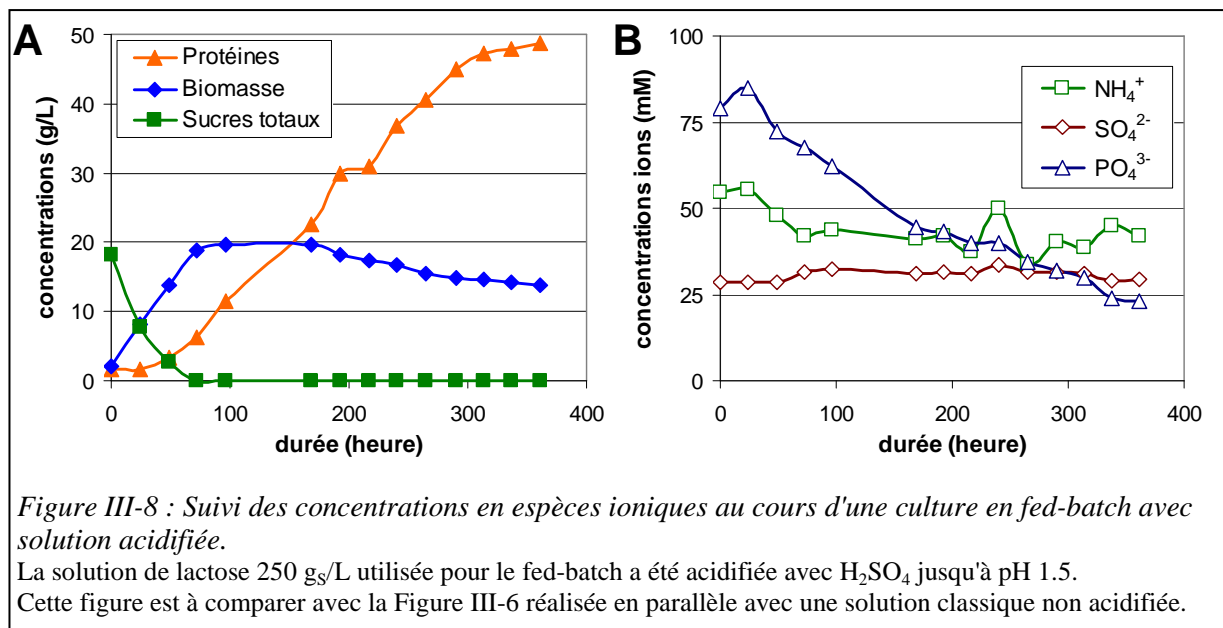
C : acidifiée par 50mM Na₂SO₄

D : acidifié par 33.4mM H₂SO₄ ou complétée par 33.4mM (NH₄)₂SO₄

1.3.4.3 Essai de la stratégie en bioréacteur

Cette stratégie a été testée en réacteur sur substrat synthétique. Le protocole de culture IFP Energies nouvelles a été utilisé, avec alimentation par une solution de lactose à 250 g_S/L acidifiée par de l'acide sulfurique jusqu'à pH 1.5.

Le suivi des concentrations en espèces ioniques (Figure III-8 B) a montré une bonne stabilisation des concentrations en sulfate et ammonium dans le milieu de culture, même en fin de culture. Le suivi des concentrations en biomasse et protéines (Figure III-8 A) montre que la production continue, sans shift vers la production de biomasse. On observe cependant un léger ralentissement de la production après 300 h, qu'on ne peut pas expliquer par une carence en nutriments essentiels.



1.4 Conclusion sur l'étude de la stœchiométrie

Pour commencer cette étude, la stœchiométrie des réactions de croissance et de production a été établie. La mesure des compositions élémentaires des cellules de *T. reesei* et des protéines sécrétées n'a pas montré de différence significative selon les souches et les conditions de culture. Ceci permet d'écrire ces 2 réactions sous la forme d'équations stœchiométriques, dont les valeurs des coefficients peuvent être calculées à partir du rendement de conversion du substrat en produit.

Les rendements de consommation d'oxygène ou de production de CO₂ sont semblables entre croissance et production, ce qui ne permet pas d'utiliser l'analyse en ligne des gaz comme capteur du métabolisme instantané.

Les milieux de culture classiquement utilisés pour *T. reesei* sont très limités en azote, ce qui peut poser problème pour les cultures en fiole, d'une part en limitant la croissance, d'autre part en entraînant des sporulations. Ceci peut être corrigé en apportant plus d'ammonium dans le milieu de culture initial. Mais dans tous les cas, le choix du tampon de pH est primordial pour éviter l'inhibition du métabolisme par l'acidification du milieu.

Pour étudier les modifications de pH lors de la culture, un outil de simulation de pH a été développé. Couplé à la stœchiométrie, il permet de prédire l'évolution du pH au cours d'une culture en fiole (par exemple pour différents tampons de pH), ou la consommation de base au cours d'une culture en bioréacteur à pH régulé.

L'équation stœchiométrique de la production de protéines a été utilisée pour miniaturiser le protocole de production en bioréacteur à l'échelle de la fiole. En effet la réalisation d'un fed-batch avec un apport stœchiométrique de substrat carboné et d'azote sous forme neutre NH₃ permet de conserver un pH stable sur une longue période, sans système de contrôle du pH. Cette stratégie facilite la réalisation de fed-batch en fiole.

En phase de production en bioréacteur avec protocole fed-batch, l'azote ou le soufre peuvent se retrouver limitant en fin de culture. Ceci peut être corrigé en acidifiant la solution d'alimentation avec un apport stœchiométrique d'acide sulfurique H₂SO₄.

Les compositions élémentaires de la biomasse et des protéines mesurées dans cette partie seront utilisées lors des cultures en bioréacteur, afin de vérifier la validité des mesures expérimentales par le calcul des bilans matières.

2 Étude cinétique et modélisation du métabolisme en production

*Pour rechercher le meilleur protocole de production, il est nécessaire d'avoir une connaissance précise du métabolisme dans toutes les conditions envisageables pour la production. Or dans la littérature, le métabolisme de *T. reesei* en production d'enzymes est mal caractérisé aux faibles taux de croissance observés en protocole fed-batch.*

*Dans toute cette partie, le terme biomasse désigne les cellules de *T. reesei* mises en culture pour la production de protéines.*

2.1 Étude détaillée du protocole industriel en fed-batch

2.1.1 Protocole de culture

Le protocole industriel IFP Energies consiste en une phase de croissance en batch sur glucose sans limitation jusqu'à épuisement du sucre (ou une concentration résiduelle inférieure à 5 g_s/L), suivie d'une phase de production en fed-batch avec alimentation à débit constant par une solution de lactose à 250 g_s/L (Figure I-9, page 41).

Cette stratégie a été appliquée pour 2 cultures en bioréacteur Dasgip (volume 1 L) mais avec un débit d'alimentation variable plutôt que constant, afin d'observer plus d'états métaboliques différents. Après 21 h d'alimentation à débit constant (1 mL/h, entre 27 h et 48 h de culture), deux stratégies ont été appliquées :

- dans l'expérience FB1, le débit est modifié brusquement à 2 mL/h à 48 h puis 3 mL/h à 72 h ;
- dans l'expérience FB2, le débit est augmenté linéairement de 1.5 mL/h à 48 h à 3.5 mL/h à 96 h puis laissé constant à 3.5 mL/h.

2.1.2 Suivi des concentrations et bilans globaux

2.1.2.1 Suivi des concentrations

Les évolutions des concentrations sont très proches dans les deux expériences (Figure III-9), et cohérentes avec les observations classiques du protocole IFP Energies nouvelles (Pourquié et al., 1988).

Pendant la phase de croissance en batch, le glucose présent initialement est consommé pour former environ 7g/L de biomasse. Aucune production de protéines n'est observée pendant cette phase, en raison de la répression de la production due à la présence de glucose (Suto and Tomita, 2001) (environ 3 g/L résiduels au moment du démarrage de l'alimentation, à 27 h).

Après 48 h, le sucre résiduel est nul et le reste pendant toute la suite de l'expérience. Ainsi entre 48 h et 250 h tout le lactose apporté par l'alimentation du fed-batch ne s'accumule pas dans le réacteur, mais est directement consommé par les cellules.

La concentration en biomasse augmente progressivement et se stabilise à environ 15 g/L. La production de protéines démarre dès le début de l'alimentation, grâce à l'effet inducteur du lactose, et la concentration en protéines augmente quasi linéairement.

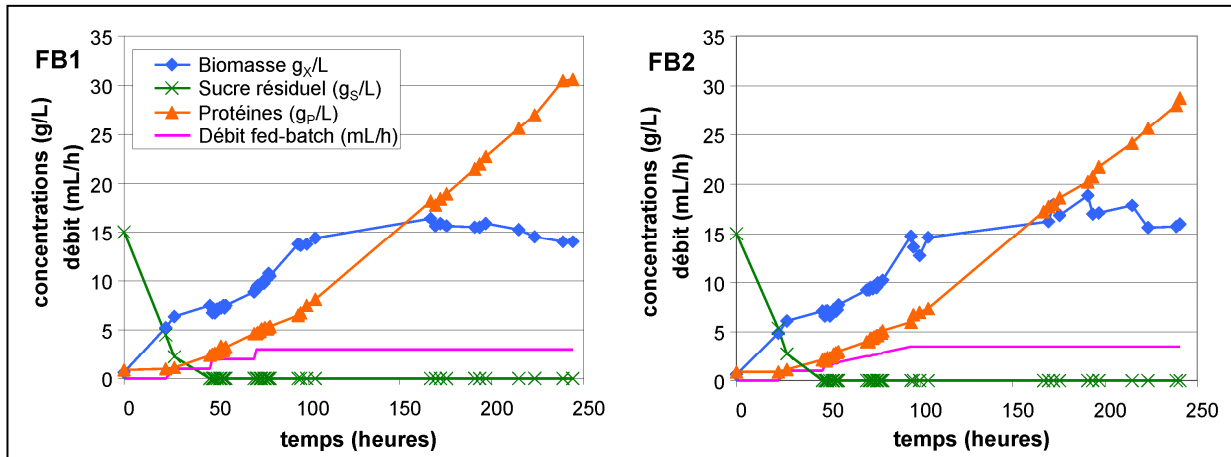


Figure III-9 : Étude du métabolisme en fed-batch : (a) débits d'alimentation et suivi des concentrations.

Suivi des concentrations de biomasse, protéines et sucre résiduel pour deux expériences en fed-batch avec des profils d'alimentation différents (escalier pour FB1 à gauche, rampe pour FB2 à droite).

Croissance en batch sur glucose à pH 4.8 et 27°C pendant 27 h, puis production à pH 4.0 et 25°C avec alimentation par une solution de lactose à 250 g/L.

2.1.2.2 Bilans volumiques

A partir du volume initial et de la somme des volumes ajoutés (alimentation du substrat et base pour la régulation du pH) ou soutirés (prélèvements pour analyse hors ligne), le volume final théorique peut être calculé. La différence avec le volume final réel mesuré en fin d'expérience donne le débit d'évaporation dû à l'aération : 0.50 ± 0.02 mL/h. Cette valeur est cohérente avec la mesure de la teneur en oxygène des gaz qui passe de 21% dans l'air sec à 20.6% dans l'air humide en sortie de fermenteur sans réaction biologique (ce qui correspond à un débit de vapeur d'eau de 0.48 mL/h). Comme le débit d'aération est quasiment constant, on fait l'hypothèse que le débit d'évaporation est constant au cours de l'expérience. On peut alors calculer le volume du réacteur au cours du temps (Figure III-10).

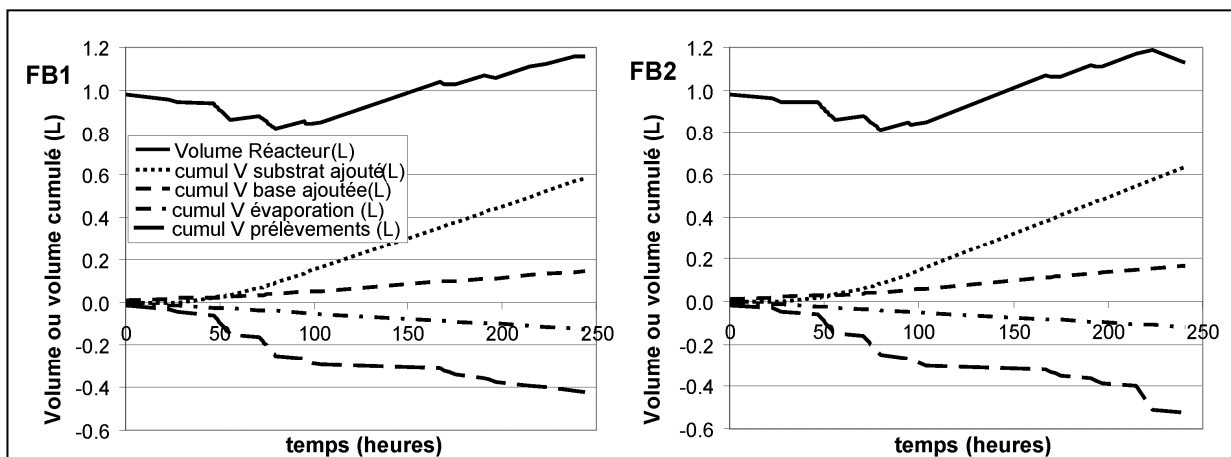


Figure III-10 : Étude du métabolisme en fed-batch : (b) bilans des volumes.

Le volume du réacteur au cours du temps a été calculé à partir de la mesure des volumes prélevés et ajoutés (base et substrat), et du calcul de l'évaporation.

2.1.2.3 Bilans carbone globaux

A partir des volumes au cours du temps, des mesures de concentrations en biomasse et protéines, des analyses des gaz, et des compositions élémentaires (III.1.1, page 67), on peut calculer les bilans carbone globaux de chaque culture (Tableau III-10). Ceux-ci sont très bons (moins de 1% d'erreur) ce qui valide la qualité des mesures expérimentales réalisées.

Tableau III-10 : Étude du métabolisme en fed-batch : (c) calcul des bilans carbone
Bilan carbone globaux (croissance et production) pour les expériences FB1 et FB2.

		Sucre	Biomasse	Protéines	CO ₂	Bilan Carbone
FB1	masse (g _C)	- 54.8	8.9	17.1	29.3	100.9%
	rendement (g _C /g _C)		0.16	0.31	0.53	
FB2	masse (g _C)	- 59.3	10.4	16.7	32.0	99.7%
	rendement (g _C /g _C)		0.18	0.28	0.54	

Comme *T. reesei* ne produit ni ne consomme de coproduits carbonés (par exemple des acides organiques), il a été décidé d'utiliser le bilan carbone instantané comme critère de minimisation pour le calcul des vitesses spécifiques selon une nouvelle méthode mathématique.

2.1.3 Calcul des vitesses spécifiques instantanées

2.1.3.1 Méthode mathématique de calcul

Les vitesses spécifiques attendues en protocole fed-batch avec *T. reesei* sont très faibles (comprises entre 0 et 30 mg g_x⁻¹ h⁻¹), il a donc été nécessaire de développer un algorithme dédié pour les calculer avec une bonne précision, et sans modèle a priori.

Tout d'abord, il est nécessaire de prendre en compte toutes les modifications de volume au cours de la culture. En particulier les prélèvements entraînent des discontinuités de volume, et donc de masse présente dans le réacteur, et le volume associé n'est pas négligeable par rapport au volume liquide dans le réacteur. Par ailleurs, du liquide est apporté en continu par l'alimentation du fed-batch et par la base utilisée pour la régulation du pH. Enfin, l'aération dans le réacteur entraîne de l'évaporation (vapeur d'eau dans les gaz de sortie). Il a donc été décidé de réaliser une simulation complète du protocole expérimental, qui prenne en compte tous les volumes apportés ou soutirés et leur composition, dans le but de réaliser une régression des concentrations mesurées. En effet, à partir des volumes mesurés et d'une hypothèse sur les vitesses spécifiques, on peut simuler le protocole expérimental pour calculer les concentrations et les comparer aux concentrations mesurées réellement.

Cependant, les concentrations en biomasse et protéines sont mesurées de façon discontinue lors des prélèvements, alors que l'on souhaite calculer les vitesses spécifiques en continu tout au long de la culture. Sans autre contrainte que l'accord entre concentrations simulées et concentrations mesurées en discontinu aux temps des prélèvements, le calcul des vitesses spécifiques en continu n'est pas solvable. Classiquement, on utilise un modèle cinétique a priori pour les vitesses spécifiques pour contraindre le système à résoudre (par exemple pour une identification de paramètres). Mais le but de cette étude est justement de mesurer les vitesses spécifiques "vraies", sans modèle a priori. Il est donc nécessaire de trouver une autre contrainte, mesurée en continu, pour résoudre le système

La principale idée de la méthode mathématique proposée ici est d'utiliser la vitesse de production de CO₂, mesurée en continu par la teneur en CO₂ des gaz de sortie, dans le calcul des vitesses spécifiques. Classiquement le bilan carbone est utilisé pour vérifier la qualité des mesures, voire pour déterminer les éventuelles erreurs de mesure, dans une démarche de réconciliation des données (Van der Heijden et al., 1994a; Van der Heijden et al., 1994b; Van der Heijden et al., 1994c). De façon

semblable ici, le bilan carbone instantané peut être calculé en continu pour le protocole simulé, en utilisant d'une part des vitesses mesurées (substrat et CO₂) et d'autre part des vitesses simulées (biomasse et produit), et peut donc être intégré comme critère pour la simulation.

Le détail de la méthode mathématique est schématisé Figure III-11. A partir d'une hypothèse sur les vitesses spécifiques de production de biomasse μ et de protéines q_p au cours du temps, et du protocole de culture détaillé (prélèvements, fed-batch, base, évaporation), on peut réaliser une simulation complète du protocole expérimental, qui donne les valeurs des concentrations et des vitesses volumiques, de biomasse et de protéines, au cours du temps. Les concentrations simulées sont classiquement comparées aux concentrations mesurées, avec un critère de minimisation des moindres carrés. Les vitesses volumiques simulées (biomasse, protéines) sont utilisées avec les vitesses mesurées (substrat, CO₂) pour calculer le bilan carbone instantané. Un critère de minimisation complet est utilisé, qui donne des poids différents aux critères discontinus liés aux concentrations et au critère continu lié au bilan carbone.

En pratique, Matlab 7.0 est utilisé pour réaliser les simulations complètes du protocole expérimental, et pour réaliser la minimisation avec la fonction *fmincon*. L'algorithme est relancé plusieurs fois, en ajustant à la main les valeurs des poids de chaque critère, afin de trouver le bon équilibre entre accord des concentrations et accord des vitesses (l'accord ne peut pas être parfait pour les deux en raison des erreurs expérimentales). La sortie finale de l'algorithme consiste en deux vecteurs donnant l'évolution au cours du temps du taux de croissance μ et de la vitesse spécifique de production de protéines q_p .

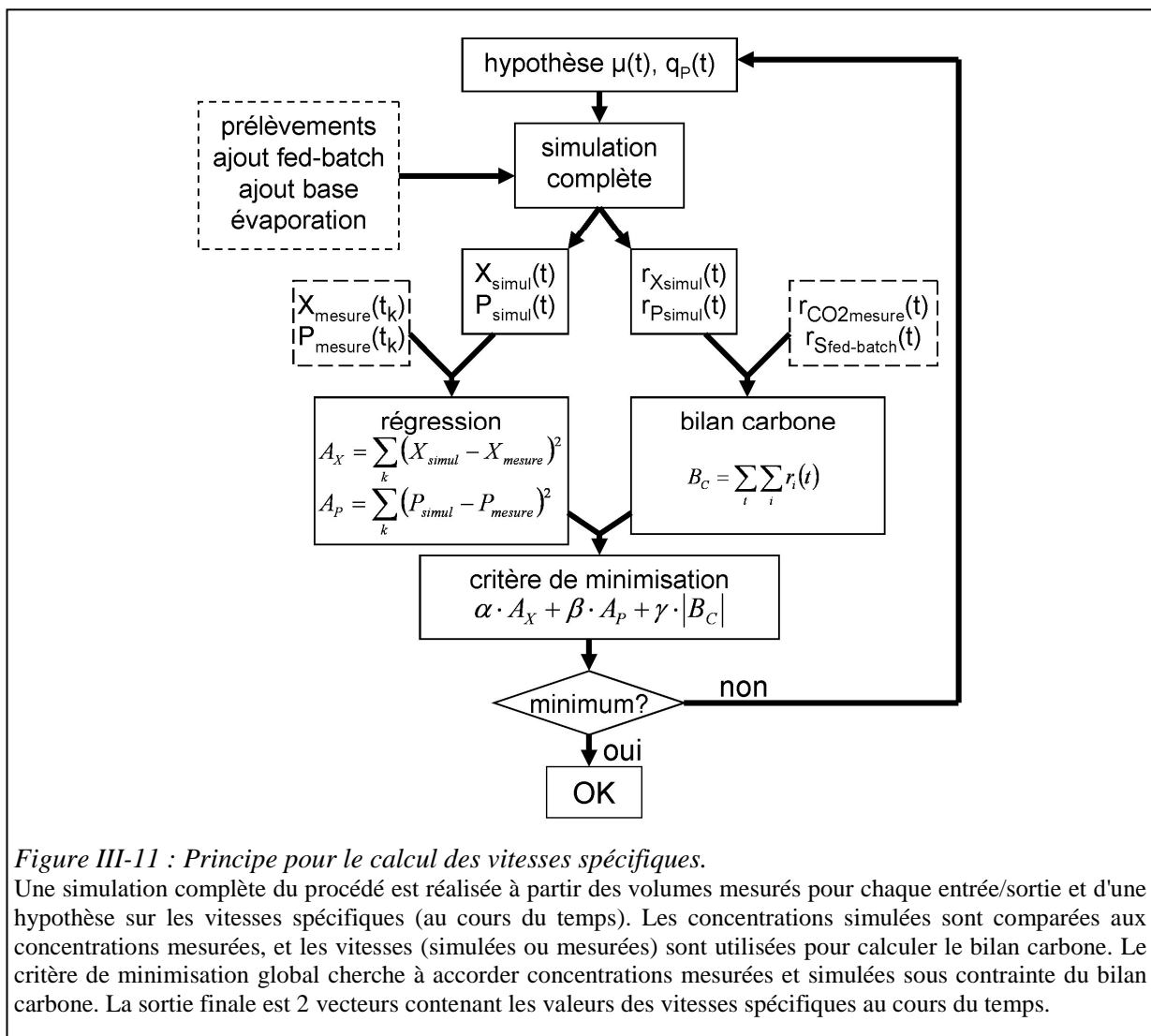


Figure III-11 : Principe pour le calcul des vitesses spécifiques.

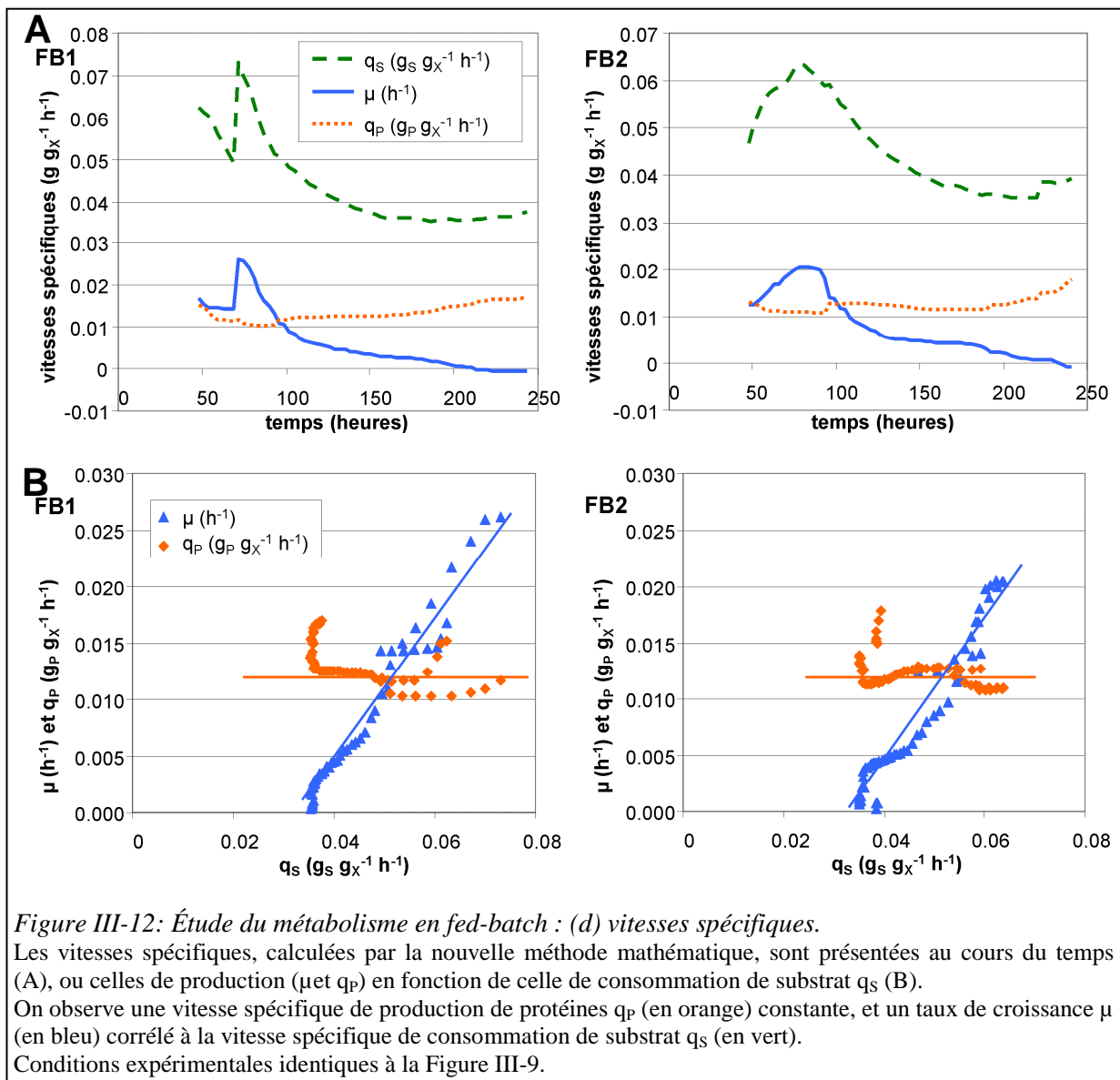
Une simulation complète du procédé est réalisée à partir des volumes mesurés pour chaque entrée/sortie et d'une hypothèse sur les vitesses spécifiques (au cours du temps). Les concentrations simulées sont comparées aux concentrations mesurées, et les vitesses (simulées ou mesurées) sont utilisées pour calculer le bilan carbone. Le critère de minimisation global cherche à accorder concentrations mesurées et simulées sous contrainte du bilan carbone. La sortie finale est 2 vecteurs contenant les valeurs des vitesses spécifiques au cours du temps.

2.1.3.2 Valeurs des vitesses spécifiques

Le calcul des vitesses spécifiques avec l'algorithme décrit ci-dessus a été réalisé uniquement sur la partie en limitation de carbone, après 48 h de culture. Les résultats sont présentés Figure III-12.

La vitesse spécifique de consommation de substrat lactose q_S est inférieure au maximum mesuré en croissance sans limitation, de l'ordre de 120 à 140 $\text{mg g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ (Lo et al., 2010b), ce qui est cohérent avec les mesures de concentration résiduelle en sucres dans le réacteur : les cellules sont bien en limitation par la source de carbone, et le sucre apporté est directement consommé. De plus, pendant la phase finale avec débit d'alimentation constant (entre 150 et 250 h), cette vitesse spécifique se stabilise vers 35 $\text{mg}_S \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$, soit une valeur identique au flux optimal conseillé dans le protocole breveté par IFP Energies nouvelles (Warzywoda et al., 1988).

La vitesse spécifique de croissance (ou taux de croissance) μ varie entre 0 et 0.025 h^{-1} , soit une plage de variation qui n'avait pas été caractérisée jusque là dans la littérature. On observe une bonne corrélation linéaire entre le taux de croissance μ et la vitesse spécifique de consommation de substrat q_S : le taux de croissance μ "subit" les variations de la vitesse spécifique de consommation de substrat q_S (elle-même imposée par le débit de fed-batch limitant).



La vitesse spécifique de production de protéines q_p est quasiment constante au cours du temps (moyenne: $12.3 \pm 1.1 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$), et sur toute la plage de taux de croissance μ observée. On n'observe aucune corrélation de la vitesse spécifique de production de protéines q_p ni avec le taux de croissance μ ni avec la vitesse spécifique de consommation de substrat q_s . Or, l'induction de la production est à son maximum grâce au pouvoir inducteur du lactose et à la limitation en carbone imposée, donc la capacité de production des cellules est limitée par un autre phénomène. Comme le métabolisme du lactose n'est pas limitant ici (car la capacité maximale de consommation de sucre d'environ $140 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ n'est pas atteinte), on peut en conclure que, à forte induction par le lactose, **la production de protéines est limitée par la synthèse ou la sécrétion des protéines**. Alors si le flux de sucre est supérieur à la quantité nécessaire pour la production limitée de protéines ($q_s > 35 \text{ mg}_s \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ dans les 2 expériences), le sucre restant est utilisé pour la croissance de cellules (d'où $\mu > 0$).

En fin d'expérience (entre 200 et 250 heures), l'augmentation de la vitesse spécifique de production de protéines q_p , associée à un taux de croissance μ négatif, est surprenante. On peut émettre l'hypothèse que pendant les 200 premières heures (où μ est légèrement supérieur à 0), les cellules ont stocké du carbone sous forme de réserves, et que quand le taux de croissance μ devient nul (à 200h), les réserves sont métabolisées en plus du sucre fourni, ce qui entraîne une diminution de la masse de biomasse (d'où le $\mu < 0$), associée à une production supplémentaire de protéines.

Ce phénomène (augmentation transitoire de la production quand μ devient nul) est souvent observé juste après le lancement du fed-batch, et associé probablement à tort à une induction plus forte au démarrage du fed-batch. Le fait qu'on l'observe ici bien après la mise en présence de l'inducteur prouve que ces phénomènes ne sont pas liés. De plus, on observe souvent que les cellules ont des densités différentes suivant la phase: la densité est inférieure à l'eau pendant la croissance (ou en protocole continu) mais est supérieure en fin de fed-batch. Cette modification de densité pourrait elle-aussi être expliquée par la consommation de réserves s'il s'agit de réserves lipidiques. Dans tous les cas, l'utilisation des réserves est un phénomène transitoire qui peut difficilement être mis à profit pour augmenter la productivité sur une longue durée.

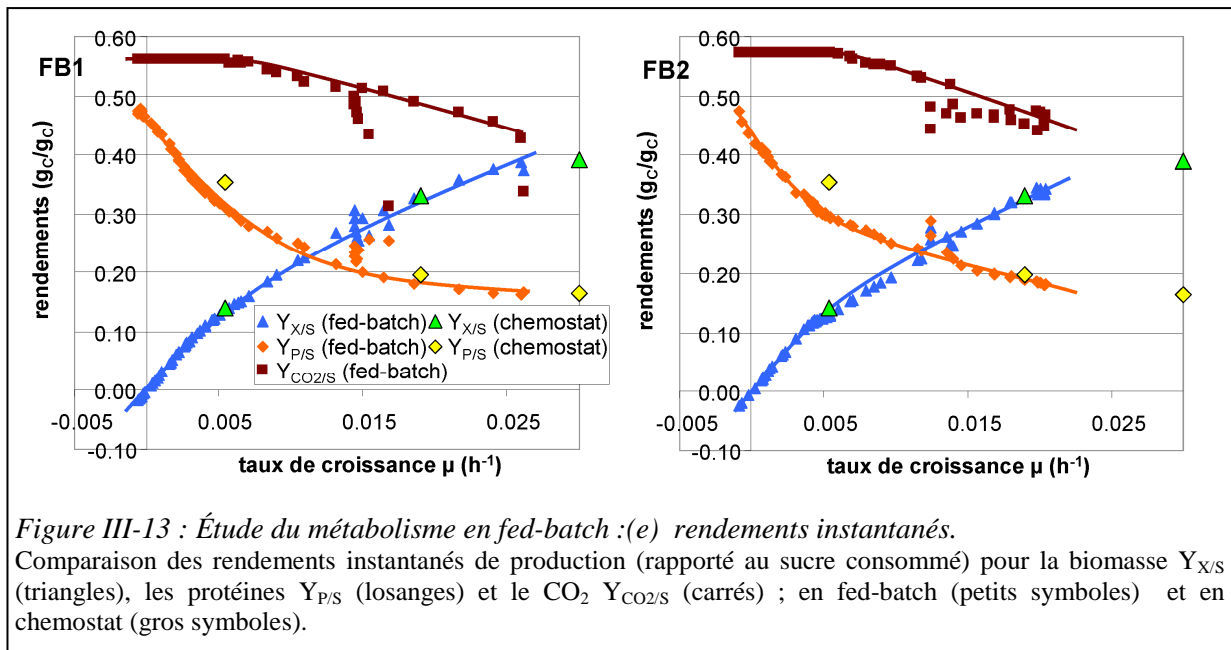
2.1.4 Validation du protocole d'étude

Pour valider le protocole d'étude en fed-batch, les rendements instantanés calculés à partir des vitesses spécifiques instantanées ont été comparés aux rendements mesurés en chemostat pour des taux de croissance comparables.

Pour cela, deux cultures en chemostat ont été réalisées, la première avec un taux de dilution de 0.019 h^{-1} , la deuxième en deux phases, avec un taux de dilution initial à 0.030 h^{-1} qui a été par la suite diminué à 0.010 h^{-1} . Sur cette dernière phase, l'état stationnaire n'a pas été atteint (cela aurait nécessité 500 h de culture sans problème), et le taux de croissance moyen mesuré était de 0.005 h^{-1} .

On observe que le rendement de production de protéines $Y_{p/s} = q_p/q_s$ diminue rapidement quand le taux de croissance μ augmente (Figure III-13 losanges). En effet, on a observé précédemment que quand le taux de croissance μ augmente, la vitesse spécifique de consommation de substrat q_s augmente, alors que la vitesse spécifique de production de protéines q_p reste constante, d'où la baisse de rendement observée.

Par ailleurs, on observe un très bon accord entre les rendements mesurés en fed-batch et en chemostat (Figure III-13 comparaison entre petit et gros symboles). Ceci valide le protocole d'étude choisi, en dynamique, et le traitement mathématique utilisé pour le calcul des vitesses spécifiques. L'avantage de la méthode en dynamique est clairement visible sur la Figure III-13 : elle permet d'observer des états métaboliques sur une large plage de taux de croissance μ alors que le protocole en chemostat ne donne que des valeurs discrètes pour une condition de taux de dilution imposé (et nécessite ici une longue durée pour obtenir l'état stationnaire).



2.2 Modèle pour la consommation du substrat

2.2.1 Choix du modèle de Pirt

La mesure précise des vitesses spécifiques a montré précédemment qu'à forte induction, la vitesse spécifique de production de protéines q_p est constante, et le taux de croissance μ est une fonction linéaire de la vitesse spécifique de consommation de substrat q_s . Ainsi le modèle de Pirt généralisé semble parfaitement adapté pour modéliser la relation entre les vitesses spécifiques :

$$q_s = \frac{\mu}{Y_X^\circ} + \frac{q_p}{Y_P^\circ} + m$$

Dans cette relation les rendements théoriques limites de production de biomasse Y_X° et de production de protéines Y_P° (en g/g_s), ainsi que la maintenance m (en $g_s g_X^{-1} h^{-1}$), sont des constantes.

Cette expression sépare la consommation de sucre en 3 voies distinctes :

- μ/Y_X° représente le flux de sucre consommé spécifiquement pour la croissance,
- q_p/Y_P° représente le flux de sucre consommé spécifiquement pour la production de protéines,
- m représente le flux de sucre consommé indépendamment de la croissance ou de la production de protéines, pour la maintenance des cellules (consommation d'énergie sans fixation de carbone).

Les rendements théoriques limites ne dépendent en théorie que de la voie métabolique mise en jeu, alors que la maintenance peut varier avec les conditions expérimentales (température, pH, salinité, inhibiteurs, ...)

2.2.2 Identification paramétrique

2.2.2.1 Modèle complet à 3 paramètres

Les vitesses spécifiques instantanées calculées précédemment en protocole industriel fed-batch sur lactose pur (III.2.1.3, page 86) couvrent une large plage de variation pour le taux de croissance μ et la vitesse spécifique de consommation de substrat q_s . Elles peuvent donc être utilisées pour identifier les paramètres du modèle de Pirt généralisé.

L'identification des 3 paramètres Y_X° , Y_P° et m par régression linéaire multiple à partir des valeurs des vitesses spécifiques se révèle peu précise (Tableau III-11 en haut). En effet, comme la vitesse spécifique de production de protéines q_P est quasiment constante pendant la période étudiée, sa plage de variation est trop faible pour permettre une bonne régression. Le terme q_P/Y_P° peut donc se confondre avec le terme de maintenance m .

Dans le cas FB1, l'identification paramétrique donne $Y_P^\circ = 0.8 \text{ g}_P/\text{g}_S$. Cette valeur de rendement limite semble trop élevée, comparée aux valeurs théoriques obtenues par modélisation métabolique pour la production de protéines chez un autre champignon filamenteux (production d'amylases par *Aspergillus niger* : $0.61 \text{ g}_{\text{a-amylase}}$ and $0.62 \text{ g}_{\text{glucoamylase}}/\text{g}_{\text{glucose}}$, Andersen et al., 2008). Au contraire pour FB2, l'identification paramétrique donne $Y_P^\circ = 0.60 \text{ g}_P/\text{g}_S$, valeur cohérente avec *A. niger*.

De plus, la biomasse et les protéines sont proches en termes de composition élémentaire, de degré de réduction, et de polymérisation (couteux en énergie) donc on s'attendrait plutôt à ce que les rendements théoriques limites soient proches aussi, comme c'est le cas pour la culture FB2.

Une nouvelle identification des paramètres a alors été réalisée en faisant l'hypothèse que $Y_X^\circ = Y_P^\circ$. L'estimation obtenue est alors bien plus précise: 2% sur les rendements, et 6% sur le terme de maintenance.

En réalisant la régression linéaire sur tous les points expérimentaux, on fait l'hypothèse que la maintenance est constante sur toute la durée de l'expérience, et on utilise ce paramètre pour le calage du modèle. Cette hypothèse est contestable puisque la maintenance peut dépendre des conditions extérieures, par exemple la température, les concentrations des différentes espèces ioniques (pour le maintien des gradients membranaires) ou solides, la concentration de biomasse dans le réacteur, ou l'agitation (stress provoqué par le cisaillement dû à l'agitation). Mais comme les paramètres qui jouent sur la maintenance ne sont pas connus précisément, il a été choisi de calculer une valeur moyenne de la maintenance sur toute la durée de l'expérience.

Tableau III-11 : Identification paramétrique selon le modèle de Pirt.

Pour les cultures en fed-batch en bioréacteur Dargip de 1 L.

Haut: identification complète – Bas, identification simplifiée en supposant $Y_X^\circ = Y_P^\circ$.

CV = coefficient de variation.

FB2	g/g _S	g _C /g _C	CV
Y_X°	0.61	0.64	± 3%
Y_P°	0.60	0.63	± 11%
m	12.4 mg _S g _X ⁻¹ h ⁻¹		± 21%

FB1	g/g _S	g _C /g _C	CV
Y_X°	0.62	0.65	± 2%
Y_P°	0.80	0.84	± 10%
m	16.5 mg _S g _X ⁻¹ h ⁻¹		± 11%

FB2	g/g _S	g _C /g _C	CV
$Y_X^\circ = Y_P^\circ$	0.62	0.64	± 2%
m	12.90 mg _S g _X ⁻¹ h ⁻¹		± 6%

FB1	g/g _S	g _C /g _C	CV
$Y_X^\circ = Y_P^\circ$	0.60	0.62	± 2%
m	10.3 mg _S g _X ⁻¹ h ⁻¹		± 6%

2.2.2.2 Modèle simplifié à 2 paramètres

La même démarche expérimentale (fed-batch avec modification du débit d'alimentation, sur substrat synthétique lactose 250 g/L) et la même méthode de traitement mathématique des données a été appliquée sur 2 autres expériences en fed-batch, notées FB3 et FB4, mais réalisées en bioréacteur Applikon avec un volume de liquide de 3 L (II.3.2.3, page 65).

Les débits d'alimentation appliqués, en escalier, et le suivi des concentrations sont présentés Figure III-14. On retrouve les mêmes tendances que pour les expériences FB1 et FB2, avec une biomasse productrice qui se stabilise pour un débit donné, puis repart en croissance quand on augmente le débit. La production de protéines semble linéaire et proportionnelle à la concentration de biomasse productrice.

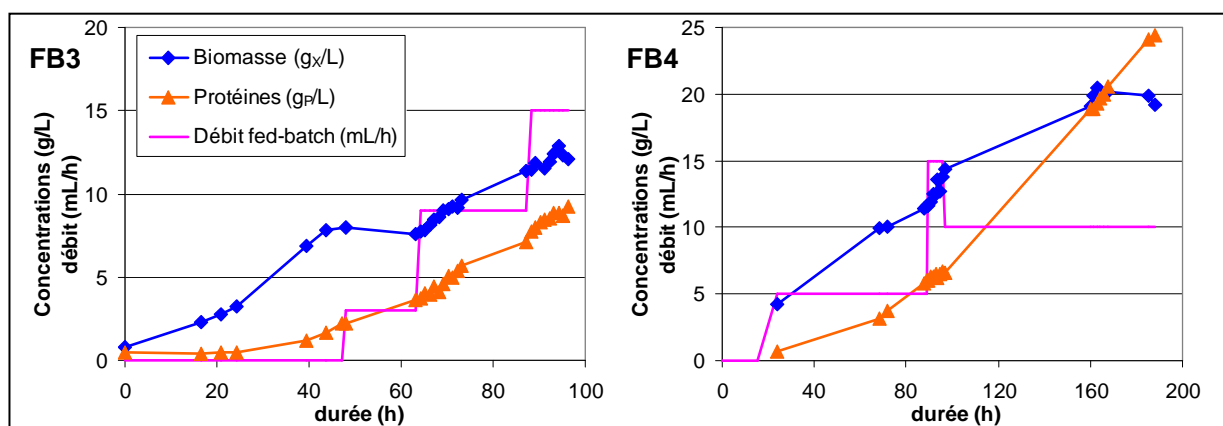


Figure III-14 : Débits d'alimentation et suivi des concentrations pour les cultures FB3 et FB4. Cultures réalisées en réacteur Applikon avec un volume de culture de 3 L.

Tableau III-12 : Identification paramétrique selon le modèle de Pirt (suite).

Pour les cultures en fed-batch en bioréacteur Applikon de 3 L.

CV = coefficient de variation.

FB3	g/g _S	g _C /g _C	CV
$Y_{X^{\circ}}=Y_{P^{\circ}}$	0.58	0.60	± 1%
m	11.8 mg _S g _X ⁻¹ h ⁻¹		± 21%

FB4	g/g _S	g _C /g _C	CV
$Y_{X^{\circ}}=Y_{P^{\circ}}$	0.59	0.62	± 2%
m	7.9 mg _S g _X ⁻¹ h ⁻¹		± 11%

L'identification des paramètres du modèle de Pirt pour ces 2 cultures donne des résultats parfaitement cohérents avec les résultats précédents (Tableau III-12), donc ces valeurs de rendement théorique et de maintenance ne dépendent pas du fermenteur utilisé, et sont bien caractéristiques de la souche étudiée ici.

Finalement, les valeurs moyennes des paramètres du modèle de Pirt, mesurées pour la souche IFP Energies nouvelles CL847 iβ, en protocole fed-batch sur lactose pur, sont :

- $Y_{X^{\circ}} = Y_{P^{\circ}} = 0.60 \pm 0.02$ g/g_S soit ± 3.3%
- $m = 10 \pm 2$ mg_S g_X⁻¹ h⁻¹ soit ± 20%

2.2.3 Validation des valeurs des paramètres

Nicholson et al. (1989) et Bailey and Tahtiharju (2003) ont réalisé des cultures de *T. reesei* en chemostat, avec des taux de dilution de 0.018 h⁻¹ et 0.021 h⁻¹ respectivement. A partir des valeurs de concentrations en biomasse et en protéines obtenues à l'état stationnaire (3 pour Nicholson et al. (1989) à 3 concentrations en sucre dans le milieu d'alimentation, 1 seul pour Bailey and Tahtiharju (2003)), il est possible de recalculer la vitesse spécifique moyenne de production de protéines q_P. On obtient :

- 17.2 ± 0.5 mg_P g_X⁻¹ h⁻¹ pour la souche MG80 de (Nicholson et al., 1989),
- 19.9 mg_P g_X⁻¹ h⁻¹ pour la souche VTT D-99676 de (Bailey and Tahtiharju, 2003).

Pour ces valeurs, on peut alors calculer la vitesse spécifique de consommation de substrat (théorique) selon le modèle de Pirt : $q_{S\ Pirt} = \frac{\mu}{Y^{\circ}} + \frac{q_P}{Y^{\circ}} + m$ en utilisant les valeurs des paramètres Y[°] et m mesurées précédemment pour la souche CL847 iβ, puis simuler les concentrations en biomasse et

protéines théoriques à l'état stationnaire par les formules : $X_{simul} = \frac{\mu \cdot S_{in}}{q_{S\ Pirt}}$ et $P_{simul} = \frac{q_P \cdot S_{in}}{q_{S\ Pirt}}$ (en

supposant que le substrat résiduel est nul, ce qui est indispensable pour avoir une telle induction, et logique étant donnée le faible taux de dilution imposé).

De plus, une analyse de sensibilité a été réalisée pour étudier l'impact des variations des paramètres Y° et m (dans la plage déterminée expérimentalement ci-dessus) sur le calcul des concentrations à l'état stationnaire :

- la variation d'un seul paramètre (3.3% pour Y° , 20% pour m) entraîne une déviation maximale de 2.8 à 3.0 % : la valeur de maintenance a bien moins d'impact que la valeur de rendement théorique limite ;
- la variation simultanée des 2 paramètres entraîne une déviation maximale de 5.8% environ.

Finalement, la comparaison des valeurs mesurées et des valeurs simulées ne montre aucune différence significative (Figure III-15).

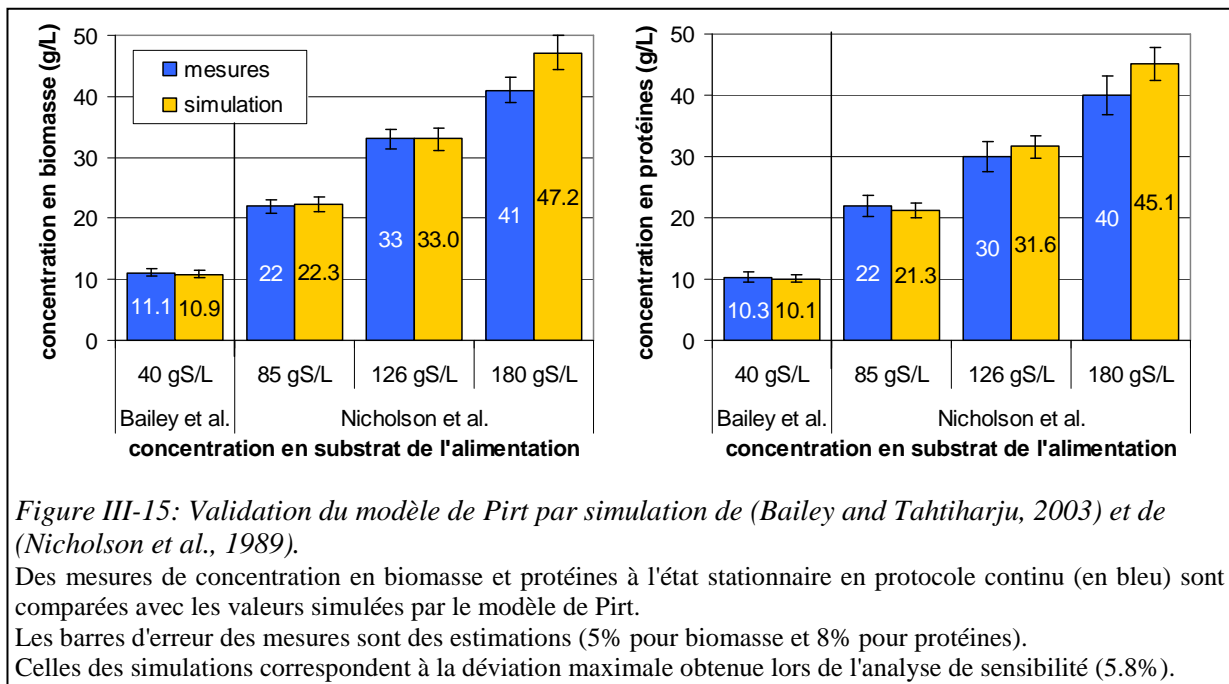


Figure III-15: Validation du modèle de Pirt par simulation de (Bailey and Tahtiharju, 2003) et de (Nicholson et al., 1989).

Des mesures de concentration en biomasse et protéines à l'état stationnaire en protocole continu (en bleu) sont comparées avec les valeurs simulées par le modèle de Pirt.

Les barres d'erreur des mesures sont des estimations (5% pour biomasse et 8% pour protéines).

Celles des simulations correspondent à la déviation maximale obtenue lors de l'analyse de sensibilité (5.8%).

Ainsi les valeurs des paramètres du modèle de Pirt identifiées en fed-batch avec la souche CL847 i β sont aussi valables pour 2 autres souches de *T. reesei*, pour un autre protocole de culture (en continu, à 2 taux de dilution et 4 concentrations en substrat), et à des vitesses spécifiques différentes. Ceci prouve que ces valeurs de paramètres sont caractéristiques de l'espèce *T. reesei*, elles pourront être extrapolées à d'autres souches et être utilisées pour des simulations de conduite.

2.3 Modèle cinétique complet de la production

2.3.1 Description du modèle

2.3.1.1 Principe

L'étude précédente du métabolisme de *T. reesei* en production de protéines à faible taux de croissance a montré d'une part que la production de protéines est totalement découplée de la croissance mais limitée par la synthèse ou la sécrétion, et d'autre part que le modèle de Pirt permet de modéliser la consommation du substrat carboné.

Le modèle métabolique complet découlant de ces observations est présenté Figure III-16. Il s'agit d'un modèle de type "goulet d'étranglement / déversoir" (bottleneck/overflow), du même type que pour modéliser la limitation de la capacité respiratoire chez *S. cerevisiae*. Ce modèle suppose que:

- une partie du sucre est consommé pour la maintenance, avec un flux m .

- III. Métabolisme de *T.reesei* sur lactose pur -

- La consommation de sucre pour la production de protéines q_p/Y° est limitée par la synthèse ou la sécrétion des protéines (goulet d'étranglement cercle orange). A forte induction (présence d'inducteur et limitation par le substrat) cette capacité maximale est atteinte ($q_p=q_{pmax}$).
- Alors tout flux de sucre supplémentaire disponible pour les cellules est consommé pour la croissance de la biomasse (déversoir). Comme la forte induction nécessite une limitation par le substrat, la capacité maximale de la cellule n'est pas atteinte (sinon du sucre s'accumulerait dans le milieu de culture).

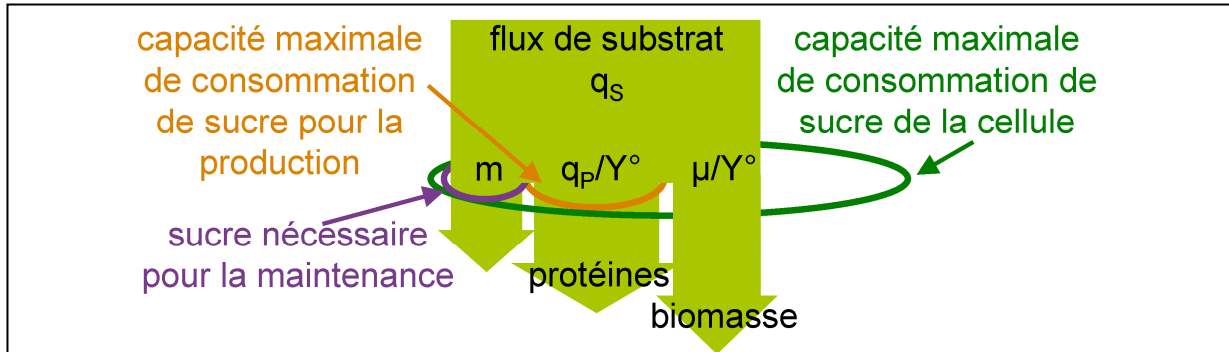


Figure III-16 : Schéma du métabolisme de *T. reesei* (à forte induction).

Le flux de sucre imposé par la limitation se répartit entre la maintenance, la production de protéines (limitée par la capacité maximale de production) et le reste est utilisé pour la croissance des cellules.

2.3.1.2 Domaine de validité

La méthode de calcul des vitesses spécifiques est présentée Tableau III-13, elle introduit deux nouveaux paramètres : la vitesse spécifique maximale de production de protéines q_{pmax} et la capacité maximale de consommation de sucre q_{Smax} .

Le domaine de validité du modèle est contraint par les valeurs de deux vitesses spécifiques :

- d'une part la vitesse spécifique de consommation de substrat q_s doit être inférieure au maximum de la souche q_{Smax} (pour rester à sucre résiduel nul, ce qui permet la forte induction), et supérieure au sucre nécessaire pour la maintenance et la production ($q_s > q_p/Y_p^\circ + m$) ;
- d'autre part, le modèle est basé sur des mesures réalisées à faible taux de croissance donc est valable uniquement pour des valeurs de taux de croissance μ entre 0 et 0.03 h^{-1} .

Tableau III-13 : Calcul des vitesses spécifiques selon le modèle cinétique de *T. reesei*.

	calcul	domaine de validité
vitesse spécifique de production de protéines q_p	l'induction est maximale $q_p = \text{cte} = q_{pmax}$	$[S]_{\text{réacteur}} = 0$
vitesse spécifique de consommation de sucre q_s	imposée par modèle de réacteur : $q_s = \frac{F_{in} S_{in}}{XV}$ dans la limite de q_{Smax} (pour maintenir $S=0$)	$\left(\frac{q_p}{Y_p^\circ} + m \right) \leq q_s \leq q_{Smax}$
taux de croissance μ	calculé grâce au modèle de Pirt : $\mu = Y_x^\circ \cdot \left(q_s - \frac{q_p}{Y_p^\circ} - m \right)$ avec maintenance constante m et rendements théoriques limites $Y_x^\circ = Y_p^\circ$	$0 \leq \mu \leq 0.03 \text{ h}^{-1}$

Concernant le modèle de Pirt, on utilisera les valeurs identifiées et validées précédemment (III.2.2.3, page 92) $Y_X^\circ = Y_P^\circ = 0.60 \pm 0.02 \text{ g/g}_S$ et $m = 10 \pm 2 \text{ mg}_S \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Concernant la capacité maximale de consommation de sucre, on peut la calculer pour $q_P = q_{P_{\max}}$ et $\mu = 0.03 \text{ h}^{-1}$, ce qui donne $85 \text{ mg}_S \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$.

La vitesse spécifique maximale de production de protéines $q_{P_{\max}}$ est plus problématique puisqu'elle peut varier d'une souche à l'autre, on propose d'utiliser une valeur moyenne de $15 \pm 3 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$, qui est représentative des souches hyperproductrices étudiées précédemment.

2.3.2 Validation du modèle en dynamique

La validation du modèle cinétique de *T. reesei* en production de protéines décrit ci-dessus est réalisée en utilisant des données expérimentales obtenues lors d'une nouvelle culture en bioréacteur Dargip notée FB5 (volume initial 0.75 L) selon le protocole IFP Energies nouvelles :

- croissance en batch sur 15g/L glucose pendant 24h (non simulée car le sucre résiduel n'est pas nul), aboutissant à la concentration en biomasse de 9.5 g/L ;
- production en fed-batch avec alimentation à débit constant 2 mL/h par une solution de lactose à 250 g/L.

La phase de production (entre 24 et 196 h) a été simulée en utilisant un modèle de réacteur parfaitement homogène et le modèle cinétique décrit ci-dessus, avec pour état initial les concentrations mesurées à 24 h. Trois simulations ont été réalisées pour 3 vitesses spécifiques de production de protéines $q_{P_{\max}}$: 12, 15 et 18 $\text{mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (Figure III-17).

On observe que les concentrations mesurées sont dans la plage d'incertitude des simulations, avec une déviation moyenne de 6% environ entre les concentrations mesurées et les simulations lorsqu'on utilise la valeur moyenne $q_{P_{\max}} = 15 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (trait gras Figure III-17).

Les simulations ont été réalisées sans tenir compte de l'évaporation (mesurée à environ 0.25 mL/h par différence entre volume final réel et théorique) qui entraîne une augmentation des concentrations mesurées d'environ 5% par rapport à la simulation. Les simulations réalisées ne tiennent pas non plus compte des prélèvements, dont le volume était de l'ordre de 1.5 à 2% du volume total du réacteur.

Ainsi, la différence observée entre mesures et simulations n'est pas significative, ce qui valide en dynamique le modèle cinétique précédent pour la simulation de *T. reesei* en production de protéines.

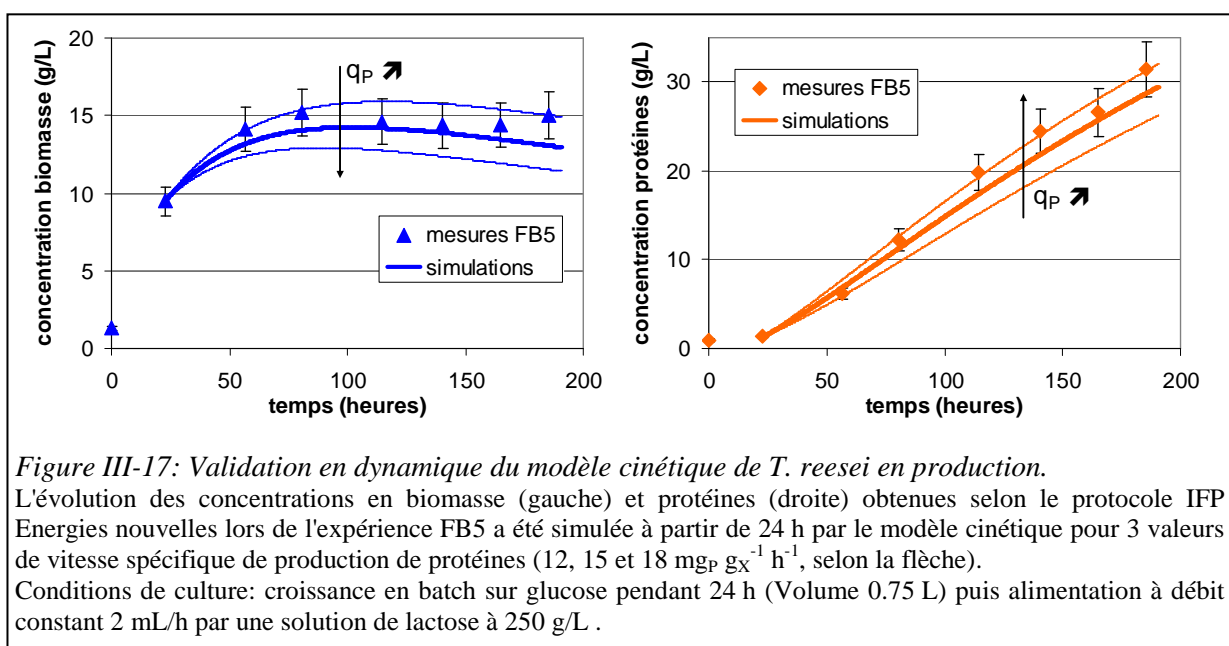


Figure III-17: Validation en dynamique du modèle cinétique de *T. reesei* en production.

L'évolution des concentrations en biomasse (gauche) et protéines (droite) obtenues selon le protocole IFP Energies nouvelles lors de l'expérience FB5 a été simulée à partir de 24 h par le modèle cinétique pour 3 valeurs de vitesse spécifique de production de protéines (12, 15 et 18 $\text{mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$, selon la flèche).

Conditions de culture: croissance en batch sur glucose pendant 24 h (Volume 0.75 L) puis alimentation à débit constant 2 mL/h par une solution de lactose à 250 g/L .

De même que précédemment, une étude de sensibilité a été réalisée pour la simulation de ce protocole, en utilisant les valeurs limites des paramètres Y° , m et $q_{P_{max}}$ (Tableau III-14). On observe que l'effet de la variation d'un paramètre sur la concentration finale en biomasse ou en protéines est toujours plus faible que la variation imposée. Ceci valide la robustesse du modèle pour la simulation dynamique de la production de protéines par *T. reesei* à forte induction.

Tableau III-14 : Étude de sensibilité du modèle cinétique.

Le protocole de production de l'expérience FB5 ci-dessus a été simulé avec différentes valeurs des paramètres $q_{P_{max}}$, Y° et m , dans les plages de variation déterminées précédemment.

paramètre		valeur moyenne	variation imposée	effet sur X_{final}	effet sur P_{final}
$q_{P_{max}}$	$mg_P g_X^{-1} h^{-1}$	15 ± 3	$\pm 20\%$	$\pm 16\%$	$\pm 10\%$
Y°	g/g_S	0.60 ± 0.02	$\pm 3.3\%$	$\pm 2.4\%$	$\pm 2.2\%$
m	$mg_S g_X^{-1} h^{-1}$	10 ± 2	$\pm 20\%$	$\pm 5.9\%$	$\pm 4.6\%$

2.4 Conclusion sur l'étude cinétique et la modélisation

Le métabolisme de *T. reesei* en production de protéines a été étudié en protocole fed-batch, afin d'observer des taux de croissance inférieurs à $0.02 h^{-1}$, ce qui n'avait pas été fait auparavant dans la littérature.

Pour calculer les vitesses spécifiques avec une bonne précision, une nouvelle méthode mathématique de calcul a été développée. D'une part elle prend en compte tous les volumes ajoutés ou soutirés pour simuler au plus proche le protocole expérimental utilisé. D'autre part, grâce à la mesure en ligne du CO_2 produit, elle utilise le calcul du bilan carbone instantané dans le critère de régression, en plus de l'accord entre concentrations simulées et mesurées. Ceci permet d'avoir une bonne confiance dans les résultats du calcul des vitesses spécifiques puisque le bilan carbone instantané est vérifié, comme dans une démarche classique de réconciliation des données. De plus, la comparaison des résultats avec ceux obtenus en protocole classique en continu a montré un très bon accord.

L'utilisation de cet algorithme pour deux cultures en fed-batch avec des profils d'alimentation différents a montré que la vitesse spécifique de production de protéines est forte et constante sur une large plage de taux de croissance (de 0 à $0.03 h^{-1}$). Ainsi la production de protéines n'est pas limitée par le métabolisme du substrat ni par l'induction (elle est maximale ici grâce à la présence de lactose et à la limitation carbone) mais par la synthèse ou la sécrétion des protéines. Alors tout flux de substrat supplémentaire est réorienté vers la croissance des cellules.

Tout d'abord, le modèle de Pirt a été utilisé pour modéliser la consommation du substrat selon trois compartiments : croissance, production et maintenance. Une identification des paramètres a été réalisée grâce aux valeurs des vitesses spécifiques calculées au cours du temps pour quatre expériences en bioréacteur en fed-batch. Puis les valeurs des paramètres ont été validées par la simulation de quatre expériences en protocole continu issues de la littérature (comparaison des simulations et des mesures pour les concentrations à l'état stationnaire).

Enfin un modèle cinétique complet de la production de protéines par *T. reesei* a été proposé, avec bilans matière, calcul des vitesses spécifiques, valeurs des paramètres et domaine de validité (Tableau III-15). Ce modèle a été validé en dynamique par comparaison avec des mesures de concentrations au cours du temps lors d'une 5^e expérience en fed-batch, et une étude de sensibilité a prouvé sa robustesse.

Ce modèle peut donc être utilisé pour simuler et comparer différents protocoles pour la production de protéines par *T. reesei*, afin de proposer un protocole de culture optimisé.

Tableau III-15 : Bilan du modèle cinétique de *T. reesei* en production de protéines.

Hypothèses	réacteur parfaitement agité	
	modèle non structuré	
	en phase de production, à forte induction, nécessitant : <ul style="list-style-type: none"> ▪ présence d'un inducteur ▪ concentration résiduelle en sucres nulle 	
	pas de limitations diffusionnelles entre la phase liquide et les cellules	
	pas de limitation par l'oxygène, ni par d'autre nutriment que le carbone	
Bilans matières	Volume de milieu liquide	$\frac{dV}{dt} = F_{in} - F_{out}$
	Masse de substrat	$\frac{dSV}{dt} = q_s \cdot X \cdot V + (F_{in} S_{in} - F_{out} S_{out})$
	Masse de biomasse (cellules de <i>T. reesei</i>)	$\frac{dXV}{dt} = \mu \cdot X \cdot V + (F_{in} X_{in} - F_{out} X_{out})$
	Masse de protéines (cellulases)	$\frac{dPV}{dt} = q_p \cdot X \cdot V + (F_{in} P_{in} - F_{out} P_{out})$
Modèle cinétique	Vitesse spécifique de production de protéines	$q_p = q_{pmax}$
	Taux de croissance	$\mu = Y_x^\circ \cdot \left(q_s - \frac{q_p}{Y_p^\circ} - m \right)$
Valeurs des paramètres	Rendements théoriques limite	$Y_x^\circ = Y_p^\circ = 0.60 \pm 0.02 \text{ g/g}_s$
	Maintenance	$m = 10 \pm 2 \text{ mg}_s \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$.
	Vitesse spécifique maximale de production de protéines	$q_{pmax} = 15 \pm 3 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$
	Vitesse spécifique maximale de consommation de substrat	$q_{smax} = 127 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$
Domaine de validité	Sucre résiduel nul	$S = 0$
	Vitesse spécifique de consommation de substrat	$\left(\frac{q_p}{Y_p^\circ} + m \right) \leq q_s \leq q_{smax}$
	Taux de croissance	$0 \leq \mu \leq 0.03 \text{ h}^{-1}$
Équations-bilans	<u>Production de biomasse sur lactose à $Y = Y_x^\circ = 0.60 \text{ g}_x/\text{g}_s$</u> $CH_{1.83}O_{0.92} + 0.333 O_2 + 0.098 NH_4^+ + 0.008 PO_4^{3-} + 0.05 \text{ cendres}$ $\rightarrow 0.628 CH_{1.8}O_{0.573}N_{0.156}P_{0.013} \text{ cendres}_{0.08} + 0.372 CO_2 + 0.511 H_2O + 0.073 H^+$	
	<u>Production de protéines sur lactose à $Y = Y_p^\circ = 0.60 \text{ g}_p/\text{g}_s$</u> $CH_{1.83}O_{0.92} + 0.312 O_2 + 0.155 NH_4^+ + 0.005 SO_4^{2-}$ $\rightarrow 0.675 CH_{1.733}O_{0.508}N_{0.23}S_{0.008} + 0.325 CO_2 + 0.570 H_2O + 0.144 H^+$	
	<u>Maintenance</u> $CH_{1.83}O_{0.92} + O_2 \rightarrow CO_2 + 0.92 H_2O$	

3 Simulation des protocoles de conduite

Dans cette partie, on s'intéresse à comparer les différents protocoles de conduite uniquement pour la phase de production de protéines, en utilisant le modèle cinétique développé et validé précédemment (valable à forte induction et à concentration résiduelle en sucres nulle).

3.1 Hypothèses

3.1.1 Phase de croissance

Pour calculer les rendements globaux sur la somme des phases successives de croissance et de production, on considérera une phase de croissance sur glucose avec un rendement de 0.45 g_x/g_s.

Pour le calcul de la productivité globale sur la somme des 2 phases successives de croissance et production, on utilisera la cinétique de croissance moyenne présentée ci-dessous pour calculer la durée de la phase de croissance en fonction de la concentration en biomasse souhaitée au début de la production.

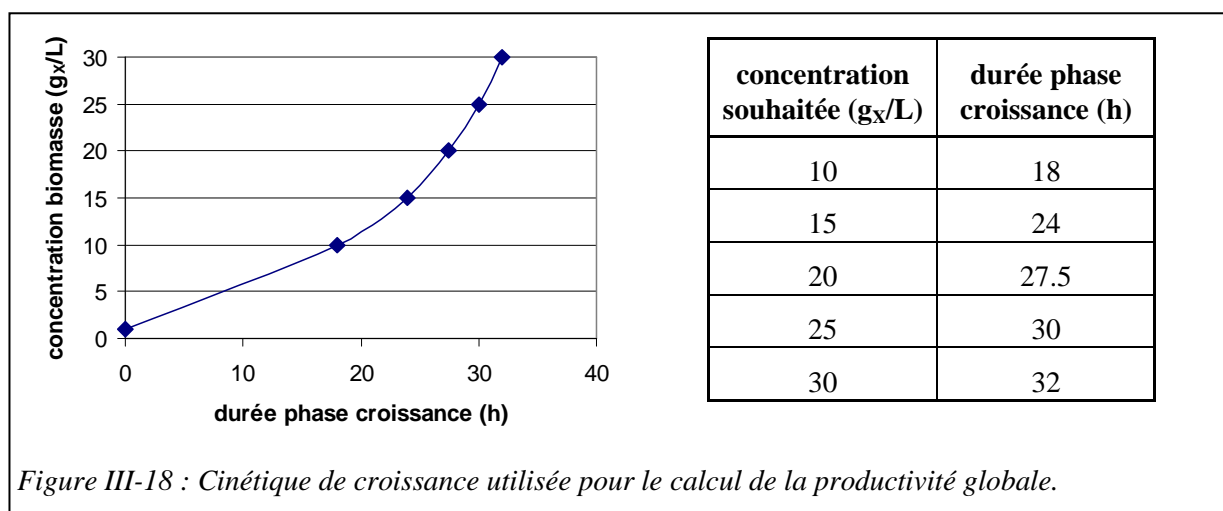


Figure III-18 : Cinétique de croissance utilisée pour le calcul de la productivité globale.

3.1.2 Besoin en oxygène

En utilisant les 3 équations bilans stœchiométriques pour chacun des 3 compartiments d'utilisation du substrat lactose (Tableau III-15), les rendements de consommation en oxygène peuvent être calculés :

- pour la partie croissance : $Y_{O_2/S}^X = 11.7 \text{ mmol/g}_S$
- pour la partie production : $Y_{O_2/S}^P = 11.0 \text{ mmol/g}_S$
- pour la maintenance : $Y_{O_2/S}^m = 35.1 \text{ mmol/g}_S$

La vitesse volumique de consommation d'oxygène s'écrit alors :

$$r_{O_2} = q_{O_2} \cdot X = \left(Y_{O_2/S}^X \cdot \frac{\mu}{Y^o} + Y_{O_2/S}^P \cdot \frac{q_P}{Y^o} + Y_{O_2/S}^m \cdot m \right) \cdot X$$

Dans un souci de faire le lien avec les paramètres utilisés en génie chimique pour le dimensionnement des réacteurs industriels, on présentera ponctuellement le besoin en oxygène sous forme de $K_L a$ équivalent, correspondant au coefficient de transfert d'oxygène minimum nécessaire pour maintenir une concentration constante en oxygène dissous [$O_{2\text{dissous}}$] :

$$K_L a^{eq} = \frac{r_{O_2}}{[O_{2dissous}^{saturation}] - [O_{2dissous}]}$$

Par la suite, on appellera " K_{La} minimum" le coefficient de transfert d'oxygène minimum nécessaire pour maintenir une concentration en oxygène dissous égale à 20% de la concentration à saturation (voir IV.3.3 *Effet de la concentration en oxygène dissous*, page 165). On prendra la concentration en oxygène à saturation pour de l'eau pure à 27°C, en équilibre avec de l'air à 21% d'oxygène à pression atmosphérique : 8 mg/L. Alors :

$$K_L a^{\min} = 156.25 \cdot r_{O_2} \text{ avec } K_L a^{\min} \text{ en h}^{-1} \text{ et } r_{O_2} \text{ en gO}_2 \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$$

Cette dernière hypothèse est une simplification puisque la concentration à saturation va varier avec la composition du milieu, et avec la pression (donc avec la hauteur de milieu liquide dans les fermenteurs industriels). De plus, la viscosité du moût de fermentation a un impact négatif sur le transfert d'oxygène, donc le coefficient de transfert d'oxygène d'un réacteur mesuré sur l'eau ne sera pas extrapolable au moût de fermentation de *T. reesei*.

On gardera donc bien en tête que les valeurs de K_{La} présentées par la suite sont plutôt une manière de représenter le besoin en oxygène r_{O_2} .

3.2 Protocole fed-batch

Le protocole fed-batch correspond à une alimentation du réacteur sans soutirage. Cette alimentation ne contient ni biomasse ni protéines, uniquement du sucre substrat carboné (et éventuellement du milieu de culture). Donc pour les simulations, les équations de bilan matière présentées Tableau III-15 ont été simplifiées avec les valeurs suivantes :

$$F_{out} = 0 \text{ L/h ,}$$

$$X_{in} = 0 \text{ g}_X/\text{L ,}$$

$$P_{in} = 0 \text{ g}_P/\text{L .}$$

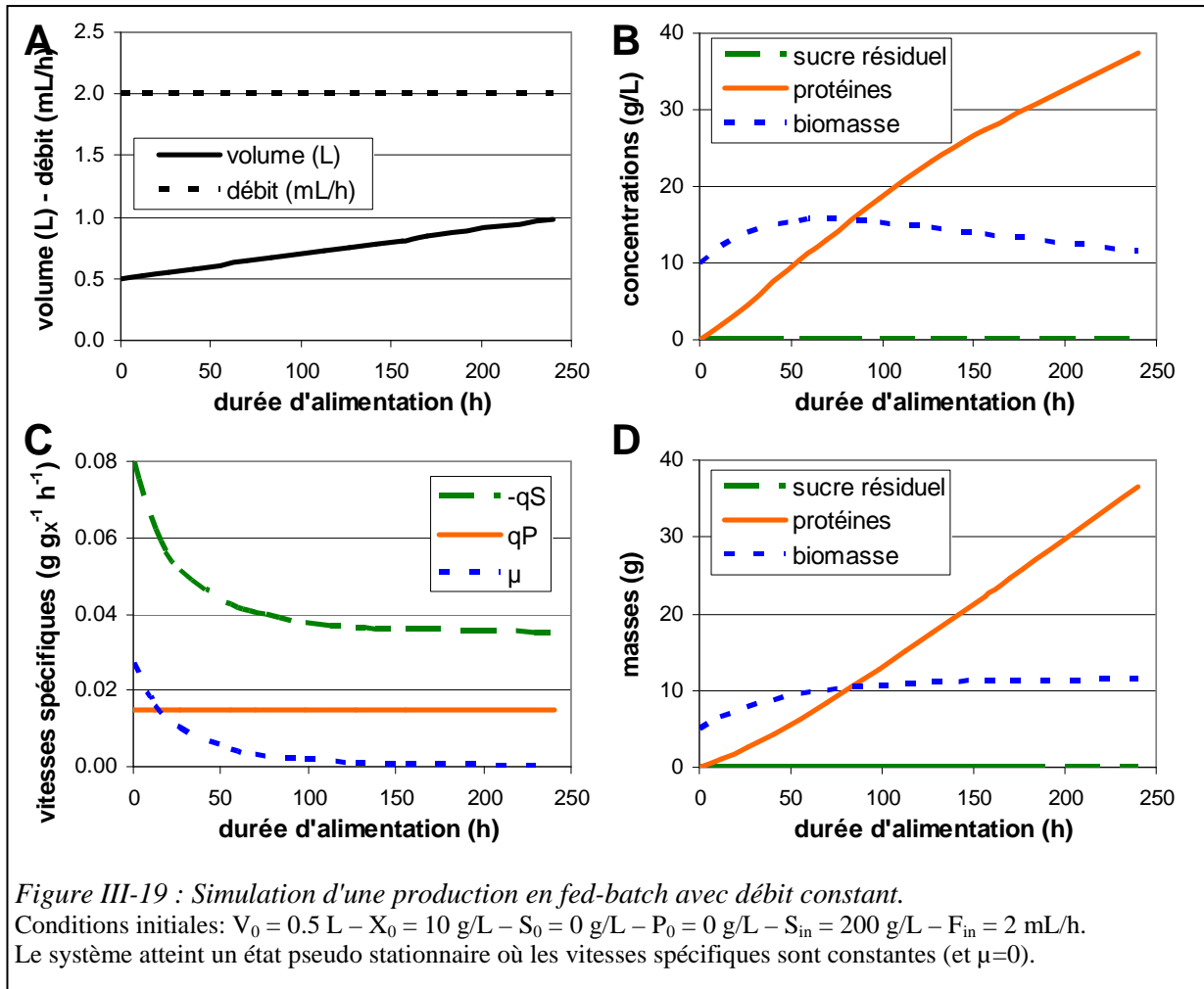
3.2.1 Évolution du système

3.2.1.1 Alimentation à débit constant

Les simulations du protocole IFP Energies nouvelles en fed-batch avec débit d'alimentation constant montrent que dans tous les cas (dont celui proposé en exemple Figure III-19) le système tend vers un état pseudo stationnaire dans lequel les vitesses spécifiques sont constantes, et le taux de croissance μ est nul (Figure III-19 C). Alors la quantité de biomasse est constante (en masse), et la masse de protéines croît linéairement (Figure III-19 D).

Ainsi, le protocole fed-batch à débit constant est parfaitement adapté pour les nouvelles souches dont la vitesse spécifique de production de protéines q_p est inconnue, puisque la quantité de biomasse va automatiquement s'adapter au flux de sucre imposé pour le transformer intégralement en protéines. Ainsi le rendement de production de protéines est maximisé, comme attendu classiquement pour les protocoles conduits en fed-batch.

En revanche, en raison de la dilution par le milieu d'alimentation, la concentration en biomasse productrice diminue, et la concentration en protéines n'est pas linéaire mais s'infléchit (Figure III-19 B). Comme le volume de milieu augmente significativement, le volume total disponible dans le bioréacteur n'est pas utilisé à son maximum (par exemple Figure III-19 A, le volume initial vaut 50% du volume final).



Ainsi la productivité en protocole fed-batch est limitée ici par la baisse de la concentration de biomasse productrice (due à l'absence de croissance à l'état quasi-stationnaire), et dans tous les cas par la mauvaise utilisation du volume de bioréacteur disponible.

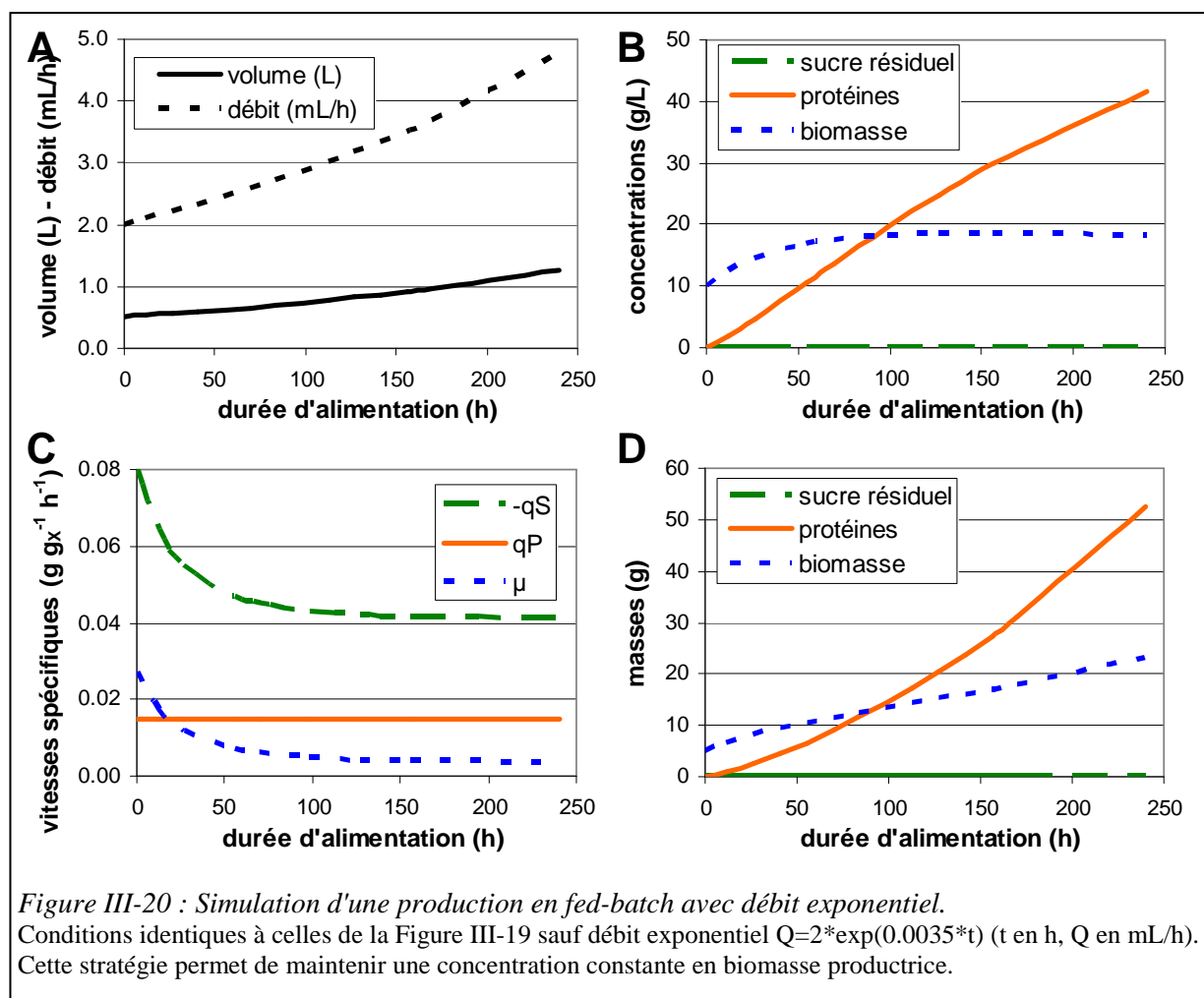
3.2.1.2 Alimentation à débit exponentiel

Pour limiter la baisse de concentration en biomasse, on peut appliquer un débit d'alimentation croissant exponentiellement, ce qui va imposer le taux de croissance μ de la biomasse :

$$F_{in} = F_0 \cdot \exp(\alpha \cdot t)$$

Dans l'exemple présenté Figure III-20, le taux de croissance μ se stabilise à une valeur de 0.0035h^{-1} correspondant au facteur de croissance α du débit d'alimentation. La concentration en biomasse se stabilise, ce qui permet une meilleure productivité (voir ci-dessous). En revanche comme une partie du substrat est utilisée pour réaliser de la croissance, le rendement de production de protéines $Y_{P/S}$ sera nécessairement moins bon qu'avec un débit constant.

De plus, utiliser un débit exponentiel entraîne une variation de volume plus grande encore entre volume initial et final, ce qui peut poser problème pour le design de l'agitation dans le fermenteur, ou limiter la durée de la culture.



3.2.2 Comparaison des grandeurs dimensionnantes

3.2.2.1 Phase de production seule

a Productivité et rendement

Afin de maximiser la production de protéines, le débit d'alimentation doit être choisi (en fonction de la biomasse obtenue après croissance et de la concentration en sucre de l'alimentation) afin d'obtenir une vitesse spécifique d'alimentation en sucre de l'ordre de $35 \text{ mg}_S \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ (cas débit constant) ou légèrement supérieure (cas débit exponentiel). Donc pour une même concentration en biomasse productrice, plus la solution d'alimentation sera diluée, plus le débit sera fort, et plus l'effet de dilution du fed-batch sera important.

Ceci impacte directement la productivité qui chute fortement aux faibles concentrations d'alimentation. Par exemple pour un fed-batch avec une concentration initiale en biomasse de $15 \text{ g}_X/\text{L}$, la productivité à 240 h passe de $0.17 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour une alimentation à $400 \text{ g}_S/\text{L}$ à $0.10 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour une alimentation à $100 \text{ g}_S/\text{L}$ (Figure III-21 A, trait plein). En revanche, le rendement en protéines n'est pas impacté par la concentration de la solution d'alimentation (pour un débit d'alimentation constant adapté à la masse de biomasse présente) (Figure III-21 B, trait plein).

L'utilisation d'un débit exponentiel permet d'augmenter légèrement la productivité du fed-batch, d'environ 15% mais au détriment du rendement qui diminue de 5 à 20 % car une partie du sucre est utilisé pour la croissance (Figure III-21, traits pointillés).

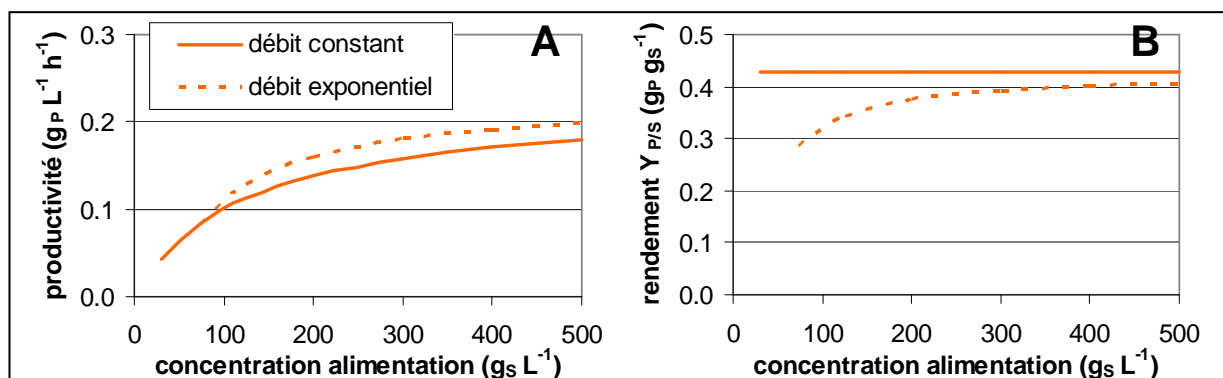


Figure III-21 : Productivité et rendement (à 240 h) d'une phase de production en fed-batch. La concentration initiale en biomasse est de 15 g_x/L. Le débit d'alimentation est adapté pour garder la biomasse constante en masse (cas débit constant, croissance nulle) ou en concentration (cas débit exponentiel).

b Variation de volume et besoin en oxygène

Cependant, le fed-batch avec débit exponentiel n'est pas utilisable avec des solutions d'alimentation de concentrations inférieures à 200 g_S/L car cela entraîne une trop grosse variation de volume du milieu, avec un volume final plus de 2 fois supérieur au volume initial. Dans le cas du fed-batch avec débit constant, la concentration minimale de la solution d'alimentation est de l'ordre de 125 g_S/L (Figure III-22 gauche).

En terme de besoin en oxygène, il est légèrement plus important dans le cas d'un débit exponentiel, en raison du sucre supplémentaire utilisé pour la croissance.

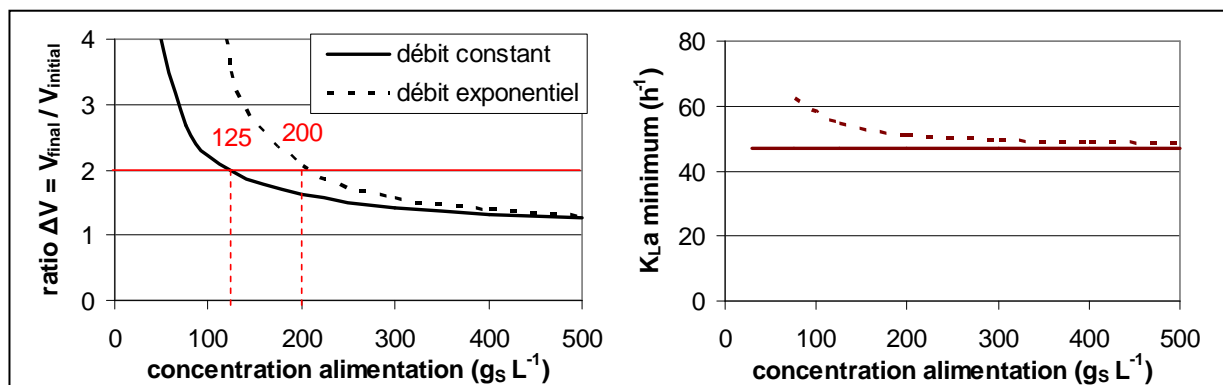


Figure III-22 : Variation de volume et besoin en oxygène maximal lors d'une phase de production en fed-batch de 240 h.

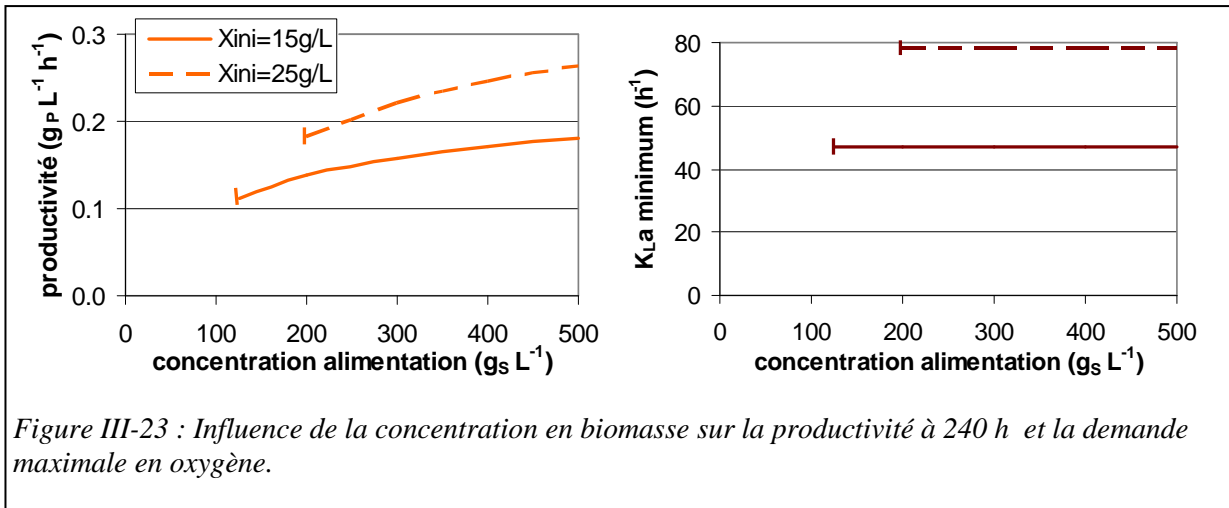
Conditions de simulation identiques à la Figure III-21 (biomasse initiale 15 g_x/L).

c Influence de la concentration en biomasse

Augmenter la concentration en biomasse initiale (au démarrage de la production) de 15 à 25 g_x/L (soit 66%) permet d'augmenter la productivité de 32 à 47% selon la concentration de l'alimentation (Figure III-23 gauche), avec toujours le même rendement maximisé.

Le fait qu'une augmentation de la biomasse de 66% ne donne pas une hausse de la productivité de 66% est dû une fois de plus à la dilution par l'alimentation, qui est plus forte à forte biomasse (débit supérieur à même concentration en sucres dans l'alimentation). A 25 g_x/L de biomasse, la modification de volume associée empêche l'utilisation de solutions d'alimentation de concentrations inférieures à 210 g_S/L.

En revanche, ceci correspond à une augmentation du besoin en oxygène (proportionnel à la biomasse) de 66% aussi, avec un K_La minium passant de 47 à 78 h⁻¹.

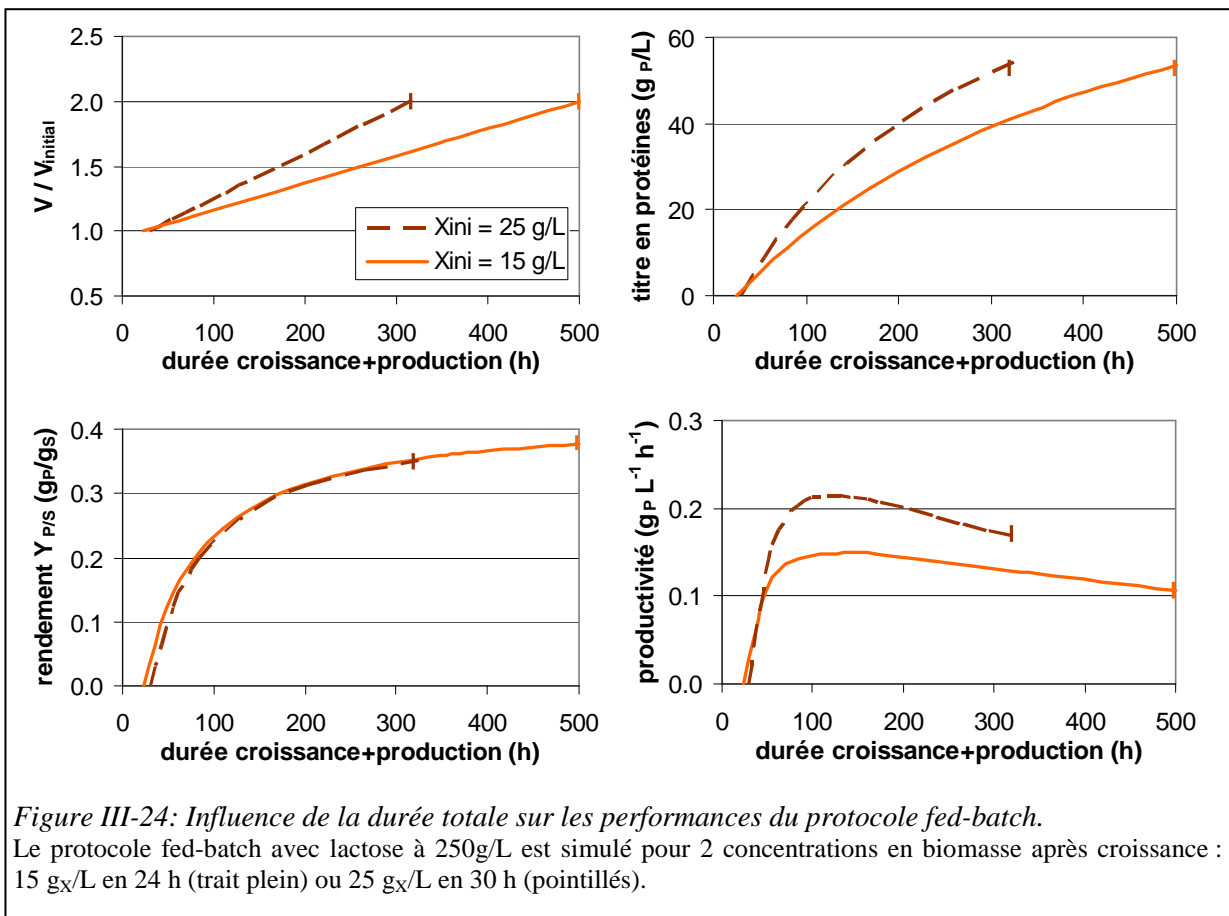


3.2.2.2 Protocole complet : croissance et production

Comme le fed-batch avec débit exponentiel ne permet pas d'amélioration significative des performances, il ne sera pas traité ici.

a Influence de la durée du fed-batch

Afin d'améliorer les performances du protocole fed-batch, on peut jouer sur la durée de la phase de production (Figure III-24). Plus la durée augmente, plus le titre final en protéines et plus le rendement de production (global sur les 2 phases de croissance et de production) augmentent.



- III. Métabolisme de *T.reesei* sur lactose pur -

En revanche, toujours en raison de l'effet de dilution, la durée est limitée par la variation de volume engendrée par le débit d'alimentation. Cette durée maximale va donc dépendre de la concentration en biomasse dans le réacteur, et de la concentration de la solution d'alimentation. Dans l'exemple présenté ci-dessus, la durée est limitée à 300 h pour une production utilisant une solution à 250 g_S/L de lactose avec 25 g_X/L de biomasse productrice, et à 500 h avec 15 g_X/L de biomasse productrice (après la croissance).

Cet effet de variation de volume fait que la productivité ne se maintient pas quand on augmente la durée de la phase de production. Au contraire la productivité d'un protocole de 300 ou 500 h est plus faible que la productivité d'un protocole de 150 h (25% plus faible dans l'exemple présenté Figure III-24). Pour un calcul plus précis il faudrait tenir compte pour le calcul de la productivité globale du temps nécessaire pour la vidange, le lavage et la préparation du fermenteur (entre 2 productions), ainsi que du temps de propagation pour la croissance (sauf si celle-ci est réalisée en parallèle).

b Bilan des performances du protocole fed-batch

Le Tableau III-6 présente le bilan des performances du protocole fed-batch à débit d'alimentation constant, pour 2 concentrations en biomasse après croissance, et 2 concentrations en sucres dans l'alimentation utilisée. Comme la durée n'a pas d'impact positif sur les performances du protocole fed-batch, les simulations utilisées pour ce bilan ont été réalisées avec une phase de production de 240 h.

On retrouve tous les résultats évoqués précédemment :

- maximisation du rendement quelles que soient les conditions par le choix du débit d'alimentation,
- productivité faible mais augmentée par la quantité de biomasse productrice, et la concentration de l'alimentation, qui permettent une meilleure utilisation du volume de réacteur disponible,
- besoin en oxygène faible (pour la phase de production) et lié uniquement à la concentration en biomasse productrice,
- titre final élevé.

Tableau III-16 : Bilan des performances du protocole fed-batch complet.

Pour 2 concentrations en biomasse après croissance, et 2 concentrations en sucres dans l'alimentation. Rendement et productivité sont calculés sur le cumul des 2 phases de croissance (24 ou 30 h) et de production (240 h). Le besoin en oxygène K_{La}^{min} est calculé sur la phase de production uniquement.

	S_{in} = 250 g_S/L	S_{in} = 500 g_S/L
X = 25 g_X/L	$\Delta V = 1.84$ $Y_{P/S} = 0.33 \text{ g}_P/\text{g}_S$ Prod. = $0.18 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $K_{La}^{min} = 78 \text{ h}^{-1}$ Titre = 49 g _P /L	$\Delta V = 1.42$ $Y_{P/S} = 0.33 \text{ g}_P/\text{g}_S$ Prod. = $0.23 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $K_{La}^{min} = 78 \text{ h}^{-1}$ Titre = 63 g _P /L
X = 15 g_X/L	$\Delta V = 1.50$ $Y_{P/S} = 0.33 \text{ g}_P/\text{g}_S$ Prod. = $0.14 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $K_{La}^{min} = 47 \text{ h}^{-1}$ Titre = 34 g _P /L	$\Delta V = 1.25$ $Y_{P/S} = 0.33 \text{ g}_P/\text{g}_S$ Prod. = $0.16 \text{ g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ $K_{La}^{min} = 47 \text{ h}^{-1}$ Titre = 43 g _P /L

3.3 Protocole continu

Le protocole continu correspond à une alimentation du réacteur avec soutirage à débit identique, de manière à ce que le volume liquide du réacteur reste constant. On appelle alors taux de dilution D le rapport du débit d'alimentation par le volume de réacteur. L'alimentation ne contient ni biomasse ni protéines, uniquement du sucre substrat carboné et du milieu de culture. La composition du soutirage est généralement supposée identique à la composition du réacteur. Donc pour les simulations, les équations de bilan matière présentées Tableau III-15 sont simplifiées avec les valeurs suivantes :

$$F_{\text{out}} = F_{\text{in}} = V \cdot D ,$$

$$X_{\text{in}} = 0 \text{ g}_X/\text{L} \text{ et } P_{\text{in}} = 0 \text{ g}_P/\text{L} ,$$

$$X_{\text{out}} = X , P_{\text{out}} = P , \text{ et } S_{\text{out}} = S = 0 \text{ g}_S/\text{L}.$$

3.3.1 Etat stationnaire

3.3.1.1 Théorie

En protocole de production en continu, le système s'équilibre à un état stationnaire où toutes les concentrations et vitesses sont constantes, en particulier le taux de croissance μ est égal au taux de dilution D imposé. Dans le cas du modèle de production de protéines par *T. reesei* :

- comme la vitesse spécifique de production de protéines q_P ne dépend que de la souche, la vitesse spécifique de consommation de substrat q_S ne dépend que du taux de dilution D imposé ;
- les rendements $Y_{X/S} = \frac{\mu}{q_S}$ et $Y_{P/S} = \frac{q_P}{q_S}$ ne dépendent que du taux de dilution D imposé ;
- La productivité instantanée ($productivité = P \cdot D = q_P \cdot X$) ne dépend que de la concentration en biomasse X .
- les concentrations en biomasse $X = \frac{D \cdot S_{in}}{q_S}$ et en protéines $P = \frac{q_P \cdot S_{in}}{q_S}$ dépendent du taux de dilution imposé et de la concentration en substrat de l'alimentation.

3.3.1.2 Simulations

Des simulations ont donc été réalisées pour des taux de dilution compris entre 0.01 et 0.03 h^{-1} , et pour des concentrations en substrat entre 20 et 100 g_S/L , correspondant aux concentrations attendues dans les hydrolysats disponibles (avec dilution éventuelle mais sans concentration) dans une bioraffinerie lignocellulosique.

Les simulations (Figure III-25) montrent bien comme attendu que :

- les rendements ne dépendent que du taux de dilution imposé, avec un rendement de production de protéines $Y_{X/S}$ compris entre 0.18 et 0.29 g_P/g_S (Figure III-25 B).
- la productivité est strictement proportionnelle à la concentration en biomasse dans le réacteur (le coefficient de proportionnalité étant la vitesse spécifique de production de protéines q_P), et peut atteindre par exemple 0.3 $\text{g}_P \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour 20 g_X/L de biomasse (Figure III-25 A).

Par ailleurs, les concentrations en biomasse et protéines à l'équilibre dans le réacteur dépendent à la fois du taux de dilution imposé et de la concentration en substrat de l'alimentation (Figure III-25 C).

Le besoin en oxygène (exprimé sous forme de K_{La} minimum) dépend lui aussi à la fois du taux de dilution imposé et de la concentration en lactose de l'alimentation. On observe cependant une bonne corrélation du besoin en oxygène avec la concentration en biomasse (Figure III-25 D) et donc avec la productivité.

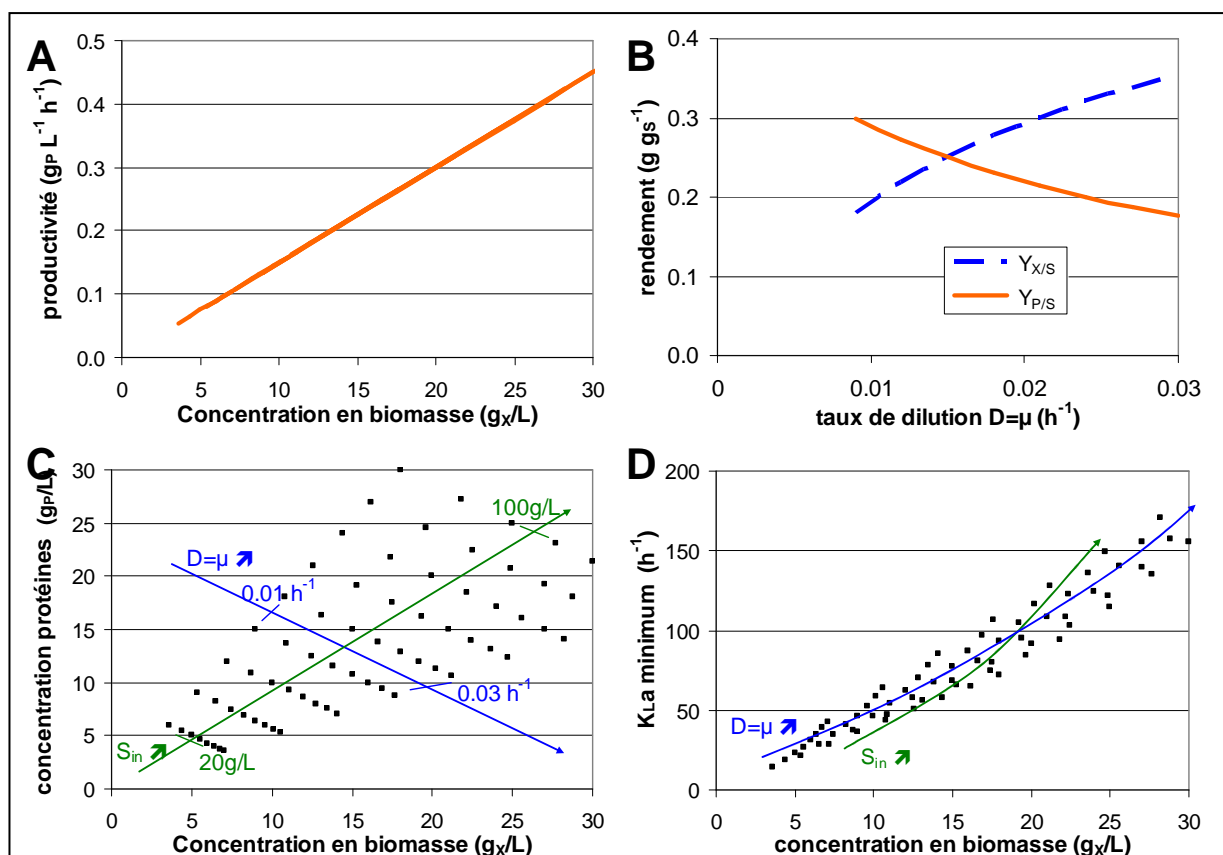


Figure III-25 : Simulations du protocole continu à l'état stationnaire.

Des simulations ont été réalisées pour $0.009 < D < 0.03 \text{ h}^{-1}$ (par pas de 0.003 h^{-1}) et pour $20 < S_{in} < 100 \text{ g/L}$ (par pas de 10 g/L).

La productivité ne dépend que de la concentration en biomasse à l'équilibre (A).

Les rendements en biomasse et protéines ne dépendent que du taux de dilution imposé (B).

Les concentrations en biomasse et protéines dépendent fortement du taux de dilution et de la concentration en lactose de l'alimentation (C).

La demande en oxygène dépend de même du taux de dilution et de la concentration en lactose de l'alimentation mais est fortement corrélée avec la concentration en biomasse (D).

Ainsi obtenir une forte productivité en protocole continu classique nécessitera une forte concentration en biomasse et un fort coefficient de transfert en oxygène.

Par rapport au protocole fed-batch, on remarque que :

- à même concentration en biomasse, le protocole continu permet une meilleure productivité, car le volume de réacteur disponible est utilisé en totalité, d'où une plus grande masse de biomasse productrice,
- le rendement en protéines est obligatoirement moins bon en continu qu'en fed-batch puisque une partie du sucre non négligeable est utilisée pour la partie croissance de la biomasse,
- alors que le protocole fed-batch nécessite des solutions d'alimentation très concentrées ($S_{in} > 125 \text{ g/L}$), le protocole continu se satisfait parfaitement de l'utilisation de solutions plus diluées ($S_{in} < 100 \text{ g/L}$), comme les hydrolysats attendus dans une bioraffinerie lignocellulosique.

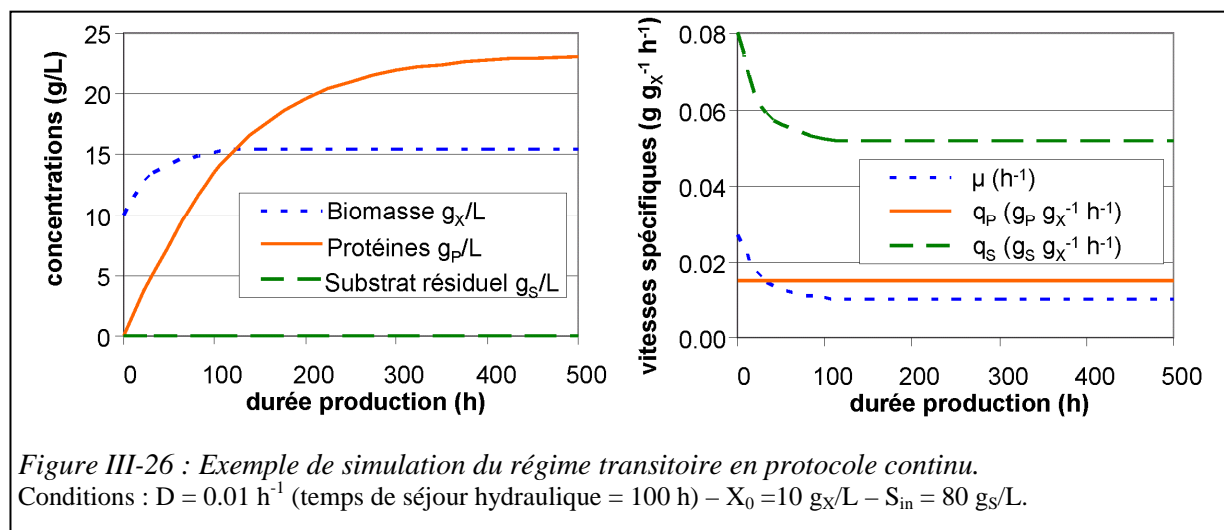
3.3.2 Prise en compte de l'état transitoire

Alors qu'il permet souvent les meilleures productivités, le protocole continu est rarement utilisé à l'échelle industrielle en raison des craintes de contamination. De plus dans le cas présent, les taux de dilutions sont très faibles, donc la durée nécessaire pour obtenir un état stationnaire est longue (500 h pour un taux de dilution de 0.01 h^{-1}).

Il est donc impératif de prendre en compte l'état transitoire avant l'obtention d'un éventuel état stationnaire, et de comparer protocole fed-batch et protocole continu pour une durée équivalente d'utilisation du bioréacteur.

3.3.2.1 Évolution du système

La simulation du régime transitoire en protocole continu (Figure III-26) montre que les vitesses spécifiques se stabilisent rapidement à la valeur théorique de l'état stationnaire (en 1 temps de séjour hydraulique). La concentration en biomasse se stabilise un peu plus lentement (en 2 temps de séjour hydraulique), et la concentration en protéines beaucoup plus lentement (en 5 temps de séjour hydraulique).



Cependant, comme le volume du fermenteur est utilisé à son maximum, la productivité est maximisée dès le début de la culture (du moins dès que la concentration en biomasse se stabilise) sans avoir besoin d'atteindre l'état stationnaire.

L'avantage du protocole continu en termes de productivité est donc valable aussi pendant le régime transitoire.

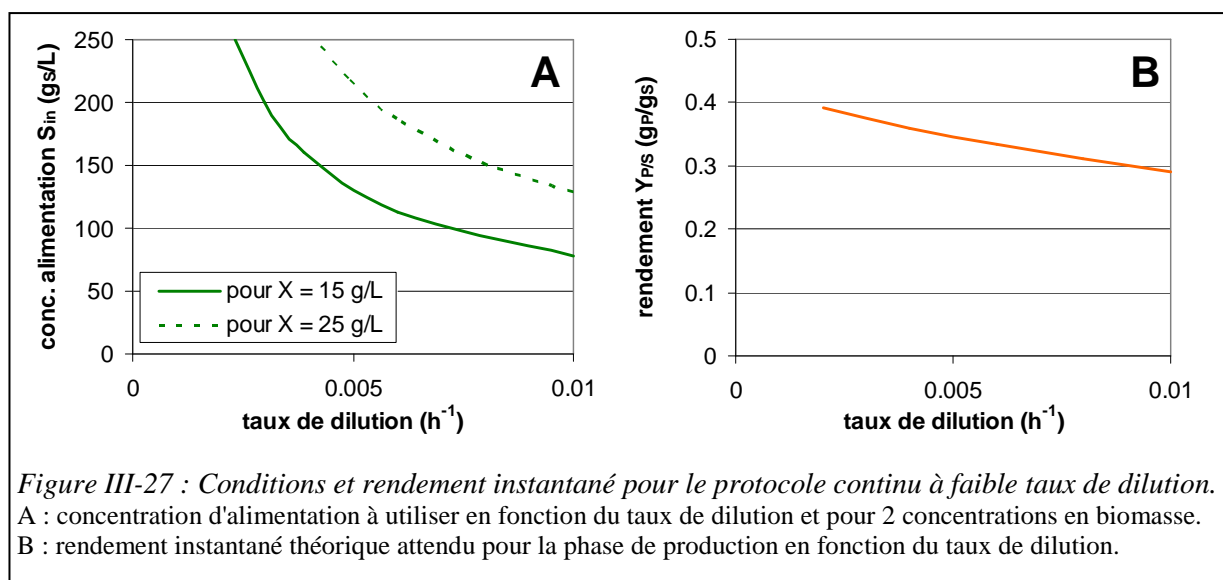
3.3.2.2 Protocole continu à faible taux de dilution

On peut alors proposer un protocole de culture en continu dans lequel on ne chercherait pas forcément à atteindre l'état stationnaire, mais on profiterait du fait que l'état transitoire offre les mêmes performances en productivité. Il est alors envisageable d'imposer des taux de dilution très faibles, et d'arrêter la culture bien avant l'état stationnaire, après une durée du même ordre que celle des cultures en fed-batch.

a Choix des conditions de culture pour la phase de production

Pour une concentration en biomasse donnée après la phase de croissance (et donc une productivité instantanée en phase de production), on peut choisir le taux de dilution à imposer en fonction de la concentration en sucres dans la solution d'alimentation (Figure III-27 A). Comme indiqué précédemment, pour le modèle étudié ici, le taux de dilution fixe le rendement instantané de production. Pour les faibles taux de dilution, ce rendement est compris entre 0.3 et 0.4 g_P/g_S (Figure III-27 B).

L'inconvénient du protocole continu classique par rapport au fed-batch pour *T. reesei* est la baisse de rendement en protéines due à l'utilisation d'une partie du substrat fourni pour la partie croissance. En imposant un taux de dilution très faible, le taux de croissance va être très faible, et la perte de rendement en protéines due à la partie croissance sera très limitée (Figure III-27 B).



b Influence de la durée sur les performances globales

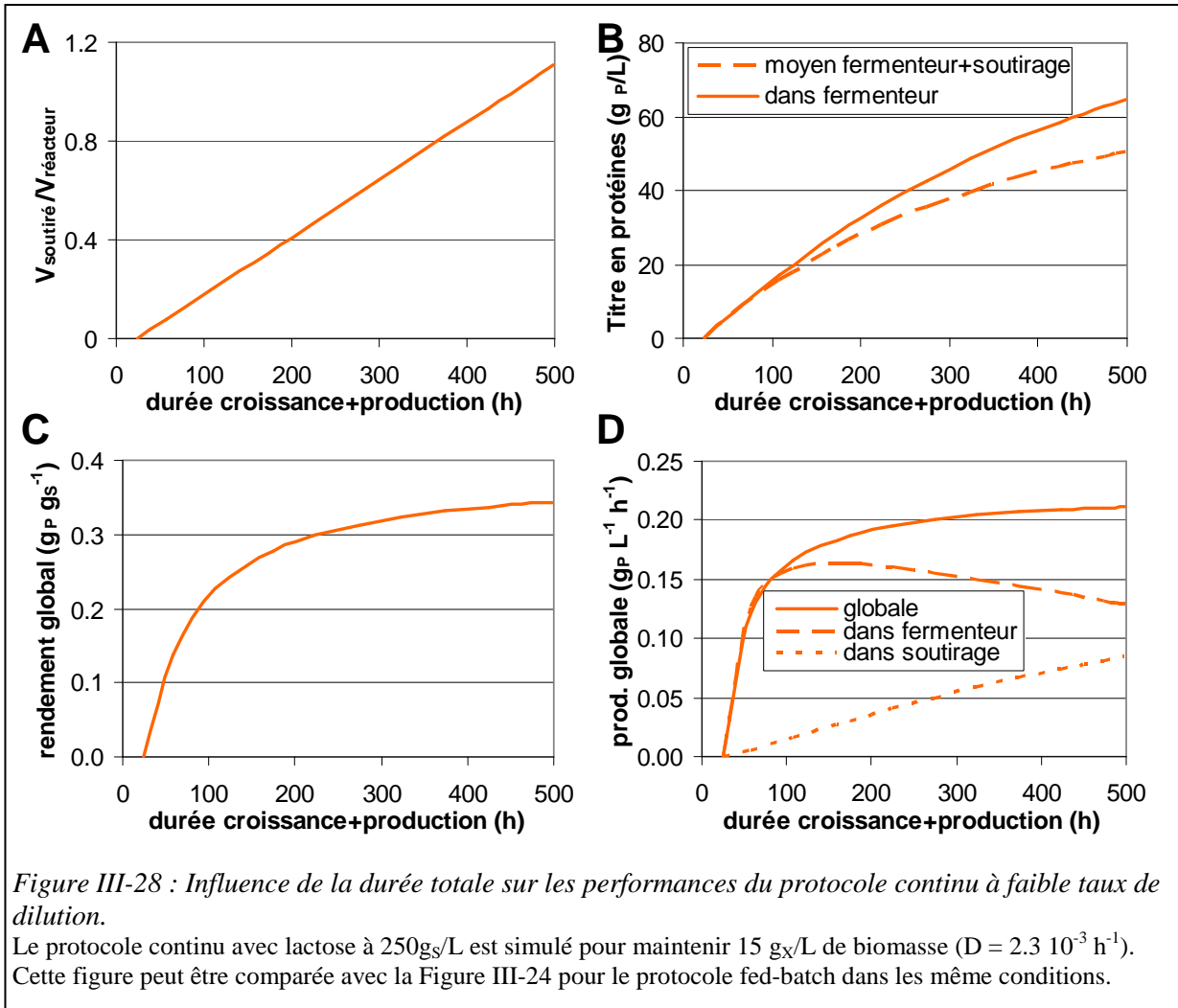
Contrairement au protocole fed-batch (Figure III-24 page 103), le volume de réacteur disponible est utilisé à son maximum dans le protocole continu, donc les performances en termes de rendement et de productivité sont améliorées quand on augmente la durée de la phase de production (Figure III-28 C et D). La productivité globale tend vers la valeur théorique instantanée, car la durée de la phase de croissance est très faible devant la durée de la phase de production. Elle est bien supérieure à la productivité en fed-batch.

Une partie non négligeable des protéines est récupérée dans le soutirage, en plus de la masse qui s'accumule dans le réacteur. Heureusement, plus le taux de dilution est faible, plus le volume du soutirage est faible. Dans l'exemple Figure III-28, le volume soutiré (après 500 h) est du même ordre que le volume du réacteur, il sera donc nécessaire d'avoir une capacité de stockage pour le volume soutiré.

Comme la concentration dans le soutirage est faible au début de la production, la concentration moyenne en protéines sur le volume total récupéré (réacteur+soutirage) est légèrement plus faible que dans le réacteur. Elle reste néanmoins aussi bonne que pour le protocole fed-batch (pour une même concentration d'alimentation).

Finalement, le protocole continu à faible taux de dilution (ou continu transitoire) cumule les avantages des protocoles fed-batch et continu, pour des durées équivalentes :

- productivité égale au protocole continu classique,
- rendement élevé, proche du rendement obtenu en fed-batch,
- demande en oxygène faible comme en protocole fed-batch,
- pas de variation de volume liquide dans le réacteur,
- volume soutiré plus faible qu'en continu classique,
- concentration finale en protéines élevée comme en fed-batch,
- possibilité d'augmenter la durée de production sans perte de productivité.



3.4 Comparaison des protocoles fed-batch et continu

3.4.1 Contraintes

Les simulations précédentes ont montré les avantages respectifs des protocoles fed-batch et continu. Pour terminer cette étude, ces 2 protocoles ont été comparés pour une même durée de phase de production (240 h), donc en considérant la phase transitoire du protocole continu et non l'état stationnaire théorique. On gardera donc en mémoire que cette durée de phase de production peut être facilement augmentée en protocole continu, mais pas en protocole fed-batch.

Deux paramètres ont été identifiés comme cruciaux précédemment : la concentration en biomasse productrice au début de la phase de production (en fin de croissance), et la concentration en sucre substrat carboné dans l'alimentation utilisée. Ces deux paramètres seront représentés respectivement en ordonnées et en abscisse dans les figures suivantes.

Les contraintes liées au taux de dilution (en protocole continu) ou à la variation de volume (en protocole fed-batch) donnent les domaines dans lesquels ces protocoles sont utilisables (Figure III-29). Aux faibles concentrations en sucre dans l'alimentation (50 à 100 g_S/L), seul le protocole continu est utilisable, alors qu'aux fortes concentrations (supérieures à 100 g_S/L) les 2 protocoles sont utilisables. Seul le protocole fed-batch sera simulé aux très fortes concentrations en sucre dans l'alimentation (supérieures à 250 g_S/L).

3.4.2 Grandeurs dimensionnantes

Le calcul des grandeurs dimensionnantes pour le cumul des phases de croissance et de production (Figure III-30 et Figure III-31) résume les grandes tendances observées précédemment.

La productivité est liée uniquement à la quantité de biomasse productrice (en masse), donc est plus forte en protocole continu qu'en protocole fed-batch (à concentration équivalente), puisque le volume du fermenteur est utilisé à son maximum (Figure III-30 A).

Le rendement de production de protéines par rapport au substrat est maximisé en protocole fed-batch (0.33 g_P/g_S). En protocole continu, les très faibles taux de dilution, entraînant de très faibles taux de croissance, permettent de retrouver un bon rendement (Figure III-30 B).

Le besoin en oxygène (calculé pour la phase de production uniquement) est lié principalement à la concentration en biomasse, mais aussi au taux de croissance (Figure III-31 A). Il est donc légèrement plus élevé en protocole continu qu'en protocole fed-batch, voire beaucoup plus important aux forts taux de dilution. Il faut néanmoins rappeler que le besoin en oxygène présenté ici correspond uniquement à la phase de production, et qu'il est bien plus élevé à la fin de la phase de croissance (mais seulement pendant quelques heures).

Concernant la concentration finale en protéines, elle est quasiment identique en protocole continu (moyenne sur le volume total produit) et en fed-batch, pour les mêmes concentrations en sucre dans l'alimentation et en biomasse dans le réacteur (Figure III-31 B). Obtenir une forte concentration finale en protéines nécessite d'utiliser des solutions d'alimentation très concentrées en sucres. Cependant, comme indiqué au paragraphe I.2.1.2.4 (page 39), dans le cas d'une utilisation sur place des enzymes, il n'est pas nécessaire de concentrer ou purifier les enzymes, donc la concentration finale en protéines n'est pas primordiale pour le choix d'un protocole de production. Cependant, la valeur minimale de 20g_P/L calculée alors nécessite d'utiliser comme substrat des solutions de sucres dont la concentration est supérieure à 100 g_S/L.

Finalement, le protocole continu à faible taux de dilution présente de nombreux avantages, aussi bien sur le fed-batch que sur le protocole continu classique. Il permet d'utiliser des solutions d'alimentation plus diluées, et d'obtenir une bonne productivité avec un besoin en oxygène quasiment identique.

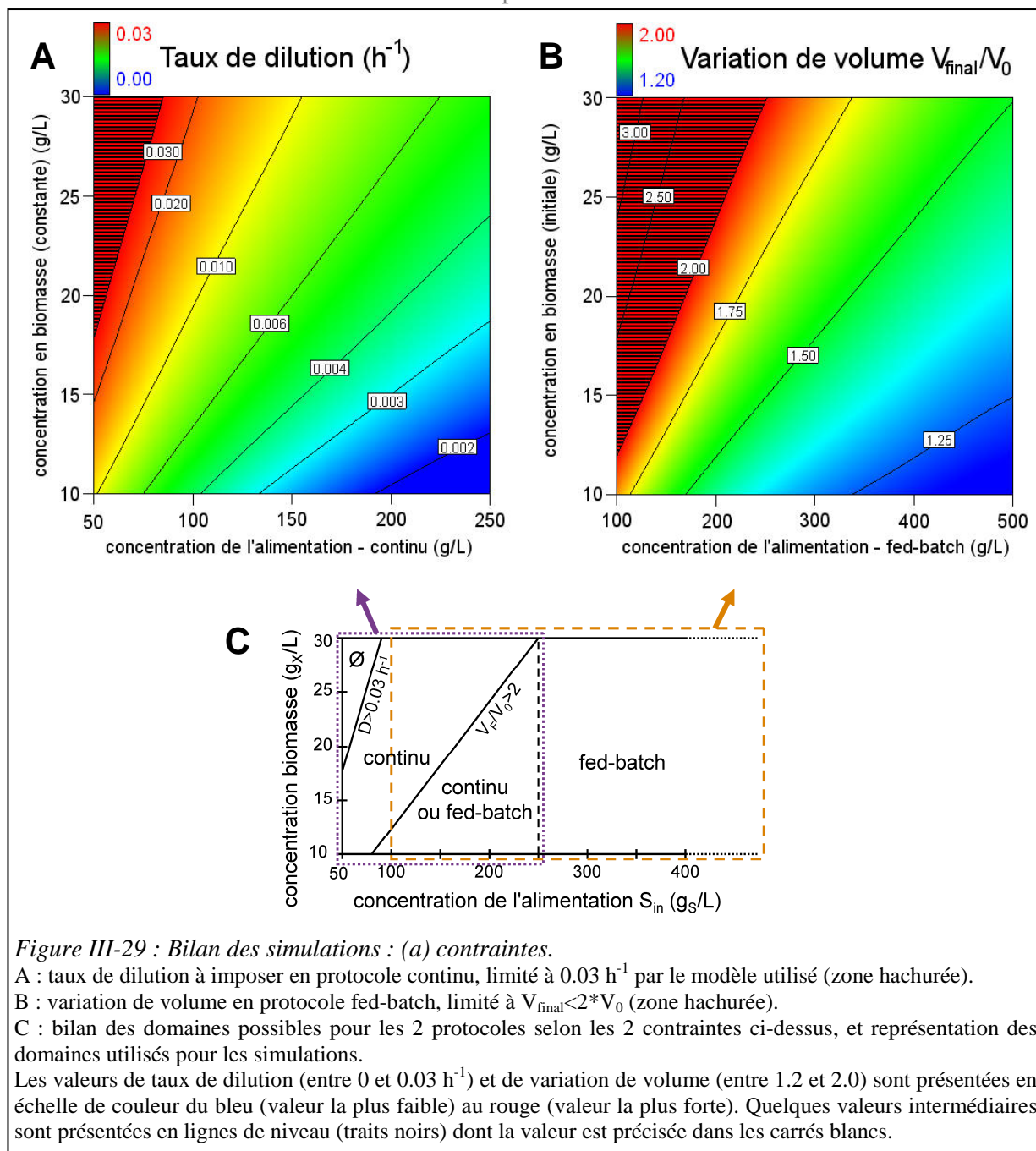


Figure III-29 : Bilan des simulations : (a) contraintes.

A : taux de dilution à imposer en protocole continu, limité à $0.03 h^{-1}$ par le modèle utilisé (zone hachurée).

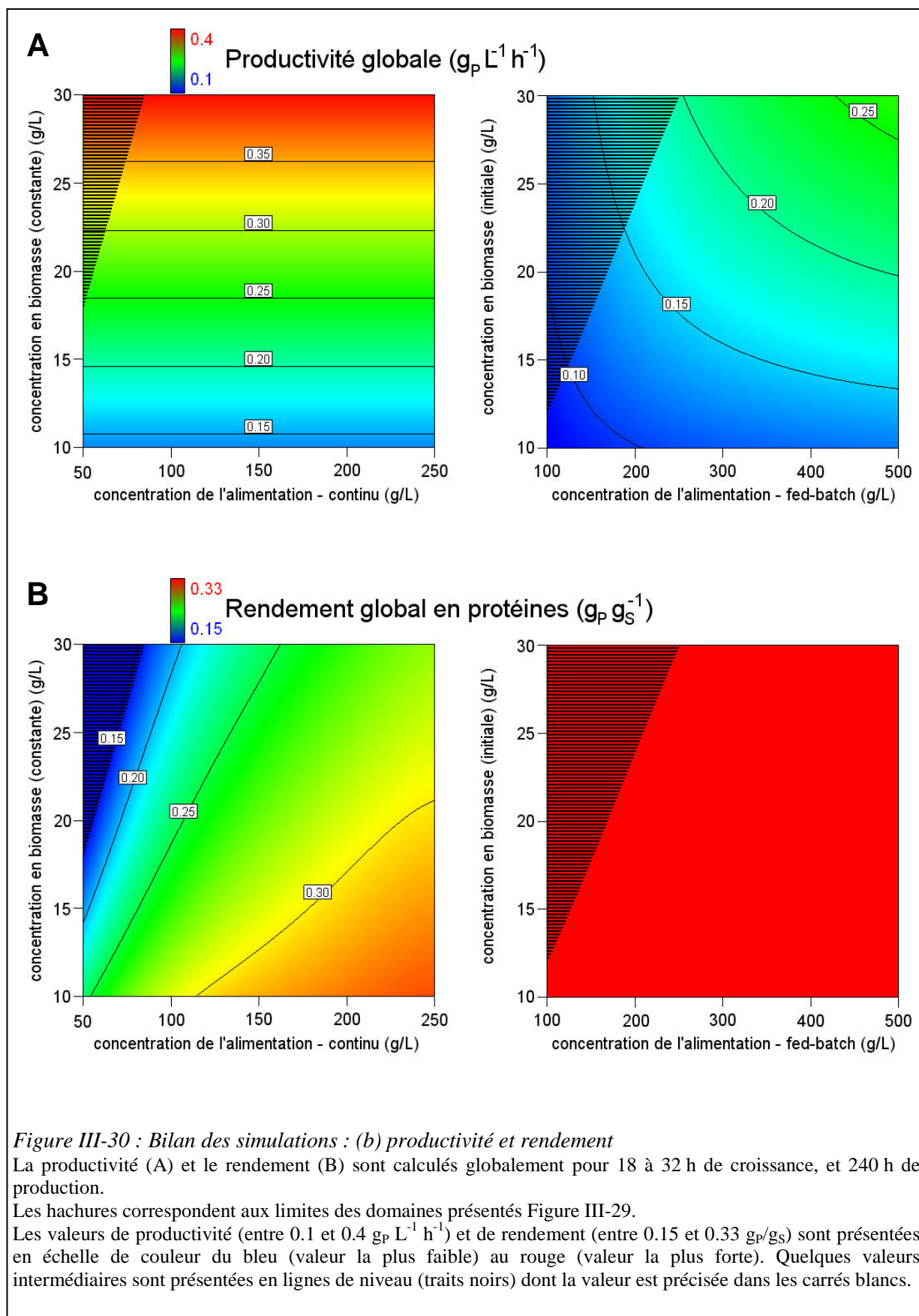
B : variation de volume en protocole fed-batch, limité à $V_{final} < 2 * V_0$ (zone hachurée).

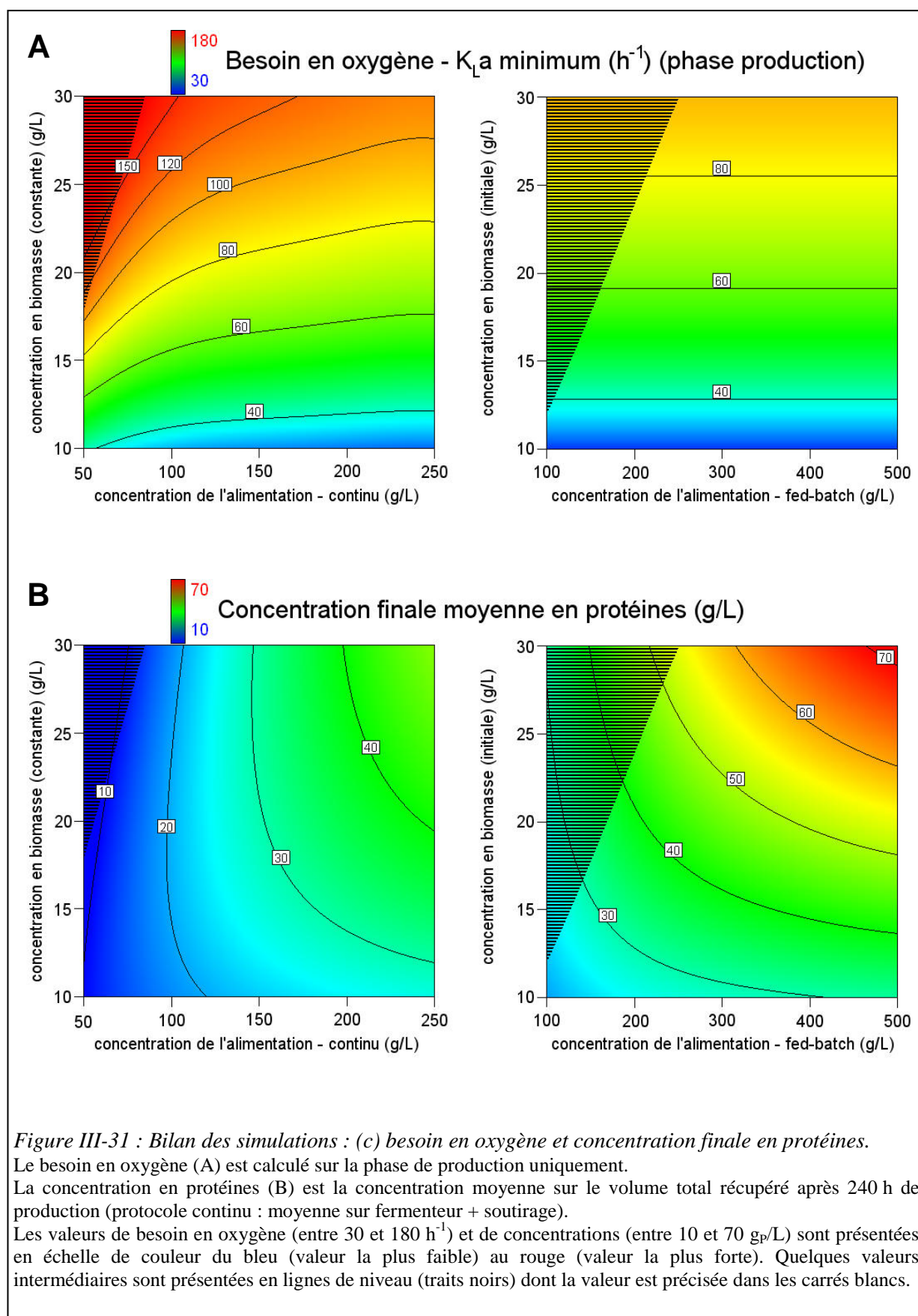
C : bilan des domaines possibles pour les 2 protocoles selon les 2 contraintes ci-dessus, et représentation des domaines utilisés pour les simulations.

Les valeurs de taux de dilution (entre 0 et $0.03 h^{-1}$) et de variation de volume (entre 1.2 et 2.0) sont présentées en échelle de couleur du bleu (valeur la plus faible) au rouge (valeur la plus forte). Quelques valeurs intermédiaires sont présentées en lignes de niveau (traits noirs) dont la valeur est précisée dans les carrés blancs.

Le seul avantage du fed-batch reste donc le rendement maximisé, ce qui pourrait être primordial si le substrat coûte très cher. Cependant, cet avantage tombe si il est nécessaire de concentrer les hydrolysats de biomasse lignocellulosique afin de les utiliser en protocole fed-batch, puisque cette étape peut se révéler coûteuse. De plus les premières études économiques (Kazi et al., 2010) semblent montrer que les coût d'investissement représentent 2/3 du coût de production des cellulases in situ, donc que c'est la productivité qui serait la grandeur dimensionnante primordiale devant le rendement.

Dans tous les cas, les 3 grandeurs dimensionnantes étudiées ici ne permettent pas à elles seules de trancher sur l'utilisation de tel ou tel protocole. Il sera nécessaire d'utiliser les valeurs obtenues pour réaliser une étude technico-économique complète de l'étape de production, avec le coût des installations (fermenteurs, moteurs, ...) et les coûts opératoires (aération, concentration des hydrolysats, ...) en prenant en compte notamment que l'utilisation de sucres issus de biomasse lignocellulosique se fait en compétition avec la production d'éthanol.





3.5 Conclusion sur la simulation des protocoles de conduite

Le modèle cinétique développé précédemment a été utilisé pour simuler les différents protocoles de conduite envisageables. Tout au long de cette étude, un intérêt particulier a été porté sur la concentration en substrat carboné dans la solution utilisée pour l'alimentation. En effet, cela peut être une contrainte pour l'utilisation d'hydrolysats de biomasse lignocellulosique comme substrat pour la production de cellulases.

En protocole fed-batch, le système tend vers un état où les vitesses spécifiques sont constantes, avec un taux de croissance nul dans le cas d'un débit d'alimentation fixe. Pour une concentration donnée en substrat, on peut donc choisir le débit d'alimentation afin de maximiser le rendement. En revanche, la productivité en fed-batch est faible car le volume de réacteur disponible n'est pas utilisé à son maximum. Le besoin en oxygène est minimisé et le titre final en protéines est maximisé.

En protocole continu classique avec obtention d'un état stationnaire, la productivité est forte grâce à l'utilisation de tout le volume de réacteur disponible. En revanche, le rendement est faible et le besoin en oxygène élevé en raison de l'utilisation d'une partie du substrat pour la croissance, afin de maintenir une concentration constante de biomasse productrice dans le réacteur malgré le soutirage. De plus, l'état stationnaire est très long à atteindre en raison des faibles taux de dilution.

Finalement, un très bon compromis consiste à réaliser la phase de production en protocole continu avec un très faible taux de dilution (débit équivalent à celui d'un fed-batch), sans attendre l'état stationnaire, qui n'est de toute façon pas atteignable dans des durées raisonnables. Ce protocole permet d'avoir à la fois une bonne productivité, un bon rendement, et un faible besoin en oxygène.

Toute cette étude a été réalisée avec du lactose pur comme substrat, ce qui serait trop coûteux à l'échelle industrielle. On cherchera donc à le remplacer en partie par des hydrolysats de biomasse lignocellulosique disponibles dans une bioraffinerie. Il convient donc d'étudier l'effet de ces hydrolysats sur le métabolisme de *T. reesei*.

IV. Intégration du protocole de production à l'échelle industrielle

Dans l'hypothèse d'une production de cellulases intégrée dans une bioraffinerie lignocellulosique, il convient d'étudier l'effet de l'intégration du protocole de production à l'échelle industrielle. Cela passe tout d'abord par l'utilisation d'hydrolysats sucrés présents dans la bioraffinerie. Ils contiennent d'une part des composés de dégradation potentiellement inhibiteurs pour *T. reesei* (IV.1, page 115) et d'autre part des mélanges de sucres, aussi bien hexoses que pentoses (IV.2.1, page 134). Par ailleurs, l'utilisation du lactose comme sucre inducteur est une option coûteuse, donc de nouveaux composés inducteurs ont été recherchés et étudiés (IV.2.2, page 150). Enfin les effets liés au changement d'échelle sont très importants lors de l'industrialisation d'un procédé biologique, et ont donc été étudiés en détail (IV.3, page 160).

1 Impact des composés de dégradation

Les différentes étapes de transformation des substrats lignocellulosiques entraînent la libération de nombreux composés, par hydrolyse chimique ou enzymatique. Certains de ces composés ont un pouvoir inhibiteur sur les microorganismes, dont *T. reesei*. Pour étudier séparément les effets de chaque composé, des milieux synthétiques ont été utilisés pour reproduire les hydrolysats potentiels.

1.1 En phase de croissance

1.1.1 Effet du pH sur les témoins

Pour cette étude des composés de dégradation, le protocole en "fioles fermées" a été utilisé car il permet de tester rapidement un grand nombre de conditions expérimentales, mais au détriment d'une grande précision puisque le suivi du CO₂ n'est pas directement relié à la croissance (II.3.1.1, page 61).

Comme l'étude des composés de dégradation a été menée avec des milieux de culture à différents pH, il est nécessaire en premier lieu de tester l'influence du pH initial sur la croissance (Figure IV-1). Les résultats montrent une plage de pH optimal entre pH 5.0 et 5.5 voire 6.0, puis une baisse progressive pour les pH plus faibles, avec à pH 3.5 une vitesse de production de CO₂ 27% plus faible. Le rendement de production de biomasse est inchangé.

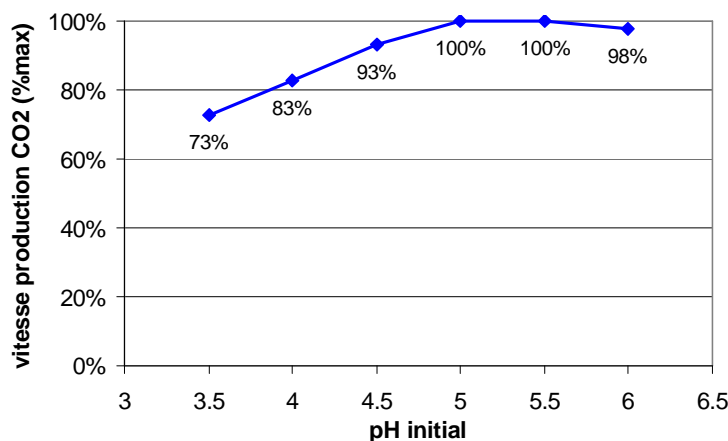


Figure IV-1 : Influence du pH sur la croissance de *T. reesei* sur glucose. La croissance de *T. reesei* est mesurée par la vitesse de production de CO₂ en protocole fioles fermées.

1.1.2 Cas particulier de l'acide acétique

1.1.2.1 Culture en fiole

Dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique, l'acide acétique provient de la dégradation chimique ou enzymatique des hémicelluloses, polymères fortement acétylés, et on observe classiquement des concentrations de l'ordre de 5 g/L. Il est généralement admis que c'est la forme acide qui a un pouvoir inhibiteur, car étant neutre et de faible poids moléculaire, elle traverse facilement la membrane externe des cellules et s'accumule dans le cytoplasme. L'effet d'inhibition va donc dépendre du pH de la culture (Herrero et al., 1985).

a Protocole

L'effet de la présence d'acide acétique sur la croissance de *T. reesei* (sur 15 g/L glucose) a été testé en protocole fioles fermées, avec différentes concentrations totales en acide acétique, et différents pH de culture (Figure IV-2), afin d'avoir des répartitions différentes entre forme acide et forme basique de l'acide acétique. Ainsi, 18 conditions initiales ont été testées (dont 1 témoin sans acide).

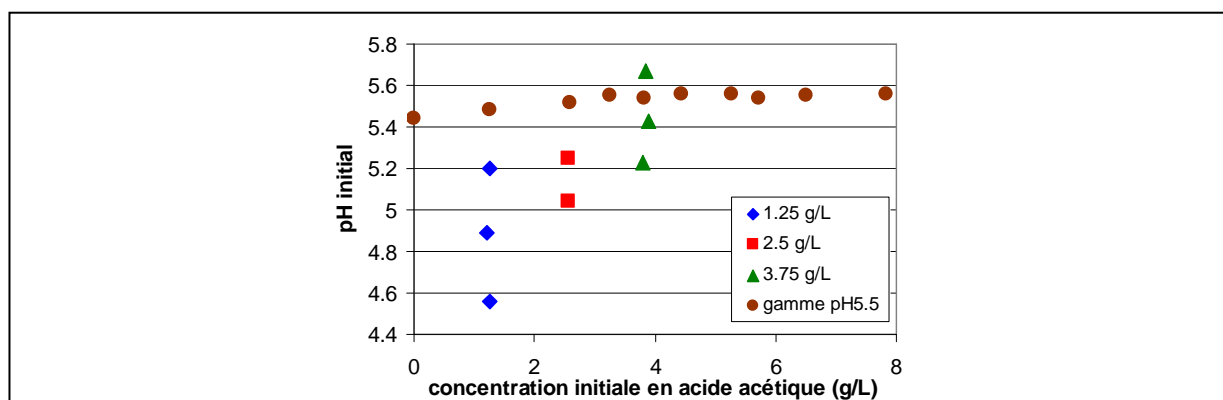


Figure IV-2 : Conditions initiales pour tester l'effet de l'acide acétique sur la croissance de *T. reesei*. Les 18 conditions initiales testées (mesure des différents pH et concentration totale en acide acétique) sont représentées en 4 groupes distincts, correspondant soit à un même pH pour différentes concentrations en acide acétique, soit à une même concentration en acide pour différents pH imposés.

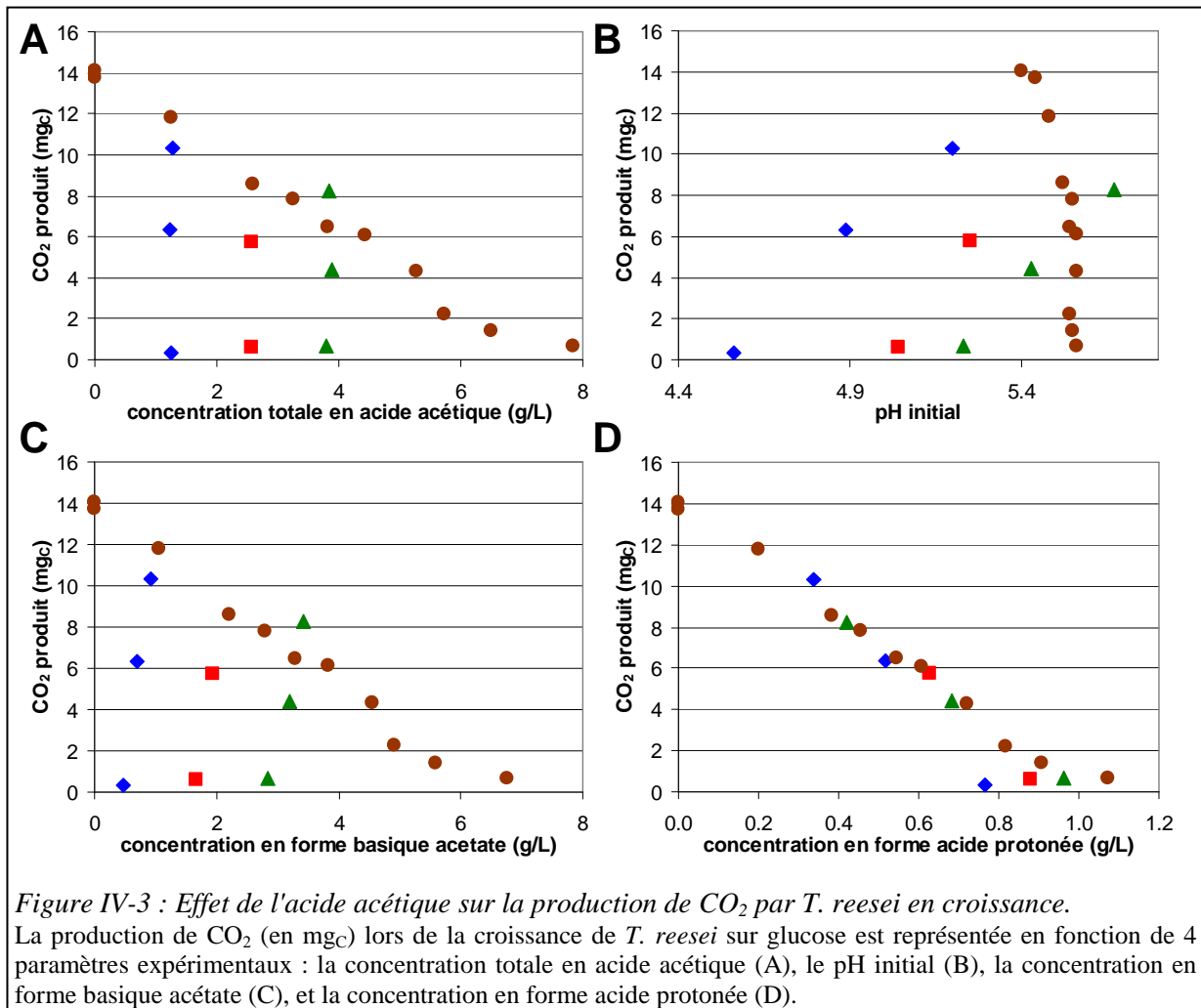
D'après l'étude précédente de l'effet du pH (IV.1.1.1, page précédente), la croissance sur glucose pur dans ce protocole va très peu dépendre du pH initial sur la plage étudiée ici (entre 4.6 et 5.7) avec au maximum 7% de ralentissement dû au pH (1 point expérimental concerné à pH 4.6, moins de 3% pour tous les autres).

Au cours de la culture, le pH des fioles contenant de l'acide acétique a été très stable grâce à son effet tampon additionnel (au maximum une augmentation de 0.38 unité de pH). Après 23 h (témoins) à 28 h (autres) de culture, le glucose consommé, l'acide acétique consommé, le CO₂ produit, et la biomasse produite ont été mesurés. Le bilan carbone se situe entre 95% et 140% pour 12 fioles sur 19, ce qui est dans une marge d'erreur acceptable pour des cultures en fiole avec ce protocole. En effet même sans inhibition par l'acide acétique, la croissance est limitée par la quantité d'oxygène piégée initialement donc l'avancement de la réaction de croissance est faible, et les incertitudes relatives de mesure sont grandes.

b Production de CO₂

La Figure IV-3 présente la production totale de CO₂ mesurée en fin de culture, en fonction des conditions expérimentales : pH (B), concentration totale en acide acétique (A), et répartition entre forme acide et basique (C et D). On observe que la production de CO₂ n'est corrélée ni avec le pH de la culture, ni avec la concentration totale en acide acétique (sous forme acide et basique), ni avec la concentration en forme basique acétate.

En revanche, on observe une très bonne corrélation de la production de CO₂ avec la concentration en forme acide protonée neutre de l'acide acétique (Figure IV-3 D). Ce résultat était attendu car conforme au mécanisme d'action communément admis pour expliquer l'entrée de l'acide acétique dans les cellules.



c Consommation des substrats et production de biomasse

De même que pour le CO₂, la seule corrélation observée pour la consommation des substrats (glucose et acide acétique) et la production de biomasse est celle avec la concentration en forme acide protonée neutre de l'acide acétique (Figure IV-4), donc quel que soit le pH ou la concentration totale en acide acétique.

De plus on remarque que l'effet de l'acide acétique sur le ralentissement de la croissance est très fort, avec une vitesse de production de biomasse divisée au moins par 2 dès 0.2 g/L en forme acide de l'acide acétique (soit 1.25 g/L d'acide acétique à pH 5.5). Enfin, comme l'ont rapporté (Szendyél and Zacchi, 2000), on observe une co-consommation du glucose et de l'acide acétique, avec environ 0.5 g/L d'acide acétique consommé pour 0.5 à 3 g/L de glucose consommé dans les fioles non totalement inhibées. Cette consommation d'acide acétique n'est pas due à une limitation en glucose car la quantité de glucose consommé est 3 à 5 fois plus faible que la quantité initiale (15g/L).

Les cultures présentant un bilan carbone entre 90 et 130% ont été utilisées pour calculer les rendements (Figure IV-5). Le rendement en biomasse est de 0.6 g_C/g_C sur glucose pur. En présence d'acide acétique, le rendement en biomasse diminue rapidement jusqu'à environ 0.4 g_C/g_C (l'incertitude est forte sur cette valeur car la croissance est très limitée dans ces fioles). En effet, les cellules

consomment de l'énergie pour lutter contre l'acide acétique, donc consomment du substrat et produisent du CO₂ sans croissance associée, ce qui diminue le rendement en biomasse. A ce stade, il n'est pas possible de conclure quant à l'utilisation de l'acide acétique consommé: le carbone est-il intégré dans la biomasse ou bien est-il uniquement minéralisé en CO₂?

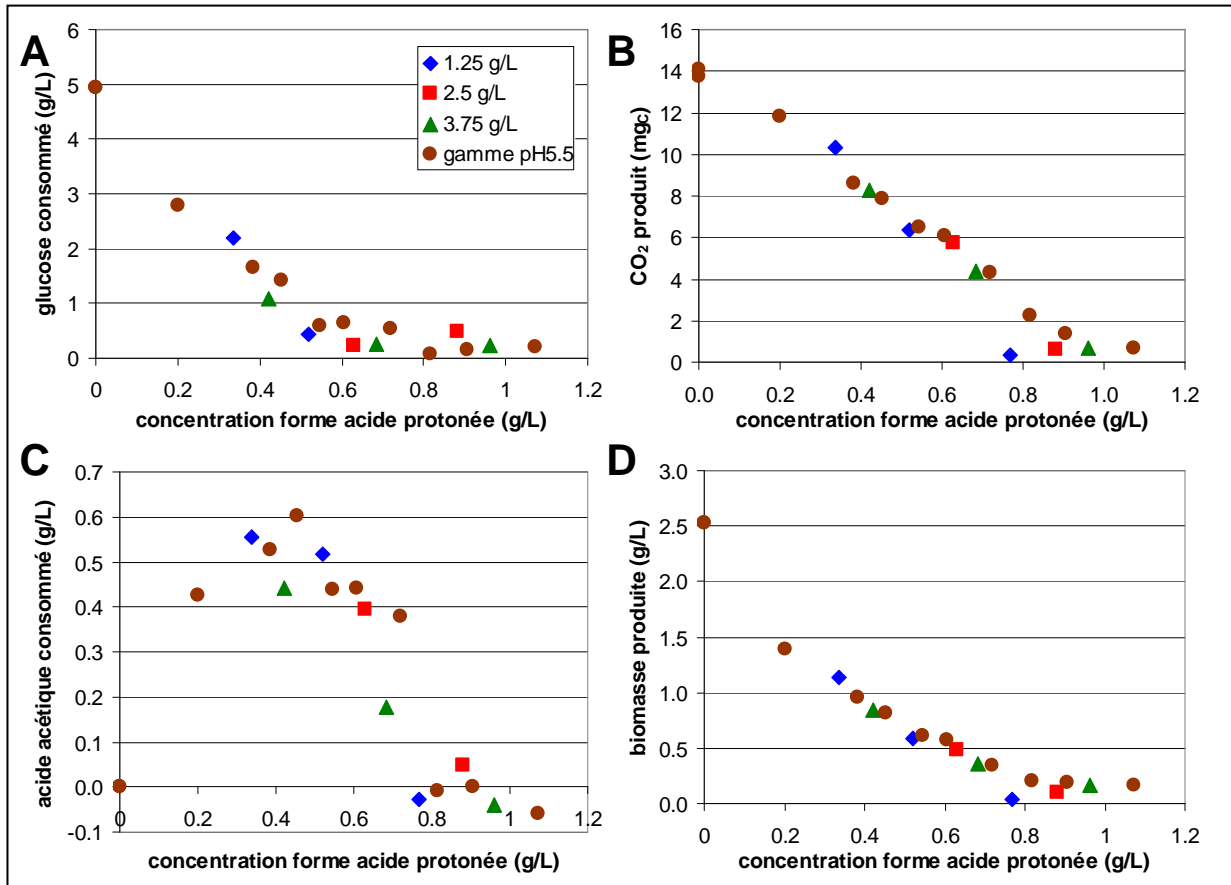


Figure IV-4 : Effet de l'acide acétique sur le métabolisme de *T. reesei* en croissance.

Les substrats consommés (glucose (A) et acide acétique (C)), ainsi que les produits (masse de CO₂ (B) et concentration en biomasse (D)) sont présentées en fonction de la concentration en forme acide protonée de l'acide acétique (seule paramètre expérimental qui donne une bonne corrélation).

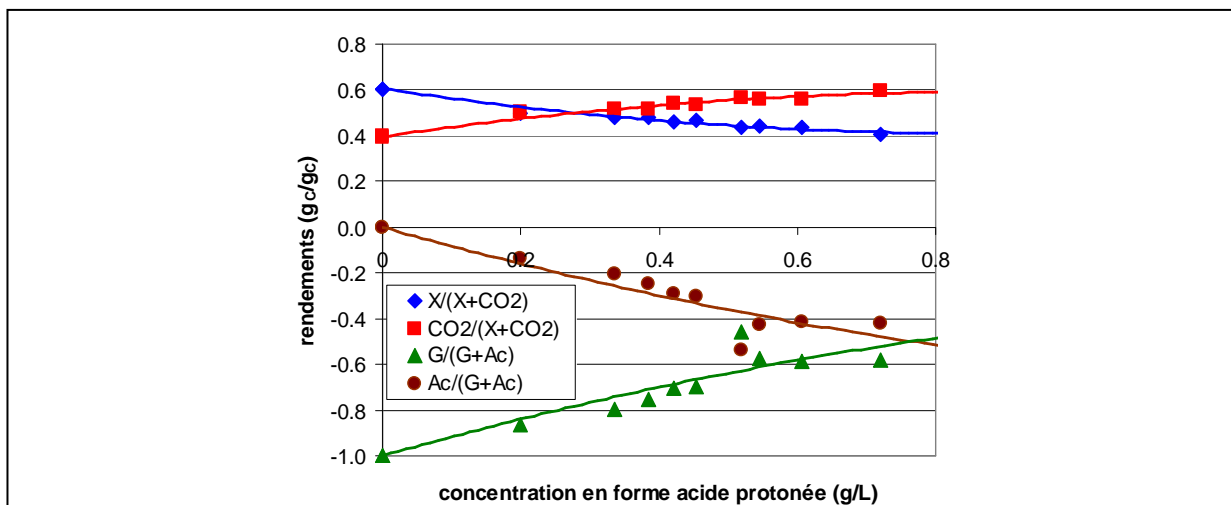


Figure IV-5 : Effet de l'acide acétique sur les rendements.

Rendements de production ou de consommation mesurés lors de la croissance de *T. reesei* sur glucose en présence d'acide acétique, représentés en fonction de la concentration en forme acide de l'acide acétique.

1.1.2.2 Culture en bioréacteur: protocole continu

a Protocole

Pour répondre à la question précédente, une étude en bioréacteur a été menée, avec pour objectif de réaliser une croissance sur acide acétique seul, et ainsi mesurer le rendement de croissance sur acide acétique. Pour éviter l'inhibition de la croissance par la forme acide protonée de l'acide acétique, un haut pH de culture (1 unité au dessus du pKa soit 5.75) a été choisi pour avoir l'acide acétique majoritairement sous forme basique acétate. De plus, le protocole continu à taux de dilution moyen ($D=0.03 \text{ h}^{-1} \approx \mu_{\text{max}}/2$) a été choisi pour avoir une limitation de la croissance par le substrat, donc une concentration résiduelle en acide acétique faible, voire nulle.

Suite à l'échec de ce test, l'expérience a ensuite été réorientée vers une co-alimentation par un mélange de glucose et d'acide acétique. La culture en bioréacteur a ainsi connu 4 phases successives :

- de 0 à 23 h : batch sur glucose (10 g/L initial)
- de 23 à 48 h : continu sur 10 g/L acide acétique
- de 48 à 56 h : batch sur acide acétique
- de 57 à 120 h : continu sur mélange 10 g/L acide acétique et 5 g/L glucose, mais après 103 h de culture une sporulation a été observée.

b Résultats

Le suivi des concentrations (Figure IV-6) et le calcul des vitesses volumiques et spécifiques (Tableau IV-1) montrent qu'en l'absence de glucose il n'y a ni croissance, ni production de protéines (données non présentées), on observe un fort lessivage de la culture en continu, et une biomasse stable en batch : la croissance de *T. reesei* est impossible sur acide acétique seul. Cependant une partie de l'acide acétique est minéralisé en CO_2 à une vitesse spécifique de consommation de l'ordre de $40 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ (à comparer à titre d'exemple à la vitesse spécifique maximale de consommation de glucose de l'ordre de $130 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour *T. reesei*)

En présence de glucose en culture continue, on observe de la croissance, mais légèrement moins rapide que le taux de dilution imposé en raison de l'inhibition par l'acide acétique (environ 0.025 h^{-1} contre 0.03 h^{-1} imposé) d'où une baisse continue de la concentration en biomasse. Le rendement de croissance sur glucose est entre 0.35 et 0.40 $\text{g}_x/\text{g}_{\text{Glucose}}$ contre plutôt 0.50 attendu pour une culture sur glucose pur à ce taux de dilution, probablement en raison de la consommation d'une partie du glucose pour lutter contre l'acide acétique.

Dans cette dernière phase, on observe toujours une consommation d'une partie de l'acide acétique, avec la même vitesse spécifique de l'ordre de $40 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$, donc non modifiée par la présence de glucose. Or la consommation d'acide acétique est du même ordre que la consommation de glucose (0.11 et $0.15 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ respectivement), donc si une partie de l'acide acétique était intégrée dans la biomasse, on s'attendrait à un rendement au moins égal à celui sur glucose pur. On peut quasiment conclure que l'acide acétique n'est pas utilisé pour la croissance mais uniquement minéralisé.

Cependant, les résultats de cette culture ne permettent pas de conclure de façon définitive à la question de savoir si une partie du carbone issue de l'acide acétique est incorporée à la biomasse lors de la croissance sur glucose. Il faudrait pour cela réaliser une culture avec des substrats marqués.

On peut néanmoins supposer un métabolisme dans lequel :

- d'une part l'acide acétique est minéralisé avec une vitesse spécifique d'environ $40 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$;
- d'autre part le glucose est consommé :
 - pour la croissance, avec un rendement théorique limite de $0.60 \text{ g}_x/\text{g}_s$,
 - pour lutter contre l'acide acétique (et pour la maintenance des cellules), avec une vitesse spécifique de l'ordre de $25 \text{ mg g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$;

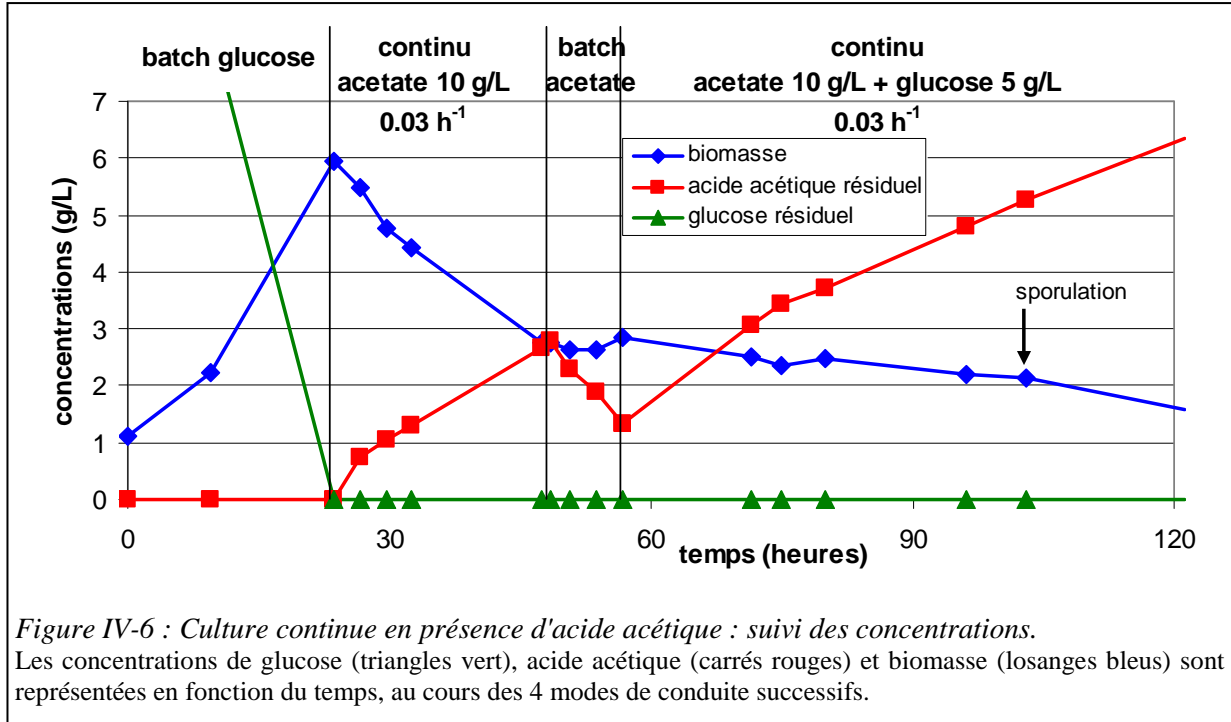


Tableau IV-1 : Bilans par phases de la culture continue sur glucose en présence d'acide acétique.

Le calcul des vitesses volumiques et spécifiques de consommation/production, ainsi que du bilan carbone, sont présentés pour chaque phase de culture (bilans par intervalles de 7 à 28

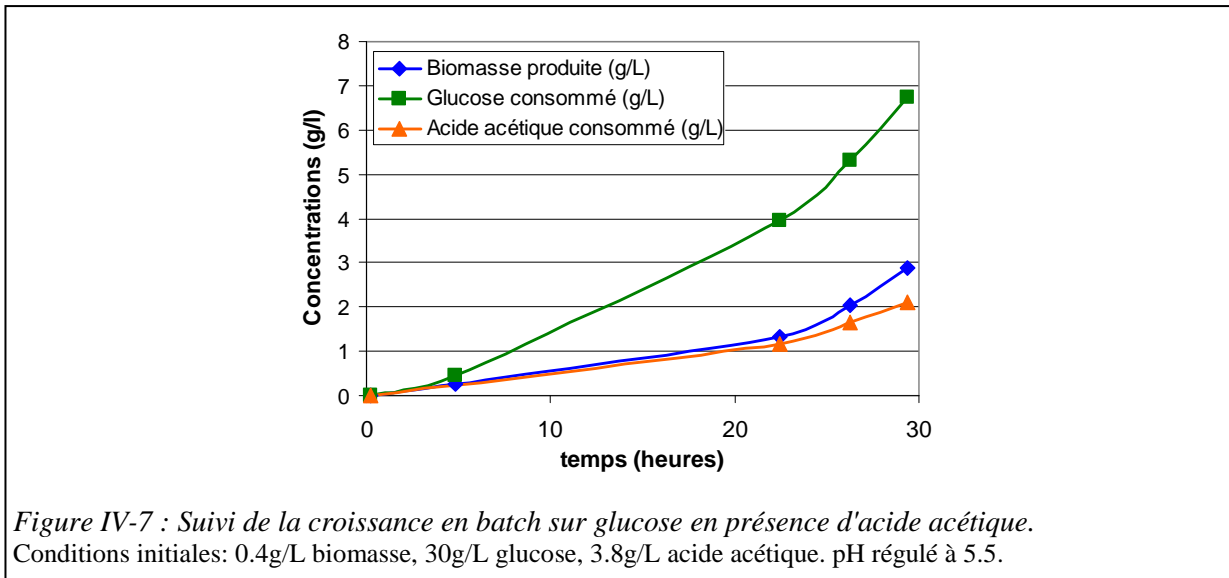
	h ⁻¹	vit. volumiques (g L ⁻¹ h ⁻¹)				BILAN CARB.	vit. spéc. (mg g ⁻¹ h ⁻¹)				
		D	r _{Gluc}	r _{Ac}	r _X		r _{CO2}	q _{Gluc}	q _{Ac}	μ	q _{CO2}
batch glucose	0 à 23h	0						-120	71		
continu acétate	23 à 32h	0.03		-0.13	-0.02	0.23	103%		-26	-3	44
	32 à 48h	0.03		-0.15	0.00	0.24	107%		-41	-1	67
batch acétate	49 à 56h	0		-0.18	0.01	0.20	81%		-65	4	72
continu glucose+acétate	56 à 75h	0.03	-0.15	-0.11	0.05	0.24	86%	-58	-41	19	94
	75 à 103h	0.03	-0.15	-0.11	0.06	0.21	81%	-65	-47	27	92

1.1.2.3 Culture en bioréacteur: protocole batch

Les mesures précédentes ont été obtenues dans le cas d'une croissance limitée par le taux de dilution imposé par le protocole continu. Pour vérifier ces mesures dans le cas d'une croissance sans limitation, une croissance a été réalisée en batch sur 30 g/L de glucose en présence de 3.8 g/L d'acide acétique et à pH 5.5.

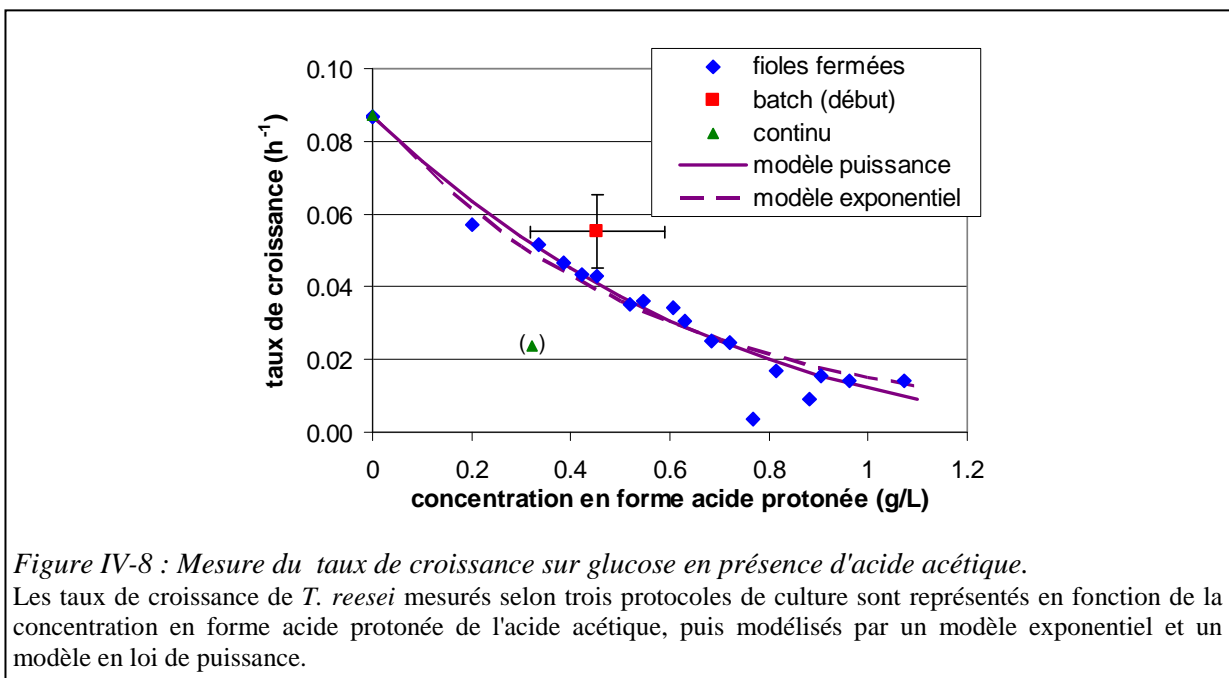
Une fois de plus, la co-consommation de l'acide acétique et du glucose a été observée (Figure IV-7), et la vitesse spécifique de consommation d'acide acétique, mesurée à environ 50 mg g⁻¹ h⁻¹, est cohérente avec résultats précédents. Le taux de croissance moyen est de 0.073 h⁻¹, et il semble qu'effectivement ce taux de croissance augmente petit à petit (d'environ 0.05 à environ 0.09 h⁻¹), au fur et à mesure que la concentration en acide acétique diminue. Néanmoins, des mesures plus précises seraient nécessaires pour valider ce point.

Dans le cas étudié ici sans limitation par la source de carbone, il est possible que l'acide acétique soit utilisé pour fabriquer des réserves sous forme de lipides, comme c'est le cas chez d'autres microorganismes (Fei et al., 2011). Cette hypothèse n'a pas été vérifiée car dans tous les cas les réserves formées au cours de la croissance sont probablement consommées au début de phase de production, à cause de la limitation carbone imposée.



1.1.2.4 Bilan pour acide acétique

Les taux de croissance mesurés dans les 3 expériences précédentes pour différentes concentrations en acide acétique sont comparés dans la Figure IV-8. La valeur moyenne obtenue pour le protocole continu n'est pas comparable aux autres puisque le taux de croissance était limité par le taux de dilution imposé. La valeur obtenue en protocole batch s'écarte un peu des valeurs mesurées en fioles fermées, mais l'incertitude de mesure est forte car il s'agit d'une valeur moyenne entre 4 et 22 h de culture.



A partir des valeurs mesurées en fioles fermées, plusieurs modèles mathématiques ont été testés pour modéliser l'inhibition observée. Deux modèles se sont révélés corrects, et aussi bon l'un que l'autre pour modéliser les données expérimentales :

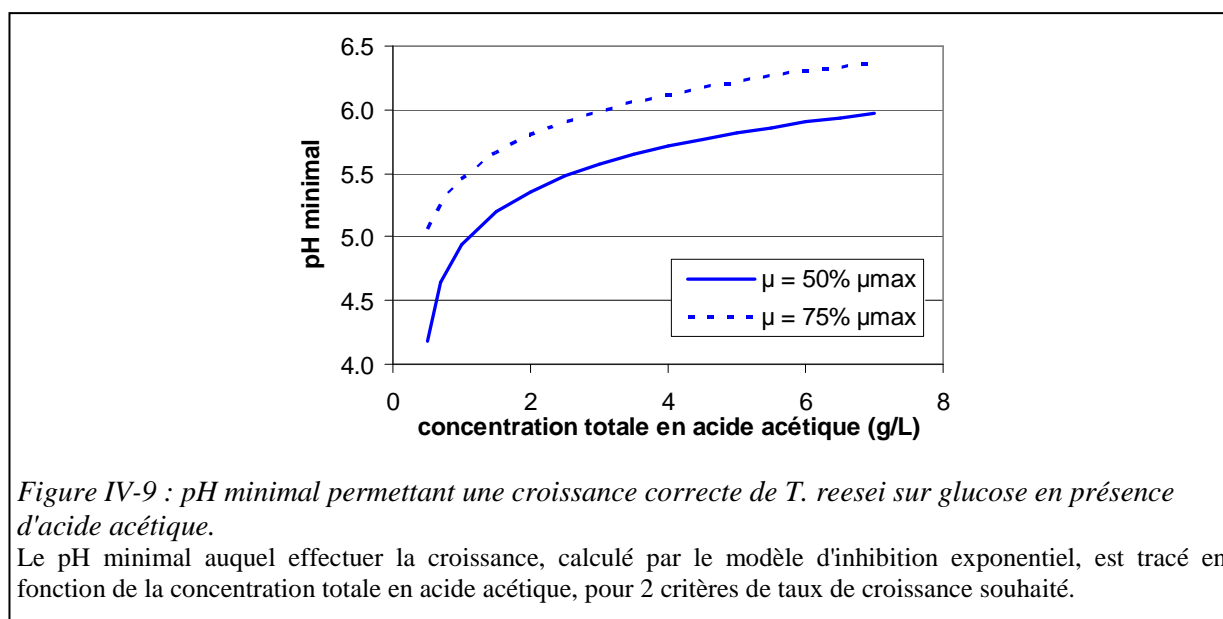
- modèle puissance :
$$\mu = \mu_{\max} \left(1 - \frac{I}{I_{\max}} \right)^n$$
 avec $I_{\max} = 2.28 \text{ g/L}$ et $n = 3.4$

- modèles exponentiel : $\mu = \mu_{\max} \exp\left(-\frac{I}{K_I}\right)$ avec $K_I = 0.57 \text{ g/L}$

où I est la concentration en forme acide protonée de l'acide acétique donc peut s'écrire en fonction du pH, du pKa, et de la concentration totale en acide acétique: $I = \frac{[\text{acide acétique}]_{\text{totale}}}{1 + 10^{pH - pKa}}$

Ces modèles d'inhibition pourront être utilisés dans le cas des hydrolysats de biomasse lignocellulosique, dont on connaît la concentration totale en acide acétique, afin de calculer le pH minimum auquel effectuer la croissance. La Figure IV-9 présente le résultat de ce calcul pour deux critères de taux de croissance à maintenir: $\mu = 0.50 * \mu_{\max}$ et $\mu = 0.75 * \mu_{\max}$.

Au vu du résultat, et comme la concentration en acide acétique dans les hydrolysats réels est de l'ordre de 5 g/L, on conseille fortement de réaliser la croissance sur hydrolysats réels à pH 6.0.



1.1.3 Étude des composés de dégradation pris individuellement

De même pour cette étude, le protocole en fioles fermées a été choisi en première approche, malgré ses limitations (production de CO₂ pas strictement proportionnelle à la croissance), pour permettre de tester facilement l'effet des nombreux composés de dégradation possibles.

1.1.3.1 Acides faibles

Après l'acide acétique, l'effet des autres acides faibles issus de la dégradation thermique des sucres a été étudié, à savoir l'acide formique et l'acide lévulinique, ainsi que de l'acide furoïque qui peut provenir de l'oxydation du furfural par *T. reesei* (Szengyel and Zacchi, 2000). Deux pH initiaux ont été testés : pH 4.0 pour être sous forme acide majoritaire et 5.5 pour être sous forme basique majoritaire.

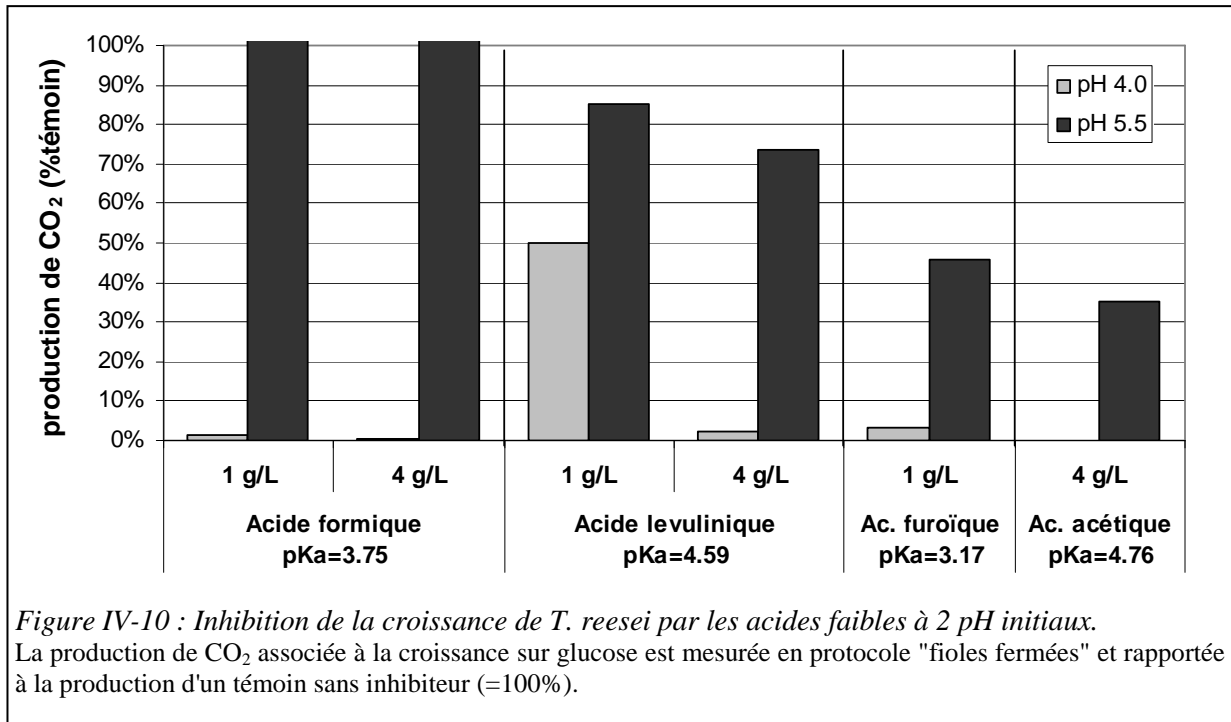
Les résultats pour la production de CO₂ rapportée au témoin à même pH (Figure IV-10) montrent que :

- à pH 4.0, l'inhibition est quasiment totale.
- à pH 5.5, et par rapport aux concentrations observées dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique (I.2.3.1.2, page 45) :
 - les acides formique et lévulinique ne sont pas inhibiteurs à concentration inférieure à 1g/L, ils ne seront donc plus étudiés par la suite.

- 1. Impact des composés de dégradation -

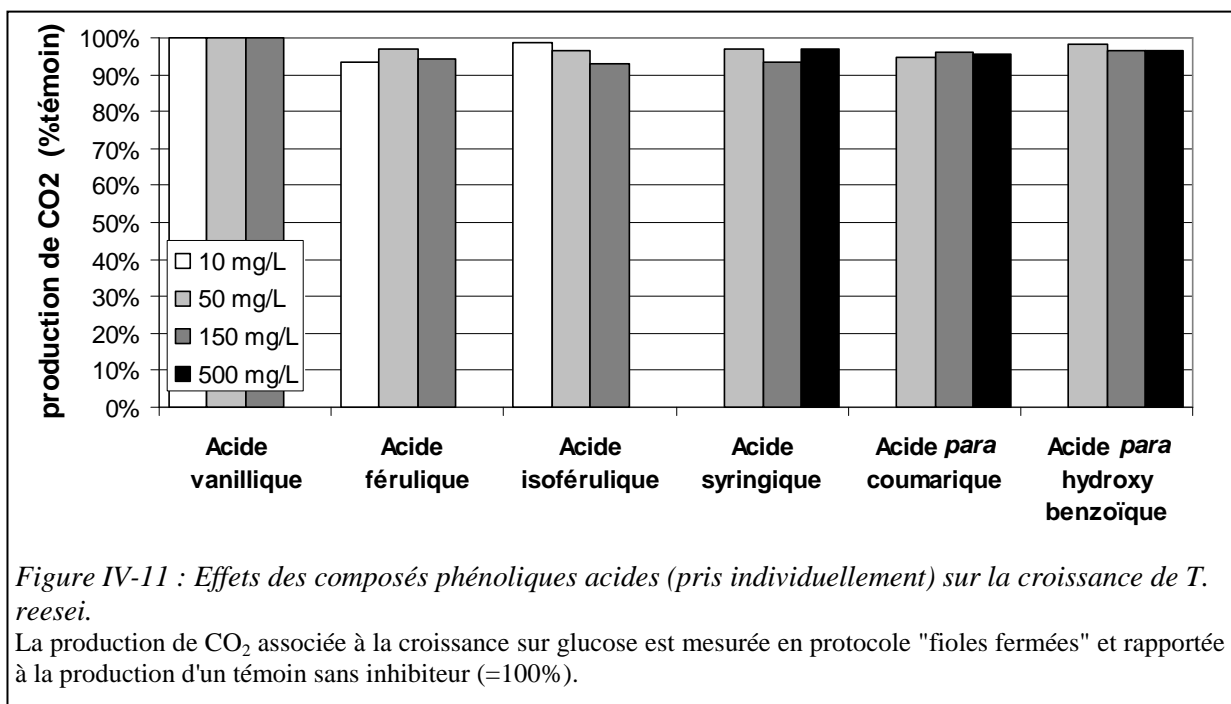
- l'acide furoïque (issu du furfural) est moyennement inhibiteur : il sera donc conservé pour la suite de l'étude, mais sous sa forme initiale furfural.

En raison de la forte influence du pH en présence d'acides faibles, toute la suite de cette étude sera réalisée à pH 5.5.



1.1.3.2 Composés phénoliques acides

Six composés phénoliques acides ont été sélectionnés pour leur présence avérée dans des hydrolysats de biomasse lignocellulosique et testés sur une gamme de concentrations couvrant l'ensemble des valeurs mesurées dans ces hydrolysats (voir Tableau I-6 page 46) : de 10 à 150 mg/L pour certains, 50 à 500 mg/L pour les autres. De même que précédemment, leur impact sur la croissance de *T. reesei* sur glucose a été mesuré par le protocole "fioles fermées".



Les résultats (Figure IV-11) montrent que pris individuellement, les acides vanillique, férulique, isoférulique, syringique, *para*-coumarique, et *para*-hydroxybenzoïque n'ont aucun effet inhibiteur (degré d'inhibition < 10% à toutes les concentrations testées). Ils ne seront donc pas conservés dans la suite de l'étude.

1.1.3.3 Composés phénoliques alcools, aldéhydes et cétones.

De même, l'impact de 6 composés phénoliques alcool, aldéhyde et cétone sur la croissance de *T. reesei* a été mesuré par le protocole "flacons fermés", sur une gamme de concentrations couvrant l'ensemble des valeurs mesurées dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique.

Les résultats (Figure IV-12) montrent que

- l'hydroquinone n'a pas d'effet inhibiteur,
- le guaiacol, le syringaldéhyde et le *p*-hydroxybenzaldéhyde présentent des effets inhibiteurs avec un ralentissement de 20 à 60 %, mais uniquement pour des concentrations supérieures à celles mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques ($C > 150 \text{ mg/L}$), donc seront considérés comme non inhibiteurs,
- la vaniline et la *p*-benzoquinone présentent des effets inhibiteurs à plus de 20% pour des concentrations recouvrant les valeurs mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques (entre 30 et 200 mg/L pour la vaniline, 30 mg/L pour la *p*-benzoquinone), donc seront considérées comme des molécules inhibitrices par la suite.

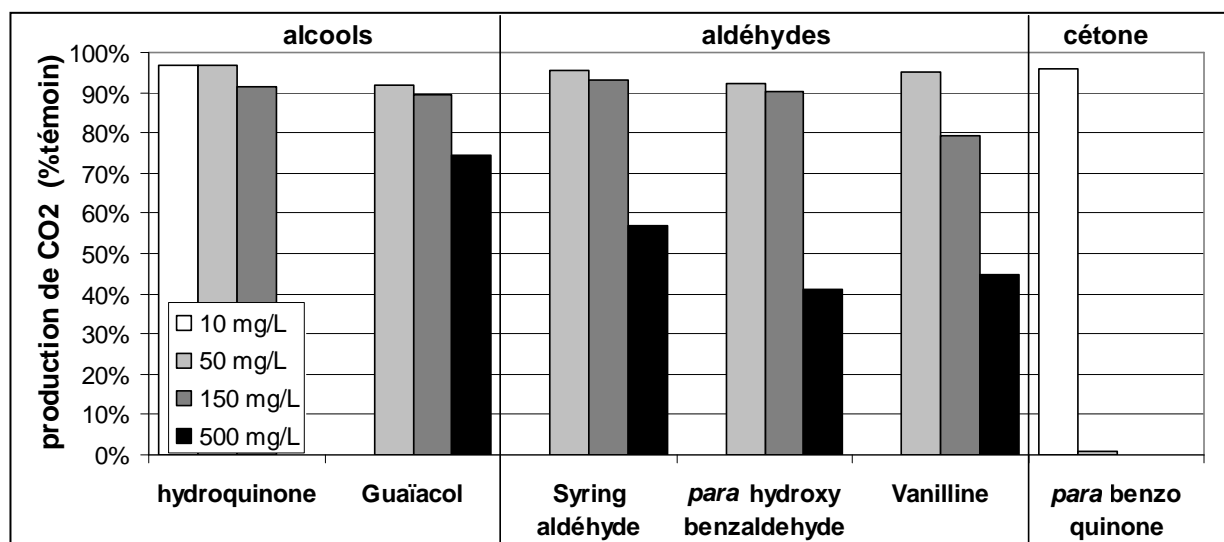


Figure IV-12 : Effets des composés phénoliques alcool, aldéhyde et cétone (pris individuellement) sur la croissance de *T. reesei*.

La production de CO₂ associée à la croissance sur glucose est mesurée en protocole "flacons fermés" et rapportée à la production d'un témoin sans inhibiteur (=100%).

1.1.4 Étude des composés inhibiteurs en mélange

L'étude des composés de dégradation de la biomasse lignocellulosique, pris individuellement, a permis de séparer :

- d'une part des composés inhibiteurs aux concentrations mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques : *para*-benzoquinone, furfural (pour l'instant testé uniquement sous forme oxydée acide furoïque), acide acétique, vanilline, 5HMF (Ce dernier n'a pas été testé dans les expériences préliminaires mais est bien connu dans la littérature comme étant inhibiteur de la croissance de *S. cerevisiae* (Palmqvist and Hahn-Hagerdal, 2000b))
- d'autre part des composés non inhibiteurs aux concentrations mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques, qui sont donc regroupés dans un "pool supposé non inhibiteur".

Comme tous ces composés sont présents en mélange dans les hydrolysats lignocellulosiques, leurs effets et interactions 2 à 2 ont été testés en mélange au moyen de plans d'expérience. Deux logiciels ont été utilisés pour leur création et leur analyse : Design Expert v8.0 (State-Ease Inc.) et Minitab 13 (Minitab Inc.).

1.1.4.1 Première mise en évidence des effets et interactions

Pour définir le domaine expérimental du plan, il a été décidé de se placer dans des gammes de concentrations qui soit correspondent aux concentrations mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques, soit sont moins concentrés pour permettre une croissance suffisante et ainsi observer des effets (d'après les résultats des expériences préliminaires).

En effet, les hydrolysats potentiels contiendraient environ 75 g/L à 100 g/L de sucres, donc pourraient être dilués trois à quatre fois pour une utilisation pour la croissance de *T. reesei*, ce qui diluerait aussi les composés inhibiteurs.

Le plan d'expérience mis en œuvre est un plan factoriel fractionnaire de résolution VI, à 6 facteurs et 2 niveaux (Tableau IV-2). Ceci permet de mettre en évidence les effets principaux des facteurs et toutes les interactions 2 à 2 (sans alias) avec le minimum d'expériences. En l'occurrence, ce plan comptabilise 32 expériences et deux points au centre.

La réponse Y étudiée est égale à la production de CO₂ rapportée à celle d'un témoin sans inhibiteur : $Y = \frac{\text{productionCO}_2}{\text{productionCO}_2\text{témoin}}$.

Tableau IV-2 : Conditions expérimentales du plan factoriel fractionnaire.
Correspondance entre coordonnées centrées réduites et valeurs de concentration pour les 6 facteurs du plan d'expérience.

	Facteur	A	B	C	D	E	F
		<i>p</i> -benzoquinone	furfural	5-HMF	acide acétique	vanilline	pool supposé non inhibiteur
valeurs de concentrations (mg/L)	+1	50	1000	500	3000	250	25 de chaque
	-1	10	400	150	1000	100	0
	Points au centre (0)	30	700	325	2000	175	12.5

L'analyse des résultats montre que seuls 4 facteurs (l'acide acétique, la vanilline, le furfural et la *p*-benzoquinone) et trois interactions (*p*-benzoquinone-acide acétique, *p*-benzoquinone-furfural et *p*-benzoquinone-vanilline) influent de manière significative sur le développement de *T. reesei* (Figure IV-13). Cependant, les 3 interactions identifiées auraient un effet bénéfique sur la croissance, ce qui n'est pas intuitif et donc nécessiterait une confirmation.

Ces résultats montrent que le furfural est inhibiteur par lui-même et pas seulement sous la forme oxydée acide furoïque.

Par ailleurs, tous les composés regroupés dans le "pool supposé non inhibiteur" n'ont ni effet ni interaction avec les autres composés du plan d'expérience (syringaldéhyde, hydroquinone, *p*-hydroxybenzaldéhyde, guaïacol, ainsi que les acides férulique, isoférulique, vanillique, syringique, *para*-coumarique et *p*-hydroxybenzoïque, tous à 25mg/L).

A l'inverse de *S. cerevisiae*, le 5-HMF n'a pas non plus d'effet ni d'interaction sur la croissance de *T. reesei*, il sera par la suite ajouté au "pool non inhibiteur" à la concentration de 150mg/L.

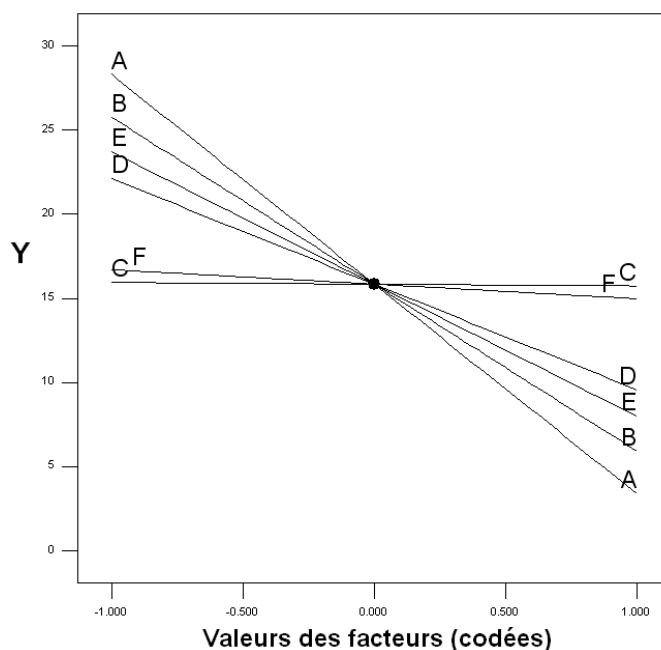


Figure IV-13 : Effets principaux sur la croissance de *T. reesei* des composés de dégradation en mélange.

Trace de Piepel présentant l'évolution de la réponse Y en fonction de la variation des 6 facteurs du plan (codage des facteurs précisé dans le Tableau IV-2 ci-dessus).

1.1.4.2 Validation des résultats et modélisation complète

a Pool non inhibiteur

Le "pool non inhibiteur" contenant le 5-HMF et 10 composés phénoliques a été comparé à un témoin sans inhibiteur (expérience réalisée en triplicate). Les résultats (Figure IV-14) valident une nouvelle fois que ce pool n'a pas d'effet significatif sur la croissance de *T. reesei*. Par la suite, il est ajouté au milieu de culture de toutes les fioles.

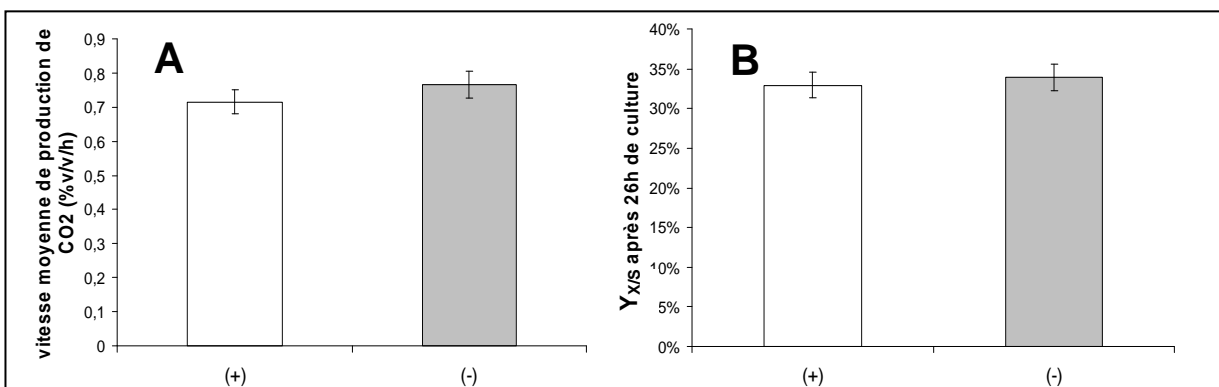


Figure IV-14 : Effet du pool non inhibiteur sur la croissance de *T. reesei*.

La croissance de *T. reesei* sur glucose est comparée en présence (+) ou absence (-) du "pool non inhibiteur". (A) vitesse moyenne de production de CO₂ - (B) rendement de conversion du glucose en biomasse ($Y_{X/S}$).

b Plan d'expérience en surface de réponse

Le plan d'expérience mis en œuvre pour confirmer les effets et interactions des composés est un plan en surface de réponse comptabilisant 24 expériences, contenant les 4 facteurs significatifs déterminés précédemment (Tableau IV-3).

Tableau IV-3 : Matrice expérimentale du second plan d'expérience.

Std n° expériences	Type de points	valeurs de concentrations en mg/L				Réponse Y r _{CO2} /r _{CO2} témoin en %
		Facteur A p-benzoquinone	Facteur B furfural	Facteur C acide acétique	Facteur D vaniline	
1	Edge	25	340	1000	100	30.4
2	Edge	11.8	700	1000	100	12.9
3	Edge	10	200	2000	100	74.1
4	Plane	10	640	2200	100	24.1
5	Edge	25	700	2500	100	11.8
6	Plane	15.5	450	3000	100	15
7	Plane	15.5	450	3000	100	17.4
8	Edge	25	200	3000	140	5.3
9	Plane	15.5	200	2800	160	11.6
10	Plane	15.5	200	1000	180	34.7
11	Plane	10	450	2000	180	15.1
12	Center	17.5	450	2000	180	9.8
13	Center	17.5	450	2000	180	10.6
14	Center	17.5	450	2000	180	10.6
15	CentEdge	10	700	3000	180	7.2
16	Edge	25	700	1000	200	7.3
17	CentEdge	10	450	1000	250	9.8
18	Edge	25	200	1500	250	1.2
19	Plane	15.5	255	1800	250	4.7
20	Plane	15.5	700	2000	250	3.3
21	Plane	15.5	700	2000	250	4.5
22	Edge	11.5	200	3000	250	3.6
23	Edge	25	560	3000	250	0.9
24	Plane	15.5	200	1000	180	3.7

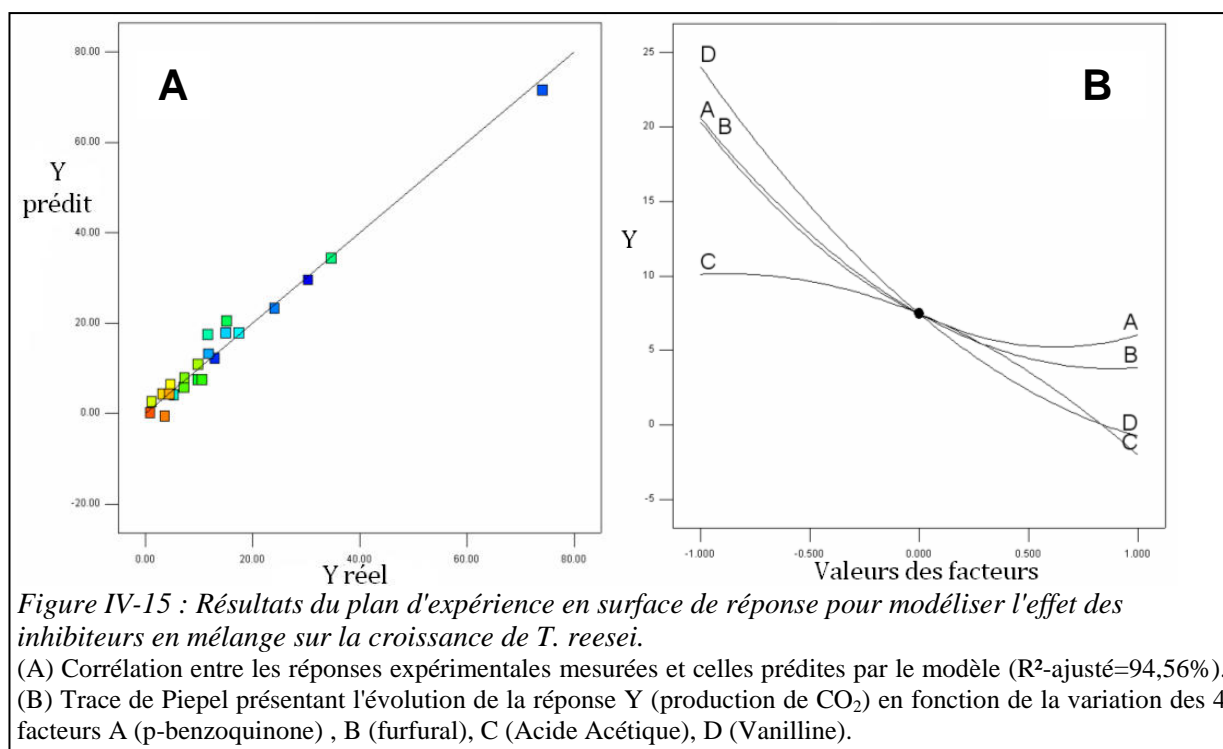
L'analyse des résultats du plan permet de définir un modèle quadratique qui décrit les effets combinés de la p-benzoquinone, du furfural, de l'acide acétique et de la vanilline ainsi que les interactions significatives associées :

$$Y = 255.4 - 7.7*[p\text{-benzo.}] - 0.32*[furfural] - 4.48.10^{-3}*[Ac. acétique] - 0.77442*[Vanilline] + 4.36.10^{-3}*[p\text{-benzo.}]*[furfural] + 6.85.10^{-3}*[p\text{-benzo.}]*[Vanilline] + 3.10^{-5}*[furfural]*[Ac.acétique] + 5.1.10^{-4}*[furfural]*[Vanilline] + 0.10160*[p\text{-benzo.}]^2 + 8.10^{-5}*[furfural]^2$$

Le R²-ajusté de ce modèle est de 94,6% et le R² de prédiction est de 80%². La Figure IV-15 A montre la bonne adéquation entre les réponses expérimentales mesurées et celles prédites par le modèle.

Cependant, le protocole utilisé pour réaliser ce plan d'expérience mesure uniquement la vitesse initiale de croissance, donc le modèle qui en découle est valable uniquement pour estimer cette réponse.

² Le coefficient de détermination ajusté est une correction statistique du coefficient de détermination pour tenir compte du nombre de variables du modèle, afin de pouvoir comparer entre elles des régressions dont le nombre de variables est différent. Le R² de prédiction représente le pourcentage du domaine expérimental dont la réponse est correctement prédite par le modèle.



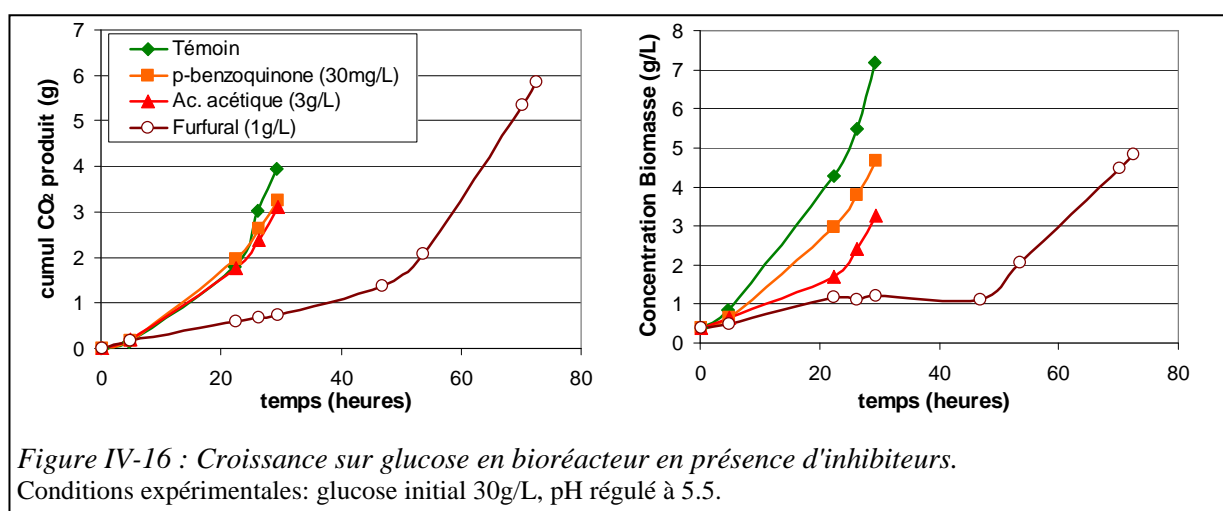
1.1.5 Effet cinétique des effets inhibiteurs en bioréacteur

1.1.5.1 Effet de latence

L'effet de 3 inhibiteurs (*para*-benzoquinone, acide acétique et furfural) a été testé en bioréacteur et comparé à un témoin sans inhibiteur, afin d'observer plus précisément les cinétiques de croissance (Figure IV-16).

En présence d'acide acétique ou de *para*-benzoquinone, la production de CO_2 est semblable à celle du témoin, mais la consommation de glucose est légèrement ralentie et la production de biomasse est fortement ralentie. Le rendement de conversion de glucose en biomasse est plus faible, respectivement de 0.37 et 0.40 g_X/g_S contre 0.50 g_X/g_S dans le témoin.

Dans le cas du furfural, on observe une très longue phase de latence (48h) pendant laquelle la croissance est très limitée. Ensuite la croissance démarre à une vitesse équivalente à celle observée dans le cas de la *para*-benzoquinone, mais le rendement final est encore plus faible, environ 0.24 g_X/g_S .



Les rendements observés pour la biomasse, plus faibles en présence d'inhibiteurs, sont le signe que le micro-organisme consomme de l'énergie (qui provient du glucose) pour lutter contre leur présence, comme dans le cas de l'acide acétique précédemment étudié.

Le phénomène de latence observé dans le cas du furfural est problématique vis-à-vis du protocole en fioles fermées utilisé précédemment. En effet, ce protocole ne mesure que la vitesse initiale de croissance, qui est très limitée en présence de furfural, alors que la croissance est correcte une fois la latence terminée. Si l'on veut tenir compte de la latence, il faudrait utiliser un autre protocole expérimental qui permette l'observation et la quantification de ces 2 phases.

Dans tous les cas, il n'est pas imaginable à l'échelle industrielle de proposer un protocole qui contienne une phase de latence de 48h car d'une part cela entraînerait une forte baisse de productivité, et d'autre part on risquerait une contamination du milieu de culture. Il faudra donc trouver un moyen soit de sélectionner des souches moins sensibles à cet effet, soit d'utiliser des conditions de prétraitement minimisant la formation de furfural, soit de détoxifier les hydrolysats contenant du furfural à trop haute concentration.

1.1.5.2 Suivi des inhibiteurs

Afin de mieux comprendre les effets observés, la concentration résiduelle de l'acide acétique et du furfural a été suivie au cours de la croissance. Ceci n'a pas pu être réalisé pour la *para*-benzoquinone car les techniques de dosages n'étaient pas au point pour ce composé chez IFP Energies nouvelles. Quant à la vanilline, elle n'a pas été testée en bioréacteur, mais un dosage réalisé sur une fiole du plan d'expérience semble montrer qu'elle est dégradée, très probablement en acide vanillique.

La présentation plus précise du suivi de l'acide acétique a déjà été effectuée au paragraphe IV.1.1.2.3, page 120.

Concernant le furfural, il semble qu'il est oxydé en acide furoïque pendant la phase de latence (Figure IV-17), ce qui est cohérent avec les observations de (Szengyel and Zacchi, 2000). Cependant, le dosage de l'acide furoïque était peu précis, et il n'est pas possible de conclure quant à la transformation stœchiométrique du furfural en acide furoïque. En effet, il est possible qu'une partie du furfural soit également strippé par l'aération dans le fermenteur. Ici 48 h ont été nécessaires pour détoxifier 2 g/L de furfural par oxydation et/ou stripping.

Après la phase de latence, le démarrage de la croissance du micro-organisme est simultané avec la fin de la dégradation du furfural. Cependant, la croissance est ralentie par la présence d'acide furoïque, ce qui est cohérent avec les résultats initiaux en fiole (voir Figure IV-10 page 123).

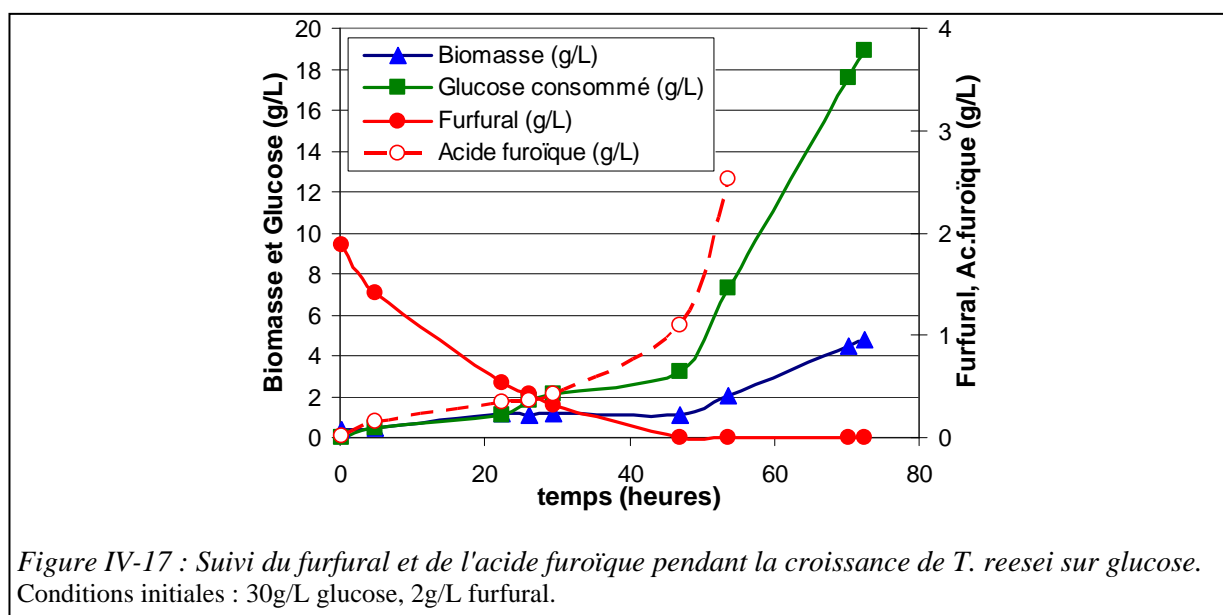


Figure IV-17 : Suivi du furfural et de l'acide furoïque pendant la croissance de *T. reesei* sur glucose. Conditions initiales : 30g/L glucose, 2g/L furfural.

Ainsi le furfural cumule 2 actions consécutives contre *T. reesei*, ce qui est très pénalisant pour la productivité de la phase de croissance. Il est donc indispensable de réduire au maximum la dose de furfural dans les hydrolysats lignocellulosiques avant utilisation pour la croissance de *T. reesei*. Le furfural a une faible pression de vapeur saturante et pourrait par exemple être éliminé par évaporation sous vide (Mussatto and Roberto, 2004).

1.1.6 Recommandations pour la croissance

Finalement, en raison de la latence induite par certains inhibiteurs comme le furfural, le modèle obtenu lors du plan d'expérience en fiole fermées ne peut pas être validé pour estimer la production de biomasse dans une condition donnée.

Cependant, la somme de résultats obtenus permet de proposer des recommandations de concentrations maximales de chacun des composés présents en mélange afin d'avoir une croissance acceptable (Tableau IV-4).

Par comparaison avec les concentrations moyennes mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques, on remarque que:

- la *para*-benzoquinone risque d'être problématique, et IFP Energies nouvelles ne dispose pas de méthode de dosage pour ce composé en mélange ;
- l'acide acétique est présent en concentration supérieure (dans le cas à pH 5.5), mais comme recommandé précédemment, l'effet d'inhibition peut être diminué en réalisant la croissance à pH 6.0 ;
- le furfural et la vanilline sont présents dans les hydrolysats à des concentrations semblables aux recommandations, donc peuvent potentiellement induire une inhibition ;
- les autres composés phénoliques, le 5-HMF et les acides lévuliniques et formiques n'entraîneront pas d'inhibition aux concentrations auxquelles ils sont présents dans les hydrolysats.

Tableau IV-4 : Bilan des concentrations maximales en inhibiteurs pour la croissance de *T. reesei* sur glucose à pH 5.5.

	concentration maximale pour <i>T. reesei</i> (mg/L)	concentration dans hydrolysats (mg/L)		
		min.	moy.	max.
<i>para</i> -benzoquinone	10		30	
acide acétique	2000 à 2500	4500	5500	7000
furfural	200 à 300	120	300	540
vanilline	100 à 200	120	250	430
autres composés phénoliques	>50			
5-HMF	500	140	300	540
acide lévulinique et formique	2000		500	

Ces recommandations n'ayant pas été validées, les valeurs de concentrations sont données uniquement à titre indicatif.

1.2 En phase de production

L'expérience d'IFP Energies nouvelles sur la valorisation des hydrolysats lignocellulosiques pour la culture de *T. reesei* a montré que leur utilisation en fed-batch pour la phase de production (après croissance sur sucres synthétiques) est bien moins problématique que leur utilisation en batch pour la phase de croissance. En effet les concentrations en inhibiteurs potentiels sont plus faibles, et les cellules ont plus de temps pour détoxifier le milieu de culture.

Les 4 inhibiteurs identifiés pour la phase de croissance ont été testés en phase de production, afin de mesurer leurs effets lorsqu'ils sont apportés en limitation dans l'alimentation du fed-batch, seuls ou en mélange. Les concentrations maximales recommandées (Tableau IV-4) ont été conservées, voire doublées quand les concentrations observées dans les hydrolysats lignocellulosiques étaient supérieures.

En pratique, le protocole en "fliales alimentées" a été utilisé. Il permet la réalisation de fed-batch en fiole avec un matériel minimum, et les résultats obtenus avec ce protocole sont extrapolables à l'échelle du bioréacteur (II.3.1.5, page 63).

Le mélange de fed-batch était constitué de 50 g/L de sucres (imposé par le protocole de culture) répartis en 1/3 lactose, 1/3 glucose, 1/3 xylose, et complété par:

- 200 mg/L de vanilline, ou
- 300 mg/L de furfural, ou
- 2500 ou 5000 mg/L d'acide acétique, ou
- en mélange: 200 mg/L de vanilline, 300 mg/L de furfural et 2500mg/L d'acide acétique.

Le test de la *p*-benzoquinone par ce protocole "fliales alimentées" n'a pas donné de résultats exploitables car elle s'est dégradée lors de l'ajout de l'ammoniaque dans le mélange de fed-batch (le pH de la solution était alors supérieur à 12).

Les résultats en termes de vitesse spécifique de production et d'activités enzymatiques sont présentés Figure IV-18.

Concernant la vitesse spécifique de production de protéines (Figure IV-18 A), on n'observe aucune différence en présence d'inhibiteurs dans le mélange de fed-batch, que ce soit des inhibiteurs seuls ou en mélange. En terme d'activités enzymatiques (Figure IV-18 B, C et D), on observe de légères différences mais non significatives, avec un effet de l'acide acétique à 2.5 g/L (positif sur l'activité xylanase, négatif sur les activités β -glucosidase et cellulase FP) qui n'est pas confirmé à 5 g/L.

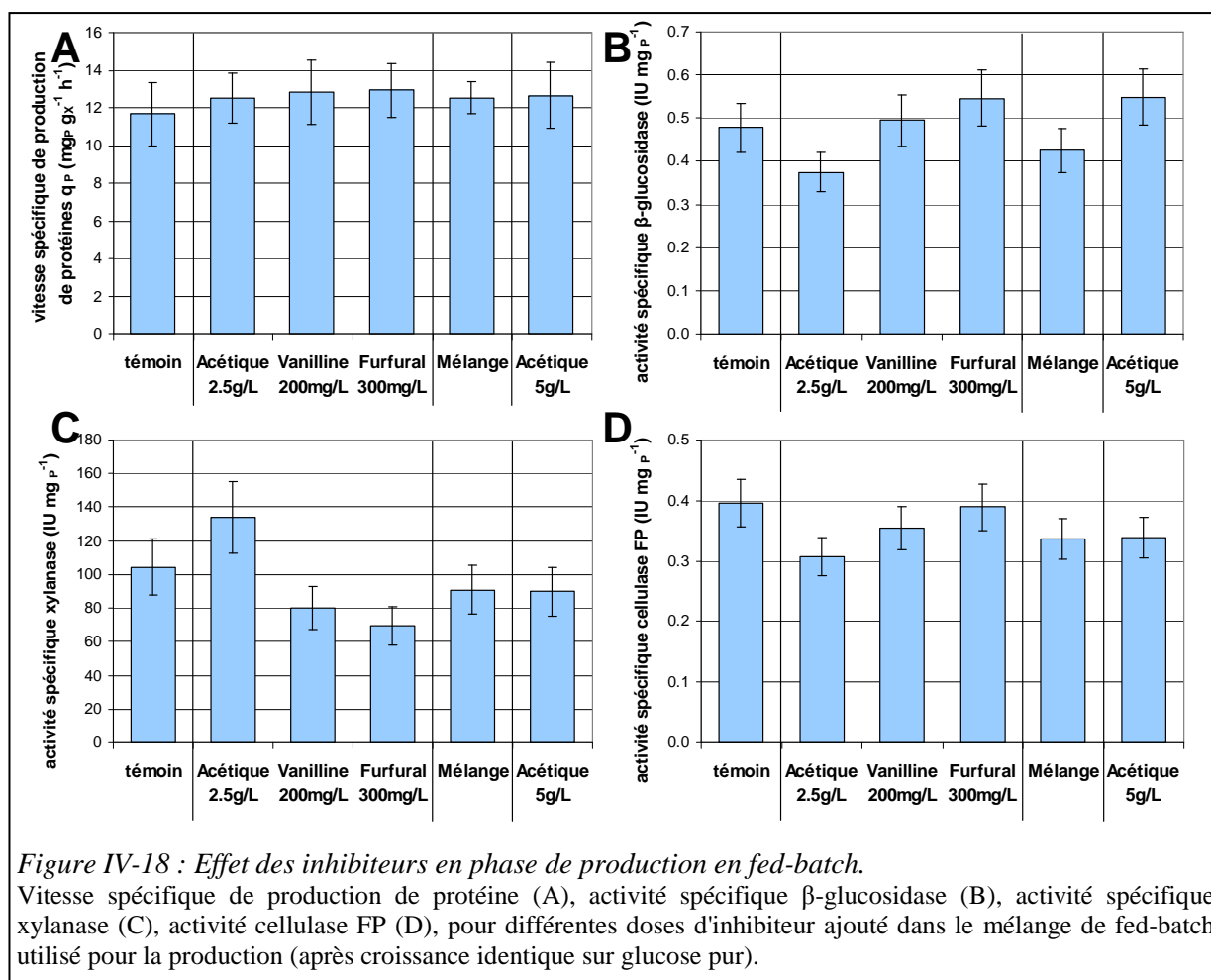
Ainsi dans les conditions expérimentales utilisées, les inhibiteurs testés n'ont eu quasiment aucun effet sur la phase de production de cellulases. Cependant, avec l'effet de dilution du fed-batch, la concentration finale en inhibiteur accumulé dans le milieu de culture n'a pas été celle des recommandations présentées Tableau IV-4 mais seulement de :

- 1.5 g/L pour l'acide acétique ;
- 120 mg/L pour la vanilline ;
- 180 mg/L pour le furfural ;

voire probablement moins puisqu'il est possible que ces 3 inhibiteurs aient été dégradés par *T. reesei* au cours de la culture, comme cela a été observé en phase de croissance (IV.1.1.5.2, page 129).

On pourrait éventuellement réaliser des tests à plus haute concentration en inhibiteur pour déterminer les concentrations limites à ne pas dépasser, mais les résultats présentés ici suffisent pour le cas des hydrolysats attendus dans une bioraffinerie lignocellulosique.

Reste finalement le cas de la *para*-benzoquinone qui devra être étudié en bioréacteur, et pour laquelle il sera nécessaire de mettre au point une méthode de dosage dans les hydrolysats lignocellulosiques.



1.3 Conclusion sur les composés de dégradation

Les hydrolysats sucrés disponibles dans une bioraffinerie lignocellulosique, et utilisables comme substrat pour la production d'enzymes, contiennent des composés de dégradation de la biomasse lignocellulosique potentiellement inhibiteurs pour *T. reesei*.

L'acide acétique provient de l'hydrolyse des groupements acétyls présents sur les hémicelluloses et ralentit fortement la croissance de *T. reesei*. Comme son effet inhibiteur est dû à la forme protonée neutre, on peut limiter l'inhibition en réalisant la croissance en batch à pH 6.0. Par ailleurs, il a été observé que les cellules de *T. reesei* détoxifiaient le milieu en minéralisant l'acide acétique en CO_2 , mais le stress dû à la présence d'acide acétique peut provoquer une sporulation.

Parmi les composés de dégradation des sucres, les acides lévuliniques, formiques et furoïques présentent le même type d'inhibition que l'acide acétique mais ne seront pas inhibiteurs pour *T. reesei* aux concentrations mesurées dans les hydrolysats lignocellulosiques, à condition de travailler à pH supérieur à 5.5. Le furfural est inhibiteur en imposant une phase de latence très longue avant le démarrage de la croissance. Durant cette phase le furfural est oxydé en acide furoïque. Enfin le 5-HMF n'a pas d'action inhibitrice.

Les composés phénoliques proviennent de l'hydrolyse de la lignine. Aucun des 6 composés acides testés n'a d'effet inhibiteur sur *T. reesei*. Les 2 composés alcool testés ont un léger effet inhibiteur mais seulement à des concentrations supérieures à celles observées dans les hydrolysats. Parmi les 3 composés aldéhydes testés, seule la vaniline a un effet significatif aux concentrations observées dans les hydrolysats. Enfin, la *p*-benzoquinone a un effet inhibiteur très fort, mais son dosage est difficile dans les hydrolysats.

- 1. Impact des composés de dégradation -

En phase de production avec alimentation en fed-batch par une solution sucrée contenant des inhibiteurs (aux concentrations inhibitrices pour la croissance), aucun effet significatif n'a été observé ni sur la vitesse de production ni sur la composition enzymatique du cocktail produit.

2 Impact des mélanges de sucres

Afin de diminuer le coût du substrat et inducteur lactose utilisé en fed-batch pendant la phase de production, deux stratégies indépendantes ont été étudiées. D'une part le lactose peut être remplacé en partie par des sucres non inducteurs présents dans la bioraffinerie lignocellulosique (IV.2.1). De plus, la fraction de lactose nécessaire à l'induction peut être remplacée par d'autres oligosaccharides inducteurs (IV.2.2).

Dans toute cette partie, seule la phase de production en fed-batch sera étudiée (après croissance identique sur glucose pur), et les hydrolysats lignocellulosiques seront représentés par des mélanges synthétiques de sucres purs pour bien observer les effets des sucres indépendamment des effets des inhibiteurs.

2.1 Remplacement de l'inducteur par des substrats industriels

2.1.1 Sucres principaux: mélanges inducteur/xylose/glucose

2.1.1.1 Conception des plans d'expériences réalisés

Afin de mimer les mélanges de sucres possibles dans une bioraffinerie lignocellulosique, les effets des 2 sucres présents majoritairement dans les hydrolysats (Tableau I-5 page 45) ont été étudiés en priorité :

- le xylose comme sucre représentatif des pentoses ;
- le glucose comme sucre représentatif des hexoses.

Ces deux sucres n'étant pas inducteurs de la production de cellulases (Figure I-12 page 48), ils doivent être complétés par un inducteur afin d'être utilisés pour la phase de production en fed-batch. Deux inducteurs ont été testés séparément :

- le lactose, inducteur industriel classique ;
- le cellobiose, intermédiaire dans l'hydrolyse de la cellulose en glucose, et inducteur naturel.

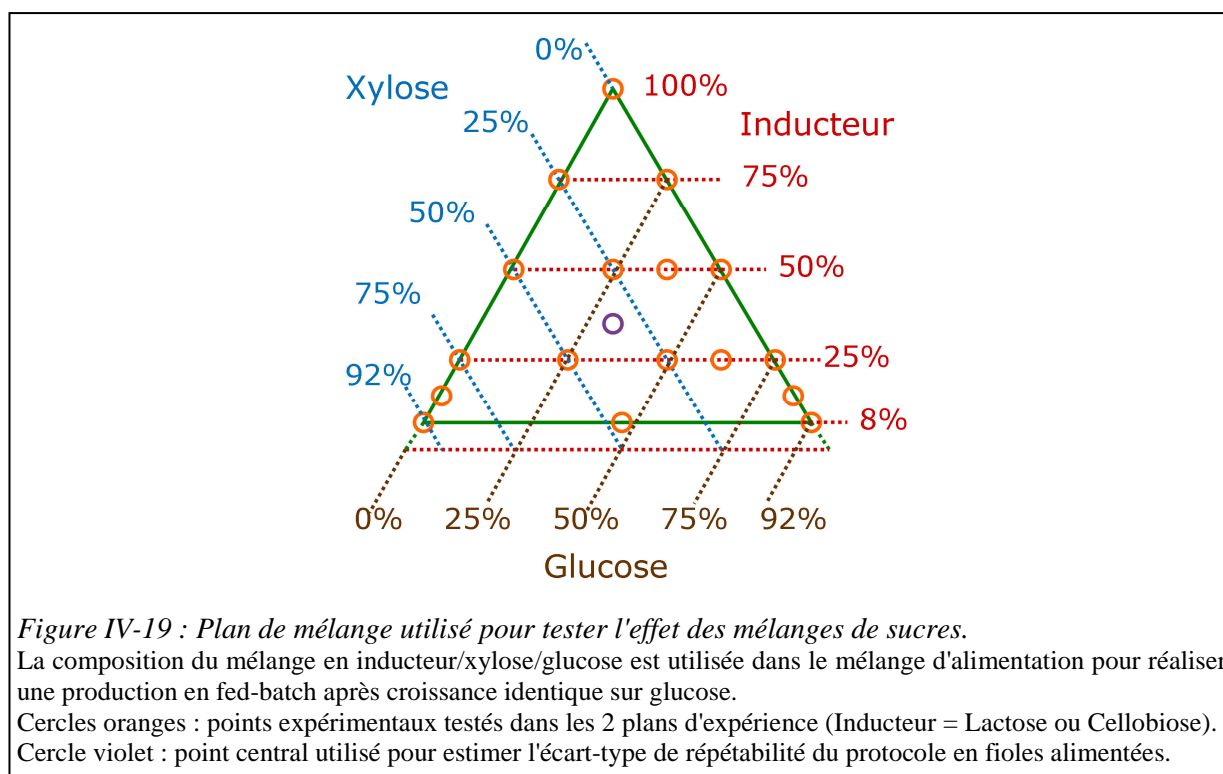
Comme un seul inducteur suffit, il ne serait pas nécessaire d'ajouter du lactose à un hydrolysats contenant déjà du cellobiose, donc les mélanges contenant du lactose et du cellobiose n'ont pas été testés. D'après l'expérience d'IFP Energies nouvelles, un minimum de 8% d'inducteur lactose ou cellobiose a été choisi dans les mélanges testés.

Ainsi 2 plans de mélange identiques à 3 facteurs, contenant chacun 17 expériences (Figure IV-19), ont été réalisés pour tester l'alimentation en fed-batch respectivement par un mélange :

- de lactose, de xylose et de glucose ;
- de cellobiose, de xylose et de glucose.

Les 3 facteurs et leurs plages de variation sont les suivants :

- sucre inducteur (lactose ou cellobiose) : entre 8% et 100%
- xylose entre 0% et 92%
- glucose entre 0% et 92%.



En raison du grand nombre d'expériences nécessaires, le protocole en "fioles alimentées" (II.3.1.5, page 63) a été choisi car il est plus facile à mettre en œuvre que des bioréacteurs.

4 réponses sont étudiées :

- vitesse spécifique de production de protéines q_p , en $\text{mg}_p \text{g}_x^{-1} \text{h}^{-1}$;
- activité spécifique cellulase FP, en IU mg_p^{-1} (II.2.5.1, page 59) ;
- activité spécifique β -glucosidase, en IU mg_p^{-1} (II.2.5.2, page 60) ;
- activité spécifique xylanase, en IU mg_p^{-1} (II.2.5.3, page 60).

On utilise les activités spécifiques plutôt que volumiques car la mise en œuvre du protocole en "fioles alimentées" donne des concentrations finales en protéines environ 5 fois plus faibles qu'en bioréacteur, et variables entre les fioles (en fonction de la vitesse spécifique de production de protéines). Pour pouvoir extrapoler, il est donc préférable de comparer les activités spécifiques.

Dans toute cette étude, la souche *T. reesei* CL847, souche hyperproductrice non modifiée génétiquement, a été utilisée.

2.1.1.2 Répétabilité du protocole d'étude

Le système de pompes utilisé pour le protocole en "fioles alimentées" permet d'alimenter 8 fioles en parallèle. Ainsi 5 séries ont été nécessaires pour réaliser les 34 points expérimentaux. La répétabilité du protocole entre les différentes séries a été vérifiée en répétant le point central du plan de mélange lactose/xylose/glucose (en violet Figure IV-19) 3 ou 4 fois dans 3 séries distinctes (soit un total de 10 répétats de ce point du plan).

Comme dans le cas général les mesures des activités ne sont pas réalisées toutes le même jour mais plutôt à chaque fin de série, les mesures d'activités pour ces points centraux ont été réalisées de même, en 3 séries distinctes. Ainsi, la répétabilité a été mesurée pour le protocole complet d'étude, comprenant la culture du micro-organisme et la mesure des activités.

Le coefficient de variation (écart-type/moyenne) des mesures est de $\pm 9\%$ à $\pm 16\%$ (Tableau IV-5), aussi bien sur la vitesse spécifique de production que sur les activités spécifiques, ce qui est correct

pour des mesures d'activité enzymatique. De plus, les écarts-type de chaque mesure sont bien inférieurs aux variations observées par la suite dans les plans de mélange.

Tableau IV-5: Répétabilité du protocole d'étude en fioles alimentées.

La répétabilité du protocole d'étude a été mesurée sur 10 répétats répartis en 3 séries distinctes, avec alimentation en fed-batch par un mélange équimassique lactose/xylose/glucose.

		moyenne	écart-type	coefficient de variation
vitesse spécifique de production	$\text{mg}_P \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$	11.9	± 1.0	$\pm 9\%$
activité spécifique cellulase FP	IU mg_P^{-1}	0.47	± 0.06	$\pm 12\%$
activité spécifique β-glucosidase	IU mg_P^{-1}	0.52	± 0.06	$\pm 10\%$
activité spécifique xylanase	IU mg_P^{-1}	131	± 20	$\pm 16\%$

2.1.1.3 Résultats des plans de mélange

a Analyse des corrélations entre réponses

L'analyse croisée des mesures brutes montre que les 3 activités enzymatiques ne sont pas corrélées avec la vitesse spécifique de production de protéines (Figure IV-20 A, B, C).

En revanche, on observe une corrélation positive entre les activités cellulase FP et β -glucosidase (Figure IV-20 D). Cette corrélation est connue dans la littérature, car la faible quantité de β -glucosidase produite par *T. reesei* limite l'hydrolyse, et des protocoles modifiés ont été proposés pour l'activité cellulase FP, avec supplémentation en β -glucosidase.

Ces deux activités sont corrélées négativement avec l'activité xylanase (Figure IV-20 E, F), ce qui est un résultat nouveau par rapport à la littérature.

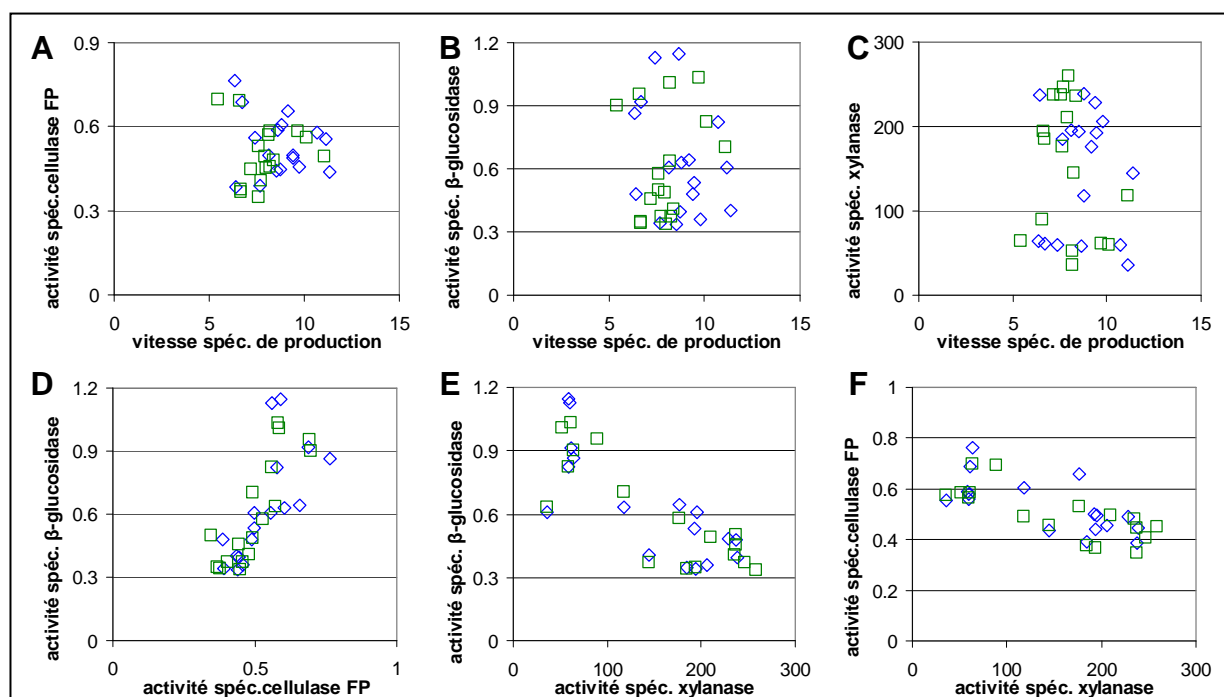


Figure IV-20 : Analyse des corrélations entre les 4 réponses étudiées.

Losanges : inducteur lactose – Carrés : inducteur cellobiose.

La vitesse spécifique de production est en $\text{mg}_P \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ et les activités spécifiques sont en IU mg_P^{-1} .

b Modélisation en fonction de la composition du fed-batch

L'analyse des résultats expérimentaux a été réalisé avec le logiciel Design Expert.

Les résultats des plans de mélange ont été modélisés par un modèle quadratique $Y = a \cdot [Inducteur] + b \cdot [Xyl] + c \cdot [Glu] + d \cdot [Ind] \cdot [Xyl] + e \cdot [Ind] \cdot [Glu] + f \cdot [Xyl] \cdot [Glu]$ où [x] représente la fraction massique du sucre x rapporté à la somme des sucres présents dans le mélange de fed-batch (de 0.08 à 1 pour l'inducteur, de 0 à 0.92 pour le xylose et le glucose). Dans le cas où les coefficients associés à certains facteurs ne sont pas significatifs, ils sont supprimés dans le modèle quand cela augmente le R² de prédiction du modèle (Le R² de prédiction est un coefficient de corrélation qui évalue la capacité prédictive d'un modèle, et qui permet de comparer des modèles dont les nombres de facteurs sont différents).

Les résultats de l'analyse statistique (Tableau IV-6) montrent que tous les modèles sont significatifs (p-value < 0.05), avec un R² de prédiction entre 0.45 et 0.92 selon la réponse. L'écart-type des modèles est du même ordre que l'écart-type mesuré sur le point central lors du test de répétabilité.

Tableau IV-6 : Modèles quadratiques résultant des plans de mélange.

Les valeurs des facteurs du modèle quadratique ainsi que les résultats statistiques (R² de prédiction, écart-type du modèle, et p-value) sont présentés pour les 2 plans de mélange et les 4 réponses étudiées. Pour la vitesse spécifique q_p, les coefficients a à f sont en mg_p g_x⁻¹ h⁻¹. Pour les activités, les coefficients a à f sont en IU/mg_p. Les cases vides correspondent à des facteurs supprimés du modèle car les coefficients associés n'étaient pas significatifs.

		a	b	c	d	e	f	R ² préd.	ecart-type	p-value
Lactose	qP	11.2	7.08	5.69	4.39	2.63		0.86	0.51	<0.0001
	FP	0.53	0.40	0.71			-0.57	0.63	0.054	0.0001
	βglu	0.59	0.44	0.83	-0.73	1.15	-1.14	0.78	0.10	<0.0001
	Xyl	32.5	159	42.6	486	151	568	0.92	17.6	<0.0001
Cellobios	qP	8.69	6.76	4.38		6.77	6.06	0.45	0.61	0.0036
	FP	0.54	0.36	0.66			-0.69	0.76	0.042	<0.0001
	βglu	0.68	0.46	1.02	-1.11		-1.28	0.83	0.082	<0.0001
	Xyl	42.6	140	79.6	628		597	0.86	25.2	<0.0001

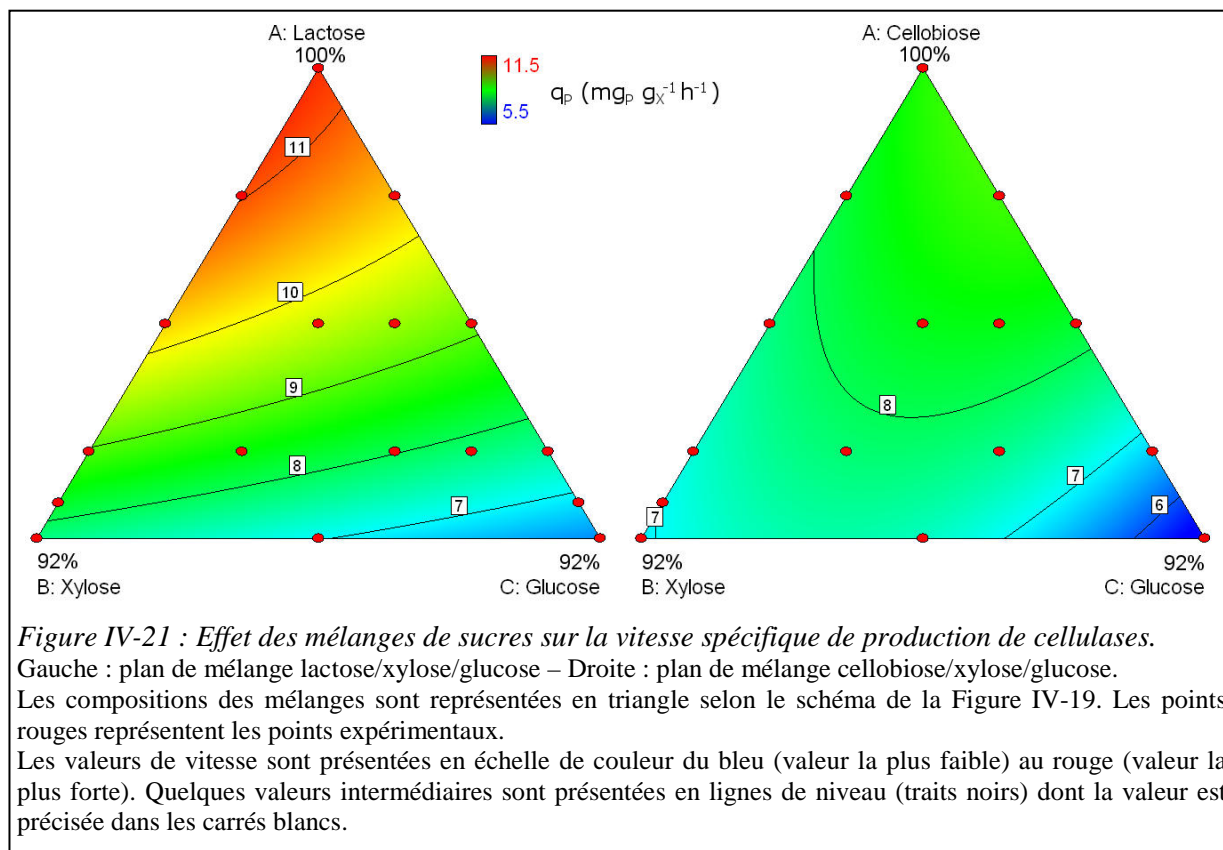
c Effet sur la vitesse spécifique de production

La Figure IV-21 présente les modèles (construits à partir des mesures expérimentales et représentatif des ces mesures) obtenus pour l'effet des mélanges de sucres sur la vitesse spécifique de production de protéines (en mg_p g_x⁻¹ h⁻¹) dans les 2 plans de mélange. Ce paramètre est important pour l'extrapolation du protocole de production de cellulases car relié à la productivité et au rendement.

L'effet principal est celui de la teneur en inducteur (lactose ou cellobiose), qui augmente la vitesse spécifique de production de protéines, avec un effet plus fort pour le lactose que pour le cellobiose (meilleure vitesse spécifique de production aux forte teneurs en inducteur).

Cependant, pour un même pourcentage d'inducteur (sur une ligne horizontale), la vitesse spécifique de production de protéines augmente quand on remplace le glucose par du xylose : le glucose a un effet répresseur supérieur à celui du xylose.

La vitesse spécifique de production de protéines est comprise entre 5.5 et 11.5 mg_p g_x⁻¹ h⁻¹ : le remplacement du lactose à 92% par du glucose ou du xylose maintient au moins 50% de la capacité de production.



d Effet sur les activités spécifiques

Les modèles associés aux 3 activités enzymatiques principales (activité cellulase FP, activité β -glucosidase et activité xylanase) dans les cocktails produits sont présentés sur les graphiques de la Figure IV-22, sous la forme des activités spécifiques.

Les profils sont du même type entre lactose et cellobiose pour les 3 activités mesurées : les effets inducteurs du lactose et du cellobiose sur les 3 activités enzymatiques mesurées sont semblables.

L'activité spécifique cellulase FP présente de faibles variations: entre 0.34 et 0.76 IU mg_p^{-1} . Elle n'est quasiment pas influencée par la teneur en inducteur dans le mélange. En revanche, elle diminue quand la teneur en xylose augmente, et augmente légèrement avec la teneur en glucose. Elle est très légèrement plus forte sur inducteur lactose que sur inducteur cellobiose.

L'activité spécifique β -glucosidase présente des variations moyennes: entre 0.35 et 1.05 IU mg_p^{-1} . Elle est principalement liée à la teneur en xylose, et diminue quand cette dernière augmente. Cependant on observe qu'elle est maximum pour des mélanges de glucose et d'inducteur contenant 50% de glucose ou plus. De même que pour l'activité FP, elle est très légèrement plus forte sur inducteur lactose que sur inducteur cellobiose.

L'activité spécifique xylanase présente de fortes variations: entre 30 et 260 IU mg_p^{-1} et ne dépend que de la concentration en xylose. On observe une augmentation linéaire de l'activité pour des teneurs en xylose entre 0 et 30%, puis une activité quasiment stable pour des teneurs en xylose de 30 et 92%. A l'inverse des deux précédentes, l'activité xylanase est légèrement plus forte sur inducteur cellobiose que sur inducteur lactose.

Par rapport aux données trouvées dans la littérature, il est tout à fait logique de trouver que l'activité xylanase dépend uniquement de la teneur en xylose. Il est en revanche nouveau d'observer qu'en conditions industrielles de type fed-batch, une teneur massique de 30% suffit pour maximiser l'activité xylanase. Le profil observé pour l'activité β -glucosidase est quant à lui tout à fait nouveau, aussi bien pour l'effet positif du glucose que pour l'effet négatif du xylose (ce dernier était pressenti dans les données présentées dans (Warzywoda et al., 1992) mais non clairement énoncé).

- 2. Impact des mélanges de sucres -

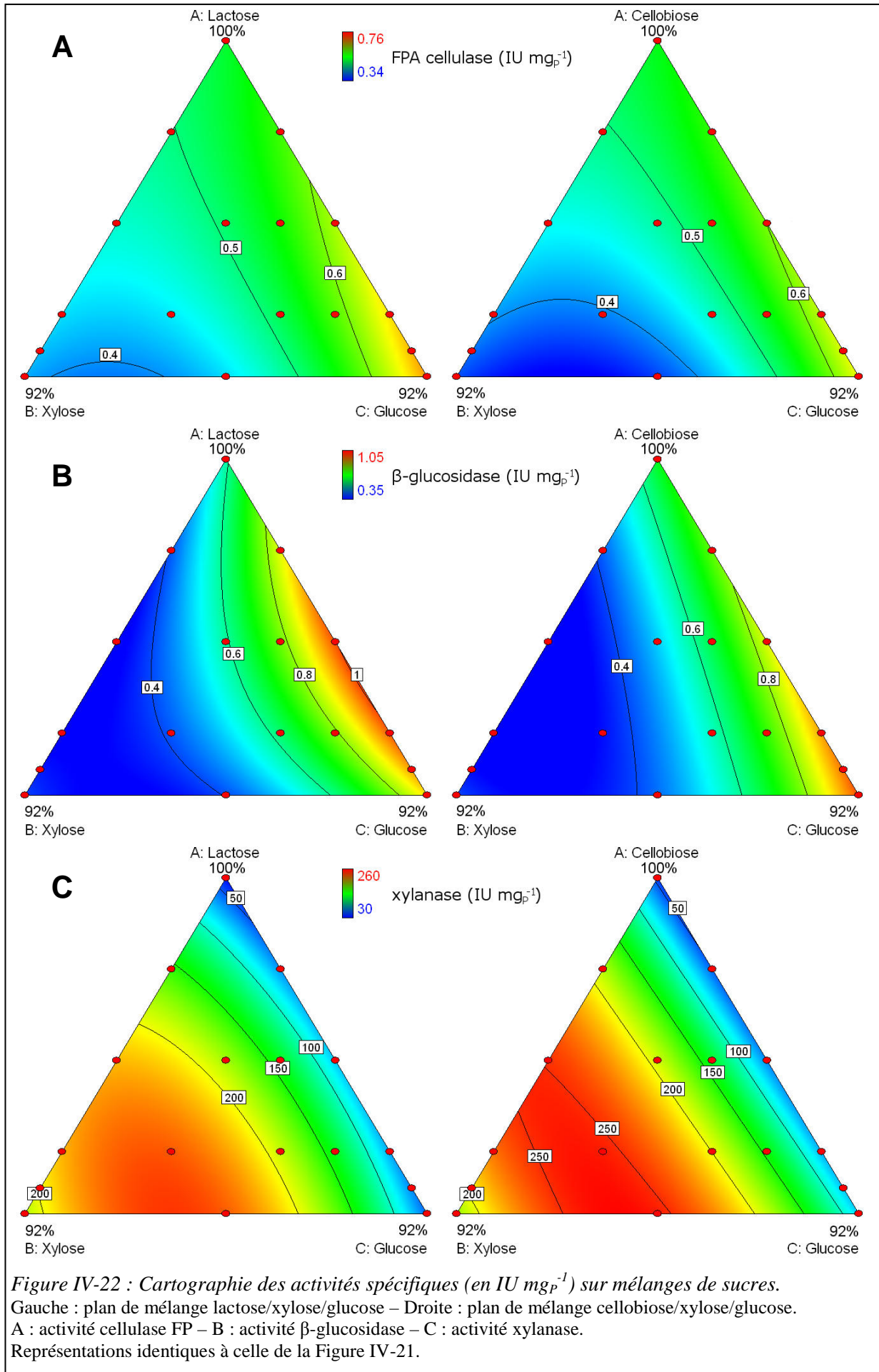


Figure IV-22 : Cartographie des activités spécifiques (en IU mg_P⁻¹) sur mélanges de sucres. Gauche : plan de mélange lactose/xylose/glucose – Droite : plan de mélange cellobiose/xylose/glucose. A : activité cellulase FP – B : activité β-glucosidase – C : activité xylanase. Représentations identiques à celle de la Figure IV-21.

Ces résultats montrent un effet inverse de la teneur en xylose sur les activités spécifiques xylanase et β -glucosidase : elle augmente l'activité xylanase alors qu'elle diminue l'activité β -glucosidase. Il y a donc incompatibilité entre ces deux activités et il y aura un compromis à trouver si ces deux activités se révèlent importantes pour l'hydrolyse enzymatique d'une biomasse lignocellulosique (voir IV.2.1.3 page 143).

Cependant, l'activité β -glucosidase peut aussi être augmentée par des travaux de génie génétique, et il serait intéressant d'étudier si les souches modifiées obtenues à IFP Energies nouvelles montrent des profils d'expression différents (ce qui serait logique car les promoteurs des gènes sont différents) ou semblables (ce qui indiquerait une régulation au niveau de la traduction ou de la sécrétion).

2.1.1.4 Validation des modèles en bioréacteur

Afin de valider les modèles résultant des plans d'expériences, 4 cultures ont été réalisées en bioréacteur Dasgip selon le protocole IFP Energies nouvelles (II.3.2.2, page 65), avec des mélanges de fed-batch qui couvrent le domaine expérimental :

- mélange 100% lactose comme témoin interne ;
- mélange 15% lactose + 85% glucose pour maximiser l'activité β -glucosidase ;
- mélange 25% lactose + 75% xylose pour maximiser l'activité xylanase ;
- mélange 50% lactose + 37.5% glucose + 12.5% xylose pour avoir un bon compromis entre ces 2 activités.

La comparaison entre bioréacteur, fiole alimentée, et modèle (Figure IV-23) montre:

- une très bonne corrélation pour les activités spécifiques cellulase FP et β -glucosidase, aussi bien qualitative que quantitative ;
- une bonne tendance qualitative pour l'activité xylanase, mais des activités spécifiques 2 fois plus faibles en bioréacteur que prédites par le modèle ;
- une mauvaise corrélation pour la vitesse spécifique de production de protéines, avec un modèle qui sous-estime la vitesse en bioréacteur.

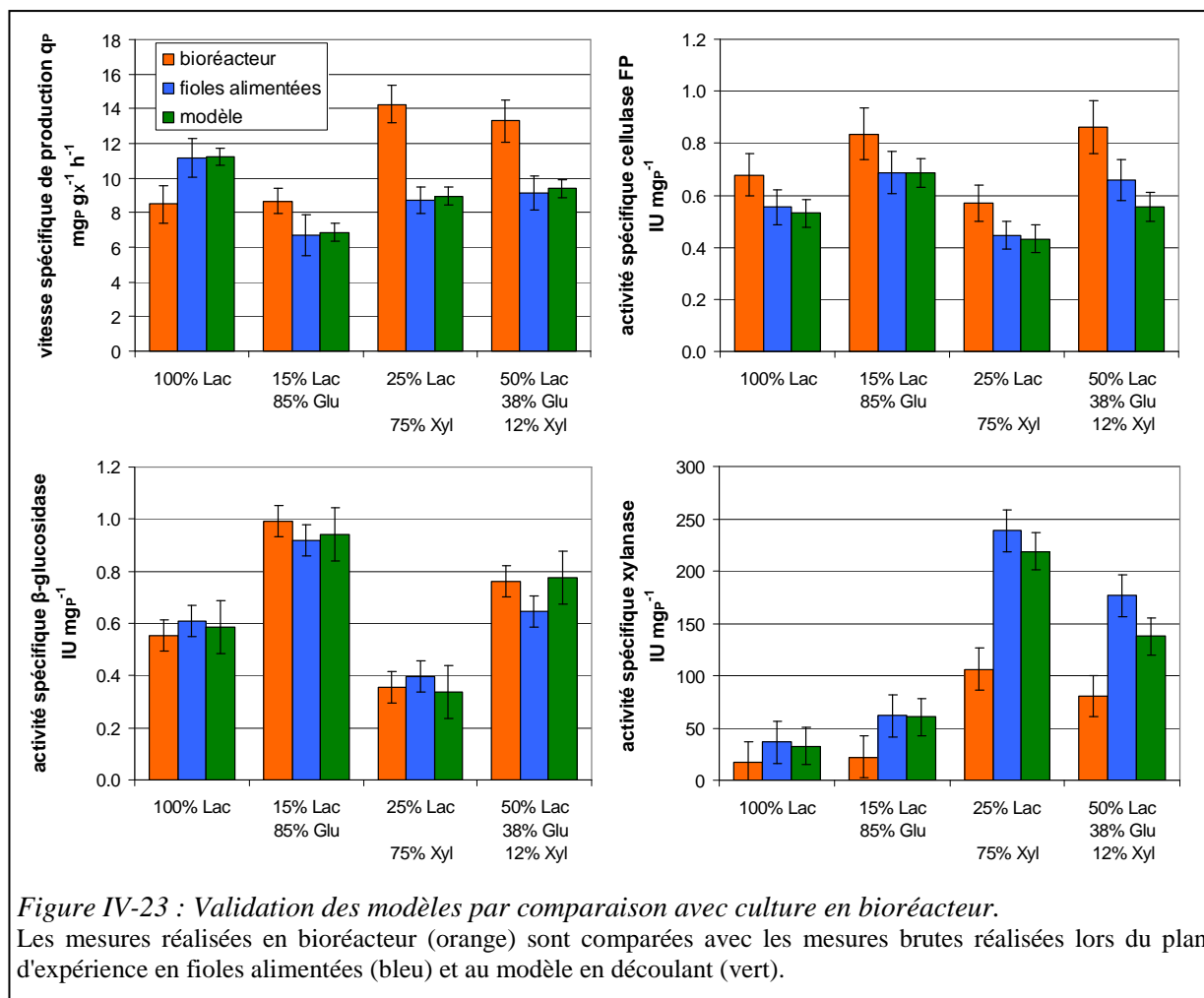
Les activités spécifiques cellulase FP et β -glucosidase mesurées au cours de cette étude sont parfaitement cohérentes avec le bilan de l'expérience d'IFP Energies nouvelles pour des mélanges à 2 sucres (Figure I-12, page 48).

La différence observée pour l'activité xylanase est surprenante. Deux hypothèses sont envisageables : soit ces enzymes sont sensibles au fort cisaillement dû à l'agitation dans les bioréacteurs, soit leur induction n'est pas constante au cours du fed-batch. Pour tester cette dernière hypothèse, on pourrait vérifier si la production d'activité xylanase en bioréacteur est constante au cours du temps, ou si elle diminue. Le modèle obtenu en fioles alimentées reste néanmoins valable pour prédire l'activité attendue en bioréacteur, avec un facteur correctif de 2.

Concernant la vitesse spécifique de production de protéines, la valeur obtenue pour le mélange 100% lactose ($8.5 \pm 1.1 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$) est incohérente avec les nombreuses mesures réalisées pour l'étude cinétique de la souche ($12.3 \pm 1.1 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ pour les expériences FB1 et FB2, cf. III.2.1.3, page 86).

En considérant cette valeur, le modèle sous-estime toujours la vitesse spécifique de production de protéines. Les valeurs plus faibles mesurées en fioles peuvent s'expliquer par le mode d'alimentation discontinu des pompes utilisées. Pour permettre la faible vitesse demandée comme consigne (0.3 mL/h), les pompes ne tournent pas en continu mais par saccades. De plus le mélange dans les fioles (agitateur orbital) est probablement moins bon que dans un bioréacteur. Ces deux effets modifient la concentration résiduelle en sucre observée localement par les cellules, et donc probablement l'induction de la production.

Le protocole d'étude en fioles alimentées reste néanmoins valable puisque l'induction observée est bien plus forte que celle obtenue sans limitation en carbone (Jourdir et al., 2012), donc les cocktails obtenus avec ce protocole sont représentatifs des cocktails attendus en bioréacteur.



Finalement, les modèles résultants du plan de mélange lactose/xylose/glucose sont corrects pour prédire les compositions enzymatiques des cocktails produits en bioréacteur avec alimentation en fed-batch, directement pour les activités cellulase FP et β -glucosidase, et avec correction par un facteur 2 pour l'activité xylanase. Concernant la vitesse spécifique de production, le modèle n'est pas prédictif mais la vitesse en bioréacteur sera au moins aussi bonne qu'en fiole.

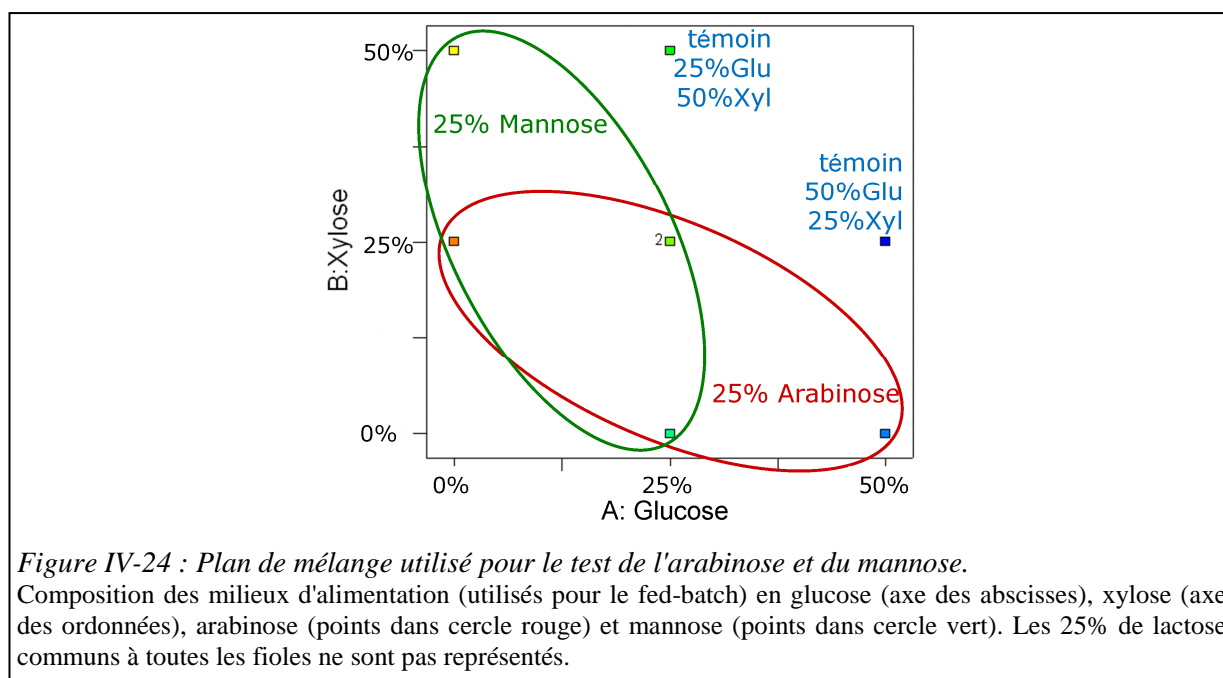
2.1.2 Sucres secondaires: effet de l'arabinose et du mannose

L'arabinose (pentose) et le mannose (hexose) sont deux sucres minoritaires présents dans les hémicelluloses, que l'on peut donc retrouver dans les hydrolysats C5 ou C5/C6 potentiellement utilisés comme substrats pour *T. reesei* (Tableau I-6 page 46).

2.1.2.1 Protocole d'étude

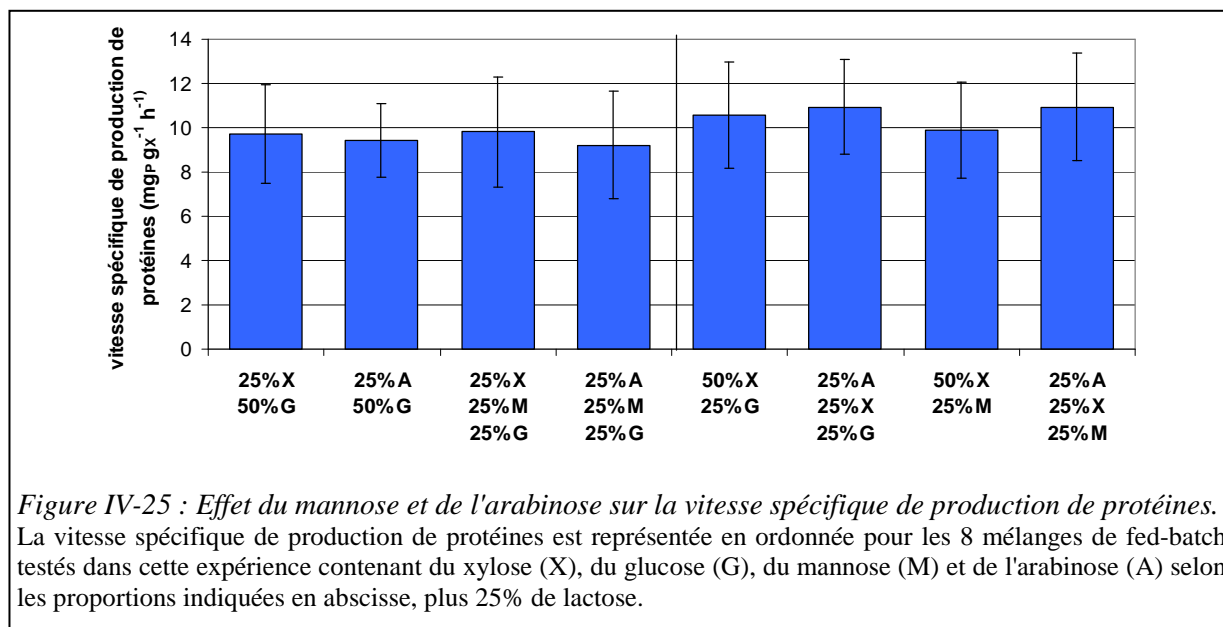
Afin d'étudier l'effet de leur présence sur la production de cellulases par *T. reesei*, le protocole d'étude en fioles alimentées a été choisi comme précédemment, avec toujours 25% d'inducteur lactose dans le mélange d'alimentation. Deux témoins ont été réalisés, contenant 25% de glucose + 50 % de xylose pour l'un, l'inverse pour l'autre

A partir de ces 2 mélanges de référence, le xylose a été remplacé par de l'arabinose (maximum 25% du total) et/ou le glucose par du mannose (maximum 25% du total). Le design du plan d'expérience résultant est présenté ci-dessous.



2.1.2.2 Résultats

En terme de vitesse spécifique de production de cellulases, aucune différence significative n'a été observée lors du remplacement du xylose par de l'arabinose et/ou du glucose par du mannose (Figure IV-25).



Concernant les activités β -glucosidase et xylanase, les résultats obtenus précédemment (pour les 2 mélanges contenant 25% de lactose et 75% de xylose ou glucose) ont été ajoutés à l'analyse. Les résultats ont été analysés avec Design-Expert, avec un modèle de type linéaire + carrés. Les 2 modèles résultant sont significatifs, avec des R^2 de prédiction de 0.87 et 0.74 respectivement.

Aucune influence (ni positive ni négative) de la présence d'arabinose ou de mannose n'a été observée sur les activités spécifiques β -glucosidase et xylanase (Figure IV-26). Le résultat particulier de la non induction de l'activité xylanase par l'arabinose est en contradiction avec une étude publiée en 2004 qui montrait une induction de l'activité xylanase par l'arabinose chez la souche Rut-C30 (Xiong et al., 2004). Deux hypothèses sont possibles pour expliquer cette différence : soit la souche CL847

utilisée par IFP Energies nouvelles a perdu la capacité d'induction par l'arabinose, soit les conditions de culture (avec arabinose en limitation ici alors qu'il est en excès chez Xiong et al.) ne permettent pas une forte induction.

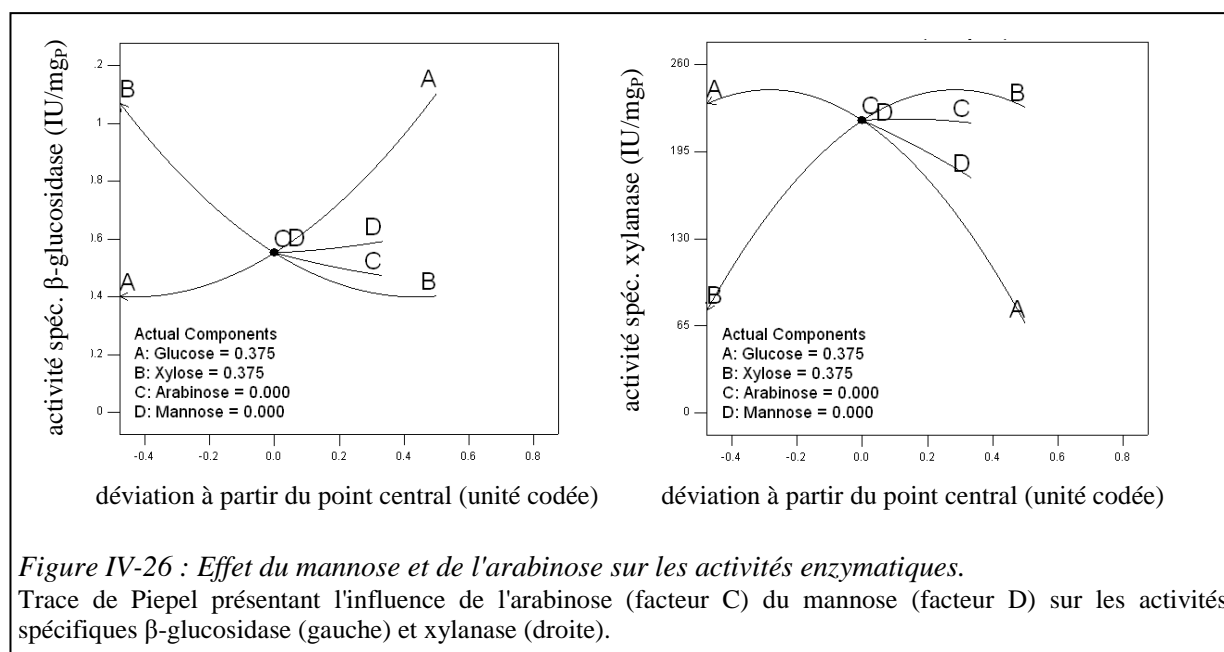


Figure IV-26 : Effet du mannose et de l'arabinose sur les activités enzymatiques.

Trace de Piepel présentant l'influence de l'arabinose (facteur C) du mannose (facteur D) sur les activités spécifiques β -glucosidase (gauche) et xylanase (droite).

Par ailleurs, une sporulation inhabituelle a été observée dans les fioles tests (mais pas dans les témoins) à partir d'environ 100 h de culture (sur 160 h), sans que cela ne modifie significativement les cinétiques de production ni les activités enzymatiques. Il est donc possible que la présence d'arabinose ou de mannose induise un stress chez les cellules de *T. reesei*. Des mesures par HPLC des concentrations résiduelles en sucres au point final ont montré que tous les sucres apportés sont bien consommés, donc cet effet n'est pas dû à l'accumulation d'arabinose ou de mannose au point final.

Il a été observé au laboratoire que lorsque le champignon forme des spores, le moût est beaucoup plus difficile à filtrer, probablement car les spores, plus petits que le mycelium, bouchent plus facilement les pores, et forment un gâteau plus compact. Il est donc important pour éviter des problèmes de filtration à l'échelle industrielle de ne pas avoir de sporulation au cours de la culture, d'autant que cela diminue le rendement final puisqu'une partie du carbone fourni est utilisé pour la formation des spores. Il sera donc nécessaire de répéter cette expérience en bioréacteur pour vérifier si des sporulations surviennent encore. Par ailleurs, quand on utilise des hydrolysats réels contenant de l'arabinose et du mannose, il peut être utile de réaliser des observations microscopiques pour vérifier qu'il n'y a pas formation de spores avant toute opération de filtration.

Mis à part cet effet sur la sporulation (qui reste à confirmer), la présence de mannose et d'arabinose n'a eu aucun effet sur la vitesse spécifique de production ni sur la composition du cocktail enzymatique.

2.1.3 Test des cocktails produits en hydrolyse

Les expériences précédentes ont montré que les cocktails enzymatiques produits en fed-batch peuvent avoir des compositions enzymatiques très différentes selon le mélange de sucres utilisé, et que certaines activités enzymatiques sont incompatibles. Ces activités enzymatiques ont été mesurées dans des conditions très particulières spécifiques à chaque dosage, donc ne permettent pas de prédire a priori l'hydrolyse d'un substrat lignocellulosique réel.

Or ces cocktails seront à terme utilisés pour réaliser l'hydrolyse enzymatique de la biomasse lignocellulosique, donc le choix d'un mélange de fed-batch pour la production d'enzymes ne peut pas

se baser uniquement sur les activités enzymatiques, mais doit prendre en compte l'influence de chaque activité sur le déroulement de l'hydrolyse enzymatique.

Il est donc nécessaire de vérifier dans quelle mesure les activités enzymatiques mesurées précédemment ont un rôle dans le déroulement de l'hydrolyse enzymatique de biomasses lignocellulosiques réelles.

2.1.3.1 Protocole d'étude

Pour cela, des hydrolyses ont été réalisées selon le protocole d'étude mis au point par IFP Energies nouvelles (II.2.6, page 61), pour comparer :

- 8 cocktails enzymatiques différents (Tableau IV-7) :
 - 7 cocktails produits dans le plan de mélange lactose/xylose/glucose qui couvrent tout le domaine expérimental (les 3 points extrêmes du triangle et les 4 points à 50% de lactose),
 - un cocktail de référence produit en bioréacteur en fed-batch avec mélange 100% lactose (K609)
- pour l'hydrolyse de 3 biomasses lignocellulosiques différentes (II.1.2.2, page 55) :
 - de la paille prétraitée par explosion à la vapeur puis lavée (utilisée à 10%MS) ;
 - de la paille prétraitée au pilote Futurol par cuisson acide, pressée mais non lavée (à 5%MS) ;
 - du peuplier prétraité au pilote Futurol par cuisson acide, pressé mais non lavé (à 5%MS).

Toutes les hydrolyses ont été réalisées à 50°C, avec une dose d'enzymes de 10 mg_P/g_{MS}.

Tableau IV-7 : Activités enzymatiques spécifiques des cocktails utilisés pour les tests d'hydrolyse.

Composition du fed-batch utilisé pour la production (en fioles alimentées), et activités enzymatiques pour les 7 cocktails choisis parmi le plan de mélange (code couleur identique à celui de la Figure IV-27), et pour le témoin interne.

									témoin
Composition fed-batch	%Lactose	8%	50%	50%	50%	50%	8%	100%	100%
	%Glucose	92%	50%	38%	25%				
	%Xylose			13%	25%	50%	92%		
Activité enz. spécifique IU mg _P ⁻¹	cellulase FP	0.76	0.59	0.66	0.50	0.46	0.39	0.55	0.56
	β-glucosidase	0.86	1.15	0.64	0.53	0.36	0.34	0.61	1.35
	xylanase	27	27	88	94	104	90	18	20

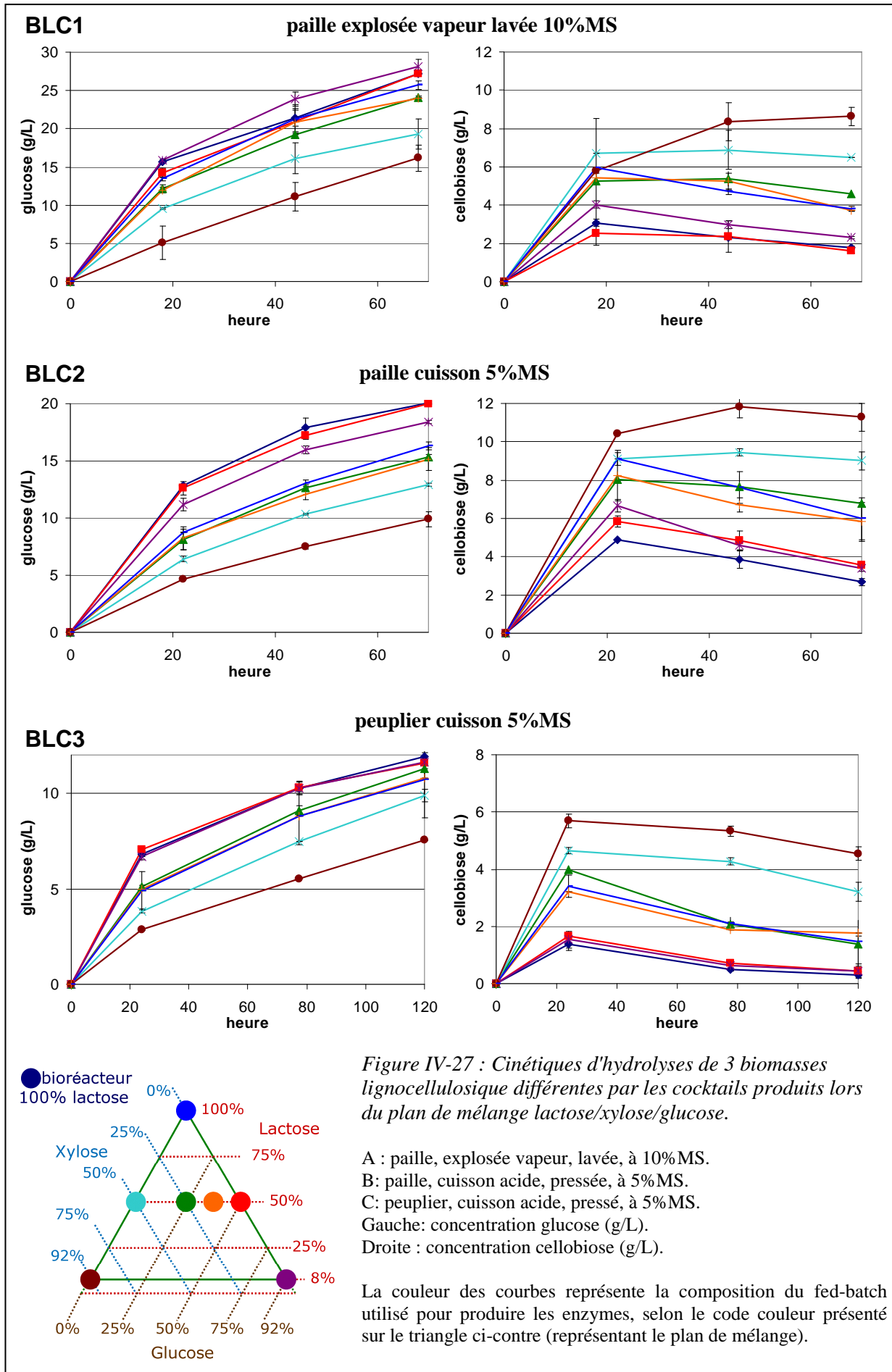
2.1.3.2 Suivi de l'hydrolyse

La Figure IV-27 présente les cinétiques de libération de glucose et d'accumulation de cellobiose au cours des hydrolyses, pour les 3 biomasses lignocellulosiques.

On observe une très forte accumulation de cellobiose, de l'ordre de 4 à 10 g/L, en raison de la faible activité β-glucosidase des cocktails produits par la souche non modifiée CL847. Le cellobiose étant très inhibiteur pour les cellobiohydrolases et les endoglucanases, cela ralentit fortement la cinétique d'hydrolyse.

Par ailleurs, on observe des concentrations en glucose différentes entre les substrats, en raison d'une part de la différence de %MS mise en jeu, et d'autre part de la récalcitrance du peuplier à l'hydrolyse. En terme de rendements de conversion finaux, ils sont pour le total glucose+cellobiose de :

- 60% à 72 h pour la paille explosée vapeur 10%MS
- 90% à 72 h pour la paille cuisson Futurol à 5%MS
- 50% à 120h (40% à 72 h) pour le peuplier cuisson Futurol à 5%MS



La performance relative de chacun des cocktails ne dépend pas de la biomasse lignocellulosique hydrolysée, ni de la durée de l'hydrolyse (différents temps d'analyse). On peut les classer en 3 groupes selon leur performance:

- les cocktails produits sur mélange lactose-glucose (violet et rouge) sont les plus performants, les hydrolyses réalisées avec ces cocktails accumulent peu de cellobiose (environ 2 g/L) et donnent une libération maximale de glucose (27, 20 et 12 g/L respectivement pour les 3 biomasses). Leur performance est comparable au témoin produit en bioréacteur sur lactose pur (bleu foncé), car il possède une activité β -glucosidase aussi bonne (1.35 contre 1.15 et 0.86 IU mg_p^{-1}).
- les cocktails produits sur mélanges lactose/xylose/glucose (orange et vert) ainsi que celui produit en fiole sur lactose pur (bleu) donnent une hydrolyse moyenne, avec une accumulation de cellobiose modérée (environ 4 g/L), et une libération de glucose environ 20 à 30% plus faible.
- les cocktails produits sur mélange lactose/xylose (turquoise et marron) donnent une mauvaise hydrolyse, avec une très forte accumulation de cellobiose (6 à 12 g/L), et une libération de glucose environ 50% plus faible.

La libération de xylose est très rapide et semblable pour tous les cocktails, sa concentration est constante après 24h pour les substrats issus de la cuisson à 5%MS (3.2g/L pour la paille, 0.7g/L pour la peuplier), et correspond en fait à du xylose libre présent dans la fraction liquide de la biomasse lignocellulosique non lavé. Pour la paille exposée vapeur lavée, on observe une légère augmentation de la concentration en xylose de 0.8g/L à 24 h à 1.4g/L à 72 h.

2.1.3.3 Effet des activités enzymatiques sur l'hydrolyse

Les résultats expérimentaux de cette étude ont été analysés avec Design Expert. Comme le classement relatif des cocktails est inchangé après 24 h pour la libération de glucose, seules les concentrations mesurées à 24 h ont été utilisées pour l'analyse.

a *Activité xylanase*

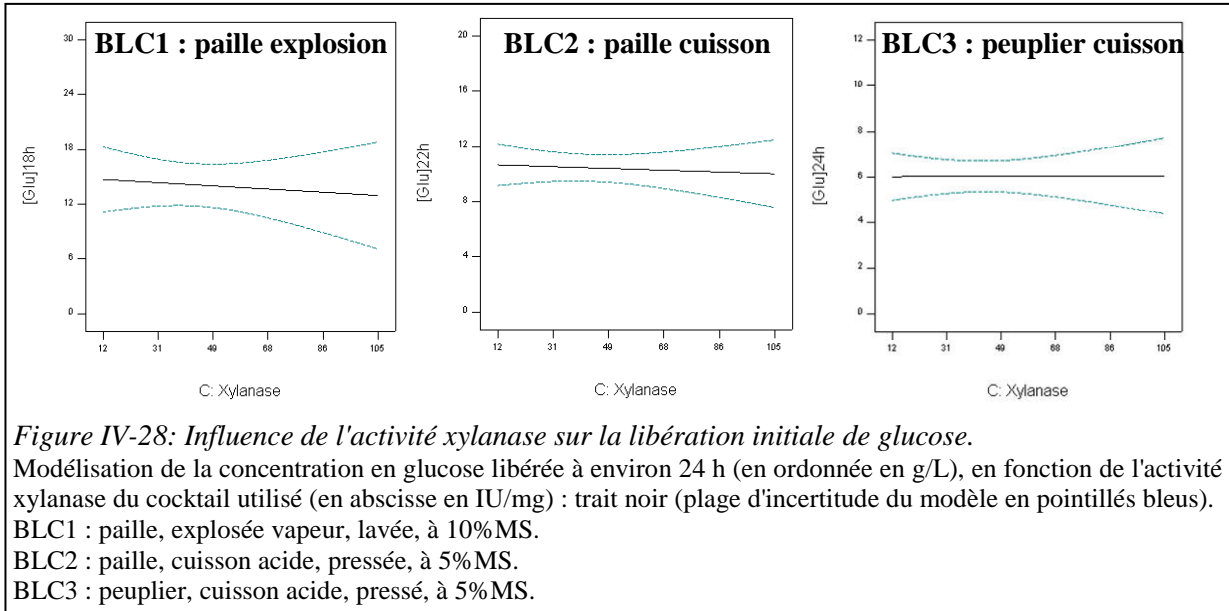
Pour commencer, un modèle linéaire basé sur les mesures d'activités enzymatiques a été choisi : $[\text{sucre}] = \text{cte} + A \cdot FP + B \cdot \beta\text{glu} + C \cdot \text{xylanase}$.

L'analyse statistique montre que l'activité xylanase des cocktails utilisés n'a aucune influence sur l'hydrolyse enzymatique pour les 3 biomasses lignocellulosiques testées ici (Figure IV-28). Ce résultat est surprenant car en contradiction avec les nombreuses publications récentes sur le sujet qui montrent une amélioration de l'hydrolyse de la cellulose avec l'activité xylanase sous deux effets : l'hydrolyse des oligomères de xylose très inhibiteurs, et l'accès à la cellulose facilité par l'hydrolyse des hémicelluloses (Qing et al., 2010; Qing and Wyman, 2011).

Dans le cas des biomasses et cocktails testés ici, deux phénomènes peuvent expliquer ce résultat. D'une part les prétraitements utilisés sont très sévères et donc les hémicelluloses sont déjà quasiment totalement hydrolysées par le traitement. D'autre part, les cocktails utilisés dont on dit qu'ils ont peu d'activité xylanase ont déjà une activité d'environ 20 IU mg_p^{-1} . Dans les conditions d'hydrolyse utilisées, cela correspond à une vitesse initiale maximale de libération de xylose de 3 (g/L)/min (cas 10%MS) ou 1.5 (g/L)/min (cas 5%MS), soit 40 fois plus rapide que la vitesse initiale maximale de libération de glucose. Même si il restait des hémicelluloses dans la biomasse prétraitée, elles ont été hydrolysées en totalité en quelques heures.

Le résultat observé ici pour l'influence de l'activité xylanase est peut-être lié uniquement à la biomasse lignocellulosique et aux cocktails utilisés, donc ne peut pas être généralisé à des biomasses lignocellulosiques moins bien prétraitées ou des cocktails enzymatiques dépourvus d'activité xylanase (par exemple des cocktails reconstitués à partir d'enzymes purifiées).

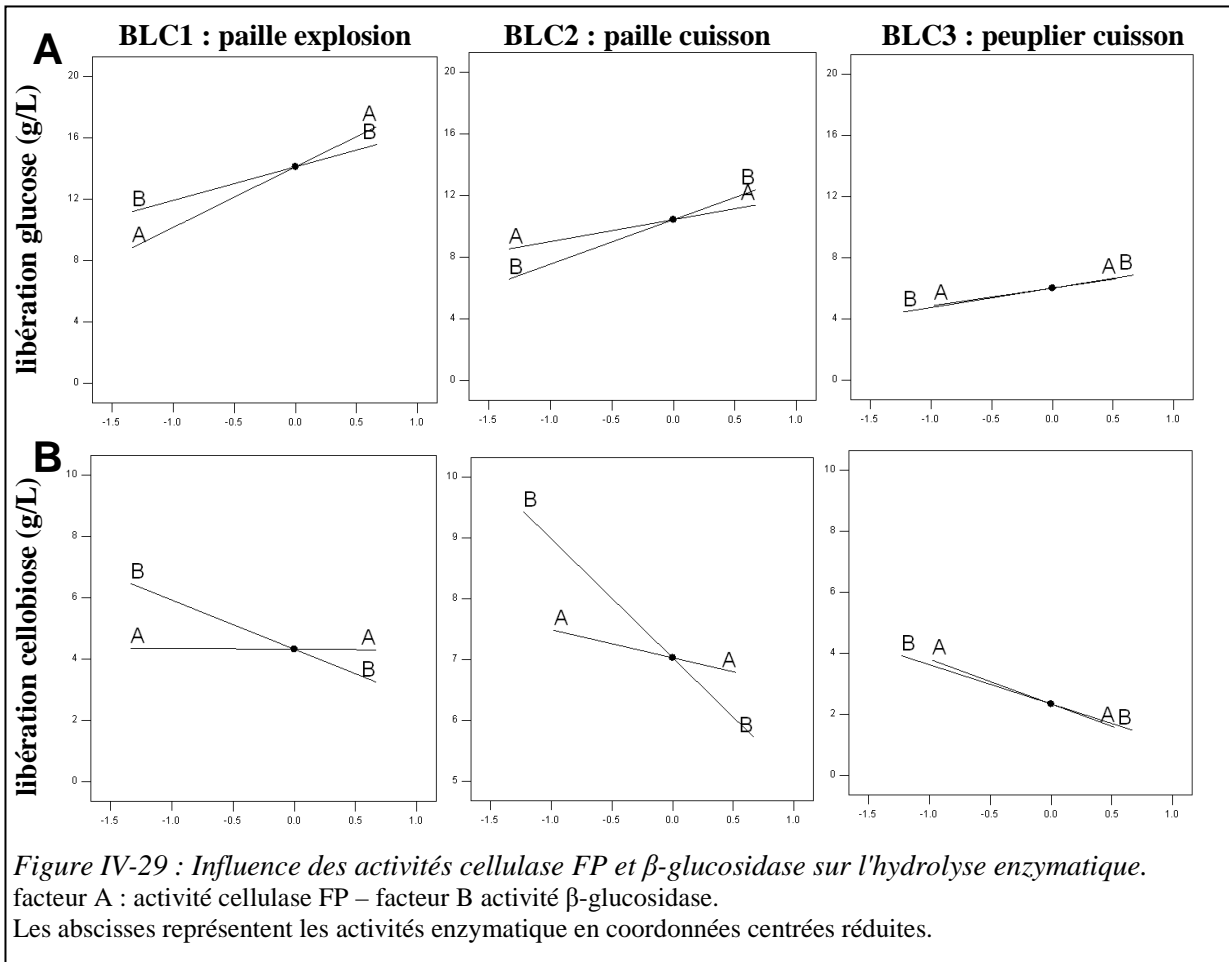
- 2. Impact des mélanges de sucres -



b Activités cellulase FP et β -glucosidase

Pour la suite de l'analyse, l'influence de l'activité xylanase est considérée comme négligeable (en accord avec les résultats précédents), donc le modèle devient : $[sucre] = cte + A \cdot FP + B \cdot \beta glu$

L'analyse statistique montre que pour les 3 biomasses lignocellulosiques, l'accumulation de cellobiose dépend principalement de l'activité β -glucosidase (corrélation négative, Figure IV-29 B). En effet, l'hydrolyse du cellobiose en glucose est limitée par les faibles quantités de β -glucosidase dans les cocktails.



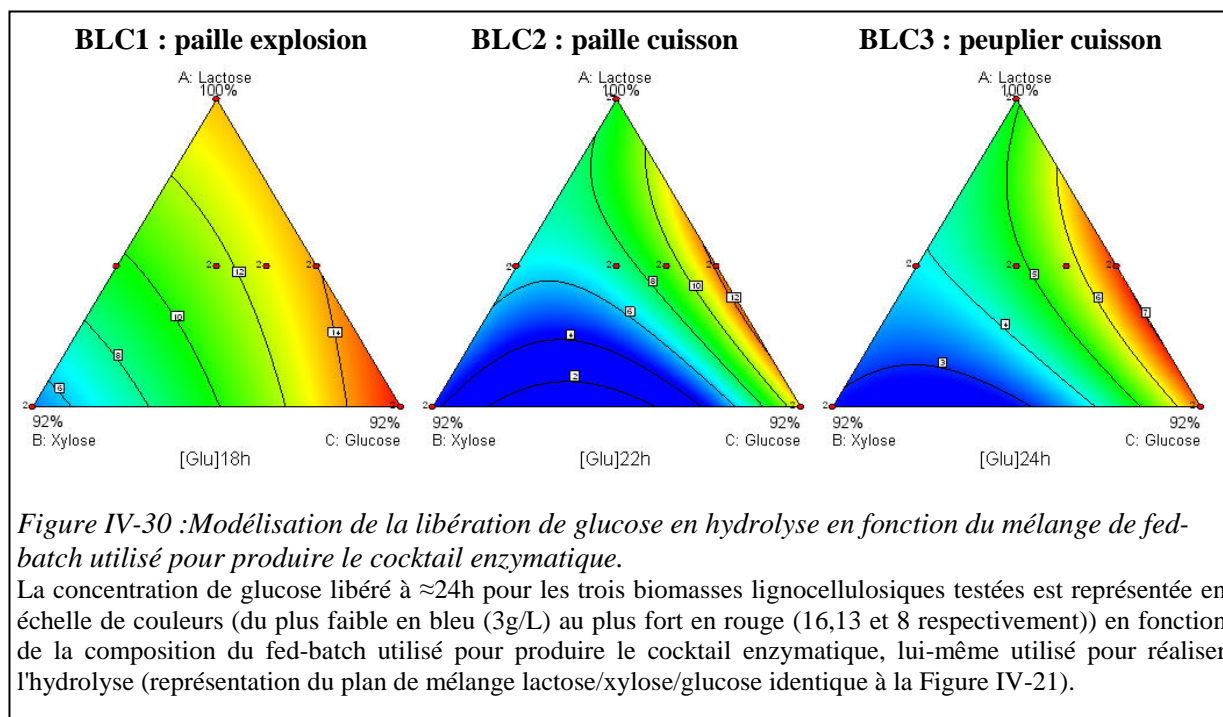
En revanche, la libération de glucose dépend de ces 2 activités à la fois, avec une balance différente selon la biomasse lignocellulosique et/ou le %MS mis en jeu et/ou le lavage ou non de la biomasse lignocellulosique (les conditions testées ne permettent pas de séparer ces 3 effets) :

- l'hydrolyse de la paille explosée à la vapeur et lavée à 10%MS dépend principalement de l'activité cellulase FP
- l'hydrolyse de la paille cuisson à 5%MS dépend principalement de l'activité β -glucosidase
- l'hydrolyse du peuplier cuisson à 5%MS dépend "à égalité" de ces 2 activités.

Ce résultat est particulièrement visible si on représente la libération de glucose en fonction de la composition du fed-batch utilisé pour produire le cocktail enzymatique (Figure IV-30). En effet on retrouve pour l'hydrolyse des profils semblables à ceux obtenus pour les activités enzymatiques (voir Figure IV-22 page 139), avec pour la paille explosée un profil qui ressemble à celui de l'activité FP, et pour les 2 substrats cuisson un profil qui ressemble à celui de l'activité β -glucosidase.

Ainsi cette analyse montre qu'on peut effectivement relier les mesures d'activité enzymatique et la performance du cocktail en hydrolyse. Elle confirme ainsi l'intérêt des cocktails produits sur des mélanges de lactose de glucose (qui présentent de meilleures activités cellulase FP et β -glucosidase) pour l'hydrolyse de biomasses lignocellulosiques.

Cependant, les cocktails utilisés pour cette étude sont très pauvres en activité β -glucosidase car produits avec la souche non modifiée CL847, donc ne sont pas extrapolables à des souches améliorées qui produisent plus d'activité β -glucosidase. Dans ce cas, on peut espérer que les cocktails produits avec des mélanges contenant du xylose soient moins mauvais en hydrolyse car auront une activité β -glucosidase plus forte. Comme l'accumulation de cellobiose sera très faible, on s'attend à avoir une vitesse d'hydrolyse corrélée uniquement à l'activité cellulase FP. Pour vérifier cette hypothèse il serait nécessaire de recommencer cette étude (production des cocktails et hydrolyses) avec une souche modifiée.



2.1.4 Conclusion sur le remplacement de l'inducteur

Pour diminuer le coût du substrat, l'inducteur peut être remplacé par du glucose ou du xylose présent dans les hydrolysats de biomasse lignocellulosique. Un plan de mélange à 3 facteurs a été utilisé pour étudier l'effet sur le cocktail enzymatique produit (vitesse de production et composition

- 2. Impact des mélanges de sucres -

enzymatique), en protocole miniaturisé en fioles alimentées. Puis les modèles ont été validés par comparaison avec des cultures en bioréacteur.

Les résultats des plans d'expériences sont semblables avec inducteur lactose ou inducteur cellobiose. L'activité spécifique xylanase dépend uniquement de la teneur en xylose de l'alimentation, et est maximisée dès 30%. L'activité β -glucosidase a un profil inverse, avec une activité plus faible en présence de xylose, et une activité maximisée dans les mélanges inducteur+glucose. L'activité cellulase FP est corrélée avec l'activité β -glucosidase, et est maximisée dans les cocktails produits avec une forte teneur en glucose.

En fioles alimentées, réduire la teneur en inducteur de 100% à 8% a permis de conserver au moins 50% de la vitesse spécifique de production. Et les performances ont été meilleures encore en bioréacteur.

La présence de mannose ou d'arabinose dans l'alimentation n'a eu aucun effet ni sur la vitesse de production ni sur les activités enzymatiques. Ces deux sucres semblent neutres, ils ne provoquent ni induction ni répression de la production. Une sporulation a cependant été observée en fin de culture, ce qui pourrait traduire un état de stress des cellules.

Des hydrolyses de biomasses lignocellulosiques prétraitées ont été réalisées en utilisant les cocktails enzymatiques produits lors des plans d'expérience. Elles ont montré que l'activité xylanase n'a aucun effet sur l'hydrolyse de la cellulose des 3 biomasses lignocellulosiques testées, et que la libération de glucose est corrélée avec l'activité β -glucosidase ou l'activité cellulase FP.

2.2 Recherche de nouveaux inducteurs

L'étude précédente a montré que le coût associé à l'achat de l'inducteur lactose peut être diminué en remplaçant une partie du lactose par des sucres industriels présents dans la bioraffinerie lignocellulosique, puisque 15% de lactose dans le fed-batch (voire moins) suffit pour maintenir les mêmes performances de production.

Cependant le lactose n'est pas disponible dans une bioraffinerie donc doit toujours être acheté à l'extérieur. Pour que la production de cellulases soit autonome, d'autres composés inducteurs ont été recherchés et leur coût de production comparé au coût d'achat du lactose.

2.2.1 Synthèse enzymatique d'oligosaccharides

L'idée étudiée dans cette partie provient de l'analyse technico-économique de la production de bioéthanol de 2^e génération réalisée par le NREL et mise à jour en mai 2011 (Humbird et al., 2011). Ce rapport indique succinctement que le milieu de fed-batch utilisé pour la production d'enzyme est préparé en incubant une solution de glucose avec une enzyme de conversion. On obtient ainsi un mélange de glucose et de sophorose (dimère de glucose $\beta(1\rightarrow2)$).

Une analyse bibliographique plus poussée a permis de trouver les résultats suivants:

- Vaheri et al. (1979) montrent que lors de l'hydrolyse de la cellulose, la β -glucosidase possède une activité annexe de trans-glycosylation, qui forme des dimères de glucose (sophorose $\beta(1\rightarrow2)$, laminaribiose $\beta(1\rightarrow3)$, gentiobiose $\beta(1\rightarrow6)$)
- Allen and Mortensen (1981) préparent un "synthetic reversion syrup" en incubant 500 g/L de glucose avec 200 IU/mL de β -glucosidase, et montrent que ce sirop utilisé en fed-batch induit la production de cellulases chez *T. reesei*.
- Ajisaka et al. (1987) montrent que la réaction d'hydrolyse catalysée par la β -glucosidase est équilibrée, et peut être inversée en utilisant des très fortes teneurs en glucose (et donc des teneurs en eau faibles). Ceci entraîne la formation de dimères de glucose. Le rendement de conversion augmente avec la teneur initiale en glucose, et avec la température.

Ainsi, l'inversion de la réaction de la β -glucosidase aux fortes teneurs en glucose, permet de former des dimères de glucose qui sont inducteurs de la production de cellulases chez *T. reesei*. Le sophorose en particulier est connu pour être un très bon inducteur, ie il entraîne une très forte induction des gènes de cellulases même à très faible concentration.

Par la suite, une demande de brevet utilisant cette technique a été déposée en 2002 par Danisco/Genencor (England et al., 2002). Le brevet a été délivré en 2010 aux Etats-Unis, mais son examen est toujours en cours en Europe.

2.2.1.1 Synthèse d'oligosaccharides au laboratoire

Afin de tester la synthèse d'oligosaccharides au laboratoire, des solutions de glucose à environ 500 g/L ont été incubées à 50°C pendant 16 h avec environ 100 IU/mL d'activité β -glucosidase provenant de 2 cocktails différents :

- le cocktail industriel Novozymes 188 produit par une souche d'*Aspergillus niger* ;
- un cocktail IFP Energies nouvelles produit par la souche modifiée *T. reesei* TR3012 dont l'activité β -glucosidase est augmentée (environ 10 IU/mg_p d'activité spécifique).

L'analyse par HPLC des sirops après incubation (Figure IV-31) montre que:

- l'utilisation d'enzyme industrielle Novozymes 188 permet 50% de conversion du glucose en oligosaccharides, avec la formation d'au moins 3 composés distincts ;
- l'utilisation d'un cocktail produit par la TR3012 permet 13% de conversion du glucose en oligosaccharides, avec la formation d'un pic en HPLC dont le temps de rétention ne correspond

- 2. Impact des mélanges de sucres -

pas au cellobiose, mais correspond au gentiobiose ou au sophorose (la méthode utilisée ne permet pas de séparer ces 2 composés).

Par ailleurs, les tests des différentes conditions expérimentales ont montré que le pourcentage de conversion à 16 h ne dépend quasiment pas de la concentration initiale en glucose tant que celle-ci est supérieure à 500 g/L, puis atteint un plateau au fortes doses d'activité β -glucosidase, qui correspond probablement à l'équilibre de la réaction (Figure IV-32).

Finalement, pour permettre une conversion maximale, les conditions expérimentales optimisées sont les suivantes:

- concentration en glucose 800 g/L (62.5% w/w), ou au moins supérieure à 500 g/L
- activité β -glucosidase environ 40 IU/g_{glucose} (diluée dans du tampon citrate 50mM pH 4.8)
 - soit 4mg_P/g_{glucose} par exemple pour un cocktail produit par la souche TR3012 dont l'activité spécifique β -glucosidase est de l'ordre de 10 IU/mg_P
- incubation sous agitation à 50°C pendant 24 h minimum.

Ces conditions ont été utilisées pour produire des oligosaccharides en grande quantité pour les tests de production suivants, avec les 2 cocktails (Novo188 et TR3012).

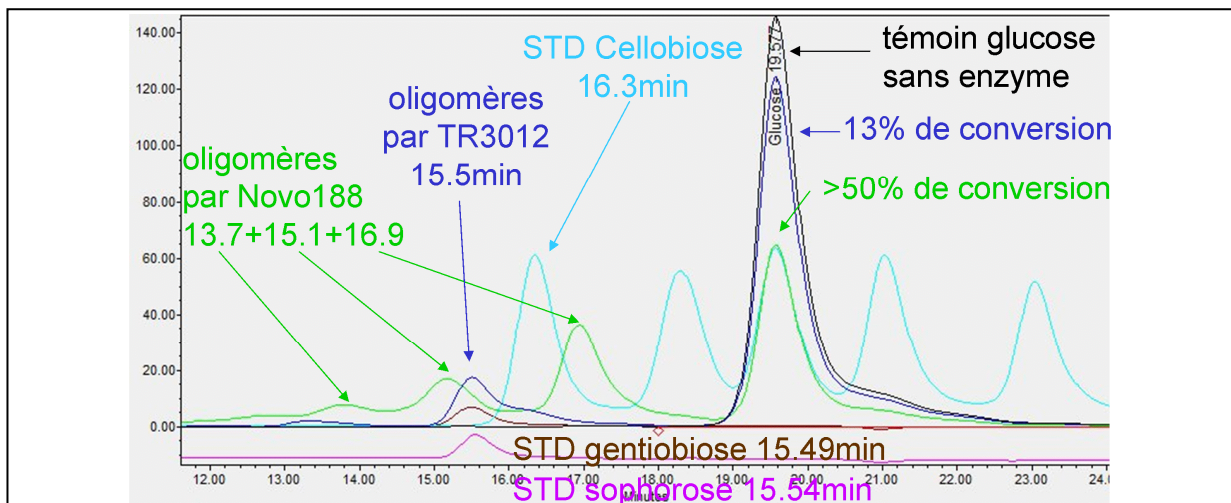


Figure IV-31 : Chromatogramme HPLC des composés formés par hydrolyse enzymatique inversée.

Bleu clair : standard contenant dans l'ordre cellobiose, lactose, glucose, xylose, galactose.

Marron: standard gentiobiose – Rose : standard sophorose.

Noir : témoin glucose sans enzyme.

Bleu foncé : mélange d'oligosaccharides produit par la souche TR3012.

Vert: mélange d'oligosaccharides produit par cocktail Novozymes188.

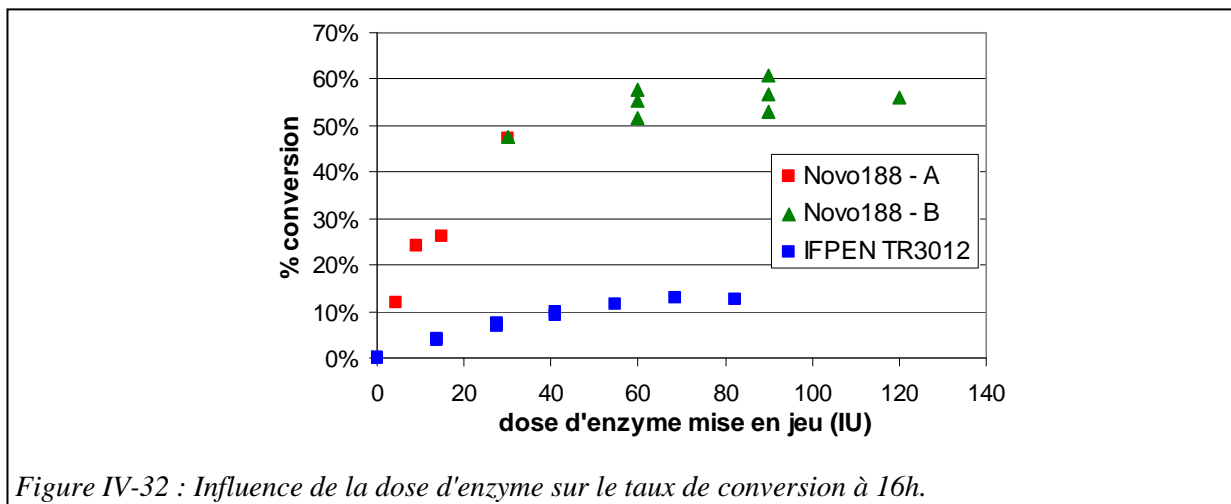


Figure IV-32 : Influence de la dose d'enzyme sur le taux de conversion à 16h.

2.2.1.2 Tests de production de protéines

a En fiole alimentée

Comme la réaction de synthèse est équilibrée, les oligosaccharides produits par synthèse enzymatique inversée sont obtenus en mélange dans du glucose. De le cas du cocktail TR3012, la teneur maximale en oligosaccharides est de 13% (des sucres totaux)

Dans les tests précédents de production en "fioles alimentées" avec inducteur lactose ou cellobiose (IV.2.1.1), les doses minimales d'inducteur (en mélange dans du glucose) qui ont été testées sont de 8% ou 15%. Ainsi, pour pouvoir comparer les inducteurs entre eux, il est nécessaire de travailler à une même teneur d'inducteur (en mélange dans du glucose), donc seule la teneur de 8% est utilisable.

Les mélanges d'oligosaccharides et de glucose produits par les 2 cocktails ont donc été supplémentés en glucose pour obtenir une teneur en inducteur de 8%, puis utilisés pour des tests de production en protocole "fioles alimentées", avec la souche CL847.

Les résultats en termes de vitesse spécifique de production de cellulases (Figure IV-33) montrent :

- une production semblable à celle du lactose dans le cas de l'utilisation du mélange d'oligosaccharides produit par le cocktail Novo 118 ;
- une production significativement supérieure à celle du lactose dans le cas du mélange produit par un cocktail de TR3012.

Ainsi le mélange d'oligosaccharides produit par la TR3012 est un meilleur inducteur que le lactose. On peut supposer que ceci est dû à la présence de sophorose (potentiellement identifié par HPLC en mélange avec du gentiobiose) et qui est connu pour être un très bon inducteur. On notera bien que la teneur de 8% testée ici correspond à un mélange d'oligosaccharides qui ne sont pas forcément tous inducteurs. Par exemple dans le brevet de Danisco, les oligosaccharides formés sont pour un quart du sophorose et pour 3 quarts du gentiobiose (England et al., 2002).

L'activité spécifique β -glucosidase finale est semblable dans les 3 conditions, entre 1.0 et 1.1 IU/mg_P, donc non influencé par la nature de l'inducteur.

En terme d'extrapolation, la production supérieure observée en fiole alimentée ne signifie pas qu'on aura une meilleure productivité en réacteur. En effet, il a été montré dans le cas du mélange 15% lactose/85% glucose que la vitesse spécifique de production de protéines q_P mesurée en fiole sous-estimait la vitesse en bioréacteur (voir paragraphe IV.2.1.1.4 page 140). De plus, il a été montré lors de l'étude cinétique qu'à forte induction en bioréacteur la vitesse spécifique de production de protéines q_P est limitée par la synthèse ou la sécrétion des protéines (III.2.1.3, page 86). En revanche, comme l'induction plus forte due à la présence de sophorose compense la répression engendrée par la forte teneur en glucose, on peut peut-être espérer garder les même performances de production à des teneurs en oligosaccharides inducteurs encore plus faibles.

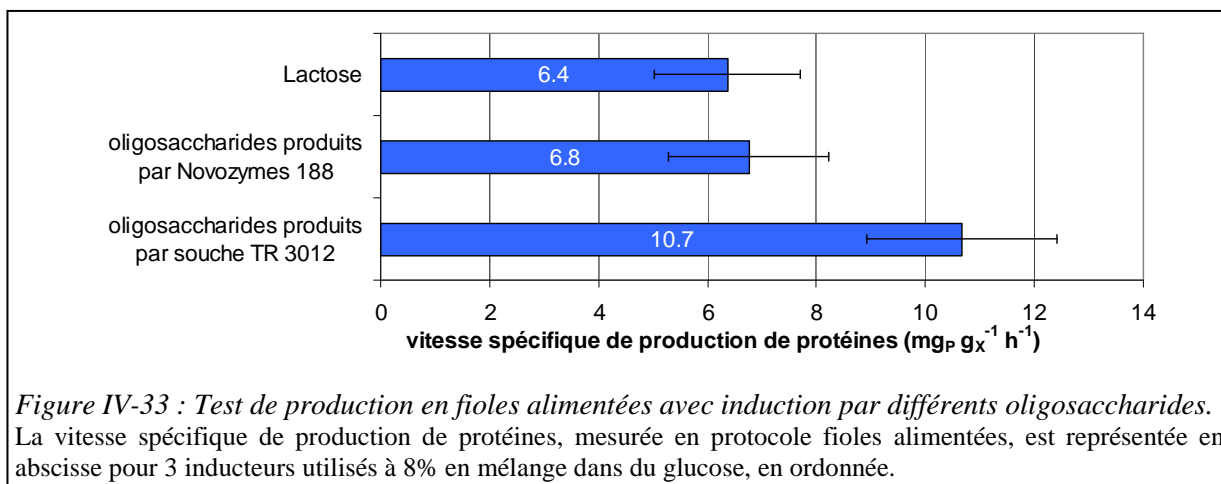


Figure IV-33 : Test de production en fioles alimentées avec induction par différents oligosaccharides. La vitesse spécifique de production de protéines, mesurée en protocole fioles alimentées, est représentée en abscisse pour 3 inducteurs utilisés à 8% en mélange dans du glucose, en ordonnée.

b En bioréacteur

Suite au test précédent de production en fioles alimentées, des cultures en bioréacteur ont été réalisées avec des mélanges de fed-batch contenant des oligosaccharides produits par la souche TR3012 à 3 teneurs différentes: 10%, 5% et 2.5% (en mélange dans du glucose). La souche utilisée pour ce test de production est la souche CL847 i β qui possède une activité β -glucosidase améliorée.

La cinétique de production de protéines est présentée Figure IV-34. On observe une production nulle avec alimentation par du glucose pur, et une bonne production avec alimentation par les mélanges contenant des oligosaccharides, comparable aux productions habituelles avec alimentation par du lactose pur. Cette production est toujours aussi bonne si on divise la teneur en oligosaccharides par 4 jusqu'à 2.5%, avec une vitesse spécifique de production de protéines q_p de l'ordre de 11 à 12 $\text{mg}_P \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ dans les 3 cas testés (contre $8.7 \pm 0.7 \text{ mg}_P \text{g}_X^{-1} \text{h}^{-1}$ pour 15% lactose en mélange dans du glucose (voir Figure IV-23 page 141)).

Concernant les activités enzymatiques spécifiques, elles sont identiques à 10% et 5% d'inducteur et semblables à celles obtenues sur lactose pur (cellulase $1.0 \pm 0.1 \text{ IU/mg}_P$ et β -glucosidase $2.9 \pm 0.1 \text{ IU/mg}_P$), et légèrement plus fortes dans le cas avec 2.5% d'inducteur (1.2 et 3.8 IU/mg_P respectivement).

Cette expérience valide donc la possibilité d'utiliser ces oligosaccharides en remplacement du lactose pour induire la production de cellulases chez *T. reesei*. De plus, la teneur en oligosaccharides peut être réduite à 2.5% voire moins (Il serait intéressant d'un point de vue économique de rechercher la teneur minimale à utiliser pour garder une bonne induction). Enfin l'utilisation de la souche CL847 i β démontre que l'induction n'était pas spécifique de la souche non modifiée CL847.

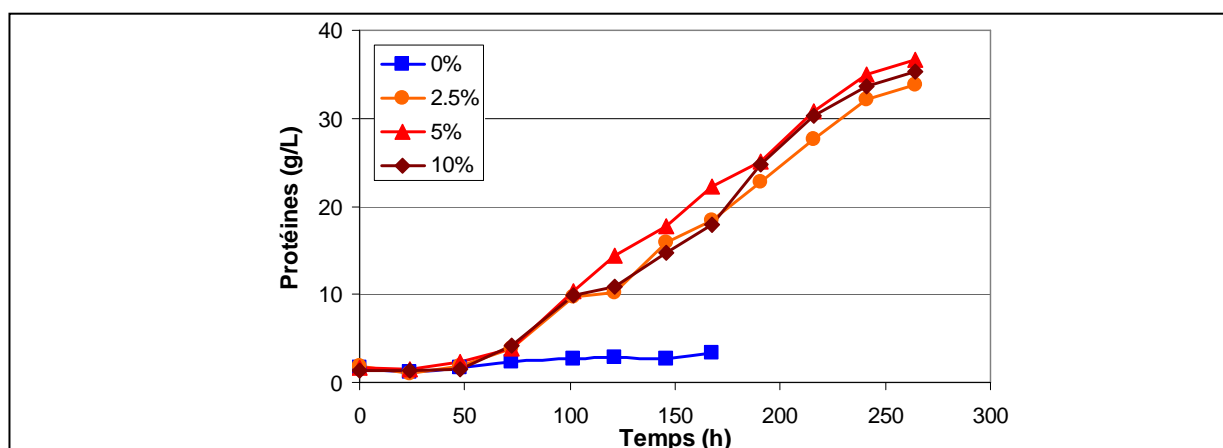


Figure IV-34 : Productions de protéines en bioréacteur avec induction par un mélange de glucose et d'oligosaccharides produits par la souche TR3012.

carrés bleus : sans oligosaccharides – rond orange : 2.5% d'oligosaccharides – triangles rouges : 5% d'oligosaccharides – losanges marrons : 10% d'oligosaccharides.

2.2.1.3 Intégration au procédé

a Schémas de procédé

Les expériences précédentes ont montré que l'inversion de la réaction de la β -glucosidase aux fortes teneurs en glucose est une très bonne technique pour produire des inducteurs, d'autant plus que le mélange d'oligosaccharides obtenu est un meilleur inducteur que le lactose.

Cependant, l'utilisation de glucose synthétique est brevetée par Danisco (England et al., 2002, demande en cours dans le cas européen). Dans une bioraffinerie lignocellulosique, on dispose d'hydrolysats de biomasse lignocellulosique, qui contiennent donc du glucose et encore des cellulases. De plus, alors que les endoglucanases et les cellobiohydrolases possèdent des domaines de fixation à la cellulose et s'adsorbent très facilement sur la fraction solide, la β -glucosidase n'en possède pas donc

reste dans la fraction liquide (bien qu'une fixation sur les parties hydrophobes de la lignine soit aussi possible). Elle est donc conservée après séparation des fractions solides et liquides.

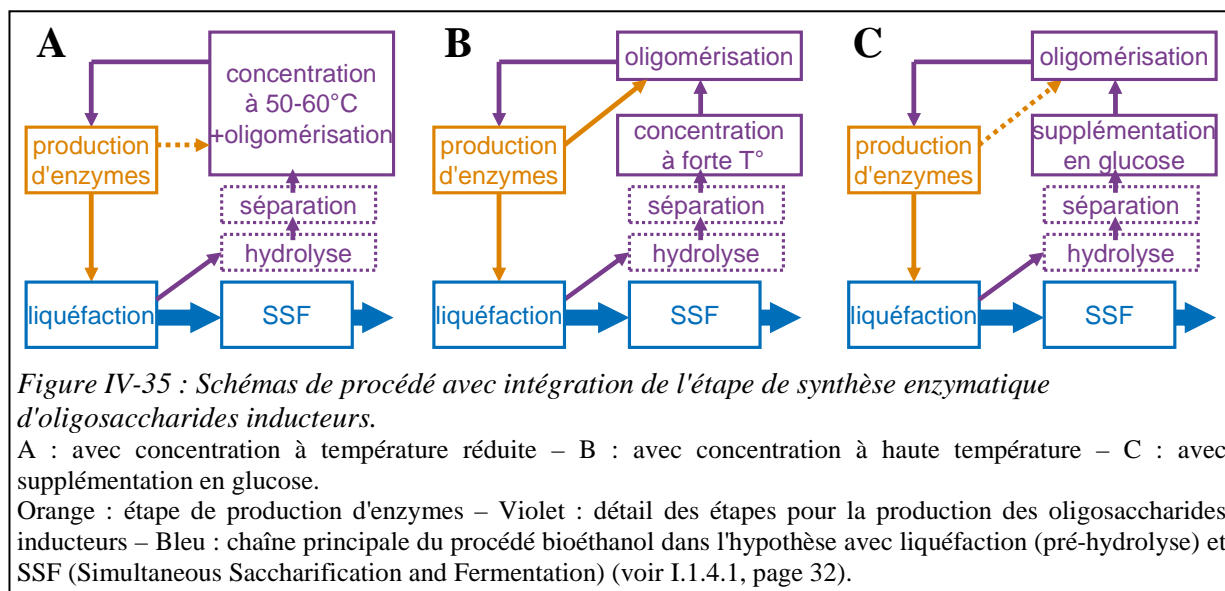
Ainsi, à la fin de l'hydrolyse enzymatique, la fraction liquide contient des sucres dont une majorité de glucose, et des enzymes β -glucosidase. On pourrait donc utiliser ces hydrolysats pour réaliser la synthèse des oligosaccharides sans avoir à ajouter du sucre synthétique ou de la β -glucosidase.

Le seul point bloquant est que les concentrations en glucose dans les hydrolysats, de l'ordre de 100 g/L, sont trop faibles pour permettre l'oligomérisation, il sera donc nécessaire de concentrer ces hydrolysats jusqu'à 500 g/L afin que la réaction catalysée par la β -glucosidase s'inverse. Cette concentration doit être menée à une température inférieure à 60°C (donc sous pression réduite) afin de ne pas dénaturer les enzymes. Sinon il sera nécessaire de rajouter des enzymes après concentration. Autre option, on pourrait compléter les hydrolysats avec du sirop de glucose issu d'hydrolysats d'amidon (plus concentré que les hydrolysats lignocellulosiques).

En termes de quantité de protéines nécessaire à l'oligomérisation, l'hydrolyse est réalisée généralement à 10 mg_p/g_{MS} ce qui donne rapporté au glucose potentiel libéré environ 20 mg_p/g_{glucose}, soit 5 fois plus que la quantité nécessaire pour l'oligomérisation. Cette marge est importante à prendre en compte car il est possible que certaines enzymes se dégradent au cours de l'hydrolyse. Dans un test initial de cette stratégie, l'activité β -glucosidase a été mesurée nulle après 72 h d'hydrolyse de paille cuisson Futurol à 20%MS. Si cette dégradation des β -glucosidase se confirme, il serait nécessaire de rajouter des enzymes aux hydrolysats avant oligomérisation.

On peut ainsi proposer 3 schémas possibles pour l'intégration de l'étape de synthèse des oligosaccharides inducteurs (Figure IV-35) :

- A: concentration des hydrolysats sous pression réduite afin de garder les enzymes actives. Ce cas est le plus simple mais probablement trop coûteux à grande échelle.
- B: concentration à haute température (moins coûteux). Comme les enzymes issues de l'hydrolyse sont détruites, il est nécessaire de rajouter des enzymes pour l'oligomérisation.
- C: dans le cas où la concentration n'est pas possible, on propose de compléter l'hydrolysats en glucose pour atteindre les concentrations en glucose nécessaires à l'oligomérisation.



b Estimation du coût du substrat

Pour vérifier l'intérêt économique de ces options, leurs coûts ont été calculés et comparés avec le cas du lactose (Tableau IV-8). Le cas C n'a pas pu être traité en l'absence d'indications sur le prix potentiel d'un sirop de glucose concentré nécessaire à la supplémentation.

- 2. Impact des mélanges de sucres -

Le prix du glucose issu d'un procédé 2G est estimé à 0.3€/kg (communication de C. Aymard, IFPEN). Avec un rendement moyen de l'étape de production d'enzymes à 0.3 g_p/g_s, le coût incompressible du substrat pour la production d'enzymes est de 1€/kg.

Dans le cas où l'inducteur est le lactose (coût d'achat estimé à 2€/kg) utilisé à une teneur massique de 15%, le surcoût lié à l'achat du lactose est de 0.85 €/kg.

Si on réalise la production en protocole fed-batch, il est nécessaire de concentrer l'hydrolysate (complémenté en lactose) jusqu'à 250 g/L, ce qui donne un coût total de substrat de 2.35 €/kg (glucose+lactose+concentration HT). A l'inverse, si on réalise la production en protocole continu, il n'est pas nécessaire de concentrer, ce qui donne un coût de substrat de 1.85 €/kg (glucose+lactose)

Pour réaliser l'oligomérisation, il est nécessaire de concentrer les hydrolysats à environ 600 g/L. Si on veut garder les enzymes actives, il est nécessaire de concentrer à basse température, ce qui consomme plus de vapeur. Dans ce cas, le coût total du substrat pour la production est de 1.80 €/kg (glucose+concentration basse T°), ce qui est équivalent au cas lactose continu (Cas A Tableau IV-8).

Autre option, on peut concentrer à haute température puis rajouter des enzymes neuves. Cette option est finalement la moins coûteuse (1.47 €/kg) car le surcoût dû aux enzymes est très largement compensé par le gain dû à la concentration en triple effet.

D'autres techniques de concentration sont envisageables pour diminuer la quantité de vapeur nécessaire (par exemple avec recompression mécanique des vapeurs) mais cela augmenterait fortement les coûts d'investissement donc n'a pas été pris en compte ici.

Tableau IV-8 : Estimation du coût du substrat pour différentes options d'inducteur et de conduite.

En supposant un rendement global en protéines de 0.3 kg_p/kg_s.

Les prix moyens de 0.3 €/kg_{glucose} et de 30 €/t_{vapeur} sont des communications de C. Aymard (IFPEN).

¹coût du substrat pour le production d'1 kg d'enzymes (et non coût total de la production).

poste	hypothèses	€/kg	€/kg ¹
glucose issu du procédé	coût estimé :	0.30	1.00
lactose	substitution par 15% de lactose à 2 €/kg	0.25	0.85
concentration pour fed-batch 100g/L => 250 g/L	à évaporer : 5.65 L _{H2O} /kg _s => cas haute T° : 0.45 t _{vapeur} /t _{H2O} (triple effet) avec coût vapeur : 30 €/t _{vapeur}	0.15	0.51
concentration pour oligomérisation : 100g/L => 600 g/L	à évaporer : 8.00 L _{H2O} /kg _s => cas basse T° : 1 t _{vapeur} /t _{H2O} (simple effet) => cas haute T° : 0.45 t _{vapeur} /t _{H2O} (triple effet) avec coût vapeur : 30 €/t _{vapeur}	0.24 0.11	0.80 0.36
si ajout d'enzymes neuves	dosage : 4 g _p /kg _{glucose} coût estimé : 8 €/kg	0.03	0.11
TOTAUX	Cas Lactose fed-batch (avec concentration)	0.70	2.35
	Cas Lactose continu (sans concentration)	0.55	1.85
	Cas (A) : basse T° sans ajout d'enzyme	0.54	1.80
	Cas (B) : haute T° puis ajout d'enzyme	0.44	1.47

Toutes ces estimations ont été réalisées sans tenir compte du taux de conversion de l'oligomérisation, en supposant que l'on utilise la solution brute à environ 10% d'oligosaccharides. Si la teneur peut être divisée par 4 comme dans l'étude réalisée précédemment, alors le coût des cas A et B sera encore diminué.

Dans tous les cas, les coûts estimés ci-dessus ne sont que des premières estimations, qu'il faudrait compléter par d'autres options de concentrations, et en prenant en compte que le glucose est utilisé au détriment de la production d'éthanol.

2.2.2 Valorisation des sophorolipides

L'étude précédente a montré une nouvelle fois le très fort pouvoir inducteur du sophorose pour la production de cellulases par *T. reesei*. En l'absence d'une réelle demande, les fournisseurs de sophorose purifié pratiquent des tarifs prohibitifs (700€/g), probablement aussi lié à la difficulté de l'extraction à partir de ressources naturelles (gousses immatures de *Sophora japonica*).

Or IFP Energies nouvelles possède une grande expertise dans la production de sophorolipides, une famille de biosurfactants composés d'une unité sophorose reliée à un acide gras par une liaison de type osidique (entre le carbone 1' du sophorose et celui en ω -1 de la chaîne lipidique). Ces composés sont produits par des levures naturelles comme par exemple *Candida bombicola*. Selon le lipide fourni au microorganisme et les conditions de culture, on obtient un mélange de différents sophorolipides, sous forme acide (fonction carboxylique libre) ou lactone cyclique (liaison ester entre l'acide gras et le groupement -OH en 4'' du sophorose), et avec les groupements -OH 6' et 6'' qui peuvent être acétylés (Figure IV-36).

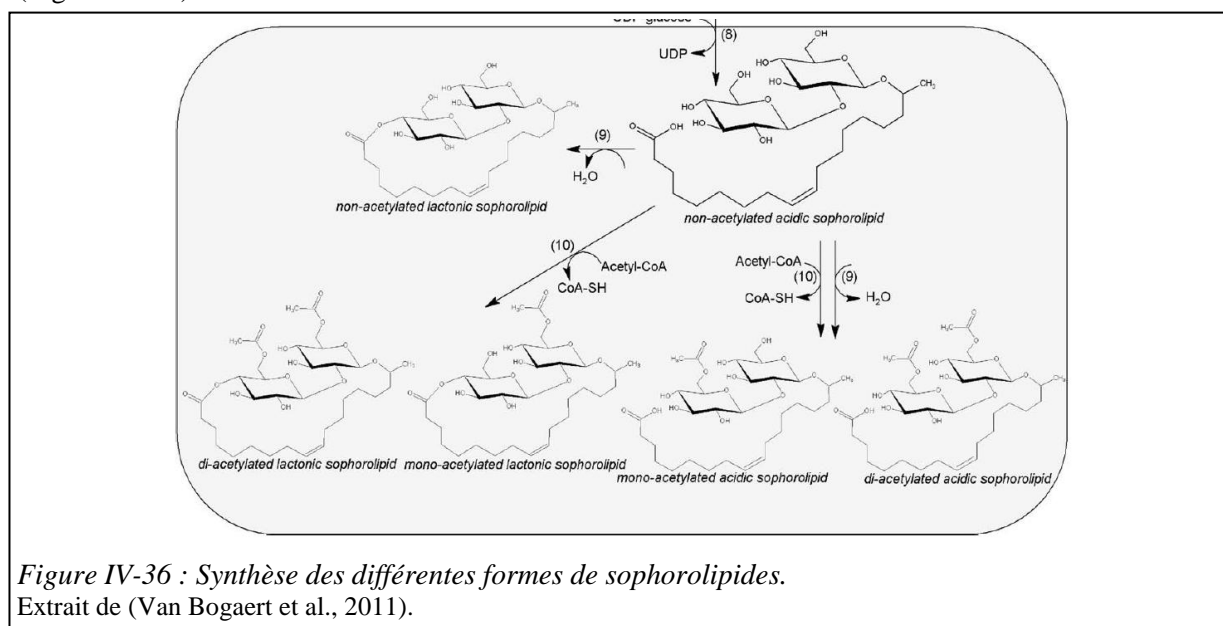


Figure IV-36 : Synthèse des différentes formes de sophorolipides.
Extrait de (Van Bogaert et al., 2011).

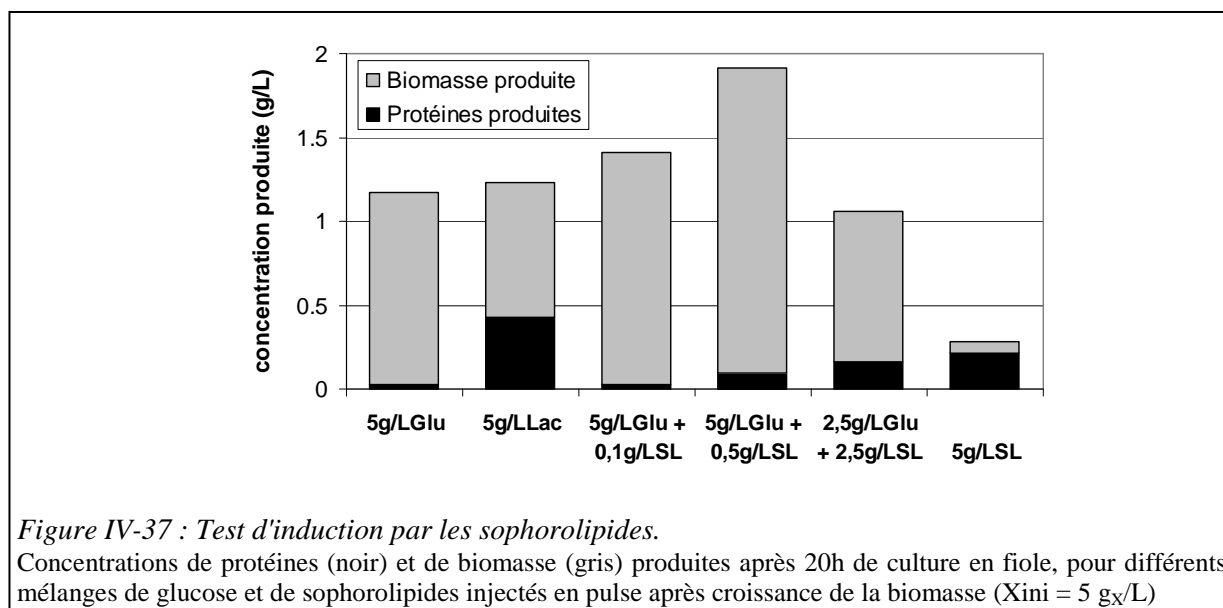
(Lo and Ju, 2009) ont démontré l'induction de la production des cellulases chez *T. reesei* Rut-C30 par des sophorolipides, et ont proposé de réaliser un coculture de *T. reesei* et de *Candida bombicola*. Cependant, leur production d'enzyme est très faible avec au maximum 0.5 IU/mL d'activité cellulase FP après 6 jours de culture (soit 0.5 à 1 g/L de protéines), et est réalisée en batch en fiole donc difficilement extrapolable à la culture en bioréacteur en fed-batch avec limitation carbone.

2.2.2.1 Test d'induction par des sophorolipides

Pour commencer, l'induction par les sophorolipides observée par (Lo and Ju, 2009) a été comparée avec l'induction par le lactose. Le protocole en fiole avec pulse de substrat (II.3.1.4, page 63) a été choisi car il permet d'observer des différences d'induction et est facile à mettre en œuvre.

Différents mélanges de glucose et de sophorolipide (sous forme acide déacétylée) ont été testés (Figure IV-37). Une concentration en sophorolipide supérieure ou égale à 0.5 g/L a permis une production de protéines supérieure à celle du témoin sur glucose pur, ce qui confirme bien les résultats de (Lo and Ju, 2009). En revanche aucun mélange n'a permis une production comparable à celle sur lactose, le substrat fourni étant principalement utilisé pour la croissance des cellules.

La répartition massique entre sucre et lipide dans une molécule de sophorolipide est d'environ 50/50. Donc dans le cas où on a fourni uniquement du sophorolipide (5 g/L), les cellules de *T. reesei* n'ont pas été efficaces pour valoriser ni la fraction lipide (attendu), ni même toute la fraction sucre disponible. Il n'a d'ailleurs pas été décrit que *T. reesei* possède l'activité enzymatique nécessaire pour couper la liaison osidique $\beta(1\rightarrow2)$ entre les parties sucre et lipide du sophorolipide.



2.2.2.2 Extraction chimique du sophorose

Si l'induction par les sophorolipides bruts est une réalité, elle est très faible par rapport au potentiel d'induction que représente le sophorose présent dans la molécule. Il n'existe pas de méthode enzymatique ni même d'enzyme référencée pour hydrolyser spécifiquement la liaison entre le sophorose et le lipide. Comme il s'agit d'une liaison osidique $\beta(1\rightarrow2)$, les enzymes présentant une activité $\beta(1\rightarrow2)$ -glucosyl-hydrolyase pourraient fonctionner mais d'une part, ce ne sont pas des enzymes très communes, et d'autre part on risquerait en même temps de couper la liaison $\beta(1\rightarrow2)$ entre les 2 résidus glucose du sophorose.

Une méthode chimique d'extraction du sophorose a donc été recherchée. Ceci est réalisé classiquement dans le but de récupérer la chaîne lipidique du sophorolipide à des fins d'analyse. Mais comme on ne cherche pas à récupérer le sophorose, les conditions d'hydrolyse sont sévères, ce qui entraîne l'hydrolyse du sophorose en 2 unités glucose.

Ici, comme le sophorolipide disponible était sous forme lactone principalement, une hydrolyse en conditions basiques ou saponification a tout d'abord été réalisée afin d'ouvrir la lactone et de déacétyler le groupement sophorose (II.1.2.3, page 56). Ainsi la forme acide non acétylée du sophorolipide a été obtenue (et utilisée pour le test précédent). Puis une hydrolyse acide ménagée (à faible teneur en acide) a été choisie pour hydrolyser les liaisons osidiques.

a Mise au point en petit volume

Réalisée en tubes fermés de 1mL contenant environ 200 g/L de sophorolipide, l'hydrolyse acide ménagée a montré un effet fort de la dose d'acide utilisée : plus la dose d'acide augmente, plus la quantité totale de sucres libérés (en 16 h) est forte, mais plus la teneur en sophorose diminue dans le mélange final de sucres (Figure IV-38).

Ainsi, les conditions testées ici entraînent l'hydrolyse des 2 fonctions osidiques du sophorolipide, d'où la libération d'un mélange de glucose et de sophorose. Cependant, la liaison entre le sophorose et le lipide semble légèrement plus fragile que la liaison interne du sophorose, ce qui permet de maximiser la teneur en sophorose du mélange aux très faibles doses d'acide.

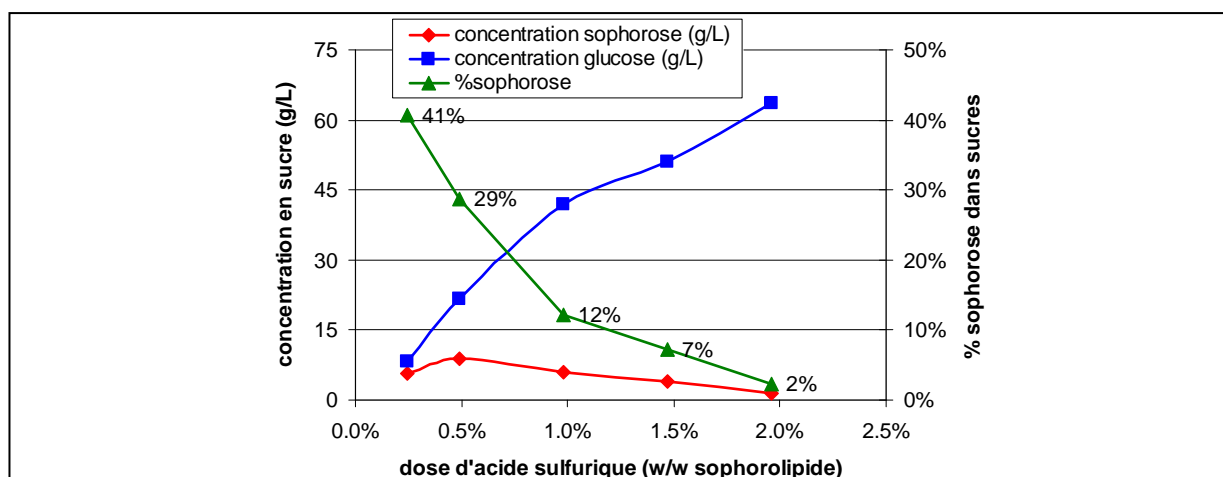


Figure IV-38 : Effet de la dose d'acide sur l'hydrolyse acide ménagée du sophorolipide.

L'hydrolyse acide du sophorolipide (pour différentes doses d'enzymes, en abscisse) est réalisée en tubes fermés pendant 16h à 100°C, puis les concentrations de glucose (carrés bleus) et de sophorose (losanges rouges) sont mesurées par HPLC. La teneur en sophorose dans le mélange est présentée en triangles verts.

b Suivi de l'hydrolyse au reflux

Afin de produire une grosse quantité de sophorose, une hydrolyse acide ménagée a été réalisée au reflux avec une dose d'acide de 0.25%w/w (masse d'acide rapportée à la masse de sophorolipide) pendant 12h.

L'analyse par HPLC de l'hydrolysats final prouve que l'opération a bien permis la libération de sophorose (Figure IV-39). De plus, un test d'hydrolyse enzymatique par de la β -glucosidase de cet hydrolysats prouve bien que *T. reesei* est capable d'hydrolyser le sophorose en glucose pour le consommer comme source de carbone.

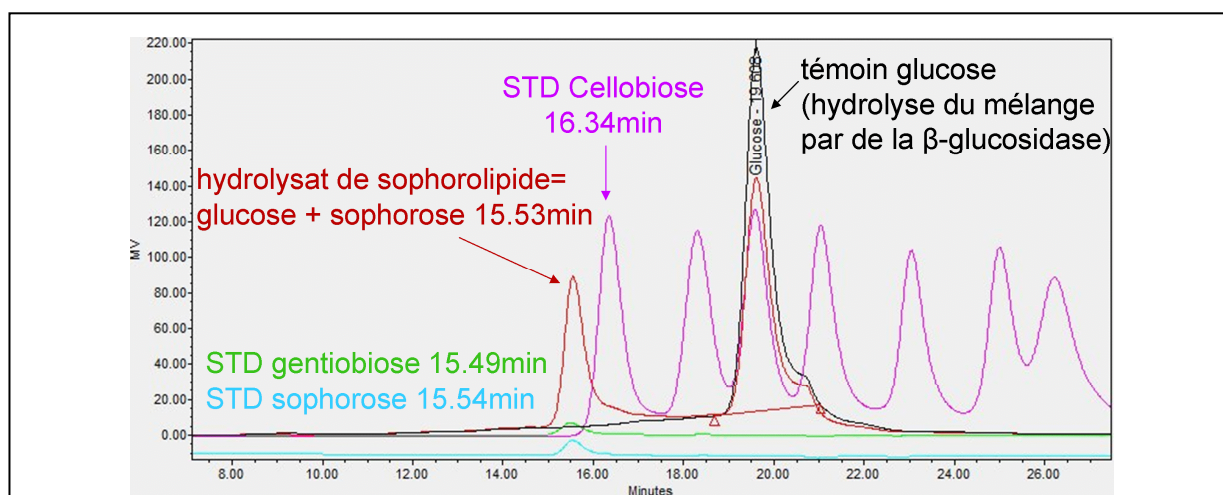


Figure IV-39 : Chromatogramme HPLC de l'hydrolysats acide ménagé de sophorolipides.

Rose : standard contenant dans l'ordre cellobiose, lactose, glucose, xylose, galactose, arabinose, mannose.

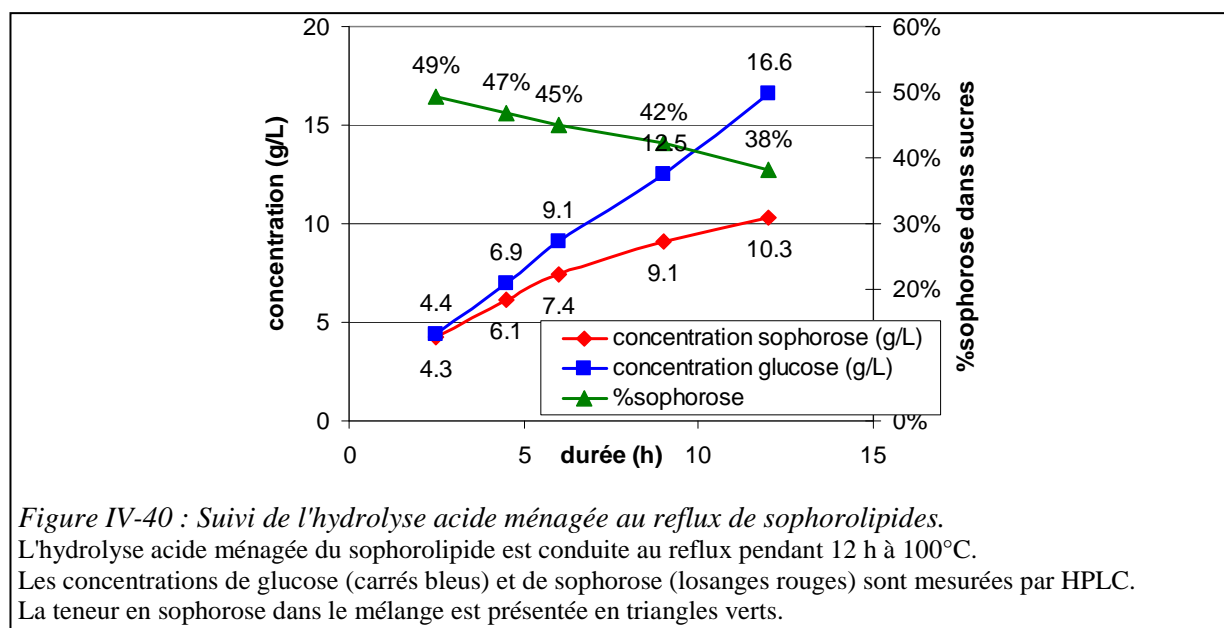
Vert : standard gentiobiose – Bleu : standard sophorose.

Rouge : hydrolysats acide ménagé de sophorolipides au reflux.

Noir : témoin glucose réalisé par hydrolyse par de la β -glucosidase de l'hydrolysats acide de sophorolipides.

Le suivi des concentrations (Figure IV-40) montre une libération de sucres totaux qui ralentit légèrement au cours du temps (16.5g/L dans les 6 premières heures, puis 10.4g/L dans les 6 h suivantes). La concentration en sophorose augmente au cours du temps, mais sa teneur dans les sucres totaux diminue au cours du temps car le sophorose, une fois libéré, continu à être hydrolysé.

En terme de rendement d'extraction, le sophorolipide était présent à une concentration maximale de l'ordre de 200 g/L (non mesurée précisément), donc seulement un quart du sucre potentiel a été libéré. Augmenter la durée d'hydrolyse permettrait d'augmenter la libération de sucre mais au prix d'une teneur en sophorose qui diminuerait encore.



2.2.2.3 Valorisation pour l'induction des cellulases

Le mélange obtenu par hydrolyse acide ménagée de sophorolipides a été utilisé pour un test de production en conditions type industrielles (protocole avec limitation carbone en fioles alimentées). Pour permettre la comparaison avec les tests de production précédemment réalisés pour le lactose et les oligosaccharides, le mélange a été complété avec du glucose pur afin que le sophorose représente 8% des sucres totaux dans le mélange de fed-batch.

Les résultats (Figure IV-41) montrent une très bonne induction par ce mélange, avec une vitesse spécifique de production de protéines encore légèrement supérieure (mais la différence n'est pas significative) à celle précédemment mesurée pour les oligosaccharides produit par un cocktail de TR3012.

En revanche, l'activité spécifique β -glucosidase est 25% plus faible que sur lactose ou oligosaccharides (0.75 contre 1.0 IU/mg_P), sans que l'on puisse proposer d'explication rationnelle.

Vu la forte capacité d'induction du sophorose, et les tests prometteurs obtenus sur les mélanges d'oligosaccharides, il serait très intéressant de réaliser des tests de production à des teneurs en sophorose encore plus faibles pour déterminer la teneur minimale permettant une bonne induction en conditions industrielles de type fed-batch (lors de la découverte du pouvoir inducteur du sophorose, il était présent dans du glucose à une teneur de 0.006%).

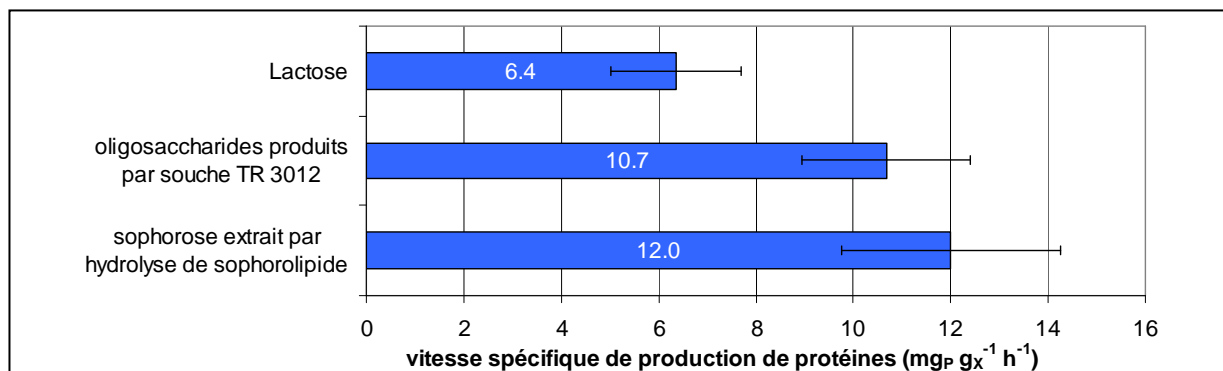


Figure IV-41: Test de production en fioles alimentées avec induction par un hydrolysats acide ménagée de sophorolipides.

La vitesse spécifique de production de protéines, mesurée en protocole fioles alimentées, est représentée en abscisse pour 3 inducteurs utilisés à 8% en mélange dans du glucose, en ordonnée (les 2 premiers ont déjà été présentés Figure IV-33 et sont recopiés ici à titre de comparaison).

2.2.2.4 Intégration au procédé

Au vu des difficultés liées à l'extraction du sophorose par voie chimique, et de la nécessité de procéder à une culture de *Candida bombicola* pour produire les sophorolipides, l'intégration de cette option dans une bioraffinerie lignocellulosique n'a pas été envisagée.

Si la teneur minimale nécessaire s'avère être très faible, alors il pourrait être envisageable pour IFP Energies nouvelles de vendre cet inducteur au même titre que les souches hyperproductrices de *T. reesei*.

Dans tous les cas, le sophorose extrait par cette méthode peut s'avérer très utile au laboratoire pour réaliser des tests de forte induction.

2.2.3 Conclusion sur la recherche de nouveaux inducteurs

Deux stratégies ont été testées pour remplacer le lactose par d'autres composés inducteurs de la production de protéines. Ces deux stratégies consistent à produire du sophorose, connu pour être un très bon inducteur chez *T. reesei*, et qui pourrait potentiellement être utilisé à des teneurs plus faibles que le lactose.

La réalisation d'une hydrolyse acide ménagée de sophorolipides permet de récupérer un mélange de sophorose et de glucose. A 8% d'inducteur dans du glucose, le sophorose a donné une vitesse spécifique de production 2 fois plus élevée qu'avec du lactose, en fioles alimentées. Cependant l'intégration de cette stratégie dans une bioraffinerie lignocellulosique ne semble pas envisageable.

L'inversion de la réaction de la β -glucosidase aux très fortes teneurs en glucose permet de former un mélange d'oligosaccharides dont du sophorose. En bioréacteur, un mélange contenant 2.5% d'oligosaccharides dans du glucose a donné une production de protéines comparable à celles avec du lactose pur. L'intégration de cette stratégie dans une bioraffinerie lignocellulosique semble possible et moins coûteuse que d'utiliser du lactose (à même teneur en inducteur) et plusieurs schémas de procédé ont été proposés.

3 Contraintes liées au changement d'échelle

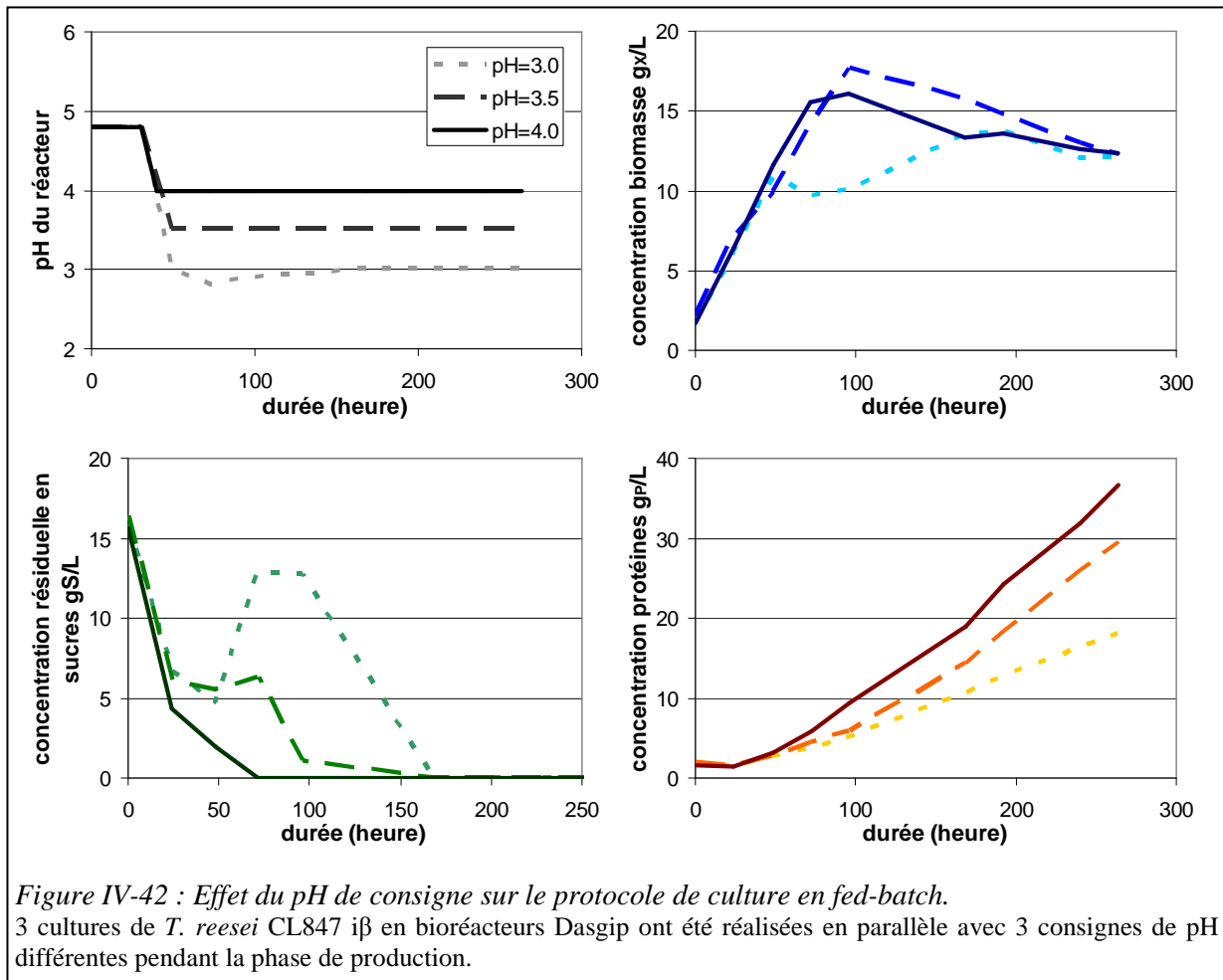
Le changement d'échelle lors du transfert d'un protocole de production entre le laboratoire et l'industrie peut entraîner de grosses modifications dont les effets doivent être étudiés en détail. Dans cette partie, les questions classiques de scale-up en termes de génie chimique (rhéologie, puissance dissipée, temps de mélange, transfert d'oxygène) ne seront que brièvement évoquées, car correspondent plus particulièrement au travail de thèse de Jean-Christophe Gabelle (IFP Energies nouvelles, INSA Toulouse). Seuls les effets potentiels sur le métabolisme des cellules seront étudiés.

3.1 Effet du pH de consigne

L'effet du pH de culture sur la croissance sur glucose a déjà été étudié précédemment, lors de l'étude des inhibiteurs (paragraphe IV.1.1.1, page 115). Il avait alors été observé que la vitesse initiale de croissance diminue d'environ 15-20% à pH 4.0 et d'environ 25-30% à pH 3.5 par rapport au maximum observé pour une plage comprise entre pH 5.0 et 5.5.

On propose donc pour la phase de croissance de conserver le pH de consigne du protocole IFP Energies nouvelles (I.2.4.1.2, page 50), à 4.8 (sauf en présence d'acide acétique, voir paragraphe IV.1.1.2.4 page 121). Concernant la phase de production, le pH de consigne historique est à 4.0, mais il pourrait être intéressant de baisser encore ce pH afin de limiter les risques de contamination.

Trois cultures ont donc été réalisées en parallèle selon le protocole fed-batch IFP Energies nouvelles afin d'investiguer l'effet du pH de consigne pendant la phase de production. La phase de croissance est réalisée à l'identique pendant 32 h à pH 4.8, puis l'alimentation en lactose est démarrée, et le pH de consigne est modifié à 4.0, 3.5 ou 3.0. En l'absence d'utilisation d'acide pour la régulation, le pH du réacteur diminue lentement : environ 10 à 15 h sont nécessaires pour atteindre la consigne.



Dans le 1^{er} réacteur témoin (traits pleins sombres Figure IV-42), la consigne a été maintenue à 4.0 comme d'habitude. On observe un profil classique avec une concentration résiduelle en sucres nulle après 50 h, une concentration en biomasse qui se stabilise vers 15 g_X/L, et une production de protéines linéaire.

Dans le 2^e réacteur (traits hachés moyens Figure IV-42), la consigne a été choisie à pH 3.5. On observe une légère accumulation de sucres, probablement due au ralentissement du métabolisme déjà observé en croissance. A cause de cette accumulation, l'induction de la production n'a pas lieu dès le démarrage de l'alimentation, la croissance dure légèrement plus longtemps, et la production est légèrement retardée. Cependant, la production est ensuite semblable à celle du réacteur témoin, avec une vitesse spécifique de production de protéines d'environ $14 \pm 1 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ dans les 2 réacteurs.

Dans le 3^e réacteur (traits pointillés clairs Figure IV-42), la consigne a été choisie à pH 3.0. En raison d'un léger décalage de la sonde, le pH du réacteur a été à pH 2.8 entre 50 et 100 h puis ce décalage a été corrigé pour maintenir un pH à 3.0 dans le réacteur. On a alors observé un arrêt complet de la croissance entre 50 et 100 h et une forte accumulation du sucre ajouté. Le débit d'alimentation a alors été diminué pour éviter une trop forte accumulation. Après la correction du pH du réacteur, la croissance a repris, et le sucre résiduel est redevenu nul (après 168 h). Malgré cela, la production de protéines est restée faible avec une vitesse spécifique de production de protéines de $6 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ en moyenne après 168 h.

En terme d'activité enzymatique, on observe un effet très prononcé du pH de consigne sur l'activité spécifique β -glucosidase, avec une activité 40% plus faible lors d'une culture à pH 3.5 que lors d'une culture à pH 4.0 (Figure IV-43 gauche). Deux hypothèses peuvent être proposées : d'une part l'induction ou la sécrétion de cette enzyme pourrait être modifiée par le pH de consigne, d'autre part, cette enzyme pourrait être moins stable et se désactiver plus rapidement à pH 3.5 qu'à pH 4.0. Une étude plus fondamentale de la stabilité de la β -glucosidase dans le temps à différents pH pourrait donc être nécessaire avant de choisir un pH de culture pour la phase de production. Dans tous les cas, l'utilisation de souches surexprimant l'activité β -glucosidase pourrait aussi être une solution pour limiter cet effet.

Concernant l'activité cellulase FP, on observe une légère baisse à pH 3.5, probablement due à la baisse de l'activité β -glucosidase du cocktail (Figure IV-43 droite), puisque ces deux activités sont corrélées.

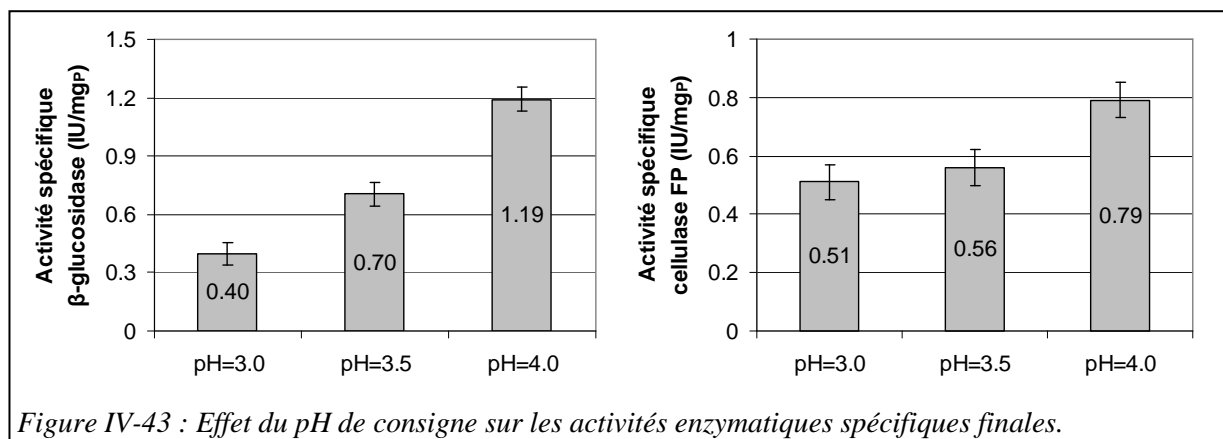


Figure IV-43 : Effet du pH de consigne sur les activités enzymatiques spécifiques finales.

Finalement, en termes de productivité en protéines, il est possible d'utiliser un pH de consigne de 3.5 pendant la phase de production (à condition de bien démarrer cette phase d'alimentation après consommation totale du glucose fourni pour la croissance, afin d'éviter une accumulation temporaire de sucres). Le cocktail enzymatique produit semble légèrement moins bon, mais une étude plus poussée permettrait peut-être d'affiner le choix de cette valeur de pH.

Ce résultat est une bonne nouvelle pour l'utilisation d'hydrolysats sucrés acides issus du prétraitement, qui pourraient éventuellement être utilisés (pour l'alimentation en fed-batch) sans stérilisation préalable, car à pH 3.5 le risque de contamination pendant la phase de production est très limité.

3.2 Effet de la teneur en CO₂ du gaz de sortie

3.2.1 Expérience au laboratoire

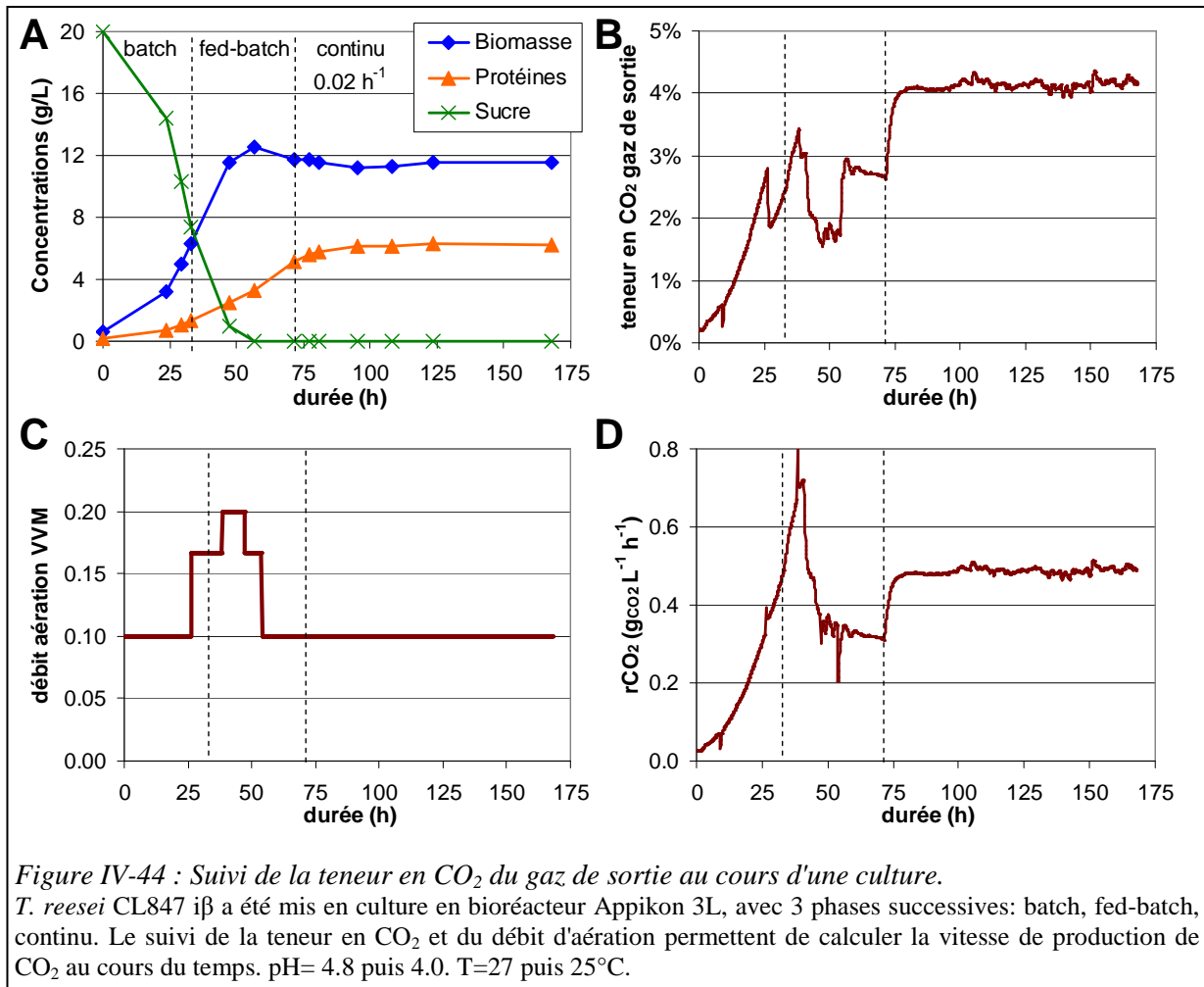
Une trop forte teneur en CO₂ dissous dans la phase liquide du réacteur pourrait inhiber les cellules de *T. reesei*, organisme aérobic strict. Pour tester cela, une culture de *T. reesei* CL847 iβ en bioréacteur Applikon 3L a été réalisée avec une faible aération (environ 0.1 VVM) afin d'obtenir de fortes teneurs en CO₂ dans le gaz de sortie. Trois phases successives ont été réalisées :

- 0 à 33 h : protocole batch sur 20 g_S/L de glucose pour réaliser la croissance (pH régulé à 4.8) ;
- 33 à 72 h : protocole fed-batch avec alimentation à un débit moyen de 2.66 mL L⁻¹ h⁻¹ par une solution de lactose de concentration S_{in}=180 g_S/L (soit un débit de sucre de 0.42 g_S L⁻¹ h⁻¹), avec pH régulé à 4.0 ;
- 72 à 168 h : protocole continu à taux de dilution 0.02 h⁻¹ avec une solution de milieu minéral et de lactose à S_{in}=45g_S/L (soit un débit de sucre de 0.72 g_S L⁻¹ h⁻¹), avec pH régulé à 4.0 ;

La teneur en CO₂ dans le gaz de sortie atteint 3% en fin de croissance, entre 2 et 3% pendant la phase fed-batch (selon le débit d'aération), puis 4% pendant la phase en continu (Figure IV-44 B).

Le suivi des concentrations (Figure IV-44 A) montre que le sucre résiduel reste bien nul à partir de 50 h, donc le métabolisme du lactose n'est pas ralenti par les fortes teneurs en CO₂ obtenues durant la phase en protocole continu. La vitesse spécifique de production de protéines se maintient entre la phase fed-batch et la phase continu, avec une valeur moyenne à 10.1 ± 0.5 mg_P g_X⁻¹ h⁻¹.

On peut donc conclure qu'au laboratoire, une teneur en CO₂ de 4% dans les gaz de sortie n'a pas eu d'impact sur le métabolisme de *T. reesei* en production de protéines.



3.2.2 Extrapolation

Lors de l'extrapolation à l'échelle industrielle, il est nécessaire de prendre en compte la hauteur du fermenteur.

En effet, au laboratoire, on peut considérer que le volume liquide est à pression atmosphérique. Alors les 4% de CO₂ dans la phase gazeuse, considérée homogène et en équilibre avec la phase liquide, se traduisent par une concentration maximale acceptable en CO₂ gazeux dissous dans la phase liquide de 64 mg/L (constante de Henry pour le CO₂: $k_H=29.41 \text{ atm}/(\text{mol/L})$).

Par ailleurs, aux faibles pH de consigne utilisés en phase de production, le CO₂ dissous ne se dissocie quasiment pas en bicarbonate et carbonate, donc il n'est pas nécessaire de tenir compte de cet effet.

Dans un fermenteur industriel (Figure IV-45), la hauteur de liquide peut dépasser 10 m, d'où une pression maximale de l'ordre de 2 atm, et une dissolution maximale de CO₂ potentiellement deux fois plus forte au fond de la cuve qu'au laboratoire. En première approche, on peut supposer que la phase gaz est homogène. Alors, la teneur maximale en CO₂ des gaz de sortie ne doit donc pas dépasser 2% (pour rester dans des conditions de concentration dissoute observées au laboratoire).

Selon le besoin en oxygène, on peut alors calculer le débit d'aération minimal à imposer pour ne pas dépasser cette teneur en CO₂. Le calcul montre que ce débit est de l'ordre de 0.50 VVM pour un fort besoin en oxygène (équivalent à un $K_L a$ minimal de 120 h⁻¹), et de l'ordre de 0.25 VVM pour un besoin en oxygène plus faible (équivalent à un $K_L a$ minimal de 60 h⁻¹) (Figure IV-45 bas droite).

La VVM minimale à appliquer sera donc à calculer plus précisément en fonction de la taille du fermenteur, et du besoin en oxygène dans le protocole de production choisi (voir Figure III-30 page 112).

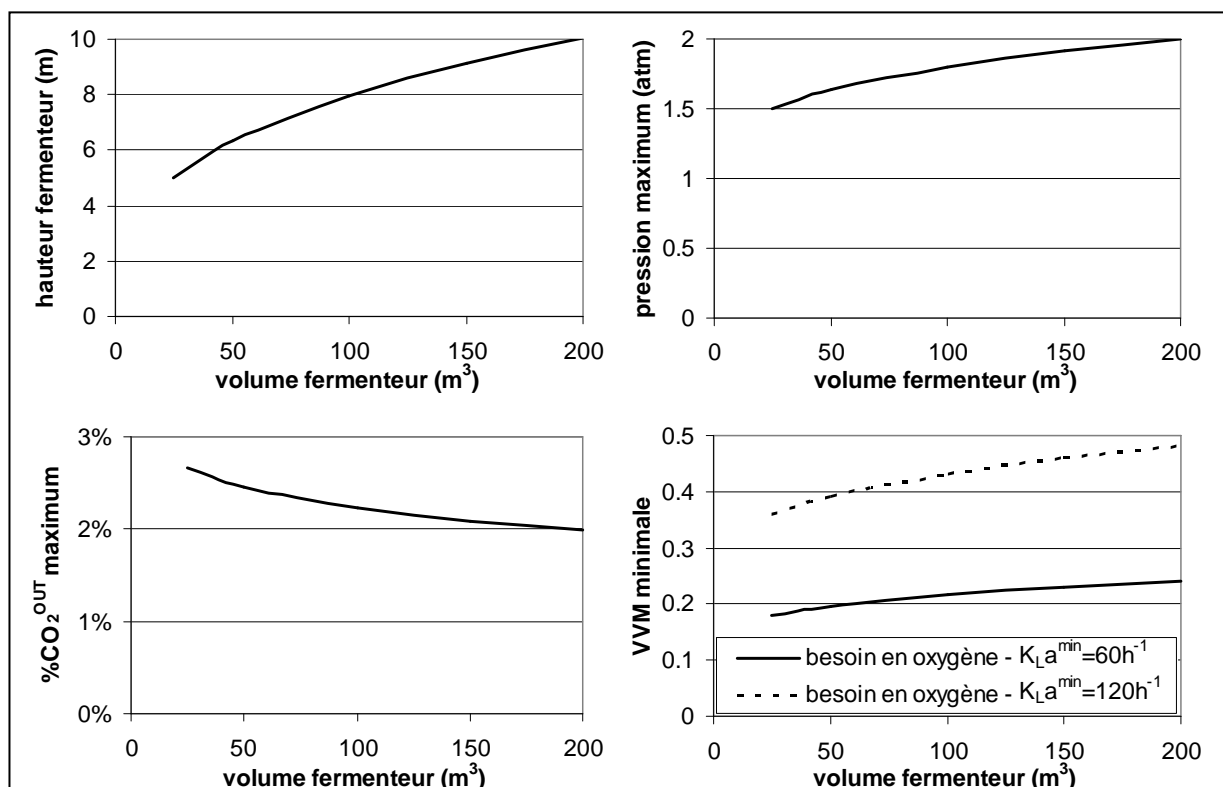


Figure IV-45 : Contraintes liées à la teneur en CO₂ pour l'extrapolation de l'aération.

Pour un fermenteur industriel de caractéristique H/D=2, le calcul de la hauteur donne la pression maximale au fond de la cuve, puis la teneur en CO₂ du gaz en sortie pour ne pas dépasser 64 mg/L de CO₂ dissous, et enfin la VVM minimale à imposer pour satisfaire cette contrainte, pour 2 hypothèses de besoin en oxygène (exprimé en $K_L a$ minimal équivalent, cf. III.3.1.2, page 98).

Pour une approche plus réaliste, on pourrait modéliser l'écoulement du gaz dans le réacteur avec un modèle piston (variation linéaire de la teneur en gaz entre le fond de la cuve et la sortie). Mais la concentration en CO₂ dissous dans la phase liquide va varier d'une part avec le transfert gaz-liquide, et d'autre part avec l'écoulement du liquide dans le réacteur dû à l'agitation. Pour une extrapolation réaliste, il sera donc aussi nécessaire de choisir un modèle simulant le mélange de la phase liquide dans le réacteur.

3.3 Effet de la concentration en oxygène dissous

3.3.1 Expérience au laboratoire

Lors d'une culture submergée, l'accès à l'oxygène est limité par sa diffusion à travers la membrane du microorganisme. Comme la vitesse de diffusion est corrélée avec la concentration en oxygène dissous de part et d'autre de la membrane, les faibles concentrations en oxygène dissous dans la phase liquide du réacteur risquent d'entraîner un ralentissement du métabolisme par manque d'oxygène. Comme *T. reesei* est aérobic strict, il n'y a pas de shift vers un métabolisme fermentaire.

Trois cultures ont été réalisées en parallèle selon le protocole fed-batch IFP Energies nouvelles afin d'investiguer l'effet de la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide, exprimée en pourcentage de la concentration à saturation.

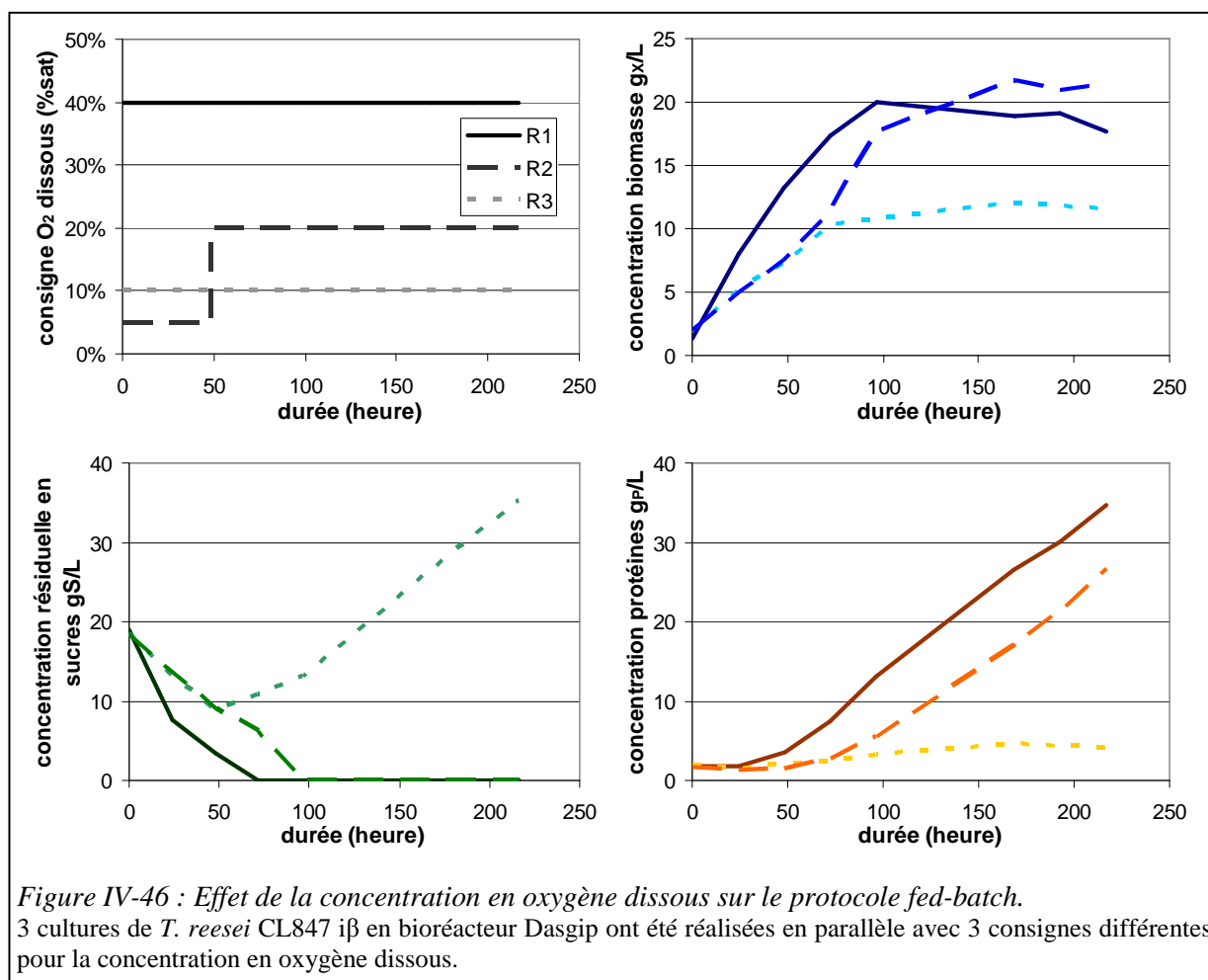
Dans le 1^{er} réacteur témoin (traits pleins sombres Figure IV-46), la consigne a été maintenue à 40% de la saturation. On observe un profil classique avec une concentration résiduelle en sucres nulle après 50 h, une concentration en biomasse qui se stabilise vers 20 g_x/L, et une production de protéines linéaire.

Dans le 3^e réacteur (traits pointillés clairs Figure IV-46), la consigne a été maintenue à 10% de la saturation. On observe un fort ralentissement de la croissance, alors même que la concentration en sucre n'est pas nulle, et une production de protéines extrêmement limitée. Cette concentration en oxygène dissous n'est donc pas suffisante pour fournir l'oxygène nécessaire aux cellules de *T. reesei*.

Dans le 2^e réacteur (traits hachés moyens Figure IV-46), la consigne était initialement à 5% de la saturation. Comme on observait un fort ralentissement de la croissance, identique à celui du 2^e réacteur, la consigne a été remontée à 20% après 50 h de culture. La croissance est alors repartit comme dans le réacteur témoin, avec stabilisation vers 20 g_x/L. La production de protéines a été retardée par la durée de croissance plus longue, mais on retrouve une vitesse spécifique de production de protéines semblable au 1^{er} réacteur, de l'ordre de 12 mg_p g_x⁻¹ h⁻¹. Ainsi, au cours de cette culture, une concentration en oxygène dissous égale à 20% de la concentration à saturation a été la limite inférieure à ne pas dépasser pour que les cellules de *T. reesei* ne soient pas en manque d'oxygène.

Au cours de ces 3 cultures, le mycélium était sous forme diffuse. Dans le cas défavorable où le mycélium formerait des "pellets", cette concentration limite en oxygène dissous serait probablement supérieure. De plus il y aurait aussi des problèmes de diffusion du sucre substrat et des protéines produites au sein de ces "pellets". Il a d'ailleurs été montré chez *Aspergillus niger* que la production de protéines se fait uniquement dans les mycelia libres et en surface des pellets, pas au centre des pellets (El-Enshasy et al., 2006). La formation de pellets est donc à éviter autant que possible (notamment en réalisant les ensemencements à forte concentration en biomasse)

On propose donc, pour l'échelle laboratoire, de considérer cette valeur de concentration en oxygène dissous égale à 20% de la concentration à saturation comme la valeur minimale à laquelle réaliser les cultures de *T. reesei*.



3.3.2 Extrapolation

A l'inverse du cas du CO₂ dissous, la grande hauteur des fermenteurs industriels va être favorable pour la concentration en oxygène dissous.

En effet, pour de l'air contenant 21% d'oxygène en équilibre avec de l'eau pure à 27°C, la concentration en oxygène dissous à saturation est de 8.2 mg/L à pression atmosphérique, et de 16.4 mg/L à 2 atm (cas du fond d'une cuve de 10 m de hauteur, voir Figure IV-45). Imposer une consigne de concentration en oxygène dissous à 20% de la saturation à pression atmosphérique équivaut donc à une consigne à 10% de la saturation pour le fond d'une cuve industrielle.

Ainsi, dans un fermenteur industriel, le transfert d'oxygène est plus fort au fond de la cuve qu'à la surface, en raison d'une part de la plus forte concentration saturante, et d'autre part de l'agitation. On conseille donc pour la régulation de la concentration en oxygène dissous d'utiliser une sonde de mesure placée en hauteur plutôt que dans le fond du fermenteur.

3.4 Effet du cisaillement dû à l'agitation

3.4.1 Expérience

Dans le cas présent d'une culture d'un microorganisme aérobic dans un réacteur liquide, la forte agitation nécessaire au transfert d'oxygène entraîne un cisaillement dans le réacteur qui pourrait endommager les cellules du microorganisme.

Le protocole utilisé pour tester cet effet a été proposé par Alvin Nienow et correspond à celui utilisé pour l'étude de *Aspergillus oryzae* (Amanullah et al., 1999). Il consiste à observer, en protocole continu, la modification de l'état stationnaire lors de la modification brutale de la vitesse d'agitation (toutes choses égales par ailleurs).

Ainsi le protocole choisi a été (après croissance en batch et démarrage de la production en fed-batch) une culture en continu avec un taux de dilution de 0.015 h^{-1} et une concentration en lactose de $20 \text{ g}_S/\text{L}$, qui donne en théorie (d'après le modèle cinétique Tableau III-15 page 97) des concentrations à l'équilibre de $5 \text{ g}_X/\text{L}$ de biomasse et $5 \text{ g}_P/\text{L}$ de protéines. La vitesse d'agitation initiale était de 500 rpm.

En raison de deux forts moussages, il n'a pas été possible d'obtenir un véritable état stationnaire pendant cette 1^{ère} phase à 500 rpm. En effet, la configuration du fermenteur fait que la mousse n'était pas cassée et s'accumulait au dessus du liquide. Comme les cellules de *T. reesei* sont hydrophobes, elles s'accumulent dans la mousse au détriment de la fraction liquide. Ainsi après le 2^e fort moussage, la vitesse d'agitation a été augmentée à 1200 rpm. A cette vitesse, la mousse s'accumulait moins dans le fermenteur, ce qui a permis d'obtenir des profils plus propres, mais jamais de véritable état stationnaire (Figure IV-47 A)

Les bilans carbonés pas intervalle sont corrects tout au long de la culture, et compris entre 80 et 100 %, ce qui permet d'avoir une bonne confiance dans les mesures et dans les calculs des vitesses spécifiques.

Il apparaît que le taux de croissance μ oscille autour de la valeur imposée par le taux de dilution 0.015 h^{-1} . La vitesse spécifique de production de protéines est comprise entre 15 et $20 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ pendant la phase initiale à 500 rpm, puis entre 10 et $15 \text{ mg}_P \text{ g}_X^{-1} \text{ h}^{-1}$ pendant la 2^e phase à 1200 rpm (Figure IV-47 B). Il semble donc que la forte hausse de la vitesse d'agitation ait eu un impact négatif sur la production de protéines.

En terme d'activité enzymatique β -glucosidase, elle augmente aussi bien en volumique qu'en spécifique après la modification de vitesse d'agitation (Figure IV-47 C). Il semble donc que les cellules produisent plus d'enzyme β -glucosidase à forte agitation, non seulement en relatif dans le cocktail, mais même en absolu.

Cependant, il est important de noter que la vitesse spécifique de production de protéines mesurée dans la 1^{ère} phase à 500 rpm est supérieure à toutes les autres mesures obtenues au cours de cette thèse. Soit cette caractéristique est particulière à la souche TR3012, utilisée pour la première fois ici dans le cadre de cette thèse, mais comme cette souche a été obtenue par modification génétique de la souche CL847 i β , il serait surprenant que l'ajout d'une β -glucosidase améliorée ait modifié sa capacité de production. Une autre hypothèse est que lors des expériences précédentes, le cisaillement était plutôt de l'ordre de celui observé ici à 1200 rpm, donc que l'on a toujours mesuré une vitesse spécifique de production de protéines limitée par le stress dû au cisaillement. Ceci pourrait expliquer pourquoi des vitesses spécifiques différentes ont été observées dans des expériences et fermenteurs différents, sans que l'on puisse pour l'instant faire de lien direct entre configuration de réacteur et productivité. On pourrait alors espérer augmenter la productivité en limitant le stress dû au cisaillement.

Dans tous les cas, une étude plus complète de l'effet du cisaillement semble nécessaire, mais elle nécessitera de trouver un dispositif expérimental fiable, qui puisse donner des résultats clairs sans être gêné par des problèmes de moussage. Dans l'idéal, réaliser une culture en colonne à bulles ou en airlift permettrait d'observer le comportement à cisaillement minimum. Ceci a été réalisé par (Ahamed and Vermette, 2010) mais leur protocole de culture (avec 50 g/L de cellulose) est trop éloigné de celui d'IFP Energies nouvelles pour pouvoir extrapoler leurs résultats.

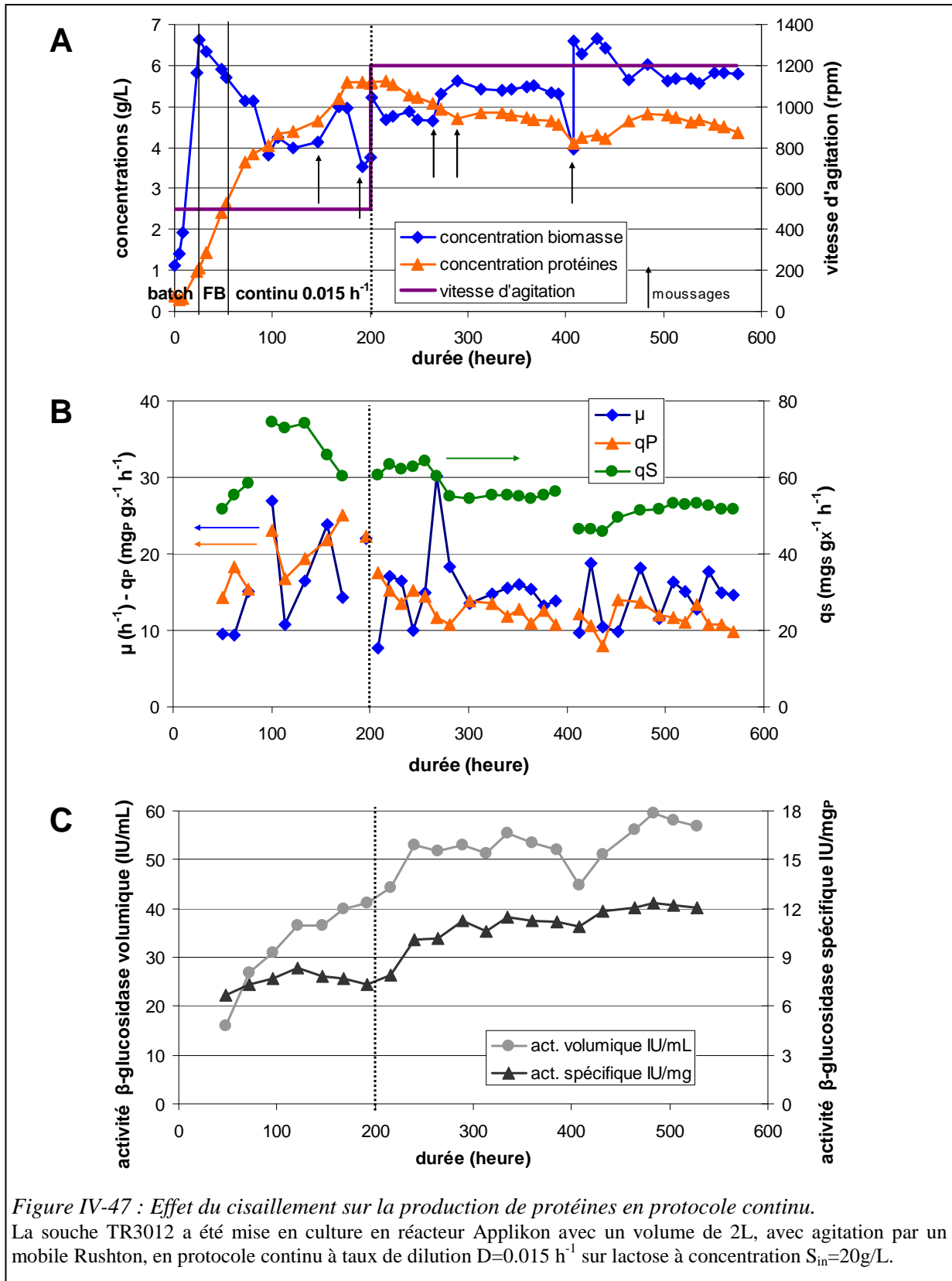


Figure IV-47 : Effet du cisaillement sur la production de protéines en protocole continu.

La souche TR3012 a été mise en culture en réacteur Applikon avec un volume de 2L, avec agitation par un mobile Rushton, en protocole continu à taux de dilution $D=0.015 \text{ h}^{-1}$ sur lactose à concentration $S_{in}=20\text{g/L}$.

3.4.2 Extrapolation

Le cisaillement moyen dans tout le fermenteur est plus faible à grande échelle qu'au laboratoire, donc ne sera pas un problème pour l'extrapolation.

En revanche, le cisaillement maximum, mesuré à proximité du mobile, va augmenter lors de l'extrapolation. Comme ce cisaillement maximum n'est pas mesurable directement (Gabelle, 2012), il

est souvent approximé par la vitesse en bout de pales. Bien que la vitesse d'agitation soit plus faible à l'échelle industrielle qu'au laboratoire, la taille des mobiles est beaucoup plus grande, donc la vitesse en bout de pale sera plus élevée.

Dans la configuration utilisée pour le test ci-dessus (mobile de diamètre 6cm), la vitesse en bout de pale était de 1.57 m/s à 500 rpm et de 3.77 m/s à 1200 rpm.

Pour un fermenteur industriel moyen (volume 100 m³, hauteur 10 m, diamètre 2.5 m, diamètre du mobile 1.25 m), une vitesse en bout de pale de 3.77 m/s sera atteinte pour une vitesse d'agitation de 57.5 rpm. Il faudrait alors calculer si cette vitesse d'agitation suffit pour le transfert d'oxygène. Sinon il sera nécessaire de réaliser des tests de résistance à plus forte vitesse en bout de pale, ou de trouver un compromis entre vitesse en bout de pale et transfert d'oxygène.

Dans tous les cas, le lien entre cisaillement maximum et vitesse en bout de pale n'a pas été établi et doit être considéré comme une hypothèse de travail. En effet, Amanullah et al. ont montré dans le cas de *Aspergillus oryzae* que les effets de l'agitation seraient plutôt corrélés avec une fonction "énergie dissipé / temps de circulation", qui représente en quelque sorte la durée pendant laquelle les cellules passent dans des zones de fort cisaillement (Amanullah et al., 1999).

3.5 Conclusion sur le changement d'échelle

Seuls les effets potentiels du changement d'échelle sur le métabolisme de *T. reesei* ont été étudiés.

Pour limiter les contaminations, le pH de la culture peut être baissé à 3.5 lors de la phase de production sans perte de vitesse de production, mais cela affecte l'activité β -glucosidase.

L'effet des teneurs en oxygène dissous et en CO₂ dissous a été étudié. Au laboratoire, une concentration en oxygène dissous égale à 20% de la saturation est nécessaire pour éviter les limitations, et une teneur en CO₂ de 4% dans les gaz de sortie n'a pas eu d'effet. Pour extrapoler ces résultats à l'échelle industrielle, il est nécessaire de prendre en compte la variation de pression selon la hauteur de la cuve. Cet effet est bénéfique pour l'oxygène dissous mais néfaste pour le CO₂.

Enfin, un premier test a été réalisé pour l'effet du cisaillement. Une légère baisse de la productivité a été observée à forte agitation. Néanmoins la productivité est restée correcte et semblable aux résultats classiques en laboratoire, ce qui est prometteur pour l'extrapolation.

Conclusion et perspectives

Le première étape de ce travail a été de caractériser la stœchiométrie des réactions conduisant à la production de biomasse cellulaire et d'enzymes sécrétées. L'étude a montré que la composition élémentaire de la biomasse et des protéines ne varie pas avec les conditions de culture, ce qui permet d'écrire les réactions de croissance et de production sous la forme d'équations stœchiométriques (dont les valeurs des coefficients dépendent d'une hypothèse sur le rendement de conversion du sucre substrat en produit). Comme ces équations mettent en jeu des espèces ioniques acide/base qui vont jouer sur le pH des solutions, les équations stœchiométriques ne sont pas suffisantes pour décrire complètement les réactions biologiques en présence. Un outil de simulation du pH a donc été développé et validé en dynamique pour des milieux de culture salins.

La stœchiométrie a été utilisée de façon classique pour vérifier la composition des milieux de culture, et calculer l'élément limitant. En croissance en fiole, l'élément limitant dans le milieu de culture classiquement utilisé à IFP Energies nouvelles est l'azote, ce qui peut être corrigé par un apport initial supérieur. Le choix du tampon pour le contrôle du pH est aussi un paramètre clé, trop souvent négligé. Pour cette étude le tampon phthalate habituellement utilisé à IFP Energies nouvelles a été conservé, mais il pourrait être intéressant de tester d'autres composés tampons. Dans ce cas, il sera très important de bien séparer l'effet dû à la nature chimique du tampon (consommation, induction) de l'effet dû à son pouvoir tampon (stabilisation du pH), ce qui est rarement fait dans la littérature. De même, vouloir corrélérer la production d'enzymes en fioles avec le composé tampon utilisé est une chose périlleuse car trop d'effets se conjuguent (par exemple variation de pH, quantité de biomasse) et dans tous les cas n'est pas extrapolable à un procédé en bioréacteur à pH contrôlé.

Pour permettre des productions de protéines en fioles qui soient extrapolables, la stœchiométrie a été utilisée pour miniaturiser le protocole fed-batch classiquement réalisé en bioréacteur. En effet, le mélange stœchiométrique du sucre et de la base azotée dans une seule solution alimentée en fed-batch permet de lever la limitation en azote, et de stabiliser le pH. Aucune sonde de pH ni pompe supplémentaire n'est nécessaire, ce qui rend possible une parallélisation des études en fioles avec un matériel minimum. Sur lactose pur, on retrouve en fiole les vitesses spécifiques de production obtenues en bioréacteur, donc ce protocole peut être utilisé en dernière étape de sélection pour des clones issus d'un travail de génie génétique. Cependant, comme le microorganisme ne réagit pas forcément exactement comme la stœchiométrie prévue dans le mélange d'alimentation (par exemple en faisant de la croissance plutôt que de la production), le pH peut varier et il est donc nécessaire de conserver un tampon de pH dans le milieu. Il pourrait être intéressant de tester d'autres tampons pour améliorer encore la robustesse de la stabilisation du pH.

En bioréacteur en fed-batch, l'élément limitant est le soufre ou l'azote (selon les proportions initiales de chacun), et ce malgré l'apport d'azote par la base pour le contrôle du pH. Une étude théorique a montré que ceci peut être corrigé en acidifiant la solution du fed-batch par un apport stœchiométrique d'acide sulfurique, qui agit d'une part comme source de soufre, d'autre part pour augmenter l'apport d'azote basique. Cette option a été validée expérimentalement et est fortement conseillée pour éviter les limitations lors de la conduite en fed-batch.

La stœchiométrie peut également être utilisée pour améliorer le suivi en ligne des cultures, voire pour créer des capteurs numériques. Les équations stœchiométriques montrent que les échanges gazeux sont semblables en croissance et en production. L'analyse des gaz en continu ne peut donc pas être utilisée comme capteur en ligne du métabolisme. En revanche, le ratio C/N est très différent dans la biomasse et dans les protéines sécrétées (8.0% et 12.7% respectivement), et il pourrait théoriquement être utilisé comme capteur. Pour cela, il est nécessaire de connaître la part de carbone transformé en biomasse ou produit : ceci est possible en phase de limitation carbone, par différence entre le carbone injecté par le fed-batch (à débit fixé) et le carbone transformé en CO₂ (mesuré dans les gaz). D'autre part, il est nécessaire de connaître la quantité d'azote fixé, ce qui est beaucoup moins facile car bien que l'azote apporté par la base pour la régulation du pH soit mesurable, la concentration en ammonium dans le liquide varie et n'est pas mesurable en ligne. Une idée intéressante à développer

serait d'utiliser une sonde de conductivité pour suivre en continu la consommation des différentes espèces ioniques, ce qui est possible car le milieu de culture est un milieu salin parfaitement défini. En couplant cette mesure avec l'analyse des gaz et le suivi de la consommation de base, on pourrait potentiellement créer un capteur numérique du métabolisme instantané (croissance ou production de protéines).

Enfin la stœchiométrie des réactions a été d'une grande aide pour l'analyse des cultures en bioréacteur. En effet, le calcul du bilan carbone permet de valider la qualité des mesures expérimentales. Il peut aussi être utilisé comme critère de minimisation pour calculer précisément les vitesses spécifiques de production de biomasse et de protéines au cours de la culture. Pour cela, une nouvelle méthode mathématique pour le traitement des résultats expérimentaux a été développée et implémentée sous Matlab. Cette méthode pourrait encore être améliorée en y ajoutant une analyse statistique qui donnerait un intervalle de confiance sur le calcul des vitesses spécifiques (par exemple en testant de nombreuses combinaisons de poids relatifs accordés aux différents paramètres du critère de minimisation). Ceci nécessite probablement de revoir l'implémentation de l'algorithme sous Matlab pour améliorer le temps de calcul.

L'utilisation de cet algorithme pour l'analyse de plusieurs cultures en fed-batch sur lactose a permis de décrire avec précision le métabolisme aux très faibles taux de croissance (entre 0 et 0.02 h^{-1}), ce qui n'avait pas été fait auparavant. Un métabolisme inattendu a été observé, avec une limitation de la production de protéines, non pas par la consommation du lactose, mais par la synthèse ou la sécrétion des protéines, avec une redirection du flux de sucre supplémentaire vers la croissance des cellules. Ce métabolisme a été modélisé par des équations simples, et le modèle résultant a été validé avec des données issues de la littérature. Les valeurs des paramètres du modèle (rendements maximum et maintenance) sont identiques pour différentes souches de *T. reesei* hyperproductrices de cellulases.

Au cours de cette étude, il a été noté que la vitesse spécifique de production de protéines (maximisée par l'induction et la limitation en carbone) peut varier selon les souches, voire selon les conditions de culture, sans que l'on ait trouvé de corrélation. Heureusement, cette vitesse maximum ne dépend pas du taux de croissance de la biomasse, ni du mode de culture (fed-batch ou continu), ce qui facilitera grandement des études plus poussées pour comprendre l'impact des conditions de culture (pH, température, cisaillement, ...). En effet, on ne sera plus obligé de réaliser les études en fed-batch avec un traitement mathématique poussé, mais on pourra par exemple regarder en protocole continu la modification d'un état stationnaire lors du changement d'un paramètre de culture.

Selon cette étude, la production n'est pas limitée par le métabolisme du sucre, ni par les mécanismes d'induction, mais par la synthèse et/ou la sécrétion des protéines. L'étude ne permet pas de trancher entre ces 2 étapes, mais comme la biomasse contient elle aussi des protéines et que la synthèse associée n'est pas négligeable devant la synthèse des protéines sécrétées, il serait plus logique que la production soit limitée par la sécrétion des protéines (ou alors par la synthèse des cellulases et autres protéines sécrétées). Cette conclusion est à prendre avec précaution car les protéines intracellulaires et sécrétées ont des compositions différentes. Dans tous les cas, ce résultat ouvre de nouvelles voies d'études, par exemple la mesure des concentrations intracellulaires des métabolites intermédiaires impliqués dans la synthèse des protéines permettrait peut être de repérer une voie métabolique limitante pour la synthèse des protéines.

Le modèle cinétique résultant de l'étude du métabolisme a été validé en dynamique avec des données issues d'une autre culture en fed-batch, puis utilisé pour comparer par simulation différents protocoles de production. Cette étude théorique a démontré le grand avantage du protocole continu à très faible taux de dilution qui combine la bonne productivité obtenue en continu classique (par une utilisation maximale du volume disponible dans le réacteur) et le fort rendement obtenu en fed-batch (car la croissance est très faible), le tout avec une demande en oxygène faible comme en fed-batch. Ce protocole a été exploré dans un autre projet à IFPEN et a permis d'aboutir à des résultats analogues aux prédictions du modèle avec des substrats industriels (communication de F. Ben Chaabane). Par ailleurs, en poussant ce raisonnement à l'extrême, le meilleur protocole pourrait être un continu avec recyclage de la biomasse. Cette idée a déjà été testée par le passé à IFP Energies nouvelles et a été un échec en raison du colmatage des unités de filtration. Un tel protocole nécessiterait donc des études poussées des techniques de filtration pour le recyclage des micro-organismes filamenteux.

Après cette étude du métabolisme sur lactose pur, des études sur des milieux synthétiques ont permis de tester l'intégration du protocole de production dans une bioraffinerie lignocellulosique, qui permettra l'utilisation des hydrolysats de biomasse lignocellulosique comme substrat. L'étude des composés de dégradation présents dans ces hydrolysats a montré le fort pouvoir inhibiteur de l'acide acétique et de la *p*-benzoquinone, et dans une moindre mesure du furfural et de la vanilline, sur la croissance de *T. reesei*. En particulier, il est nécessaire de réaliser la croissance à pH 6.0 si on veut utiliser comme source de carbone des hydrolysats contenant de l'acide acétique. En phase de production avec alimentation par une solution contenant ces inhibiteurs, aucun impact significatif n'a été observé sur la vitesse de production ou la composition des cocktails. Dans les deux cas, des études complémentaires en bioréacteur sont nécessaires pour valider les concentrations limites déterminées en fiole.

Par ailleurs, pour pouvoir exploiter ces résultats dans le cas d'hydrolysats réels, de gros progrès sont à réaliser pour le dosage de ces composés dans une matrice complexe comme celle des hydrolysats réels. En particulier, la *p*-benzoquinone a une concentration inhibitrice très faible et n'a pas pu être dosée à IFP Energies nouvelles, même dans un milieu synthétique. On pourra alors réaliser des tests avec des hydrolysats réels et peut être trouver des corrélations entre la composition d'un hydrolysats et son utilisation par *T. reesei*, ce qui n'a pas pu être fait à partir des quelques analyses disponibles pour l'instant.

L'effet (sur la phase de production en limitation carbone) des mélanges de sucres présents dans les hydrolysats a ensuite été testé avec le nouveau protocole en fiole alimentée. Cette étude a montré que la teneur en lactose dans l'alimentation peut être diminuée jusqu'à 15% voire 8% (des sucres totaux) sans baisse significative de la productivité. En revanche, les teneurs en xylose et glucose ont une grande influence sur les activités enzymatiques β -glucosidase et xylanase, avec des effets antagonistes. Le test des cocktails produits pour l'hydrolyse de biomasse lignocellulosique prétraitée n'a pas montré de corrélation entre activité xylanase et hydrolyse de la cellulose, car cette dernière était limitée par l'activité β -glucosidase.

Toute cette étude a été réalisée avec une souche hyperproductrice obtenue par mutagenèse aléatoire. Depuis, de nouvelles souches ont été obtenues par génie génétique, qui surexpriment la β -glucosidase native ou une version améliorée. Il serait très intéressant de tester ces souches dans un plan de mélange semblable pour voir comment une modification génétique ciblée peut modifier le profil des cocktails enzymatiques produits. De plus, les cocktails produits par ces souches ne sont pas limités par la β -glucosidase en hydrolyse, donc d'autres effets pourraient être observés quant aux enzymes limitantes.

Dans tous les cas, seules trois activités enzymatiques ont été mesurées sur les cocktails produits. On ne peut exclure l'existence d'effets plus fins qui n'ont pas été observés, par exemple une modification des ratios entre les différentes cellulases. De plus, les activités cellulase et xylanase sont des mesures globales qui ne décrivent pas certaines actions enzymatiques spécifiques. Pour tester cette hypothèse, plusieurs options sont possibles. D'une part, on pourrait développer d'autres méthodes de dosage spécifiques de certaines activités (endoglucanases, arabinofuranosidase, ...) mais la mise au point de ces méthodes peut être fastidieuse. D'autre part, on pourrait réaliser des électrophorèses 2D pour quantifier rapidement la quantité de chaque enzyme présente dans le cocktail (Herpoel-Gimbert et al., 2008), mais cette quantification massive n'est pas forcément proportionnelle à l'activité et ne donne pas de valeur d'activité dans le cocktail. Ces deux approches sont donc complémentaires pour mieux décrire les cocktails produits par *T. reesei* (aussi bien en fiole qu'en réacteur), ce qui pourrait permettre d'identifier des activités importantes pour l'hydrolyse.

Comme le coût associé à l'achat du lactose est encore élevé, deux stratégies plus exploratoires ont été testées pour fournir d'autres composés inducteurs de la production de cellulases. L'extraction du sophorose produit par *Candida bombicola* dans les sophorolipides est la plus logique car le sophorose est connu pour être un très bon inducteur. Cette idée nécessite encore de nombreuses études pour extrapoler l'extraction du sophorose à moindre coût. La seconde idée, synthétiser des inducteurs en inversant la réaction enzymatique de la β -glucosidase, paraît applicable plus facilement dans une bioraffinerie lignocellulosique car n'utilise que des composés déjà présents dans l'usine. Des

développements supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour valider la faisabilité technique et l'intérêt économique de cette étape d'oligomérisation, ainsi que sa protection par brevet.

En parallèle, il a été remarqué que l'utilisation d'inducteur synthétisé par voie enzymatique permet de diminuer la dose d'inducteur au moins jusqu'à 2.5%, car le mélange d'oligosaccharides obtenu contient du sophorose. Il serait donc très intéressant de tester l'induction par ce mélange (ou par du sophorose extrait des sophorolipides) à des teneurs encore plus faibles, ce qui permettrait de diminuer encore le coût dû à l'inducteur dans le protocole de production. Par ailleurs, il faudra vérifier si l'induction est maintenue quand on utilise des hydrolysats réels plutôt que des sucres synthétiques.

L'extrapolation d'un protocole de production à l'échelle industrielle est une étape clé dans le développement d'un procédé, et plusieurs études ont été menées sur cet aspect, en restant focalisé sur le métabolisme plutôt que sur des problématiques de génie chimique, traitées dans une thèse réalisée en parallèle (Gabelle, 2012). Pour limiter les risques de contaminations, le pH peut être diminué à 3.5 en phase de production, à condition de bien rester en limitation de carbone. Les effets de l'O₂ et du CO₂ dissous ont été étudiés, et une concentration minimale en oxygène dissous est à maintenir pour éviter les limitations du métabolisme par l'oxygène. Cette étude est à compléter car les hypothèses utilisées en première approche (réacteur parfaitement mélangé et phase gazeuse homogène) ne sont pas vérifiées à grande échelle. Enfin, une première étude de l'impact du cisaillement a montré une bonne tenue du microorganisme à forte agitation, mais avec une production potentiellement encore légèrement supérieure à plus faible cisaillement. L'effet du cisaillement doit être étudié plus en détail, tout en gardant à l'esprit que cet effet est potentiellement plus fort au laboratoire qu'à l'échelle industrielle, et que les problèmes associés seront minimisés lors de l'extrapolation.

En conclusion, les travaux menés au cours de cette thèse ont fait progresser de façon substantielle le modèle de connaissance du métabolisme de *T. reesei*, en particulier de ses capacités de production de cellulases, et les modèles développés sont des outils d'aide rationnelle à la définition d'un protocole de production de cellulases intégré dans une bioraffinerie lignocellulosique. Les options de conduite résultant des modèles ou proposées au cours de ces travaux devront désormais être validées à l'échelle industrielle, et avec l'utilisation d'hydrolysats réels, par exemple sur le pilote construit pour réaliser les études du projet Futurol.

Références

- Ahamed A and Vermette P (2008a) **Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions.** *Biochemical Engineering Journal* 40, 3, p. 399-407.
- Ahamed A and Vermette P (2008b) **Enhanced enzyme production from mixed cultures of *Trichoderma reesei* RUT-C30 and *Aspergillus niger* LMA grown as fed batch in a stirred tank bioreactor.** *Biochemical Engineering Journal* 42, 1, p. 41-46.
- Ahamed A and Vermette P (2010) **Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor.** *Biochemical Engineering Journal* 49, 3, p. 379-387.
- Ajisaka K, Nishida H, and Fujimoto H (1987) **The Synthesis of Oligosaccharides by the Reversed Hydrolysis Reaction of Beta-Glucosidase at High Substrate Concentration and at High-Temperature.** *Biotechnology Letters* 9, 4, p. 243-248.
- Akin, H (2008) **Evolution du pH pendant la fermentation alcoolique de moûts de raisins : modélisation et interprétation métabolique.** Thèse de doctorat (INP Toulouse).
- Allen AL and Andreotti RE (1982) **Cellulase Production in Continuous and Fed-Batch Culture by *Trichoderma-Reesei* Mcg80.** *Biotechnology and Bioengineering Symposium* 12, 4, p. 451-459.
- Allen AL and Mortensen RE (1981) **Production of Cellulase from *Trichoderma reesei* in Fed-Batch Fermentation from Soluble Carbon-Sources.** *Biotechnology and Bioengineering* 23, 11, p. 2641-2645.
- Almeida JRM, Modig T, Petersson A, Hahn-Hagerdal B, Liden G, and Gorwa-Grauslund MF (2007) **Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*.** *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82, 4, p. 340-349.
- Alriksson B, Cavka A, and Jonsson LJ (2011) **Improving the fermentability of enzymatic hydrolysates of lignocellulose through chemical in-situ detoxification with reducing agents.** *Bioresource Technology* 102, 2, p. 1254-1263.
- Amanullah A, Blair R, Nienow AW, and Thomas CR (1999) **Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*.** *Biotechnology and Bioengineering* 62, 4, p. 434-446.
- Andersen MR, Nielsen ML, and Nielsen J (2008) **Metabolic model integration of the bibliome, genome, metabolome and reactome of *Aspergillus niger*.** *Molecular Systems Biology* 4:178.
- Aro N, Pakula T, and Penttila M (2005) **Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi.** *Fems Microbiology Reviews* 29, 4, p. 719-739.
- Ayrinhac C, Margeot A, Ferreira NL, Ben Chaabane F, Monot F, Ravot G, Sonet JM, and Fourage L (2011) **Improved Saccharification of Wheat Straw for Biofuel Production Using an Engineered Secretome of *Trichoderma reesei*.** *Organic Process Research & Development* 15, 1, p. 275-278.
- Bader J, Klingspohn U, Bellgardt KH, and Schugerl K (1993) **Modeling and Simulation of the Growth and Enzyme-Production of *Trichoderma reesei* Rut C30.** *Journal of Biotechnology* 29, 1-2, p. 121-135.
- Bailey MJ and Tahtiharju J (2003) **Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy.** *Applied Microbiology and Biotechnology* 62, 2-3, p. 156-162.

- Ballerini D, Desmarquest JP, Pourquie J, Nativel F, and Rebeller M (1994) **Ethanol Production from Lignocellulosics: Large Scale Experimentation and Economics**. *Bioresource Technology* 50, 1, p. 17-23.
- Coradetti ST, Craig JP, Xiong Y, Shock T, Tian CG, and Glass NL (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* 109, 19, p. 7397-7402.
- Dalal, P (1989) **Etude physiologique et cinétique de la production des enzymes cellulolytiques chez *Trichoderma reesei* en culture continue**. Thèse de doctorat (Université de Paris-sud - Centre d'Orsay).
- Dashtban M, Maki M, Leung KT, Mao C, and Qin W (2010) **Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison**. *Critical Reviews in Biotechnology* 30, 4, p. 302-309.
- Davies CW (1962) **Ion Association**. Butterworths, Washington. VIII - 190 p.
- Davila, A-M (1993) **Production par fermentation et structures chimiques d'une famille de biosurfactants : les sophorolipides de *Candida bombicola***. Thèse de doctorat (Université de Provence Aix-Marseille I).
- Domingues FC, Queiroz JA, Cabral JMS, and Fonseca LP (2000) **The influence of culture conditions on mycelial structure and cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C-30**. *Enzyme and Microbial Technology* 26, 5-6, p. 394-401.
- Durand H, Baron M, Calmels T, and Tiraby G (1988a) **Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains**. In: FEMS Symposium n°43: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation, p. 135-151. (Aubert J-P, Beguin P, and Millet J, Eds). Academic Press, London.
- Durand H, Clanet M, and Tiraby G (1988b) **Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production**. *Enzyme and Microbial Technology* 10, 6, p. 341-346.
- Edwards J, Foody B, and Munkvold G (2009) **Method for cellulase production**. Iogen Energy Corporation, brevet international n° WO 2009/026716 A1.
- Edwards R, Mahieu V, Griesemann J-C, Larive J-F, and Rickeard D (2006) **Well-to-wheels analysis of future automotive fuels and powertrains in the European context**. WTT Report 030506. New York, Society of Automotive Engineers. SAE transactions.
- El-Enshasy H, Kleine J, and Rinas U (2006) **Agitation effects on morphology and protein productive fractions of filamentous and pelleted growth forms of recombinant *Aspergillus niger***. *Process Biochemistry* 41, 10, p. 2103-2112.
- England G, Kelley A, and Mitchinson C (2002) **Induction Of Gene Expression Using A High Concentration Sugar Mixture**. Genencor International Inc, brevet international n° WO 2004/035070 A1.
- Fei Q, Chang HN, Shang L, Choi JJ, Kim N, and Kang J (2011) **The effect of volatile fatty acids as a sole carbon source on lipid accumulation by *Cryptococcus albidus* for biodiesel production**. *Bioresource Technology* 102, 3, p. 2695-2701.
- Ferreira SMP, Duarte AP, Queiroz JA, and Domingues FC (2009) **Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production**. *Electronic Journal of Biotechnology* 12, 3:6.
- Gabelle, JC (2012) **Analyse locale et globale de l'hydrodynamique et du transfert de matière dans des milieux à rhéologie complexe caractéristiques des milieux de fermentation**. Thèse de doctorat (Université de Toulouse).
- Gabelle JC, Augier F, Carvalho A, Rousset R, and Morchain J (2011) **Effect of Tank Size on K(L)A and Mixing Time in Aerated Stirred Reactors with Non-Newtonian Fluids**. *Canadian Journal of Chemical Engineering* 89, 5, p. 1139-1153.

- Gabelle JC, Jourdir E, Licht RB, Ben Chaabane F, Henaut I, Morchain J, and Augier F (2012) **Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors.** Chemical Engineering Science 75, p. 408-417.
- Gaunt DM, Trinci APJ, and Lynch JM (1984) **Metal-ion composition and physiology of *Trichoderma reesei* grown on a chemically defined medium prepared in 2 different ways.** Transactions of the British Mycological Society 83, 4, p. 575-581.
- Ghose TK (1987) **Measurement of cellulase activities.** Pure and Applied Chemistry 59, 2, p. 257-268.
- Gusakov AV (2011) **Alternatives to *Trichoderma reesei* in biofuel production.** Trends in Biotechnology 29, 9, p. 419-425.
- Harima T and Humphrey AE (1980) **Estimation of *Trichoderma Qm 9414* Biomass and Growth-Rate by Indirect Means.** Biotechnology and Bioengineering 22, 4, p. 821-831.
- Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, Keweloh H, and Debont JAM (1994) **Mechanisms of Resistance of Whole Cells to Toxic Organic-Solvents.** Trends in Biotechnology 12, 10, p. 409-415.
- Hendy NA, Wilke CR, and Blanch HW (1984) **Enhanced Cellulase Production in Fed-Batch Culture of *Trichoderma reesei* C30.** Enzyme and Microbial Technology 6, 2, p. 73-77.
- Hermann WA (2006) **Quantifying global exergy resources.** Energy 31, 12, p. 1685-1702.
- Herpoel-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Molle D, Lignon S, Mathis H, Sigoillot JC, Monot F, and Asther M (2008) **Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains.** Biotechnology for Biofuels 1:18.
- Herrero AA, Gomez RF, Snedecor B, Tolman CJ, and Roberts MF (1985) **Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acids: a mechanism based on uncoupling by weak acids.** Applied Microbiology and Biotechnology 22, 1, p. 53-62.
- Hui JPM, White TC, and Thibault P (2002) **Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*.** Glycobiology 12, 12, p. 837-849.
- Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, and Dudgeon D (2011) **Process Design and Economics for Biochemical Conversion of Lignocellulosic Biomass to Ethanol: Dilute-Acids Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover.** NREL Report n° TP-5100-47764.
- Jourdir E, Poughon L, Larroche C, Monot F, and 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 11:70.
- Juhasz T, Egyhazi A, and Reczey K (2005a) **beta-glucosidase production by *Trichoderma reesei*.** Applied Biochemistry and Biotechnology 121, 1-3, p. 243-254.
- Juhasz T, Szengyel Z, Reczey K, Siika-Aho M, and Viikari L (2005b) **Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources.** Process Biochemistry 40, 11, p. 3519-3525.
- Juhasz T, Szengyel Z, Szijarto N, and Reczey K (2004) **Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30.** Applied Biochemistry and Biotechnology 113, 1-3, p. 201-211.
- Kazi FK, Fortman JA, Anex RP, Hsu DD, Aden A, Dutta A, and Kothandaraman G (2010) **Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover.** Fuel 89, Supplement 1, p. S20-S28.
- Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA, and Blanch HW (2012) **The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels.** Biotechnology and Bioengineering 109, 4, p. 1083-1087.
- Kuhls K, Lieckfeldt E, Samuels GJ, Kovacs W, Meyer W, Petrini O, Gams W, Borner T, and Kubicek CP (1996) **Molecular evidence that the asexual industrial fungus *Trichoderma reesei* is a**

- clonal derivative of the ascomycete *Hypocrea jecorina*.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 93, 15, p. 7755-7760.
- Lange HC and Heijnen JJ (2001) **Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*.** Biotechnology and Bioengineering 75, 3, p. 334-344.
- Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, and Jonsson LJ (1999) **Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce.** Applied Biochemistry and Biotechnology 77, 1-3, p. 91-103.
- Lo CM and Ju LK (2009) **Sophorolipids-induced cellulase production in cocultures of *Hypocrea jecorina* Rut C30 and *Candida bombicola*.** Enzyme and Microbial Technology 44, 2, p. 107-111.
- Lo CM, Zhang Q, Callow NV, and Ju LK (2010a) **Cellulase production by continuous culture of *Trichoderma reesei* Rut C30 using acid hydrolysate prepared to retain more oligosaccharides for induction.** Bioresource Technology 101, 2, p. 717-723.
- Lo CM, Zhang Q, Callow NV, and Ju LK (2010b) **Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate.** Process Biochemistry 45, 9, p. 1494-1503.
- Lonchamp D and Thery M (1985) **Production de cellulases par culture de *Trichoderma reesei*. Rapport n°1 : Exploitation des résultats des campagnes pilotes 1984-1985.** Rapport IFP Energies nouvelles Réf. 33670.
- Lonchamp D and Thery M (1987) **Production de cellulases par culture de *Trichoderma reesei*. Rapport n°2 : Exploitation des résultats de laboratoire et des essais pilotes 1985-1986.** Rapport IFP Energies nouvelles Réf. 34906.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RJ (1951) **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** Journal of Biological Chemistry 193, 1, p. 265-275.
- Mandels M, Parrish FW, and Reese ET (1962) **Sophorose as an inducer of cellulase in *Trichoderma viride*.** Journal of Bacteriology 83, 2, p. 400-408.
- Mandels M and Weber J (1969) **The Production of Cellulases.** In: Cellulases and Their Applications, p. 391-414. (Reese ET and Hajny GJ, Eds). American Chemical Society.
- Maras M, DeBruyn A, Schraml J, Herdewijn P, Claeysens M, Fiers W, and Contreras R (1997) **Structural characterization of N-linked oligosaccharides from cellobiohydrolase I secreted by the filamentous fungus *Trichoderma reesei* RUTC 30.** European Journal of Biochemistry 245, 3, p. 617-625.
- Mussatto SI and Roberto IC (2004) **Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review.** Bioresource Technology 93, 1, p. 1-10.
- Muthuvelayudham R and Viruthagiri T (2006) **Fermentative production and kinetics of cellulase protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw.** African Journal of Biotechnology 5, 20, p. 1873-1881.
- Muthuvelayudham R and Viruthagiri T (2007) **Optimization and modelling of cellulase protein from *Trichoderma reesei* Rut C30 using mixed substrate.** African Journal of Biotechnology 6, 1, p. 41-46.
- Nicholson C, Foody BP, Malloch EL, and Balon J (1989) 7th Canadian Bioenergy R&D Seminar.
- Nielsen J (1993) **A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms.** Biotechnology and Bioengineering 41, 7, p. 715-727.
- Pakula TM, Salonen K, Uusitalo J, and Penttilä M (2005) **The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*.** Microbiology 151, 1, p. 135-143.

- Palmqvist E and Hahn-Hagerdal B (2000a) **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification.** *Bioresource Technology* 74, 1, p. 17-24.
- Palmqvist E and Hahn-Hagerdal B (2000b) **Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition.** *Bioresource Technology* 74, 1, p. 25-33.
- Philippidis GP (1994) **Cellulase Production Technology.** In: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, p. 188-217. (Himmel M, Baker JO, and Overend RP, Eds). American Chemical Society.
- Pourquie J, Warzywoda M, Chevron F, They D, Lonchamp D, and Vandecasteele JP (1988) **Scale up of cellulase production and utilization.** In: *FEMS Symposium n°43: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*, p. 71-86. (Aubert J-P, Beguin P, and Millet J, Eds). Academic Press, London.
- Puget J-L, Blanchet R, Salençon J, and Carpentier A (2010) **Le changement climatique.** Rapport de l'Académie des sciences du 26 octobre 2010.
- Qing Q, Yang B, and Wyman CE (2010) **Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes.** *Bioresource Technology* 101, 24, p. 9624-9630.
- Qing Q and Wyman C (2011) **Supplementation with xylanase and beta-xylosidase to reduce xylo-oligomer and xylan inhibition of enzymatic hydrolysis of cellulose and pretreated corn stover.** *Biotechnology for Biofuels* 4:18.
- Singhania RR, Sukumaran RK, Patel AK, Larroche C, and Pandey A (2010) **Advancement and comparative profiles in the production technologies using solid-state and submerged fermentation for microbial cellulases.** *Enzyme and Microbial Technology* 46, 7, p. 541-549.
- Sipos B, Benko Z, Dienes D, Reczey K, Viikari L, and Siika-Aho M (2010) **Characterisation of Specific Activities and Hydrolytic Properties of Cell-Wall-Degrading Enzymes Produced by *Trichoderma reesei* Rut C30 on Different Carbon Sources.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 161, 1-8, p. 347-364.
- Smith MP and Coward-Kelly G (2008) **Production of Cellulases.** *Novozymes, brevet américain n° US 2008/0199908 A1.*
- Stricker AR, Mach RL, and de Graaff LH (2008) **Regulation of transcription of cellulases- and hemicellulases-encoding genes in *Aspergillus niger* and *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*).** *Applied Microbiology and Biotechnology* 78, 2, p. 211-220.
- Suto M and Tomita F (2001) **Induction and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi.** *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92, 4, p. 305-311.
- Szengyel Z and Zacchi G (2000) **Effect of acetic acid and furfural on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 89, 1, p. 31-42.
- Tholudur A, Ramirez WF, and McMillan JD (1999) **Mathematical modeling and optimization of cellulase protein production using *Trichoderma reesei* RL-P37.** *Biotechnology and Bioengineering* 66, 1, p. 1-16.
- Tolan J and Foody B (1999) **Cellulase from Submerged Fermentation.** In: *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, p. 41-67. (Tsao G, Ed). Springer, Berlin.
- Tredici MR (2010) **Photobiology of microalgae mass cultures: understanding the tools for the next green revolution.** *Biofuels* 1, 1, p. 143-162.
- UNDP, UNDESA, and WEC (2000) **World energy assessment : energy and the challenge of sustainability.** United Nations Development Programme , New York. 506 p.
- US DOE (consultation le 21-3-2012) **Biomass Feedstock Composition and Property Database.** Biomass Program, Energy Efficiency and Renewable Energy (EERE), US Department of Energy (DOE). Adresse internet : <http://www.afdc.energy.gov/biomass/progs/search1.cgi> .
- Vaheri M, Leisola M, and Kauppinen V (1979) **Transglycosylation products of cellulase system of *Trichoderma reesei*.** *Biotechnology Letters* 1, 1, p. 41-46.

- Van Bogaert INA, Zhang JX, and Soetaert W (2011) **Microbial synthesis of sophorolipids**. *Process Biochemistry* 46, 4, p. 821-833.
- Van der Heijden R, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, and Luyben K (1994a) **Linear constraint relations in biochemical reaction systems: 1. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates**. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 1, p. 3-10.
- Van der Heijden R, Romein B, Heijnen JJ, Hellinga C, and Luyben K (1994b) **Linear constraint relations in biochemical reaction systems: 2. Diagnosis and estimation of gross errors**. *Biotechnology and Bioengineering* 43, 1, p. 11-20.
- Van der Heijden R, Romein B, Heijnen JJ, Hellinga C, and Luyben K (1994c) **Linear constraint relations in biochemical reaction systems: 3. Sequential application of data reconciliation for sensitive detection of systematic errors**. *Biotechnology and Bioengineering* 44, 7, p. 781-791.
- Velkovska S, Marten MR, and Ollis DF (1997) **Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30**. *Journal of Biotechnology* 54, 2, p. 83-94.
- Warzywoda M, Ferre V, and Pourquié J (1988) **Process for producing cellulolytic enzymes**. Institut Français du Pétrole, brevet américain n° US4762788.
- Warzywoda M, Larbre E, and Pourquié J (1992) **Production and characterization of cellulolytic enzymes from *Trichoderma reesei* grown on various carbon sources**. *Bioresource Technology* 39, 2, p. 125-130.
- Warzywoda M, Monot F, and Ballerini D (2006) **Process for the production of cellulolytic and hemicellulolytic enzymes using distillation residues from the ethanolic fermentation of enzymatic hydrolyzates of (ligno)cellulosic materials**. Institut Français du Pétrole, brevet européen n° EP1690944 B1.
- Watson TG, Nelligan I, and Lessing L (1984) **Cellulase Production by *Trichoderma reesei* (Rut-C30) in Fed-Batch Culture**. *Biotechnology Letters* 6, 10, p. 667-672.
- Xiong H, Turunen O, Pastinen O, Leisola M, and von Weymarn N (2004) **Improved xylanase production by *Trichoderma reesei* grown on L-arabinose and lactose or D-glucose mixtures**. *Applied Microbiology and Biotechnology* 64, 3, p. 353-358.

Annexe : publications

Jourdier E, Poughon L, Larroche C, Monot F, and 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 11, 70.

Jourdier E, Ben Chaabane F, Poughon L, Larroche C and Monot F (2012) **Simple Kinetic Model of Cellulase Production by *Trichoderma reesei* for Productivity or Yield Maximization.** Chemical Engineering Transactions 27, 313-318.

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

Ben Chaabane F, Jourdier E, Licht R, Cohen C and Monot F (2012) **Kinetic characterization of *Trichoderma reesei* CL847 TR3002: an engineered strain producing highly improved cellulolytic cocktail,** Journal of Chemistry and Chemical Engineering 6 (2), 109-117.

RESEARCH

Open Access

A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains: application to cellulase hyper-producing *Trichoderma reesei* strains

Etienne Jourdi¹, Laurent Poughon², Christian Larroche², Frédéric Monot¹ and Fadhel Ben Chaabane^{1*}

Abstract

Background: During bioprocess development, secondary screening is a key step at the boundary between laboratory and industrial conditions. To ensure an effective high-throughput screening, miniaturized laboratory conditions must mimic industrial conditions, especially for oxygen transfer, feeding capacity and pH stabilization.

Results: A feeding strategy has been applied to develop a simple screening procedure, in which a stoichiometric study is combined with a standard miniaturization procedure. Actually, the knowledge of all nutrients and base or acid requirements leads to a great simplification of pH stabilization issue of miniaturized fed-batch cultures. Applied to cellulase production by *Trichoderma reesei*, this strategy resulted in a stoichiometric mixed feed of carbon and nitrogen sources. While keeping the pH between shake flask and stirred bioreactor comparable, the developed shake flask protocol reproduced the strain behaviour under stirred bioreactor conditions. Compared to an already existing miniaturized shake flasks protocol, the cellulase concentration was increased 5-fold, reaching about 10 g L⁻¹. Applied to the secondary screening of several clones, the newly developed protocol succeeded in selecting a clone with a high industrial potential.

Conclusions: The understanding of a bioprocess stoichiometry contributed to define a simpler and more effective miniaturization. The suggested strategy can potentially be applied to other fed-batch processes, for the screening of either strain collections or experimental conditions.

Keywords: Screening, Miniaturization, Stoichiometry, Fed-batch, pH Control, Cellulase, *Trichoderma reesei*

Background

Bioprocess development and miniaturization

During the development of an industrial process involving micro-organisms, the screening of strain collections is a compulsory step for the selection of a strain exhibiting the best performances in industrial conditions. The screened collections can be issued from any primary screening and they often contain hundreds of strains which economically cannot all be tested at a large scale. Therefore, the secondary screening step must be carried out at a small scale, but representative of industrial

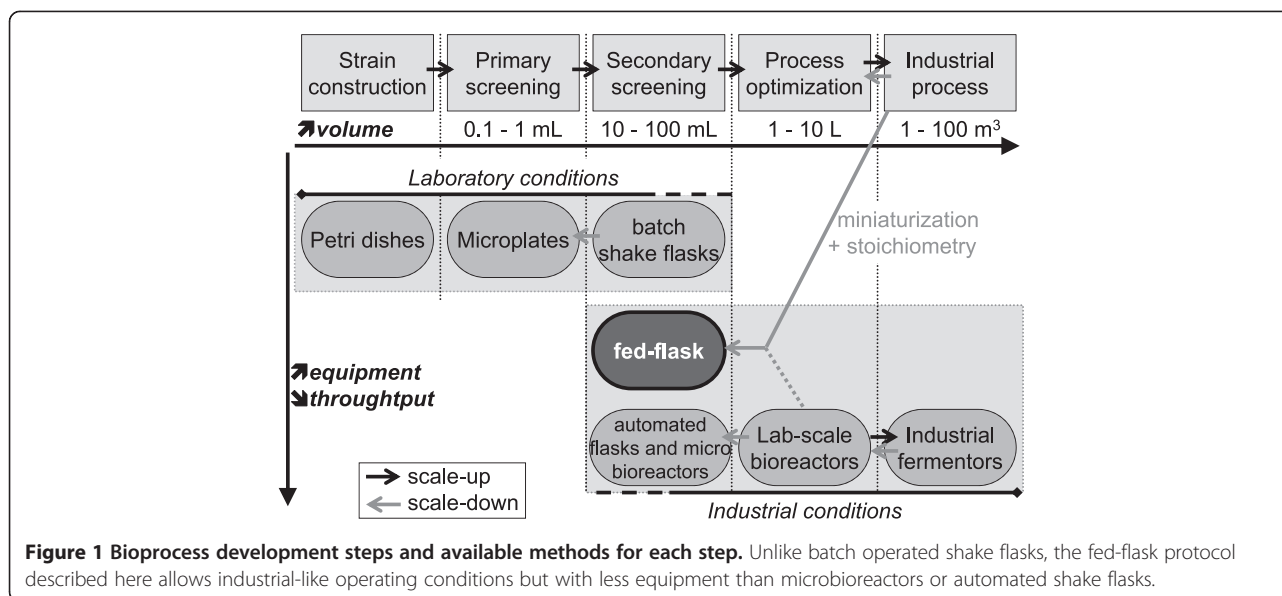
conditions. Any minor difference between screening method and large scale cultivation protocol may lead to the selection of a clone which is inappropriate for an industrial process [1].

Current bioprocess development steps are presented in Figure 1. Strain construction is carried out on agar-based solid medium supplemented with a specific substance chosen for the screening (e.g. the substrate of the bio-transformation, or a resistance marker). Then screenings are performed in liquid cultures, generally in shake flasks, but many methods have been developed to miniaturize and automate this step. Direct miniaturization of shake flasks to around 1 mL can be carried out in microtiter plates (MTPs) and several high-throughput devices are commercially available for automated monitoring of

* Correspondence: fadhel.ben-chaabane@ifpen.fr

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

Full list of author information is available at the end of the article



growth, oxygen partial pressure and pH by optical sensors [2]. For a better control of the operating conditions (mainly pH and dissolved oxygen), microbioreactors have been developed by miniaturization of the laboratory scale bioreactor, with two distinct strategies. On the one hand, microfluidic chips have been designed to equip MTPs with micropumps for pH control and substrate feed [3]. On the other hand, stirred tank or bubble column reactors have been miniaturized down to 10 and 2 mL respectively [4,5], but these low volumes may be critical for off-line analysis.

Microbioreactors have been developed for a wide range of applications, with a material-based approach, in order to precisely mimic lab-scale bioreactors. They may be applied for high-throughput screening thanks to their low volumes but they are quite complex to handle and their operating conditions may be a limiting issue. For example, the optical sensors used for pH monitoring in microbioreactors are not useable below pH 5.5 [6], and feeding is seldom possible whereas industrial processes are frequently operated in fed-batch mode.

Recently, two simple techniques have been proposed to handle glucose-limited fed-batch in shake flask: the slow release of glucose crystals from silicon elastomer discs [7], and the enzymatic glucose release from polysaccharides [8,9]. The first one can also be used with Na_2CO_3 crystals for pH stabilization [10]. However, in both cases, the feed rate, although reproducible, cannot be set and controlled so that these techniques are suitable only for a primary screening. For precise fed-batch operation in shake flasks with minimum equipment, Weuster-Botz et al. proposed a parallel substrate feeding strategy in which a single pump is used to feed successively up to 16 shake flasks [11]. For pH control, a

second pump can be used in the same way for base feed. However, in this case, this system requires one pH-probe and two feed lines for each flask.

Bareither and Pollard [12] recently reviewed small-scale bioreactors available on the market or in development and concluded that no single device has yet succeeded in a miniaturization which retains full functionality of conventional bioreactors. Therefore the choice or design of a miniaturized device must be based on the main characteristics of the planned industrial process.

Cellulase production using *Trichoderma reesei*

The study case chosen for the test and validation of this strategy is cellulolytic enzymes (cellulases) production using recombinant *T. reesei* strains. *T. reesei* is a fungus with very high protein secretion capacity which has been successfully cultivated at industrial scale for cellulase production [13]. Novel industrial *T. reesei* strains are the result of genetic improvement programmes often including high-throughput screening steps [14].

Cellulase production by *T. reesei* requires an inducer of the cellulolytic system. The natural inducer cellulose, whether pure or in lignocellulosic material, leads to good productions but is hard to handle at an industrial scale because of its insolubility [15]. As a substitute, the disaccharide lactose is the most classic soluble inducer and carbon source [16]. However, even in derepressed strains, cellulase production is very low in the presence of readily-metabolized sugars in excess, which is the case in batch culture [17]. Therefore, soluble inducing carbon sources must be fed continuously, in a fed-batch or continuous protocol, so that their residual concentrations in the bioreactor will remain close to zero.

The industrial production protocol developed by IFP Energies nouvelles is based on these observations [15]. First, cellular growth is carried out in a batch mode on soluble sugar. Then, when residual sugars concentration comes to zero, cellulase production is carried out in carbon-limited fed-batch mode with concentrated lactose solution, resulting in maximized cellulase production rate. The specific substrate feed rate (equal to the specific substrate uptake rate) is the main criterion for maximized production, and it must be kept constant during scale-up or scale-down approaches. In the industrial stirred bioreactor process, temperature and dissolved oxygen are controlled, and an ammonia solution is used for pH control at 4.8 and for nitrogen supply. This protocol is too complex to be used for high-throughput screenings.

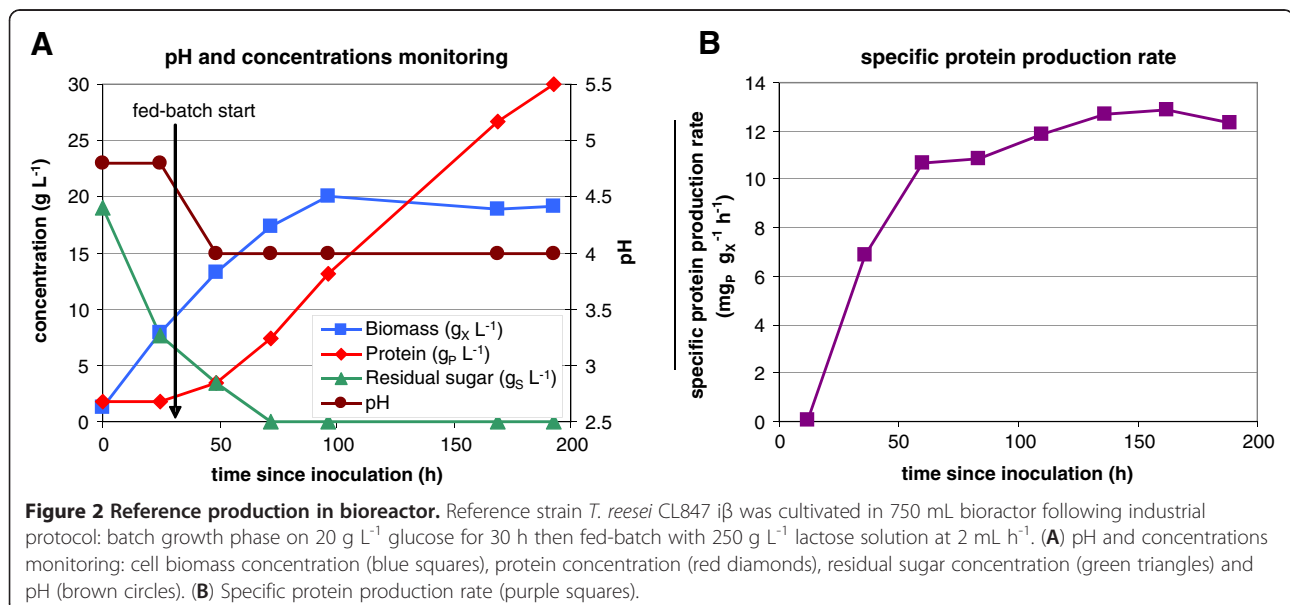
pH stabilization is a major criterion for the development of *T. reesei* small-scale cultivation protocols. It should preferably be kept between 4.0 et 5.5, like in industrial protocol. pH outside this range will stop metabolism and may durably denature produced cellulases, whose optimal pH is around 5.0. In batch shake flask cultivations without buffer, pH quickly drops below 3.5 so that many buffer systems have been tested [18,19]. The conclusion varies between authors since the chosen criterion (final enzymatic activity) depends on many factors in batch cultivations.

For the selection of a strain with high industrial potential, one of the most important criterion is the expected protein productivity so that the secondary screening must not be based solely on cellular growth. Since around 90% of the enzymatic cocktail secreted by *T. reesei* strains in industrial conditions are cellulases [20], the enzymatic activity of a supernatant is proportional to the

protein concentration, and protein productivity is closely related to cellulolytic activity productivity. Thus, to free from producing cell biomass, the chosen criterion for the selection of an industrial strain is the specific protein production rate q_p (mg of protein per g of biomass per hour). For hyper-producing *T. reesei* strains, its value is below $5 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ in batch cultivation whereas it reaches around $15 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$ in carbon-limited fed-batch or continuous cultivations [17]. Obviously a small-scale cultivation protocol suited for the selection of industrial strains has to allow high specific protein production rate, which requires fed-batch mode.

Recently, Cianchetta et al. described a screening strategy consistent with cultivations in batch shake flasks for the identification of hypercellulolytic *T. reesei* strains [21]. However in their shake flask protocol, the strains were cultivated with excess cellulose so the results cannot be extrapolated to the industrial carbon-limited protocol. To increase enzyme production in shake flasks, a resting cell strategy is often used, in which a lactose pulse is performed after glucose depletion, but lactose is still in excess [22]. This protocol is thereafter named shake flask pulse protocol. To our knowledge, no small-scale fed-batch protocol has been proposed for the selection of *T. reesei* strains with high industrial potential.

In this study, a stoichiometric miniaturization strategy is described for the design of a simple screening procedure which retains the experimental conditions of an industrial process. This strategy was applied to cellulase production by *T. reesei* which requires carbon-limited fed-batch and pH stabilization. For fed-batch mode, a standard miniaturization strategy was used. In parallel, a stoichiometric study of the micro-organism behaviour in industrial conditions was performed in order to develop



a simple pH stabilization strategy. Usually stoichiometry is used to calculate yield or mass balance. In this work it was used for calculation of nutriment requirements for later medium design. Actually, acid or base requirements for pH control are stoichiometrically related to nutriment uptake from the culture medium. Accordingly, knowing nutriment needs allows predicting acid or base needs. In practice, no pH probe is required and base or acid are mixed with the feed, which halves the number of pumps. The resulting protocol (thereafter named "fed-flask" mode for stoichiometric fed-batch mode operated in shake flask) was first validated by comparison with reference production in bioreactor and then applied for the secondary screening of various *T. reesei* clones.

Results

Reference fed-batch production in bioreactor

The industrial protocol already mentioned [15] was used to perform a reference fed-batch cultivation of *T. reesei* CL847 iβ strain in lab-scale bioreactor. Monitoring of pH, substrate and products concentrations (Figure 2 A), and calculation of the specific protein production rate q_p (Figure 2 B) showed 3 different phases. During the first 30 hours, cell growth occurred in a batch phase on glucose as a carbon source. Due to the repressor effect of glucose, no protein production was observed during this phase ($q_p = 0 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$). Then, from 30 to 72 hours, the lactose feed induced protein production, but the residual sugar concentration was not null, resulting in a limited induction of the production ($q_p = 7 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$). Both biomass and protein were produced. Then, after 72 hours, residual sugars concentration was null, resulting in a high induction of the protein synthesis ($q_p = 12.5 \pm 0.5 \text{ mg}_p \text{ g}_x^{-1} \text{ h}^{-1}$). Biomass growth stopped and protein production was maximum. During this phase, a protein production yield of $0.36 \pm 0.03 \text{ g g}^{-1}$ on lactose was obtained. Final protein concentration after 192 h total cultivation was 30 g L^{-1} .

Stoichiometry of cellulase production

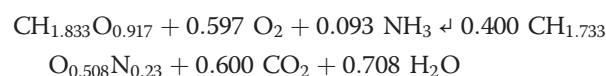
To understand the nutriment needs during protein production by *T. reesei*, compositional analysis of different secretomes was performed. Measurements were done on 3 desalted secretomes produced by CL847 iβ strain in 3 independent bioreactor cultivations with lactose feed (same conditions than reference fed-batch production, duration 265, 340 and 240 h, final concentrations 43, 65 and 33 g L^{-1}). These measurements were compared to the theoretical protein composition based on nucleotidic sequences of the genes coding for the four major cellulases CBH1, CBH2, EG1, EG2 [23], which account for around 75% of the secretome [20]. Results showed large differences between theoretical and measured compositions (Table 1). Whereas carbon and hydrogen content were quite equivalent, oxygen

Table 1 Theoretical and measured compositions of *T. reesei* secretome

	theoretical	measured	
	mass content	mass content	molar composition
C	$53.0 \pm 0.9\%$	$47.3 \pm 0.1\%$	1
H	$6.6 \pm 0.1\%$	$6.83 \pm 0.04\%$	1.733
O	$23.2 \pm 0.7\%$	$32.0 \pm 0.8\%$	0.508
N	$16.7 \pm 0.2\%$	$12.7 \pm 0.5\%$	0.23
S	$1.6 \pm 0.5\%$	$1.00 \pm 0.05\%$	0.008
Total	$100.1 \pm 2.4\%$	$99.7 \pm 0.6\%$	

Three independent final secretomes produced by *T. reesei* CL847 iβ under reference fed-batch production in bioreactor (with lactose feed) were desalted and analysed for their elementary compositions (values are mean and standard deviation of the 3 secretomes). Theoretical composition was based on amino-acids sequences of the fourth main cellulases.

content was 38% higher and nitrogen and sulfur content were 24% and 38% lower, respectively, in the measured composition compared to the theoretical one. Using mean measured secretome composition and measured production yield, the overall stoichiometry of protein production by *T. reesei* on lactose when no residual sugars (no biomass growth) was determined as:



During protein production on lactose, no other metabolite such as an organic acid is consumed or produced, so this equation describes all the biological reactions occurring during protein production. For instance, using this equation, the calculated carbon balance for the third phase of the reference bioreactor production (After 72 h: protein production with no growth) was $0.95 \text{ gC}_{\text{produced}} \text{ gC}_{\text{consumed}}^{-1}$, which proves that every carbon substrate and product were considered.

Fed-flask protocol design

For the design of the new fed-flask protocol, a standard miniaturization of the lab-scale bioreactor was first carried out at constant specific substrate feed rate (Table 2). Flasks were chosen for their simplicity to handle and rotary shaker for easy agitation and temperature control. After preliminary experiments, working volume (50 mL) and biomass concentration (7 to 8 g L^{-1}) were chosen to avoid oxygen transfer limitation (see Discussion). Initial glucose concentration for batch phase (15 g L^{-1}) was chosen to reach the biomass concentration. Temperature was not a critical issue since the optimal range for *T. reesei* is wide [15]. Feed rate and lactose concentration in feed were chosen to keep constant the specific substrate feed rate.

Then, a stoichiometric approach was used to remove pH control system by mixing the base with the substrate feed (Table 2 and Figure 3). With this strategy, no pH

Table 2 Conditions used for the stoichiometric miniaturization strategy

	bioreactor protocol	fed-flask protocol	miniaturization fold
Working volume (mL)	750	50	/15
Biomass concentration (g L ⁻¹)	17	7.5	/2.2
Feed composition	lactose (g L ⁻¹)	250	/5
	NH ₃ (mM)	(separate ¹)	160
Feed rate (mL h ⁻¹)	2	0.3	/6.6
specific lactose feed rate (g g ⁻¹ h ⁻¹)	0.04	0.04	constant

Experimental conditions for reference fed-batch production in bioreactor, and miniaturization fold applied for the design of the fed-flask protocol (at constant specific lactose feed rate). ¹For bioreactor protocol, NH₃ was added on demand by pH control system, whereas it was stoichiometrically mixed with the feed for fed-flask protocol (see Figure 3).

probe was required and the number of pumps was halved. The measured stoichiometry of protein production on lactose was used to predict the NH₃ base need during fed-batch: 3.2 mmol of NH₃ per gram of lactose. Using 50 g L⁻¹ lactose feed, 15 mL of 11 N ammonia solution were mixed per liter of lactose feed. With the same reasoning, sulfur requirement was calculated to be 0.8 g L⁻¹ ammonium sulfate.

Validation of the fed-flask protocol

Using the reference strain *T. reesei* CL847 iβ, the new fed-flask protocol was compared to the shake flask pulse protocol and to the reference fed-batch production protocol in bioreactor (previously presented Figure 2). For flasks experiments, growth phase was identical, then production was induced with a pulse of 20 g L⁻¹ lactose (shake flask pulse protocol) or with a stoichiometric mixed feed of lactose and ammonia (new fed-flask protocol). Off-line monitoring of pH and concentrations, and calculation of specific protein production rate are presented in Figure 4.

During growth phase on glucose, pH fell because of ammonium consumption (Figure 4 A). This fall was

weaker when the culture medium contained 50 mM phtalate than 25 mM owing to the buffer effect of phtalate. However, in shake flask pulse protocol, even 50 mM phtalate buffer was insufficient to stabilize pH after the lactose pulse. pH dropped below 3.3 after 142 h and biological activity stopped due to low pH effect. With the new fed-flask protocol, pH remained constant at 5.0 in 50 mM buffered flask and slightly rose from 4.1 to 4.8 in 25 mM buffered flasks. The use of a feed mixing lactose and ammonia in stoichiometric proportion mimicked the pH control strategy used for reference fed-batch production in bioreactor and allowed a good pH stabilization in flasks for more than 150 h.

Biomass and protein concentration profiles were similar in the new fed-flask protocol and in the reference fed-batch bioreactor cultivation (Figure 4 B and C, compared to Figure 2 A). After feed start, biomass remained constant (in mass) and protein production was almost linear, reaching 10 g L⁻¹ after 160 h of feeding. No effect of buffer concentration or pH was observed on the protein production rate. With the shake flask pulse protocol with lactose pulse, protein production rate was 3.5 times lower, and stopped 110 h after the pulse at 2.3 g L⁻¹ due

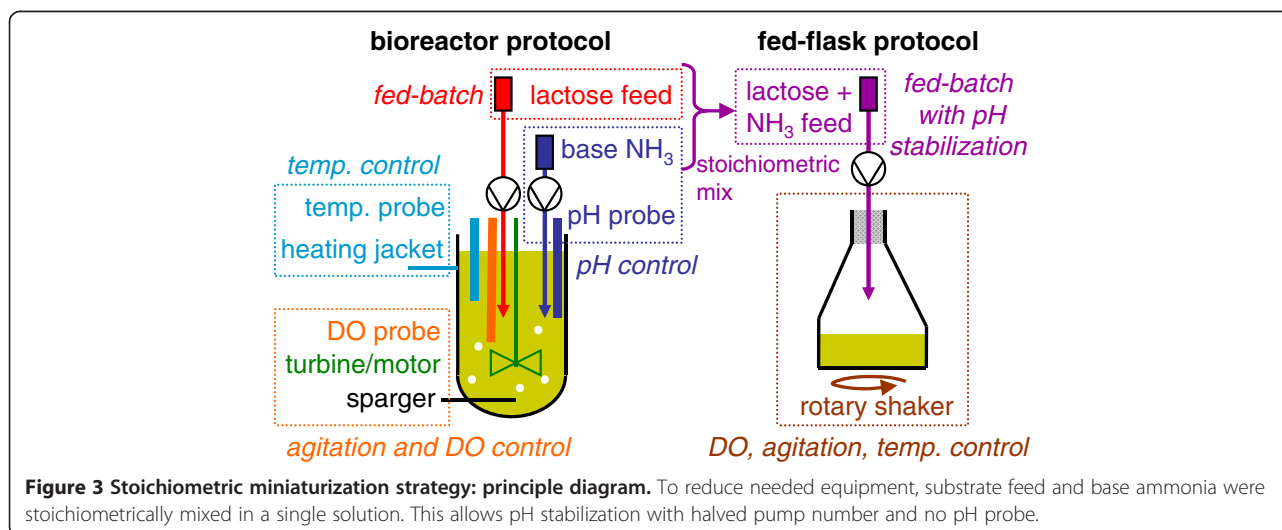
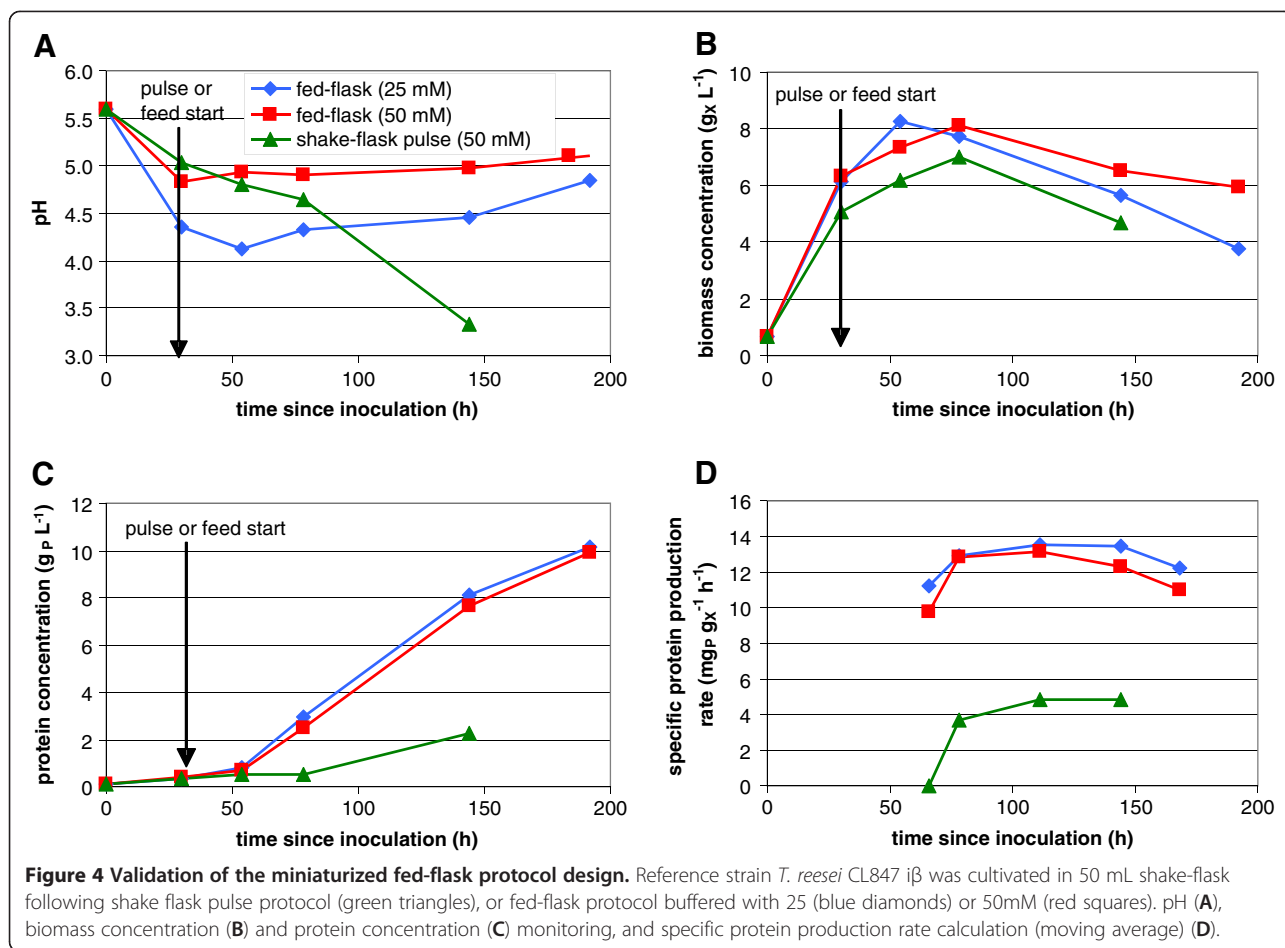
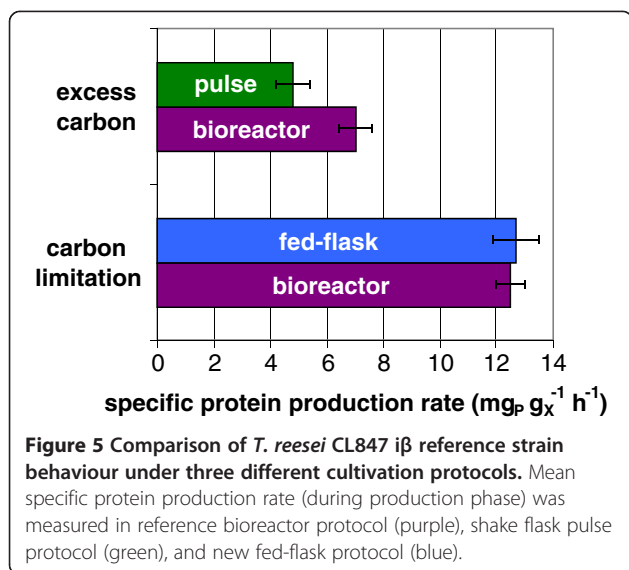


Figure 3 Stoichiometric miniaturization strategy: principle diagram. To reduce needed equipment, substrate feed and base ammonia were stoichiometrically mixed in a single solution. This allows pH stabilization with halved pump number and no pH probe.



to pH fall. Final lactose concentration was 14.8 g L⁻¹, only 5.2 g L⁻¹ lactose had been consumed before low pH inhibition occurred.



The specific protein production rate (Figure 4 D) was limited to 4.8 mg_P g_X⁻¹ h⁻¹ in the shake flask pulse protocol due to the excess of lactose. In contrast, in the new fed-flask protocol, it reached 12.7 ± 0.8 mg_P g_X⁻¹ h⁻¹, owing to the carbon-limited feed which maintained residual sugar concentration close to zero (no residual sugar was detected by HPLC). Both values were consistent with those obtained in reference fed-batch bioreactor cultivation performed under comparable substrate feeding conditions (Figure 5). These results validated the new fed-flask protocol for the screening of strains with high hyperproducing capacity.

Application to secondary screening

To test this new protocol, a strain collection issued from a genetic engineering work was screened in order to rank the strains according to their protein production capacity in the operational conditions defined during the miniaturization.

During conidia purification and isolation steps, 25 clones were selected for stability, growth and general morphology on PDA plates. Then, a primary screening was achieved in classic shake flasks to check for

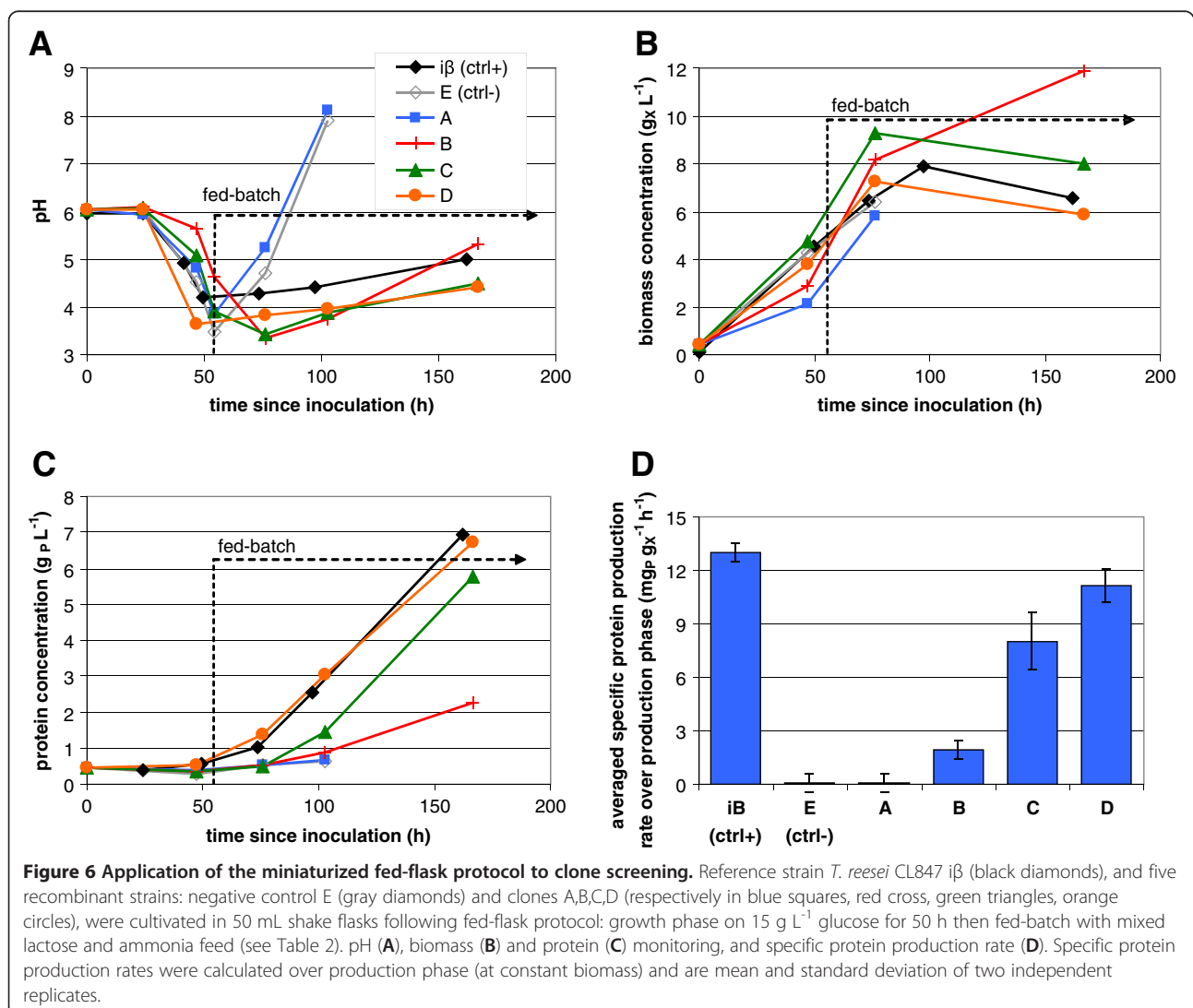
transgene expression and protein production. For the secondary screening with the new fed-flask protocol, 4 clones (A, B, C, D) were selected for their good transgene expression and fair protein production levels (data not shown). These 4 clones were considered equivalent at the end of the primary screening. Clone E which lost the parental strain capacity to produce high levels of proteins was selected as a negative control. Parental strain *T. reesei* CL847 i β was selected as a positive control. These 6 clones were tested by using the new fed-flask protocol: feed was started after 50 h growth phase on 15 g L⁻¹ glucose. The experiments were duplicated and gave similar results: Figure 6 presents the monitoring of the second experiment and average specific protein production rate.

During growth phase, the 6 clones showed differences in pH decrease (Figure 6 A). Since the buffer concentration was identical, these differences may reflect different growth

rates, or different spore concentration at inoculation. During the fed-batch phase, clones B, C and D showed a pH profile similar to the reference strain *T. reesei* CL847 i β , with a good pH stabilization, between 4 and 5. On the other hand, clone A and negative control E showed a very quick rise of pH, up to 8, which completely inhibited biomass growth and protein production.

Biomass and protein profiles (Figure 6 B and C) were similar for clones C and D and for reference strain *T. reesei* CL847 i β , with almost constant biomass concentration around 7 g L⁻¹, and linear protein production up to around 7 g L⁻¹ after 120 h feed. Clone B showed biomass accumulation up to 12 g L⁻¹ and lower protein production, reaching 2.3 g L⁻¹. Clone A and negative control E did not produce any protein.

The mean specific protein production rate (Figure 6 D) is the only reliable criterion to determine whether a strain is a hyperproducing one or not. Clones A and B, like



negative control E, lost the hyperproducing phenotype of the parental reference strain i β . Clone D has almost the same specific protein production rate as the parental strain: it kept the hyperproducing phenotype. Clone C, which produced almost the same protein concentration, but with higher producing biomass concentration, has an intermediate phenotype, with a specific protein production rate 38% lower.

Using this new fed-flask protocol for a secondary screening step, 5 clones were ranked according to their protein production capacity, which was not possible during the first screening step with classic shake flasks protocol.

Discussion

Compositional analysis of *T. reesei* secretomes

Using three different secretomes produced by *T. reesei* in bioreactor fed-batch cultivations, the mean nitrogen mass content was measured at $12.7 \pm 0.5\%$ instead of the usual 16%. This result can be explained by the high glycosylation level of *T. reesei* cellulases [24]. For example, Hui et al. studied CBH2, EG1 and EG2 glycosylation patterns and determined that glycosylation accounted for 12 to 24% of their molecular mass [25]. Here, using mean theoretical cellulase composition and mean glycosylation composition, glycosylation was estimated to account for around 25% of the molecular mass of produced cellulases, which is consistent with Hui et al.

Protocol design

In order to design a small-scale protocol for secondary screening, the industrial fed-batch protocol had to be simplified as much as possible. In particular the complex pH control system, with pH probe and concentrated ammonia solution, had to be removed. Since the use of a lactose limited feed was compulsory to maintain maximal protein production, a new miniaturization strategy was proposed, based on the stoichiometric mix of carbon substrate and ammonia in the feed. Protein production stoichiometry in fed-batch cultivation was used to calculate the ammonia needed which was introduced with the lactose feed. This strategy was successful for pH stabilization and this result confirms that the stoichiometric equation used well describes protein production, especially because no organic acid or other ionic metabolite is produced. However, since this stoichiometry may slightly vary according to culture conditions, and since the growth phase is carried out without feed so without ammonia input, the culture medium needed to be buffered.

During fed-flask protocol validation, similar protein productions were observed in media buffered with 25 mM or 50 mM phtalate. Although buffering is crucial in flasks experiments, a weaker buffer system was chosen

for the screening experiments, with 25 mM phtalate, since high buffer concentration may have an effect on cells behaviour [18]. Moreover, pH drop during growth phase is a good indicator of sugar consumption, which is the major criterion for deciding to start the feeding. During production phase, pH is mainly stabilized by the stoichiometric ammonia input from feed, so buffer concentration is less important. However, a pH drop below 3.5, as observed in shake flask pulse protocol, may inactivate produced enzymes.

Oxygen transfer

Due to their low K_{La} values, oxygen transfer is often considered as the main issue in shake flasks, especially for high cell density experiments [12]. In preliminary experiments, slower growth was observed in 100 mL working volume compared to 50 mL, due to oxygen transfer rate limitation (data not shown). Therefore a 50 mL working volume was chosen. During the fed-batch step, the volume increased but the oxygen demand was lower than in the growth phase since the carbon source supply was limited by the feed rate. So, oxygen was not a limiting nutriment during fed-batch, which is consistent with the fact that lactose residual concentration remained close to zero.

To validate this hypothesis, we calculated the minimal K_{La} needed to allow sufficient oxygen transfer during production phase. Using measured protein production stoichiometry and set lactose feed rate in our experimental conditions (Table 2), the oxygen consumption rate was calculated to be $200 \text{ mg}_{O_2} \text{ L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Then the minimum K_{La} value (for null dissolved oxygen concentration) was estimated at a value of 25 h^{-1} . Every experimental device allowing K_{La} above this value will be sufficient for our experimental conditions. For shake flasks, this value is consistent with K_{La} measured by Wittman et al. [26]: around 80 h^{-1} in shake flasks with 50 mL water at 150 rpm.

Oxygen transfer in flasks is a critical issue when designing fed-batch mode which maintains substrate limitation. The simple calculation described above for the minimal K_{La} value needed can direct the choice of the experimental device.

pH monitoring

Clone A and negative control E did not produce any protein and showed a quick pH rise after lactose feed start. They might have lost the ability to metabolize lactose, which accumulated in the culture medium (up to 12 g L^{-1} at 100 h, whereas residual concentration remained null for clones B to D). Then nitrogen from feed was not co-metabolized and ammonia also accumulated in the medium (up to 85 mM at 100 h, whereas it remained constant at around 40 mM for clones B to D),

leading to this quick pH rise. Clone B used lactose feed for growth instead of protein production, with similar mass yield on lactose. But the amount of nitrogen needed for growth is lower than the one used for protein production (Harima et Humphrey measured a nitrogen mass content of 6.7% for *T. reesei* QM9414 strain [27]). In our miniaturization strategy, ammonia input was based on nitrogen content in proteins, so clone B accumulated ammonia in culture medium (up to 50 mM at 166 h), which explains the quicker pH rise for clone B cultivation than for positive control CL847 i β strain. Then a pH rise quicker than positive control may be a good indicator to eliminate clones with lower enzyme producing capacity.

Fed-flask protocol advantages

The comparison of the flasks protocols using reference strain *T. reesei* CL847 i β (Figure 5) showed that protocols in flasks which do not handle the carbon limitation are not suitable to rank hyperproducing strains according to their specific protein production rate, whereas the fed-flask protocol did. It will be essential after genetic engineering works to quickly and reliably select strains which will have the best productivity at an industrial scale.

Moreover this new fed-flask protocol requires much less equipment than bioreactor cultivation: no bioreactor, only flasks and rotary shaker; no pH control system (neither pH probe nor base nor additional controlled pump); no dissolved oxygen control system (neither oxygen probe nor compressed air nor motor). In addition, the number of pumps for feeding can be reduced using the parallel feeding system developed by Weuster-Botz et al. [11]. Thereby it allows efficient secondary screening of collections of strains. We estimated that an operator who needed 2 weeks to carry out 4 bioreactor cultivations in parallel, can carry out 16 fed-flask cultivations per week, that is, a 8-fold increase.

Miniaturization strategy

The miniaturization strategy proposed in this study was developed to mimic an industrial process. It may be applied for the miniaturization of many other industrial biotechnological processes. Its main advantage is to allow pH stabilization in flasks when operated in carbon-limited fed-batch mode. Therefore this strategy is suitable for every fed-batch process, provided that pH variation can be related to the consumption of the substrate present in the feed. In this study, a stoichiometric approach was used to determine the relation between lactose and ammonia consumption, but an empirical approach can also be used for this determination. In the general case, even overflow metabolites as organic acids

may be considered, as long as their production is stoichiometrically linked to substrate consumption.

Moreover, this miniaturized protocol can be used for other applications. Unlike strategies based on diffusional or enzymatic release, this strategy can be applied to complex feed compositions and to accurate feed rate profiles, provided that the pump system allows precise rate control. Therefore the resulting protocol can also be used to test the effect of the feed composition or the feed rate on the behaviour of a given strain.

Conclusion

A new strategy has been proposed for the design of screening protocols, which ensures a simpler and more accurate miniaturization of fed-batch operated bioprocess. Based on a stoichiometric study of the bioprocess, the feed composition may be designed to supply every nutriment and base or acid requirements in a single solution. Its main advantage is to enable a good pH stabilization without control system. Therefore strain behaviour is identical to pH-regulated bioreactor cultivation so that the screening is carried out in industrial-like conditions. Moreover, less equipment is needed for the screening of strain collection or experimental conditions, since it does not require any pH probe or additional pump.

This strategy was applied to cellulase production by *T. reesei*, a key step for the biochemical conversion of lignocellulosic materials. The resulting protocol was validated using reference fed-batch production in bioreactor then applied to the secondary screening of several clones in bioreactor-like operational conditions. It succeeded in selecting an engineered hyper-producing strain with high industrial potential.

Methods

Compositional analysis

To determine the stoichiometry of protein production by *T. reesei*, compositional analysis of several supernatants was realized by SGS Multilab (Evry, France). To avoid concurrent measurement of remaining ions from culture medium, supernatants were first desalted using FPLC (Akta; GE Healthcare) equipped with Hitrap desalting column, then lyophilized.

Culture media

For bioreactor cultivations, the medium composition was: cornsteep solid 4 g L⁻¹; KOH 1.66 g L⁻¹; H₃PO₄ 85% 2.5 mL L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 2.8 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0.6 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O 0.6 g L⁻¹; FeSO₄·7H₂O 60 mg L⁻¹; MnSO₄·H₂O 12 mg L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 16 mg L⁻¹; Co(NO₃)₃·6H₂O 18 mg L⁻¹; H₃BO₃ 2 mg L⁻¹. pH is adjusted to 4.8 with NH₃ 20%.

For shake flasks, fed-flasks, and preculture cultivations, the media composition was: cornsteep solid 1.5 g L⁻¹; dipotassium phtalate 6 g L⁻¹ (case 25 mM) or 12 g L⁻¹ (case 50 mM); H₃PO₄ 85% 0.8 mL L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 4.2 g L⁻¹; MgSO₄·7H₂O 0.3 g L⁻¹; CaCl₂·2H₂O 0.15 g L⁻¹; FeSO₄·7H₂O 30 mg L⁻¹; MnSO₄·H₂O 6 mg L⁻¹; ZnSO₄·7H₂O 8 mg L⁻¹; CoNO₃·6H₂O 9 mg L⁻¹; H₃BO₃ 1 mg L⁻¹. pH was adjusted to 6.0 with NaOH 30%.

Strains

T. reesei CL847 iβ was obtained by genetic engineering of the hyperproducer CL847 strain, both from Cayla Company, Toulouse France [28,29]. Clones used to test the new protocol were obtained by genetic engineering from *T. reesei* CL847 iβ strain. All strains were maintained on PDA plates.

Bioreactor cultivations

For a standard fed-batch production based on the industrial protocol [30], cultivation was carried out in Dasgip fedbatch-pro bioreactors with an initial working volume of 750 mL. Growth phase in batch was performed on 20 g L⁻¹ glucose at pH 4.8 and 27 °C for 30 h. Then fed-batch was performed at pH 4.0 and 25 °C with 250 g L⁻¹ lactose solution feed at 2 mL h⁻¹. pH was automatically adjusted with 5.5 N NH₃ solution. Aeration rate was fixed at 30 sL h⁻¹ and agitation was regulated to maintain 40% dissolved oxygen.

Flasks cultivations

500 mL Schott flasks with 50 mL working volume were incubated at 30 °C and 150 rpm in an Infors rotary shaker.

For shake flask pulse protocol, the culture medium was buffered with 50 mM dipotassium phtalate. Growth phase was performed on 15 g L⁻¹ glucose for 33 h. Then protein production was induced with a 20 g L⁻¹ lactose pulse.

The new fed-flask protocol was designed by stoichiometric miniaturization of the bioreactor protocol (see text, Table 2, and Figure 3), for an initial working volume of 50 mL and a biomass concentration around 8 g L⁻¹. Growth phase was performed on 15 g L⁻¹ glucose for 50 h (until glucose concentration below 5 g L⁻¹) then flasks were fed at 0.3 mL h⁻¹ with a mixed solution containing: lactose 50 g L⁻¹; NH₃ 20% (11 N) 15 mL L⁻¹; (NH₄)₂SO₄ 0.8 g L⁻¹. This composition was calculated from the stoichiometry of protein production to meet carbon, nitrogen and sulfur requirements, and to stabilize pH.

Analysis

Culture medium was filtrated using Whatman GF/C filters. For biomass concentration determination, biomass

cake was washed with distilled water then dried at 105 °C until constant weight. For protein concentration determination, supernatants were diluted with distilled water then protein concentration was measured against BSA standard (0-1.5 g L⁻¹ range with second-order regression) by Lowry method [31] using DC Protein Assay (Biorad). Sugars concentration was measured by HPLC: separation was carried out using Varian Metacarb 87P column with mobile phase milliQ water at 0.4 mL min⁻¹, 80 °C and pressure around 32 bar; detection was carried out with Waters 2414 refractive index detector. Ammonium concentration was measured by HPLC: separation was carried out using Dionex IonPac CS12A column with mobile phase methanesulfonic acid 20 mM at 1 mL min⁻¹, 30°C and pressure around 2000 psi; detection was carried out with Dionex CD conductivity detector at 35°C.

Competing interests

IFP Energies nouvelles has filed a patent application on this methodology.

Acknowledgements

This study was part of Projet Futurool, a project supported by OSEO Innovation. Antoine Margeot and Hugues Mathis (IFP Energies nouvelles) are acknowledged for the construction of mutant strains used in this work.

Author details

¹IFP Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Pr eau, 92852 Rueil-Malmaison, France. ²Clermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, Polytech Clermont-Ferrand, 24 av. des Landais, BP 20206, 63174 Aubi re cedex, France.

Authors' contributions

EJ and FBC designed the study. EJ carried out the experiments and drafted the manuscript. CL and LP are academic supervisors of EJ. All authors revised, read and approved the final manuscript.

Received: 22 March 2012 Accepted: 30 May 2012

Published: 30 May 2012

References

1. Scheidle M, Jeude M, Dittrich B, Denter S, Kensy F, Suckow M, Klee D, Buchs J: **High-throughput screening of *Hansenula polymorpha* clones in the batch compared with the controlled-release fed-batch mode on a small scale.** *FEMS Yeast Res* 2010, **10**:83-92.
2. Blomberg A: **Measuring growth rate in high-throughput growth phenotyping.** *Curr Opin Biotechnol* 2011, **22**:94-102.
3. Funke M, Buchenauer A, Schnakenberg U, Mokwa W, Diederichs S, Mertens A, Muller C, Kensy F, Buchs J: **Microfluidic biolector-microfluidic bioprocess control in microtiter plates.** *Biotechnol Bioeng* 2010, **107**:497-505.
4. Betts JI, Baganz F: **Miniature bioreactors: current practices and future opportunities.** *Microb Cell Fact* 2006, **5**:21.
5. Weuster-Botz D, Puskeiler R, Kusterer A, Kaufmann K, John GT, Arnold M: **Methods and milliliter scale devices for high-throughput bioprocess design.** *Bioprocess Biosyst Eng* 2005, **28**:109-119.
6. Schapper D, Alam MNHZ, Szita N, Lantz AE, Gernaey KV: **Application of microbioreactors in fermentation process development: a review.** *Anal Bioanal Chem* 2009, **395**:679-695.
7. Jeude M, Dittrich B, Niederschulte H, Anderlei T, Knocke C, Klee D, Buchs J: **Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique.** *Biotechnol Bioeng* 2006, **95**:433-445.
8. Panula-Perala J, Siurkus J, Vasala A, Wilmanowski R, Casteleijn MG, Neubauer P: **Enzyme controlled glucose auto-delivery for high cell density cultivations in microplates and shake flasks.** *Microb Cell Fact* 2008, **7**:31.

9. Hemmerich J, Wenk P, Lutkepohl T, Kensy F: **Fed-batch cultivation in baffled shake flasks fed-batch mode.** *Genet Eng Biotechnol News* 2011, **31**:52–54.
10. Scheidle M, Dittrich B, Klinger J, Ikeda H, Klee D, Buchs J: **Controlling pH in shake flasks using polymer-based controlled-release discs with pre-determined release kinetics.** *BMC Biotechnol* 2011, **11**:25.
11. Weuster-Botz D, Altenbach-Rehm J, Arnold M: **Parallel substrate feeding and pH-control in shaking-flasks.** *Biochem Eng J* 2001, **7**:163–170.
12. Bareither R, Pollard D: **A review of advanced small-scale parallel bioreactor technology for accelerated process development: current state and future need.** *Biotechnol Prog* 2011, **27**:2–14.
13. Ballerini D, Desmarquest JP, Pourquie J, Nativel F, Rebeller M: **Ethanol production from lignocellulosics - large-scale experimentation and economics.** *Bioresour Technol* 1994, **50**:17–23.
14. Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F: **New improvements for lignocellulosic ethanol.** *Curr Opin Biotechnol* 2009, **20**:372–380.
15. Pourquie J, Warzywoda M, Chevron F, They D, Lonchamp D, Vandecasteele JP: **Scale up of cellulase production and utilization.** In *FEMS Symposium n°43: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. Edited by Aubert J-P, Beguin P, Millet J. London: Academic; 1988:71–86.
16. Dashtaban M, Buchkowski R, Qin W: **Effect of different carbon sources on cellulase production by *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) strains.** *Int J Biochem Mol Biol* 2011, **2**:274–286.
17. Tolan J, Foody B: **Cellulase from Submerged Fermentation.** In *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. 65th edition. Edited by Tsao G, Brainard A, Bungay H, Cao N, Cen P, Chen Z, Du J, Foody B, Gong C, Hall P, Ho N, Irwin D, Iyer P, Jeffries T, Ladisch C, Ladisch M, Lee Y, Mosier N, Mühlemann H, Sedlak M, Shi N, Tsao G, Tolan J, Torget R, Wilson D, Xia L. Berlin/Heidelberg: Springer; 1999:41–67.
18. Ferreira SMP, Duarte AP, Queiroz JA, Domingues FC: **Influence of buffer systems on *Trichoderma reesei* Rut C-30 morphology and cellulase production.** *Electronic Journal of Biotechnology* 2009, **12**(3):6.
19. Juhasz T, Szengyel Z, Szijarto N, Reczey K: **Effect of pH on cellulase production of *Trichoderma reesei* RUT C30.** *Appl Biochem Biotechnol* 2004, **113**:201–211.
20. Herpoel-Gimbert I, Margeot A, Dolla A, Jan G, Molle D, Lignon S, Mathis H, Sigouillot JC, Monot F, Asther M: **Comparative secretome analyses of two *Trichoderma reesei* RUT-C30 and CL847 hypersecretory strains.** *Biotechnol Biofuels* 2008, **1**:18.
21. Cianchetta S, Galletti S, Burzi PL, Cerato C: **A novel microplate-based screening strategy to assess the cellulolytic potential of *trichoderma* strains.** *Biotechnol Bioeng* 2010, **107**:461–468.
22. Morikawa Y, Ohashi T, Mantani O, Okada H: **Cellulase induction by lactose in *Trichoderma reesei* PC-3-7.** *Appl Microbiol Biotechnol* 1995, **44**:106–111.
23. Martinez D, Berka RM, Henrissat B, Saloheimo M, Arvas M, Baker SE, Chapman J, Chertkov O, Coutinho PM, Cullen D, Danchin EGJ, Grigoriev IV, Harris P, Jackson M, Kubicek CP, Han CS, Ho I, Larrondo LF, de Leon AL, Magnuson JK, Merino S, Misra M, Nelson B, Putnam N, Robbertse B, Salamov AA, Schmoll M, Terry A, Thayer N, Westerholm-Parvinen A, et al: **Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*).** *Nat Biotechnol* 2008, **26**:553–560.
24. Kruszewska JS, Perlinska-Lenart U, Gorka-Niec W, Orlowski J, Zembek P, Palamarczyk G: **Alterations in protein secretion caused by metabolic engineering of glycosylation pathways in fungi.** *Acta Biochim Pol* 2008, **55**:447–456.
25. Hui JPM, White TC, Thibault P: **Identification of glycan structure and glycosylation sites in cellobiohydrolase II and endoglucanases I and II from *Trichoderma reesei*.** *Glycobiology* 2002, **12**:837–849.
26. Wittmann C, Kim HM, John G, Heinze E: **Characterization and application of an optical sensor for quantification of dissolved O₂ in shake-flasks.** *Biotechnol Lett* 2003, **25**:377–380.
27. Harima T, Humphrey AE: **Estimation of *Trichoderma* QM 9414 biomass and growth-rate by indirect means.** *Biotechnol Bioeng* 1980, **22**:821–831.
28. Durand H, Clanet M, Tiraby G: **Genetic-improvement of *trichoderma-reesei* for large-scale cellulase production.** *Enzyme Microb Technol* 1988, **10**:341–346.
29. Durand H, Baron M, Calmels T, Tiraby G: **Classical and molecular genetics applied to *Trichoderma reesei* for the selection of improved cellulolytic industrial strains.** In *FEMS Symposium n°43: Biochemistry and Genetics of Cellulose Degradation*. Edited by Aubert J-P, Beguin P, Millet J. London: Academic; 1988:135–151.
30. Warzywoda M, Ferre V, Pourquie J: **Process for producing cellulolytic enzymes.** *Institut Français du Pétrole R-MF* 1988, **9**:8. 675595(US4762788). 28-11-1984.
31. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: **Protein measurement with the Folin phenol reagent.** *J Biol Chem* 1951, **193**:265–275.

doi:10.1186/1475-2859-11-70

Cite this article as: Jourdiere et al.: A new stoichiometric miniaturization strategy for screening of industrial microbial strains: application to cellulase hyper-producing *Trichoderma reesei* strains. *Microbial Cell Factories* 2012 **11**:70.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit





Simple Kinetic Model of Cellulase Production by *Trichoderma Reesei* for Productivity or Yield Maximization

Etienne Jourdier^a, Fadhel Ben Chaabane^{*a}, Laurent Poughon^b, Christian Larroche^b, Frédéric Monot^a

^aIFP Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison, France.

^bClermont Université, Université Blaise Pascal, Institut Pascal, Polytech Clermont-Ferrand, 24 av. des Landais, BP 20206, 63174 Aubière cedex, France.
fadhel.ben-chaabane@ifpen.fr

A simple kinetic model of cellulase production by *Trichoderma reesei* on lactose was developed and parameters identified using bibliographic and personal data. Assuming a mean representation of industrial hyperproducer strains, this model was used to simulate and compare several cultivation strategies regarding three criteria: in addition to usual productivity and yield calculation, oxygen demand was studied and used as a constraint for protocol design.

Results showed that none of the protocols maximizes both productivity and yield, requiring to find a compromise for these parameters. Moreover, substrate concentration in the feed was the main criterion for the choice of the protocol, while oxygen demand and biomass concentration were the main issues to reach high productivities. The model will be useful for an economic study of cultivation strategies.

1. Introduction

Biological conversion of ligno-cellulosic materials into biofuels or chemicals requires the use of cellulolytic (or cellulases) and hemicellulolytic enzymes to hydrolyse cellulose and hemicellulose into fermentable sugars. Cellulases represent a large array of enzymes with activity against plant cell wall, and are naturally produced by plant pathogens (Gibson et al., 2011). Among these microorganisms, *Trichoderma reesei* is currently recognized as the best industrial producer (Philippidis, 1994), owing to its very high protein secretion capacity, and it has been successfully cultivated at industrial scale up to at least 30 m³ (Ballerini et al., 1994).

Since cellulase production is repressed by the presence of readily-metabolized sugars, *T. reesei* cultivation must be conducted under carbon limitation, in fed-batch or continuous modes (Tolan and Foody, 1999) to maximize enzyme production. As a substitute to the natural inducer cellulose, which is hard to handle and control at an industrial scale, lactose is the most usual soluble inducer and carbon source used for industrial cellulase production (Warzywoda et al., 1988).

Although industrial fed-batch protocols produce high protein levels, cellulase production is still the main economic bottleneck in biological lignocellulose conversion processes. In the case of a cellulosic ethanol plant from corn stover with in-situ cellulase production using *T. reesei*, the two major ways to reduce the ethanol production cost are (after feedstock cost) enzyme production cost and enzyme loading for hydrolysis (Kazi et al., 2010).

Three criteria are important for the economic study of a biological process: productivity affects investment costs (fermentor cost), yield affects operating costs (substrate cost), and oxygen demand

affects both investment costs (motor and compressor) and operating costs (electric power for stirring and aeration)

In this study, a simple *T. reesei* kinetic model was built based on bibliography review and accurate kinetic study, then used to compare different cultivation strategies regarding productivity, yield and oxygen demand.

2. Kinetic model

An identical growth phase was assumed for all strategies and only the protein production period was studied.

2.1 Protein production model

Since protein production was known to be maximum under carbon limitation, this study assumed production in fed-batch or continuous mode with low feeding rate so that residual substrate concentration remained null in the bioreactor. The fed substrate was directly consumed by cells, giving Eq (1).

$$\frac{dSV}{dt} = 0 = F_{in}S_{in} - qS.X.V \quad (1)$$

A generalized expression of Pirt law was assumed for substrate utilization. It fictitiously divided substrate uptake into three metabolic processes: growth, protein production and maintenance (Muthuvelayudham and Viruthagiri, 2007).

$$qS = \frac{\mu}{Y_{x^{\circ}}} + \frac{qP}{Y_{p^{\circ}}} + m \quad (2)$$

In chemostat studies, (Allen and Andreotti, 1982) as well as (Pakula et al., 2005) observed an almost constant and maximum specific protein production rate for dilution rates between 0.02 and about 0.04 h⁻¹. (Tolan and Foody, 1999) assumed it was also constant for growth rates from 0 to 0.02 h⁻¹.

Therefore most studies considered an uncoupled production model (Lo et al., 2010; Velkovska et al., 1997), which was assumed valid here for low growth rates between 0 and 0.03 h⁻¹ (Eq. 3).

$$qP = \beta \quad (3)$$

2.2 Parameters identification

During growth on lactose, a maximal yield $Y_{x^{\circ}}$ of 0.6 g.g⁻¹ was generally observed both at high growth rates (Lo et al. 2010), and at low growth rates (Pakula et al., 2005), so this value was assumed to be valid for this work. Bibliographic and personal data (submitted for publication) for cellulase production by *T. reesei* on lactose were used for the identification of the other parameters (Table 1). Since parameters were consistent between strains, a mean strain representative of hyperproducing strains was hypothesized and used for simulations.

Table 1: parameters identification, and values chosen for this study, assuming $Y_{x^{\circ}} = 0.6 \text{ g.g}^{-1}$.

strain	cultivation mode	$Y_{p^{\circ}}$ $\text{g}_P\text{-g}_S^{-1}$	m $\text{mg}_S\text{-g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	qP $\text{mg}_P\text{-g}_X^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$	references
MG80	continuous	0.60	10.8	16.9	(Nicholson et al. 1989)
VTT D-99676	continuous	0.60	8.3	19.9	(Bailey and Tahtharju 2003)
CL 847	fed-batch	0.58-0.62	8-12	12-18	(submitted for publication)
mean strain		0.6	10	15	hypothesis for simulations

2.3 Oxygen transfer

The minimal oxygen transfer coefficient K_{La} needed to keep a constant dissolved oxygen concentration C_{O_2} , could be estimated by Eq. 4:

$$K_{La} = \frac{r_{O_2}}{C_{O_2} - C^*} \quad (4)$$

where C^* was oxygen concentration at saturation (8 mg.L^{-1}) and the oxygen uptake rate r_{O_2} was calculated using mass balance owing to mean biomass and protein concentration (data submitted for publication). To avoid oxygen limitation, a minimal and constant dissolved oxygen concentration of 20 % saturation was assumed.

2.4 Simulations

Simulations were performed using Matlab® v7.1 or Microsoft® Office Excel 2003, with 0.24 h time step.

3. Results and discussion

3.1 Continuous mode – steady state

Simulations were performed for dilution rates from 0.01 to 0.03 h^{-1} and sugar concentrations in feed from 20 to 100 g.L^{-1} . As expected, productivity depended only on the biomass concentration in the bioreactor (with proportional factor q_P) but since minimal K_{La} was also almost proportional to biomass, high productivities in continuous mode will be limited by oxygen transfer (Figure 1A). Interestingly, since specific protein production rate was assumed to be constant, yields depended only on the dilution rate (Figure 1B), with protein yields ranging from 0.18 to $0.29 \text{ g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$.

3.2 Fed-batch mode

Simulations of fed-batch mode with constant feed rate showed that the physiology approached an equilibrium for which specific substrate uptake rate was stabilized and specific growth rate was null (Figure 2A). Biomass was constant in mass, and protein mass increased linearly. Accordingly this protocol was quite suitable for new strains with unknown specific protein production rate since biomass will automatically adapt to the substrate flux to transform it in proteins. Thereby protein yield was maximized, as expected for fed-batch mode.

However, due to dilution by the feed, the total working volume of the bioreactor was not used. The increase in volume led to a decrease in the concentration of producing biomass and, as a result, the protein concentration was not linear (Figure 2B). Moreover, the less concentrated the substrate feed, the more pronounced this effect. Therefore, productivity was much lower than in continuous mode, especially when substrate concentration was low (Figure 3 black).

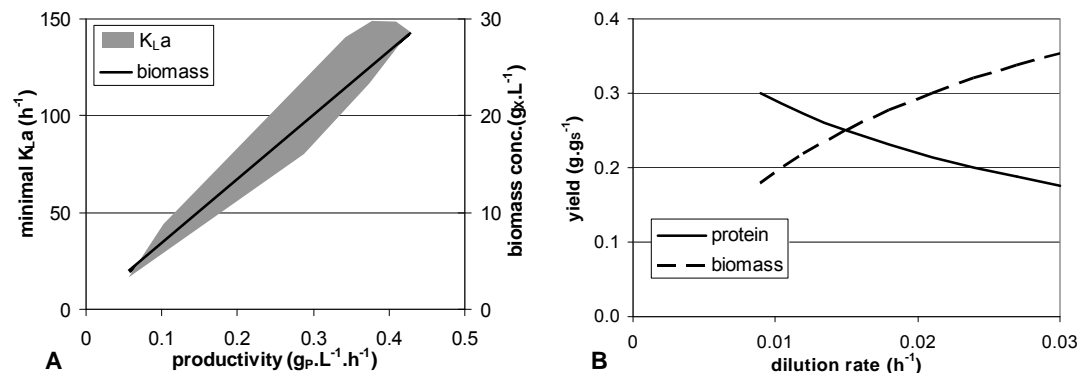


Figure 1: Continuous mode simulation at steady state: (left) biomass concentration (black line) and minimal K_{La} (gray area) – (right) yields for biomass (dashed line) and protein (plain line)

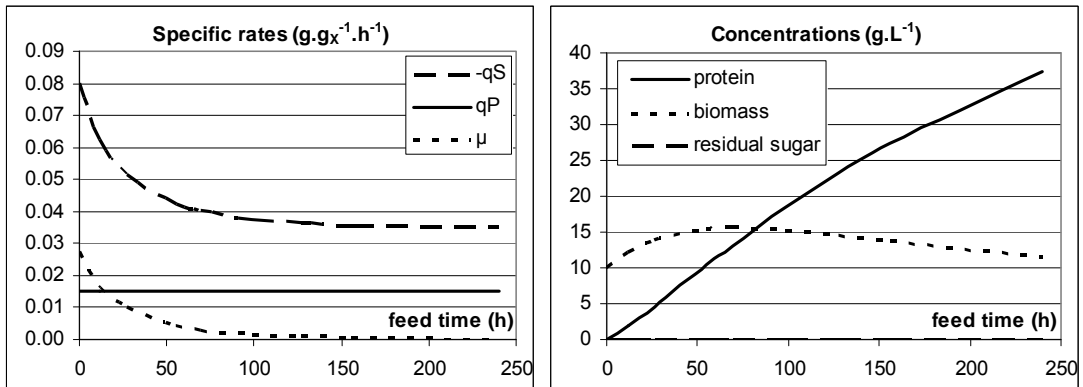


Figure 2: Fed-batch mode simulation. Specific rates (left) and concentration (right) for protein (plain line), biomass (dotted line) and substrate (dashed line).

One possibility to obtain better productivities in fed-batch mode was to achieve a constant biomass concentration by using an exponential feed rate. However, since substrate was used for growth, protein yield would be lower. In our study case (15 g.L^{-1} initial biomass), this strategy resulted in around 15 % higher productivity, with near 10 % lower yield (Figure 3). However, it should be pointed out that with this strategy the difference between initial and final volumes was even higher than before, which might be an issue for stirring design.

3.3 Strategies comparison under constraints

This model was used to compare the 3 previous protocols under some typical constraints to find out which protocol would be best suited for industrialisation. Since a high biomass concentration could lead to high viscosity, cell dry weight concentration was limited to 20 g.L^{-1} . In order to avoid high volume change during fed-batch, the initial volume was at least 50 % of the final volume. Since oxygen transfer might be costly in an aerobic process (for stirring and aeration), a maximum oxygen transfer coefficient $K_L a$ of 80 h^{-1} was assumed.

Under these hypothesis, simulations were performed to compare continuous mode, constant fed-batch and exponential fed-batch at different substrate feed concentrations. Results for the maximum productivity and yield obtained under these constraints were presented in Figure 4.

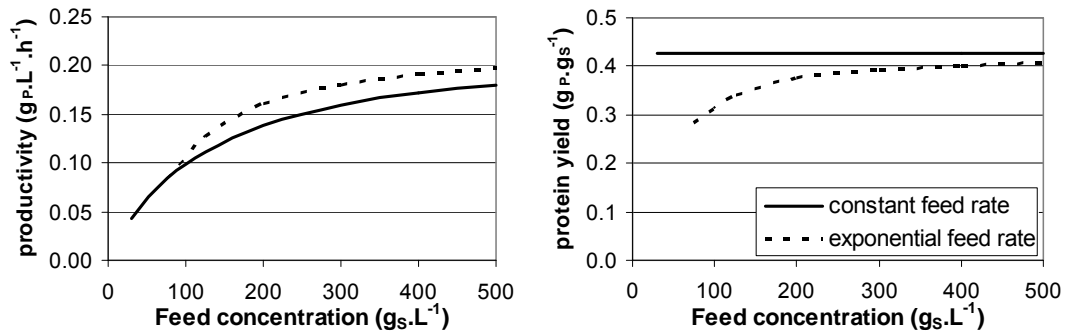


Figure 3: 240 h fed-batch phase productivity (left) and yield (right) for constant feed rate maximizing yield (plain line) or exponential feed rate for constant biomass concentration (dotted line). Initial biomass concentration $X_0 = 15 \text{ g.L}^{-1}$.

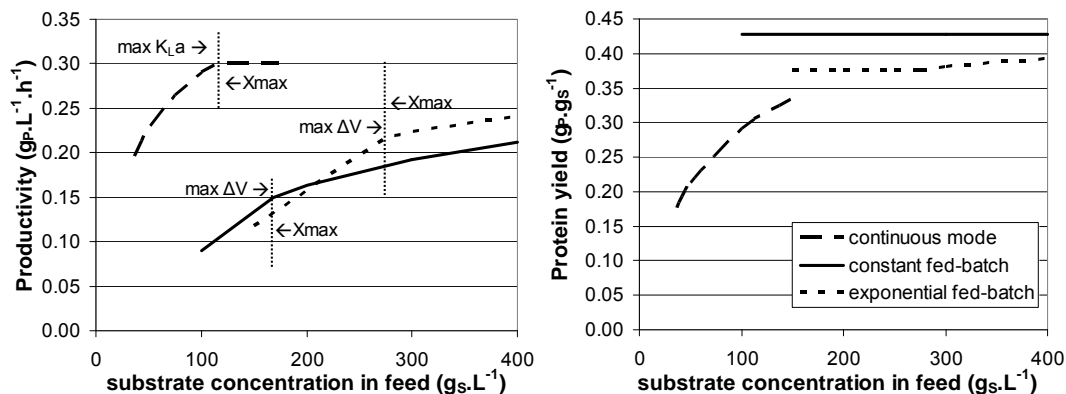


Figure 4: Maximal productivity (left) and yield (right) for three different cultivation modes: constant rate fed-batch (plain line), exponential rate fed-batch (dotted line), and continuous mode (dashed line) under constraints ($X < 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $K_L a < 80\cdot\text{h}^{-1}$; $\Delta V < 100 \%$).

In the fed-batch mode, the productivity was limited by maximum biomass (at high substrate concentration) or volume change (at low substrate concentration). Protein yield was always maximized when applying a constant rate, and slightly lower for an exponential feed. For both protocols, substrate feed below $150 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ led to very low productivities.

The continuous mode was more suitable for low feed concentration, and led to high productivities. However it was limited by maximum biomass at high substrate concentration in feed (and low dilution rate), and by oxygen transfer at low substrate concentration (and higher dilution rate). Protein yield was lower than in fed-batch mode and dropped at high dilution rate (low substrate concentration).

Interestingly, industrial constraints chosen here had an impact almost only on productivity. Indeed, protein yield depended only on growth rate (see Figure 1B), which is determined by outlet rate, so did not depend on volume change, biomass or oxygen demand. In particular oxygen transfer might limit productivity in continuous mode but had no impact on protein yield.

4. Conclusion

A study of the bibliographic data showed that the specific cellulase production rate was constant at low growth rate for highly inducing soluble sugars like lactose. Then a simple kinetic model was developed to describe cellulase production by *T. reesei* and its parameters were determined using bibliography and personal results. This model was used to simulate and compare different cultivation strategies under industrial constraints. Even though some results were expected (fed-batch maximizes yield, continuous mode maximizes productivity), other ones were new and specific to *T. reesei* cellulase production. In particular in continuous mode, the yield depended only on the dilution rate, and oxygen transfer was a very important issue since it might limit the productivity. In fed-batch mode, productivity was much lower and could be limited by volume increase.

As a result, there is no optimal strategy for the three criteria of main importance for industrial design, namely productivity, yield and oxygen demand. Therefore the cheaper approach for cellulase production by *T. reesei* is not intuitive and this model will be used for an economic comparison of the different strategies.

Acknowledgments

This study was part of Projet Futurol, a project supported by OSEO Innovation.

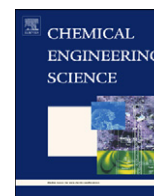
Nomenclature

V: Bioreactor volume (L)
X: Biomass concentration in bioreactor ($\text{g}_x\cdot\text{L}^{-1}$)

S: Residual substrate concentration in bioreactor ($\text{g}_S \cdot \text{L}^{-1}$)
 S_{in} : Substrate concentration in feed ($\text{g}_S \cdot \text{L}^{-1}$)
 F_{in} : Inlet flow rate ($\text{L} \cdot \text{h}^{-1}$)
 D: Dilution rate (h^{-1})
 μ : Biomass growth rate (h^{-1})
 q_P : Specific protein production rate ($\text{mg}_P \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 q_S : Specific substrate uptake rate ($\text{mg}_S \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 m: Maintenance coefficient ($\text{mg}_S \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 Y_X^o : Maximal biomass yield ($\text{g}_X \cdot \text{g}_S^{-1}$)
 Y_P^o : Maximal protein yield ($\text{g}_P \cdot \text{g}_S^{-1}$)
 $K_L a$: Oxygen transfer coefficient (h^{-1})
 r_{O_2} : Volumetric oxygen uptake rate ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 C_{O_2} : Dissolved oxygen concentration in bioreactor ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)
 C^* : Dissolved oxygen concentration at saturation ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)

References

- Allen A.L., Andreotti R.E., 1982, Cellulase Production in Continuous and Fed-Batch Culture by *Trichoderma-Reesei* Mcg80, *Biotechnol. Bioeng.*, 451-459.
- Bailey M.J., Tahtiharju J., 2003, Efficient cellulase production by *Trichoderma reesei* in continuous cultivation on lactose medium with a computer-controlled feeding strategy, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 62(2-3), 156-162.
- Ballerini D., Desmarquest J.P., Pourquie J., Nativel F., Rebeller, M., 1994, Ethanol Production From Lignocellulosics - Large-scale Experimentation and Economics, *Bioresour. Technol.*, 50(1), 17-23.
- Gibson D.M., King B.C., Hayes M.L., Bergstrom G.C., 2011, Plant pathogens as a source of diverse enzymes for lignocellulose digestion, *Curr. Opin. Microbiol.*, 14(3), 264-270.
- Kazi F.K., Fortman J.A., Anex R.P., Hsu D.D., Aden A., Dutta A., Kothandaraman G., 2010, Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover, *Fuel*, 89, S20-S28.
- Lo C.M., Zhang Q., Callow N.V., Ju L.K., 2010, Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* Rut C30 using lactose as inducing substrate, *Process Biochem.*, 45(9), 1494-1503.
- Muthuvelayudham R., Viruthagiri T., 2007. Optimization and modelling of cellulase protein from *Trichoderma reesei* Rut C30 using mixed substrate, *Afr. J. Biotechnol.*, 6, 41-46.
- Nicholson C., Foody B., Foody P., Malloch E., Malloch L., Balon J., 1989, Proceedings 7th Canadian Bioenergy Seminar, Conseil national de recherches du Canada.
- Pakula T.M., Salonen K., Uusitalo J., Penttila M., 2005, The effect of specific growth rate on protein synthesis and secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*, *Microbiology-Sgm.*, 151, 135-143.
- Philippidis G.P. 1994, Cellulase Production Technology, In: *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production*, 566 ed. American Chemical Society, 188-217.
- Tolan J., Foody B., 1999, Cellulase from Submerged Fermentation, In: *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, 65 ed. Eds. Tsao G. et al., Springer Berlin / Heidelberg, Germany, 41-67.
- Velkovska S., Marten M.R., Ollis D.F., 1997, Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30, *J. Biotechnol.*, 54(2), 83-94.
- Warzywoda M., Ferre V., Pourquie J., 1988, Process for producing cellulolytic enzymes, US4762788, Institut Français du Pétrole, Rueil-Malmaison France, (patent).



Impact of rheology on the mass transfer coefficient during the growth phase of *Trichoderma reesei* in stirred bioreactors

J.-C. Gabelle^{a,c,d,e,*}, E. Jourdiere^b, R.B. Licht^b, F. Ben Chaabane^b, I. Henaut^b, J. Morchain^{c,d,e}, F. Augier^a

^a IFP Energies nouvelles, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize, France

^b IFP Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Préau, 92852 Rueil-Malmaison, France

^c Université de Toulouse; INSA, UPS, INP; LISBP, 135 Avenue de Ranguieu, F-31077 Toulouse, France

^d INRA, UMR792 Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France

^e CNRS, UMR5504, F-31400 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 December 2011

Received in revised form

6 March 2012

Accepted 30 March 2012

Available online 5 April 2012

Keywords:

Non-Newtonian fluids

Mass transfer

Bioreactors

Fermentation

Trichoderma reesei

Filamentous fungi

ABSTRACT

Submerged cultures of filamentous fungi are widely used in industry to produce a variety of economically important proteins, such as cellulase enzymes. One of the possible strategies to increase enzyme yields relies on enhancing biomass concentration before production. However, when biomass concentration is increased, the culture broth becomes highly shear-thinning, affecting both mixing and oxygen transfer.

Fungi and enzyme yields depend strongly on the ability to supply oxygen to the broth and, in consequence, scale-up considerations mainly focus on gas–liquid mass transfer predictions.

In this study, rheology and mass transfer are characterised during the growth of *Trichoderma reesei*. A power law model is proposed to simulate the rheology of the broth, based on a consistency index that depends on the concentration of the biomass.

Mass transfer coefficients measured during the growth phase in bioreactors of 3 and 20 L are compared to those measured with water and model fluids. As the value of power consumption is important for the mass transfer correlations, special care was devoted to validating its measurement in the larger vessel. Comparisons between experiments and recently developed correlations showed that the use of model fluids is a good way to investigate hydrodynamics and mass transfer inside large mock-ups. Good agreement was observed between mass transfer coefficients measured during the growth phase and those calculated using a correlation developed from model fluid experiments (Gabelle et al., 2011). The tools established here to estimate rheology and mass transfer during the *T. reesei* growth phase could be used in the future for cost estimation and process optimisation.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Filamentous fungi are widely used for the industrial production of enzymes and other proteins (Gibbs et al., 2000; Oolman et al., 1986; Nevalainen et al., 2005; McNeil and Harvey, 1993). Due to the nature of their filamentous growth form, mycelial suspensions are generally viscous and behave in a non-Newtonian manner because of interactions between the suspended filaments (Olsvik and Kristiansen, 1994; Metz et al., 1979). Rheology influences transport properties and results in poor oxygen mass transfer. This makes it difficult to achieve well-mixed and aerated suspensions.

* Corresponding author at: IFP Energies nouvelles, Process design and modeling division, Rond-point de l'échangeur de Solaize, BP 3, 69360 Solaize, France. Tel.: +33 4 37 70 21 42; fax: +33 4 37 70 20 08.

E-mail addresses: frederic.augier@ifpenergiesnouvelles.fr, jgabelle@gmail.com (J.-C. Gabelle).

Cellulase enzymes represent a significant part of the overall production costs for cellulosic ethanol (Wyman, 2003; Wyman, 2007). These enzymes are generally produced by the fungus *Trichoderma reesei*, which has a high secretion capacity (Tolan and Foody, 1999).

An efficient fermentation culture strategy was proposed by Warzywoda et al. (1983) based on the physiology of *T. reesei*, a fungus that produces biomass under excess sugar conditions and cellulases under sugar-limitation conditions. During the initial growth step on excess glucose, a high Oxygen Uptake Rate (OUR) is necessary to perform the fermentation culture, as mycelial cell growth strongly impacts the viscosity of the broth (Marten et al., 1996; Metz et al., 1979; Olsvik and Kristiansen, 1994; Kim et al., 1983).

In order to achieve growth and subsequent production of metabolites in aerobic fermentation, the system requires sufficient Dissolved Oxygen (DO) tension, especially during the growth phase (Papagianni, 2004). When dealing with filamentous

fungi, it is difficult to maintain non-zero DO concentrations, therefore, a high oxygen mass transfer coefficient, kla , is required.

For economic reasons, a high biomass concentration is needed in order to produce the required amount of cellulase enzymes. At high biomass concentration during the growth phase, the media becomes highly shear-thinning. The increase in viscosity leads to mass transfer and mixing limitations throughout the fermentation (Patel and Thibault, 2009; Schugerl, 1981), thereby negatively affecting the efficiency and productivity of the entire fermentation process (Vardar and Lilly, 1982; Kubicek et al., 1980).

To overcome the problem of oxygen mass transfer limitations, the logical first step would be to increase the stirrer speed and/or the gas flow rate. However, neither of these changes is ideal, since either would lead to an increase in both investment and operating costs. Furthermore, increasing agitation or gas flow rate can lead to (a) foaming problems and (b) shear damage (Ahamed and Vermette, 2010). Lejeune and Baron (1995) demonstrated that the enzyme production by *T. reesei* was negatively affected by the agitation rate. The effect of hydrodynamic conditions on the morphology of filamentous fungi has been addressed by many authors (Amanullah et al., 2000; Amanullah et al., 1999; Justen et al., 1996; Makagiansar et al., 1993; Smith et al., 1990; Patel et al., 2010; Patel et al., 2009) in both in-situ and ex-situ experiments. It is clear from the analysis of these papers that there is a strong link between hydrodynamics and morphology. However, the influence of the morphology on metabolite production is still not clear, and would need additional study for the specific case of the *T. reesei* strain.

1.1. Scale-up considerations

Since the biomass-to-ethanol conversion has not yet been demonstrated at an industrial scale, great attention must be paid to the scaling up of this process. The main challenge during scale-up is to achieve process yields comparable to those achieved in laboratory experiments. In general, the design of large-scale bioreactors is concerned with heterogeneity problems such as shear stress or substrate gradients (Bylund et al., 1998; George et al., 1998). Although a large number of studies have examined cellulase production, little has been done on the influence of operating conditions on oxygen mass transfer. Patel and Thibault (2009) used a dynamic method for the determination of the volumetric oxygen transfer coefficient during the fermentation of *T. reesei* and *A. niger*. For both fermentations, they reported a decrease of kla during growth for relatively low biomass concentrations (2–7 g L⁻¹). Using gas phase analysis, Schell et al. (2001) measured the volumetric oxygen transfer coefficient during the growth phase of *T. reesei* in various vessel sizes. They compared measured kla values with existing Newtonian and non-Newtonian correlations but without taking the change in rheological properties during the fermentation into account.

Marten et al. (1995) performed cellulase production using *T. reesei* in a 16 L fermentor. They focused on dynamic and oscillatory shear measurements, reporting a “gel-like” behaviour for all samples irrespective of the concentration and time. Marten et al. (1996) investigated the influence of agitation speed on enzyme productivity. At the lowest agitation rate (250 rpm) with air as the inlet gas, they observed oxygen limitation that induced slow growth and low enzyme productivity. However, in this study, the volumetric power draw was not measured and the prediction of kla was not discussed. Recently, Albaek et al. (2012) reported volumetric oxygen transfer coefficient measurements in a pilot scale vessel (550 L) used for enzyme production by *T. reesei*. A significant mass transfer decrease was observed with increasing broth viscosity. They proposed a correlation ($\pm 30\%$ accuracy) for the prediction of kla during the growth

phase that depends strongly on viscosity (power law coefficient of 0.50). However, the actual data on rheology and mass transfer were not reported for proprietary reasons.

It appears from a literature review that, in filamentous culture, oxygen mass transfer is closely linked to both rheology and biomass concentration. This phenomenon is still only partially understood, especially in the case of *T. reesei*. Correlations for the prediction of the volumetric oxygen transfer coefficient in this complex media are unsatisfactory, since both rheology and mass transfer measurements must be performed during the fermentation.

Whatever the fermentation strategy and operating conditions, the prediction of the mass transfer coefficient is of great importance for the scale-up of aerated bioreactors. As large-scale fermentation experiments are very expensive, hydrodynamic, and mass transfer studies can be done in a cold mock-up filled with model fluids that have similar rheological behaviour. Polymer solutions such as Carboxymethyl Cellulose (CMC) and Xanthan Gum (XG) are often chosen to mimic the fermentation broth of filamentous fungi (Pedersen et al., 1993; Pedersen et al., 1994; Allen and Robinson, 1991; Svihla et al., 1995). In the past, many correlations have been proposed to predict the kla in stirred reactors with complex fluids (Nishikawa et al., 1981; Kawase and Mooyoung, 1988; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Cooke et al., 1988). Correlations are generally based on power laws involving power consumption P/V , superficial gas velocity U_s , and the apparent viscosity of the media μ_a . Recently, it has been pointed out that existing correlations tend to underestimate the impact of scale-up on the volumetric oxygen transfer coefficient, and a consistent correlation based on measurements in 42 and 320 L reactors has been proposed (Gabelle et al., 2011). This correlation is based on measurements of solutions containing between 0 and 0.5% of XG or CMC for various impeller configurations.

The first objective for the scale-up of cellulase production at high *T. reesei* concentrations is to characterize the mass transfer and rheology during laboratory-scale fermentations. Therefore, the aim of this work is to measure gas–liquid mass transfer coefficients and rheology during the growth of *T. reesei* in two different laboratory bioreactors (3 and 20 L) at high biomass concentrations.

The results are analysed and compared to (a) mass transfer coefficients measured in model fluids and (b) existing kla correlations that include the effect of rheology.

Volumetric oxygen transfer coefficient values measured in water and during the fermentation are then discussed and compared with a recently developed correlation for non-Newtonian model media (Gabelle et al., 2011) and the correlations of Albaek et al. (2012) and Wang et al. (1979). Apparent viscosities in the broth are based on rheology measurements and the calculation of the mean shear rate in the reactors. Results are also compared with kla values measured in XG solutions in the 3 L bioreactor.

2. Materials and methods

As shown in Fig. 1, the mass transfer coefficient in complex fluids depends on aerated power draw, P_g , superficial velocity, U_s , and apparent viscosity μ_a . The superficial gas velocity is directly linked to the gas flow rate and the reactor cross section. Measuring P_g at such a small scale is rather difficult (Ascanio et al., 2004). For this work, we verified that the power consumption estimated from torque measurements was sufficiently accurate to be used in the correlation to predict the kla in water. To do this, we compared the experimental mass transfer measurements to the predicted values from the correlation for air–water systems (Gabelle et al., 2011). Once gassed power number (N_{pg}) had been

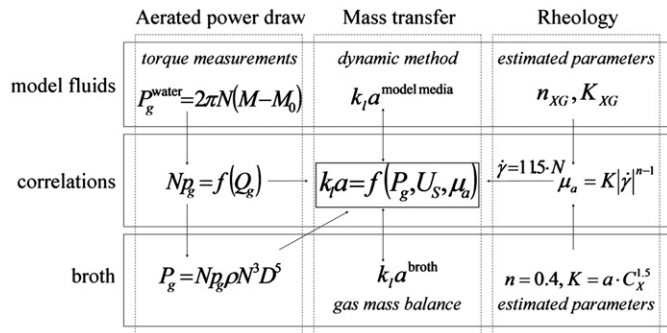


Fig. 1. Diagram of the structure of the paper.

validated from water measurements, an accurate estimate of power consumption could be obtained regardless of the media, i.e. in fermentation broths, as proposed by Gabelle et al. (2011). The apparent viscosity was calculated from rheological parameters at the mean shear rate. The changes in rheological parameters and biomass concentration with time were determined on samples collected during the fermentation. Model fluids were chosen to mimic the rheological behaviour of the broth in the range of the shear rate expected in the bioreactor. This methodology made it possible to compare the mass transfer in real biological media to that in non-Newtonian model fluids.

2.1. Theoretical aspects

2.1.1. Gas–liquid mass transfer

The rate of change of the oxygen concentration C_L in a liquid phase is given by the general expression:

$$\frac{dC_L}{dt} = kla(C^* - C_L) - OUR \quad (1)$$

where C^* is the oxygen concentration at saturation, kla is the volumetric mass transfer coefficient, and OUR is the oxygen uptake rate.

2.1.1.1. Without oxygen consumption. When OUR is zero (no biological reaction, i.e. water or model fluids), C_L follows a first order equation:

$$\frac{dC_L}{dt} = kla(C^* - C_L). \quad (2)$$

The volumetric mass transfer coefficient can be determined by a dynamic technique described by other authors (de Figueiredo and Calderbank, 1979; Cabaret et al., 2008; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Garcia-Ochoa et al., 2010).

2.1.1.2. With oxygen consumption. When oxygen uptake rate changes slowly with time (the general case for the study of biological reactions), a quasi-steady-state approximation is applied, in which the rate of change of the oxygen concentration is assumed to be zero. In this case, the oxygen transfer rate and oxygen uptake rate are equal

$$kla(C^* - C_L) = OUR \quad (3)$$

and the OUR can be determined by a gas phase mass balance under steady-state conditions

$$F_{O_2}^{\text{in}} - F_{O_2}^{\text{out}} - VOUR = 0 \quad (4)$$

where F^{in} and F^{out} are the molar flow rates measured at the bioreactor inlet and outlet.

2.1.1.3. Mass transfer prediction. Different correlations are available in the literature concerning the calculation of volumetric mass transfer coefficients. In water, the kla is usually correlated to gassed power input per unit volume, P_g/V and superficial gas velocity, U_s :

$$k_l a = C \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha U_s^\beta \quad (5)$$

Wang et al. (1979) proposed a correlation in the form of Eq. (5) with $C=0.034$, $\alpha=0.33$, and $\beta=0.56$ for non-Newtonian fungal cultivation in stirred vessels ranging from 20 L to 30 m³. However, this correlation does not consider the effect of viscosity changes during the fermentation. Albaek et al. (2012) established a correlation that includes viscosity effects for kla prediction during the growth of *T. reesei* with two types of impellers in a 550 L fermentor. They reported a surprisingly small effect of gassing rate on mass transfer:

$$k_l a (h^{-1}) = 0.88 \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.50} U_s^{0.15} \mu_a^{-0.50}. \quad (6)$$

Gabelle et al. (2011) proposed a different correlation for kla prediction that is valid for a large range of apparent viscosities and vessel sizes (20–340 L):

$$k_l a (h^{-1}) = 83 \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0.44} U_s^{0.47} \left(1 + \frac{\mu_a}{\mu_c} \right)^{-1}. \quad (7)$$

This correlation was established in water and polymer (XG and CMC) model media. For the mass transfer coefficient calculation in water, the apparent viscosity in Eq. (7) is replaced by the water viscosity value.

2.1.2. Gassed power number

In order to calculate the mass transfer coefficient with these correlations, it is important to know the gassed power draw or/and gassed power number precisely. The power number is not constant in the presence of gas bubbles. When air is sparged into an aerated vessel, low-pressure air-filled cavities are formed. This phenomenon results in a decrease in the efficiency of the stirrer and the power number decreases with increasing aeration rate. Np_g is calculated by

$$Np_g = \frac{P_g}{\rho N^3 D^5}. \quad (8)$$

According to Paul et al. (2004), Np_g depends on the geometry of the tank, scale, clearance, D/T ratio, and type of stirrer. Besides, Gabelle et al. (2011) proved that, in the dispersion regime for a certain range of viscosities (similar to this work), Np_g is independent of rheology.

2.1.3. Rheological models

$$\mu_a = K|\dot{\gamma}|^{n-1}. \quad (9)$$

The Oswald de Waele model was chosen for the prediction of apparent viscosity (see Eq. (9)) and rheological data were fitted in the range of 10–1000 s⁻¹.

2.1.4. Apparent viscosity and shear rate calculation

Apparent viscosity was extracted from flow curves at the mean shear rate in the reactor. This was done with the classical Metzner–Otto correlation (Metzner and Otto, 1957):

$$\dot{\gamma} = 11.5N. \quad (10)$$

This correlation was established in the laminar regime but is also widely used in the turbulent regime. Gabelle et al. (2011) reviewed different correlations from the literature concerning the average shear rate calculation. The correlations were found to have little effect on the fitting parameters for mass transfer prediction.

2.2. Experimental apparatus

Experiments were carried out in two bioreactors of 3 and 20 L (working volume 2.5 and 13 L, respectively) (see Fig. 2).

2.2.1. 3 L bioreactor

The 3 L reactor had a double flux-specific impeller from Rayneri Co ($D=0.078$ m). The bioreactor had an inner diameter, T , of 0.14 m and a liquid height, H , of 0.22 m. The 3 L reactor was equipped with 5 long, vertical cylinders as baffles. A cooling device with two tubes was placed around the impeller, as can be seen in Fig. 2. The maximum stirring velocity was 1500 rpm. An air injection flow rate of 1 L min^{-1} was used during the fermentation.

2.2.2. 20 L bioreactor

In the 20 L reactor, agitation was provided by a multiple stirrer system with one baffle. It contained one Rushton turbine ($D/T=0.4$) located 6 cm from the tank bottom and one pitched-blade turbine ($D/T=0.4$) at the upper stage. The bioreactor had an inner diameter of 0.25 m and an aspect ratio of $H=2 T$. Agitation speed was varied from 500 to 1200 rpm. Compressed air was supplied by a ring sparger, with a flow rate that could be varied from 0.3 to $2 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (0.2 – 2 vvm). Two other agitation systems were used for the validation of the volumetric oxygen transfer coefficient in water: the same agitation system with three baffles instead of one, and a dual pitched-blade system with one baffle. The torque was measured with a T22/10 N m torque metre (HBM Inc., Marlborough, MA, USA).

2.3. Fermentation conditions

2.3.1. Strain

T. reesei strain CL847 was used in this study (Durand et al., 1988).

2.3.2. Culture medium and cultivation conditions

The composition of the culture medium is as follows: KOH: 1.66 g/L; H_3PO_4 85%: 2 mL; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: 2.8 g/L; MgSO_4 , $7\text{H}_2\text{O}$:

0.6 g/L; CaCl_2 , $2\text{H}_2\text{O}$: 0.6 g/L; Solution A: 2.5 mL. The composition of Solution A was as follows: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 10 g/L; $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$: 9 g/L; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$: 3.2 g/L; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 2.8 g/L.

The inoculum was prepared by transferring 1×10^7 spores into a flask containing 250 mL of the culture medium (glucose 30 g/L). Three flasks were used in the case of the 20 L bioreactor. The preculture was grown for 72 h at 30°C with 150 rpm shaking. The preculture was transferred to the bioreactor, resulting in a final volume of 2.5 L for the 3 L bioreactor and 13 L for the 20 L bioreactor. The cultivation in the bioreactors was carried out at 27°C . The pH was kept at 4.8 by adding NH_3 at 5.5 N.

2.3.3. Analysis of the culture

Residual glucose was measured using HPLC (Varian) with an HPX-87P column (at 85°C). Dry weight was measured by filtration (with a WATTMANN[®] GF/C membrane $1.2 \mu\text{m}$) followed by drying at 105°C .

2.4. Model fluid

Solutions of Xanthan gum (0.25, 0.5 and 1%) (G1253 Sigma supplied by Sigma Aldrich Co, St. Louis) were used as model fluids to mimic the fermentation broth. Sodium azide (0.02%) was used as a biocide. The solution was stirred until complete dissolution was reached, and then left for 24 h without any mixing to complete the polymer hydration. Power law constants of XG solutions' rheology are presented in Table 1.

2.5. Gas-liquid mass transfer

2.5.1. In water and model fluids

The volumetric mass transfer coefficient in both water and model media was determined by the dynamic technique (de Figueiredo and Calderbank, 1979; Cabaret et al., 2008;

Table 1
Rheological properties of model media fitted to Eq. (9).

Medium	n	K (Pa s^n)
0.25% Xanthan gum	0.37	0.48
0.5% Xanthan gum	0.26	3.34
1% Xanthan gum	0.19	9.52

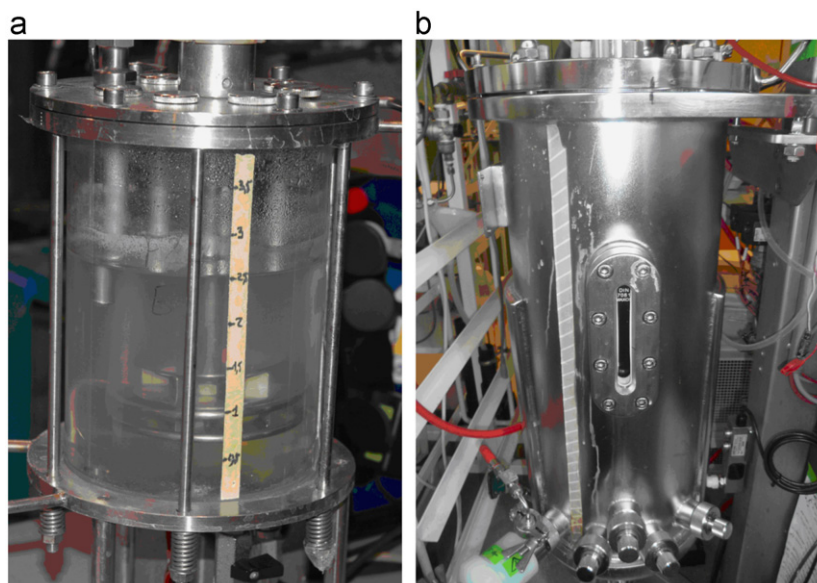


Fig. 2. Bioreactors used in this work: left 3 L bioreactor and right 20 L bioreactor.

García-Ochoa and Gomez, 2009; García-Ochoa et al., 2010). First, nitrogen was introduced in order to eliminate oxygen dissolved in the liquid phase. Then, the liquid was aerated with air until oxygen saturation was reached. The dissolved oxygen concentration was recorded as a function of time using a fast oxygen micro sensor (Ox 100 fast; Unisense, Aarhus, Denmark). The response time of the probe depends on the diffusion coefficient of the liquid. As the diffusion coefficients of model fluids and water are very similar Ho et al. (1988), the model fluid response times were found to be the same as those of water (less than 2.5 s). The kla was determined using Eq. (2).

2.5.2. In fermentation with *T. reesei*

The volumetric oxygen transfer coefficient was calculated according to Eq. (3). C_L was measured using a dissolved oxygen probe (InPro 6820 series, Mettler Toledo, Urdorf, Switzerland). $F_{O_2}^{out}$ was measured using a gas analyser: COSMA Beryl 102 (3 L bioreactor) or Bluesens gas sensor GmbH BCP O2 (20 L bioreactor). $F_{O_2}^{in}$ was measured twice, once just before inoculation and again at the end of the experiment.

2.6. Gassed power draw

The torque was measured using a torque metre and the aerated power consumption was calculated according to:

$$P_g = 2\pi N(M - M_0) \quad (11)$$

where the minimum torque M_0 is subtracted to account for power losses in the motor, gearbox, bearings, and seals. For all measurements, the velocity was set to the maximum speed (1200 rpm) to minimise measurement error.

2.7. Rheology

The rheological tests were performed on a commercial controlled stress rheometer (AR2000 from TA Instruments). To ensure accuracy and uniform shear rate, a large 6 cm cone and plate geometry was preferable. Some measurements were also made using a FANN rheometer model 286 with a concentric cylinder geometry for comparison. This geometry was also

suitable, but would have required a larger sample volume. Tests made with a vane and cup geometry led to unstable measurements; this geometry was therefore rejected.

With the cone and plate geometry, increasing logarithmic shear rate sweeps (from 0.1 to 1000 s^{-1}) were applied, followed by subsequent decreasing shear rate sweeps (from 1000 to 0.1 s^{-1}). Each step lasted 3 min and was done at 27 °C. The first flow curves involved intact samples, whereas the second ones concerned sheared samples. In fact, the various pre-shear histories of the samples (either 100 s^{-1} for 1 min or 200 s^{-1} for 1 min) were equivalent and led to the same flow curves. As the growth of *T. reesei* in a bioreactor took place under stirring conditions, the rheological results are focused on sheared samples during the decreasing shear rate sweep, which are considered to be the most representative.

3. Results and discussion

3.1. Fermentation

Growth cultivation of *T. reesei* in 3 L bioreactor is first performed with initial glucose concentrations of 55 $g L^{-1}$, then in order to reach higher biomass concentration, cultivation in 20 L bioreactor is performed with 90 $g L^{-1}$ initial glucose concentration. The exhaustion of glucose was achieved after 50 h in the 3 L bioreactor and 65 h in the 20 L bioreactor, corresponding to maximum biomass concentrations of 22 and 30 $g L^{-1}$, respectively. The quasi-exponential growth characteristic of filamentous fungi (Nielsen and Villadsen, 1992) was observed in both bioreactors (see Fig. 3). The mean specific growth rate of biomass is found to be approximately 0.07 h^{-1} in both bioreactors, which is consistent with this strain physiology. Regarding morphology, any pellet form is observed, mycelium was under dispersed forms in both bioreactors, with free mycelia and weak clumps.

In the 20 L bioreactor, an effort was made to maintain the Dissolved Oxygen (DO) above 20%. First, the aeration rate was held at a constant value of 1.0 vvm and agitation speed was increased from 400 to 1000 rpm. Then, to compensate for the high oxygen demand, the aeration rate was increased to 1.7 vvm. However, even at this aeration and the maximum agitation speed

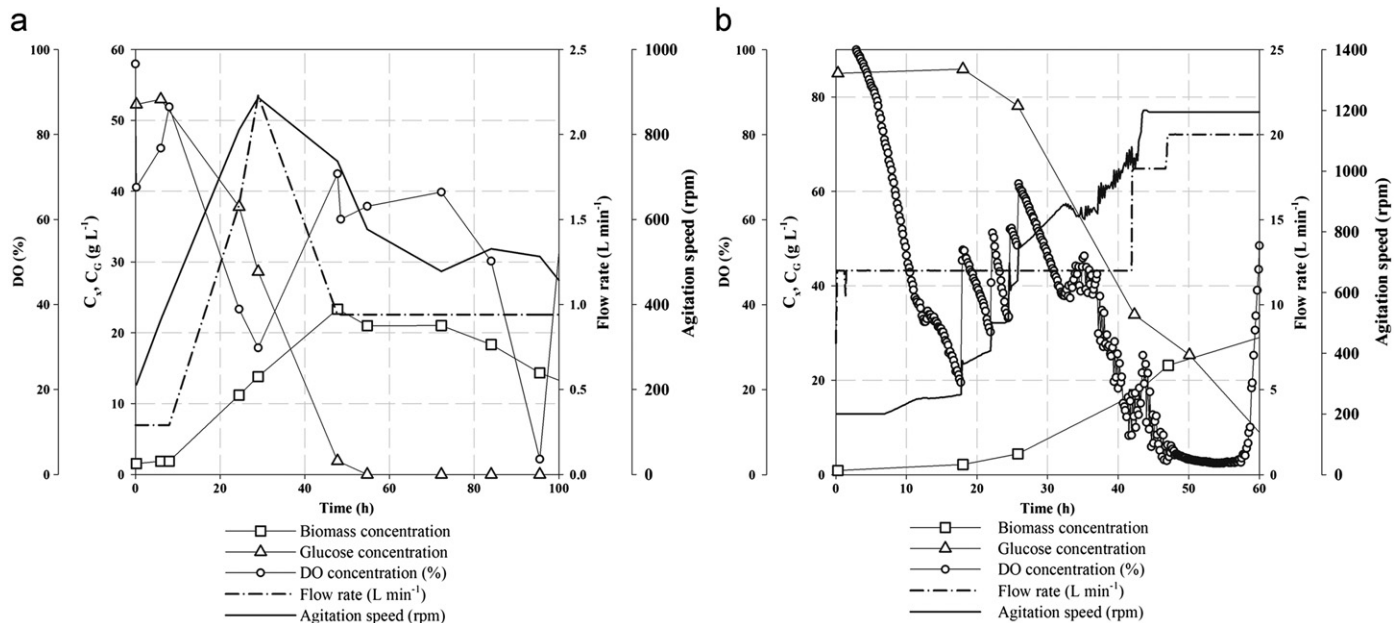


Fig. 3. Data from *T. reesei* fermentation in the 3 L bioreactor. Data from *T. reesei* fermentation in the 20 L bioreactor.

of 1200 rpm, an insufficient amount of oxygen was transferred to the culture and the DO concentration remained low for 10 h until glucose exhaustion. No effect was observed on morphology.

3.2. Rheology measurements

In Figs. 4 and 5, apparent viscosities at different culture times are reported for the 3 and 20 L bioreactors. Measurements were performed using a decreasing shear rate. At the beginning of the fermentation ($t=0$ h), the broth was Newtonian and had a constant apparent viscosity of 2.5×10^{-3} Pa.s. Subsequently, it can be observed that the fermentation broth became more shear-thinning with time. In Fig. 4(a), the enzyme production step began around $t=46$ h. This explains why the broth became less viscous after $t=46$ h. In Fig. 4(b), only the growth phase is investigated. It can be noted that there are two slopes in the graph. When the samples are not pre-sheared, there is a “gel-like” behaviour and the measurements are not consistent.

Fig. 5 shows the effect of pre-shearing and a constant slope is observed. In addition, samples measured with the concentric cylinder geometry gave relatively good agreement with the cone and plate geometry. The apparent viscosities of the XG 0.25% and XG 0.5% are also compared with culture broth samples at different times during the fermentation. XG 0.25% flow curves are similar to those of the culture broth for times shorter than 46 h. Although the slope is too steep ($n=0.26$), the XG 0.5% curve is a reasonable representation of the culture broth at the end of the growth phase for low shear rates $< 200 \text{ s}^{-1}$.

In Fig. 6, the apparent viscosities at three shear rates are plotted against time during the growth phase in the 20 L bioreactor. From this graph, it appears that the evolution of apparent viscosity during fungal cell growth proceeds in three stages. Between $t=20$ and 40 h, the apparent viscosity remains constant as biomass concentration increases from 2 to 9 g L^{-1} . From $t=40$ to 50 h, there is a rapid rise in apparent viscosity corresponding to an increase in biomass concentration. After $t=55$ h, the increase of apparent viscosity is less pronounced, and a maximum is reached at $t=85$ h.

First, both rheological parameters K and n were estimated with data regression. The flow behaviour index (n) was found to be constant (0.4 ± 0.1) for biomass concentrations higher than 7 g L^{-1} . This corresponds to data for other filamentous fungi (Riley et al., 2000; Pedersen et al., 1993) and may also be valid for *T. reesei*. Then, assuming a value of $n=0.4$, the consistency index (K) was predicted. In Fig. 7, K is plotted as a function of

biomass concentration. It varies as biomass concentration to the power 1.5

$$K = \begin{cases} a_1 X^{1.5}, & X \in [1.30 \text{ g L}^{-1}] \\ a_2 \end{cases} \quad (12)$$

In the literature, values between 1.5 and 2.9 (see Table 2) are reported (Olsvik and Kristiansen, 1994; Petersen et al., 2008). The consistency index should actually depend on a variety of parameters including roughness, compactness, and dimension of the clumps. However, these types of measurements were not made in this study. Due to the large variation in the consistency index value, K is reported as a function of two constants in Eq. (12). The values are $a_1=9 \times 10^{-3}$ and $a_2=3 \times 10^{-2}$.

3.3. Mass transfer measurements

Kla measurements were performed on both the 3 and 20 L bioreactors. In the smaller reactor, it was not relevant to use or fit mass transfer coefficients because of the impact of the gas–liquid area at the top of the reactor. Effective superficial gas velocity was difficult to estimate because of the presence of a vortex at the

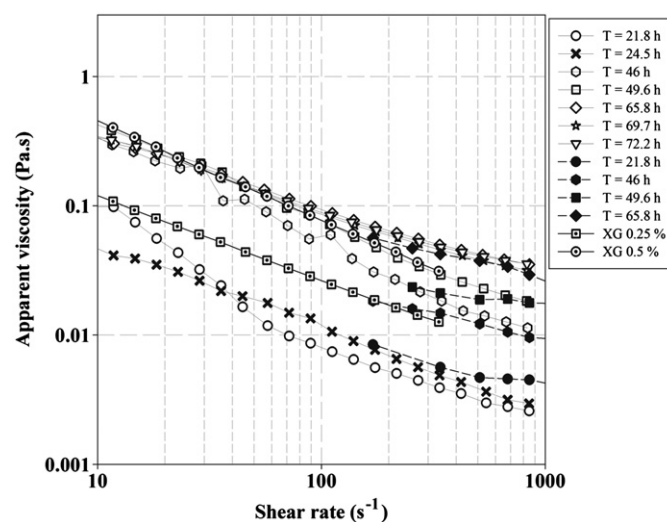


Fig. 5. Flow curves at different times during the fermentation in the 20 L bioreactor with an increasing shear rate. Filled symbols refer to measurements performed with the concentric cylinder geometry. Hollow symbols refer to the cone and plate geometry.

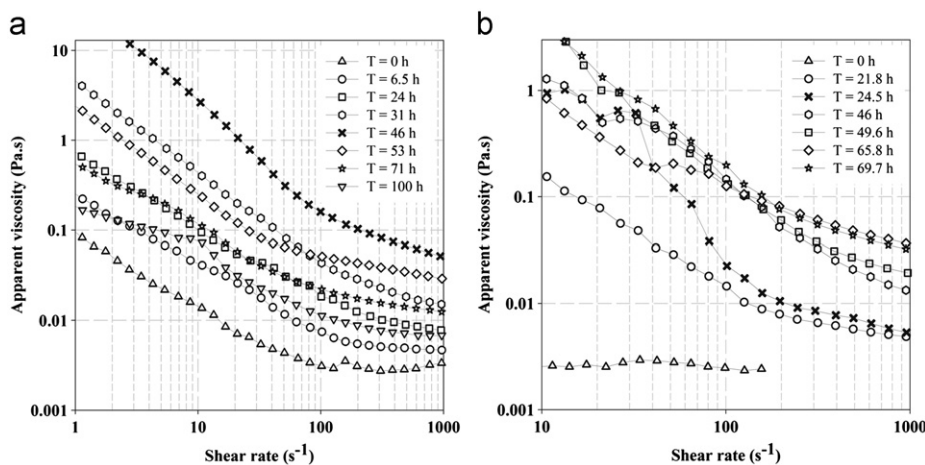


Fig. 4. Flow curves at different times during the fermentation: (a) in the 3 L bioreactor and (b) in the 20 L bioreactor (cone and plate geometry) with a decreasing shear rate.

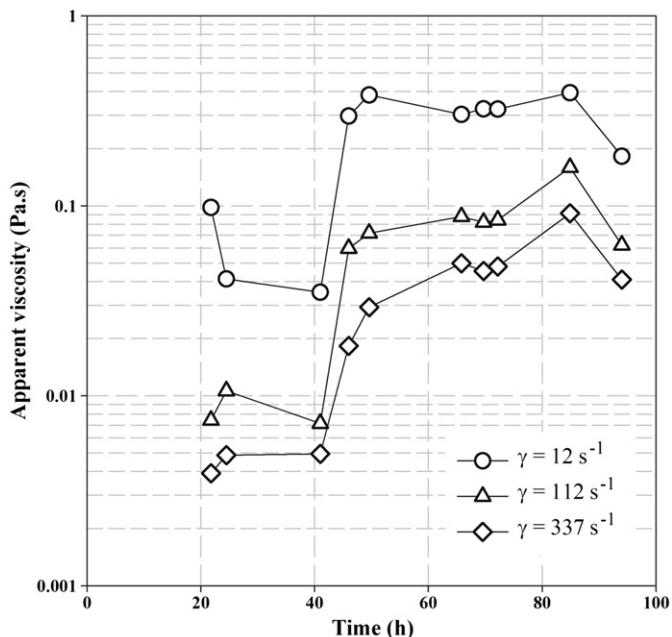


Fig. 6. Apparent viscosity during the growth phase for three shear rates (cone and plate geometry).

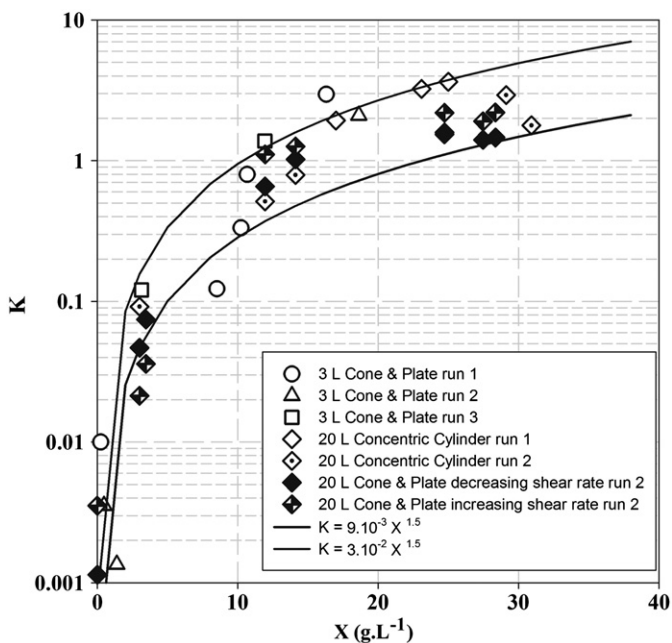


Fig. 7. Evolution of the consistency index with the biomass concentration.

Table 2
Value of power in Eq. (12) for a variety of fungi.

Source	Exponent in Eq. (12)	Organism
Albaek et al. (2011)	1.5–1.56	<i>A. oryzae</i>
Olsvik et al. (1993)	1.7	<i>A. niger</i>
Riley et al. (2000)	2.9	<i>P. chrysogenum</i>

interface, which made the use of classical correlations inappropriate. Therefore, kla measurements in the 3 L bioreactor were directly compared with measurements made for model fluids (XG solutions) of various concentrations in order to estimate the mass transfer decrease due to the changing rheology.

In the bigger reactor (20 L), mass transfer correlations were more suitable, and the torque measurement could be used to check the power consumption. This made it easier to validate correlations using air–water measurements.

3.3.1. Measurements in 3 L bioreactor

kla measurements were performed in the bioreactor at different times during the fermentation of *T. reesei*. They are reported in Fig. 8 versus the agitation rate (P_g was not appropriate in the 3 L bioreactor), which was constantly adjusted during the fermentation to keep DO concentrations high. Measurements were compared with volumetric oxygen transfer coefficient measurements made in water and XG solutions of different concentrations. The results show different interesting regimes. At first, the value of kla in the fermentation broth is very high, close to its value in water. After 20 h, the kla is approximately half its value in water, closer to its value in the 0.25% XG solutions. The highest kla values occur between 25 and 48 h, during which time the fungus has a high OUR, resulting in high stirring rates. After 50 h, the volumetric oxygen transfer coefficient decreases, and the behaviour of the broth is again similar to that of water. The comparison between the broth and the model fluids demonstrates the decrease in kla induced by rheology, and shows that the kla value is lower in the culture broth than in water.

3.3.2. Measurements in 20 L bioreactor

3.3.2.1. Validation of power number measurements. The gassed power number of the 20 L bioreactor was determined using water for a large range of flow rates (0 to 40 L min⁻¹). It can be expressed as

$$Np_g = 1.5 - 0.0106Q_g(L\text{min}^{-1}). \quad (13)$$

Typical values of gassed power number were relatively low (~ 1.5) for a dual impeller configuration. This can be explained by the relatively small distance between the two impellers (Hudcova et al., 1989) and the non-standard geometry of the tank (one baffle). At maximum aeration rate, the power was reduced by 30% of the unaerated power number.

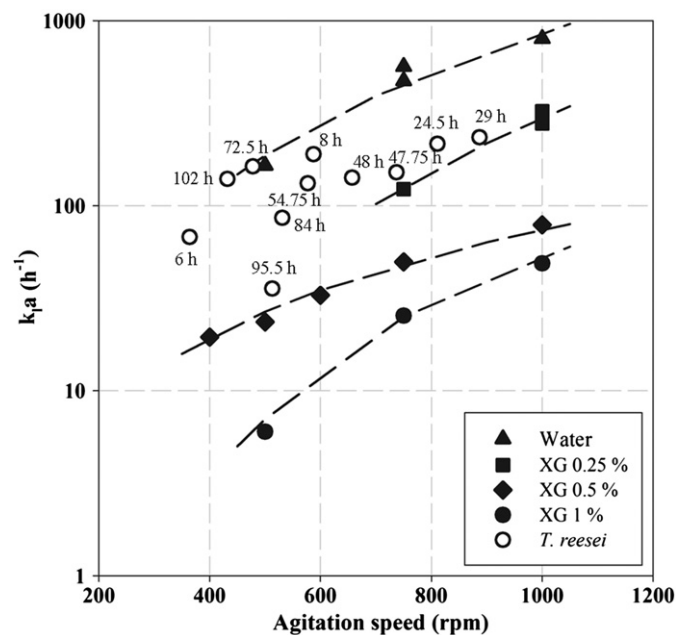


Fig. 8. Comparison between kla measured in the 3 L bioreactor and kla measured in non-Newtonian solutions.

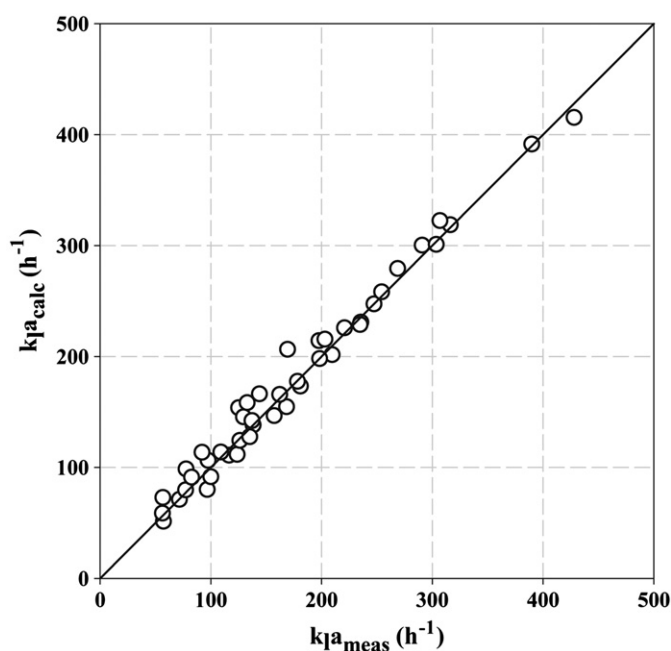


Fig. 9. Parity diagram of k_{La} measured in water and predicted from the correlation of Gabelle et al. (2011) for three configurations tested in the 20 L reactor.

Dynamic mass transfer experiments were used to characterize the reactor and to validate power number measurements. In Fig. 9, the volumetric oxygen transfer coefficient in water is shown for the three agitation systems described earlier, and the values are compared with the k_{La} values predicted by the correlation (Eq. (7)) (Gabelle et al., 2011). Good agreement is found between the measured k_{La} values and those predicted by the correlation. The average error is about 7%. This result indicates that the power number measurement was accurate. As found in Gabelle et al. (2011), the Np_g measured in water was close to the value obtained in non-Newtonian liquids (in the turbulent regime), so P_g measured in water could be used to calculate aerated power draw (P_g) during the fermentation.

3.3.2.2. Volumetric oxygen transfer coefficient measurements during growth phase. As shown in Fig. 3b, the rates of aeration and agitation were chosen in order to maintain the DO at a high value ($\sim 40\%$) during the first part of the growth. After $t=40$ h, even when both agitation and aeration were at their maximum values, the OUR was so high that the DO fell to a low value at $t=50$ h. In Fig. 10, the k_{La} measured by the gas phase analysis is plotted against time during the growth phase. The k_{La} increased up to 40 h, since the agitation rate was increased in order to maintain a DO higher than 20%. Before $t=25$ h, the k_{La} predicted by the water correlation did not agree with the k_{La} measured by the gas balance method. This was due to the presence of glucose ($\sim 80 \text{ g L}^{-1}$) and low biomass concentration ($\sim 1\text{--}2 \text{ g L}^{-1}$). Moreover, the precision of the mass transfer measurement was not sufficiently high at the beginning of the culture (F^{in} and F^{out} were similar in value). At $t=40$ h, the maximum aeration rate (20 L min^{-1}) and agitation speed (1200 rpm) were reached. At that time, the biomass concentration was approximately 12 g L^{-1} . Between $t=40$ and 55 h, the volumetric mass transfer coefficient decreased from 200 to 150 h^{-1} and the biomass concentration increased from 12 to 25 g L^{-1} . During this time the broth became more shear-thinning, which demonstrates that the rheology of the broth clearly affected mass transfer efficiency. At $t=55$ h, the volumetric oxygen transfer coefficient value predicted by the

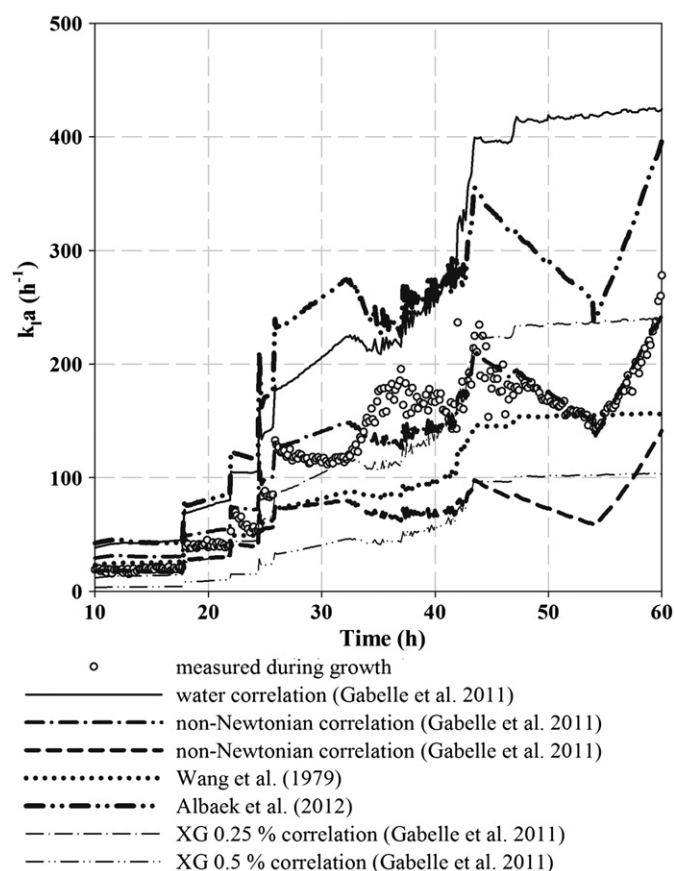


Fig. 10. Comparison between k_{La} measured during the growth phase and k_{La} predicted by correlations.

correlation established in water and validated in the same reactor was 2.5 times higher than the measured k_{La} . The non-Newtonian correlation using the constant a_2 in Eq. (12) underestimated the volumetric oxygen transfer coefficient by 50%. On the other hand, when the parameter a_1 in Eq. (12) was used for the apparent viscosity prediction, the measured k_{La} was in good agreement with the volumetric oxygen transfer coefficient predicted by the non-Newtonian correlation. At the end of the growth phase ($t=55$ h), the filamentous fungi partly changed to spores, which had lower viscous flow properties (Marten et al., 1995). Consequently, an increase in k_{La} was observed. The change in k_{La} value was well predicted by the non-Newtonian correlation. The correlation of Wang et al. (1979) (Eq. (5)) underestimated the volumetric oxygen transfer coefficient during the first part of the growth phase, but predicted a value similar to the measured value at the end of the biomass growth phase. The correlation of Alback et al. (in press) (Eq. (6)) accurately followed the trend of the k_{La} curve but this correlation overestimated the measured k_{La} . In Fig. 10, volumetric oxygen transfer coefficient values for the model fluids (XG solutions of 0.25% and 0.5%) are also reported. These values were estimated from the Eqs. (7) and (9) and Table 1. Comparison with model fluids shows that the broth behaves roughly like solutions with 0.25% XG, except at the end of the growth phase where the k_{La} decreases continuously and tends toward the behaviour of XG 0.5% solutions.

4. Conclusions and perspectives

Growth of *T. reesei* in two laboratory scale bioreactors has been investigated in terms of biomass growth, mass transfer, and

rheology. A comparison is proposed between mass transfer in the broth, the available correlations, and measurements in XG solutions.

Rheology measurements in the broth are complex, and depend both on the method used and the conditioning of the sample before measurements are taken. Nevertheless, it has been found that rheology during the growth phase can be approximated by a power law, for which the consistency index (K) evolves as a function of the biomass concentration to the power 1.5.

Gas–liquid mass transfer is strongly impacted by the rheology of the media, especially when biomass concentration exceeds approximately 15 g L^{-1} . In this work, mass transfer correlations were only used to test if the effects of operating conditions and rheology could be predicted. The correlation of Gabelle et al. (2011), established in model fluids, tends to underestimate the oxygen mass transfer because it does not take the composition of the fluid into account. It seems that not only does the apparent viscosity plays an important role in decreasing mass transfer in the culture broth, but the biomass structure also affects mass transfer and should be investigated in future work. Moreover, it is known that, depending on the fermentation strategy, the micro-organisms are able to produce surfactants (Blijdenstein et al., 2010; Bailey et al., 2002) that can also impact mass transfer. In addition, large salt concentrations in the culture medium can improve mass transfer, and may help explain why model media tend to underestimate mass transfer during the fermentation.

In this study, we have shown that an easy way to investigate the hydrodynamics and mass transfer in the culture medium is to use XG solution as a model fluid. This model fluid could be preferred to real broth when studying the reactor design or hydrodynamics. The tools developed in this study can also be applied to overcome problems associated with filamentous cultures. In the future, cold mock-ups of hundreds of litres will be used to test reactor configurations in order to study the scale-up of cellulase production.

Notations

a_1	constant in Eq. (12)
a_2	constant in Eq. (12)
C	constant in Eq. (5)
C_L	oxygen concentration in the liquid (mol m^{-3})
C^*	oxygen concentration at the gas–liquid interface (mol m^{-3})
D	stirrer diameter (m)
F	molar flow rate (mol s^{-1})
H	liquid height (m)
kla	oxygen mass transfer coefficient (s^{-1})
K	consistency index (Pa s^n)
M	torque (N m)
M_0	torque due to gearbox, bearings and seals (N m)
N	stirring rate (s^{-1})
N_{pg}	gassed power number (–)
n	flow behaviour index (–)
OUR	Oxygen Uptake Rate ($\text{mol m}^{-3} \text{ s}^{-1}$)
P	unaerated power consumption (W)
P_g	aerated power consumption (W)
P_g/V	specific power input (W m^{-3})
Q_g	gas flow rate ($\text{m}^3 \text{ s}^{-1}$)
U_s	superficial gas velocity (m s^{-1})
T	tank diameter (m)
t	time (s)
V	volume (m^3)
X	biomass concentration (g L^{-1})

Greek letters

α	constant in Eq. (5)
β	constant in Eq. (5)
γ	shear rate (s^{-1})
μ_a	apparent viscosity (Pa s)
μ_c	critical viscosity (Pa s)
ρ	density (kg m^{-3})

Acknowledgement

This work was supported by the French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and IFP Energies Nouvelles.

References

- Ahamed, A., Vermette, P., 2010. Effect of mechanical agitation on the production of cellulases by *Trichoderma reesei* RUT-C30 in a draft-tube airlift bioreactor. *Biochemical Engineering Journal* 49 (3), 379–387.
- Albaek, M.O., Gernaey, K.V., Hansen, M.S., Stocks, S.M., 2011. Modeling enzyme production with *Aspergillus oryzae* in pilot scale vessels with different agitation, aeration, and agitator types. *Biotechnology and Bioengineering* 108 (8), 1828–1840.
- Albaek, M.O., Gernaey, K.V., Hansen, M.S., Stocks, S.M., 2012. Evaluation of the energy efficiency of enzyme fermentation by mechanistic modeling. *Biotechnology and Bioengineering* 109, 950–961.
- Allen, D.G., Robinson, C.W., 1991. The prediction of transport parameters in filamentous fermentation broths based on results obtained in pseudoplastic polymer-solutions. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 69 (2), 498–505.
- Amanullah, A., et al., 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Engineering Journal* 5 (2), 109–114.
- Amanullah, A., Blair, R., Nienow, A.W., Thomas, C.R., 1999. Effects of agitation intensity on mycelial morphology and protein production in chemostat cultures of recombinant *Aspergillus oryzae*. *Biotechnology and Bioengineering* 62 (4), 434–446.
- Ascanio, G., Castro, B., Galindo, E., 2004. Measurement of power consumption in stirred vessels—A review. *Chemical Engineering Research & Design* 82 (A9), 1282–1290.
- Bailey, M., et al., 2002. Process technological effects of deletion and amplification of hydrophobins I and II in transformants of *Trichoderma reesei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 58, 721–727.
- Blijdenstein, T.B.J., Groot, P.W.N. de, Stoyanov, S.D., 2010. On the link between foam coarsening and surface rheology: Why hydrophobins are so different. *Soft Matter* 6 (8), 1799–1808.
- Bylund, F., Collet, E., Enfors, S., Larsson, G., 1998. Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 18 (3), 171–180.
- Cabaret, F., Fradette, L., Tanguy, P.A., 2008. Gas–liquid mass transfer in unbaffled dual-impeller mixers. *Chemical Engineering Science* 63 (6), 1636–1647.
- Cooke, M., Middleton, J.C., Busch, J.R. 1988. Mixing and mass transfer in filamentous fermentations. In: *Proceedings of the Second International Conference Bioreactor fluid dynamics*, Cranfield, UK.
- Durand, H., Clanet, M., Tiraby, G., 1988. Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production. *Enzyme and Microbial Technology* 10 (6), 341–346.
- de Figueiredo, M.M.L., Calderbank, P.H., 1979. The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chemical Engineering Science* 34 (11), 1333–1338.
- Gabelle, J.-C., Augier, F., Carvalho, A., Rousset, R., Morchain, J., 2011. Effect of tank size on kla and mixing time in aerated stirred reactors with nonnewtonian fluids. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 89 (5), 1139–1153.
- García-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances* 27 (2), 153–176.
- García-Ochoa, F., Gomez, E., Santos, V.E., Merchuk, J.C., 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal* 49 (3), 289–307.
- George, S., Larsson, G., Olsson, K., Enfors, S.O., 1998. Comparison of the baker's yeast process performance in laboratory and production scale. *Bioprocess Engineering* 18, 135–142.
- Gibbs, P.A., Seviour, R.J., Schmid, F., 2000. Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions. *Critical Reviews in Biotechnology* 20 (1), 17–48.
- Ho, C.S., Ju, L.K., Baddour, R.F., 1988. The anomaly of oxygen diffusion in aqueous xanthan solutions. *Biotechnology and Bioengineering* 32, 8–17.
- Hudcova, V., Machon, V., Nienow, A.W., 1989. Gas–liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers. *Biotechnology and Bioengineering* 34 (5), 617–628.

- Justen, P., Paul, G.C., Nienow, A.W., Thomas, C.R., 1996. Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and Bioengineering* 52 (6), 672–684.
- Kawase, Y., Mooyoung, M., 1988. Volumetric mass-transfer coefficients in aerated stirred tank reactors with Newtonian and non-Newtonian media. *Chemical Engineering Research and Design* 66 (3), 284–288.
- Kim, J.H., Lebeault, J.M., Reuss, M., 1983. Comparative-study on rheological properties of mycelial broth in filamentous and pelleted forms. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 18 (1), 11–16.
- Kubicek, C.P., Zehentgruber, O., El-Kalak, H., Rohr, M., 1980. Regulation of citric acid production by oxygen: Effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 9 (2), 101–115.
- Lejeune, R., Baron, G.V., 1995. Effect of agitation on growth and enzyme production of *Trichoderma reesei* in batch fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology* 43 (2), 249–258.
- Makgiansar, H.Y., Shamlou, P.A., Thomas, C.R., Lilly, M.D., 1993. The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Engineering* 9 (2–3), 83–90.
- Marten, M.R., Velkovska, S., Khan, S.A., Ollis, D.F., 1995. Steady and dynamic shear characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51–52, 319–328.
- Marten, M.R., Velkovska, S., Khan, S.A., Ollis, D.F., 1996. Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. *Biotechnology Progress* 12 (5), 602–611.
- McNeil, B., Harvey, L.M., 1993. Viscous fermentation products. *Critical Reviews in Biotechnology* 13 (4), 275–304.
- Metz, B., Kossen, N., van Suijdam, J., 1979. The Rheology of Mould Suspensions. In: *Advances in Biochemical Engineering*. Vol. 11. Springer, Berlin/Heidelberg, 103–156.
- Metzner, A.B., Otto, R.E., 1957. Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE Journal* 3 (1), 3–10.
- Nevalainen, K.M.H., Te'o, V.S.J., Bergquist, P.L., 2005. Heterologous protein expression in filamentous fungi. *Trends in Biotechnology* 23 (9), 468–474.
- Nielsen, J., Villadsen, J., 1992. Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science* 47 (17–18), 4225–4270.
- Nishikawa, M., Nakamura, M., Hashimoto, K., 1981. Gas absorption in aerated mixing vessels with non-Newtonian liquid. *Journal of Chemical Engineering of Japan* 14 (3), 227–232.
- Olsvik, E., Tucker, K.G., Thomas, C.R., Kristiansen, B., 1993. Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnology and Bioengineering* 42, 1046–1052.
- Olsvik, E., Kristiansen, B., 1994. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnology Advances* 12 (1), 1–39.
- Oolman, T., Blanch, H.W., Erickson, L.E., 1986. Non-Newtonian fermentation systems. *Critical Reviews in Biotechnology* 4 (2), 133–184.
- Papagianni, M., 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances* 22 (3), 189–259.
- Patel, N., Choy, V., Malouf, P., Thibault, J., 2009. Growth of *Trichoderma reesei* RUT C-30 in stirred tank and reciprocating plate bioreactors. *Process Biochemistry* 44 (10), 1164–1171.
- Patel, N., Choy, V., White, T., Munkvold, G., Thibault, J., 2010. Design of a novel Couette flow bioreactor to study the growth of fungal microorganism. *Journal of Biotechnology* 145 (3), 264–272.
- Patel, N., Thibault, J., 2009. Enhanced in situ dynamic method for measuring *k_{la}* in fermentation media. *Biochemical Engineering Journal* 47 (1–3), 48–54.
- Paul, L.P., Atiemo-Obeng, V., Kresta, S.M., 2004. *Handbook of Industrial Mixing: Science and Practice*. John Wiley and Sons, Hoboken, NJ, USA.
- Pedersen, A.G., Bundgaardnielsen, M., Nielsen, J., Villadsen, J., 1994. Characterization of mixing in stirred tank bioreactors equipped with Rushton turbines. *Biotechnology and Bioengineering* 44 (8), 1013–1017.
- Pedersen, A.G., Bundgaardnielsen, M., Nielsen, J., Hassager, O., 1993. Rheological characterization of media containing *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering* 41 (1), 162–164.
- Petersen, N., Stocks, S., Gernaey, Krist V., 2008. Multivariate models for prediction of rheological characteristics of filamentous fermentation broth from the size distribution. *Biotechnology and Bioengineering* 100 (1), 61–71.
- Riley, G.L., Tucker, K.G., Paul, G.C., Thomas, C.R., 2000. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnology and Bioengineering* 68 (2), 160–172.
- Schell, D.J., Farmer, J., Hamilton, J., Lyons, B., McMillan, J.D., Saez, J.C., Tholudar, A., 2001. Influence of operating conditions and vessel size on oxygen transfer during cellulase production. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 91–3, 627–642.
- Schugerl, K., 1981. Oxygen transfer into highly viscous media. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 19, 71–174.
- Smith, J.J., Lilly, M.D., Fox, R.L., 1990. The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium-chrysogenum*. *Biotechnology and Bioengineering* 35 (10), 1011–1023.
- Svihla, C.K., Dronawat, S.N., Hanley, T.R., 1995. Steady-state shear characteristics of *Aspergillus niger* broths. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 51–2, 355–366.
- Tolan, J.S.; Foody, B. 1999. Cellulase from Submerged Fermentation. In: *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 41–67. Springer Berlin/ Heidelberg.
- Vardar, F., Lilly, M.D., 1982. Effect of cycling dissolved-oxygen concentrations on product formation in penicillin fermentations. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 14 (4), 203–211.
- Wang, D., et al., 1979. *Fermentation and Enzymes Technology*. John Wiley and Sons, New York.
- Warzywoda, M., Bardin, V., Pourquie, J. 1983. Procédé de production d'enzymes cellulolytiques FR-B-2 555 603.
- Wyman, C.E., 2003. Potential synergies and challenges in refining cellulosic biomass to fuels, chemicals, and power. *Biotechnology Progress* 19 (2), 254–262.
- Wyman, C.E., 2007. What is (and is not) vital to advancing cellulosic ethanol. *Trends in Biotechnology* 25 (4), 153–157.

Kinetic Characterization of *Trichoderma reesei* CL847 TR3002: An Engineered Strain Producing Highly Improved Cellulolytic Cocktail

Fadhel Ben Chaabane*, Etienne Jourdir, Rachel Licht, Céline Cohen and Frédéric Monot
 IFP Energies nouvelles, 1 et 4 avenue de Bois-Préau, Rueil-Malmaison 92852, France

Received: October 26, 2011 / Accepted: November 18, 2011 / Published: February 25, 2012.

Abstract: Enzymatic hydrolysis of lignocellulose is often considered to be the major economic bottleneck of the production process of bioethanol from lignocellulose. It is generally admitted that the most efficient organism for the production of cellulolytic enzymes is the fungus *Trichoderma reesei*, mostly due to its high secretion capacity. Unfortunately, this fungus secretes very low concentrations of β -glucosidase, thereby often requiring β -glucosidase supplementation for complete cellulose hydrolysis. It is especially important to have sufficient quantities of β -glucosidase in order to prevent inhibition of cellobiohydrolases by cellobiose. In order to optimize the produced cocktail, a more efficient β -glucosidase was cloned into *T. reesei* CL847 strain. The new strain, called CL847 TR3002, secretes the evolved β -glucosidase and was tested for cellulase production in laboratory-scale reactors. Its growth kinetics and cellulase production were characterized using fed-batch and chemostat modes under various culture conditions. The cellulase activities of the evolved strain were compared with activities of the parent strain. In addition, hydrolysis of a steam exploded wheat straw was performed at three different enzyme-loading levels (5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of dry matter) and a new kinetic model was developed.

Key words: *Trichoderma reesei*, cellulases, fed-batch, bioreactor, kinetics.

Nomenclature

D	Dilution rate (h^{-1})	$q_{p,\max}$	Maximal specific protein production rate ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
DM	Dry matter	r_j	Volumetric rate of the compound j
Gal	Galactose concentration (g/L)	$R_{P/S}$	Yield of amount of protein produced per amount of lactose consumed
Gluc	Glucose concentration (g/L)	$R_{X/S}$	Yield of amount of biomass produced per amount of lactose consumed
hs	Specific hydrolysis rate ($\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{enz}\cdot\text{h}^{-1}$)	V_i	initial hydrolysis rate ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)
$h_{s,\max}$	Maximum specific hydrolysis rate ($\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{enz}\cdot\text{h}^{-1}$)	X	Biomass concentration (g/L)
Lac	Lactose concentration (g/L)	Y_{glu}	Yield of hydrolysis (%)
Lac_0	Lactose concentration in the feed (g/L)	Φ_j	Flux in Cmol/h of the compound j
P	Protein concentration (g/L)	λ_j	Degree of reduction of the compound j
Q_{ev}	Volumetric rate of evaporation (L/h)	μ	Specific growth rate (h^{-1})
Q_f	Volumetric feed flow rate (equal to 0 L/h during the batch phase)	μ_{\max}	Maximal growth rate (h^{-1})
Q_{pg}	Sample flow rate in the fed-batch mode and bleed flow rate in the chemostat mode (L/h)		
Q_N	Volumetric flow rate of ammonium (L/h)		
Q_f	Volumetric flow rate of lactose (L/h)		
q_i	Specific consumption rate of substrate i		

*Corresponding author: Fadhel Ben Chaabane, Ph.D., research fields: industrial microbiology, biofuels. E-mail: fadhel.ben-chaabane@ifpen.fr, Tel: 01 47 52 50 30.

1. Introduction

Biological conversion of lignocellulosic materials to ethanol generally includes an enzymatic hydrolysis step performed by cellulolytic enzymes. One of the most effective organisms for the production of these enzymes is the fungus *Trichoderma reesei*, because of

its high secretion capacity. However, both the low activity of cellulases and their high cost are major bottlenecks of the bioethanol production process. Several options can be considered to decrease the enzyme production cost, e.g. using inexpensive substrates, increasing the final enzyme concentration, defining suitable fermentation modes, enhancing productivity and increasing the activities of the enzymatic cocktail.

The produced enzymatic cocktail of *T. reesei* used for hydrolysis of lignocellulosic biomass contains nine major enzymes with three activities: two cellobiohydrolases (CBH) that liberate cellobiose (a glucose dimer) from the chain ends of cellulose, five endoglucanases (EG) that attack the cellulose at random, and two β -glucosidases (BGL) that cleave cellobiose to release glucose. *T. reesei* is more heavily weighted toward CBH enzymes. β -glucosidase is secreted in very low concentrations by *T. reesei* strains; therefore a complete hydrolysis of cellulose often requires supplementation with extra β -glucosidase. Since the activity of CBHs is inhibited by the presence of cellobiose, it is especially important to have sufficient concentrations of β -glucosidase.

In order to optimize the produced cocktail, a more efficient β -glucosidase was cloned into the industrial cellulase production strain *T. reesei* CL847 [1]. The improved β -glucosidase was evolved by several rounds of L-Shuffling™, a specific directed evolution method starting from three parental proteins [2]. Compared with the native β -glucosidase, the best enzyme had a 242-fold increased kcat for the artificial substrate used for screening [2].

Various *T. reesei* CL847 clones that expressed the evolved β -glucosidase were obtained, and strain TR3002 [3] was selected for cellulase production testing in laboratory-scale reactors. In order to better characterize this new strain, its growth and cellulase production kinetics were characterized using chemostat and fed-batch modes under various culture conditions. Carbon, nitrogen and redox degree balances were all

calculated throughout the course of the fermentation in order to determine the specific rates, volumetric rates, yields and the main parameters likely to affect the cellulase production. The proteins were analyzed for cellulase and hemicellulase activities. In addition, hydrolysis of a steam exploded wheat straw was performed at three different enzyme loading levels (5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of dry matter) in order to develop a kinetic model to simulate the hydrolysis.

2. Material and Methods

2.1 Strain

Trichoderma reesei strain CL847 TR3002 [3] was used in this study.

2.2 Culture Medium and Cultivation Conditions

Composition of the culture medium is as follows: KOH: 3.32 g/L; 85% H₃PO₄: 4 mL; (NH₄)₂SO₄: 5.6 g/L; MgSO₄·7H₂O: 1.2 g/L; CaCl₂·2H₂O: 1.2 g/L; Solution A: 5mL. The composition of the solution A is as follows: FeSO₄·7H₂O: 10 g/L; Co(NO₃)₂·6H₂O: 9 g/L; MnSO₄·1H₂O: 3.2 g/L; ZnSO₄·7H₂O: 2.8 g/L.

The inoculum was prepared by transferring 1×10^7 spores into a flask containing 250 mL of the culture medium (Glucose 30 g/L). The preculture was grown for 72 h in a "Fernbach" flask at 30 °C with shaking at 150 rpm.

The preculture was transferred to the bioreactor, resulting in a final volume of 2 L. The cultivation in the bioreactors was carried out at 27 °C and the carbon source was lactose, known to induce cellulase synthesis. The pH was kept at 4.8 by the addition of NH₃ at 5.5 N. The kinetics of growth and cellulase production of the new strain were characterized using chemostat and fed-batch culture modes:

(a) The chemostat culture mode: Lactose at a concentration of 8 g/L was supplied at a constant rate to obtain the desired dilution rate for each experiment (between 0.01 h⁻¹ and 0.03 h⁻¹). The culture generally reached steady state after cultivation of four to five residence times;

(b) The fed-batch mode: After a batch phase of 30 h with an initial lactose concentration of 30 g/L, the fed-batch phase was started at a flow rate of 4 mL/h with a lactose solution at 240 g/L.

2.3 Analysis of the Culture

Residual lactose, glucose and galactose were measured using HPLC (Varian) with an HPX-87P column (at 85 °C). CO₂ and O₂ levels in the off-gas were measured on-line by the analyzer COSMA Beryl 100 and Beryl 102. Dry weight was measured by filtration (with Whatman® GF/C membrane 1.2 µm) followed by drying at 105 °C until constant mass.

Soluble extracellular protein was assayed by the method of Lowry et al. [4] after precipitation of proteins with an equal volume of 10% trichloroacetic acid. Bovine serum albumin was used as the standard. The assays for cellulase activity (filter-paper units, FPU) and for aryl β-glucosidase activity were carried out at pH 4.8 using standard methods (IUPAC 1987) [5].

2.4 Hydrolysis

The objective was to compare the hydrolysis using TR3002 enzymes at different concentrations (5 mg, 10 mg and 20 mg protein per g of dry matter) with hydrolysis using CL 847 enzymes, and then to develop a kinetic model for the hydrolysis. The hydrolysis was performed in a 2 L bioreactor at 50 °C and pH = 4.8. The substrate was a steam-exploded wheat straw (57% cellulose) after acid impregnation.

2.5 Mass Balances

Mass balances were established for the biomass concentration X , the protein concentration P , and the concentration of the various sugars in order to calculate the specific rates ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$), the volumetric rates ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) and the yields ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). See Fig. 1 for a schematic of the bioreactor.

The lactose flow rate Q_f (Fig. 1) is equal to 0 during the batch phase (t_{0h} - t_{30h}). Q_{pg} is the bleed rate in the chemostat and is equal to 0 in the fed-batch mode:

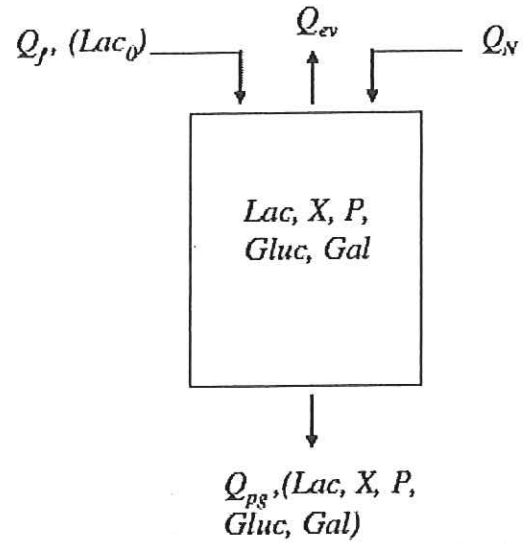


Fig. 1 Schematic diagram of the bioreactor. *Gal*: galactose concentration; *Gluc*: glucose concentration; *Lac*: lactose concentration; Lac_0 : lactose concentration in the feed (g/L); *P*: protein concentration; *X*: biomass concentration; Q_{ev} : volumetric flow rate of evaporation (L/h); Q_{pg} : bleed flow rate (L/h); Q_N : volumetric flow rate of ammonium (L/h); Q_f : volumetric flow rate of lactose (L/h).

$$\frac{dX \cdot V}{dt} = \mu \cdot X \cdot V - X \cdot Q_{pg}$$

$$\frac{dLac \cdot V}{dt} = -q_{lac} \cdot X \cdot V + Lac_0 \cdot Q_f - Lac \cdot Q_{pg}$$

$$\frac{dP \cdot V}{dt} = v_p \cdot X \cdot V - P \cdot Q_{pg}$$

$$\frac{dGluc \cdot V}{dt} = -q_{Gluc} \cdot X \cdot V - Gluc \cdot Q_{pg}$$

$$\frac{dGal \cdot V}{dt} = q_{Gal} \cdot X \cdot V - Gal \cdot Q_{pg}$$

$$\frac{dV}{dt} = Q_f - Q_{pg} - Q_{EV} + Q_N$$

The volumetric rates r_x , r_p , r_{lac} , r_{gluc} , r_{gal} of each component are equal to the corresponding specific rates multiplied by the biomass concentration. The yields of R_{ij} are calculated by dividing the volumetric rate of the component (i) by the volumetric rate of the component (j).

We used the Roels approach [6] to establish the carbon, nitrogen and degree of reduction balances. The balances were performed based on the elemental composition for one C-mol of each element. The

biomass composition given by Lejeune and Baron [7] was used, as well as the protein elemental composition described by Nielsen and Villadsen [8]. In order to easily compare the balances throughout the course of the experiment, it was necessary to normalize them as follows:

$$\text{Carbon : Bc (\%)} = \frac{\Phi_{Lac} - \Phi_{Gluc} - \Phi_{Gal} - \Phi_X - \Phi_{CO_2} - \Phi_P}{\Phi_{Lac}}$$

$$\text{Nitrogen : Bn (\%)} = \frac{\Phi_{NH_3} - 0.13\Phi_X - 0.27\Phi_P}{\Phi_{NH_3}}$$

$$\text{Degree of reduction : Br (\%)} = \frac{\lambda_{Lac} \cdot \Phi_{Lac} - \lambda_{Gluc} \cdot \Phi_{Gluc} - \lambda_{Gal} \cdot \Phi_{Gal} - \lambda_X \cdot \Phi_X + \lambda_{O_2} \cdot \Phi_{O_2} - \lambda_P \cdot \Phi_P}{\lambda_{Lac} \cdot \Phi_{Lac}}$$

The balances are satisfactory if *Bc*, *Bn* and *Br* are close to 0.

3. Results and Discussion

3.1 Chemostat Culture Mode

Growth and protein production were studied in a lactose-limited chemostat with different dilution rates. Fig. 2 shows the evolution of biomass and protein concentrations for one experiment at a dilution rate of 0.02 h^{-1} . Steady state was reached after 200 hours of culture. There was a small foaming problem after 500

hours that disturbed the steady state and slightly increased the biomass concentration, however, the protein concentration remained fairly stable with just a slight decrease during the foaming.

The three balances were all between 90% and 95% (carbon balance and nitrogen balance $> 93\%$ and degree of reduction balance $> 90\%$) which lends confidence to the reliability of the measurements.

Fig. 3 allows us to understand the kinetic behavior of the strain. The evolutions of the yields of biomass, protein and CO_2 over lactose are plotted versus biomass growth rate (equal to the dilution rate). When the growth rate increases (or when the dilution rate in the chemostat is increased), the biomass over lactose yield $R_{X,S}$ increases, the protein yield $R_{P,S}$ decreases and the CO_2 yield $R_{CO_2,S}$ remains constant.

T. reesei only produces cellulase enzymes under sugar-limitation and the maximum yield is obtained when the growth rate is lower than 0.015 h^{-1} . Therefore, producing cellulases in bioreactor fermentation requires strict control of the carbon source concentration. The fungus must first be grown up under excess sugar and nutrient conditions in order to produce a substantial quantity of biomass in the bioreactor, and then put on a

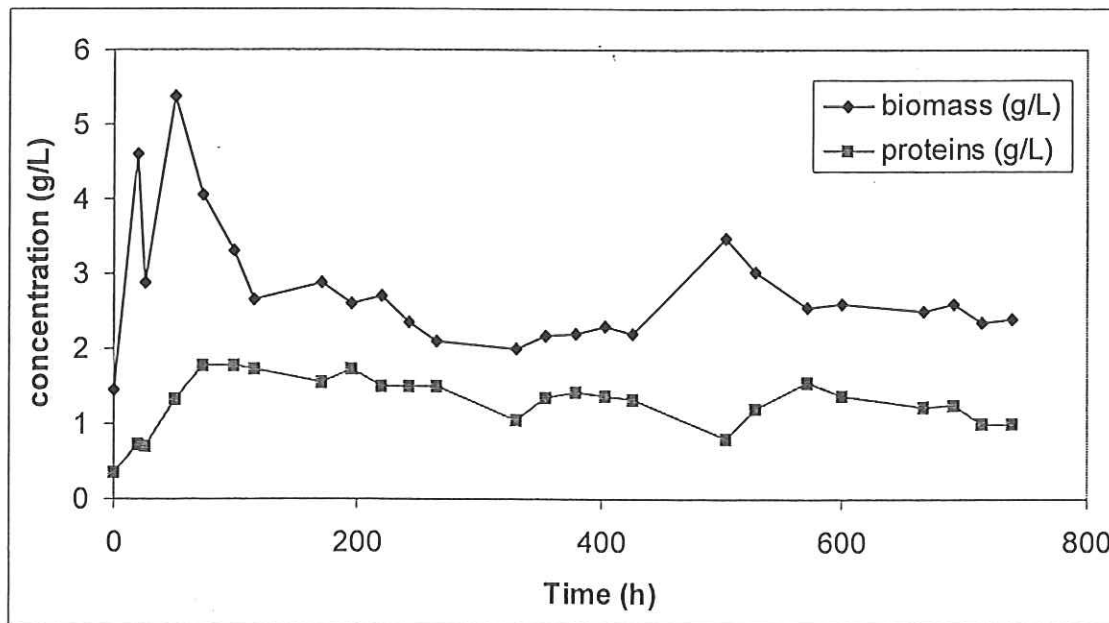


Fig. 2 Biomass and protein concentrations (g/L) in the bioreactor over the cultivation time in a chemostat with a dilution rate of 0.02 h^{-1} . *T. reesei* CL847 TR3002, pH = 4.8, temperature = $27 \text{ }^\circ\text{C}$, vvm = 0.5, $D = 0.02 \text{ h}^{-1}$.

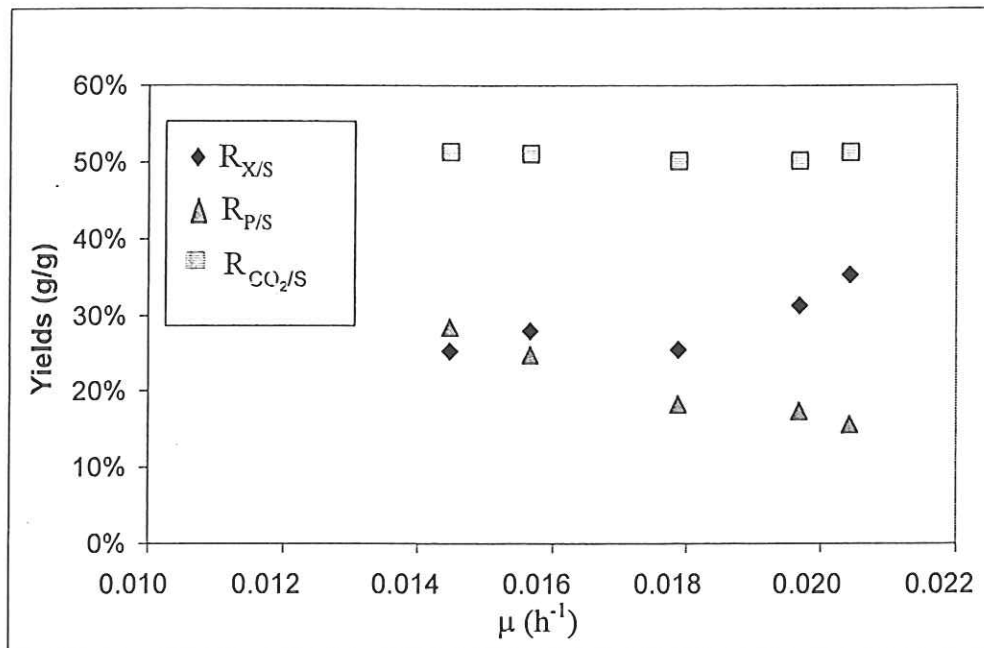


Fig. 3 The biomass over lactose yield $R_{X/S}$, the protein over lactose yield $R_{P/S}$ and the CO_2 over lactose yield $R_{\text{CO}_2/S}$ versus biomass growth rate (equal to the dilution rate at steady state): pH = 4.8, temperature = 27 °C, vvm = 0.5.

carbon-limited diet for the cellulase production phase. This is typically achieved by a batch growth phase where the initial quantity of sugar is rapidly consumed to produce a growing concentration of biomass, followed by a fed-batch production phase where a limiting quantity of lactose is fed continuously to the bioreactor.

3.2 Fed-Batch Culture Mode

Growth and protein production were studied using this kind of culture mode. Cell biomass is mainly produced during the non-limiting lactose culture phase (Fig. 4) and cell dry weight increased to 20 g/L after 70 hours. Cellulase production increased to 37 g/L protein during the second culture phase with lactose limitation. The growth rate (Fig. 5) remained constant during the first 70 hours of the culture at a value of 0.04 h⁻¹, and then fell gradually to zero. The specific protein production rate increased to 15 mg·g⁻¹·h⁻¹ at the beginning of the carbon source limitation. This value decreased slightly between 95 h and 110 h before another increase to 20 mg·g⁻¹·h⁻¹. These values are similar to those obtained with the parent strain, *T.*

reesei CL 847 (data not shown) suggesting that TR3002 could be used at larger scale with confidence.

3.3 Hydrolysis

Since it is important not only to produce a lot of proteins, but also to produce an efficient cellulase cocktail, we tested the enzymatic activity of the produced cocktail at the end of the experiment. We compared the cellulolytic activity of the enzymes produced by the TR3002 strain in the bioreactor with the activities of parent CL847 strain. In addition to the beta-glucosidase specific activity of the TR3002 which was 11 times higher than the activity of CL847 [3], we also measured the filter paper activity (0.77 FPU/mg), which was 50% higher for the improved strain than for the other cocktail (0.55 FPU/mg).

In addition to determination of cellulase activities, hydrolysis of a steam exploded wheat straw after an acid impregnation was performed. The objective was to study this hydrolysis using different concentrations of TR3002 enzymes in order to develop a kinetic model. The results of the hydrolysis using three different loadings (5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg per g of DM) are

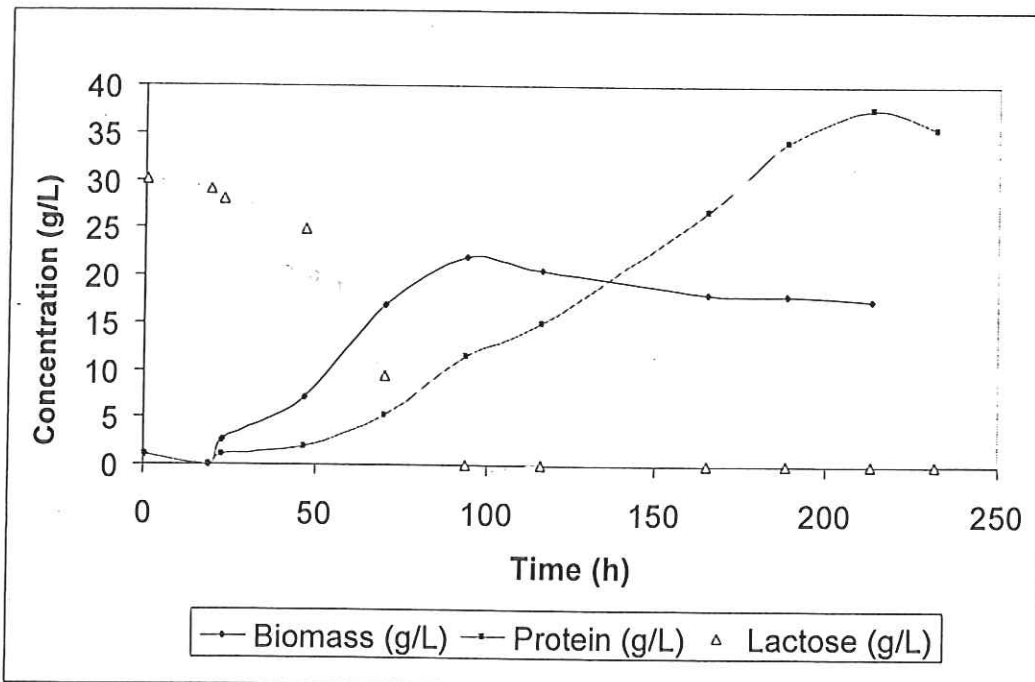


Fig. 4 Biomass, protein and lactose concentrations (g/L) in the bioreactor over the cultivation time. *T. reesei* CL847 TR3002: pH = 4.8, temperature = 27 °C, vvm = 0.5.

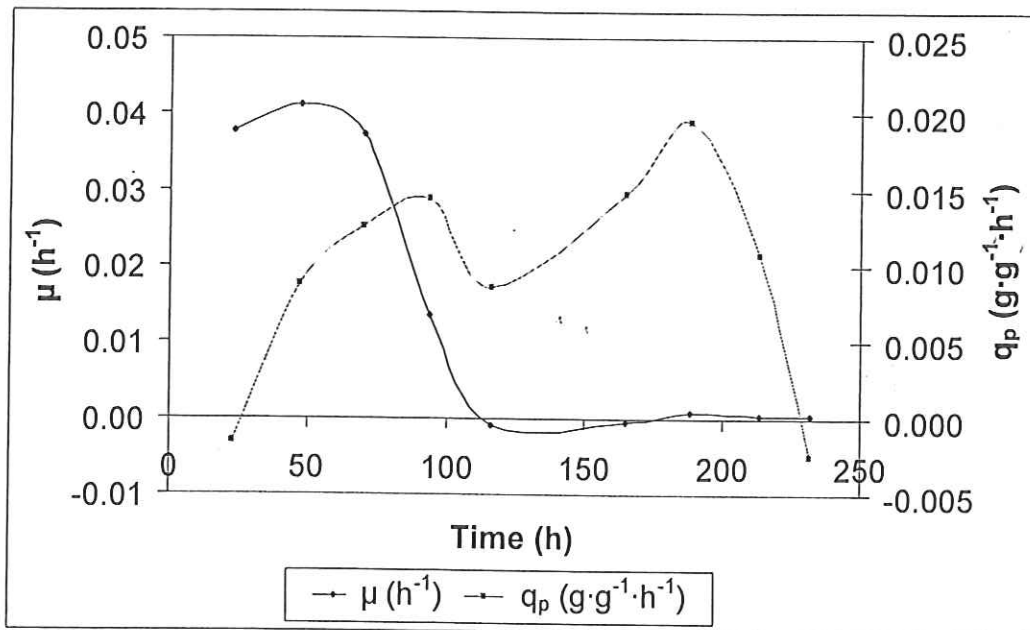


Fig. 5 Growth rate μ and specific protein production rate $q_{protein}$ over the cultivation time. *T. reesei* CL847 TR3002: pH = 4.8, temperature = 27 °C, vvm = 0.5.

reported in Fig. 6. The yield is close to 100% after 55 hours with concentrations of 10 mg/g and 20 mg/g and close to 85% of the maximal yield after 78 hours of culture with a 5 mg/g enzyme concentration. The hydrolysis using TR3002 enzymes at 5 mg/g dry matter was found to be equivalent to the hydrolysis with the

enzymes produced by the parent strain CL847 at a concentration of 20 mg/g (Table 1). Therefore, we can considerably reduce the quantity of enzymes used in the hydrolysis process without any loss in hydrolysis performance. As a reminder, the hydrolysis process is considered to be one of the major economic bottlenecks

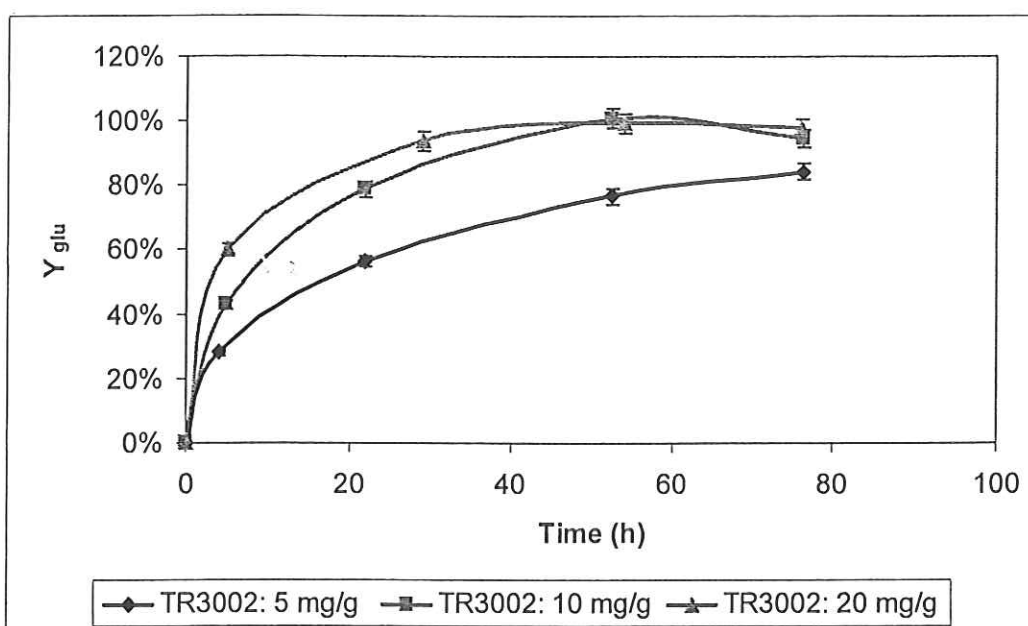


Fig. 6 Evolution of the glucose concentration during the hydrolysis of a steam exploded wheat straw using three different concentration of TR3002 enzymes: 5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of DM and hydrolysis using 20 mg/g of the parent strain CL847. Temperature = 50 °C, pH = 4.8, 500 rpm.

Table 1 Initial hydrolysis rate V_i and hydrolysis yield Y_i during the hydrolysis of a steam exploded wheat straw using three different concentration of TR3002 enzymes: 5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of DM and hydrolysis using 20 mg/g of CL847. Temperature = 50 °C, pH = 4.8, 500 rpm.

	V_i (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹) after 5 h	Y_{glu} after 55 h
TR3002: 20 mg/g	7.4	100%
TR3002: 10 mg/g	5.6	98%
TR3002: 5 mg/g	4.3	76.6%
CL847: 20 mg/g	3.7	77.8%

of the production process of bioethanol from the lignocellulose because of the high cost of cellulases.

3.4 Kinetic Modeling

Fig. 7 shows the evolution of the hydrolysis rate versus the glucose concentration at three different enzyme concentrations. We can see that glucose is a strong inhibitor of the hydrolysis rate. The major part of the hydrolysis is performed at a very low rate. Fig. 8 plots the specific rate, the rate divided by the enzyme concentration of the hydrolysis and shows that there is a non-linear glucose inhibition. Based on these observations, we decided to model hydrolysis with a simple non-structured model with only four parameters.

$$hs = h_{smax} \times (1 - Gluc/Gluc_{max})^n$$

$$n = a \times [enz] + b$$

The parameters were identified as:

$$Gluc_{max} = 70 \text{ g/L}$$

$$h_{smax} = 0.1 \text{ g} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{enz} \cdot \text{h}^{-1}$$

$$a = -0.0457$$

$$b = 3.2$$

This model fits very well with the experimental results (Fig. 9) at three different enzyme concentrations. The advantage of this non-structured model is its simplicity and the small number of parameters used compared to mechanistic models. It is generally very difficult to experimentally obtain sufficient mechanistic knowledge on hydrolysis of real substrates. In addition, the mechanistic models often contain a great number of parameters which are difficult to estimate and their applications may lead to physically meaningless results.

Our model fulfils our aim which was to describe the evolution of glucose concentration during the hydrolysis of a steam exploded wheat straw, using different enzyme concentrations. It could be easily used to the predict performances of different *T. reesei*

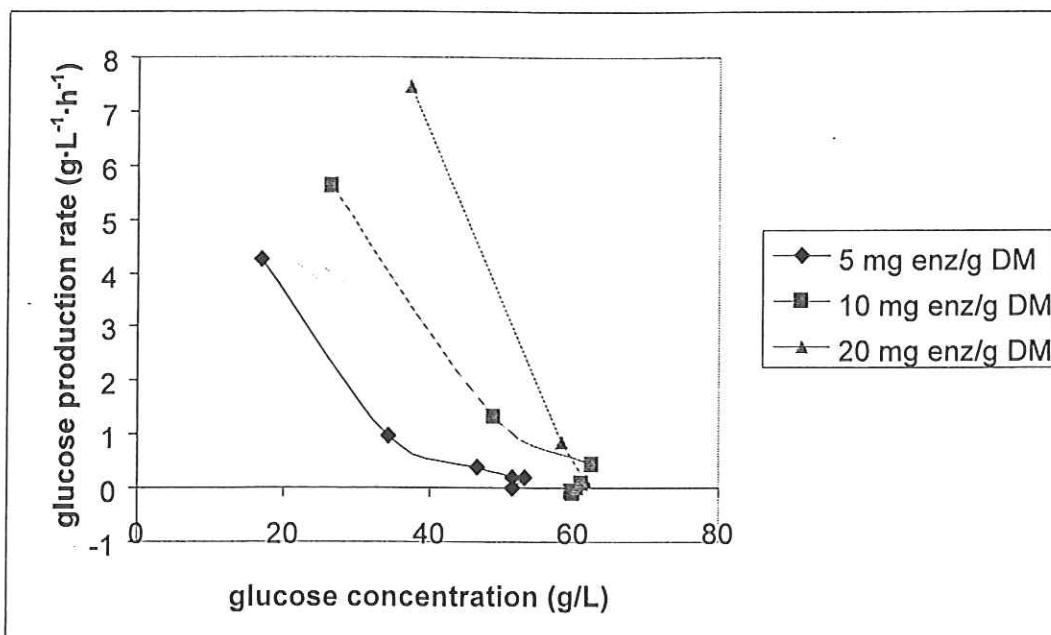


Fig. 7 Hydrolysis rate versus the glucose concentration at three different enzyme concentrations of TR3002: 5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of DM. Temperature = 50 °C, pH = 4.8, 500 rpm.

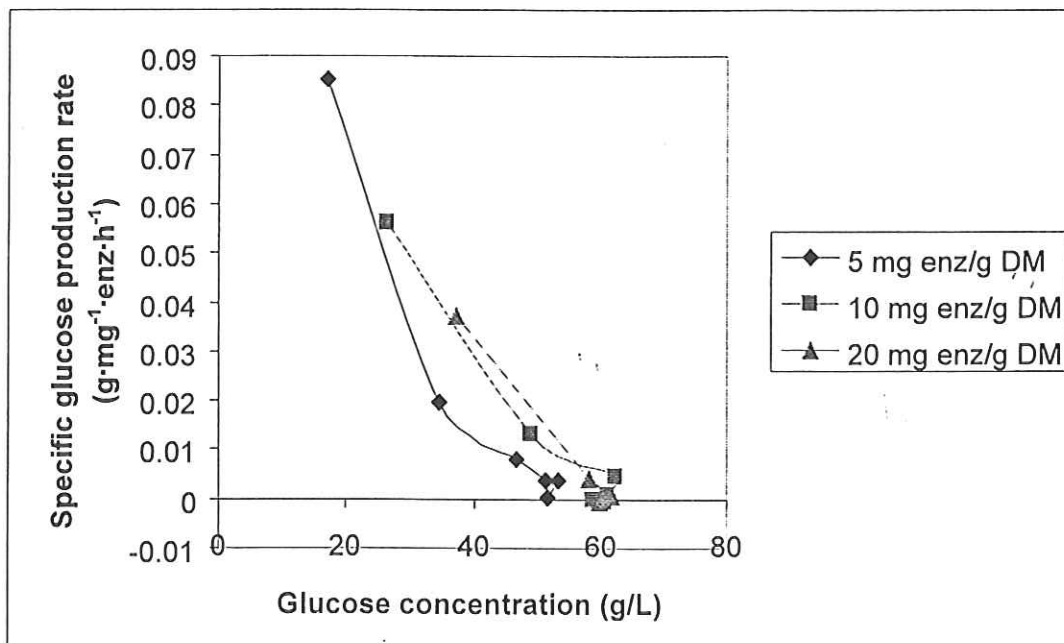


Fig. 8 Specific rate of hydrolysis versus the glucose concentration at three different enzyme concentrations of TR3002: 5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of DM. Temperature = 50 °C, pH = 4.8, 500 rpm.

cellulolytic cocktails after having identified the new set of parameters corresponding to the new cocktail.

4. Conclusion

A new strain *T. reesei* CL847 TR3002 that produces an improved cellulolytic cocktail was characterized in

chemostat and fed-batch modes using lactose as the carbon source. This strain has a maximum growth rate μ_{max} of 0.04 h⁻¹ and a maximum protein specific production rate q_{pmax} of 17 mg·g⁻¹·h⁻¹. This strain only produces cellulase enzymes under sugar-limitation, and the maximum protein yield is obtained when the

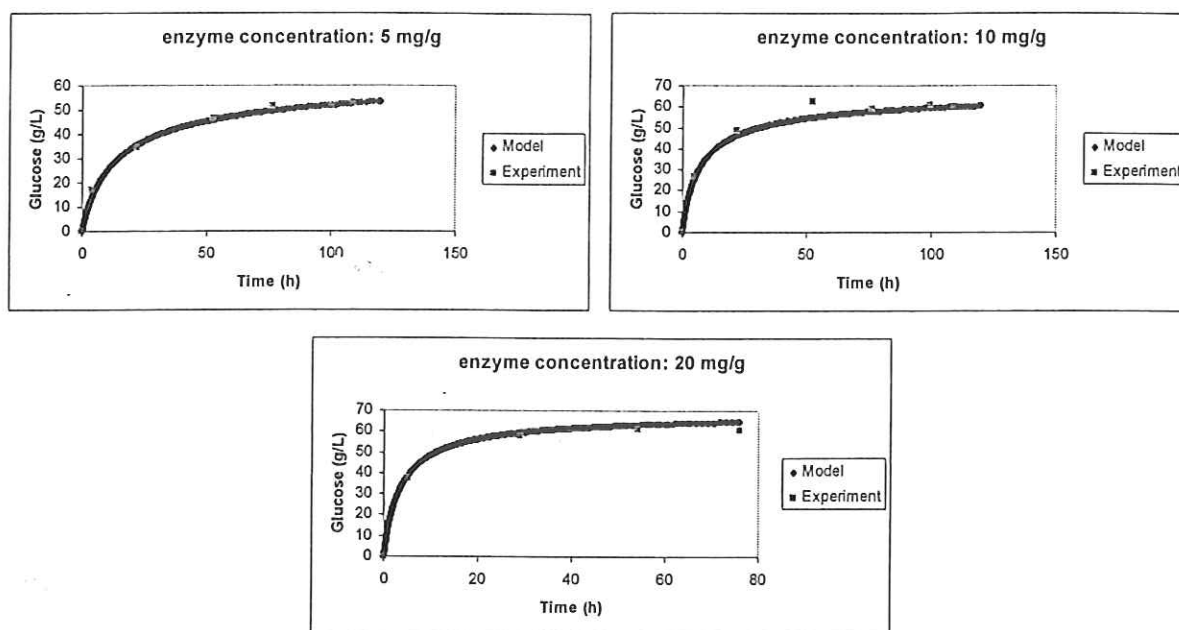


Fig. 9 Comparison between the model and the experimental results at three different enzyme concentrations of TR3002: 5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of DM.

growth rate is less than 0.015 h^{-1} . The kinetic parameters of the recombinant strain were similar to those of the parent strain suggesting that TR3002 could be used at larger scale with confidence. The β -glucosidase activity of the produced cocktail is 11 times higher than the cocktail produced by the parental strain and the FPase specific activity is 50% higher. The quantity of enzymes required in the hydrolysis process was reduced without any loss in hydrolysis performance. The hydrolysis of a steam exploded wheat straw was performed at three different enzyme loading levels (5 mg/g, 10 mg/g and 20 mg/g of dry matter) and a new non structured kinetic model with only four parameters integrating glucose inhibition was developed. This simple hydrolysis model could be easily used to predict performances of different *T. reesei* cellulolytic cocktails.

Acknowledgments

The authors thank Laurent Fourage and Gilles Ravot from Proteus (70 Allée Graham Bell 30035 Nimes, France) and Antoine Margeot (IFP Energies nouvelles) for kindly providing strain TR3002. Rachel Licht is a recipient of the French-American Fullbright program.

References

- [1] Warzywoda, M.; Ferre, V.; Pourquie, J. Development of a Culture Medium for Large-Scale Production of Cellulolytic Enzymes by *Trichoderma reesei*. *Biotechnol Bioeng.* 1983, 25(12), 3005-3011.
- [2] Ayrinhac, C.; Margeot, A.; Lopes Ferreira, N.; Ben Chaabane, F.; Monot, F.; Ravot, G.; et al. Improved Saccharification of Wheat Straw for Biofuel Production Using an Engineered Secretome of *Trichoderma reesei*. *Organic Process Research & Development* 2011, 15, 275-278.
- [3] Lopes-Ferreira, N.; Margeot, A.; Mathis, H.; Fourage, L. β -glucosidase Variants Having Improved Activity and Uses Thereof. WO/2010/029259, 2010.
- [4] Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L.; Randall, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193, 265-275.
- [5] IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Measurement of Cellulase Activities. *Pure. Appl. Chem.* 1987, 59, 257-268.
- [6] Roels, J. A. *Energetics and Kinetics in Biotechnology*; Elsevier Biomedical Press: New York, 1983.
- [7] Lejeune, R.; Baron, G. V. Effect of Agitation on Growth and Enzyme Production of *Trichoderma reesei* in Batch Fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995, 43, 249-258.
- [8] Nielsen, J.; Villadsen, J. *Bioreaction Engineering Principles*; Plenum Press: NY, 1994.

Résumé

*Dans le contexte énergétique et climatique mondial, le coût élevé des enzymes cellulolytiques (cellulases) freine le développement des bioraffineries lignocellulosiques, pour produire des biocarburants et composés chimiques à partir d'une matière première végétale renouvelable. L'objectif de ce travail est de caractériser et de modéliser le métabolisme du micro-organisme *Trichoderma reesei*, afin d'optimiser le protocole industriel de production de cellulases. Cette étude a été réalisée sur des milieux modèles représentatifs de ceux attendus à l'échelle industrielle. Tout d'abord, la stœchiométrie des réactions de croissance et de production a été établie, puis une étude cinétique a été menée pour mesurer précisément le comportement du micro-organisme à forte induction de la production de cellulases. Le modèle résultant a été utilisé pour optimiser le protocole industriel de production. Ensuite, l'intégration de cette étape dans une bioraffinerie lignocellulosique a été étudiée, avec l'effet sur le métabolisme i) des mélanges de sucres disponibles, ii) des composés inhibiteurs issus de la dégradation de la lignocellulose, et iii) du changement d'échelle. Ces travaux ont fait progresser de façon substantielle les connaissances du métabolisme de *T. reesei* en ce qui concerne la production de cellulases, et les modèles développés sont des outils d'aide rationnelle à la définition d'un procédé de production de cellulases intégré dans une bioraffinerie lignocellulosique.*

Mots-clés: Trichoderma reesei, lignocellulose, biomasse, bioraffinerie, cellulase, métabolisme, production industrielle, modélisation, rendement, productivité, besoin en oxygène, inhibiteurs, hydrolysats lignocellulosiques, extrapolation.

Abstract

*In the global energetic and climatic context, the high cost of the cellulolytic enzymes (cellulases) postpones the development of lignocellulosic biorefineries, dedicated to produce biofuels and chemical compounds from renewable vegetable feedstocks. The aim of this work was to measure and model the metabolism of the micro-organism *Trichoderma reesei*, in order to optimize the industrial protocol for the production of cellulase. This study was carried out using synthetic media representative of industrial ones. First, the stoichiometries of growth and protein production reactions were determined. Then, a kinetic study was conducted to precisely measure the specific rates of *T. reesei* at high induction of cellulase production. The resulting model was used to optimize the industrial production protocol. Finally the integration of this step in a lignocellulosic biorefinery was studied by determining the impacts on the metabolism of i) available sugar mixtures, ii) inhibitory compounds from lignocellulosic biomass degradation, and iii) scale-up. These results significantly contributed to improve the knowledge of *T. reesei* metabolism on cellulase production. The developed models are rational tools for the optimization of a cellulase production protocol suited to lignocellulosic biorefineries.*

Keywords: Trichoderma reesei, lignocellulose, feedstocks, biorefinery, cellulase, metabolism, industrial production, modelling, yield, productivity, oxygen demand, inhibitory compounds, lignocellulosic hydrolyzates, scale-up.