

Université Lille 1

Sciences et Technologies

Ecole doctorale 104- Sciences de la Matière, du Rayonnement et de l'environnement

# Thèse

Présentée par Omar CHTIOUI

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'Université Lille 1 Sciences et Technologies

Spécialité : Ingénierie des Fonctions Biologiques

Numéro d'ordre : 40703

---

## **Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques tournants**

---

Laboratoire ProBioGEM, UPRES-EA 1026

Soutenance le 02 décembre 2011

Iordan NIKOV, Professeur	Université Lille 1 Sciences et Technologies, France	Directeur
Silvia ALEXANDROVA, Professeur	E.N.S.G.T.I., Pau, France	Rapporteur
Venko BESCHKOV, Professeur	Académie des Sciences de Bulgarie	Rapporteur
Pascal DHULSTER, Professeur	Université Lille 1 Sciences et Technologies, France	Examineur
Frédérique GANCEL, Maître de Conférences	Université Lille 1 Sciences et Technologies, France	Examineur
Krasimir DIMITROV, Maître de Conférences	Université Lille 1 Sciences et Technologies, France	Examineur
Ludovic MONTASTRUC, Maître de Conférences	Université de Toulouse, France	Examineur
Marie-Line DELIA, Maître de Conférences	Université de Toulouse, France	Examineur

## Remerciements

Je tiens à remercier tout d'abord le Professeur Pascal DHULSTER, directeur du laboratoire ProBioGEM, pour la confiance qu'il m'a accordée pour réaliser ma thèse pendant ces trois dernières années.

Je remercie du fond du cœur, le Professeur Iordan NIKOV, directeur de cette thèse pour sa confiance et son soutien accordés tout au long de ces trois années de thèse. Sa disponibilité ainsi que ses compétences scientifiques m'ont permis de bien diriger et orienter ma thèse.

Je remercie l'ensemble du jury qui a bien voulu juger ce travail. Je remercie tout d'abord Madame le Professeur Silvia ALEXANDROVA et Monsieur le Professeur Venko BESCHKOV qui m'ont fait l'honneur d'évaluer et de corriger ce manuscrit. Merci au Professeur Pascal DHULSTER, aux Docteurs Marie-Line DELIA et Ludovic MONTASTRUC d'avoir accepté d'être examinateur de cette thèse. Merci également aux Docteurs Krasimir DIMITROV et Frédérique GANCEL d'avoir accepté de participer au jury d'évaluation de mon travail.

Je souhaite particulièrement remercier les Docteurs Krasimir DIMITROV et Frédérique GANCEL pour leur encadrement, disponibilité et nombreux conseils.

Un grand merci pour le Docteur François COUTTE pour son aide précieuse lors des expériences de fermentation en bioréacteurs et sa maîtrise du matériel de la plate-forme de fermentation du laboratoire.

De même, je tiens à remercier le Professeur Naima ARROUME, les Docteurs Nour-Eddine CHIHIB, Peggy VAUCHEL et Didier LECOUTURIER ainsi que les Ingénieurs de Recherche Mme Gabrielle CHATAIGNE et Mr Max BECHET pour leur soutien, leur bonne humeur ainsi que pour leur aide pratique. Je remercie aussi l'équipe technique : Laurent BONNEAU, Estelle Hamont, François LENO et Corinne BOISTEL pour tout le matériel fourni et pour les centaines de cycles d'autoclavages effectués pendant ces années. A Cathy

OUBLION, la secrétaire du laboratoire, pour sa gentillesse et son aide précieuse pour les procédures administratives.

J'exprime ma chaleureuse reconnaissance au Dr. Loubna FIRDAOUS, tutrice d'enseignements et au Dr. Anne FERTIN, pour avoir enseigné avec elles les centaines d'heures de travaux pratiques effectuées au cours de ces années. Je remercie le Pr. Pascal DHULSTER qui m'a permis d'effectuer ces enseignements et l'Ingénieur d'Etude Bertrand FERTIN pour sa sympathie, son soutien et pour ses précieux conseils lors des enseignements de génie des procédés.

Un grand merci pour la fine équipe des doctorants ou docteurs : François, Lucie, Mathieu, Estelle, Arthur, Sameh, Walla, Jovana, Aurélien, Marwan, Amirouche, Layal, Joany, Pauline, Cédric, Faiza, Adil et il Pampa « Léandro ».

J'aimerai aussi dire MERCI à Papa, Maman, Meriouma, Khelil, Tarek, Rim ainsi que mes amis pour leur encouragement et leur soutien lors des moments difficiles.

Enfin je remercie ma fiancée 'TOUTA' pour sa gentillesse, ses encouragements et surtout pour tout le bonheur qu'elle me procure.

## Résumé

La souche de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 produit deux familles de lipopeptides (les surfactines et les fengycines/plipastatines) qui présentent des propriétés biologiques d'intérêt. La productivité des procédés fermentaires en mode continu ou discontinu et leur extrapolation à grande échelle est limitée par des problèmes cinétiques et technologiques notamment par le transfert d'oxygène et la formation massive de mousse. Le travail réalisé porte sur la mise en œuvre d'un procédé innovant permettant la production de lipopeptides sans mousse et sur l'extraction des molécules à partir du milieu de fermentation. Après des travaux concernant l'amélioration de la production des lipopeptides par des cellules de *B. subtilis* immobilisées sur des supports solides, un bioréacteur à disques tournants permettant la production importante et sélective de lipopeptides a été mis en œuvre. Des concentrations de plus de 1 g L<sup>-1</sup> de lipopeptides ont été obtenues lors des fermentations. Le transfert d'oxygène, facteur limitant primordial de ce métabolisme chez *B. subtilis*, a été étudié. Il a été fortement affecté par l'agitation pour toutes les configurations du bioréacteur étudiées. Pour des K<sub>L</sub>a se situant entre 0,001 et 0,003 s<sup>-1</sup>, le métabolisme est orienté vers la synthèse de fengycines qui représentent jusqu'à 80 % des lipopeptides synthétisés. La productivité en fengycine particulièrement intéressante et la simplicité de la mise en œuvre du bioréacteur permet d'envisager une extrapolation de la production à l'échelle industrielle. Simultanément à la production, des études concernant l'extraction des lipopeptides par pertraction dans un contacteur à disques tournants ont été entreprises. Les résultats obtenus sur l'extraction de la surfactine montrent le potentiel de cette technique séparative pour la récupération des lipopeptides à partir de leur milieu de fermentation.

## Abstract

*Bacillus subtilis* ATCC 21332 produces two families of lipopeptides (surfactins and fengycins/plipastatins) with different biological properties of interest. The productivity of fermentation process in batch or continuous conditions and bioreactors scale-up are limited by the problems of oxygen transfer limitation and foaming. This work presents a novel process of non-foaming production of lipopeptides in a rotating discs bioreactor and pertraction studies on the recovery of lipopeptides from fermentation broth. The improving production of lipopeptides by *B. subtilis* immobilized on solid supports enabled the implementation of an original bubbleless bioreactor for a selective production of lipopeptides. More than 1 g L<sup>-1</sup> of lipopeptides was produced in this new rotating discs bioreactor. The oxygen transfer, a key factor for the metabolism of *B. subtilis*, was studied, also. In every studied configuration of bioreactor, the transfer of oxygen was strongly affected by the agitation conditions. At K<sub>L</sub>a in the range of 0.001-0.003 s<sup>-1</sup>, mainly fengycin was produced (up to 80% of total lipopeptides). The obtained high fengycin selectivity and the simplicity of the implementation of the rotating discs bioreactor suggest its potential scale-up. The extraction of lipopeptides by pertraction in a rotating discs contactor was studied, also. The obtained results on surfactin recovery by pertraction allow to consider this technique as suitable for lipopeptides extraction from fermentation broth.

## Table des matières

<b>Avant propos</b> .....	<b>21</b>
<b>Chapitre I INTRODUCTION</b> .....	<b>24</b>
<b>1. Etude bibliographique</b> .....	<b>25</b>
1.1. <i>Bacillus subtilis</i> .....	25
1.2. Les peptides issus de la synthèse non ribosomale .....	26
1.2.1. Organisation des synthétases .....	27
1.2.2. Biosynthèse des molécules NRP .....	29
1.2.3. Particularités de structure .....	31
1.2.4. Activités biologiques des peptides non ribosomaux.....	31
1.3. Les lipopeptides <i>B. subtilis</i> .....	33
1.3.1. La surfactine .....	33
1.3.1.1. Généralités sur la surfactine .....	33
1.3.1.2. Propriétés des surfactines .....	35
1.3.1.2.1. <i>Propriétés tensioactives et moussantes</i> .....	35
1.3.1.2.2. <i>Propriétés biologiques</i> .....	35
1.3.1.2.3. <i>Activité hémolytique</i> .....	36
1.3.2. Les fengycines et les plipastatines.....	36
1.3.2.1. Fengycines ou plipastatines : structure des molécules et des opérons.....	36
1.3.2.2. Les propriétés des fengycines ou plipastatines.....	37
1.4. Domaines d'application potentielle des surfactines et des plipastatines.....	38
1.4.1. En agroalimentaire et en agronomie.....	38
1.4.2. En pétrochimie .....	39
1.4.3. En cosmétique et pharmaceutique.....	39
1.4.4. En environnement.....	39
1.5. La production des lipopeptides de <i>B. subtilis</i> .....	39
1.5.1. Milieux de culture utilisés .....	39

1.5.2.	Conditions de culture utilisées.....	41
1.5.3.	Production des lipopeptides en bioréacteur et ses contraintes.....	42
1.6.	Les bioréacteurs à biofilm.....	44
1.6.1.	Généralités.....	44
1.6.2.	Le bioréacteur à disques tournants .....	44
1.6.2.1.	Distribution du temps de séjour (DTS).....	46
1.6.2.2.	Utilisation pour le traitement des eaux usées .....	46
1.6.2.3.	Utilisation en production .....	47
1.7.	Biofilm bactérien .....	47
1.7.1.	Etapas de sa formation.....	47
1.7.1.1.	Phase de latence.....	48
1.7.1.2.	Phase de croissance .....	49
1.7.1.3.	Phase d'équilibre .....	49
1.7.1.4.	Détachement.....	49
1.7.2.	Diffusion des substrats .....	50
1.8.	Transfert de l'oxygène .....	51
1.8.1.	Absorption physique.....	52
1.8.1.1.	Schéma théorique du transfert d'oxygène du gaz au microorganisme .....	53
1.8.1.2.	Solubilité des gaz en phase liquide.....	55
1.8.1.3.	Flux de matière.....	55
1.8.1.4.	La conductance de transfert.....	56
1.8.1.5.	Modèles locaux de transfert.....	57
1.8.2.	Le coefficient volumétrique de transfert .....	58
1.8.2.1.	Théorie.....	58
1.8.2.2.	Détermination de $K_La$ .....	59
1.8.2.2.1.	<i>Méthodes "dynamiques"</i> .....	60
1.8.2.2.2.	<i>Mise en oeuvre de la réoxygénation</i> .....	60
1.8.3.	Modification du milieu .....	62
1.8.4.	$K_La$ et dimensionnement.....	63
1.9.	Récupération des lipopeptides .....	64
1.9.1.	Précipitation acide .....	64

1.9.2.	Ultrafiltration.....	64
1.9.3.	Récupération de la mousse .....	65
1.9.4.	Adsorption .....	65
1.9.5.	Extraction liquide-liquide.....	65
1.9.6.	Système tri-phasique : la pertraction .....	66
1.9.6.1.	Principe de la pertraction.....	66
1.9.6.2.	Applications de la pertraction.....	67
1.9.6.3.	Types de membranes liquides.....	68
<b>2.</b>	<b>Situation et objectif du travail.....</b>	<b>73</b>
 <b>Chapitre II MATERIELS et METHODES .....</b>		<b>75</b>
<b>1.</b>	<b>Souche bactérienne et milieux de culture.....</b>	<b>76</b>
1.1.	Souche.....	76
1.2.	Milieux de culture .....	76
1.2.1.	Le milieu de Landy.....	76
1.2.2.	Le milieu LB .....	77
1.3.	Conservation de la souche et préparation d'un inoculum .....	77
1.3.1.	Conservation de la souche .....	77
1.3.2.	Préparation d'un inoculum .....	77
<b>2.</b>	<b>Production par des cultures planctoniques ou immobilisées de <i>Bacillus subtilis</i> ..</b>	<b>78</b>
2.1.	Culture de cellules planctoniques .....	78
2.2.	Culture par immobilisation .....	78
2.3.	Culture en bioréacteur à disques .....	79
2.3.1.	Présentation du bioréacteur à disques.....	80
2.3.1.1.	Dimensionnements et configurations .....	80
2.3.1.2.	Distribution du temps de séjour (DTS).....	82
2.3.1.3.	Mesure du $K_{La}$ .....	83
2.3.2.	Conditions expérimentales de production .....	84
2.3.3.	Les configurations des bioréacteurs .....	84

2.3.3.1.	Aération du bioréacteur à disques .....	85
2.3.3.2.	Variation du nombre de disques .....	85
2.3.3.3.	Variation du nombre d'agitateurs .....	85
2.3.3.4.	Variation de la vitesse rotationnelle .....	86
2.3.4.	Arrêt de culture et nettoyage du bioréacteur à disques.....	86
<b>3.</b>	<b>Analyses.....</b>	<b>87</b>
3.1.	Mesure de la biomasse .....	87
3.1.1.	Biomasse libre .....	87
3.1.2.	Biomasse immobilisée sur billes .....	87
3.1.3.	Caractérisation de la biomasse immobilisée sur les disques .....	88
3.2.	Préparation des échantillons et quantification des lipopeptides .....	88
3.2.1.	Préparation des échantillons .....	88
3.2.2.	Dosage des lipopeptides par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP).....	89
3.3.	Dosage du glucose, acide glutamique et des acides organiques par CLHP.....	90
<b>4.</b>	<b>Extraction.....</b>	<b>91</b>
4.1.	Extraction liquide-liquide .....	91
4.2.	Pertraction .....	92
4.2.1.	Présentation du contacteur à disques tournants .....	93
4.2.2.	Conditions expérimentales .....	94
<b>Chapitre III RESULTATS et DISCUSSION .....</b>		<b>96</b>
<b>1.</b>	<b>Production des lipopeptides de <i>Bacillus subtilis</i> en fioles d'Erlenmeyer.....</b>	<b>97</b>
1.1.	Introduction.....	97
1.2.	Culture en fioles Erlenmeyer .....	98
1.2.1.	Croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 libre en fioles d'Erlenmeyer ou immobilisé sur billes de PPch.....	98
1.2.2.	Production des lipopeptides.....	100

1.3.	Discussion .....	103
1.4.	Valorisation des résultats .....	105
1.4.1.	Publication.....	106
1.4.2.	Communications affichées .....	106
1.4.3.	Présentations orales .....	106
<b>2.</b>	<b>Production des lipopeptides de <i>Bacillus subtilis</i> en bioréacteur à disques.....</b>	<b>107</b>
2.1.	Introduction.....	107
2.2.	Etude du coefficient de transfert d'oxygène $K_{La}$ et de la distribution du temps de séjour (DTS).....	108
2.2.1.	Etude de la distribution du temps de séjour (DTS) .....	108
2.2.2.	Etude du coefficient de transfert d'oxygène $K_{La}$ .....	109
2.3.	Analyse de l'effet du débit d'air .....	110
2.3.1.	Introduction .....	110
2.3.2.	Croissance de la souche.....	111
2.3.3.	Production de lipopeptides .....	114
2.4.	Analyse de l'effet du nombre de disques .....	121
2.4.1.	Introduction .....	121
2.4.2.	Croissance de la souche.....	121
2.4.3.	Production de lipopeptides .....	124
2.5.	Analyse de l'effet des agitateurs .....	129
2.5.1.	Introduction .....	129
2.5.2.	Croissance de la souche.....	129
2.5.3.	Production de lipopeptides .....	132
2.6.	Analyse de l'effet de la vitesse rotationnelle .....	137
2.6.1.	Introduction .....	137
2.6.2.	Croissance de la souche.....	137
2.6.3.	Production de lipopeptides .....	140

2.7.	Interprétation des résultats de production .....	145
2.8.	Etude du biofilm .....	146
2.9.	Discussion .....	152
2.10.	Valorisation des résultats .....	155
2.10.1.	Publication.....	155
2.10.2.	Communication affichée .....	156
2.10.3.	Présentations orales .....	156
<b>3.</b>	<b>Purification des lipopeptides de <i>Bacillus subtilis</i> par extraction liquide-liquide.</b>	<b>157</b>
3.1.	Introduction.....	157
3.2.	Préparation des échantillons .....	157
3.3.	Etude d'équilibre d'extraction liquide-liquide.....	158
3.4.	Pertraction .....	160
3.5.	Discussion .....	161
3.6.	Valorisation des résultats .....	163
3.6.1.	Publication.....	163
3.6.2.	Communication affichée .....	164
3.6.3.	Présentations orales .....	164
	<b>Chapitre IV CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>165</b>
	<b>Liste des références .....</b>	<b>169</b>
	<b>Annexe .....</b>	<b>189</b>

## Liste des Figures

Figure 1: <i>B. subtilis</i> observée en microscope optique .....	25
Figure 2: Organisation du complexe multienzymatique produisant la surfactine.....	27
Figure 3: Domaine d'adénylation.....	28
Figure 4: Domaine de thiolation.....	28
Figure 5: Domaine de condensation.....	28
Figure 6: Domaine de la thioestérase .....	29
Figure 7: Structure primaire de la surfactine S1 .....	34
Figure 8: Structure primaire de la Fengycine.....	37
Figure 9: Rotating biological contactor.....	45
Figure 10: Evolution de la concentration d'un substrat S au voisinage et à l'intérieur d'un biofilm.....	51
Figure 11: Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire en régime stationnaire .....	53
Figure 12: Système triphasique de la pertraction .....	67
Figure 13: Membrane liquide émulsionnée.....	69
Figure 14: Membranes supportées. ....	70
Figure 15: Exemple d'une membrane volumique .....	70
Figure 16: Photographie du bioréacteur à disques rotatifs.....	80
Figure 17: Schéma d'une pale perforée.....	80
Figure 18: Schéma du bioréacteur à disques .....	81
Figure 19: Schéma du bioréacteur à disques rotatifs avec agitateurs.....	82

Figure 20 : Représentation schématique du bioréacteur à disques rotatifs utilisé pour déterminer la distribution du temps de séjour .....	83
Figure 21: Représentation schématique d'extraction liquide-liquide .....	92
Figure 22: Représentation schématique du pertracteur. ....	94
Figure 23: Photographie du contacteur à disques tournants.....	95
Figure 24: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch .....	99
Figure 25: Chromatogramme CLHP de la surfactine et quantification par la méthode du standard externe.....	100
Figure 26: Comparaison de la production de surfactine par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	101
Figure 27: Chromatogramme CLHP de la fengycine et quantification par la méthode du standard externe.....	102
Figure 28: Comparaison de la production de fengycine par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332.....	103
Figure 29 : Suivi de l'évolution de la conductivité dans le bioréacteur .....	109
Figure 30 : Evolution du $K_{La}$ en fonction de la vitesse rotationnelle pour trois configurations .....	109
Figure 31: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et sans agitateurs .....	111
Figure 32: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs .....	113
Figure 33 : Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et sans agitateurs.....	115
Figure 34 : Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et sans agitateurs.....	116

Figure 35 : Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs .....	118
Figure 36 : Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs .....	119
Figure 37 : Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs .....	122
Figure 38: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans agitateurs .....	123
Figure 39: Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs .....	125
Figure 40: Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs pendant 72 heures. ....	125
Figure 41: Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans agitateurs après 72 heures.....	127
Figure 42: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques pendant 72 heures. ....	130
Figure 43: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans disques pendant 72 heures.....	131
Figure 44: Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques pendant 72 heures.....	133
Figure 45: Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques pendant 72 heures.....	133

Figure 46: Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans disques pendant 72 heures. ....	135
Figure 47: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs pendant 72 heures. ....	138
Figure 48: Analyse de la croissance de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs sans disques pendant 72 heures. ....	139
Figure 49: Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C	141
Figure 50: Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C	143
Figure 51 : Photographie des disques colonisés par <i>B. subtilis</i> ATCC 21332. ....	147
Figure 52 : Observation par microscope à épi-fluorescence de la formation du biofilm de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 formé sur les disques du bioréacteur. ....	148
Figure 53 : Observation par microscope à épi-fluorescence de la formation du biofilm de <i>B. subtilis</i> ATCC 21332 formé sur les disques du bioréacteur après 72 heures de culture. ....	149
Figure 54: Evolution de la production des lipopeptides en fonction du $K_{La}$ .....	151
Figure 55 : Les quantités des biofilms obtenues dans les différentes configurations ainsi que les quantités produites de lipopeptides (surfactine et fengycine).....	152
Figure 56 : Effet du méthanol sur l'élution de la surfactine lors de l'étape de lavage de la technique de purification de la surfactine sur les cartouches C18 .....	158
Figure 57: Effet du pH sur le degré d'extraction des lipopeptides par les solvants organiques .....	159
Figure 58 : Evolution de la concentration de la surfactine dans la phase d'alimentation (F), la membrane liquide (M) et la phase de réception (R) pendant une pertraction .....	161

## Liste des Tableaux

Tableau 1 : Séquences peptidiques des homologues de surfactine de <i>B. subtilis</i> . .....	34
Tableau 2: Description des résistances au transfert d'oxygène en culture microbienne.....	54
Tableau 3 : Comparaison entre les trois types de membranes liquides.....	71
Tableau 4 : Production cellulaire et consommation du glucose.....	112
Tableau 5 : Production cellulaire et consommation du glucose.....	114
Tableau 6: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	117
Tableau 7 : Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	120
Tableau 8: Production cellulaire et consommation du glucose.....	123
Tableau 9: Production cellulaire et consommation du glucose.....	124
Tableau 10: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	126
Tableau 11: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	128
Tableau 12: Production cellulaire et consommation du glucose.....	131
Tableau 13: Production cellulaire et consommation du glucose.....	132
Tableau 14: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	134
Tableau 15: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	136
Tableau 16: Production cellulaire et consommation du glucose.....	139
Tableau 17: Production cellulaire et consommation du glucose.....	140
Tableau 18: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	142
Tableau 19: Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations.....	144
Tableau 20 : Production, productivité et $K_{La}$ pour quelques configurations .....	150

## Liste des abréviations

### Microorganismes :

<i>B. subtilis</i> :	<i>Bacillus subtilis</i>
<i>B. thuringiensis</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<i>B. anthracis</i>	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>B. licheniformis</i>	<i>Bacillus licheniformis</i>

### Divers

Ala :	Alanine
ARN :	Acide ribonucléique
ARNm :	Acide ribonucléique messenger
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
Asp :	Aspartate
CMC :	Concentration Micellaire Critique
D :	Dextrogyre
Gln :	Glutamine
Glu :	Acide glutamique
Ile :	Isoleucine
ISR :	Résistance Systémique Induite
$K_{La}$ :	Coefficient volumétrique de transfert d'oxygène
L :	Lévogyre
Leu :	Leucine

MOPS :	Acide 3-[N-morpholino]-propane sulfonique
M.S. :	Matière sèche
NRP :	Non Ribosomal Peptide
NRPS :	Non Ribosomal Peptide Synthetase
PB :	Polybutène
PES :	polyéthane sulphone
PKS :	Polyketide synthase
PP :	Polypropylène
PPch :	Polypropylène avec de la poudre de charbon actif
PSpch :	polystyrène polyméthyle méthacrylate avec de la poudre de charbon actif
TFA :	Acide Trifluoroacétique
Thr :	Thréonine
Val :	Valine
VIH :	Virus de l'Immunodéficience Humaine

### Méthodes

CLHP :	Chromatographie liquide à haute performance
DTS :	Distribution du Temps de Séjour

## Liste des symboles :

<b><math>E_a</math></b>	Energie d'activation de $K_{La}$	$J \text{ mol}^{-1}$
<b><math>Y_{X/P}</math></b>	Taux de formation du produit par rapport à la biomasse formée	$\text{mg g}^{-1}$
<b><math>Y_{X/S}</math></b>	Rendements de conversion du substrat en biomasse	$\text{g g}^{-1}$
<b><math>Y_{P/S}</math></b>	Rendement de conversion du substrat en produit	$\text{mg g}^{-1}$
<b><math>F</math></b>	Phase d'alimentation	-
<b><math>M</math></b>	Membrane liquide	-
<b><math>R</math></b>	Phase réceptrice	-
<b><math>\text{min}^{-1}</math></b>	Tour par minute	-
<b><math>J_{O_2}</math></b>	Flux d'espèce diffusante	$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
<b><math>D_{O_2}</math></b>	Coefficient de diffusion	$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$
<b><math>C_{O_2}</math></b>	Concentration en espèce	$\text{mol L}^{-1}$
<b><math>Sc</math></b>	Nombre de Schmidt	-
<b><math>R_g</math></b>	Résistance globale	$\text{s m}^{-1}$
<b><math>x_A^*</math></b>	Concentration du gaz A dissous	$\text{g L}^{-1}$
<b><math>He</math></b>	Constante de Henry	$\text{m}^3 \text{ Pa mol}^{-1}$
<b><math>p_A</math></b>	Pression partielle	Pa
<b><math>F_d</math></b>	Densité de flux de diffusion	$\text{mol s}^{-1}$
<b><math>D_A</math></b>	Coefficient de diffusion de l'espèce A dans la phase d'intérêt	$\text{m}^2 \text{ s}^{-1}$
<b><math>N_{A0}</math></b>	Densité de flux molaire à l'interface	$\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
<b><math>k_L</math></b>	Conductance de transfert du composé A en phase liquide	$\text{m s}^{-1}$
<b><math>x_{A0}</math></b>	Concentration à l'interface	$\text{mol L}^{-1}$

$x_A$	Concentration au cœur de la phase liquide	$\text{mol L}^{-1}$
$k_G$	Conductance de transfert en phase gazeuse	$\text{m s}^{-1}$
$p_A$	Pression partielle au sein de la phase gazeuse	Bar
$p_{A0}$	Pression partielle à l'interface	Bar
$(K_L a)_{loc}$	Conductance globale de transfert	$\text{s}^{-1}$
$W_A$	Flux transféré	$\text{mol s}^{-1}$
$V$	Volume	$\text{m}^{-3}$
$a_{loc}$	Aire interfaciale incluse dans l'élément de volume $dV$	$\text{m}^2 \text{m}^{-3}$
$K_L a'$	Valeur instantanée de $K_L a$ pendant la période transitoire	$\text{s}^{-1}$
$C_L$	Concentration de l'oxygène résiduel à un temps donné dans le fermenteur	$\text{g L}^{-1}$
$C_L^*$	Concentration de l'oxygène résiduel dans le fermenteur	$\text{g L}^{-1}$
$C_L^0$	Concentration de l'oxygène résiduel initiale dans le fermenteur	$\text{g L}^{-1}$
$K_d$	Coefficient de partage	
$C_{org}^*$	Teneur du soluté dans la phase organique lorsque l'équilibre est atteint	$\text{g L}^{-1}$
$C_{aq}^*$	Teneur du soluté dans la phase aqueuse lorsque l'équilibre est atteint	$\text{g L}^{-1}$
Lettres grecques :		
$\Delta$	Epaisseur du film liquide	m
$\nu$	Viscosité cinématique	$\text{m}^2 \text{s}^{-1}$
$\omega$	Vitesse angulaire (rotationnelle)	$\text{s}^{-1}$
$\tau_G$	Temps de séjour des bulles	s

## Avant propos

La première génération très ancienne de tensioactifs correspond au savon. Par la suite, grâce aux différentes transformations du pétrole, les tensioactifs de 2<sup>ème</sup> génération ont été obtenus. Actuellement, du fait des conséquences de leur fabrication ainsi que de leur utilisation sur l'environnement, des tensioactifs de 3<sup>ème</sup> génération issus aussi du pétrole ont apparus. Dans un but purement environnemental et axé sur le développement durable, plusieurs recherches ont porté sur la production de surfactants issus d'origine biologique. Depuis, ils existent plusieurs tensioactifs synthétisés par voie biologique par des bactéries. La surfactine, comme son nom l'indique est connue pour son activité surfactante très puissante. *Bacillus subtilis* produit cette molécule lipopeptidique avec d'autres lipopeptides. Mis à part leur caractère tensioactif, ces molécules possèdent aussi un large panel d'activités biologiques recherchées. Cependant, la production à grande échelle reste un obstacle pour sa commercialisation du fait des faibles taux de production des souches sauvages ainsi qu'à leur forte activité moussante qui limite et perturbe les procédés aérés ainsi que leur production. Pour associer des capacités de production importantes et la réduction des coûts de production, l'enjeu des bioindustries consiste aujourd'hui en l'intensification des performances des bioprocédés en termes de productivité, sélectivité, titres et rendements. Il est par ailleurs parfaitement établi que l'obtention de hautes performances résulte des interactions entre les processus biologiques et les transferts multiphasiques (matière et chaleur) au sein du bioréacteur. Chacun de ces phénomènes, caractérisés par une constante de temps propre, contribue à la dynamique du système du bioréacteur. Les interactions doivent être identifiées et quantifiées afin de maîtriser les facteurs limitants et réduire leurs impacts sur les performances des bioprocédés.

Le présent travail se base sur ces interactions (entre les processus biologiques et les transferts multiphasiques) pour réaliser un procédé de production de surfactine et de fengycine par une souche sauvage : *Bacillus subtilis* ATCC 21332 en bioréacteur. En effet, un procédé innovant de production de lipopeptides dans un bioréacteur à biofilm sur des disques rotatifs a été développé. Un procédé original d'extraction de ces molécules reposant sur l'utilisation de membranes liquides a été aussi étudié.

Le procédé de production en réacteur à disques permet la production des lipopeptides de *Bacillus subtilis* sans formation de mousse en appliquant une aération sans bulles et sans avoir recourt à une optimisation génétique de la souche sauvage. Le transfert d'oxygène, facteur limitant primordial sur le métabolisme microbien, a fait l'objet de travaux dans de nombreuses équipes de recherche. Cependant, les données de la littérature sur le transfert de gaz sont obtenues en culture microbienne planctonique et dans des situations qui ne visent pas un objectif d'optimisation de la productivité et sélectivité. Les biotechnologies modernes, au contraire, recherchent les hautes performances avec des concentrations cellulaires élevées par l'immobilisation des cellules sur des supports solides, des taux de croissance élevés, des cinétiques maîtrisées et des modes de conduite optimisés. C'est dans ce cadre que s'inscrit le présent travail.

Les problèmes fondamentaux auxquels nos travaux ont l'ambition de contribuer sont les suivants :

- Quelles sont les influences de l'activité de cellules planctoniques et immobilisées sur la productivité et sélectivité du procédé et sur le transfert, dans des conditions de production extrapolables industriellement?
- Comment maîtriser le transfert d'oxygène en conditions de forte productivité dans un bioréacteur sans bulles, à aération par interfaces?
- Quelle géométrie adapter pour maintenir une production intensive et durable ?
- Peux-on extraire les lipopeptides à partir de leur milieu de production en utilisant la pertraction (membranes liquides)?

Ces quatre questions structurent ce document et cette activité de recherche. Le présent travail a donc pour objectif de contribuer à la maîtrise et l'intensification des performances de procédés biotechnologiques par la connaissance des relations entre les dynamiques relatives aux microorganismes et le transfert d'oxygène, au sein d'un bioréacteur. Ceci passe par l'acquisition de données expérimentales fiables, reproductibles, et d'outils d'investigation adaptés afin de caractériser qualitativement et quantitativement les processus biologiques et physiques en condition de production intensive.

Ces travaux poursuivent les efforts menés dans le laboratoire ProBioGEM pour maîtriser les processus biologiques et physiques afin d'obtenir de hautes performances en culture cellulaire sans modifications génomiques.

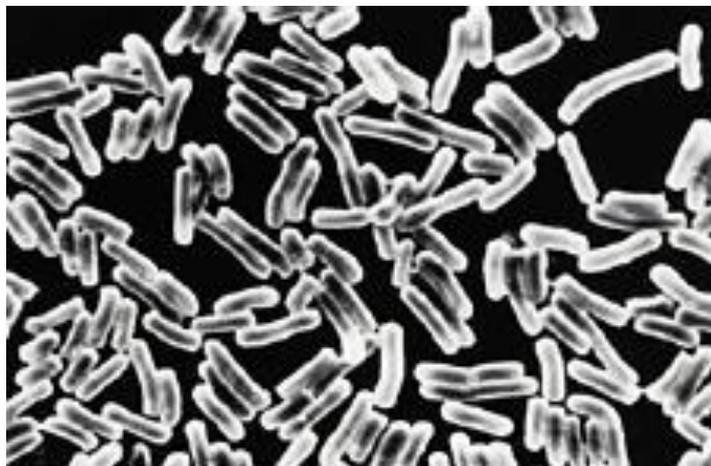
Ce document est organisé en trois chapitres. L'étude bibliographique rassemble l'état des connaissances sur la souche utilisée, les procédés de production et séparation, le transfert gaz-liquide en culture cellulaire, en insistant sur l'interprétation des phénomènes (les modèles décrivant les influences de l'environnement sur le coefficient de transfert d'oxygène,  $K_{La}$ , sont analysés; les méthodes permettant la détermination de  $K_{La}$  sont détaillées). Ce premier chapitre a pour objectif d'apporter les connaissances nécessaires sur les molécules synthétisées, sur leurs mécanismes de régulation, ainsi que sur les techniques de leur production et de séparation. L'ensemble du matériel et des méthodes est précisé dans le chapitre éponyme. Le troisième chapitre est consacré au développement du bioréacteur à disques, aux études de transfert d'oxygène et de production de fengycine et de surfactine dans ce nouvel appareil, ainsi qu'à l'extraction des lipopeptides par pertraction. Enfin, dans la partie Conclusion et Perspectives, une synthèse des résultats originaux obtenus dans ce travail est présentée et de nouvelles voies d'investigations sont proposées.

**Chapitre I**  
**INTRODUCTION**

## 1. Etude bibliographique

### 1.1. *Bacillus subtilis*

*Bacillus subtilis* appartient à l'embranchement des firmicutes, à la famille des *Bacillaceae* et au genre *Bacillus*. Comme son embranchement l'indique, c'est une bactérie à Gram positif. Les cellules sont de morphologie bacilliforme, le plus souvent de forme rectiligne à bouts carrés ou arrondis. Les tailles sont variables de 2 à 10  $\mu\text{m}$  en longueur et de 0,5 à 2  $\mu\text{m}$  en largeur. *B. subtilis* est mobile grâce à une ciliature péritriche (flagelles implantés sur toute la surface de la bactérie). *B. subtilis* est une bactérie catalase positive, aérobie ou aéro-anaérobie. La bactérie peut se développer dans une plage de température entre 10°C et 50°C. En conditions défavorables, la cellule végétative donne naissance à une spore, résistante dans le milieu extérieur. Les formes végétatives et les spores font de *B. subtilis* une bactérie ubiquitaire que l'on peut isoler de l'eau de mer, de l'eau douce ou des aliments. Cette bactérie n'est pas considérée comme pathogène pour l'homme mais peut exceptionnellement contaminer les aliments et causer une intoxication alimentaire. D'autres espèces de *Bacillus* notamment *B. anthracis* et *B. cereus* sont des espèces pathogènes.



*Figure 1: B. subtilis observée en microscope optique*  
(échelle 1 cm / 2  $\mu\text{m}$ )

*B. subtilis* est l'un des microorganismes les plus étudiés comme *E.coli* et les levures. « *B. subtilis* est sans conteste considéré comme la bactérie modèle des bactéries à Gram+ mais aussi comme l'un des organismes les plus étudiés » (Sonenshein *et al.*, 2002).

Son étude approfondie comme modèle des bactéries Gram+ a permis d'établir les voies de métabolisme et de régulation cellulaires. Le séquençage total du génome de la souche *B. subtilis* 168 a été réalisé par Kunst et ses collaborateurs en 1997 et révisé par Zeigler et ses collaborateurs en 2008 (Kunst *et al.*, 1997 ; Zeigler *et al.*, 2008). Ceci a permis de mettre en place de nouvelles approches expérimentales dites globales comme par exemple la transcriptomique (l'étude des ARN messagers) et l'analyse des 4200 gènes contenus dans son génome.

*B. subtilis* atteint de très hautes densités cellulaires et sécrète un grand nombre de molécules. Cette capacité a été mise à profit par l'industrie notamment pour la production d'enzymes telles que les protéases et les cellulases dans les industries des détergents, les amylases pour l'industrie du pain.

*B. subtilis* a été aussi utilisé au Japon pour la préparation d'un plat traditionnel à base de soja fermenté (Natto). Sa capacité à produire une large variété de molécules à activité biologique, en fait une bactérie d'intérêt pour l'industrie pharmaceutique.

*B. subtilis* synthétise des antibiotiques peptidiques comme la surfactine, l'iturine, Bacitracine.

Les souches de *B. subtilis* sont capables de produire des molécules peptidiques par une autre voie que la synthèse ribosomique classique. Cette voie est nommée synthèse peptidique non ribosomale.

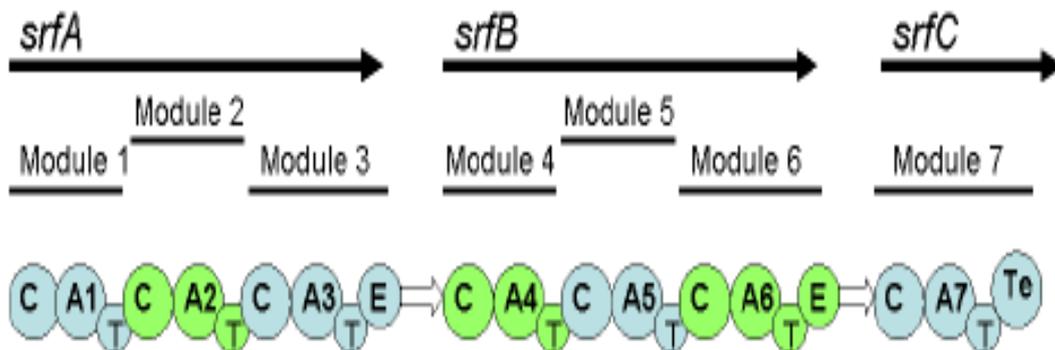
## **1.2. Les peptides issus de la synthèse non ribosomale**

La synthèse protéique la plus connue se fait par la voie classique ribosomale (transcription des gènes en ARN messagers qui sont eux-mêmes traduits en protéines). Cependant, chez les bactéries et les champignons, il existe une synthèse peptidique indépendante des ribosomes. Cette synthèse est effectuée par des complexes enzymatiques connus sous le nom de synthétases ou NRPS (Non Ribosomal Peptide Synthétase). Les molécules issues de cette voie présentent une grande diversité de structure et d'activités biologiques.

### 1.2.1. Organisation des synthétases

Les synthétases sont les enzymes responsables de la synthèse peptidique non ribosomale. Ces enzymes sont remarquables par leur masse puisqu'elles peuvent atteindre  $5.10^6$  Da, soit une masse deux fois plus importante que celle des ribosomes. Ces protéines sont de grands complexes modulaires qui représentent à la fois la matrice, rôle comparable à celui de l'ARN messenger (ARNm) dans la voie classique, mais aussi la machinerie biosynthétique, fonction effectuée par les ARN de transfert (ARNt) et les ribosomes au sein de la synthèse protéique classique. Pour la production d'un seul peptide, plusieurs synthétases peuvent être nécessaires. Pour la surfactine par exemple, 3 synthétases codées par *srfA*, *B* et *C* sont responsables de la synthèse de la molécule. Les gènes codant les synthétases impliquées dans la synthèse d'un même peptide sont généralement organisés en opéron chez les bactéries et en cluster chez les eucaryotes.

Les synthétases sont organisées en modules (Figure 2). Chaque module est responsable de l'incorporation d'un acide aminé spécifique ou d'un monomère dans la chaîne peptidique en formation. Les molécules utilisées dans cette voie ne sont pas uniquement les vingt acides aminés protéogéniques. En effet, plusieurs centaines de monomères différents peuvent être incorporés au sein des peptides.



**Figure 2:** Organisation du complexe multienzymatique produisant la surfactine.

Les gènes *srfA*, *srfB* et *srfC* codent pour sept modules permettant la production d'un peptide composé de sept acides aminés.

Chaque module de la synthétase est subdivisé en domaines. Chaque domaine présente une fonction particulière dans l'incorporation du monomère. Il existe quatre types de domaines principaux :

- **Le domaine d'adénylation (A)** : il permet la reconnaissance d'un acide aminé spécifique et son activation grâce à une réaction d'adénylation (l'acide aminé est transformé en aminoacyl adénylate).

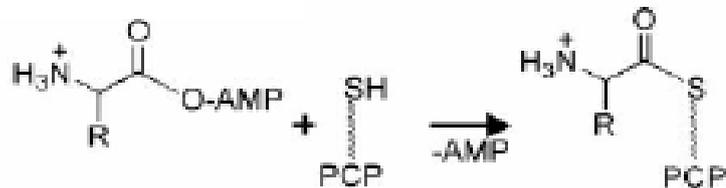
**Domaine A**



*Figure 3: Domaine d'adénylation*

- **Le domaine de thiolation (T ou PCP pour Peptidyl Carrier Protein)** : il fixe l'acide aminé sur la synthétase de manière covalente par l'intermédiaire d'une liaison thioester.

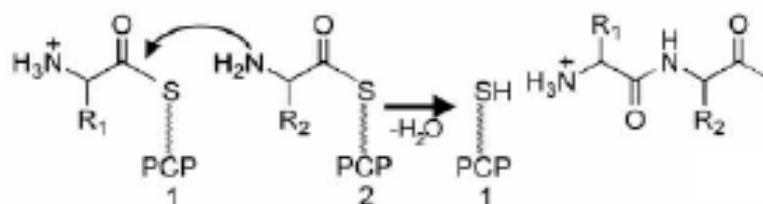
**Domaine PCP**



*Figure 4: Domaine de thiolation*

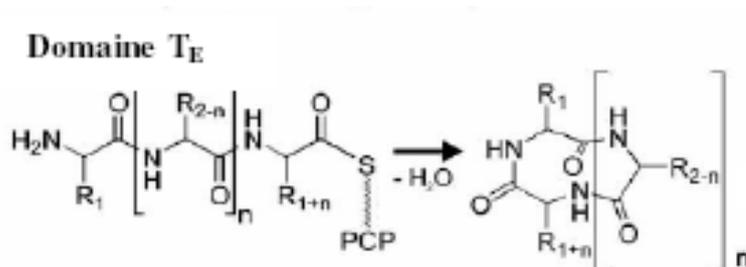
- **Le domaine de condensation (C)** : il permet la formation de la liaison peptidique entre deux monomères.

**Domaine C**



*Figure 5: Domaine de condensation*

- **Le domaine de la thioestérase (Te)** : il permet de libérer le peptide néoformé par la rupture de la liaison thioester qui le lie au domaine T.



*Figure 6: Domaine de la thioestérase*

Il existe également des domaines secondaires facultatifs qui permettent d'effectuer des modifications au niveau des acides aminés comme l'épimérisation (transformation d'un monomère de la série L en isomère de la série D), la méthylation (ajout d'un groupement méthyle) ou encore la formylation (ajout d'un groupement formyle).

### 1.2.2. Biosynthèse des molécules NRP

Il existe trois grands types de biosynthèse. Le premier est la biosynthèse linéaire. Dans ce type de biosynthèse, il y a colinéarité entre la synthétase et le peptide produit. Cela signifie que l'enchaînement des modules de la synthétase correspond à celui des monomères incorporés dans le produit. Ce type de biosynthèse correspond au cas le plus fréquent.

Le second type de synthèse est la biosynthèse itérative. Dans ce cas, certains modules de la synthétase sont utilisés plus d'une fois lors de la synthèse d'un même peptide.

Enfin, le dernier type est la biosynthèse non linéaire. Dans ce type de biosynthèse, l'agencement des modules de la synthétase est différent de celui des monomères du peptide.

On peut également retrouver au sein du peptide des monomères qui ont une origine autre que celle de la peptide synthétase. En effet, il peut y avoir, incorporation de parties synthétisées par des polykétides synthases PKS). Ce cas est celui des mycosubtilines par exemple. Les polykétides sont des métabolites secondaires synthétisés par les bactéries, les

champignons, les plantes et les animaux. Ils sont dérivés de la polymérisation de sous-unités propionyles et acétyles dans un procédé similaire à la synthèse d'acides gras. On obtient alors un peptide mixte NRPS/PKS (Guez, 2007).

Ces différentes biosynthèses permettent d'obtenir une grande diversité structurale. En effet, contrairement aux peptides issus de la voie ribosomale qui possèdent tous une structure primaire linéaire, les peptides non ribosomaux peuvent présenter des caractéristiques structurales particulières.

La synthèse linéaire permet dans certains cas de produire des peptides totalement ou partiellement cycliques. Dans ce cas, il se forme une liaison entre deux monomères de la chaîne peptidique pour former le cycle, et l'agencement des monomères reste identique à celui des modules de la synthétase. Les deux autres types de biosynthèse, la biosynthèse itérative et la biosynthèse non linéaire, permettent également d'obtenir de nombreuses structures, linéaires, des cycliques ou branchée. Dans ce dernier cas, les peptides sont composés d'une chaîne peptidique principale qui porte des ramifications. Cette structure est, dans une certaine mesure, comparable à celle des sucres. De plus, dans le cas des peptides partiellement cycliques, plusieurs cycles peuvent se former, ce qui augmente encore la diversité structurale de ces peptides.

Les modules d'adénylation sont plus ou moins spécifiques d'un monomère. Ainsi, au cours de la biosynthèse, différents variants d'une même molécule peuvent être obtenus. On obtient par exemple les surfactines S1 et [Gln1] qui diffèrent entre elles par la présence de glutamate pour la surfactine S1 et la présence de glutamine pour la deuxième.

En effet, selon les conditions environnementales dans lesquelles évolue la souche, une forme préférentielle sera produite. Il a été montré que différentes molécules d'iturines peuvent être obtenues en fonction du milieu nutritif notamment de l'acide aminé précurseur (Guez, 2007). Une autre étude portant sur la diversité des gènes codant la microcystine au sein d'une population de cyanobactéries, a montré que la diversité des variants de la microcystine résulte de l'activation d'acides aminés variés durant la biosynthèse. Dans ce cas, les domaines d'adénylation de la synthétase peuvent activer non pas un seul acide aminé spécifique, mais un ensemble d'acides aminés possibles. Ainsi, selon les acides aminés disponibles dans le milieu, l'acide aminé incorporé sera différent et un type de variant sera obtenu (Guez, 2007).

Les molécules variantes peuvent également être le produit de synthèse de variants génétiques. En effet, une séquence nucléique différente au niveau du gène de la synthétase va conduire à la production d'un peptide différent. Par exemple, la séquence de la synthétase produisant la bacillomycine D est différente de celle produisant la bacillomycine L (Coutte, 2009).

### **1.2.3. Particularités de structure**

La première particularité des peptides non ribosomaux est leur petite taille. En effet, ce type de peptides contient entre deux et cinquante de monomères. Cependant, malgré leur taille réduite, les peptides synthétisés par cette voie originale présentent de nombreuses particularités et une grande diversité.

En effet, chaque module de la synthétase est responsable de l'incorporation d'un monomère spécifique et il peut exister au sein des modules, des domaines secondaires capables de modifier le monomère incorporé. Ainsi, il existe au sein de certaines synthétases des domaines secondaires d'épimérisation qui permettent l'incorporation d'acides aminés sous la forme D, alors que les acides aminés protéogéniques sont uniquement du type L. De plus, d'autres domaines secondaires permettent la méthylation, l'hydroxylation ou encore la formylation des acides aminés incorporés.

Une autre particularité des NRP est l'incorporation de parties provenant d'autres voies de biosynthèse. Comme nous l'avons vu précédemment, il existe des peptides mixtes NRPS/PKS. Une partie lipidique peut également être greffée à la partie peptidique dans le cas des lipopeptides. La partie lipidique est apportée et greffée par les PKS. Des sucres ou encore des acides carboxyliques peuvent être ajoutés lors de la synthèse du peptide.

Enfin, il existe, en plus de la diversité des monomères incorporés, une diversité au niveau de la structure de ces peptides, grâce aux différents types de biosynthèses. Ces particularités permettent d'obtenir des molécules complexes ayant des activités biologiques intéressantes pour les domaines de la pharmacologie et de l'agro-alimentaire.

### **1.2.4. Activités biologiques des peptides non ribosomaux**

Les peptides non ribosomaux représentent une famille très diverse de produits naturels présentant un très large éventail d'activités biologiques et de propriétés pharmacologiques. En effet, certains peptides synthétisés par cette voie sont des antibiotiques qui sont permettant de

détruire ou de ralentir la croissance des bactéries. La pénicilline, célèbre antibiotique découvert par Alexander Fleming en 1928, et la céphalosporine sont synthétisées à partir d'un précurseur commun, le tripeptide-ACV, lui même synthétisé par une synthétase. D'autres peptides font partie de la classe des anti-viraux, ou encore de la classe des anti-fongiques, substances permettant de détruire les champignons comme la kurstakin produite par *B. thuringiensis* et qui agit contre *Stachybotrys charatum* (Hathout *et al.*, 2000 ; Price *et al.* 2007).

Certains peptides non ribosomaux sont appelés des sidérophores. Ce sont des composés permettant la chélation du fer. Les sidérophores permettent aux microorganismes de capter, dans le milieu extérieur, le fer nécessaire à leur survie. Parmi les sidérophores, on peut citer l'entérobactine de *Escherichia coli* ou encore la yersiniabactine de *Yersinia pestis*. Certains sidérophores sont produits par *Bacillus subtilis* comme la bacillibactine produite par *Bacillus subtilis* 168 (Hussein, 2011).

D'autres peptides ont une activité immuno-modulatrice. L'exemple le plus connu est celui de la cyclosporine qui est utilisée après une greffe pour réduire les risques de rejet. Certains peptides sont des toxines comme les microcystines ou des cytostatiques, substances permettant de bloquer la synthèse, le fonctionnement ou la prolifération cellulaire, comme l'épothilone ou la bléomycine.

Parmi ces peptides NRP, on retrouve également des surfactants, substances améliorant la miscibilité entre des phases hydrophiles et hydrophobes et largement utilisés en cosmétique ou en agroalimentaire. Ces diverses activités biologiques et propriétés physico-chimiques confèrent une grande importance aux peptides non ribosomaux.

Les études bioinformatiques permettent de rechercher *in silico* dans les génomes des souches séquencées des molécules potentiellement synthétisées par ces souches. De cette façon, une étude menée dans le laboratoire sur 39 souches de *Bacillus* ou genres nouveaux nous a permis de mettre en évidence, des gènes reconnus comme des gènes NRPS et codant pour des molécules de structure nouvelle (Hussein, 2011).

### 1.3. Les lipopeptides *B. subtilis*

Les lipopeptides des *B. subtilis* sont synthétisés par voie non ribosomique. Les iturines, les surfactines et fengycines ou plipastatines représentent les trois principales familles de lipopeptides produits par cette espèce (Bonmatin *et al.*, 2003). La structure générale des lipopeptides est un cycle peptidique de 7 -acides  $\alpha$ -aminés sous forme L et D (iturines, surfactines) ou de huit -acides  $\alpha$ -aminés L et D (fengycines).

Dans le cas des surfactines, le cycle heptapeptidique est directement lié en  $\beta$  à une longue chaîne hydrocarbonée par une liaison ester ou une liaison amide pour les iturines. Le cycle octapeptidique de la fengycine est formé à partir d'un décapeptide par liaison ester interne entre la fonction hydroxyl de l'acide  $\alpha$ -aminé C-terminal, la D-Tyr, et la fonction carboxyle de la D-alloThr. Le décapeptide est lié à son extrémité N-terminale par liaison amide à une chaîne hydrocarbonée  $\beta$ -hydroxylée (Vanittanakom *et al.*, 1986).

#### 1.3.1. La surfactine

##### 1.3.1.1. Généralités sur la surfactine

La surfactine est l'un des biosurfactants les plus efficaces avec une capacité de réduire la tension de surface de l'eau de 72 à 27.  $10^{-3}\text{N m}^{-1}$  (Grangemard *et al.*, 2001 ; Kell *et al.*, 2007).

Les surfactines sont des heptapeptides cycliques reliés par une liaison ester à une chaîne d'acides gras  $\beta$ -hydroxylée dont la longueur varie de 13 à 16 carbones. La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-Leu-D-Leu-Val-Asp-D-Leu-Leu donnant la configuration suivante : LLDLLDL (Figure 7).

Les acides aminés L-Glu et L-Asp renforcent le caractère amphiphile responsable des propriétés tensioactives. Cette molécule est généralement produite par *B. subtilis* en fin de la phase exponentielle de croissance.

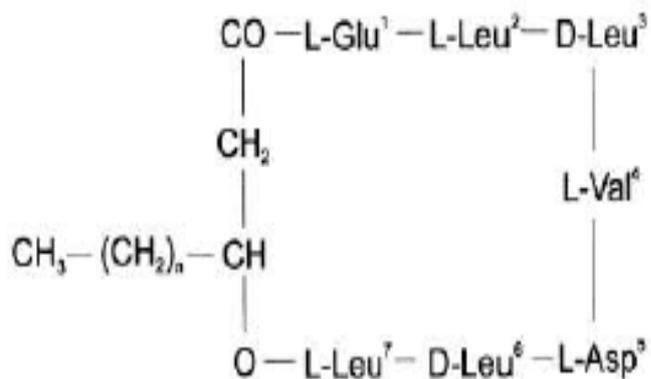


Figure 7: Structure primaire de la surfactine S1

Une grande variété des constituants de la partie heptapeptidique existe dans cette famille (Tableau 1).

Tableau 1 : Séquences peptidiques des homologues de surfactine de *B. subtilis*.  
Les acides aminés de substitution sont en gras

Noms	Acides aminés et position (série D ou L)							Références
	L1	L2	D3	L4	L5	D6	L7	
S(1)	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Arima <i>et al.</i> , 1968
[Gln1]S	<b>Gln</b>	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	Leu	Trischman <i>et al.</i> , 1994
[Ala4]S	Glu	Leu	Leu	<b>Ala</b>	Asp	Leu	Leu	Peypoux <i>et al.</i> , 1994
[Leu4]S	Glu	Leu	Leu	<b>Leu</b>	Asp	Leu	Leu	Bonmatin <i>et al.</i> , 1994
[Ile4]S	Glu	Leu	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	Leu	Bonmatin <i>et al.</i> , 1994
[Val7]S	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	Peypoux <i>et al.</i> , 1991
[Ile7]S	Glu	Leu	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	Baumgart <i>et al.</i> , 1991
[Ile 4,7]S	Glu	Leu	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	<b>Ile</b>	Grangemard <i>et al.</i> , 1997
[Ile2, 4,7]S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	<b>Ile</b>	Asp	Leu	<b>Ile</b>	Grangemard <i>et al.</i> , 1997
[Ile 2][Val,7]S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	Bonmatin <i>et al.</i> , 1994
[Val 2][Ile,7]S	Glu	<b>Val</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	Bonmatin <i>et al.</i> , 1994
[Val2,7]S	Glu	<b>Val</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Val</b>	Bonmatin <i>et al.</i> , 1994
[Ile2,7]S	Glu	<b>Ile</b>	Leu	Val	Asp	Leu	<b>Ile</b>	Bonmatin <i>et al.</i> , 1994

### 1.3.1.2. Propriétés des surfactines

Les lipopeptides appartenant à la famille des surfactines présentent les propriétés caractéristiques des composés amphiphiles. Les activités biologiques, physico-chimiques, de surface et interfaciales sont étroitement liées à l'organisation de ces molécules en micelles dès que la concentration est supérieure à la CMC (Osman *et al.*, 1998).

#### 1.3.1.2.1. Propriétés tensioactives et moussantes

La surfactine est classée parmi l'un des plus puissants biosurfactants connu (Peypoux *et al.*, 1999).

En solution aqueuse, les lipopeptides s'agrègent spontanément pour former des micelles dans lesquelles la partie polaire est exposée à l'eau (Ishigami *et al.*, 1995 ; Deleu *et al.*, 1999a ; Deleu *et al.*, 1999b ; Shen *et al.*, 2009). La surfactine est reconnue comme étant un biosurfactant très efficace avec une capacité de réduire la tension de surface de l'eau. de 72 à 27.  $10^{-3} \text{N m}^{-1}$  (Grangemard *et al.*, 2001 ; Kell *et al.*, 2007). La CMC (Concentration Micellaire Critique) de la surfactine est de l'ordre de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Les propriétés tensioactives varient selon la température et le pH de la solution. La présence de sels, tel que le NaCl, dans la phase aqueuse diminue la CMC (Thimon *et al.*, 1992).

Des études menées par Razfindralambo et ses collaborateurs en 1996 sur la capacité des lipopeptides à former des mousses, montrent qu'à longueur de chaîne lipidique égale, la surfactine est capable de former de la mousse plus dense que celle formée par l'iturine A mais moins stable dans le temps (Razfindralambo *et al.*, 1996).

Les surfactines ont des propriétés comparables au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), mais elles ont l'avantage sur ce composé synthétique, d'être non toxiques, d'avoir une faible CMC et d'être biodégradables (Peypoux *et al.*, 1999 ; Deleu *et al.*, 1999a)

#### 1.3.1.2.2. Propriétés biologiques

Les surfactines possèdent des propriétés antibactériennes dont antimycoplasmiques, antivirales contre le VIH (Itokawa *et al.*, 1994), antitumorales, hypocholestérolémiantes et elles induisent le mécanisme de résistance des plantes contre les phytopathogènes par la

résistance systémique induite (ISR) (Vollenbroich *et al.*, 1997a ; Vollenbroich *et al.*, 1997b ; Peypoux *et al.*, 1999 ; Ongena *et al.*, 2007). Elles peuvent aussi être utilisées en bioremédiation pour la dépollution des sols (Kosaric, 2005 ; Mulligan *et al.*, 2005). Les surfactines peuvent aussi dégrader certains hydrocarbures (Kosaric, 2005).

Cependant, ces molécules ne possèdent pas d'activité antifongique propre, mais ont des effets synergiques avec l'iturine A et la fengycine (Maget-Dana *et al.*, 1992 ; Leclere *et al.*, 2006 ; Ongena *et al.*, 2007 ; Ongena et Jaques 2008).

#### 1.3.1.2.3. *Activité hémolytique*

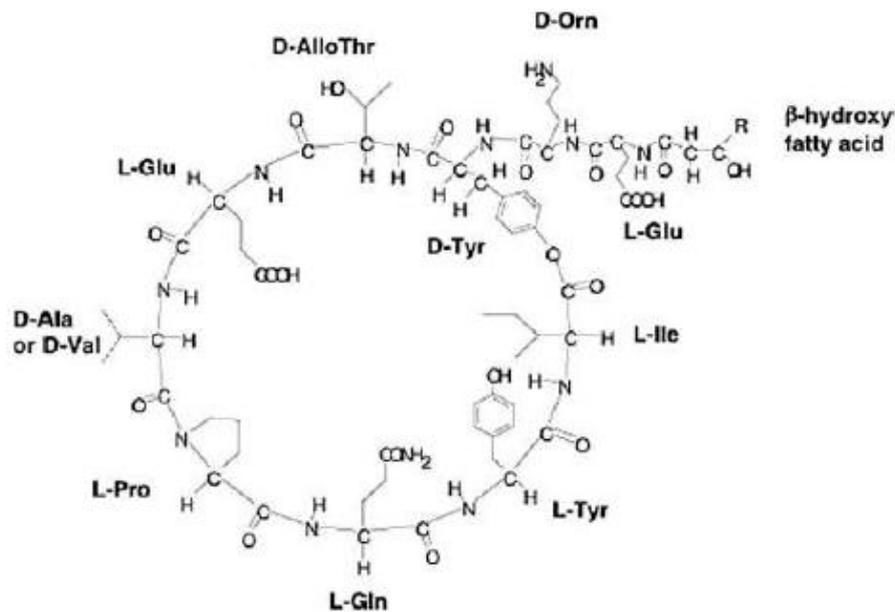
Les propriétés amphiphiles des surfactines leur permettent d'interagir avec les membranes biologiques et de les déstructurer (Maget-Dana et Ptak 1995 ; Carrillo *et al.*, 2003 ; Kell *et al.*, 2007). Cela leur confère leurs propriétés antibactériennes et leur activité hémolytique. Cette dernière activité peut être mise en évidence lorsque les cellules produisant des surfactines forment une zone de lyse en milieu solide contenant des érythrocytes (Nakano *et al.*, 1988).

### 1.3.2. Les fengycines et les plipastatines

#### 1.3.2.1. Fengycines ou plipastatines : structure des molécules et des opérons

Les plipastatines et les fengycines sont des lipopeptides composés d'un décapeptide. Les fengycines ont été isolées de *Bacillus subtilis* F-29-3 par Vanittanakom *et al.* (1986) comme des agents antifongiques et les plipastatines ont été identifiées par Nishikiori *et al.* (1986) chez *Bacillus cereus* BMG302-fF67. Ces molécules diffèrent entre elles par la position de la D-tyr qui se trouve en position 3 dans les molécules appelées fengycines et en position 9 dans les molécules nommées plipastatines. La connaissance actuelle des génomes des différentes souches productrices est partielle. Les résultats obtenus récemment au laboratoire suggèrent que les souches *B. subtilis* ATCC 21332 et BBG 21 produiraient de la fengycine (Hussein, 2011).

Le cycle octapeptidique de la fengycine est formé à partir d'un décapeptide par liaison ester interne entre la fonction hydroxyle de l'acide  $\alpha$ -aminé C-terminal, la D-Tyr (3<sup>ème</sup> acide aminé), et la fonction carboxyle de la L-Ile (10<sup>ème</sup> acide aminé) (Deleu *et al.*, 1999a). Le premier acide aminé (L-Glu) est lié au groupement hydroxyle d'un acide gras  $\beta$ -hydroxylé (Tsuge *et al.*, 1999) possédant entre 14 et 18 atomes de carbone (Siegmond Lang, 2002). La chaîne peptidique est composée de la séquence d'acides aminés suivante : Glu-D-Orn-D-Tyr-D-AThr-Glu-D-Ala-Pro-Gln-Tyr-Ile (Figure 8).



**Figure 8:** Structure primaire de la Fengycine  
(Deleu *et al.*, 2008)

#### 1.3.2.2. Les propriétés des fengycines ou plipastatines

Les fengycines ont une activité antifongique contre les champignons filamenteux. Elles présentent des propriétés hémolytiques 40 fois moins importantes que celles des surfactines (Vanittanakom *et al.*, 1986 ; Hbid 1996 ; Deleu *et al.*, 2005). Ces molécules agissent en synergie avec les surfactines dans des activités de lutte contre les phytopatogènes (Souto *et al.*, 2004 ; Ongena *et al.*, 2005 ; Ongena *et al.*, 2007 ; Ongena et Jaques 2008). Les fengycines ont une CMC plus faible que celle des surfactines de l'ordre de 6,25 mg L<sup>-1</sup>.

## **1.4. Domaines d'application potentielle des surfactines et des plipastatines**

Grâce à leurs effets aux interfaces et à la diversité des structures qu'ils peuvent prendre, les tensioactifs présentent différentes propriétés techno-fonctionnelles leur permettant d'être utilisés pour des applications dans de nombreux domaines. Le marché des agents de surface, excluant les protéines largement utilisées dans le secteur alimentaire, approche les 10 millions de tonnes dans le monde avec un taux de croissance annuel estimé à 3,6%. La croissance est attendue majoritairement dans les pays de la zone Asie-Pacifique et dans des pays en voie de développement économique. En Europe, 40% des tensioactifs sont destinés à des applications industrielles allant du nettoyage à la formulation des produits agro-chimiques et des applications qui utilisent les tensioactifs comme auxiliaires pour différents procédés de fabrication (la polymérisation d'émulsion pour les peintures, les auxiliaires pour les procédés textiles et les fibres, les additifs pour lubrifiants...). Presque tous les tensioactifs utilisés de nos jours sont des dérivés chimiques du pétrole. Cependant, un grand intérêt est porté sur les tensioactifs d'origine biologique (microbienne) produits par *B. subtilis*, notamment la surfactine et la fengycine, connues pour leur faibles CMC, leur biodégradabilité et leur non toxicité. Ces molécules en font des molécules de choix pour les industries agroalimentaires, pétrochimiques, cosmétiques et des applications environnementales et agronomiques (Paquot, présentation personnelle).

### **1.4.1. En agroalimentaire et en agronomie**

En agroalimentaire, ces molécules sont retrouvées dans des produits naturels comme le Soumbala et le Bikalga fermentés (Savadogo *et al.*, 2011). Un large champ d'applications existe en agronomie, notamment pour les fengycines et les plipastatines grâce à leurs propriétés antifongiques. On peut envisager d'utiliser ces molécules dans les récoltes et les semis pour une meilleure protection contre d'éventuels phytopatogènes. Des études ont montré que les fengycines sont responsables de l'antagonisme *in vitro* plusieurs souches de *B. subtilis* vis-à-vis de champignons phytopatogènes (Souto *et al.*, 2004). De même les fengycines et les surfactines sont capables d'induire la résistance systémique chez quelques végétaux notamment la tomate et l'haricot (Ongena *et al.*, 2005 ; Ongena *et al.*, 2007 ; Ongena et Jacques, 2008 ; Davel, 2011).

### **1.4.2. En pétrochimie**

Les surfactants sont très utilisés dans les industries pétrochimiques, notamment dans l'industrie pétrolière, pour extraire le pétrole adsorbé sur la roche en diminuant la viscosité du produit ce qui permet de faciliter son transport. On peut également utiliser directement des microorganismes qui coloniseront cet environnement et secrèteront les biosurfactants nécessaires. L'industrie pétrolière utilise les biosurfactants pour réparer les accidents qu'elle provoque en mer et sur terre (Banat, 2000).

### **1.4.3. En cosmétique et pharmaceutique**

Les surfactines et les fengycines possèdent respectivement des propriétés antibactériennes et antifongiques. Grâce à leurs propriétés antifongiques elles peuvent être utilisées dans la composition des produits cosmétiques pour en améliorer la conservation (Vollenbroich *et al.* , 1997a ; Vollenbroich *et al.* , 1997b ; Deleu *et al.*, 1999a ; Deleu *et al.*, 1999b ; Deleu *et al.*, 2005).

### **1.4.4. En environnement**

Les biosurfactants comme les surfactines présentent plusieurs avantages par rapport aux surfactants synthétiques et chimiques, tels que leur faibles CMC, leur biodégradabilité. Ces molécules sont étudiées pour des applications de bioremédiation des sols et la dispersion des déversements de pétrole (Bertrand *et al.*, 1994 ; Kosaric, 2005 ; Mulligan *et al.*, 2005). Leurs propriétés tensioactives permettent de favoriser le décrochage des polluants industriels fixés sur des matrices solides.

## **1.5. La production des lipopeptides de *B. subtilis***

### **1.5.1. Milieux de culture utilisés**

En raison de leur grand intérêt industriel, plusieurs milieux de culture de *B. subtilis* ont été mis au point pour la production des lipopeptides. En règle générale, ces milieux de culture contiennent une source de carbone apportée par un sucre (le glucose généralement mais aussi

le saccharose), une source d'azote organique ou minérale apportée par un acide aminé (l'acide glutamique), le sulfate d'ammonium ou l'extrait de levure, une source de sels organiques et de sels minéraux.

Les milieux couramment utilisés dérivent des ceux décrits par Cooper (Cooper *et al.*, 1981) et par Landy (Guez *et al.*, 2008). Certains chercheurs ont fait des optimisations des ces milieux (Jacques *et al.*, 1999). Plusieurs études ont montré l'effet des facteurs environnementaux sur la production de la surfactine. En effet, Duitman et ses collaborateurs en 1999 ont montré que la souche *B. subtilis* ATCC 6633 produit de la surfactine que lorsqu'elle est cultivée sur du milieu Landy. Cependant, la mycosubtiline a été produite en milieu DSM. Des études au laboratoire ont montré que cet effet est lié à la souche.

Le glucose est la source de carbone la plus utilisée par *B. subtilis*. Pour *B. subtilis* C9, l'addition de glucose conduit à un taux plus élevé de production spécifique (biosurfactant/cellule) que l'utilisation du saccharose. La concentration de la production de biosurfactant augmente presque linéairement avec l'augmentation de la concentration initiale du sucre (Hee-Sik *et al.*, 1997).

Les deux principaux milieux de culture mentionnés dans la littérature pour la production surfactine sont le milieu Cooper et le milieu Landy (Cooper *et al.*, 1981; Landy *et al.*, 1948). Jacques et son équipe en 1999 ont montré que la fengycine a été synthétisée par *B. subtilis* S499 dans un milieu optimisé (contenant du saccharose comme source de carbone).

Les sources d'azote minéral ou organique peuvent favoriser la synthèse des lipopeptides de *B. subtilis*. En effet, la surfactine peut être produite en milieu Cooper contenant de l'azote minéral ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) ou en milieu Landy contenant de l'acide glutamique. Dans ce milieu, le remplacement de l'acide glutamique par la leucine ou l'isoleucine favorise la synthèse de nouvelles iso formes de mycosubtiline (Guez, 2007).

Des études ont montré l'effet stimulateur du fer et du manganèse (Wei *et al.*, 2004). Les  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{FeSO}_4$  et  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$  ont permis de favoriser la production de la surfactine (Davis *et al.*, 1999 ; Yeh *et al.*, 2005). De faibles quantités de  $\text{MnSO}_4$  ont permis d'augmenter la production de surfactine (Wei *et al.*, 2007).

Les sels tels que  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{ZrOCl}_2$ ,  $\text{UO}_2(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$  ou  $\text{VOSO}_4$  n'ont pratiquement aucun effet sur la biomasse ou les rendements en surfactine (Cooper *et al.*, 1981). Cependant, la présence de sel ( $\text{NaCl}$  5%) a été nécessaire pour la production de lichenysin par *B. licheniformis* (Yakimov *et al.*, 1995)

### 1.5.2. Conditions de culture utilisées

Les paramètres environnementaux sont déterminants pour la synthèse de lipopeptides. Les trois paramètres les plus importants sont la température de croissance et de production, l'oxygénation et le pH du milieu.

Concernant la température, il a été démontré que pour la production de la surfactine et la fengycine une température de 30°C est souvent utilisée (Chollet-Imbert *et al.*, 2008 ; Gancel *et al.*, 2009 ; Coutte *et al.*, 2010). Des températures plus élevées (37°C) favorisent la synthèse de la surfactine par *B. subtilis* RB14 (Ohno *et al.*, 1995). La diminution de la température à 25°C a permis d'augmenter 30 fois la production de mycosubtiline avec les souches ATCC 6633 et sont dérivé BBG 100 (Fickers *et al.*, 2008).

Des études ont montré que le pH du milieu affecte la synthèse de la surfactine pour plusieurs souches de *B. subtilis* (Cosby *et al.*, 1998). La synthèse de la mycosubtiline par *B. subtilis* ATCC 6633 est régulée par le pH du milieu ainsi que par le type du tampon utilisé. Lorsque le milieu est tamponné entre 6 et 6,5 par du MES, la souche produit de faible quantité de lipopeptides. Cependant, lorsque le MOPS est utilisé à pH 6,5, la même souche produit 3 fois plus de mycosubtiline que dans des milieux non tamponnés (Guez, 2007). Cependant pour la production de surfactine ou de fengycine, le pH est souvent ajusté à 7 (Chollet-Imbert *et al.*, 2008 ; Gancel *et al.*, 2009 ; Coutte *et al.*, 2010).

De nombreux paramètres peuvent aussi influencer les cultures bactériennes tels que l'apport en oxygène et l'élimination du dioxyde de carbone, le degré de stress, l'homogénéité du mélange et les paramètres hydrodynamiques sont liés à la dissipation d'énergie (Shioya *et al.*, 1999). De même, il a été constaté que l'apport suffisant d'oxygène dissous ainsi que l'agitation mécanique dans les bioréacteurs jouent un rôle très important dans la production des lipopeptides (Davis *et al.*, 1999 ; Jacques *et al.*, 1999 ; Yeh *et al.*, 2006 ; Guez *et al.*, 2008 ; Coutte *et al.*, 2010).

Cependant, l'apport d'oxygène par l'aération est l'origine d'un problème crucial dans la production des lipopeptides : la formation abondante de mousse gênante.

### 1.5.3. Production des lipopeptides en bioréacteur et ses contraintes

La production des lipopeptides à grande échelle reste très coûteuse et de nombreux efforts ont été faits pour minimiser les coûts. La production des lipopeptides de *B. subtilis* en bioréacteur a d'abord été décrite par Cooper *et al.*, en 1981.

Plusieurs stratégies ont été établies pour faire face au problème économique, notamment en augmentant les rendements de production ou de biomasse par l'optimisation des milieux de culture (Cooper *et al.*, 1981 ; Jacques *et al.*, 1999 ; Wei *et al.*, 2004 ; Yeh *et al.*, 2006) ou bien en modifiant la souche par génie génétique pour augmenter les productions obtenues chez les souches productrices sauvages (Leclère *et al.*, 2005). De nombreuses études ont été consacrées à la conception et l'optimisation du bioréacteur ou du procédé de production (Davis *et al.*, 1999 ; Davis *et al.*, 2001 ; Yeh *et al.*, 2006 ; Guez *et al.*, 2007 ; Liu *et al.*, 2007 ; Coutte *et al.*, 2010, Fahim, 2011)

Hormis le faible rendement de production des souches sauvages, la formation de mousse reste le plus grand obstacle à la production des lipopeptides car elle rend quasi impossible la réalisation du procédé et la récupération des lipopeptides. Ce problème est la résultante de la nature des molécules tensioactives, de l'aération et de l'agitation mécanique du milieu de culture. La formation de mousse incontrôlable induit une perte du volume réactionnel et une difficulté de récupération des molécules d'intérêt.

Lee et Kim (2008) et Davis *et al.*, (1999) ont proposé l'apport d'oxygène par culture en présence de peroxyde d'hydrogène ou la respiration en anaérobiose en présence de nitrate. Cependant, ces techniques ne limitent pas totalement la formation de mousse gênante et limitent la croissance bactérienne.

D'autres auteurs ont élaboré des procédés intégrés pour contrôler cette mousse. Le premier procédé consiste à collecter la mousse et à la refroidir pour la casser et diminuer le volume de collecte (Cooper *et al.*, 1981 ; Davis *et al.*, 2001 ; Guez *et al.*, 2007). L'extraction donc des lipopeptides se fait directement par la mousse collectée. Dans l'étude réalisée par Davis en 2001 sur l'effet de l'agitation sur la production de surfactine par *B. subtilis* ATCC 21332, une production de 104 mg a été atteinte avec un rendement de conversion du glucose en surfactine ( $Y_{P/S}$ ) de 2,6 mg g<sup>-1</sup> et des taux d'extraction de 85 à 100%, cependant une perte incontrôlée du volume réactionnel a été engendrée par le fort moussage (Davis *et al.*, 2001).

Une autre étude de procédé moussant avec recyclage des cellules a été publiée par Yeh et ses collaborateurs en 2006. Ces auteurs ont évalué l'impact du  $K_La$  sur la production de la surfactine, montrant qu'une agitation de  $300 \text{ min}^{-1}$  et une aération de 1,5 vvm étaient des conditions optimales pour atteindre un rendement de conversion du glucose en surfactine  $Y_{P/S} = 161 \text{ mg g}^{-1}$ .

Malgré les taux élevés de récupération des lipopeptides dans la mousse, le procédé reste difficilement extrapolable à l'échelle industrielle.

De ce fait, la suppression de la mousse a été envisagée par ajout d'agents antimousse chimique, au cours des cycles de fermentation. Les agents chimiques affectent cependant la physiologie des bactéries et la pureté des molécules d'intérêts (Lee et Kim, 2008). Il est nécessaire de trouver des procédés permettant d'augmenter la production de lipopeptides en évitant la formation de cette mousse.

Coutte et ses collaborateurs en 2010 ont intégré une membrane en fibres creuses à un bioréacteur pour produire de la surfactine et de la fengycine en condition non moussante. L'apport de l'oxygène nécessaire se fait par les pores de la membrane et supprime le barbotage. Plusieurs configurations ont fait l'objet de ces études pour atteindre des concentrations en surfactines qui varient de 180 à  $240 \text{ mg L}^{-1}$  avec des rendements de conversion du glucose en surfactine  $Y_{P/S}$  de 11,7 à  $12,8 \text{ mg g}^{-1}$ . Pour la fengycine les concentrations varient de 47 à  $393 \text{ mg L}^{-1}$  et des  $Y_{P/S}$  de 2,5 à  $24,4 \text{ mg g}^{-1}$  (Coutte *et al.*, 2010).

Malgré les efforts apportés pour la conception de ces bioréacteurs à membranes, ce procédé semble peu exploitable à l'échelle industrielle du fait du coût des membranes et de leur encrassement qui nécessite de longs cycles de nettoyage.

Gancel et ses collaborateurs ont mis au point un autre procédé de production non moussant grâce au biofilm formé sur des billes en suspension dans le milieu de culture en Erlenmeyer (Gancel *et al.*, 2009).

Ainsi la production des lipopeptides par des cellules organisées en biofilm serait une solution proposée pour répondre aux problèmes déjà cités.

## **1.6. Les bioréacteurs à biofilm**

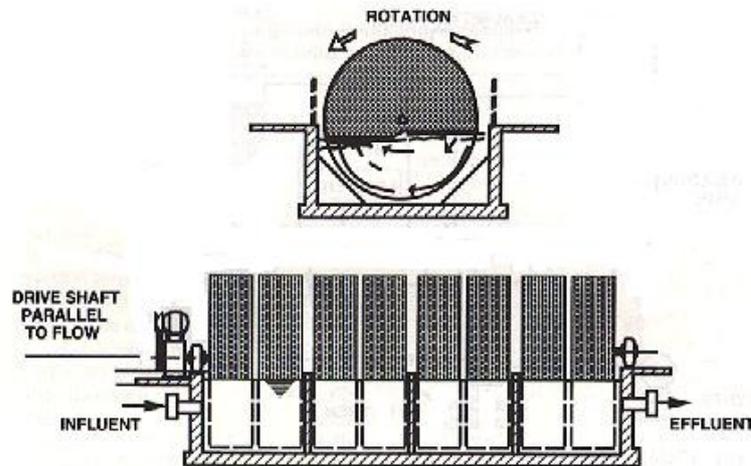
### **1.6.1. Généralités**

Les bioréacteurs à cellules fixées se répartissent en deux groupes : les biofilms statiques c'est-à-dire que le support est immobile tels que les lits fixes noyés ou les lits bactériens et les biofilms dynamiques en circulation comme les lits fluidisés ou les bioréacteurs à disques. Généralement, les cellules sont fixées sur une surface inerte. Le premier réacteur biologique à lit bactérien a été développé à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle en Grande-Bretagne (Dysfonctionnements biologiques des stations d'épuration: origines et solutions, Ministère de l'Agriculture et de la Pêche, FNDAE n° 33). Le traitement des eaux usées est le domaine qui utilise le plus de réacteur à biofilm.

En 2009, Gancel et ses collaborateurs ont réussi à obtenir un procédé de production de lipopeptides non moussant (Gancel *et al.*, 2009). Cette production a été réalisée grâce à des biofilms de *B. subtilis* fixés sur des billes. Ce procédé s'est avéré une solution pour éviter la formation de mousse puisque l'air nécessaire à cette souche est disponible à la surface du milieu de fermentation en contact direct avec les billes qui contiennent le biofilm. La synthèse des deux lipopeptides, et essentiellement la fengycine, est fortement augmentée par l'immobilisation des cellules de *B. subtilis* sur les billes.

### **1.6.2. Le bioréacteur à disques tournants**

Les bioréacteurs à disques tournants sont généralement constitués d'une série de disques circulaires fixés sur un axe horizontal tournant. Ils sont considérés comme étant des bioréacteurs à biofilm dynamiques. Le biofilm microbien se forme sur les disques. Les disques sont à moitié immergés dans la phase liquide et en tournant, les cellules fixées consomment l'oxygène nécessaire directement dans la phase supérieure gazeuse.



**Figure 9:** Rotating biological contactor

(John and Cookson, 1995)

Il existe plusieurs paramètres mécaniques comme diamètre, nombre et surface de disques, rugosité de leur surface, vitesse de rotation et plus spécialement vitesse périphérique, section droite, etc... Parmi ces paramètres, la vitesse périphérique semble être le paramètre le plus important et responsable pour le renouvellement de la surface d'échange de disques. Le transfert d'oxygène autour d'un disque tournant est étroitement lié avec ce renouvellement. Ce transfert est lié aussi au mouvement du fluide autour du disque en régime permanent. On peut considérer que chaque volume élémentaire placé à la surface du disque vertical tournant est sous l'action de la pesanteur et de la force centrifuge. Pour des vitesses angulaires élevées, le flux d'oxygène qui traverse par diffusion le film liquide formé peut être rapproché à la théorie de Levitch (1962) développée pour le transfert de matière autour d'un disque tournant horizontal en régime stationnaire. Grace aux certaines hypothèses faites par Levitch, le flux d'espèce diffusante sur le disque ( $J_{O_2}$ ) est représenté par l'expression suivante :

$$J_{O_2} = D_{O_2} C_{O_2}^{vol} Sc^{1/3} (\omega/\nu)^{1/2} .1/K \quad (1)$$

avec  $D_{O_2}$  coefficient de diffusion de l'espèce,  $C_{O_2}$  concentration en espèce au sein du volume,  $Sc$  nombre de Schmidt,  $\omega$  vitesse angulaire de rotation,  $\nu$  viscosité cinématique et  $K$  est un coefficient.

On voit que le comportement hydrodynamique et de transfert d'oxygène du réacteur dépend de plusieurs paramètres (équation (1)), mais pour une température donnée et concentration au sein du volume constante les facteurs principaux restent la vitesse angulaire des disques ainsi que la cinétique du procédé développé. Ces facteurs sont primordiaux aussi pour l'extrapolation de ces appareils. Dans les procédés de traitement d'eau contenant une pollution organique la vitesse angulaire ne dépassent pas  $10 \text{ min}^{-1}$  (Di Palma *et al.*, 2003), tandis que pour traitement des polluants inorganiques, comme des métaux, une vitesse optimale de  $26 \text{ min}^{-1}$ , notamment pour l'oxydation de fer, est recommandée (Nikolov *et al.*, 2002).

#### 1.6.2.1. Distribution du temps de séjour (DTS)

La technique de détermination des temps de séjour (DTS) par un traceur consiste à injecter une solution de concentration donnée à l'entrée du système et on suit en fonction du temps la réponse, notamment la concentration à la sortie. Les molécules marquées du traceur ne doivent avoir évidemment aucune interaction avec les substances contenues dans le système mais doivent être assez proches de celles-ci afin d'avoir les mêmes propriétés d'écoulement. Le traceur peut être injecté de trois manières différentes : sous forme d'impulsion, sous forme d'échelon ou de façon quelconque (Leclerc *et al.*, 1995). Le traceur ne doit pas être injecté à très forte concentration pour éviter la formation de courants de convection naturelle transitoires résultant d'un écart de densité entre le traceur et le fluide.

L'étude de la DTS permet pour un réacteur donné quelconque, de définir son comportement et de déterminer les flux de matières et d'énergie. Cette étude permet également de mettre en évidence des dysfonctionnements du réacteur tels que les courts-circuits et les zones mortes. En d'autre terme les expériences réalisées sur la DTS nous permettront de voir s'il y a variation significative de la disponibilité des substrats dans le bioréacteur en fonction des configurations utilisées.

#### 1.6.2.2. Utilisation pour le traitement des eaux usées

Durant ces dernières décennies, le traitement des eaux usées domestiques et industrielles par les bioréacteurs à disques tournants est devenue une méthode très étudiée et très utilisée (Kim *et al.*, 2007). L'utilisation fréquente de ce type de bioréacteur dans le

traitement des eaux usées est due essentiellement à sa commodité, la simplicité de sa conception, son faible coût énergétique ainsi qu'à la facilité de son entretien (Nikolov *et al.*, 2002). Boumansour et Vassel en 1998 ont réussi à trouver des  $K_{La}$  de  $6 \cdot 10^{-4}$  à  $42 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  dans le bioréacteur à disques rotatifs par traceur gazeux.

#### 1.6.2.3. Utilisation en production

Mis à part leur large utilisation dans les traitements des eaux usées, les bioréacteurs à disques tournants présentent plusieurs applications. En effet, une étude sur la production d'acide lactique par des champignons filamenteux a été réalisée par l'intermédiaire de bioréacteur à disques tournants (Jianping *et al.*, 1997). Le rendement  $Y_{P/S}$  de conversion du glucose en acide lactique atteint  $0,7 \text{ g g}^{-1}$ . D'autre part, en 2007, Kim et ses collaborateurs ont réussi à produire de la cellulose par des cellules de *Gluconacetobacter* sp. RKY5 fixées sur des disques rotatifs. Les concentrations respectives en cellules et en cellulose atteintes sont de l'ordre de  $5,58 \text{ g L}^{-1}$  et de  $6,17 \text{ g L}^{-1}$ .

### 1.7. Biofilm bactérien

Le biofilm est un film biologique adhérent à une surface (racines, canalisations, tube digestif, dents). Il est constitué de cellules microbiennes, d'exopolymères, et d'eau. Les exopolymères peuvent représenter 50 à 90% du carbone organique présent dans le biofilm (Nicoletta *et al.*, 2000). Le biofilm peut donc être considéré comme un gel de polymères adhérent dans lequel se trouve des microorganismes. Il présente une structure poreuse et très adsorbante. Les récentes techniques d'analyse et d'observation ont permis de constater que le biofilm n'est pas un empilement régulier de cellules mais qu'il présente une grande hétérogénéité.

#### 1.7.1. Etapes de sa formation

La formation du biofilm est un phénomène complexe se déroulant en plusieurs étapes, notamment, le conditionnement organique de la surface, l'adhésion des cellules sur le support, une phase de croissance caractérisée par la formation de biofilm, une phase de stabilisation ou « d'équilibre » et enfin le détachement (Ghazani, 2007).

#### 1.7.1.1. Phase de latence

Les deux premières étapes constituent la phase de latence ; elle correspond au temps nécessaire pour la formation des premières cellules fixées.

Le conditionnement organique de la surface a lieu quelques minutes après l'exposition de la surface à un flux de fluide contenant des microorganismes, des molécules organiques et inorganiques. Un solide immergé dans un liquide acquiert une charge de surface, soit par ionisation de groupes de surface, soit par adsorption d'ions présents dans la phase aqueuse. Une fois chargée, cette surface attire des contre-ions correspondant à des nutriments inorganiques et organiques qui peuvent être utilisés par les bactéries. Par conséquent, la formation de cette couche électrique est indirectement une source potentielle de nutriments. Cette adsorption conditionne la surface du support pour la fixation des microorganismes (Characklis *et al.*, 1982). Cependant, la formation d'une couche importante dans la phase initiale du développement du biofilm ne produira pas un biofilm plus important. La couverture organique initiale est donc nécessaire, mais ne détermine pas la croissance du biofilm (Apilanez *et al.*, 1998).

L'adhésion se déroule en deux étapes, une première étape réversible de nature physicochimique qui suit les lois d'adsorption avec des forces attractives et répulsive, suivie d'une seconde étape irréversible de nature biologique avec la production d'exopolymères cellulaires. Au cours de la première étape, les cellules se rapprochent de la surface du support par interactions attractives gouvernées par les forces de Van Der Waals et les liaisons chimiques hydrophobes et ioniques. Elles peuvent alors s'y fixer de façon réversible. Ces forces sont liées aux propriétés physico-chimiques des cellules et de la surface du solide (Belkhadir, 1986, Alves *et al.*, 1999). La seconde étape fait intervenir la production de polysaccharides secondaires ainsi que d'autres polymères biologiques tels que les protéines. Elle est considérée comme responsable de la fixation irréversible entre les cellules et la surface. La force d'adhésion d'un biofilm suit le même phénomène que la densité et augmente avec la profondeur (Alves *et al.*, 1999). La colonisation initiale durant la phase de latence a lieu préférentiellement dans les cavités et les creux du support, à l'abri des mouvements de milieu. L'influence du type du support sur l'adhésion et la formation du biofilm a été étudiée par Gjaltema *et al.*, (1997).

#### 1.7.1.2. Phase de croissance

Une fois fixées, les cellules se développent en micro-colonies et se développent rapidement à la surface du support. La phase de croissance est rapide; elle suit une phase exponentielle avec une consommation du substrat qui augmente jusqu'à une épaisseur critique du biofilm (épaisseur active) au-delà de laquelle le taux de consommation du substrat n'évolue plus (Lazarova et Manem, 1995). Ce phénomène est attribué aux limitations de diffusion du substrat à l'intérieur de la biomasse fixée. La durée de la phase de croissance dépend de la disponibilité du substrat dans le milieu.

#### 1.7.1.3. Phase d'équilibre

Le biofilm atteint son épaisseur maximale avec une stabilisation de la biomasse fixée lorsque la production de la biomasse est compensée par le détachement (Heijnen *et al.*, 1989). Lorsque les contraintes hydrodynamiques dans le réacteur ne sont pas suffisamment importantes, le biofilm continue sa croissance en épaisseur. L'activité spécifique du biofilm tend à l'abaisser lorsque l'épaisseur du biofilm biologique dépasse une valeur critique (Buffière *et al.*, 1995).

#### 1.7.1.4. Détachement

Bien que le phénomène de détachement soit impliqué dans l'ensemble des processus de la formation du biofilm, il est généralement décrit de façon indépendante et son étude se limite souvent à celle de la phase de stabilisation du biofilm. Le détachement est le résultat de plusieurs phénomènes notamment, la mort cellulaire, la perte rapide et massive de biofilm surtout avec des biofilms épais lors de changements environnementaux brutaux comme une forte diminution de la charge ou la présence d'un toxique. La mort cellulaire dans les parties internes conduit également à une rupture de la liaison solide-biofilm. Deux autres phénomènes sont les origines du détachement comme l'érosion (la perte permanente de petites particules de la surface du biofilm, essentiellement provoquée par les forces de cisaillement) et l'abrasion qui est analogue à l'érosion, mais provoquée par les collisions de particules (Van Loodsrecht et Heijnen, 1996 ; Nicolella *et al.*, 2000).

Le taux de détachement du biofilm est une fonction complexe, qui inclut l'hydrodynamique de l'écoulement, la morphologie du biofilm et les caractéristiques du support. Les données

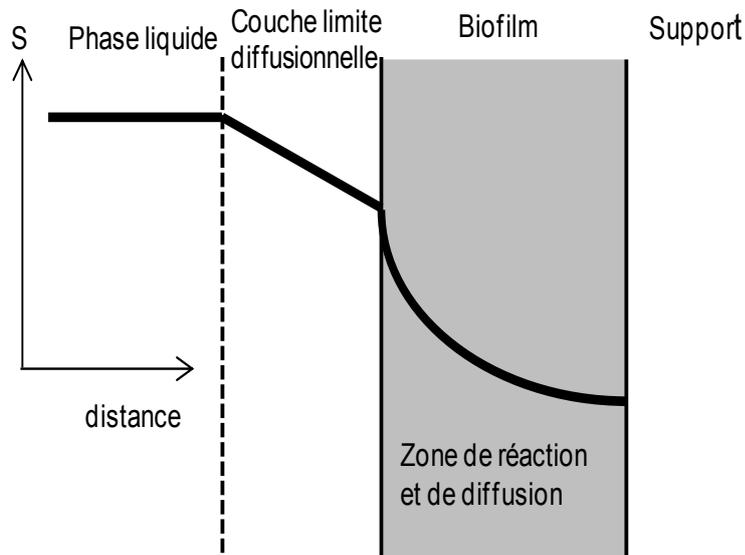
expérimentales sur le taux de détachement du biofilm dans les réacteurs à lits fluidisés signalés par Nicoletta *et al.*, (1996) ont montré que le coefficient du taux de détachement spécifique augmente fortement avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement.

La formation du biofilm dépend de la quantité en substrat (l'oxygène, le carbone) et en nutriments disponibles dans le milieu. Cette quantité disponible est régie principalement par le transport et le transfert de masse. Il est important de comprendre les processus présentés à l'intérieur du biofilm afin d'appréhender la respiration des microorganismes actifs.

Un réacteur comportant un biofilm peut être décrit comme un système à trois phases séparées : la phase solide (le biofilm), la phase liquide (le substrat) et la phase gazeuse (l'air). Dans ces phases, on décrit deux types de transport provoqués par l'alimentation en continu du substrat et de l'oxygène notamment le transport des substrats et le transfert de l'oxygène.

### **1.7.2. Diffusion des substrats**

En 2000, Eberl et ses collaborateurs proposent de décrire le biofilm par deux compartiments : la phase solide contenant toute la biomasse et la phase liquide. Dans la phase liquide, le substrat est transporté par convection et par diffusion moléculaire en raison du gradient de concentration du substrat. Dans la phase solide, il est transporté essentiellement par diffusion et consommé par réactions biochimiques. Des résistances au transfert sont localisées à l'extérieur ou à l'intérieur du biofilm, dans la zone appelée la couche limite diffusionnelle, occasionnées par les limitations diffusionnelles couplées à la réaction biologique (Figure 10).



**Figure 10:** Evolution de la concentration d'un substrat  $S$  au voisinage et à l'intérieur d'un biofilm  
(Buffière, 1995)

Lorsqu'on augmente la vitesse d'écoulement, la couche limite de concentration devient plus fine et la concentration dans le biofilm augmente en raison de l'augmentation du transfert de masse dans la phase solide (Eberl *et al.*, 2000).

Il a été observé que la morphologie et la structure du biofilm dépendent du transport du substrat. Effectivement en raison des gradients de concentration, un gradient de taux de croissance existe aussi (Nicoletta *et al.*, 2000). Les microorganismes qui possèdent le plus haut taux de croissance seront trouvés à l'extérieur du biofilm, alors que ceux dont la croissance est plus lente seront à l'intérieur.

## 1.8. Transfert de l'oxygène

L'intensification des productions microbiennes nécessite la gestion optimale des flux de matière et des écoulements afin d'éviter les limitations et maintenir le microorganisme à son potentiel optimal. Le transfert de matière le plus complexe à caractériser et à maîtriser est le transfert des gaz. L'oxygène consommé et le dioxyde de carbone produit sont les gaz majoritairement présents dans les milieux de cultures cellulaires aérobies. L'oxygène est un gaz peu soluble. En ce sens, le transfert d'oxygène apparaît fréquemment comme un facteur

limitant les performances des bioprocédés et l'utilisation des hautes densités cellulaires (en biofilm par exemple). Au sein du bioréacteur, la concentration en oxygène dissous résulte de la combinaison des dynamiques des phénomènes de transfert (matière, quantité de mouvement) et des phénomènes biologiques (consommation d'oxygène par la réaction microbienne). En condition de forte consommation d'oxygène, l'apport d'oxygène doit être parfaitement maîtrisé. Le dioxyde de carbone joue souvent un double rôle en culture cellulaire : à faible concentration, le  $\text{CO}_2$  est essentiel à la cellule, notamment dans les voies anapérotiques; à plus forte concentration, le  $\text{CO}_2$  dissous et les ions  $\text{HCO}_3^-$  perturbent l'activité des microorganismes en réduisant la croissance et en limitant l'activité métabolique centrale (Jones et Greenfield, 1982 ; McIntyre et McNeil, 1998). La ventilation (« stripping ») permet de limiter sa concentration : le flux d'air injecté dans le bioréacteur apporte l'oxygène nécessaire à la croissance et assure la ventilation (Royce et Thornhill, 1992).

Afin de rendre compte de l'état de l'art du domaine, quatre volets sont proposés en insistant sur la description et la modélisation des phénomènes :

- Dans un premier temps l'absorption purement physique est présentée pour permettre l'introduction des théories et des lois fondamentales.
- Dans un deuxième temps les influences physiques, chimiques et mécaniques portant sur le coefficient de transfert d'oxygène,  $K_{La}$ , sont développées.
- Puis les effets de la présence et de l'activité microbienne sur l'absorption sont introduits.
- Le dernier volet, plus technologique, présente les méthodes permettant la détermination de  $K_{La}$ .

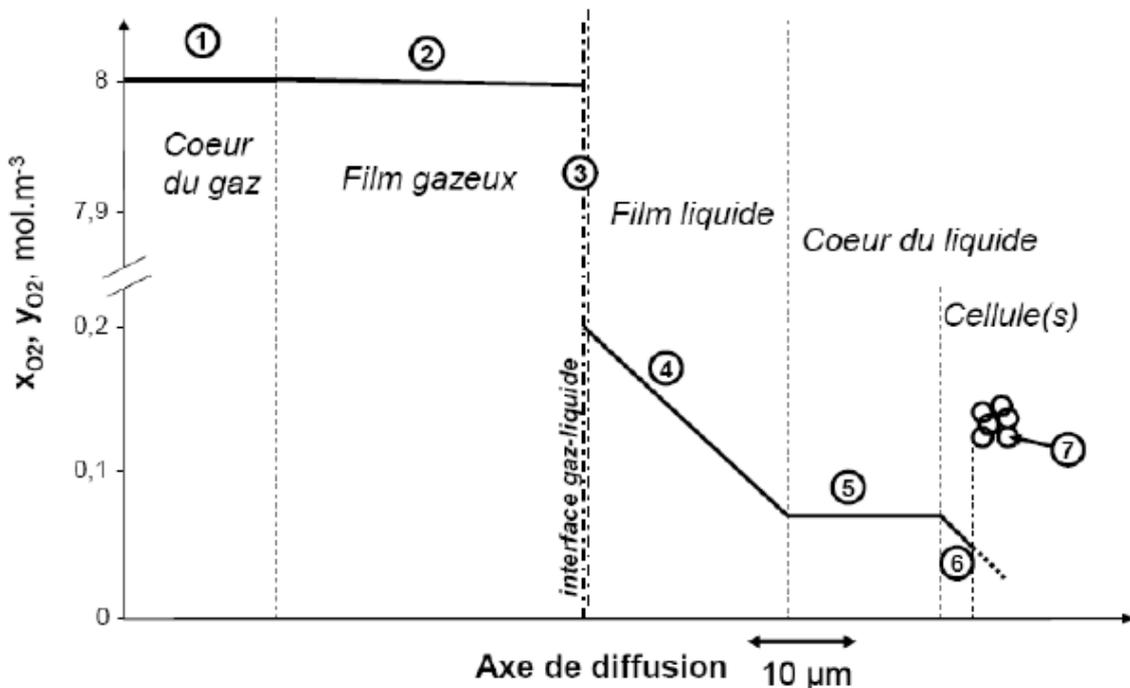
### **1.8.1. Absorption physique**

L'étude est réalisée dans le cas de liquides mécaniquement agités, c'est-à-dire mettant en jeu, à l'échelle macroscopique, des mouvements convectifs, et à l'échelle microscopique, la diffusion moléculaire.

### 1.8.1.1. Schéma théorique du transfert d'oxygène du gaz au microorganisme

En culture submergée, selon la théorie la plus répandue (Arnold et Steel, 1958), le transfert d'oxygène depuis la phase gazeuse jusqu'au microorganisme peut être décomposé en une série d'étapes, comme l'illustre la Figure 11, pour un profil de concentration d'oxygène correspondant à des conditions standard de culture cellulaire. A chaque étape correspond une résistance au transfert (Tableau 2) qui induit un gradient de concentration. Ces étapes sont supposées survenir en série, c'est-à-dire que l'oxygène ne transfère pas via des mécanismes parallèles. On peut alors calculer une résistance globale  $R_g$ , somme des résistances en série. Si une des résistances est largement plus petite que les autres alors l'étape correspondante n'est pas limitante. Pour le transfert d'oxygène on considère que la résistance dans le film liquide,  $R_{i4}$ , est limitante :

$$R_g = \sum i \approx R_{i4} \quad (2)$$



**Figure 11:** Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire en régime stationnaire (D'après Arnold et Steel, 1958). Les résistances successives au transfert (1 à 8) sont décrites dans le Tableau 2.  $x_{O_2}$ ,  $y_{O_2}$  : concentrations en oxygène en phases liquide et gazeuse, respectivement.

**Tableau 2:** Description des résistances au transfert d'oxygène en culture microbienne.  
Les numéros des résistances correspondent aux numéros sur la Figure 11.

Résistance	Localisation	Remarques
R <sub>i1</sub>	Au sein de la bulle de gaz	$\ll R_{i4}$ ; le cœur de la bulle est homogène à cause des recirculations internes dues aux mouvements dans le liquide et au mouvement brownien
R <sub>i2</sub>	Dans le film gazeux	$\ll R_{i4}$ , si le gaz est peu soluble (Bartholomew, 1950), sauf pour des bulles d'un diamètre inférieur à l'épaisseur théorique du film de diffusion
R <sub>i3</sub>	Au passage de l'interface	$=0$ , implique que la relation de Henry est applicable $\neq 0$ en présence d'agents de surface $\ll R_{i4}$ en général, si le gaz est peu soluble dans le liquide
R <sub>i4</sub>	Dans le film liquide	Résistance principale au transfert
R <sub>i5</sub>	En phase liquide	$=0$ si le réacteur est parfaitement agité $\neq 0$ si des gradients de concentration sont présents, par exemple dans un réacteur aéré par la surface, ou en présence de milieu liquide fortement visqueux
R <sub>i6</sub>	Dans le film liquide autour des cellules	$\ll R_{i4}$ car les cellules se trouvent à l'intérieur du champ turbulent
R <sub>i7</sub>	Dans l'enceinte cellulaire	L'oxygène est à la disposition de la cellule mais doit encore diffuser jusqu'au site de consommation. Il existe une résistance supplémentaire pour atteindre une cellule au centre d'une micelle, d'un biofilm, d'un floque, ou d'un agrégat.

### 1.8.1.2. Solubilité des gaz en phase liquide

A l'interface gaz-liquide, la concentration de l'espèce soluble en phase liquide est généralement décrite par une relation d'équilibre. Dans le cas de gaz peu solubles, comme l'oxygène, la relation d'équilibre est décrite par la loi de Henry:

$$x_A^* = H_e \cdot p_A \quad (3)$$

où  $x_A^*$  est la concentration du gaz A dissous, en équilibre avec sa pression partielle  $p_A$  dans le gaz en contact de l'élément de fluide. La constante de Henry,  $H_e$ , décroît en fonction de la température, et est une fonction de la composition du milieu (équation (3)) dépend donc de la température et de la pression partielle en gaz, mais aussi de la composition du milieu.

L'effet des électrolytes est le plus souvent de réduire la solubilité du gaz (« salting out effect ») (Weisenberger et Schumpe, 1996).

La présence de sucres diminue également la solubilité des gaz (Sablayrolles et Barre, 1986) mais l'effet est moins prononcé que celui des électrolytes.

### 1.8.1.3. Flux de matière

Si la concentration en gaz dissous dans le cœur du liquide est différente de celle de l'interface, le réarrangement chaotique des molécules tend à réduire la différence de concentration d'une manière décrite par les lois de diffusion. On dit abusivement que le potentiel de transfert est moteur de la diffusion. La première loi de Fick (1855) indique que la densité de flux de diffusion,  $F_d$ , est proportionnelle au gradient de concentration :

$$F_d = -D_A \text{ grad } x \quad (4)$$

où  $D_A$  est le coefficient de diffusion de l'espèce A dans la phase d'intérêt.

A partir de la première loi de Fick et de l'équation de continuité relative au constituant A on peut établir sur un volume V, la densité de flux de transfert (diffusion + transport), ainsi

que de déterminer le profil de concentration en fonction du temps (soit en supposant  $DA$  constant sur l'espace et en négligeant le terme de transport) :

#### 1.8.1.4. La conductance de transfert

La conductance de transfert est introduite de manière pragmatique pour exprimer que le flux de matière est égal au produit d'un coefficient de proportionnalité par une différence de potentiel d'échange. On peut exprimer la densité de flux molaire à l'interface,  $N_{A0}$  ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), pour le transfert en phase liquide :

$$N_{A0} = k_L (x_{A0} - x_A) \quad (5)$$

où  $k_L$  est la conductance de transfert du composé **A** en phase liquide ( $\text{m s}^{-1}$ ),  $x_{A0}$  est la concentration à l'interface et  $x_A$  la concentration au cœur de la phase liquide. Et pour le transfert en phase gazeuse :

$$N_{A0} = k_G (p_A - p_{A0}) \quad (6)$$

où  $k_G$  est la conductance de transfert en phase gazeuse ( $\text{mol bar}^{-1} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ),  $p_A$  est la pression partielle au sein de la phase gazeuse et  $p_{A0}$  la pression partielle à l'interface.

Notons que les conductances de transfert dépendent aussi d'une contribution liée au mouvement d'ensemble des molécules, qui a lieu indépendamment du gradient de concentration, et qui est en partie générée par la diffusion elle-même. Cette contribution est négligée pour les faibles intensités de transfert, comme par exemple pour la diffusion de l'oxygène dans l'eau.

Les conductances individuelles relatives à chaque phase ainsi que les concentrations interfaciales sont difficiles à mesurer. Une conductance globale de transfert est donc définie par rapport à la phase d'intérêt : la phase liquide :

$$N_{A0} = K_L (x_A^* - x_A) \quad (7)$$

où  $K_L$  est la conductance globale de transfert du composé **A** définie par rapport à la phase liquide,  $x_A^*$  est la concentration du constituant **A** dans la phase liquide, à l'interface gaz-

liquide, et donc supposée en équilibre avec sa pression partielle  $p_A$  dans la phase gazeuse (Eq.(3)). A partir de cette définition il est possible d'écrire l'équation (8) en termes de conductance, inverse de la résistance :

$$1/K = H_e/k_G + 1/k_i + 1/k_L \quad (8)$$

Où sont considérées respectivement les résistances du film gazeux, de l'interface, et du film liquide.

#### 1.8.1.5. Modèles locaux de transfert

L'objectif des modèles locaux de transfert est de relier  $k_L$  aux grandeurs caractéristiques du système. Les trois modèles principaux (Whitman, Higbie, Danckwerts) reposent sur les trois hypothèses communes suivantes :

- 1/ A l'interface l'équilibre de concentration est atteint.
- 2/ La résistance interfaciale au transfert est nulle.
- 3/ Il n'y a pas de réaction entre le liquide et le gaz et des hypothèses complémentaires, spécifiques à chaque modèle.

On va présenter le model du double film. Ce modèle, plus simple, reste le plus utilisé. Le modèle du double film (Whitman, 1923) est schématisé sur la Figure 11 (en omettant la résistance interfaciale) ; il est basé sur les hypothèses suivantes :

- Il existe un double film stagnant de part et d'autre de l'interface gaz-liquide.
- La résistance au transfert est localisée dans les deux films.

Le gaz franchit donc le double film par diffusion moléculaire uniquement. En utilisant la forme unidimensionnelle de l'équation  $F = -D_A \text{grad } x$ , selon un axe  $z$  perpendiculaire à l'interface, on peut écrire :

$$F = D / \delta (x_A^* - x_A) \quad (9)$$

où  $\delta$  est l'épaisseur du film liquide,  $x_A^*$  est la concentration de l'espèce A à l'interface et  $x_A$  la concentration dans le liquide homogène. Par identification avec équation (9)

$$k_L = D_A / \delta \quad (10)$$

où  $\delta$  reflète l'hydrodynamique du système ainsi que certaines de ses propriétés physiques.

Le modèle du film est par hypothèse applicable uniquement en régime stationnaire, où lorsque le temps de contact entre le gaz et le liquide est supérieur au temps de pénétration, c'est-à-dire au temps nécessaire à l'établissement du profil stationnaire de concentration dans le film.

L'improbabilité de l'existence d'une telle discontinuité hydrodynamique entre un film stagnant et un milieu agité et la volonté de prendre en compte l'effet de la turbulence sur l'interface gaz-liquide a poussé au développement d'autres modèles, dits de renouvellement de surface: les éléments de volume de l'interface demeurent à l'interface pendant un certain temps avant d'être remplacés par de nouveaux éléments de volume en provenance du cœur du liquide. Les interfaces gaz-liquide sont donc composées d'éléments d'âges différents. La différence entre les modèles de renouvellement de surface réside dans la répartition des temps de séjours de ces éléments autour du temps de séjour moyen.

## 1.8.2. Le coefficient volumétrique de transfert

### 1.8.2.1. Théorie

En pratique l'aire interfaciale des contacteurs gaz-liquide est souvent inconnue ; la conductance globale de transfert est donc définie sous la forme d'une grandeur volumétrique,  $(K_L a)_{loc}$ , directement mesurable par une expérience d'absorption :

$$dW_A = K_{L,loc} a_{loc} (x_A^* - x_A).dV \quad (11)$$

où  $dW_A$  est le flux transféré ( $\text{mol.s}^{-1}$ ) dans l'élément de volume  $dV$  et  $a_{loc}$  est l'aire interfaciale incluse dans l'élément de volume  $dV$ .

$K_{L,loc}$  et  $a_{loc}$  sont fonctions de la puissance dissipée localement, et donc de la position dans le réacteur (Lopes de Figueiredo et Calderbank, 1979 ; Royce et Thornhill, 1992). Le problème de leur détermination est simplifié en intégrant sur l'ensemble du réacteur et en proposant un coefficient volumétrique de transfert global, valeur moyenne définie sur l'ensemble du réacteur :

$$W_A = K_L a (x_A^* - x_A) V_L \quad (12)$$

$W_A$  est le flux transféré par l'ensemble du réacteur ( $\text{mol.s}^{-1}$ ),  $V_L$  le volume de liquide dans le réacteur, et  $K_L a$  ( $\text{s}^{-1}$ ) est le coefficient volumétrique de transfert global défini par rapport à la phase liquide.

Cette équation est valable en l'absence de réaction chimique et pour une température et un coefficient de diffusion à l'interface proche de celui du cœur du liquide.

Son utilisation implique que le réacteur soit considéré comme un réacteur homogène en terme de puissance dissipée.

L'oxygène étant un gaz peu soluble, le terme de résistance en phase gaz  $H/k_G$ , peut presque toujours être négligée (Van't Riet et Tramper, 1991 ; Royce et Thornhill, 1992). En effet, en 1590, Bartholomew et ses collaborateurs ont démontré ( $V_L=3,2$  L, aération=1,8 vvm,  $N=375\text{min}^{-1}$ ,  $27 < T < 32^\circ\text{C}$ ) que l'énergie d'activation de  $K_L a$  vaut  $E_a=17600$   $\text{J.mol}^{-1}$  ce qui correspond à un phénomène de diffusion en phase liquide, et ce qui prouve que l'étape limitante du transfert d'oxygène est bien localisée dans la phase liquide, car en phase gazeuse  $E_a$  serait 10 fois plus petit.

#### 1.8.2.2. Détermination de $K_L a$

Pour obtenir la valeur de  $K_L a$  on peut soit mesurer  $K_L a$  directement, soit mesurer  $K_L$  et  $a$ , mais il est difficile de mesurer indépendamment  $K_L$  et  $a$ . En général  $k_L$  est déduit de la mesure de  $K_L a$  et de  $a$  (Van't Riet, 1979), mesuré par une méthode chimique ou optique. Cependant la mesure de  $a$  est source d'erreurs et il est préférable de mesurer directement  $K_L a$  (Linek *et al.*, 1988).

Le nombre des méthodes disponibles pour le calcul de  $K_L a$  ainsi que les variantes de leur mise en œuvre est souvent la cause des incohérences entre les données de la littérature. Nous nous limitons ici aux méthodes applicables en contacteur agité.

On distingue les méthodes « dynamiques » des méthodes « statiques ». Les méthodes dynamiques consistent à étudier l'évolution de la concentration en oxygène (habituellement en phase liquide) en réponse à un échelon de concentration dans le gaz entrant. Les méthodes statiques nécessitent la disparition simultanée de l'oxygène absorbé, soit par un système à flux

continu, soit par une réaction chimique ou enzymatique de consommation et reposent sur un bilan matière de l'oxygène.

On distingue également, par rapport aux bioprocédés on distingue (Rainer, 1990) les méthodes indirectes (sans système biologique) des méthodes directes (avec système biologique consommant de l'oxygène). On distingue aussi les méthodes physiques (basées sur l'absorption ou la désorption d'un gaz) des méthodes chimiques (basées sur la consommation d'un gaz et censées, dans certaines conditions, accélérer le transfert d'oxygène à cause de la réaction dans le film et de la modification des propriétés d'interface), et enfin les méthodes locales (photographies pour mesurer la taille de bulle) des méthodes globales (Poughon *et al.*, 2003).

#### 1.8.2.2.1. Méthodes "dynamiques"

La méthode la plus employée est celle nommée « réoxygénation » dans laquelle le réacteur est soumis à un échelon gazeux entre l'azote et l'air (noté  $N_2 \rightarrow \text{Air}$ ), ou avec de l'oxygène pur, pour un réacteur ayant été préalablement dégazé (échelon noté  $0 \rightarrow O_2$ ), mais une désoxygénation (échelon  $\text{Air} \rightarrow N_2$ ) peut être employée également.

Le calcul permettant d'accéder à la valeur de  $K_{La}$  repose sur la résolution de bilans matière en régime transitoire pour les phases gaz et liquide, ainsi que de la description de la dynamique de l'électrode (Dang *et al.*, 1977 ; Ruchti *et al.*, 1981 ; Linek *et al.*, 1982).

#### 1.8.2.2.2. Mise en oeuvre de la réoxygénation

L'échelon de concentration peut être effectué de deux manières : en modifiant la concentration en oxygène du gaz d'entrée à vitesse d'agitation et débit de gaz constants (procédure A) ; alternativement, en démarrant l'aération alors que le système ne contient pas de gaz sous la forme de bulles (l'agitation doit alors parfois être démarrée au même moment), sous réserve que la concentration en oxygène au départ soit différente de celle de l'équilibre imposé par le gaz d'entrée (procédure B). Si la procédure A est utilisée l'aire interfaciale et  $K_{La}$  sont supposés rester constants ; le bilan dynamique sur le gaz dispersé devient alors très important puisqu'il décrit le passage des micro-volumes d'azote aux micro-volumes d'air.  $K_{La}$  mesuré dans l'eau peut varier de 30% selon la durée de la période de transition pendant laquelle l'azote est coupé et l'air n'est pas encore injecté dans le système (Ruchti *et al.*, 1981).

Il est donc recommandé de fixer ce laps de temps. D'autre part cette influence est amplifiée si le calcul ne prend pas en compte la dynamique du gaz (Linek *et al.*, 1982). Si la procédure B est utilisée, l'aire interfaciale prend du temps à se construire et  $K_L a$  n'est pas constant mais tend vers une valeur stabilisée. Un modèle linéaire (« start-up ») a été proposé par Linek *et al.* (1981, 1987) :

$$K_L a'(t) = K_L a t / \tau_G \text{ pour } t \in [0 ; \tau_G] \quad (13)$$

$$K_L a'(t) = K_L a \text{ pour } t > \tau_G \quad (14)$$

où  $K_L a'$  est la valeur instantanée de  $K_L a$  pendant la période transitoire, et  $\tau_G$  le temps de séjour des bulles ( $\tau_G = V_G / Q_d$ ).

Depuis les années 1980 Linek étudie et propose des améliorations aux méthodes de calcul de  $K_L a$  par réoxygénation. Linek *et al.* (1981) démontrent que les valeurs de  $K_L a$  calculées par les procédures A et B sont équivalentes à condition de considérer dans le modèle « start-up » les transports simultanés de l'oxygène et de l'azote dans le cas de l'échelon  $N_2 \rightarrow \text{Air}$  (Linek *et al.*, 1982) ainsi que la construction de l'aire interfaciale, bien que l'influence de cette construction ne semble pas jouer sur le résultat (contacteur multi-agitateurs par exemple). Par contre il n'est pas nécessaire de considérer le transfert d'azote si la procédure A est utilisée (Linek *et al.*, 1981 ; Linek *et al.*, 1982). Cependant la méthode start-up de Linek n'est pas valable si la période de mise en régime est de l'ordre de grandeur du temps nécessaire à la saturation du réacteur (Gogate et Pandit, 1999).

### *Conclusions sur les méthodes dynamiques*

Pour la plupart des méthodes dynamiques, la valeur de  $K_L a$  dépend des hypothèses utilisées pour décrire le profil gazeux. Ces hypothèses sont difficilement vérifiables et pèsent largement sur la valeur de  $K_L a$  : elles constituent donc une source principale d'erreur. Pour cette raison les méthodes dynamiques sont plus précises à faible valeur de  $K_L a$  ( $< 0.05 \text{ s}^{-1}$ , Linek *et al.*, 1987) car l'homogénéité du gaz est plus grande. L'effet de la distribution des temps de séjour des volumes gazeux peut être éliminé en travaillant dans des conditions telles que la composition du gaz varie peu entre l'entrée et la sortie du réacteur (Chandrasekharan et Calderbank, 1980), mais ceci est impossible en cultures cellulaires intensives ou pour la mesure de  $K_L a$  élevés.

### 1.8.3. Modification du milieu

Les modifications du milieu d'origine biologique sont dues à l'excrétion de métabolites. Ces métabolites peuvent être des surfactants. Ainsi, Bandyopadhyay *et al.* (1967) attribuent la décroissance de  $K_{La}$  aux modifications physicochimiques du milieu (batch de levure ; agitation et ventilation constantes ;  $K_{La}$  passe de  $0,066 \text{ s}^{-1}$  à  $0,05 \text{ s}^{-1}$  lorsque  $X$  croît de  $6 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$  à  $21,5 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$ ). L'excrétion d'agents viscosants, comme lors de la production de xanthan (Garcia-Ochoa et Gomez, 2005), peut également modifier le milieu.

Les modifications rhéologiques induites par la biomasse elle-même peuvent également être prises en compte dans les modifications du milieu.

Par contre il faut faire attention à ne pas confondre les facteurs modifiant la solubilité de l'oxygène, c'est-à-dire le potentiel de transfert, avec les facteurs ayant un rôle sur  $K_{La}$ . Car le flux transféré est le produit de deux facteurs indépendants : le coefficient de transfert et le potentiel de transfert (équation 12) :  $W_{O_2} / V = K_{La} (x_{O_2}^* - x_{O_2})$ . D'autre part il faut faire attention à ne pas attribuer à la biomasse des modifications qu'elle n'a pas générées, comme lors de l'utilisation de cellules empaquetées (Ju et Sundararajan, 1995). La distribution de l'oxygène dans un biofilm est très importante car elle est à l'origine des processus d'oxydation biologique du carbone et de la nitrification. Le transfert de l'oxygène dans un biofilm se décompose en trois étapes, le passage de l'oxygène gazeux à l'oxygène dissous, le transfert de l'oxygène dissous à la surface du biofilm, puis la diffusion et la réaction dans le biofilm (Nicolella *et al.*, 2000). Le transfert de l'oxygène gazeux à l'oxygène dissous peut être estimé par la méthode dite de re-oxygénation (Buffière *et al.*, 1995).

Le transfert de l'oxygène dissous à la surface du biofilm, puis la diffusion et la réaction au sein de celui-ci est fonction du gradient de concentration en oxygène que l'épaisseur et la densité du biofilm affectent. Des mesures du profil de concentration en oxygène dissous au sein du biofilm à l'aide d'une microélectrode, montrent en plus de la décroissance rapide de la concentration en oxygène dissous avec l'augmentation de la profondeur, la possibilité de prédire les zones aérobies et anaérobies selon l'épaisseur du biofilm.

L'oxygène et les substrats (la source de carbone et la source de l'azote) doivent traverser et être transportés par diffusion moléculaire à travers le système pour atteindre les cellules microbiennes et être consommés. La profondeur de la pénétration du substrat dans le

biofilm dépend surtout de la porosité du biofilm, la concentration en substrat, le transfert de masse et le taux de réaction dans le biofilm.

Concernant les bioréacteurs à disques, la présence de biomasse fixée sur les disques augmente le transfert de l'oxygène dans le biofilm. Cette augmentation est expliquée par l'augmentation considérable de la surface et à la consommation de la biomasse fixée de l'oxygène (Di Palma *et al.*, 2002). D'autres auteurs ont montré que 90% de l'oxygène gazeux présent se dissous dans le biofilm (Spengel et Dzombak, 1992). Il est donc clair que la prédiction de la structure du biofilm est primordiale dans l'analyse et la compréhension structurelle du biofilm parce que l'hydrodynamique, le transfert de masse et la conversion dans les réacteurs à biofilm dépendent de la densité, de la porosité, de la forme et de l'épaisseur.

#### **1.8.4. $K_L a$ et dimensionnement**

Les méthodes classiques de dimensionnement à l'échelle supérieure (extrapolation) reposent sur la conservation d'un paramètre essentiel à la culture cellulaire ; lorsqu'il s'agit de l'oxygène dissous, ce paramètre est souvent la puissance dissipée par unité de volume ou  $K_L a$  (Aiba *et al.*, 1973 ; Junker, 2004). Or, on remarque souvent une inadéquation entre la production en réacteur de laboratoire et la production industrielle car ces méthodes d'extrapolation considèrent le réacteur comme un système homogène et ne tiennent pas compte des hétérogénéités propres aux réacteurs industriels (Bylund *et al.*, 1998).

Le dimensionnement assisté par méthode numérique comme le pratique Reuss (Schmalzriedt *et al.*, 2003) est une approche intégrée, qui permet d'associer l'idéalité des réacteurs de laboratoire à la complexité des grands réacteurs, en combinant l'hydrodynamique et la réponse microbienne au stress. L'approche numérique intégrée permet un calcul plus fin de l'extrapolation à partir de l'étude de la réponse microbienne au stress, obtenue en laboratoire par une approche opposée à l'extrapolation, le scale-down. L'objectif du scale-down est de détecter les conditions d'hétérogénéités auxquelles les microorganismes sont soumis à l'échelle industrielle et de les reproduire à l'échelle du laboratoire (Neubauer *et al.*, 1995). Pour cela le réacteur de scale-down est composé de réacteurs idéaux en série (Bylund *et al.*, 1999).

## **1.9. Récupération des lipopeptides**

Les techniques d'extraction ou de récupération et de purification des lipopeptides produits par *B. subtilis* à partir des milieux de fermentation sont l'objet de plusieurs études effectuées dans plusieurs laboratoires. En l'occurrence l'extraction et la purification de la surfactine.

### **1.9.1. Précipitation acide**

Cette technique reste la technique la plus ancienne pour la récupération des lipopeptides. Cette technique consiste à précipiter la surfactine directement du surnageant de culture avec une précipitation acide. Vu le faible taux de pureté de seulement 55% (Chen et Juang, 2008), cette technique est généralement couplée à des extractions par des solvants organiques ou à des techniques membranaires pour augmenter la pureté (Arima *et al.*, 1968 ; Chen *et al.*, 2007).

### **1.9.2. Ultrafiltration**

Au dessus des CMC, les molécules des lipopeptides s'associent pour former des micelles avec des diamètres 2 à 3 fois plus grands que les molécules libres (Osman *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 1999b). A partir de cette constatation que des équipes de recherche se sont intéressées à purifier les surfactines par les techniques membranaires, notamment l'ultrafiltration qui permet à la fois de retenir les micelles de surfactine et de les concentrer.

Ce procédé permet de concentrer les molécules de 85 à 95% en fonction de la membrane utilisée. Ensuite et par l'ajout de solvant destructurant des micelles, le taux de récupération de la surfactine atteint les 85% avec 75% de pureté (Sen et Swaminathan ,2005 ; Isa *et al.*, 2007 ; Chen et Juang , 2008).

Cependant, les techniques membranaires nécessitent de très longues durées de lavage et de régénération. De même que le coût des membranes est relativement cher. Tous ces inconvénients rendent ces techniques difficilement industrialisables.

### **1.9.3. Récupération de la mousse**

Au cours de ces dernières années, plusieurs équipes de recherches ont voulu mettre au point des techniques d'extraction plus écologiques qui respectent l'environnement. Parmi ces techniques on trouve la technique du moussage excessif. En effet, cette technique repose sur l'apport d'oxygène nécessaire au milieu de culture par barbotage, ce qui favorise la formation de mousse due à la présence des lipopeptides. La mousse ainsi dégagée conduit à l'extraction de la quasi-totalité des lipopeptides (Davis *et al.*, 2001 ; Guez *et al.*, 2007). Cependant cette technique n'est pas très sélective par rapport aux lipopeptides et nécessite une opération de purification complémentaire pour augmenter la pureté des lipopeptides.

### **1.9.4. Adsorption**

Cette technique repose sur les propriétés physico-chimiques des lipopeptides et leur affinité par rapport aux adsorbants. En effet, plusieurs recherches se sont focalisées sur l'adsorption de la surfactine sur différents supports solides afin de la retirer et de la purifier du milieu de culture à l'aide de colonnes d'adsorption (Ishigami *et al.*, 1995 ; Liu *et al.*, 2007 ; Chen et Juang, 2007 ; Montastruc *et al.*, 2008).

### **1.9.5. Extraction liquide-liquide**

L'extraction liquide-liquide a été également utilisée pour la récupération de la surfactine par des solvants (Chen et Juang, 2008 ; Dimitrov *et al.*, 2008a). Cette opération consiste en un transfert d'un ou plusieurs composés chimiques d'une phase liquide vers une deuxième phase liquide immiscible à la première. En général, le système diphasique est composé d'une solution aqueuse contenant un ou plusieurs solutés et d'une phase organique appropriée pour solubiliser le(s) soluté(s) d'intérêt. Souvent le solvant organique est une solution d'un composé spécifique (extractant, molécule capable d'interagir avec le soluté d'intérêt) dans un diluant non miscible à l'eau. L'extractant réagit avec le soluté par l'intermédiaire des groupements fonctionnels adéquats (Haddaoui, 2004).

En pratique, l'utilisation d'un procédé d'extraction liquide-liquide nécessite deux opérations successives :

- une mise en contact intime des deux liquides durant un temps suffisant à l'obtention de l'équilibre pendant lequel le ou les solutés sont transférés de la phase d'alimentation dans le solvant ; à l'équilibre, le rapport des concentrations du soluté dans l'extrait et le raffinat, appelé coefficient de distribution, donne une mesure de l'affinité relative du soluté pour les deux phases.
- après leur contact, une séparation ultérieure des deux liquides (extrait et raffinat)

Cette technique a montré une bonne sélectivité pour l'extraction de la surfactine (Chen et Juang, 2008). Cependant la régénération du solvant organique reste un problème à résoudre. Il sera très important de trouver un moyen de dés-extraire les lipopeptides de la phase organique et régénérer ainsi le solvant.

### **1.9.6. Système tri-phasique : la pertraction**

#### 1.9.6.1. Principe de la pertraction

La pertraction est une opération qui intègre une extraction et une dés-extraction et qui permet la régénération du solvant organique en continu. C'est une technique de séparation relativement récente, économique en solvant et en énergie (Kislik, 2010 ; Boyadzhiev, 1990). La pertraction peut être considérée comme un procédé membranaire, vu que c'est une technique basée sur la séparation des molécules à l'aide d'une membrane liquide. Habituellement, la membrane liquide est une phase organique non miscible à l'eau qui sépare deux phases aqueuses et qui permet un transport sélectif d'un ou plusieurs solutés d'une des phases aqueuses (la phase d'alimentation) vers l'autre (la phase réceptrice). Ils existent aussi des membranes liquides aqueuses, séparant deux solutions organiques (Boyadzhiev et Lazarova, 1995).

Le terme « pertraction » provient du Latin « per trahere », par analogie à la dérivation du terme « extraction » de « ex trahere » (Schlosser et Kossaczky, 1986).

Le transport à travers une membrane liquide associe les deux opérations extractives dans un système formé de trois phases liquides (Figure 12) : la phase aqueuse d'alimentation (F), la membrane liquide organique (M) et la phase aqueuse réceptrice (R). Le transfert du soluté est le résultat d'une extraction à la première interface (F/M) et d'une dés-extraction du soluté à la deuxième interface (M/R). Le transfert du soluté à travers la membrane liquide



1998 ; Fournier-Salaun et Salaun, 2009). Plusieurs sont les applications de la pertraction pour la récupération, la séparation et la concentration des métaux : cuivre, uranium, actinides, zinc, fer, nickel, argent, chrome... (Kislik, 2010 ; Raszowska-Kaczor *et al.*, 2010 ; Wodzki *et al.*, 2004 ; Alexandrova *et al.*, 2001 ; Dimitrov *et al.*, 2002). Elle est également utilisée pour l'extraction des acides aminés comme la lysine (Boyadzhiev et Atanassova, 1992) et la phénylalanine (Boyadzhiev et Atanassova, 1994), antibiotiques comme la pénicilline (Smith et Hossain, 2007, Lazarova *et al.*, 2002), l'érythromycine (Cascaval *et al.*, 2010 ; Habaki *et al.*, 2002) et la tylosine (Boyadzhiev *et al.*, 2003), des alcaloïdes comme l'atropine (Dimitrov *et al.*, 2005) et la glaucine (Lazarova et Dimitrov, 2009) et les acides organiques comme l'acide lactique (Martak *et al.*, 2008) et acide citrique (Yordanov et Boyadzhiev, 2004).

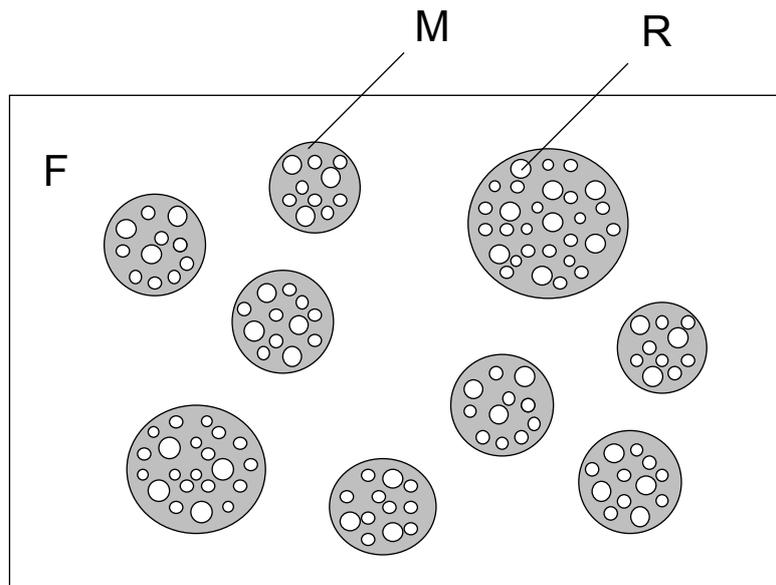
Concernant l'application des membranes liquides pour l'extraction, séparation ou purification des lipopeptides, à notre connaissance, une seule étude jusqu'à présent a été publiée. En effet Dimitrov et ses collaborateurs ont appliqué la pertraction pour l'extraction de la surfactine à partir d'une solution modèle constituée d'eau et de surfactine pure (Dimitrov *et al.*, 2008a).

#### 1.9.6.3. Types de membranes liquides

Il y a différentes façons d'organiser dans l'espace le système de trois phases liquides. Habituellement, les membranes liquides sont classées en trois groupes : les membranes émulsionnées (doubles émulsions), les membranes supportées (immobilisées) et les membranes volumiques (Kislik, 2010 ; Boyadzhiev, 1995)

- **Membranes liquides émulsionnées (doubles émulsions)**

L'élaboration de ce type de membranes s'effectue par la formation d'abord d'une émulsion très fine de la phase réceptrice (aqueuse) dans le solvant organique à l'aide d'un tensioactif approprié. Cette émulsion fine est ensuite dispersée sous forme de gouttes dans la phase continue d'alimentation F en appliquant une agitation modérée (Figure 13). Après la fin de la pertraction, l'émulsion fine (M+R) est séparée de la phase d'alimentation par crémage. Ensuite l'émulsion fine est détruite par voies chimique, thermique ou électrique afin de séparer les phases M et R et ainsi récupérer la substance d'intérêt dans une solution aqueuse (phase R).

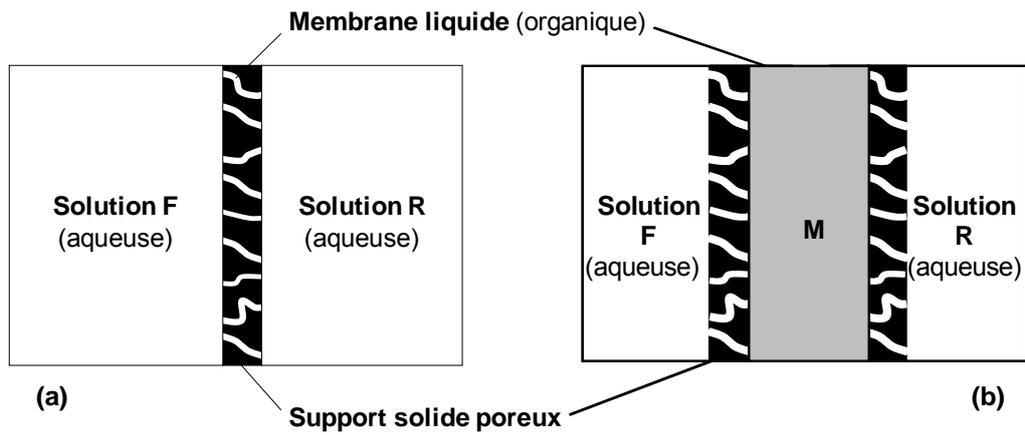


**Figure 13:** *Membrane liquide émulsionnée*  
(F : phase d'alimentation ; M : membrane liquide ; R : phase réceptrice)

- **Membranes liquides supportées (immobilisées)**

Ils existent deux types de membranes liquides supportées. Dans le premier cas la membrane liquide M est imprégnée dans les pores d'un support solide qui sépare les phases F et R (Figure 14a). L'inconvénient principal de cette configuration est que la membrane peut être perforée sous l'effet de la pression exercée par les phases aqueuses ou suite au lessivage de la phase M.

Dans le deuxième type de membranes liquides supportées, la membrane liquide est soutenue des deux côtés par des supports solides poreux (Figure 14b). Cette configuration, parfois considérée aussi comme membrane volumique, permet de diminuer le phénomène de lessivage, mais le transport des solutés à travers la membrane liquide est très lent.



**Figure 14:** Membranes supportées.

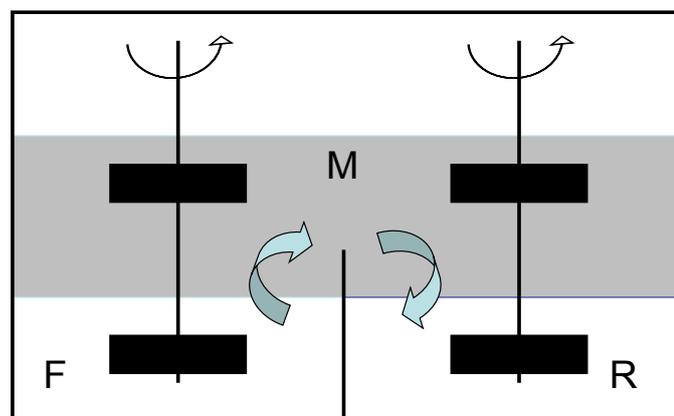
(a) Phase organique contenue dans les pores du support solide.

(b) Phase organique emprisonnée entre deux supports solides poreux

- **Les membranes liquides volumiques**

Le principe de la pertraction avec de membranes liquides volumiques est présenté sur la Figure 15. Dans ce type de système le volume de la phase organique est relativement important, parfois plus important que les volumes des phases d'alimentation et de réception.

Ce type de membrane liquide est très utilisé à l'échelle du laboratoire parce qu'il est simple à mettre en œuvre. Il permet d'étudier fondamentalement les phénomènes de transport.



**Figure 15:** Exemple d'une membrane volumique

Les principaux avantages et inconvénients des différents types de membranes liquides sont présentés dans le Tableau 3 (Alexandrova *et al.*, 2000).

**Tableau 3 : Comparaison entre les trois types de membranes liquides**

<b>Membranes liquides</b>	<b>Avantages</b>	<b>Inconvénients</b>
<b>Membranes émulsionnées</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Surface spécifique importante</li> <li>- Flux de matière importants</li> <li>- Faible sensibilité aux impuretés solides</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Difficultés de formation et de destruction des émulsions</li> <li>- Nécessité d'utilisation de tensioactifs</li> <li>- Durée de vie courte (osmose, coalescence)</li> </ul>
<b>Membranes supportées</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Surface d'échange connue et constante</li> <li>- Possibilité de régulation des débits</li> <li>- Durée de vie important (100 d'heures).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Régime de fonctionnement instable</li> <li>- Sensibilité aux impuretés solides</li> <li>- Pertes de charge importantes</li> <li>- Efficaces uniquement pour des solutions diluées</li> </ul>
<b>Membranes volumiques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Surface d'échange connue et constante</li> <li>- Régime de fonctionnement stable</li> <li>- Possibilité de régulation des débits</li> <li>- Durée de vie importante (1000 heures)</li> <li>- Applicables pour des solutions diluées et concentrées.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Faible surface spécifique d'échange</li> <li>- Membrane épaisse et flux de matière relativement faibles</li> </ul>

Concernant l'application de la pertraction pour l'extraction et la purification de molécules tensioactives comme les lipopeptides, apparemment l'utilisation des membranes émulsionnées n'est pas envisageable, vue la présence d'autres tensioactifs dans la préparation

de l'émulsion fine R/M. L'application de membranes liquides supportées n'est pas non plus un choix raisonnable compte tenu des problèmes de lessivage qui vont être amplifiés par la présence de biosurfactants. Apparemment les membranes volumiques semblent les plus adaptées pour extraire des lipopeptides à partir de leur milieu de fermentation par pertraction.

Parmi les différentes configurations existantes de pertracteurs à membranes liquides volumiques, le contacteur à disques tournants attire l'intérêt à cause des surfaces d'échange relativement importantes entre les phases, l'agitation correcte des phases et la stabilité du système tri-phasique dans le temps, permettant de travailler en régime discontinu ou continu (Alexandrova *et al.*, 2000, Dimitrov *et al.*, 2002). Ce type de pertracteur a été utilisé avec succès pour l'extraction et séparation des nombreuses substances d'intérêt, tels que des ions métalliques (Zhivkova *et al.*, 2004 ; Dimitrov *et al.*, 2008b), du phénol (Fournier-Salaun et Salaun, 2009 ; Alexandrova *et al.*, 2000), des antibiotiques (Boyadzhiev *et al.*, 2003), des alcaloïdes (Lazarova et Dimitrov, 2009), et notamment de la surfactine à partir de solutions modèles (Dimitrov *et al.*, 2008a).

## 2. Situation et objectif du travail

*B. subtilis* synthétise plusieurs types de molécules issues par la voie non ribosomale, c'est le cas des surfactines et des fengycines. Ces deux familles ont une structure lipopeptidique à large champ d'activités biologiques très recherchées. En effet la fengycine est un antifongique très actif et la surfactine comme son nom l'indique est considérée comme le plus puissant tensioactif connu. Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la production de ces lipopeptides à grande échelle reste très complexe en raison de trois problèmes majeurs, notamment, les faibles niveaux de production des lipopeptides des souches sauvages, l'apparition de mousse à cause de l'association de l'agitation mécanique, de l'aération par bullage de l'air et les propriétés tensioactives de ces molécules. Le dernier problème reste la difficulté de l'extrapolation industrielle des techniques déjà étudiées. Les objectifs du présent travail se déclinent en trois grandes parties.

Dans un premier temps, la production aérobie de la surfactine et de la fengycine par des cellules planctoniques et immobilisées sera étudiée dans des fioles agitées, type Erlenmeyer. Cet équipement permet l'étude fiable de 3 paramètres principaux nécessaires pour l'extrapolation d'un procédé, notamment la puissance dissipée, la vitesse de transfert d'oxygène ( $K_L a$ ) et le temps de mélange. La souche *B. subtilis* ATCC 21332 fixée sur des supports solides flottants montrera la faisabilité de ce procédé dans des conditions sans bullage. Pour éviter le phénomène de moussage durant la production des biosurfactants, l'air nécessaire à cette souche aérobie est disponible à la surface du milieu de fermentation en contact direct avec les cellules planctoniques et les billes qui contiennent le biofilm. Par la suite, une étude comparative avec une culture planctonique (cellules libres) démontrera que les cellules immobilisées sur les billes permettent une production de deux types de lipopeptides (surfactine et fengycine) plus élevée et orientée vers la synthèse de fengycine.

Ces essais, à l'échelle laboratoire serviront comme étude en amont pour la mise en place d'un procédé sans bulles, en utilisant des cellules planctoniques et immobilisées en bioréacteur à disques rotatifs. Le transfert d'oxygène, facteur limitant primordial pour le métabolisme microbien, sera l'objet de nos efforts. La méthode dynamique sera appliquée pour étudier l'évolution de la concentration en oxygène en phase liquide en réponse à un échelon de concentration dans le gaz entrant. Tenant compte des difficultés liées au caractère

moussant de ces molécules, la mise en œuvre de ce bioréacteur visera à stabiliser le procédé et à améliorer la productivité de la biosynthèse. Une étude de la variation des différents paramètres du bioréacteur permettra d'optimiser ce procédé.

Enfin, la pertraction sera appliquée pour la récupération des lipopeptides directement à partir des surnageants issus de productions des cultures de *B. subtilis* ATCC 21332. Le choix de cette technique est justifié par la sélectivité de l'extraction par solvant et la possibilité de récupérer les molécules transportées dans une nouvelle phase aqueuse. Les études de pertraction seront menées dans un contacteur à disques tournants permettant un transfert rapide dans un système tri-phasique stable dans le temps. Avant de procéder à la pertraction, d'abord des études sur l'extraction liquide-liquide des lipopeptides seront réalisées dans de systèmes diphasiques afin de trouver, d'une part, les conditions favorables pour extraire les lipopeptides vers un solvant organique approprié et, d'autre part, les conditions favorables pour leur des-extraction vers une autre phase aqueuse réceptrice et la régénération du solvant.

**Chapitre II**  
**MATERIELS et METHODES**

## 1. Souche bactérienne et milieux de culture

### 1.1. Souche

Tout au long des expériences effectuées dans ce travail, une seule souche a été utilisée. *B. subtilis* ATCC 21332 est productrice de deux types de lipopeptides : les fengycines et les surfactines.

### 1.2. Milieux de culture

#### 1.2.1. Le milieu de Landy

Le milieu de Landy est composé de glucose, 20 g L<sup>-1</sup> ; acide glutamique, 5 g L<sup>-1</sup> ; MgSO<sub>4</sub>, 0,5 g L<sup>-1</sup> ; extraits de levure 1 g L<sup>-1</sup> ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 g L<sup>-1</sup> ; KCl, 0,5 g L<sup>-1</sup> ; CuSO<sub>4</sub>, 1,6 mg L<sup>-1</sup> ; Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, 1,2 mg L<sup>-1</sup> ; MnSO<sub>4</sub>, 0,4 mg L<sup>-1</sup>. Dans nos expériences, le milieu est tamponné par de l'acide 3-(N- morpholino) – propane sulfonique (MOPS) 0,1 M et le pH est ajusté avec une solution de KOH 3 M stérile.

Afin d'assurer la reproductibilité de la composition du milieu de culture, les réactifs sont préalablement préparés sous forme de solutions stocks stériles concentrées 20 fois. Ces solutions sont ensuite utilisées pour reconstituer le milieu final. Les solutions stock sont les suivantes :

- Une solution de Glucose 20X (400 g L<sup>-1</sup>) stérilisée par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes et conservée à 4°C.
- Une solution d'acide glutamique 20X (100 g L<sup>-1</sup>) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
- La solution A contenant de l'extrait de levure 20X (20 g L<sup>-1</sup>) et du MgSO<sub>4</sub> 20X (10 g L<sup>-1</sup>) est stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes.
- La solution B contenant du K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20X (20 g L<sup>-1</sup>) et du KCl 20X (10 g L<sup>-1</sup>) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
- La solution C contenant du CuSO<sub>4</sub> 20X (32 mg L<sup>-1</sup>) et du Fe<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub> 20X (24 mg L<sup>-1</sup>) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.
- Une solution de l'acide 3-(N- morpholino) – propane sulfonique (MOPS) 20X (420 g L<sup>-1</sup>) est stérilisée par filtration sur une membrane de 0,2 µm de porosité.

- Une solution de KOH 3 M stérilisée par autoclave à 121°C pendant 20 minutes pour ajuster le pH du milieu à 7.

Ainsi pour préparer un litre de milieu il faut mélanger de manière stérile 50 mL de chaque solution concentrée et ajouter 700 mL d'eau distillée stérile.

### **1.2.2. Le milieu LB**

Le milieu Luria-Bertani (LB) est un milieu nutritif utilisé sous forme bouillon pour favoriser la croissance de la souche conservée à -80°C lors de sa revivification. Ce milieu est composé de : Tryptone 10 g L<sup>-1</sup>; extrait de levure 5 g L<sup>-1</sup> ; NaCl 10 g L<sup>-1</sup>; pH 7,2. Le milieu gélosé (17 g L<sup>-1</sup> d'agar) est utilisé lors de l'isolement de la souche. La stérilisation du milieu LB se fait par autoclavage à 121°C pendant 20 minutes.

## **1.3. Conservation de la souche et préparation d'un inoculum**

### **1.3.1. Conservation de la souche**

A partir d'un stock du laboratoire, la souche *B. subtilis* ATCC 21332 a étéensemencée dans 5 mL de bouillon LB et incubée à 30°C sous agitation de 160 min<sup>-1</sup> pendant 24h. La pureté de la souche a été contrôlée par coloration de Gram et par isolement sur gélose LB. Une colonie bien isolée est repiquée sur bouillon LB. La culture placée à 30°C, 160 min<sup>-1</sup> est arrêtée pendant sa phase exponentielle (après 8 heures). Le surnageant contenant les cellules est réparti en cryotubes dans du milieu LB contenant 40% de glycérol. Les tubes homogénéisés sont stockés à -80°C.

### **1.3.2. Préparation d'un inoculum**

Pour chacune des expériences, une pré-culture est préparée à partir d'un tube stock conservé à -80°C. Le tube est décongelé en deux étapes (-20°C pendant 30 minutes puis 20°C pendant 30 minutes). La pré-culture est réalisée à 30°C et 160 min<sup>-1</sup> d'agitation jusqu'en phase exponentielle de croissance (DO= 2) dans 5mL de bouillon LB. Ce tube est transvasé dans un Erlenmeyer de 1 litre contenant 100 mL de milieu Landy- MOPS pH 7. La culture est réalisée 18h à 30°C sous agitation de 160 min<sup>-1</sup>.

## 2. Production par des cultures planctoniques ou immobilisées de *Bacillus subtilis*

### 2.1. Culture de cellules planctoniques

Les expériences concernant les fermentations de cellules libres ont été effectuées dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre contenant 100 mL de milieu Landy- MOPS à pH 7. Le faible volume réactionnel permet une aération en surface et l'échange d'oxygène avec l'extérieur grâce au bouchon filtrant. La DO initiale de la culture ( $DO_{600nm}$ ) est ajustée à 0,1.

Pour avoir une  $DO_{600nm}$  de 0,1 à partir d'un inoculum la formule ci-dessous est appliquée :

$$DO_1.V_1 = DO_2.V_2 \quad (15)$$

$DO_1$  étant la densité optique à 600nm de l'inoculum et  $V_1$  étant le volume qu'on doit prélever de l'inoculum et mettre dans l'Erlenmeyer,  $DO_2$  et  $V_2$  étant respectivement la densité optique à 600nm et le volume de la culture à lancer dans l'Erlenmeyer.

Les cultures à 30°C et 160 min<sup>-1</sup> sont suivies pendant 72 heures et des prélèvements sont effectués régulièrement sur ces cultures sous la hotte à flux laminaire pour :

- Contrôler la pureté (isolement sur boîte de gélose LB)
- Mesurer la densité optique à 600 nm
- Déterminer le poids sec
- Mesurer le pH
- Doser les lipopeptides

### 2.2. Culture par immobilisation

Au sein du laboratoire, plusieurs supports non poreux, de densité inférieure à celle de l'eau ont été testés. Deux supports sont hydrophobes : le polypropylène (PP) et le polybutène (PB). Trois supports sont hydrophiles : le polyéthane sulphone (PES), le polystyrène polyméthyle méthacrylate fonctionalisé par de la poudre de charbon actif (PSPch) et le polypropylène fonctionalisé par de la poudre de charbon actif est incorporée dans la matrice

(PPch). Dans ce travail, seul ce dernier support (PPch) a été retenu en raison de sa stabilité lors de l'autoclavage et de la reproductibilité des résultats de production.

Les expériences utilisant des cellules immobilisées ont été réalisées en deux étapes distinctes ; une étape de colonisation des supports et une étape de production des lipopeptides. L'expérience de colonisation dure 96 heures à 30°C en Erlenmeyer de 1 litre. 40 grammes de billes de PPch stériles sont ajoutées à 200 mL du milieu de Landy MOPS pH7. La DO initiale de la culture est ajustée à 0,5. Le milieu est agité doucement à 40 min<sup>-1</sup> pour permettre aux cellules de bien adhérer au support et éviter la formation de mousse. Le milieu de culture est renouvelé après 48 heures.

La deuxième étape du procédé concerne la production des lipopeptides. Après la colonisation, les billes sont légèrement rincées avec une solution stérile de phosphate de potassium et transférées dans un Erlenmeyer de 1 litre contenant 200 mL de milieu de Landy MOPS pH7. Les cultures sont mises à incuber à 30°C à 140 min<sup>-1</sup> pendant 72 heures. Des prélèvements sont effectués régulièrement sur ces cultures sous la hotte à flux laminaire pour effectuer les mêmes contrôles et mesure que celles effectuées sur les cellules planctoniques.

### **2.3. Culture en bioréacteur à disques**

La croissance et la production de lipopeptides chez *B. subtilis* nécessitent un apport en oxygène dans le milieu de culture. Dans les réacteurs classiques, cet apport d'oxygène est assuré par bullage. Associé à une forte agitation du bioréacteur et aux molécules tensioactives, le bullage provoque un fort moussage et l'arrêt du procédé de production après quelques heures. La production de lipopeptides (surfactine et fengycine) réalisée à l'échelle du laboratoire ou à des échelles pilotes ou industrielles pose donc un problème. Il est alors nécessaire de trouver un procédé permettant de contrôler la formation de mousse.

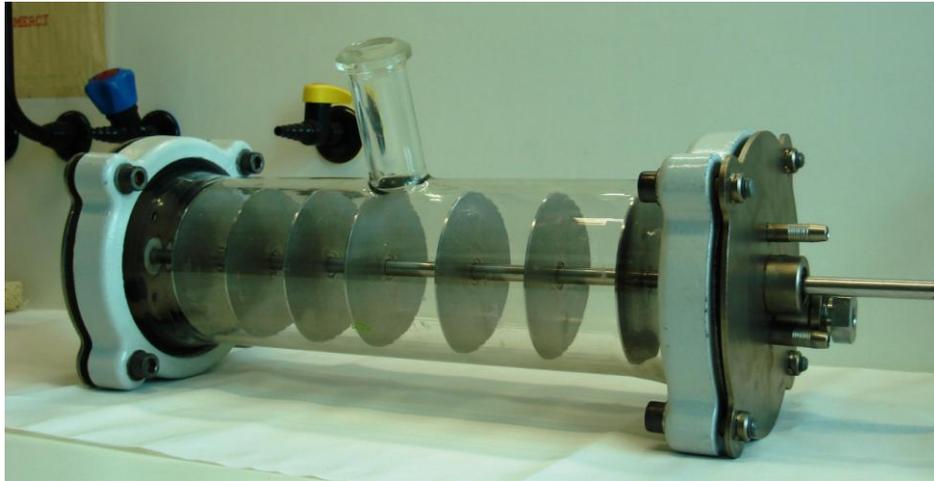
Dans le bioréacteur à disques ; les disques assurent la formation du biofilm. Ils sont couverts de mince film liquide externe permettant un transfert intensif d'oxygène. En effet, l'oxygénation du milieu se fait par une aération à la surface non-immersée du disque et par la surface libre du liquide de réacteur (et non pas par bullage) ce qui permet d'empêcher la formation de mousse. Les disques rotatifs autour de l'axe favorisent le transfert de l'oxygène grâce à la formation de ce mince film liquide qui est en contact périodique avec l'air et avec le milieu liquide. En rotation continue, le film échange l'oxygène dissous avec le milieu, permettent également l'oxygénation de la culture. La surface non immergée dans le liquide se

renouvelle et se charge en oxygène à chaque rotation. Pour intensifier le transfert d'oxygène au sein de liquide, des agitateurs à trois pales perforées ont été placés (voir paragraphe suivant) entre les disques dans quelques expériences.

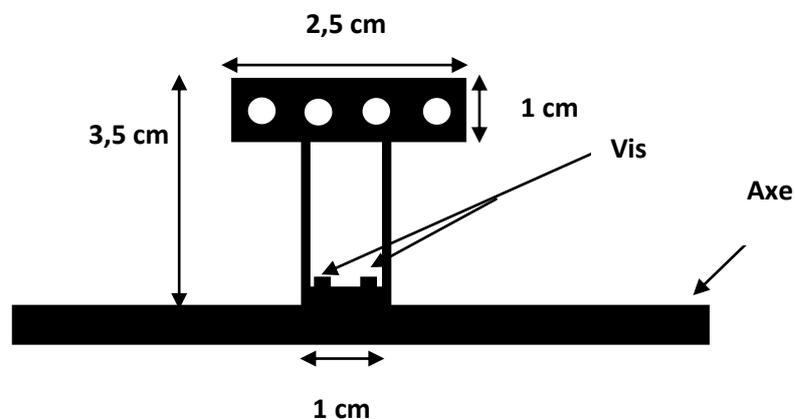
### 2.3.1. Présentation du bioréacteur à disques

#### 2.3.1.1. Dimensionnements et configurations

Le bioréacteur à disques est un cylindre de 40 cm de longueur et 10 cm de diamètre. Les disques hydrophiles sont en inox de 9,4 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur (Figure 16). Les agitateurs à trois pales perforées sont schématisés et présentés à la Figure 17.



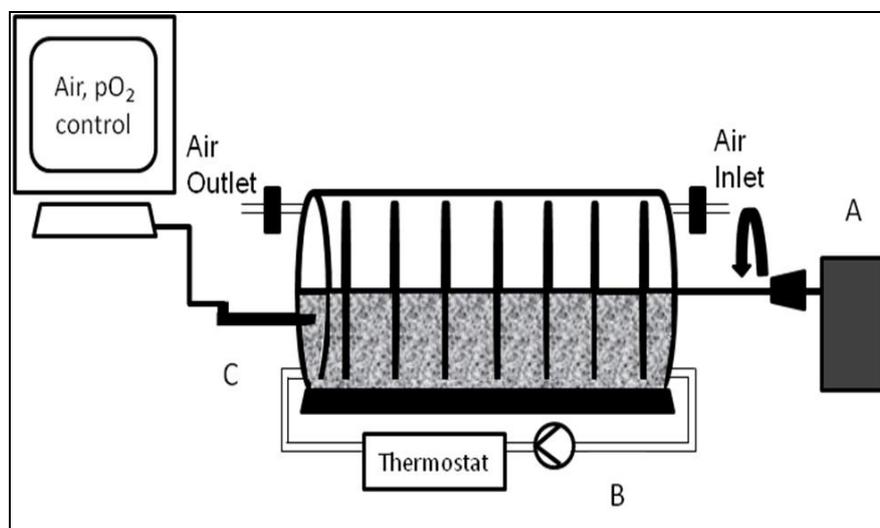
*Figure 16: Photographie du bioréacteur à disques rotatifs*



*Figure 17: Schéma d'une pale perforée*

Les disques et les agitateurs tournent sur l'axe grâce à une vitesse rotationnelle fixée au préalable par un moteur tournant. L'homogénéité du milieu de culture dans le bioréacteur est assurée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique comme le montre la représentation schématique (Figure 18 et Figure 19).

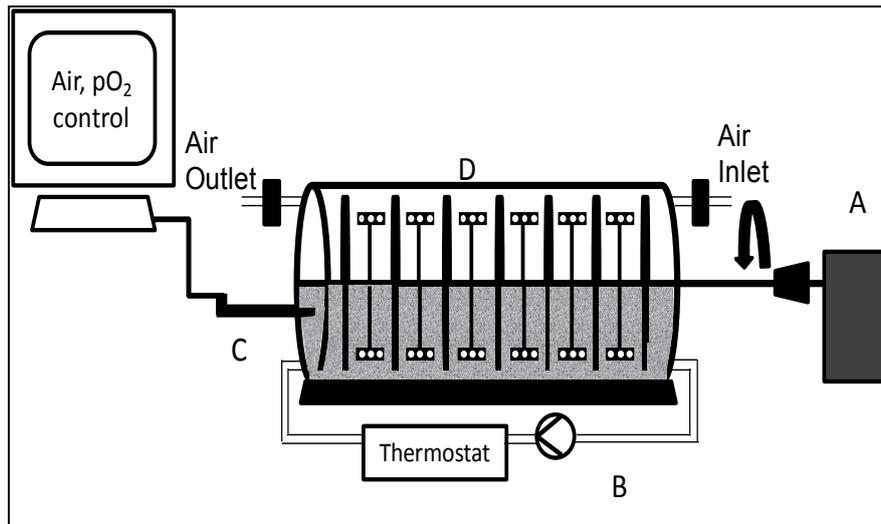
Les disques et les agitateurs sont entraînés grâce à un moteur à control de vitesse. La recirculation du milieu de culture dans le bioréacteur est assurée par l'intermédiaire d'une pompe péristaltique (Figure 18 et Figure 19).



**Figure 18:** Schéma du bioréacteur à disques

*A : moteur rotatif ; B : pompe péristaltique ; C : Electrode à oxygène dissous*

Dans ce procédé, l'aération se fait par les interfaces gaz-liquide, plus précisément tangentiellement aux surfaces liquides formées. Ce type d'aération permet un certain apport d'oxygène nécessaire à la croissance bactérienne et la production des surfactines et des fengycines mais évite la formation de mousse générée dans les procédés à bullage.



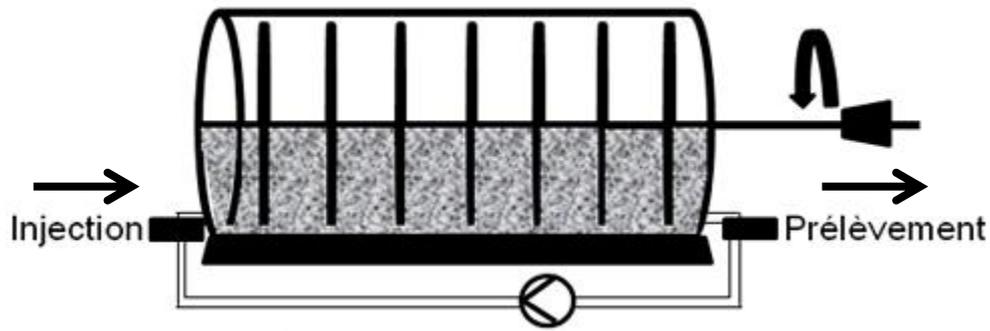
**Figure 19:** Schéma du bioréacteur à disques rotatifs avec agitateurs

A : moteur rotatif ; B : pompe péristaltique ; C : Electrode à oxygène dissous ; D : Agitateurs

#### 2.3.1.2. Distribution du temps de séjour (DTS)

Nous avons mis en œuvre une méthodologie d'injection par impulsion au cours de ce travail. Ceci consiste à injecter dans un temps très court (injection «Dirac»), une quantité donnée du traceur.

Le traceur utilisé dans cette étude est une solution de chlorure de sodium à  $100 \text{ g L}^{-1}$  dont 50 mL ont été injectés instantanément à l'entrée des différentes configurations du réacteur (Sans disques/Sans agitateurs ; Sans disques/6 agitateurs ; 7 disques/6 agitateurs ; 7 disques/sans agitateurs) sous forme d'un Dirac. Sachant que la vitesse optimale recommandée pour un procédé d'oxydation est de  $26 \text{ min}^{-1}$  (Nikolov *et al.*, 2002), une vitesse angulaire de  $30 \text{ min}^{-1}$  a été sélectionnée. Chaque minute un échantillon est prélevé à la sortie du bioréacteur et une mesure de la conductivité est réalisée. Lorsque les valeurs sont stables l'échantillonnage s'achève.



**Figure 20 :** Représentation schématique du bioréacteur à disques rotatifs utilisé pour déterminer la distribution du temps de séjour

### 2.3.1.3. Mesure du $K_La$

Pour chaque configuration du bioréacteur, le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène ( $K_La$ ) est mesuré dans les mêmes conditions que celles mises en œuvre dans les procédés de fermentation, à l'exception du milieu de fermentation remplacé par de l'eau distillée. L'oxygène dissous est mesuré avec une sonde à oxygène immergée (Mettler Toledo, Viroflay, France). Les valeurs du  $K_La$  sont mesurées selon la méthode du dégazage à l'azote : l'arrivée de l'oxygène (air) est coupée, l'azote est injecté dans l'eau et dans la partie supérieure (vide) du réacteur pour chasser tout l'oxygène présent et jusqu'à l'obtention d'une valeur nulle d'oxygène dissous. La mesure de la remontée de la valeur d'oxygène dissous est mesurée après réouverture de l'arrivée d'air (Trible *et al.*, 1995 ; Yeh *et al.*, 2006).

Le bilan relatif à l'absorption d'oxygène sans réaction chimique s'écrit comme suit :

$$dC_L/dt = K_La (C_L^* - C_L(t)) \quad (16)$$

L'équation qui permet d'identifier le  $K_La$  est la suivante :

$$\ln (C_L^* - C_L / C_L^* - C_L^0) = K_La t + \text{constante} \quad (17)$$

avec :

- $C_L^*$  étant la concentration de l'oxygène résiduel dans le fermenteur.
- $C_L^0$  étant la concentration de l'oxygène résiduel initiale dans le fermenteur.

- $C_L$  étant la concentration de l'oxygène résiduel à un temps donné dans le fermenteur.

La valeur du  $K_{La}$  correspond à la pente de la droite de la fonction  $\ln = f(t)$ .

### 2.3.2. Conditions expérimentales de production

La mise en place de culture bactérienne nécessite la maîtrise de la stérilité quant au matériel, verrerie, bioréacteur, connections et outils nécessaires aux différents prélèvements. La stérilisation du bioréacteur et des connections se fait par autoclave pendant 30 minutes à 110°C pour éviter l'usure des joints. Tout le reste du matériel est stérilisé 20 minutes à 121°C. Le volume réactionnel du fermenteur est de 1,2 litre. Le milieu Landy à pH 7 tamponné avec du MOPS est préparé dans des conditions stériles à partir des solutions stocks et ensuite versé dans le bioréacteur.

Dans toutes les expériences la température de 30°C a été régulée par un thermostat. Pour favoriser le mélange dans le bioréacteur, le milieu de culture circule avec une pompe péristaltique avec un débit de 70 mL min<sup>-1</sup>. L'air entrant est filtré au travers d'un filtre stérilisant de 0,2 µm.

L'électrolyte de la sonde à oxygène est renouvelé à chaque expérience. La sonde à oxygène est calibrée après autoclavage du bioréacteur lorsque le milieu de culture atteint la température de 30°C. Le 0 % de pO<sub>2</sub> est obtenu en reliant le câble de la sonde à la masse et le 100 % pO<sub>2</sub> en saturant le milieu en air (1 heure d'aération en surface). Après le calibrage de la sonde à oxygène, la souche bactérienne est inoculée (T0 de l'expérience). La densité optique initiale dans le bioréacteur au temps zéro est ajustée à 0,1 DO.

Le logiciel de commande du processus et d'acquisition des données (AFS Biocommand -New Brunswick Scientific) contrôle le débit de l'air et mesure l'oxygène dissous pendant tout le procédé.

### 2.3.3. Les configurations des bioréacteurs

Plusieurs expériences ont été effectuées sur le bioréacteur à disques dans le but de trouver les conditions optimales pour une meilleure production de lipopeptides par la souche *B. subtilis* ATCC 21332.

Toutes ces expériences se sont déroulées à 30°C (Chollet-Imbert *et al.*, 2008 ; Gancel *et al.*, 2009 ; Coutte *et al.*, 2010), le volume réactionnel est de 1,2 litre de milieu de Landy pH 7 tamponné avec du MOPS 0,1 M, la DO initiale est 0,1 DO et le milieu de culture circule avec une pompe péristaltique avec un débit de 70 mL min<sup>-1</sup>.

Le mode de culture de toutes les expériences qui suivront étant le mode fermé (Batch), la durée de l'expérience dans le bioréacteur à disques est de 72 heures et la souche utilisée est *B. subtilis* ATCC 21332.

#### 2.3.3.1. Aération du bioréacteur à disques

L'aération de la culture en bioréacteur à disques est assurée par une aération en surface par débit fixé au préalable et restant constant pendant toute l'expérience. En effet, trois débits d'air ont été testés, notamment 200 L h<sup>-1</sup>, 100 L h<sup>-1</sup> et 0 L h<sup>-1</sup>.

#### 2.3.3.2. Variation du nombre de disques

Les disques en acier inoxydable assureront l'adhésion des cellules de *B. subtilis* et la formation de biofilm dans les conditions optimales. L'adhésion des cellules dans ce réacteur se fait sur les deux faces des disques rotatifs. Pour voir l'effet des disques sur la production de surfactines et de fengycines, plusieurs expériences ont été menées avec une variation du nombre de disques. Le choix a été fait pour 14 disques, 7 disques. L'expérience sans disques n'a pas été réalisée à cause de la formation de pellicule à la surface stagnante du milieu de fermentation. La pellicule ainsi formée, augmentera la production des lipopeptides, ce qui faussera les études comparatives qu'on va faire (Chollet-Imbert *et al.*, 2008).

#### 2.3.3.3. Variation du nombre d'agitateurs

L'ajout des agitateurs dans le bioréacteur à disques a pour fonction l'agitation et le mélange du milieu dans le but de rendre le réacteur parfaitement mélangé et donc la disponibilité du substrat dans n'importe quel emplacement du réacteur. On limitera ainsi les zones mortes. Les agitateurs utilisés sont des composés de trois pales perforées pour éviter la formation de biofilm et pour obtenir une meilleure agitation dans le milieu de culture.

Des expériences ont été réalisées avec 9 agitateurs, 6 agitateurs ou 0 agitateur.

#### 2.3.3.4. Variation de la vitesse rotationnelle

Le facteur hydrodynamique de la vitesse rotationnelle étant très important. En effet, la vitesse rotationnelle est un paramètre qui joue un rôle crucial dans l'adhésion des cellules sur les disques. En même temps, le film liquide présent sur les disques en rotation dépend de cette vitesse. En effet plus la vitesse est forte, plus le renouvellement de ce film est plus rapide. Cependant, à de très fortes vitesses cela risque de projeter le liquide hors du disque limitant ainsi la formation du biofilm. Pour cela, trois vitesses ont été testées : 42, 30 et 6  $\text{min}^{-1}$ .

Des échantillons de culture de 5 mL sont régulièrement prélevés stérilement à l'aide d'un bec Bunsen portatif permettront d'effectuer les mesures suivantes :

- Une mesure de la densité optique à 600 nm
- Une mesure du pH
- Une mesure du poids sec
- Un prélèvement du surnageant de culture pour le dosage des lipopeptides par CLHP : 3 mL de culture sont centrifugés 10 min à 10000  $\text{min}^{-1}$  à 15°C et le surnageant de culture est conservé à -20°C.
- Un contrôle de la pureté par isolement sur boîte de gélose LB en fin de culture

#### **2.3.4. Arrêt de culture et nettoyage du bioréacteur à disques**

Après la fin de la culture de 72 heures, le bioréacteur est vidé à l'aide d'une pompe péristaltique. Le bouillon de culture est centrifugé 10 min à 10000  $\text{min}^{-1}$  à 15°C et le surnageant de culture est conservé à 4°C pour les éventuelles analyses ou pour les extractions liquide-liquide. Les disques sont enlevés et subissent les analyses concernant la caractérisation de la biomasse immobilisée (§ 3.1.3).

Le bioréacteur ainsi vidé, rempli avec 1,5 litre d'eau distillée est passé en autoclave pour une décontamination pour une durée de 30 minutes à 110°C. A la fin de cette décontamination, le bioréacteur est démonté et chaque élément est lavé avec du détergent ensuite rincé abondamment avec de l'eau distillée et mis dans une étuve pour sécher.

### **3. Analyses**

#### **3.1. Mesure de la biomasse**

##### **3.1.1. Biomasse libre**

La mesure de la biomasse est faite par deux techniques, celle de la densité optique et celle du poids sec. En effet, la mesure de la densité optique à une longueur d'onde de 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) est faite grâce à un spectrophotomètre SECOMAM Prim (SECOMAM, Domont, France).

La technique du poids sec consiste à déterminer la quantité de matière sèche dans un échantillon. Les coupelles utilisées pour ces mesures sont préalablement mises à 105°C pendant 48 heures avant d'être pesées à vide. Cinq mL de culture sont centrifugés à 10000  $\text{min}^{-1}$  pendant 10 minutes. Après avoir stocké le surnageant pour les analyses précédemment détaillées, le culot est lavé une fois avec 10 mL d'eau distillée et centrifugé 10000  $\text{min}^{-1}$  pendant 10 minutes. La conservation des culots bactériens se fait à -20°C en attendant que les mesures soient faites ensemble pour une même expérience. Chaque culot est homogénéisé dans 10 mL d'eau distillée et déposé dans une coupelle de masse connue, est placé dans une étuve à 105°C pendant 48 heures. En fin, une pesée permettra de déterminer la quantité de matière sèche dans un échantillon.

##### **3.1.2. Biomasse immobilisée sur billes**

La quantification de la biomasse immobilisée sur les billes de PPch a lieu juste après l'étape de colonisation. Cette technique consiste à placer les billes dans 4 mL d'eau distillée et à les soniquer à 20 KHz pendant 2 minutes (Ultrasonic Biobloch Scientific, Model 75038).

Le nettoyage et la préparation des billes se fait en trois étapes : une décontamination à 121°C pendant 20 minutes par la suite un lavage sous l'eau courante. Une deuxième étape de lavage qui est la plus lente et qui consiste à les vortexer une minute dans une solution de SDS à 10%, les laver dans du tampon phosphate pH 7 (2 fois 100 mL). Par la suite les soniquer à 20 KHz pendant 2 minutes (Ultrasonic Biobloch Scientific, Model 75038) et laver les billes dans une solution de NaOH à 5% à 70°C pendant 1 heure, et enfin les rincer trois fois à l'eau

distillée et les sécher en étuve. La dernière étape est une étape de stérilisation en tube à 121°C pendant 20 minutes qui n'est qu'une préparation des billes pour une éventuelle utilisation.

### **3.1.3. Caractérisation de la biomasse immobilisée sur les disques**

Concernant les biofilms formés sur les disques, seule la quantité de la matière sèche est déterminée après 72 heures de culture. En effet, les biofilms se trouvant sur les disques sont raclés des deux faces ensuite lavés avec de l'eau distillée, centrifugés comme décrit précédemment pour déterminer le poids sec du biofilm sur chaque disque.

- Observation du biofilm par microscopie à épi-fluorescence

L'observation des biofilms formés sur les disques du bioréacteur se fait grâce à un microscope à épi-fluorescence (Nikon, Optiphot-2, Japan). Après 72 heures de fermentation, les disques sont retirés, rincés avec de l'eau distillée. Un marquage par de l'acridine orange se fait en appliquant 5 mL d'une solution d'acridine orange préalablement préparée à 0,01 % poids/volume dans un tampon acétate. Le marquage dure une dizaine de minutes et ensuite les disques sont rincés avec 10 mL d'eau distillée pour enlever l'excès du marqueur. Les biofilms marqués sont ainsi observés correctement sur les disques. L'acridine orange a pour rôle de colorer les cellules en orange.

## **3.2. Préparation des échantillons et quantification des lipopeptides**

### **3.2.1. Préparation des échantillons**

Deux types de conditionnements sont utilisés pour le dosage des lipopeptides par CLHP, le premier consiste en une simple filtration du surnageant de culture à doser sur un filtre de cellulose 0,22 µm concernant les échantillons issus des différentes fermentations.

Le second concerne les échantillons issus d'extraction liquide-liquide ou de pertraction qui ne contiennent que de faibles quantités de lipopeptides. En effet, une purification et une concentration sur colonne C18 (Alltech, USA) a été nécessaire. La colonne C18 est conditionnée par 20 mL de méthanol (Acros Organics, USA) 100% puis rincée avec 10 mL

d'eau ultra pure, 1 mL d'échantillon est ensuite déposé et on fait un lavage à 8 mL d'eau ultra pure. Enfin, les lipopeptides retenus par la cartouche sont élués avec 8 mL de méthanol 100%. L'éluât est évaporé grâce à un évaporateur sous vide (Speed Vac Plus SC110A, Savant, GMI, Ramsey, USA) jusqu'à obtenir un dépôt sec. Ce dépôt est repris dans 200 mL de méthanol 100% et sont injectés en chromatographie liquide haute performance en phase inverse.

L'avant dernière étape de la récupération des lipopeptides des cartouches C18 qui consiste à un lavage des cartouches avec 8 mL d'eau ultra pure pour enlever les sels et les éventuelles impuretés a été longuement étudiée. En effet, une étude sur l'effet du méthanol à décrocher la surfactine a été faite.

Pour cela différents tests sur un même échantillon ont été réalisés avec des solutions de lavages d'eau ultra pure contenant différentes proportions de méthanol. Le but étant de trouver la bonne solution de lavage qui permet de garder tous les lipopeptides sur la cartouche C18. En effet sept solutions d'eau ultra pure et de méthanol ont été testées : 100% eau ; 95% eau et 5% méthanol ; 90% eau et 10% méthanol ; 85% eau et 15% méthanol ; 80% eau et 20% méthanol ; 50% eau et 50% méthanol et 100% méthanol. Ces tests préliminaires ont permis de choisir la solution optimale pour éliminer les sels et garder les lipopeptides.

### **3.2.2. Dosage des lipopeptides par chromatographie liquide haute performance en phase inverse (CLHP)**

Les échantillons sont dosés grâce à un système CLHP (WATERS, Online Degaser, 717 Autosampler, 660S Controller, 626 Pump, 2996 PhotoDiodeArray ; Waters Corporation, Milford, MA, USA). La colonne utilisée est une C18 (Vydac, 5 $\mu$ m, 250x3.0 mm, 218TP ; Grace, Deerfield, Illinois, USA). Pour chaque échantillon, on effectue deux dosages, le premier pour les surfactines et le deuxième pour les fengycines. Pour le premier, 20  $\mu$ L sont injectés à un débit de 0,6 mL min<sup>-1</sup>.

Les résultats obtenus sont comparés au standard de surfactine injecté à 1g L<sup>-1</sup> (fourni par Dr. François Coutte). L'élution est réalisée pendant 20 minutes en mode isocratique par un mélange de solvant composé d'acétonitrile/eau/acide trifluoroacétique 80/20/0,1 (v/v/v).

L'élution des fengycines se fait par le même mélange avec un gradient de 45/55/0,1 jusqu'à 55/45/0,1 pendant 30 minutes ensuite en isocratique à 55/45/0,1 pendant 10 minutes. Le standard de fengycine a été également fourni par Dr. François Coutte. Le temps de rétention ainsi que la dérivée seconde du spectre entre 200 et 400 nm (barrette de diodes, PDA

2996, Waters) de chaque pic sont automatiquement analysés à l'aide du logiciel Millennium pour permettre l'identification des molécules éluées.

### **3.3. Dosage du glucose, acide glutamique et des acides organiques par CLHP**

Ce dosage se réalise par CLHP Spectra SYSTEM P1000 XR Thermoelectron Corporation (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, U.S.A.), dans une colonne Fast fruit juice (co-polymère de sulfonate et styrène-divinylbenzène, 7 µm, 7,8 x 150 mm, Waters). Une colonne de garde en co-polymère de sulfonate et de styrène-divinylbenzène (Grundy *et al.*, 1993) est placée en amont de la colonne. Les conditions opératoires sont les suivantes : le débit est fixé à 0,8 mL/min, la colonne est maintenue à 55°C grâce à un four pour colonne CLHP, l'éluant utilisé est une solution d'H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05%, le volume d'injection est de 20 µL, la détection est réalisée à l'aide d'un réfractomètre Spectra SYSTEM RI-150 (Thermoelectron Corporation) et le temps d'une analyse est de 8 min. L'échantillon ne demande aucun prétraitement, à part une filtration des surnageants de culture à travers un filtre de cellulose 0,22 µm. Chaque pic est identifié par son temps de rétention et les molécules sont quantifiées par rapport à une courbe étalon préalablement réalisée (grâce à des standards externes préalablement enregistrés) à l'aide du logiciel AZUR 4.6 (AZUR software, Datalys, France).

## 4. Extraction

### 4.1. Extraction liquide-liquide

Pour déterminer les conditions permettant d'appliquer la pertraction pour la récupération des lipopeptides de leur milieu de production, l'extraction liquide-liquide a été étudiée.

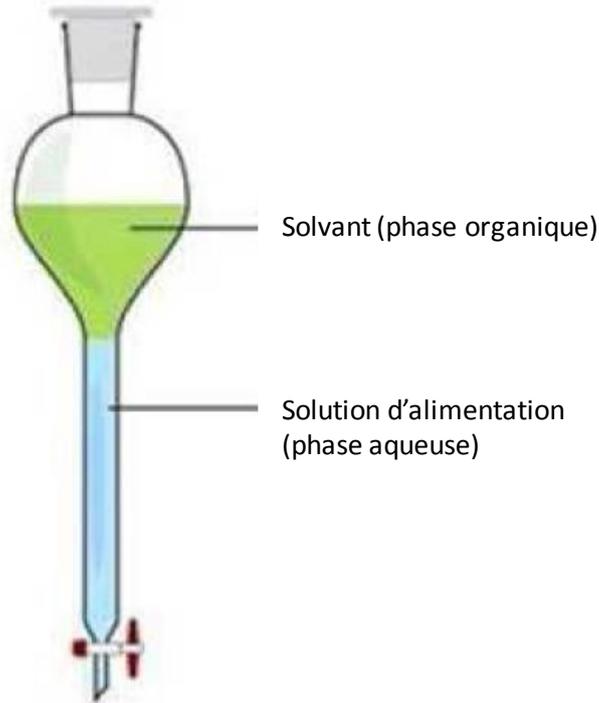
L'équilibre entre des phases aqueuses contenant des lipopeptides et des solvants organiques a été étudié dans des ampoules à décanter. Comme phase aqueuse des solutions individuelles modèles contenant respectivement  $50 \pm 5.0 \text{ mg L}^{-1}$  surfactine ou  $100 \pm 5.0 \text{ mg L}^{-1}$  fengycine, tamponnés avec une solution de phosphate de potassium ( $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1 M ont été utilisés. Comme solvant organique, du *n*-heptane (SDS, Val de Reuil) ou du dodécane (WWR International, Fontenay sous Bois) ont été utilisés. L'effet du pH sur l'affinité des lipopeptides par rapport aux solvants organiques et en conséquence sur le taux d'extraction de surfactine et de fengycine a été étudié. La plage des pH étudiés a été de 5,5 à 9,0.

Des ampoules à décanter de capacité 100 mL (SQUIBB, TGI Germany) ont été utilisées pour l'étude des équilibres entre les phases aqueuses et organiques. Le pH des solutions aqueuses a été mesuré avec un pH mètre type InoLab pH/ION Level 2 P (WTW GmbH and Co. KG, Germany).

Dans chaque ampoule, 15 mL de solution de lipopeptide préalablement tamponnés (0,2 M phosphate) ont été mis en contact avec un même volume de solvant organique (Figure 21). Afin d'atteindre l'équilibre le contact entre les deux phases a duré au moins 16 heures. Compte tenu de la présence de tensioactifs (les lipopeptides biosurfactants), des agitations très douces ont été faites (au moins quatre agitations dans des intervalles raisonnables). Il était important d'éviter la formation d'émulsion stable à l'interface entre les deux phases.

Au début de chaque manipulation et pour chaque ampoule, un volume de 1 mL de la phase aqueuse initiale (phase d'alimentation) a été prélevé et préparé selon la deuxième technique de préparation des échantillons (détaillée dans le § 3.2.1) pour déterminer les concentrations initiales en lipopeptides.

De même, à la fin de la manipulation, 1 mL de chaque phase aqueuse finale a été prélevé de chaque ampoule pour déterminer la concentration des lipopeptides restants et calculer le taux d'extraction et de passage de ces molécules vers la phase organique.



*Figure 21: Représentation schématique d'extraction liquide-liquide*

La distribution (ou le partage) d'un soluté entre deux phases à l'équilibre est donnée par le coefficient de partage ( $K_d$ ). Ce dernier se définit par le rapport des teneurs respectives du soluté, dans chaque phase lorsque l'équilibre est atteint :

$$K_d = C_{org}^* / C_{aq}^* \quad (18)$$

Les coefficients de partage seront par la suite calculés en utilisant la formule ci-dessus pour chaque cas pour déterminer les meilleures conditions d'extraction et de dés-extraction.

## 4.2. Pertraction

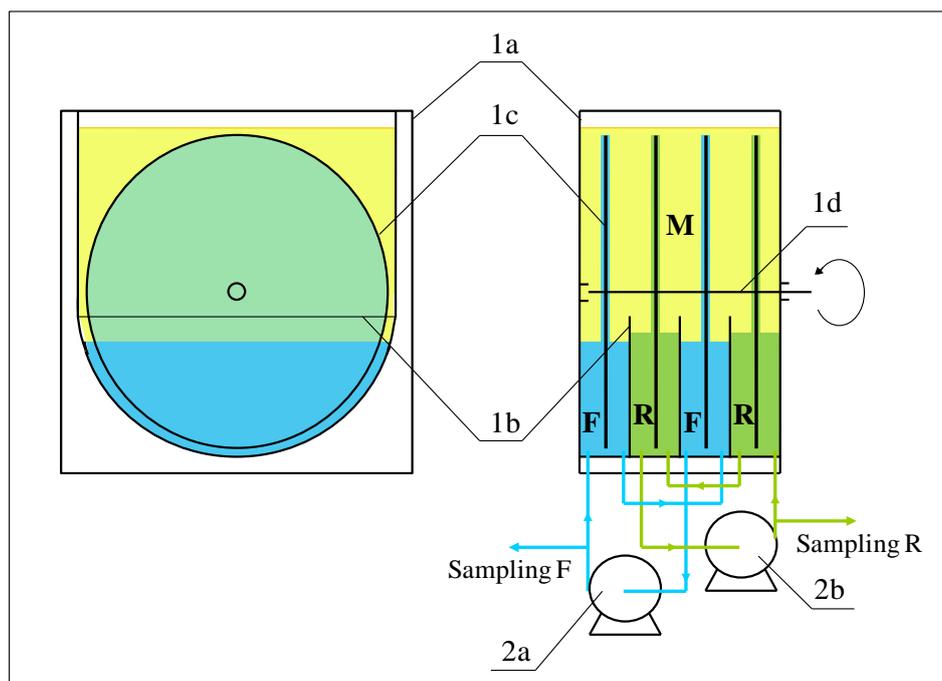
La technique de séparation des lipopeptides de leur milieu de production a été la pertraction dans nos études. Le choix de cette technique est justifié par le fait de récupérer les molécules transportées dans une nouvelle phase aqueuse, de la sélectivité de la membrane liquide par rapport aux autres techniques membranaires qui ont un très grand inconvénient : l'encrassement et leur micro-perforation qui diminue énormément leur sélectivité. D'un autre côté, la pertraction n'a jamais été utilisée pour la récupération de surfactine ou de fengycine à

partir de leur milieu de production sauf pour le cas de molécules modèles (surfactine) préalablement purifiées (Dimitrov *et al.*, 2008).

#### **4.2.1. Présentation du contacteur à disques tournants**

Les pertractions ont été réalisées dans un appareil de pertraction nommé : contacteur à disques tournants (Figure 22 et Figure 23). Les phases aqueuses d'alimentation (F) et de réception (R) occupent la partie inférieure de l'appareil qui est divisée en quatre compartiments identiques (deux compartiments pour la phase d'alimentation et deux compartiments pour la phase de réception). La phase organique (M) occupe la partie supérieure commune de telle façon qu'elle soit en contact avec les deux phases aqueuses. Dans chaque, compartiment, se trouve un disque tournant qui est en partie immergé dans la phase aqueuse correspondante. Chaque disque (18 cm de diamètre et 1 mm d'épaisseur) est recouvert d'un tissu hydrophile (coton).

La rotation des disques provoque la formation des films aqueux sur les surfaces hydrophiles des disques et leur renouvellement continu au cours de la pertraction. Ainsi, le film aqueux sur les disques provenant de chacune des phases aqueuses est en contact direct et permanent avec la phase organique permettant le transfert des molécules extractables. La surface de contact entre la phase organique (M) et chacune des phases aqueuses (F) et (R) est de 700 cm<sup>2</sup>. La rotation des disques assure aussi le mélange de chacune des trois phases dans l'appareil. Les deux pompes péristaltiques 2a et 2b font circuler les phases aqueuses pour une homogénéité meilleure et pour permettre de prélever des échantillons



**Figure 22:** Représentation schématique du pertracteur.

1 : Contacteur à disques tournants (1a : le corps de l'appareil ; 1b : parois de séparation des compartiments ; 1c : disques rotatifs ; 1d : axe de rotation) 2 : Pompes péristaltiques (2a : pompe pour la phase F ; 2b : pompe pour la phase R) F : solution d'alimentation ; R : solution de réception ; M : membrane liquide

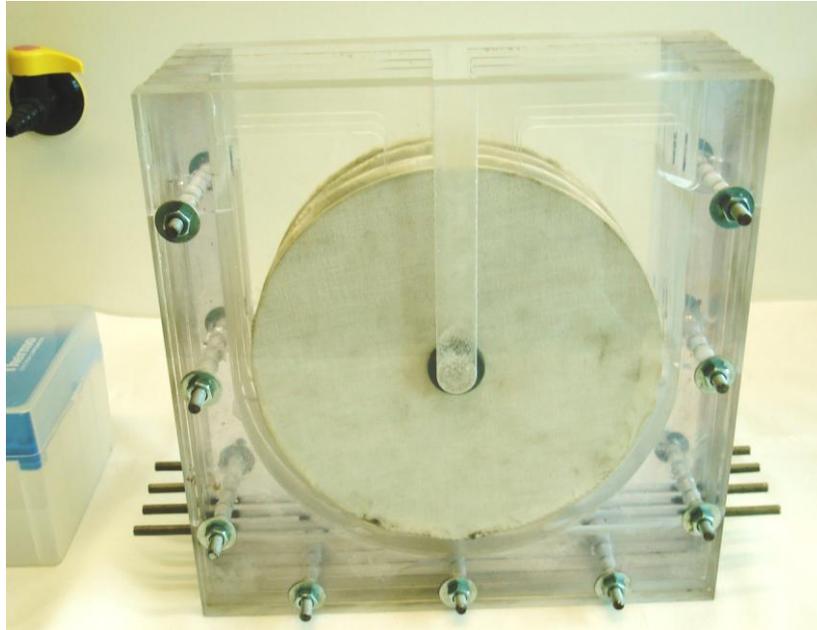
#### 4.2.2. Conditions expérimentales

Les paramètres optimaux déterminés par les études des équilibres en ampoules nous ont permis de réaliser les expériences de pertractions suivantes. Ces paramètres correspondent aux pH des deux phases F et R ainsi qu'au choix du solvant organique.

Les volumes des phases aqueuses F et R ont été de 270 mL chacun. La phase d'alimentation (F) a été préparée à partir d'un surnageant de culture comme expliqué précédemment (§ 4.1). En effet le surnageant a été dilué et tamponné à pH 5,7 avec une solution de phosphate de potassium ( $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de phosphate). La phase réceptrice est une solution aqueuse à  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  de tampon phosphate à pH 7,3. Comme membrane liquide, 1250 mL de *n*-heptane ont été utilisés.

Les expériences ont été réalisées sous hotte chimique à une température de  $22 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . La vitesse rotationnelle des disques a été fixée à  $10 \text{ min}^{-1}$ . Le choix de cette vitesse relativement faible est justifié par le fait de la présence de molécules tensioactives et le risque

de former des gouttelettes fines des solutions F et R dans la phase organique et le passage des gouttelettes d'une phase aqueuse à l'autre.



*Figure 23: Photographie du contacteur à disques tournants*

A intervalle de temps régulier, des prélèvements de 1,5 mL ont été effectués à partir de la phase d'alimentation (F) et de la phase de réception (R) jusqu'à la fin des expériences qui ont duré généralement 6 heures. Pour chaque échantillon, une préparation a été faite selon la deuxième technique de préparation des échantillons précédemment détaillée (§ 3.2.1) pour déterminer la concentration en lipopeptides présents. Pour se rassurer que les conditions aux interfaces de contact restent optimales au cours de la pertraction, des mesures du pH des phases F et R ont été réalisées pendant et à la fin de l'expérience de pertraction.

**Chapitre III**  
**RESULTATS et DISCUSSION**

## 1. Production des lipopeptides de *Bacillus subtilis* en fioles d'Erlenmeyer

### 1.1. Introduction

Comme décrit dans la partie bibliographique, les lipopeptides produits par *B. subtilis* présentent un large champ d'applications potentielles dans de nombreux domaines grâce à leurs propriétés tensioactives (§ 1.4). Dans la plupart des études récentes, la production en surfactine en bioréacteur est réalisée avec la souche *B. subtilis* ATCC 21332, car elle est considérée comme souche modèle productrice d'une seule famille de lipopeptides, les surfactines. L'extrapolation industrielle reste encore difficilement réalisable du fait des propriétés moussantes de ces molécules tensioactives et des conditions aérobies en bioréacteur agité. Un autre problème reste aussi très limitant pour la production à grande échelle qui n'est autre que la faible production de lipopeptides par les souches sauvages. Cependant, plusieurs techniques ont été mises en œuvre pour répondre à ces problèmes. En effet, ces techniques consistent soit à collecter la mousse qui déborde soit à modifier par génie génétique les souches sauvages pour augmenter les taux de production. Un procédé réussi après extrapolation c'est: des objectifs de production atteints; la qualité du produit obtenue; le prix de revient respecté; les contraintes sécurité et environnement respectées. Le succès du procédé va dépendre : des résultats issus de la recherche, des études préliminaires entreprises à l'échelle du laboratoire et pilote et bien sûr du mode d'extrapolation. Le procédé de production de surfactants dans des milieux agités et aérés provoque sans contestation un fort moussage entraînant un débordement du milieu de culture ainsi que des cellules (§ 1.5). On peut conclure que la maîtrise du flux d'oxygène et de l'énergie mécanique dissipée dans le réacteur gaz-liquide est le problème clé pour le passage en échelle industrielle ainsi que pour le métabolisme de cellules. D'autre part, des paramètres typiques d'ingénierie peuvent être étudiés dans des fioles pour définir les conditions culturelles de production. Il est connu que, le transfert d'oxygène, la puissance consommée et le temps de mélange sont des paramètres basiques pour un passage en échelle. On peut citer, qu'environ 90 % de cultures cellulaires et procédés fermentaires sont étudiés dans des fioles. (Büchs *et al.*, 2001). Donc, l'influence de l'aération par interfaces et la modification du contact interfaciale peut être étudiée correctement dans un tel type d'équipement.

Enfin, le but de cette étude est de mettre au point une technique originale d'aération par interfaces, sans bulles, pour produire des lipopeptides de *B. subtilis* ATCC 21332 sans

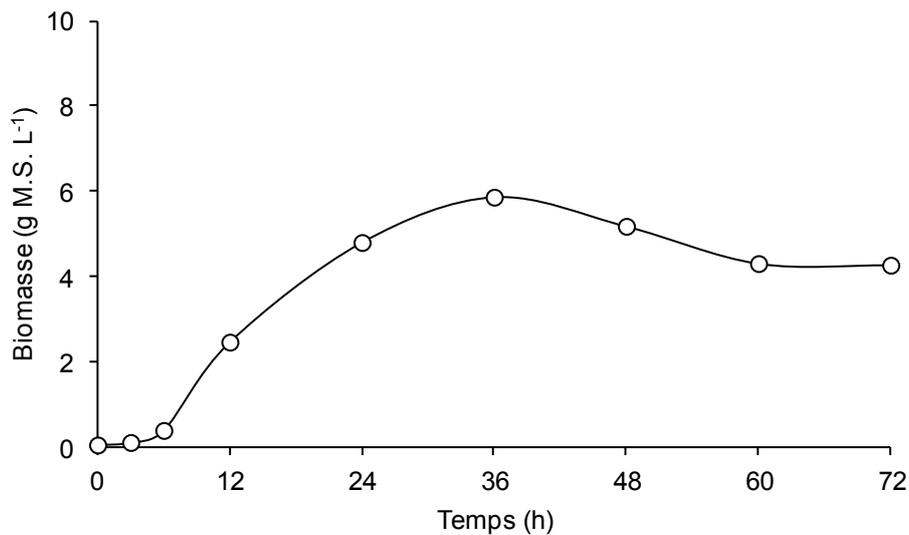
formation de mousse et en améliorant la production. Cette technique repose aussi sur la culture de cellules immobilisées sur des supports solides dans des fioles d'Erlenmeyer. La production a été réalisée avec des cellules planctoniques et des cellules immobilisées sur des surfaces solides dans le but de faire une étude comparative. Des études, préalablement effectuées au laboratoire sur différentes surfaces polymériques, ont permis de choisir le polypropylène expansé, un support flottant, greffé de la poudre de charbon actif. Ce support (PPch) a été utilisé pour l'immobilisation et la production des lipopeptides. Ce choix permet d'avoir une surface solide en contact direct avec la phase gazeuse. Pour éviter le phénomène de moussage durant la production des biosurfactants, l'air nécessaire à cette souche aérobique est disponible à la surface du milieu de fermentation en contact direct avec les billes qui supportent le biofilm. Dans cette première partie, nous analyserons les performances de cette nouvelle technique comparée à une culture de cellules planctoniques et étudierons l'effet de l'immobilisation des cellules de *B. subtilis* ATCC 21332 sur la production des surfactines et des fengycines

## **1.2. Culture en fioles Erlenmeyer**

La souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été cultivée dans du milieu de Landy MOPS pH 7 à 30°C à 160 min<sup>-1</sup> pendant 72 heures en mode batch selon les conditions décrites précédemment (§ 2.1). Deux types de cultures sont comparés : la culture de cellules planctoniques et la culture de cellules immobilisées sur billes de polypropylène expansé de poudre de charbon actif PPch. Toutes les expériences ont été réalisées en triple.

### **1.2.1. Croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 libre en fioles d'Erlenmeyer ou immobilisé sur billes de PPch**

Le profil caractéristique de croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en fioles d'Erlenmeyer lors d'une culture batch est donné dans la Figure 24. La croissance commence par une phase d'adaptation pendant les trois premières heures, ensuite une phase exponentielle de croissance de 9 heures. La croissance devient ensuite presque linéaire et par la suite passe à une phase de déclin.



**Figure 24:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy MOPS pH 7 à 30°C à 160 min<sup>-1</sup> pendant 72 heures dans des fioles d'Erlenmeyer de 1 litre. Le volume de culture est de 100 mL

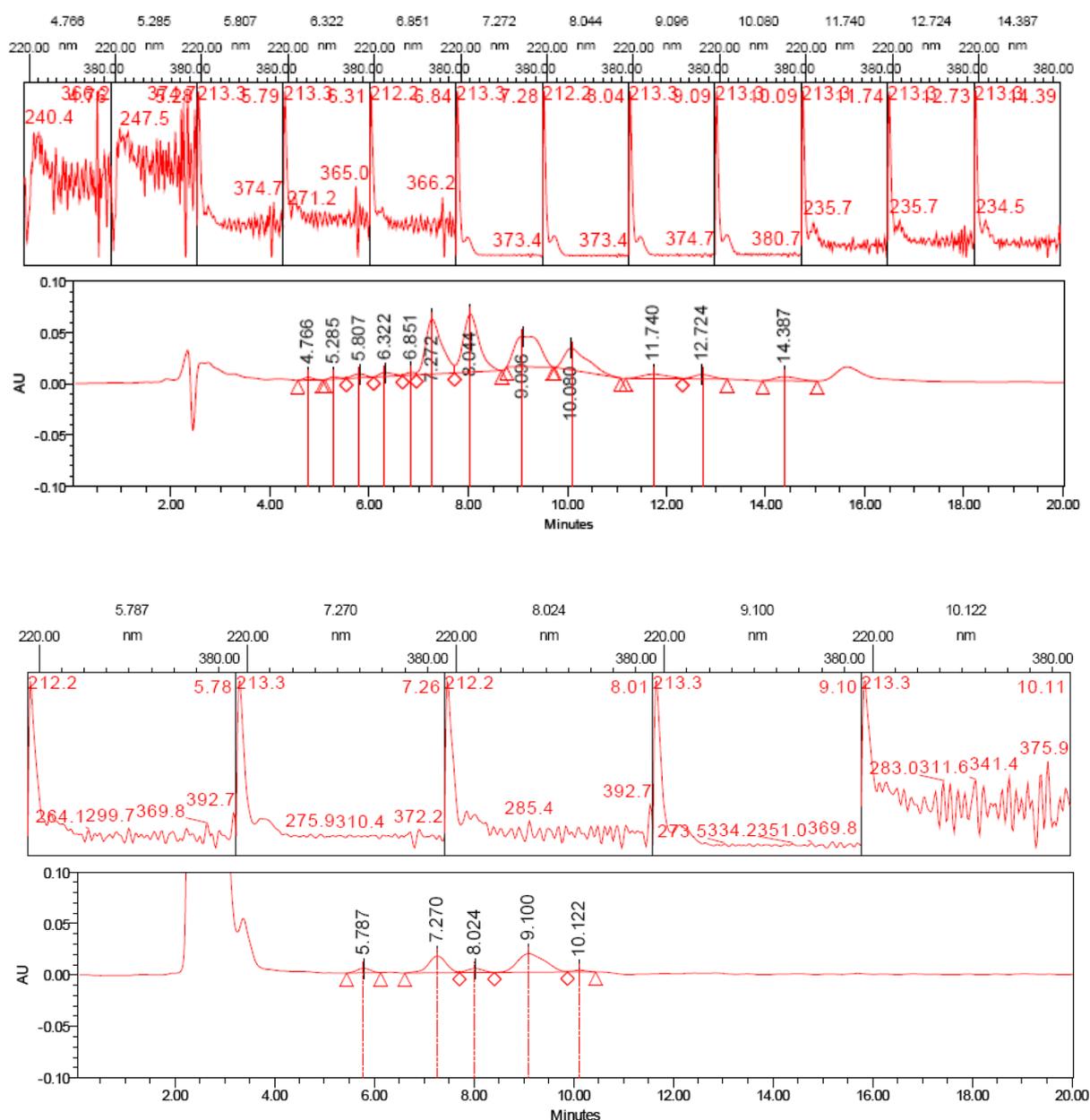
Durant la phase quasi linéaire, la croissance augmente jusqu'à atteindre une quantité maximale de 5,86 grammes de M.S à 36 heures. A la fin de l'expérience (72 heures), la croissance de la souche chute à une valeur de 4,25 grammes de M.S.

Concernant la croissance sur billes de PPch, le procédé s'est avéré stable (aucune mousse n'a été observée) lors de toute la manipulation et les billes ont présenté une stabilité quant au traitement thermique de stérilisation. Au niveau de la croissance, lors de la première étape correspondant à l'immobilisation de la biomasse sur les supports de PPch, l'estimation de la biomasse à 96 heures a atteint  $1,6 \cdot 10^8$  cellules par gramme de support.

La deuxième étape concerne l'analyse et la comparaison de la production des lipopeptides par les deux modes de culture : culture de cellules libres et culture de cellules fixées sur billes de PPch.

### 1.2.2. Production des lipopeptides

Le dosage des lipopeptides est réalisé par CLHP selon les conditions décrites précédemment (§ 3.2.2, Figure 25 et Figure 26).

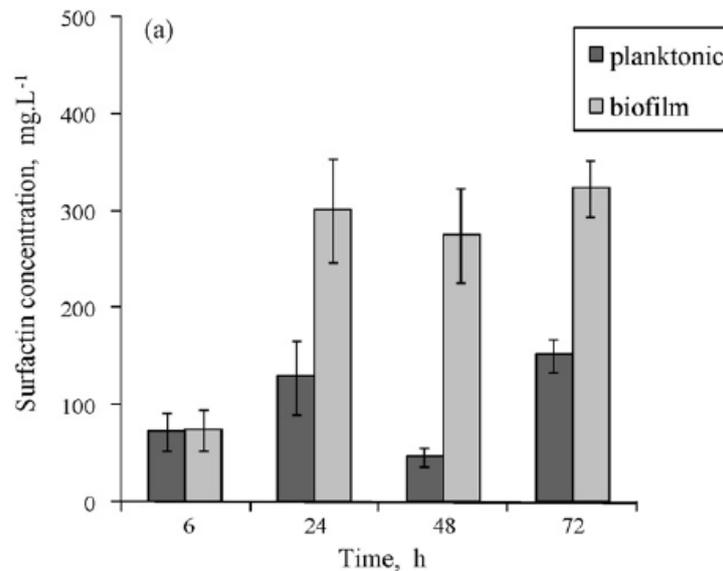


**Figure 25:** Chromatogramme CLHP de la surfactine et quantification par la méthode du standard externe.

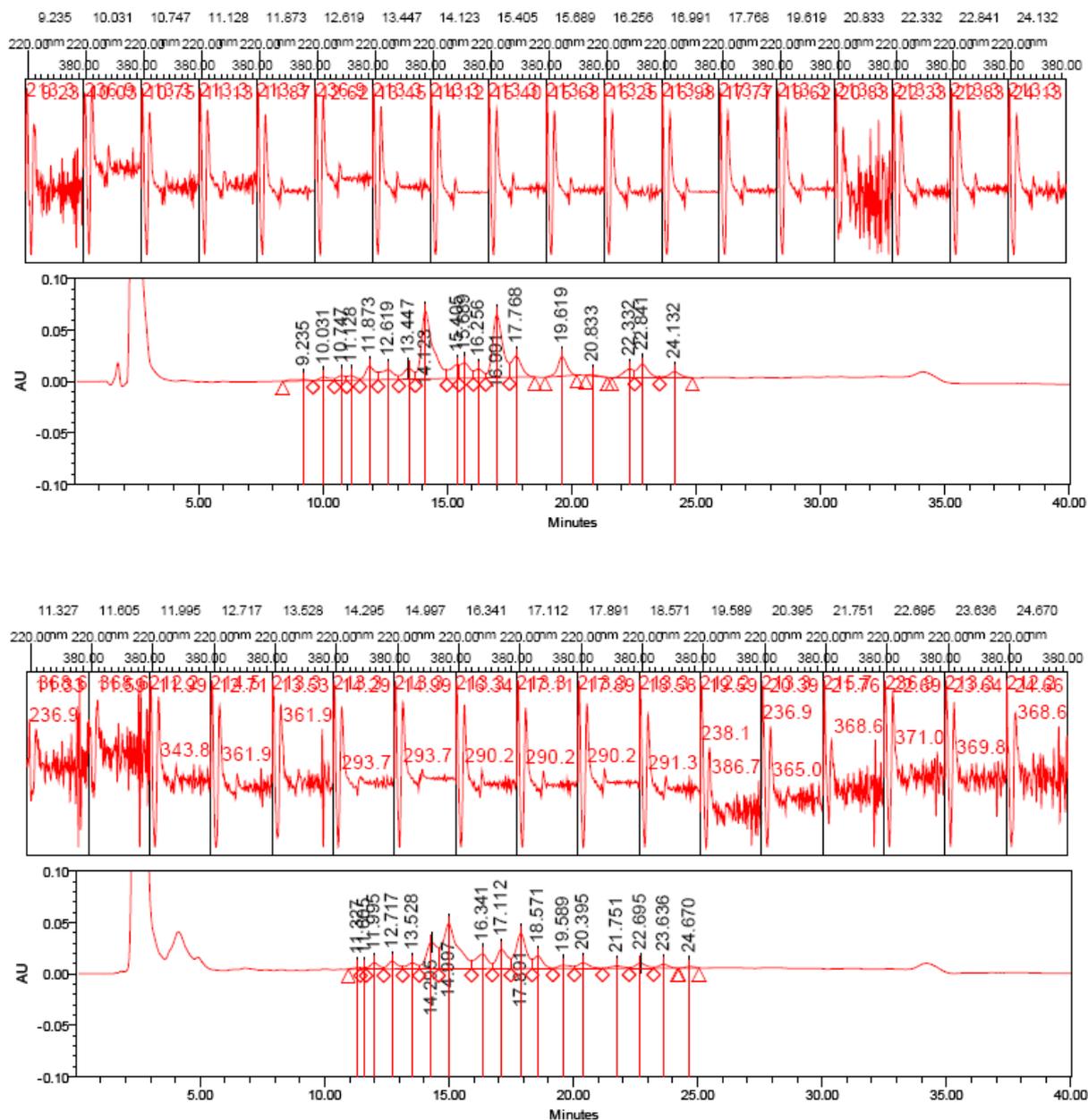
La dérivée seconde de chaque pic intégré est au dessus du chromatogramme. En haut : standard de surfactine à 1 g L<sup>-1</sup>. En bas : Echantillon issu de culture en bioréacteur à disques.

Les analyses de production montrent qu'au milieu de la phase exponentielle de culture (6 heures), la surfactine est secrétée à la fois par les cellules planctoniques dans l'expérience avec une culture de cellules libres et par les cellules immobilisées sur billes de PPch dans l'expérience avec biofilm. Les concentrations de surfactine sont de l'ordre de  $75 \text{ mg L}^{-1}$  dans les deux expériences (Figure 26). La production est ensuite accélérée pour les cellules en biofilm qui atteignent des concentrations de plus de  $300 \text{ mg L}^{-1}$  à la fin de l'expérience (72 heures).

En comparaison, la production de surfactine par des cellules libres reste deux fois moins importante (de l'ordre de  $150 \text{ mg L}^{-1}$ ).



**Figure 26:** Comparaison de la production de surfactine par *B. subtilis* ATCC 21332 entre des cultures de cellules libres et des cultures de cellules en biofilm immobilisées sur des billes de PPch

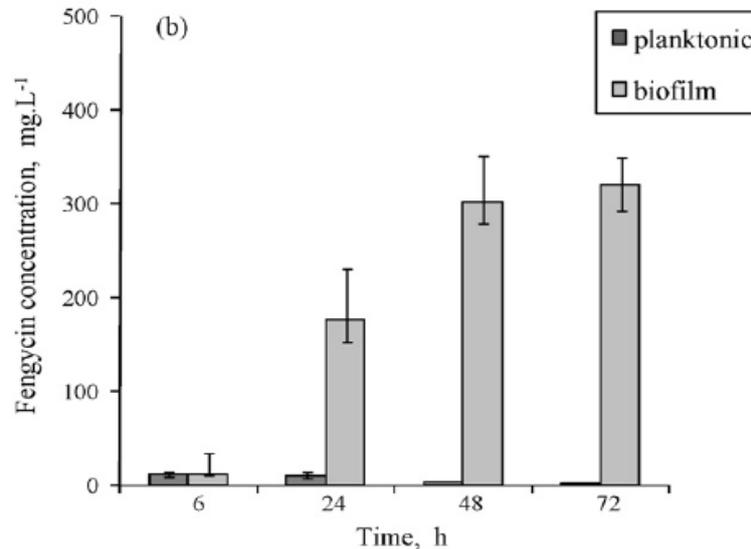


**Figure 27:** Chromatogramme CLHP de la fengycine et quantification par la méthode du standard externe.

La dérivée seconde de chaque pic intégré est au dessus du chromatogramme. En haut : standard de fengycine à  $1 \text{ g L}^{-1}$ . En bas : Echantillon issu de culture en bioréacteur à disques.

L'analyse de la Figure 28 montre que les cellules planctoniques produisent très peu de fengycines (moins de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Dans le procédé avec des cellules immobilisées, les cellules commencent à produire une petite quantité de fengycine après 6 heures de culture. A la fin du procédé avec les cellules en biofilm, des concentrations beaucoup plus importantes que pour

les cellules planctoniques sont trouvées dans la culture. En effet une concentration de plus de 300 mg L<sup>-1</sup> a été atteinte à 72 heures de culture.



**Figure 28:** Comparaison de la production de fengycine par *B. subtilis* ATCC 21332 entre des cultures de cellules libres et des cultures de cellules en biofilm immobilisées sur des billes de PPch

### 1.3. Discussion

Dans cette partie, nous avons proposé un procédé original de bioréacteur aéré sans bulles en utilisant des cellules préalablement fixées sur des billes de polypropylène expansé de poudre de charbon actif (PPch) qui flottent à la surface du milieu. Pour éviter le phénomène de moussage durant la production des biosurfactants, l'air nécessaire à cette souche aérobie est disponible à la surface du milieu de fermentation en contact direct avec les billes couvertes par le biofilm.

Par la suite nous avons démontré que le procédé avec les cellules immobilisées sur les billes permet une croissance de la bactérie et une production de deux types de lipopeptides (surfactine et fengycine).

Les billes de PPch permettent une meilleure adhésion des cellules hydrophiles grâce à leur surface hydrophile (engendrée par la poudre de charbon actif) et rugueuse. Dimitrov en 2007 a observé grâce à la microscopie à épi fluorescence que sur des supports de polystyrène et polyméthyle méthacrylate expansé de poudre de charbon actif PSpch, les cellules de *B.*

*subtilis* forment des agglomérations composées de plusieurs colonies distinctes et des biofilms relativement minces (D. Dimitrov, 2007). Après colonisation de *B. subtilis*, les surfaces deviennent plus hydrophiles rendant le procédé d'immobilisation plus rapide. La croissance du biofilm dépend des interactions entre les cellules fixées et le reste des cellules planctoniques. Cependant, la production de molécules amphiphiles qui conditionnent les propriétés de surface peut aussi agir sur cette croissance.

En analysant les résultats de la production des lipopeptides et en les comparant à la production de cellules planctoniques, nous pouvons dire qu'il semblerait que les cellules immobilisées améliorent la production des surfactines et des fengycines à partir des premières 24 heures de cultures.

Leclère et ses collaborateurs ont montré l'effet de la mouillabilité de surface (par la présence de lipopeptides) sur la croissance et la propagation des colonies de *B. subtilis* sur boîte (Leclère *et al.*, 2006). Les auteurs ont observé qu'à une faible concentration de 20 mg L<sup>-1</sup>, la mouillabilité est augmentée et l'effet invasif de la colonie est accéléré. Cependant des concentrations de lipopeptides très élevées inhibent et empêchent la propagation de la colonie.

Avec le temps, la surface du biofilm devient de plus en plus hydrophobe ce qui inhibe la croissance du biofilm et donc de la production des lipopeptides (Figures 26 et 28). Les lipopeptides peuvent former un film de conditionnement à la surface du biofilm et peuvent ainsi faire varier les propriétés de surfaces par leurs propriétés amphiphiles (Shakerifard *et al.*, 2009). En effet, les lipopeptides peuvent être reliés au biofilm hydrophile par leur partie peptidique alors que la chaîne lipidique est orientée vers l'extérieur du biofilm. Ainsi il semble que cela pourrait influencer la croissance du biofilm et par conséquent affecter directement la production des lipopeptides.

Les résultats de production des lipopeptides (Figure 26 et Figure 28) montrent que les cultures de biofilm produisent plus que les cultures de cellules planctoniques dès les premières 24 heures. Cet effet est toujours le même à 48 heures et à 72 heures, cependant, il est plus important pour la fengycine. Ces résultats montrent que les cellules immobilisées semblent favoriser la production des lipopeptides. Il semble aussi que les cellules immobilisées modifient la sélectivité de la production et l'orientent ainsi vers la production de la fengycine.

La souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été longtemps considérée comme souche mono productrice de surfactine, cependant, le présent travail a confirmé la découverte récemment publiée par Gancel et ses collègues concernant la production simultanée de la surfactine et de la fengycine par cette souche (Gancel *et al.*, 2009). Cette production simultanée est probablement liée à la présence des cellules immobilisées.

En conclusion cette étude a permis de mettre au point un procédé de production aéré non moussant permettant de produire simultanément deux familles de lipopeptides : les surfactines et les fengycines. L'air nécessaire à cette souche aérobique est disponible à la surface du milieu de fermentation en contact direct avec les billes sur lesquelles se forme le biofilm. Les résultats obtenus montrent bien que l'immobilisation augmente la production des lipopeptides et modifie la sélectivité de cette production. Après 48 heures de culture, les cellules en biofilm produisent 2 à 4 fois plus de surfactines que les cellules planctoniques et 15 fois plus de fengycines. Cependant, ce procédé ne pourra pas avoir d'éventuelle extrapolation industrielle vu le faible volume réactionnel utilisé ( $1/10^{\text{ème}}$  pour 100 mL dans un Erlenmeyer de 1 litre ou  $1/5^{\text{ème}}$  pour 200 mL dans un Erlenmeyer de 1 litre). Il faut donc trouver un procédé qui permet à la fois d'éviter le problème de mousse, d'augmenter la production des lipopeptides et dont l'extrapolation industrielle sera envisageable.

#### **1.4. Valorisation des résultats**

Ces études sur la production des surfactines et des fengycines en fioles d'Erlenmeyer, notamment par des cellules immobilisées sur billes de PPch ont permis de trouver une solution à la fois au problème de moussage ainsi qu'au problème des faibles taux de production de la souche *B. subtilis* ATCC 21332.

Ces travaux ont donné lieu à une publication dans *Process Biochemistry* et deux communications affichées ainsi qu'à deux présentations orales dans des congrès nationaux et internationaux (l'orateur est souligné). Toutes ces communications ont été soumises à un comité de lecture.

#### 1.4.1. Publication

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel and Iordan Nikov. (2010). Biosurfactants production by immobilized cells of *Bacillus subtilis* ATCC21332 and their recovery by pertraction. *Process Biochemistry*, 45 (11) pp. 1795-1799.

#### 1.4.2. Communications affichées

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2009). Production de lipopeptides par *Bacillus subtilis* ATCC 21332 immobilisées et extraction de la surfactine par pertraction. 2<sup>ème</sup> journée thématique de l'EDT **GEPROC**, Gembloux, 16 décembre

**Omar Chtioui**, Frédérique Gancel, Krasimir Dimitrov, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2011). Intérêt du biofilm de *Bacillus subtilis* pour favoriser la production de la fengycine. Colloque AdebioTech / Réseau National Biofilms. Gestion des biofilms, enjeux industriels, Biocitech, PARIS - ROMAINVILLE, 13 octobre

#### 1.4.3. Présentations orales

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel and Iordan Nikov. (2009). Production de biosurfactants dans un réacteur à biofilm et leur extraction par pertraction. 11<sup>ème</sup> congrès de la Société Française de Génie des Procédés **SFGP**, Marseille, 14-16 octobre.

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2010). Production de lipopeptides par souches de *Bacillus* immobilisées. Journée des jeunes chercheurs **UGÉPE** Nord Pas-de-Calais, Dunkerque, 03 juin.

## 2. Production des lipopeptides de *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques

### 2.1. Introduction

La production des lipopeptides à grande échelle reste très coûteuse du fait des trois problèmes majeurs : l'extrapolation industrielle des procédés mis en œuvre pour cette production, l'inévitable formation de mousse excessive par le bullage du milieu de fermentation et enfin, la faible production de ces lipopeptides dans les procédés conventionnels par les souches sauvages notamment, *B. subtilis* ATCC 21332.

Il a été récemment démontré aussi que *B. subtilis* ATCC 21332 est capable de croître et de produire des lipopeptides en conditions limitantes en oxygène (Nakano *et al.*, 1997 ; Cruz *et al.*, 2000 ; Coutte *et al.*, 2010, Fahim *et al.*, 2011). Plusieurs stratégies ont été établies pour la production de la surfactine et de la fengycine dans des procédés sans mousse soit à l'aide de cellules fixées sur billes et l'apport de l'oxygène nécessaire à la surface (Gancel *et al.*, 2009, Fahim *et al.*, 2011) ou soit par un contacteur air-liquide par l'intermédiaire de membranes en fibres creuses qui assurent l'apport d'oxygène sans bullage (Coutte *et al.*, 2010). Malgré les bons rendements obtenus avec ce dernier procédé, son extrapolation industrielle reste non envisageable. Dans les conditions de production en culture par biofilm, il a été constaté que cette production est améliorée et qu'elle s'est orientée vers la production de fengycine.

C'est à partir de ces constatations nous avons décidé de mettre au point un bioréacteur de laboratoire à disques tournants pour la production des lipopeptides par des cellules de *B. subtilis* ATCC 21332 fixées sur les surfaces des disques tournants. Ce réacteur est oxygéné par une aération sans bullage qui consiste à injecter l'air à la surface du milieu de fermentation. Le choix de ce type de bioréacteur est également justifié par la facilité de son utilisation, sa conception simple, la faible consommation d'énergie et surtout par la simplicité de son entretien. Le but de ces travaux est d'étudier la faisabilité de la production des lipopeptides par ce procédé non moussant. D'autre part, une étude de la variabilité des différents paramètres en régime batch a été faite dans le but de maîtriser cette production et de trouver les conditions optimales pour l'obtention de meilleurs rendements.

## **2.2. Etude du coefficient de transfert d'oxygène $K_L a$ et de la distribution du temps de séjour (DTS)**

### **2.2.1. Etude de la distribution du temps de séjour (DTS)**

Cette partie concerne la compréhension et la caractérisation hydrodynamique du bioréacteur avec plusieurs configurations notamment la présence ou l'absence des disques et la présence ou l'absence des agitateurs. L'étude de la DTS permet de définir le comportement hydraulique du bioréacteur. Elle permet aussi de détecter les éventuels dysfonctionnements tels que les zones mortes.

L'étude de la DTS a été réalisée selon les conditions précédemment décrites (§ 2.3.1.2). La fréquence rotationnelle était fixée de  $30 \text{ min}^{-1}$ , recommandée pour un procédé d'oxydation. La conductivité à la sortie du bioréacteur a été suivie toutes les minutes jusqu'à la stabilisation. Les résultats de la conductivité sont représentés dans la Figure 29. On remarque que dans les configurations sans les disques, la phase stationnaire de conductivité a été atteinte plus rapidement que dans les configurations avec disques. Ceci peut être expliqué par le fait que les disques font l'effet de compartiments et donc il faut plus de temps pour le passage du marqueur (NaCl dans ce cas). Cependant on remarque aussi que les agitateurs favorisent bien le mélange dans le bioréacteur. En effet, en comparant les configurations de même type avec ou sans agitateurs, on remarque qu'en présence d'agitateurs la phase stationnaire est vite atteinte. Cependant, il faut noter que dans le bioréacteur avec la configuration sans disque et sans pale, on atteint très vite la stabilité (2 ou 3 minutes). Ce dernier cas est expliqué par le fait qu'il n'y a pas de compartiments ou d'agitateurs et par une homogénéisation qui est accélérée par le débit de la pompe péristaltique. On peut conclure que le temps de mélange maximal est autour de 7 minutes.

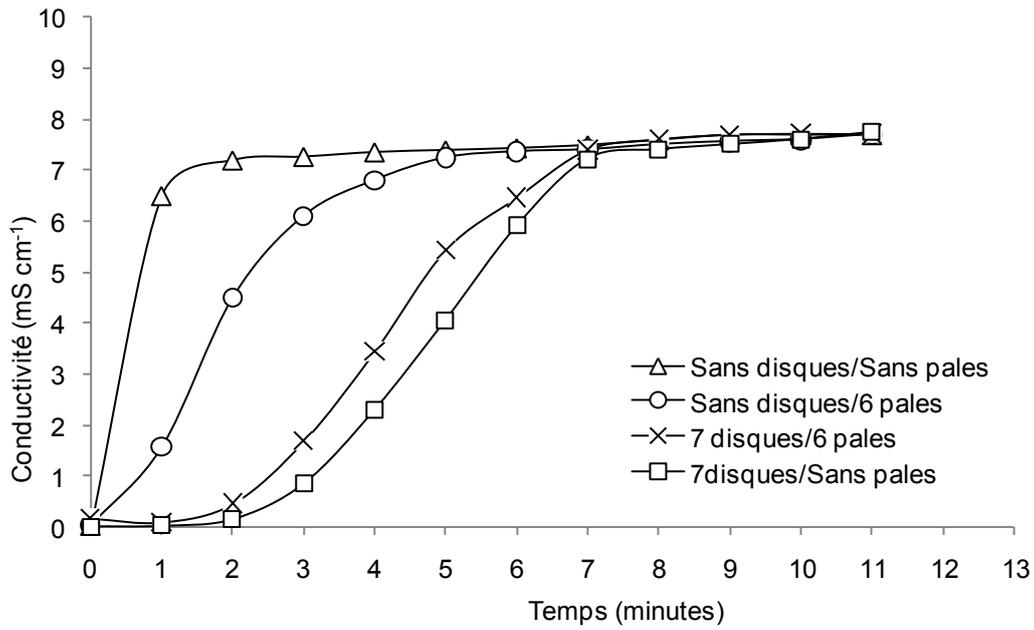


Figure 29 : Suivi de l'évolution de la conductivité dans le bioréacteur

### 2.2.2. Etude du coefficient de transfert d'oxygène $K_La$

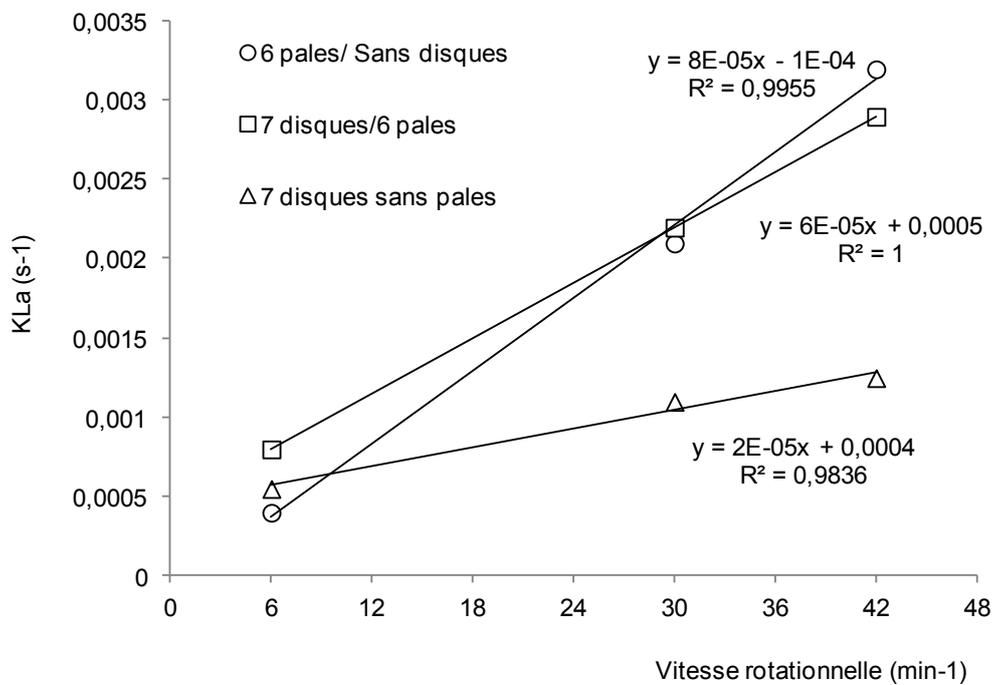


Figure 30 : Evolution du  $K_La$  en fonction de la vitesse rotationnelle pour trois configurations

En développant ce bioréacteur, un de nos objectifs est d'avoir la possibilité de travailler à faibles débits de gaz dans un système bi-phasique, avec cependant un transfert d'oxygène vers la surface non-immersée de disques important, et une homogénéisation du liquide suffisante pour transférer l'oxygène au sein du liquide et aussi pour la mise en suspension de cellules planctoniques. C'est pourquoi nous avons utilisé un système d'agitation radiale supplémentaire, notamment l'agitateur à trois pales décalées à 120°. Nous nous sommes donc intéressés à l'influence du système sur le transfert de matière. L'effet du débit d'air sera discuté pour les essais en production. Nous présentons sur la Figure 30 les évolutions de  $k_{La}$  en fonction de la vitesse angulaire des disques pour trois configurations géométriques. Cette Figure montre clairement que  $k_{La}$  est fortement influencé par l'utilisation des agitateurs pour des vitesses supérieures à 18 min<sup>-1</sup>, sachant qu'un disque unique tournant n'a aucun effet de pompage. Il est intéressant de noter aussi que l'augmentation de  $k_{La}$  due à l'agitation mécanique peut modifier la sélectivité de la réaction microbienne, sachant que l'apport d'oxygène est un facteur primordial (Fahim *et al.*, 2011, Fahim, 2011).

### **2.3. Analyse de l'effet du débit d'air**

#### **2.3.1. Introduction**

Comme nous l'avons vu dans la partie bibliographique, l'apport suffisant d'oxygène dissous dans les bioréacteurs joue un rôle très important dans la production des lipopeptides (Davis *et al.*, 1999 ; Jacques *et al.*, 1999 ; Yeh *et al.*, 2006 ; Guez *et al.*, 2008 ; Coutte *et al.*, 2010 ; Fahim *et al.*, 2011). C'est pour cette raison qu'une étude sur l'aération a été réalisée.

Le but de ces travaux est d'étudier l'effet de la variation du débit d'air sur le transfert de l'oxygène dissous dans le milieu de fermentation et par conséquent sur la production des surfactines et des fengycines dans le bioréacteur à disques ce qui nous permettra de conclure si ce paramètre a un effet significatif sur le transfert d'oxygène et donc sur la culture et la production.

La souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été cultivée en mode batch dans le milieu de Landy pendant 72 heures à 30°C selon les conditions décrites précédemment (§ 2.3.3.1).

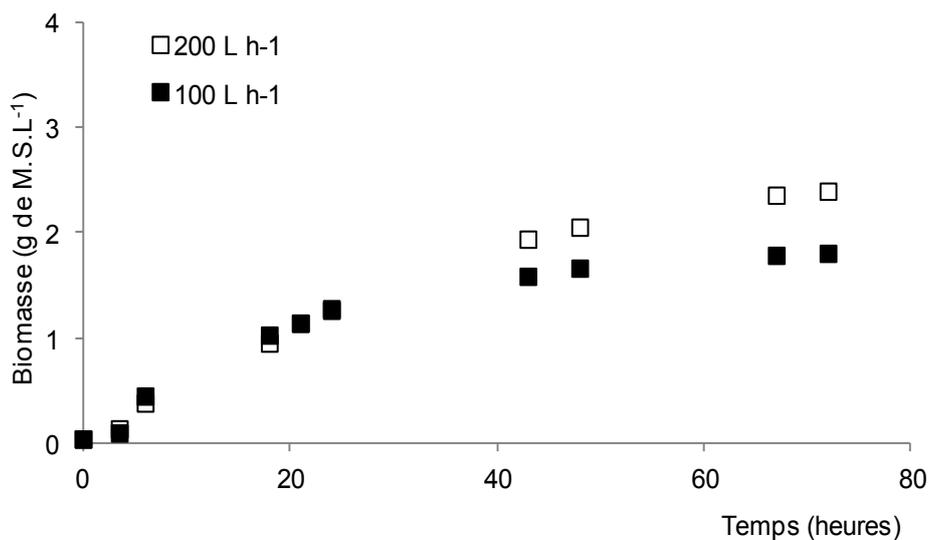
Les résultats obtenus avec différents débits d'air appliqués dans le bioréacteur à disques sont par la suite comparés deux à deux, notamment 200 L h<sup>-1</sup> et 100 L h<sup>-1</sup> pour une configuration avec 7 disques sans agitateurs et 100 L h<sup>-1</sup> et 0 L h<sup>-1</sup> (sans circulation d'air) pour

une autre configuration avec 7 disques et 6 agitateurs. Toutes ces expériences sont réalisées avec une vitesse rotationnelle de  $30 \text{ min}^{-1}$ .

### 2.3.2. Croissance de la souche

Les premiers résultats concernent les deux premiers cas notamment, 7 disques sans agitateurs avec deux débits d'air fixés au préalable :  $100 \text{ L h}^{-1}$  et  $200 \text{ L h}^{-1}$ .

Le profil caractéristique de croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en bioréacteur à disques lors d'une culture batch est observé pour ces deux configurations (Figure 31). Il commence par une phase d'adaptation pendant les trois premières heures, ensuite une phase exponentielle de croissance. La croissance devient ensuite presque linéaire.



**Figure 31:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à  $30^\circ\text{C}$  avec 7 disques et sans agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Vitesse rotationnelle =  $30 \text{ min}^{-1}$

Durant cette phase, la biomasse augmente linéairement jusqu'à atteindre une quantité maximale de 1,80 et 2,39 g de M.S. par litre respectivement pour les expériences avec une aération de  $100 \text{ L h}^{-1}$  et de  $200 \text{ L h}^{-1}$ . Ces valeurs sont obtenues à la fin des cultures, soit après 72 heures. On observe bien que la croissance des cellules planctoniques dans le cas du bioréacteur aéré avec  $200 \text{ L h}^{-1}$  est meilleure.

Pour un débit d'air de 100 L h<sup>-1</sup>, on récolte 0,5 g de M.S. de biofilm fixé sur les 7 disques. La production totale de biomasse est de 2,66 g de M.S. (biomasse libre et fixée).

Pour un débit d'air de 200 L h<sup>-1</sup>, la faible quantité de biomasse adhérente n'a pas permis la quantification et la biomasse libre est de 2,87 g de M.S.

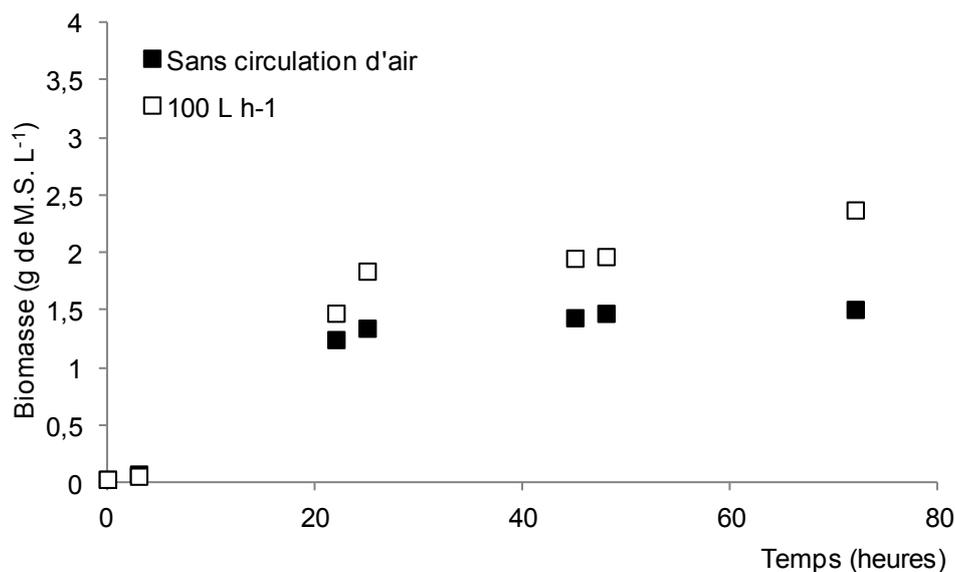
Les rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse sont donc de Y<sub>X/S</sub> de 0,157 et 0,176 g de M.S. g<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et de 200 L h<sup>-1</sup> (Tableau 4).

**Tableau 4 :** Production cellulaire et consommation du glucose (7 disques sans agitateurs)

Analyses	100 L h <sup>-1</sup>	200 L h <sup>-1</sup>
Biomasse libre (g de M.S.)	2,16	2,87
Biomasse fixée (g de M.S.)	0,5	Négligeable
Biomasse totale produite (g de M.S.)	2,66	2,87
Glucose consommé (g)	16,9	16,3
Y <sub>X/S</sub> (g de M.S. g <sup>-1</sup> )	0,157	0,176

La deuxième étude concerne les deux autres configurations notamment, 7 disques en présence de 6 agitateurs avec deux débits d'air fixés au préalable : 100 L h<sup>-1</sup> et 0 L h<sup>-1</sup> (sans circulation d'air).

Le profil caractéristique de croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en bioréacteur à disques lors d'une culture batch est observé pour ces deux configurations (Figure 32). Il commence par une phase d'adaptation pendant les trois premières heures, ensuite une phase exponentielle de croissance. La croissance devient ensuite presque linéaire.



**Figure 32:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Durant cette phase, la biomasse augmente linéairement jusqu'à atteindre une quantité maximale de 2,38 et 1,51 g de M.S. par litre respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et sans circulation d'air. Ces valeurs sont obtenues à la fin des cultures, soit après 72 heures. On remarque que la croissance des cellules planctoniques dans le cas du bioréacteur aéré avec 100 L h<sup>-1</sup> est meilleure que dans le bioréacteur sans circulation d'air. En effet, elle augmente plus rapidement dès les premières 24 heures.

Pour la configuration sans circulation d'air, 0,3 g de M.S. de biofilm fixé sur les 7 disques ont été obtenus. Cependant, pour le bioréacteur avec un débit d'air de 100 L h<sup>-1</sup>, la quantité de biomasse adhérente quantifiée est de l'ordre de 0,1 g. Les productions de biomasses totales obtenues sont de 3,15 g de M.S. pour une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et de 1,91 g de M.S. en absence de circulation d'air, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,209 et 0,141 g de M.S. g<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et celle sans circulation d'air (Tableau 5).

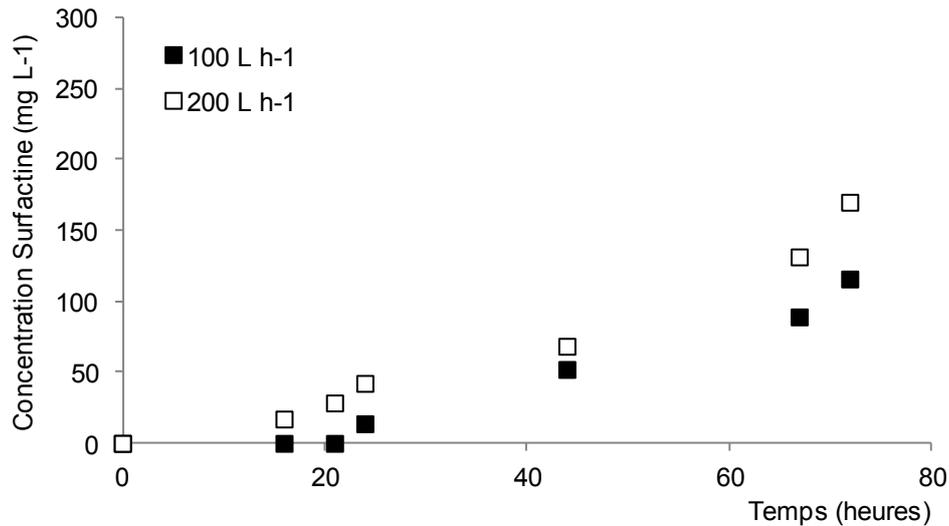
**Tableau 5 :** Production cellulaire et consommation du glucose (7 disques et 6 agitateurs)

Analyses	100 L h <sup>-1</sup>	Sans circulation d'air
Biomasse libre (g de M.S.)	2,85	1,81
Biomasse fixée (g de M.S.)	0,3	0,1
Biomasse totale produite (g de M.S.)	3,15	1,91
Glucose consommé (g)	15,02	13,5
Y <sub>x/s</sub> (g de M.S. g <sup>-1</sup> )	0,209	0,141

### 2.3.3. Production de lipopeptides

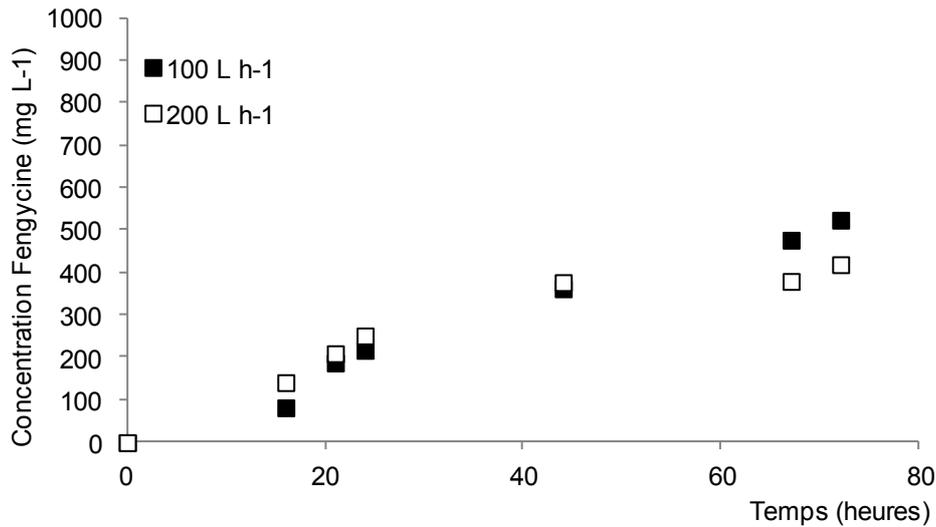
Ces résultats font l'objet d'une étude comparative entre les cinétiques de productions de lipopeptides en fonction du débit d'air appliqué (Figure 33 et Figure 34).

Concernant la surfactine, sa production commence avant la 20<sup>ème</sup> heure pour le procédé avec le débit d'air de 200 L h<sup>-1</sup> alors que cette production commence après pour le procédé ayant un débit d'air de 100 L h<sup>-1</sup>. La quantité de surfactine produite par le bioréacteur aéré de 200 L h<sup>-1</sup> a été plus élevée. En effet, la production de la surfactine augmente avec le temps pour atteindre des concentrations de 116 et de 170 mg L<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec un débit d'air de 100 L h<sup>-1</sup> et de 200 L h<sup>-1</sup>. En conséquence, on obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine Y<sub>p/s</sub> de 8,2 et 12,5 mg g<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et de 200 L h<sup>-1</sup> (Tableau 6).



**Figure 33** : Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et sans agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L, la vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Les cinétiques de productions de la fengycine dans les configurations 7 disques et sans agitateurs sont similaires et augmentent pour atteindre 524 et 419 mg L<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et de 200 L h<sup>-1</sup> à la fin des cultures (Figure 34). On remarque que pour la configuration avec le débit d'air le plus faible, on obtient des concentrations légèrement supérieures. Il semble donc que l'augmentation du débit d'air n'affecte pas la synthèse. Les rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine  $Y_{P/S}$  de 37,2 et 30,9 mg g<sup>-1</sup> ont été calculés et sont présentés dans le Tableau 6.



**Figure 34 :** Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et sans agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L, la vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

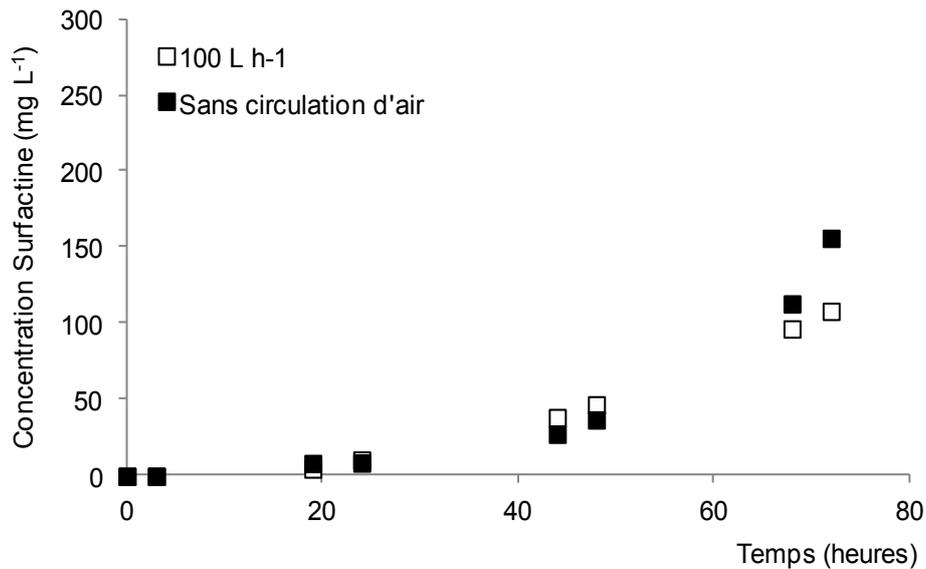
Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  obtenus sont de 288,7 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec 100 L h<sup>-1</sup> de débit d'air et de 246,3 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec 200 L h<sup>-1</sup> de débit d'air. Les analyses du dosage du glucose montrent qu'à la fin des cultures, la consommation du glucose ne dépasse pas 70% de la quantité initiale dans les deux configurations, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine)  $Y_{P/S}$  de l'ordre de 45,4 mg g<sup>-1</sup> et de 43,4 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 6). D'après les  $Y_{P/X}$  et les  $Y_{P/S}$  obtenus, il semble que l'aération n'affecte pas trop la production de fengycine, cependant, la production de la surfactine semble être plus affectée par l'augmentation du débit d'air.

**Tableau 6:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (7 disques)

Analyses	100 L h <sup>-1</sup>	200 L h <sup>-1</sup>
Biomasse produite (g de M.S.)	2,66	2,87
Glucose consommé (g)	16,9	16,3
Surfactine produite (mg)	139	204
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	8,2	12,5
Fengycine produite (mg)	629	503
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	37,2	30,9
Production totale de lipopeptides (mg)	768	707
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	45,4	43,4
Y <sub>P/X</sub> (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	288,7	246,3

Les résultats concernant les productions de surfactine et de fengycine dans les configurations avec 7 disques et 6 agitateurs avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> ou sans circulation d'air sont présentés dans les Figures 35 et 36.

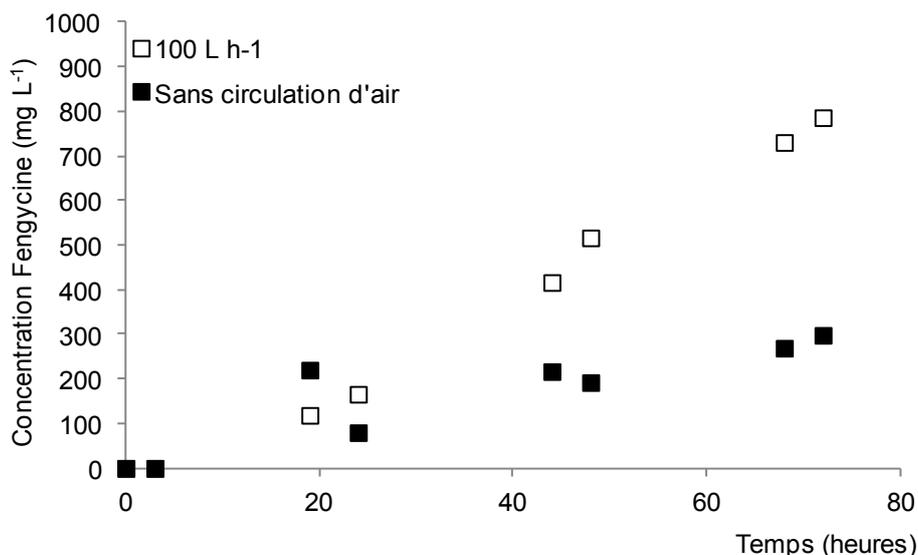
Les courbes de production de la surfactine présentent des allures très similaires et la production est plutôt précoce pour ces deux configurations par rapport aux configurations déjà étudiées puisque cette production commence dès 20 heures de culture. En effet, la production de la surfactine augmente avec le temps pour atteindre des concentrations de 108 et de 156 mg L<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et celle sans circulation d'air, donnant respectivement des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine Y<sub>P/S</sub> de 8,7 et 13,9 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 7).



**Figure 35 :** Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L, la vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Dans les deux bioréacteurs, la production de la fengycine est déjà significative à 24 heures (Figure 36).

La concentration de fengycine obtenue à la fin de la culture aérée atteint une valeur nettement plus élevée que celle obtenue avec le bioréacteur sans circulation d'air. En effet, la production de la fengycine augmente jusqu'à des valeurs maximales de 787 mg L<sup>-1</sup> et 298 mg L<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et celle sans circulation d'air. Il semble qu'avec le bioréacteur le plus aéré on a plus de production de fengycine. Des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine  $Y_{P/S}$  de 62,8 et 26,5 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les expériences avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> et sans circulation d'air (Tableau 7).



**Figure 36** : Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L, la vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  obtenus sont de 340,9 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec 100 L h<sup>-1</sup> de débit d'air et de 285,3 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur sans circulation d'air. Les analyses du dosage du glucose montrent qu'à la fin des cultures, la consommation du glucose se situe entre 55% et 65% de la quantité initiale dans les deux configurations, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine)  $Y_{P/S}$  de l'ordre de 71,5 mg g<sup>-1</sup> et de 40,4 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 7).

Dans la configuration avec une aération de 100 L h<sup>-1</sup> une nette augmentation de la production de la fengycine est observée, l'aération semble affecter la production de la fengycine.

**Tableau 7** : Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (7 disques 6 agitateurs)

Analyses	100 L h <sup>-1</sup>	Sans aération
Biomasse produite (g de M.S.)	3,15	1,91
Glucose consommé (g)	15,02	13,5
Surfactine produite (mg)	130	187
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	8,7	13,9
Fengycine produite (mg)	944	358
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	62,8	26,5
Production totale de lipopeptides (mg)	1074	545
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	71,5	40,4
Y <sub>P/X</sub> (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	340,9	285,3

D'après les résultats obtenus concernant l'étude de l'effet du débit d'air, il semble que l'augmentation du débit d'air favorise la croissance des cellules planctoniques. En effet, lors des conditions sans circulation de l'air, de très faibles quantités de biomasse par rapport aux autres configurations ont été obtenues. La production des lipopeptides quant à elle, est fortement liée à la présence de cellules immobilisées (configurations 100 L h<sup>-1</sup> et 200 L h<sup>-1</sup> avec les disques sans agitateurs), plus on a de cellules en biofilm plus la production de fengycine est augmentée (de même pour les configurations 100 L h<sup>-1</sup> et sans circulation de l'air avec agitateurs et disques). L'aération ainsi que les cellules immobilisées semblent jouer un rôle crucial lors de la production des fengycines dans les configurations étudiées.

## **2.4. Analyse de l'effet du nombre de disques**

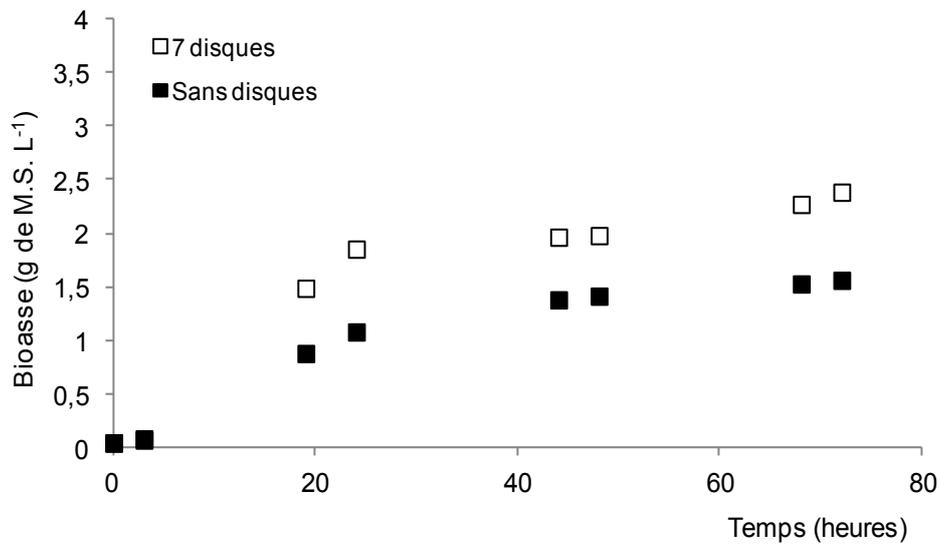
### **2.4.1. Introduction**

L'étude sur l'effet des disques sur la production des lipopeptides a été réalisée en variant le nombre de disques dans chaque expérience notamment, 14 disques, 7 disques et sans disque. Une étude comparative a concerné les configurations de 14 disques sans agitateurs et de 7 disques sans agitateurs à  $30 \text{ min}^{-1}$ . Cependant, l'expérience sans disques sans agitateurs n'a pas été faite à cause de la formation de pellicule à la surface stagnante du milieu de fermentation. Cette pellicule constituée de cellules non planctoniques et non fixées sur un support est gênante dans notre cas. Ces cellules ne peuvent donc pas être comparées aux cellules fixées sur les disques. Cette expérience a été changée par une expérience avec 6 agitateurs sans disque et comparée à celle avec 6 agitateurs et 7 disques.

### **2.4.2. Croissance de la souche**

La première étude concerne les expériences dans le bioréacteur en présence de 6 agitateurs avec 7 disques en comparaison d'une croissance sans disques à une vitesse rotationnelle de  $30 \text{ min}^{-1}$ .

La cinétique de croissance de la biomasse planctonique de *B. subtilis* ATCC 21332 est présentée à la Figure 37. On observe que les cinétiques de croissance ont les mêmes allures que dans les configurations précédentes.



**Figure 37 :** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs pendant 72 heures.

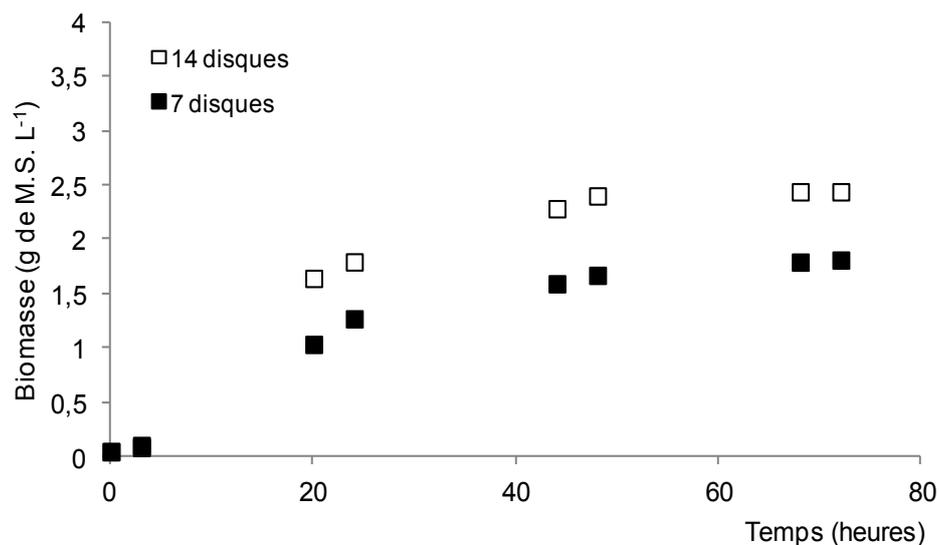
Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Pendant la phase linéaire, la biomasse augmente jusqu'à atteindre une quantité maximale de 2,38 et 1,56 g de M.S. par litre après 72 heures de culture respectivement pour le bioréacteur avec des disques et celui sans disques. On remarque qu'il y a une nette différence de la croissance des cellules planctoniques pour ces deux cas. En effet, on peut dire qu'il semblerait que la présence de disques dans ce cas favorise la croissance des cellules planctoniques. Pour le bioréacteur avec disques, on a obtenu à 0,3 g de M.S. de biofilm fixé sur les 7 disques. Les productions totales des biomasses ainsi obtenues sont de 3,15 et 1,87 g de M.S. respectivement pour le bioréacteur avec disques et celui sans disques, donnant respectivement des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,209 et 0,153 g de M.S. g<sup>-1</sup> (Tableau 8).

**Tableau 8:** Production cellulaire et consommation du glucose (En présence de 6 agitateurs)

Analyses	7 disques	Sans disques
Biomasse libre (g de M.S.)	2,85	1,87
Biomasse fixée (g de M.S.)	0,3	0
Biomasse totale produite (g de M.S.)	3,15	1,87
Glucose consommé (g)	15,02	12,23
$Y_{X/S}$ (g de M.S. $g^{-1}$ )	0,209	0,153

Les résultats ci-dessous concernent les croissances des cellules libres et immobilisées sur les 7 ou les 14 disques sans les agitateurs. Les concentrations de biomasse libres obtenues après 72 heures représentent 1,8 et 2,43 g de M.S. par litre de milieu de culture respectivement pour la configuration avec 7 disques et celle avec 14 disques, donnant des productions totales de biomasse libres et en biofilm respectivement de 2,66 et 3,72 g de M.S (Figure 38).



**Figure 38:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans agitateurs pendant 72 heures.

Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

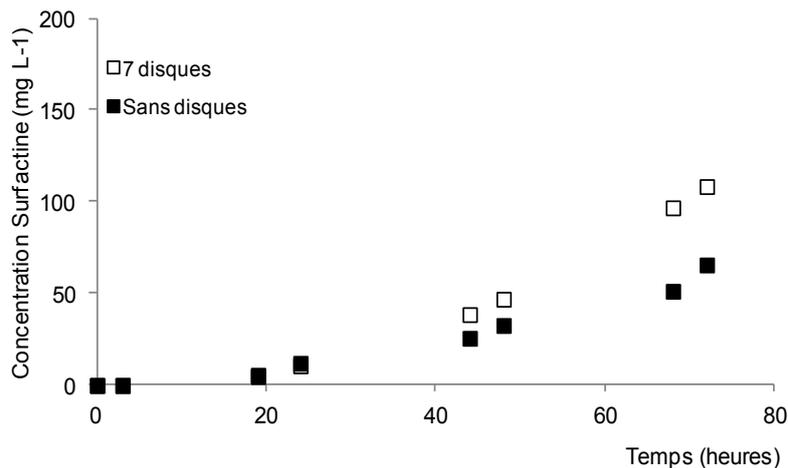
Les productions totales des biomasses ainsi obtenues sont de 2,66 et 3,72 g de M.S. respectivement pour le bioréacteur avec 7 disques et celui avec 14 disques, donnant respectivement des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,157 et 0,188 g de M.S.  $g^{-1}$ . Pour le bioréacteur avec 7 disques, les cellules fixées sur les disques représentent 19% de la biomasse totale. Cependant, pour le bioréacteur avec 14 disques, elles représentent 22% (Tableau 9).

**Tableau 9:** Production cellulaire et consommation du glucose (sans agitateurs)

<b>Analyses</b>	<b>7 disques</b>	<b>14 disques</b>
Biomasse libre (g de M.S.)	2,16	2,92
Biomasse fixée (g de M.S.)	0,5	0,8
Biomasse totale produite (g de M.S.)	2,66	3,72
Glucose consommé (g)	16,9	19,8
$Y_{X/S}$ (g de M.S. $g^{-1}$ )	0,157	0,188

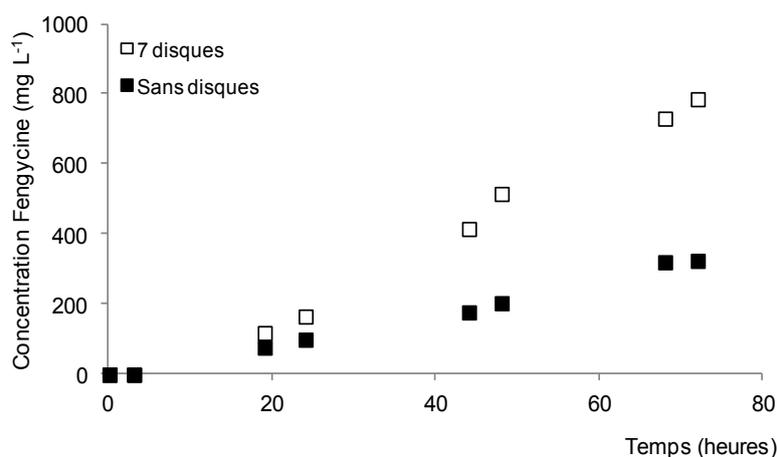
### 2.4.3. Production de lipopeptides

Concernant la production de surfactine, la production commence après 20 heures pour les deux configurations (Figure 39). Cette production augmente avec le temps pour atteindre des concentrations de 108 et de 66  $mg L^{-1}$  respectivement pour les expériences avec et sans disques. En conséquence, on obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine  $Y_{P/S}$  de 8,7 et 6,46  $mg g^{-1}$  respectivement pour les deux expériences (Tableau 10).



**Figure 39:** Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>.  
Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Les cinétiques de production de la fengycine dans les deux cas précédemment cités augmentent pour atteindre 787 et 327 mg L<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec et sans disques à la fin des cultures (Figure 40). On remarque qu'avec la configuration avec les disques, on obtient les concentrations les plus élevées. On peut dire que la présence des disques affecte cette production. Des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine  $Y_{P/S}$  de 62,8 et 32,1 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les expériences avec et sans disques (Tableau 10).



**Figure 40:** Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>.  
Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

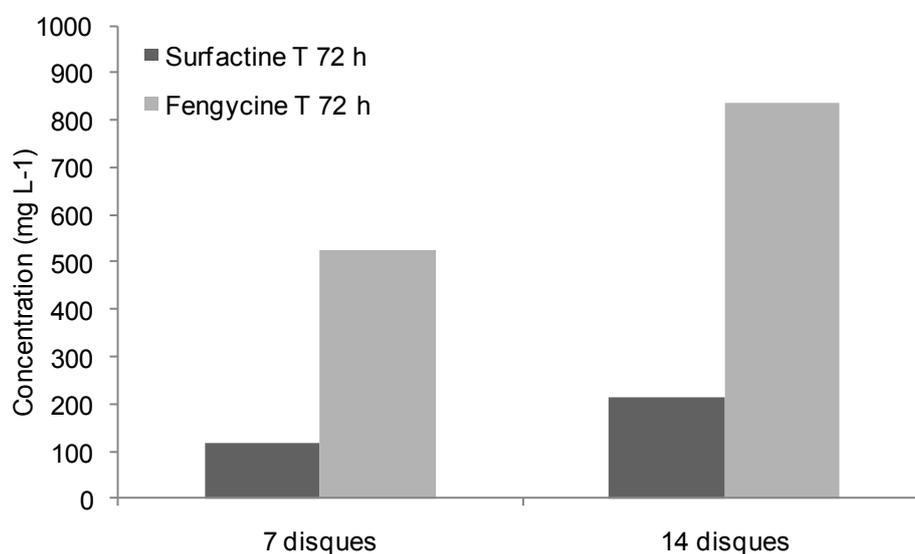
Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  obtenus sont de 340,9 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec 7 disques et de 251,9 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur sans disques. A la fin des cultures, la consommation du glucose représente 62 et 51% de la quantité initiale respectivement pour les expériences avec et sans disques, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine)  $Y_{P/S}$  de l'ordre de 71,5 mg g<sup>-1</sup> et de 38,5 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 10).

**Tableau 10:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (sans agitateurs)

Analyses	7 disques	Sans disques
Biomasse produite (g de M.S.)	3,15	1,87
Glucose consommé (g)	15,02	12,23
Surfactine produite (mg)	130	79
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	8,7	6,46
Fengycine produite (mg)	944	392
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	62,8	32,1
Production totale de lipopeptides (mg)	1074	471
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	71,5	38,5
$Y_{P/X}$ (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	340,9	251,9

Les résultats ci-dessous concernent la production des lipopeptides pour les deux configurations avec 7 et 14 disques sans les agitateurs. Les histogrammes de production des surfactines et des fengycines sont représentés dans la Figure 41.

A la fin des cultures, la production de fengycine est très supérieure à celle de la surfactine dans ces deux cas. En effet, on obtient des concentrations de surfactine de 116 et 212 mg L<sup>-1</sup> donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine  $Y_{P/S}$  de 8,2 et 12,83 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les expériences avec 7 disques et celle avec 14 disques (Tableau 11). Cependant, les productions de fengycine pour le même ordre d'expériences sont de l'ordre de 524 et 838 mg L<sup>-1</sup>. Des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine  $Y_{P/S}$  de 37,2 et 50,8 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les configurations avec 7 disques et celle avec 14 disques (Tableau 11).



**Figure 41:** Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans agitateurs après 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  obtenus sont de l'ordre de 288,7 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec les 7 disques et de 338,7 mg g<sup>-1</sup> de M.S. respectivement pour celui avec 14 disques. A la fin des cultures, la consommation du glucose est de 70% de la quantité initiale dans la configuration avec 7 disques et de 83% pour celle avec 14 disques, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine)  $Y_{P/S}$  de l'ordre de 45,4 et de 63,6 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 11).

**Tableau 11:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (sans agitateurs)

Analyses	7 disques	14 disques
Biomasse produite (g de M.S.)	2,66	3,72
Glucose consommé (g)	16,9	19,8
Surfactine produite (mg)	139	254
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	8,2	12,83
Fengycine produite (mg)	629	1006
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	37,2	50,8
Production totale de lipopeptides (mg)	768	1260
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	45,4	63,6
$Y_{P/X}$ (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	288,7	338,7

D'après les résultats obtenus concernant l'étude de l'effet du nombre des disques, la présence des disques favorise la croissance des cellules planctoniques. De plus, il s'est avéré que la croissance des cellules planctoniques augmente en augmentant le nombre de disques dans le bioréacteur. La production des lipopeptides (surtout la fengycine) est fortement affectée par l'ajout de disques. Cependant, le  $K_{La}$  semble avoir un effet sur la production de fengycine. En effet plus le  $K_{La}$  augmente plus la production de la fengycine augmente. Il faut noter que pour la configuration sans disques et pour un  $K_{La}$  de 0,0021 s<sup>-1</sup>, la production de la fengycine est faible par rapport aux autres configurations, ceci peut s'expliquer par le fait qu'il n'y a pas de biofilm (quantité très négligeable sur les agitateurs) et que seulement les cellules planctoniques synthétisent des lipopeptides.

## 2.5. Analyse de l'effet des agitateurs

### 2.5.1. Introduction

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, l'agitation mécanique dans les bioréacteurs joue un rôle très important dans la production des lipopeptides (Davis *et al.*, 1999 ; Jacques *et al.*, 1999 ; Yeh *et al.*, 2006 ; Guez *et al.*, 2008 ; Coutte *et al.*, 2010).

L'objectif de ces expériences est d'étudier l'effet des agitateurs avec ou sans la présence des disques sur la croissance de la culture et par conséquent sur la production des surfactines et des fengycines dans le bioréacteur.

La souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été cultivée en mode batch dans le milieu de Landy pendant 72 heures à 30°C selon les conditions décrites précédemment (§ 2.3.3.3).

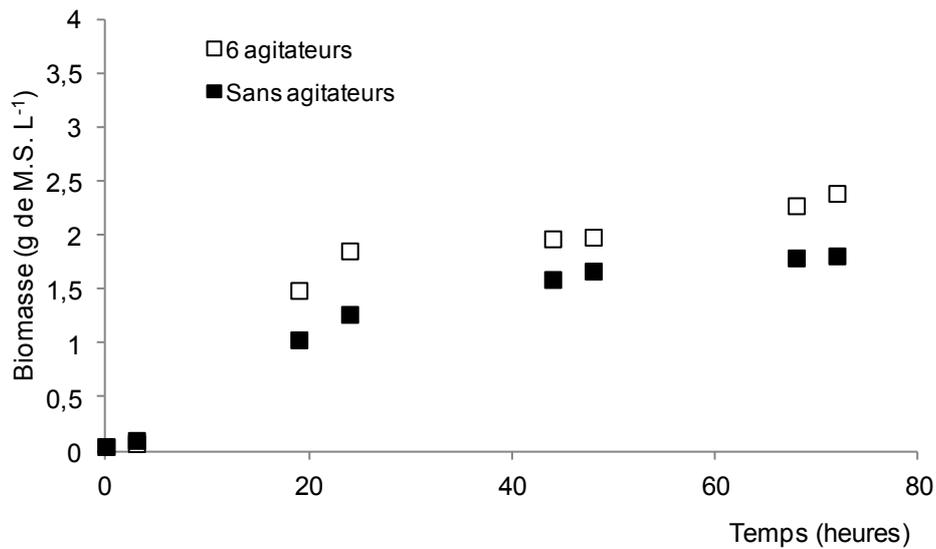
Quatre expériences ont été réalisées et comparées deux à deux :

- 7 disques sans agitateurs à 30 min<sup>-1</sup>
- 7 disques avec 6 agitateurs à 30 min<sup>-1</sup>
- sans disque avec six agitateurs à 42 min<sup>-1</sup>.
- sans disque avec neuf agitateurs à 42 min<sup>-1</sup>.

### 2.5.2. Croissance de la souche

La première série d'expériences concerne deux configurations : la première avec 7 disques sans agitateurs, dans la deuxième on rajoute 6 agitateurs. Les deux fermentations ont été réalisées avec une vitesse de 30 min<sup>-1</sup>.

Les profils de croissance montrent que les cellules libres en présence d'agitateurs croissent plus rapidement que dans le procédé sans agitateurs (Figure 42). En effet, la biomasse augmente linéairement jusqu'à atteindre une quantité maximale à la fin des cultures (72 heures) de 2,38 et 1,8 g de M.S. par litre respectivement pour les expériences avec 6 agitateurs et celle sans les agitateurs.



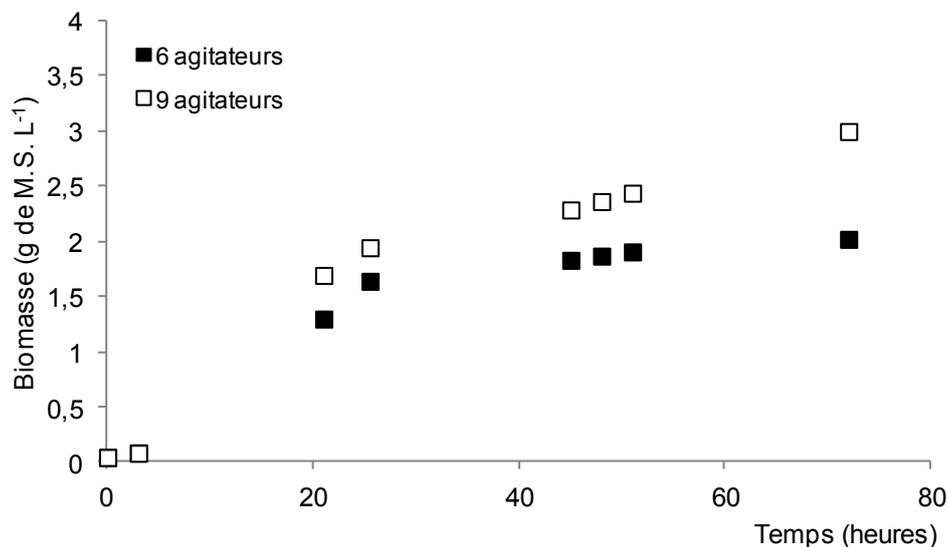
**Figure 42:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques (sans ou avec agitateurs) pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Pour la configuration 7 disques- 6 agitateurs ; 0,3 g de M.S. de biofilm fixé est obtenu sur les 7 disques. Pour le bioréacteur moins agité (7 disques sans agitateurs), la quantité de biomasse adhérente quantifiée est plus importante et elle est de l'ordre de 0,5 g. Les productions totales de biomasses sont alors de 3,15 g de M.S. en présence d'agitateurs et de 2,66 g de M.S. en l'absence d'agitateurs, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,209 et 0,157 g de M.S. g<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec 6 agitateurs et celle sans les agitateurs (Tableau 12).

**Tableau 12:** Production cellulaire et consommation du glucose (7 disques)

Analyses	6 agitateurs	Sans agitateurs
Biomasse libre (g de M.S.)	2,85	2,16
Biomasse fixée (g de M.S.)	0,3	0,5
Biomasse totale produite (g de M.S.)	3,15	2,66
Glucose consommé (g)	15,02	16,9
$Y_{X/S}$ (g de M.S. $g^{-1}$ )	0,209	0,157

Dans les deux autres configurations (sans disque avec six agitateurs et sans disque avec neuf agitateurs à  $42 \text{ min}^{-1}$ ), la croissance de la souche de *B. subtilis* ATCC 21332 en mode batch pendant 72 heures atteint des maxima de 2,01 et de 2,99 g de M.S. respectivement pour l'expérience avec 6 agitateurs et celle avec 9 agitateurs (Figure 43).



**Figure 43:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à  $30^\circ\text{C}$  sans disques pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air =  $100 \text{ L h}^{-1}$ . Vitesse rotationnelle =  $42 \text{ min}^{-1}$

Les profils de croissance des deux expériences réalisées avec 6 ou neuf agitateurs montrent que le nombre d'agitateurs affecte la croissance de la souche. On remarque bien qu'après la 24<sup>ème</sup> heure, les cellules planctoniques croissent plus rapidement dans le bioréacteur avec 9 agitateurs.

On obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,152 et 0,207 g de M.S.  $g^{-1}$  respectivement pour les expériences réalisées avec 6 agitateurs et 9 agitateurs (Tableau 13).

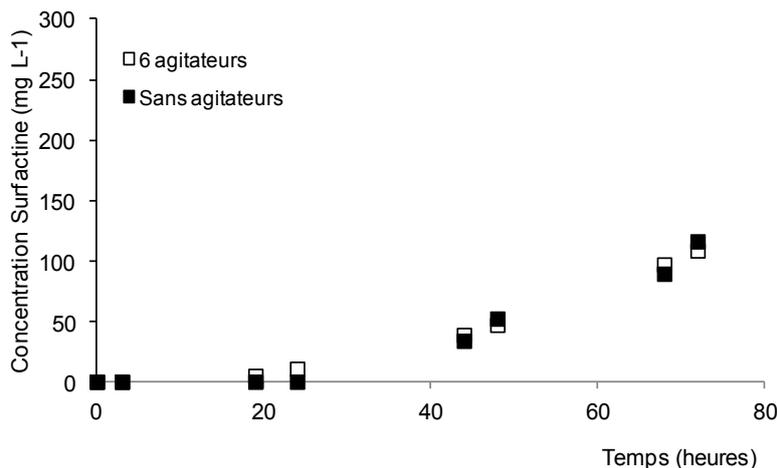
**Tableau 13:** Production cellulaire et consommation du glucose (sans disques)

Analyses	6 agitateurs	9 agitateurs
Biomasse totale produite (g de M.S.)	2,41	3,59
Glucose consommé (g)	15,84	17,34
$Y_{X/S}$ (g de M.S. $g^{-1}$ )	0,152	0,207

### 2.5.3. Production de lipopeptides

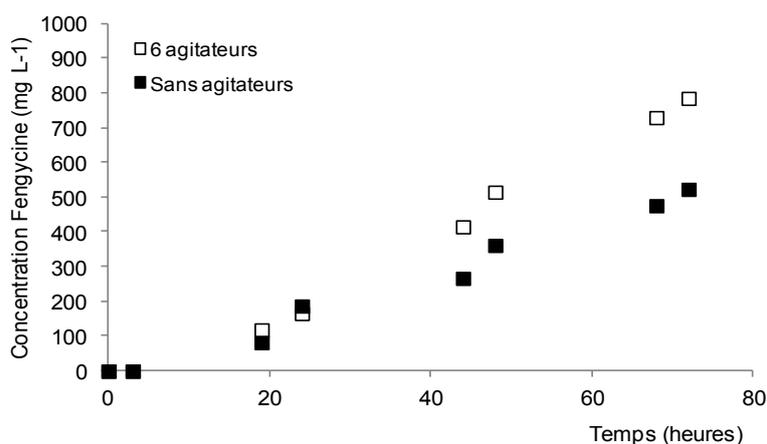
Les profils de production de surfactine dans le cas des bioréacteurs à disques sans agitateurs et avec les 6 agitateurs sont presque identiques (Figure 44). De même que les concentrations maximales de surfactine obtenues en fin de culture sont presque les mêmes : 108 mg  $L^{-1}$  et 116 mg  $L^{-1}$ . Dans ces deux cas de Figure, la présence d'agitateurs n'affecte pas la production de la surfactine.

Dans ces deux cas on obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine  $Y_{P/S}$  de 8,7 et 8,2 mg  $g^{-1}$  respectivement pour les expériences avec les 6 agitateurs et sans les agitateurs (Tableau 14).



**Figure 44:** Analyse de la concentration de la surfactine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques (sans ou avec agitateurs) pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

Pour la production de la fengycine, la présence d'agitateurs joue un rôle important. En effet on observe que la production de la fengycine dans le bioréacteur à 7 disques en présence de 6 agitateurs est très élevée par rapport au réacteur à disques sans agitateurs. 787 mg L<sup>-1</sup> et 524 mg L<sup>-1</sup> sont les concentrations de fengycine obtenues à la fin des cultures respectivement pour le réacteur à disque avec les 6 agitateurs et le réacteur à disque sans agitateurs (Figure 45). A la fin des expériences, on obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine  $Y_{P/S}$  de 62,8 et 37,2 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 14).



**Figure 45:** Analyse de la concentration de la fengycine produite dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques (sans ou avec agitateurs) pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 30 min<sup>-1</sup>

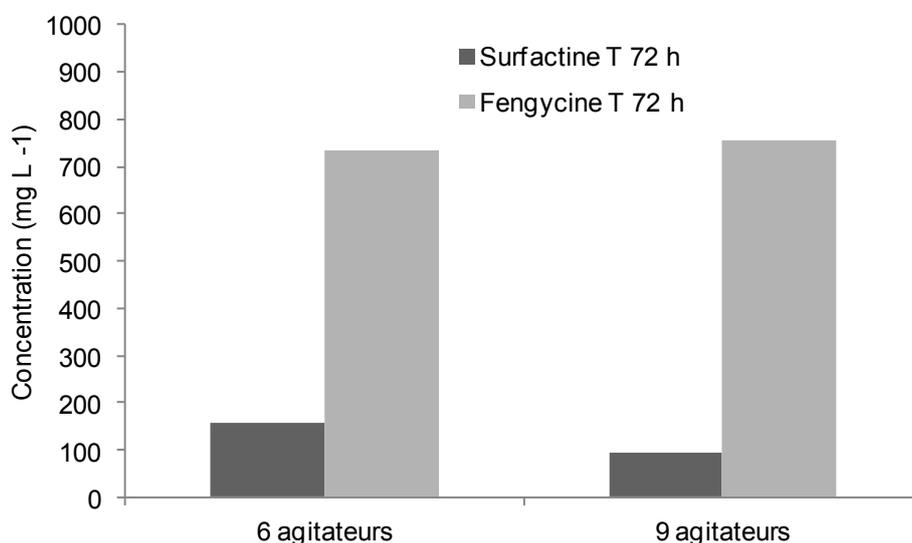
Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  obtenus sont de l'ordre de 288,7 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec les disques mais sans les agitateurs et de 340,9 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec les disques et les 6 agitateurs. A la fin des cultures, la consommation du glucose est de 62% de la quantité initiale pour le bioréacteur avec les agitateurs et elle est de 70% pour celui sans agitateurs, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine)  $Y_{P/S}$  de l'ordre de 71,5 mg g<sup>-1</sup> et de 45,4 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 14).

**Tableau 14:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (7 disques)

Analyses	6 agitateurs	Sans agitateurs
Biomasse produite (g de M.S.)	3,15	2,66
Glucose consommé (g)	15,02	16,9
Surfactine produite (mg)	130	139
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	8,7	8,2
Fengycine produite (mg)	944	629
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	62,8	37,2
Production totale de lipopeptides (mg)	1074	768
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	71,5	45,4
$Y_{P/X}$ (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	340,9	288,7

La partie qui suit concerne l'étude de la production des lipopeptides pour les configurations sans disques avec 6 agitateurs et celle avec 9 agitateurs. Les histogrammes de production des surfactines et des fengycines sont représentés dans la Figure 46.

Après 72 heures de culture, la production de fengycine est toujours très supérieure à celle de la surfactine dans ces deux cas. En effet, on obtient des concentrations de surfactine de 156 et 96 mg L<sup>-1</sup> donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine Y<sub>P/S</sub> de 11,81 et 6,63 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les expériences avec 6 agitateurs et celle avec 9 (Tableau 15). Cependant, les productions de fengycine pour le même ordre d'expériences sont de l'ordre de 735 et 755 mg L<sup>-1</sup>. Des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine Y<sub>P/S</sub> de 55,5 et 52,3 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les configurations avec 6 agitateurs et celle avec 9 agitateurs (Tableau 15).



**Figure 46:** Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C sans disques pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>. Vitesse rotationnelle = 42 min<sup>-1</sup>

Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée Y<sub>P/X</sub> obtenus sont de l'ordre de 442,7 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec 6 agitateurs et de 284,4 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour celui avec 9 agitateurs. A la fin des cultures, la consommation du glucose est de 66% pour la configuration avec 6 agitateurs et de 72% lorsque le nombre d'agitateurs passe à 9, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine) Y<sub>P/S</sub> de l'ordre de 67,4 mg g<sup>-1</sup> et de 58,9 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 15). D'après ces analyses, le passage de 6 à 9 agitateurs n'affecte ni la production de la surfactine et ni celle de la fengycine.

**Tableau 15:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (sans disques)

Analyses	6 agitateurs	9 agitateurs
Biomasse produite (g de M.S.)	2,41	3,59
Glucose consommé (g)	15,84	17,34
Surfactine produite (mg)	187	115
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	11,81	6,63
Fengycine produite (mg)	880	906
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	55,5	52,3
Production totale de lipopeptides (mg)	1067	1021
$Y_{P/S}$ (mg g <sup>-1</sup> )	67,4	58,9
$Y_{P/X}$ (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	442,7	284,4

Les résultats ainsi détaillés montrent que l'ajout et l'augmentation du nombre d'agitateurs permet d'améliorer la croissance des cellules libres. Cependant, l'ajout des agitateurs en présence de disques affecte la formation et la croissance du biofilm (inhibe sa croissance) ; ceci est probablement lié aux forces de cisaillement causées par la rotation des agitateurs à côté des disques. La présence des agitateurs favorise le mélange au sein du bioréacteur et permet ainsi une augmentation de la production par rapport aux configurations sans agitateurs.

## 2.6. Analyse de l'effet de la vitesse rotationnelle

### 2.6.1. Introduction

Le but de ces expériences est d'étudier l'effet de la variation de la vitesse rotationnelle des agitateurs (3 vitesses différentes) sur la croissance de la souche et la production des surfactines et des fengycines, dans le réacteur en présence ou absence de 7 disques.

La souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été cultivée en mode batch dans le milieu de Landy pendant 72 heures à 30°C selon les conditions décrites précédemment (§ 2.3.3.4).

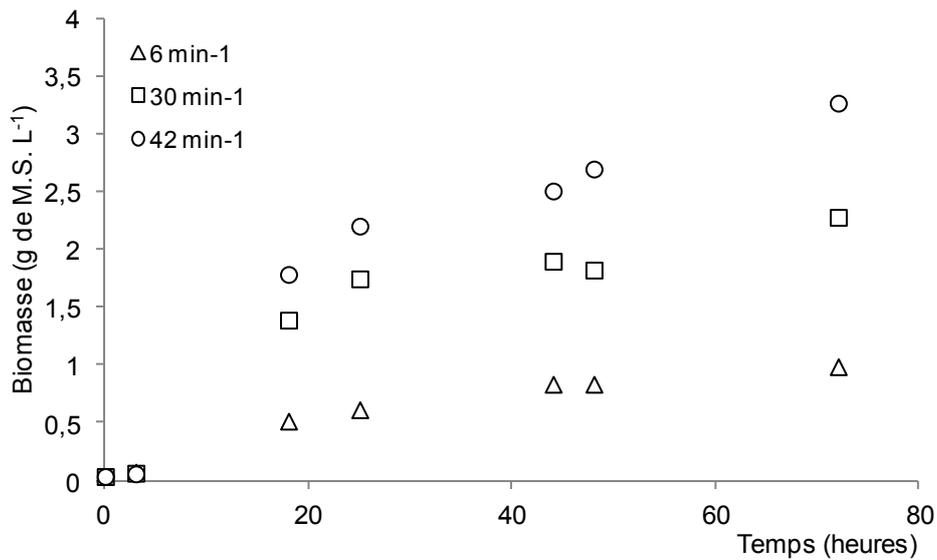
Six configurations ont été étudiées et réparties en deux études :

- 7 disques et 6 agitateurs avec trois vitesses rotationnelles notamment, 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup>.
- 6 agitateurs sans disques avec trois vitesses rotationnelles notamment, 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup>.

### 2.6.2. Croissance de la souche

La première étude concerne les expériences dans le bioréacteur avec 7 disques et 6 agitateurs aux trois vitesses rotationnelles.

La croissance de la biomasse planctonique de *B. subtilis* ATCC 21332 en bioréacteur à disques lors d'une culture batch a été observée pour ces trois configurations (Figure 47).



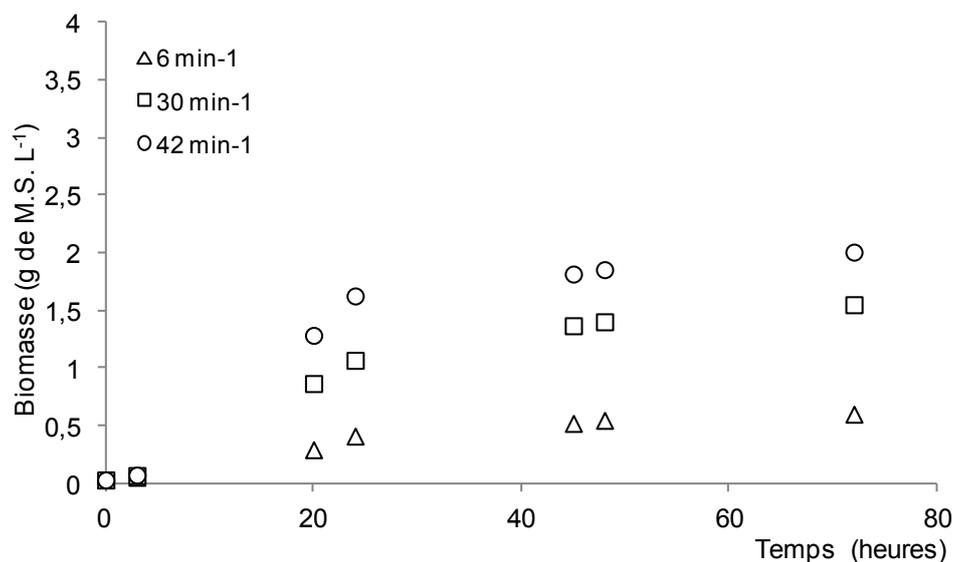
**Figure 47:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs pendant 72 heures.  
Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>

Pendant la phase linéaire, la biomasse augmente jusqu'à atteindre une quantité maximale de 0,99, 2,38 et 3,27 g de M.S. par litre après 72 heures de culture respectivement pour les vitesses de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup>. On remarque qu'il y a une nette différence de la croissance des cellules planctoniques dans ces trois cas. Plus la vitesse rotationnelle augmente plus la croissance de la biomasse libre est meilleure. Pour le bioréacteur tournant à 6 min<sup>-1</sup>, on a obtenu 0,2 g de M.S. de cellules immobilisées sur les 7 disques. Cependant, pour des vitesses de 30 min<sup>-1</sup> et de 42 min<sup>-1</sup>, les quantités de biomasse adhérente quantifiée sont respectivement de l'ordre de 0,3 g et 0,1 g de M.S. Ceci permet de dire que de part et d'autre d'une vitesse de 30 min<sup>-1</sup> la quantité de biomasse fixée diminue. Les productions totales des biomasses sont de 1,39, 3,15 et 4,02 g de M.S. respectivement pour ces trois vitesses, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,127, 0,209 et 0,246 g de M.S. g<sup>-1</sup> respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup> (Tableau 16).

**Tableau 16:** Production cellulaire et consommation du glucose (7 disques et 6 agitateurs)

Analyses	6 min <sup>-1</sup>	30 min <sup>-1</sup>	42 min <sup>-1</sup>
Biomasse libre (g de M.S.)	1,19	2,85	3,92
Biomasse fixée (g de M.S.)	0,2	0,3	0,1
Biomasse totale produite (g de M.S.)	1,39	3,15	4,02
Glucose consommé (g)	10,92	15,02	16,36
Y <sub>X/S</sub> (g de M.S. g <sup>-1</sup> )	0,127	0,209	0,246

La deuxième étude concerne la configuration avec 6 agitateurs sans disque à trois vitesses rotationnelles de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup>. Les profils de croissance de la biomasse sont représentés dans la Figure 48.



**Figure 48:** Analyse de la croissance de *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs sans disques pendant 72 heures.

Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>

Les profils de croissance dans ces conditions présentent de faibles croissances relativement aux autres configurations avec des disques. En effet la biomasse augmente pour donner des concentrations massiques de 0,61 ; 1,56 et 2,01 g de M.S. par litre respectivement pour les configurations avec des vitesses rotationnelles de  $6 \text{ min}^{-1}$ ,  $30 \text{ min}^{-1}$  et  $42 \text{ min}^{-1}$  (Tableau 17). On remarque aussi que la croissance des cellules libres augmente en augmentant la vitesse rotationnelle des agitateurs. Il semble ainsi que l'homogénéisation du milieu affecte la croissance des cellules libres. On obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en biomasse  $Y_{X/S}$  de 0,113, 0,153 et 0,152 g de M.S.  $\text{g}^{-1}$  respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de  $6 \text{ min}^{-1}$ ,  $30 \text{ min}^{-1}$  et  $42 \text{ min}^{-1}$  (Tableau 17).

**Tableau 17:** Production cellulaire et consommation du glucose (6 agitateurs sans disques)

Analyses	$6 \text{ min}^{-1}$	$30 \text{ min}^{-1}$	$42 \text{ min}^{-1}$
Biomasse totale produite (g de M.S.)	0,73	1,87	2,41
Glucose consommé (g)	6,46	12,23	15,84
$Y_{X/S}$ (g de M.S. $\text{g}^{-1}$ )	0,113	0,153	0,152

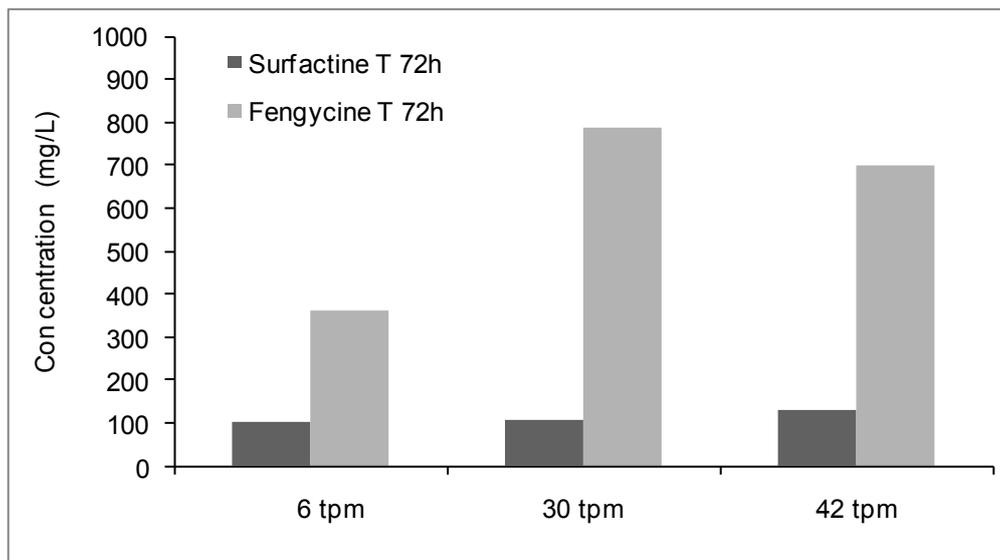
### 2.6.3. Production de lipopeptides

La production des lipopeptides (surfactine et fengycine) a été comparée aux trois vitesses rotationnelles en présence de 7 disques et de 6 agitateurs (Figure 49).

Pour toutes ces expériences on remarque que la production des fengycines est supérieure à celle des surfactines. Les concentrations maximales de surfactine obtenues en fin de culture sont 102, 108 et 133  $\text{mg L}^{-1}$  avec une vitesse rotationnelle de  $6 \text{ min}^{-1}$ ,  $30 \text{ min}^{-1}$  et  $42 \text{ min}^{-1}$  (Figure 49). Les quantités de surfactine augmentent avec l'augmentation de la vitesse. Dans ces trois cas on obtient des rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine  $Y_{P/S}$  de 11,17, 8,65 et 9,78  $\text{mg g}^{-1}$  respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de  $6 \text{ min}^{-1}$ ,  $30 \text{ min}^{-1}$  et  $42 \text{ min}^{-1}$  (Tableau 18).

Concernant la fengycine, la production augmente avec l'augmentation de la vitesse rotationnelle. Cependant on observe une faible diminution de la production à 42 min<sup>-1</sup>. A la fin des cultures de 72 heures des concentrations de 360, 787 et 698 mg L<sup>-1</sup> avec une vitesse rotationnelle respectivement de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup> ont été obtenues (Figure 49).

Des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine Y<sub>P/S</sub> de 39,6, 62,8 et 51,2 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup> (Tableau 18).



**Figure 49:** Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 7 disques et 6 agitateurs pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100 L h<sup>-1</sup>

Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée Y<sub>P/X</sub> obtenus sont de l'ordre de 398,5 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec la vitesse de 6 min<sup>-1</sup>, de 340,9 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec la vitesse de 30 min<sup>-1</sup> et de 248,2 mg g<sup>-1</sup> de M.S. pour le bioréacteur avec la vitesse de 42 min<sup>-1</sup>.

A la fin des cultures, la consommation du glucose est de 45%, 62% et 68 % de la quantité initiale respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup>, donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine) Y<sub>P/S</sub> de l'ordre de 45,4, 43,4 et 61,0 mg g<sup>-1</sup> (Tableau 18).

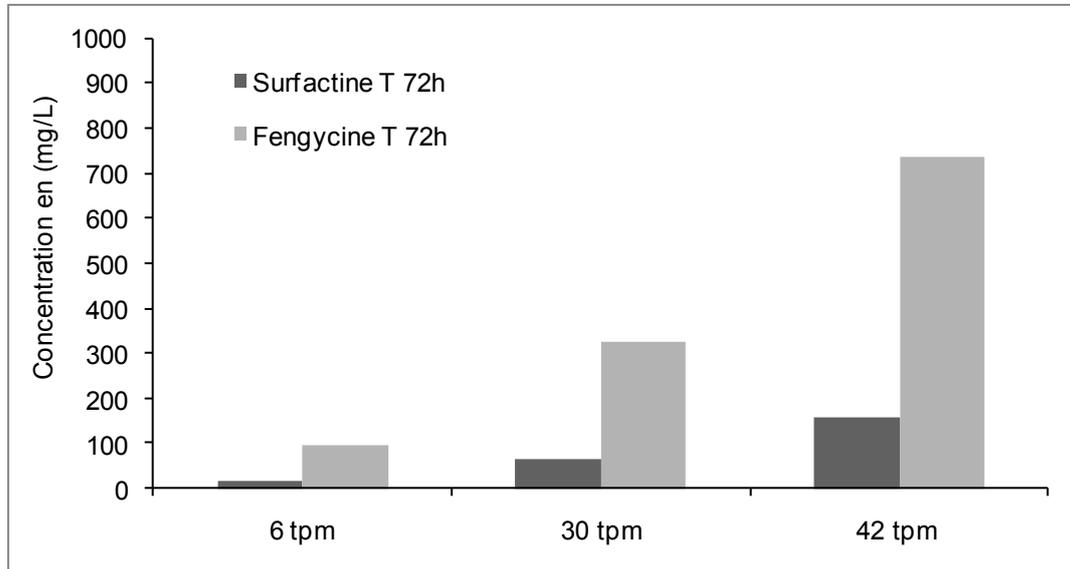
**Tableau 18:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (7 disques 6 agitateurs)

Analyses	6 min <sup>-1</sup>	30 min <sup>-1</sup>	42 min <sup>-1</sup>
Biomasse produite (g de M.S.)	1,39	3,15	4,02
Glucose consommé (g)	10,92	15,02	16,36
Surfactine produite (mg)	122	130	160
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	11,17	8,65	9,78
Fengycine produite (mg)	432	944	838
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	39,6	62,8	51,2
Production totale de lipopeptides (mg)	554	1074	998
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	45,4	43,4	61,0
Y <sub>P/X</sub> (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	398,5	340,9	248,2

Les résultats qui suivent concernent l'étude de la production des lipopeptides pour la configuration avec 6 agitateurs sans disques. Trois vitesses rotationnelles sont testées : 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup>. Les histogrammes de production des surfactines et des fengycines sont représentés dans la Figure 50.

A la fin des cultures, la production de fengycine obtenue est très supérieure à celle de la surfactine dans ces trois cas. En effet, on obtient des concentrations de fengycine de 95, 327 et 735 mg L<sup>-1</sup> donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en fengycine Y<sub>P/S</sub> de 17,6, 32,1 et 55,5 mg g<sup>-1</sup> sont obtenus respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de 6 min<sup>-1</sup>, 30 min<sup>-1</sup> et 42 min<sup>-1</sup> (Tableau 19). Cependant, les productions de surfactine pour le même ordre d'expériences sont de l'ordre de 16, 66 et 156 mg L<sup>-1</sup>. Des

rendements de conversion du substrat (glucose) en surfactine  $Y_{P/S}$  de 2,94, 6,46 et 11,81  $\text{mg g}^{-1}$  sont obtenus respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de 6  $\text{min}^{-1}$ , 30  $\text{min}^{-1}$  et 42  $\text{min}^{-1}$  (Tableau 19).



**Figure 50:** Analyse des concentrations finales des lipopeptides produits dans le milieu de culture par *B. subtilis* ATCC 21332 en culture batch dans du milieu de Landy pH 7 à 30°C avec 6 agitateurs sans disques pendant 72 heures. Le volume de culture est de 1,2 L. Débit d'air = 100  $\text{L h}^{-1}$

Les taux de formation de lipopeptides (surfactine et fengycine) par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  obtenus sont de l'ordre de 182,2  $\text{mg g}^{-1}$  de M.S. pour la culture avec la vitesse de 6  $\text{min}^{-1}$  et de 251,9  $\text{mg g}^{-1}$  de M.S. et de 442,7  $\text{mg g}^{-1}$  de M.S. respectivement pour les cultures avec les vitesses de 30  $\text{min}^{-1}$  et 42  $\text{min}^{-1}$ . Après 72 heures, la consommation du glucose est de 27%, 51% et 66% de la quantité initiale respectivement pour les expériences avec une vitesse rotationnelle de 6  $\text{min}^{-1}$ , 30  $\text{min}^{-1}$  et 42  $\text{min}^{-1}$ , donnant des rendements de conversion du substrat (glucose) en lipopeptides (surfactine et fengycine)  $Y_{P/S}$  de l'ordre de 20,6, 38,5 et de 67,4  $\text{mg g}^{-1}$  (Tableau 19).

**Tableau 19:** Production de surfactine et de fengycine dans différentes configurations (6 agitateurs sans disques)

Analyses	6 min <sup>-1</sup>	30 min <sup>-1</sup>	42 min <sup>-1</sup>
Biomasse produite (g de M.S.)	0,73	1,87	2,41
Glucose consommé (g)	6,46	12,23	15,84
Surfactine produite (mg)	19	79	187
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	2,94	6,46	11,81
Fengycine produite (mg)	114	392	880
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	17,6	32,1	55,5
Production totale de lipopeptides (mg)	133	471	1067
Y <sub>P/S</sub> (mg g <sup>-1</sup> )	20,6	38,5	67,4
Y <sub>P/X</sub> (mg g <sup>-1</sup> de M.S.)	182,2	251,9	442,7

D'après les résultats obtenus concernant l'étude de l'effet de la vitesse angulaire, il y a un effet favorable entre l'augmentation de la vitesse rotationnelle et la croissance des cellules planctoniques dans les 6 configurations étudiées. Cet effet est d'autant plus important que lorsqu'on associe les agitateurs aux disques. En augmentant la vitesse rotationnelle, on favorise le transfert de l'oxygène dans le milieu et on obtient ainsi des valeurs de  $K_{L,a}$  plus élevées. De plus, la production des lipopeptides (surtout la fengycine) est fortement affectée par l'augmentation de la vitesse angulaire et donc du  $K_{L,a}$ . La forte production de fengycine est aussi affectée par la présence de disques (cellules immobilisées).

## 2.7. Interprétation des résultats de production

Nous venons de présenter l'ensemble des résultats expérimentaux sur la production de biosurfactants dans les différentes configurations du bioréacteur à disques tournants. En commentant brièvement l'influence des principaux paramètres, retenons les points essentiels suivants :

- Ils existent deux approches pour intensifier les performances des bioprocédés en termes de productivité, sélectivité et rendements. La première concerne les interactions entre les processus biologiques et les transferts multiphasiques (quantité de mouvement, matière et chaleur) au sein du bioréacteur; la seconde s'intéresse aux modifications génomiques visant la création de souches à productivité et sélectivité élevées. Notre travail s'inscrit dans le cadre de la première approche et concerne plus précisément le développement du bioréacteur à disques tournants destiné à la production microbiologique de biosurfactants. Des concentrations d'intérêt industriel ont été obtenues, notamment plus de  $1 \text{ g L}^{-1}$ , dont jusqu'à 80 % de fengycine. Parmi les différentes configurations étudiées, deux d'entre elles ont été retenues et recommandées pour la production sélective de fengycine : les bioréacteurs à 14 disques et à 7 disques et 6 agitateurs. Les analyses du dosage du glucose montrent qu'à la fin des cultures, la consommation du glucose se situe entre 62,5% et 82,5% de la quantité initiale (24 g) dans les deux configurations. Ces résultats correspondent à rendements de conversion du glucose en fengycine  $Y_{P/S}$  de l'ordre de  $63 \text{ mg g}^{-1}$ , donc 2,5 fois plus élevés que ceux obtenus par Coutte et ses collègues en 2010 dans leur travail pionnier en production de fengycine en bioréacteur à membrane. Il est intéressant de souligner que les résultats dans le bioréacteur à disques ont été obtenus à très faibles concentrations de cellules. En effet, la concentration maximale de cellules ne dépasse pas  $4 \text{ g M.S. L}^{-1}$ . On peut conclure que dans ces conditions, les cellules sont très actives physiologiquement. Enfin, les taux de formation de fengycine par rapport à la biomasse formée  $Y_{P/X}$  de l'ordre de  $300 \text{ mg g}^{-1}$  de M.S. ont été obtenus.

- Le transfert d'oxygène, facteur limitant primordial du métabolisme microbien, a fait l'objet de notre travail. Par ailleurs, nous avons mis en avant un système d'agitation qui permet d'avoir des coefficients de transfert jusqu'à 3 fois plus élevés que ceux obtenus avec un réacteur sans agitateurs classique (à même nombre de disques tournants). Nous avons utilisé un système d'agitation radiale supplémentaire, notamment des agitateurs à trois pales décalées à  $120^\circ$ . Nous nous sommes donc intéressés à l'influence du système sur le transfert de matière qui est lié à la production, sachant que la modification de  $k_{La}$  due à l'agitation

mécanique peut modifier la sélectivité de la réaction microbienne (Fahim *et al.*, 2011 ; Fahim, 2011). Les deux configurations retenues se caractérisent par des valeurs de  $k_{La}$  élevées entre  $0,002\text{ s}^{-1}$  et  $0,003\text{ s}^{-1}$ . La vitesse angulaire de rotation, le facteur le plus important pour arriver à ces valeurs de  $k_{La}$ , devrait être supérieur de  $30\text{ min}^{-1}$ . L'évolution du  $k_{La}$  en fonction de la vitesse angulaire des disques pour toutes les configurations géométriques est positive. En ce qui concerne la production de fengycine : en augmentant la vitesse angulaire, on augmente la production via le  $k_{La}$ . Le  $k_{La}$  est fortement influencé par l'utilisation des agitateurs, sachant qu'un disque unique tournant a un effet très faible sur le mélange. Il est intéressant de noter le fait observé pour première fois par Fahim *et al.* (2011) concernant la sélectivité de production de la fengycine. En effet, cette production en fonction du  $k_{La}$  passe par un maximum, autrement dit au-delà d'une certaine valeur de  $k_{La}$  le procédé est dévié vers la production de la surfactine. Il faut noter aussi, que dans le travail de production de Coutte *et al.* (2010) des concentrations maximales de l'ordre de  $400\text{ mg L}^{-1}$  de fengycine et de  $200\text{ mg L}^{-1}$  de surfactine ont été obtenues pour un  $k_{La}$  d'ordre de  $0,008\text{ s}^{-1}$ .

- En comparaison avec les autres types de bioréacteurs utilisés pour la production de lipopeptides, le bioréacteur à disques tournants se démarque par sa grande simplicité de mise en œuvre ainsi que par des productions élevées de lipopeptides (et notamment de fengycine). Ce bioréacteur présente ainsi un énorme potentiel pour être extrapolé à l'échelle industrielle.

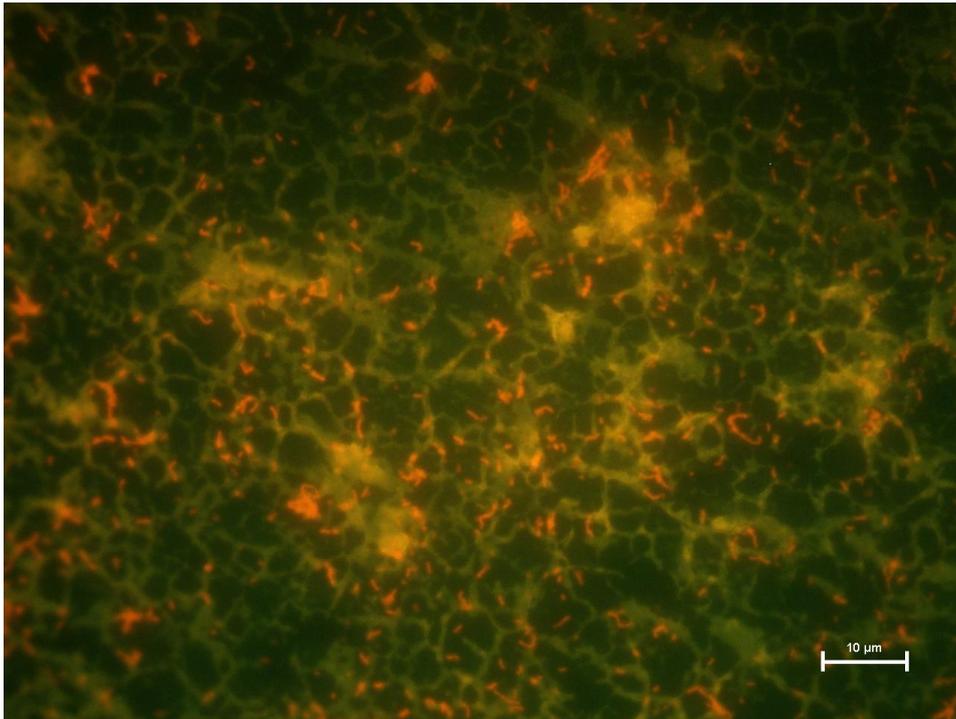
## 2.8. Etude du biofilm

Durant les expériences avec les disques tournants, une formation de biofilm a été observée sur les deux faces des disques. Après le premier jour, on observe à l'œil nu de petits granules qui correspondent à des colonies. Après 48 heures de culture, les surfaces des disques sont envahies et elles deviennent rugueuses. A la fin de l'expérience, le biofilm formé sur chaque disque est quantifié (Figure 51).



**Figure 51 :** Photographie des disques colonisés par *B. subtilis* ATCC 21332 après 72 h de culture. Les conditions sont : 7 disques sans agitateurs, la vitesse est de  $30 \text{ min}^{-1}$  et l'aération est de  $100 \text{ L h}^{-1}$

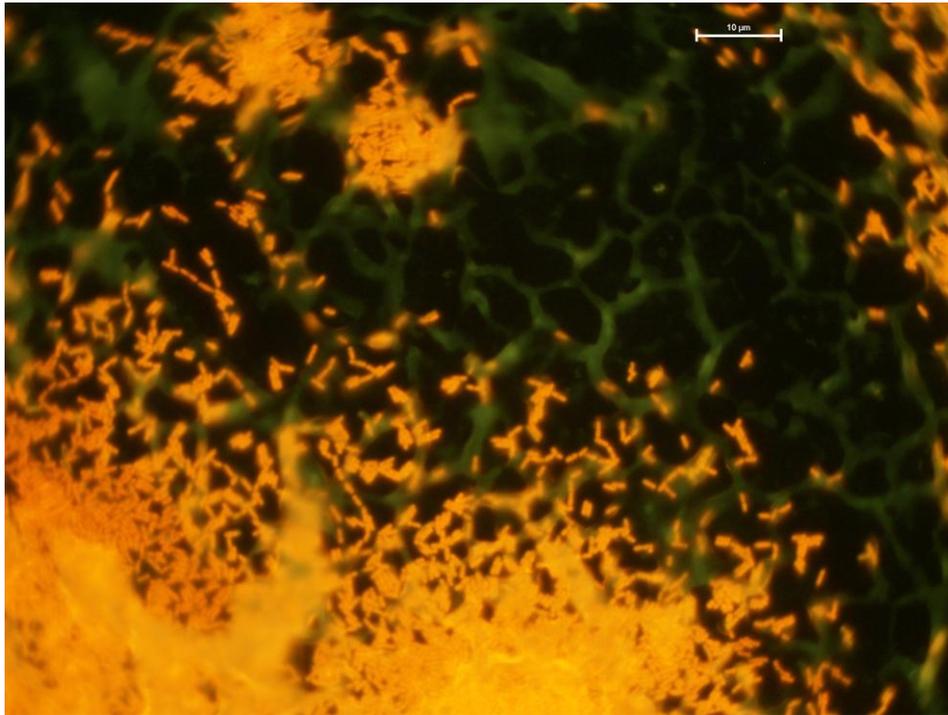
A la fin de l'expérience (72 heures) les disques sont démontés et les biofilms sont marqués par de l'acridine orange et observés en microscopie à épi-fluorescence. Les cellules dans ce cas apparaissent colorées en orange et la surface non colonisée en noir. Pour une configuration de 7 disques avec 6 agitateurs à  $30 \text{ min}^{-1}$  de vitesse rotationnelle et sans circulation d'air, l'observation microscopique des disques a montré que les disques ne contiennent que des cellules isolées et quelques microcolonies (Figure 52). Ces cellules sont probablement des cellules en phase d'adhésion primaire sur la surface du disque et qui n'ont pas encore formé de biofilm.



**Figure 52 :** Observation par microscope à épifluorescence de la formation du biofilm de *B. subtilis* ATCC 21332 formé sur les disques du bioréacteur.

Les conditions sont : 7 disques et 6 agitateurs, la vitesse est de  $30 \text{ min}^{-1}$  sans circulation d'air

Dans le cas du bioréacteur avec la configuration à 7 disques sans agitateurs avec une vitesse rotationnelle de  $30 \text{ min}^{-1}$  et avec un débit d'air de  $100 \text{ L h}^{-1}$  la formation d'un biofilm est observée (Figure 53). Après 72 heures de culture, on observe que la surface est colonisée par les cellules de *B. subtilis*. On remarque sur un même champ optique différents stades de formation du biofilm notamment des cellules adhérentes, des microcolonies et des macrocolonies qui débutent une stratification pour élaborer un biofilm mature. Dans cette configuration (absence d'agitateurs) la croissance des cellules adhérentes sur les disques permet d'aboutir à un biofilm. Cependant dans le cas précédent (présence d'agitateurs) les forces de cisaillement causées par les agitateurs semblent inhiber la croissance des cellules adhérentes sur les disques.



**Figure 53 :** Observation par microscope à épifluorescence de la formation du biofilm de *B. subtilis* ATCC 21332 formé sur les disques du bioréacteur après 72 heures de culture.

Les conditions sont : 7 disques sans agitateurs, la vitesse est de  $30 \text{ min}^{-1}$  et l'aération est de  $100 \text{ L h}^{-1}$

Les expériences avec les disques ont toutes présenté une formation de cellules adhérentes ou de biofilms quantifiables sauf pour le cas de l'expérience avec une aération de  $200 \text{ L h}^{-1}$  qui ne semble pas favoriser l'expression des polysaccharides extracellulaires (EPS) et les protéines permettant la structuration du film.

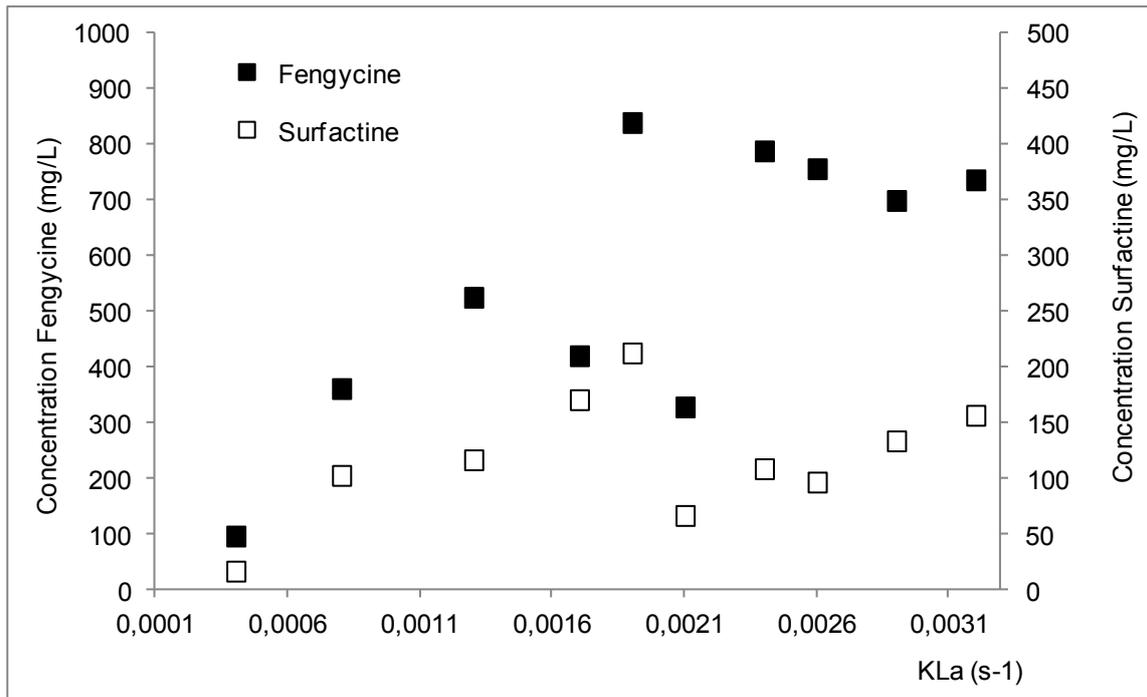
Les quantités des biofilms obtenues dans les différentes configurations ainsi que les quantités produites de lipopeptides (surfactine et fengycine) sont présentées dans la figure 55. On remarque que plus le nombre de disques augmente plus la quantité de biofilm augmente. La quantité de biofilm diminue avec l'ajout des agitateurs. Dans ce cas une vitesse de  $30 \text{ min}^{-1}$  est la plus appropriée pour favoriser la croissance du biofilm. D'autre part, la production de lipopeptides semble être affectée par les cellules immobilisées dans les fermentations en présence de disques. Cependant lors d'une culture avec une vitesse de  $42 \text{ min}^{-1}$  (milieu très agité) la production n'est pas affectée par la faible présence de cellules immobilisées sur les disques.

Les résultats concernant les meilleures productions relatives aux différentes configurations choisies sont rassemblées dans le Tableau 20 :

**Tableau 20 : Production, productivité et  $K_{La}$  pour quelques configurations**

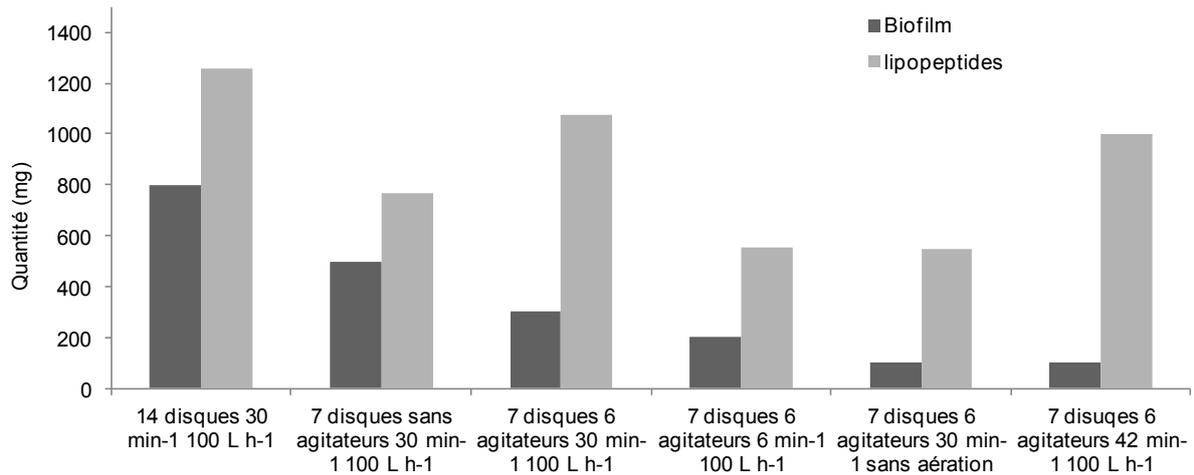
	Feng produite (mg)	Surf produite (mg)	Biomasse produite totale (g)	Sucre consommé (g)	$Y_{P/S}$ (Feng/glucose) (mg/g)	$Y_{P/X}$ (Feng/biomasse) (mg/g)	$K_{La}$ ( $s^{-1}$ )
14 disques 30 $min^{-1}$	1006	254	3,72	19,8	50,8	270,4	0,0019
7 disques 6 agitateurs 30 $min^{-1}$	944	130	3,15	15,02	62,8	299,7	0,0022
9 agitateurs sans disques 42 $min^{-1}$	906	115	3,59	17,34	52,3	252,4	0,0026
6 agitateurs sans disques 42 $min^{-1}$	880	187	2,41	15,84	55,5	365,1	0,0032
7 disques 6 agitateurs 42 $min^{-1}$	838	160	4,02	16,36	51,2	208,5	0,0029

D'après ces résultats, on remarque que les meilleures productivités sont obtenues pour des coefficients de transfert volumétrique se situant au entre  $0,002 s^{-1}$  et  $0,003 s^{-1}$ . De ce fait, cette production est très affectée par ce paramètre. En effet, pour des  $K_{La}$  similaires, la production des lipopeptides est orientée vers une production sélective de fengycine qui dépasse les 80% dans certains cas (Tableau 20).



**Figure 54:** Evolution de la production des lipopeptides en fonction du  $K_{La}$  dans différentes configurations du bioréacteur

La Figure 54 montre l'évolution de la production des lipopeptides produits (surfactine et fengycine) en fonction des  $K_{La}$ . Généralement, en augmentant le  $K_{La}$ , la production des lipopeptides augmente. Pour des  $K_{La}$  se situant entre 0,001 et 0,003 s<sup>-1</sup>, le métabolisme est orienté vers la synthèse de fengycines qui représentent jusqu'à 80 % des lipopeptides synthétisés. La surfactine est très peu produite par rapport à la fengycine qui est synthétisée en très grande quantité : plus de 700 mg L<sup>-1</sup> lorsque les valeurs de  $K_{La}$  se situent entre 0,002 et 0,003 s<sup>-1</sup>. Il semble que dans ces conditions la production de la fengycine n'est pas trop affectée. Les taux de production des lipopeptides relativement faibles dans la configuration sans disques avec 6 agitateurs à 30 min<sup>-1</sup> et un débit d'air de 100 L h<sup>-1</sup> ( $K_{La}$  de 0,0021) sont probablement dûs à l'absence de cellules immobilisées à ces conditions.



**Figure 55 :** Les quantités des biofilms obtenues dans les différentes configurations ainsi que les quantités produites de lipopeptides (surfactine et fengycine)

## 2.9. Discussion

Dans ce chapitre un procédé de production de lipopeptides de *B. subtilis* ATCC 21332 par un bioréacteur à disques tournants a été mis en œuvre pour la première fois.

Ce bioréacteur à disques tournants est un appareil mis au point pour permettre l'apport de l'oxygène nécessaire à la culture par une aération en surface qui peut être une solution appropriée pour palier au problème de la formation de mousse gênante à cette production en cas de bullage de l'air dans le milieu de culture contenant les biosurfactants.

Les résultats obtenus avec ce type de bioréacteur ont démontré qu'il permet à la fois la croissance de la souche de *B. subtilis* ATCC 21332 ainsi que la production des lipopeptides.

La souche cultivée dans le bioréacteur à disques tournants se trouve soit sous forme planctonique (cellules libres) dans le milieu de culture, soit sous forme de biofilm (cellules immobilisées) sur les disques. La présence de ces deux formes rend l'étude du comportement physiologique de la biomasse dans ce bioréacteur très complexe.

L'adhésion des cellules sur les disques et leur croissance semblent être influencées par plusieurs paramètres notamment, le nombre de disques, la présence d'agitateurs ainsi que la vitesse rotationnelle. En effet, nous avons remarqué que plus nous avons de disques plus la quantité de biofilm formé est élevée mais elle n'est pas pour cela proportionnelle (500 mg pour 7 disques et 800 mg pour 14 disques). D'autre part, pour une vitesse inférieure ou supérieure à  $30 \text{ min}^{-1}$  on remarque qu'on obtient une quantité moins importante de cellules immobilisées qu'à  $30 \text{ min}^{-1}$  qui peut être la vitesse appropriée pour l'adhésion des cellules et la formation de biofilm (Figure 55). En effet pour une vitesse faible de  $6 \text{ min}^{-1}$  le film liquide entraîné par la rotation des disques pourrait retomber directement et exercer des forces sur les cellules qui commencent à s'adhérer ou à croître sur les disques. Cependant, pour une vitesse rotationnelle plus élevée ( $42 \text{ min}^{-1}$ ), les forces hydrodynamiques du film liquide pourraient détacher les cellules adhérentes par les forces centrifuges exercées par cette vitesse. Dans le cas où on intègre les agitateurs avec les disques, on obtient une quantité moins importante de cellules immobilisées (500 mg pour 7 disques et 300 mg pour 7 disques et 6 agitateurs). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les agitateurs situés entre les disques augmentent les forces de cisaillement inhibant ainsi la croissance des cellules fixées et donc la formation de biofilm.

Dans le cas de cultures dans le bioréacteur avec une configuration constituée uniquement d'agitateurs, seules les cellules libres sont présentes, en négligeant la très faible quantité de cellules sur les agitateurs, et leur croissance semble être fortement affectée par la vitesse rotationnelle qui correspond à la vitesse de mélange dans le bioréacteur. En effet plus on augmente la vitesse rotationnelle plus on obtient des quantités de biomasse plus élevées en fin de culture. Ceci confirme bien ce qui a été dit dans la partie bibliographique concernant l'effet de l'agitation sur la production des lipopeptides.

Les biomasses totales obtenues sont relativement plus importantes pour les fermentations en présence de disques. Néanmoins, les quantités de cellules libres sont plus élevées en présence d'agitateurs couplés à des disques qu'en présence de disques seulement. La croissance des cellules planctoniques s'est avérée aussi influencée par la vitesse rotationnelle en présence de disques et d'agitateurs et même en présence de disques seulement. En effet, nous avons démontré que plus on augmente la vitesse rotationnelle plus la croissance des cellules libres atteint des quantités élevées, ceci démontre bien l'effet de l'agitation sur la croissance de la souche de *B. subtilis* ATCC 21332. Les rendements de

conversion du glucose en biomasse en fin de culture sont de même ordre de grandeur que ceux trouvés par d'autres études de *B. subtilis* ATCC 21332 à 30°C en milieu de Landy, de Cooper ou MSI (Davis *et al.*, 1999 ; Davis *et al.*, 2001 ; Yeh *et al.*, 2006 ; Coutte *et al.*, 2010). Cependant, les quantités de biomasses obtenues en fin de culture sont relativement faibles par rapport à celles obtenues par des cultures en fioles d'Erlenmeyer. Cette faible croissance en bioréacteur est certainement liée à une limitation en substrat qui ne peut être que l'oxygène dissous disponible. En effet, cette hypothèse est démontrée tout d'abord par les analyses de dosage des substrats et qui montrent qu'il n'y a pas de limitation concernant le glucose (pour toutes les configurations) et le glutamate (pour le bioréacteur avec 7 disques seulement). De même, qu'une production de 2-3 butanediol ou de son précurseur l'acétoïne, de lactate dans ces conditions révèle une croissance en limitation d'oxygène comme a été démontré par plusieurs auteurs (Nakano *et al.*, 1997 ; Cruz *et al.*, 2000 ; Coutte *et al.*, 2010)

Malgré les productions élevées des lipopeptides obtenues, aucune formation de mousse n'a été observée dans les différentes configurations utilisées.

Dans chacune des configurations testées, il s'est avéré que la production de la fengycine est toujours plus élevée que celle de la surfactine. Ces résultats montrent bien que ce bioréacteur permet une production élevée de lipopeptides et l'orienté vers la synthèse de la fengycine qui atteint des concentrations très élevées. En effet, dans le cas de la configuration avec 14 disques, la concentration de la fengycine atteint 838 mg L<sup>-1</sup>, ceci représente un résultat impressionnant de production de cette molécule. D'autant plus que la souche *B. subtilis* ATCC 21332 a été longtemps considérée comme une souche mono productrice de surfactine. Dans la littérature on ne trouve malheureusement pas de valeurs de production de fengycine en bioréacteur sauf pour le cas des bioréacteurs couplés à des membranes. Dans ce type de bioréacteur à membrane, le maximum de production de fengycine avec la meilleure configuration ne dépasse pas les 400 mg L<sup>-1</sup> (Coutte *et al.*, 2010). Cependant ce procédé reste non industrialisable du fait des problèmes liés à l'encrassement des membranes ainsi qu'au long temps de cycle de production qui comprendra les différents lavages des membranes pour éliminer les cellules fortement adhérentes. Les faibles productions de surfactine pourraient être expliquées par une concurrence entre les deux voies métaboliques pour une production excessive de fengycine.

Comme nous l'avons déjà démontré au début de ce chapitre, les billes en PPch préalablement colonisées pendant 96 heures par des cellules de *B. subtilis* ATCC 21332 ont un rôle très important dans la production des lipopeptides et surtout l'orientation de la synthèse vers la fengycine. Cependant, dans le cas du bioréacteur à disques tournants, la croissance, la colonisation et la production se sont déroulées en même temps. C'est-à-dire que pendant ces expériences, les disques n'étaient pas préalablement colonisés par les cellules. Pour mieux comprendre le métabolisme des cellules adhérentes sur les disques, il est plus judicieux de tester des disques préalablement colonisés par des cellules.

Tous ces résultats montrent l'efficacité du procédé utilisé pour la première fois pour la production simultanée de la surfactine et de la fengycine. Cependant, cette coproduction des deux lipopeptides rend la compréhension de la production et du métabolisme plus complexe. Pour mieux décortiquer ces phénomènes il serait plus judicieux d'utiliser une souche mono productrice. Le bioréacteur à disques rotatifs pourra ainsi être exploitable à l'échelle pilote ou même à l'échelle industrielle pour la production des lipopeptides.

## **2.10. Valorisation des résultats**

Ces études sur la production des surfactines et des fengycines en bioréacteur à disques tournants, ont permis de trouver une solution à la fois au problème de moussage ainsi qu'au problème des faibles taux de production de la souche *B. subtilis* ATCC 21332.

Ces travaux ont donné lieu à une publication dans *Process Biochemistry* (acceptée par le congrès SFGP 2011 pour être soumise) et une communication affichée ainsi qu'à deux présentations orales dans des congrès nationaux et internationaux (l'orateur est souligné). Toutes ces communications ont été soumises à un comité de lecture.

### **2.10.1. Publication**

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2011). Rotating discs bioreactor, a new concept for lipopeptides production. Article accepté par le congrès SFGP 2011 pour être soumis en décembre 2011 à *Process Biochemistry*.

### **2.10.2. Communication affichée**

**Omar Chtioui**, Frédérique Gancel, Krasimir Dimitrov, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2011). Intérêt du biofilm de *Bacillus subtilis* pour favoriser la production de la fengycine. Colloque Adebitech / Réseau National Biofilms. Gestion des biofilms, enjeux industriels, Biocitech, PARIS - ROMAINVILLE, 13 octobre.

### **2.10.3. Présentations orales**

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2010). Production de lipopeptides par souches de *Bacillus* immobilisées. Journée des jeunes chercheurs **UGÉPE** Nord Pas-de-Calais, Dunkerque, 03 juin.

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2011). Bioréacteur innovant pour la production de biosurfactants. **12<sup>ème</sup>** congrès de la Société Française de Génie des Procédés **SFGP**, Lille, 29 novembre au 1<sup>er</sup> décembre.

### **3. Purification des lipopeptides de *Bacillus subtilis* par extraction liquide-liquide**

#### **3.1. Introduction**

Comme nous l'avons vu dans la synthèse bibliographique, la surfactine et la fengycine présentent différentes propriétés techno-fonctionnelles qui leur ouvrent la porte à des applications dans de nombreux domaines. De ce fait, la récupération et la purification de ces tensioactifs à partir des milieux de fermentation présentent un intérêt important. Le but des travaux effectués dans cette partie est d'étudier la faisabilité d'appliquer la pertraction pour la récupération des lipopeptides contenus dans des surnageants issus de productions des cultures de *B. subtilis* ATCC 21332.

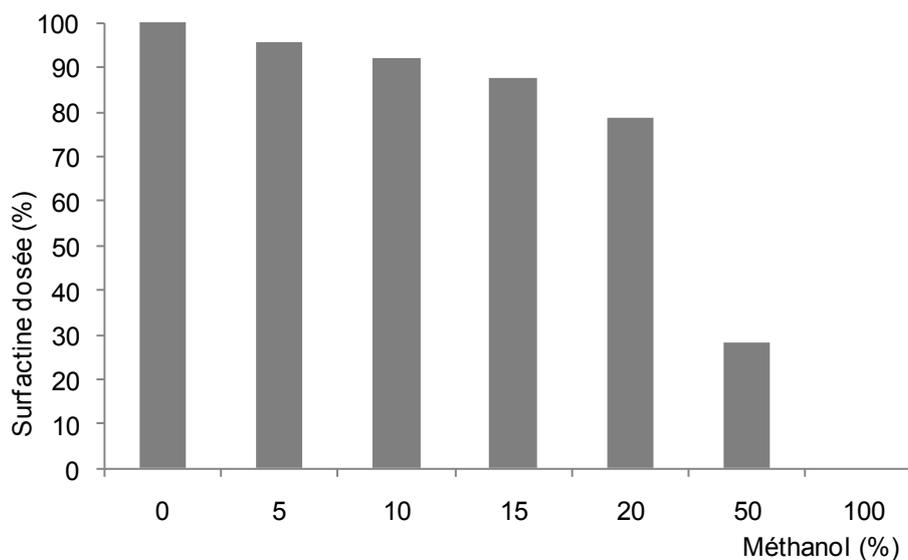
#### **3.2. Préparation des échantillons**

Comme cela a été décrit dans la partie « MATÉRIELS et MÉTHODES », les échantillons issus d'extraction liquide-liquide ou de pertraction ont été conditionnés et purifiés sur des colonnes C18 (Alltech, USA) avant de les analyses.

Une étude de la dernière étape de purification (qui consiste en un lavage des cartouches pour éliminer les sels et laisser les lipopeptides accrochés sur la cartouche) concernant l'effet du méthanol à décrocher la surfactine a été faite selon les conditions précédemment décrites (§ 3.2.1).

Différents tests sur un même échantillon ont été réalisés avec des solutions de lavages d'eau ultra pure contenant différentes proportions de méthanol. En effet sept solutions d'eau ultra pure et de méthanol ont été testées : 100% eau ; 95% eau et 5% méthanol ; 90% eau et 10% méthanol ; 85% eau et 15% méthanol ; 80% eau et 20% méthanol ; 50% eau et 50% méthanol et 100% méthanol.

Les résultats du dosage de la surfactine pour chaque cas sont présentés dans la Figure 56. En effet, on remarque que la présence du méthanol a un effet sur le décrochage des surfactines même à de faibles proportions. Ces résultats nous ont ainsi conduits de choisir d'utiliser une solution d'eau ultra pure exempte de méthanol pour cette étape de purification. De même, le test réalisé avec 100% de méthanol confirme bien que les surfactines sont bien décrochées comme l'indique la dernière étape de cette purification (§ 3.2.1).



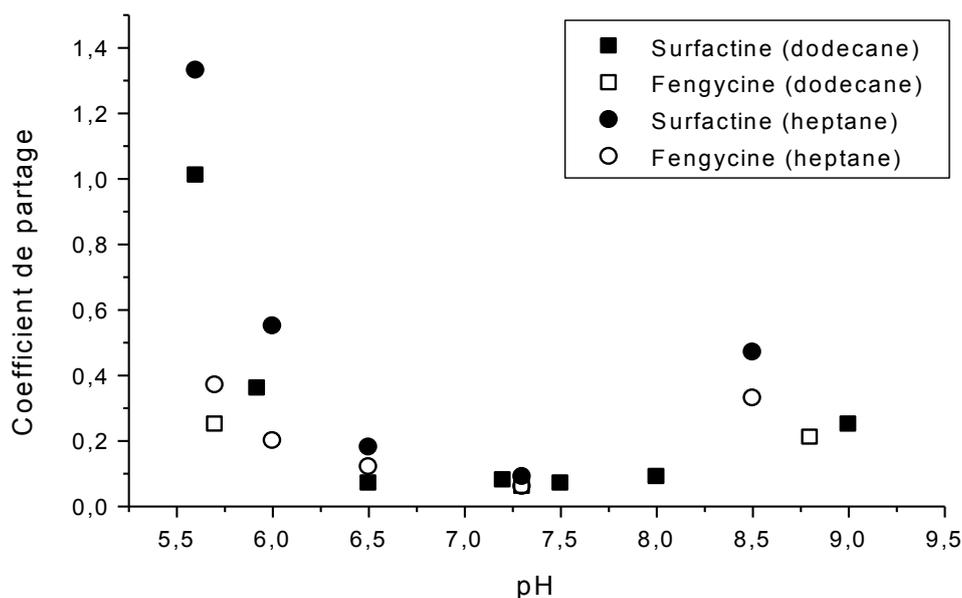
*Figure 56 : Effet du méthanol sur l'élution de la surfactine lors de l'étape de lavage de la technique de purification de la surfactine sur les cartouches C18*

### 3.3. Etude d'équilibre d'extraction liquide-liquide

Avant d'essayer la faisabilité de l'extraction des lipopeptides par la pertraction, une étude approfondie par extraction liquide-liquide dans des systèmes diphasiques a été faite pour déterminer l'équilibre thermodynamique ainsi que les conditions optimales d'extraction et de dés-extraction des lipopeptides notamment, les pH de la phase d'alimentation et de la phase de réception ainsi que le solvant organique adéquat.

Des expériences sur l'extraction des surfactines et des fengycines séparément ont été faites avec deux solvants organiques : le *n*-heptane et le dodecane. L'étude a été faite sur une gamme de pH entre 5,5 et 9,0. En fait, les meilleures conditions pour la production des lipopeptides sont à pH neutre. Donc l'extraction des lipopeptides à partir d'un tel milieu sera envisagée, mais pour pouvoir améliorer le taux d'extraction des petites modifications du pH ont été également réalisées. D'autant plus que la souche *B. subtilis* peut produire lipopeptides dans des conditions de pH entre 6,0 et 8,5 (Tao *et al.*, 2007). Cependant l'acidification des milieux de fermentation contenant surfactine est limitée à cause de la tendance du lipopeptide de précipiter à pH inférieur à 5,5 (Wei et Chu, 1998).

Les coefficients de partage ont été calculés comme précédemment décrit (§ 4.1). Il s'est avéré que ce coefficient est très affecté par le pH (Figure 57). En effet, les résultats de ces expériences ont montré que généralement pour des valeurs de pH moyennement neutres, l'extraction des surfactines et des fengycines n'est pas favorisée. Cependant à des pH moyennement acides (5,6-6,0) et moyennement basiques (8,5-9,0) l'extraction est nettement améliorée surtout pour des pH acides (Figure 57). Le degré d'extraction de la surfactine obtenu est supérieur à celui de la fengycine pour les mêmes conditions, de plus le *n*-heptane a présenté un meilleur taux d'extraction et une meilleure sélectivité pour les deux lipopeptides par rapport au dodecane. Les faibles coefficients de partage obtenus à des pH neutres montrent qu'à ces conditions les lipopeptides ont un comportement clairement hydrophile. Donc des solutions aqueuses de pH neutre semblent appropriées pour la dés-extraction des lipopeptides et la régénération continue du solvant organique au cours d'une pertraction.



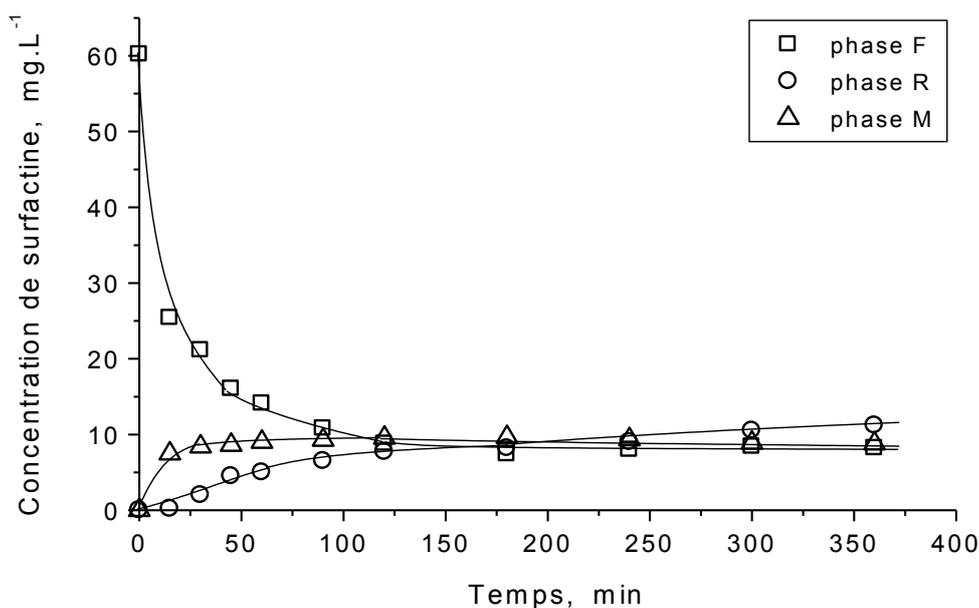
**Figure 57:** Effet du pH sur le degré d'extraction des lipopeptides par les solvants organiques (Concentration initiale de la surfactine =  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ; Concentration initiale de la fengycine =  $100 \text{ mg L}^{-1}$ )

### 3.4. Pertraction

Les expériences préliminaires précédentes nous ont ainsi permis de mettre au point les conditions favorables pour les deux étapes qui constituent la pertraction, notamment l'extraction et la dés-extraction. La récupération de la surfactine à partir d'un milieu de fermentation a été réalisée par pertraction avec le *n*-heptane comme membrane liquide (M) et comme phase de réception (R) une phase aqueuse à 0,2 mol L<sup>-1</sup> de tampon phosphate à pH 7,3. Le pH de cette phase est un pH qui favorise le passage de la surfactine vers la phase de réception. La concentration initiale de surfactine dans la phase d'alimentation (F) a été de 60,2 mg L<sup>-1</sup>. Compte tenu de la très faible concentration de fengycine dans cette phase (< 5 mg L<sup>-1</sup>) son transfert au cours de pertraction n'a pas été suivi. Le pH de la phase d'alimentation a été fixé à 5,7 à l'aide de tampon de phosphate (0,2 mol L<sup>-1</sup> phosphates). La pertraction des surfactines a été ainsi réalisée selon les conditions décrites précédemment (§ 4.2.2).

Excepté la formation temporaire de quelques fines gouttelettes à proximité de l'interface F/M au début de l'expérience, le système de trois phases a été très stable pendant la pertraction.

L'évolution de la concentration de surfactines dans les deux phases aqueuses lors de la pertraction en mode batch est présentée dans la Figure 58. Malgré un coefficient de partage autour de 1,0 les résultats obtenus montrent une bonne extraction de surfactine à partir du surnageant de culture par la membrane liquide. En effet, plus de 75% de la surfactine présente initialement dans la phase d'alimentation a été extraite dès la première heure. La concentration de surfactine dans la membrane liquide, calculée par bilan de matière, augmente rapidement au début de l'expérience, passe par un maximum et commence à décroître après environ 2 heures de pertraction. A partir de ce moment les concentrations de surfactine dans les phases F et M sont très proches et diminuent ensemble. Cependant, la dés-extraction (passage de la surfactine de la membrane liquide vers la phase réceptrice) a été relativement lente. A la fin de l'expérience (6 heures), environ 20% des surfactines sont passées vers la phase de réception. Néanmoins, en observant les résultats on remarque bien que l'équilibre n'est pas encore atteint et que la concentration de la surfactine dans la phase R dépasse les concentrations dans les autres phases et continue constamment d'augmenter.



**Figure 58 :** Evolution de la concentration de la surfactine dans la phase d'alimentation (F), la membrane liquide (M) et la phase de réception (R) pendant une pertraction (Concentration initiale de surfactine = 60,2 mg L<sup>-1</sup> ; pH<sub>F</sub> = 5,7 ; pH<sub>R</sub> = 7,3)

### 3.5. Discussion

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'extraction des lipopeptides par pertraction dans un contacteur à disques tournants et il s'est avéré que dans les conditions utilisées la récupération de la surfactine à partir de surnageants de culture est prometteuse.

Des études préliminaires diphasiques nous ont permis de conclure que les coefficients de partage des surfactines et des fengycines dans la phase aqueuse et la phase organique sont fortement affectés par la variation du pH. En effet, ces coefficients sont faibles à des pH neutres et augmentent progressivement à des pH acides et basiques. Cette constatation peut être expliquée pour la surfactine par le fait de ses changements de conformations hélice- $\alpha$ , feuillet- $\beta$  et désordonnée dans des milieux de différentes acidités. Osman et ses collaborateurs ont montré que dans une zone de pH neutre (6,5-7,5) les molécules de surfactine sont organisées généralement en micelles feuillet- $\beta$  (Osman *et al.*, 1998). Cette configuration est caractérisée par une exposition des groupes carboxyliques à la surface de la micelle qui

explique le caractère polaire de la surfactine. Dans ces conditions, la surfactine est sous forme anionique avec deux charges négatives : une charge pour l'aspartate et l'autre pour le glutamate. Ainsi, le caractère anionique de la surfactine dans ces milieux prédétermine sa solubilité limitée dans les solvants non polaires et, par conséquent, de son extraction insignifiante par *n*-heptane et par dodécane. En dehors de cette zone neutre, d'autres conformations ont été observées (Osman *et al.*, 1998). Avec l'augmentation des valeurs du pH à 8,5 ou plus et au dessous de la CMC, les monomères de surfactine ont généralement une conformation désordonnée. Cependant, au dessus de la CMC, les molécules de surfactine sont organisées généralement en micelles d'hélice- $\alpha$ . Ainsi, la micro polarité fortement réduite des micelles  $\alpha$ -hélices comparée aux micelles feuillet- $\beta$  pourrait expliquer la meilleure extraction de surfactine dans les alcanes avec des solutions à la fois basiques et acides.

Malgré la faible variation des coefficients de partage de la fengycine dans la phase aqueuse et organique en fonction du pH (Figure 57), le comportement de la courbe d'extraction est très similaire à celui de la surfactine. Ceci nous permet de dire qu'il semblerait qu'il y a une ressemblance entre les micro-polarités de ces deux lipopeptides.

Le pH de 5,7 de phase d'alimentation (F) de la pertraction a été utilisé afin d'assurer des conditions favorables pour l'extraction de la surfactine. A ce pH faiblement acide, les extrémités hydrophobes (lipidiques) des molécules de surfactine sont en conformation non ordonnée ou en  $\alpha$ -hélices et elles sont plus accessibles au solvant non-polaire utilisé (*n*-heptane). Le pH neutre de 7,3 de la phase de réception (R) permet ainsi aux molécules de surfactine de s'organiser en micelles feuillet- $\beta$  et donc les groupes carboxyliques seront exposés à la surface de la micelle et la solubilité des molécules sera limitée dans les solvants non polaires et, par conséquent, de son extraction insignifiante par le *n*-heptane. Cependant la faible dés-extraction de 20% peut être expliquée par le fait que l'équilibre thermodynamique n'a pas été atteint et que l'accumulation de la surfactine dans cette phase est très lente. Le lent passage de la surfactine dans la phase réceptrice peut être expliqué par le grand volume de la phase organique qui représente plus de quatre fois le volume de la phase (R), par la faible vitesse rotationnelle des disques ou par l'accumulation des molécules de surfactine aux interfaces. La faible concentration des surfactines dans la phase réceptrice (R) peut aussi limiter la formation des micelles feuillet- $\beta$  ( $\beta$ -sheet) ce qui favorise leur passage (retour) vers la phase organique.

En comparant ces résultats à ceux obtenus par une pertraction d'une solution modèle de molécules de surfactine (Dimitrov *et al.*, 2008a), il s'est avéré que dans notre cas (qui correspond à une pertraction à partir d'un surnageant de culture) la cinétique de récupération de la surfactine est plus lente. Il semblerait que les autres molécules (autres que les surfactines) se trouvant dans le surnageant de culture pourraient affecter le transfert de la surfactine à travers la membrane liquide. En effet, la proportion des lipopeptides dans les surnageants de culture est très faible ce qui rend leur récupération difficile.

La pureté de la surfactine dans la phase (R) n'a malheureusement pas été déterminée. Cependant des études réalisées par Chen et Juang ont trouvé des puretés de surfactine allant de 60 à 75% après une extraction par le *n*-hexane (Chen et Juang, 2008). Ces taux de pureté relativement élevés laissent considérer que la récupération des lipopeptides à partir de leur milieu de fermentation par pertraction dans un contacteur à disques tournants pourrait bien être appliquée.

### **3.6. Valorisation des résultats**

Les études concernant la purification des lipopeptides de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 par extraction liquide-liquide et par pertraction dans un contacteur à disques tournants, ont permis de trouver les équilibres thermodynamiques de ces deux lipopeptides et en même temps la pertraction a été appliquée pour récupérer la surfactine directement du milieu de fermentation pour une première fois.

Ces travaux ont donné lieu à une publication dans *Process Biochemistry* et une communication affichée ainsi qu'à une présentation orale dans des congrès nationaux et internationaux (l'orateur est souligné). Toutes ces communications ont été soumises à un comité de lecture.

#### **3.6.1. Publication**

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel and Iordan Nikov. (2010). Biosurfactants production by immobilized cells of *Bacillus subtilis* ATCC21332 and their recovery by pertraction. *Process Biochemistry*, 45 (11) pp. 1795-1799.

### 3.6.2. Communication affichée

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel, Iordan Nikov and Pascal Dhulster. (2009). Production de lipopeptides par *Bacillus subtilis* ATCC 21332 immobilisées et extraction de la surfactine par pertraction. 2<sup>ème</sup> journée thématique de l'EDT **GEPROC**, Gembloux, 16 décembre

### 3.6.3. Présentations orales

**Omar Chtioui**, Krasimir Dimitrov, Frédérique Gancel and Iordan Nikov. (2009). Production de biosurfactants dans un réacteur à biofilm et leur extraction par pertraction. 11<sup>ème</sup> congrès de la **Société Française de Génie des Procédés SFGP**, Marseille, 14-16 octobre.

**Chapitre IV**  
**CONCLUSION ET**  
**PERSPECTIVES**

Les surfactines et les fengycines sont deux groupes de molécules présentant un grand spectre d'activités biologiques. De plus, ces lipopeptides sont biodégradables ce qui permet d'envisager leur utilisation dans de nombreuses applications industrielles et environnementales. Cependant, la production à grande échelle de ces molécules pose de nombreux problèmes en raison des faibles quantités de production de ces molécules par les souches sauvages de *B. subtilis* et de la formation de mousse gênante engendrée par le bullage d'air lors des cultures réalisées en bioréacteurs classiques.

Dans les travaux présentés dans la thèse, un procédé permettant d'augmenter la production des lipopeptides synthétisés par *B. subtilis* ATCC 21332 a été développé. Tout d'abord, des études en amont concernant la production de surfactine et fengycine par cette souche immobilisée sur des supports solides ont permis de démontrer l'amélioration de la production des lipopeptides par les cellules organisées en biofilm par rapport à la production par des cellules libres. En effet, les résultats obtenus ont montré une forte augmentation de la production de surfactine en cas d'ajout de supports solides colonisés par un biofilm de *B. subtilis* (concentrations 2 à 4 fois supérieures à celles obtenues par des cultures de cellules libres). L'effet de l'immobilisation a été encore plus important pour la production de fengycines dont la concentration a augmenté d'environ 15 fois dans le cas de cellules immobilisées.

A la base de ces résultats, un procédé innovant de production de lipopeptides dans un bioréacteur à biofilm sur des disques rotatifs a été développé. Tenant compte des difficultés liées au caractère tensioactif de ces molécules, la mise en œuvre de ce bioréacteur a permis de stabiliser le procédé et d'améliorer la production des lipopeptides. Les études des différentes configurations du bioréacteur et des différents paramètres hydrodynamiques ont permis d'évaluer leur effet sur la production des lipopeptides et de choisir des conditions optimales de production. Le bioréacteur à disques rotatifs a permis d'atteindre des concentrations d'intérêt industriel, notamment plus de  $1 \text{ g L}^{-1}$ , à une faible concentration cellulaire totale (de l'ordre de  $3\text{-}4 \text{ g M.S.L}^{-1}$ ), avec des rendements des lipopeptides rapportés à la biomasse  $Y_{P/X}$  de l'ordre de  $300\text{-}400 \text{ mg g}^{-1}$  de M.S. La synthèse de ces lipopeptides a été fortement influencée par les conditions d'agitation et la disponibilité de l'oxygène. Pour des  $K_{La}$  se situant entre  $0,001$  et  $0,003 \text{ s}^{-1}$ , le métabolisme est orienté vers la synthèse de fengycines qui représentent jusqu'à 80 % des lipopeptides synthétisés. La productivité en fengycine

particulièrement intéressante et la simplicité de la mise en œuvre du bioréacteur permet d'envisager une extrapolation de la production à l'échelle industrielle.

Une autre partie de la thèse a été consacrée à l'étude d'un procédé innovant d'extraction de ces molécules reposant sur l'utilisation de membranes liquides. La pertraction a été appliquée pour l'extraction des lipopeptides dans un contacteur à disques tournants. Cette technique s'est avérée prometteuse pour la récupération de la surfactine à partir de surnageants de culture. Plus de 75% de la surfactine présente initialement dans la phase d'alimentation a été extraite dès la première heure. Cependant, à la fin de l'expérience (6 heures), environ 20% de surfactine a été retrouvée dans la phase de réception. Ce faible taux de récupération dans la phase réceptrice semble être affecté par la présence d'autres molécules dans le surnageant de culture.

Suite à ces travaux, les objectifs principaux fixés au début de la thèse ont été atteints et plusieurs investigations peuvent être proposées pour approfondir et valoriser encore plus ces études. Tout d'abord, les études sur la régulation physiologique de *B. subtilis* ATCC 21332 en cellules immobilisées peuvent être approfondies afin d'expliquer l'orientation du métabolisme vers la synthèse de fengycine lors des cultures en bioréacteur à disques. De plus, l'immobilisation de cellules sur des disques de différents types de surfaces est envisagée pour favoriser la formation de biofilm et de production de lipopeptides. Le passage du régime batch vers le régime continu est nécessaire pour obtenir une production importante de lipopeptides. Enfin, une éventuelle extrapolation du bioréacteur à disques rotatifs à l'échelle pilote est envisagée.

En ce qui concerne la pertraction, un certain nombre de modifications concernant les compositions de la membrane liquide et de la phase réceptrice sont envisagées en vue d'assurer une meilleure régénération du solvant et l'accumulation des lipopeptides dans la phase réceptrice. Pour éviter les problèmes d'adsorption des lipopeptides sur les surfaces des disques tournants, des disques plus hydrophiles peuvent être envisagés. Evidemment, les études de la pertraction de fengycine, ainsi que la pertraction simultanée des deux lipopeptides à partir des milieux réels de fermentation sont nécessaires pour confirmer l'intérêt d'appliquer la pertraction pour la récupération de ces lipopeptides. Ces investigations permettront de se focaliser sur la faisabilité de la pertraction des lipopeptides en continu et sur

le couplage fermentation-pertraction pour une production et purification simultanée dans le cadre d'un procédé intégré.

## Liste des références

### A

Aiba, S., Humphrey, A.E., and Millis, N.F. (1973). Aeration and agitation, in Biochemical Engineering, second edition. Academic press, New York, 163-194.

Alexandrova, S., Saboni, A., Boyadzhiev, L., Mouhab, N., and Estel, L. (2000). Récupération de substances par pertraction à films tournants. Chemical Engineering Journal, **79**(2):155-163.

Alexandrova, S., Dimitrov, K., Saboni, A., and Boyadzhiev, L. (2001). Selective recovery of silver from dilute polymetal solutions by rotating film pertraction. Separation and Purification Technology, **22-23**:567-570.

Alves, M.M., Pereira, M.A., Novais, J.M., Polanco, F. F., and Mota, M. (1999). A new device to select microcarriers for biomass immobilization: application to an anaerobic consortium. Water Environ. Res., **71**(2):209-217.

Apilanez, I., Gutidérrez, A., and Diaz, M. (1998). Effect of surface materials on initial biofilm development. Bioresource Technol., **66**:225-230.

Arima, K., Kakinuma, K., and Tamura, G. (1968). Surfactin, a cristalline peptidlipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: Isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**: 488-494.

Arnold, B.H., and Steel, R. (1958). Oxygen supply and demand in aerobic fermentations. In Biochemical Engineering, R. Steel, Ed, Heywood & Co., Ltd., London, 328 pp.

### B

Banat, I.M. (2000). Les biosurfactants plus que jamais sollicités. Biofutur, **198**.

Bandyopadhyay, B., Humphrey, A.E., and Taguchi, H. (1967). Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, **9**:533-544.

Bartholomew, W.H., Karow, E.O., Sfat, M.R., and Wilhelm, R.H. (1950). Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations – Mass transfer of oxygen in submerged fermentation of *Streptomyces griseus*. *Industrial and Engineering Chemistry*, **42**:1801-1809

Baumgart, F., Kluge, B., Ullrich, C., Vater, J., and Ziessow, D. (1991). Identification of amino acid substitutions in the lipopeptide surfactin using 2D NMR spectroscopy. *Biochem Biophys Res Commun*, **3**:998-1005.

Belkhadir, R. Etude fondamentale des biomasses fixées : description et modélisation des films biologiques anaérobies. Thèse, INSA Toulouse. (France) (1986).

Bertrand, J.C., Bonin, P., Goutx, M., Gauthier, M., and Mille, G. (1994). The potential application of biosurfactants in combatting hydrocarbon pollution in marine environments. *Res. Microbiol.*, **145**:53-56.

Bonmatin, J.M., Genest, M., Labbé, H., and Ptak, M. (1994). Solution three-dimensional structure of surfactin: a cyclic lipopeptide studied by 1H-NMR, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers*, **7**:975-86.

Bonmatin, J. M., Laprévote, O., and Peypoux, F. (2003). Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen*, **6**:541- 556.

Boumansour, B.E., and Vassel, J.L. (1998). A new tracer gas method to measure oxygen transfer and enhancement factor on RBC. *Water Research*, **32**:1049-1058.

Boyadzhiev, L. (1990). Liquid pertraction or liquid membranes – state of the art, *Sep. Sci. Technol.*, **25**:187-205.

Boyadzhiev, L., and Alexandrova, S. (1992). Dephenolation of phenol containing waters by Rotating Film Pertraction. *Separation Science and Technology* **27** (10): 1307-1317.

Boyadzhiev, L., Alexandrova, S., Kirilova, Z., and Saboni, A. (2003). Pertraction continue de tylosine dans un contacteur à films tournants." *Chemical Engineering Journal* **95**(1-3):137-141.

Boyadzhiev, L., and Atanassova, I. (1994). Extraction of phenylalanine from dilute solutions by rotating film pertraction, *Process Biochem.*, **29**:237-243.

Boyadzhiev L, and Lazarova Z. (1995). Liquid membranes (liquid pertraction). *Membr. Sci. Technol. Ser.*, **2**:283-352.

Buffière, P., Steyer, J.P., Fonade, C., and Moletta R., (1995). Comprehensive modeling of methanogenic biofilms in fluidized bed systems. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**(6):725-736.

Bylund, F., Collet, E., Enfors, S.O., and Larsson, G. (1998). Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation, *Bioprocess Engineering*, **18**:171-180.

Bylund, F., Guillard, F., Enfors, S.O., Trägårdh, C., and Larsson, G. (1999). Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance, *Bioprocess Engineering*, **20**:377-389.

## C

Carrillo, C., Teruel, J.A., Aranda, F.J., and Ortiz, A. (2003). Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta*, **1611**:91-97.

Cascaval, D., Galaction, A.I., and Nicuta, N. (2010). Comparative studies of free and facilitated pertraction of erythromycin from streptomyces erythreus broths, *Chem. Biochem. Eng. Q.*, **24**(2):177-185.

Chandrasekharan, K., and Calderbank, P.H. (1980). The evaluation of mass transfer product from unsteady-state absorption/desorption. *Chemical Engineering Science*, **35**:1477-1480.

Characklis, W.G., Trulear, M.G., Bryers, J.D., and Zilver N. Dynamics of biofilm processes: methods. *Water Research*, **16**:1207-1216.

Chen, H.L., and Juang, R.S. (2007). Extraction of surfactin from fermentation broth with n-hexane in microporous PVDF hollow fibers: Significance of membrane adsorption. *J. Membr. Sci.*, **325**:599-604.

Chen, H.L., and Juang, R.S. (2008). Extraction of surfactin from fermentation broth with n-hexane in microporous PVDF hollow fibers: significance of membrane adsorption. *J. Membr. Sci.*, **325**:599–604.

Chen, H.L., and Juang, R.S. (2008). Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. *Biochem Eng J*, **38**:39–46.

Chen, X.H., Koumoutsis, A., Scholz, R., Eisenreich, A., Schneider, K., Heinemeyer, I., Morgenstern, B., Voss, B., Hess, W.R., Reva, O., Junge, H., Voigt, B., Jungblut, P.R., Vater, J., Süßmuth, R., Liesegang, H., Strittmatter, A., Gottschalk, G., and Borriss, R. (2007). Comparative analysis of the complete genome sequence of the plant growth-promoting bacterium *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42. *Nature Biotechnol*, **25**:1007-1014.

Chollet-Imbert, M., Gancel, F., Slomianny, C., and Jacques, P. (2008). Differentiated pellicle organization and lipopeptide production in standing culture of *Bacillus subtilis* strains. *Arch Microbiol*, **191**:63–71.

Cooper, D.G., Macdonald, C.R., Duff, S.J., and Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**:408-412.

Cosby, W.M., Vollenbroich, D., Lee, O.H., and Zuber, P. (1998). Altered *srf* expression in *Bacillus subtilis* resulting from changes in culture pH is dependent on the Spo0K oligopeptide permease and the ComQX system of extracellular control. *J. Bacteriol*, **180**:1438-1445.

Coutte, F. Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à membrane. Thèse, Université Lille 1 (France) (2009).

Coutte, F., Lecouturier, D., Ait Yahia, S., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., and Dhulster, P. (2010). Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **87**:499-507.

Cruz, R.H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., and Jahn, D. (2000). Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J.Bacteriol*, **182**: 3072-3080.

## D

Dang, N.D.P., Karrer, D.A., and Dunn, I.J. (1977). Oxygen transfer coefficient by dynamic model moment analysis. *Biotech. Bioeng.*, **19** (16): 853-865.

Davis, D.A., Lynch, H.C., and Varley, J. (1999). The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. *Enz. Microb. Technol.*, **25**:322-329.

Davis, D.A., Lynch, H.C., and Varley, J., (2001). The application of foaming for the recovery of surfactin from *B. subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme Microb. Technol.*, **28**:346-354.

Deleu, M., Paquot, M., and Nylander, T. (2005). Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J. Colloid Interface Sci.*, **283**:358-365.

Deleu, M., Paquot, M., and Nylander, T. (2008). Effect of fengycin, a lipopeptide produced by *Bacillus subtilis*, on model biomembranes. *Biophys J.*, **94**:2667-2679.

Deleu, M., Paquot, M., Jacques, P., Thonart, P., Adriaensen, Y., and Dufrene, Y.F. (1999a). Nanometer scale organization of mixed surfactin/phosphatidylcholine monolayers. *Biophys. J.* **77**:2304-2310.

Deleu, M., Razafindralambo, H., Popineau, Y., Jacques, P., Thonart, P., and Paquot, M. (1999b). Interfacial and emulsifying properties of lipopeptides from *Bacillus subtilis*. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **152**:3-10.

Deravel, J. Caractérisation des lipopeptides d'origine non ribosomique comme biopesticides. Thèse, Université Lille 1 (France) (2011).

Di Palma, L., Merli, C., Paris, M., and Petrucci, E. (2003). A steady-state model for the evaluation of disk rotational speed influence on RBC kinetic: model presentation. *Bioresource Technology*, **86**:193–200.

Di Palma, L., Verdone, N., Chianese, A., Di Felice, M., Merli, C., Petrucci, E., and Veriani, G. (2002). Treatment of Wastewater with High Inorganic Salts Content. *Environmental Engineering Science*, (19):329-339.

Dimitrov, K., Alexandrova, S., Boyadzhiev, L., Ruellan, S., and Burgard, M. (1997). Recovery of copper from solutions by rotating film pertraction, *Sep. Sci. Technol.*, **12**:165-173.

Dimitrov, K., Boyadzhiev, L., Saboni, A., Alexandrova, S. (2002). Silver Recovery from Dilute Aqueous Solutions Using Semi-Batch RF-Pertraction, *Chem. Eng. Technol.*, **25** (6):663-666.

Dimitrov, K., Gancel, F., Montastruc, L., and Nikov, I. (2008). Liquid membrane extraction of bio-active amphiphilic substances: recovery of surfactin. *Biochem Eng J*, **42**:248–53.

Dimitrov, K., Metcheva, D., and Boyadzhiev, L. (2005). Integrated processes of extraction and liquid membrane isolation of atropine from *Atropa belladonna* roots. *Sep Purif Technol*, **46**(1–2):41–5.

Dimitrov, K., Rollet, V., Saboni, A., and Alexandrova, S. (2008). Recovery of nickel from sulphate media by batch pertraction in a rotating film contactor using Cyanex 302 as a carrier, *Chem. Eng. Process.*, **47**(9-10):1562-1566.

## E

Eberl, H.J., Picioreanu, C., Heijnen, J.J., and Van Loosdrecht M.C.M. (2000). A threedimensional numerical study on the correlation of spatial structure, hydrodynamic conditions, and mass transfer and conversion in biofilms. *Chem. Eng. Sci.*, **55**:6209-6222.

## F

Fahim, S. Process of lipopeptides production by *Bacillus subtilis*. Thèse, Université Lille 1 (France) (2011).

Fahim, S., Dimitrov, K., Gancel, F., Jacques, P., and Iordan Nikov. (2011). Impact of energy supply and oxygen transfer on selective lipopeptide production of *B.subtilis* ATCC 21332. Article accepté par le congrès SFGP pour soumettre dans «Process Biochemistry».

Fickers, P., Leclère, V., Guez, J.S., Béchet, M., Coucheney, F., Joris.,B., and Jacques, P. (2008). Temperature dependence of mycosubtilin homologue production in *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *Res. Microbiol*, **159**: 449-457.

Fournier-Salaun, M.C., and Salaun, P. (2009). Influence of operating parameters on chromic ions removal from aqueous solution by liquid membranes. *Desalination*, **249**(2):549-553.

## G

Gancel F, Montastruc L, Liu T, Zhao L, and Nikov I. (2009). Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron-enriched light polymer particles. *Process Biochem*, **44**(9):975-8.

Garcia-Ochoa, F., and Gomez, E. (2005). Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, **92**:761-772.

Ghazani, M.T. Etude des performances et optimisation d'un réacteur cascade à biomasse hybride pour le traitement des eaux usées urbaines. Thèse UNIVERSITE DE LIMOGES (France) (2007).

Grangemard, I., Peypoux, F., Wallach, J., Das, B.C., Labbé, H., Caille, A., Genest, M., Maget-Dana, R., Ptak, M., and Bonmatin, J.M. (1997). Lipopeptides with improved properties: structure by NMR, purification by HPLC and structure-activity relationships of new isoleucyl-rich surfactins. *J Pept Sci.*, **2**:145-54.

Grangemard, I., Wallach, J., Maget-Dana, R., and Peypoux, F. (2001). Lichenysin: a more efficient cation chelator than surfactin. *Appl Biochem Biotechnol*, **90**:199-210.

Grundy, F.J., Waters, D.A., Takova, T.Y., and Henkin, T.M. (1993). Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **10**:259-271.

Guez, J.S. Etude de la productivité et de la selectivité de la biosynthèse de mycosubtiline, un antibiotique surfactant de *Bacillus subtilis*. Thèse, Université Lille 1 (France) (2007).

Guez, J.S., Chenikher, S., Cassar, J.P., and Jacques, P. (2007). Setting up and modelling of overflowing fed-batch cultures of *Bacillus subtilis* for the production and continuous removal of lipopeptides. *J. Biotechnol*, **131**:67-75.

Guez, J.S., Müller, C.H., Danzé, P.M., Büchs, J., and Jacques, P. (2008). Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptides by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. *J. Biotechnol*, **134**:121-126.

Gjaltema, A., van der Marel, N., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (1997). Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: hydrodynamic conditions versus surface characteristics. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**(6):880-889.

Gogate, P.R., Pandit, A.B. (1999). Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, **4**:7-15.

## H

Habaki, H., Egashira, R., Stevens, G.W., and Kawasaki, J. (2002). A novel method improving low separation performance for W/O/W ELM permeation of erythromycin. *Journal of Membrane Science*, **208**:89–103.

Haddaoui, J. Propriétés complexantes, extractantes et de transport des calix[4]arènes couronnes diamides en conformation cône vis-à-vis des cations alcalins . Thèse, Université Louis Pasteur de Strasbourg (France) (2004).

Hathout, Y., Ho, Y.P., Ryzhov, V., Demirev, P. and Fenselau, C. (2000). Kurstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *J. Nat. Prod.*, **63**:1492-1496.

Hbid, Ch. Contribution à l'étude de la relation entre la structure des lipopeptides de *Bacillus subtilis* et leurs activités hémolytique et antifongique. Thèse, Université de Liège (Belgique) (1996).

Hee-Sik, K., Byung-Dae, Y., Chang-Ho, L., Hyun-Hyo, S., Hee-Mock, O., Tohoru, K., and Yoshiki, T. (1997). Production and Properties of a Lipopeptide Biosurfactant from *Bacillus subtilis* C9, *Journal of fermentation and Bioengineering*, **84**(1): 41-46.

Heijnen J.J., Mulder A., Enger W., Hoeks F. (1989). Review on the application of anaerobic fluidized bed reactors in wastewater treatment. *Chem. Eng. Journal*, **41**:37-50.

Hussein, W. Study on the regulation and biosynthesis of fengycin and plipastatin produced by *Bacillus subtilis*. Thèse, Université Lille 1 (France) (2011).

## I

Isa, M.H.M., Coraglia, D.E., Frazier, R.A., and Jauregi, P., (2007). Recovery and purification of surfactin from fermentation broth by a two-step ultrafiltration process. *J. Membr. Sci.*, **296**:51-57.

Ishigami, Y., Osman, M., Nakahara, H., Sano, Y., Ishiguro, R., and Mastsumoto, M. (1995). Significance of beta-sheet formation for micellization and surface adsorption of surfactin. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **4**:341-348.

Itokawa, H., Miyashita, T., Morita, H., Tekaya, K., Hirano, T., Homma, M., and Oka, K. (1994). Structural and conformational studies of [Ile7] and [Leu7] surfactins from *Bacillus subtilis* natto. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **42**:604-607.

## J

Jacques, P., Hbid, C., Destain, J., Razafindralambo, H., Paquot, M., De Pauw, E., and Thonart, P., (1999). Optimization of biosurfactant lipopeptide production from *Bacillus*

*subtilis* S499 Plackett-Burman design. Appl. Biochem. Biotechnol. Part A Enzyme Eng. Biotechnol, 77-79, 223-233.

Jianping, L., Bo, C., Jianping, W., and Peilin, C. (1997). L-lactic acid fermentation in a rotating-disc contactor with simultaneous product separation by ion-exchange. Chinese Journal of Chemical Engineering, (5): 49-55.

John, T., and Cookson, J.R. (1995). Bioremediation Engineering: Design and Application. McGraw-Hill, Inc, New York, New York.

Jones, R.P., and Greenfield, P.F. (1982). Review: Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Enzyme Microb. Technol., 4:210-223.

Ju, L.K., and Sundararajan, A. (1995). The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors. Bioprocess Engineering, 13:271-278.

Junker, B.H. (2004). Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. Journal of Bioscience and Bioengineering, 97:347-364.

## K

Kell, H., Holzwarth, J.F., Boettcher, C., Heenan, R.K., and Vater, J. (2007). Physicochemical studies of the interaction of the lipoheptapeptide surfactin with lipid bilayers of L-alpha-dimyristoyl phosphatidylcholine. Biophys. Chem., 128:114-124.

Kim, Y.J., Kim, J.N., Wee, Y.J., Park, D.H., and Ryu, H.W. (2007). Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* sp. RKY5 in a Rotary Biofilm Contactor. Applied Biochemistry and Biotechnology, (07):136-140.

Kislik V.S. (2010). Liquid membranes: principes and applications in chemical separations and wastewater treatment. Elsevier, First edition.

Kosaric, N. (2005). Biosurfactants and their application for soil bioremediation. Food Technol. Biotechnol., 39:295-304.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borriss, R., Boursier, L., Brans, A.,

Braun, M., Brignell, S.C., Bron, S., Brouillet, S., Bruschi, C.V., Caldwell, B., Capuano, V., Carter, N.M., Choi, S.K., Codani, J.J., Connerton, I.F., Danchin, A. *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis* Nature, **390**:249-256.

## L

Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B., and Colio, L.G., (1948). Bacillomycin: an antibiotic from *Bacillus subtilis* active against pathogenic fungi. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **67**:530-541.

Lazarova, M., and Dimitrov, K. (2009). Selective recovery of alkaloids from *glaucium flavum crantz* using integrated process extraction-pertraction, Sep. Sci. Technol., **44**(1):227-241.

Lazarova V., and Manem J. (1995). Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. Water Res., **29**(10):2227-2245.

Lazarova, Z., Syska, B., and Schugerl, K. (2002). Application of large-scale hollow fiber contactors for simultaneous extractive removal and stripping of penicillin G, J. Membr. Sci., **202**:151-164.

Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Guez, J.S., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-Imbert, M., and Jacques, P., (2005). Mycosubtilin overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 enhances the organism's antagonistic and biocontrol activities. Appl. Environ. Microbiol., **71**:4577-4584.

Leclère, V., Marti, R., Bechet, M., Fickers, and Jacques, P. (2006). The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surfaceactive properties. Arch Microbiol, **186**:475–83.

Leclerc, J.P., Detrez, C., Bernard, A., and Schweich (1995). DTS un logiciel d'aide à l'élaboration de modèles d'écoulement dans les réacteurs, Revue de l'institut français du pétrole, **50**(5):641-656.

Lee, B.S., and Kim, E.K. (2008). Lipopeptide production from *Bacillus sp.* GB16 using a novel oxygenation method. Enzyme Microb. Tech., **35**:639-647.

Levich, V.G. (1962). *Physicochemical Hydrodynamics*, Prentice-Hall.

Linek, V., Beneš, P., and Hovorka, F. (1981). The role of interphase nitrogen transport in the dynamic measurement of the overall volumetric mass transfer coefficient in air-sparged systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**:301-319.

Linek, V., Beneš, P., and Vacek, V. (1982). Analysis of differences in  $k_L a$  values by steady state and dynamic methods in stirred tanks. *The Chemical Engineering Journal*, **25**:77-88.

Linek, V., Beneš, P., and Vacek, V. (1988). Dynamic pressure method for  $k_L a$  measurement in Large-scale bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, **33**:1406-1412.

Liu, T., Montastruc, L., Gancel, F., Zhao, L., and Nikov, I. (2007). Integrated process for production of surfactin (Part 1): adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon. *Biochem Eng J.*, **33**:333–40.

Lopes de Figueiredo, M. and Calderbank, P. (1979). The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chemical Engineering Science*, **34**:1333-1338.

## M

McIntyre, M. and McNeil, B. (1998). Morphometric and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi submerged cultivation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**:291-298.

Maget-Dana, R., Thimon, L., Peypoux, F., and Ptak, M. (1992). Surfactin/iturin A interactions may explain the synergistic effect of surfactin on the biological properties of iturin A. *Biochimie*, **74**:1047-1051.

Maget-Dana, R., and Ptak, M. (1995). Interactions of surfactin with membrane models. *Biophys. J.*, **68**:1937-1943.

Marták, J., Schlosser, Š., and Vlčková, S. (2008). Pertraction of lactic acid through supported liquid membranes containing phosphonium ionic liquid. Journal of Membrane Science, **318** (1-2): 298-310.

Montastruc, L., Liu, T., Gancel, F., Zhao, L., and Nikov, I. (2008). Integrated process for production of surfactin. Part 2 : Equilibrium and kinetic study of surfactin adsorption onto activated carbon. *Biochem. Eng. J.*, **38**:349-354.

Mulligan, C.N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environ. Pollut.*, **133**:183-198.

## N

Nakano, M.M., Dailly, Y.P., Zuber, P., and Clark, D.P. (1997). Characterization of anaerobic fermentative growth of *Bacillus subtilis*: identification of fermentation end products and genes required for growth, *J. Bacteriol.*, **179**:6749-6755.

Nakano, M.M., Marahiel, M.A., and Zuber, P. (1988). Identification of a genetic locus required for biosynthesis of the lipopeptide antibiotic surfactin in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, **170**:5662-5668.

Neubauer, P., Häggström, L., and Enfors, S.O. (1995). Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth field in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations, *Biotechnology and bioengineering*, **47**:139-146.

Nicolella C., Di Felice R. and Rovatti M. (1996). An experimental model of biofilm detachment in liquid fluidized bed biological reactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **51**:713–719.

Nicolella, C., van Loosdrecht, M.C.M., and Heijnen, J.J. (2000). Wastewater treatment with particulate biofilm reactors. *Journal of biotechnology*, **80**:1-33.

Nikolov, L., Karamanev, D., Mamatarikova, V., Mehochev, D., and Dimitrov, D. (2002). Properties of the biofilm of *Thiobacillus ferrooxidans* formed in rotating biological contactor. *Biochem. Eng. J.*, **12**:43-48.

Nishikiori T, Naganawa H, Muraoka Y, Aoyagi T, and Umezawa H (1986a). Plipastatins: new inhibitors of phospholipase A2, produced by *Bacillus cereus* BMG302-fF67. III. Structural elucidation of plipastatins. *J. Antibiot.*, **39**:755-761

## O

Ongena, M., and Jacques, P. (2008). *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol*, **16**:115-125.

Ongena, M., Jacques, P., Touré, Y., Destain, J., Jabrane, A., and Thonart, P. (2005) Involvement of fengycin-type lipopeptides in the multifaceted biocontrol of *Bacillus subtilis*, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, **69**:29-38.

Ongena, M., Jourdan, E., Adam, A., Paquot, M., Brans, A., Joris, B., Arpigny, J.L., and Thonart, P. (2007). Surfactin and fengycin lipopeptides of *Bacillus subtilis* as elicitors of induced systemic resistance in plants. *Environ Microbiol*, **9**:1084–1090.

Osman, M., Høiland, H., Holmsen, H., and Ishigami, Y. (1998). Tuning micelles of a bioactive heptapeptide biosurfactant via extrinsically induced conformational transition of surfactin assembly. *J. Pept. Sci.*, **4**:449-458.

Ohno, A., Ano, T., and Shoda, M. (1995). Effect of temperature on production of lipopeptide antibiotics, iturin A and surfactin by a dual producer, *Bacillus subtilis* RB14, in solid-state fermentation. *J. Ferment. Bioeng.*, **80**:517-519.

## P

Palanivelu, K., Shanthana Lakshmi, D., and Ranganathan, K.R. (1998). Removal and recovery of hexavalent chromium from plating wastewater using liquid membrane, *J. Sci. Ind. Res.*, **57**(12):903-906.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., and Wallach, J. (1999). Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol*, **51**:553–563.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Das, B.C., Ptak, M., and Michel, G., (1991). Isolation and characterization of a new variant of surfactin, the [Val7] surfactin. *Eur J Biochem*, **202**:101-106.

Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Labbe, H., Grangemard, I., Das, B.C., Ptak, M., Wallach, J., and Michel, G. (1994) . [Ala4] surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. *Eur J Biochem*, **224**:89-96.

Poughon, L., Duchez, D., Cornet, J.F., and Dussap, C.G. (2003). KLa determination: comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **25**:341-348.

Price, N. P., Rooney, A. P., Swezey, J. L., Perry, E., and Cohan, F. M. (2007). Mass spectrometric analyses of lipopeptides from *Bacillus* strains isolated from diverse geographical locations. *FEMS Microbiol. Lett.*, **271**:83-89.

## R

Rainer, B.W. (1990). Determination methods of the volumetric oxygen transfer coefficient kLa in bioreactors. *Chemical and Biochemical Engineering*, **4**:185-196.

Raszowska-Kaczor, A., Adamczak, P., and Wodzki, R. (2010). Hybrid rotating reactor for Zn(II) recovery and separation, *Desalination*, **257** (1-3), 66-72.

Razafindralambo, H., Paquot, M., Baniel, A., Popineau, Y., Hbid, C., Jacques, P., and Thonart, P., (1996). Foaming properties of surfactin, a lipopeptide biosurfactant from *Bacillus subtilis*. *JAOCS J Am Oil Chem Soc*, **73**:149-151.

Royce, P. N., and Thornhill, N. F. (1992). Analysis of noise and bias in fermentation oxygen uptake rate data. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**:634- 637.

Ruchti, G., Dunn, I.J., and Bourne, J.R. (1981). Comparison of dynamic oxygen electrode methods for the measurement of KLa, *Biotechnol. Bioeng.*, **23**:277-290.

## S

Sablayrolles, J.M. and Barre, P. (1986). Evolution de la solubilité de l'oxygène au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin. Etude sur milieux modèles. *Sciences des Aliments*, **6**:177-184.

Savadogo, A., Tapi, A., Chollet, M., Wathelet, B., Traoré, A.S., and Jacques, P. (2011). Identification of surfactins producing strains in Soumbala and Bikalga fermented condiments using Polymerase Chain Reaction and Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry methods. *International Journal of Food Microbiology*.

Schlosser, S., Kertesz, R., and Martak, J. (2005). Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction: an overview with a case study on recovery of MPCA. *Sep Purif Technol*, **41**(3):237–66.

Schmalzriedt, S., Jenne, M., Mauch, K., and Reuss, M. (2003). Integration of physiology and fluid dynamics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 19-68.

Sen, R., and Swaminathan, T. (2005). Characterization of concentration and purification parameters and operating conditions for small-scale recovery of surfactin. *Process Biochem.*, **40**:2953-2958.

Shakeri Fard, P., Gancel, F., Jacques, P., and Faille, C. (2009). Effect of different *Bacillus subtilis* lipopeptides on surface hydrophobicity adhesion of *Bacillus cereus* 98/4 spores to stainless steel and Teflon. *Biofouling*, **25**:533–541

Shen, S. F., Smith, K. H., Cook, S., Kentish, S. E., Perera, J. M., Bowser, T, and Stevens, G. (2009). W. Phenol recovery with tributyl phosphate in a hollow fiber membrane contactor: 128 Experimental and model analysis. *Separation and Purification Technology*, **69**(1): 48-56.

Shioya, S., Morikawa, M., Kajihara, Y., and Shimizu, H. (1999). Optimization of agitation and aeration conditions for maximum virginiamycin production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:164- 169.

Schlosser, S., and Kossaczky, E. (1986). Pertraction through liquid membranes. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, **(101)**: 115-125.

Siegmund Lang. (2002). Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, **(7)**:12-20.

Smith, E., Hossain, M.M. (2007). Extraction and recovery of penicillin G in a hollow-fiber membrane contactor, *Asia-Pacific J. Chem. Eng.*, **(2)**: 455-459.

Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., and Losick, R. (2002) *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, physiology and molecular genetic.*

Souto, G.I., Correa, O.S., Montecchia, M.S., Kerber, N.L., Pucheu, N.L., Bachur, M. and Garcia, A.F. (2004). Genetic and functional characterization of *Bacillus* sp. strain excreting surfactin and antifungal metabolites partially identified as iturin-like compounds. *Journal of Applied Microbiology*, **(97)**:1247–1256

Spengel, D., and Dzombak, D. (1992). Biokinetic modeling and scale-up considerations for rotating biological contactors. *Water Res.*, **64**: 223.

## T

Thimon, L., Peypoux, F., Maget-Dana, R., Roux, B., and Michel, G. (1992). Interactions of bioactive lipopeptides, iturin A and surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol Appl Biochem*, **16**:144-151.

Trible, L.A., Briens, C.L., and Margaritis, A.A. (1995). Determination of the volumetric mass transfer coefficient ( $k_{La}$ ) using dynamic "gas out-gas in" method: analysis of errors caused by dissolved oxygen probe. *Biotechnol Bioeng*, **46**: 388-392.

Trischman, J.A., Jensen, P.R., and Fenical, W. (1994). Halobacillin: A cytotoxic cyclic acylpeptide of the iturin class produced by a marine *Bacillus*. *Tetrahedron Lett*, **35**: 5571-5574.

Tsuge, K., Ano, T., Hirai, M., Nakamura, Y., and Shoda, M. (1999). The genes *degQ*, *pps*, and *lpa-8 (sfp)* are responsible for conversion of *Bacillus subtilis* 168 to plipastatin production. *Antimicrob. Agents Chemother*, **43**: 2183-2192.

## U

Urtiaga, A., Gutiérrez, R., and Ortiz, I. (2009). Phenol recovery from phenolic resin manufacturing: Viability of the emulsion pertraction technology. *Desalination*, **245**: 444-450.

## V

Van Loosdrecht M.C.M. and Heijnen J.J. (1996). Biofilm processes in immobilised living cell systems, R.G. Willaert, G.V. Baron and L. De Backer Eds, Wiley, 255-271.

Van Oss, C.J., Good, R.J., and Chaudhury, M.K. (1988). Additive and non-additive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir*, **4**: 884-91.

Vanittanakom, N., Loeffler, W., Koch, U., and Jung, G. (1986). Fengycin - A novel antifungal lipopeptide antibiotic produced by *Bacillus subtilis* F-29-3. *J. Antibiot.*, **39**: 888-901.

Van't Riet, K. (1979). Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **18**: 357-364.

Van't Riet, K. and Tramper, J. (1991). *Basic bioreactor design*, Marcel Dekker, New York, Bassel, Hong Kong, 465 pp.

Vollenbroich, D., Ozel, M., Vater, J., Kamp, R.M., and Pauli, G. (1997a). Mechanism of inactivation of enveloped viruses by the biosurfactant surfactin from *Bacillus subtilis*. *Biologicals*, **25**:289-297.

Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., and Vater, J. (1997b). Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**:44-49.

## W

Wei, Y.H., and Chu, I.M. (1998). Enhancement of surfactin production in iron-enriched media by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Enzyme and Microbial Technology*, **22**:724-728.

Wei, Y.H., Lai, C.C., and Chang, J. S. (2007). Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochemistry*, **42**:40-5.

Wei, Y.H., Wang, L.F., and Chang, J.S. (2004). Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.*, **20**:979-983.

Weisenberger, S. and Schumpe, A. (1996). Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *AIChE Journal*, **42**:298-300.

Whitman, W.G. (1923). A preliminary experimental confirmation of the two-film theory of gas absorption. *Chem. Metall. Eng.*, **29**:146-148.

Wodzki, R., Szczepanska, G., Szczepanski, P. (2004). Unsteady state pertraction and separation of cations in a liquid membrane system: Simple network and numerical model of competitive  $M^{2+}/H^+$  counter-transport. *Sep. Purif. Technol.*, **36**:1-16.

## Y

Yakimov, M.M., Timm is, K.N., Wray, V., and Fredrickson, H.L. (1995). Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Applied and Environmental Microbiology*, **61**:1706-1713.

Yeh, M.S., Wei, Y.H., and Chang, J.S. (2005). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by addition of solid carriers. *Biotechnology Progress*, **21**:1329-1334.

Yeh, M.S., Wei, Y.H., and Chang, J.S. (2006). Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem*, **41**:1799-1805.

Yordanov, B., and Boyadzhiev, L. (2004). Pertraction of citric acid by means of emulsion liquid membranes, *J. Membr. Sci.*, **238**: 191-197.

## Z

Zeigler, D.R., Pragai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., Albert, T., Bai, R., Wyss, M., and Perkins, J.B. (2008). The origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains *J. Bacteriol*, **190**:6983-6995.

Zhivkova, S., Dimitrov, K., Kyuchoukov, G., Boyadzhiev, L. (2004). Separation of zinc and iron by pertraction in a rotating film contactor with Kelex 100 as a carrier, *Sep. Purif. Technol.*, **37**:9-16.

## **Annexe**

Les résultats de comparaison des productions des lipopeptides entre les cellules planctoniques et les cellules en biofilm de *B. subtilis* ATCC 21332 réalisées en fioles d'Erlenmeyer présentés au § 1. ainsi que les résultats de la récupération de la surfactine directement du surnageant de culture par pertraction présentés au § 3. ont fait l'objet d'un article publié dans le journal « Process Biochemistry » en Mai 2010.

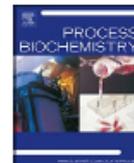
## Annexe 1

Process Biochemistry 45 (2010) 1795–1799



Contents lists available at ScienceDirect

Process Biochemistry

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/procbio](http://www.elsevier.com/locate/procbio)

## Biosurfactants production by immobilized cells of *Bacillus subtilis* ATCC 21332 and their recovery by pertraction

Omar Chtioui, Krasimir Dimitrov\*, Frederique Gancel, Jordan Nikov

Laboratoire ProBioGEM EA 1026, PolytechLille, Université de Lille 1, 59650 Villeneuve d'Ascq, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 June 2009

Received in revised form 11 May 2010

Accepted 12 May 2010

## Keywords:

Surfactin

Fengycin

Production

Biofilm

Liquid membranes

Pertraction

## ABSTRACT

Microbial production and isolation of biosurfactants was studied. The production of lipopeptides surfactin and fengycin was performed by free and immobilized aerobic cells of *Bacillus subtilis* ATCC 21332. After preliminary tests with 5 polymer materials, the particles of polypropylene foamed with powder activated carbon (PPch) were selected for lipopeptides production for their thermal and mechanical stability and for the high colonizing effect. To avoid foaming during biosurfactant production, biofilm grown on solid floating support was aerated by air injected over the surface of cultural medium. The synthesis of both lipopeptides and especially of the fengycin was greatly enhanced by the immobilization. The relationship between support wettability, colonization of the cells, and lipopeptide production was discussed. Extraction behaviour of the lipopeptides into alkanes was studied. The distribution ratio of surfactin was found to be higher than this of fengycin at the same conditions and the *n*-heptane was more efficient solvent for both lipopeptides. Kinetics of surfactin recovery from fermentation broth applying batch pertraction in a rotating discs contactor was studied. Lipopeptide was successfully extracted (more than 75% in the first hour) using *n*-heptane as liquid membrane and a 0.2 mol L<sup>-1</sup> phosphate buffer solution (pH ~7.3) as receiving solution. However, the stripping of the organic liquid and surfactin accumulation into the receiving phase were less efficient.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

The use of biofilm reactor, leading to high cell concentrations per unit volume, seemed a promising method for improving reactor performance and selectivity [1–3]. Adhesion of microbial cells to the solid surface is a rather complicated process which involves Van der Waals forces, ionic and hydrogen bonds, interfacial energy, morphology and conditioning of the inert solid surface by extracellular macromolecules and by products [2]. Electric charge of the solid surface, surface composition and surface morphology are three major properties influencing cell attachment. On the other hand, characteristics and activities of the bacteria play an important role in cell adhesion. Environmental, physicochemical and hydrodynamic conditions, such as pH, ionic strength, composition of culture medium (presence of metallic ions) and intensity of turbulence, influence the cell adsorption [4].

In the present work, we focused on the production of biosurfactants by immobilized cells of *Bacillus subtilis* and on their isolation from fermentation broth by a perspective continuous separation based on a liquid membrane technique (known also as pertraction).

Two lipopeptides families are excreted by *B. subtilis* ATCC 21332, namely surfactin and fengycin [4]. The fermentation products are cyclic lipopeptides composed of 7 (surfactin) or 10 (fengycin) amino acid residues linked to one hydrophobic  $\beta$ -hydroxy fatty acid (C13 to C16 for surfactin and C14 to C18 in the case of fengycin) [5]. The surfactin peptidic moiety contains two charged amino acid chains (Glu-1 and Asp-5) and the fengycin has three charged amino acids (Glu-1, -5 and Orn-2) which represent the hydrophilic part of the peptides. The lipidic chains should be extend freely in solution below the critical micellar concentration (CMC, 10 mg L<sup>-1</sup> for surfactin and 6.25 mg L<sup>-1</sup> for fengycin). They strongly participate in intermolecular hydrophobic interactions in supramolecular structures, such as micelles. The properties of surfactin and fengycin are mainly related to their amphiphilic character. Due to their particular biological and physicochemical properties, and especially their biodegradability, these biosurfactants represent interest for application in agriculture, petrol industry, pollution remediation and pharmaceutical fields [4,5]. To date, these compounds have not been able to compete economically with their chemically synthesized counterparts, because of the poor strain productivity and the expensive substrates. Continued efforts must therefore be redirected to improve the bioproduction efficiency and recovery processes in order to optimize the yields. The immobilized cultures of *B. subtilis* ATCC 21332 produced 2.0–4.3 times more biosurfactants than planktonic cells [4]. The immobilization seemed

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [krasimir.dimitrov@polytech-lille.fr](mailto:krasimir.dimitrov@polytech-lille.fr) (K. Dimitrov), [jordan.nikov@polytech-lille.fr](mailto:jordan.nikov@polytech-lille.fr) (I. Nikov).

to modify also the ratio between surfactin and fengycin with an enhancement of the fengycin production in the biofilm reactors. A potential improvement in the biofilm technology can be the development of supports with extensive surface roughness and optimal physical parameters for cell attachment. The adhesion of bacteria depends on surface properties of bacterial cell and solid surface, especially their hydrophilicity and wettability. The most common approach to this problem is based on surface thermodynamics and the van Oss technique which implies that the free energy will be minimal at equilibrium [6]. Theoretically, if the total free energy ( $\Delta G$ ) of a system containing a cell and an adjacent support is reduced by contact, then adhesion of the cell to the support could be expressed by:

$$\Delta G = \gamma_{12} - \gamma_{13} - \gamma_{23} \quad (1)$$

where  $\Delta G$  is the Gibbs free energy of adhesion per unit interfacial area and  $\gamma$  is the interfacial tension relevant to interfaces cell (1)/support (2), cell (1)/liquid (3) and support (2)/liquid (3) [1,2]. Adhesion takes place when  $\Delta G < 0$ . Thus, the bacterial adhesion, will be favoured if the process itself induces a decrease of the free energy. To improve biofilm growth on polymer supports, using free energy approach, Dimitrov et al. tested polymer materials with different surface properties [2]. The ability of two aerobic strains (Gram-negative) (*Pseudomonas aeruginosa* O1 and Gram-positive *B. subtilis* CIP 5265) to grow on various polymer materials (non-coated and coated) has been investigated. The microbial water contact angles of these bacteria strains were found to be 40.3° and 33.3°, respectively [2]. Besides the surface free energy, other factors, such as the surface morphology, have significant influence on the adhesion process [2]. Studying the swarming behaviour of *B. subtilis* strains producing lipopeptides, Leclere et al. have also observed that a relatively low surface tension on interface solid medium/cells led to an extended capacity of colony spreading [7].

The aims of this work are (i) to investigate the influence of surface morphology and wettability on the attachment of hydrophilic strain *B. subtilis* ATCC 21332 using different adapted materials, (ii) to study lipopeptides production on a selected support, and (iii) to recover surfactin from the fermentation broth by using pertraction technique.

The pertraction technique integrates an extraction from a feed aqueous solution (fermentation broth in this study) to an organic solvent and a back extraction in a second aqueous solution, also in permanent contact with the organic liquid [8,9]. Due to its selectivity towards the molecules present in the feed, the organic liquid is called "liquid membrane". Compared to acid precipitation and foam fractionation, the solvent extraction provides higher surfactin purity after its recovery from complex media [10]. An advantage of pertraction towards classical liquid extraction is the continuous regeneration of the organic solvent during the process. Recently this technique has been applied for surfactin removal from its model aqueous solutions [11]. In present study, the ability of the process for surfactin extraction from real complex fermentation medium was investigated. Among the large variety of liquid membrane techniques, the pertraction in rotating discs contactor (RDC) was selected because of its stable and efficient continuous operation [11,12].

## 2. Materials and methods

### 2.1. Biofilm carriers

The choice of particles non-porous (in depth) was based on preliminary studies [2]. Polypropylene (PP) and polybutene (PB) have predominant hydrophobic surface. Polyethane sulfone (PES), polystyrene coated with a layer, containing powder activated carbon and polymethylmethacrylate (PSpCh), and polypropylene foamed with powder activated carbon (PPCh) are less hydrophobic. The roughness of the coated supports was enhanced and their water contact angles were about 60°. PSpCh and PPCh microcellular supports were produced as described elsewhere [2,4].

### 2.2. Bacterial strains and culture conditions

#### 2.2.1. Colonization of supports

The capacity of colonization of the five studied supports in Lm1 broth (Landy base medium at pH 7 buffered with MOPS 100 mM without glutamic acid [4]), and gentle agitation (40 min<sup>-1</sup>) was studied each 48 h, from 0 to 196 h. In each culture, 40 g of beads were added. The cultures were inoculated at OD = 0.5 as initial optical density (at 600 nm). Each 48 h Lm1 culture medium was replaced by fresh broth. All experiments were achieved in aerobic batch conditions. In order to avoid foaming, the air was injected over the surface of cultural medium under O<sub>2</sub> – sufficient conditions using 1000 mL flasks containing 200 mL of medium. With this configuration, biofilm on particles and medium are alimented in oxygen directly from the interfaces. All the experiments were performed three times.

#### 2.2.2. Quantitative analysis of biomass

At the end of the colonization step, beads were removed and sonicated in 4 mL of water during 2 min at 20 kHz. The biomass was estimated by the dry weight. After centrifugation of supernatant, planktonic biomass was quantified by the same method. Cell numbers were estimated from a correlation established between dry weight and viable cells concentration determined by standard plate count analyses.

### 2.3. Production of lipopeptides

After 144 h of colonization on PPCh beads, supernatant and free cells were discarded. Then the beads were gently washed in phosphate buffer and replaced in Lm2 medium (modified Landy medium at pH 7 buffered with MOPS 100 mM with glutamic acid [4]) to perform the production of lipopeptides. The culture was agitated at 140 min<sup>-1</sup> and incubated at 30 °C during at least 72 h in the 1000 mL flasks. All tests were triplicate.

### 2.4. Quantitative analysis of lipopeptides

At the end of the culture, 1 mL of supernatant was purified and the concentrations of surfactin and fengycin in the aqueous solutions were determined by HPLC using the procedure described in our previous work [4]. In the extraction equilibrium studies, the initial concentrations of lipopeptides in the aqueous solutions were determined prior to phase contact and their equilibrium concentrations after complete phase settling. Lipopeptide concentrations in the organic solutions were calculated by mass balance neglecting a possible accumulation of lipopeptides at the interfaces. In the kinetic studies, the concentrations in the two aqueous solutions were determined only.

### 2.5. Purification of fengycin by ultrafiltration

After fengycin production, cells were discarded by centrifugation at 8000 × g during 30 min. The supernatant was filtered using ultrafiltration membrane with molecular weight cutoffs (MWCO) of 10,000 Da, until the volume of retentate reach 1/10 of the initial volume. Above CMC, the lipopeptide is mainly in the form of micelles and is retained by the membrane. Filtration was repeated three times before addition of methanol in the retentate (up to 70%) in order to break out micelles and allow lipopeptide passing through the membrane. The collected permeant solution was dried under vacuum and lipopeptides were solubilised in water for the extraction equilibrium studies.

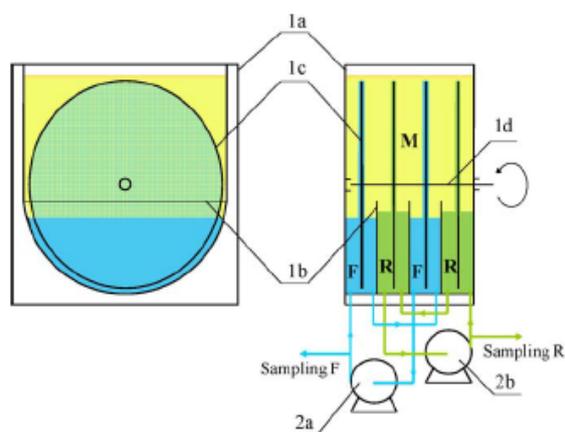
### 2.6. Isolation of lipopeptides

#### 2.6.1. Procedure of liquid extraction equilibrium studies

Equilibrium distribution of each lipopeptide between organic and aqueous solutions was studied in separating funnels using individual lipopeptide model aqueous solutions, respectively 50.0 ± 5.0 mg L<sup>-1</sup> surfactin or 100.0 ± 5.0 mg L<sup>-1</sup> fengycin. The initial surfactin solutions were prepared using commercial surfactin (Fluka, 98%), while the fengycin used was obtained as described in 2.3 and 2.5 of present work. The aqueous solutions were buffered with phosphate buffer (0.2 mol L<sup>-1</sup>), prepared with KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (both p.a. grade reagents from Merck). The acidity of the aqueous solutions was measured with a pH-meter InoLab pH/ION Level 2 P (WTW GmbH & Co. KG, Germany). As organic solvents n-heptane and dodecane (Merck, p.a. grade reagents) were used. In each experiment 15 mL lipopeptide aqueous solution and 15 mL organic solvent were contacted and shaken moderately for 15 min. To achieve the equilibrium and the complete settling, the flasks were reposed for at least 16 h before taking off samples and analysis. The experiments were carried out at room temperature of 22 ± 1 °C.

#### 2.6.2. Procedure of pertraction studies

Pertraction studies were carried out in a rotating discs contactor (1), presented schematically in Fig. 1. The aqueous solutions occupy the lower part of the RDC, which is divided into 4 compartments (two for the feed solution F and two for the receiving solution R). The organic liquid M occupies the common upper part of the RDC covering both aqueous solutions. In each compartment rotates a disc, 1 mm thick and 18 cm in diameter, coated by hydrophilic cloth. The discs are partially immersed in the corresponding aqueous solutions. The rotation induces formation



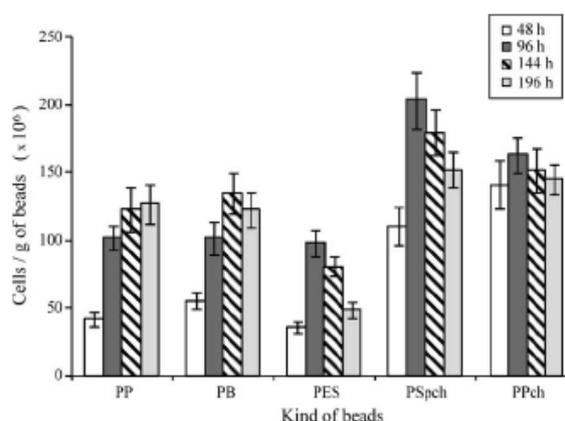
**Fig. 1.** Schematic diagram of the experimental set-up (F – feed solution; R – receiving solution; M – liquid membrane); 1 – rotating discs contactor (1a – body; 1b – separating walls; 1c – rotating discs; 1d – common shaft); 2 – peristaltic pumps (2a – pump for circulation of feed solution F; 2b – pump for circulation of receiving solution R).

and continuous renewal of aqueous films on the discs surfaces, as well as an agitation of all phases. The aqueous films on the upper part of the discs are in permanent contact with the organic solution providing contact surfaces of  $700\text{ cm}^2$  between each aqueous solution and the organic liquid. As a feed solution, 270 mL culture supernatant, obtained after 72 h fermentation, preliminary centrifuged and buffered to pH 5.7 with  $0.2\text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer, was used. As planktonic cells were used for lipopeptides production, amount of fengycin remained very low and was not studied during perturbation. As a receiving solution 270 mL  $0.2\text{ mol L}^{-1}$  phosphate buffer of pH 7.3 was used and the liquid membrane was 1250 mL *n*-heptane. For additional homogeneity of the aqueous solutions and for handy sample takings, both liquids were circulated by means of peristaltic pumps (2). The experiments were carried out at  $22 \pm 1^\circ\text{C}$  and at constant discs rotation velocity of  $10\text{ min}^{-1}$ . This relatively low velocity was chosen because of the presence of surfactant species and the risk of droplet formation and process deterioration. Apart from the first few minutes while some micro-droplets of the F phase in the vicinity of the interface F/M were observed, the three-liquid-phase system was stable during perturbation process.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Colonization of beads and production of lipopeptides

The results on colonization of *B. subtilis* ATCC 21332 on the five studied supports in Lm1 medium are shown in Fig. 2. The higher microbial colonizations ( $1.6\text{--}2.0 \times 10^8$  cells/g of support) were obtained for the polymers coated by activated carbon: PSpch and PPch. As the mechanical and thermal stability tests showed an important loss of weight of PSpch particles (data not shown), the production of biosurfactants were performed with the PPch support. Comparing the results of the colonization on PP supports, one can conclude that the modification of polymer by active carbon enhances the adhesion of the strain. Both surface hydrophilicity and roughness could contribute to adhesion of this hydrophilic strain. After 48 h, the immobilized biomass on PPch supports reached about  $1.5 \times 10^8$  cells/g of support and remained steady, as maximal immobilization occurring after 96 h was around  $1.65 \times 10^8$  cells/g of support, and then slightly decreased. After 48 h, the number of immobilized cells on PPch seemed to be almost steady. By using epifluorescence microscopy Dimitrov observed that, on the supports of PSpch, the cells of *B. subtilis* form an agglomeration composed by many separate colonies with relatively thin biofilms [13]. When properties of the surfaces (before and after colonization) were compared, a decrease of water contact angle was observed (from  $60^\circ$  to  $8.6^\circ$ , Table 1) [2]. Thus, the colonized surfaces become completely hydrophilic with an increased wettability and the further



**Fig. 2.** Quantification of biomass immobilized on supports: Strain *B. subtilis* ATCC 21332 (Lm1 medium,  $30^\circ\text{C}$ ; PP – polypropylene, PB – polybutene, PES – polyethane sulfone, PSpch – polystyrene coated with a layer of polymethylmethacrylate and activated carbon, PPch – polypropylene foamed with powder activated carbon).

colonization could be accelerated. In production, after the initial colonization, the biofilm growth depends on the interactions between the deposited bacterial cells and the planktonic cells but the surface properties could also be conditioned by the presence of the produced amphiphilic species. Analysing the results on lipopeptide production (Fig. 3), we can conclude that the immobilized cells improve highly the fengycin and surfactin production, especially at the beginning of fermentation process, while the concentrations are relatively low. Leclere et al. have clearly demonstrated the relationship between medium wettability, colony spreading and lipopeptide production [7]. They have observed that at low surfactin concentration and up to  $20\text{ mg L}^{-1}$ , the presence of lipopeptide enhanced the wettability of the solid surface and an accelerated colony spreading was reported for surface tension up to  $42\text{ mN m}^{-1}$ . However, high lipopeptide concentration impedes the colony spreading. During fermentation process, with the time, the biofilm surface becomes more hydrophobic, which hampers further growing of the biofilm and relates to the observed decrease of the rate of lipopeptide production (Fig. 3). After contact with the surface, the biosurfactant can form a conditioning film, thereby varying surface properties, in particular its hydrophilicity. Because of their amphiphilic structure, these molecules are probably oriented on biofilm surface in a way that the hydrophilic part is connected onto the initially hydrophilic biofilm surface and the fatty acid chains are exposed to the surrounding space. This could affect the kinetics of biofilm formation and, therefore, the rate of lipopeptide production. It should be mentioned that the supports conditioned with surfactin or fengycin have much higher water contact angle than the biofilm of *B. subtilis* (see Table 1: *B. subtilis* on PSpch, PSpch<sub>feng</sub>, PSpch<sub>surf</sub>).

The results in Fig. 3 show also that after 24 h, biofilm cultures produced more lipopeptides than planktonic cells. This effect still exists at 48 h and 72 h and it is very significant in the case of fengycin. The obtained results suggest that the immobilization enhance lipopeptide production, but also it can modify the selectivity of the bioreaction concerning fengycin or surfactin production. To date, the *B. subtilis* ATCC 21332 was considered to produce only surfactin, but the present work confirmed the recently reported conclusion [4] that this strain is a co-producer of surfactin and fengycin, especially after immobilization. After 48 h and 72 h of colonization, the immobilized biomass was found to be 2 times more than planktonic cells. The results obtained for production suggest that the immobilization enhance lipopeptide synthesis, but

**Table 1**Surface thermodynamic properties of the studied PS and *B. subtilis* surfaces (water contact angles measurements).

	<i>B. subtilis</i> cells <sup>a</sup>	PS	PSpch	<i>B. subtilis</i> on PS	<i>B. subtilis</i> on PSpch	PSpch <sub>feng</sub>	PSpch <sub>surf</sub>
Contact angle (°)	33.3 ± 1.5 <sup>a</sup>	66.9 ± 0.7 <sup>a</sup>	60.0 ± 1.0 <sup>a</sup>	39.4 ± 0.7 <sup>a</sup>	8.6 ± 0.5 <sup>a</sup>	60.0 ± 0.5 <sup>b</sup> 60.0 ± 0.5 <sup>c</sup>	60.0 ± 0.4 <sup>b</sup> 82.0 ± 0.5 <sup>c</sup>

PS<sub>surf</sub> – polystyrene surface conditioned with surfactin, PS<sub>feng</sub> – polystyrene surface conditioned with fengycin, *B. subtilis* on PS – biofilm on polystyrene surfaces, *B. subtilis* on PSpch – biofilm on polystyrene surface coated with a layer of polymethylmethacrylate and activated carbon.

<sup>a</sup> Dimitrov et al. [2].

<sup>b</sup> This study at lipopeptide concentrations below CMC (4 mg L<sup>-1</sup>).

<sup>c</sup> This study at lipopeptide concentrations above CMC (400 mg L<sup>-1</sup>).

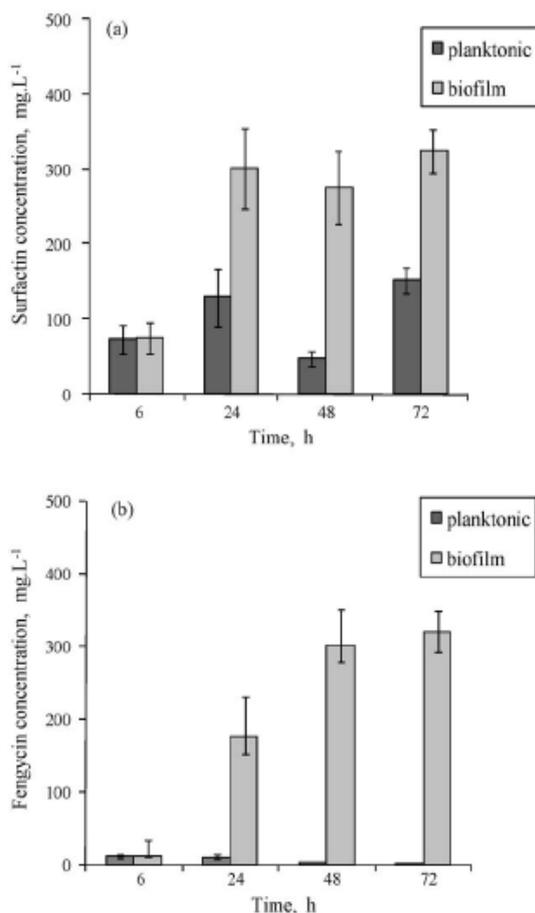
also modify the selectivity of the bioreaction. Indeed, after 48 h, the biofilms produced 2–4 times more surfactin and at least 15 times more fengycin than the planktonic cells (per a dry weight basis). Obviously, the immobilization of the cells improves their production.

### 3.2. Recovery of lipopeptides by solvent extraction and by pertraction

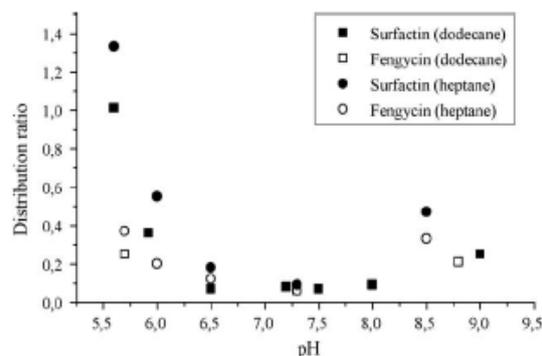
In order to establish suitable conditions to apply a pertraction for biosurfactants isolation from fermentation broth, the extraction behaviour of two alkanes on lipopeptides removal from their aqueous solutions was studied. The distribution ratio of both studied lipopeptides between the alkanes and the aqueous solutions was

found to be strongly affected by the variation of pH (Fig. 4). It was very low at neutral pH and increased progressively at more acid or basic media. For surfactin, such behaviour could be explained by its different kind of conformations ( $\alpha$ -helice,  $\beta$ -sheet or unordered conformation) in basic, neutral and acid media and therefore by the variation of lipopeptide micropolarity with pH changes [11,14]. Despite the lower variation of fengycin distribution ratio with pH change, the extraction behaviour of the two lipopeptides is quite similar and analogous variation of their micropolarity could be suggested. At same conditions, the distribution ratio of fengycin is lower than the surfactin one. The difference between the extraction ability of the lipopeptides could be attributed to their different charges.

The relatively high surfactin extraction from acid media and its low distribution ratio at neutral pH allow an application of pertraction process for lipopeptide recovery from aqueous media, including fermentation broth. The *n*-heptane was found to be the more efficient solvent for lipopeptides and, therefore, it was used as a liquid membrane in the pertraction studies. The evolution of surfactin concentration in the aqueous phases during batch pertraction from real fermentation broth is given in Fig. 5. The obtained results show a relatively efficient extraction of surfactin from the feed solution (more than 75% in the first hour), while the stripping of the organic liquid was much slower. It should be mentioned that the pH value of the R phase was suitable for back extraction of surfactin and the formation of the more polar  $\beta$ -sheet conformation of lipopeptide in this phase, favourable for its recovery. At the end of the experimental run about 20% of the surfactin was accumulated in the R phase, but the equilibrium was not reached and the concentration in this phase kept growing. The relatively slow stripping of the membrane could be attributed to the voluminous, non-intensively stirred bulk membrane and to the low concentrations in the R phase in the beginning, which hampers the formation of  $\beta$ -sheet micelles. A possible surfactin accumulation at the interfaces could also contribute to its relatively slow transfer into the R phase. A considerable adsorption of surfactin on microporous hydrophobic PVDF membranes has been observed by



**Fig. 3.** Production of lipopeptides by *B. subtilis* ATCC 21332 (Lm2 medium, 30 °C, 144 h of colonization, PPch used as support): (a) surfactin production; (b) fengycin production.



**Fig. 4.** Effect of equilibrium pH on degree of lipopeptide extraction by organic solvents ( $C_{\text{surf, initial}} = 50.0 \pm 5.0$  mg L<sup>-1</sup>;  $C_{\text{feng, initial}} = 100.0 \pm 5.0$  mg L<sup>-1</sup>).

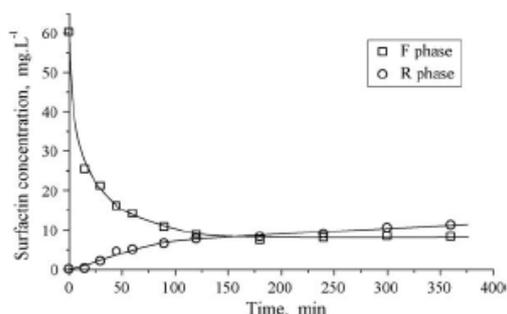


Fig. 5. Evolution of surfactin concentration in feed and receiving solutions versus time during pertraction at  $10 \text{ min}^{-1}$  ( $C_{F, \text{initial}} = 60.2 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $\text{pH}_F = 5.7$ ,  $\text{pH}_R = 7.3$ ).

Chen et al. during surfactin extraction from aqueous solutions to *n*-hexane through hollow fibers [15]. In present study, the hydrophilic coatings of the discs served just for aqueous films formation and such adsorption at the coatings should be less important, but the mass balance at the end of the experimental run suggested at least 8% of losses. Hence, an accumulation of surfactin at the interfaces occurred. Comparing to surfactin pertraction from model aqueous solutions [11], the kinetics of surfactin transport in the case of fermentation supernatant was found to be slower. The fermentation broth is a complex mixture, containing other species that could affect surfactin transfer through the liquid membrane. Usually, the amount of lipopeptide in the fermentation broth is rather low (0.7% wt in the studied case) and its isolation from such media is a real technological problem. Because of the low concentrations of dissolved species in the R phase and, therefore, the big error of dry weight measures, surfactin purity in this phase was not determined, but Chen et al. have reported 60–75% purity of surfactin after its extraction into *n*-hexane [10]. The high purity of lipopeptides after alkane extraction and their efficient recovery by pertraction in a RDC suggest that the liquid membrane technique could be a promising method for their isolation from fermentation broth.

#### 4. Conclusions

Biofilm production of lipopeptides, coupled with an adapted separation technique can be an important process strategy. The immobilized *B. subtilis* ATCC 21332 strain on PPch support produce, in time course, 2–4 times more surfactin than the free cells. During the aerobic production, the immobilized cells of *B. subtilis* secrete both surfactin and fengycin molecules and the synthesis of fengycin is greatly enhanced. The kinetics of biofilm formation and the rate of lipopeptide production are affected by the presence of lipopeptides and their concentration. The kinetic studies in a RDC shows that surfactin could be successfully extracted from fermentation broth by using pertraction with *n*-heptane as liquid membrane and a phosphate buffer solution ( $\text{pH} \sim 7.3$ ) as a receiving phase, at agitation

of  $10 \text{ min}^{-1}$ . However, the stripping of the organic liquid and surfactin accumulation into the receiving phase, at these conditions, are relatively slow. Considering the complexity of the fermentation broth and the surfactant character of the lipopeptides, to optimize the conditions for their recovery by pertraction, further investigations, related to the composition of the liquid membrane and the receiving solution and the choice of agitation conditions, are needed.

#### Acknowledgements

Financial support for this work by ARCUS project Nord-Pas de Calais/Bulgarie PECO and from the Université Lille 1 is gratefully appreciated. We are particularly grateful to Dr D. Dimitrov (Pro-BioGEM laboratory and UBS) for PSPch supports and contact angle measurements and Dr M. Deleu (Agricultural University of Gembloux, Belgium) for the kindly provided standard of fengycin.

#### References

- [1] Nikov I, Nikolov V, Dimitrov D. Biodegradation of aniline using light carriers with optimised surface in TPIFB. *Bioprocess Eng* 1999;21:547–52.
- [2] Dimitrov D, Hadjiev D, Nikov I. Optimization of support medium for particle based biofilm reactors. *Biochem Eng J* 2007;37:238–45.
- [3] Liu T, Montastruc L, Gancel F, Zhao L, Nikov I. Integrated process for production of surfactin (Part 1): adsorption rate of pure surfactin onto activated carbon. *Biochem Eng J* 2007;33:333–40.
- [4] Gancel F, Montastruc L, Liu T, Zhao L, Nikov I. Lipopeptide overproduction by cell immobilization on iron-enriched light polymer particles. *Process Biochem* 2009;44(9):975–8.
- [5] Ongena M, Jacques P. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol* 2008;16:115–25.
- [6] van Oss CJ, Good RJ, Chaudhury MK. Additive and non-additive surface tension components and the interpretation of contact angles. *Langmuir* 1988;4:884–91.
- [7] Leclere V, Marti R, Bechet M, Fickers, Jacques P. The lipopeptides mycosubtilin and surfactin enhance spreading of *Bacillus subtilis* strains by their surface-active properties. *Arch Microbiol* 2006;186:475–83.
- [8] Boyadzhiev L, Lazaroza Z. Liquid membranes (liquid pertraction). In: Noble R, Stern S, editors. *Membrane Separation Technology, Principles and Applications*. Amsterdam: Elsevier; 1995. p. 283–352.
- [9] Schlosser S, Kertesz R, Martak J. Recovery and separation of organic acids by membrane-based solvent extraction and pertraction: an overview with a case study on recovery of MPCA. *Sep Purif Technol* 2005;41(3):237–66.
- [10] Chen HL, Juang RS. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. *Biochem Eng J* 2008;38:39–46.
- [11] Dimitrov K, Gancel F, Montastruc L, Nikov I. Liquid membrane extraction of bio-active amphiphilic substances: recovery of surfactin. *Biochem Eng J* 2008;42:248–53.
- [12] Dimitrov K, Metcheva D, Boyadzhiev L. Integrated processes of extraction and liquid membrane isolation of atropine from *Atropa belladonna* roots. *Sep Purif Technol* 2005;46(1–2):41–5.
- [13] Dimitrov D. Modeling of three phase inverse fluidized bed bioreactor for wastewater treatment. Ph.D. Thesis, Université de Bretagne Sud, France; 2007. p. 44.
- [14] Osman M, Hoiland H, Holmsen H. Micropolarity and microviscosity in the micelles of the heptapeptide biosurfactant "surfactin". *Colloid Surf B: Biointerfaces* 1998;11:167–75.
- [15] Chen HL, Juang RS. Extraction of surfactin from fermentation broth with *n*-hexane in microporous PVDF hollow fibers: significance of membrane adsorption. *J Membr Sci* 2008;325:599–604.

## Résumé

La souche de *Bacillus subtilis* ATCC 21332 produit deux familles de lipopeptides (les surfactines et les fengycines/plipastatines) qui présentent des propriétés biologiques d'intérêt. La productivité des procédés fermentaires en mode continu ou discontinu et leur extrapolation à grande échelle est limitée par des problèmes cinétiques et technologiques notamment par le transfert d'oxygène et la formation massive de mousse. Le travail réalisé porte sur la mise en œuvre d'un procédé innovant permettant la production de lipopeptides sans mousse et sur l'extraction des molécules à partir du milieu de fermentation. Après des travaux concernant l'amélioration de la production des lipopeptides par des cellules de *B. subtilis* immobilisées sur des supports solides, un bioréacteur à disques tournants permettant la production importante et sélective de lipopeptides a été mis en œuvre. Des concentrations de plus de  $1 \text{ g L}^{-1}$  de lipopeptides ont été obtenues lors des fermentations. Le transfert d'oxygène, facteur limitant primordial de ce métabolisme chez *B. subtilis*, a été étudié. Il a été fortement affecté par l'agitation pour toutes les configurations du bioréacteur étudiées. Pour des  $K_{La}$  se situant entre 0,001 et 0,003  $\text{s}^{-1}$ , le métabolisme est orienté vers la synthèse de fengycines qui représentent jusqu'à 80 % des lipopeptides synthétisés. La productivité en fengycine particulièrement intéressante et la simplicité de la mise en œuvre du bioréacteur permet d'envisager une extrapolation de la production à l'échelle industrielle. Simultanément à la production, des études concernant l'extraction des lipopeptides par pertraction dans un contacteur à disques tournants ont été entreprises. Les résultats obtenus sur l'extraction de la surfactine montrent le potentiel de cette technique séparative pour la récupération des lipopeptides à partir de leur milieu de fermentation.

Mots-clés : Lipopeptides, Surfactine, Fengycine, Transfert d'oxygène, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, Bioréacteur à disques tournants

## Abstract

*Bacillus subtilis* ATCC 21332 produces two families of lipopeptides (surfactins and fengycins/plipastatins) with different biological properties of interest. The productivity of fermentation process in batch or continuous conditions and bioreactors scale-up are limited by the problems of oxygen transfer limitation and foaming. This work presents a novel process of non-foaming production of lipopeptides in a rotating discs bioreactor and pertraction studies on the recovery of lipopeptides from fermentation broth. The improving production of lipopeptides by *B. subtilis* immobilized on solid supports enabled the implementation of an original bubbleless bioreactor for a selective production of lipopeptides. More than  $1 \text{ g L}^{-1}$  of lipopeptides was produced in this new rotating discs bioreactor. The oxygen transfer, a key factor for the metabolism of *B. subtilis*, was studied, also. In every studied configuration of bioreactor, the transfer of oxygen was strongly affected by the agitation conditions. At  $K_{La}$  in the range of 0.001-0.003  $\text{s}^{-1}$ , mainly fengycin was produced (up to 80% of total lipopeptides). The obtained high fengycin selectivity and the simplicity of the implementation of the rotating discs bioreactor suggest its potential scale-up. The extraction of lipopeptides by pertraction in a rotating discs contactor was studied, also. The obtained results on surfactin recovery by pertraction allow to consider this technique as suitable for lipopeptides extraction from fermentation broth.

Keywords: Lipopeptides, Surfactin, Fengycin, Oxygen transfer, *Bacillus subtilis* ATCC 21332, Rotating discs bioreactor