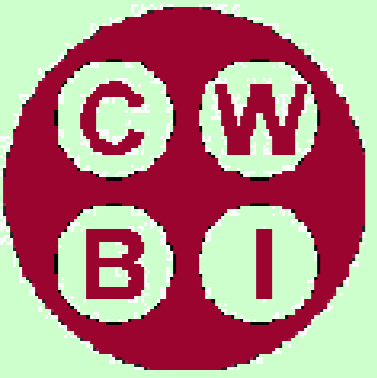


Utilisation d'un bio-réacteur *scale-down* pour la production de lipase à partir de *Yarrowia lipolytica*



KAR T., DELVIGNE F., DESTIN J. et THONART P.

CENTRE WALLON DE BIOLOGIE INDUSTRIELLE Unité de Bio-industries
FACULTE UNIVERSITAIRE DES SCIENCES AGRONOMIQUES DE GEMBOUX



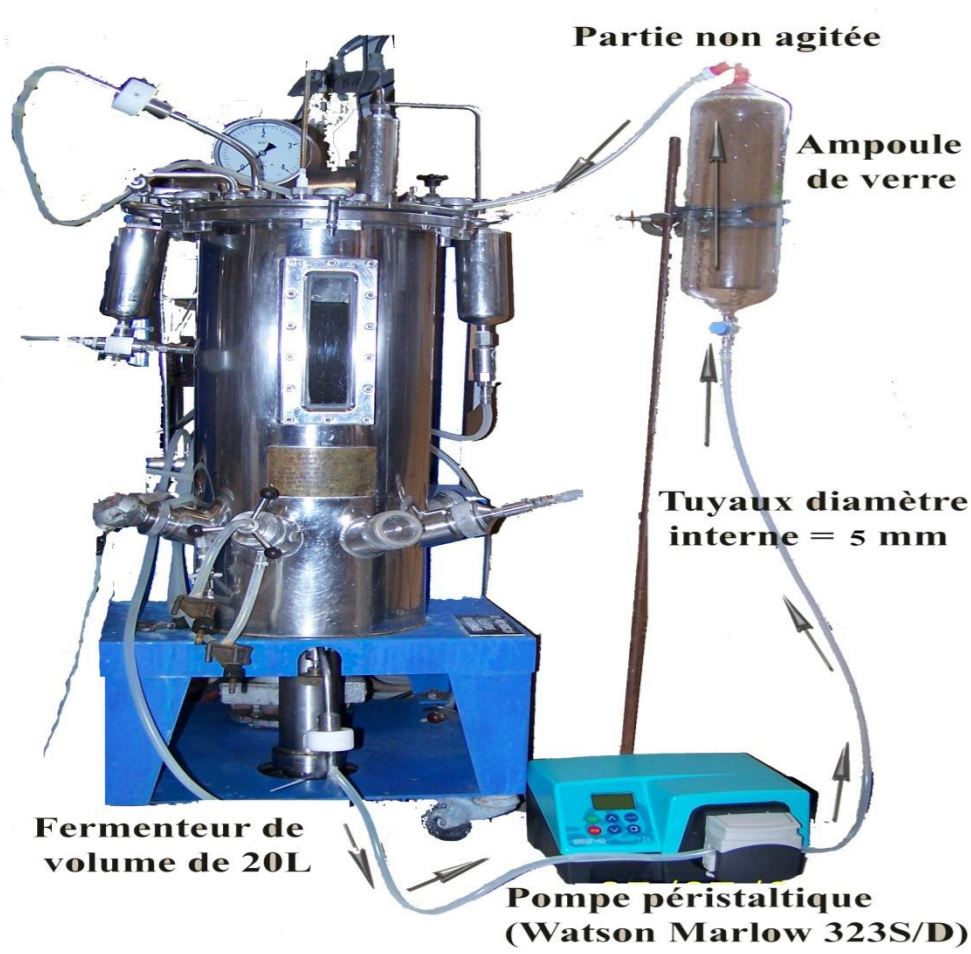
INTRODUCTION

Les résultats obtenus au niveau de fermenteur de laboratoire et de volume industriel sont souvent différents à cause de la diminution de l'efficacité d'homogénéisation (substrats, oxygène dissous ...etc.) du réacteur lorsque le volume augmente tels que. Dans cette optique, le fermenteur *scale-down* peut être utilisé. Il s'agit d'un système permettant de représenter à petite échelle les conditions de mélange des réacteurs de taille industrielle.

Les lipases microbiennes sont stables dans de nombreux solvants organiques et ne requièrent pas de co-facteur pour être actives. Leurs domaines d'application sont très vastes et variés. Pour la production de la lipase, la levure non conventionnelle présente de nombreuses potentialités. A ce propos, *Yarrowia lipolytica* est le microorganisme le plus important vu qu'il produit les lipases à l'échelle industrielle. Pour des raisons économiques, les conditions de culture (pH, dispersion liquide-liquide, aération, ...etc.) lors de la production de la lipase, doivent être optimisées.

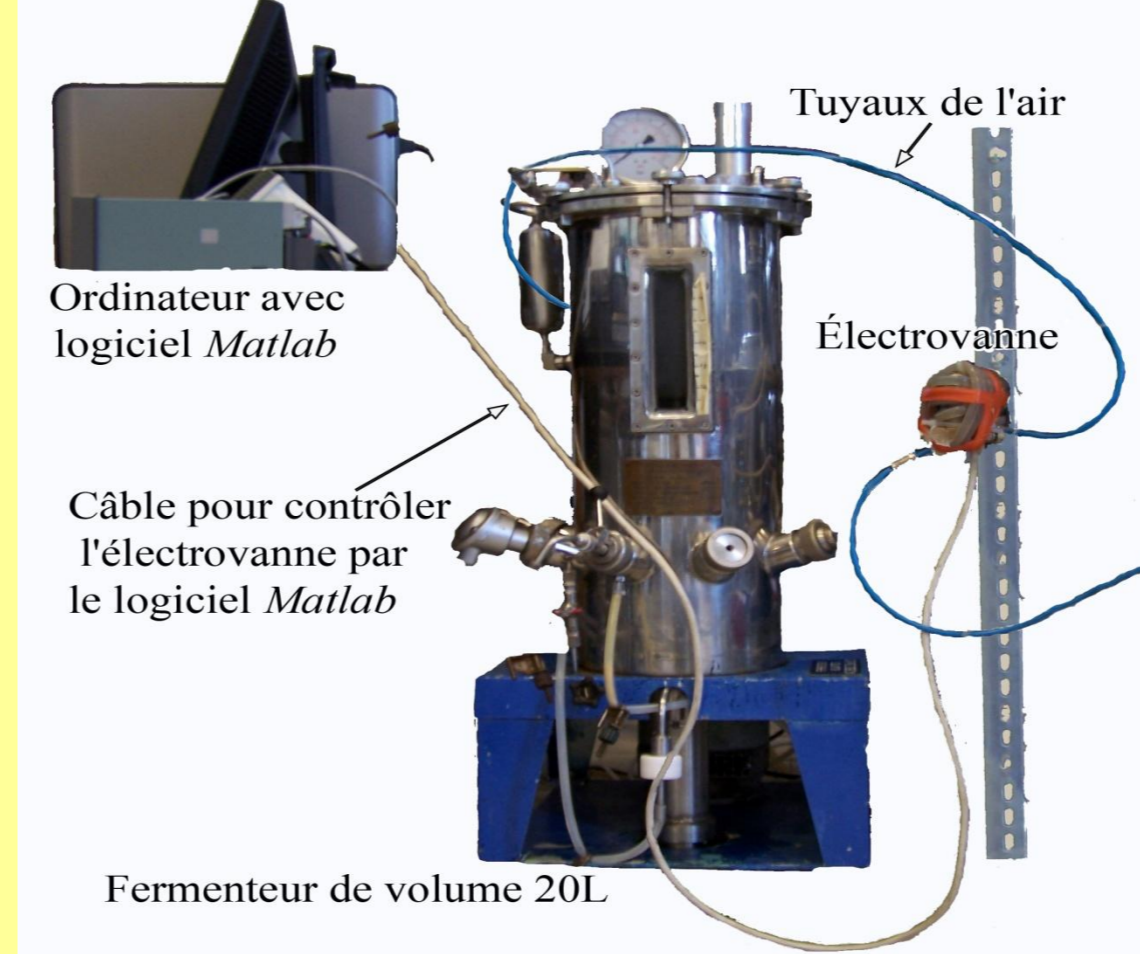
Ce poster présente les résultats de l'effet de l'extrapolation sur la production de lipase à partir de *Yarrowia lipolytica* en mode batch avec un milieu de production optimisé (Destain *et al.*, 2005). Les effets de la concentration en oxygène dissous, la dispersion liquide-liquide et les gradients de pH, qui sont affectés par le mélange du milieu de culture, sont présentés dans ce poster. Dans cette optique, plusieurs dispositifs *scale-down* ont été utilisés. Ceux-ci permettent de reproduire à l'échelle du laboratoire les hétérogénéités rencontrées à l'échelle industrielle.

STRATÉGIE ET RÉSULTATS



Le premier type de réacteur *scale-down* comprend un réacteur agité classique 20L, et un dispositif permettant la recirculation du milieu de culture à l'extérieur du réacteur. La recirculation entre les deux parties du dispositif est réalisée grâce à une pompe péristaltique.

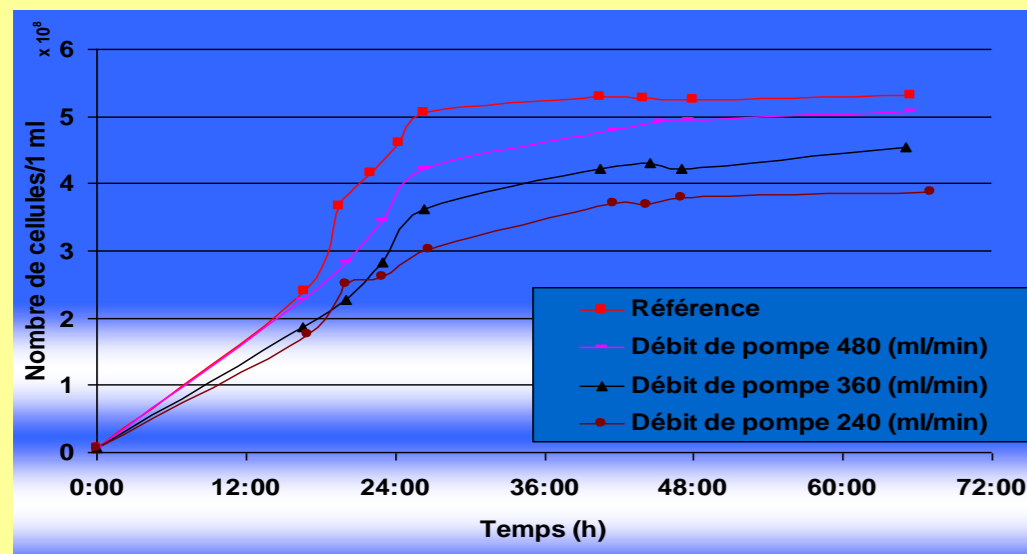
Les débits de recirculation ont été choisis de manière à obtenir des conditions hydrodynamiques différentes, trois débits ont été utilisés (480, 360, 240 ml/min).



Les réacteurs de deuxième type comprennent un réacteur agité classique 20L et un dispositif permettant l'injection contrôlée d'air dans le milieu de culture par l'intermédiaire d'une électrovanne. L'électrovanne est connectée à l'ordinateur, qui donne l'ordre d'ouvrir ou de fermer la vanne par le logiciel MATLAB.

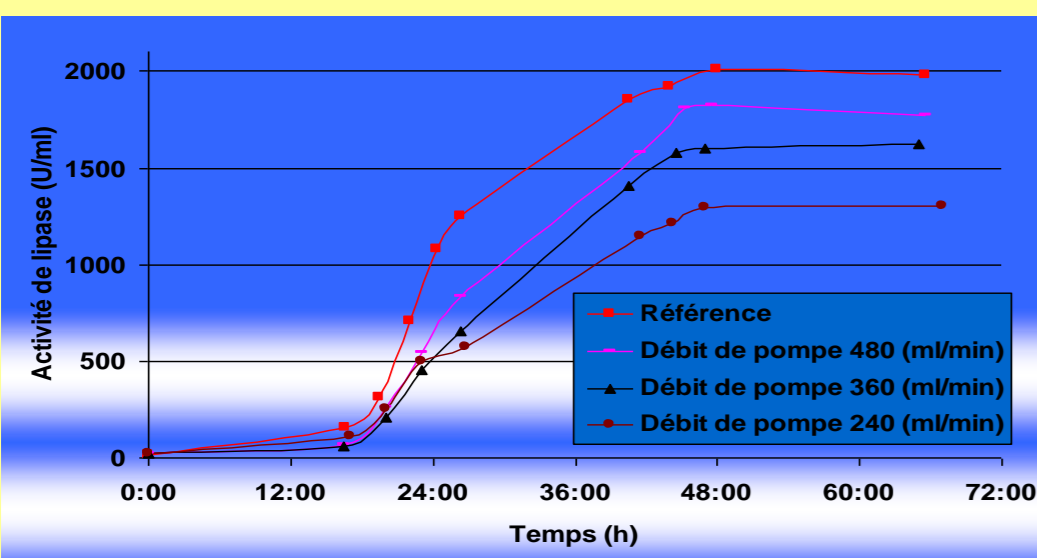
Il existe deux approches pour commander l'aération dans le réacteur de second type: l'approche déterministe et l'approche stochastique.

Le premier type de réacteur *scale-down* avec recirculation



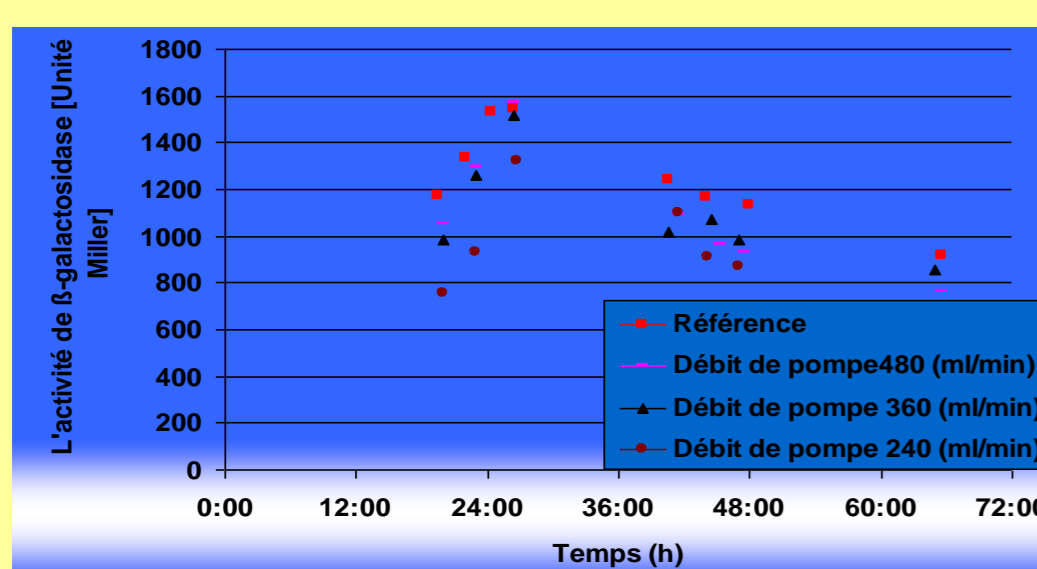
Évolution du nombre de cellules pour les différents débits de recirculation et pour la référence

Dans tous les cas étudiés en réacteur *scale-down*, le nombre des cellules est inférieur à celui obtenu avec le réacteur de référence, il est influencé par le débit de recirculation. Ce qui montre déjà l'influence de l'intensité de mélange du réacteur sur la physiologie microbienne.



Évolution de l'activité de la lipase pour les différents débits de recirculation et la référence

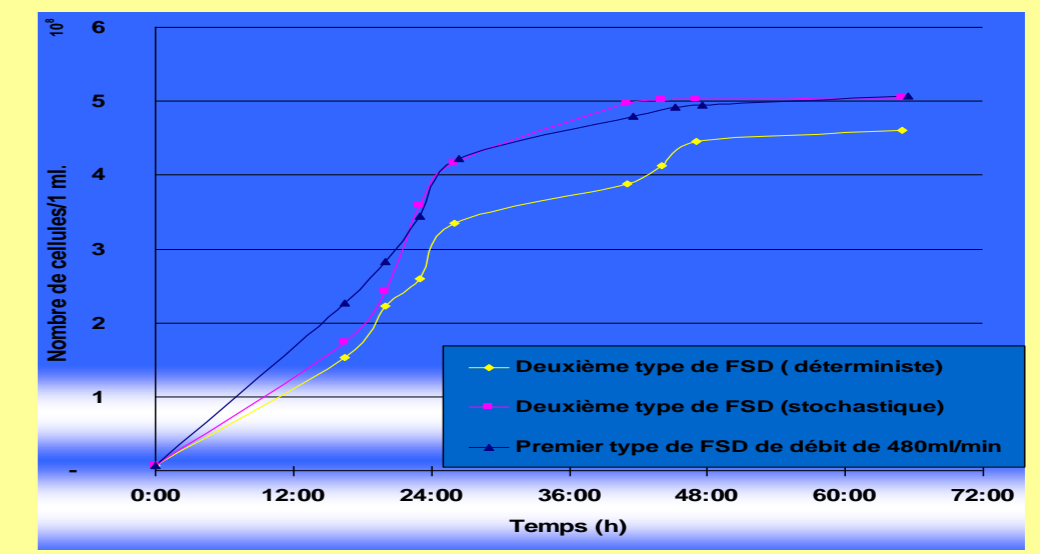
Pour tous les tests réalisés en fermenteur *scale-down*, l'activité de la lipase obtenue est inférieure à l'activité de la lipase calculée pour le réacteur de référence. La figure ci-dessus montre aussi que l'activité de la lipase augmente avec les débits de recirculation.



Évolution de l'activité de la Beta-galactosidase pour les différents débits de recirculation et la référence

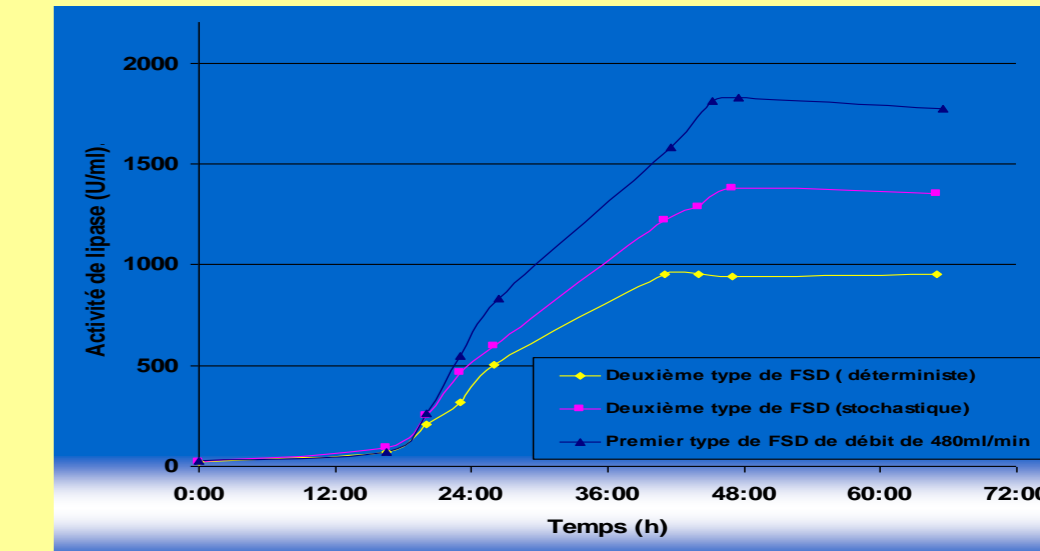
Au début de la phase exponentielle, l'activité de la Beta-galactosidase est différente pour tous les réacteurs (référence et fermenteurs *scale-down*). Ensuite, en fin de phase exponentielle, l'activité de Beta-galactosidase atteint le même niveau dans tous les cas sauf celui qui correspond au débit le plus faible.

Le deuxième type de réacteur *scale-down* avec électrovanne



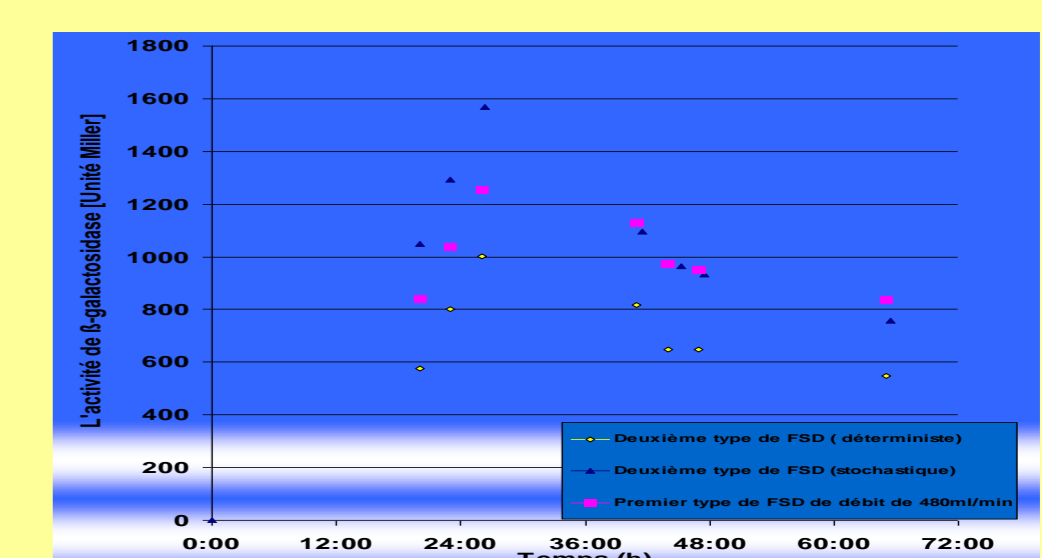
Évolution du nombre de cellules pour premier type de fermenteur *scale-down* de débit 480 ml/min, et le deuxième type de fermenteur *scale-down* (déterministe et stochastique)

Dans les études menées en réacteur *scale-down* de premier type avec un débit de 480ml/min, le nombre des cellules est supérieur à celui obtenu avec le réacteur *scale-down* de deuxième type déterministe, et est égal à celui obtenu avec le réacteur *scale-down* de deuxième type stochastique.



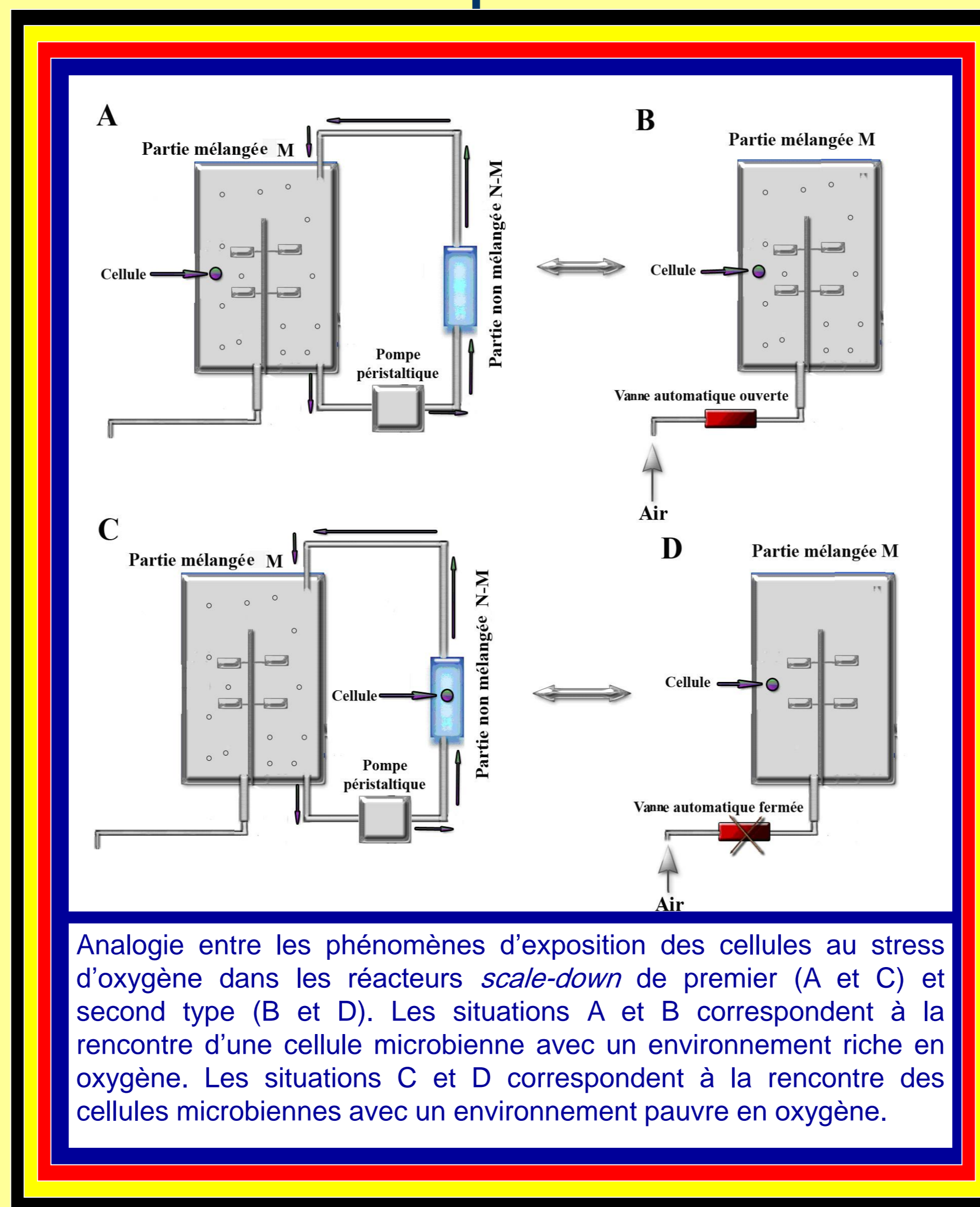
Évolution de l'activité de la lipase pour les différents fermenteurs *scale-down* (premier type et deuxième type soit déterministe soit stochastique).

En ce qui concerne le premier type avec un débit de 480ml/min, l'activité de la lipase est supérieure à celle calculée pour les réacteurs de deuxième type, et l'activité de la lipase du modèle stochastique est supérieure à celle obtenue avec le modèle déterministe.

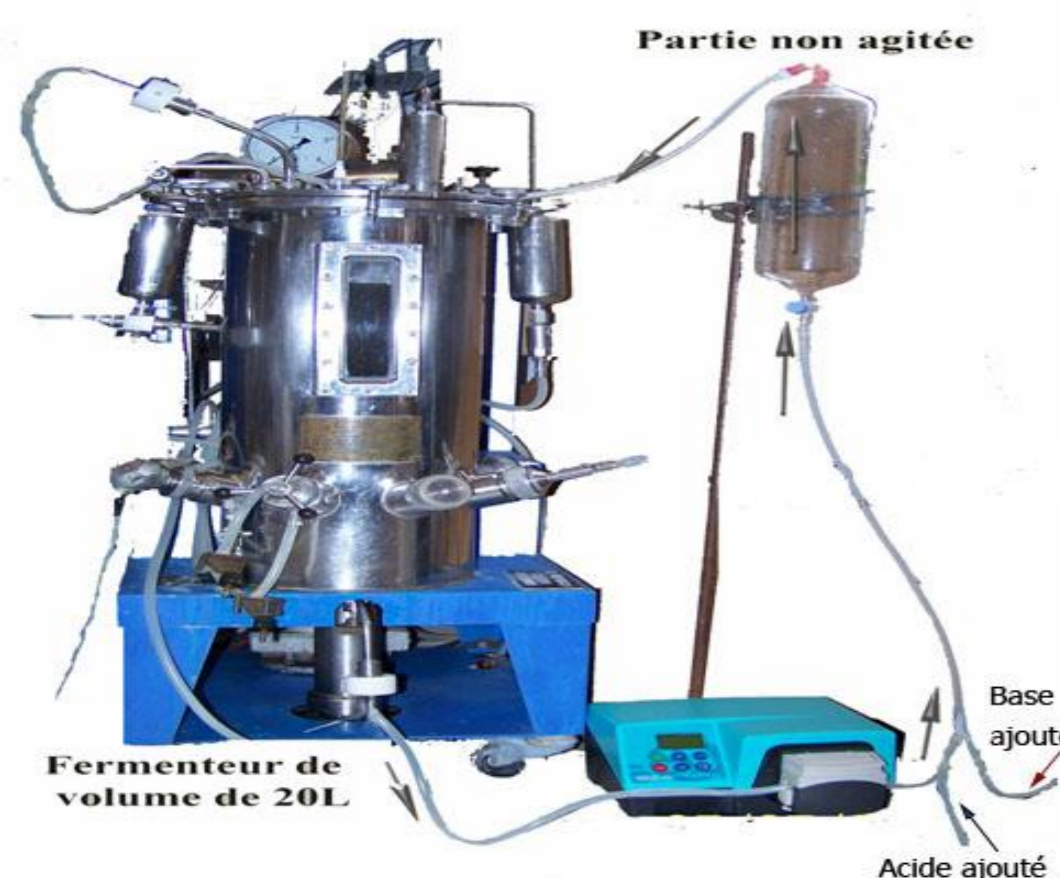


Evolution de l'activité de la Beta-galactosidase pour les différents fermenteurs *scale-down* (premier type et deuxième type soit déterministe soit stochastique).

Pour toute la période de fermentation, l'activité de la Beta-galactosidase est différente pour tous les réacteurs (premier type et deuxième type soit déterministe soit stochastique).



Analogie entre les phénomènes d'exposition des cellules au stress d'oxygène dans les réacteurs *scale-down* de premier (A et C) et second type (B et D). Les situations A et B correspondent à la rencontre d'une cellule microbienne avec un environnement riche en oxygène. Les situations C et D correspondent à la rencontre des cellules microbiennes avec un environnement pauvre en oxygène.

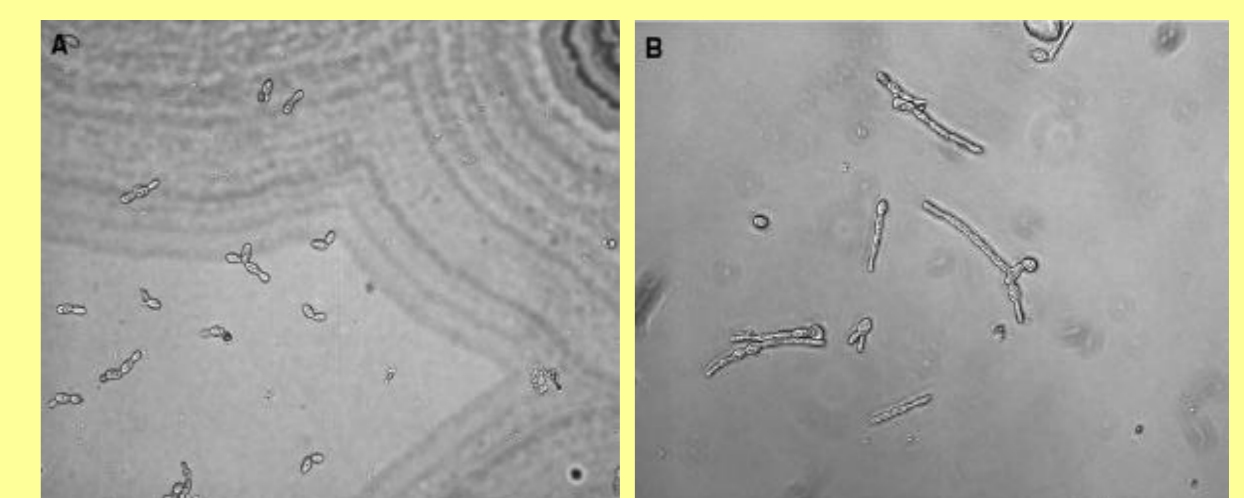


La fluctuation du pH

Le pH est régulé en réacteur industriel par l'ajout de base ou d'acide dans la partie supérieure du réacteur et l'enregistrement de la valeur de pH avec une sonde dans la partie inférieure du réacteur. Le temps de réponse de la sonde et de l'action locale du contrôleur, ainsi que leur séparation physique au niveau du volume du bio-réacteur, induit un gradient de pH. Pour observer l'effet à petite échelle, le gradient de pH est généré par injection de base ou d'acide à l'entrée de la partie non mélangée du premier type de réacteur *scale-down*.

Les expériences du premier type de réacteur *scale-down* avec régulation du pH à la partie mélangée ont été comparées avec la régulation du pH à la partie non mélangée. Aucun changement significatif n'est observé au niveau du nombre de cellules, de l'expression du gène LIP2, ni au niveau de l'activité de lipase.

Toutefois, une modification morphologique des cellules a été observée avec la régulation du pH au niveau non mélangée du premier type de réacteur.



Comparaison d'une culture avec la régulation du pH dans la partie agitée (A) où la cellule de levure est normale et d'une culture avec une régulation du pH réalisée au niveau de la partie non agitée (B) où un dimorphisme est observé.

Conclusions

Pour le réacteur *scale-down* de premier type, le nombre de cellules est toujours plus faible dans le cas d'un fermenteur *scale-down* par rapport au réacteur de référence. Il a été ainsi prouvé que la réduction du débit de recirculation pour une culture en fermenteur *scale-down* affecte la physiologie des cellules. L'activité de la Beta-galactosidase (il y a un gène rapporteur LacZ placé sous le contrôle du promoteur LIP2 chez la souche *Yarrowia lipolytica* JMY775) a été déterminée pour démontrer l'effet du fermenteur *scale-down* sur la capacité des cellules à produire de la lipase. Ainsi l'effet du réacteur *scale-down* sur l'activité de la Beta-galactosidase (la production métabolique de la lipase) dépend de la phase de croissance, cet effet n'est pas constaté en fin de phase exponentielle, sauf pour le débit le plus faible et doit donc être attribué à une diminution de la capacité des cellules à sécréter la lipase lorsque les conditions hydrodynamiques deviennent limitantes.

Un deuxième type de réacteur *scale-down* a été mis en oeuvre afin d'isoler l'influence du transfert d'oxygène par rapport à l'effet de la dispersion liquide-liquide (ou plus précisément du méthyloléate dans le milieu de culture aqueux). Il a été montré que la stratégie de contrôle de la vanne d'air a un impact très important sur la production de lipase. La stratégie de contrôle la plus représentative (par rapport aux résultats obtenus avec le réacteur *scale-down* de premier type) est la régulation par simulation stochastique qui fait l'analogie avec les probabilités de passage en zone aérée et non aérée. Les tests de culture menés avec cette stratégie (soit l'approche déterministe soit l'approche stochastique) ont montrés l'influence prépondérante du transfert d'oxygène lors de l'extrapolation du procédé de production de la lipase. Le réacteur *scale-down* de second type peut être amélioré en utilisant une vanne d'admission d'air à ouverture/fermeture graduelle.

Les fluctuations de pH en fermenteur *scale-down* n'entraînent aucun changement significatif au niveau du nombre de cellules, de l'expression du gène LIP2, ni au niveau de l'activité de lipase. L'effet du pH n'a été observé qu'au niveau morphologique.