

## **Cycle de séminaires « Bioprocédés et biotechnologie »**

Frank Delvigne  
Année académique 2010-2011

Cycle de cours donnés à l'université de Constantine (Algérie)

1

## **Première partie Production de micro-organismes en bioréacteur**

2

## Introduction

Contenu classique d'un cours de génie biochimique (*Biochemical engineering*) :

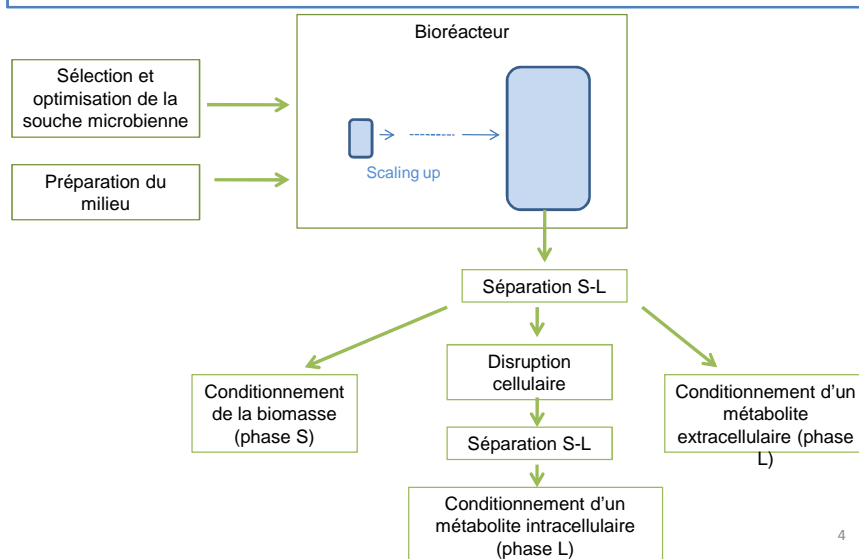
- Bilans des réactions biochimiques
- Cinétique de croissance microbienne (parallélisme avec cinétique enzymatique)
- Bilans des bioréacteurs (batch, fed-batch, continu)
- Génie chimique (design des bioréacteurs, phénomènes de transfert)
- Techniques de séparation et de purification/conditionnement des bio-produits (*Downstream processing*)

Bouquins de référence :

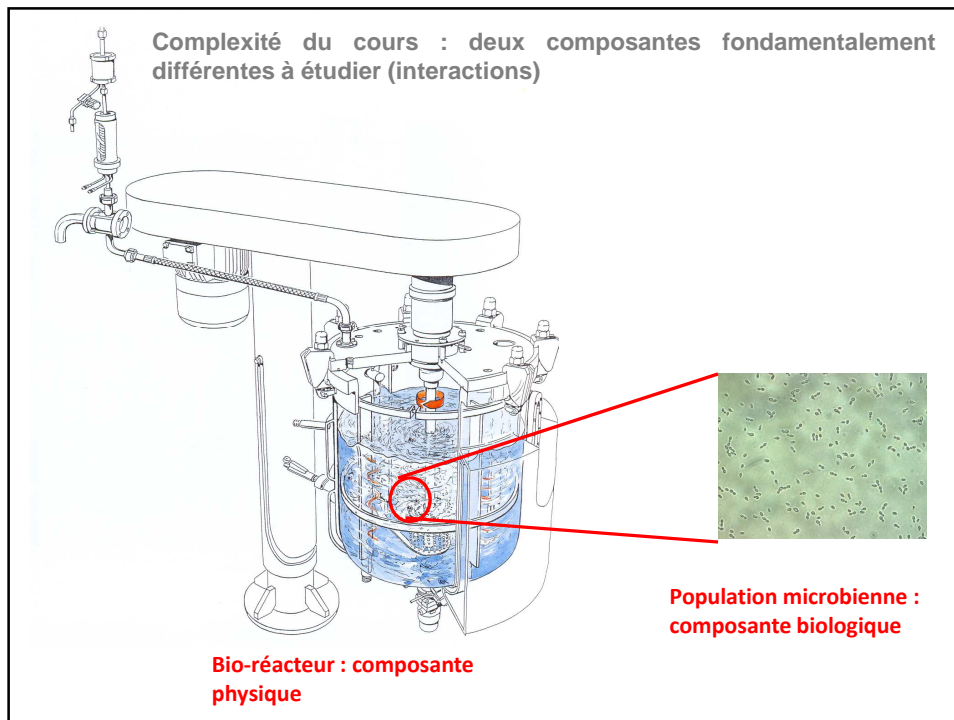
- Blanch H., Clark D.S. (1997) *Biochemical engineering*, Marcel Dekker
- Bailey J.E., Ollis D.F. (1986) *Biochemical engineering fundamentals*, McGraw Hill

3

## Schéma d'opérations unitaires caractéristique des bioprocédés



4



## Synopsis

Mise en œuvre des bioréacteurs : description du matériel

Génie chimique relatif aux bioréacteurs

Ecriture des équations de bilan et systèmes dynamiques

Simulation des systèmes dynamiques (MatLab)

Traitement des données sous MatLab

Dynamique des bioréacteurs

Bilans biochimiques

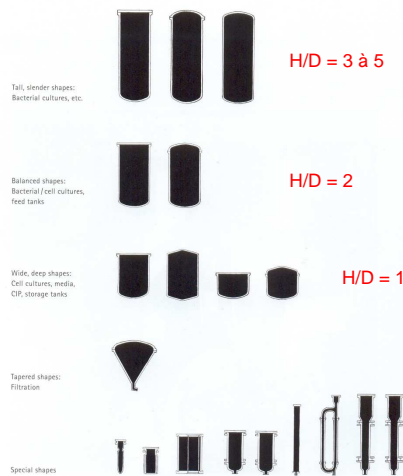
## Mise en œuvre de bioréacteurs : description du matériel



7

## 1. Bioréacteurs et équipements associés

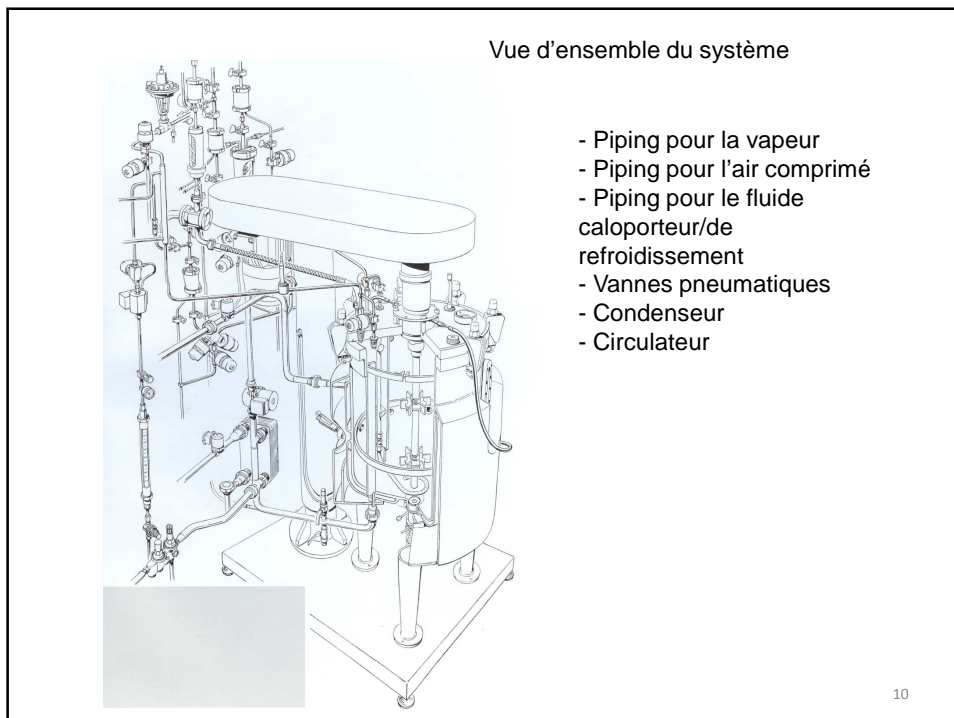
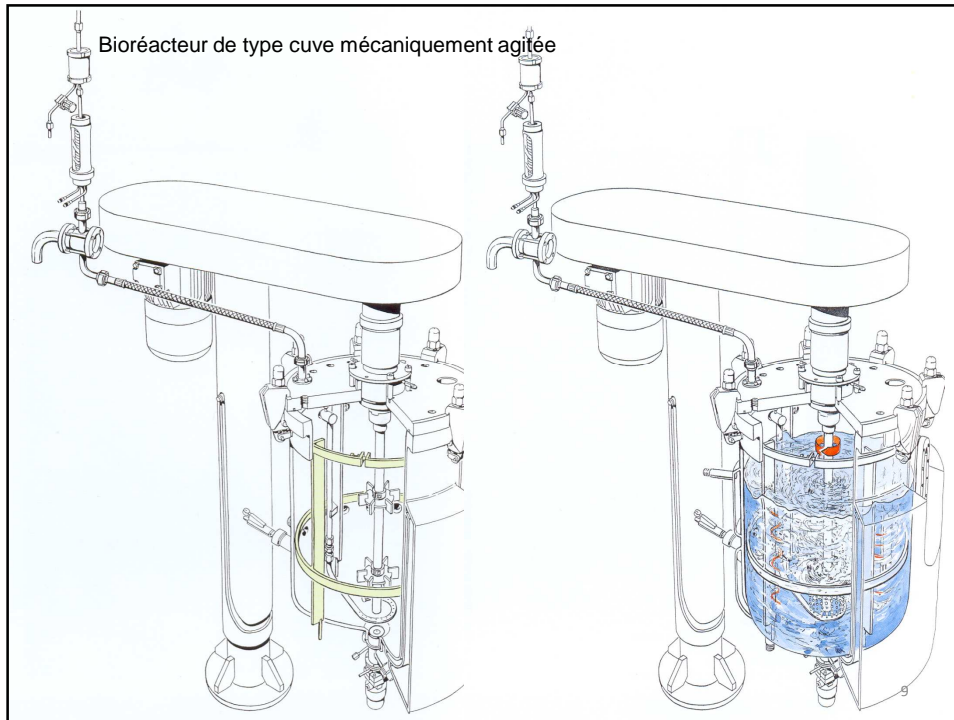
Géométrie générale du réacteur biologique :

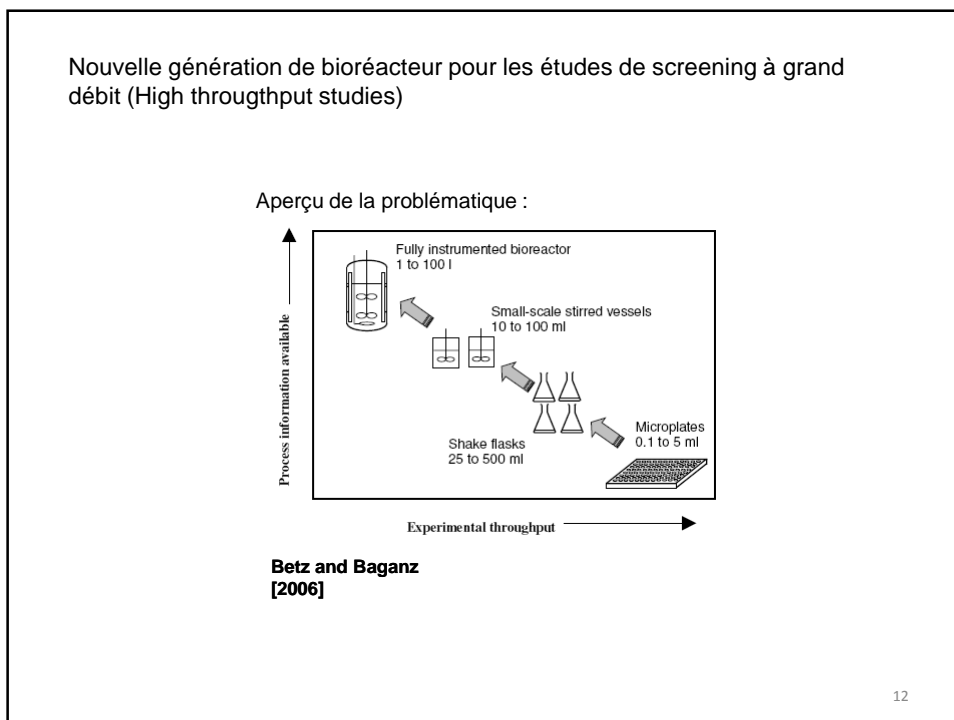
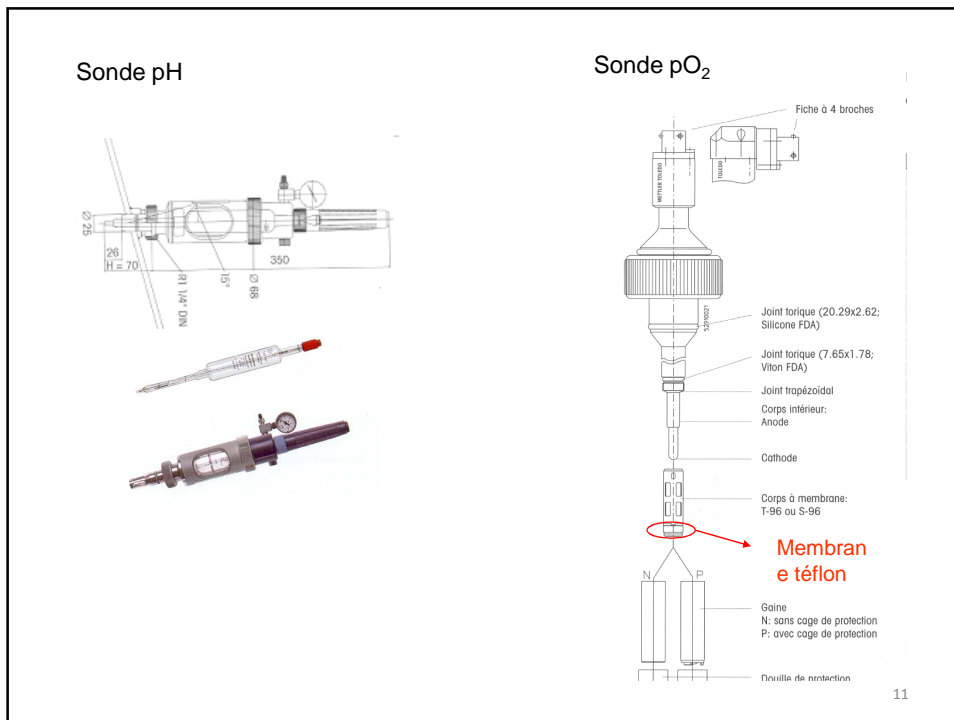


Système d'agitation :

- Mécanique
- Pneumatique

8

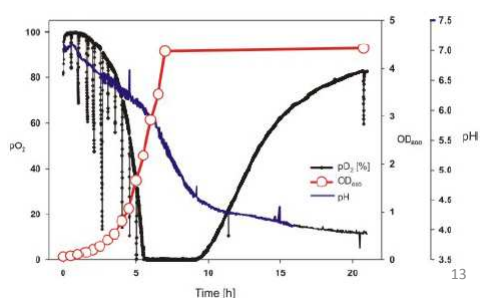




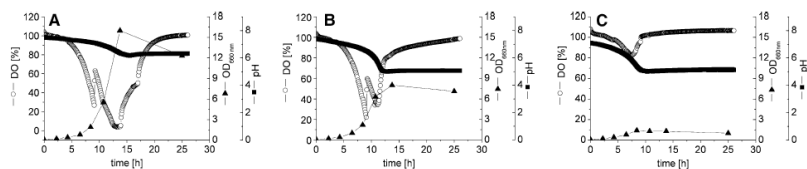
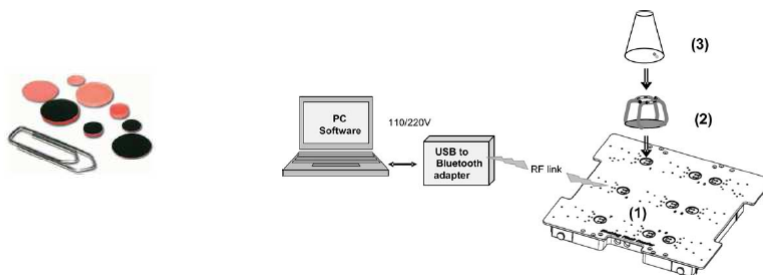
Amélioration de l'outil de screening de base : 90% des expériences (au niveau académique et industriel) mettant en œuvre la culture de micro-organismes sont réalisées en erlenmeyer



Vasala et al. [2006]

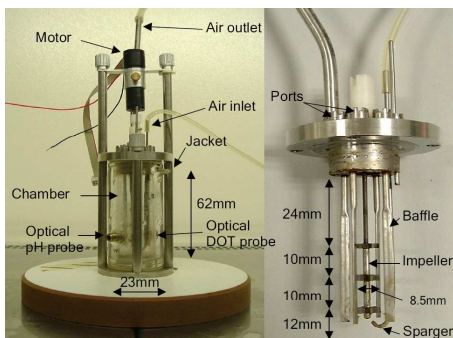


Développement d'une gamme de senseurs optiques



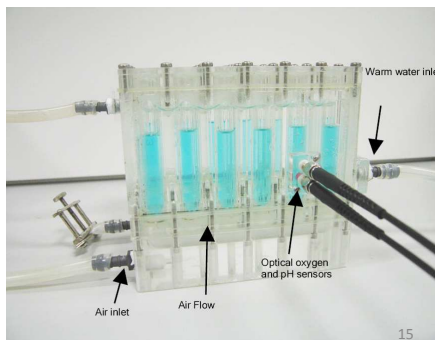
Cultivation of *C. glutamicum lysC<sup>ΔP</sup>* in batch culture on defined medium with different concentrations of phosphate buffer 106 mM (a), 32 mM (b) and 6 mM (c). Cultivations were carried out in 250 ml non-baffled plastic shake flasks equipped with an oxygen and pH sensor at 30°C and 230 rpm

Cuve agitée miniature ( $V_L = 18 \text{ ml}$ )



Betz and Baganz [2006]

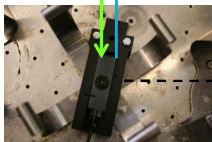
Colonne à bulles miniature ( $V_L = 2 \text{ ml}$ )



15

Exemples de mini-bioréacteurs « hand-made »

Enregistrement de la pO<sub>2</sub> (système Presens)



Alimentation fed-batch en glucose (système EnBase)





Exemples d'une plateforme de micro-bioréacteurs

**Bench top**

BioLector

pH  
Biomass & Fluorescence  
Oxygen

A B C D

Fluorescence Intensity (a.u.)

Time (h)

Time (h)

Time (h)

Time (h)

Systèmes de culture « disponibles »



## Génie chimique relatif aux bioréacteurs

### 1. Rappel : opération de mélange

#### Bioréacteurs de dimensions standards : recommandations

##### Cuve :

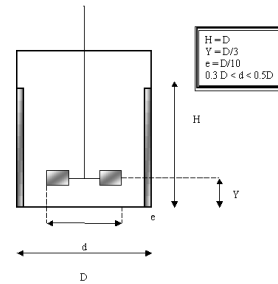
- Cuve cylindrique à fond plat.
- Hauteur de liquide (H) égale au diamètre de la cuve (D).
- Le rapport H/D peut être égal à 2 ou à 3 dans le cas de bioréacteurs aérés ou munis de plusieurs mobiles d'agitation.

##### Contre-pales :

- Nombre de contre-pales ( $n_p$ ) = 4.
- Largeur des contre-pales (b) = D/12 ou D/10.
- Hauteur des contre-pales ( $h_p$ ) = H.
- Écartement par rapport à la paroi de la cuve ( $e_p$ ) = 0 ou 0,2D.

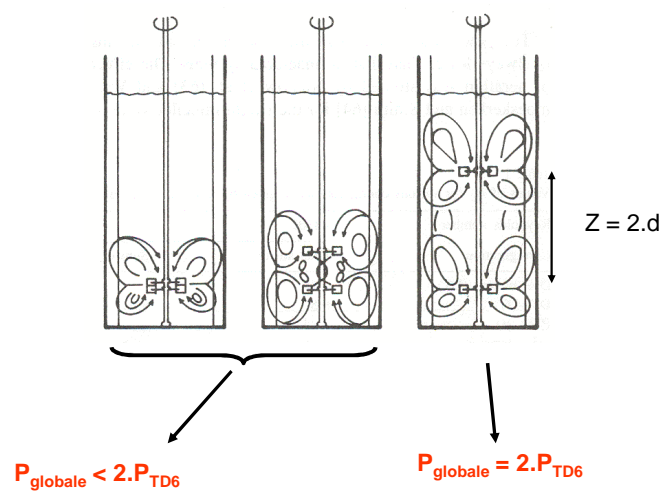
##### Mobiles d'agitation :

- Diamètre du mobile (d) = D/3.
- Distance par rapport au fond de la cuve (Y) = D/3.
- Le nombre de pales ( $n_p$ ) et le rapport diamètre du mobile (d) sur largeur de la pale (l) sur hauteur de la pale (w) est fonction du type de mobile utilisé (pour une TD6 :  $n_p = 6$  et  $d/l/w = 20/5/4$ )



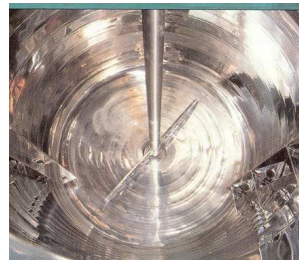
19

#### Bioréacteurs à plusieurs étages d'agitation H/D > 1

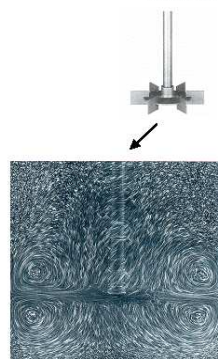
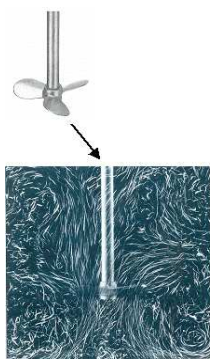
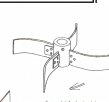
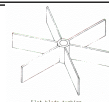
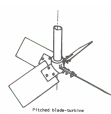
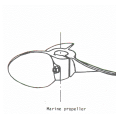


20

## Opération de mélange : cuve mécaniquement agitée

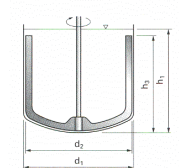


## Actions des mobiles d'agitation

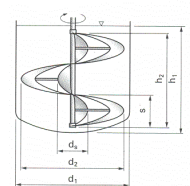
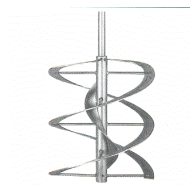


## Actions des mobiles d'agitation

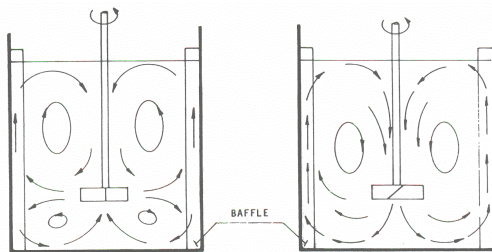
Milieux à viscosité élevée → mobiles à action tangentielle



Ancre



Ruban hélicoïdal



RADIAL

AXIAL

### Calcul de la puissance dissipée par un système d'agitation

**Théorème de Vaschy-Buckingham** : réduction de 16 à 13 variables sans dimensions.

$$N_p = k \cdot Re^x \cdot Fr^y \cdot We^z \cdot (H/d)^{x1} \cdot (D/d)^{x2} \dots$$

Nombre de Reynolds ( $Re$ ) =  $\rho N d^2 / \mu$

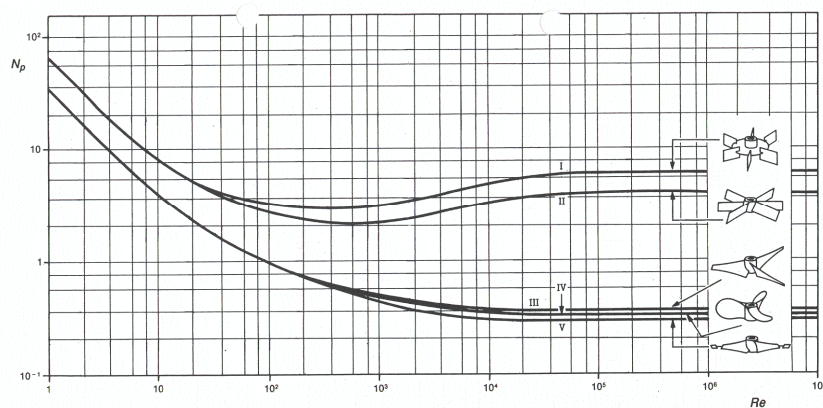
Nombre de puissance ou de Newton ( $N_p$ ) =  $P / \rho N^3 d^5$

Nombre de Weber ( $We$ ) =  $\rho N^2 d^3 / \sigma$

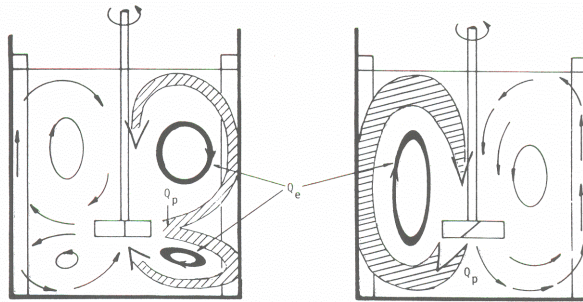
Nombre de Froude ( $Fr$ ) =  $N^2 d / g$

25

### Courbe caractéristique de puissance : $N_p = f(Re)$



26

**Calcul des débits de fluide**

Circulation = entraînement + pompage

**Pompage :**

$$Q_p = N_{qp} \cdot N \cdot d^3$$

$$t_p = V_l / Q_p$$

$$f_p = 1 / t_p$$

**Circulation :**

$$Q_c = Q_e + Q_p = N_{qc} N d^3$$

$$t_c = V_l / Q_c$$

27

**Application :**

Soit une cuve standard ( $D = 0,3 \text{ m}$ ) contenant de l'eau. Cette cuve est équipée d'un mobile d'agitation de type TD6 tournant à  $400 \text{ min}^{-1}$ .

Caractéristiques de la TD6 :

$$N_p = 5,5$$

$$N_{qp} = 0,85$$

$$N_{qc} = 1,51$$

Calculez la puissance dissipée, la vitesse périphérique, les débits de pompage et de circulation et les temps de pompage et de circulation.

28

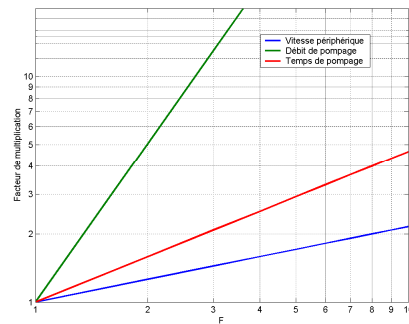
## 2. Extrapolation (*scale-up*) : principe des similitudes

$$N_{\text{industriel}} = N_{\text{lab}} \cdot (D_{\text{industriel}}/D_{\text{lab}})^{\alpha/\beta}$$

Avec  $F = D_{\text{industriel}}/D_{\text{lab}}$

Exemple : choix de P/V comme critère d'extrapolation

$$\frac{P}{V} = \frac{N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot d^5}{D^3} = \frac{N^3 \cdot D^5}{D^3} = N^3 \cdot D^2$$



29

### Application :

La culture d'un micro-organisme anaérobie a été mise au point dans un fermenteur pilote de 785 litres (cuve standard de  $D = 1\text{m}$ ). La cuve est équipée d'une TD6 tournant à  $180\text{ min}^{-1}$ . Le liquide est peu visqueux et peut être assimilé à de l'eau du point de vue des propriétés physico-chimiques.

Calculez la vitesse périphérique, les débits et temps de pompage et de circulation.

La culture à l'échelle industrielle doit se faire dans un volume de  $50\text{ m}^3$ . Calculez l'évolution des différents paramètres cités précédemment si on garde la puissance volumique à un niveau constant.

30

Résolution :




Volume (m <sup>3</sup> )	0,79	50,00
d (m)	0,33	1,33
N (s <sup>-1</sup> )	3,00	1,16
P(W)	610,60	38891,45
<b>P/V (W/m<sup>3</sup>)</b>	<b>777,83</b>	<b>777,83</b>
Vitesse périphérique (m/s)	3,14	4,84
Débit de pompage (m <sup>3</sup> /s)	0,09	2,27
Temps de pompage (s)	8,52	22,07

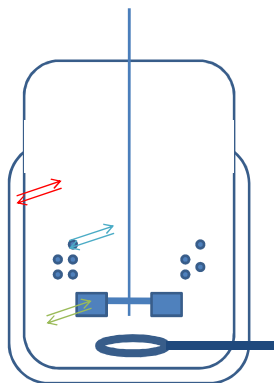
1,54  
24,58  
2,59

Facteur multiplicateur = f(F)

31

## Phénomènes de transfert en bioréacteur agité

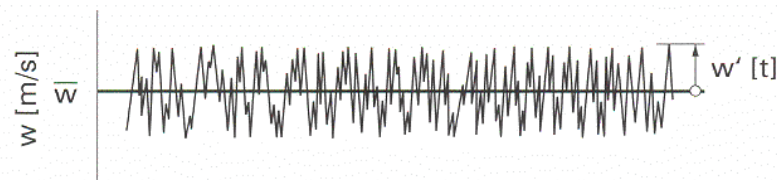
- Transfert de masse 
- Transfert de chaleur 
- Transfert de quantité de mouvement 



32



### Notion de turbulence :



$$w_i = W + w'$$

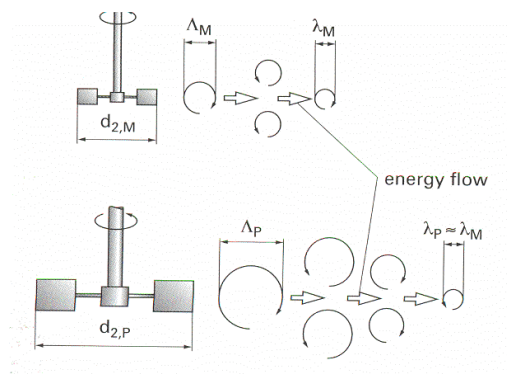
$$k = \frac{1}{2} (w'_x{}^2 + w'_y{}^2 + w'_z{}^2)$$

$$w'_x{}^2 = w'_y{}^2 = w'_z{}^2$$

33

### Echelle de Kolmogoroff :

Hypothèse de Kolmogoroff : pour un nombre de Reynolds important (de manière à se situer en régime turbulent), dans un système d'écoulement donné, les tourbillons de petite taille sont indépendants des mouvements du fluide et constituent une turbulence locale homogène et isentropique

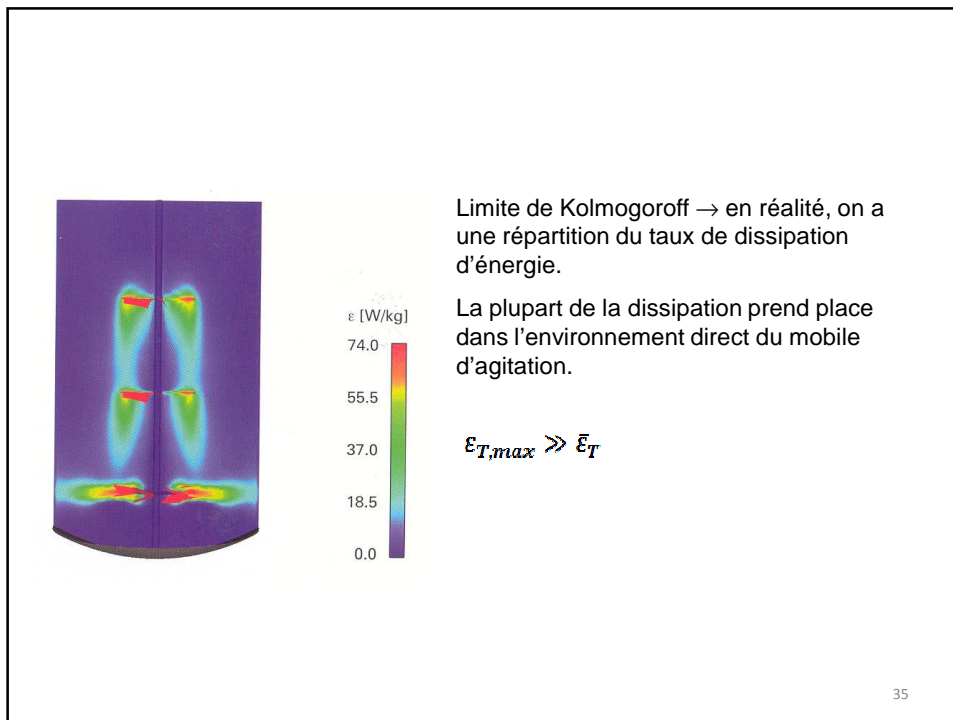


$$\bar{\epsilon}_T = \frac{P}{\rho \cdot V}$$

$$\lambda_K = \left( \frac{\epsilon_T}{\nu^3} \right)^{-1/4}$$

Viscosité cinématique :  
 $\nu = \mu/\rho = 10^{-6}$  (eau)

34



### Application :

Soit un bioréacteur mécaniquement agité de configuration standard équipé d'un mobile TD6 ( $d = 0.1\text{m}$  ;  $N_p = 5.5$  ;  $N_{qc} = 1.51$ ). Le milieu de culture peut être assimilé à de l'eau au niveau des propriétés physico-chimiques.

Si le mobile tourne à un taux d'agitation de  $1200\text{ min}^{-1}$  et en utilisant le principe de Kolmogoroff, quel(s) micro-organismes ou cellule(s) sont (est) affecté(es) par le cisaillement :

*E. coli* :  $d_{\text{cellule}} \sim 1\ \mu\text{m}$

*S. cerevisiae* :  $d_{\text{cellule}} \sim 7\ \mu\text{m}$

*Penicillium canescens* :  $d_{\text{cellule}} \sim 50\text{-}100\ \mu\text{m}$

*Sodoptera frugiperda* (Sf9):  $d_{\text{cellule}} \sim 20\ \mu\text{m}$

CHO :  $d_{\text{cellule}} \sim 30\ \mu\text{m}$

Que deviennent vos calculs si, dans la zone de l'agitateur la puissance spécifique est 30 fois plus élevée que la puissance spécifique moyenne ?

Calculez la fréquence à laquelle les micro-organismes sont soumis à cette puissance spécifique maximale.

Proposez des solutions pour améliorer la situation

## 2. Transfert de quantité de mouvement : homogénéisation

### Mesure du temps de mélange



Temps

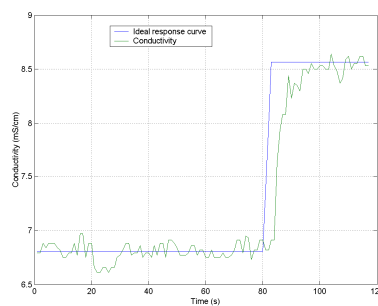
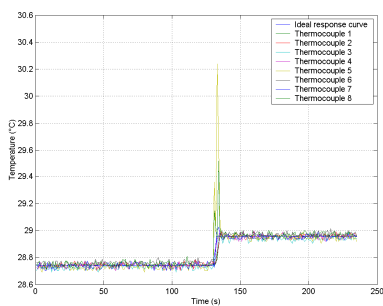
Deux phénomènes interviennent dans le mélange :

- La circulation
- La turbulence

37

### Méthodes plus précises :

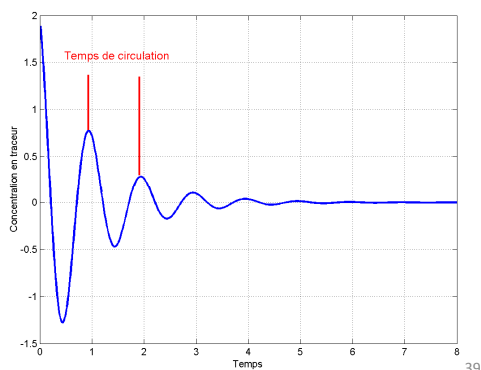
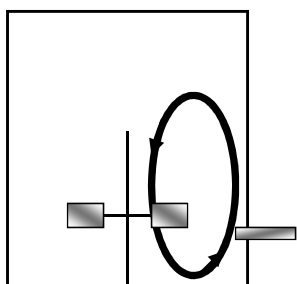
Traceur	Sonde
Acide-base	pH
Solution saline	Conductivité
Solution chauffée	Thermocouple



38

**Grandeurs caractéristiques** : corrélation basées sur la circulation.

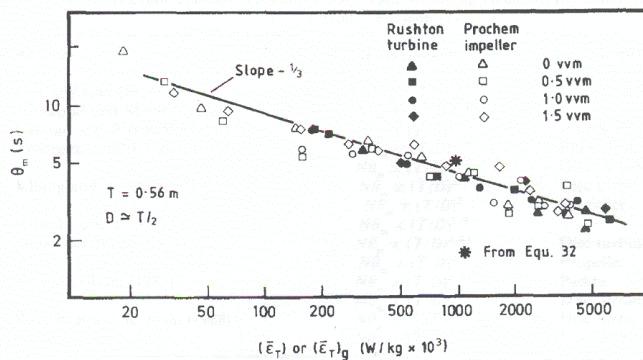
$$t_m \cdot N = 3,9 \cdot (d/D)^{-3} \cdot N_{qc}^{-1}$$



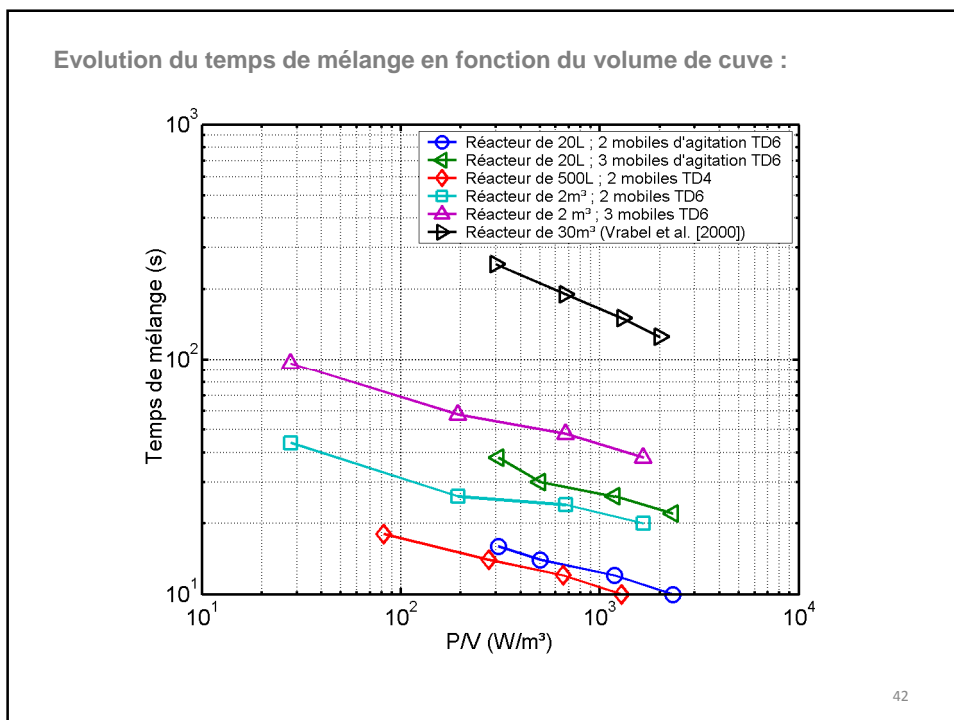
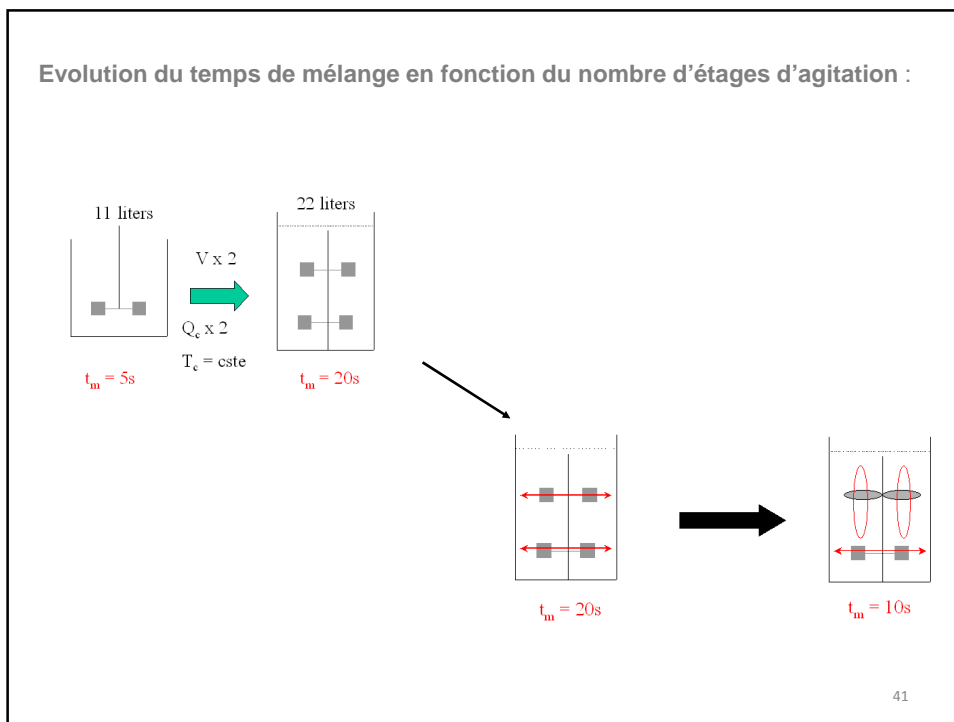
39

**Grandeurs caractéristiques** : corrélation basées sur la turbulence.

$$t_m = 5,9 \cdot D^{2/3} \cdot \epsilon_T^{-1/3} \cdot (d/D)^{-1/3}$$

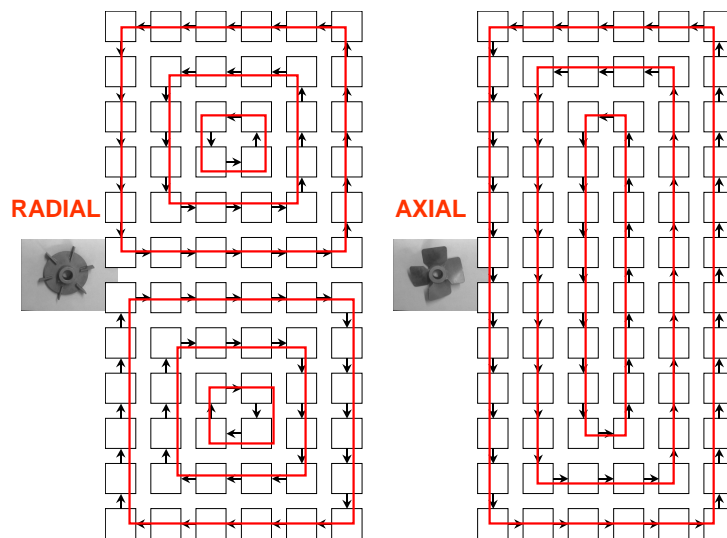


40



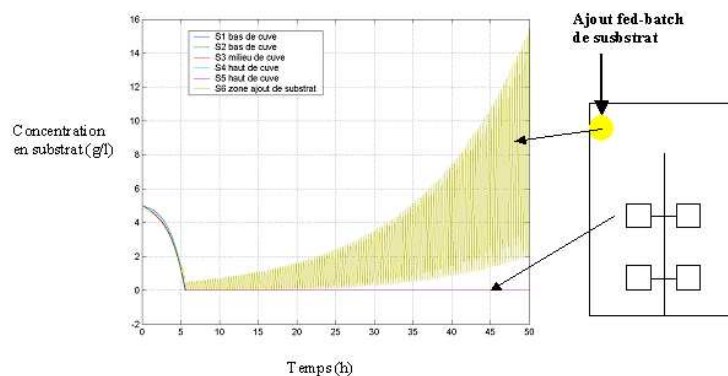
Modèles structurés pour l'hydrodynamique des bioréacteurs

- Modèles compartimentés
- Réseau de zones



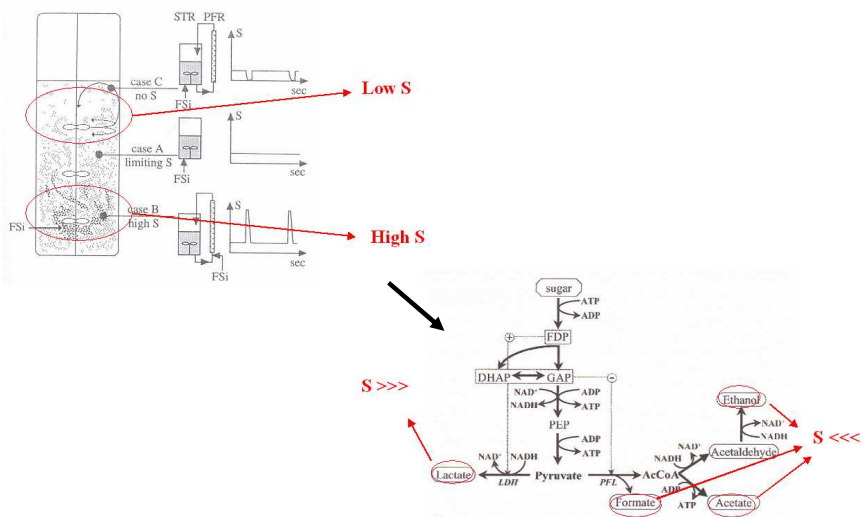
43

Exemple de l'importance de la dynamique du système : gradient de concentration en substrat pour une culture *fed-batch*



44

Influence de la concentration en substrat sur le métabolisme : exemple de *Lactococcus lactis*

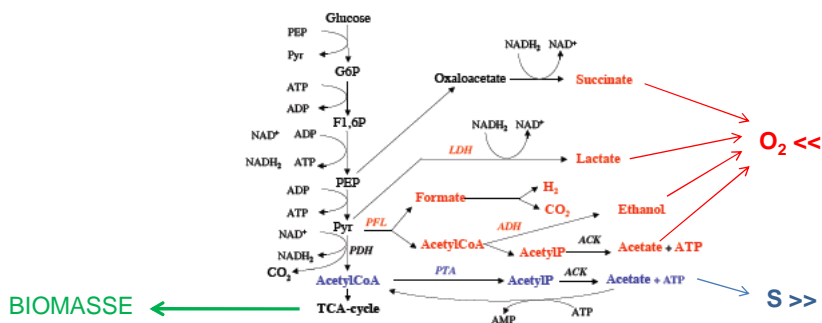


45

Influence de la concentration en substrat sur le métabolisme : exemple de *Escherichia coli*

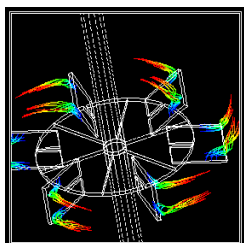
Bascule métabolique déclenchée par :

- Excès de glucose
- Manque d'oxygène (voie des acides mixtes chez certains procaryotes)

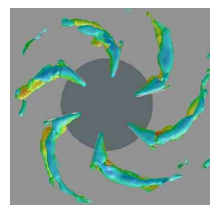
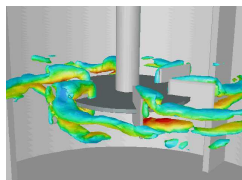


46

### 3. Dispersion G-L et transfert d'oxygène



Phase L



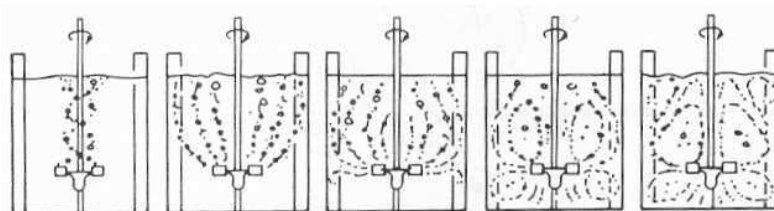
Phase L + phase G

Bakker [2000]

47

### Illustration des différents régimes d'écoulement gaz-liquide au sein d'une cuve agitée :

De la gauche vers la droite, le débit d'air est maintenu constant et la vitesse d'agitation est progressivement augmentée



Engorgement

Engorgement  
partiel

Charge

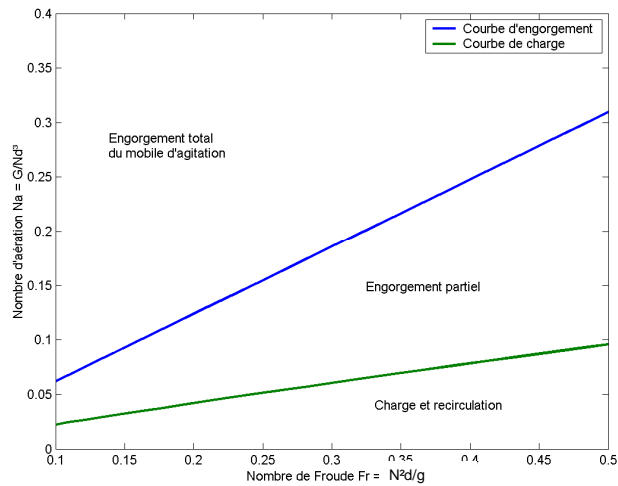
Recirculation

Nienow [1998]

48

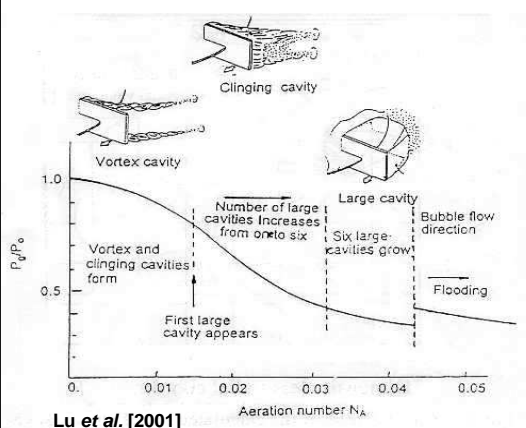


**Diagramme de flux (forme adimensionnelle) :**



49

**Puissance dissipée en milieu aéré : décroît en fonction du débit d'air injecté et de la forme des cavités gazeuses**



Lu et al. [2001]

Michel et Miller :

$$P_g = m \cdot (P_0^2 Nd^3 / G^{0.56})^n$$

Avec pour une TD6 : m = 0,78 n = 0,45

**Effet proportionnel sur les débits de pompage et de circulation :**

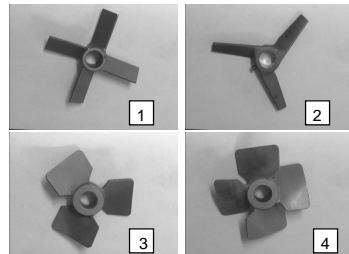
$$Q_{p \text{ aéré}} = (P_{\text{aéré}}/P_0) \cdot Q_p$$

$$Q_{c \text{ aéré}} = (P_{\text{aéré}}/P_0) \cdot Q_c$$

50

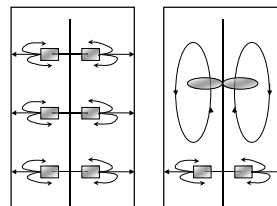
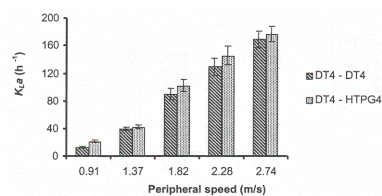
## Optimisation de la géométrie et de la configuration des mobiles d'agitation

### 1. Hélices à pales profilées :



- 1 : hélice à pales inclinées.  
 2 : hélice à pales profilées A310 (coefficient de solidité : 22%)  
 3 : hélice à pales profilées A340 (coefficient de solidité : 67%)  
 4 : hélice à pales profilées A315 (coefficient de solidité : 87%)

### 2. Systèmes hybrides :



51

**Calcul du  $k_a$  à partir des variables opératoires du réacteur agité :**  
**Corrélations de Van't Riet : indépendantes de la géométrie du mobile, valable pour les milieux aqueux et seulement si dispersion effective du gaz.**

- Pour l'eau distillée (milieux coalescents) :

$$k_a = 0.026 \cdot (P/V)^{0.4} \cdot (G/S)^{0.5}$$

- Pour les milieux contenant des électrolytes (milieux non coalescents) :

$$k_a = 0.002 \cdot (P/V)^{0.7} \cdot (G/S)^{0.2}$$

A partir de là, on peut imaginer la forme de la corrélation pour un bioréacteur sans agitation mécanique (de type pneumatique) :

$$k_a = C \cdot (G/S)^\alpha$$

Rappel : variation de la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide :

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a (C_L^0 - C_L) - q_{O_2X}$$

Compo  
physique

Compo  
biologique

52

**Application :**

Soit 2 mobiles d'agitation : une TD6 et une hélice à pales profilées ( $d = 0.5$  m). Les équations décrivant la courbe de charge sont les suivantes :

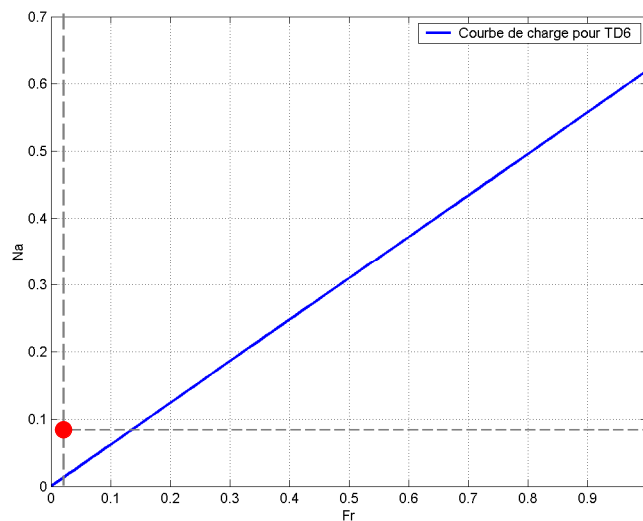
$$\text{TD6 : } Na = 30 \cdot (d/D)^{3,5} \cdot Fr$$

$$\text{Hélice : } Na = 6000 \cdot (d/D)^{1,55} \cdot Fr^{2,7}$$

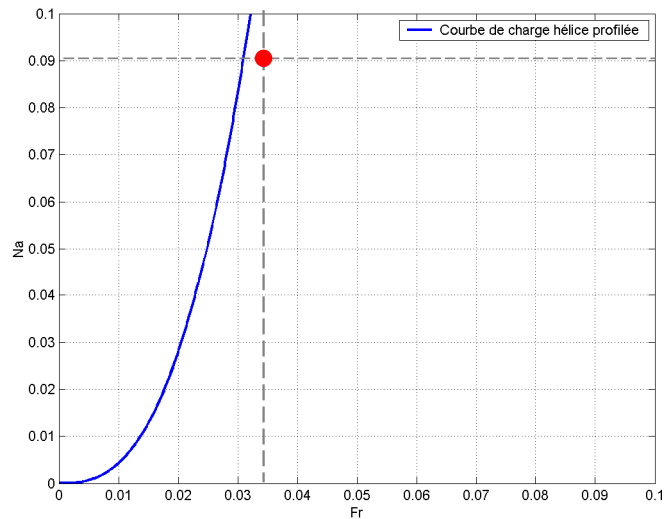
Comparez les performances respectives de dispersion gaz-liquide pour les deux agitateurs si on doit respecter les contraintes suivantes :

	N maximum pour cisaillement ( $s^{-1}$ )	G minimum pour transfert d'oxygène (vvm)
TD6	0,51	0,13
Hélice profilée	0,83	0,19

53

**Résolution :**

54

**Résolution (suite) :**

55

**Transfert d'oxygène en relation avec la cinétique microbienne****Définitions importantes :**OTR : *oxygen transfer rate* (capacité de transfert physique)OUR : *oxygen uptake rate* (capacité d'absorption biologique)

$$\frac{dC_L}{dt} = k_L a \underbrace{(C_L^o - C_L)}_{\text{OTR}} \underbrace{q_{O_2X}}_{\text{OUR}}$$

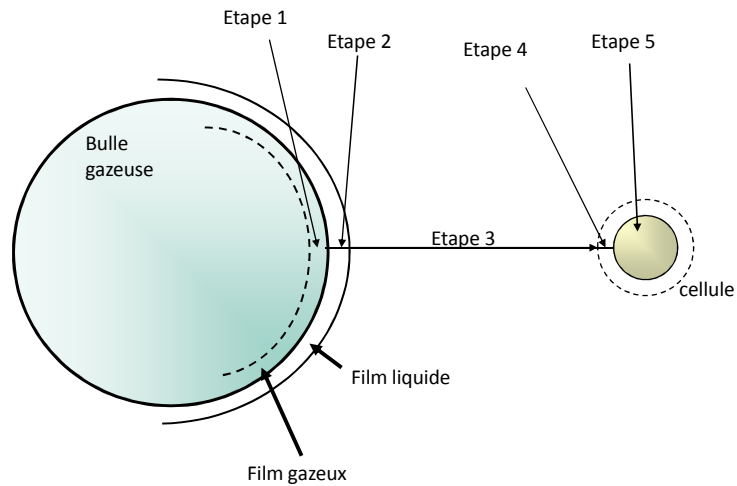
Pour une culture microbienne avec un taux de croissance  $\mu$ , une concentration en biomasse  $X$  et un coefficient de rendement  $Y_{XO_2}$ , la demande en oxygène (OUR) est donnée par :

$$\text{OUR} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{XO_2}}$$

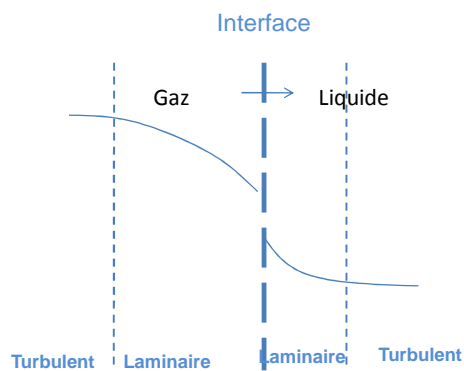
56

## Processus de transfert d'oxygène

Description et modélisation



**Rappel** : théorie du double film



Au niveau des films laminaires, le transfert de matière se déroule uniquement par diffusion.  
On applique alors la loi de Fick:

$$J_A = -D \cdot \frac{dC}{dZ}$$

Avec :

- $J_A$  : flux diffusif d'un composé A ( $\text{mol/s.m}^2$ )
- $D$  : coefficient de diffusion moléculaire ( $\text{m}^2/\text{s}$ )
- $dC/dZ$  : gradient de concentration à l'équilibre ( $\text{mol/m}^3$ )

Si on considère une espèce A qui traverse les deux films :

$$J_A = D_G \cdot \frac{C_G - C_{Gi}}{Z_G} = D_L \cdot \frac{C_{Li} - C_L}{Z_L}$$

$D_G$  et  $D_L$  : diffusivités effectives (m<sup>2</sup>/s)  
 $Z_G$  et  $Z_L$  : épaisseur des deux films (m)

Cette équation peut être exprimée en terme de coefficient de transfert de masse  $k$  (m<sup>2</sup>/s)

$$J_A = k_G \cdot (C_G - C_{Gi}) = k_L \cdot (C_{Li} - C_L)$$

Le taux total de transfert de matière est donné par :

$$Q = J_A \cdot A = J_A \cdot (a \cdot V)$$

$A$  : surface d'échange (m<sup>2</sup>)  
 $a$  : surface spécifique d'échange (m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>)

$$\xrightarrow{A} Q = k_G \cdot A \cdot (C_G - C_{Gi}) = k_L \cdot A \cdot (C_{Li} - C_L)$$

$$\xrightarrow{a} Q = k_G \cdot a \cdot (C_G - C_{Gi}) \cdot V_L = k_L \cdot a \cdot (C_{Li} - C_L) \cdot V_L$$

Les concentrations aux interfaces étant difficiles à déterminer, on préfère exprimer l'équation en fonction de taux global  $K$  de transfert de masse :

$$Q = K_G \cdot a \cdot (C_G - C_G^0) \cdot V_L = K_L \cdot a \cdot (C_L^0 - C_L) \cdot V_L$$

$C_G^0$  et  $C_L^0$  sont les concentrations à l'équilibre dans chacune des phases

La relation d'équilibre dans un système gaz-liquide peut être déterminée par la loi de Henry (applicable pour les systèmes dilués)

$$p_A = H_A \cdot C_{LA}^0$$

$H_A$ , constante de Henry (bar m<sup>3</sup>/kg) :  $C_{GA} \cdot R \cdot T = C_{LA}^0 \cdot H_A$

La solubilité de l'oxygène dans la phase gazeuse étant plus importante :

$$Q = K_L \cdot a \cdot (C_L^0 - C_L) \cdot V_L$$

Avec :

$$C_G = H \cdot C_L^0$$

## Optimalisation du transfert d'oxygène

Nous disposons donc de deux facteurs sur lesquels nous pouvons agir pour augmenter la vitesse de transfert d'oxygène des bulles gazeuses vers le microorganisme :  $k_L \cdot a$  et  $(C_L - C_L)$ .

$$Q = k_L \cdot a (C_L - C_L)$$

- augmenter  $(C_L - C_L)$

- \* Modifier la pression du soluté (augmenter le pourcentage d'oxygène dans l'air) ( $O_2$  pur x 5)
- \* Augmenter la pression de l'air dans le fermenteur (2 bars : quantité x 2)

-augmenter  $k_L \cdot a$

- \* Influence du sel (peu utilisable)
- \* Influence de composés organiques (éthanol) peu utilisable
- \* Influence de détergent ; favorable à faible concentration, défavorable à forte concentration

- augmenter  $a$

- \* Augmenter  $a$  par agitation et force de cisaillement (voir plus loin)

## Solubilité des gaz dans les liquides

Le tableau suivant donne la solubilité de l'oxygène dans de l'eau distillée

T°C	Pression kPa		
	100.0	101.3	103.0
25	8.15	8.26	8.40
30	7.45	7.55	7.69
35	6.85	6.94	7.07

Les facteurs qui affectent la solubilité de l'oxygène sont

- la pression partielle d'oxygène
- la température
- la présence de solutés dans la phase liquide (sel, tensio-actifs et substances organiques)
  - 1) l'effet de la pression partielle d'oxygène ( $P_O$ ) est exprimée par la loi de Henry  
 $C_s = P_O / H_e$  ( $H_e$  = constante de Henry,  $C_s$  = concentration à la saturation en oxygène (mg/l))
  - 2) l'effet de la température peut être exprimée par la relation empirique de Truesdale et al. (1955)  
 $C_s = 14,16 - 0,3943 T + 0,007714 T^2 - 0,0000646 T^3$   
 L'air contient 20,94% oxygène. La pression partielle est de 158,8 mm de Hg. L'erreur standard est de 0.05mg/l
  - 3) Les sels dissous diminuent la solubilité de l'oxygène. Dans une solution saturée de NaCl, la solubilité de l'oxygène diminue d'un facteur 2.

## Les techniques de mesure du $K_L a$

-Techniques directes : en présence de micro-organismes

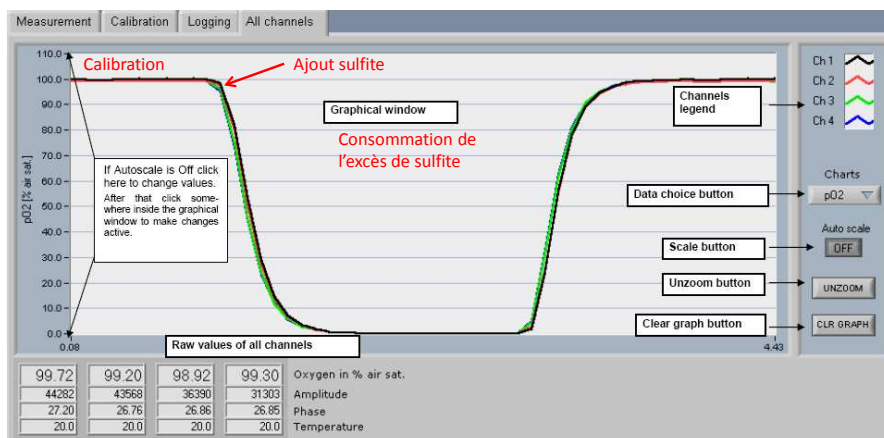
$$dC_L/dt = K_L a(C_L^0 - C_L) - Q_0$$

-Techniques indirectes : en absence de micro-organismes

$$dC_L/dt = K_L a(C_L^0 - C_L)$$

### Technique indirecte de détermination du $K_L a$

Suivi d'une expérience de *gassing-in gassing-out*



64

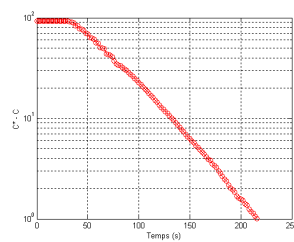
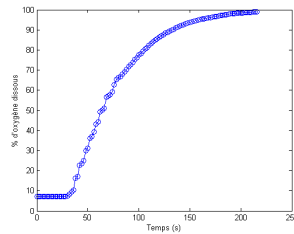


## Exploitation des données

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C_L)$$

$$\int \frac{dC}{C^* - C_L} = k_L a \cdot t$$

$$\ln(C^* - C_L) = k_L a \cdot t$$



A l'équilibre, le transfert physique (OTR) doit satisfaire la demande (OUR) :

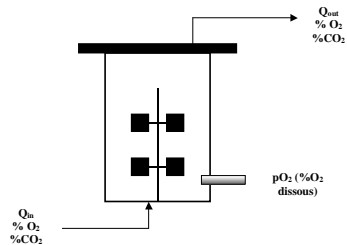
$$k_L a \cdot (C_L^0 - C_L) = \frac{\mu \cdot X}{Y_{XO}}$$

En pratique, on préfère de maintenir une concentration en oxygène > à une concentration critique  $C_{L \text{ crit}}$

$$k_L a_{\min} = \frac{\mu \cdot X}{Y_{XO} \cdot (C_L^0 - C_{L \text{ crit}})}$$

Pour calculer les paramètres opératoires du réacteur pour atteindre ce  $k_L a$ , voir précédemment

### Equilibre entre OUR et OTR lors d'une culture : principe des bilans gazeux



$q_0$  déterminé par bilan gazeux :

$$k_L a = \frac{Q_{IN O_2} - Q_{OUT O_2}}{C^* - C_L}$$

$$Q_{IN O_2} = Q_{IN} \cdot 0,2094$$

$$Q_{IN N_2} = Q_{IN} \cdot 0,79$$

$$\% N_{N_2, OUT} = 100 - \% O_2 - \% CO_2$$

$$Q_{OUT} = \frac{100}{\% N_{2, OUT}} \cdot Q_{IN N_2}$$

$$Q_{OUT O_2} = \frac{\% O_2}{100} \cdot Q_{OUT}$$

Régime stationnaire :

$$\frac{dC_L}{dt} = 0$$

$$q_0 = k_L a \cdot (C^* - C_L)$$

$$k_L a = \frac{q_0}{C^* - C_L}$$

Pour le QR :

$$Q_{OUT CO_2} = \frac{\% CO_{2, OUT}}{100} \cdot Q_{OUT}$$

$$QR = \frac{Q_{OUT CO_2}}{Q_{IN O_2} - Q_{OUT O_2}}$$

67

### Application :

Soit une fermentation de *Penicillium sp.* Le volume utile du fermenteur est de 50 litres et l'aération est à 0,16 vvm (composition de l'air entrant : 20,94% d'O<sub>2</sub> et 79% de N<sub>2</sub>). La culture est conduite à 30°C et à pression atmosphérique (C\* oxygène = 7,6 mg/l).

L'analyseur de gaz placé à la sortie du fermenteur collecte les mesures suivantes à des temps de fermentation différents :

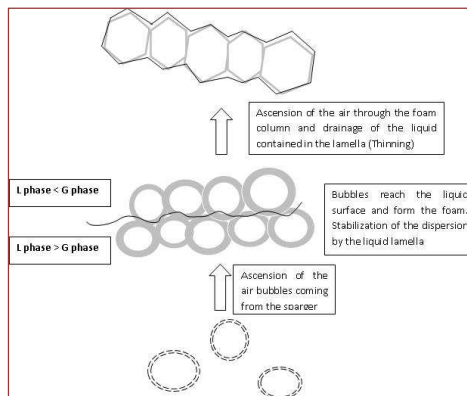
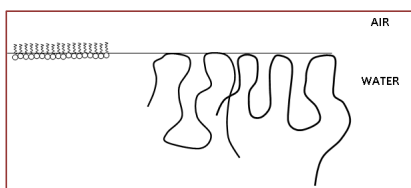
Temps (h)	%O <sub>2</sub>	%CO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>
2	20,26	0,54	71,7
20	20,1	0,84	0,3

Calculez le  $k_L a$  pour ces deux temps de fermentation. Comment expliquer les différences obtenues ?

68

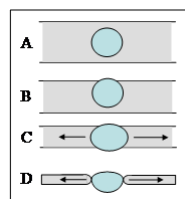
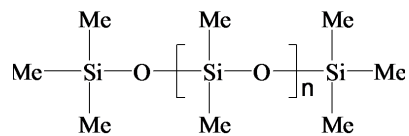
**Phénomènes limitant l'OTR**

- Limite mécanique du système d'agitation
- Sensibilité des micro-organismes au stress mécanique
- Formation de mousses



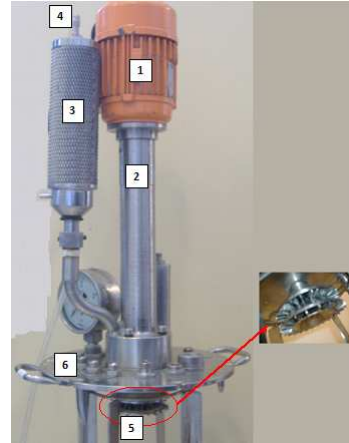
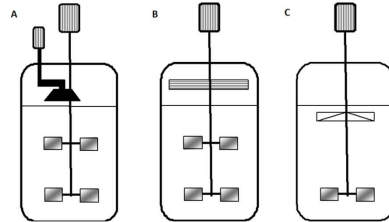
69

**Antimousse chimique**



70

### Antimousse physique



71

## Écriture des équations de bilan pour des systèmes dynamiques : applications aux bioprocédés

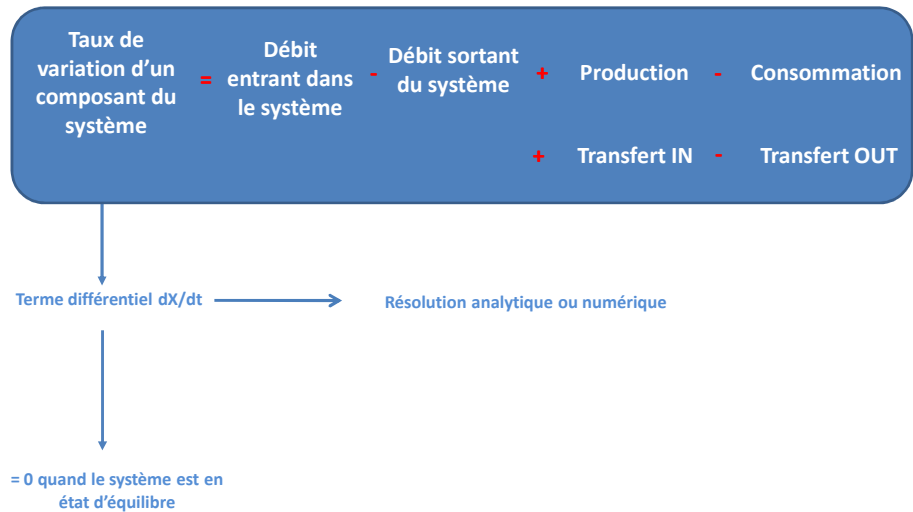
### Références

Dunn, I.J., Heinzle E., Ingham J., Prenosil J.E. (2003) Biological reaction engineering : dynamic modelling fundamentals with simulation examples, 2<sup>nd</sup> ed., Wiley-VCH

Constantinides A., Mostoufi, N. (1999) Numerical methods for chemical engineers with MATLAB applications, Prentice-Hall

72

## 1. Ecriture d'un bilan de masse dynamique



73

## En pratique : différents cas de figure

- Transport de matière dans une phase

$$\text{Taux de variation d'un composant du système} = \text{Débit entrant dans le système} - \text{Débit sortant du système}$$

- Transport de matière entre différentes phases

$$\text{Taux de variation d'un composant du système} = \text{Débit entrant dans le système} - \text{Débit sortant du système} + \text{Transfert IN} - \text{Transfert OUT}$$

- Consommation/production de matière

$$\text{Taux de variation d'un composant du système} = \text{Production} - \text{Consommation}$$

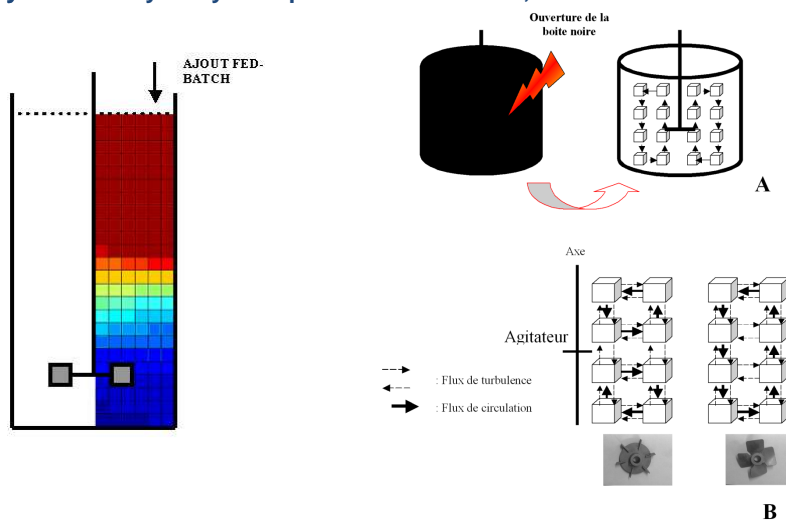
- Réactions (bio)chimique : cons./prod. de matière avec prise en compte de la stœchiométrie

$$\text{Taux de variation d'un composant du système} = \text{Production} - \text{Consommation}$$

Attention à la stœchiométrie

74

**2. Système 1 : hydrodynamique des bioréacteurs, modèle structuré**



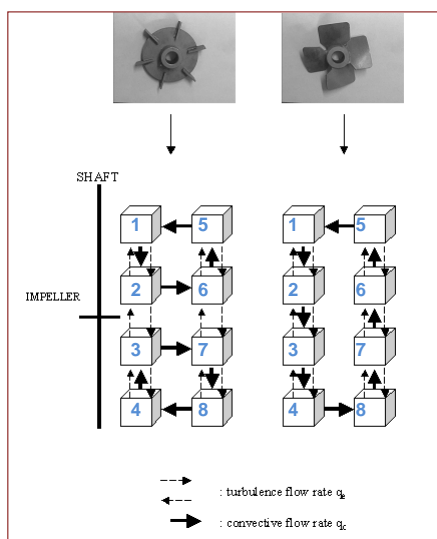
**Cas de figure :** transport de matière dans une phase

$$\text{Taux de variation d'un composant du système} = \text{Débit entrant dans le système} - \text{Débit sortant du système}$$

75

**Application :**

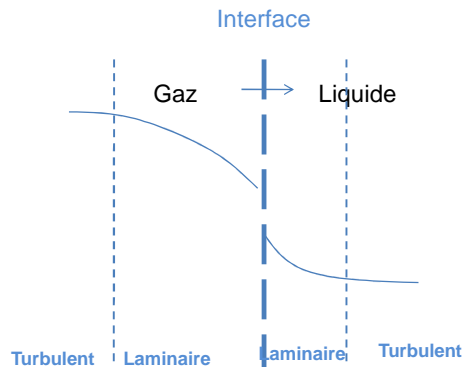
Un bioréacteur agité de 500 litres muni d'une turbine de rushton ou d'une hélice profilée A315 peut être modélisé par le principe des réacteurs parfaitement agités en série. De par la connaissance des écoulements (radial ou axial), le modèle peut être agencé de deux manières (figure ci-contre).  
 Écrivez le système d'équations différentielles représentant l'évolution des concentrations en espèce C dans les différents compartiments du réacteur. Présentez le système d'équations sous forme matricielle.



76

### 3. Système 2 : transfert d'oxygène dans les bioréacteurs

Rappel : théorie du double film



Au niveau des films laminaires, le transfert de matière se déroule uniquement par diffusion. On applique alors la loi de Fick:

$$J_A = -D \cdot \frac{dC}{dz}$$

Avec :

- $J_A$  : flux diffusif d'un composé A (mol/s.m<sup>2</sup>)
- $D$  : coefficient de diffusion moléculaire (m<sup>2</sup>/s)
- $dC/dz$  : gradient de concentration à l'équilibre (mol/m<sup>3</sup>)

77

Si on considère une espèce A qui traverse les deux films :

$$J_A = D_G \cdot \frac{C_G - C_{Gi}}{Z_G} = D_L \cdot \frac{C_{Li} - C_L}{Z_L}$$

$D_G$  et  $D_L$  : diffusivités effectives (m<sup>2</sup>/s)  
 $Z_G$  et  $Z_L$  : épaisseur des deux films (m)

Cette équation peut être exprimée en terme de coefficient de transfert de masse  $k$  (m<sup>2</sup>/s)

$$J_A = k_G \cdot (C_G - C_{Gi}) = k_L \cdot (C_{Li} - C_L)$$

Le taux total de transfert de matière est donné par :

$$Q = J_A \cdot A = J_A \cdot (a \cdot V)$$

$A$  : surface d'échange (m<sup>2</sup>)  
 $a$  : surface spécifique d'échange (m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>)

$$\xrightarrow{A} Q = k_G \cdot A \cdot (C_G - C_{Gi}) = k_L \cdot A \cdot (C_{Li} - C_L)$$

$$\xrightarrow{a} Q = k_G \cdot a \cdot (C_G - C_{Gi}) \cdot V_L = k_L \cdot a \cdot (C_{Li} - C_L) \cdot V_L$$

78

Les concentrations aux interfaces étant difficiles à déterminer, on préfère exprimer l'équation en fonction de taux global K de transfert de masse :

$$Q = K_G \cdot a \cdot (C_G - C_G^0) \cdot V_L = K_L \cdot a \cdot (C_L^0 - C_L) \cdot V_L$$

$C_G^0$  et  $C_L^0$  sont les concentrations à l'équilibre dans chacune des phases

La relation d'équilibre dans un système gaz-liquide peut être déterminée par la loi de Henry (applicable pour les systèmes dilués)

$$p_A = H_A \cdot C_{LA}^0$$

$H_A$ , constante de Henry (bar m<sup>3</sup>/kg) :  
 $C_{GA} \cdot R \cdot T = C_{LA}^0 \cdot H_A$

La solubilité de l'oxygène dans la phase gazeuse étant plus importante :

$$Q = K_L \cdot a \cdot (C_L^0 - C_L) \cdot V_L$$

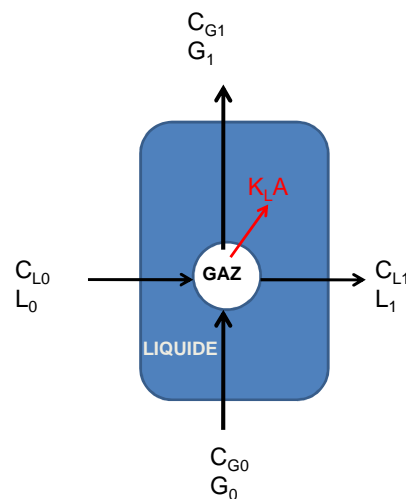
Avec :

$$C_G = H \cdot C_L^0$$

79

### Application :

Etablissez les équations représentant la dynamique des espèces  $C_{G1}$  et  $C_{L1}$  dans un réacteur continu fonctionnant aux débits G et L (schéma ci-contre)



**Cas de figure :** transport de matière entre deux phases

Taux de variation d'un composant du système	=	Débit entrant dans le système	-	Débit sortant du système	+	Transfert IN	-	Transfert OUT
---	---	-------------------------------	---	--------------------------	---	--------------	---	---------------

80

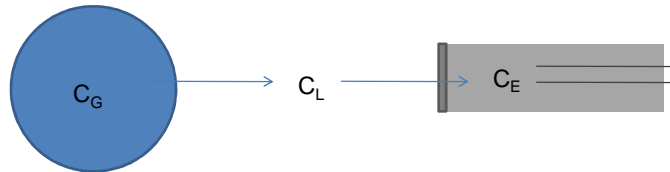


### Cas particulier : mesure dynamique de l'oxygène avec temps de réponse

Phase 1 : air

Phase 2 : eau

Phase 3 : électrolyte



$$\frac{dC_E}{dt} = \frac{C_L - C_E}{\tau_E}$$

Avec  $\tau_E$  : constante de temps de l'électrode

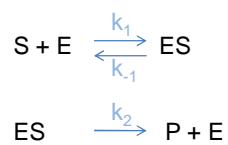
81

### 4. Système 3 : cinétique microbienne en bioréacteur

Lien entre taux de croissance et disponibilité en substrat – Equation de Monod

#### Application :

Etablissez les équations représentant la dynamique des espèces S et ES dans le schéma réactionnel type enzyme/substrat présenté ci-contre



**Cas de figure** : consommation/production de matière

Taux de variation d'un composant du système = Production - Consommation

82

Ces équations permettent de retomber sur le modèle de réaction enzymatique Michaelis-Menten :

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{k_2 \cdot S \cdot E_0}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} + S}$$

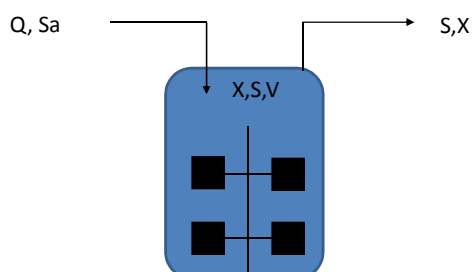
$$r_s = \frac{v_{\max} \cdot S}{K_M + S}$$

83

### Application :

Etablissez les équations représentant la dynamique des espèces X et S dans un réacteur continu avec un taux de croissance  $\mu$  et un taux de dilution D

Taux de variation d'un composant du système = Débit entrant dans le système - Débit sortant du système + Production - Consommation

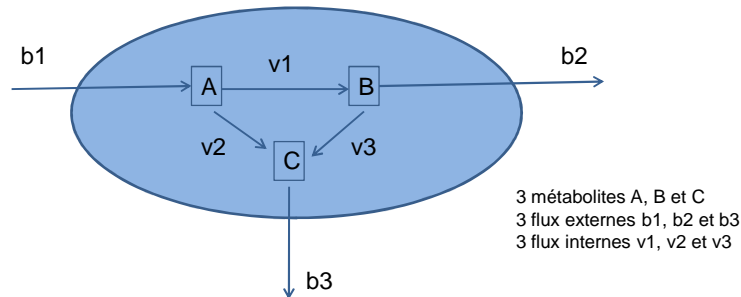


84

### 5. Système 4 : réactions biochimiques

#### Application :

Etablissez les équations représentant la dynamique des métabolites A, B et C à partir du réseau schématisé ci-dessous



**Cas de figure :** consommation/production de matière avec loi stœchiométrique

Taux de variation  
d'un composant du  
système = Production - Consommation

Attention à la  
stœchiométrie

85

Balance de masse dynamique :  $\frac{dA}{dt} = -v1 - v2 + b1$

$$\frac{dB}{dt} = v1 + v3 - b2$$

$$\frac{dC}{dt} = v2 - v3 - b3$$

Sous forme matricielle :

$$\frac{d}{dt} \begin{bmatrix} A \\ B \\ C \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 1 & -1 & 0 & 0 & -1 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} v1 \\ v2 \\ v3 \\ b1 \\ b2 \\ b3 \end{bmatrix}$$

$$\frac{dX}{dt} = S \cdot v$$

S : matrice stœchiométrique  
V : vecteur de flux

Balance de masse à l'équilibre :

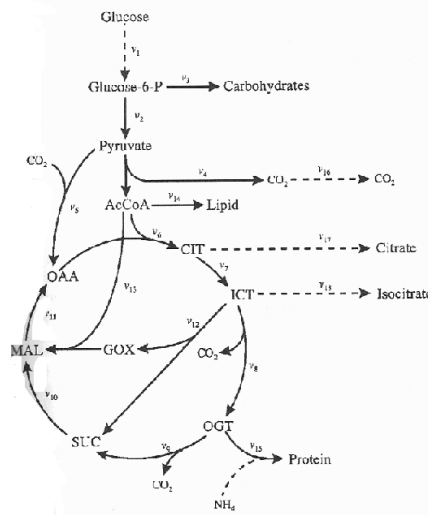
$$S \cdot v = 0$$

Principe de base de l'analyse des flux métaboliques

86

Le principe des flux métaboliques peut être appliqué à des réseaux plus complexes.

Exemple : production de citrate par *Candida lipolytica*



87

## Traitement des données sous MatLab

### Références

Finlayson, B.A. (2006) Introduction to chemical engineering computing, Wiley

[www.mathworks.com](http://www.mathworks.com)

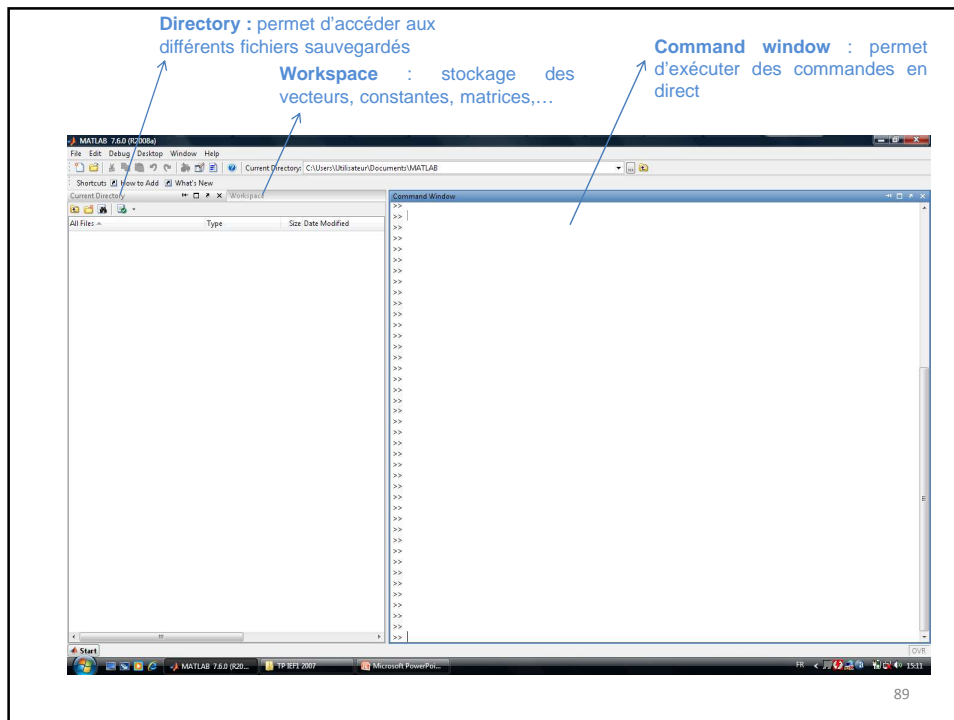
### MatLab : Matrix Laboratory

#### Applications :

- Traitement de données
- Résolution d'équations :
  - \* Algébriques
  - \* Différentielles ordinaires (ODEs)
  - \* Dérivées partielles (PDE)
- Acquisition de données

Éléments de base : vecteurs et matrices

88



### Création de vecteurs et de matrices

Utilisez les commandes suivantes dans la « command window »

Vecteur ligne :  $V = [2 \ 6 \ 9];$

Vecteur colonne :  $V = \begin{bmatrix} 2 \\ 6 \\ 9 \end{bmatrix};$  ou  $V = [2;6;9];$

Transposée du vecteur :  $V'$

Matrice :  $M = [2 \ 4 \ 6 ; 8 \ 10 \ 12 ; 14 \ 16 \ 18];$

Transposée de matrice :  $M'$

Génération d'une matrice nulle :  $Mzero = \text{zeros}(3,3);$

Visualiser les éléments nuls d'une matrice :  $\text{spy}(Mzero)$

Matrice diagonale :  $Mdiag = \text{diag}([1 \ 1 \ 1]);$   
 $\text{spy}(Mdiag)$

Matrice d'éléments unitaires :  $Mones = \text{ones}(3,3);$   
 $\text{spy}(Mones)$

Pour effacer le « workspace » :  $\text{clear}$

Matrice : `M = [2 4 6 ; 8 10 12 ; 14 16 18];`

Vecteur : `x = [2;3;4];`

Multipliation : `M*x;`

`ans = [40;94;148]`

91

### Application simple

Conversion de valeur d'oxygène dissous exprimée en %

Temps (s)	0	1	2	3	4	5	6
% Oxygène	100	99	95,8	90,2	82	75,2	60,6

Dans la fenêtre de commande, on tape les commandes suivantes (en vert)

Séries de données (sous forme de vecteurs dans MatLab):

`t = [0 1 2 3 4 5 6];`

`Oxypercent = [100 99 95.8 90.2 82 75.2 60.6];`

La saturation (100%) correspond à 7.8 mg/L d'oxygène dissous

`Oxymgl = (Oxypercent./100)*7.8;`

Pour visualiser le résultats :

`plot(t,Oxymgl)`

Affichage des résultats : `plot(x,y)`

Cette commande crée une nouvelle fenêtre faisant apparaître la figure. Celle-ci peut être sauvegardée sous différents formats

92

### Application simple, suite

Mise en forme de la figure

```
plot(t,Oxymgl,'-o') %'-o' cercles relié par une ligne
xlabel('Temps (s)')
ylabel('Oxygène dissous (mg/L)')
```

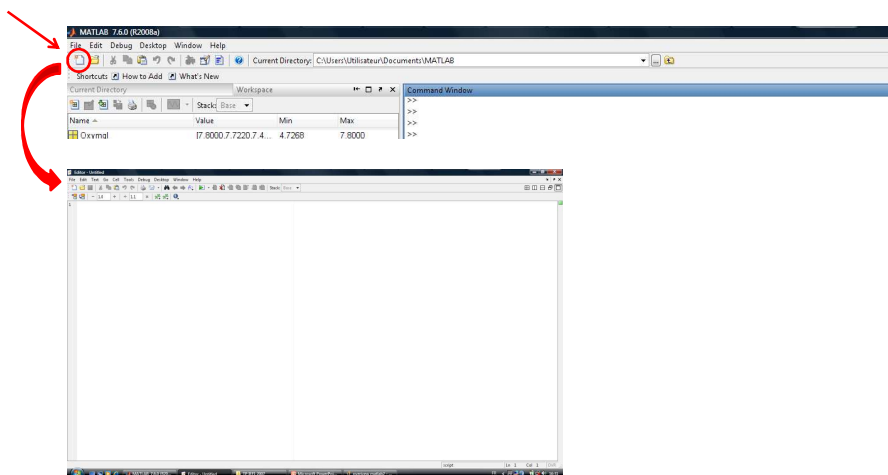
Pour sauvegarder des figures de haute qualité

```
print -painters -dtiff -r600 nomfigure.tiff
```

Le fichier nomfigure.tiff sera enregistré dans le dossier actif de la fenêtre 'current directory'

93

### Création d'un fichier .m



```
t = [0 1 2 3 4 5 6];
Oxypercent = [100 99 95.8 90.2 82 75.2 60.6];
Oxymgl = (Oxypercent./100)*7.8;
plot(t,Oxymgl)
xlabel('Temps (s)')
ylabel('Oxygène dissous (mg/L)')
```

%Temps  
% Données en %  
% Données en mg/L

94

Fichier .m : feuille de code

Fichier .mat : fichier de données (save and load)

Fonction MatLab : exemple de la fonction « polyfit »

>> help polyfit

POLYFIT Fit polynomial to data.

P = POLYFIT(X,Y,N) finds the coefficients of a polynomial P(X) of degree N that fits the data Y best in a least-squares sense. P is a row vector of length N+1 containing the polynomial coefficients in descending powers, P(1)\*X^N + P(2)\*X^(N-1) +...+ P(N)\*X + P(N+1).

95

#### Application : calcul du $K_L a$ à partir de données expérimentales

Une mesure de  $K_L a$  a été réalisée par la méthode de la sonde à oxygène. Les résultats sont repris dans le fichier .mat « oxykla » avec une fréquence d'acquisition de 2 secondes.

Ecrivez un code permettant de calculer automatiquement le  $K_L a$  à partir du fichier

Fonctions utiles :

« load »

« polyfit »

Indexation des matrices et vecteurs

96



**Application : calcul de bilans lors d'une culture fed-batch**

Une culture fed-batch de *E. coli* a été réalisée par un contrôle de l'ajout via la réponse de la sonde à oxygène.

Les données sont contenues dans le fichier .mat « fedoxy » qui reprend les valeurs d'oxygène dissous à des intervalles de 30 secondes.

Sachant que le fed-batch débute après 6 heures de culture et que la pompe est activée lorsque le % en oxygène dissous est supérieur à 30%, calculez la quantité de glucose ajoutée et la concentration théorique finale en biomasse.

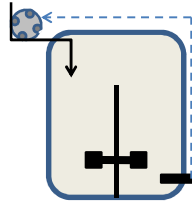
$$Q_{\text{pompe}} = 16 \text{ mL/min}$$

$$S_a = 500 \text{ g/L}$$

$$Y_{xs} = 0,5$$

$$V_{\text{réacteur}} = 10\text{L (début fed-batch !)}$$

$$X_0 = 2 \text{ g/l (début fed-batch)}$$

**Fonctions utiles :**

« sum »

fonctions logiques < > =

97

**Application : calcul d'un profil d'ajout fed-batch**

L'évolution de la biomasse (en g/L) au cours du temps dans un réacteur en mode fed-batch a été simulée. Les résultats sont repris dans le fichier .mat « tauxspec ».

Sur base de ces résultats, calculez le profil adapté d'ajout du glucose en terme d'évolution du débit (mL/h).

$$q_S = 0.05 \text{ g/g.h}$$

$$S_a = 500 \text{ g/L}$$

$$V_{\text{réacteur}} = 10\text{L (supposé constant durant la période d'ajout)}$$

**Fonctions utiles :** cf exercices précédents

98

## Simulation des systèmes dynamiques sous MatLab

### Références

Finlayson, B.A. (2006) Introduction to chemical engineering computing, Wiley

Constantinides A., Mostoufi, N. (1999) Numerical methods for chemical engineers with MATLAB applications, Prentice-Hall

[www.mathworks.com](http://www.mathworks.com)

99

## Résolution numérique d'équations différentielles

$$\frac{dy_1}{dt} = f_1(y_1, y_2, \dots, y_n, t)$$

$$\frac{dy_2}{dt} = f_2(y_1, y_2, \dots, y_n, t)$$

$$\frac{dy_n}{dt} = f_n(y_1, y_2, \dots, y_n, t)$$

$$\frac{dy}{dt} = f(y, t)$$

**Problème :**  $\frac{dy}{dt} = f(y, t) \quad y(t_0) = y_0$

**Intégration :**  $\int_{y_1}^{y_{i+1}} dy = \int_{t_1}^{t_{i+1}} f(t, y) \cdot dt$

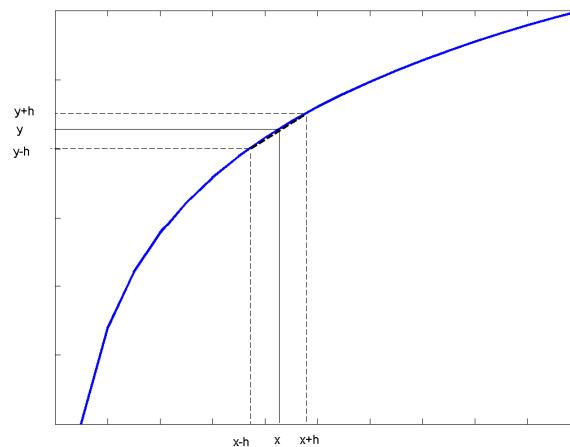
$$y_{i+1} - y_1 = \int_{t_1}^{t_{i+1}} f(t, y) \cdot dt$$

**Euler :**  $y_{i+1} - y_i = \Delta y_i$

$$y_{i+1} = y_i + \Delta y_i$$

Estimé par différences finies

**Différences finies :**



$$y(x+h) = y(x) + \frac{h}{1!} y'(x) + \frac{h^2}{2!} y''(x) + \frac{h^3}{3!} y'''(x) + \dots$$

**Euler :**  $\Delta y_i = h y'_i + O(h^2)$

$$y_{i+1} = y_i + h y'_i + O(h^2)$$

## Equation de croissance exponentielle : algorithme d'Euler

$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X \quad X(t_0) = 0.1$$

$$X_{i+1} = X_i + h y_i' + O(h^2)$$

$$X_{i+1} = X_i + h \mu X_i + O(h^2)$$

Solution analytique :  $\int_{X_i}^{X_{i+1}} \frac{dX}{X} = \int_{t_i}^{t_{i+1}} \mu \cdot dt$

$$\ln X_{i+1} - \ln X_i = \mu \cdot (t_i - t_{i+1})$$

$$X_{i+1} = X_i \cdot e^{\mu \cdot (t_i - t_{i+1})}$$

### Exemple sous Excel avec la méthode d'Euler

Résolution numérique de l'équation de croissance exponentielle

$$dX/dt = \mu \cdot X \cdot dt$$

Condition initiale  $X_0 = 0.1$  g/l

Spécification des paramètres  $\mu = 0.5$  h<sup>-1</sup>

Choix du pas de discrétisation  $h$

#### Application de l'algorithme d'Euler :

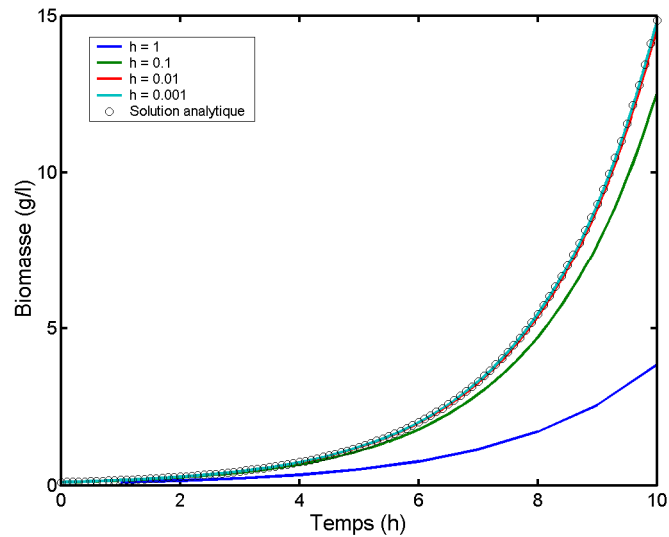
$$X(0) = 0$$

$$t_1 = t_0 + h : X(1) = X(0) + h f(t_0, X(0)) = X(0) \cdot (1 + h\mu)$$

$$t_2 = t_1 + h : X(2) = X(1) + h f(t_1, X(1)) = X(1) \cdot (1 + h\mu)$$

$$t_n = t_{n-1} + h : X(n) = X(n-1) + h f(t_{n-1}, X(n-1)) = X(n-1) \cdot (1 + h\mu)$$

Attention au pas de temps de discrétisation employé  
 Comparaison avec la solution analytique



Algorithme plus sophistiqué d'ordre supérieur avec adaptation automatique du pas de temps : Runge-Kutta

## Algorithme de Runge-Kutta

$$y_{i+1} = y_i + h y'_i + \frac{h^2 y''_i}{2!} + O(h^3)$$

Dans MatLab, différentes fonctions disponibles :

ode23  
 ode45  
 ode113  
 ode23s  
 ode15s

## Présentation des équations sous MatLab :

### Premier fichier .m :

- `function y = f(t,y)`
- Entrée des constantes
- Entrée des équations algébriques
- Entrée des équations différentielles (sous forme matricielle si plusieurs équations)

### Second fichier .m :

- Solveur `ode`
- Fonction `plot`

### Premier fichier .m :

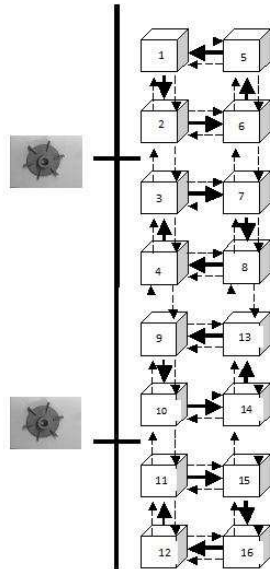
```
function dydt = modcomp(t,y)
dydt(1) = ;
dydt(2) = ;

dydt(n) = ;
```

### Second fichier .m :

```
y0 = ;
Tspan = ;
[t,y] = ode23s('modcomp',tspan,y0);
```

## Modèle compartimenté de bio-réacteur



Soit un bio-réacteur bi-agité (TD6-TD6) modélisé suivant la figure annexée.  
 Si  $q_c = 0.1 \text{ m}^3/\text{s}$  et  $q_e = 0.2 \text{ m}^3/\text{s}$   
 Calculez le temps de mélange du système après injection d'un pulse unitaire au niveau du compartiment 1.

## Mesure du $k_a$

Un bio-réacteur a été préalablement désoxygéné par ajout d'une solution de sulfite (condition initiale  $C_L(0) = 0 \text{ mg/l}$ ). Une sonde à  $pO_2$  placée dans le bas du réacteur permet de mesurer l'évolution de la concentration en oxygène dissous avec un temps de réponse de 18 secondes. Le temps de réponse  $\tau$  de sonde à oxygène peut être modélisé par l'équation :

$$\frac{dC_L}{d\tau} = \frac{C_L - C_E}{\tau}$$

Le  $k_a$  apparent obtenu après traitement des résultats est de  $0.08 \text{ s}^{-1}$ .  
 Simulez la courbe d'évolution de la concentration en oxygène dissous avec et sans temps de réponse.

## Réacteur *batch*

Considérons la culture d'un micro-organisme en mode batch. Les paramètres de cinétique microbienne sont les suivants :

$$\mu_{\max} = 0.6 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = 0.01 \text{ g/l}$$

$$Y_{xs} = 0.5$$

La maintenance est considérée comme négligeable.

La concentration initiale en substrat dans le réacteur est de 10 g/l, et celle de la biomasse est de 0.1 g/l.

Ecrivez un programme MatLab permettant de résoudre numériquement le système d'équations différentielles.

## Réacteur *fed-batch*

Considérons la culture d'un micro-organisme en mode fed-batch. Les paramètres de cinétique microbienne sont les suivants :

$$\mu_{\max} = 0.6 \text{ h}^{-1}$$

$$K_s = 0.01 \text{ g/l}$$

$$Y_{xs} = 0.5$$

La concentration initiale en substrat dans le réacteur est de 5 g/l et celle de la biomasse est de 0.1 g/l. La culture est alimentée en substrat (concentration en substrat dans la fiole d'ajout : 500 g/l) grâce à un algorithme régulant la vitesse de la pompe d'ajout ( $Q_{\max} = 1 \text{ L/h}$ ):

$$Q = (Q_0 \cdot \exp(\mu_{\text{pompe}} \cdot (t - t_{\text{start}})));$$

if  $Q > Q_{\max}$  |  $\mu_{\text{pompe}} = 0$

$$Q = Q_{\max};$$

end

if  $t < t_{\text{start}}$

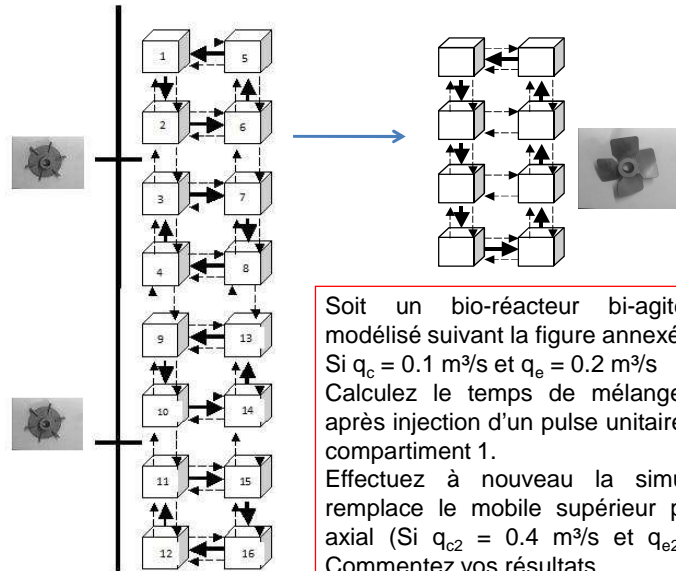
$$Q = 0;$$

end

Ecrivez un programme MatLab permettant de résoudre numériquement le système d'équations différentielles ( $dx/dt$  ;  $ds/dt$  ;  $dV/dt$ ). Calculez les paramètres de régulation de la pompe ( $Q_0$  et  $\mu_{\text{pompe}}$ ) permettant d'éviter l'accumulation de substrat dans le réacteur.



### Bioréacteur agité : modèle hydrodynamique compartimenté



113

## MatLab : synopsis

114

### Syntaxe de base

- [ ] pour spécifier les limites d'un élément, vecteur, matrice
- () pour préciser les arguments d'une fonction prédéfinie (pour obtenir des informations sur une fonction, taper help suivi d'un espace suivi du nom de la fonction, ex : help sum)
- ; à placer après une commande (sauf plot)

Pas d'espace et de caractères spéciaux pour les noms de fichier et les noms de variables définis dans MatLab

Exemple : ~~Transfert d'oxygene.m~~ → Transfert\_oxygene.m

Dans MatLab 7,3 est 7.3

115

### Création de matrice, vecteur

```
V = [1 2 3 4]           % vecteur ligne
V = [1; 2; 3; 4]       % vecteur colonne
M = [1 2 3 ; 4 5 6]    % matrice
V(2)                   % accéder à un élément d'un vecteur
M(2,3)                 % accéder à un élément d'une matrice
2:7                     % construire un vecteur de 2 à 7 avec un pas de 1 (défaut)
2:0.1:7                % construire un vecteur de 2 à 7 avec un pas de 0.1
```

Fonctions intéressantes pour la génération automatique de matrices:

```
ones
zeros
diag
spy
```

Pour plus d'informations, taper « help nomdefonction » dans la fenêtre de commande

116

### Opérations mathématiques

`a+b, a-b, a*b, a/b`  
`sqrt(a)`  
`a^b`  
`abs(a)`  
`exp(a)`  
`log(a)`                   %attention log en base 2.72  
`log10(a)`  
`sin(a), cos(a), tan(a)`  
`round(x)`

### Opérations matricielles

`A * B`  
`A .* B`                   % élément par élément  
`A'`  
`sum(A)`                   % somme des colonnes  
`sum(A,2)` ou `sum(A')`   % somme des lignes

117

### Outil graphique

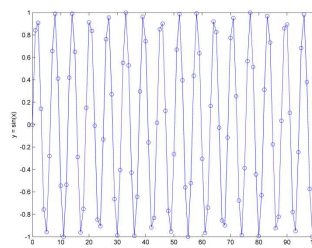
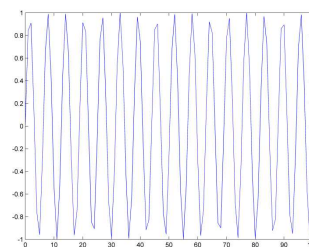
Fonction `plot`

Exemple :

```
x = 0:100;
y = sin(x);
plot(x,y)
```

```
x = 0:100;
y = sin(x);
plot(x,y,'-o')
xlabel('x')
ylabel('y = sin(x)')
```

```
print -painters -dtiff -r600 fig.tiff
```



118

### Résolution d'équations différentielles

#### Exemple 1

Résoudre numériquement  $dx/dt = 5x$  de  $t = 3$  à  $t = 12$  avec la condition initiale  $x(0) = 7$

Créer la fonction f contenant l'équation à résoudre :

```
function dydt=f(t,x)
dydt = 5*x;
```

Lancer la fonction ode45 pour la résolution numérique :

```
[t,x]=ode45('f',3:12,7)
```

119

```
>> help ode45
```

ODE45 Solve non-stiff differential equations, medium order method.

[TOUT,YOUT] = ODE45(ODEFUN,TSPAN,Y0) with TSPAN = [T0 TFINAL] integrates the system of differential equations  $y' = f(t,y)$  from time T0 to TFINAL with initial conditions Y0. ODEFUN is a function handle. For a scalar T and a vector Y, ODEFUN(T,Y) must return a column vector corresponding to  $f(t,y)$ . Each row in the solution array YOUT corresponds to a time returned in the column vector TOUT. To obtain solutions at specific times T0,T1,...,TFINAL (all increasing or all decreasing), use TSPAN = [T0 T1 ... TFINAL].

120

**Exemple 2**

Résoudre numériquement le système d'équations :

$$\begin{aligned} dw/dt &= 5w \\ dz/dt &= 3w + 7z \end{aligned}$$

de  $t = 3$  to  $t = 12$ , avec les conditions initiales  $w(0) = 7$ ,  $z(0) = 8.2$

Créer la fonction myfunc contenant le système d'équations à résoudre :

```
function dydt=myfunc(t,x)
w = x(1); z = x(2);
dydt(1) = 5*w;
dydt(2) = 3*w + 7*z;
```

Lancer la fonction ode45 pour la résolution numérique :

```
[t,x]=ode45('myfunc',3:12,[7 8.2])
```

121

**Exemple 3****Modèle hydrodynamique de réacteur**

Créer la fonction myfunc contenant le système d'équations à résoudre :

```
function dydt = modcomp(t,y)
```

```
% Entrée des constantes
```

```
qc = 0.1;
```

```
qe = 0.2;
```

```
% Ecriture des équations différentielles
```

```
S = [-(qc+2*qe) qe 0 0 qc+qe 0 0 0 0 0 0 0 0 0;
qc+qc -(qc+3*qe) qe 0 0 qe 0 0 0 0 0 0 0 0;
0 qe -(qc+3*qe) qc+qc 0 0 qe 0 0 0 0 0 0 0;
0 0 qe -(qc+3*qe) 0 0 0 qc+qe qe 0 0 0 0 0;
qe 0 0 -(qc+2*qe) qc+qe 0 0 0 0 0 0 0 0;
0 qc+qe 0 0 qe -(qc+3*qe) qe 0 0 0 0 0 0 0;
0 0 qc+qe 0 0 qe -(qc+3*qe) qe 0 0 0 0 0 0;
0 0 qe 0 0 qc+qe -(qc+3*qe) 0 0 0 0 qe 0 0;
0 0 0 qe 0 0 0 -(qc+3*qe) qe 0 0 qc+qe 0 0 0;
0 0 0 0 0 0 qe+qc -(qc+3*qe) qe 0 0 qe 0;
0 0 0 0 0 0 0 0 qe -(qc+2*qe) 0 0 0 qc+qe;
0 0 0 0 0 0 qe 0 0 0 -(qc+3*qe) qc+qe 0 0;
0 0 0 0 0 0 0 qc+qe 0 0 qe -(qc+3*qe) qe 0;
0 0 0 0 0 0 0 0 qc+qe 0 0 qe -(qc+3*qe) qe;
0 0 0 0 0 0 0 0 0 qe 0 0 qc+qe -(qc+2*qe)];
```

```
dydt = S*y;
```

122

Lancer la fonction ode45 pour la résolution numérique :

```
[t,y] = ode45('modcomp',0:0.1:150,[1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0]);
plot(t,y)
xlabel('Time (s)')
ylabel('Tracer concentration (normalized)')
```

123

#### Exemple 4 Temps de réponse d'une sonde à oxygène

Créer la fonction myfunc contenant le système d'équations à résoudre :

```
function dydt = kla (t,y)
CI = y(1);
Ce = y(2)
% Entrée des constantes
C0I = 100;
kla = 0.05;
to = 18;

% Entrée des équations différentielles
dCI dt = kla*(C0I-CI);
dCe dt = (CI-Ce)/to;
dydt = [dCI dt;dCe dt];

[t y] = ode45('kla',0:0.1:150,[0 0])
plot(t,y(:,1),t,y(:,2))
```

124

Lancer la fonction ode45 pour la résolution numérique :

```
[t y] = ode45('kla',0:0.1:150,[0 0])  
plot(t,y(:,1),t,y(:,2))
```

125

## Dynamique des bioréacteurs

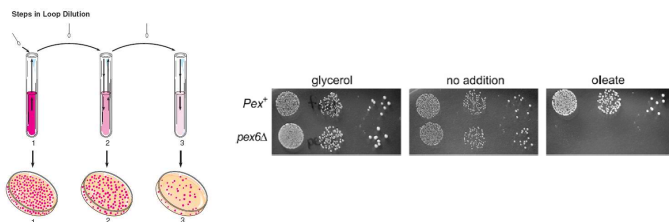
### Estimation des paramètres de croissance microbienne

- Réacteur BATCH
- Réacteur FED-BATCH
- Réacteur CONTINU-CHEMOSTAT

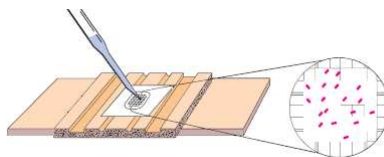
126

### Techniques de mesure de la biomasse

#### - Comptage sur boîte de Pétri

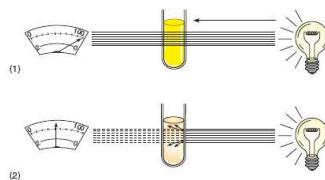


#### -Microscopie (comptage direct)



127

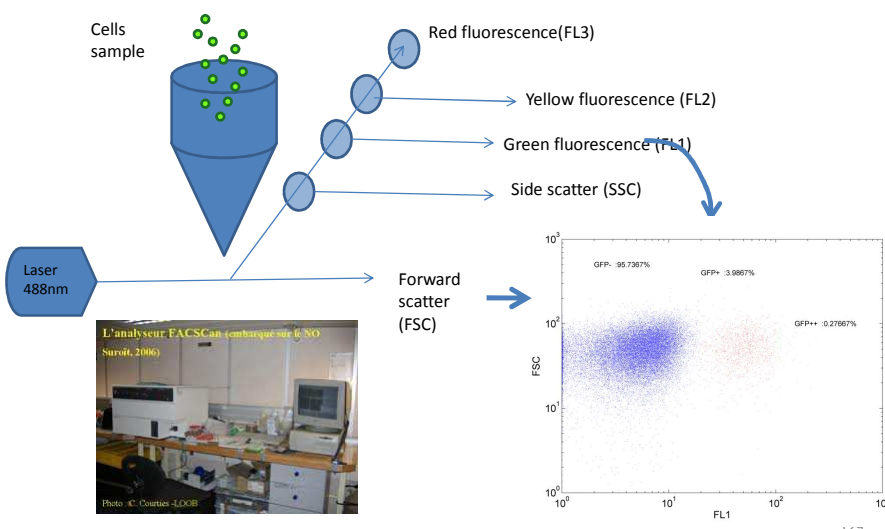
#### -Spectrophotometer



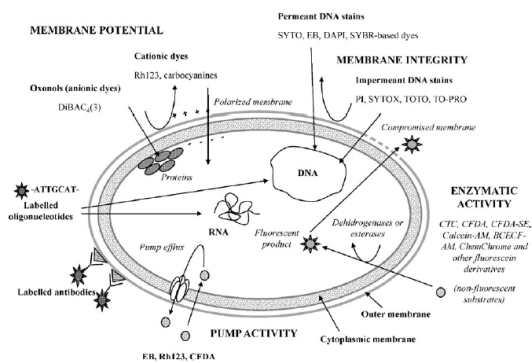
#### - Indirect parameters extracted from sensors (direct parameter now possible)



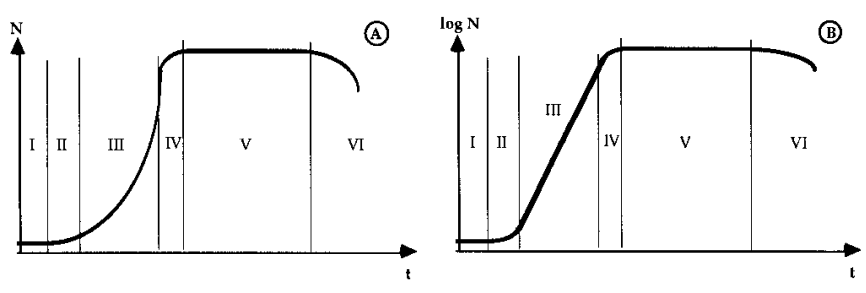
Nouvelle tendance : application de la cytométrie en flux en microbiologie



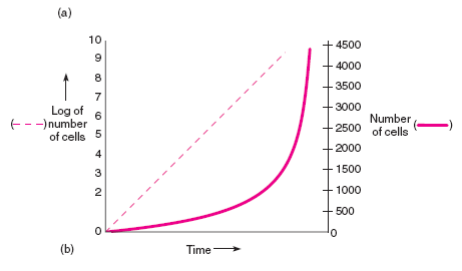
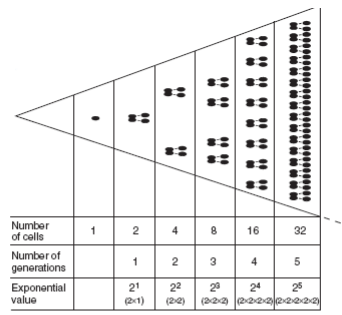
Types de fluorochromes disponibles  
Technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization)



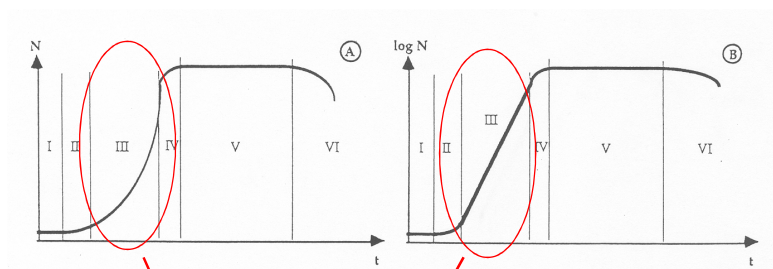
Typical growth curve :



131



### Traditional approach : growth curve



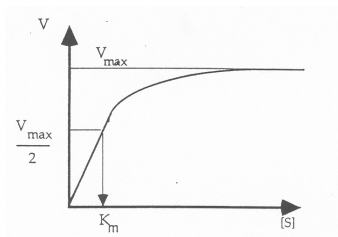
$$\frac{dX}{dt} = \mu \cdot X$$

$\mu$  : specific growth rate ( $h^{-1}$ )

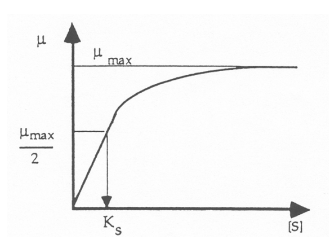
### Traditional approach : Monod

Micro organisms are considered as a « pool of enzymes »

Theory of a limiting substrate → Monod



Michaelis-Menten



Monod

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{K_s + S}$$

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \frac{S \cdot X}{K_s + S}$$

First problem

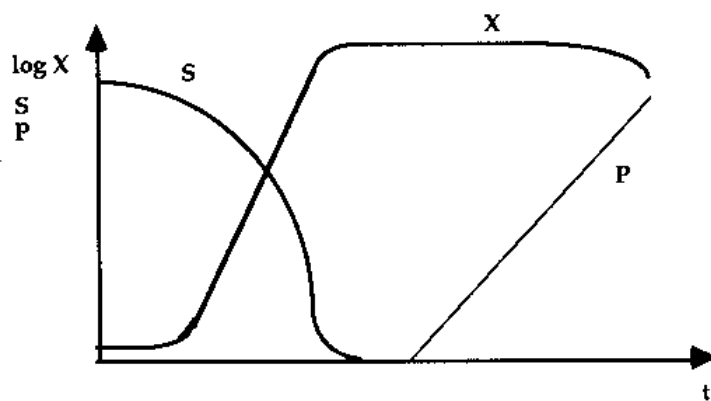
$\mu_{max}$  and  $K_s$  varies with pH,  $T^\circ$ , nature of the substrate, exposure to stress,...

Can be resolved by one of the numerous Monod modified expression

Monod (1942)	$\mu(S) = \frac{\mu_m S}{K_m + S}$
Tessier (1942)	$\mu(S) = \mu_m \left( 1 - \exp\left(-\frac{S}{K_m}\right) \right)$
Moser (1958)	$\mu(S) = \frac{\mu_m S^2}{K_m + S^2}; \lambda > 0$
Contois (1959)	$\mu(S, C) = \frac{\mu_m S}{K_c C + S}$
Powell (1967)	$\mu(S) = \frac{\mu_m}{2K_m} (K_m + S - \sqrt{K_m^2 + S^2 - 4K_m S})$
Peringer, Blachere, Corrieu and Lane (1972)	$\mu(S, A) = \mu_m^0 \frac{S}{K_m + S} \left( \frac{A}{K_a + A} + \frac{1}{1 + K_b A} \right) + \mu_m^1$ with $2\mu_m^0 + \mu_m^1 = \mu_m$
Jackson and Edwards (1975)	$\mu(S, H^+) = \frac{\mu_m S}{\left( 1 + \frac{K_2}{H^+} + \frac{H^+}{K_1} \right) (K_m + S + S^2/K(1 + K_3/H^+))}$
Olsson (1976)	$\mu(S, A) = \mu_m \frac{SA}{(K_m + S)(K_a + A)}$
Dourado and Calvet (1983)	$\mu(S, P) = \mu_m \frac{S}{(K_m + S + S^2/K_i)(K_p + P)} \left( 1 - \frac{P}{P_i} \right)$
Williams, Yousefpour and Swanick (1984)	$\mu(S, A, P) = \left( \frac{K_1 S}{K_m + S} + \frac{K_2 P}{K_p + P} \right) \left( \frac{A}{K_a + A} + K_3 A - K_4 \right)$

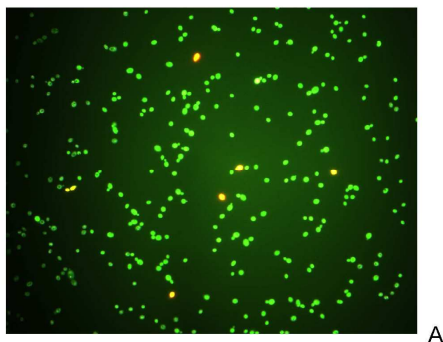
$S$  = substrate concentration,  $C$  = cell mass concentration,  $P$  = product concentration,  $A$  = dissolved oxygen concentration,  $H^+$  = hydrogen ion concentration,  $K_{(any\ subscript)}$  = constant,  $\mu$  = specific growth rate,  $\mu_m$  = maximum specific growth rate.

Growth, substrate consumption and metabolite production



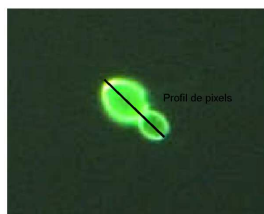
Different modelling alternatives for microbial growth :

- The simplest way to express microbial growth : Monod type equation (saturation)
- Structured modelling : take into account the internal dynamics of the system to be studied
- Segregated modelling : take into account the heterogeneity of the microbial population

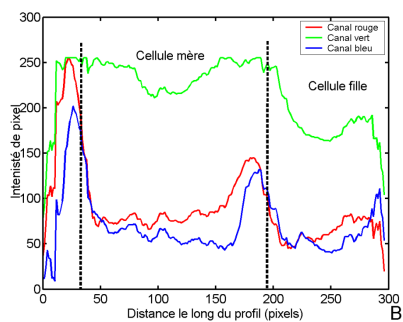


A

Image analysis



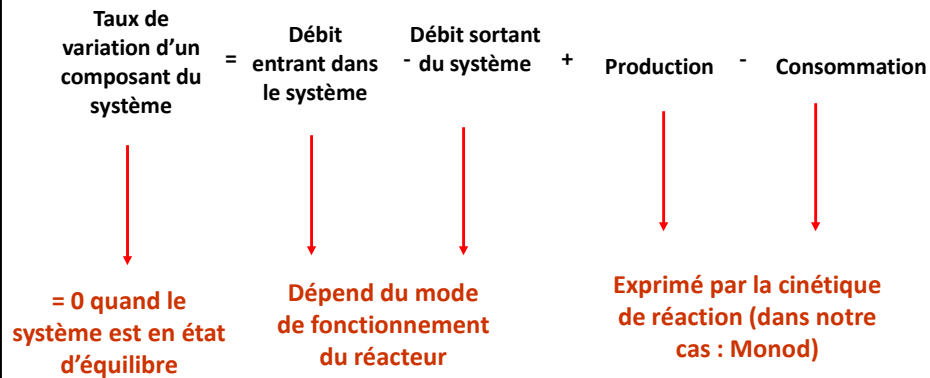
A



B

## Principe de modélisation des bioréacteurs

### Bilan de masse : forme générale



## Estimation des paramètres de croissance à partir d'une culture *batch*

### Hypothèses nécessaires pour l'application de l'équation de Monod :

- Réacteur parfaitement mélangé.
- Pas de mortalité cellulaire.
- La source de C est le seul substrat limitant.
- L'oxygène est apporté en excès.

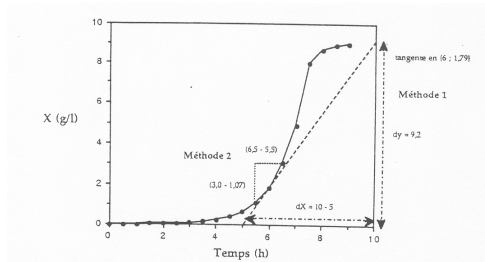
**Bilan de masse sur le fermenteur :** Taux de variation = débit entrant – débit sortant + accumulation

→ **BIOMASSE :** 
$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu_{\max} \cdot \frac{S \cdot X}{K_s + S}$$

→ **SUBSTRAT :** 
$$\frac{dS}{dt} = -r_s = -\frac{r_x}{Y_{x/s}} - m_s \cdot X$$

A partir des données de fermentation (évolution de la biomasse et du substrat carboné), il faut estimer les différents paramètres du modèle :  $\mu$ ,  $\mu_{\max}$ ,  $K_s$ ,  $Y_{x/s}$ ,  $m_s$ .

**1. Calcul de  $r_x$  et  $r_s$**



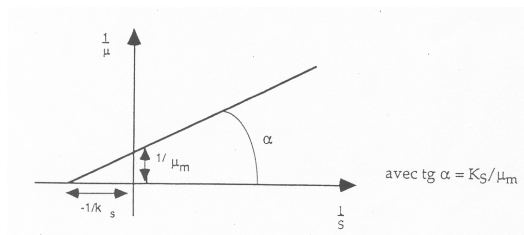
**2. Estimation de  $\mu_{max}$  et  $K_s$**

Méthode de Lineweaver-Burke → linéarisation de l'équation de Monod :

$$\mu = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_s + S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{1}{\mu_{max}} \cdot \frac{K_s + S}{S}$$

$$\frac{1}{\mu} = \frac{K_s}{\mu_{max}} \cdot \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{max}}$$

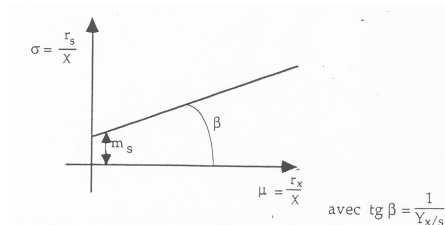


**3. Estimation de  $Y_{x/s}$  et  $m_s$**

Linéarisation de l'équation exprimant la vitesse de consommation du substrat

$$r_s = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + X \cdot m_s$$

$$\frac{r_s}{X} = \frac{1}{Y_{x/s}} \cdot \frac{r_x}{X} + m_s$$



**Productivité des cultures batch :**

!!! Temps de culture + temps industriel

**Temps total :**

$$t_{total} = T_{exp} + t_0 = \frac{1}{\mu_{max}} \ln \frac{X_f}{X_0} + t_0 \quad \text{AVEC} \quad \ln \frac{X_f}{X_0} = \mu_{max} \cdot T_{exp}$$

$$t_0 = t_V + t_N + t_R + t_S + T_L + T_F$$

**Quantité totale de biomasse produite :**

$$X_f - X_0 = Y_{X/S} \cdot S_0$$

**Productivité totale (batch) :**

$$\text{Productivité(batch)} = \frac{\mu_{max} \cdot Y_{X/S} \cdot S_0}{\ln \frac{X_f}{X_0} + \mu_{max} \cdot t_0}$$

**Paramètres de croissance microbienne à partir d'un réacteur BATCH : exercice**

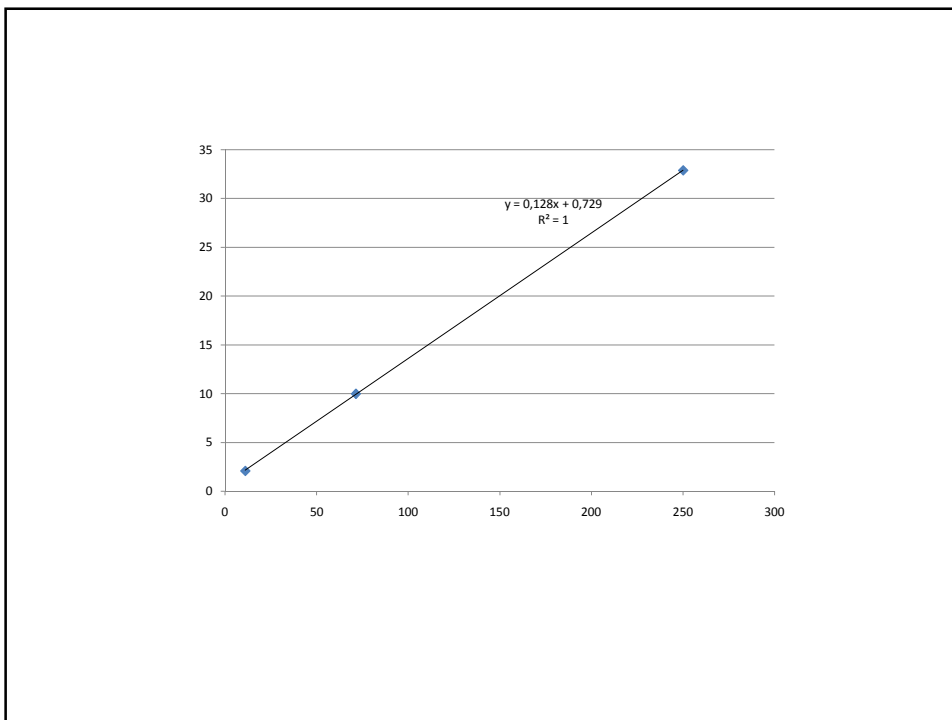
Considérons une culture batch de *Bacillus subtilis*. Cette culture est réalisée dans un fermenteur de 300 litres utiles considéré comme parfaitement mélangé et suffisamment aéré. Les substrats azotés et carbonés sont respectivement la peptone et le glucose, ce dernier étant le substrat limitant. La température (30°C) et le pH (7) sont maintenus constants par un système de régulation. La culture a été suivie par des mesures de MS cellulaire et par un dosage HPLC du glucose. **Calculez**

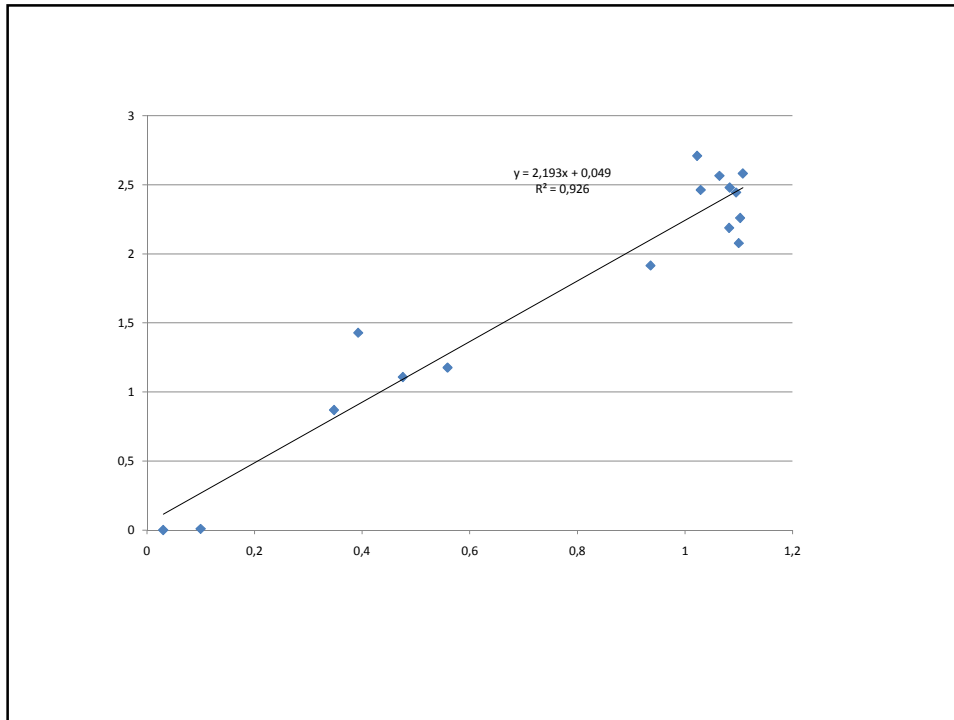
 $\mu_{max}$ ,  $Y_{X/S}$ ,  $m_s$  et  $K_s$ 

1	0,023	20
1,5	0,028	19,98
2	0,034	19,96
2,5	0,047	19,94
3	0,078	19,87
3,5	0,13	19,74
4	0,221	19,6
4,5	0,372	19,2
5	0,633	18,64
5,5	1,07	17,77
6	1,791	16,3
6,5	3,01	13,33
7	4,889	8,89
7,5	8,01	0,09
8	8,7	0,014
8,5	8,88	0,004
9	8,97	0,002



t	X	S	rx	rs	$\mu$	$1/\mu$	$1/S$	rx/X	rs/X
0	0,02	20							
0,5	0,02	20	0,003	0	0,15	6,66666667	0,05	0,15	0
1	0,023	20	0,008	0,02	0,34782609	2,875	0,05	0,34782609	0,86956522
1,5	0,028	19,98	0,011	0,04	0,39285714	2,54545455	0,05005005	0,39285714	1,42857143
2	0,034	19,96	0,019	0,04	0,55882353	1,78947368	0,0501002	0,55882353	1,17647059
2,5	0,047	19,94	0,044	0,09	0,93617021	1,06818182	0,05015045	0,93617021	1,91489362
3	0,078	19,87	0,083	0,2	1,06410256	0,93975904	0,05032713	1,06410256	2,56410256
3,5	0,13	19,74	0,143	0,27	1,1	0,90909091	0,05065856	1,1	2,07692308
4	0,221	19,6	0,242	0,54	1,09502262	0,91322314	0,05102041	1,09502262	2,44343891
4,5	0,372	19,2	0,412	0,96	1,10752688	0,90291262	0,05208333	1,10752688	2,58064516
5	0,633	18,64	0,698	1,43	1,10268562	0,90687679	0,05364807	1,10268562	2,25908373
5,5	1,07	17,77	1,158	2,34	1,08224299	0,92400691	0,05627462	1,08224299	2,18691589
6	1,791	16,3	1,94	4,44	1,08319375	0,92319588	0,06134969	1,08319375	2,47906198
6,5	3,01	13,33	3,098	7,41	1,02923588	0,97159458	0,07501875	1,02923588	2,46179402
7	4,889	8,89	5	13,24	1,02270403	0,9778	0,11248594	1,02270403	2,70812027
7,5	8,01	0,09	3,811	8,876	0,47578027	2,10181055	11,11111111	0,47578027	1,10811486
8	8,7	0,014	0,87	0,086	0,1	10	71,4285714	0,1	0,00988506
8,5	8,88	0,004	0,27	0,012	0,03040541	32,8888889	250	0,03040541	0,00135135
9	8,97	0,002					500		





## Fed-batch culture : mass balance

### Monod hypothesis:

- Perfectly mixed reactor
- No cellular death
- The only limiting substrate is the carbon source
- Dissolved oxygen is provided in excess

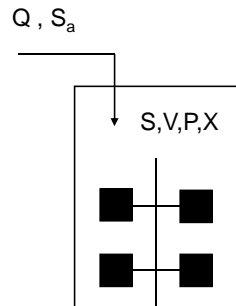
### First case : metabolites synthesis

#### 1. Growth period: equations identical to those used for batch

$$\frac{dX}{dt} = r_x = \mu_{\max} \frac{S \cdot X}{K_s + S} \quad \frac{dS}{dt} = -r_s = -\frac{r_x}{Y_{x/s}} - m_s \cdot X \quad \frac{dV}{dt} = 0$$

2. **Metabolite synthesis period (fed-batch) :**

$$\frac{dV}{dt} > 0$$



→ **BIOMASS** : cellular concentration is kept constant and  $r_x = 0$ .  
Variation at the level of the biomass concentration can only be attributed to dilution effect :

$$\frac{dX}{dt} = \frac{dV}{dt} \cdot \frac{X}{V}$$

→ **SUBSTRATE** : 
$$\frac{dS}{dt} = -r_s - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{S}{V} + Q \cdot \frac{S_a}{V}$$

Hypothesis : added substrate is immediately consumed ( $S \approx 0$ )

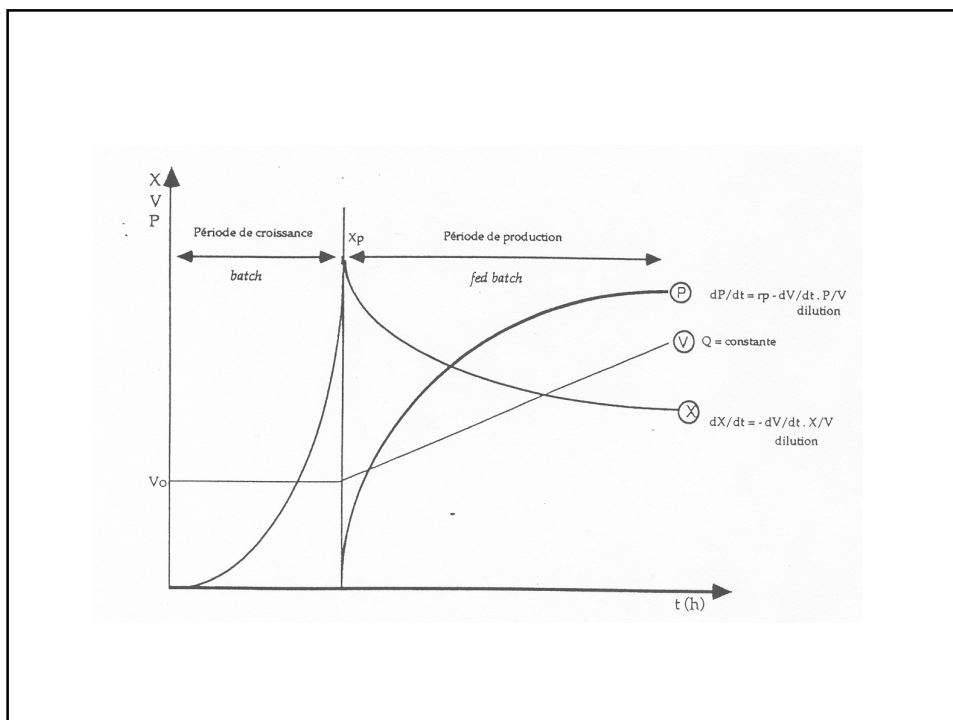
$$\frac{dS}{dt} = -r_s + Q \cdot \frac{S_a}{V} = 0$$

$$r_s = Q \cdot \frac{S_a}{V} = m_s \cdot X + \frac{r_p}{Y_{p/s}}$$

→ **METABOLITE** : 
$$\frac{dP}{dt} = -r_p - \frac{dV}{dt} \cdot \frac{P}{V}$$

$$r_p = \chi \cdot X$$

→ **VOLUME** : 
$$\frac{dV}{dt} = Q$$



## 2<sup>nd</sup> case : biomass production.

1. Growth period: see batch .

2. Fed-batch period:

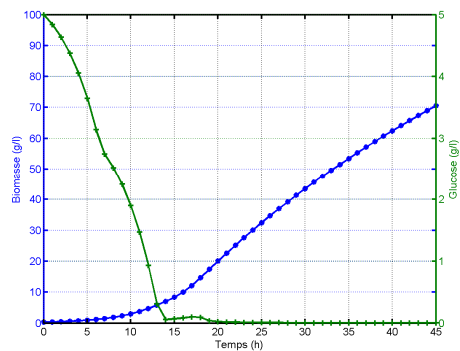
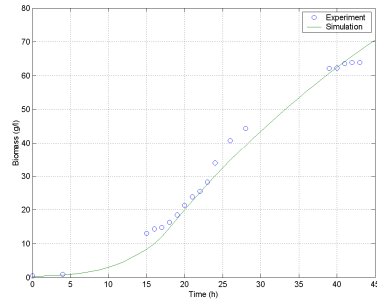
$$\rightarrow \text{BIOMASS : } \frac{dX}{dt} = r_x - \frac{dV}{dt} \frac{X}{V} = \mu \cdot X - \frac{Q}{V} \cdot X \quad \text{with } \mu = \text{cst}$$

$$\rightarrow \text{SUBSTRATE : } \frac{dS}{dt} = -r_s - \frac{dV}{dt} \frac{S}{V} + \frac{dV}{dt} \frac{S_a}{V}$$

$$\frac{dS}{dt} = -r_s - Q \cdot \frac{S}{V} + Q \cdot \frac{S_a}{V} = -r_s + \frac{Q}{V} (S_a - S)$$

$$r_s = \frac{Q}{V} (S_a - S) = \frac{r_x}{Y_{x/s}} + m_s \cdot X \quad \text{If } S = \text{cste and } dS/dt = 0$$

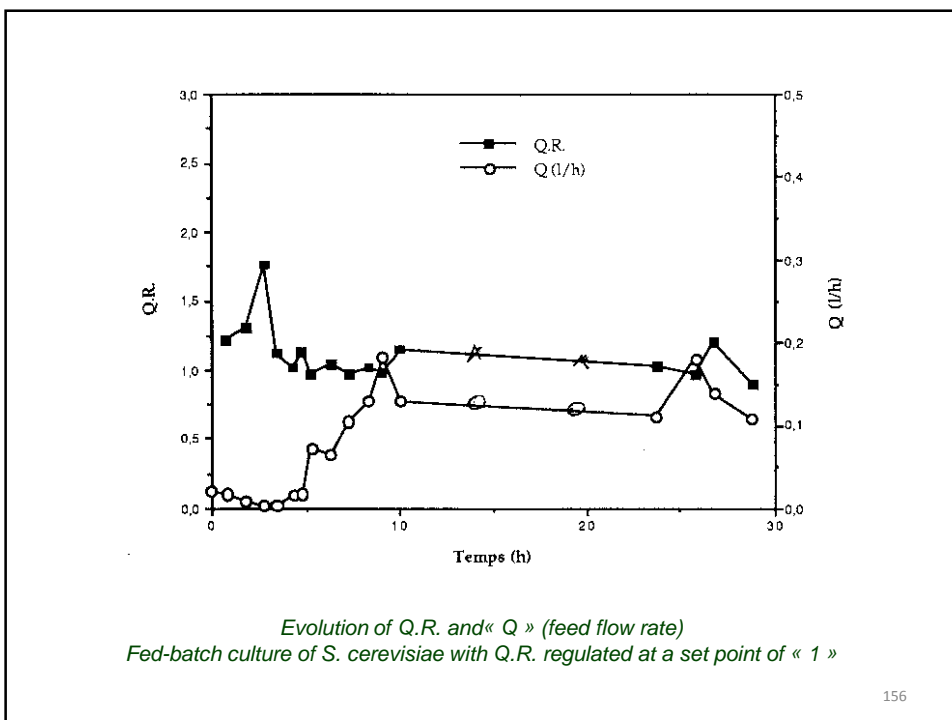
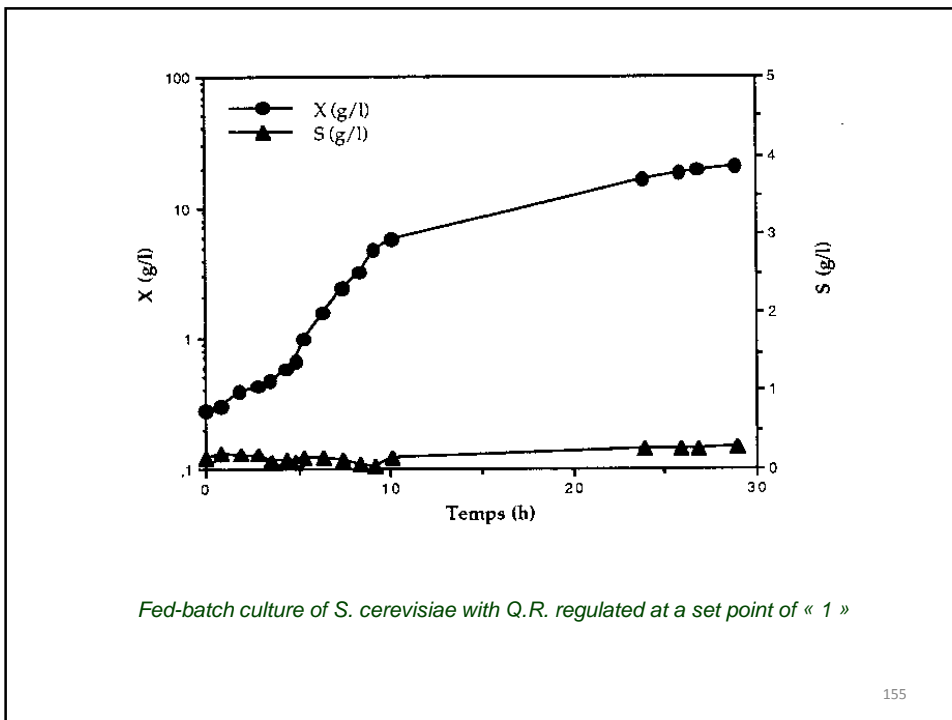
$$\rightarrow \text{VOLUME : } \frac{dV}{dt} = Q \quad \text{with } Q \text{ being comprised between } Q_{\min} \text{ et } Q_{\max}$$

Example : *P. pastoris* fed-batch culture

*Fed-batch culture of S. cerevisiae with Q.R. regulated at a set point of « 1 »*  
*( $S_a = 200\text{g/l}$ ;  $V_0 = 10$  liters;  $V_f = 12,88$  liters)*

Durées (h)	X (g/l)	S (g/l)	Q.R.	Q (l/h)	V (litre)	$S_a \cdot (V - V_0)$ (g)*
0	0,28	0,15	-	0,02	10,00	1,6
0,83	0,3	0,21	1,22	0,016	10,013	2,6
1,83	0,39	0,19	1,3	0,009	10,022	4,4
2,83	0,42	0,18	1,76	0,003	10,025	5
3,5	0,47	0,11	1,12	0,003	10,027	5,4
4,33	0,58	0,12	1,02	0,016	10,040	8
4,83	0,66	0,11	1,13	0,016	10,048	9,6
5,33	0,97	0,14	0,97	0,072	10,084	16,8
6,33	1,52	0,14	1,04	0,063	10,147	29,4
7,33	2,42	0,13	0,97	0,104	10,251	50,2
8,33	3,12	0,06	1,02	0,129	10,38	76
9,08	4,68	0,04	0,98	0,181	10,516	103,2
10,08	5,66	0,14	1,15	0,128	10,644	128,8
23,83	16,17	0,27	1,03	0,11	12,164	432,8
25,83	18,33	0,24	0,97	0,18	12,527	505,4
26,83	19,11	0,25	1,2	0,139	12,666	533,2
28,83	20,28	0,28	0,9	0,107	12,88	576,0

\*  $S_a \cdot (V - V_0)$  = Apport cumulé en glucose (g)



### Control of glucose effect positive strains

Software sensor: respiratory ratio

$QR > 1 \rightarrow$  alcohol production (overflow)

$QR = 1 \rightarrow$  growth

$QR < 1 \rightarrow$  alcohol reassimilation

QR can be measured by gas balance analysis (derived method can also be used to monitor  $K_a$ )

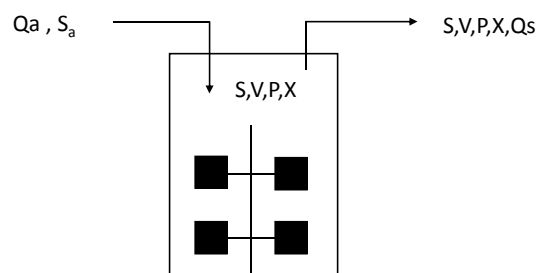
Other control procedures:

Ethanol, glucose sensores

pHstat, DOstat

Exponential feeding algorithm (if kinetics parameters are well known)

### Estimation des paramètres de croissance à partir d'une culture continue



Principe : maintenir  $\mu_{max}$  en gardant les mêmes conditions de culture au cours du temps.

Caractéristiques du procédé continu :

- $dV/dt = 0 \rightarrow Q_a = Q_s = Q$
- Taux de dilution  $D = Q/V$  ( $h^{-1}$ )
- Temps de séjour moyen  $t_s = V/Q = 1/D$  (h)

$$\rightarrow \text{BIOMASSE : } \frac{dX}{dt} = \mu \cdot X - D \cdot X = X \cdot (\mu - D)$$

$$\rightarrow \text{SUBSTRAT : } \frac{dS}{dt} = D \cdot S_a - r_s - D \cdot S = D \cdot (S_a - S) - r_s$$

$$\rightarrow \text{PRODUIT : } \frac{dP}{dt} = r_p - D \cdot P$$

L'évolution de ces concentrations dépend du taux de dilution D. On peut mettre en évidence 2 valeurs clés de ce paramètre :

-Le taux de dilution critique  $D_c$

-Le taux de dilution maximal  $D_m$

### 1er CAS : $D > D_c$

On assiste au phénomène de lessivage du réacteur  $\rightarrow dX/dt < 0$

### 2ème CAS : $0 < D < D_c$

Evolution vers un équilibre :

$$X = X_{eq} \rightarrow r_x = \mu \cdot X = D \cdot X$$

$$S = S_{eq} \rightarrow r_s = D \cdot (S_a - S) \quad \rightarrow \text{CHEMOSTAT}$$

$$P = P_{eq} \rightarrow r_p = D \cdot P$$

### 3ème CAS : $D = D_c = \mu_{max}$

$$dX/dt = X \cdot (\mu_{max} - D) = 0 \quad \rightarrow \text{TURBIDOSTAT}$$

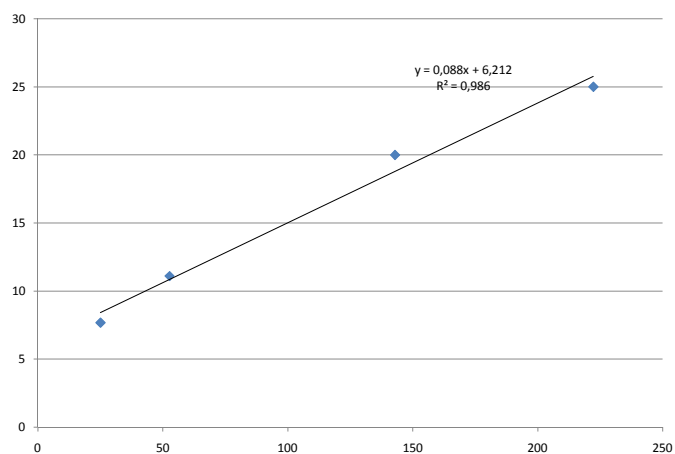


### Paramètres de croissance microbienne à partir d'un réacteur continu : exercice

Une culture d'*E. coli* recombinant à été soumise à différent taux de dilution dans un dispositif de type chémostat. Les données récoltées sont les suivantes :

D (h <sup>-1</sup> )	S (g/l)
0,13	0,04
0,09	0,019
0,05	0,007
0,04	0,0045

Calculez le taux de croissance maximal et le Ks



Les paramètres de croissance peuvent être utilisés pour simuler des cultures en réacteur batch, fed-batch ou continu.

Besoin d'un outil numérique afin de résoudre les équations différentielles (système dynamique) : Excel, MatLab

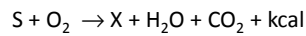
## Bilans chimiques

- Etablissement de l'équation stœchiométrique globale de la croissance microbienne
- Utilisation de l'équation stœchiométrique pour le calcul des besoins en substrats

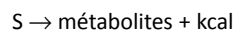
Les procédés microbiologiques sont gouvernés par des lois stœchiométriques et thermodynamiques. La connaissance des bilans permet d'évaluer la composition du milieu de culture, le rendement théorique de bioconversion,....

3 types de réactions d'un micro-organisme face à un substrat :

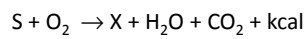
**Synthèse de biomasse :**



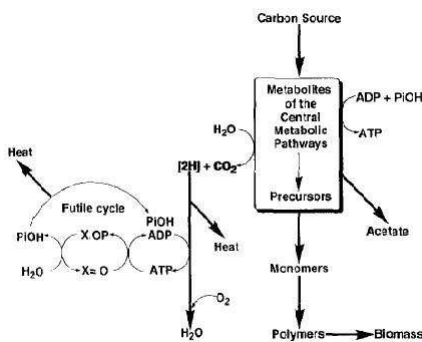
**Bioconversion :**



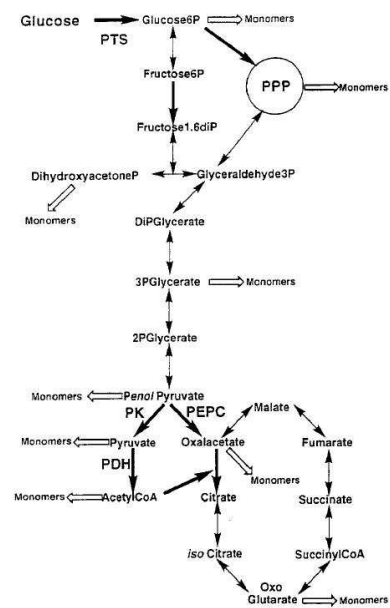
**Maintenance :**



Métabolisme = réseau complexe de réactions biochimiques



D'après Holms [1996] *FEMS microbiology review*

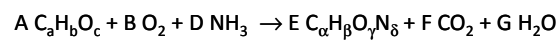


Nombre important de réactions biochimiques

Besoin d'un outil numérique afin de résoudre le système d'équations algébriques linéaires (système à l'état stationnaire) : Excel, MatLab

## Bilan chimique

Les voies biochimiques peuvent être simplifiées en une réaction globale : considérons la réaction globale pour un micro-organisme chimio-organotrophe aérobie



**A,B,C,D,E,F,G** : coefficients stoechiométriques.

**a,b,c** : composition du substrat carboné.

**$\alpha,\beta,\gamma,\delta$**  : composition de la biomasse (dépend de la nature du substrat, du type de micro-organisme et de l'état physiologique des cellules).

### 1. Rendement défini à partir du substrat carboné.

Le substrat carboné peut jouer 2 rôles :

- Source d'énergie (formation d'ATP) → substrat oxydé
- Edification des constituants cellulaires → substrat carboné assimilé

Définition d'un coefficient de rendement de la conversion du substrat en biomasse  $Y_{x/s}$ .  
Ce coefficient est une bonne estimation de la quantité de C assimilé par rapport au C total (C assimilé + C oxydé).

Calcul de  $Y_{x/s}$  à partir de l'équation stoechiométrique :

$$Y_{x/s} = \frac{E \cdot C_{\alpha} H_{\beta} O_{\gamma} N_{\delta} \cdot 1,11}{A \cdot C_a H_b O_c}$$

Dans le cas d'une culture d'un micro-organisme aérobie sur hydrate de carbone pour la production de biomasse, la valeur moyenne de  $Y_{x/s}$  est de 0,5.

$Y_{x/s}$  permet de calculer les besoins en substrat si l'équation stoechiométrique est connue.

Si l'équation n'est pas connue (rappel) :

$$\frac{dS}{dt} = -r_s = -\frac{r_x}{Y_{x/s}} - m_s \cdot X$$

Si on considère que la concentration en cellule passe de  $X_0$  à  $X_f$  et que la concentration en substrat passe de  $S_0$  à  $S_f$ , il est possible d'intégrer l'équation précédente :

$$S_0 = \frac{X}{Y_{x/s}} + \frac{m_s}{\mu_{\max}} \cdot X$$

### Bilan chimique : exercice 1

Soit un micro-organisme dont la composition élémentaire est la suivante :

C : 57%

H : 7,3%

O : 12%

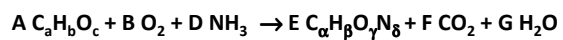
N : 19%

Déterminez la formule brute du micro-organisme.

### Bilan chimique : exercice 2

Soit un micro-organisme dont la formule brute est  $C_{4,4}H_{7,3}O_{1,2}N_{0,86}$ . Le rendement de conversion par rapport au substrat carboné est égal à 0,51. Le substrat est du glucose.

Etablissez l'équation stoechiométrique :



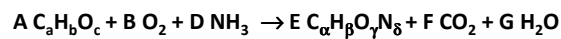
Calculez le QR

## 2. Rendement lié à la consommation en oxygène

Estimation de la demande en oxygène compliquée :

$$Q_{O_2} = \frac{1}{Y_{x/O_2}} \approx \frac{r_{O_2}}{R_x} \quad \begin{array}{l} \text{quantité d'O}_2 \text{ consommé par g} \\ \text{de biomasse produite} \end{array}$$

**MATELES** : estimation de la demande en oxygène d'un micro-organisme à partir de l'équation stœchiométrique



**Bilan en O<sub>2</sub>** :

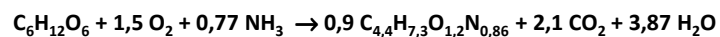
O<sub>2</sub> apporté par le substrat + O<sub>2</sub> moléculaire = O<sub>2</sub> dans la biomasse + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O

$$c \cdot A + \alpha \cdot B = \gamma \cdot E + 2 \cdot F + G$$

$$Q_{O_2} = 16 \left[ \frac{2a+b/2-c}{Y_{x/s} \cdot MM_s} + \frac{\%O}{1600} - 2 \cdot \frac{\%C}{1200} - \frac{1 \cdot \%H}{2 \cdot 100} + \frac{3 \cdot \%N}{2 \cdot 1400} \right]$$

## Bilan chimique : exercice 3

La croissance aérobie d'une bactérie sur glucose répond à l'équation stœchiométrique suivante :



Quelle est la quantité de sucre, d'oxygène et d'azote nécessaire pour produire 1 g de biomasse ?

### Bilan chimique : exercice 4

Considérons un bacille de formule brute  $C_{4,4}H_{7,3}O_{1,2}N_{0,86}$ . Les paramètres cinétiques sont les suivants :

$$\mu_{\max} = 1,43 \text{ h}^{-1}$$

$$Y_{x/s} = 0,45$$

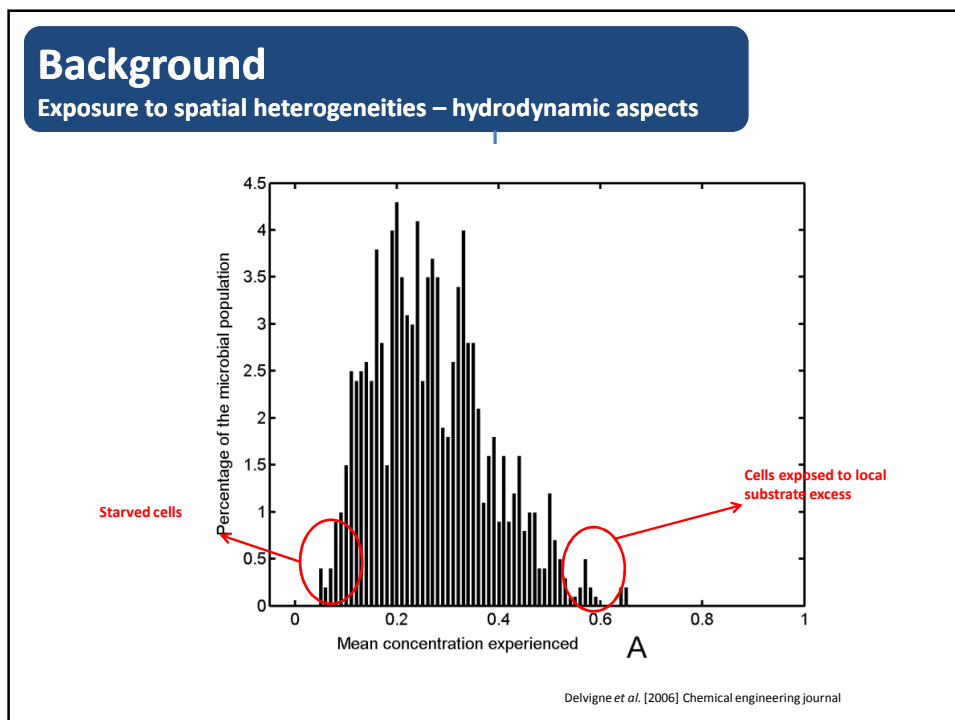
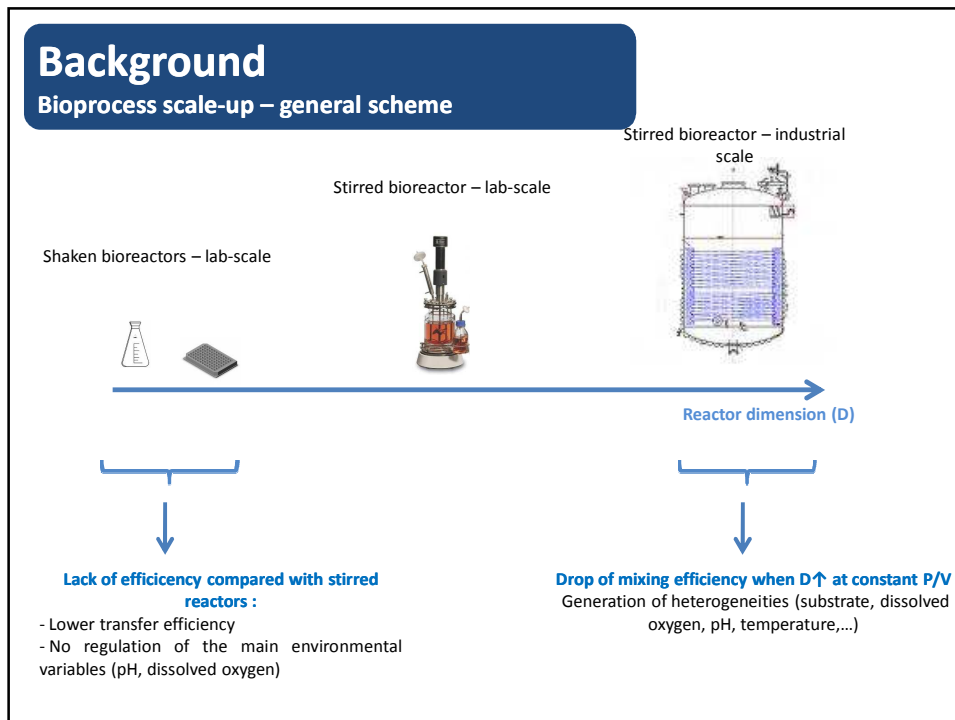
$$m_s = 0,05$$

Le milieu contient du glucose, du  $NH_3$  et des éléments minéraux.

Quelle sont les quantités de substrat, d'azote et d'oxygène qui doivent être présentes dans le milieu si on désire produire 10 g/l de biomasse ?

## Deuxième partie Utilisation des biocapteurs pour l'optimisation des bioréacteurs



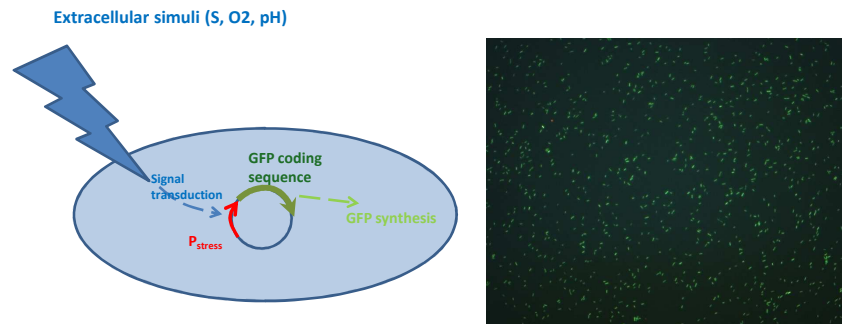


## Experimental strategy

### Fluorescent reporter system

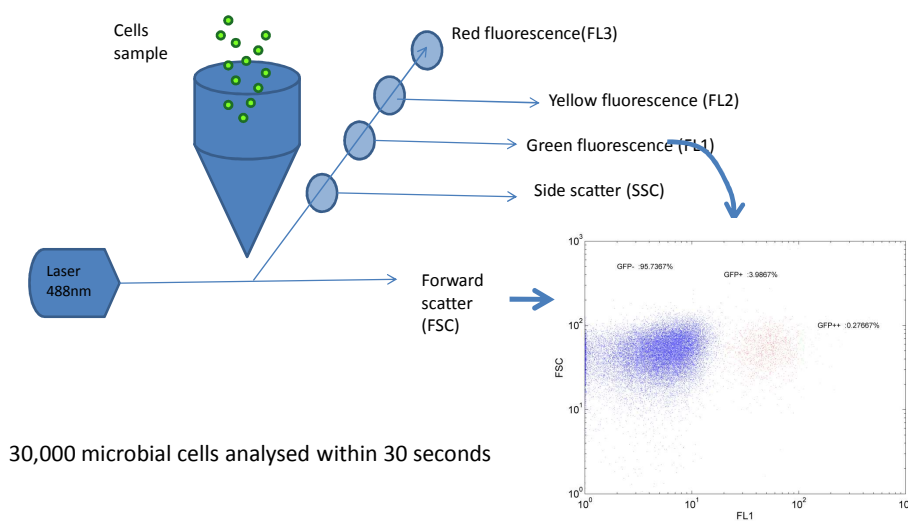
#### Basic principle :

Using the microbial population as « physiological tracer » for the estimation of the bioreactor mixing and transfer efficiency (potentially capturing the stochasticity linked with the CTD)



## Experimental strategy

### Flow cytometry – an efficient tool to characterize microbial population heterogeneity

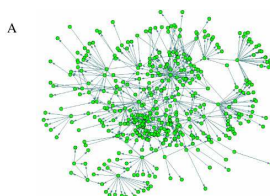


## Experimental strategy

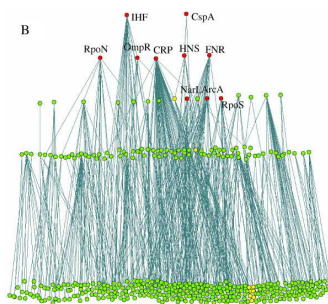
Choosing the right ORF for my application

*E. coli* : about 4000 ORFs :

Transcriptional network



Transcriptional network – hierarchical classification



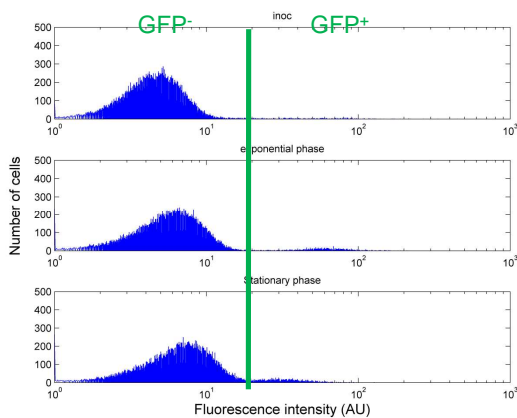
Ma et al. [2004] BMC Bioinformatics, 5:199

## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library

Cultivation in shake flasks on mineral medium

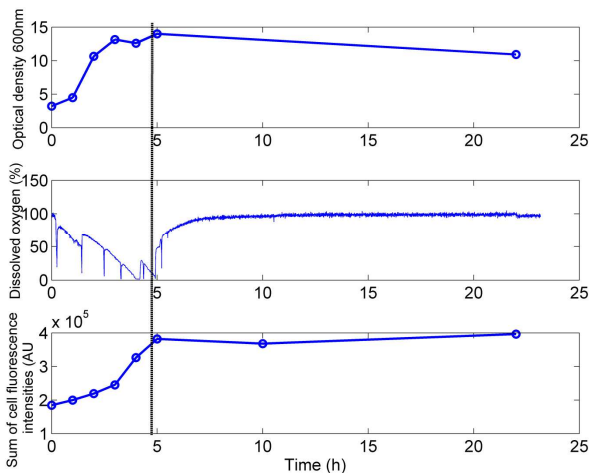
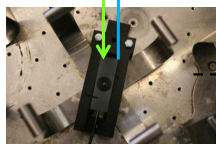
*prpoS::gfp*



## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library  
Representativeness of shaken bioreactor

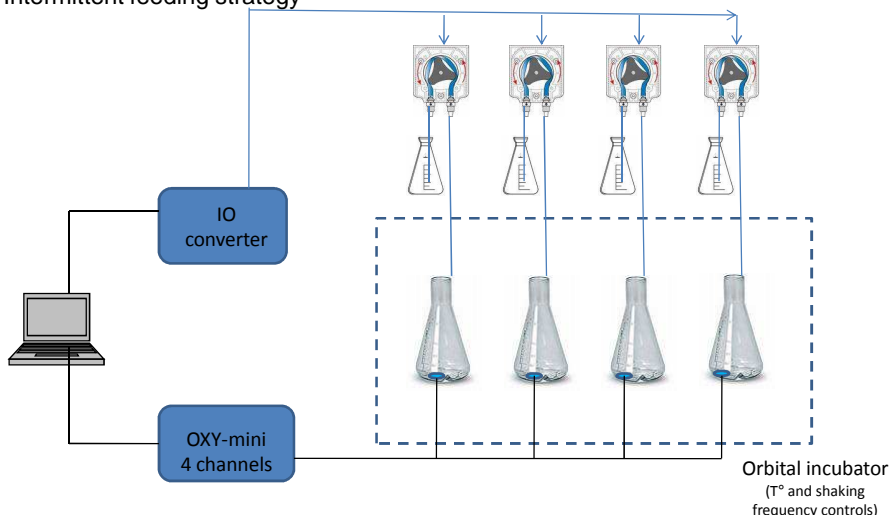
**Shake flask** : easy to handle, well suited to perform parallel cultures, but lack of representativeness compared to the performances of stirred bioreactors



## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library  
Representativeness of shaken bioreactor

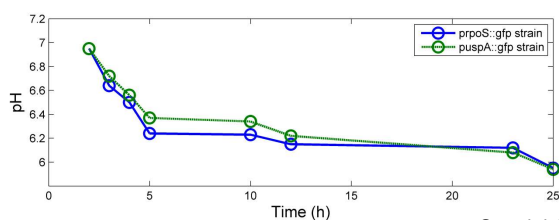
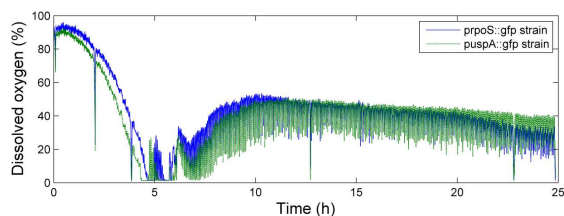
Intermittent feeding strategy



## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library  
Representativeness of shaken bioreactor

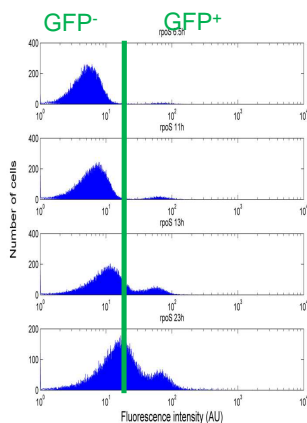
Cultures of GFP clones in shaken bioreactors (1L baffled shake flask : initial working volume : 200mL ; final working volume : 400 mL)



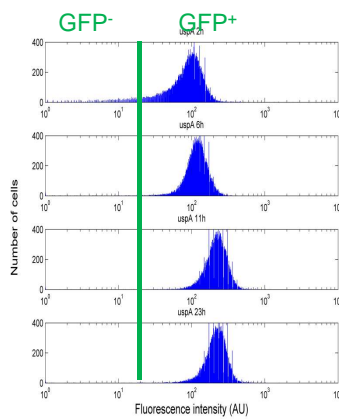
Growth inhibiting value : 4.5

## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library  
Representativeness of shaken bioreactor



prpoS::gfp

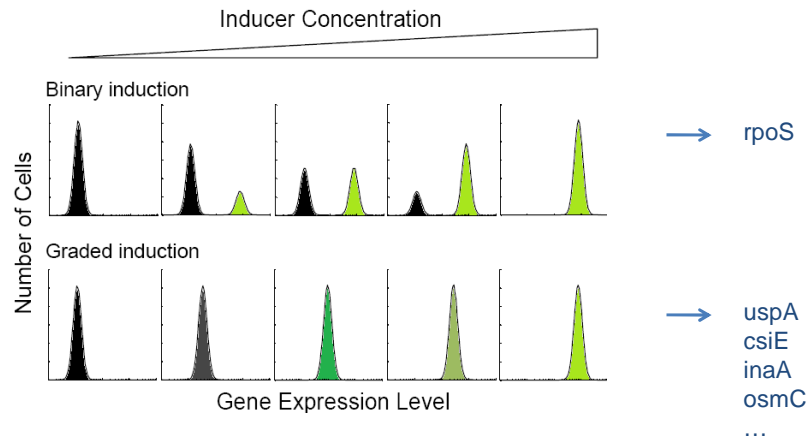


puspA::gfp

## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library

Two modes of expression : binary or graded



Zhang *et al.* (2006) Theoretical biology and medical modelling, 3:18

## Results

Screening among an *E. coli* GFP clones library

Binary mode of gene expression → sources :

- Short mRNA and protein half-lives
- High sensitivity for the detection of the reporter protein

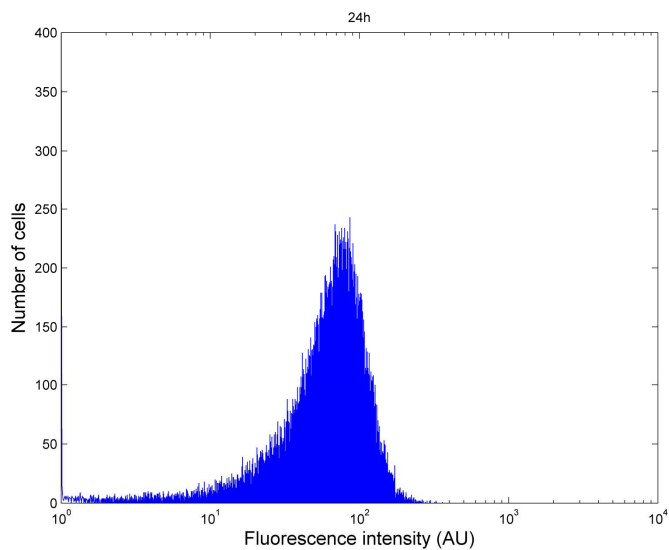
Generally not observed for GFP reporter system considering the high protein stability of this system compared with  $\beta$ -galactosidase and luciferase reporters

This mechanism of gene induction give rise to differentially expressed phenotypes at the protein level. Can potentially be used to gain more sensitivity about the impact of extracellular fluctuations

## Results

*Behaviour of prpoS::gfp strain in fed-batch stirred bioreactor*

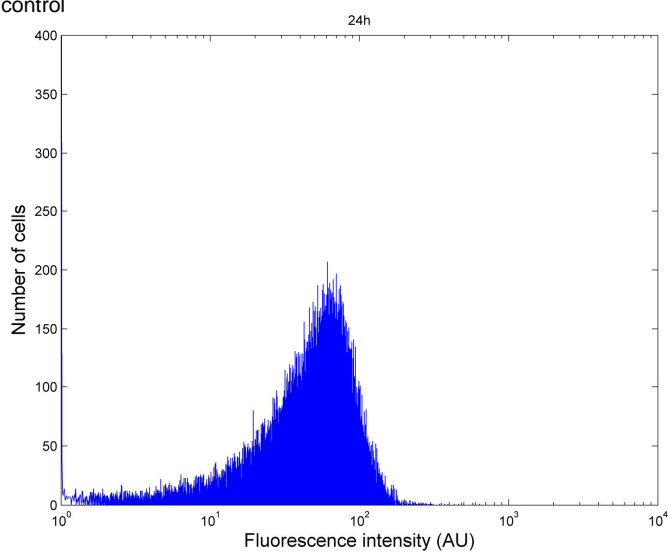
Regulation of the addition of glucose by the dissolved oxygen level (SP = 30%) PID control



## Results

*Behaviour of prpoS::gfp strain in fed-batch stirred bioreactor*

Regulation of the addition of glucose by the dissolved oxygen level (SP = 30%), ON/OFF control



## Results

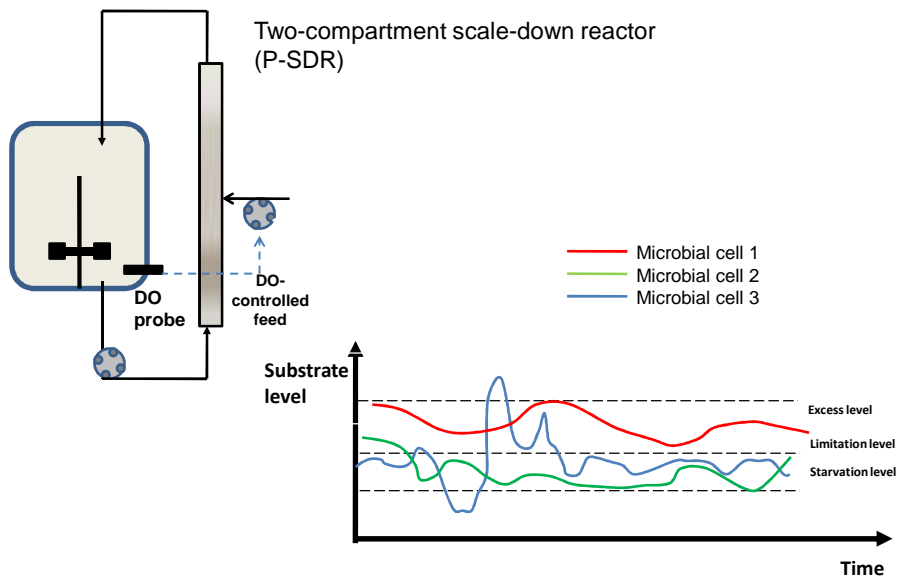
*Behaviour of  $prpoS::gfp$  strain in fed-batch stirred bioreactor*

### Basic observations :

- Binary mode for GFP expression at the end of the batch phase and during the transition from batch to fed-batch phase
- After the induction of the major part of the population (all the cells are in the GFP+ state), graded mode of GFP expression is observed
- Successive glucose excess tends to slow down the binary expression phase

## Results

*Behaviour of  $prpoS::gfp$  strain in two-compartment scale-down bioreactor*



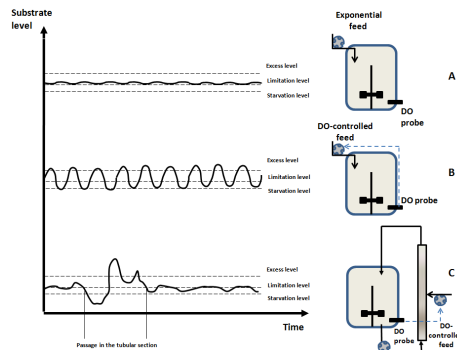


## Results

Behaviour of *prpoS::gfp* strain in two-compartment scale-down bioreactor

### Operating conditions :

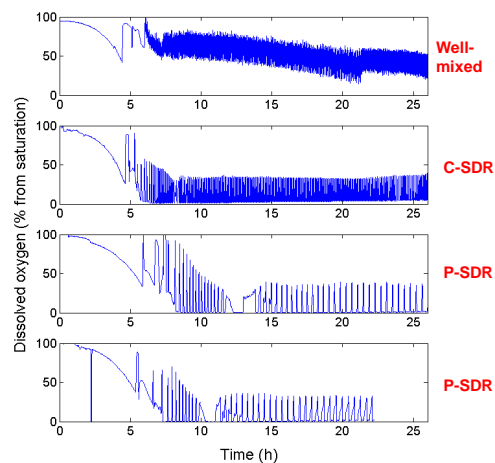
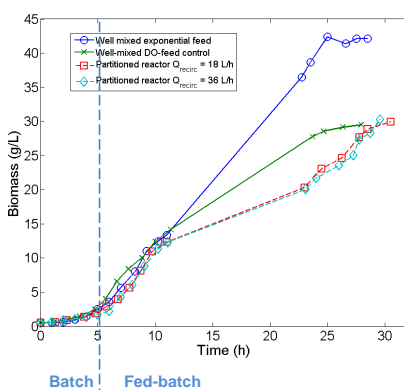
- Stirred bioreactor, working volume 10L
- Mineral medium, glucose as carbon source
- Fed-batch with exponential feed algorithm
- Scale-down approaches with DO-controlled fed-batch and partitioned reactor

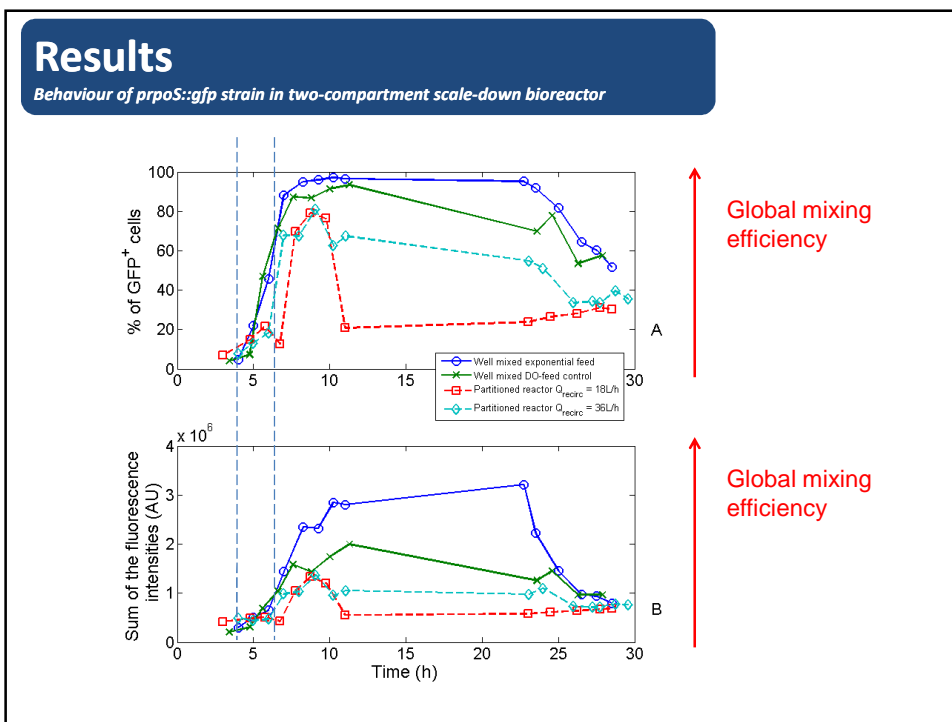
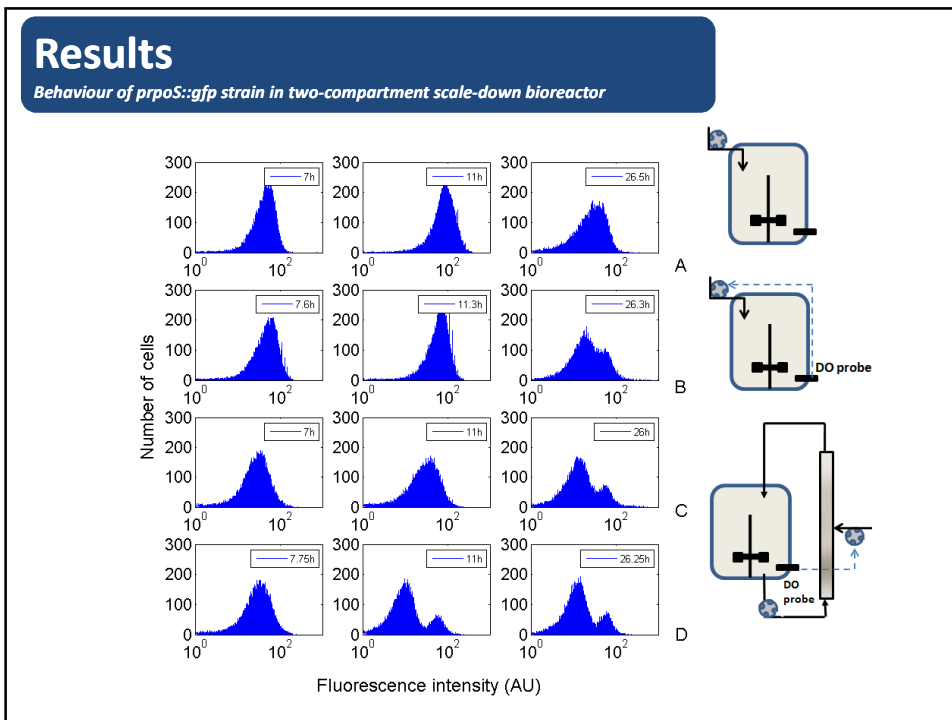


Delvigne F. et al. [2009] *Microbial cell factories*, 8:15

## Results

Behaviour of *prpoS::gfp* strain in two-compartment scale-down bioreactor

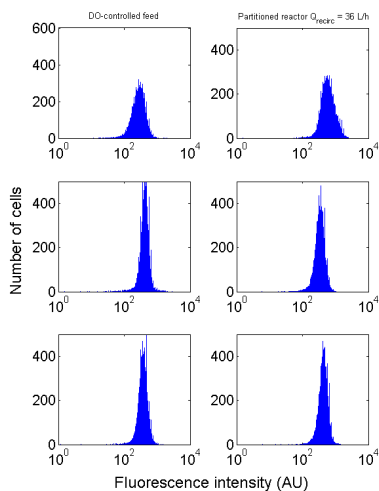




## Results

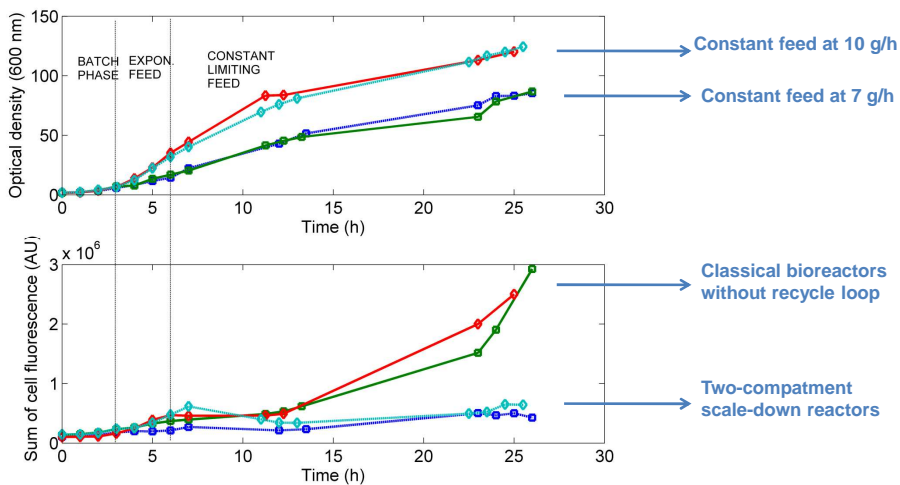
*Behaviour of prpoS::gfp strain in two-compartment scale-down bioreactor*

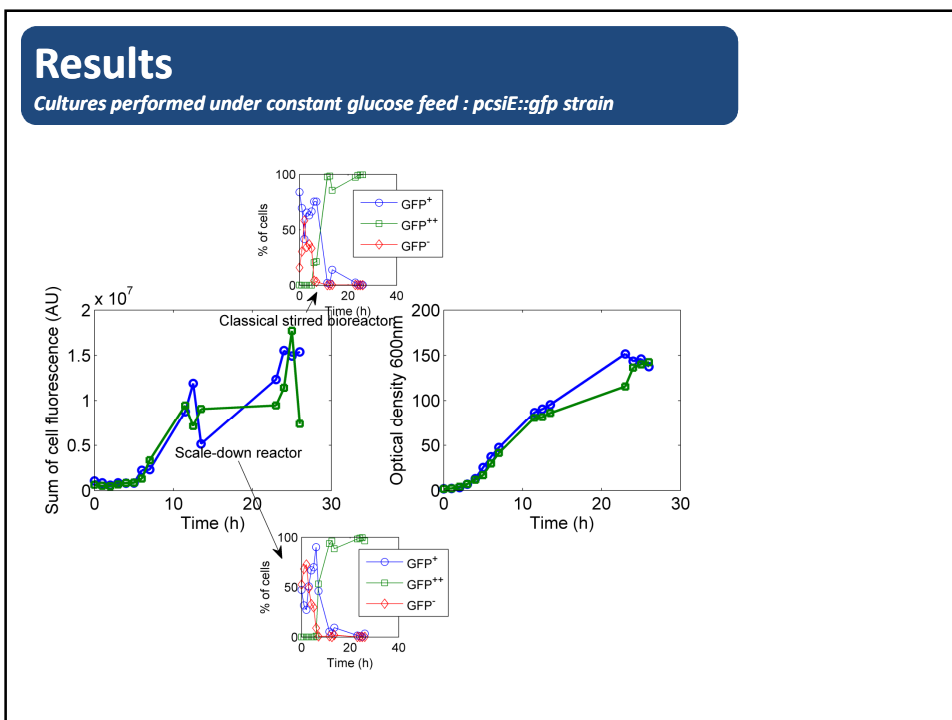
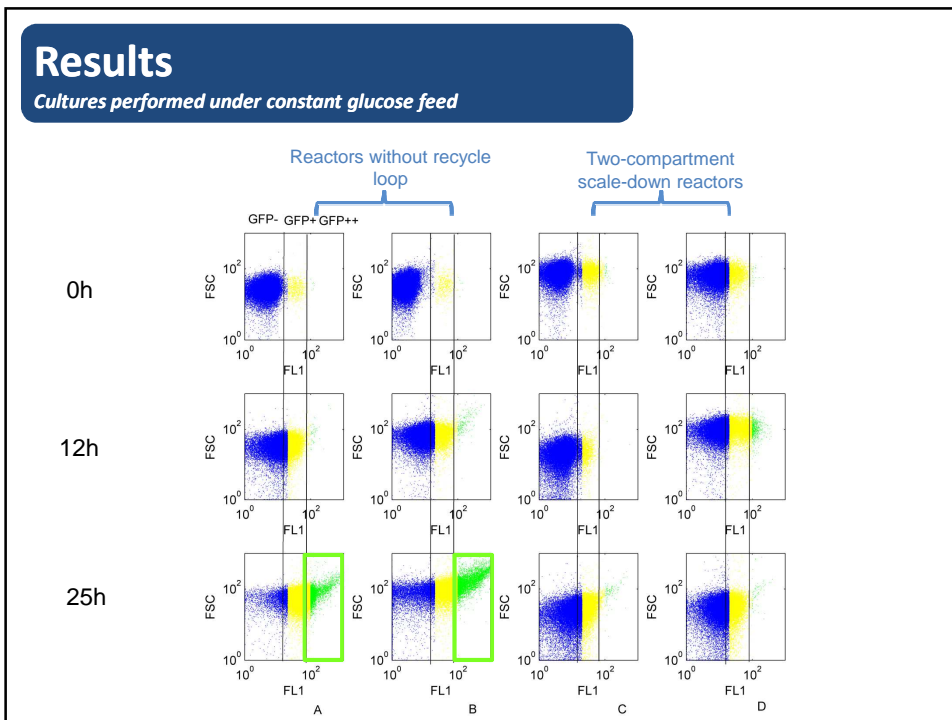
A *pcya::GFPmut2* strain is not influenced by hydrodynamic conditions



## Results

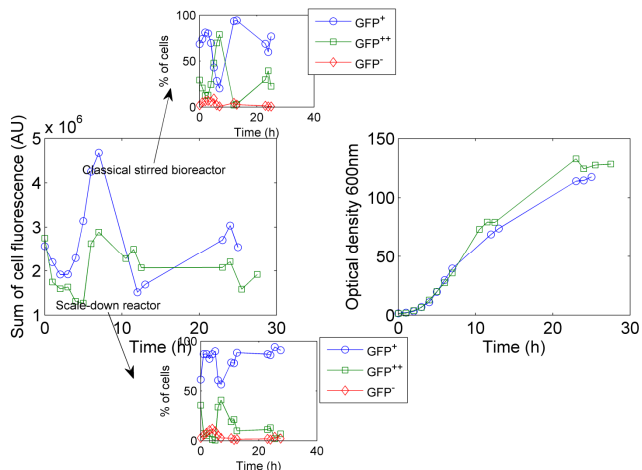
*Cultures performed under constant glucose feed*





## Results

Cultures performed under constant glucose feed : *puspA::gfp* strain



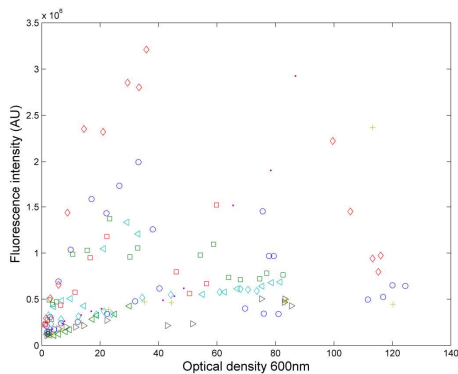
To be validated by using a DO-controlled feed  
 Prytz *et al* [2003] *Biotech bioeng* **83**:595-603

## Results

Synopsis : relation between GFP expression level and cell density

Two main mechanisms proposed to regulate *rpoS* in high cell density cultures :

- Cell density DeLisa and Bentley [2002] *Microbial cell factories*, 1:5
- Decreasing growth rate Inssen and Egli [2004] *Microbiology*, **150**:1637:1648



## Perspectives and conclusion

prpoS::GFP strains seems to react to the degree of homogeneity inside the bioreactor :

Homogenous reactor : GFP+

Inhomogenous reactor : GFP-

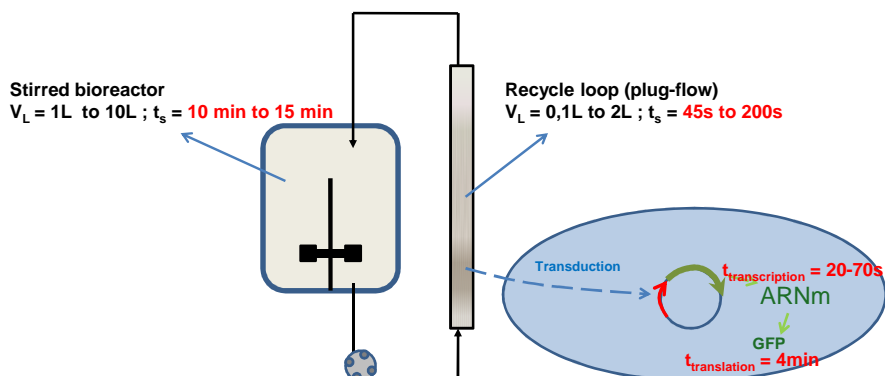
## Perspectives and conclusion

Two questions have to be raised :

- Flow cytometry combined with  $P_{\text{stress}}::\text{GFP}$  expression → impact of extrinsic fluctuations

What about the intrinsic fluctuations ?

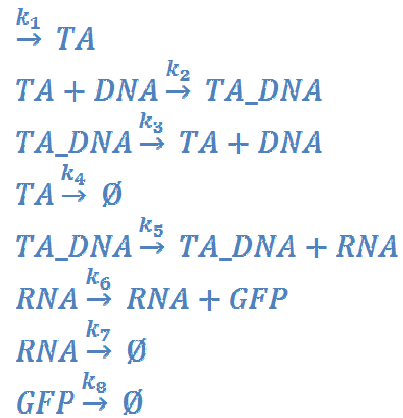
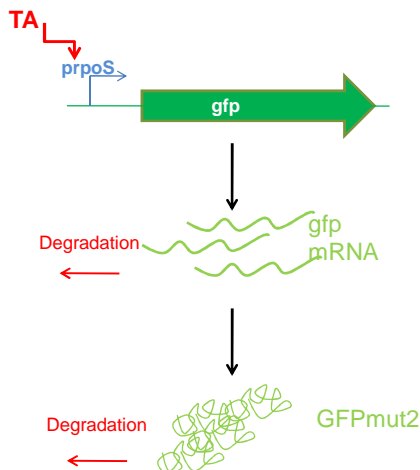
- Characteristic times of hydrodynamic mechanisms compared with those of the biological processes behind GFP synthesis



## Perspectives and conclusion

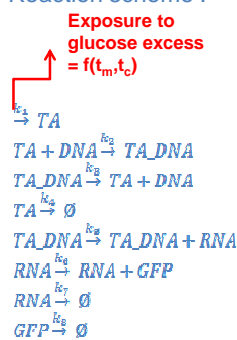
Complex phenomena :

- Two sources of noise (extrinsic and intrinsic)
- Very different characteristic time constants (physical and biological processes)
- A model is required



## Perspectives and conclusion

Reaction scheme :



Generation time :  
 $k_8 = \log(2)/t_g$

ODEs system :

$$\begin{aligned}
 \frac{dTA}{dt} &= k_1 - k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_4 \cdot TA + k_3 \cdot TA\_DNA \\
 \frac{dTA\_DNA}{dt} &= k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_3 \cdot TA\_DNA - k_5 \cdot TA\_DNA \\
 \frac{dDNA}{dt} &= k_2 \cdot TA \cdot DNA - k_2 \cdot TA \cdot DNA \\
 \frac{dRNA}{dt} &= k_5 \cdot TA\_DNA - k_6 \cdot RNA - k_7 \cdot RNA \\
 \frac{dGFP}{dt} &= k_6 \cdot RNA - k_8 \cdot GFP
 \end{aligned}$$

$$GFP_{steady-state} = RNA_{steady-state} \cdot \left( \frac{k_6}{k_8} \right)$$

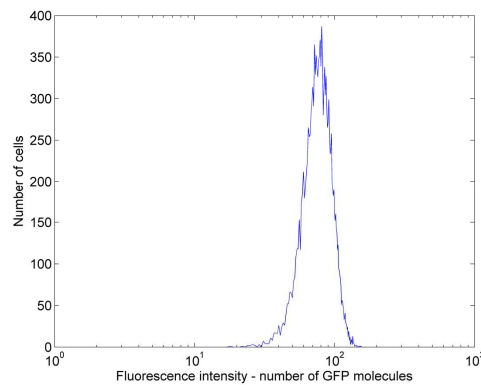
8 rates (including the characteristic time constants) to specify

## Perspectives and conclusion

These equations can be used in the classical deterministic formalism (ODEs solver), but more interestingly in the stochastic formalism :

Probability that reaction  $\mu$  occurs at time  $\tau$  (Gillespie algorithm)

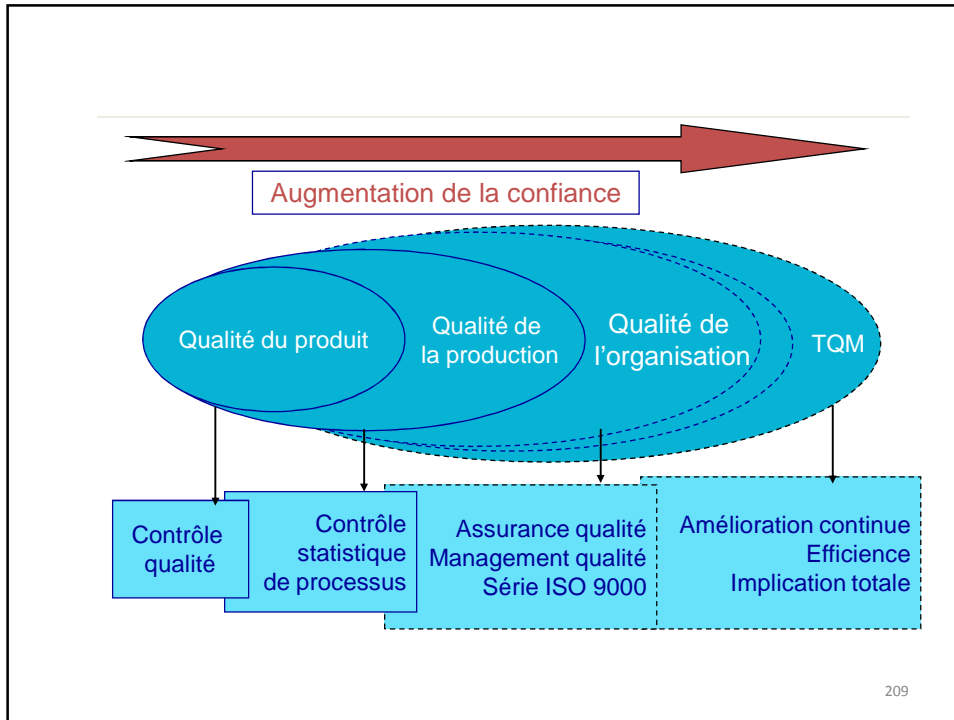
Gillespie [1977] J. of physical chemistry, 81:2340-2361



Example : simulation of 30,000 cells after 6 hours of induction

**Troisième partie**  
**Traçabilité et assurance qualité dans les**  
**bioprocédés microbiens**

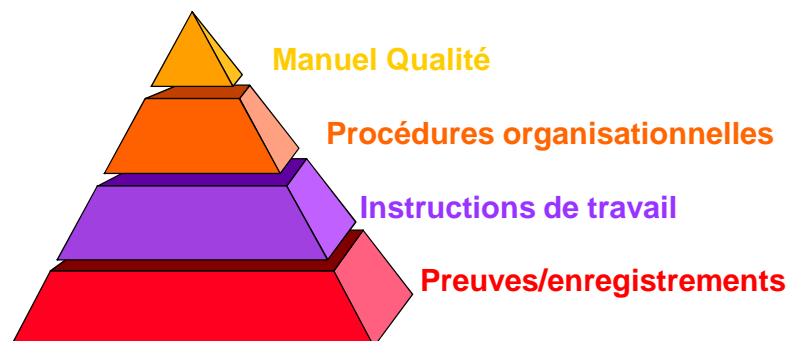




209

## Norme ISO 9001:2000

### La documentation qualité



210

## Pourquoi la traçabilité

---

- ✓ Etat des lieux : une inquiétude généralisée
- ✓ L'impératif sécuritaire
- ✓ La mondialisation et la diversité des chaînes d'approvisionnement
- ✓ La production de masse et la perte de proximité
- ✓ La complexité de l'offre
- ✓ L'évolution du comportement du consommateur
- ✓ Un environnement de plus en plus réglementé

211

## Pourquoi la traçabilité

---

### Les enjeux

- ✓ Maîtriser la qualité
- ✓ Assurer la sécurité du consommateur et optimiser les rappels de produits
- ✓ Maîtriser les flux logistiques
- ✓ Respecter la réglementation
- ✓ Profiter d'un atout commercial
- ✓ Protéger une image de marque

212

## Définir la traçabilité

---

Définition ISO 9000:2000

« Aptitude à retrouver l'historique,  
la mise en œuvre ou l'emplacement  
de ce qui est examiné »

Pour un produit :

l'origine des matériaux et composants;  
l'historique de réalisation;  
la distribution et l'emplacement du  
produit après livraison.

213

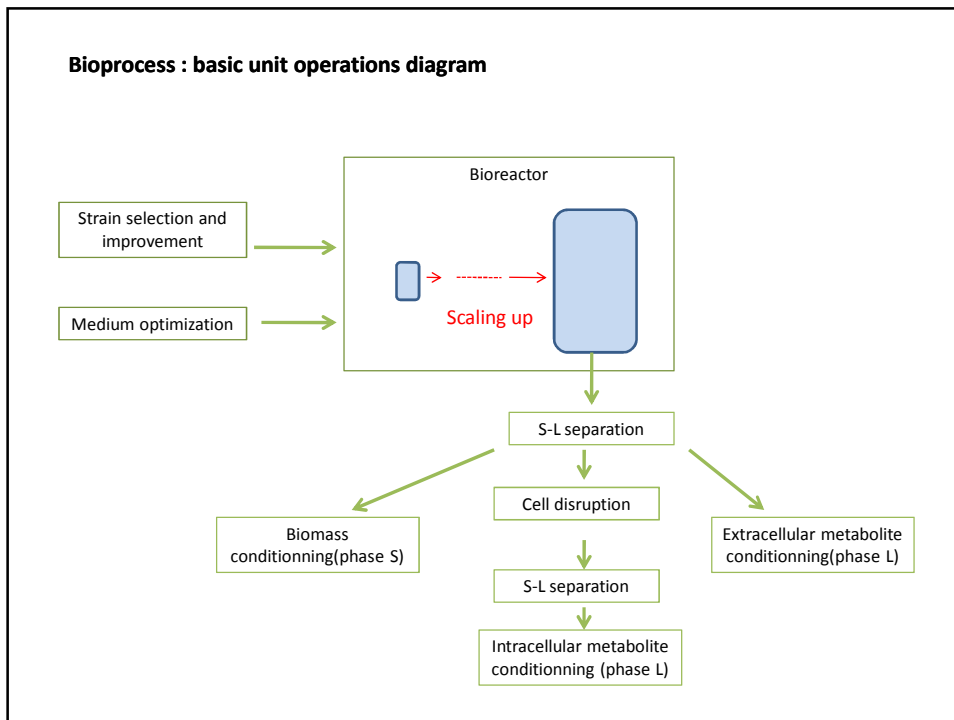
## Définir la traçabilité

---

Définition Règlement (CE) 178/2002

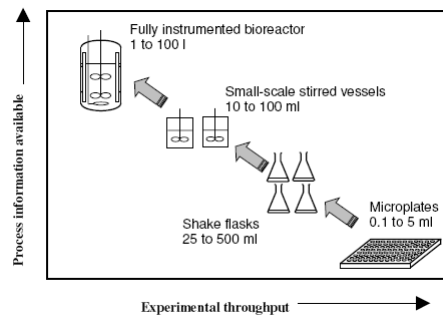
« **Capacité de retracer**,  
à travers toutes les étapes de la production, de la  
transformation et de la distribution,  
**le cheminement** d'une denrée alimentaire, d'un  
aliment pour animaux, d'un animal producteur de  
denrées alimentaires ou d'une substance  
destinée à être incorporée dans une denrée  
alimentaire ou un aliment pour animaux »

214



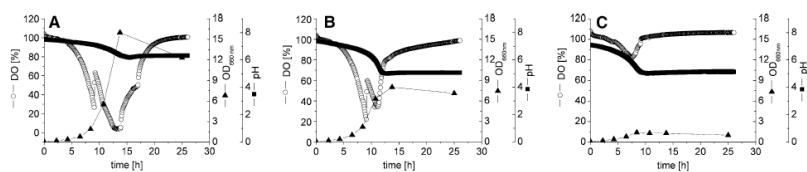
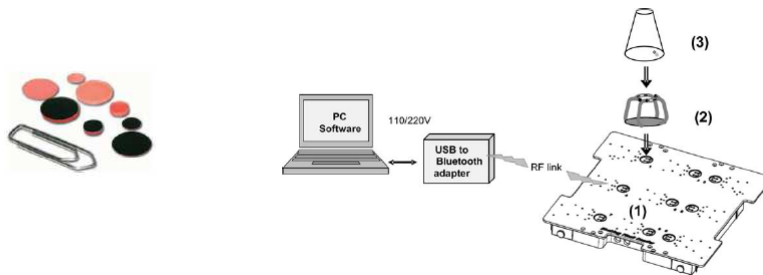
Nouvelle génération de bioréacteur pour les études de screening à grand débit (High throughput studies)

Aperçu de la problématique :



**Betz and Baganz [2006]**

2<sup>ème</sup> approche : développement d'une gamme de senseurs optiques



Cultivation of *C. glutamicum lysC<sup>tr</sup>* in batch culture on defined medium with different concentrations of phosphate buffer 106 mM (a), 32 mM (b) and 6 mM (c). Cultivations were carried out in 250 ml non-baffled plastic shake flasks equipped with an oxygen and pH sensor at 30°C and 230 rpm

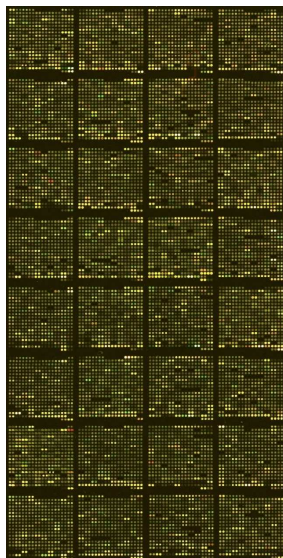
Exemples d'une plateforme de micro-bioréacteurs

Systèmes de culture « disponibles »

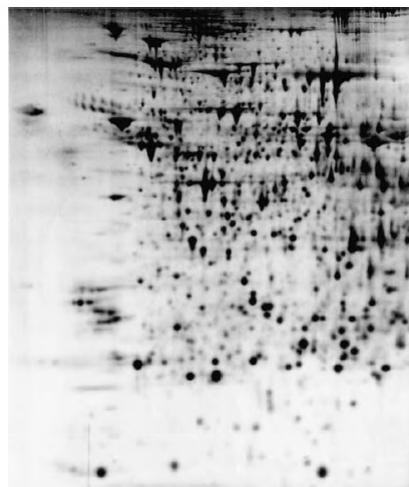


« Omics » technologies

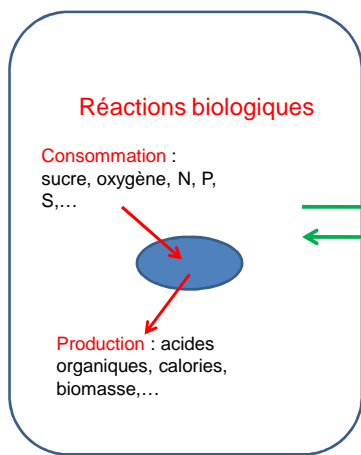
DNA microarray



2D gel electrophoresis



## 2. Régulation des bioréacteurs



### Régulation

#### Batch :

- Température
- pH
- Oxygène dissous
- Mousse

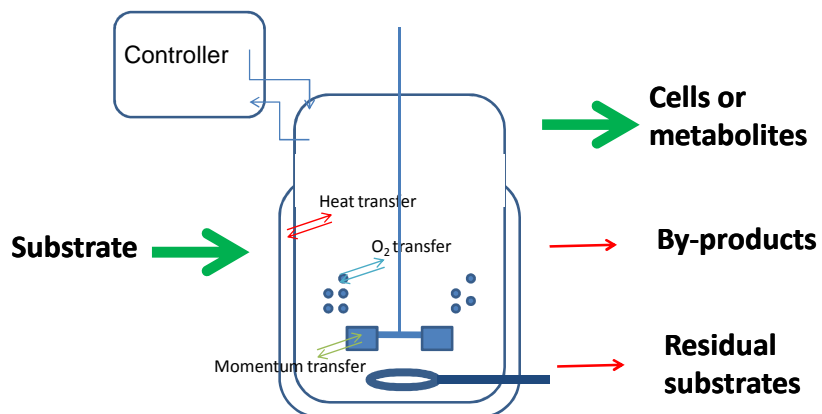
#### Fed-batch/continu

- Température
- pH
- Oxygène dissous
- Mousse
- Volume (si fed-batch ou continu)
- Substrat (fed-batch ou continu)

A réaliser avec les senseurs et actuateurs disponibles

221

### Overview of bioreactor operations



**Practical implementation of PID controller :**

- At the level of transmitter



- At the level of central controller

Freelance  
 AUTO    DA104    QR\_CO2\_Conv    QR\_O2\_Conv    tic024\_conv    >>    V.AQ  
 20    Klaxon

SB20\_G\_2

Choir Page d'alarmes Retour Avancer Sélectionner Options Imprimer Aide

ON Time EFT 00:00:00 **SB 20 litres** ON Général 'Fred'

	CV	SP1	SP2	Délais	OP	Mode	Output		
Agitation	0.0	150.0	0.0	00:00	150.0	Manuel		Agit OFF	HL 500.0 LL 150.0
Température	21.5	30.0	0.0	00:00	0.0	Manuel	Sans	Circ. OFF	Process 00:00:00
pH	8.51	3.00	0.00	00:00	3.00	Manuel	Sans	Volume Base OFF 0.0	Volume Acide OFF 0.0
Oxy. Dissous	4.9	50.0	0.0	00:00	50.00	Manuel	0.0	Sans action	Facteur % 3.5
Aération	0.0								
KL <sub>a</sub>	0.00	Coef KL <sub>a</sub> 7.60	Co2 Gazous -0.02	O2 Gazous 0.00	O2 Cons. 0.0 g/h	Tot. O2 Cons. 0.1 g	CO2 Prod. 0.0 g/h	Tot. CO2 Prod. 0.0 g	
QR	0.00				0.0				
Fed Batch	Volume Initial 250.0	Volume Final 510.315		Délai Fed 00:00	'SANS FED'	QR	0.0	Pompe OFF	Temps fed 1607.138
	0.000	0.000							Appel 300 litres

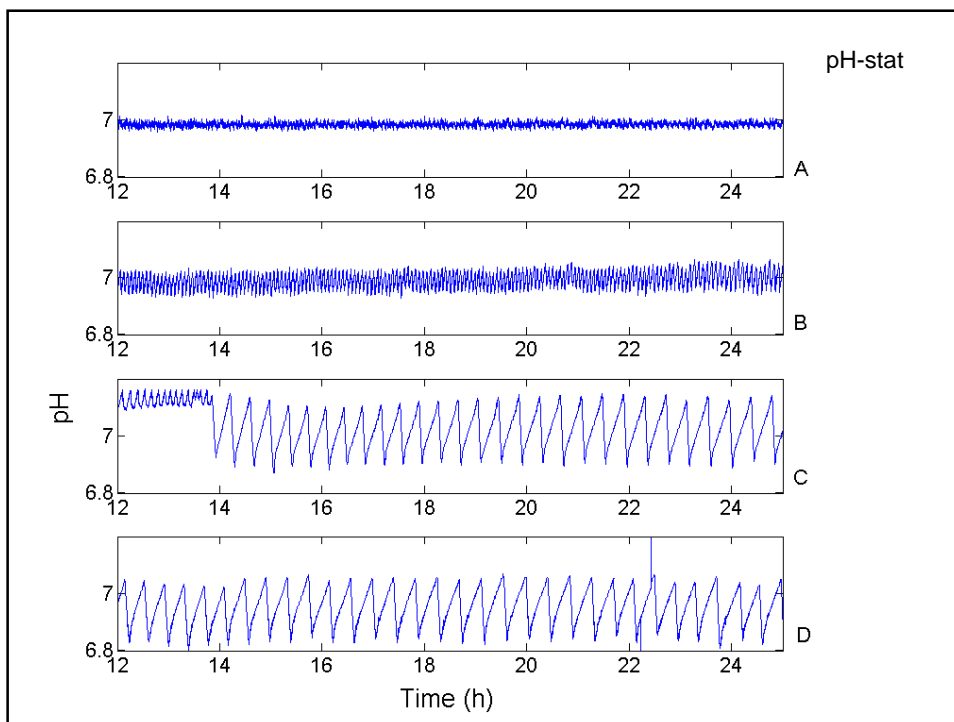
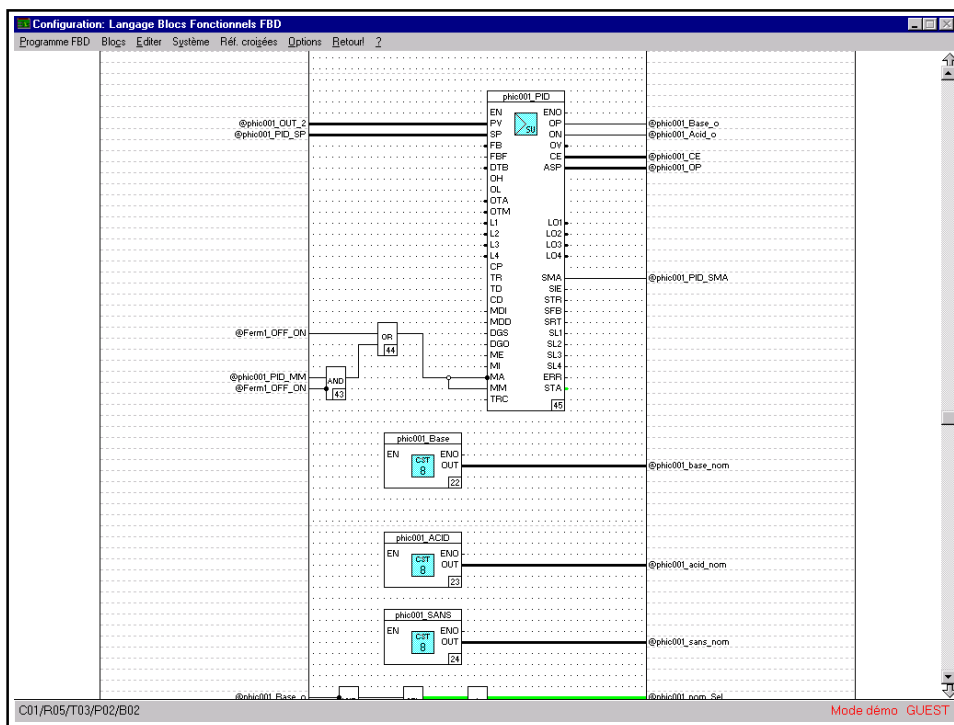
Agitation Tempér. pH Dis. O2 QR-KLa Fed Global Courbes C2 C3

PC.2\_géné

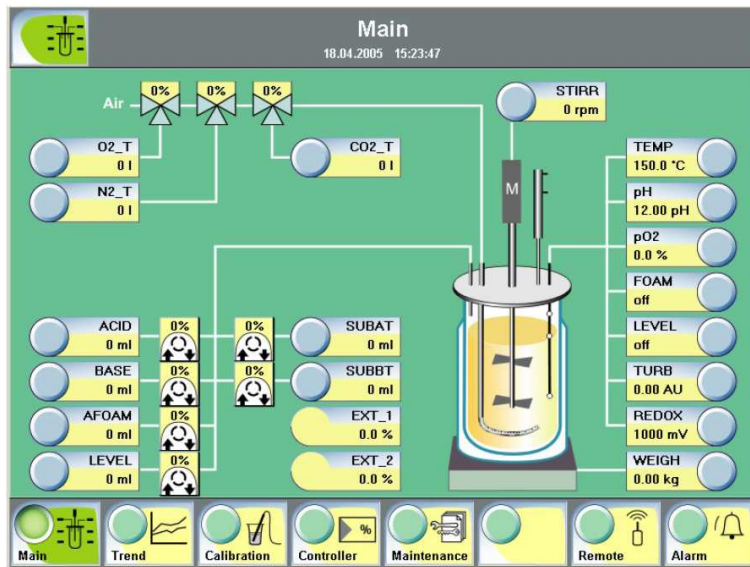
Veille Alarmes Im. Sys. Incr. << >> Syno. Courbes Groupe SEC JEXP JEV JPER G.Ramp. Conduire

22/04/02 11:25:015

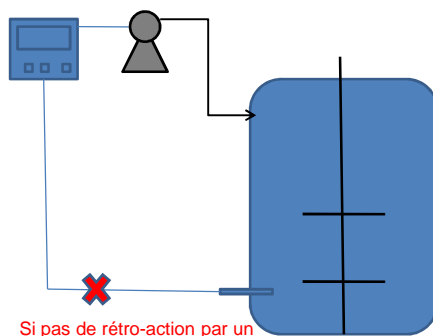




## Interface pour un système de régulation de bioréacteur

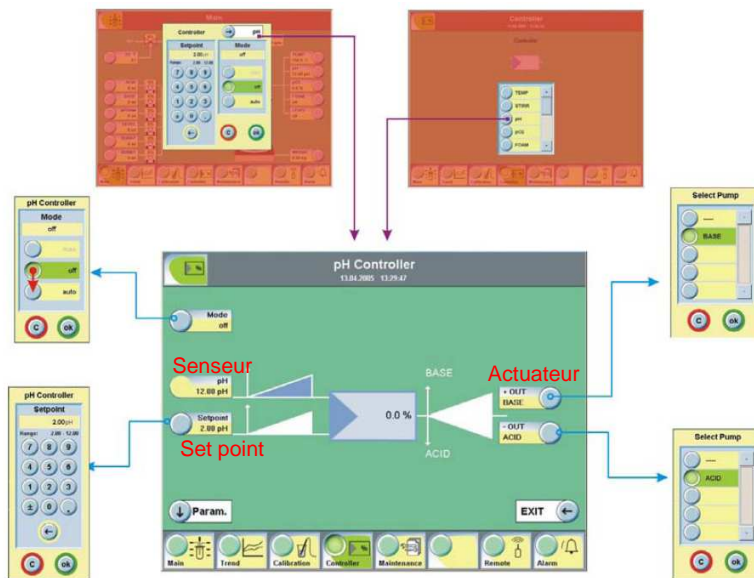


227

Boucle de régulation fermée avec rétro-action (*feedback*)

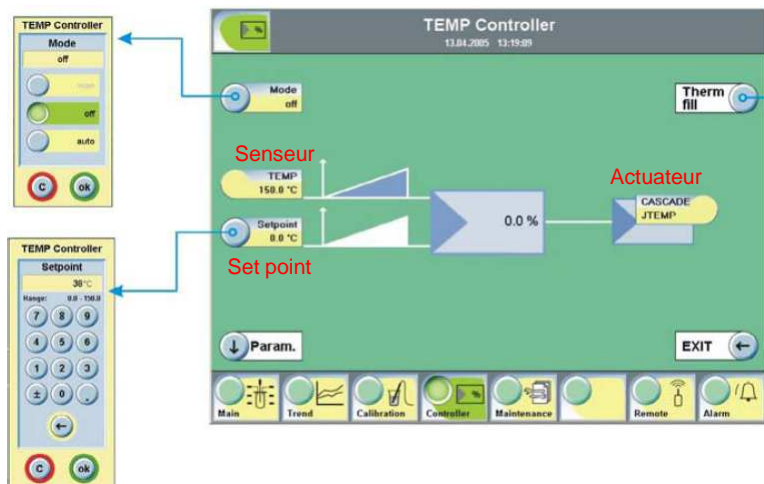
Si pas de rétro-action par un  
 senseur, boucle de  
 régulation ouverte

Interface de régulation : pH

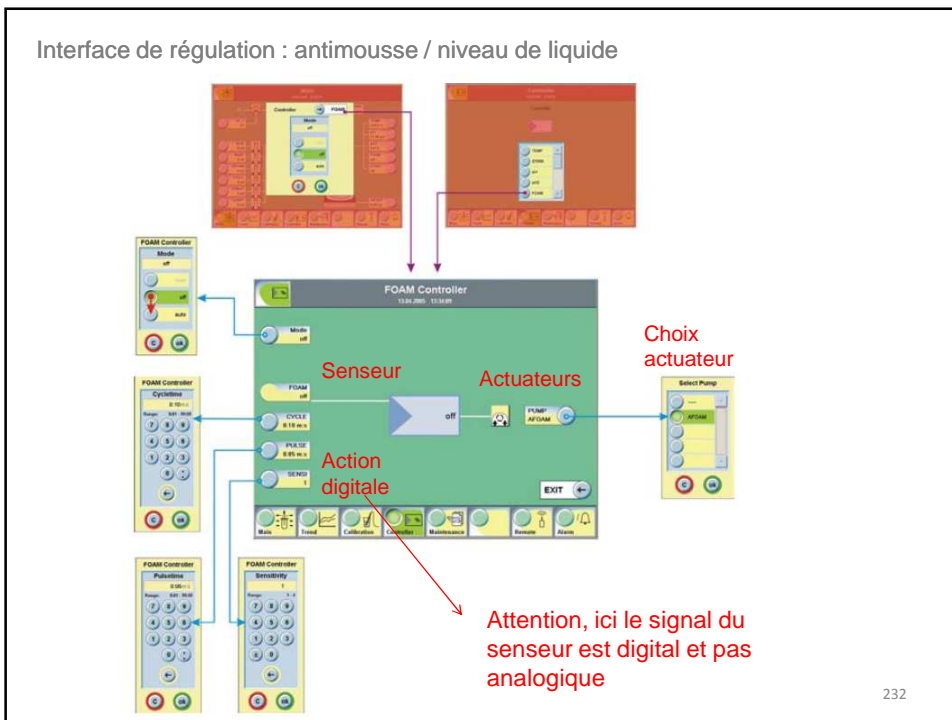
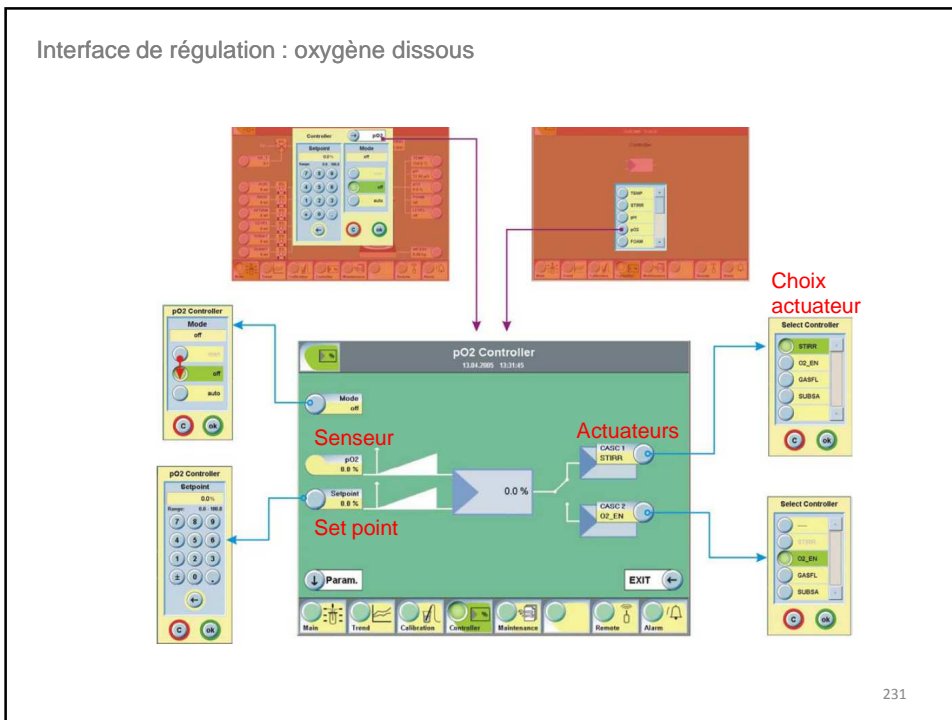


229

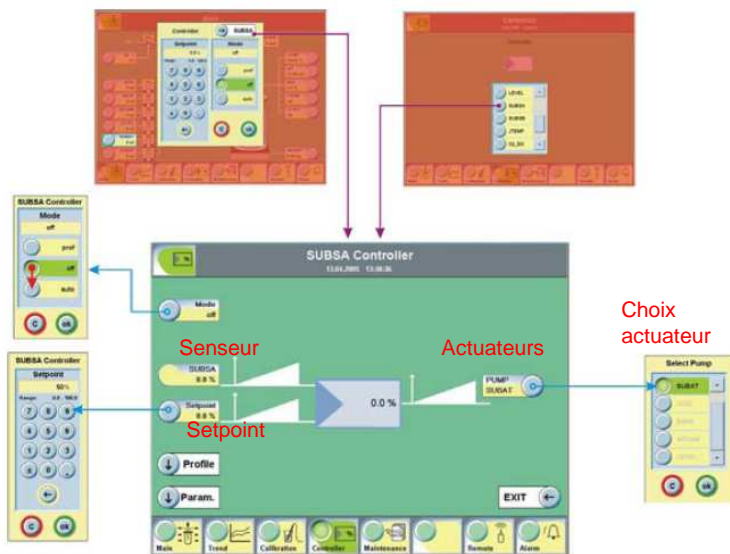
Interface de régulation : température



230

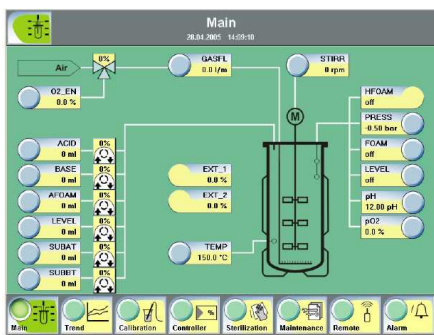


Interface de régulation : fed-batch

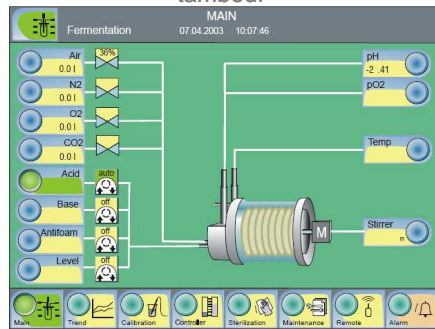


233

Vue système : bioréacteur industriel

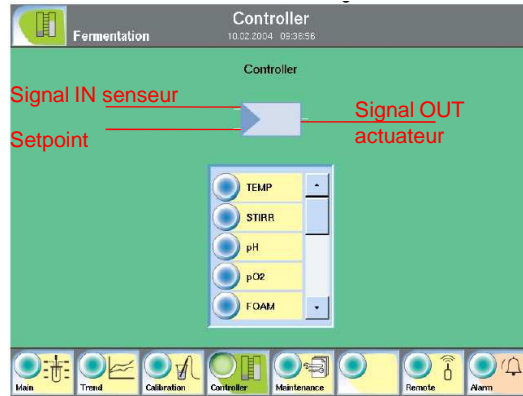


Vue système : bioréacteur type tambour



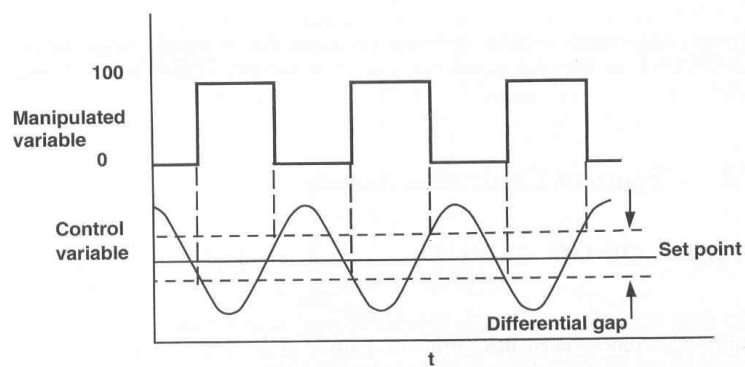
234

## Types de régulation



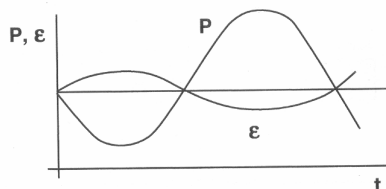
- Contrôleur ON-OFF
- Contrôleur proportionnel
- Contrôleur proportionnel-intégral
- Contrôleur proportionnel-différentiel
- Contrôleur proportionnel-intégral-différentiel (PID)

## Contrôleur ON-OFF



Possibilité d'inclure une zone morte dans laquelle le contrôleur ne réagit pas  
Système le plus simple, mais apparition d'oscillations

## Contrôleur proportionnel



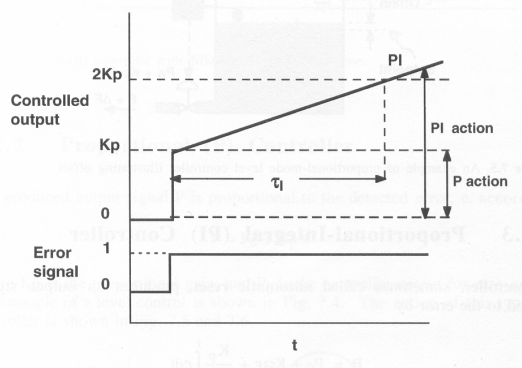
$$P = P_0 + K_p \cdot \varepsilon$$

$P$  : signal output (signal envoyé par le contrôleur)  
 $\varepsilon$  : erreur (différence entre le signal output et le signal input de la sonde)  
 $K_p$  : gain proportionnel

## Contrôleur proportionnel-intégral

$$P = P_0 + K_p \cdot \varepsilon + \frac{K_p}{\tau_I} \cdot \int_0^t \varepsilon \cdot dt$$

$\tau_I$  : constante de temps d'intégration



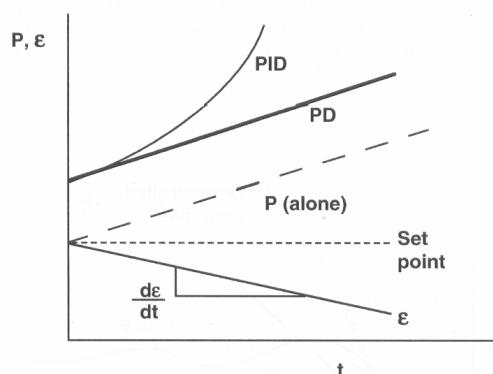
Si l'erreur est constante

$$\frac{dP}{dt} = \frac{K_p}{\tau_I} \cdot \varepsilon \cdot t$$

### Contrôleur proportionnel-différentiel

$$P = P_0 + K_P \cdot \varepsilon + K_P \cdot \tau_D \cdot \frac{d\varepsilon}{dt}$$

$\tau_D$  : constante de temps différentielle



### Contrôleur proportionnel-intégral-différentiel (PID)

$$P = P_0 + K_P \cdot \varepsilon + \frac{K_P}{\tau_I} \cdot \int_0^t \varepsilon \cdot dt + K_P \cdot \tau_D \cdot \frac{d\varepsilon}{dt}$$

