
UNIVERSITÉ DE LILLE – SCIENCE ET TECHNOLOGIE
ÉCOLE DOCTORALE SCIENCE DE LA MATIÈRE, DU RAYONNEMENT ET DE
L'ENVIRONNEMENT

Doctorat
Ingénierie des Fonctions Biologiques

ALEXANDRE BERTH

**INFLUENCE DES PARAMÈTRES OPÉRATOIRES SUR LA PRODUCTION DE
SURFACTINE DANS UN BIORÉACTEUR À BIOFILM AÉRÉ PAR MEMBRANE**

Préparée à l'Institut Charles Violette, Cité scientifique, Bâtiment Polytech Lille,
59650 Villeneuve d'Ascq

Soutenue publiquement le 18 Juillet 2019

Jury :

Pascal DHULSTER, Professeur	Université Lille, France	Directeur
Guillaume DELAPLACE, Directeur de Recherche	DR INRA, Lille, France	Co-directeur
Didier LECOUTURIER, Maître de Conférences	Université Lille, France	Co-encadrant
Frank DELVIGNE, Professeur	Université Liège, Belgique	Rapporteur
Laurence SOUSSAN, Maître de Conférences	ENSCM, France	Rapporteuse
Karine LOUBIERE, Directrice de Recherche	DR CNRS, Toulouse, France	Présidente
Claire ALBASI, Directrice de Recherche	DR CNRS, Toulouse, France	Examinatrice

« Une brique pèse un kilo plus une demi-brique,
combien pèse une brique ? »

Claude Berth

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier l'ensemble de mes encadrants, le Pr. Pascal DHULSTER, le DR Guillaume DELAPLACE et plus particulièrement le Dr. Didier LECOUTURIER ainsi que la région Hauts-de-France pour avoir participé au financement de la thèse.

Je remercie également l'ensemble des membres du jury, le Dr. Laurence SOUSSAN, le Pr. Frank DELVIGNE qui a également participé au comité de suivi de thèse avec le Dr. Karine LOUBIERE et enfin le Pr. Claire ALBASI.

J'accorde une attention particulière à Mme Corinne BOISTEL, technicienne de laboratoire, dont la disponibilité et l'organisation sans faille m'ont toujours permis d'avancer rapidement dans mes travaux de recherche, depuis le tout début.

J'adresse mes remerciements à l'équipe de l'IRCL de Lille pour leur accueil et leurs conseils avisés et notamment à Mme Nathalie JOUY pour son expertise.

Je remercie Mmes Corinne BOISTEL, Cathy OUBLION et particulièrement Mme Julie DUHAYON qui m'ont aidé à endosser la responsabilité de la gestion des consommables plastiques du laboratoire.

Un grand merci aux Drs. François KRIER et Didier LECOUTIRER pour m'avoir associé aux enseignements brassicoles de l'IUT A qui m'ont permis de réunir deux de mes passions. Je n'oublie pas non plus le Dr. Peggy VAUCHEL et le Pr. DIMITROV pour leur agréable compagnie durant les heures d'encadrement de travaux pratiques. Je tiens à remercier spécifiquement M. Bertrand FERTIN pour son implication et ses conseils aussi bien techniques que pédagogiques.

J'adresse mon amitié à tous les collègues qui ont été présents durant ces 4 années pour leur soutien et leur présence, que ce soit au quotidien, à mon mariage ou à la naissance de ma fille, Amélie BERTH.

Enfin, je remercie chaleureusement toute ma famille et toute ma belle-famille qui ont toujours été là pour moi, et plus particulièrement Mmes Marie-Gabrielle BERTH, Christine COX et Blandine BERTH pour avoir eu le courage de relire ma thèse et d'essayer, avec succès, de comprendre mon sujet de recherche.

RÉSUMÉ

Les bioréacteurs à biofilm aéré par contacteur membranaire représentent un moyen de production alternatif aux bioréacteurs aérés par bullage. Ils sont, par exemple, utilisés pour éviter la formation abondante de mousse lors de la production de lipopeptides, molécules d'intérêt aux propriétés surfactantes produites notamment par *Bacillus subtilis*. La maîtrise du biofilm qui se forme à l'interface gaz-liquide dans la membrane représente la clé pour optimiser les paramètres de production et préparer une montée en échelle.

Dans un premier temps, le transfert d'oxygène seul est étudié dans un bioréacteur aéré par membrane à fibre creuse microporeuse. Une analyse dimensionnelle a été couplée de façon innovante à un plan d'expériences fractionnaire, réduisant considérablement le nombre d'expérience pour obtenir une relation de procédé. Les performances de transfert d'oxygène sont modélisées en fonction du débit de liquide, du volume de liquide et de la pression de gaz. Dans un second temps, l'état physiologique du biofilm et la production de surfactine sont étudiés en régime continu. La présence d'un biofilm agit comme un accélérateur de transfert d'oxygène au lieu d'une résistance. Les variations de débit de liquide, de pression de gaz, de concentrations en glucose et en oxygène ont permis de déterminer le régime de limitation en substrats, apportés en contre-diffusion, tous les deux révélés comme limitants. L'augmentation du débit de liquide permet une meilleure pénétration du glucose dans le biofilm sans en augmenter la taille. L'augmentation de la concentration en oxygène conduit aux meilleurs résultats de production de surfactine atteignant $1,2 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, niveau encore jamais atteint avec d'autres types de bioréacteurs.

Mots-clefs : Bioréacteur ; Biofilm ; Membrane ; Modélisation ; Analyse dimensionnelle ; Surfactine

ABSTRACT

MEMBRANE AERATED BIOFILM CHARACTERIZATION IN A CONTINUOUS BIOREACTOR

Membrane aerated biofilm bioreactors are a convenient alternative production way to sparged bioreactors. They are, for example, used to avoid the important foam formation during lipopeptides production, molecule of interest with tensioactive properties produced among others by *Bacillus subtilis*. The control of the biofilm which grows at the gas-liquid interface in the membrane represents the key to optimise production parameters and prepare the scale-up.

First, only the oxygen transfer is studied in a bioreactor aerated by a microporous hollow fiber membrane. A dimensional analysis was coupled in an innovative way with a fractional design of experiments, reducing greatly the number of experiments to obtain a process relationship. Oxygen transfer performances are modelled in function of the liquid flow rate, the liquid volume and the gas pressure. Then, the biofilm physiological condition and the surfactin production are studied in continuous state. The biofilm presence acts as an oxygen transfer booster instead of a resistance. Variations of liquid flow rate, gas pressure, glucose and oxygen concentrations enabled to determine the substrates limitation state, brought in counter-diffusion, both revealed limiting. The increase of the flow rate enables a better glucose penetration inside the biofilm without increasing its size. The increase in oxygen concentration leads to the best results in surfactin production reaching $1,2 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$, level still never reached with other bioreactors types.

Keywords : Bioreactor ; Biofilm ; Membrane ; Model ; Dimensional analysis ;
Surfactin

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	3
RÉSUMÉ	4
ABSTRACT	5
TABLE DES MATIÈRES	6
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	11
INTRODUCTION	13
Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	15
1 Les bioréacteurs	16
2 Les bioréacteurs à contacteur membranaire	19
2.1 Schéma de principe.....	19
2.2 Les différentes membranes.....	20
2.3 Les domaines d'utilisation.....	23
3 Les biofilms	26
3.1 La formation d'un biofilm.....	26
3.2 Les caractéristiques d'un biofilm.....	27
3.3 <i>Bacillus subtilis</i>	29
4 Les phénomènes de transfert	30
4.1 Les résistances au transfert.....	30
4.2 Le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène $k_L a$	32
4.3 Le coefficient de transfert d'oxygène k_L	33
4.4 Le transfert d'oxygène à travers une membrane.....	34
4.5 Le transfert dans un biofilm adhérent sur membrane.....	41
5 La modélisation	44
5.1 Le changement d'échelle.....	44
5.2 Le modèle mathématique.....	45

5.3	La CFD (Computational Fluid Dynamic)	46
5.4	L'analyse dimensionnelle.....	46
6	Situation de travail et objectif de la thèse.....	51
	Chapitre II : MATÉRIELS et MÉTHODES.....	53
1	Les souches.....	54
2	Les milieux.....	55
2.1	Solution de surfactine	55
2.2	Le milieu de Landy.....	55
2.3	Le milieu de Landy optimisé	56
2.4	Le milieu TSA	56
2.5	Le milieu PBS.....	56
3	Cultures de <i>B. subtilis</i> en fioles d'Erlenmeyer	57
3.1	Conservation des souches.....	57
3.2	Préparation d'un inoculum.....	57
3.3	Conditions de culture en fiole d'Erlenmeyer.....	58
4	Cultures de <i>B. subtilis</i> en bioréacteur aéré membrane.....	59
4.1	Minibioréacteur 500 mL et membrane 24 cm ²	59
4.2	Bioréacteur 5 L et membrane 2,5 m ²	60
4.3	Fiole 250 mL et membrane 24 cm ²	62
4.4	Conditions de culture en continue en bioréacteur	63
4.5	Décrochage de la biomasse, lavage et stockage des membranes.....	63
5	Analyse dimensionnelle.....	65
6	Plan d'expériences	70
6.1	Modélisations	72
6.2	Expériences supplémentaires et optimisation de la relation de procédé	74
7	Analyses.....	76
7.1	Mesure de la biomasse.....	76

7.2	Dosage des lipopeptides par CLHP.....	76
7.3	Dosage du glucose et des métabolites primaires par CLHP	77
7.4	Analyse du métabolisme cellulaire par cytométrie en flux	78
7.5	Mesure du transfert d'oxygène sans micro-organismes	83
7.6	Mesure du transfert d'oxygène avec micro-organismes.....	86
Chapitre III : RÉSULTATS et DISCUSSION.....		87
1	Introduction	88
2	Détermination de l'équipement utilisé pour la culture bactérienne	89
2.1	Introduction.....	89
2.2	Analyse de la croissance bactérienne.....	90
2.3	Analyse de la production de lipopeptides.....	91
2.4	Résultats de culture dans les différents bioréacteurs	91
2.5	Discussion.....	92
3	Identification de la souche d'intérêt	94
3.1	Introduction.....	94
3.2	Analyse de la croissance bactérienne.....	96
3.3	Analyse de la production de lipopeptides.....	96
3.4	Analyse de la consommation de substrat et de la production de métabolites primaires	97
3.5	Résultats de culture pour les différentes souches.....	99
3.6	Discussion.....	100
4	Conséquence des changements de température sur la production de surfactine par des tests en fiole.....	102
4.1	Introduction.....	102
4.2	Analyse de la croissance bactérienne.....	102
4.3	Analyse de la production de surfactine.....	103
4.4	Analyse de la consommation de substrat et de la production de métabolites primaires	104

4.5	Analyse par cytométrie en flux	106
4.6	Résultats de culture aux différentes températures	107
4.7	Discussion.....	108
5	<i>Mise en évidence de l'impact de l'aération sur la production de surfactine par des tests en fiole.....</i>	109
5.1	Introduction.....	109
5.2	Analyse de la croissance bactérienne.....	109
5.3	Analyse de la production de surfactine.....	110
5.4	Analyse de la consommation de substrat et de la production de métabolites primaires	111
5.5	Résultats de culture aux différentes conditions d'aération	113
5.6	Discussion.....	114
6	<i>Modélisation de l'aération sans micro-organismes dans un bioréacteur aéré par membrane</i>	115
6.1	Introduction.....	115
6.2	Données expérimentales	115
6.3	Analyse statistique du plan d'expériences fractionnaire	117
6.4	Analyse des effets de la relation de procédé préliminaire	120
6.5	Optimisation de la relation de procédé préliminaire	122
6.6	Validité des relations empiriques pour le k_{La} et le k_L à plus grande échelle	126
6.7	Conclusion	127
6.8	Valorisation des résultats.....	128
7	<i>Caractérisation du biofilm</i>	130
7.1	Introduction.....	130
7.2	Exemple de culture et test de répétabilité.....	131
7.3	Analyse de l'état physiologique des cellules par cytométrie en flux	132
7.4	Comparaison des conditions opératoires.....	136
7.5	Comparaison des performances d'aération en présence et en absence de biofilm	141

7.6 Discussion.....	143
Chapitre IV : CONCLUSION et PERSPECTIVES.....	146
RÉFÉRENCES.....	150
ANNEXES.....	163
Annexe 1 : Cinétiques de culture en bioréacteur à biofilm aéré par membrane	164
Annexe 2 : Tableaux récapitulatifs des paramètres et résultats de culture en bioréacteur à biofilm aéré par membrane	168

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
ASP	Aspartate
ATP	Adénosine triphosphate
CCCP	Cyanide 3-chlorophenylhydrazone
CFD	Mécanique des fluides numérique
CLHP	Chromatographie liquide à haute performance
CMC	Concentration micellaire critique
D-	Dextrogyre
DO	Densité optique
EPS	Exopolysaccharides
FS	Forward scatter
GLU	Acide glutamique
L-	Lévogyre
LEU	Leucine
MMO	Méthane Mono-Oxygénase
MS	Matière sèche
MSD	Ecart-type moyen
MOPS	Acide 3-[N-morpholino] -propane sulfonique Acide
OD	Oxygène dissous
OTR	Taux de transfert d'oxygène
P	Produit
PCR	Réaction de polymérisation en chaine
PBS	Tampon phosphate salin
PES	Polyethersulfone
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
Re	Nombre de Reynolds
RPM	Rotations par minute
RSG	Redox sensor green
S	Substrat
Sc	Nombre de Schmidt

Sh	Nombre de Sherwood
SS	Side scatter
TFA	Trifluoroacétate
TPIFB	Bioréacteur triphasé à lit fluidisé inversé
TRL	Niveau de maturité technologique
TSA	Tryptone caséine soja
VAL	Valine
X	Biomasse

INTRODUCTION

L'utilisation intensive de produits phytosanitaires est devenue un réel problème depuis quelques années, avec pour conséquence la contamination massive des sols en profondeur et des conséquences sanitaires pour les populations avoisinantes. Le gouvernement européen a mis en place de nombreuses mesures parmi lesquelles le portefeuille de projets Smartbiocontrol déployé dans les Hauts de France, le Grand Est et la Wallonie visant à découvrir et développer la production de biomolécules capables de lutter efficacement contre les principales maladies de grandes cultures tout en respectant l'environnement et l'Homme. Le projet Bioprod, qui nous concerne, s'inscrit dans le portefeuille Smartbiocontrol et a notamment pour objectif l'étude de nouvelles stratégies de production de biomolécules.

Les lipopeptides sont des biomolécules amphiphiles, avec un fort pouvoir tensioactif, ayant un large champ d'activités biologiques notamment des capacités de biocontrôle. Ces propriétés rendent la production des molécules difficile car, actuellement, la majorité des cultures de micro-organismes se fait en apportant l'oxygène nécessaire à la croissance bactérienne par bullage. La quantité importante de bulles associées à la production de molécules tensioactives entraîne la formation abondante de mousse. Les méthodes de production usuelles ne sont donc pas adaptées à la production spécifique de ces biomolécules, l'ajout d'anti-mousse entraînant un traitement de purification coûteux. Des systèmes de fermentation innovants sont étudiés de part et d'autre de la frontière Franco-Belge, incluant les bioréacteurs à biofilm aérés par contacteur membranaire. Ce procédé permet de mettre en contact à travers une membrane le milieu de culture et l'air sans qu'il n'y ait d'introduction d'air par mélange, ce qui permet d'éviter la formation de mousse. Actuellement, ce système existe à l'échelle industrielle pour le traitement de l'eau, mais très peu d'études ont été réalisées pour la production de biomolécules. Le manque de connaissance rend la mise en place de ce procédé encore coûteux car aucun paramètre n'est optimisé et empêche totalement la projection du procédé à plus grande échelle, ce qui permettrait de réduire encore les coûts.

Ce manuscrit débute par un état de l'art des connaissances entourant les bioréacteurs à biofilm aéré par membrane. Après avoir repris quelques définitions concernant les

bioréacteurs communs et plus spécifiquement sur les bioréacteurs à contacteur membranaire, les lipopeptides de *Bacillus subtilis* seront présentés. La formation et les caractéristiques d'un biofilm seront ensuite abordées, suivies des phénomènes de transfert à travers les membranes et les biofilms bactériens. Les différentes méthodes de modélisation seront également introduites et plus spécifiquement l'analyse dimensionnelle. La synthèse bibliographique se terminera par une présentation de la situation de travail et des objectifs de la thèse. Après une présentation des matériels et des méthodes utilisées, les résultats de l'étude seront décrits en commençant par la détermination et la caractérisation du système d'étude. La modélisation de l'aération du système sans micro-organisme sera ensuite détaillée suivie de l'étude du comportement du biofilm adhérent à la membrane. Enfin, un chapitre viendra conclure sur l'ensemble des résultats obtenus durant cette thèse et abordera les perspectives qui s'ouvrent à la suite de ce projet.

Chapitre I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

1 Les bioréacteurs

Les bioréacteurs à biofilm aéré par membrane sont un type de bioréacteur particulier, il est donc nécessaire de commencer par la définition d'un bioréacteur. Un bioréacteur est un appareil permettant la culture de micro-organisme dans les meilleures conditions possibles. Il existe quasiment autant d'association de bioréacteur avec un ensemble de paramètres que de micro-organisme. En effet, chaque souche possède des caractéristiques différentes et donc un mode de production particulier auquel doit s'adapter le bioréacteur. Les bioréacteurs les plus courants sont les bioréacteurs à cuves agitées. Ils consistent en une cuve stérilisable contenant un mobile d'agitation, des sondes de pH, température et oxygène dissous. Un système de chauffe et de cryogénie permet de réguler la température comme une double enveloppe par exemple. La cuve contient un milieu de culture apportant les éléments nutritionnels essentiels à la croissance bactérienne, généralement une source de carbone, une source d'azote et des minéraux. Le pH est maintenu constant grâce à l'ajout d'acide et/ou de base. Enfin, l'oxygène est apporté grâce à un diffuseur situé en bas de cuve qui distribue l'air sous les pales d'agitation répartissant les bulles de façon homogène dans le réacteur.

Un bioréacteur peut être utilisé en batch, fed-batch ou en continue. Le batch consiste à laisser se dérouler la croissance bactérienne sans ajout de milieu. La culture se déroule donc en suivant les phases de croissance des micro-organismes : latence, croissance, croissance exponentielle, ralentissement, stationnaire et déclin. Le fed-batch consiste à ajouter tout au long de la culture du milieu concentré afin de limiter la variation de volume. Cette méthode permet de prolonger la culture en apportant les nutriments nécessaires à la croissance bactérienne. Enfin, la culture continue consiste, après une phase de batch, à apporter et soutirer à la même vitesse du milieu de culture dans la cuve afin de renouveler le milieu sans en changer le volume. Cette dernière méthode permet de maintenir une croissance et une production constante sur de longues périodes.

Le suivi de réacteur se fait grâce à l'enregistrement en ligne de tous les paramètres précédemment cités (Température (T°), oxygène dissous (OD), pH) auxquels il est possible de rajouter :

- l'analyse des gaz de sortie (notamment le dioxygène et le dioxyde de carbone), notamment pour vérifier la consommation d'oxygène par les bactéries et donc leurs bons développements,
- la mesure de biomasse en continue,
- le suivi des volumes d'acide et de base versées,
- la pression dans le système,
- le taux de renouvellement du milieu en mode continu,
- la mesure des concentrations en nutriments et en produits,
- la mesure de la masse contenue dans le bioréacteur.

L'ensemble de ces mesures et plus précisément l'analyse des différents substrats et produits permet de suivre la croissance bactérienne grâce à des indicateurs de conversion. En effet, de même que pour une réaction enzymatique dans laquelle, les micro-organismes jouent le rôle de catalyseur. Les vitesses de réactions peuvent être calculées que ce soit pour la consommation du substrat (noté S) r_s , la production de biomasse (noté X) r_x ou la production de produit (noté P) r_p . Ces vitesses sont généralement exprimées en $\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Etant donné que la biomasse se multiplie au cours de la fermentation, la quantité de catalyseur change au cours du temps. La vitesse spécifique de réaction correspond à la vitesse de réaction rapportée à la quantité de catalyseur, c'est-à-dire à la quantité de biomasse. Ainsi, la vitesse spécifique de consommation de substrat q_s s'exprime en gramme de substrat consommé par gramme de biomasse par heure, la vitesse spécifique de production de produit q_p s'exprime en gramme de produit par gramme de biomasse par heure et la vitesse spécifique de croissance μ s'exprime en h^{-1} . En phase de croissance exponentielle, la vitesse spécifique de croissance est maximale, notée μ_{max} .

Les rendements de conversion permettent de connaître la rentabilité des réactions enzymatiques et peuvent être calculés à partir des vitesses de réactions (équations (I 1.1), (I 1.2) et (I 1.3)).

$$\begin{array}{l} \text{Rendement de conversion du substrat en} \\ \text{biomasse} \end{array} \quad Y_{x/s} = r_x/r_s = \mu/q_s \quad \text{(I 1.1)}$$

$$\begin{array}{l} \text{Rendement de conversion du substrat en} \\ \text{produit} \end{array} \quad Y_{p/s} = r_p/r_s = q_p/q_s \quad \text{(I 1.2)}$$

Taux de production de produit par rapport à la biomasse $Y_{p/x} = r_p/r_x = q_p/\mu$ (I 1.3)

Lors de la production d'une molécule d'intérêt, ces indicateurs peuvent par exemple servir à vérifier quel pourcentage de substrat est utilisé pour la fabrication du produit d'intérêt. L'objectif est alors de favoriser la bonne utilisation du substrat et de limiter la formation de métabolites primaires indésirables. Par exemple, l'acide lactique, l'acide acétique et le 2,3-butanediol sont les produits de la fermentation anaérobie de *Bacillus subtilis*, synonymes de conditions de culture limitées en oxygène (Cruz Ramos et al., 2000).

Les conditions de culture doivent être adaptées à chaque souche cultivée en fonction des molécules qui sont produites. En fonction de l'objectif de production, il n'est pas toujours possible de conduire les réactions dans un bioréacteur agité standard aéré par bullage. Pour cela, il existe de nombreuses autres géométries de réacteurs adaptées à des productions particulières.

Le bioréacteur à disque tournant permet de faire croître une population bactérienne sous forme de biofilm adhérent à des disques plongés à moitié dans le milieu de culture et en rotation. La rotation permet d'apporter par phase soit les nutriments présents dans le milieu soit l'oxygène présent dans l'air (Chtioui et al., 2014; Kirouani, 2016).

Le réacteur à lit fluidisé consiste en une colonne contenant un liquide et des microparticules solides qui sont mises en suspension grâce à une troisième phase, le gaz qui est envoyé sous pression par le bas de la colonne. Les micro-porteurs permettent d'améliorer l'agitation et de supporter la croissance de bactéries adhérentes sous forme de biofilm (Fahim et al., 2013).

Enfin, il existe également les bioréacteurs à biofilm aéré par membrane qui sont décrits plus amplement dans la partie suivante.

2 Les bioréacteurs à contacteur membranaire

Parmi l'ensemble des bioréacteurs existants, les bioréacteurs à contacteur membranaire sont une technologie qui se développe depuis les années 1970 (Esato and Eiseman, 1975) dans le domaine de l'oxygénation du sang et depuis les années 1990, plus particulièrement dans le traitement des eaux usées (Williamson et al., 1992). Cette technologie peut être appliquée dans d'autres domaines grâce à ses nombreux avantages comme la surface d'échange importante et la séparation des phases liquide/gaz en contact.

2.1 Schéma de principe

Il existe de très nombreux bioréacteurs à membrane différents grâce notamment à la large gamme de membranes présentes sur le marché et aux nombreuses applications possibles. Le principe consiste à apporter ou enlever un constituant d'un fluide en le mettant en contact au sein d'une membrane avec un autre fluide. La membrane sert ainsi d'interface d'échange tout en conservant chaque constituant de part et d'autre, évitant ainsi tout mélange. La Figure 1 présente un exemple de cuve agitée contenant un fluide (grisé) et une boucle de recirculation à travers une membrane où le fluide est mis en contact avec de l'air avant de retourner dans la cuve. Un contacteur désigne une membrane utilisée spécifiquement pour mettre en contact deux fluides contrairement à l'utilisation classique des membranes de filtration où les composants d'un seul fluide sont séparés.

Les indicateurs spécifiques à un bioréacteur à contacteur membranaire sont :

- l'expression des vitesses de réaction par rapport à la surface membranaire et non au volume de milieu, en $\text{g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$,
- le taux de production de biomasse planctonique (par décrochage) par rapport à la biomasse fixée (équation (I 2.1)).

Taux de production de biomasse
planctonique (X_p) par rapport à la biomasse
fixée (X_f)

$$Y_{X_p/X_f} = r_{X_p} \cdot V / X_f \quad (\text{I 2.1})$$

La biomasse planctonique correspond à des cellules isolées retrouvées dans la phase liquide tandis que la biomasse fixée correspond aux cellules du biofilm adhérentes à la membrane.

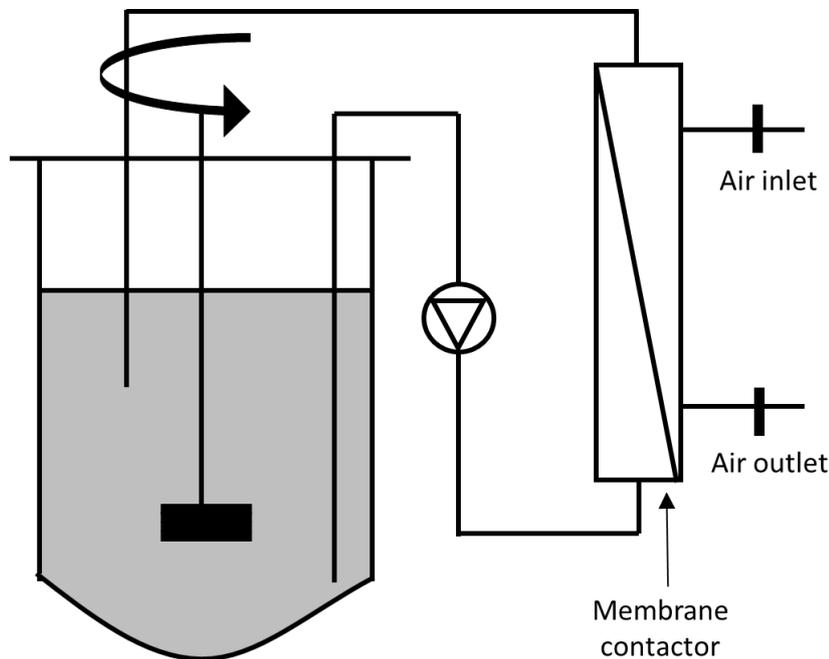


Figure 1 : Schéma de principe d'un bioréacteur à membrane représentant la cuve, la boucle de recirculation, la membrane, l'entrée et la sortie d'air.

2.2 Les différentes membranes

Les membranes peuvent se différencier par leur géométrie, leur matériau de fabrication, leur densité ou encore leur mode d'utilisation.

2.2.1 Les géométries

Les formes les plus courantes sont les membranes à fibres creuses, les membranes tubulaires et les membranes planes.

Une fibre creuse est une fine fibre évidée dans la longueur permettant le passage d'un fluide. Elles sont généralement assemblées en grand nombre (des dizaines de milliers en taille industrielle) parallèlement, sous forme de module, et liées à l'aide de colle à leurs extrémités afin de séparer intérieur et extérieur des fibres. Cette forme est celle qui permet d'obtenir la plus grande surface spécifique, c'est-à-dire la plus grande surface d'échange rapportée à l'encombrement du module. Le diamètre intérieur est inférieur à 1 mm (Bacchin, 2005). Le flux est laminaire à l'intérieur des fibres, avec de

faibles contraintes de cisaillement, ce qui permet de maintenir une biomasse fixée si nécessaire. Leur coût est relativement élevé (Martin and Nerenberg, 2012) à l'achat.

Les membranes tubulaires sont également assemblées parallèlement sous forme de module mais avec des diamètres internes bien plus grand allant de 4 à 25mm. Ce genre de géométrie permet de traiter des volumes plus importants mais un encombrement plus important pour une surface d'échange identique à celle des fibres creuses. Les diamètres internes permettent d'atteindre le régime turbulent, réduisant ainsi la couche limite et améliorant la performance de l'échange. La couche limite est définie comme la zone dans laquelle la vitesse d'écoulement est réduite de 99% par rapport à la vitesse maximale dans la conduite. Elles peuvent supporter des pressions plus importantes. Leur coût de fabrication est bien moins important que celui d'une membrane à fibre creuse.

2.2.2 Les matériaux de fabrication

Les matériaux utilisés pour la fabrication de membrane peuvent être classés en deux grandes catégories : les membranes organiques et les membranes inorganiques.

2.2.2.1 Membrane organique

Les membranes organiques sont les plus utilisées. Il existe différents matériaux comme l'acétate de cellulose facile à fabriquer mais peu résistant à la température (35°C max) et au pH (entre 4 et 6). Plus résistant que l'acétate de cellulose, on retrouve également les polyamides aromatiques, résistants au pH sur une gamme de 4 à 11 mais sensibles au chlore et facilement colmatés. Il existe également le polysulfone (polymère thermoplastique) qui offre une très grande résistance mécanique et chimique. L'inconvénient du polysulfone pour certaines applications est sa forte hydrophobicité.

Les fibres sont liées entre elles à leurs extrémités avec de la colle époxy. La stérilisation à l'aide d'un autoclave n'est donc pas toujours possible car cette colle n'est pas résistante aux hautes températures.

Les membranes organiques possèdent l'avantage d'être peu coûteuses en comparaison avec les membranes inorganiques.

2.2.2.2 Membrane inorganique

Ces membranes dont la fabrication est très onéreuse peuvent être conçues à base de céramique ou de carbone. Leur grande résistivité et leur longévité en font des membranes adaptées aux conditions de fonctionnement extrêmes.

2.2.3 La densité

Il existe trois types de densité de membrane. Premièrement, les membranes denses qui ne permettent l'échange de part et d'autre de la membrane que par diffusion. Les échanges sont donc limités en fonction de l'affinité de l'élément à traiter et du matériau de fabrication ainsi que du traitement de surface de la membrane. Les avantages de ce type de membrane sont le faible encrassement et la possibilité de monter en pression étant donné qu'aucun mélange entre les deux fluides n'est possible. La limite de pression est fixée seulement par la résistance mécanique de la membrane.

Il existe également des membranes microporeuses où la taille des pores peut être choisie parmi des gammes de membranes de micro ou ultrafiltration en fonction des molécules que l'on souhaite échanger. Les membranes microporeuses permettent un meilleur transfert car la diffusion se fait directement au niveau des pores contrairement aux membranes denses (Martin and Nerenberg, 2012). En effet, dans une membrane microporeuse, si la pression dépasse la pression de bullage définie en fonction du couple membrane/fluide, le fluide peut traverser les pores. Les pores d'une membrane peuvent être de taille uniforme (symétrique) sur l'épaisseur de la paroi ou de forme conique (asymétrique) avec un diamètre plus important du côté extérieur selon la méthode de fabrication (Figure 2a et b).

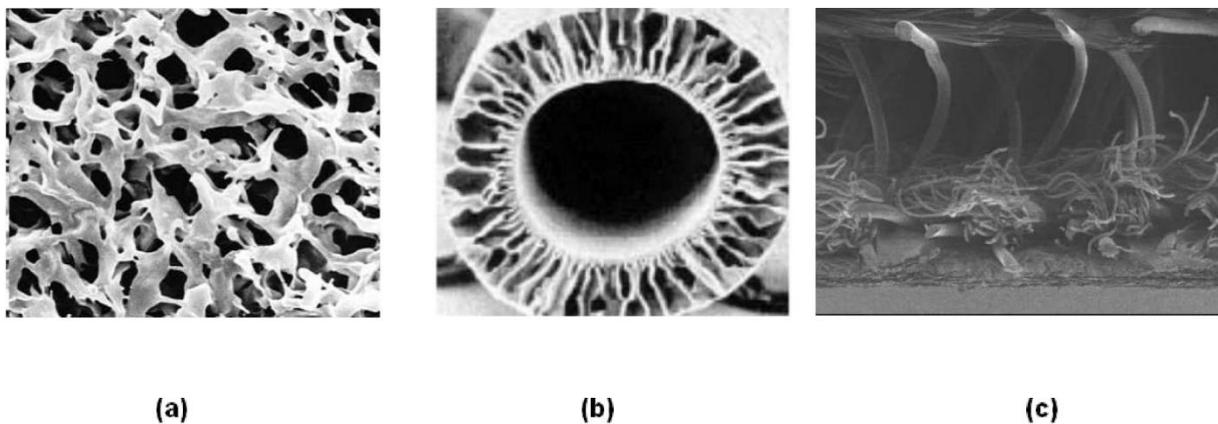


Figure 2 : Structure des membranes a) symétrique, b) asymétrique et c) composite (Seyhi et al., 2011).

Enfin, il existe depuis peu des membranes composites (Figure 2c) qui allient une fine couche d'un matériau résistant dense associé à une couche microporeuse. Cette stratégie permet de conserver la capacité de résistance à la pression des membranes denses tout en y alliant la capacité de transfert des membranes creuses microporeuses.

2.3 Les domaines d'utilisation

2.3.1 L'extraction liquide / liquide

L'extraction liquide consiste à mettre en contact à travers une membrane deux liquides. Le liquide extracteur sera soit moins concentré, soit aura plus d'affinité avec la molécule d'intérêt. L'échange se fera par gradient à travers la membrane. Un exemple est l'extraction d'arôme d'huile essentielle de citron à l'aide de membranes planes et d'éthanol comme solvant (Dupuy et al., 2011). Il existe également des méthodes utilisant la pervaporation, utilisée par exemple pour le retrait de l'eau et de l'éthanol du bioéthanol à travers une membrane en silice (Moussa et al., 2015).

2.3.2 L'oxygénation du sang

Les membranes sont utilisées pour l'oxygénation du sang car elles permettent la séparation des phases (sang et oxygène) tout en maintenant un transfert satisfaisant. Cela permet d'éviter tout risque d'embolie pulmonaire mais également d'abimer les cellules sanguines. En effet, ces cellules sont sensibles au cisaillement créé lors de l'aération par bullage (Albal et al., 1983; Catapano et al., 2004).

2.3.3 La culture de cellules animales

La culture de cellules animales diffère de la culture bactérienne par différents points dont l'un est la plus grande sensibilité au cisaillement des cellules. En effet, ces cellules ne sont pas faites pour résister à des sollicitations mécaniques induites par la circulation du milieu, contrairement aux bactéries par exemple. Cela pose donc un problème lors de la culture en bioréacteur car l'agitation est limitée et par conséquent le transfert d'oxygène également. Une des solutions à ce problème peut être l'utilisation de membranes afin de limiter la contrainte de cisaillement.

Des études ont montré la faisabilité de ce procédé (De Napoli et al., 2014; Ducommun et al., 2000). Une membrane externe plane en polytétrafluoroéthylène (PTFE) de 120 cm² a été utilisée pour comparer le transfert avec de l'air, du dioxygène pur ou un liquide acide saturé en dioxygène, permettant de retirer l'ammonium du milieu tout en apportant l'oxygène. Dans ce dernier cas, la membrane apporte une double utilité car elle assure à la fois un rôle d'aération et d'extraction liquide/liquide (Schneider et al., 1995). La production d'anticorps monoclonaux a également été étudiée à l'aide d'un système d'aération composé de tubes de silicone dense immergés et mis en mouvement grâce à un rotor dans le milieu non agité. L'oxygène diffuse à travers la membrane dense et la mise en mouvement permet de réduire la couche limite (Frahm et al., 2009).

2.3.4 Le traitement de l'eau

Le traitement de l'eau est la principale utilisation de membrane en tant que contacteur membranaire depuis maintenant plus de 20 ans pour ce qui est de la surface utilisée. On recense plus de 300 installations en Europe (Grasmick et al., 2007) dont plus d'une centaine en France. En effet, le traitement des eaux usées utilise les bactéries naturellement présentes pour dégrader les matières organiques avec des réactions d'oxydation qui ne peuvent se dérouler qu'en présence d'oxygène. Usuellement, cet oxygène est apporté par bullage. L'utilisation de membranes pour l'apport d'oxygène permet d'éviter le mélange des phases et donc les remontés d'odeurs nauséabondes habituellement induites par le bullage. Les bactéries se développent préférentiellement près de l'apport d'oxygène, c'est-à-dire sur la membrane qu'elles utilisent comme support, formant un biofilm. Une des limites de ce procédé est le phénomène de colmatage important qui empêche à terme le passage de l'oxygène. Des solutions hydrodynamiques, électriques ou encore mécaniques existent pour réguler la quantité de biomasse adhérente et maintenir des performances d'aération correctes (Jantaporn, 2016).

2.3.5 La bioproduction de méthanol

Le méthane peut être converti en méthanol avec un catalyseur, la MMO (Méthane Mono-Oxygénase), en présence d'oxygène. Cette réaction est limitée avec le MMO isolé (Ito et al., 2014). Pen et al., (2014) ont montré la faisabilité de la bioproduction de méthanol avec *Methylosinus trichosporium*, bactérie produisant la MMO, dans un

bioréacteur à double membranes microporeuses (polyethersulfone (PES), taille de pore 0,45 μm , 500 cm^2) permettant l'apport séparé d'oxygène et de méthane. Ce système permet d'éviter le mélange de gaz qui peut être explosif tout en apportant l'ensemble des substrats nécessaire à la conversion du méthane en méthanol.

2.3.6 La production de molécules tensioactives

Produire des molécules tensioactives à partir de micro-organisme représente un défi actuel car ces molécules amphiphiles ont la propriété de faciliter grandement la formation de mousse. Le bullage associé à des molécules tensioactives provoque la formation d'une très grande quantité de mousse, le débordement et l'entraînement du milieu et des cellules en dehors du bioréacteur. Le maintien de la stérilité n'est alors plus assuré et la productivité reste peu élevée.

L'utilisation d'un bioréacteur à contacteur membranaire semble donc particulièrement adaptée à la production de molécules tensioactives. En effet, la séparation des phases de part et d'autre de la membrane permet un transfert d'oxygène tout en évitant le mélange et donc l'apparition de mousse. Des études antérieures menées par notre groupe ont montré la faisabilité d'un tel système dans le cadre de la production de lipopeptides par une souche de *Bacillus subtilis* (Coutte et al., 2010). Un biofilm bactérien important se développe alors sur la membrane.

3 Les biofilms

Un biofilm est un ensemble de micro-colonies bactériennes adhérentes à une surface et fixées les unes aux autres avec la production d'exopolymères (Jouenne, 2016). Les bactéries se développent naturellement sous forme de biofilm dans les milieux humides, recouvrant tous types de supports tels que la coque des bateaux, la surface d'un liquide, les dents, etc. Les caractéristiques des biofilms peuvent être bénéfiques comme par exemple dans le traitement de l'eau ou sur les racines des plantes. Ils peuvent également être néfastes et non désirés comme dans le domaine chirurgical où de nombreux cas de contamination d'instruments ont été recensés. Pour ces raisons, les étapes de formation des biofilms et leurs caractéristiques ont été largement étudiés au cours des dernières années (Huang et al., 2019; Kovács and Dragoš, 2019; Sharahi et al., 2019).

3.1 La formation d'un biofilm

La formation d'un biofilm suit un schéma répétitif d'adhésion, de différenciation, de maturation et de dispersion afin de coloniser une nouvelle surface (Figure 3).

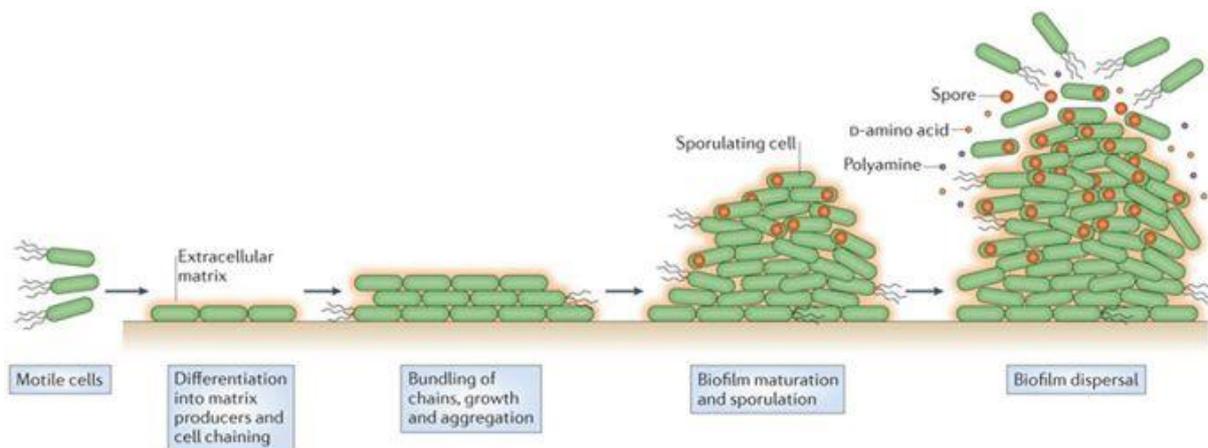


Figure 3 : Etapes de la colonisation d'un support par *Bacillus subtilis* (Vlamakis et al., 2013)

Les bactéries planctoniques peuvent explorer leur environnement proche à l'aide de protons et de molécules de signalisation qui diffusent radialement (Costerton, 1999). Une forte concentration indique la présence d'une surface proche. Les bactéries ont tendance à « explorer » les surfaces qu'elles rencontrent et à y adhérer, dans un premier temps de façon réversible avec des liaisons de faible intensité.

Il s'ensuit une adhésion irréversible. Le phénotype, c'est-à-dire la part du génome qui est exprimée, se modifie afin de mieux s'adapter à son environnement. Ainsi, les éventuels flagelles peuvent disparaître, la production d'exopolysaccharides (EPS) augmente, la composition des membranes cellulaires change et les bactéries peuvent cesser de se séparer pour former des chaînes. La production des molécules d'EPS permet de passer d'une adhésion réversible à une adhésion irréversible, favorisant la formation d'une colonie (Costerton, 1999).

La division cellulaire ainsi que le recrutement depuis la phase liquide permettent l'expansion des micro-colonies aussi bien sur le plan horizontal que sur le plan vertical. La croissance des colonies entraîne la diversification des phénotypes exprimés au sein du consortium de bactéries. Tandis que certaines cellules deviennent surproductrices d'EPS, d'autres vont pouvoir sporuler ou rester motile par exemple. Ces changements phénotypiques n'étant pas définitifs, les bactéries composant le biofilm peuvent s'adapter aux changements de l'environnement (Vlamakis et al., 2013).

En fonction des conditions environnementales et des souches, un biofilm peut atteindre le stade de maturité après 24 heures pour des biofilms mono-espèce (Lomander et al., 2004) ou après quelques mois pour des consortiums complexes multi-espèce, en traitement des eaux par exemple (Hou et al., 2013; Zhou et al., 2014). Le biofilm est dit mature lorsque la quantité de biomasse qui le compose est stable dans le temps. La quantité de biomasse se régule grâce à la libération d'amas de bactéries dans la phase liquide qui vient contrebalancer le développement naturel du biofilm. Ces agrégats sont libérés grâce à la production de D-amino-acides et de polyamines, molécules dégradant l'EPS (Vlamakis et al., 2013). Ils pourront s'implanter sur une nouvelle surface où les conditions environnementales seront favorables à la croissance. Le taux de croissance du biofilm est alors égal au taux de détachement, assurant ainsi un équilibre et une biomasse constante.

3.2 Les caractéristiques d'un biofilm

Les biofilms peuvent prendre des formes différentes en fonction de leur environnement et de leur composition. La forme la plus répandue est la forme dite en « doigt de gants », représentée par la formation de micro-colonies en excroissance par rapport à la colonie basale (Figure 4). Ces excroissances prennent la forme de champignons. Ils sont composés en moyenne de 10 à 25% massique de cellules principalement

présentes sur le chapeau, le reste étant la matrice d'EPS produite par les bactéries (Costerton, 1999).

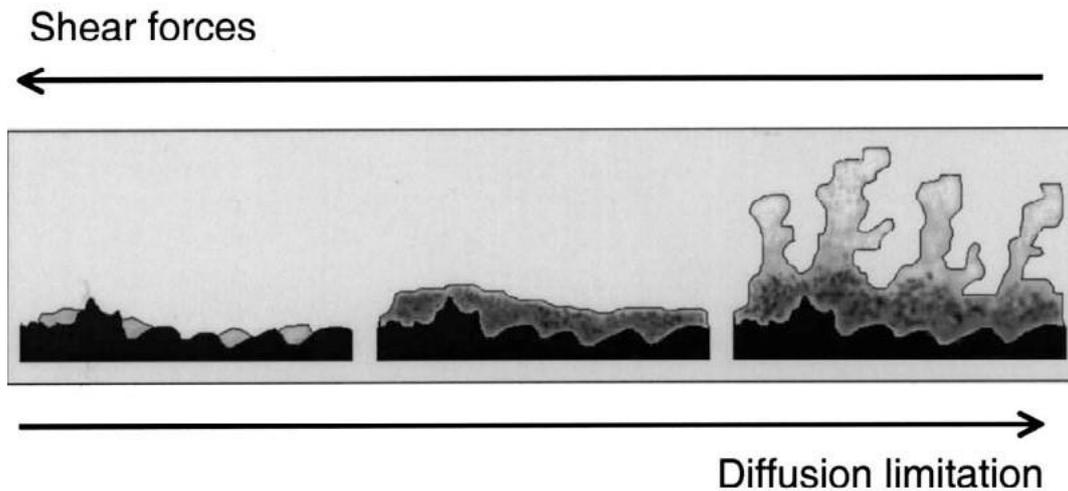


Figure 4 : Représentation schématique de la forme d'un biofilm en fonction des conditions environnementales, forces de cisaillement et limitation du transfert par diffusion (Van Loosdrecht et al., 2002).

Les principales caractéristiques des biofilms sont :

- la structure tridimensionnelle incluant l'épaisseur ϵ , la rugosité, la porosité, la densité et les propriétés viscoélastiques,
- les propriétés biochimiques et biologiques incluant l'état physiologique des cellules, les différents phénotypes et la composition du biofilm.

Ces caractéristiques sont influencées par l'interaction de trois phénomènes : (i) le transport des nutriments jusqu'au biofilm, (ii) les conditions hydrodynamiques qui induisent un cisaillement sur le biofilm et (iii) la vitesse de consommation des substrats par le biofilm. Plus l'apport de nutriment est important, plus le biofilm se développe sur le plan vertical avec la formation de protubérances. Au contraire, plus la contrainte de cisaillement est importante, plus l'érosion du biofilm augmente, rendant le biofilm fin, dense et lisse. Enfin, plus les vitesses de réaction (consommation du substrat) sont importantes par rapport aux phénomènes de transfert (diffusion), plus un gradient de concentration se forme dans le biofilm, ce qui contribue à le rendre poreux et filamenteux (Picioreanu et al., 1998).

Il est intéressant de conduire des bioréacteurs en présence de biofilms afin de fixer la biomasse et de séparer le milieu de culture du catalyseur biologique (les micro-

organismes). En mode continue, il n'y a alors plus de risque de lessivage puisque le renouvellement du milieu n'empêche que la croissance planctonique. Cependant, la culture de biofilm étant beaucoup moins répandue que la culture planctonique, de nombreux leviers restent à être étudiés, notamment l'amélioration des connaissances pour le transfert d'oxygène dans le cadre de la croissance d'un biofilm.

3.3 *Bacillus subtilis*

Dans ces travaux, toutes les souches utilisées font parties de l'espèce *Bacillus subtilis*, une bactérie gram + de l'embranchement des *Firmicutes* et de la famille des *Bacillaceae*. Cette bactérie ubiquitaire, mésophile et aérobie stricte a une forme rectangulaire aux angles arrondis d'environ 2 à 4 µm de longueur sur 0,5 à 2 µm de largeur. Elle possède des flagelles, la capacité de sporuler pour résister à des conditions extrêmes et la capacité à former des biofilms. Parmi le genre *Bacillus*, il existe des souches pathogènes pour l'homme (*Bacillus anthracis* par exemple responsable de la maladie du charbon) dont *Bacillus subtilis* ne fait pas partie.

Cette souche représente la bactérie Gram + modèle en laboratoire au même titre qu'*Escherichia Coli* pour les bactéries Gram -. Son génome est totalement séquencé depuis 1997 (Kunst et al., 1997), elle est facilement cultivable et croît rapidement (temps de génération inférieur à 30 minutes). Elle est utilisée par les industries agroalimentaires, sanitaires et pharmacologiques pour les enzymes et les nombreuses molécules d'intérêts qu'elle peut produire, notamment des molécules à activité antifongique et antibactérienne.

Une spécificité de *Bacillus subtilis* est qu'il est capable de produire des molécules issues d'une synthèse peptidique non ribosomique. Cette synthèse n'est pas faite par des ribosomes mais par des complexes multienzymatiques comportant plusieurs modules permettant chacun d'activer et de rajouter un acide aminé à la chaîne peptidique de la molécule en cours de formation.

4 Les phénomènes de transfert

Les bioréacteurs à contacteur membranaire sont principalement utilisés pour transférer de l'oxygène dans un milieu de culture. L'apport d'oxygène est en effet un élément clé de la plupart des installations de bioréacteur. Le dimensionnement nécessite pour cela une bonne connaissance des phénomènes de transfert. De nombreuses études se sont attardées sur les paramètres influant le transfert dans des bioréacteurs en général, dont certaines plus spécifiquement sur les bioréacteurs à membrane (Gabelman and Hwang, 1999).

4.1 Les résistances au transfert

Dans le cas général d'une aération par bullage, le transfert d'oxygène a été largement étudié, notamment les phénomènes influant tels que la taille des bulles, le régime d'écoulement des bulles, les résistances au transfert... Tous ces phénomènes sont repris et détaillé dans le travail de Garcia-Ochoa and Gomez, (2009). Le modèle le plus utilisé pour décrire le transfert d'oxygène est celui des résistances en série (Whitman, 1923) qui prend comme hypothèse que : (i) les phases sont à l'équilibre aux interfaces, (ii) les principales résistances sont situées dans les couches limites gaz et liquide et (iii) le coefficient global de transfert de masse, K_L , est le résultat de deux coefficients locaux de transfert de masse, k_L côté liquide et k_G côté gaz. Les différentes résistances au transfert depuis une bulle jusqu'à l'intérieur d'une cellule sont présentées sur la Figure 5.

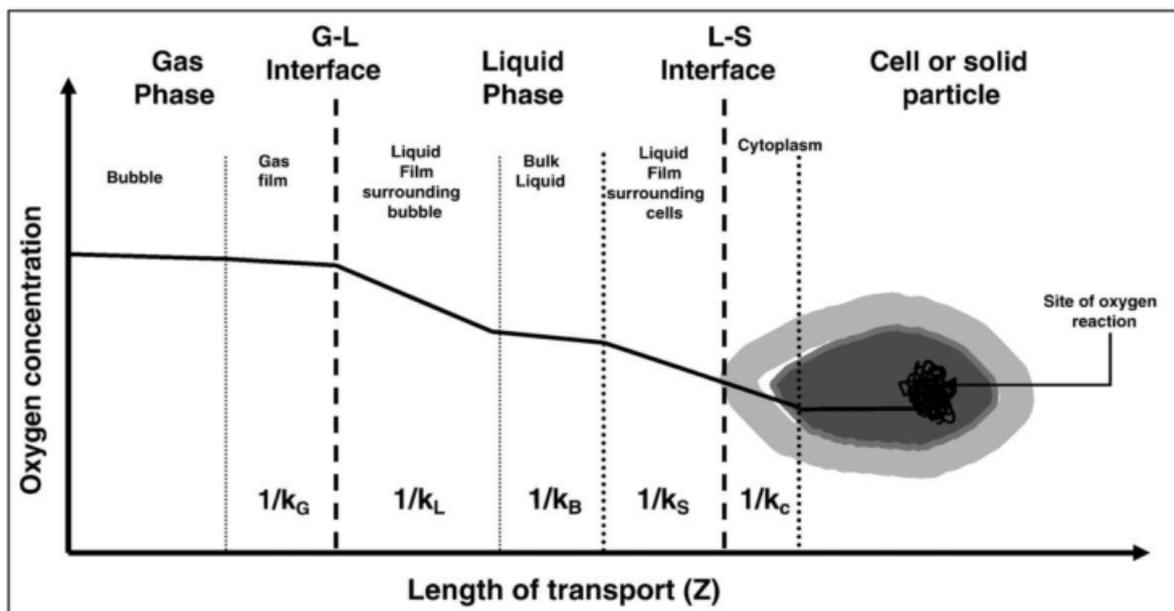


Figure 5 : Schéma représentant les résistances présentes lors du transfert d'oxygène depuis une bulle jusqu'à l'intérieur d'une cellule (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009)

La Figure 6 représente spécifiquement le transfert d'oxygène depuis une phase gaz vers une phase liquide à travers une membrane microporeuse hydrophobe ainsi que le profil de concentration en oxygène dans les différentes phases. La concentration en oxygène dans la phase gaz infiniment mélangée est constante. A l'approche de la membrane, une couche limite se forme où la concentration en oxygène diminue. Le phénomène de transfert est purement diffusif dans les couches limites. A l'intérieur des pores, le transfert se fait uniquement par diffusion avec une diminution linéaire de la concentration en oxygène à l'approche de la phase liquide. Enfin, de même que pour le côté gaz, on retrouve une couche limite du côté liquide où le transfert est diffusif puis devient convectif dans la phase liquide. Les principales résistances se trouvent au niveau des couches limites de diffusion, de part et d'autre de la membrane.

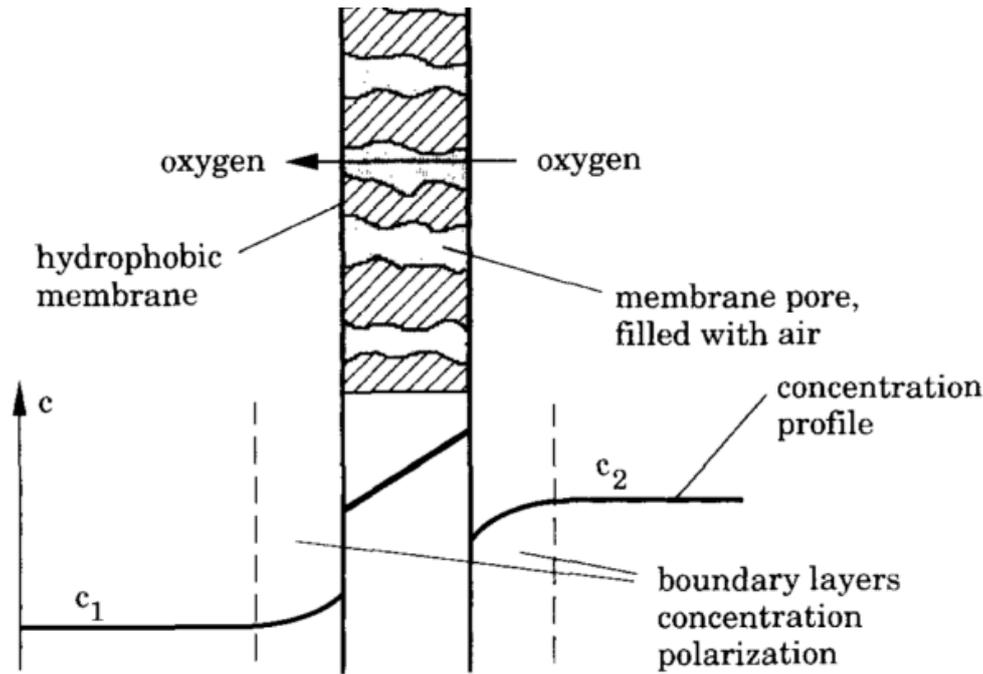


Figure 6 : Schéma représentant le transfert d'oxygène à travers une membrane microporeuse hydrophobe avec d'un côté un flux d'air et de l'autre un flux de liquide. Les concentrations c_1 et c_2 correspondent respectivement aux concentrations en oxygène dans le milieu de culture et dans le gaz

Afin de comparer les performances d'aération entre elles, des indicateurs ont été développées à partir des différentes résistances au transfert.

4.2 Le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène $k_L a$

Le flux molaire d'oxygène au sein de chaque phase J^0 ($\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) peut s'écrire comme indiqué dans l'équation (I 4.1).

$$J^0 = K_G(p_G - p^*) = K_L(C^* - C_L) \quad (\text{I } 4.1)$$

K_G et K_L sont les coefficients de transfert de masse à l'interface respectivement côté gaz et côté liquide. p_G et p^* représentent respectivement la pression partielle d'oxygène côté gaz et la pression partielle d'oxygène à l'interface en équilibre avec la phase liquide de concentration C^* .

Le transfert d'oxygène par unité de volume de réacteur (oxygen transfer rate OTR en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) peut être calculé en multipliant J^0 par la surface d'échange par unité de volume a selon l'équation (I 4.2):

$$OTR = a \cdot J^0 = K_L a (C^* - C_L) \quad (I\ 4.2)$$

Le $k_L a$ correspond au coefficient volumétrique de transfert d'oxygène et s'exprime en h^{-1} . Le $k_L a$ est le produit de k_L , le coefficient de transfert d'oxygène, et a , la surface d'échange. Il est largement utilisé en fermentation pour comparer les capacités d'aération des bioréacteurs à bullage. En effet, la valeur exacte de a dans un bioréacteur à bullage est difficile à déterminer. Il est alors admis que la densité de bulles par unité de volume est constante (Zlokarnik, 2001).

L'OTR peut être estimé dans des fioles d'Erlenmeyer en utilisant la relation de Maier, 2002 :

$$k_L a = 6,67 \cdot 10^{-6} \cdot N^{1,16} V_L^{-0,83} d_0^{0,38} d^{1,92} \quad (I\ 4.3)$$

Avec N la vitesse de rotation, V_L le volume de remplissage de la fiole, d_0 le diamètre d'agitation et d le diamètre interne maximum de la fiole.

4.3 Le coefficient de transfert d'oxygène k_L

Dans le cas d'un bioréacteur à membrane, la valeur exacte de a est connue car la surface d'échange est donnée par le fabricant. Les bioréacteurs peuvent donc être comparés soit en fonction du $k_L a$ soit en fonction directement du k_L , coefficient de transfert d'oxygène. Seul ce dernier indicateur est utilisé dans les études portant sur des bioréacteurs à membrane. La comparaison n'est alors pas évidente avec les bioréacteurs à bullage due à l'utilisation de deux coefficients différents.

De plus, le k_L représente la résistance au transfert de masse côté liquide, qui dépend d'une part des propriétés physico-chimiques de la phase liquide et d'autre part des conditions hydrodynamiques d'écoulement dans les fibres. Ces conditions d'écoulement sont définies en partie par la géométrie de la membrane (organique ou inorganique, rugosité, diamètre interne des fibres...), rendant l'indicateur k_L dépendant du type de membrane utilisé.

Le transfert d'oxygène étant souvent le paramètre limitant dans les réactions biologiques, de nombreuses études se sont attardées sur les paramètres qui influent sur ce phénomène. Dans le cas des bioréacteurs à membranes, ces études sont plus rares. Un bilan des connaissances actuelles est présenté ci-après.

4.4 Le transfert d'oxygène à travers une membrane

Dans cette section, les principaux paramètres influant le transfert d'oxygène à travers une membrane sont abordés et ordonnés en commençant par les conditions opératoires, puis les phases en présence et enfin les équipements.

4.4.1 Conditions opératoires

Les conditions opératoires décrivent l'ensemble des paramètres d'un processus. Dans le cadre de l'utilisation de bioréacteurs, ces paramètres sont les plus facilement modifiables et font également l'objet de nombreuses études d'optimisation.

4.4.1.1 Effet de la température

Même si la température a un impact direct et non négligeable sur le transfert d'oxygène, elle est fixée en fonction du métabolisme des micro-organismes mis en œuvre qui se développent préférentiellement à une température spécifique. Ce n'est donc pas un paramètre étudié dans le cadre d'une optimisation du transfert de matière faisant intervenir un micro-organisme car il n'y a qu'un très faible degré de liberté pour le faire varier.

4.4.1.2 Effet du débit de liquide

Comme vu précédemment, la plus grande résistance au transfert se trouve au niveau de la couche limite de diffusion du côté liquide. Plusieurs solutions existent afin de réduire cette couche limite dont la modification des conditions hydrodynamiques d'écoulement au sein de la phase liquide.

Schneider et al., (1995) utilisent une membrane plane d'ultrafiltration en PTFE pour oxygéner une culture de cellules animales. L'augmentation du débit de liquide d'un facteur 9 (de 150 à 1350 ml/min) entraîne une augmentation linéaire du transfert d'oxygène. Côté et al., (1989) ont étudié l'augmentation du flux de liquide de $Re = 0.6$ à $Re = 49$. A un Reynolds de 0,6, la résistance due à la couche limite côté liquide représente 79 % de la résistance totale, le reste étant dû à la membrane dense en silicone. L'augmentation du flux de liquide entraîne une diminution de la résistance due à la couche limite côté liquide d'un facteur 4, réduisant l'impact de la résistance due à la couche limite côté liquide à 45 %.

4.4.1.3 Effet de la pression d'air

Modifier de la pression imposée au côté gaz permet d'augmenter la pression partielle en oxygène et ainsi d'augmenter le gradient de concentration entre les phases. Théoriquement, cela devrait permettre d'améliorer la capacité de transfert d'une phase à l'autre sans faire varier les coefficients de transfert. En effet, ces derniers sont indépendants du gradient de concentration entre les phases.

Qi et al., (2003) ont mesuré le k_{La} dans le cadre de la culture de cellules de mammifères avec des membranes à fibres creuses en silicone. En faisant varier les pressions d'entrée et de sortie et en mesurant la pression à différents points le long des membranes, ils ont mis en évidence que le k_{La} , qui est un paramètre système, ne dépend pas de la pression entre 1,0 et 1,7 bar, contrairement à l'OTR qui augmente de 47 % sur cette gamme de pression.

Les résultats de Côté et al., (1989) montrent que l'augmentation de la pression partielle de dioxygène n'a pas d'influence sur K , le coefficient de transfert, jusqu'à 3 bars.

La limite technique à l'augmentation de la pression d'air dépend du point de bullage de la membrane. En effet, au-delà d'une certaine pression, l'air peut traverser la membrane et buller dans la phase liquide. Cette limite peut être dépassée en augmentant la contre-pression imposée par la phase liquide mais l'interface est alors moins stable.

4.4.1.4 Effet du débit d'air dans les fibres

Dans le cadre d'utilisation de fibres ouvertes, un flux de gaz est maintenu constant.

Ducommun et al., (2000) ont fait varier le débit de gaz de 200 à 800 mL/min dans un réacteur de 2 litres aéré par 100 cm de tube (poreux à 80 %) et de 6 mm de diamètre en PTFE. Aucune influence n'a été observée ce qui confirme l'hypothèse de la très faible variation de concentration dans la phase gaz au cours du transfert.

4.4.2 Phases en présence

Les phases en présence correspondent aux caractéristiques des matières premières utilisées. Le transfert d'oxygène inclut généralement une phase gazeuse et une phase liquide.

4.4.2.1 Phase gaz

Le fluide le plus souvent utilisé pour apporter l'oxygène est de l'air comprimé grâce à son faible coût. Des études ont été menées avec de l'air enrichi en oxygène ou de l'oxygène pur afin d'augmenter le gradient de concentration et donc le transfert de matière.

Selon Côté et al., (1989), qui utilisent une membrane à fibre creuse denses en silicone, le dioxygène pur semblerait 20 % plus efficace que l'air pour le transfert d'oxygène, mais ces résultats se doivent d'être confirmés car ils suspectent l'azote initialement prévu pour désoxygéner l'eau de s'adsorber sur la membrane puis de se relarguer pendant les essais (Schaffer et al., 1960).

4.4.2.2 Phase liquide

L'oxygène est transféré à travers la membrane vers un milieu de culture liquide qui peut être de l'eau ou un milieu chimiquement défini pour la croissance des micro-organismes. Dans ce dernier cas, les paramètres du milieu liquide sont définis pour répondre aux attentes du micro-organismes. Les principales caractéristiques physiques du milieu liquide pouvant influencer sur le transfert sont : la viscosité, la densité et la tension de surface. Dans le cadre de la production de lipopeptides telle que la surfactine, la tension de surface du milieu évolue significativement au cours de la culture.

4.4.2.2.1 Les lipopeptides

Un lipopeptide est un peptide associé à une chaîne d'acides gras. Ceux produits par *Bacillus subtilis* se divisent en trois familles : les surfactines, les iturines et les fengycines. La partie peptidique est cyclique, hydrophile et peut posséder de nombreuses activités biologiques différentes comme antibiotique, antifongique ou inducteur de croissance (Ongena and Jacques, 2008). La chaîne d'acide gras est la partie hydrophobe de la molécule dont la longueur peut varier en fonction du nombre de molécules de carbone. Cette dualité entre partie hydrophobe et hydrophile donne sa propriété intrinsèque à ce type de molécule : être amphiphile. En effet cette molécule se place préférentiellement aux interfaces liquides aqueux/organiques et aide ainsi à les stabiliser. Cette propriété permet entre autres de former des mousses ou des émulsions.

4.4.2.2 La surfactine

La surfactine est un lipopeptide d'environ 1,36 kDa constitué d'une chaîne de 13 à 16 acides gras β hydroxylées liée à une chaîne peptidique cyclique composée de 7 acides aminés : Glu, Leu, D-Leu, Val, Asp, D-Leu, Leu (Bonmatin et al., 1994; Grangemard et al., 1997)(Figure 7).

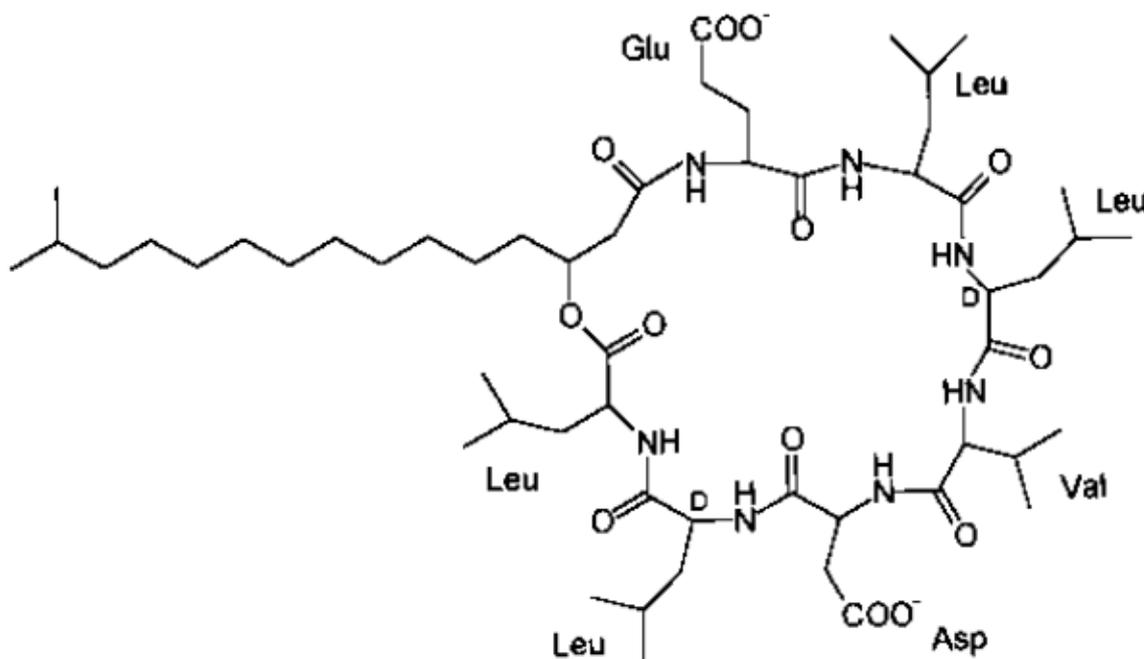


Figure 7 : Structure de la surfactine (Vollenbroich et al., 1997)

Dans un milieu aqueux, la surfactine peut former des micelles à partir d'une certaine concentration, la concentration micellaire critique (CMC). La forme micellaire est le rassemblement de molécules amphiphiles sous forme de sphère avec une chaîne polaire hydrophobe dirigée vers l'intérieur et une tête hydrophile vers le milieu aqueux (et inversement en milieu organique) afin de limiter le contact des parties hydrophobes avec le milieu aqueux. Cette conformation ne peut apparaître qu'à partir d'une certaine concentration de molécules amphiphiles, la CMC, qui est spécifique à chaque lipopeptide. La CMC de la surfactine est de 10 μM (Kell et al., 2007) et la tension de surface peut être diminuée de 72 $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ (eau déminéralisée) à 27.10⁻³ $\text{N}\cdot\text{m}^{-1}$ avec une solution à 0,05 % (Arima et al., 1968). Le pouvoir tensioactif de la surfactine est un des plus puissants parmi les biosurfactants (Peypoux et al., 1999).

4.4.2.2.3 La tension de surface

L'effet de la tension de surface sur le transfert d'oxygène a déjà été étudié par Côté et al., (1989) qui ont démontré que l'ajout de surfactant (équivalent à 6mg.L^{-1} de lauryl sulfate) augmente le coefficient global de transfert K (somme de la résistance de la membrane et du coefficient local de transfert d'oxygène côté liquide) de 20 %. Ils présumant que cela est lié aux caractéristiques de la membrane qui est hydrophobe. En effet, la présence de surfactant faciliterait ainsi le contact entre le milieu aqueux et la membrane.

4.4.3 Équipements

Les équipements correspondent aux bioréacteurs et membranes utilisés. Le transfert ayant lieu au sein de la membrane, seules les caractéristiques des membranes seront abordées.

4.4.3.1 Hydrophobicité des fibres

L'hydrophobicité des membranes poreuses constitue un paramètre essentiel pour le transfert de matière car il détermine la mouillabilité des pores, c'est-à-dire la capacité de la phase aqueuse à pénétrer à l'intérieur des pores. Ainsi, selon l'hydrophobicité d'une membrane, l'interface d'échange sera située du côté interne ou externe des fibres.

Karoor and Sirkar, (1993) proposent de comparer la capacité d'échange ($k_L a$) entre une membrane microporeuse mouillée et non mouillée (membrane polypropylène 100 à 300 cm^2 , hydrophobe, flux de liquide côté tube et flux à contre-courants) et concluent que la capacité de transfert est améliorée avec une membrane non mouillée. Yasuda and Lamaze, (1972) testent différentes membranes, denses et microporeuses ainsi que différentes hydrophobicités. Il apparaît que les membranes microporeuses en polysulfone, matière hydrophobe, permettent le meilleur échange (1,7 fois plus que dans les mêmes conditions avec une membrane dense en silicone). La résistance au transfert d'une membrane microporeuse est négligeable en comparaison avec la résistance qu'oppose une membrane dense puisque l'échange se déroule au niveau des pores. De plus, le polysulfone, moins hydrophobe que le silicone, permet un meilleur contact entre la surface de la membrane et le milieu et donc un meilleur échange.

La meilleure performance des membranes non mouillées s'explique par le meilleur transfert dans la phase gaz que dans la phase liquide. Le transfert de matière à l'intérieur des pores se fait par diffusion et dépend donc des caractéristiques de la phase présente. Dans le cas de membranes non mouillées, les pores sont remplis de gaz ce qui permet de limiter l'apparition de gradient de concentration en oxygène entre le gaz à l'extérieur des fibres et le gaz à l'interface avec le milieu aqueux.

4.4.3.2 Ouverture des fibres

Lors de l'utilisation de membranes pour l'aération d'un milieu, il est possible d'utiliser des fibres fermées ou ouvertes. L'utilisation de fibres ouvertes implique un flux de gaz constant et une concentration en oxygène qui varie très peu. En effet, l'échange avec le milieu est négligeable en comparaison avec le renouvellement constant du gaz. Il est possible, lors de l'utilisation de gaz plus onéreux ou plus dangereux comme l'oxygène pur, d'utiliser des membranes fermées. Il n'y a alors plus qu'une entrée côté gaz et plus de sortie, entraînant une pression de gaz qui est maintenue constante sans aucun flux ni renouvellement de ce gaz à part les échanges à travers la membrane. L'intégralité du gaz est alors transférée dans le milieu et il n'y a plus de perte.

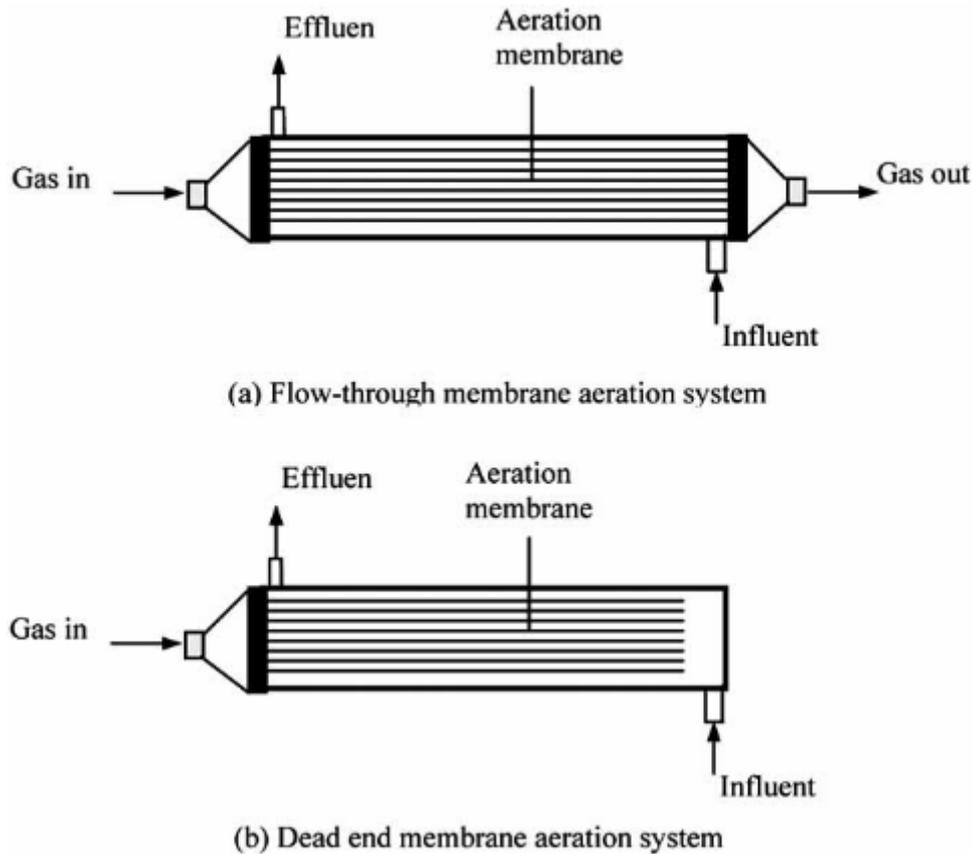


Figure 8 : Schéma des différents modes d'aération par membrane avec (a) des fibres ouvertes et (b) des fibres fermées (Li et al., 2008)

Côté et al., (1989) propose une étude complète de l'échange d'oxygène à travers une membrane dense en silicone de 258 cm² avec flux de liquide à l'extérieur des fibres. Ils démontrent qu'en fermant la membrane, le résultat est 45 % moins efficace qu'avec une membrane ouverte car la vapeur d'eau stagne dans les membranes fermées. En présence de micro-organisme, l'absence de flux entrainerait également la stagnation du CO₂ produit et la condensation des vapeurs en cas de chute de température. Ahmed and Semmens, (1992b) confirment la rétention des condensats de vapeurs et la rétrodiffusion du nitrogène en utilisant des fibres fermées.

4.4.3.3 Flux de liquide à l'intérieur ou à l'extérieur des fibres

Les phases gaz et liquides peuvent circuler à l'intérieur ou à l'extérieur des fibres. Les deux configurations existent dans la littérature sans avoir été comparées. La surface d'échange est identique à l'intérieur et à l'extérieur avec l'utilisation de membrane poreuse symétriques. La majorité des études portant sur le traitement de l'eau font circuler la phase liquide à l'extérieur des fibres afin d'éviter le colmatage des

membranes. En effet, les biofilms multi-espèce peuvent se développer de façon conséquente et pourraient rapidement boucher l'intérieur des fibres.

4.5 Le transfert dans un biofilm adhérent sur membrane

4.5.1 Les configurations possibles

La particularité d'un biofilm aéré par contacteur membranaire est que l'oxygène est apporté par le côté du biofilm qui est adhérent à la membrane tandis que les nutriments sont apportés par le côté libre du biofilm en contact avec la phase liquide. La principale source de carbone apportée par la phase liquide sera notée ci-après substrat. Cette contre-diffusion peut créer différentes couches limitantes au sein du biofilm, recherchées ou non (Picard, 2011).

Dans la configuration où l'oxygène et le substrat peuvent traverser l'ensemble du biofilm (Figure 9 A), aucune partie de ce dernier n'est limitée en substrat. Cette configuration est difficile à atteindre en régime permanent car le paramètre limitant est alors la cinétique de croissance du biofilm. Les bactéries pourront croître à leur taux de croissance maximal.

Dans la configuration où le substrat est consommé avant d'atteindre la base du biofilm (Figure 9 B), une partie du biofilm n'est alors plus productif et crée une résistance supplémentaire au transfert d'oxygène.

La configuration où l'oxygène est consommé avant d'atteindre la phase liquide (Figure 9 C) peut être recherchée dans le traitement de l'eau car la présence de zones aérobies et anoxiques permet les réactions simultanées de nitrification et dénitrification. De même, cette configuration peut être utile en présence de gaz dangereux (nocif ou explosif), car le gaz ne passe pas dans la phase liquide (Pen et al., 2014).

Deux configurations existent en état de doubles limitations. La première fait apparaître où les limitations en substrat et en glucose sont latérales sans se rencontrer (Figure 9 D). Dans la seconde, aucune partie du biofilm n'est alimentée en oxygène et en substrat (Figure 9 E). Ces configurations ne sont en général pas recherchées.

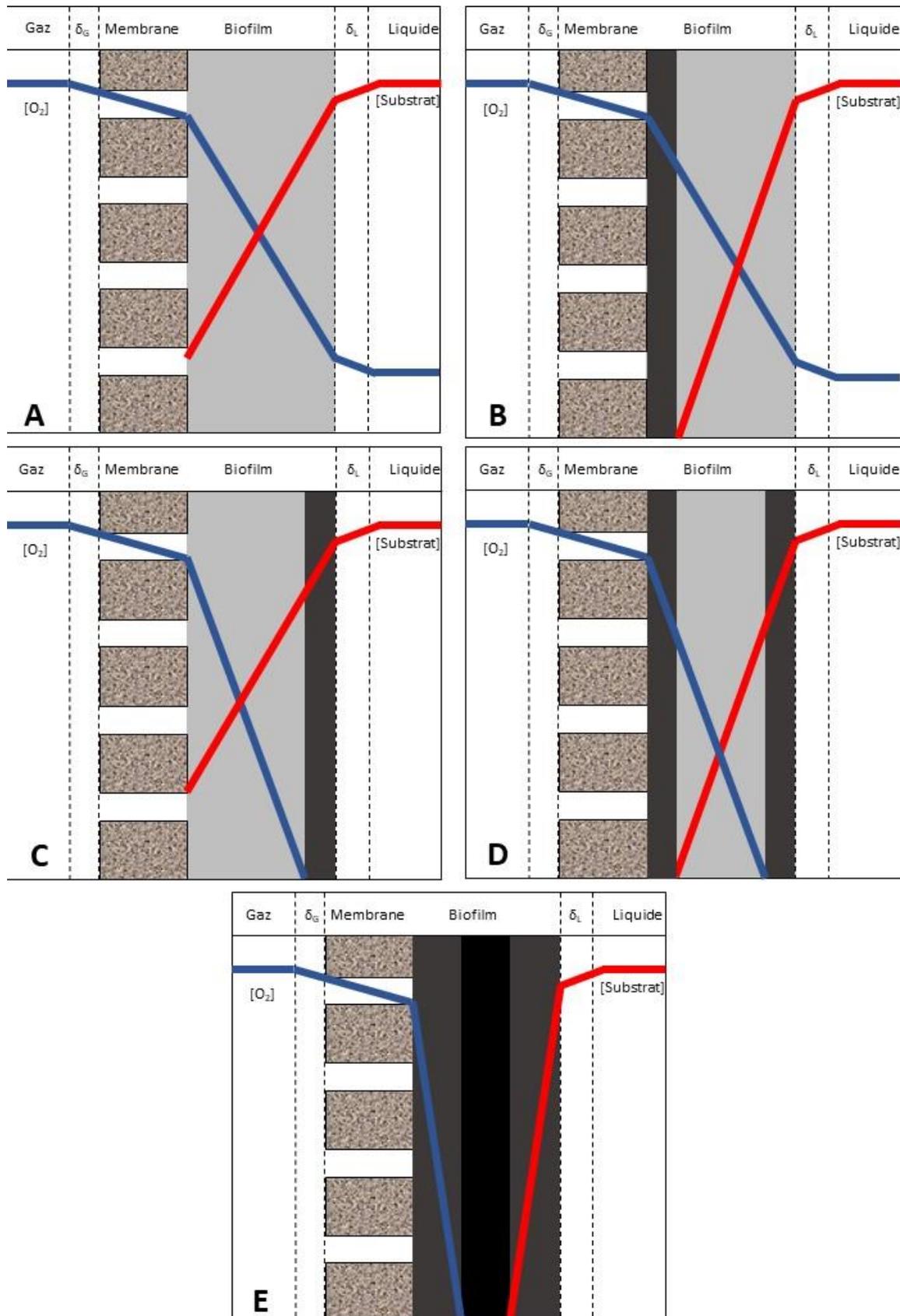


Figure 9 : Profil de concentration en dioxygène et en substrat dans un biofilm adhérent à une membrane microporeuse hydrophobe (A) Aucune limitation, (B) limitation en substrat, (C) limitation en dioxygène, (D) limitation latérale en substrat et dioxygène, (E) double limitation centrale en substrat et dioxygène

4.5.2 Les paramètres influents

Dans le cadre de la culture bactérienne adhérente sur membrane, les paramètres influençant l'état du biofilm sont non seulement ceux cités dans le chapitre § 1.4.4 mais également ceux ayant un impact sur le transfert de substrat et sur l'état physiologique des cellules qui composent le biofilm.

Syron and Casey, (2008) font varier les concentrations en substrat, l'épaisseur du biofilm et sa densité via le flux de liquide et la taille de la membrane. Ils déduisent que l'OTR est fortement dépendant de la concentration en glucose. Plus il y a de glucose, plus l'OTR augmente. L'OTR augmente rapidement avec l'augmentation de l'épaisseur du biofilm en régime transitoire car plus de bactéries consomment de l'oxygène. Il diminue ensuite lorsqu'il y a limitation en glucose (configuration B de la Figure 9) et donc que l'épaisseur de biofilm non alimenté devient un frein au transfert d'oxygène. À l'aide d'un modèle mathématique, ils arrivent à prédire la configuration de limitation de leur système en connaissant les vitesses de diffusion et de réaction du substrat et de l'oxygène.

Il n'est cependant pas toujours possible d'avoir accès à l'ensemble des données permettant de connaître la configuration dans laquelle se trouve une culture. Le choix des paramètres opératoires à fixer pour obtenir les meilleures conditions de culture n'est donc pas toujours évident. Les effets des paramètres peuvent être étudiés individuellement en les faisant varier un à un ou avec une approche globale faisant intervenir la modélisation. De nombreuses méthodes existent dont les principales utilisées en génie des procédés sont citées ci-après.

5 La modélisation

La modélisation est un outil permettant de prédire une ou plusieurs réponses en fonction des variations de paramètres entrants. Cela a principalement pour but de pouvoir anticiper, de définir un maximum et/ou un minimum ou de mener à bien un changement d'échelle. Pour cela, il existe de nombreuses méthodes qui nécessitent plus ou moins d'expériences, d'hypothèses ou de calcul et conduisent ainsi à de larges gammes d'applications.

5.1 Le changement d'échelle

Le changement d'échelle est une problématique récurrente dès qu'un procédé est découvert à l'échelle du laboratoire et doit être transposé à l'échelle industrielle. Il faut en effet être capable de dimensionner les futures installations en prévoyant tous les changements qu'impliquent le nouveau matériel.

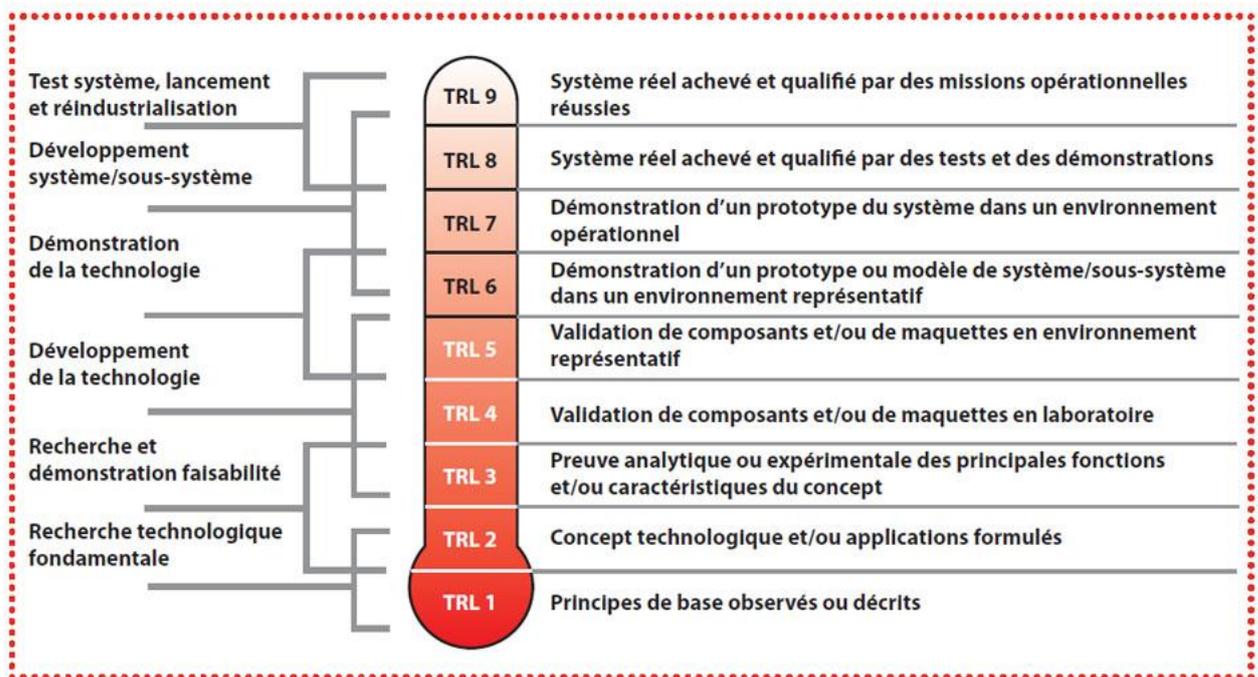


Figure 10 : Echelle TRL (Technology Readiness Level) ("Quelques explications sur l'échelle des TRL (Technology readiness level)," 2009)

De nombreux outils ont été mis au point dont l'échelle TRL (« Technology Readiness Level ») qui permet de se positionner par rapport à l'avancement du changement d'échelle et ainsi définir les priorités.

Dans le cadre de cette thèse, la recherche technologique fondamentale (TRL 1 et 2) ainsi que la démonstration de faisabilité ont déjà été effectuées (TRL 2 et 3). Le développement de la technologie (TRL 3 à 5) sont en cours car la preuve expérimentale des principales fonctions du concept (TRL 3) a été réalisée ainsi que la démonstration de la technologie dans un environnement représentatif (TRL 6) (Coutte et al., 2013, 2010). Il est cependant essentiel de revenir à la validation de maquette en laboratoire (TRL 4) pour permettre le passage de cette technologie de l'échelle laboratoire à un prototype industriel optimisé, avec l'ensemble des données nécessaires au dimensionnement.

Les études préliminaires à la montée en échelle font appel à différentes méthodes de modélisation dont les principales sont présentées ci-après dans le cadre de l'aération par membrane.

5.2 Le modèle mathématique

Le modèle mathématique consiste à rechercher l'ensemble des équations décrivant les phénomènes de transfert et de réaction qui se déroule au sein et autour d'un biofilm, de les compiler en utilisant un logiciel adapté qui permettra d'obtenir une modélisation.

Syron and Casey, (2008) proposent une modélisation des flux d'oxygène et de glucose au sein d'un biofilm mono-espèce sur une membrane dense apportant de l'oxygène dans le contexte du traitement de l'eau. Ils procèdent de la façon suivante : (i) combinaison des équations de réaction et de diffusion des deux substrats, (ii) définition des conditions aux frontières, (iii) conversion des équations dimensionnelles en adimensionnelles et (iv) résolution à l'aide du logiciel Matlab. A l'aide de ces équations, ils peuvent ainsi déterminer dans quelle configuration se situe le bioréacteur, soit en double limitation, soit en limitation dû à la cinétique de croissance, soit en limitation de glucose ou d'oxygène.

L'avantage de cette méthode est qu'elle permet, une fois toutes les équations et constantes connues de procéder à différentes modélisations en fonction des paramètres que l'on rentre dans le logiciel. Le principal inconvénient est que les constantes ne sont pas toujours connues et doivent soit être obtenue par l'expérimentation soit estimées, ce qui réduit la fiabilité de la modélisation. Cette

méthode requiert également de bonnes connaissances mathématiques et informatiques.

5.3 La CFD (Computational Fluid Dynamic)

La CFD, de la même manière que le modèle mathématique, demande une connaissance approfondie des réactions et des équations de transfert du procédé étudié. La différence est la discrétisation du système sous forme d'une multitude de cellules (volumes de contrôles). A l'aide d'un logiciel, la concentration de chaque élément (oxygène, substrats, biomasse...) est calculée pour chaque région. Selon le modèle ainsi défini numériquement, toutes les concentrations sont connues en tout point du système modélisé, et cela au cours du temps. Plus les régions sont petites, plus le modèle sera précis mais plus la puissance informatique nécessaire sera importante.

Un exemple d'utilisation de la CFD est l'étude de Kavousi et al., (2016). Ils ont continué l'étude de Casey et al., (2000a) sur l'effet du débit de liquide dans le contexte de traitement des eaux par bioréacteur à contacteur membranaire. Ils ont étudié l'effet de la configuration géométrique de membranes à fibres creuses (espacement et nombre de fibres) sur les conditions hydrodynamiques et le transfert d'oxygène. La CFD a permis de modéliser les conditions d'écoulement et de transfert sur l'ensemble du module. Cette modélisation a été validée expérimentalement.

5.4 L'analyse dimensionnelle

Les méthodes numériques ne peuvent s'appliquer à tous les procédés car certains font appel à des équations trop complexes à résoudre ou trop gourmand en temps de calcul.

L'analyse dimensionnelle permet d'établir l'ensemble des nombres sans dimension gouvernant un phénomène. La collecte et l'analyse de données sous forme de nombres sans dimension permet (i) d'obtenir une relation de procédé liant directement les phénomènes physiques à l'effet étudié et (ii) d'obtenir une relation valable indépendamment de l'échelle d'étude. Cette méthode de modélisation a été largement décrite dans la littérature (Delaplace et al., 2015). Elle peut se présenter sous la forme de six étapes principales :

1. définir la ou les variable(s) cible(s),
2. lister toutes les grandeurs physiques indépendantes ayant une influence potentielle sur la variable cible,
3. déterminer les dimensions des grandeurs physiques,
4. appliquer le théorème de Vaschy-Buckingham¹ pour créer les nombres sans dimension,
5. réarranger les nombres sans dimension obtenus,
6. établir la relation de procédé à l'aide de données expérimentales.

Les étapes 1 à 3 demandent une réflexion approfondie sur le système pour choisir judicieusement la variable cible et trouver l'ensemble des paramètres physiques ayant un effet possible. La détermination des dimensions des grandeurs physiques consiste à les décomposer en dimensions fondamentales. Par exemple, une force ne sera pas présentée en Newton mais en Kilogramme.Mètre.Secunde⁻², l'objectif étant de n'utiliser que des dimensions fondamentales.

Les étapes 4 et 5 sont purement mathématiques et permettent d'obtenir des nombres sans dimension. Le réarrangement permet quant à lui de faire apparaître des nombres sans dimension déjà reconnu dans la communauté scientifique comme le nombre de Reynolds par exemple.

Enfin, l'étape 6 commence par le choix d'une forme mathématique permettant de décrire numériquement le phénomène physique. En fonction du phénomène étudié, une forme peut être plus adaptée qu'une autre. En l'absence de connaissance de la forme recherchée, la forme monomiale est la plus souvent utilisée car elle inclue le moins de coefficients. Ces coefficients seront ensuite calculés à l'aide d'un solveur pour obtenir la relation de procédé liant la variable cible adimensionnelle aux nombres sans dimension représentant des phénomènes physiques.

¹« Toute grandeur physique représentant un phénomène fonction de m grandeurs physiques indépendantes mesurées par n dimensions fondamentales peut être décrit par une fonction implicite entre $m-n$ nombres sans dimension »

Les nombres sans dimension sont au cœur de cette méthode. Certains sont systématiquement utilisés pour la description de phénomènes de transfert. Les principaux utilisés dans ce manuscrit sont décrits dans les paragraphes ci-après.

5.4.1 Le nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds (Re) est un nombre sans dimension qui décrit une mesure interne de flux de quantité de mouvement. Il compare le flux de quantité de mouvement (force d'inertie) dû à la convection à celui dû par la diffusion visqueuse (force visqueuse). Il permet ainsi de déterminer le régime d'écoulement d'un fluide. L'équation (I 5.1) présente la formule du nombre de Reynolds dans le cadre de l'écoulement dans une canalisation de section circulaire.

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d}{\mu} \quad (\text{I } 5.1)$$

$$v = \frac{4 \cdot Q_L}{\pi \cdot d^2} \quad (\text{I } 5.2)$$

Avec ρ la masse volumique du fluide, v la vitesse linéaire d'écoulement (équation (I 5.2)), d le diamètre de la conduite, μ la viscosité dynamique du fluide et Q_L le débit de liquide.

Le fluide peut s'écouler selon trois régimes différents (Figure 11) :

- en régime laminaire ($Re < 2000$), les forces visqueuses sont majoritaires et le liquide s'écoule sous forme de couches parallèles qui glissent les unes sur les autres dans la même direction. Il y a très peu de mélange et le profil de vitesse est parabolique avec une vitesse maximum au centre de la section,
- en régime transitoire ($2000 < Re < 3000$), les forces visqueuses et d'inertie sont présentes,
- en régime turbulent ($Re > 3000$), les forces d'inerties sont majoritaires et le liquide s'écoule de façon turbulente en se mélangeant tout au long de son trajet. Le profil de vitesse est uniforme sur toute la section.

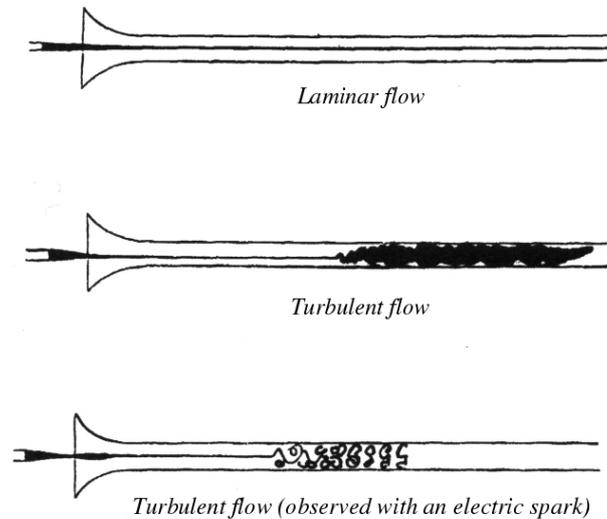


Figure 11 : Observation des turbulences par O. Reynolds en 1883

En régime laminaire, dans une conduite circulaire, la contrainte de cisaillement à la paroi τ_p peut se calculer selon l'équation (I 5.3) et s'exprime en Pascal (White, 2011).

$$\tau_p = \frac{8 \cdot v \cdot \mu}{d} \quad (I 5.3)$$

5.4.2 Le nombre de Sherwood

Le nombre de Sherwood (Sh) est un nombre sans dimension qui définit une mesure interne de flux de matière (équation (I 5.4)). Il compare les transferts dus aux phénomènes de convection à ceux de diffusion.

$$Sh = \frac{k \cdot d}{D} \quad (I 5.4)$$

Avec k le coefficient de transfert de masse et D le coefficient de diffusion.

Dans le cas d'un transfert à travers une membrane avec un côté gaz et un côté liquide, le coefficient de transfert k est noté k_L car la résistance principale se trouve côté liquide (voir chapitre § I 0). Le nombre de Sherwood, qui implique k ou k_L , permet de décrire le transfert de masse à travers une membrane. Ahmed et Semmens, 1992a proposent la relation suivante qui décrit le transfert d'oxygène à travers des fibres creuses fermées avec un flux de liquide à l'extérieur des fibres :

$$Sh = 0,143. Re^{0,83} \quad (I 5.5)$$

Ils précisent dans leurs travaux que la relation est dépendante de la pression de gaz et le volume de liquide n'a pas été varié durant l'étude.

5.4.3 Le nombre de Schmidt

Le nombre de Schmidt (Sc) est un nombre sans dimension qui décrit une mesure interne composite. Il compare les forces de diffusivité de quantité de mouvement et de diffusivité massique (équation (I 5.6)).

$$Sc = \frac{\mu}{\rho \cdot D} \quad (I 5.6)$$

Ce nombre apparaît régulièrement sous forme de constante avec un exposant fixé à 0,33 dans les équations de transfert d'oxygène à travers une membrane. Par exemple, Kavousi et al., 2016 ont récemment proposé une relation de la même forme que l'équation (I 5.5) pour décrire le transfert d'oxygène à travers une membrane dense avec le flux de liquide à l'extérieur des fibres, mais faisant intervenir le nombre de Schmidt :

$$Sh = 1,7. Re^{0,42}. Sc^{0,33} \quad (I 5.7)$$

6 Situation de travail et objectif de la thèse

Les biomolécules tels que les lipopeptides sont des solutions alternatives à l'utilisation de pesticides chimiques. Des études sont en cours pour continuer de découvrir de nouvelles molécules et surtout pour développer les moyens de production. En effet ces molécules sont produites à partir de micro-organismes. L'aération par bullage des bactéries est incompatible avec les propriétés tensioactives des lipopeptides à cause de la formation abondante de mousse. Des solutions alternatives sont recherchées partout dans le monde mais aussi de part et d'autre de la frontière Franco-Belge, notamment au sein de l'Institut Charles Viollette situé dans la région des Hauts-de-France. Une de ces solutions est l'utilisation de bioréacteurs aérés par contacteur membranaire. Ces derniers permettent de mettre en contact de part et d'autre d'une membrane à fibre creuse microporeuse le milieu de culture et l'air afin d'aérer le milieu sans mélange de phase. Ce procédé n'a encore été que peu étudié à ce jour. De plus amples connaissances sont nécessaires afin de pouvoir le transposer à une échelle industrielle.

La première étape de recherche sera la définition d'un système d'étude. Différents matériels étant disponible afin de réaliser un montage expérimental, une étude comparative sera menée afin de déterminer le choix le plus judicieux. De même, le choix de la souche bactérienne fera l'objet d'une recherche bibliographique approfondie et d'une culture comparative des souches présélectionnées.

Afin d'obtenir des résultats comparables, les conditions expérimentales de travail sont fixées en commun avec les différents partenaires de l'étude. La souche utilisée est ainsi la souche choisie à l'issue de l'étude comparative. La température de travail est fixée à 37°C. Le milieu de culture est également défini comme être un milieu de Landy optimisé.

Une fois le système complet défini, une première étude effectuera une analyse dimensionnelle couplée à un plan d'expériences pour modéliser le transfert d'oxygène dans un système sans micro-organismes. Pour cela différents paramètres seront étudiés : le flux de liquide dans les fibres, la pression de gaz à l'extérieur des fibres, la tension de surface et le volume de liquide dans la cuve.

Le système sera ensuite étudié avec micro-organismes et donc colonisation de la membrane par des bactéries adhérees sous forme de biofilm. Les données concernant le régime permanent seront étudiées et comparées aux résultats de la modélisation en eau. Une nouvelle modélisation sera proposée intégrant la partie biologique du système.

L'objectif de la thèse est donc de définir les conditions de culture optimales pour la production de lipopeptides dans un bioréacteur à biofilm aéré par contacteur membranaire via la modélisation du système. Cette modélisation à l'aide de l'analyse dimensionnelle permettra par la suite le dimensionnement des installations pour produire à plus grande échelle.

Chapitre II : MATÉRIELS et MÉTHODES

1 Les souches

Quatre souches différentes de la famille des *Bacillus subtilis* ont été utilisées au cours de ces travaux.

Les souches *Bacillus subtilis* ATCC 21332, ATCC 6633 et ATCC 9943 sont des souches répertoriées et disponibles dans la collection American Type Culture Collection. La souche *Bacillus subtilis* BBG131 modifiée génétiquement a également été utilisée. Ces souches produisent différents lipopeptides présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Présentation des lipopeptides produits par les souches *Bacillus subtilis* BBG131 ; ATCC21332, ATCC 6633 et ATCC 9943

	ATCC21332	ATCC6633	ATCC9943	BBG131
Surfactine	X	X	X	X
Fengycine			X	
Iturine		X	X	

La souche *Bacillus subtilis* BBG131 a été créée à partir de *Bacillus subtilis* 168, souche de référence dont le génome est séquencé depuis 1997 (Kunst et al., 1997) dans le but d'obtenir un mutant mono-producteur constitutif de surfactine. Dans un premier temps, la production fonctionnelle de lipopeptides a été rétablie par l'ajout du gène *sfp* provenant de la souche *Bacillus subtilis* ATCC21332, indispensable à la production de surfactine (Dohren, 1997). Un promoteur constitutif P_{repU} a ensuite été ajouté afin de s'affranchir des mécanismes de régulation de la production de lipopeptides. Enfin, la production de plipastatine, un autre lipopeptide, a été interrompue (Coutte, 2012) rendant la souche obtenue, BBG131, mono-productrice de surfactine. La souche initiale *Bacillus subtilis* 168 était déjà résistante au chloramphénicol et à la néomycine ainsi qu'auxotrophe en tryptophane, c'est-à-dire incapable d'en produire elle-même. L'ajout de tryptophane dans le milieu de culture est donc indispensable dans tous les milieux de culture pour obtenir une croissance. Les modifications génétiques supplémentaires apportées pour obtenir *Bacillus subtilis* BBG131 ont nécessité l'ajout d'un gène de résistance à la spectinomycine.

2 Les milieux

2.1 Solution de surfactine

Lors d'expérimentations pour l'étude du transfert d'oxygène à travers la membrane sur un modèle, une solution de surfactine est utilisée afin de tester l'impact de la tension de surface. La CMC de la surfactine a été mesurée à l'aide d'un tensiomètre Lauda TD1 (Lauda, Allemagne) et a été trouvée égale à $0,12 \text{ g.L}^{-1}$, en adéquation avec la bibliographie (Slivinski et al., 2012). Les concentrations de surfactine utilisées lors de notre étude ont varié de 0 à 1 g.L^{-1} de façon à se placer au-dessus et en-dessous de la CMC. La gamme de tension de surface correspondante varie de $0,072$ à $0,027 \text{ N.m}^{-1}$. L'ajout de surfactine n'influe pas significativement la densité et la viscosité de la solution dans la gamme de concentration étudiée. Zdziennicka et al., (2018) ont démontré que de 0 à 50 mg.dm^{-3} de surfactine dans de l'eau distillée, les variations de densité et de viscosité étaient inférieures à 2 % à 40°C . Seule la tension de surface est modifiée.

2.2 Le milieu de Landy

Le milieu de Landy est un milieu chimiquement défini avec comme source principale de carbone du glucose et comme source principale d'azote de l'acide glutamique, qui est également une source de carbone secondaire. Il est composé chimiquement selon la composition suivante : glucose, 20 g.L^{-1} ; acide glutamique, 5 g.L^{-1} ; extraits de levure 1 g.L^{-1} ; K_2HPO_4 , 1 g.L^{-1} ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; KCl , $0,5 \text{ g.L}^{-1}$; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $1,6 \text{ mg.L}^{-1}$; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $1,2 \text{ mg.L}^{-1}$; $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ (Landy et al., 1948). Du tryptophane à 16 mg.L^{-1} peut être ajouté dans le cas d'utilisation de micro-organismes auxotrophes de cet acide aminé. Le milieu de Landy est préparé à partir des solutions stocks concentrées 20 fois :

- glucose 400 g.L^{-1} stérilisé par autoclave (115°C , 30 min),
- acide glutamique 100 g.L^{-1} filtré sur membrane PES $0,2 \mu\text{m}$,
- solution A : extrait de levure 20 g.L^{-1} et $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 g.L^{-1} stérilisé par autoclave (121°C , 20 min),
- solution B contenant les sels de potassium K_2HPO_4 20 g.L^{-1} et KCl 10 g.L^{-1} stérilisé par autoclave (121°C , 20 min),

- solution C contenant les oligoéléments $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 32 mg.L^{-1} , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 24 mg.L^{-1} et $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 8 mg.L^{-1} stérilisé par autoclave (121°C , 20 min),
- tryptophane 320 mg.L^{-1} filtré sur membrane PES $0,2 \mu\text{m}$.

Après avoir reconstitué le milieu, le pH de ce dernier est ensuite ajusté à 7 par l'ajout d'acide phosphorique H_3PO_4 3 M ou d'hydroxyde de potassium KOH 3 M stériles. Dans le cas d'utilisation en culture en fiole, le pH peut être tamponné à l'aide d'une solution de 3-morpholinopropane-1-sulfonicacid (MOPS) 0,1 M filtré sur membrane PES $0,2 \mu\text{m}$.

2.3 Le milieu de Landy optimisé

Le milieu de Landy a été spécifiquement optimisé pour la production de surfactine par la souche *B. subtilis* BBG131 (Motta Dos Santos et al., 2016). Selon cette étude, seuls deux constituants influencent significativement la production du lipopeptide. Le milieu de Landy optimisé est donc identique que le milieu de Landy sauf pour la concentration en acide glutamique qui passe de 5 à $13,5 \text{ g.L}^{-1}$ et pour la concentration en tryptophane qui quadruple, passant de 16 à 64 mg.L^{-1} . Ces modifications ont permis de doubler la production de surfactine lors de cultures en microbioréacteur (culture de 1 mL) et en bioréacteur aéré par membrane.

2.4 Le milieu TSA

Le milieu TSA (Tryptone Soy Agar) a été utilisé pour la culture sur boîte lors de la revivification. Il est composé de tryptone 15 g.L^{-1} , de peptone de soja 5 g.L^{-1} , de NaCl 5 g.L^{-1} et d'agar bactériologique 15 g.L^{-1} .

Afin de sélectionner la souche BBG131, une solution de spectinomycine (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.) stérilisée par filtration à $0,2 \mu\text{m}$ à $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ est rajoutée au milieu TSA en surfusion avant de couler les boîtes de Petri.

2.5 Le milieu PBS

Le milieu PBS (phosphate-buffer saline = Tampon phosphate salin) est un milieu tampon de pH 7,4 utilisé pour le nettoyage, la dilution et la conservation de courte durée des suspensions bactériennes. Il est composé de 8 g.L^{-1} de NaCl, de $1,44 \text{ g.L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 , de $0,24 \text{ g.L}^{-1}$ de KH_2PO_4 et de $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ de KCl.

3 Cultures de *B. subtilis* en fioles d'Erlenmeyer

3.1 Conservation des souches

Les souches bactériennes sont conservées dans des cryotubes à billes à -80°C . Pour cela, les bactéries sont étalées en strie sur milieu TSA (additionné de spectinomycine pour *B. subtilis* BBG131) et incubées à 37°C pendant 24 h. Une colonie isolée est ensuite reprise et étalée sur milieu TSA et incubée 24 h à 37°C . La biomasse ainsi formée est récupérée stérilement à l'ose, introduite dans des cryotubes à billes (Technical service consultants, Ltd, Heywood UK). Après homogénéisation au vortex, le liquide de conservation est retiré stérilement à la pipette pour ne laisser que les billes. Les cryotubes à billes sont alors conservés à -20°C pour une utilisation régulière et à -80°C pour une conservation longue durée.

3.2 Préparation d'un inoculum

Les inocula sont préparés en étalant en strie une bille de cryotube sur TSA (additionné de spectinomycine pour *B. subtilis* BBG131) et en incubant 24 h à 37°C . Une colonie isolée est reprise et dissoute dans 10 mL de milieu de Landy tamponné avec du MOPS contenus dans une fiole d'Erlenmeyer de 100 mL. La préculture P1 ainsi formée est incubée à 37°C entre 12 et 16 h. La préculture P1 sert à ensemer une préculture P2 de 100 mL de milieu de Landy tamponné avec du MOPS contenus dans une fiole d'Erlenmeyer de 1 L à une $\text{DO}_{600\text{nm}}$ initiale de 0,2.

L'objectif étant d'ensemencer la culture finale avec une suspension de bactéries en phase exponentielle de croissance, la cinétique de croissance de *B. subtilis* BBG131 a été étudiée. Le taux de croissance népérien de *B. subtilis* BBG131 a été calculé en traçant le logarithme de l'absorbance à 600 nm (ou densité optique DO) en fonction du temps pendant la phase exponentielle d'une culture en fiole à 37°C . La pente de la courbe indique que le taux de croissance népérien maximal de *B. subtilis* BBG131 $\mu_{\text{max}}_{37^{\circ}\text{C}} = 0,33 \text{ h}^{-1}$. Cette mesure est cohérente avec la bibliographie (Burdett et al., 1986) qui trouvent un taux de croissance de $0,35 \text{ h}^{-1}$ pour la souche sauvage *B. subtilis* 168 à 35°C .

La préculture P2 est donc incubée à 37°C entre 12 et 16 h afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance.

3.3 Conditions de culture en fiole d'Erlenmeyer

Les cultures en fioles d'Erlenmeyer sont réalisées avec du milieu de Landy optimisé tamponné au MOPS à 37°C avec une agitation de 160 rpm (rotation par minute). L'inoculation se fait à partir de la préculture P2 de façon à obtenir une DO_{600nm} initiale de 0,2. La pureté des cultures est vérifiée régulièrement par isolement sur milieu gélosé TSA. Des prélèvements sont effectués stérilement tout au long de la croissance bactérienne afin de mesurer :

- la quantité de biomasse (DO),
- la quantité de sucre, métabolites primaires et lipopeptides en stockant l'échantillon à 4°C pour une analyse par CLHP.

4 Cultures de *B. subtilis* en bioréacteur aéré membrane

Les expériences en bioréacteur aéré par membrane ont été réalisées dans un premier temps sur trois dispositifs différents afin de sélectionner le plus performant pour notre étude. Les différents dispositifs et les membranes associées sont présentés ci-après.

4.1 Minibioréacteur 500 mL et membrane 24 cm²

Le premier consiste en un minibioréacteur (Applikon Biotechnology, Schiedam, Pays-Bas) de 500 mL de capacité constitué d'une cuve à fond bombé agité avec une pale Rushton. Le volume de milieu dans la cuve est de 200 mL sauf indication contraire. Une boucle externe de circulation permet l'aération à travers une membrane à fibres creuses microporeuses en polysulfone de 24 cm², contenant 4 fibres de 0,308 m de longueur, de diamètre interne 0,75 mm et des pores symétriques de 0,65 μm (CFP-6-D-MM01A, GE Healthcare, MA, USA). Cette membrane a été choisie pour se placer dans la continuité des travaux de Coutte, (2012) mais à plus petite échelle.

La thermorégulation de la cuve et le condenseur fonctionnent avec des systèmes Peltier. Les 4 pompes péristaltiques présentes sur les minibioréacteurs permettent (i) la régulation du pH par apport de NaOH 3 M, (ii) la mise en alimentation et soutirage continu du système et (iii) la mise en circulation du milieu à un débit Q_L variant de 2 à 20 mL.min⁻¹ dans la boucle externe d'aération sauf indication contraire. Au-delà de 20 mL.min⁻¹, l'interface d'échange n'était plus suffisamment stable pour éviter le passage d'une phase dans l'autre.

Les appareils de mesure disponibles sont des sondes de température, de pH (sonde 8 mm, Z001017080, Minibio 500, Applikon) et de l'absorbance à 600 nm (sonde 8 mm polarographique, Z010017080, MiniBio 500, Applikon), des balances et un analyseur de gaz séquentiel TANDEM Multiplex (Magellan Instruments, Hertfordshire, UK).



Figure 12 : Photo du montage d'un minibioreacteur 500 mL avec une membrane 24 cm²



Figure 13 : Photo d'une membrane de 24 cm² (CFP-6-D-MM01A, GE Healthcare, MA, USA)

4.2 Bioréacteur 5 L et membrane 2,5 m²

Le deuxième consiste en un bioréacteur (Applikon Biotechnology, Schiedam, Pays-Bas) de 5 L de capacité constitué d'une cuve à fond bombé agité avec une pale Rushton. Le volume dans la cuve est de 3 L. La membrane utilisée est à fibres creuses microporeuses en polysulfone de 2,5 m², contenant 1925 fibres de 0,673 m de longueur, de diamètre interne 0,75 mm et des pores de 0,65 µm (CFP-6-D-55A, GE Healthcare, MA, USA). Cette membrane est identique à celle utilisée dans les travaux de Coutte, (2012).

La thermorégulation de la cuve se fait par une enveloppe chauffante et un tube en U alimenté par de l'eau froide. Le condenseur fonctionne avec une circulation d'eau

froide en continue. Les 3 pompes péristaltiques présentes sur les bioréacteurs permettent la régulation du pH par apport de NaOH 3 M et la mise en alimentation et soutirage continu du système. La mise en circulation du milieu à un débit $Q_L = 3 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$ dans la boucle d'aération se fait à l'aide d'une pompe péristaltique externe.

Les appareils de mesure disponibles sont des sondes de température, de pH (sonde 12 mm, Z001023551, Applikon) et d'oxygène dissous (sonde 12 mm polarographique, Z010023525, Applikon), des balances et un analyseur de gaz séquentiel TANDEM Multiplex (Magellan Instruments, Hertfordshire, UK).



Figure 14 : Photo du montage d'un bioréacteur 5 L avec une membrane 2,5 m²



Figure 15 : Photo d'une membrane de 2,5 m² (CFP-6-D-55A, GE Healthcare, MA, USA)

4.3 Fiole 250 mL et membrane 24 cm²

Le dernier consiste en une fiole d'Erlenmeyer 250 mL placée dans une étuve sur un agitateur magnétique. Un bouchon en silicone percé de tubes en verre reliés à des tuyaux flexibles permet l'alimentation, le soutirage, la prise d'échantillons et la circulation dans la boucle d'aération. Le volume dans la fiole est de 100 mL. La membrane utilisée est celle de 24 cm², identique au montage des minibioréacteurs 500 mL. Il n'y a pas de condenseur. Une pompe péristaltique permet la mise en circulation dans la boucle d'aération et une seconde pompe péristaltique multicanaux permet la mise en continue du système (alimentation et retour). La régulation du pH se fait manuellement après la mesure du pH de chaque échantillon.

Les appareils de mesure disponibles sont une sonde de température ambiante (étuve) et un analyseur de gaz.



Figure 16 : Photo du montage d'une fiole 250 mL avec une membrane 24 cm²

4.4 Conditions de culture en continue en bioréacteur

La culture en bioréacteurs se fait avec du milieu de Landy optimisé à 37°C, pH 7 et avec une agitation de 150 rpm. Les sondes de pH sont calibrées avant stérilisation par autoclave (121°C, 20 min). Les sondes d'OD sont calibrées après autoclavage par bullage dans le milieu à 37°C jusqu'à stabilisation pour obtenir le 100 %. L'équilibre au niveau de l'interface d'échange dans la membrane se fait avant inoculation en réglant les restrictions placées en sortie de membrane côté air et côté liquide. Des manomètres analogiques permettent de régler la pression à la valeur désirée. Le milieu de culture circule à l'intérieur des fibres de la membrane et le gaz à l'extérieur. Les membranes ne sont pas fermées côté gaz afin d'éviter l'accumulation de vapeur d'eau côté gaz. Le gaz utilisé est de l'air comprimé sauf indication contraire. Le débit de gaz est réglé à $Q_G = 0,1 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ pour les membranes de 24 cm² (au minimum nécessaire pour l'analyseur de gaz) et à $Q_L = 3 \text{ L}\cdot\text{min}^{-1}$ pour la membrane de 2,5 m². Une voie de l'analyseur de gaz séquentiel est réservée pour avoir une valeur témoin en continue.

L'ensemencement se fait à une $DO_{600\text{nm}}$ de 0,2. La culture commence par une phase de batch qui dure 12 à 14 h pour laisser le temps aux bactéries de se développer et d'adhérer à la membrane. La mise en alimentation continue se fait ensuite en alimentant et en soutirant en milieu de culture à un débit identique, correspondant à un taux de dilution de 0,5 h⁻¹, afin de se placer en lessivage. Des échantillons sont prélevés stérilement régulièrement afin d'effectuer les mesures de DO, de lipopeptides, de glucose et de métabolites primaires. La culture se déroule ensuite pendant au minimum 54 h de continu.

4.5 Décrochage de la biomasse, lavage et stockage des membranes

Afin d'étudier la physiologie des cellules adhérentes, il est nécessaire de les décrocher en limitant le stress provoqué. En fin de manipulation, les membranes sont vidées afin de ne laisser que la biomasse adhérente. Le décrochage des cellules se fait manuellement en fermant les sorties air, en branchant deux seringues stériles de 3 mL (une vide et une contenant une solution stérile de PBS à 4°C) à chaque extrémité et en effectuant une série de mouvements de va-et-vient dans la membrane. L'absorbance à 600 nm et le volume de l'échantillon ainsi récupéré sont mesurés. Il est conservé à 4°C le temps du transport pour une analyse en cytométrie en flux.

Les membranes sont ensuite nettoyées à l'aide du protocole suivant issus des travaux de Coutte, (2012) et en accord avec les travaux de Chen et al., (2008) et Chen and Juang, (2008) :

- eau distillée, 50°C, 30 minutes pour décrocher la biomasse faiblement fixée (prise d'échantillon),
- NaOH 0,1 M, 50°C, 1 heure pour décrocher la biomasse fortement fixée et la majorité des lipopeptides (prise d'échantillon),
- NaOH 0,5 M, 50°C, 1 heure pour la régénération de la membrane,
- NaOCl 100 ppm, 50°C, 1 heure pour la régénération de la membrane,
- eau distillée jusqu'à un retour à pH 7.

Les échantillons récoltés sont centrifugés pendant 10 minutes à 10 000xg. Le surnageant est conservé à 4°C pour une analyse CLHP et le culot à -20°C pour une analyse de matière sèche.

Les membranes sont ensuite fermées et conservées à 4°C jusqu'à la prochaine utilisation.

5 Analyse dimensionnelle

L'analyse dimensionnelle n'a pu être appliquée qu'à l'étude du transfert de matière à travers la membrane sans prendre en compte l'impact d'un biofilm. En effet, la mise en place des expériences avec biofilm étant lourde, la quantité de données récupérées n'est pas suffisante pour pouvoir établir une relation de procédé. Cependant, les résultats de modélisation obtenus sans micro-organismes seront utilisés et comparés avec les résultats de fermentation pour mieux comprendre l'impact du biofilm sur le transfert d'oxygène.

La première étape d'une analyse dimensionnelle est le choix de la variable cible. Dans le cas d'un bioréacteur aéré par membrane, le choix s'est porté sur deux variables cibles décrivant chacune le transfert d'oxygène d'un point de vue différent : le k_L et le k_{La} .

La deuxième étape consiste à lister l'ensemble des grandeurs physiques impliquées dans un bioréacteur aéré par membrane fonctionnant en conditions isothermes. Cette liste a été réalisée avec la même méthode (Hassan et al., 2012). Cette liste peut se diviser selon les catégories suivantes :

- Conditions initiales et limites :
 - Cuve et agitation : V_L, d_t, d_i, C_b
 - Membrane : d_f, L, d_p, n
 - Autres paramètres géométriques : $\{p_{geo}\}_1, \{p_{geo}\}_2$
 - Champ de gravité : g
- Paramètres matières : $\rho_L, \mu_L, \rho_G, \mu_G, \sigma, D$
- Paramètres procédé : N, Q_G, Q_L, p_G

La liste complète des paramètres considérés dans l'analyse dimensionnelle est reprise dans l'équation (II 5.1).

$$k_L \text{ ou } k_{La} = f1_k \left(\rho_L, \mu_L, d_f, Q_L, V_L, p_G, \sigma, D, g, d_t, d_i, C_b, \{p_{geo}\}_1, \{p_{geo}\}_2, d_p, L, n, \rho_G, \mu_G, N, Q_G \right) \quad (\text{II 5.1})$$

Avec k un entier variant entre 1 et 2 selon le paramètre dimensionnel cible choisi (k_L ou k_{La} respectivement) et $f1_k$ une fonction mathématique.

L'étape 3 consiste à déterminer les dimensions des grandeurs physiques listées précédemment (équation (II 5.1)). Trois dimensions fondamentales sont nécessaires pour décrire l'ensemble des grandeurs physiques, une dimension de Longueur (L), une dimension de Masse (M) et une dimension de Temps (T).

La quatrième étape est l'application du théorème de Vaschy-Buckingham. Ainsi, les variables cibles choisies, fonctions de 21 grandeurs physiques indépendantes dépendantes de 3 dimensions fondamentales peuvent être décrites par 18 nombres sans dimension π_i . Pour établir les nombres sans dimension, il faut choisir une base d'adimensionnalisation (ici ρ_L, μ_L et d_f) composée de 3 grandeurs physiques répétées dimensionnellement indépendantes et dont les dimensions couvrent l'ensemble des dimensions fondamentales listées précédemment (L, M et T). Cette base constitue la matrice centrale du Tableau 2.

Comme indiqué dans le livre de (Delaplace et al., 2015), une fois les variables répétées sélectionnées, des opérations matricielles permettent d'obtenir les nombres sans dimension. La matrice centrale carrée notée \mathbf{C} est tout d'abord transformée en matrice identité notée \mathbf{C}_I , modifiant ainsi la matrice résiduelle notée \mathbf{R} (partie gris clair du Tableau 2) en \mathbf{R}_m (partie gris clair du Tableau 3) selon l'équation (II 5.2).

$$\mathbf{R}_m = \mathbf{C}^{-1} \times \mathbf{R} \quad (\text{II 5.2})$$

Les nombres sans dimension caractérisant le phénomène physique sont déduit des coefficients contenus dans la matrice résiduelle modifiée et présentés dans l'équation (II 5.3).

Tableau 2 : Matrice aux dimensions des grandeurs physiques. La matrice centrale apparait en gris foncé et la matrice résiduelle en gris clair

	ρ_L	μ_L	d_f	k_L	$k_L a$	Q_L	V_L	P_G	σ	D	g	d_i	d_t	C_b	$\{p_{geo}\}_1$	$\{p_{geo}\}_2$	d_p	L	n	ρ_G	μ_G	N	Q_G
Masse, M	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Longueur, L	-3	-1	1	1	0	3	3	-1	0	2	1	1	1	1	0	1	1	1	0	-3	-1	0	3
Temps, T	0	-1	0	-1	-1	-1	0	-2	-2	-1	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-1	-1	-1

Tableau 3 : Matrice résiduelle modifiée (en gris clair) obtenue après transformation de la matrice centrale (gris foncé) en matrice identité

	ρ_L	μ_L	d_f	k_L	$k_L a$	Q_L	V_L	P_G	σ	D	g	d_i	d_t	C_b	$\{p_{geo}\}_1$	$\{p_{geo}\}_2$	d_p	L	n	ρ_G	μ_G	N	Q_G
Masse, M	1	0	0	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	-1	-1
Longueur, L	0	1	0	1	1	1	0	2	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
Temps, T	0	0	1	-1	-2	1	3	-2	-1	0	-3	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	-2	1

$$k_L \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f}{\mu_L} \text{ ou } k_L a \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L} = f2_k \left(\begin{array}{l} Q_L \cdot \frac{\rho_L}{\mu_L \cdot d_f}; \frac{V_L}{d_f^3}; p_G \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L^2}; \sigma \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f}{\mu_L^2}; D \cdot \frac{\rho_L}{\mu_L}; g \cdot \frac{\rho_L^2 \cdot d_f^3}{\mu_L^2}; \frac{d_i}{d_f}; \frac{d_t}{d_f}; \\ \frac{C_b}{d_f}; \{p_{geo}\}_1; \frac{\{p_{geo}\}_2}{d_f}; \frac{d_p}{d_f}; \frac{L}{d_f}; n; \frac{\rho_G}{\rho_L}; \frac{\mu_G}{\mu_L}; N \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L}; Q_G \cdot \frac{\rho_L}{\mu_L \cdot d_f} \end{array} \right) \quad (II.5.3)$$

Avec $f2_k$ une fonction mathématique

$$\pi_{cible 1} = Sh = \frac{k_L \cdot d_f}{D} \text{ ou } \pi_{cible 2} = k_L a^* = k_L a \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L}$$

$$= f_{3k} \left(\begin{array}{l} \pi_1 = Re = Q_L \cdot \frac{4 \cdot \rho_L}{\mu_L \cdot d_f \cdot \pi \cdot n}, \pi_2 = V_L^* = \frac{V_L}{d_f^3}, \pi_3 = p_G^* = p_G \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L^2}, \pi_4 = \sigma^* = \sigma \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f}{\mu_L^2}, \pi_5 = Sc = \frac{\mu_L}{D \cdot \rho_L}; \\ \pi_6 = g \cdot \frac{\rho_L^2 \cdot d_f^3}{\mu_L^2}; \pi_7 = \frac{d_i}{d_f}; \pi_8 = \frac{d_t}{d_f}; \pi_9 = \frac{C_b}{d_f}; \pi_{10} = \{p_{geo}\}_1; \pi_{11} = \frac{\{p_{geo}\}_2}{d_f}; \pi_{12} = \frac{d_p}{d_f}; \pi_{13} = S^* = n \frac{L}{d_f}; \\ \pi_{14} = n; \pi_{15} = \frac{\rho_G}{\rho_L}; \pi_{16} = \frac{\mu_G}{\mu_L}; \pi_{17} = N \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L}; \pi_{18} = Q_G \cdot \frac{\rho_L}{\mu_L \cdot d_f} \end{array} \right) \quad (II 5.4)$$

Avec f_{3k} une fonction mathématique

Après réarrangement des nombres sans dimension initialement obtenus, l'équation (II 5.3) peut être réécrite (équation (II 5.4)) pour former certains nombres sans dimension connus dont la signification physique est déjà établie.

Les nombres sans dimension classiquement utilisés pour décrire un phénomène d'écoulement dans une canalisation sont le nombre de Sherwood, le nombre de Reynolds et le nombre de Schmidt (Wickramasinghe et al., 1992). Il est important de préciser que dans le cas d'un bioréacteur à membrane, deux types d'écoulements peuvent être rencontrés : dans le réacteur et dans la membrane. Le nombre de Reynolds retenu dans ces travaux de recherche est celui caractérisant le régime d'écoulement dans la membrane, là où se situe le transfert d'oxygène. Même s'il n'est pas utilisé ici, le nombre de Reynolds caractérisant l'écoulement dans le réacteur apparaît parmi les nombres sans dimension de l'équation (II 5.4) (π_{17}).

Le programme expérimental de ces travaux sans micro-organismes se base sur un système unique de réacteur aéré par membrane ainsi qu'une unique phase gazeuse. La vitesse d'agitation N est fixée à 150 rpm et le flux de gaz à 250 mL.min⁻¹. Certains nombres sans dimension sont donc restés inchangés (π_5 à π_{18}). Leur influence sur les variables cibles n'a donc pas pu être quantifiée.

L'application de l'analyse dimensionnelle au système étudié permet de définir quatre nombres sans dimension qui gouvernent l'évolution des variables cibles adimensionnelles (Sh ou $k_L a^*$) repris dans l'équation (II 5.5).

$$Sh \text{ ou } k_L a^* = F_k \left(\begin{array}{l} \pi_1 = Re = Q_L \cdot \frac{4 \cdot \rho_L}{\mu_L \cdot d_f \cdot \pi \cdot n}, \pi_2 = V_L^* = \frac{V_L}{d_f^3}, \\ \pi_3 = p_G^* = p_G \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f^2}{\mu_L^2}, \pi_4 = \sigma^* = \sigma \cdot \frac{\rho_L \cdot d_f}{\mu_L^2} \end{array} \right) \quad (\text{II 5.5})$$

Avec F_k une fonction mathématique dépendante du nombre sans dimension cible.

Ces quatre nombres sans dimension sont indépendants les uns des autres et représentent les mesures internes de quatre grandeurs physiques dimensionnelles indépendantes (Q_L, V_L, p_G, σ).

6 Plan d'expériences

La méthode des plans d'expériences permet de minimiser le nombre d'expériences nécessaire pour déterminer les facteurs significativement influents sur une variable cible et obtenir une première équation de modélisation.

Cette méthode nécessite de tester l'effet de plusieurs facteurs en même temps. Les résultats sont exploités en fonction de l'écart-type moyen des résultats. Utiliser cette méthode sur des expériences faisant intervenir des micro-organismes s'avérait risqué car une trop grande variation des résultats aurait rendu l'ensemble de l'étude inexploitable. Il a donc été décidé de n'appliquer cette méthode qu'à l'analyse du transfert d'oxygène dans le système sans micro-organisme.

L'objectif a été d'appliquer le plan d'expériences en utilisant en tant que facteurs et réponses les nombres sans dimension issus de l'analyse dimensionnelle pour minimiser le nombre d'expériences nécessaires à l'obtention d'une relation de procédé. Pour cela, un plan d'expériences fractionnaire 2^{4-1} avec quatre facteurs $(\pi_1, \pi_2, \pi_3, \pi_4)$ et deux niveaux a été utilisé (bas noté $X_i=-1$ et haut noté $X_i=+1$). Ces quatre facteurs ont été transformés en variables centrées réduites (X_1, X_2, X_3, X_4) en utilisant l'équation

$$X_i = 2 \frac{\pi_i - \pi_{i0}}{\Delta \pi_i} \quad (\text{II 6.1})$$

Avec X_i la variable centrée réduite du facteur i , π_i le facteur adimensionnel i (indiqués dans l'équation (II 5.5) et le tableau). π_{i0} est la valeur du nombre adimensionnel i au point central et $\Delta \pi_i$ est le pas défini par la formule $\Delta \pi_i = \pi_i^{+1} - \pi_i^{-1}$.

Les valeurs + et - de σ^* (aussi appelé π_4 , correspondant à la tension de surface adimensionnelle) dans le Tableau 4 ont été volontairement inversées pour faire correspondre le - à l'eau pure et le + à l'ajout de tensioactif ayant pour effet une diminution de la tension de surface. Il a été supposé que le facteur π_4 aurait un effet binaire correspondant à la présence (en saturation) ou à l'absence de tensioactif adhérent à la surface de la membrane.

Tableau 4 : Variables, facteurs et niveaux utilisés dans le plan d'expériences fractionnaire

Variables		Niveaux			
		Valeurs dimensionnelles		Valeurs adimensionnelles	
		-1	+1	-1	+1
X_1	$\pi_1 = Re$ Nombre de Reynolds	$3.3 \cdot 10^{-8}$ $m^3 \cdot s^{-1}$	$10^{-7} m^3 \cdot s^{-1}$	11	33
X_2	$\pi_2 = V_L^*$ Volume de liquide adimensionnel	0,150 L	0,450 L	$3.6 \cdot 10^5$	$10.7 \cdot 10^5$
X_3	$\pi_3 = p_G^*$ Pression de gaz adimensionnelle	$5 \cdot 10^4$ Pa	10^5 Pa	$2.8 \cdot 10^7$	$5.6 \cdot 10^7$
X_4	$\pi_4 = \sigma^*$ Tension de surface adimensionnelle	$70 mN \cdot m^{-1}$	$27 mN \cdot m^{-1}$	$5.2 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^4$

L'avantage d'utiliser un plan d'expériences fractionnaire est la réduction conséquente du nombre d'expériences en sélectionnant une fraction des expériences d'un plan d'expériences complet. Pour cela, il est supposé qu'une interaction entre plusieurs facteurs peut être remplacée par une aliase. L'aliase détermine quels effets seront confondus (Box et al., 2005; Dali Youcef et al., 2017; Net et al., 2014). Ici l'interaction de degré 3 ($X_1X_2X_3$) supposée négligeable (Montgomery, 2013; Pierlot et al., 2008) est choisie comme aliase et remplacée par une quatrième variable X_4 (Tableau 5).

Tableau 5 : Expériences du plan d'expériences fractionnaire avec Re : nombre de Reynolds, V_L^* le volume de liquide adimensionnel, p_G^* la pression de gaz adimensionnelle et σ^* la tension de surface adimensionnelle

Expériences	$X_1: Re$	$X_2: V_L^*$	$X_3: p_G^*$	$X_1X_2X_3$	$X_4:$ $= \sigma^*$	X_1X_2 $= X_3X_4$	X_1X_3 $= X_2X_4$	X_1X_4 $= X_2X_3$
1	-	-	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	-	-	+
3	-	+	-	+	+	-	+	-
4	+	+	-	-	-	+	-	-
5	-	-	+	+	+	+	-	-
6	+	-	+	-	-	-	+	-
7	-	+	+	-	-	-	-	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+

La présence d'un facteur binaire (σ^*) rend impossible la comparaison avec un point central. Les points centraux ont donc été remplacés par la duplication de chaque expérience.

6.1 Modélisations

La méthode classique de multi-régression associée à un plan fractionnaire 2^{4-1} permet d'obtenir un modèle décrivant l'évolution de π_{cible} à l'aide de variables centrées réduites comme indiqué dans l'équation (II 6.2).

$$\pi_{cible} = A + \sum_{i=1}^4 \alpha_i X_i + \sum_{i,j=1}^4 \alpha_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (\text{II 6.2})$$

Avec π_{cible} la variable adimensionnelle cible, soit Sh ou $k_L a^*$.

A , α_i et α_{ij} sont respectivement une constante et les effets des variables centrées réduites et des interactions, calculés avec une régression des moindres carrés sur les données expérimentales. ε est une erreur négligeable correspondant aux interactions de 3 variables ou plus.

Les données expérimentales ont été traitées à l'aide du logiciel Modde Pro 12 (Umetrics, Umea, Sweden) pour obtenir les effets et les informations statistiques (Q^2

and R^2) indiquant la robustesse du plan d'expériences. Q^2 montre une estimation de la précision de la prédiction et devrait être supérieur à 0,5 pour proposer une prédiction précise. R^2 estime la proportion de variation entre les données expérimentales et les prédictions et varie entre 0 et 1, 1 étant une prédiction parfaite.

6.1.1 Forme polynomiale

En introduisant l'équation (II 6.1) dans l'équation (II 6.2), les variables centrées réduites sont transformées en facteurs (II 6.3) et après réarrangement, une relation de procédé liant les facteurs adimensionnels π_i aux variables cibles π_{cible} est obtenue (II 6.4).

$$\pi_{target} = A + \sum_{i=1}^4 \frac{\alpha_i}{\Delta\pi_i} (\pi_i - \pi_{i0}) + \sum_{i,j=1}^4 \frac{\alpha_{ij}}{\Delta\pi_i \cdot \Delta\pi_j} (\pi_i - \pi_{i0})(\pi_j - \pi_{j0}) + \varepsilon \quad (\text{II 6.3})$$

$$\pi_{target} = A' + \sum_{i=1}^4 \frac{\alpha_i}{\Delta\pi_i} \pi_i + \sum_{i,j=1}^4 \frac{\alpha_{ij}}{\Delta\pi_i \cdot \Delta\pi_j} (\pi_i \pi_j - \pi_i \pi_{j0} - \pi_j \pi_{i0}) \quad (\text{II 6.4})$$

Où $A' = A - \sum_{i=1}^4 \frac{\alpha_i}{\Delta\pi_i} \pi_{i0} + \sum_{i,j=1}^4 \frac{\alpha_{ij}}{\Delta\pi_i \cdot \Delta\pi_j} \pi_{i0} \pi_{j0} + \varepsilon$ est un terme constant dans lequel l'erreur négligeable ε est incluse.

6.1.2 Forme monomiale

Comme expliqué précédemment, l'utilisation d'un plan d'expérience mène traditionnellement à une modélisation sous forme polynomiale (II 6.4) entre variables cibles et facteurs. Cette forme mathématique de l'équation n'est pas la plus couramment utilisée en transfert de matière ou en chimie. Les formes monomiales telles que l'équation (II 6.5) sont plus souvent rencontrées pour décrire des phénomènes sous forme de relation de procédé.

$$\pi_{cible} = E \cdot \prod_{i=1}^4 (\pi_i)^{\gamma_i} \quad (\text{II 6.5})$$

Avec E une constante et γ_i le coefficient à l'exposant.

Afin d'obtenir cette forme mathématique, les résultats du plan d'expériences ont été reconsidérés sous forme de $\ln(\pi_{cible})$ et $\ln(\pi_i)$ au lieu de respectivement π_{cible} comme réponses et π_i comme facteurs.

Dans ce cas, l'équation (II 6.2) est transformée en équation (II 6.6). La même méthodologie a été appliquée pour transformer les variables centrées réduites en facteurs (équations (II 6.7) à (II 6.9)).

$$\ln(\pi_{cible}) = \ln(B) + \sum_{i=1}^4 \beta_i \ln(X_i) + \sum_{i,j=1}^4 \beta_{ij} \ln(X_i) \ln(X_j) + \varepsilon \quad (\text{II 6.6})$$

$$\begin{aligned} \ln(\pi_{cible}) = \ln(B) + \sum_{i=1}^4 \frac{\beta_i}{\Delta \ln(\pi_i)} (\ln(\pi_i) - \ln(\pi_{i0})) \\ + \sum_{i,j=1}^4 \frac{\beta_{ij}}{\Delta \ln(\pi_i) \cdot \Delta \ln(\pi_j)} (\ln(\pi_i) - \ln(\pi_{i0})) (\ln(\pi_j) - \ln(\pi_{j0})) \end{aligned} \quad (\text{II 6.7})$$

$$\begin{aligned} + \ln(\exp(\varepsilon)) \\ \pi_{cible} = B \cdot \prod_{i=1}^4 \left(\frac{\pi_i}{\pi_{i0}} \right)^{\frac{\beta_i}{\Delta \ln(\pi_i)}} \\ \cdot \prod_{i,j=1}^4 \exp \left[\frac{\beta_{ij}}{\Delta \ln(\pi_i) \cdot \Delta \ln(\pi_j)} \cdot \ln \left(\frac{\pi_i}{\pi_{i0}} \right) \cdot \ln \left(\frac{\pi_j}{\pi_{j0}} \right) \right] \cdot \exp(\varepsilon) \end{aligned} \quad (\text{II 6.8})$$

$$\pi_{cible} = B' \cdot \prod_{i=1}^4 (\pi_i)^{\frac{\beta_i}{\Delta \ln(\pi_i)}} \prod_{i,j=1}^4 \exp \left[\frac{\beta_{ij}}{\Delta \ln(\pi_i) \cdot \Delta \ln(\pi_j)} \cdot \ln \left(\frac{\pi_i}{\pi_{i0}} \right) \cdot \ln \left(\frac{\pi_j}{\pi_{j0}} \right) \right] \quad (\text{II 6.9})$$

Avec

$$B' = B \cdot \prod_{i=1}^4 (\pi_{i0})^{-\frac{\beta_i}{\Delta \ln(\pi_i)}} \cdot \exp(\varepsilon) \quad (\text{II 6.10})$$

Dans l'équation (II 6.10), B' est aussi une constante incluant l'erreur négligeable ε . β_i et β_{ij} sont respectivement les effets des variables et interactions qui ont été calculés avec la méthode des moindres carrés sur les données expérimentales.

6.2 Expériences supplémentaires et optimisation de la relation de procédé

Les expériences supplémentaires ont été réalisées pour (i) consolider la relation de procédé obtenue par le plan d'expériences fractionnaire et (ii) pour élargir le domaine de validité de l'équation finale modélisant le transfert d'oxygène. Ces expériences ont été menées en ne faisant varier qu'un paramètre à la fois et en gardant fixe les autres.

L'ensemble des résultats (plan d'expériences + expériences supplémentaires) a été analysé à l'aide du solveur de Microsoft Excel 2016 pour obtenir à la fois une relation monomiale et une relation polynomiale décrivant l'évolution des données expérimentales π_{cible} en fonction des nombres sans dimension obtenus dans le chapitre § II 5.

Les coefficients de la relation de procédé optimisé ont été obtenus en minimisant l'écart type moyen (MSD) (équation (II 6.11)) comme proposé dans la publication de (Hassan et al., 2012).

$$MSD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n abs\left(\frac{Y_{i\ predicted} - Y_{i\ exp}}{Y_{i\ exp}}\right) \quad (II\ 6.11)$$

Avec n le nombre d'expériences, $Y_{i\ predicted}$ les valeurs prédites et $Y_{i\ exp}$ les valeurs expérimentales.

7 Analyses

7.1 Mesure de la biomasse

La mesure de la biomasse peut se faire selon deux méthodes : la mesure de l'absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre SECOMAN Prime (SECOMAN, Domont, France) et la mesure de la matière sèche. La matière sèche se mesure à partir du culot d'un échantillon centrifugé 10 minutes à 10 000xg. Il est repris dans 10 mL d'eau distillée, homogénéisé au vortex et centrifugé pendant 10 minutes à 10 000xg afin de retirer les éléments du milieu de culture. A cette étape, le culot peut être conservé à -20°C. Pour l'analyse, le culot est repris dans 5 mL d'eau distillée, homogénéisé au vortex et disposé dans une coupelle aluminium préalablement pesée après 48 h à 105°C. Cette coupelle est placée 48 h (temps suffisant pour évaporer la totalité de l'eau de l'échantillon) à 105°C puis pesée sur une balance de précision afin d'obtenir la quantité de matière sèche.

Les mesures de biomasse sur les échantillons de culture se font avec un spectrophotomètre et sont ensuite converties en une concentration en matière sèche. Pour cela, une culture témoin de *B. subtilis* BBG131 a été réalisée et pour chaque échantillon, l'absorbance à 600 nm et la matière sèche ont été mesurées.

Les résultats ont montré que le facteur de conversion entre l'absorbance à 600 nm et la concentration en matière sèche (en g M.S..L⁻¹) est de 4,9 ±0,3. Les mesures de biomasse sur les échantillons issus du lavage des membranes se font directement en matière sèche.

7.2 Dosage des lipopeptides par CLHP

La chromatographie liquide haute performance (CLHP) est une méthode de séparation dont le principe consiste à séparer des molécules selon leurs propriétés hydrophobes, ioniques ou encore d'exclusion stérique avec une membrane adaptée. Le couplage de cette méthode à un système de détection rend cet outil à la fois polyvalent et spécifique.

Les échantillons sont filtrés sur membrane 0,2 µm en acétate de cellulose avant d'être injectés dans un système ACQUITY UPLC (Ultra Performance Liquid

Chromatography) (WATERS, Milford, MA, USA). La phase fixe utilisée est une colonne C18 (Oligonucléotide BEH C18, WATERS, Milford, MA, U.S.A.) de 2,1 mm de diamètre et de 50 mm de longueur. Les phases mobiles utilisées sont : (A) de l'eau ultra-pure additionnée de 0,1 % (V/V) de TFA (Acide TriFluoroAcétique) et (B) de l'acétonitrile additionnée de 0,1 % (V/V) de TFA. Un injecteur automatique (WATERS, Milford, MA, U.S.A.) envoie 10 μ L d'échantillon avec un débit de phase mobile de 0,6 mL.min⁻¹. Les proportions des phases mobiles sont réparties selon le programme suivant pour la surfactine :

- gradient (A/B) de (55/45) à (20/80) pendant 7 minutes,
- isocratique (A/B) de (20/80) pendant 5 minutes,
- isocratique (A/B) de (0/100) pendant 2 minutes,
- isocratique (A/B) de (55/45) pendant 5 minutes.

Le programme de détection de la fengycine et des iturines est identique à celui des travaux de Coutte, (2012).

Après avoir été séparés par la colonne, les constituants de l'échantillon sont analysés avec un détecteur à barrette de diodes (WATERS, Milford, MA, USA) permettant de collecter la fluorescence sur une large gamme de longueurs d'ondes (190 à 500 nm). Les résultats sont confrontés à un standard de surfactine à 500 mg.L⁻¹ (Sigma, St Louis, MO, U.S.A.). L'analyse de la fluorescence à 280 nm et de la dérivée seconde des spectres à l'aide du logiciel Empower permet d'identifier les différents lipopeptides.

7.3 Dosage du glucose et des métabolites primaires par CLHP

Le glucose, principal substrat carboné, ainsi que l'acide lactique, l'acide acétique et le 2,3-butanediol, métabolites secondaires, sont analysés par CLHP. Les échantillons sont filtrés sur membrane 0,2 μ m en acétate de cellulose avant d'être injectés dans un système CLHP (WATERS, Milford, MA, USA). La phase fixe utilisée est une colonne échangeuse d'ion (Fast Fruit Juice, WATERS, Milford, MA, U.S.A.) de 7,8 m de diamètre et de 150 mm de longueur. La phase mobile utilisée est de l'eau ultra-pure additionnée de 0,347 % (V/V) d'acide phosphorique. Un injecteur automatique (717 plus autosampler, WATERS, Milford, MA, U.S.A.) envoie 20 μ L d'échantillon avec un débit de phase mobile de 0,8 mL.min⁻¹ à 55°C. Les constituants de l'échantillon sont analysés avec un réfractomètre (410 Differential Refractometer, WATERS, Milford,

MA, USA). Les chromatogrammes sont analysés à l'aide du logiciel Empower pour qualification et quantification. Les résultats sont rapportés à une gamme étalon pour chaque composé.

7.4 Analyse du métabolisme cellulaire par cytométrie en flux

7.4.1 Principe et protocole de traitement des échantillons

La cytométrie en flux consiste à analyser une population de micro-organismes individu par individu. Dans un premier temps, il est possible de déterminer la taille moyenne et l'homogénéité de l'échantillon. Cette analyse peut être complétée par le marquage des cellules à l'aide de sondes. Une sonde est une molécule capable de se fixer spécifiquement et d'émettre un rayonnement lorsqu'elle est excitée. Ainsi, avec un laser de longueur d'onde spécifique, il est possible d'exciter ces molécules et de lire leur émission de lumière à l'aide d'un détecteur approprié (Infrarouge, visible, ultraviolet). Il existe de très nombreuses sondes permettant d'étudier un large spectre de paramètres tels que la viabilité, la vitalité ou encore l'activité respiratoire.

Le *BacLight™ RedoxSensor™ Green Vitality Kit* (Invitrogen Molecular Probes, USA) permet de marquer spécifiquement les réactions de réduction qui se déroulent dans une cellule. La présence de telles réactions indique une activité respiratoire de la cellule car elles sont impliquées dans la chaîne de transport d'électrons, l'anabolisme et le catabolisme cellulaire. Plus le signal fluorescent est fort à 520 nm, plus l'activité respiratoire est importante. Le signal peut être bloqué à l'aide de carbonyl cyanide 3-chlorophénylhydrazone (CCCP) et permet ainsi de distinguer la fluorescence du RSG dans des cellules ayant un métabolisme actif ou passif.

Les échantillons sont conservés à 4°C et sont analysés rapidement après la récolte. Les suspensions bactériennes sont homogénéisées pour obtenir des concentrations cellulaires de même ordre de grandeur pour chaque échantillon, soit environ 10^6 cellules.mL⁻¹ en diluant dans une solution de PBS. L'absence d'amas dans les échantillons de biofilm a été vérifiée (chapitre § II 7.4.2.1). Après homogénéisation au vortex, 500 mL de chaque échantillon sont introduits dans 3 tubes qui seront préparés comme suit :

- un tube témoin,

- un tube de contrôle additionné de 4 μL de CCCP (incubé 5 minutes à température ambiante) puis de 1 μL de RSG (incubé 15 minutes à 37°C dans le noir),
- un tube de mesure additionné de 1 μL de RSG (incubé 15 minutes à 37°C dans le noir).

Les concentrations en réactifs ont été choisies à la suite d'une série d'essais déterminant les concentrations menant aux résultats les plus discriminatifs (chapitre § II 7.4.2.2).

Les tubes sont ensuite introduits dans le cytomètre à flux CYAN ADP (Beckman Coulter, Brea, Californie, U.S.A.). Seul le laser Argon-ion de 488 nm sera utilisé et les longueurs d'ondes 530/30 seront collectées pour la fluorescence de la sonde RSG. Les résultats sont analysés avec le logiciel Kaluza V1.8.

7.4.2 Validation de la méthode

La méthode d'analyse par cytométrie en flux a été validée avec des échantillons de biofilm issus de culture en bioréacteur aéré par membrane. Elle servira principalement à caractériser l'activité respiratoire de la biomasse planctonique et sessile se développant sur la membrane.

7.4.2.1 Vérification de la présence d'amas dans les échantillons de biofilm

Dans un premier temps l'absence d'amas dans les échantillons de biofilm a été vérifié. La présence d'amas est incompatible avec la technique de cytométrie en flux qui permet d'analyser les cellules une à une à l'aide de lasers dans un capillaire extrêmement fin. L'opération de décrochage qui permet d'obtenir les échantillons de biofilm peut ne pas suffire à désagréger les amas ce qui pourrait non seulement fausser les mesures mais également endommager l'appareil.

La vérification s'effectue en comparant deux échantillons de biofilms dont l'un a subi une sonication et l'autre non (Figure 17).

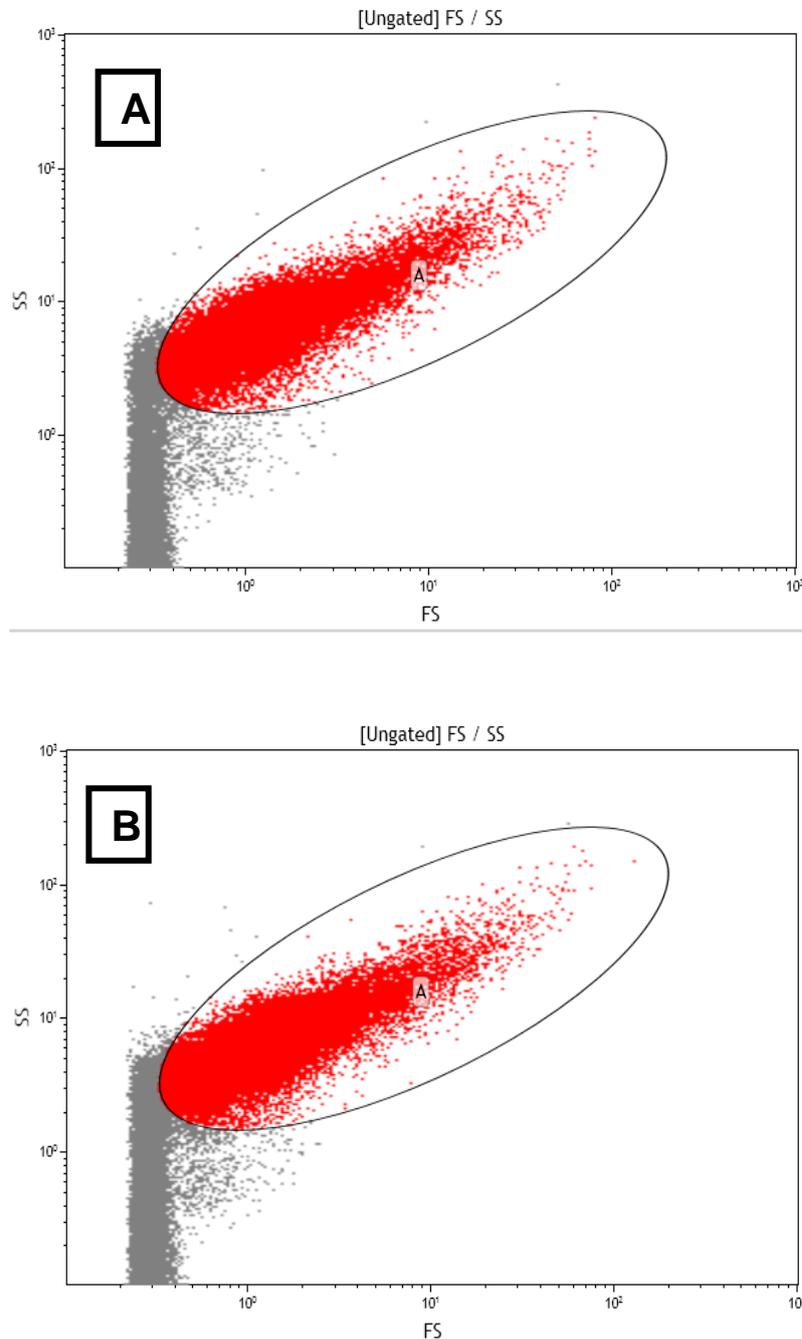


Figure 17 : Comparaison de deux échantillons de biofilm avec sonication (A) et sans sonication (B) après analyse par cytométrie en flux

La comparaison des échantillons se fait à l'aide de graphiques FS/SS (soit taille (Forward Scatter FS) / granulométrie (Side Scatter SS)) permettant d'observer l'hétérogénéité d'une population. La sonication n'a aucun impact sur la forme des

événements observés par cytométrie. Elle n'est donc pas nécessaire pour analyser les échantillons de biofilm par cytométrie.

Cette représentation graphique permet également de sélectionner la population de cellules à prendre en compte (en rouge sur la Figure 17) pour les futures analyses. L'ensemble des événements détectés par le cytomètre ayant une taille faible et représentés sur la Figure 17 en gris ne sont que des débris cellulaires.

7.4.2.2 Validation des résultats à l'aide de CCCP

Les résultats de cytométrie en flux sont présentés en fonction de la quantité d'évènement pour chaque intensité. Le pic gris de la Figure 18 représente l'auto-fluorescence des cellules, c'est-à-dire la fluorescence sans marquage avec la sonde RSG.

Lors de l'ajout de la sonde RSG, l'intensité de la fluorescence augmente proportionnellement à l'activité respiratoire comme le montre le pic rouge de la Figure 18 où la population bactérienne en phase exponentielle a été mise en contact avec du RSG.

Afin de distinguer les bactéries ayant un potentiel d'oxydo-réduction élevé de celle ayant un potentiel faible, du CCCP est ajouté en plus du RSG. Le CCCP est un réactif bloquant la chaîne de transmission d'électrons. Les échantillons traités au CCCP et au RSG seront donc beaucoup moins fluorescents en fonction de la quantité de CCCP ajouté (pics vert pour 4 μ L et bleu pour 2 μ L de la Figure 18) que les échantillons traités seulement au RSG (pic rouge de la Figure 18).

La concentration idéale en CCCP permettant d'observer un décalage total de la population sans recouvrement des pics a été déterminée comme le double de celle recommandée dans le protocole du kit *BacLight*TM *RedoxSensor*TM, soit 4 μ L par tube de 500 μ L. Ce décalage permet de démarquer les cellules ayant une fluorescence forte notées « *pot high* » des cellules avec un potentiel faible notées « *pot low* » (Figure 18).

Les résultats avec CCCP ne sont pas présentés par la suite mais seulement la fluorescence de la sonde RSG et la séparations « *pot low* » et « *pot high* » qui découle de ces tests.

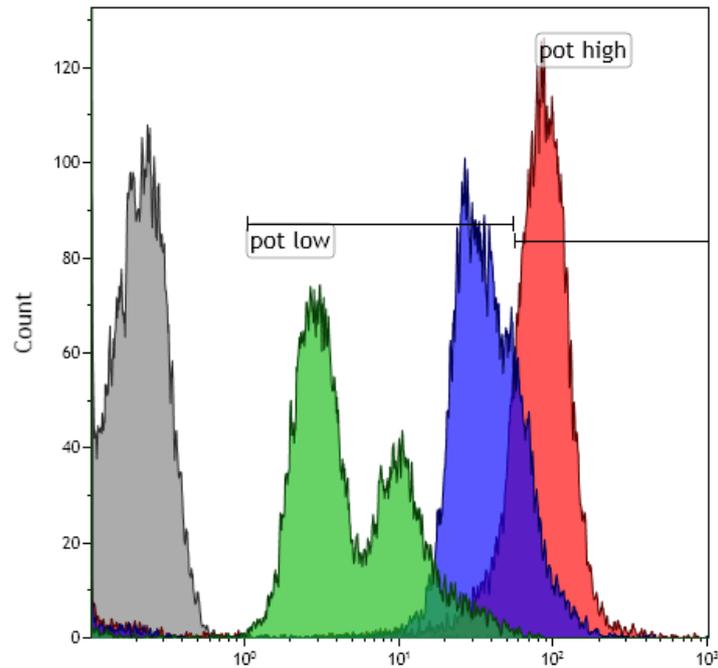


Figure 18 : Fluorescence de la sonde RSG à 520 nm sur des échantillons de biofilm analysés par cytométrie en flux. Gris : auto fluorescence, vert : CCCP 4 μ L, bleu : 2 μ L, rouge CCCP 0 μ L.

7.4.2.3 Validation de la reproductibilité

Une expérience de culture sur bioréacteur aéré par membrane a été répétée quatre fois dans les mêmes conditions avec le même matériel. Les échantillons de biofilms récupérés ont été testés selon le protocole de cytométrie en flux précédemment définie. Les intensités de fluorescence sont comparées dans la Figure 19 et montrent la reproductibilité des résultats. En effet, les quatre pics se trouvent tous en potentiel élevé avec une intensité moyenne semblable (axe des abscisses).

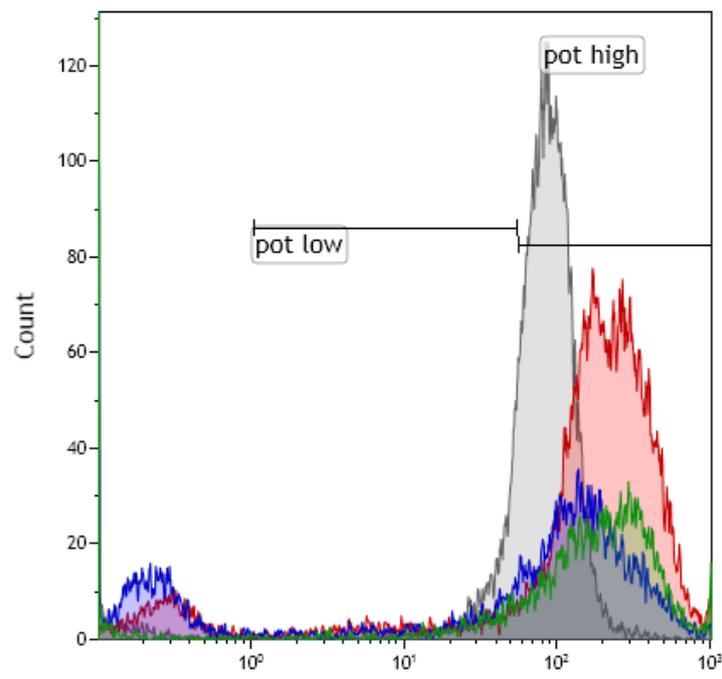


Figure 19 : Fluorescence de la sonde RSG à 520 nm sur des échantillons de biofilm analysés par cytométrie en flux. Les résultats sont ceux de 4 biofilms cultivés dans 4 bioréacteurs aérés par membrane identiques dans les mêmes conditions expérimentales.

7.5 Mesure du transfert d'oxygène sans micro-organismes

Les performances d'aération du bioréacteur aéré par membrane ont été évaluées via deux grandeurs : le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène (k_{LA}) et le coefficient de transfert d'oxygène (k_L).

7.5.1 Détermination du coefficient volumétrique de transfert d'oxygène k_{LA}

Le coefficient volumétrique de transfert d'oxygène k_{LA} est déterminé par une méthode dynamique similaire à celle décrite dans les travaux de (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009). Cette méthode consiste dans un premier temps à retirer l'oxygène contenu dans le milieu avec de l'azote. Une fois la concentration en oxygène dissous (OD) proche de 0 %, l'aération en air est enclenchée et après la stabilisation du signal ($t = t_1$), l'évolution de la concentration en OD est suivie au cours du temps (Figure 20).

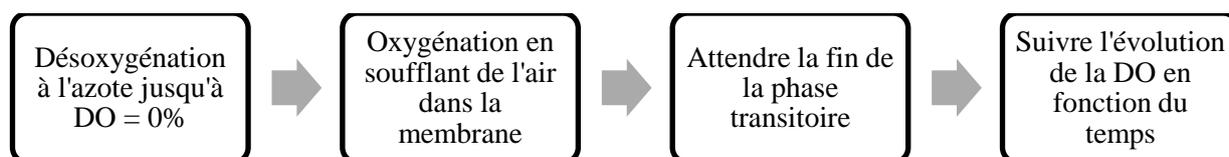


Figure 20 : Procédure expérimentale de mesure des coefficients de transfert d'oxygène.

En considérant que le mélange dans le bioréacteur se fait de façon parfaitement agitée, le bilan de matière peut être établi et permet d'en déduire la valeur du $k_L a$ selon l'équation (II 7.1)

$$\ln \left(\frac{C_{(p_G)}^* - C_2}{C_{(p_G)}^* - C_1} \right) = k_L a \cdot (t_2 - t_1) \quad (\text{II 7.1})$$

Avec $C_{(p_G)}^*$ la concentration en OD à 37°C et à pression $p_G = p_{atm} + p_{relative}$, C_1 et C_2 les concentrations respectives en OD aux temps t_1 et t_2 (fin du suivi). $C_{(p_G)}^*$ (100 %) ont été obtenues en envoyant de l'air dans la cuve agitée jusqu'à atteindre une valeur stable.

Selon la loi de Henry, la quantité de gaz dissous dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle de ce gaz appliqué sur le liquide. $C_{(p_G)}^*$ est donc directement déduit du ratio de la pression partielle de gaz injecté (p_G/p_{atm}) et de $C_{(p_{atm})}^*$ (Equation ((II 7.2) où H est le coefficient de Henry à T=37°C, $H=1.1 \cdot 10^{-8} \text{ mol.kg}^{-1}.\text{Pa}^{-1}$ (Chaix et al., 2014)).

$$C_{(p_G)}^* = p_G \cdot H \Rightarrow \frac{C_{(p_G)}^*}{C_{(p_{atm})}^*} = \frac{p_{atm} + p_{relative}}{p_{atm}} \quad (\text{II 7.2})$$

7.5.2 Détermination du coefficient de transfert d'oxygène k_L

Le coefficient de transfert d'oxygène k_L est estimé selon la méthode décrite dans les travaux de (Ahmed and Semmens, 1992b). Ces auteurs déterminent k_L en combinant et dérivant principalement deux équations. La première décrit le transfert d'oxygène à travers une membrane à fibres creuses (II 7.3) tandis que la seconde établit le bilan de matière en oxygène dans la cuve. Ces équations et les principales étapes de calcul sont rappelées ci-après :

En supposant un écoulement de type piston dans la membrane, le transfert d'oxygène peut être décrit par l'équation (II 7.3) :

$$v_L \cdot \frac{dC_z}{dz} = k_L \frac{S}{V} (C_{(pG)}^* - C_z) \quad (\text{II } 7.3)$$

Avec v_L la vitesse superficielle du liquide dans les fibres ($v_L = 4 \cdot Q_L / \pi d^2$), C_z la concentration en OD correspondant à une position z dans une fibre, V le volume de liquide dans la cuve et S la surface d'échange indiquée par le fabricant.

En intégrant l'équation (II 7.3) avec les conditions aux limites $C_z = C_{in}$ à $z = 0$ (entrée) et $C_z = C_{out}$ à $z = L$ (sortie), l'équation (II 7.4) peut être déduite :

$$C_{out} = C_{(pG)}^* - (C_{(pG)}^* - C_{in}) \cdot \exp\left(-\frac{k_L \cdot S \cdot L}{V \cdot v_L}\right) \quad (\text{II } 7.4)$$

Avec C_{out} la concentration en OD en sortie de fibre, C_{in} la concentration en OD mesurée dans la cuve et L la longueur des fibres donnée par le fabricant.

Le bilan de matière en oxygène dans la cuve peut également être établi (II 7.5)

$$V \cdot \frac{dC_{in}}{dt} = Q_L C_{out} - Q_L C_{in} \quad (\text{II } 7.5)$$

Avec Q_L le débit de liquide.

En substituant C_{out} de l'équation (II 7.4) dans l'équation (II 7.5) et en intégrant aux conditions limites $C_{in} = C_1$ à $t=t_1$ et $C_{in} = C_2$ à $t=t_2$, l'équation (II 7.6) est obtenue.

$$\ln\left(\frac{C_{(pG)}^* - C_1}{C_{(pG)}^* - C_2}\right) = \left[\frac{Q_L}{V_f} \left(1 - \exp\left(-\frac{k_L \cdot S \cdot L}{V \cdot v_L}\right)\right)\right] (t_2 - t_1) \quad (\text{II } 7.6)$$

Avec V_f le volume de liquide contenu dans une seule fibre.

Selon l'équation (II 7.6), le coefficient de transfert k_L peut être déduit en traçant $\ln\left(\frac{C_{(pG)}^* - C_1}{C_{(pG)}^* - C_2}\right)$ en fonction de $(t_2 - t_1)$ et en mesurant la pente x donnant l'équation (II 7.7).

$$k_L = -\frac{V \cdot v_L}{S \cdot L} \cdot \ln\left[1 - x \frac{V_f}{Q_L}\right] \quad (\text{II } 7.7)$$

7.6 Mesure du transfert d'oxygène avec micro-organismes

Le transfert d'oxygène avec micro-organisme se calcule à partir des mesures continues de concentration en oxygène entre les gaz en entrée et en sortie de membrane selon l'équation (II 7.8) (Wiesmann et al., 2007). Cette équation ne prend pas en compte la concentration en oxygène dissous dans la cuve car cette dernière est nulle sur l'ensemble des expériences en régime continu.

$$OTR = \frac{Q_G \cdot \rho_{O_2} \cdot \Delta Y_{O_2}}{S} \quad (\text{II 7.8})$$

Avec Q_G le débit volumique de gaz, ρ_{O_2} la masse volumique de l'oxygène, S la surface de membrane et ΔY_{O_2} la variation de concentration en oxygène entre l'entrée et la sortie en pourcentage massique.

Dans le cas où une production importante de gaz accompagne la consommation d'oxygène, il est alors possible de prendre en compte la modification de la composition de l'air dans les calculs selon l'équation (Wiesmann et al., 2007) :

$$OTR = \frac{Q_G \cdot \rho_{O_2} \cdot Y_{N_2 \text{ in}}}{S} \left(\frac{Y_{O_2 \text{ in}}}{Y_{N_2 \text{ in}}} - \frac{Y_{O_2 \text{ out}}}{Y_{O_2 \text{ out}}} \right) \quad (\text{II 7.9})$$

Avec Y_i les pourcentages massiques de concentration de l'élément i dans l'air et $Y_{N_2} = 1 - Y_{O_2} - Y_{CO_2}$

L'OTR peut se mesurer aussi bien par rapport à un volume de réacteur que par rapport à une surface de membrane. L'équation (I 4.2) liant le $k_L a$ et l'OTR volumétrique ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$) peut être modifiée de façon à obtenir l'OTR superficiel ($\text{g} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$) :

$$OTR = K_L a \cdot (C^* - C_L) \cdot \frac{V}{S} \quad (\text{II 7.10})$$

Avec V le volume de liquide dans le réacteur.

Chapitre III : RÉSULTATS et DISCUSSION

1 Introduction

Afin de mener à bien cette étude, de nombreux choix concernant les conditions expérimentales ont dû être réalisés. Afin de motiver ces choix, des expériences ont été réalisées et forment les chapitres § III 2 à 5. L'ensemble des éléments présentés permettent de justifier le choix de la souche bactérienne et du système de production. Une fois le système défini, des études complémentaires ont été menées afin de caractériser la souche en fonction de deux paramètres clés, les conditions d'aération et de température. Ces deux paramètres affectent directement la production de surfactine et le métabolisme de la souche. L'objectif de ces chapitres est de pouvoir réaliser la suite des expériences dans des conditions optimales fixées et de pouvoir interpréter les résultats avec les connaissances nécessaires sur le métabolisme de la souche choisie.

Une fois le système défini, le transfert d'oxygène seul dans un bioréacteur aéré par contacteur membranaire est étudié (chapitre § III 6). L'objectif de cette partie est de pouvoir, à partir des paramètres expérimentaux, prédire les performances de transfert d'oxygène afin de les comparer par la suite aux résultats obtenus avec un biofilm qui croît sur la membrane.

Enfin, une série d'expériences faisant varier les principaux paramètres opératoires vient terminer cette étude afin de caractériser leurs impacts sur l'état physiologique du biofilm. L'objectif de cette partie est, en confrontant les résultats aux données recueillies précédemment, de mieux identifier le régime de limitation du biofilm et de d'optimiser les conditions opératoires pour améliorer la production de surfactine.

2 Détermination de l'équipement utilisé pour la culture bactérienne

2.1 Introduction

Comme décrit précédemment, les contacteurs membranaires représentent une solution prometteuse pour la bioproduction de lipopeptides, métabolite secondaire tensioactif de *B. subtilis*, car ils permettent l'aération de la culture bactérienne sans formation de mousse. Ce type de bioréacteur n'est pas proposé à petite échelle de façon commerciale. Il est principalement utilisé pour le traitement des eaux qui ne nécessite pas de contrainte de stérilité et sur des volumes d'un ordre de grandeur tout à fait différent de la production de métabolites secondaires. Suite à une première recherche comparant plusieurs types de membrane (Coutte et al., 2010), des membranes à fibres creuses microporeuses ont été sélectionnées. Sans solution industrielle disponible, plusieurs montages de réacteur ont été étudiés afin de choisir le modèle le plus efficace, disponible et reproductible permettant de faire une étude de modélisation à petite échelle.

Le premier consiste en un minibioréacteur agité de 500 mL de capacité doté d'une régulation de pH, d'oxygène dissous et de température et muni d'une boucle externe permettant l'aération à travers une membrane à fibres creuses microporeuses de 24 cm² de surface d'échange

Le deuxième consiste en un bioréacteur de 5 L de capacité doté d'une régulation de pH, d'oxygène dissous et de température et muni d'une boucle externe permettant l'aération à travers une membrane à fibres creuses microporeuses de 2,5 m² de surface d'échange.

Le dernier consiste en une fiole d'Erlenmeyer 250 mL placée dans une étuve sur un agitateur magnétique avec une boucle de circulation externe à travers une membrane à fibre creuse microporeuse de 24 cm². Un bouchon en silicone percé de tubes en verre reliés à des tuyaux flexibles permet l'alimentation, le soutirage ainsi que la prise d'échantillons.

La détermination de l'équipement utilisé pour la culture a été réalisée avec la souche *B. subtilis* ATCC9933.

La culture a été réalisée en alimentation continue dans le milieu de Landy optimisé à 37°C pendant au moins 52 h. Les résultats sont comparés en fonction de l'évolution de la croissance de la biomasse, de l'évolution de la concentration en lipopeptides, de consommation en oxygène et d'évolution de la concentration en oxygène dissous.

2.2 Analyse de la croissance bactérienne

L'évolution de la biomasse dans les différents équipements est représentée dans la Figure 21. Le temps 0 correspond à la mise en alimentation continu du système.

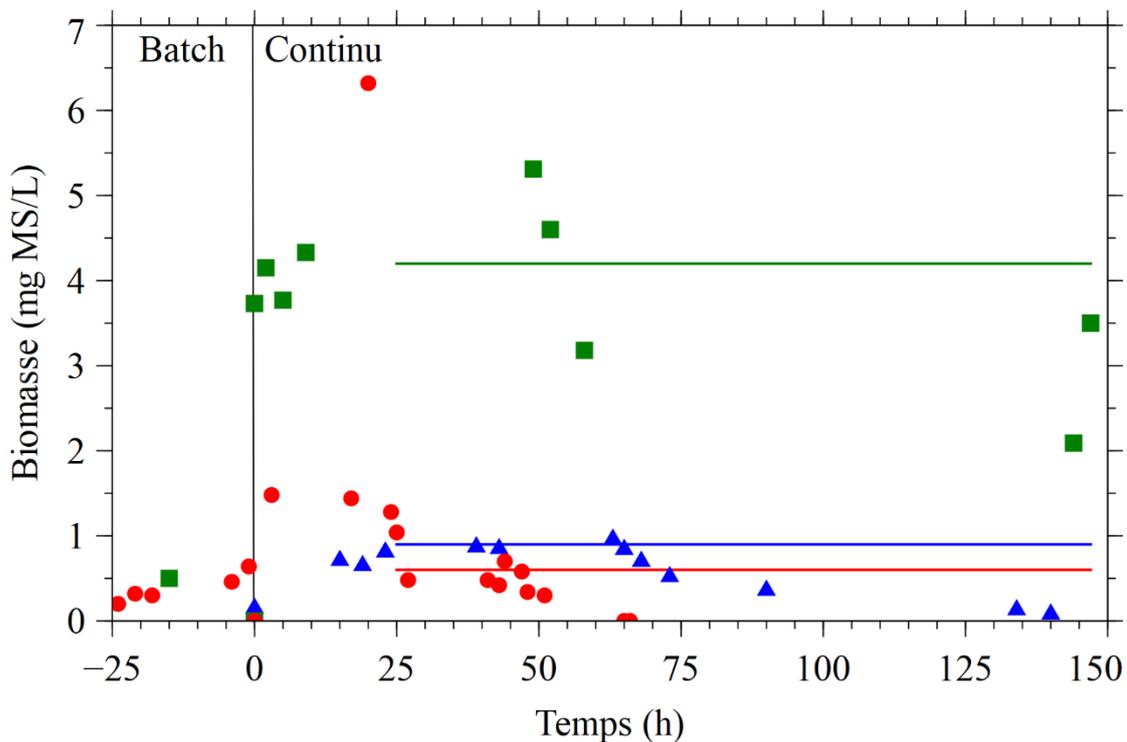


Figure 21 : Evolution de la concentration en biomasse dans différents bioréacteurs. Culture continue de *B. subtilis* ATCC 9943 à 37°C en milieu de Landy optimisé. Les phases batch et continu sont identifiées. ■ Minibioréacteur 500 mL • Bioréacteur 5 L ▲ Fiole 250 mL

La culture en minibioréacteur de 500 mL est considérée stable entre 25 et 150 h de culture avec une biomasse moyenne de $4,2 \pm 0,3$ mg de M.S.. L^{-1} . La culture en bioréacteur de 5 L est considérée stable entre 30 et 55 h avec une biomasse moyenne de $0,6 \pm 0,1$ mg de M.S.. L^{-1} . La culture en fiole de 250 mL est considérée stable entre 30 et 65 h (après plus de 6 volumes de liquide renouvelés) avec une biomasse moyenne de $0,9 \pm 0,1$ mg de M.S.. L^{-1} .

2.3 Analyse de la production de lipopeptides

Les lipopeptides produits par *B. subtilis* ATCC 9943 sont la fengycine et la surfactine. Ces deux molécules ont été produites dans l'ensemble des bioréacteurs utilisés, dans des proportions différentes. Les cultures sont considérées stables sur les mêmes intervalles que pour la biomasse.

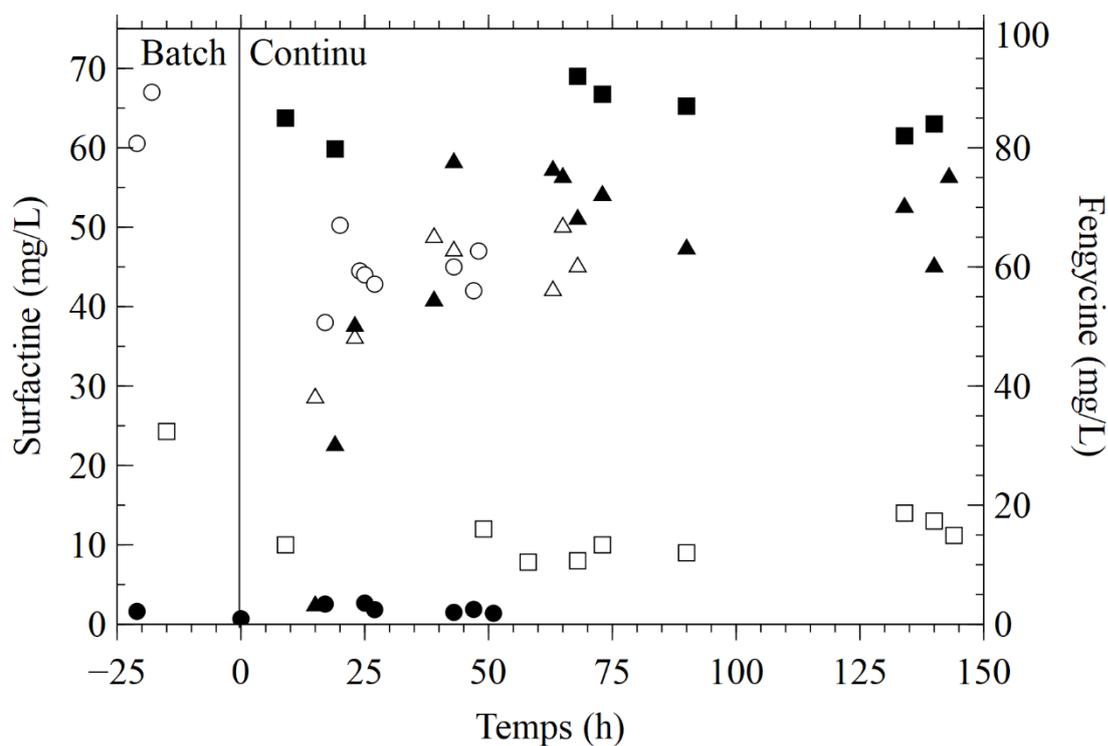


Figure 22 : Evolution de la concentration en lipopeptides dans différents bioréacteurs. Culture continue de *B. subtilis* ATCC 9943 à 37°C en milieu de Landy optimisé. Les phases batch et continu sont identifiées. La surfactine est représentée par des marqueurs pleins et la fengycine par des marqueurs vides. ■ Minibioréacteur 500 mL • Bioréacteur 5 L ▲ Fiole 250 mL

2.4 Résultats de culture dans les différents bioréacteurs

Les résultats en régime permanent ainsi que les résultats de fin de culture obtenus après lavage des membranes sont présentés dans le Tableau 6.

2. Détermination de l'équipement utilisé pour la culture bactérienne

Tableau 6 : Principaux paramètres de culture en régime permanent et résultats du nettoyage des membranes en fonction du bioréacteur utilisé. Culture continue de *B. subtilis* ATCC 9943 à 37°C en milieu de Landy optimisé avec un taux de dilution de 0,2 h⁻¹

		Minibioréacteur	Bioréacteur	Fiole
		500 mL	5 L	250 mL
X_{planctonique}	(g MS/L)	4,2±0,3	0,6±0,1	0,9±0,1
r_x	(g MS/L/h)	0*	0*	0*
Surfactine	(mg/L)	87±4	2,1±0,3	76±1
r_P surfactine	(mg/L/h)	17,4	0,4	15,2
Fengycine	(mg/L)	11±2	45±3	46±4
r_P fengycine	(mg/L/h)	2,1	8,9	9,1
X_{fixée}	(g)	0,295	0	0
X_{fixée}	(g/m ²)	123	0	0
Surfactine fixée	(mg)	0	279	0
Fengycine fixée	(mg)	0		0

*La vitesse de croissance de la biomasse est considérée comme nulle en régime permanent assurant une quantité de biomasse dans le réacteur constante.

Les résultats montrent une production équivalente de surfactine dans le minibioréacteur 500 mL et en fiole 250 mL plus élevée qu'en bioréacteur 5 L. La production de fengycine est quant à elle plus élevée en bioréacteur 5 L et en fiole 250 mL. La présence de lipopeptides n'a pu être mesurée que sur la membrane du bioréacteur de 5 L, ce qui s'explique par la surface plus importante (2,5 m² vs 24 cm²) et donc l'adsorption d'une plus grande quantité de lipopeptides.

2.5 Discussion

La comparaison des résultats de culture obtenus sur les trois systèmes nous permet de conclure que la production de lipopeptides est plus importante avec le système en fiole 250mL (122 mg.L⁻¹) et minibioréacteurs 500mL (98 mg.L⁻¹).

Le choix du système doit également inclure les caractéristiques des différents appareils, notamment leurs disponibilités, les équipements de caractérisation et de suivi présents (sondes DO, pH, température...) et la répétabilité.

Parmi les 3 systèmes, les minibioreacteurs 500 mL se démarquent particulièrement par :

- la présence de toutes les sondes nécessaires (pH, DO, T°, contact),
- le contrôle du pH en continu par l'ajout de base,
- l'enregistrement en continu de la composition des gaz en sortie.
- la possibilité d'utiliser 6 bioreacteurs simultanément,

A l'inverse, le système en fiole 250 mL ne permet pas de mesurer le pH ni de le contrôler. Il n'y a pas non plus de sonde à oxygène dissous et une seule expérience peut être lancée à la fois.

La prise en compte des différents résultats et caractéristiques a permis de sélectionner le minibioreacteur 500 mL comme système pour le reste des expériences pour obtenir le plus rapidement possible des résultats avec un maximum de contrôle et de reproductibilité tout en conservant une bonne productivité en lipopeptides.

3 Identification de la souche d'intérêt

3.1 Introduction

Dans le but d'étudier un système en particulier, le bioréacteur à biofilm aéré par contacteur membranaire, il a fallu sélectionner une production de lipopeptide et un micro-organisme producteur. Seules les souches de *Bacillus subtilis* ont été étudiées car cette bactérie est à ce jour largement utilisée et connue en matière de productivité et de croissance. Des études existent sur la production de surfactine par cette espèce et permettront de confronter les résultats obtenus dans ces travaux. De plus, cette espèce a la capacité de former des biofilms (Vlamakis et al., 2013). Une étude bibliographique a été réalisée recensant les différentes souches de *Bacillus subtilis* utilisées à ce jour pour la production de lipopeptides ainsi que les conditions de culture associées.

Tableau 7 : Etude bibliographique des différentes souches de *Bacillus subtilis* utilisées pour la production de lipopeptides

Souche de <i>Bacillus subtilis</i>	Production lipopeptides (mg/L/h)	Température (°C)	Agitation (rpm)	Milieu de culture	Référence
ATCC21332	190	30	300	Milieu MSI à 40g.L ⁻¹ de glucose	(Yeh et al., 2006)
LAMI008	146	30	180	Milieu APGE + Extrait de levure	(Rocha et al., 2009)
BBG131	110	37	300	Milieu de Landy	(Coutte et al., 2013)
LB5a	63	30	150	Eaux usées de manioc	(Nitschke and Pastore, 2004)
ATCC21332	61	30	150	Eaux usées de manioc	
ATCC21332	50	30	200	Milieu MSI à 40g.L ⁻¹ de glucose	(Yeh et al., 2005)
NB22	34	25	0	Sous-produit du manioc	(Ohno et al., 1996)
DSM3256	33	30	200	OGMS + glu à 40 g.L ⁻¹	(Sen and Swaminathan, 2004)
ATCC21332	28	30	200	MMS optimisé pour les ions	(Wei et al., 2007)
ATCC21332	24	30	200	Milieu MSM + NB + enrichie en Fe ²⁺	(Wei et al., 2004)

ATCC21332	18	30	200	Milieu MSM	(Wei and Chu, 2002)
ATCC 9943	13	32	0	Milieu ML	(Chollet-Imbert et al., 2008)
ATCC21332	12	30	30	Milieu de Landy	(Chtioui et al., 2014)
ATCC6633	12	30	150	Milieu NB	(Cagri-Mehmetoglu et al., 2012)
LB5a	11	35	150	Eaux usées de manioc	(Barros et al., 2008)
BA1	5	37	0	Milieu optimisé	(Zune et al., 2014)
BBG100	3	30	NC	Milieu de Landy	(Leclère et al., 2005)
LAMI005	3	30	200	Milieu MM	(Aparecida Giro et al., 2009)
BBG100	2	30	175	Milieu de Landy	(Guez et al., 2008)
ATCC6633	1	30	175	Milieu de Landy	

Le classement par productivité des différentes souches présentes dans le tableau est seulement à titre indicatif. En effet, chaque étude utilise des systèmes de culture, des températures et des milieux différents, ce qui affecte grandement la productivité des souches et rend la comparaison difficile. De plus, seule la production totale de lipopeptides est prise en compte sans différenciation des différents types de lipopeptides produits.

Dans un souci de reproductibilité, seules les souches disponibles en collection ont été sélectionnées comme choix potentiel de souche modèle pour cette étude. De plus, les souches ayant été remarquées pour leurs capacités à former des biofilms ont été favorisées, notamment *Bacillus subtilis* ATCC 9943. Ce sont donc les souches de *Bacillus subtilis* ATCC 21332, 9943 et 6633 qui ont été sélectionnées afin de comparer leurs performances en bioréacteur à biofilm aéré sur membrane. Les résultats seront tout de même comparés avec des résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire (Coutte, 2012) avec une souche génétiquement modifiée monoproductrice de surfactine, *B. subtilis* BBG131 décrite précédemment dans le chapitre § II 1. Si un trop grand écart de productivité est observé, cette dernière sera conservée pour la suite de l'étude.

Cette sélection permettra de débiter la caractérisation du système dans les meilleures conditions possibles.

La détermination de la souche bactérienne a été réalisée en culture continu en minibioreacteur 500 mL rempli avec 200 mL de milieu de Landy optimisé et avec un taux de dilution de $0,2 \text{ h}^{-1}$.

3.2 Analyse de la croissance bactérienne

L'évolution de la biomasse des différentes souches est représentée dans la Figure 23.

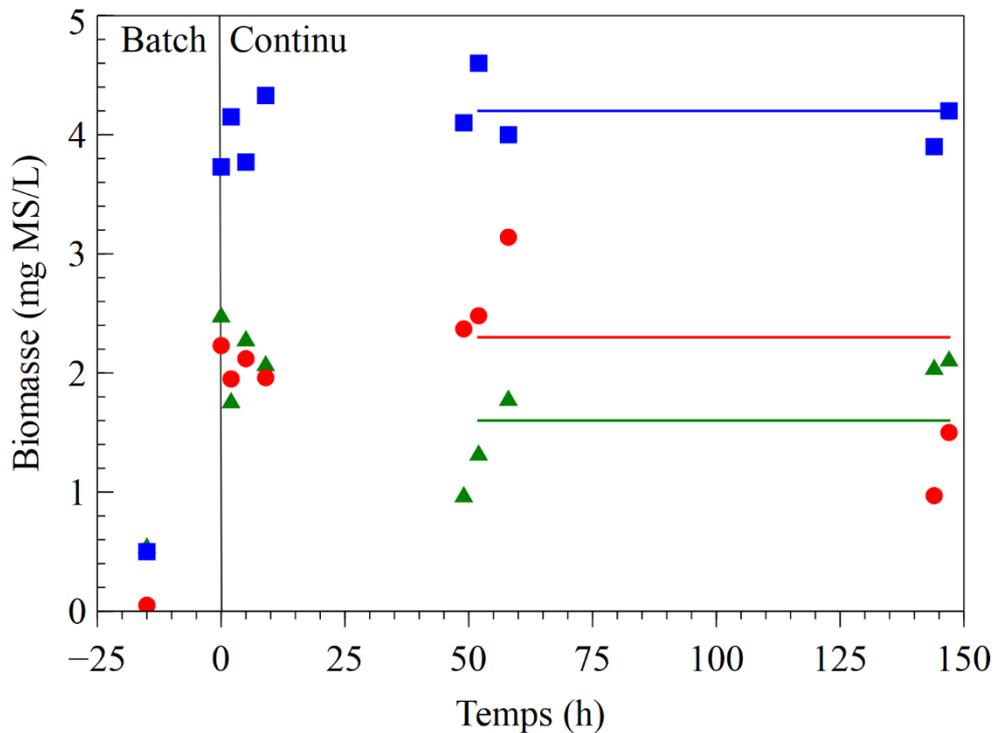


Figure 23 : Evolution de la concentration en biomasse des différentes souches en Minibioreacteur 500 mL. Culture continue à 37°C en milieu de Landy optimisé. Les phases batch et continu sont identifiées. ■ *B. subtilis* ATCC 9943 ● *B. subtilis* ATCC 6633 ▲ *B. subtilis* ATCC 21332

Les cultures sont considérées stables à partir de 50 h, soit après l'équivalent de 10 volumes de milieu passé. La biomasse planctonique la plus élevée est retrouvée dans la culture de *B. subtilis* ATCC 9943 avec une moyenne de $4,2 \pm 0,3 \text{ mg M.S.}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.3 Analyse de la production de lipopeptides

B. subtilis ATCC 9943 est connue pour pouvoir produire des lipopeptides des familles de fengycine, surfactine et iturine contrairement à *B. subtilis* ATCC 21332 qui ne produit que la surfactine. *B. subtilis* ATCC 6633 est capable de produire des lipopeptides des familles de surfactine et d'iturines (Chollet-Imbert et al., 2008). Aucune molécule de la famille des iturines n'a été détecté au cours des cultures. Il est

possible que ces molécules aient été produites en trop faible quantité pour être détectées par les appareils de mesure utilisés (CLHP et colonne C18). Les cultures sont considérées stables sur les mêmes intervalles que pour la biomasse. Le suivi de production en lipopeptides au cours de la culture en minibioreacteur 500 mL en alimentation continue, à 37°C et en milieu de Landy optimisé est présenté dans la Figure 24.

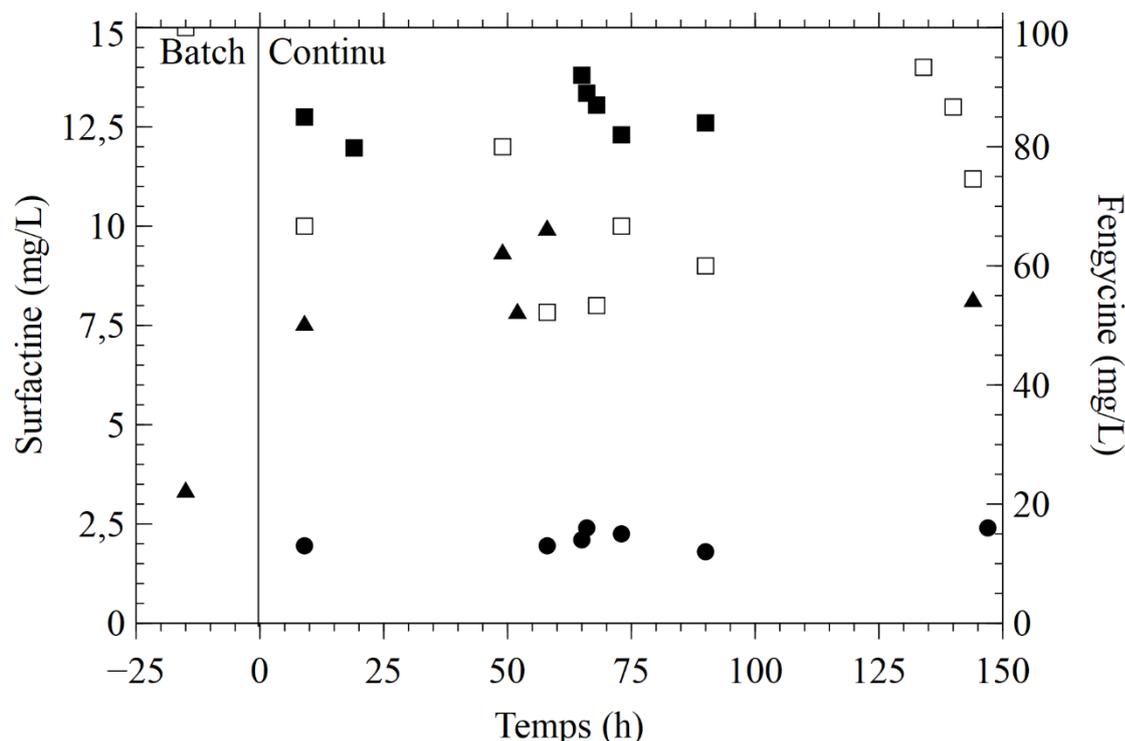


Figure 24 : Evolution de la concentration en surfactine et fengycine produites par les différentes souches. Les phases batch et continu sont identifiées. La surfactine est représentée par des symboles pleins (axe de gauche) et la fengycine par des symboles vides (axe de droite) ■ *B. subtilis* ATCC 9943 ● *B. subtilis* ATCC 6633 ▲ *B. subtilis* ATCC 21332

3.4 Analyse de la consommation de substrat et de la production de métabolites primaires

La principale source de carbone contenu dans le milieu de Landy est le glucose concentré à 20 g.L⁻¹. On remarque une consommation presque totale de ce substrat au bout de 15 h de culture batch pour l'ensemble des souches (Figure 25). À la suite de la mise en route du mode d'alimentation continue, la concentration augmente et finit par se stabiliser en fonction de la vitesse de consommation et de la quantité de biomasse de chaque espèce.

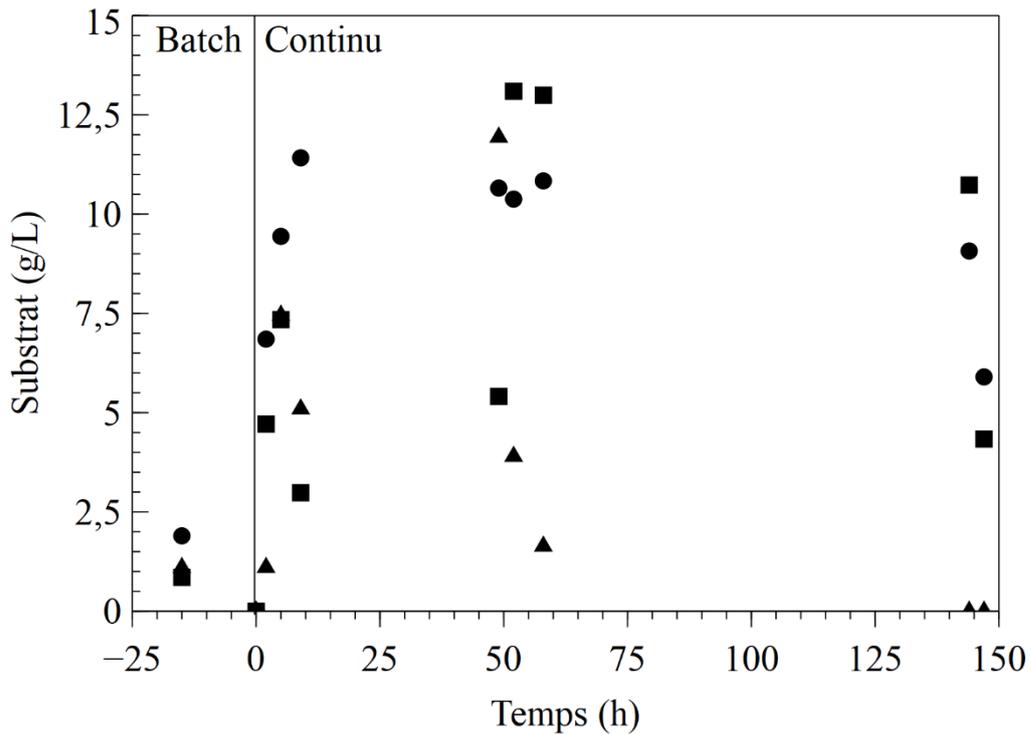


Figure 25 : Evolution de la concentration en substrat des différentes souches en Minibioréacteur 500mL. Culture continue à 37°C en milieu de Landy optimisé. Les phases batch et continu sont identifiées. ■ *B. subtilis* ATCC 9943 • *B. subtilis* ATCC 6633 ▲ *B. subtilis* ATCC 21332

Les métabolites primaires suivis sont l'acide lactique, l'acide acétique et le 2,3-butanediol. Seul l'acide lactique est détecté à une concentration supérieure à 0,7 g.L⁻¹. Sa concentration est élevée dès le début de la phase d'alimentation en continu pour toutes les souches (de 4 à 5 g.L⁻¹) et atteint jusqu'à 7 g.L⁻¹ pour la souche *B. subtilis* ATCC6633 en fin de culture (Figure 26).

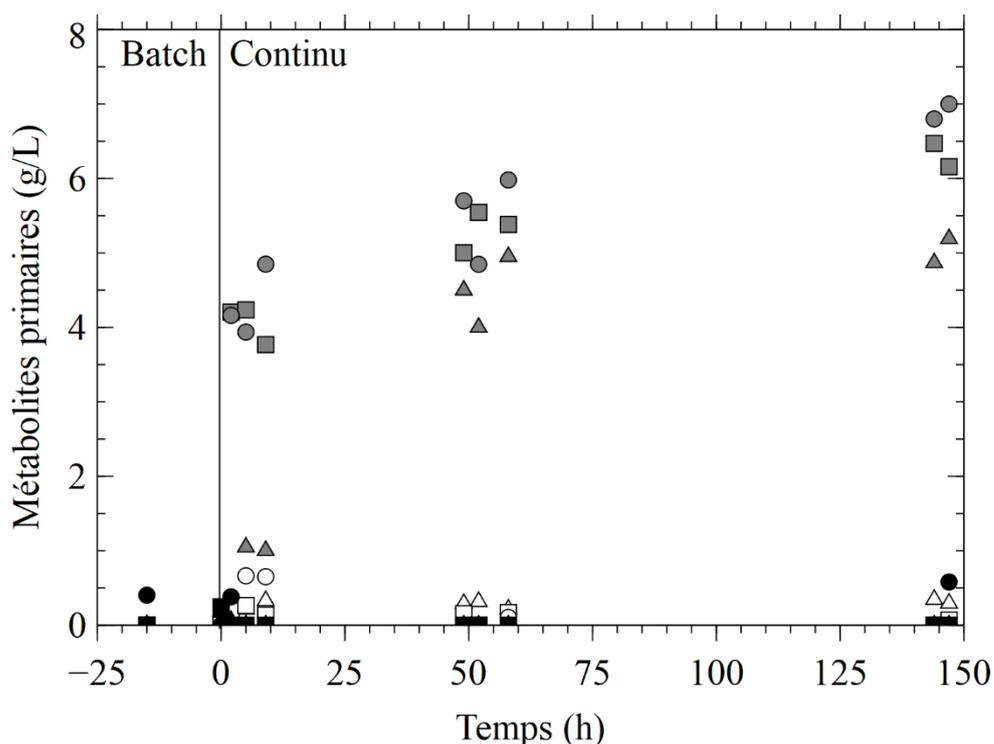


Figure 26 : Evolution de la concentration en métabolites primaires des différentes souches en Minibioréacteur 500 mL. Culture continue à 37°C en milieu de Landy optimisé. Les phases batch et continu sont identifiées. L'acide lactique est représenté par des marqueurs gris, l'acide acétique par des marqueurs vides et le 2,3-butanediol par des marqueurs pleins ■ *B. subtilis* ATCC 9943 • *B. subtilis* ATCC 6633 ▲ *B. subtilis* ATCC 21332

3.5 Résultats de culture pour les différentes souches

Dans le Tableau 8 sont rassemblés les différents résultats obtenus avec les 3 souches *B. subtilis* ATCC 9943, ATCC 6633 et ATCC 21332 en Minibioréacteur de 500 mL, rempli avec du milieu de Landy optimisé à 37°C et avec un taux de dilution 0,2 h⁻¹.

Les résultats reportés dans le Tableau 8 ont été comparés avec ceux obtenus avec la souche génétiquement modifiée *B. subtilis* BBG131 (Coutte, 2012) décrite dans le chapitre § II 1 et comportent :

- d'une part ceux obtenus en régime permanent à la suite des analyses sur le milieu de culture (biomasse planctonique, lipopeptides, glucose résiduel, métabolites primaires),
- d'autre part ceux obtenus à la fin de l'expérience après lavage des membranes et analyse des composés décrochés (biomasse fixée) et désorbés (lipopeptides).

Tableau 8 : Principaux paramètres de culture en régime permanent et résultats du nettoyage des membranes en fonction de la souche utilisée.

		<i>B. subtilis</i> ATCC21332	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>B. subtilis</i> ATCC9943	<i>B. subtilis</i> BBG131**
$X_{\text{planctonique}}$	(g M.S..L ⁻¹)	1,6 ±0,2	2,3 ±0,2	4,2 ±0,3	3,8
S	(g.L ⁻¹)	2,4 ±1,1	10,1 ±0,7	12,4 ±1,0	0
r_X	(g M.S..L ⁻¹ .h ⁻¹)	0*	0*	0*	0*
P surfactine	(mg.L ⁻¹)	59 ±7	14 ±2	87 ±4	671
r_P surfactine	(mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	11,7	2,9	17,4	134,2
$Y_{P/S}$ surfactine	(mg.g ⁻¹)	3,3	11,4	3,3	33,5
P fengycine	(mg.L ⁻¹)	-	-	11±2	-
r_P fengycine	(mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	-	-	2,1	-
$Y_{P/S}$ fengycine	(mg.g ⁻¹)	-	-	1,4	-
r_P lactate	(mg.L ⁻¹ .h ⁻¹)	0,9	0,9	1,1	0,5
r_S glucose	(g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	1,5	2,0	3,5	4,0
$X_{\text{fixée}}$	(g)	0,33	0,155	0,295	9,1
	(g.m ⁻²)	138	65	123	4
Surfactine fixée	(mg) (g.m ⁻²)	0	0	0	583
Fengycine fixée	(mg) (g.m ⁻²)	-	-	0	-

* La vitesse de croissance de la biomasse est nulle en régime permanent.

** Résultats issus d'une culture en bioréacteur de 5 L aérée par une membrane à fibres creuses microporeuses de 2,5 m² (Coutte, 2012)

3.6 Discussion

La comparaison des résultats précédemment obtenus de la souche BBG131 montre une grande différence de productivité de lipopeptides (Tableau 8). En effet la souche génétiquement produit 6 fois plus de lipopeptides (671 mg.L⁻¹) que la souche de collection la plus productrice (ATCC9943 avec 98 mg.L⁻¹). Dans le contexte des études de production en bioréacteur réalisées avec une biomasse fixée et une conduite de

fermenteur en lessivage, la productivité des souches a un rôle crucial sur la possibilité de mesurer la concentration des lipopeptides dans la phase liquide. Afin de s'assurer que la concentration en lipopeptides reste au-dessus du seuil de détection, notamment lors de l'augmentation du taux de dilution et la modification des conditions de cultures, la souche BBG131 a été retenue comme souche modèle. Cette souche possède différents avantages :

- sa cinétique de croissance est déjà connue,
- un seul lipopeptide, la surfactine, est produit, facilitant l'analyse des résultats,
- la production de surfactine est importante,
- la production de surfactine est sous contrôle d'un promoteur constitutif, évitant ainsi une régulation génétique,
- les résultats de culture (croissance, production de surfactine, consommation de substrat...) seront comparables aux études précédentes (Coutte et al., 2013, 2010),
- les acteurs du projet Smartbiocontrol utilisent cette souche pour tester différents bioréacteurs innovants dont les performances seront comparées.

4. Conséquence des changements de température sur la production de surfactine par des tests en fiole

4 Conséquence des changements de température sur la production de surfactine par des tests en fiole

4.1 Introduction

La température, paramètre essentiel pour la culture de micro-organismes, à laquelle le bioréacteur est maintenu (37°C) n'est pas forcément identique à celle de la membrane. En effet, des déperditions de chaleur se produisent au niveau des tubulures et par le flux de gaz qui passe à température ambiante entre les fibres de la membrane. Pour connaître les déperditions exactes, la température a été mesurée en sortie de membrane en fonction du débit de liquide pour différentes tailles de membranes (Tableau 9).

Tableau 9 : Température en sortie de membrane 24 cm² et 2,5 m² en fonction du débit pour un bioréacteur tempéré à 37°C

Débit (mL.min ⁻¹)	Température (°C)	
	Membrane 24 cm ²	Membrane 2,5 m ²
4000		35
2000		34
20	30	
10	29	
2	26	

L'écart observé étant non négligeable (jusqu'à 11°C) pour la membrane 24 cm² qui correspond au système retenu pour la suite de l'étude, des expériences de croissance à 26, 30 et 37°C en fiole d'Erlenmeyer de 1 L contenant 200 mL de milieu de Landy optimisé ont été réalisées pendant 72 h pour connaître l'impact de la température sur les paramètres de croissance de la souche BBG131. Toutes les valeurs présentées sont issues d'expériences réalisées en triplicata.

4.2 Analyse de la croissance bactérienne

L'évolution de la biomasse aux différentes températures est représentée dans la Figure 27.

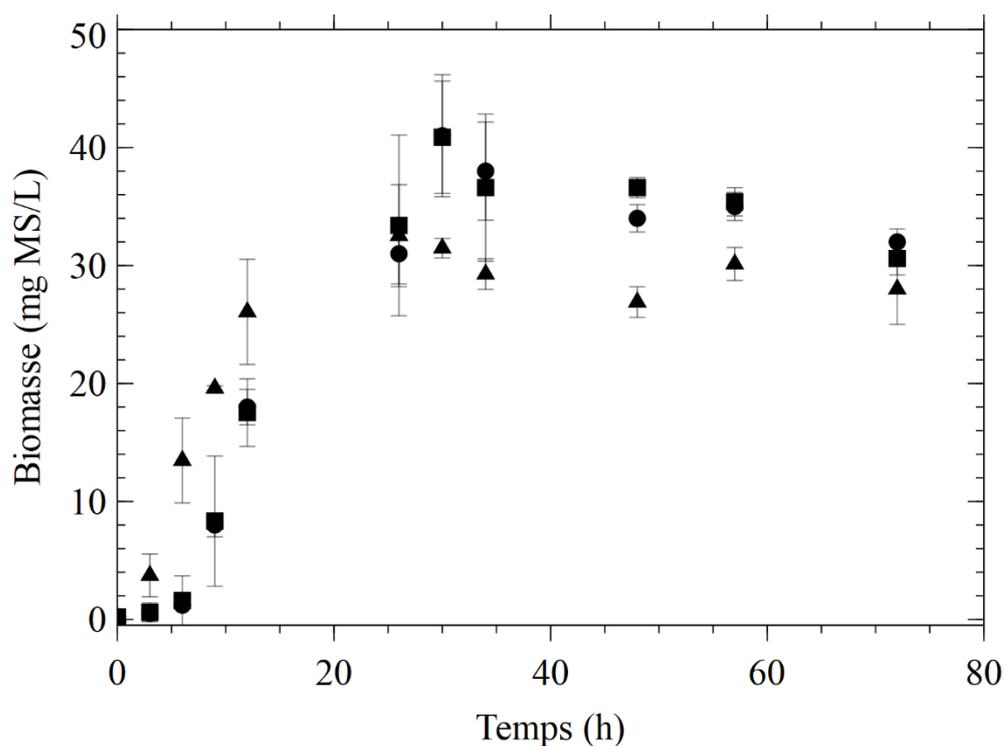


Figure 27 : Evolution de la concentration en biomasse en fonction du temps à différentes températures. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer de 1 L avec 200 mL de milieu de Landy optimisé. ● 26°C ■ 29°C ▲ 37°C

Les profils des courbes de croissances bactériennes aux différentes températures adoptent la même évolution avec une légère avance à 37°C (fin de la phase exponentielle entre 12 et 26 h vs au bout de 30 h pour 26°C et 29°C). La biomasse maximale atteinte est plus élevée aux faibles températures (40 mg M.S..L⁻¹ vs 32 mg M.S..L⁻¹ à 37°C).

4.3 Analyse de la production de surfactine

B. subtilis BBG131 est monoproduit de surfactine. Seul ce lipopeptide a donc été suivi au cours des cultures (Figure 28).

4. Conséquence des changements de température sur la production de surfactine par des tests en fiole

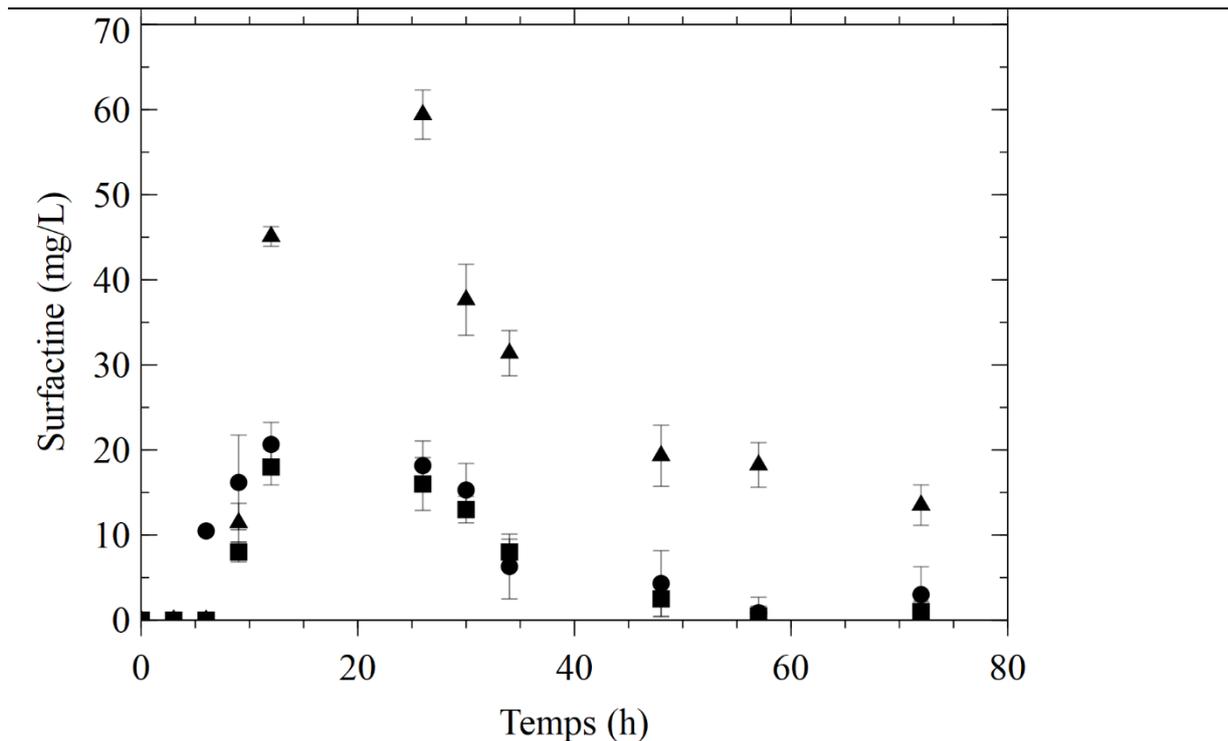


Figure 28 : Evolution de la concentration en surfactine en fonction du temps à différentes températures. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer de 1 L avec 200 mL de milieu de Landy optimisé. ● 26°C ■ 29°C ▲ 37°C

La surfactine apparaît après 6 à 9 heures de culture. La concentration augmente ensuite régulièrement en suivant la croissance bactérienne puis décline à partir de 26 h quelle que soit la température. La concentration maximale est 3 fois plus élevée à 37°C qu'à 26°C et 29°C (60 mg.L⁻¹ contre seulement 20 mg.L⁻¹).

4.4 Analyse de la consommation de substrat et de la production de métabolites primaires

Le principal substrat contenu dans le milieu de Landy est le glucose concentré à 20 g.L⁻¹. La totalité du substrat est consommée au bout de 35 h à 26°C et 29°C mais seulement après 26 h à 37°C (Figure 29). La consommation totale de substrat correspond à la fin de la période de croissance exponentielle de biomasse.

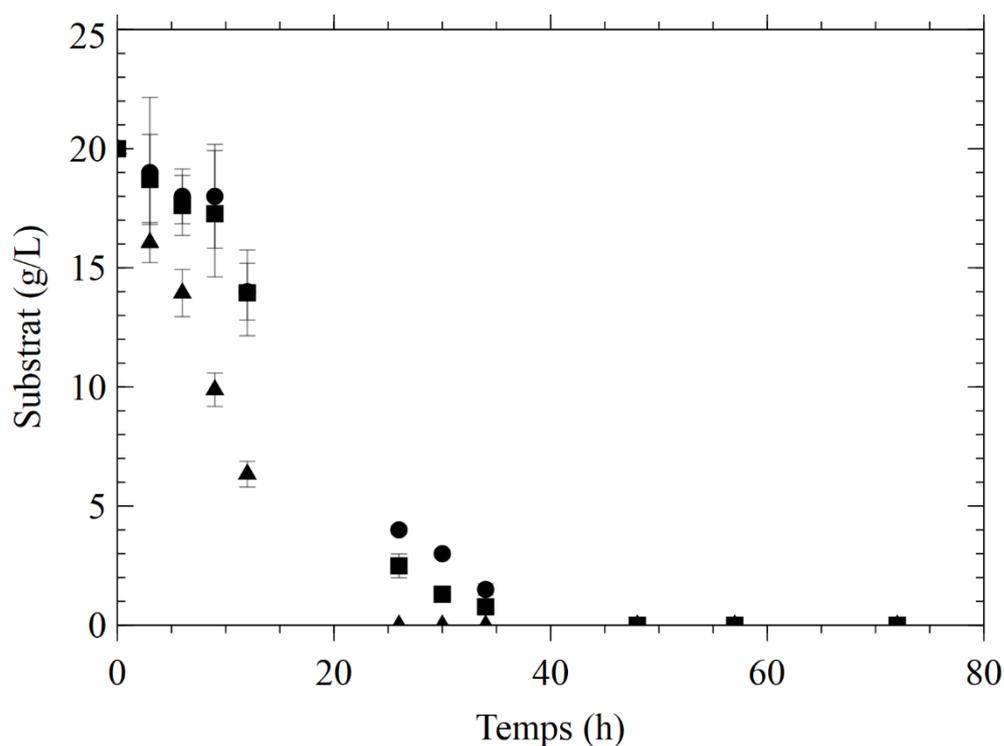


Figure 29 : Evolution de la concentration en glucose en fonction du temps à différentes températures. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer de 1 L avec 200 mL de milieu de Landy optimisé. ● 26°C ■ 29°C ▲ 37°C

Les métabolites primaires mesurés sont l'acide lactique, l'acide acétique et le 2,3-butanediol. Aucune trace de 2,3-butanediol n'a été détecté au cours des 72 h de culture. Les concentrations en métabolites primaires des différentes cultures restent faibles tout au long de la culture sauf l'acide lactique dont la concentration augmente dès la consommation totale du glucose à 37°C (après 26 h) et quelques heures plus tard pour les cultures à 26°C et 29°C (après 56 h). La concentration en acide lactique ne cesse ensuite d'augmenter jusqu'à atteindre 7 g.L⁻¹ en fin de culture à 37°C contre 1,5 g.L⁻¹ aux autres températures.

4. Conséquence des changements de température sur la production de surfactine par des tests en fiole

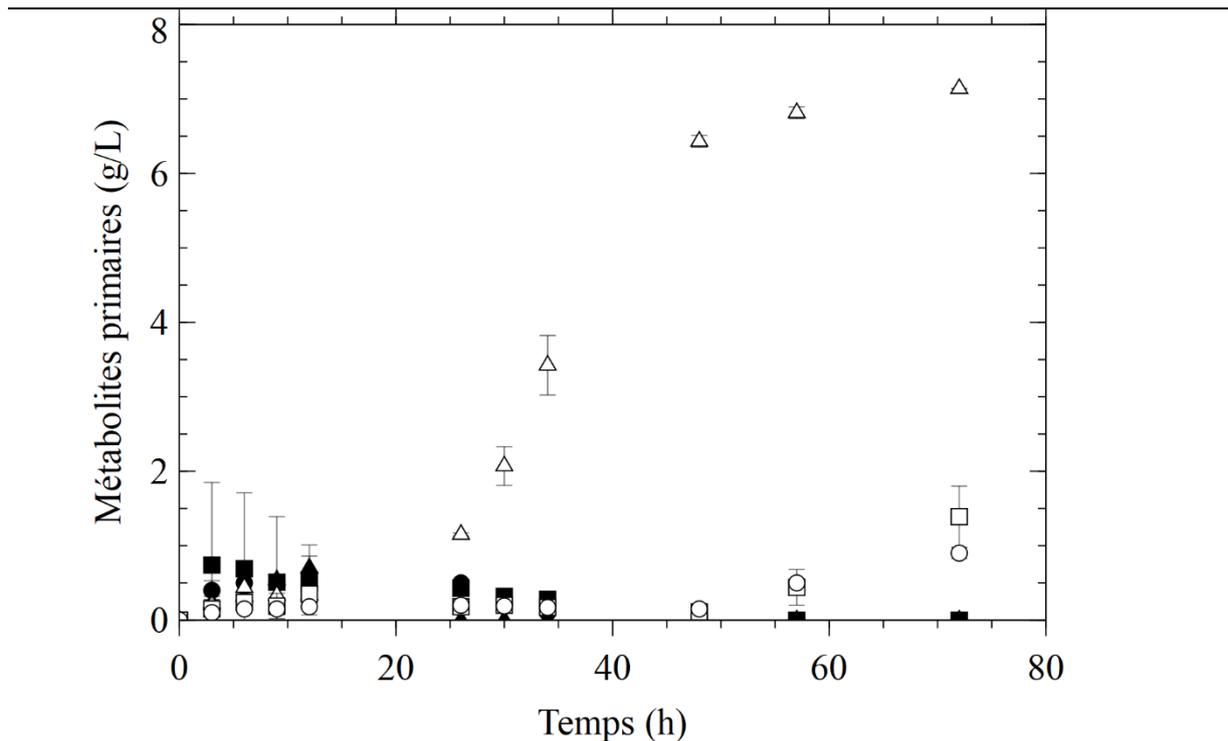


Figure 30 : Evolution de la concentration en métabolites primaires en fonction du temps à différentes températures. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer de 1 L avec 200 mL de milieu de Landy optimisé. L'acide lactique est représenté par des marqueurs vides et l'acide acétique par des marqueurs pleins • 26°C ■ 29°C ▲ 37°

4.5 Analyse par cytométrie en flux

Des échantillons de culture à 26°C et 30°C ont été analysés par cytométrie en flux afin de déterminer si une différence d'activité respiratoire existe entre différentes conditions de température d'incubation. Pour cela la sonde RSG est utilisée et réagit dans la chaîne d'oxydo-réduction en créant une fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à l'activité d'oxydo-réduction de la cellule. Cette sonde a été choisie car l'activité d'oxydo-réduction est directement liée à l'activité respiratoire des cellules, l'oxygène étant l'accepteur final d'électron permettant la libération d'une molécule d'ATP (adénosine triphosphate).

L'activité respiratoire observée par cytométrie en flux (Figure 31) n'indique aucune différence de métabolisme entre deux cultures de *B. subtilis* conduites à 26°C ou 29°C. En effet, les pics gris (26°C) et rouge (29°C) se superposent avec une intensité moyenne très semblable (axe des abscisses).

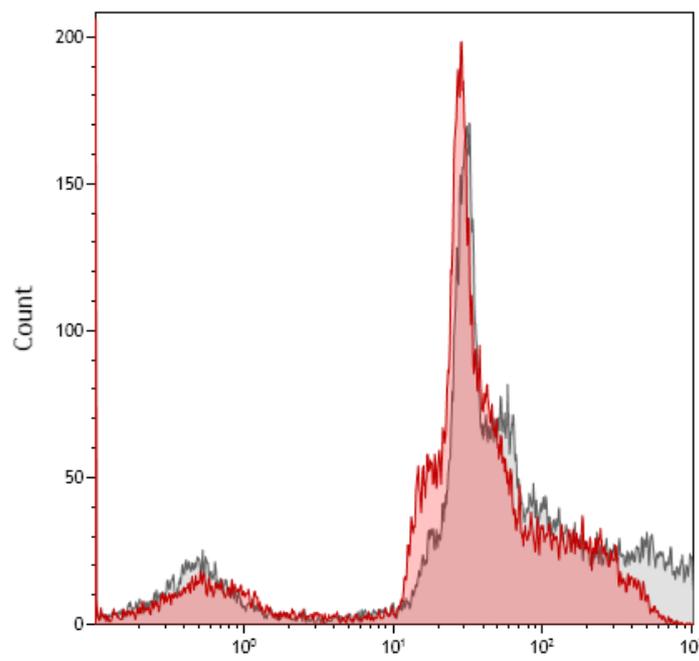


Figure 31 : Fluorescence de la sonde RSG à 520 nm par cytométrie en flux. Culture de *B. subtilis* en fiole Erlenmeyer 500 mL contenant 100 mL de milieu de Landy optimisé. Rouge : 29°C, gris : 26°C.

4.6 Résultats de culture aux différentes températures

Les résultats de culture en fiole sont résumés dans le Tableau 10. Les différents indicateurs sont également présentés. Le taux de croissance μ est calculé à partir des données relevées pendant la phase exponentielle de croissance qui se situe entre 0 et 9 h à 37°C et entre 3 et 9 h à 26°C et 29°C. La culture à 37°C est terminée après 26 h d'incubation. Les cultures à 26°C et 29°C sont terminées après 35 h d'incubation.

Tableau 10 : Principaux résultats de culture à différentes températures. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer de 1 L avec 200 mL de milieu de Landy optimisé

Température (°C)	26	29	37
X_{\max} (mg M.S..L ⁻¹)	41	41	33
μ (h ⁻¹)	0,39	0,40	0,45
P_{\max} surfactine (mg.L ⁻¹)	18	21	59
S_{final} (g.L ⁻¹)	0	0	0
$Y_{P/X}$ (g.g M.S. ⁻¹)	0,44	0,51	1,79
$Y_{P/S}$ (mg.g ⁻¹)	0,90	1,05	2,95

4. Conséquence des changements de température sur la production de surfactine par des tests en fiole

Le taux de croissance est plus grand lorsque la température de culture est plus élevée. Les rendements $Y_{P/X}$ montrent une meilleure productivité des cellules à température élevée. De même, les rendements $Y_{P/S}$ montrent qu'une plus grande partie du glucose est utilisée pour la production de lipopeptides à température élevée.

4.7 Discussion

Comme attendu, la température a une influence non négligeable sur le métabolisme de *Bacillus* et sur la production de surfactine. Les meilleurs rendements sont obtenus à 37°C avec une production de surfactine triplée par rapport aux températures basses et des vitesses de croissance et de consommation du glucose plus élevées. L'ensemble du métabolisme est accéléré et permet une production plus efficace de surfactine avec un rendement $Y_{P/S}$ également triplé.

Au contraire, la différence entre les températures basses, 26°C et 29°C, est limitée avec une quantité de biomasse finale identique, une variation de vitesse de croissance inférieure à 2 %, une différence de production de surfactine totale inférieure à 15 % et aucune différence d'activité respiratoire.

Par la suite, l'ensemble des résultats obtenus sur membrane 24 cm² pourra être comparé sans prendre en compte le changement de température de croissance du biofilm (dû aux différents débits de liquide utilisés) car le métabolisme de la souche n'est que très légèrement modifié. En revanche, lors de comparaisons avec des résultats d'expériences obtenus en bioréacteur de 3 L avec une membrane de 2,5 m², il faudra cependant s'assurer de prendre en compte la différence de température qui influence fortement le métabolisme et peut faire varier jusqu'à un facteur 3 la production de surfactine même si la température est également réduite par rapport à la consigne de 37°C sur ces membranes.

5 Mise en évidence de l'impact de l'aération sur la production de surfactine par des tests en fiole

5.1 Introduction

L'aération a un effet notoire sur la production de lipopeptide. Elle influe sur le type de lipopeptide produit dans le cas de souches pluri-productrices. Elle peut également influencer la cinétique de croissance et par conséquent la cinétique de production des lipopeptides. C'est pourquoi ce paramètre a été étudié en fiole d'Erlenmeyer avec une vitesse de rotation de 200 rpm et un diamètre d'agitation de 2,5 cm. En faisant varier le volume des fioles et le taux de remplissage, une gamme de k_{La} allant de 15 à 119 h^{-1} a pu être testée (Tableau 11).

Tableau 11 : Volume des fioles d'Erlenmeyer et taux de remplissage utilisés pour obtenir différentes conditions d'aération. Le k_{La} est calculé à partir de la relation de l'étude de Maier, 2002

Volume (L)	Taux de remplissage (%)	k_{La} (h^{-1})
0,25	5	119
1	5	86
1	10	49
1	40	15

5.2 Analyse de la croissance bactérienne

L'évolution de la biomasse aux différentes conditions d'agitation est présentée dans la Figure 32.

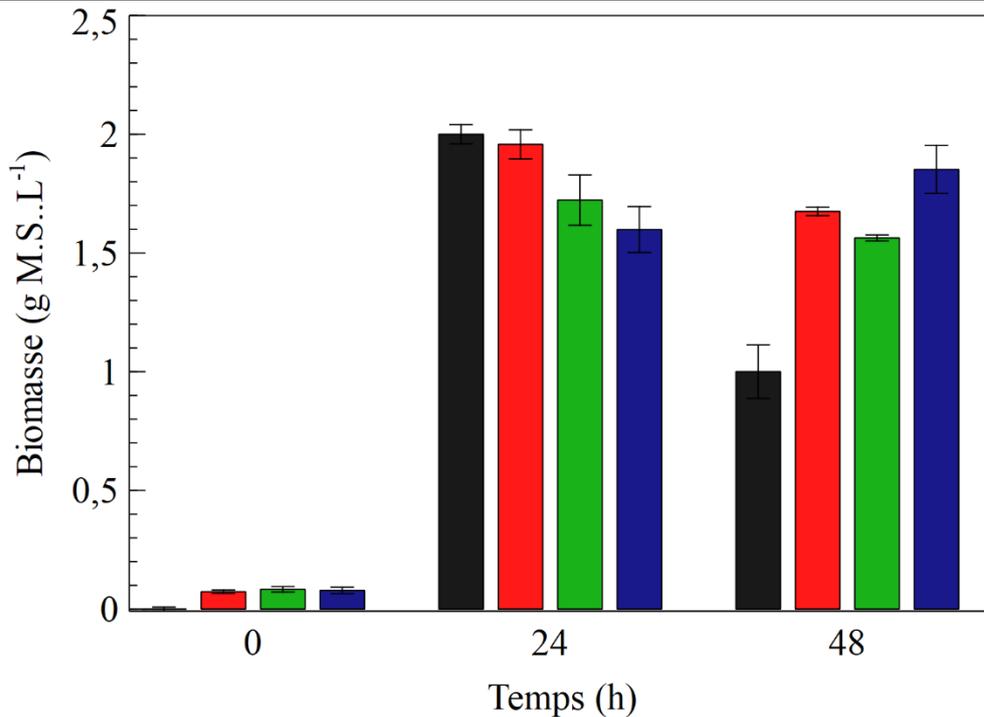


Figure 32 : Evolution de la concentration en biomasse en fonction du temps à différentes conditions d'agitation. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer en milieu de Landy optimisé. Noir, $k_{La}=15 \text{ h}^{-1}$; rouge, $k_{La}=49 \text{ h}^{-1}$; vert, $k_{La}=86 \text{ h}^{-1}$; bleu, $k_{La}=119 \text{ h}^{-1}$

La biomasse planctonique augmente fortement entre 0 et 24 h de culture pour atteindre des valeurs allant de 2 g M.S..L⁻¹ pour une aération de 15 h⁻¹ à 1,5 g M.S..L⁻¹ pour une aération plus importante de 119 h⁻¹. Entre 24 et 48h la concentration en biomasse diminue pour toutes les conditions sauf la plus forte aération où une légère augmentation est observée.

5.3 Analyse de la production de surfactine

L'évolution de la concentration en surfactine aux différentes conditions d'agitation est présentée dans la Figure 33.

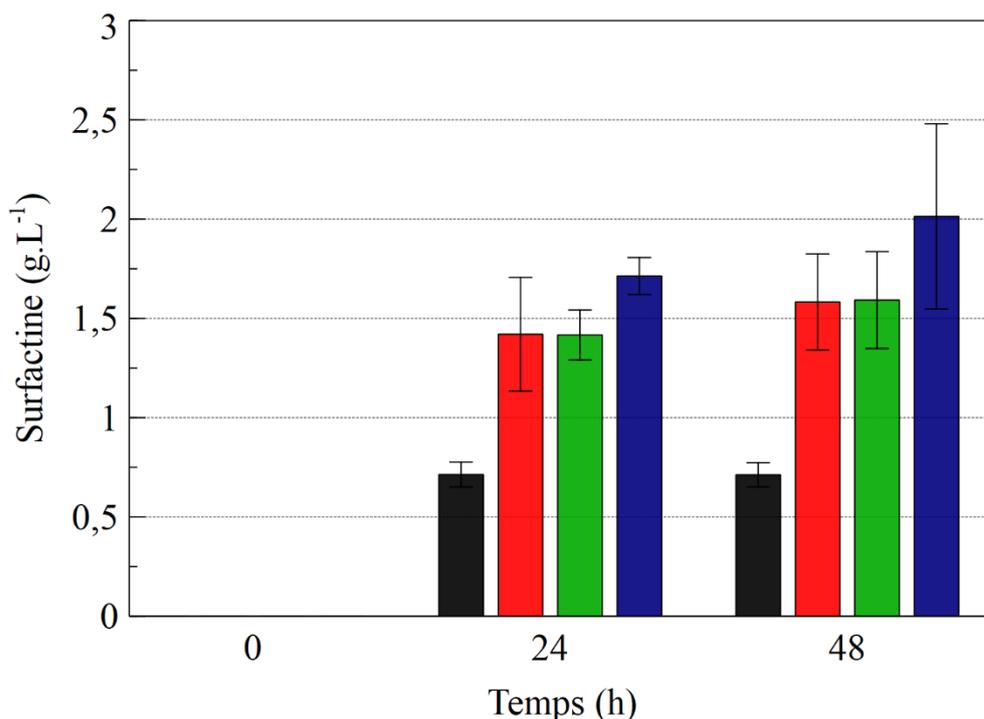


Figure 33 : Evolution de la concentration en surfactine en fonction du temps à différentes conditions d'agitation. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer avec du milieu de Landy optimisé Noir, $k_{La}=15 \text{ h}^{-1}$; rouge, $k_{La}=49 \text{ h}^{-1}$; vert, $k_{La}=86 \text{ h}^{-1}$; bleu, $k_{La}=119 \text{ h}^{-1}$

La surfactine apparaît dès 24 h de culture avec une concentration croissante en fonction du k_{La} pouvant varier du simple au double entre une aération de 15 h^{-1} et une aération de 119 h^{-1} . Les productions en surfactine sont sensiblement identiques entre 49 h^{-1} et 119 h^{-1} . La concentration en surfactine n'évolue plus après 24h d'incubation.

5.4 Analyse de la consommation de substrat et de la production de métabolites primaires

Le substrat contenu dans le milieu de Landy est le glucose concentré à 20 g.L^{-1} . L'évolution de la concentration en glucose dans le milieu de culture est présentée dans la Figure 34. Dès 24 h de culture seule une concentration résiduelle de glucose est détectée et cette dernière reste constante jusqu'à 48 h.

5. Mise en évidence de l'impact de l'aération sur la production de surfactine par des tests en fiole

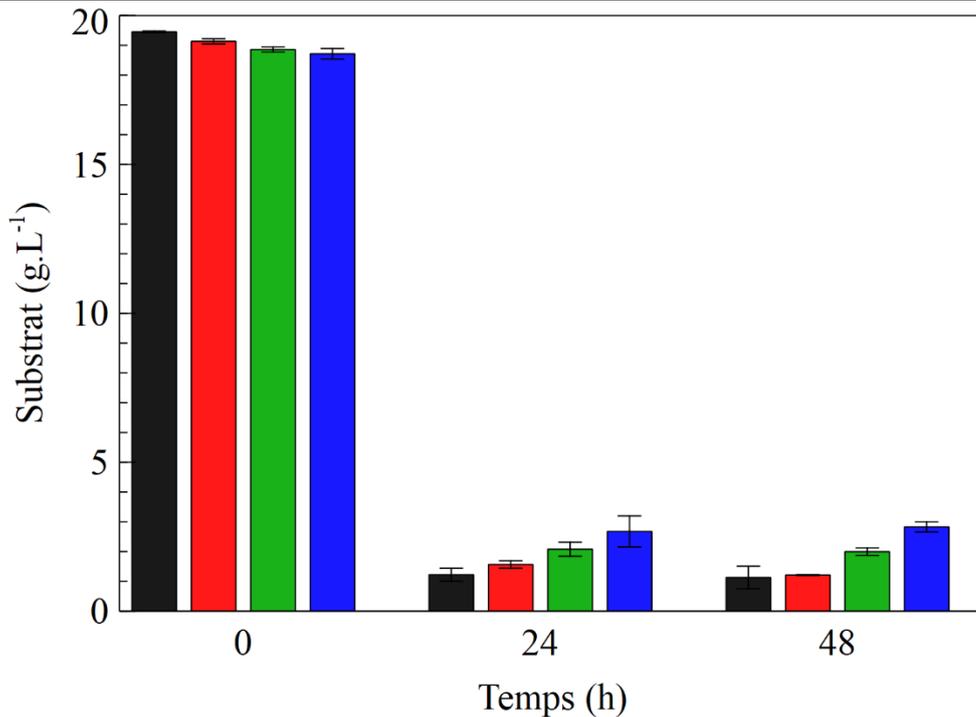


Figure 34 : Evolution de la concentration en substrat en fonction du temps à différentes conditions d'agitation. Culture de *B. subtilis* BGG131 en fiole erlenmeyer avec du milieu de Landy optimisé Noir, $k_{La}=15 \text{ h}^{-1}$; rouge, $k_{La}=49 \text{ h}^{-1}$; vert, $k_{La}=86 \text{ h}^{-1}$; bleu, $k_{La}=119 \text{ h}^{-1}$

Les métabolites primaires sélectionnés pour être analysés sont l'acide lactique, l'acide acétique et le 2,3-butanediol. Les concentrations en métabolites primaires sont nulles en début de culture. Ils apparaissent dès 24 h de culture. La concentration en lactate augmente avec le k_{La} avec un maximum de 3 g.L^{-1} pour une aération de 119 h^{-1} . Les concentrations en acétate sont sensiblement les mêmes ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$) et n'évolue pas entre 24 et 48 h. Du 2,3-butandiol est détecté dans toutes les cultures jusqu'à 2 g.L^{-1} . La concentration en 2,3-butandiol diminue à 48 h de culture de moitié pour toutes les conditions sauf l'aération la plus faible (15 h^{-1}) où la concentration varie pas.

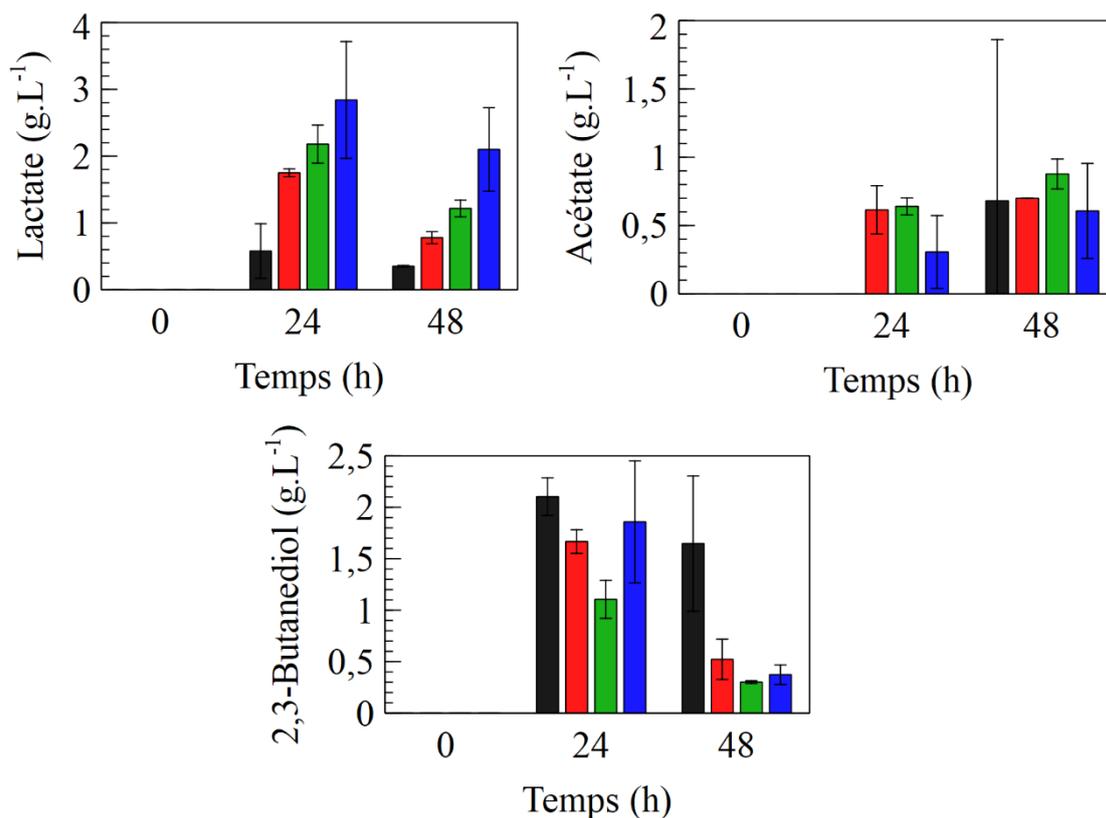


Figure 35 : Evolution de la concentration en métabolites primaires en fonction du temps à différentes conditions d'agitation. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer en milieu de Landy optimisé. Noir, $k_{La}=15 \text{ h}^{-1}$; rouge, $k_{La}=49 \text{ h}^{-1}$; vert, $k_{La}=86 \text{ h}^{-1}$; bleu, $k_{La}=119 \text{ h}^{-1}$

5.5 Résultats de culture aux différentes conditions d'aération

Les résultats de culture en fiole sont résumés dans le Tableau 12. Les différents indicateurs sont également présentés. Les cultures sont considérées terminées à 24 h car la concentration en glucose reste ensuite constante jusque 48 h.

Tableau 12 : Principaux résultats de culture à différentes conditions d'aération à 24 h. Culture de *B. subtilis* BBG131 en fiole d'Erlenmeyer en milieu de Landy optimisé

k_{La}	h^{-1}	15	49	86	119
X	(mg MS/L)	2,0±0,1	2,0±0,1	1,7±0,2	1,6±0,1
P surfactine	(mg/L)	0,7±0,06	1,4±0,3	1,4±0,2	1,7±0,1
S	(g/L)	1,2±0,3	1,6±0,2	2,1±0,3	2,7±0,6
$Y_{P/X}$	(g/g MS)	0,35	0,70	0,82	1,1
$Y_{P/S}$	(mg/g)	0,04	0,08	0,08	0,10

Les rendements de surfactine sur biomasse $Y_{P/X}$ et de surfactine sur substrat (glucose) suivent une amélioration constante et proportionnelle à l'augmentation de l'apport en oxygène. L'augmentation du $Y_{P/S}$ montre une meilleure utilisation du glucose pour la production de surfactine avec l'augmentation de l'aération.

5.6 Discussion

Les résultats montrent l'importance des conditions d'aération dans le cadre de la production de surfactine. En effet, le métabolisme de *Bacillus subtilis* BBG131 est fortement dépendant de la disponibilité de l'accepteur final d'électron qui est l'oxygène. La production de surfactine étant directement liée à la croissance bactérienne par suite des modifications génétiques de la souche, les conditions d'aération apparaissent comme un paramètre de culture primordial pour l'optimisation de la production.

6 Modélisation de l'aération sans micro-organismes dans un bioréacteur aéré par membrane

6.1 Introduction

La modélisation du transfert d'oxygène sans micro-organisme s'est révélée être une étape essentielle de l'étude de ce système. En effet, afin de découpler les phénomènes de transfert purs et les phénomènes de réaction (consommation) dus au biofilm bactérien, une première étude sans micro-organisme permettra de cibler et de modéliser à l'aide du couplage analyse dimensionnelle et plan d'expériences le transfert d'oxygène à travers une membrane de 24 cm².

6.2 Données expérimentales

Les résultats dimensionnels pour k_{La} et k_L obtenus ainsi que les conditions expérimentales testées sont repris dans le Tableau 13. Le Tableau 14 reprends les valeurs expérimentales adimensionnelles correspondantes. Les données obtenues par le plan d'expériences sont présentées en gris et numérotées de 1 à 8 tandis que les données supplémentaires sont en blanc et numérotées de 9 à 18. Chaque résultat présenté correspond à la moyenne d'au moins trois répétitions.

6. Modélisation de l'aération sans micro-organismes dans un bioréacteur aéré par membrane

Tableau 13 : Conditions expérimentales dimensionnelles testées (5 premières colonnes) et résultats dimensionnels de performance d'aération mesurés (2 dernières colonnes). Les données obtenues dans le cadre du plan d'expériences apparaissent en gris (# 1 à 8). Le reste des résultats (#9 à 18) est issu d'expériences supplémentaires

N° exp	Q _L (mL.min ⁻¹)	V _L (L)	p _G (Pa)	σ (mN.m ⁻¹)	k _{La} (s ⁻¹)	k _L (m.s ⁻¹)
1	2	0,15	5 10 ⁴	70	8,5 10 ⁻⁵	1,9 10 ⁻⁸
2	6	0,15	5 10 ⁴	27	15,3 10 ⁻⁵	3,5 10 ⁻⁸
3	2	0,45	5 10 ⁴	27	4,5 10 ⁻⁵	1,0 10 ⁻⁸
4	6	0,45	5 10 ⁴	70	10,2 10 ⁻⁵	2,3 10 ⁻⁸
5	2	0,15	10 ⁵	27	6,4 10 ⁻⁵	1,4 10 ⁻⁸
6	6	0,15	10 ⁵	70	12,9 10 ⁻⁵	2,9 10 ⁻⁸
7	2	0,45	10 ⁵	70	4,3 10 ⁻⁵	1,0 10 ⁻⁸
8	6	0,45	10 ⁵	27	6,3 10 ⁻⁵	1,4 10 ⁻⁸
9	2	0,15	10 ⁵	70	5,4 10 ⁻⁵	1,2 10 ⁻⁸
10	4	0,15	10 ⁵	70	7,3 10 ⁻⁵	1,7 10 ⁻⁸
11	10	0,15	10 ⁵	70	9,9 10 ⁻⁵	2,3 10 ⁻⁸
12	20	0,15	10 ⁵	70	15,4 10 ⁻⁵	3,5 10 ⁻⁸
13	6	0,30	10 ⁵	70	8,7 10 ⁻⁵	2,0 10 ⁻⁸
14	6	0,45	10 ⁵	70	7,1 10 ⁻⁵	1,6 10 ⁻⁸
15	6	0,15	5 10 ⁴	70	12,6 10 ⁻⁵	2,9 10 ⁻⁸
16	6	0,15	1,5 10 ⁵	70	13,2 10 ⁻⁵	1,9 10 ⁻⁸
17	6	0,15	10 ⁵	32	10,6 10 ⁻⁵	2,4 10 ⁻⁸
18	6	0,15	10 ⁵	28	10,4 10 ⁻⁵	2,4 10 ⁻⁸
19	6	0,15	10 ⁵	27	11,3 10 ⁻⁵	2,6 10 ⁻⁸

Les valeurs de k_{La} obtenues sont significativement plus faible que les valeurs habituellement retrouvées dans la littérature portant sur les bioréacteurs (k_{La} de 10⁻² s⁻¹ (Fahim et al., 2013; Hassan et al., 2012)). Cela s'explique par la taille des membranes utilisées (24 cm²) volontairement sélectionnée comme la plus petite possible afin de faciliter la mise en place des expériences et initier le scale-up. Les valeurs de k_{La} sont supposées être proportionnelles à la surface d'échange et par conséquent seront plus élevées sur des systèmes comprenant de plus grandes membranes (k_{La} de 10⁻² s⁻¹ pour une membrane de 2,5 m² (Coutte et al., 2013)).

Tableau 14 : Conditions expérimentales adimensionnelles testées (5 premières colonnes) et résultats adimensionnels de performance d'aération mesurés (2 dernières colonnes). Les données obtenues dans le cadre du plan d'expériences apparaissent en gris (# 1 à 8). Le reste des résultats (#9 à 18) est issu d'expériences supplémentaires

N° exp	Re	V_L^*	p_G^*	σ^*	$k_L a^*$	Sh
1	11	$3,6 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	$4,7 \cdot 10^{-5}$	$6,9 \cdot 10^{-3}$
2	33	$3,6 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^4$	$8,6 \cdot 10^{-5}$	$12,4 \cdot 10^{-3}$
3	11	$10,7 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^4$	$2,5 \cdot 10^{-5}$	$3,6 \cdot 10^{-3}$
4	33	$10,7 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	$5,7 \cdot 10^{-5}$	$8,2 \cdot 10^{-3}$
5	11	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^4$	$3,6 \cdot 10^{-5}$	$5,2 \cdot 10^{-3}$
6	33	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	$7,4 \cdot 10^{-5}$	$10,5 \cdot 10^{-3}$
7	11	$10,7 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	$2,4 \cdot 10^{-5}$	$3,4 \cdot 10^{-3}$
8	33	$10,7 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^4$	$3,5 \cdot 10^{-5}$	$5,1 \cdot 10^{-3}$
9	11	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	3,0	4,4
10	22	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	4,1	5,9
11	56	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	5,6	8,0
12	111	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	8,6	12,4
13	33	$7,1 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	4,9	7,0
14	33	$10,7 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	4,0	5,8
15	33	$3,6 \cdot 10^5$	$2,8 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	7,1	10,2
16	33	$3,6 \cdot 10^5$	$8,4 \cdot 10^7$	$5,2 \cdot 10^4$	4,7	6,7
17	33	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$2,4 \cdot 10^4$	6,0	8,6
18	33	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$2,1 \cdot 10^4$	5,8	8,4
19	33	$3,6 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$	$2,0 \cdot 10^4$	6,4	9,2

Concernant les valeurs de k_L , la comparaison est complexe car ce dernier représente la résistance au transfert côté liquide liée (i) aux propriétés physico-chimiques de la phase liquide et (ii) aux conditions hydrodynamiques d'écoulement à l'intérieur des fibres côté liquide dépendant de la géométrie de la membrane. Une large gamme de valeurs de k_L est retrouvée dans la littérature, par exemple 10^{-4} m.s^{-1} pour une colonne à bulle à l'échelle laboratoire (Painmanakul et al., 2005) et 10^{-2} m.s^{-1} dans une membrane dense à fibres creuses en silicone de $0,0258 \text{ m}^2$ (Côté et al., 1989).

6.3 Analyse statistique du plan d'expériences fractionnaire

Les résultats statistiques du plan d'expériences fractionnaire, obtenus avec le logiciel Modde Pro 12, ont montré une valeur de R^2 de 0,95 pour l'équation (II 6.4), indiquant

6. Modélisation de l'aération sans micro-organismes dans un bioréacteur aéré par membrane

que le modèle de régression obtenu par le plan d'expériences décrit correctement les données expérimentales. La valeur de Q^2 , égale à 0,89 pour l'équation (II 6.4), démontre une capacité précise de prédiction du modèle. Les mêmes observations peuvent être faites sur les résultats statistiques de l'équation (II 6.9) (respectivement 0,95 pour R^2 et 0,89 pour Q^2). Ces résultats montrent que le couplage du plan d'expériences et de l'analyse dimensionnelle est tout à fait adapté pour obtenir rapidement une relation de procédé.

Les effets calculés avec le plan d'expériences sont présentés dans le Tableau 15. Chaque paramètre est supposé indépendant car aucune interaction ne s'est révélée significativement influente en comparant les effets à l'intervalle de confiance repris dans la légende du Tableau 15.

Tableau 15 : Effets obtenus avec le plan d'expériences pour le nombre de Sherwood et le $k_L a^*$ adimensionnel. L'intervalle de confiance est (i) Sherwood polynomiale $\pm 0,8 \cdot 10^{-3}$, (ii) Sherwood monomiale $\pm 0,9$, (iii) $k_L a^*$ polynomiale $\pm 0,5 \cdot 10^5$ and (iv) $k_L a^*$ monomiale $\pm 0,7$

	Polynomiale		Monomiale		
	Sherwood	$k_L a^*$	Sherwood	$k_L a^*$	
α_1	2,1 10^{-3}	1,5 10^{-5}	β_1	0,31	0,32
α_2	-1,8 10^{-3}	-1,3 10^{-5}	β_2	-0,27	0,27
α_3	-0,9 10^{-3}	-0,6 10^{-5}	β_3	-0,12	-0,12
α_4	-0,3 10^{-3}	-0,3 10^{-5}	β_4	-0,07	-0,07
α_{12}	-0,6 10^{-3}	-0,4 10^{-5}	β_{12}	-0,01	-0,01
α_{13}	-0,4 10^{-3}	-0,3 10^{-5}	β_{13}	-0,04	-0,04
α_{14}	0,0	0,0	β_{14}	-0,01	-0,01

La comparaison entre les effets et l'intervalle de confiance indique que seul trois des quatre facteurs étudiés ont un impact significatif sur le nombre de Sherwood et le $k_L a^*$. Il est à noter que les coefficients α_3 et β_3 correspondant au paramètre pression se trouvent relativement proche de l'intervalle de confiance. Ce paramètre est donc, parmi ceux qui influent significativement, celui dont l'impact est le plus faible sur la réponse observée, le transfert d'oxygène.

Les facteurs les plus influents sont : (i) le nombre de Reynolds membrane, (ii) le volume adimensionnel de liquide dans la cuve et (iii) la pression adimensionnelle de gaz car leurs effets sont largement plus grands que l'intervalle de confiance, et cela pour les deux formes mathématiques étudiées. Le nombre de Reynolds est communément retrouvé dans les relations de procédés de la littérature (Catapano et al., 2004; Gabelman and Hwang, 1999) tandis que le volume et la pression ne sont que très peu étudiés et donc rarement pris en compte.

Toutes ces observations permettent de réécrire les équations (II 6.4) à (II 6.9) respectivement en les équations (III 6.1) et (III 6.2), permettant de ne garder que les paramètres significativement influents.

$$\pi_{target} = A' + \frac{\alpha_1}{\Delta Re} Re + \frac{\alpha_2}{\Delta V_L^*} V_L^* + \frac{\alpha_3}{\Delta p_G^*} p_G^* \quad (\text{III 6.1})$$

$$\pi_{target} = B' \cdot Re^{\frac{\beta_1}{\Delta \ln(Re)}} \cdot V_L^{\frac{\beta_2}{\Delta \ln(V_L^*)}} \cdot p_G^{\frac{\beta_3}{\Delta \ln(p_G^*)}} \quad (\text{III 6.2})$$

Il est à noter que les équations (III 6.1) et (III 6.2) ne contiennent que trois effets significativement influents et aucune interaction.

En remplaçant chaque constante et chaque effet par sa valeur, les équations (III 6.1) et (III 6.2) deviennent les équations (III 6.3) à (III 6.6).

$$Sh = 8,87 \cdot 10^{-3} + 1,95 \cdot 10^{-4} Re - 5,10 \cdot 10^{-9} V_L^* - 6,22 \cdot 10^{-11} p_G^* \quad (\text{III 6.3})$$

$$k_L a^* = 6,11 \cdot 10^{-5} + 1,37 \cdot 10^{-6} Re - 3,58 \cdot 10^{-11} V_L^* - 4,18 \cdot 10^{-13} p_G^* \quad (\text{III 6.4})$$

$$Sh = 428 \cdot Re^{0,57} \cdot (V_L^*)^{-0,49} \cdot (p_G^*)^{-0,36} \quad (\text{III 6.5})$$

$$k_L a^* = 2,75 \cdot Re^{0,58} \cdot (V_L^*)^{-0,50} \cdot (p_G^*)^{-0,35} \quad (\text{III 6.6})$$

Les équations (III 6.3) à (III 6.6) sont les relations de procédés préliminaire (avant optimisation) décrivant les évolutions du nombre de Sherwood ou du $k_L a^*$ par différentes formes mathématiques (polynomiale ou monomiale).

La comparaison entre données expérimentales et données prédites permet de calculer l'écart-type moyen qui est de 20 %, 21 %, 16 % et 16 % pour respectivement les équations (III 6.3), (III 6.4), (III 6.5) et (III 6.6).

La méthodologie développée ici prouve que la combinaison entre analyse dimensionnelle et plan d'expériences est une méthode efficace pour obtenir rapidement des équations mathématiques de relation de procédé (déterminées par régression multilinéaire). Ici seules 8 expériences découlant du plan d'expériences fractionnaire ont permis de réaliser une modélisation.

De plus, il a été démontré que la méthode des plans d'expériences initialement prévue pour obtenir des formes mathématiques polynomiale peut être adapté pour obtenir des relations de procédés sous forme monomiale (voir chapitre § II 6.1.2) sans nécessité d'expériences supplémentaires. Cette découverte est très intéressante surtout dans le domaine de l'ingénierie chimique ou biologique car la majorité des corrélations empiriques (ou relations de procédés) sont données et connues sous forme monomiale. Comme souligné dans le livre de Delaplace et al., (2015), même si rien ne garantit que la relation de procédé sera capable de décrire la « vrai » loi physique (qui est théorique mais analytiquement inaccessible), la forme monomiale est généralement utilisée. Ce choix s'explique également par le nombre d'inconnus à identifier qui est minimisé et par la capacité de cette forme à approximer une large gamme de fonctions mathématiques.

6.4 Analyse des effets de la relation de procédé préliminaire

L'analyse des relations empiriques (équations (III 6.3) à (III 6.6)) montre des tendances similaires pour décrire les variations des variables cibles (nombre de Sherwood et $k_L a^*$) en fonction des nombres sans dimension. Le débit de liquide adimensionnel est le paramètre ayant l'influence positive la plus élevée sur le transfert d'oxygène. Le volume de liquide dans la cuve est le paramètre ayant l'impact négatif le plus élevé. La pression de gaz adimensionnelle a également un effet non négligeable mais plus modéré tandis que la tension de surface adimensionnelle n'est pas significativement influente.

L'augmentation du débit de liquide dans les fibres améliore grandement les capacités de transfert d'oxygène comme également remarqué dans les travaux de Ahmed and

Semmens, (1992b). Cela peut s'expliquer par l'augmentation de la vitesse de circulation du liquide qui impact directement l'épaisseur de la couche limite de diffusion ((Casey et al., 2000b; De Napoli et al., 2014). Une étude similaire utilisant une membrane dense en silicone et une circulation du liquide à l'extérieur des fibres a noté une augmentation du nombre de Sherwood de 4,7 à 19,3 en faisant varier le nombre de Reynolds de 0,6 à 49 (Côté et al., 1989). Le transfert d'oxygène peut donc être optimisé en choisissant le débit de liquide le plus élevé compatible avec les contraintes du système utilisé (capacité de la pompe, pression dans la membrane...).

L'effet de la pression était censé être lissé en corrigeant l'impact de C_p^* pour chaque pression, mais un impact négatif de l'augmentation de la pression sur le transfert d'oxygène a été observé. Cette observation indique que ce paramètre n'aurait pas seulement une influence sur la force motrice due au gradient de concentration mais également sur la résistance au transfert. Ahmed and Semmens, (1992a) ont observé une amélioration du transfert avec l'élévation de la pression dans un système similaire avec une membrane à fibres creuses dont la sortie de gaz est scellée. Cette amélioration est supposée n'être qu'une conséquence de la rétrodiffusion du nitrogène dans la phase gaz créant une variance dans la mesure. Une seconde étude avec une membrane dense et une circulation de gaz à l'intérieur des fibres montre que la pression partielle en oxygène n'a aucun effet jusqu'à 3 bars (Côté et al., 1989). Dans notre cas, il n'y a à priori pas de rétrodiffusion étant donné qu'un flux de gaz est maintenu constant durant la durée de l'expérience. La diminution du transfert d'oxygène observé peut être due à une déformation de la membrane avec l'augmentation de la pression de gaz (qui circule à l'extérieur des fibres). Cette déformation pourrait réduire la taille effective des pores et entraîner une réduction de la surface de contact entre les phases gaz et liquide.

La tension de surface adimensionnelle ne semble pas avoir d'influence significative sur les variables cibles. Ce paramètre a d'ores et déjà été étudié dans d'autres systèmes de contacteur gaz-liquide tels que des colonnes à bulles, des bioréacteurs à cuve agitée ou des bioréacteurs triphasés à lit fluidisé inversé (TPIFB). Les résultats obtenus sont inhabituels dans le domaine du transfert de matière gaz-liquide en bioréacteur à bulle. En effet, l'aération par bullage est fortement impactée par la tension de surface qui, quand elle diminue, aide à réduire la taille des bulles entraînant une augmentation de la surface de contact. L'impact secondaire également retrouvé

en aération par bullage est la modification du coefficient de transfert de matière côté liquide (k_L) en changeant le temps caractéristique à l'interface des bulles (Painmanakul et al., 2005). Dans notre cas, étant donné qu'il n'y a pas de bulles, le surfactant ne peut avoir d'effet que par son adhésion à la membrane. Une étude utilisant la même membrane (à l'exception de la taille 2,5 m² vs 24 cm²) a trouvé une diminution du k_{LA} de 35 % avec une membrane saturée en surfactant (Coutte et al., 2010). Une seconde étude s'intéressant à une membrane dense en silicone a observé une augmentation de 20 % du coefficient de transfert de matière attribuée à la modification des propriétés de la membrane lors d'addition de l'équivalent de 6 mg.L⁻¹ de surfactant (Côté et al., 1989). La comparaison de ces données suggère que l'effet de la tension de surface dans un système sans bullage est largement dépendant du type de membrane utilisé et donc de l'interaction entre le matériau utilisé et le surfactant. Ici, le transfert d'oxygène à travers la membrane microporeuse en polysulfone ne semble pas être modifié par la présence de surfactant.

6.5 Optimisation de la relation de procédé préliminaire

Afin d'améliorer la précision de la relation de procédé précédemment établie en utilisant les données expérimentales du plan d'expérience (#1 à #8), l'ensemble des données collectées (#1 à #19) ont été utilisées. Pour cela, une régression multilinéaire et le solveur de Microsoft Excel ont été utilisés (voir Chapitre III.6.2).

Le Tableau 16 présente les différentes équations prédictives ((III 6.7) à (III 6.10)) pour le nombre de Sherwood et le k_{LA}^* trouvé dans cette étude. Ces équations prédictives, sous forme monomiale et polynomiale, ne prennent en considération que les nombres sans dimension significativement influents selon le plan d'expérience. Les écarts types moyens (MSD) associés aux équations sont également donnés.

Chaque relation est valide sur le domaine $11 < Re < 111$, $3,6 \cdot 10^5 < V_L^* < 1,1 \cdot 10^6$ et $2,8 \cdot 10^7 < p_G^* < 8,4 \cdot 10^7$ qui correspond aux valeurs dimensionnelles $3,3 \cdot 10^{-8} < Q_L < 10^{-7}$ m³.s⁻¹, $0,15 < V_L < 0,45$ L et $5 \cdot 10^4 < p_G < 1,5 \cdot 10^5$ Pa. Les valeurs des paramètres non variables ont été fixées menant aux nombres sans dimension suivants : $\pi_6 = 4,12 \cdot 10^3$, $\pi_7 = 4,05 \cdot 10^1$, $\pi_8 = 9,33 \cdot 10^1$, $\pi_9 = 3,33 \cdot 10^{-1}$, $\pi_{12} = 8,67 \cdot 10^{-4}$, $\pi_{13} = 1,64 \cdot 10^3$, $\pi_{14} = 4$, $\pi_{15} = 1,27 \cdot 10^{-3}$, $\pi_{16} = 1,89 \cdot 10^{-2}$, $\pi_{17} = 8,42 \cdot 10^1$, $\pi_{18} = 5,54 \cdot 10^6$.

La relation de procédé sous forme monomiale décrivant les performances d'aération implique habituellement le nombre de Schmidt (Sc) avec un exposant fixe de 0,33 (Kavousi et al., 2016). Le nombre de Schmidt, $\mu/\rho D$, est un nombre matériaux pure, qui dépend exclusivement des propriétés du liquide agité et de la diffusivité de l'oxygène, D , dont les valeurs ne changent pas au cours de ces travaux.

Tableau 16 : Comparaison des équations mathématiques et de l'écart-type standard pour les valeurs prédites du nombre de Sherwood et du $k_L a^*$

Origine	Équation	MSD	
(III 6.3) optimisée	$Sh = 6,2 \cdot 10^{-3} + 1,3 \cdot 10^{-4} Re - 2,5 \cdot 10^{-9} V_L^* - 2,8 \cdot 10^{-11} p_g^*$	13,2 %	(III 6.7)
(III 6.4) optimisée	$Sh = 58,7 \cdot Re^{0,47} \cdot (V_L^*)^{-0,36} \cdot (p_g^*)^{-0,33}$	10,3 %	(III 6.8)
(III 6.5) optimisée	$k_L a^* = 4,8 \cdot 10^{-5} + 7,9 \cdot 10^{-7} Re - 2,2 \cdot 10^{-11} V_L^* - 1,9 \cdot 10^{-13} p_g^*$	13,0 %	(III 6.9)
(III 6.6) optimisée	$k_L a^* = 6,8 \cdot Re^{0,52} \cdot (V_L^*)^{-0,36} \cdot (p_g^*)^{-0,49}$	10,3 %	(III 6.10)

Côté et al., (1989) ont obtenu expérimentalement la relation $Sh = 0,61 Re^{0,363} Sc^{0,333}$ (avec Re variant de 0,6 à 49) pour décrire le transfert de matière dans des systèmes d'aération par membrane (sans bullage). Plus récemment, Kavousi et al., (2016) ont proposés la relation $Sh = 1,7 Re^{0,42} Sc^{0,33}$ pour décrire par une approche CFD les performances de transfert de gaz dans une membrane à fibre creuse confinée, c'est à dire avec la sortie gaz fermée (avec Re variant de 1100 à 5500). La valeur du coefficient du nombre de Reynolds (0,47) retrouvé dans ces travaux coïncident donc avec la littérature.

La précision des relations de procédés obtenues s'améliore avec l'augmentation du nombre de données prises en compte (Tableau 16). Cependant, il faut noter que la précision des relations préliminaires (équations (III 6.3) à (III 6.6) obtenues avec seulement le plan d'expérience) reste proche de celle des relations optimisées obtenues avec l'ensemble des données (équations (III 6.7) à (III 6.10)), et plus spécifiquement pour les relations décrivant le $k_L a^*$.

6. Modélisation de l'aération sans micro-organismes dans un bioréacteur aéré par membrane

Les valeurs prédites par la forme monomiale (équations (III 6.4) et (III 6.8)), qui possède le plus faible écart-type moyen, sont comparées aux valeurs expérimentales du nombre de Sherwood (et respectivement du k_{La}^* , équations (III 6.6) et (III 6.10)) dans la Figure 36. Cette dernière illustre également la faible amélioration de la précision de prédiction lors de l'optimisation des équations décrivant le k_{La}^* et une forte amélioration pour les équations décrivant le nombre de Sherwood. Les tendances obtenues à l'aide du plan d'expérience sont confirmées lors de la prise en compte des expériences additionnelles.

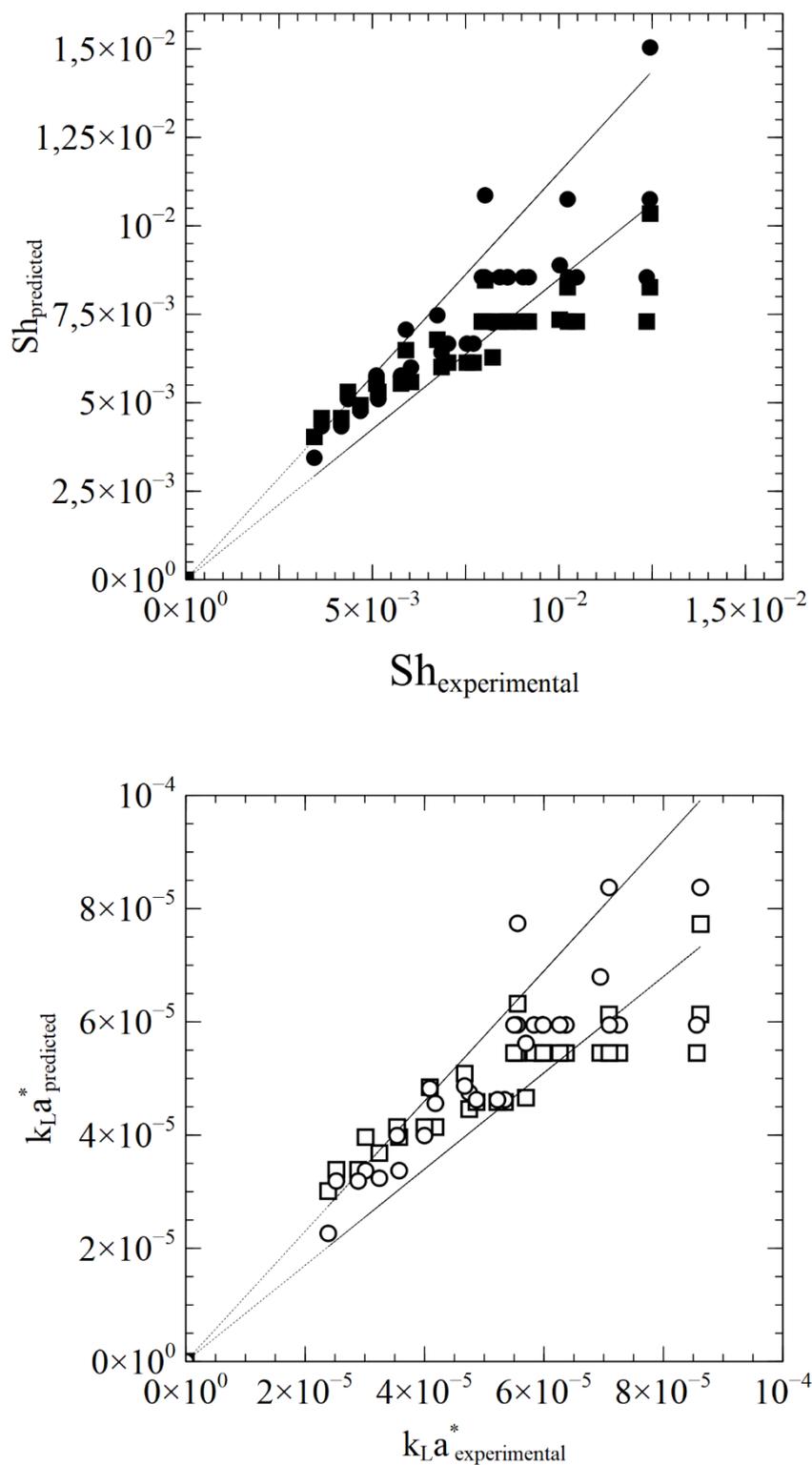


Figure 36 : Comparaison entre les valeurs expérimentales et prédites du nombre de Sherwood et du $k_L a^*$. Les valeurs prédites sont obtenues par différentes équations. Cercle plein, eq. (III 6.4), carré plein, eq. (III 6.6), cercle vide, eq. (III 6.8), carré vide, eq. (III 6.10). Les lignes en pointillées représentent les valeurs prédites avec un écart-type standard de $\pm 15\%$.

En conclusion, les équations (III 6.8) et (III 6.10) montrent la ressemblance de comportements du nombre de Sh et du k_{LA}^* en fonction des variations des nombres sans dimension. En effet, les coefficients suivent les mêmes variations et sont relativement proches les uns des autres pour chaque paramètre.

L'utilisation des données supplémentaires récoltées à l'aide des expériences complémentaires a permis d'étendre le domaine de validité des relations obtenues et par conséquent le champ des applications potentielles. Les résultats confirment également que la forme monomiale souvent retrouvée dans la littérature comme l'équation (II 6.5) est mieux adaptée pour la prédiction du transfert d'oxygène à travers une membrane.

6.6 Validité des relations empiriques pour le k_{LA} et le k_L à plus grande échelle

Un système de production de surfactine identique a été utilisé lors de travaux précédents pour étudier le transfert d'oxygène avec la même membrane en polysulfone à l'exception de la surface d'échange qui est de 2,5 m² (Tableau 17) (Coutte et al., 2010). La valeur de k_{LA} trouvée est de $4,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ sur des membranes usées (après fermentation et lavage) mais aucune étude des paramètres influents n'a été réalisée.

En utilisant les relations trouvées dans cette étude (ici l'équation (III 6.10)) pour prédire le k_{LA} dans le cas précédent, un résultat différent est retrouvé ($4,3 \cdot 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ au lieu de $4,3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$). Cela signifie que des paramètres qui n'ont pas été variés dans cette étude et dont l'effet a été inclus dans la constante des équations (III 6.3) à (III 6.10) ont un effet non négligeable. Les ratios adimensionnels intégrés dans la constante qui sont affectés par un changement de taille de membrane sont les ratios π_7 et π_{11} , π_{13} , π_{14} et π_{18} comme montré dans le Tableau 17. La constante de la relation de procédé pour une taille de membrane supérieure devrait donc être différente. Cependant, assumons que la surface d'échange adimensionnelle ($\pi_{13} = S^* = n \frac{L}{d_f}$) soit le principal ratio géométrique adimensionnel incluant l'effet d'un changement de surface d'échange et que la valeur de la constante des équations (III 6.3) à (III 6.10) soit proportionnelle à la surface d'échange adimensionnelle, nous obtenons :

$$A' \text{ or } B' = f 4_k(\pi_7, \pi_{11}, \pi_{13}, \pi_{14}, \pi_{18}) \quad (\text{III 6.11})$$

$$A'' \text{ or } B'' = r \cdot \pi_{13} \cdot f5_k(\pi_7, \pi_{11}, \pi_{14}, \pi_{18}) \quad (\text{III 6.12})$$

Avec A'' et B'' les constantes de la relation pour des échelles de membrane différentes indépendantes de la surface d'échange, f4 et f5 deux fonctions mathématiques et r le ratio des surfaces d'échange spécifiques (ici r=133).

Cela permet de calculer le k_{La} pour d'autres tailles de membranes en multipliant la constante des équations (III 6.3) à (III 6.10) par les ratios des surfaces. En tenant compte de cette hypothèse, les relations de procédés semblent valides pour le système à plus grande échelle (Coutte et al., 2010), confirmant l'intérêt de prédiction des relations (III 6.3) à (III 6.10).

Tableau 17 : Comparaison des paramètres de Coutte et al., (2010) et de cette étude

	Coutte et al., (2010)	Cette étude
Température (°C)	30	37
Surface de membrane (m²)	2,5	2,4 10 ⁻³
Volume d'eau dans la cuve (m³)	2,35 10 ⁻³	1,5 10 ⁻⁶ to 4,5 10 ⁻⁶
Surface d'échange spécifique (a) (m⁻¹)	1064	8
Nombre de Reynolds	16	11 to 111
Pression (bar)	0,5	0,5 to 1,5
k_{La} (s⁻¹)		
Avant la fermentation	1,1 10 ⁻²	5,4 10 ⁻⁵ to 1,1 10 ⁻⁴
Pendant la fermentation	6,2 10 ⁻³	-
Après la fermentation	1,1 10 ⁻³	-
Après nettoyage	4,3 10 ⁻³	1,1 10 ⁻⁴
Après adsorption de surfactine	7,1 10 ⁻³	-

6.7 Conclusion

Les performances d'aération d'un bioréacteur aéré par membrane à fibres creuses microporeuses produisant des biosurfactants ont été étudiées en couplant analyse dimensionnelle et plan d'expérience fractionnaire.

Ce couplage nécessite l'utilisation des nombres sans dimension en tant que facteurs du plan d'expérience (ici le débit de liquide dans les fibres, la pression de gaz à l'extérieur des fibres, le volume de liquide et la tension de surface). Cette combinaison

encore jamais utilisée à ce jour se trouve être une méthode efficace pour identifier rapidement les paramètres les plus influents et pour obtenir, avec un nombre d'expérience minimal, des relations empiriques décrivant l'évolution du transfert volumétrique d'oxygène adimensionnel k_{La}^* et le nombre de Sherwood.

Le plan d'expérience fractionnaire a permis d'obtenir des relations de procédés préliminaires correct à la fois sous forme monomiale et polynomiale avec un bon niveau de précision. Les expériences additionnelles ont été menées pour élargir le domaine de validité menant à deux équations empiriques (III 6.8) et (III 6.10) (écart-type inférieur à 11%) décrivant les performances de transfert d'oxygène. Il a également été prouvé que la relation décrivant le k_{La} dans un bioréacteur aéré par membrane à petite échelle pouvait être transposée pour prédire des résultats à plus grande échelle.

De ces équations sont déduits les moyens d'optimisation des performances d'aération dans un bioréacteur aéré par membrane à fibre creuse microporeuse. Les paramètres devraient être choisis de la manière suivante : (i) utiliser le débit de liquide maximal compatible techniquement avec les pompes et membranes, (ii) choisir la pression minimale de gaz pour éviter les déformations de la surface de membrane et (iii) minimiser le volume de liquide dans la cuve. Les relations adimensionnelles vont permettre également de guider le choix de la taille de la membrane d'un bioréacteur aéré par membrane à une échelle différente pour une valeur de k_{La} voulue.

Pour conclure, au-delà de cette étude dédiée aux performances d'aération dans un bioréacteur aéré par membrane, ce travail présente les lignes directrices du couplage de l'analyse dimensionnelle pour identifier rapidement les nombres sans dimension significativement influents et pour établir la relation empirique gouvernant le nombre sans dimension cible tout en réduisant les efforts expérimentaux.

6.8 Valorisation des résultats

Les résultats de cette partie ont donné lieu à une publication dans un journal à comité de lecture international ainsi qu'à trois communications par posters.

Publication :

Berth, A., Lecouturier, D., Loubiere, K., Dhulster, P., Delaplace, G., 2018. Modelling and optimisation of gas-liquid mass transfer in a microporous hollow fiber

membrane aerated bioreactor used to produce surfactin. *Biochem. Eng. J.*
doi:10.1016/J.BEJ.2018.10.029

Communications par posters :

Berth, A., Lecouturier, D., Delaplace, G., Dhulster, P., 2018. How to model aeration performances in a membrane contactor reactor coupling design experiment and dimensional analysis, *GPE Green Process Engineering*. Toulouse, France, 3-6 Juin.

Berth, A., Lecouturier, D., Delaplace, G., Dhulster, P., 2017. Etude de l'encrassement d'un bioreacteur à biofilm aéré par contacteur membranaire en fibre creuse microporeuse en utilisant l'analyse dimensionnelle, *SFGP Société Française du Génie des Procédés*. Nancy, France, 11 - 13 Juillet.

Berth, A., Lecouturier, D., Delaplace, G., Dhulster, P., 2017. Membrane aerated biofilm reactor: study of oxygen transfer through porous hollow fibers, *French Federation of Biotechnology – Bioreactors Symposium 2017, Innovative approaches in bioreactors design and operation*. Villeneuve d'Ascq, France, 15 - 16 May (Prix poster).

7 Caractérisation du biofilm

7.1 Introduction

La production de surfactine par un biofilm de *B. subtilis* a été étudiée dans un bioréacteur aéré par contacteur membranaire. Les principales variables cibles suivies sont le transfert d'oxygène et la production de surfactine. Les conditions initiales et limites n'ont pas été modifiées au cours de ces travaux (géométries de bioréacteur et de membrane uniques). Les paramètres opératoires variables qui ont été choisis sont :

- Paramètres matières : [glucose], [O₂]
- Paramètres procédé : Q_L , p_G

Le choix de ces paramètres procédé comme variables d'étude est issu de la modélisation de l'aération sans micro-organisme qui nous a permis de déterminer les paramètres significativement influents sur le transfert d'oxygène, soit le débit de liquide dans les fibres, la pression de gaz à l'extérieur des fibres et le volume de liquide dans la cuve.

Le volume de liquide dans la cuve n'a cependant pas été retenu comme paramètre variable du fait d'un mode de fonctionnement en continu. Par expérience, nous savons que la concentration en oxygène dissous dans la cuve devient rapidement nulle dans la cuve et le reste tout le long de l'expérience. Nous pouvons donc estimer que l'impact du volume de remplissage est limité sur les paramètres cibles. Cette hypothèse a été vérifiée a posteriori car la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide est restée nulle à partir de la phase transitoire pour chaque expérience.

Les paramètres matières ont été sélectionnés afin de faire varier les concentrations de deux substrats utilisés par *B. subtilis*, le glucose, qui est la principale source de carbone et d'énergie et l'oxygène qui est l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire. Nous utilisons d'ores et déjà un milieu optimisé par Motta Dos Santos et al., (2016). Seule la concentration en glucose a été modulée pour étudier l'impact sur le transfert à travers le biofilm.

Le taux de dilution a été sélectionné de manière à se placer en lessivage en choisissant un taux de dilution supérieur au taux de croissance de *B. subtilis* BBG131 ($\mu=0,33 \text{ h}^{-1}$ à 37°C, chapitre § II 3.2). Cette configuration permet d'éviter le maintien

des cellules planctoniques par croissance. La population bactérienne prépondérante présente dans le bioréacteur est donc le biofilm adhérent à la membrane en régime permanent et les cellules qui s'en détachent.

L'objectif de cette partie est dans un premier temps de présenter les résultats des cultures obtenus lors des différentes expériences de croissance de biofilm en régime continu. Les résultats de l'impact des paramètres opératoires sur le biofilm et de la production de la molécule d'intérêt, la surfactine, sont présentés dans un premier temps. Dans un second temps, l'analyse spécifique du transfert d'oxygène et la comparaison avec la modélisation obtenue sans micro-organismes seront abordées.

7.2 Exemple de culture et test de répétabilité

Toutes les expériences ont été menées avec les paramètres suivants fixes :

- Débit d'air à l'extérieur des fibres : $100 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- Volume de milieu : 0,2 L
- Taux de dilution : $0,5 \text{ h}^{-1}$

En revanche, chaque expérience ne fait varier qu'un des paramètres ci-dessous à la fois. Une expérience de référence a été réalisée avec des points centraux et en triplicata afin de vérifier la reproductibilité et d'obtenir un point de comparaison. Les points centraux sont les suivants :

- Débit de liquide dans les fibres : $10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$
- Pression de gaz à l'extérieur des fibres : 0,5 bar
- Concentration en glucose : $20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$
- Concentration en oxygène : 20 %

Les évolutions cinétiques des principaux paramètres de cette expérience de référence sont présentées dans la Figure 37. Les mêmes cinétiques sont disponibles en Annexe pour l'ensemble des conditions expérimentales testées.

Le régime est considéré permanent quand 2 à 3 valeurs stables (de biomasse et d'OTR, deux mesures disponibles en instantané) sont atteintes, et toujours après au moins 10 volumes de réacteur renouvelés. Seules les valeurs obtenues en régime permanent seront utilisées par la suite. Le biofilm se stabilise rapidement avec des valeurs stables au bout de 35 à 48 h. Les résultats de l'expérience de référence, issus

de triplicata, montrent une excellente répétabilité pour l'ensemble des mesures et analyses effectuées.

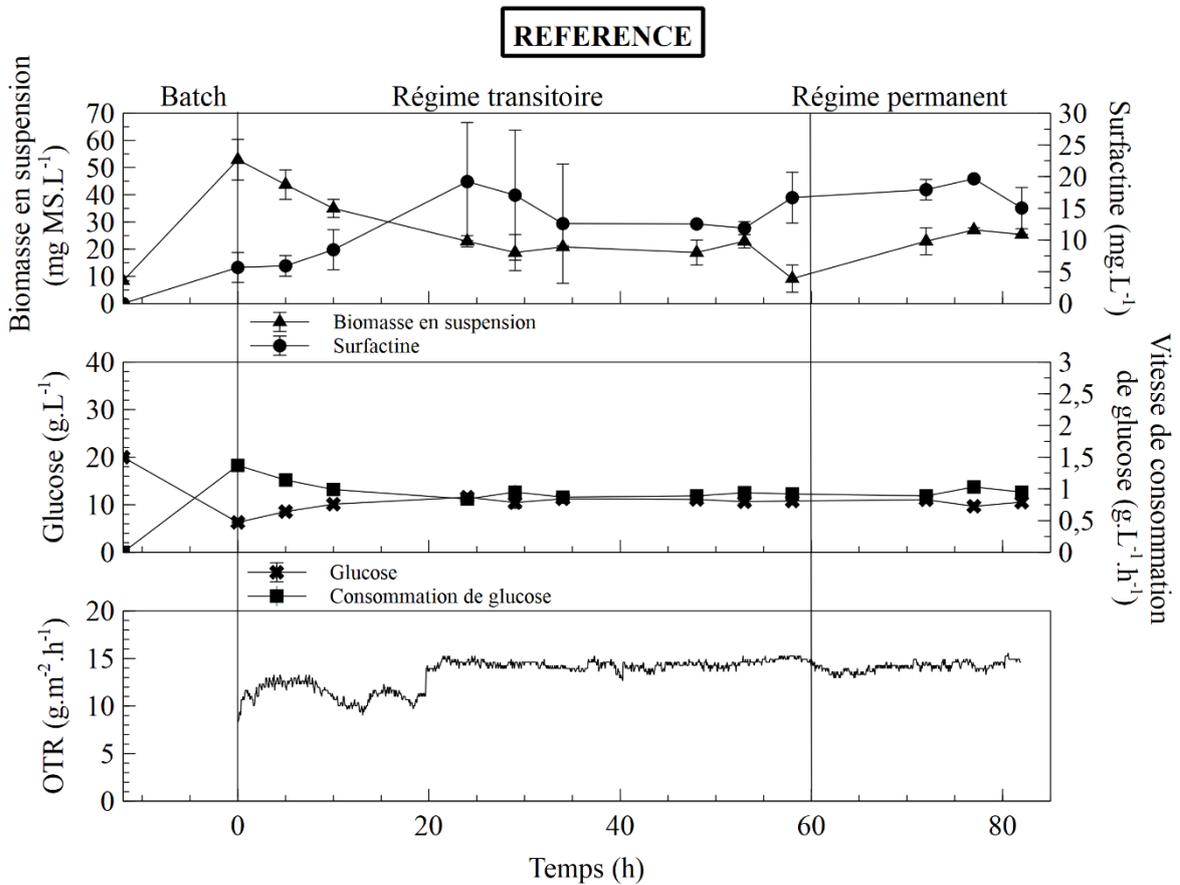


Figure 37 : Cinétiques de culture d'une croissance de *B. subtilis* en biofilm aéré par contacteur membranaire. Triangle : biomasse en suspension, rond : concentration en surfactine, carré : concentration en glucose, croix : vitesse de consommation de glucose.

Tous les paramètres et résultats sont présentés dans l'Annexe sous forme de tableaux. Les valeurs des travaux de Coutte, (2012) sont également présentées. L'ensemble de ces résultats est discuté ci-après.

7.3 Analyse de l'état physiologique des cellules par cytométrie en flux

A la fin de chaque expérience, la biomasse adhérente aux membranes est détachée et analysée par cytométrie en flux à l'aide de la sonde RSG permettant de mettre en évidence l'activité respiratoire des cellules. Trois conditions ont pu être comparées aux conditions de référence : le débit de liquide élevé $Q_L=20 \text{ mL.min}^{-1}$, la pression de gaz élevée $P_G = 1 \text{ bar}$ et la concentration de glucose à 40 g.L^{-1} (Figure 38). Une quatrième condition, la concentration en oxygène dans la phase gaz, a pu être testée

indépendamment. Cette dernière condition n'est pas comparable avec les précédentes en raison d'une différence d'intensité de fluorescence nécessitant le changement du voltage utilisé lors de l'acquisition des données.

Dans les conditions de référence, la fluorescence moyenne observée est de 58 (fluorescence en unités arbitraires lue sur l'axe des abscisses, Figure 38). La présence d'un seul pic indique l'existence d'une seule population relativement homogène d'un point de vue de l'activité respiratoire. Son potentiel moyen est réparti équitablement dans les zones de potentiel bas et haut, représentées respectivement par « pot low » et « pot high ».

L'augmentation de la pression de gaz (courbe bleu, Figure 38) permet d'améliorer l'activité respiratoire du biofilm comme le montre la présence de 85 % de la population en zone de potentiel haut avec une fluorescence de 133. L'accès à l'oxygène par le biofilm serait donc facilité par l'augmentation de la pression malgré une quantité de biofilm plus importante.

L'augmentation du débit de liquide (courbe rouge, Figure 38) induit l'apparition de deux pics réparties à 19 % avec un potentiel faible (fluorescence de 5) et à 81 % à potentiel haut (fluorescence de 45), ce qui signifie l'existence de deux populations bactériennes. La population à potentiel haut semble avoir une activité respiratoire proche de celle cultivée avec les conditions de référence. L'apparition de la seconde population correspond à la couche de biofilm qui pourrait ne pas avoir accès à l'oxygène en raison de sa consommation totale par les couches proches de la membrane, selon une configuration limitante en oxygène (C, D ou E, Figure 9). L'augmentation de la contrainte de cisaillement de $\tau_p = 4$ Pa à $\tau_p = 8$ Pa permet une meilleure pénétration du glucose et, dans le cas d'une limitation en glucose, une augmentation de la taille du biofilm ayant accès à la fois au glucose et à l'oxygène.

L'augmentation de la concentration en glucose dans le milieu de culture (courbe verte, Figure 38) a un impact similaire à l'augmentation de la pression sur le métabolisme du biofilm. La grande majorité de la population (91 %) se retrouve en potentiel élevé avec une fluorescence de 106.

D'après les résultats précédents, la population de biofilm en conditions de référence semble se trouver en double limitation (Figure 9 configuration D ou E). En effet,

l'augmentation du gradient de transfert pour les deux substrats (oxygène par la pression et glucose par la concentration) induit une amélioration de l'activité respiratoire du biofilm.

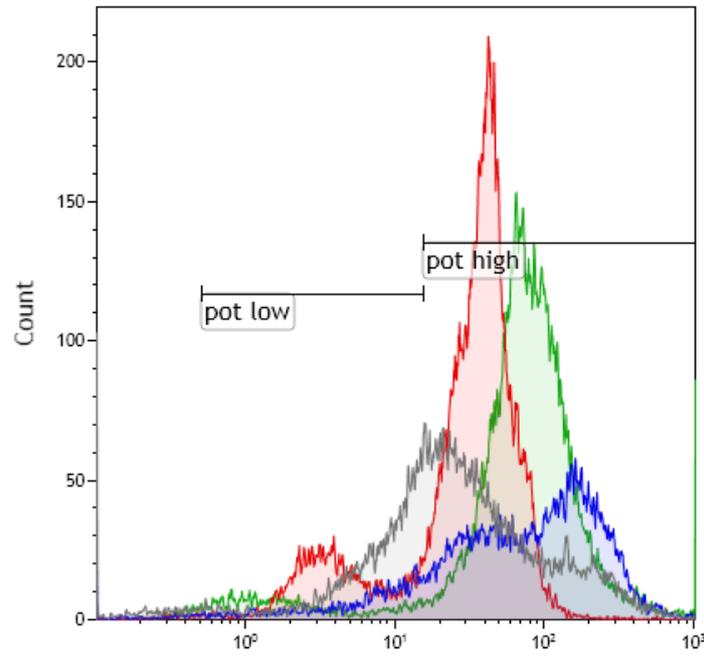


Figure 38 : Fluorescence de la sonde RSG à 520 nm par cytométrie en flux. Biofilm de *B. subtilis* en cultivé en bioréacteur à membrane avec milieu de Landy en modifiant un paramètre à la fois par rapport aux conditions de référence. Gris : Référence ($P_G = 0,5$ bar ; $Q_L = 10$ mL.min⁻¹ ; [Glucose] = 20 g.L⁻¹), bleu : $P_G = 1$ bar, rouge : $Q_L = 20$ mL.min⁻¹, vert : [Glucose] = 40 g.L⁻¹.

Les cellules soumises au contact avec un air enrichi en oxygène se retrouvent en majorité avec un potentiel d'oxydation faible (fluorescence inférieure à 5, Figure 39) contrairement aux résultats obtenus dans les conditions de référence (fluorescence de 58). L'augmentation de la concentration en oxygène semble avoir un impact négatif sur le métabolisme cellulaire au contraire de l'augmentation de la pression.

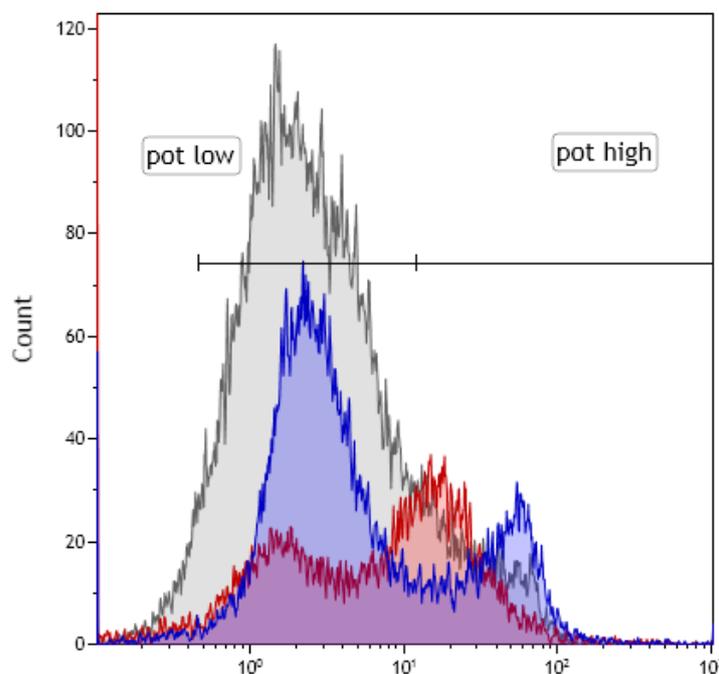


Figure 39 : Fluorescence de la sonde RSG à 520 nm par cytométrie en flux. Biofilm de *B. subtilis* en cultivé en bioréacteur à membrane avec milieu de Landy optimisé et air enrichi en oxygène (38%). Les 3 couleurs correspondent à 3 répétitions identiques.

Les mesures de taille (FS) et de granulosité (SS) des cellules de biofilm ont montré des résultats similaires pour l'ensemble des expériences à l'exception du changement de concentration en oxygène. La taille moyenne des cellules est comprise entre 1 et 3 μm selon une répartition homogène (correspondant à une abscisse (FS) de 2, Figure 40). Au contraire, l'enrichissement de l'air en oxygène entraîne un regroupement de la taille des cellules autour de 1 μm (correspondant à une abscisse (FS) de 0,8). Ce changement de taille peut être dû à un phénomène de sporulation de la population mais au vu de la production importante de surfactine (chapitre § III 7.5), cette hypothèse est peu probable. La seconde explication est la modification morphologique des cellules en réponse aux changements de conditions environnementales comme reporté par Simões et al., (2007) sur un biofilm de *Pseudomonas fluorescens*.

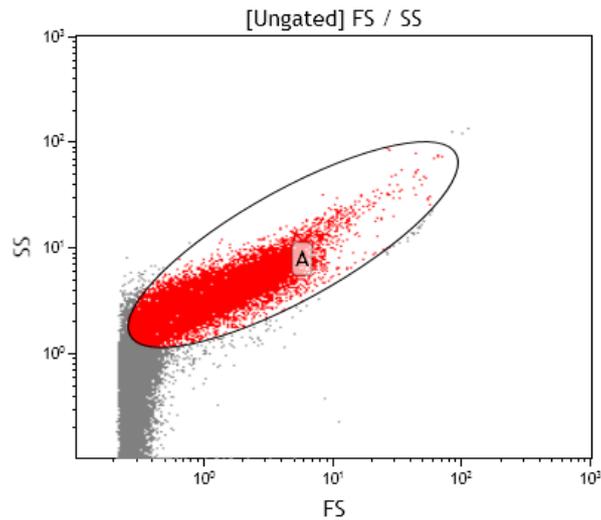


Figure 40 Représentation graphique de la granulosité en fonction de la taille des cellules de biofilm cultivées en condition de référence et analysées par cytométrie en flux. Les cellules dans la zone A sont comptées et les données sont présentées ci-dessous.

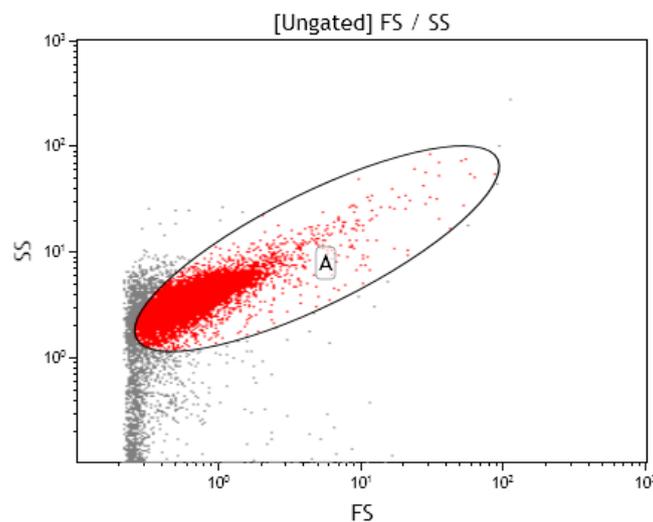


Figure 41 : Représentation graphique de la granulosité en fonction de la taille des cellules de biofilm cultivées en condition de référence et analysées par cytométrie en flux. Les cellules dans la zone A sont comptées et les données sont présentées ci-dessous

7.4 Comparaison des conditions opératoires

Les résultats sont comparés dans un premier temps en termes de biomasse planctonique et fixée, de production de surfactine et de consommation de glucose pour chaque condition opératoire.

La biomasse présente dans le réacteur est constituée d'une partie fixée et d'une partie planctonique. La population planctonique correspond ici seulement au décrochement de biomasse du biofilm car le fonctionnement du bioréacteur en lessivage ne permet

pas le développement de la population des cellules en suspension par croissance. La répartition de la population bactérienne donne une indication sur le taux de renouvellement du biofilm.

Dans l'ensemble des expériences, aucune présence de métabolites primaires n'a été détectée contrairement aux résultats obtenus par Coutte, (2012).

7.4.1 Impact du débit de liquide dans les fibres

Trois débit de liquide dans les fibres différents ont pu être comparés allant de 2 à 20 mL.min⁻¹, soit un nombre de Reynolds allant respectivement de 11 à 111.

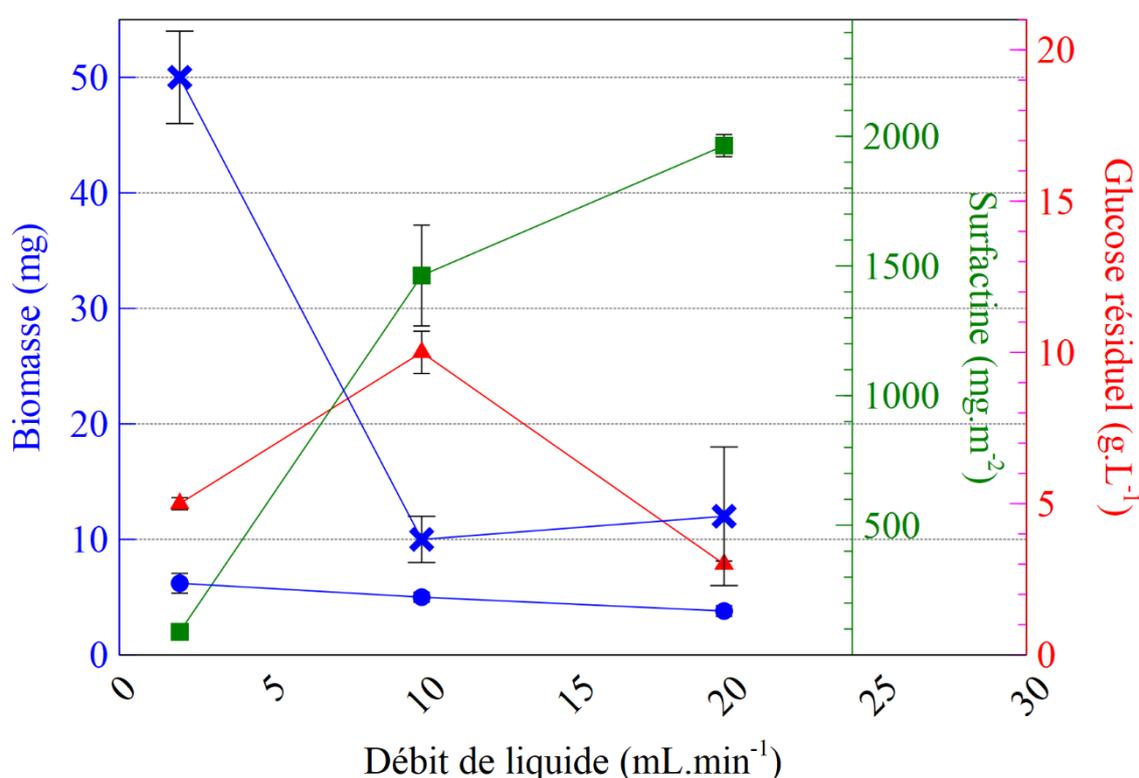


Figure 42 : Impact du débit de liquide dans les fibres sur les paramètres de culture en régime permanent. Croix bleue : biomasse fixée, rond bleu : biomasse planctonique, carré vert : surfactine, triangle rouge : glucose résiduel.

La quantité de biomasse fixée diminue avec l'augmentation du débit de liquide et donc de la contrainte de cisaillement de $\tau_p = 0,8$ Pa à $\tau_p = 8$ Pa. Un pallier est atteint à partir de 10 mL.min⁻¹, soit $\tau_p = 4$ Pa, où la quantité de biomasse fixée ne varie plus et se stabilise autour de 10 mg de biomasse fixée (Figure 42).

L'augmentation du débit de liquide impacte positivement la production de surfactine, en accord avec les résultats de l'analyse physiologique du biofilm,. Plus de glucose est consommé comme le montre la variation du glucose résiduel de 10 à 3 g.L⁻¹ (Figure 42). Cette augmentation est due à l'augmentation de la contrainte de cisaillement dans le liquide ce qui permet de réduire la couche limite et d'améliorer le transfert (Casey et al., 2000b; Pankhania et al., 1999). Cela corrobore l'hypothèse d'une configuration en conditions de référence (débit de 10 mL.min⁻¹) limitante en glucose.

La diminution du débit de liquide entraîne une augmentation de la biomasse planctonique et de la biomasse fixée (en pourcentage) par rapport à la biomasse totale (89 % à $Q_L = 2 \text{ mL.min}^{-1}$ et 66 % à $Q_L = 10 \text{ mL.min}^{-1}$). Il y a donc moins de décrochage, ce qui est dû à la diminution de la contrainte de cisaillement (Casey et al., 2000b; Debus et al., 1994). La diminution du débit réduit drastiquement la production de surfactine. Malgré une quantité de biomasse fixée élevée, seule une faible partie du biofilm a accès aux deux substrats (configurations D, Figure 9) et permet la production de surfactine.

7.4.2 Impact de la pression de gaz à l'extérieur des fibres

Trois pression de gaz différentes à l'extérieur des fibres ont pu être comparées allant de 0,25 à 1 bar. Au-delà de cette pression, l'interface n'était plus suffisamment stable pour maintenir l'équilibre durant la durée de l'expérience.

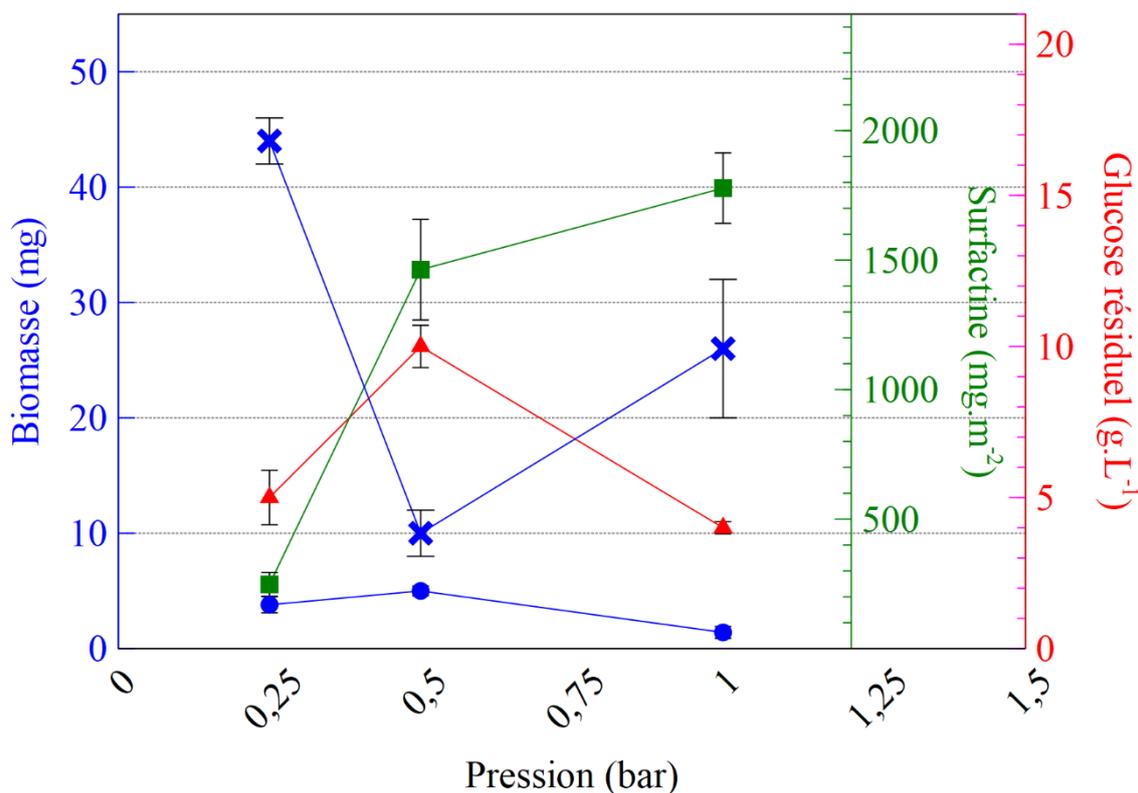


Figure 43 : Impact de la pression de gaz à l'extérieur des fibres sur les paramètres de culture en régime permanent. Croix bleue : biomasse fixée, rond bleu : biomasse planctonique, carré vert : surfactine, triangle rouge : glucose résiduel.

L'effet de la pression sur la production de surfactine est corrélé aux résultats obtenus en cytométrie en flux.

L'augmentation de la pression de 0,5 à 1 bar peut induire une augmentation de la population bactérienne fixée par une plus grande disponibilité de l'oxygène au contact de la membrane (dû au gradient de concentration plus élevé). Elle induit une amélioration de l'activité respiratoire mais également de la production de surfactine (1463 mg.m⁻² à 0,5 bar à 1778 mg.m⁻² à 1 bar) avec une augmentation de la consommation de glucose (Figure 43).

Une pression de gaz faible (0,25 bar) peut induire un positionnement de l'interface tel que les pores soient remplis par le milieu, créant une niche bénéfique à la croissance bactérienne pouvant expliquer la quantité de biomasse fixée importante (44 mg). Cependant, la consommation de glucose est augmentée alors que la production de surfactine chute (1463 mg.m⁻² à 0,5 bar à 248 mg.m⁻² à 0,25 bar). Cette hausse de

consommation pourrait être expliquée par la maintenance des cellules composant le biofilm étant donné l'augmentation de la quantité de biomasse fixée.

7.4.3 Impact des concentrations en glucose et en oxygène

Les concentrations en glucose dans le milieu de culture d'alimentation et en oxygène dans le gaz ont été variées. Deux concentrations en glucose ont été testées, 20 et 40 g.L⁻¹. De même, deux concentrations en oxygène ont été testées l'utilisation de deux gaz, de l'air comprenant 20 % d'oxygène et de l'air enrichi à 38 % d'oxygène.

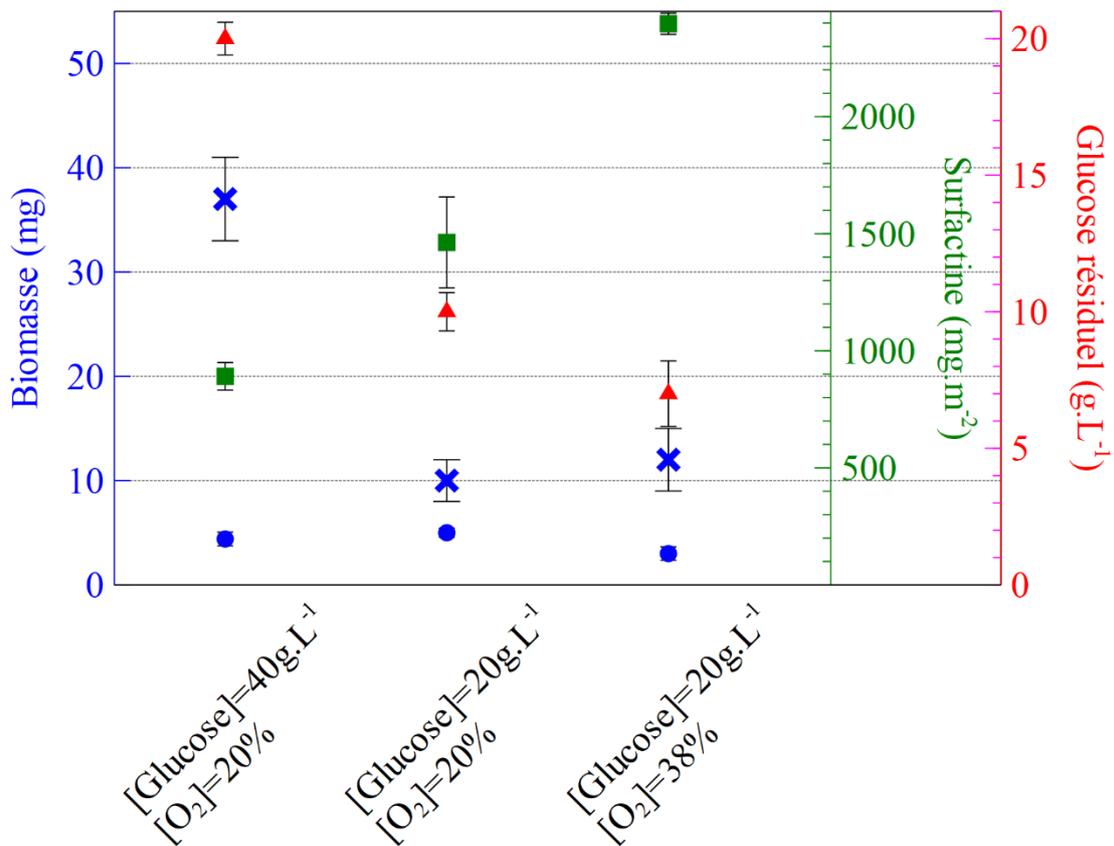


Figure 44 : Impact des concentrations en glucose et en oxygène sur les paramètres de culture en régime permanent. Croix bleu : biomasse fixée, rond bleu : biomasse planctonique, carré vert : surfactine, triangle rouge : glucose résiduel.

L'augmentation de la concentration en glucose induit un plus grand gradient de concentration et donc potentiellement une meilleure pénétration du glucose dans le biofilm. Cette plus grande disponibilité pourrait permettre d'obtenir l'accès au substrat d'une plus grande partie du biofilm et donc d'augmenter la taille du biofilm. Une augmentation de la consommation de glucose est observée sans amélioration de la production de surfactine (Figure 44). Malgré une disponibilité plus importante du

principal substrat carboné, la limitation en oxygène est toujours présente et empêche l'amélioration de la production de surfactine.

L'augmentation de la concentration en oxygène dans l'air induit une forte augmentation de la production de surfactine malgré (i) une légère diminution du glucose résiduel, (ii) aucune modification de la biomasse fixée et (iii) une faible activité respiratoire. Ces conditions de culture sont les plus favorables à la production de surfactine, atteignant $2,4 \text{ mg.m}^{-2}$, soit le double en comparaison avec les conditions de référence ($[\text{O}_2] = 20 \%$) et six fois plus que dans les travaux de Coutte, (2012).

7.5 Comparaison des performances d'aération en présence et en absence de biofilm

Les performances d'aération ont été calculées et prédites à partir de l'équation (II 7.10) dans des conditions expérimentales identiques à l'exception de l'eau qui est remplacée par du milieu de Landy optimisé et de l'ajout de micro-organismes. La différence entre les résultats prédits et mesurés, présentée dans la Figure 45, montre l'impact du biofilm qui se forme à l'interface sur le transfert d'oxygène. Il apparaît que cet encrassement agit comme un accélérateur du transfert d'oxygène. Les performances mesurées sont 5 à 25 fois plus élevées avec micro-organismes que sans. L'influence des conditions opératoires sur le transfert d'oxygène seul apparaît comme négligeable comparée à l'impact du biofilm. Les paramètres opératoires ont une influence sur l'état du biofilm qui à son tour impacte fortement le transfert d'oxygène.

Le résultat particulièrement élevé de transfert d'oxygène obtenu en conditions de référence est difficilement interprétable. L'explication la plus plausible est une erreur lors de la calibration de l'analyseur de gaz pour cette expérience qui peut expliquer une telle différence. Nous n'exploiterons donc pas cette donnée par la suite.

Un débit de liquide faible (2 mL.min^{-1}) dans les fibres induit une augmentation de l'OTR en comparaison avec un débit élevé (20 mL.min^{-1}). Un faible débit de liquide permet à une plus grande quantité de biomasse d'adhérer à la membrane, ce qui peut expliquer la plus grande consommation d'oxygène. La vitesse de consommation spécifique d'oxygène reste faible avec un débit de liquide faible ($0,4 \text{ gO}_2.\text{gX}_f^{-1}.\text{h}^{-1}$) en comparaison avec un débit de liquide élevé ($1,1 \text{ gO}_2.\text{gX}_f^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Au contraire, malgré une population fixée élevée, une faible pression entraîne le plus faible OTR mesuré, inférieur à $5 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$. Le gradient d'oxygène est donc impactant sur la profondeur de pénétration de l'oxygène dans le biofilm qui est relativement faible à $P_G=0,25$, expliquant la faible production de surfactine.

L'élévation de la pression et l'enrichissement de l'air en oxygène induisent une augmentation de la pression partielle en oxygène et impactent aussi le gradient de concentration. Dans les deux cas, une amélioration de l'OTR est observée. Les résultats obtenus avec l'air enrichi en oxygène sont cependant 34 % plus élevés malgré une biomasse deux fois moins nombreuse, atteignant une vitesse de consommation spécifique d'oxygène de $2,1 \text{ gO}_2\cdot\text{gX}_f^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. L'augmentation de la pression peut influencer sur la position de l'interface gaz-liquide à l'intérieur du pore, modifiant ainsi l'accès à l'oxygène du biofilm. L'enrichissement de l'air en oxygène a un effet positif sur le transfert comme indiqué par Côté et al., (1989). Ces deux hypothèses peuvent expliquer la différence observée entre l'augmentation de la pression de gaz et l'enrichissement de l'air en oxygène.

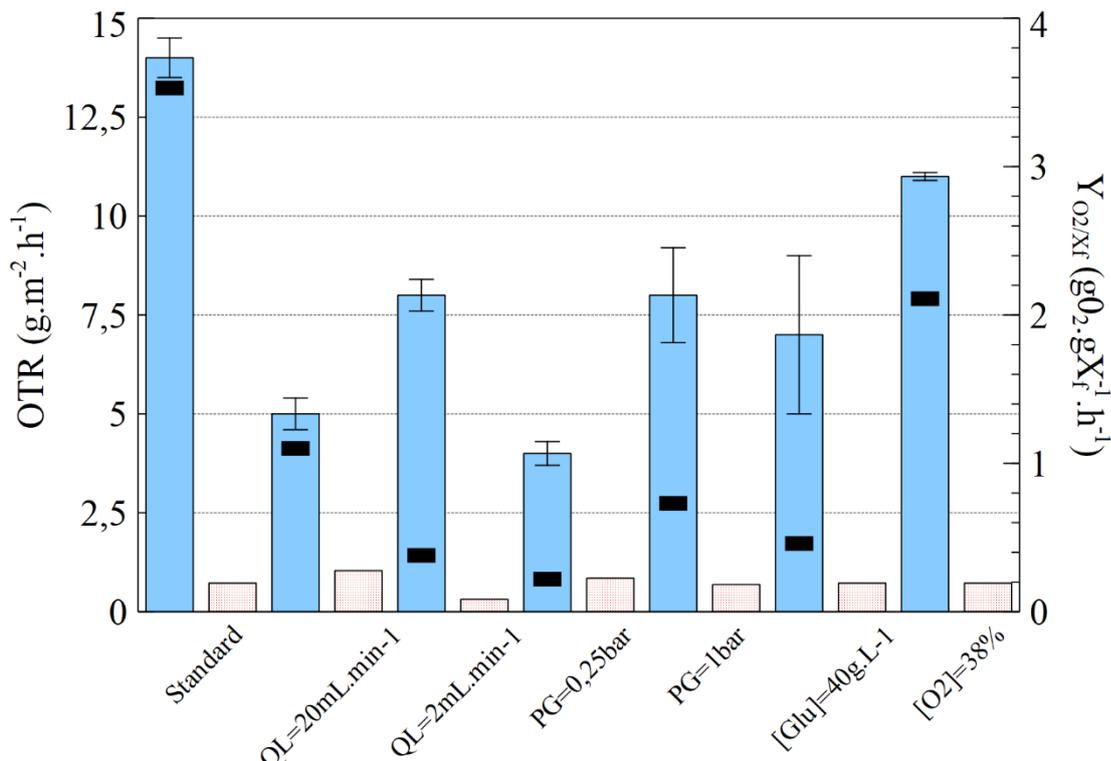


Figure 45 : Comparaison des OTR (Oxygen transfer rate) mesurés (bleu) et prédits (blanc) selon l'équation (II 7.10) pour différentes conditions expérimentales. Les paramètres de l'expérience de référence sont : $Q_L = 10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, $P_G = 0,5 \text{ bar}$, $[\text{Glucose}] = 20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $[\text{O}_2] = 20 \%$. Les barres noires représentent la vitesse de consommation spécifique d'oxygène Y_{O_2/X_f} .

Le changement de concentration en glucose dans le milieu de culture ne semble pas avoir d'impact significatif sur le transfert d'oxygène ni sur la vitesse de consommation spécifique d'oxygène.

7.6 Discussion

L'ensemble de ces expériences montrent la stabilité et la reproductibilité de ce procédé innovant couplant un bioréacteur à un contacteur membranaire. En effet de nombreuses fermentations en alimentation continue ont été conduites avec succès pendant plusieurs jours sur plusieurs bioréacteurs et l'ensemble des résultats obtenus étaient sensiblement identiques.

La différence de résultats entre l'augmentation de la pression de gaz et l'augmentation de la concentration en oxygène dans la phase gaz indique la présence d'un phénomène autre que la simple augmentation du gradient de concentration induite par les deux changements de conditions opératoires. Ce phénomène pourrait être l'impact mécanique de l'augmentation de la pression sur les fibres et plus précisément sur la position de l'interface dans les pores. Cette position n'a pas pu être mesurée.

La compilation de l'ensemble des résultats permet de déduire la configuration de disponibilité de substrat dans le biofilm dans les conditions de référence. L'absence d'oxygène dissous dans le milieu indique une consommation totale de l'oxygène par le biofilm. L'amélioration de la productivité en surfactine par l'augmentation de la disponibilité de l'oxygène (par la pression ou la concentration) indique une pénétration plus profonde de l'oxygène dans le biofilm, soit une configuration C, D ou E (Figure 9). Au vu des résultats obtenus en augmentant la concentration en glucose et en augmentant le débit dans les fibres (réduisant la couche limite et facilitant l'accès au glucose du biofilm), la configuration C, où le glucose n'est pas limitant, est écartée. Les résultats de cytométrie en flux indiquent la présence d'une seule population ayant une activité respiratoire plus élevée en augmentant de la concentration en glucose. La configuration du biofilm en condition de référence est donc la D, une double limitation sans qu'il n'y ait de zone qui soit atteinte à la fois par la limitation en glucose et en oxygène. En effet, les cellules de cette zone n'auraient pas pu apparaître en cytométrie en flux comme ayant une activité respiratoire élevée.

L'augmentation de la concentration en glucose a comme effet d'augmenter la taille du biofilm. Cet impact n'est pas souhaitable dans une configuration où l'ensemble du biofilm n'est déjà pas alimenté en oxygène. Cette modification de paramètre opératoire n'est donc pas recommandée pour optimiser la production de surfactine en utilisant un bioréacteur à biofilm aéré par membrane. L'impact de la pression semble difficilement exploitable sans avoir accès à la position de l'interface à l'intérieur des pores même s'il semblerait que l'augmentation de la pression ait un léger impact positif sur la production de surfactine.

A partir de ces constats, des pistes d'amélioration du procédé peuvent être envisagées afin d'atteindre les configurations B ou C, et idéalement la A où l'ensemble du biofilm a accès à tous les nutriments nécessaires à son développement et à la production de métabolites d'intérêt. L'objectif n'est pas d'augmenter la taille du biofilm au risque de faire apparaître une zone délétère en substrats mais bien d'améliorer la disponibilité des nutriments dans le biofilm. L'augmentation du débit de liquide et l'enrichissement de l'air en oxygène montrent des résultats prometteurs avec une productivité en surfactine pouvant atteindre $1,2 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$, soit 64% de plus qu'en conditions de référence et plus de 30 fois plus en comparaison avec les résultats obtenus dans les travaux de Coutte et al., (2013) sur une membrane de $2,5 \text{ m}^2$ ($0,038 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$). De plus, il a été montré qu'une différence de température existe dans les biofilm en fonction de l'échelle (§ III 4.1) et est défavorable à la plus petite échelle.

La comparaison de ces résultats avec d'autres bioréacteurs n'est pas triviale étant donné que les résultats en bioréacteur à membrane sont exprimés en fonction d'une surface et non d'un volume. Dans des conditions optimales (débit de liquide augmenté et air enrichie en oxygène) et avec un bioréacteur équipé d'une membrane de $2,5 \text{ m}^2$, nous pourrions légitimement extrapoler une production minimale équivalente à 3 g.h^{-1} , soit avec un volume de 3 litres de milieu $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ de surfactine. Les résultats obtenus avec d'autres bioréacteurs sont de 6 mg.h^{-1} de mycosubtiline pour un réacteur à débordement (Chenikher et al., 2010), de $12 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans un réacteur à lit fluidisé (Fahim et al., 2013) et de $26 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ d'un mélange de surfactine et de fengycine dans un réacteur à disque tournant (Chtioui, 2011). La meilleure production de lipopeptide est obtenue par Yeh et al., (2006) avec l'ajout de micro-porteurs et une concentration en glucose de 40 g.L^{-1} atteignant $190 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Les résultats obtenus à petite échelle sur un bioréacteur à biofilm aéré par membrane sont donc prometteurs

en comparaison avec les autres systèmes existants, avec des résultats attendus plus de 5 fois supérieurs aux meilleurs actuels.

Chapitre IV : CONCLUSION et PERSPECTIVES

Les bioréacteurs à biofilm aéré par membrane sont une nouvelle technologie innovante permettant l'aération d'un milieu de culture sans bullage, appliqué notamment à la production de molécules d'intérêt comme les lipopeptides pour éviter la formation de mousse. L'objectif de cette thèse était de caractériser l'impact des paramètres opératoires sur le biofilm qui se forme à l'interface gaz-liquide dans la membrane afin de préparer une montée en échelle.

Les performances d'aération seules ont été étudiées en couplant une analyse dimensionnelle et un plan d'expérience, menant à l'utilisation de nombres sans dimension en tant que facteurs (variation du débit de liquide dans les fibres, de la pression à l'extérieur des fibres, du volume de liquide et de la tension de surface). Une telle combinaison, encore jamais utilisée, se révèle une méthode efficace pour identifier rapidement les paramètres les plus influents et pour obtenir, avec un effort expérimental minimal, une corrélation empirique décrivant l'évolution du transfert d'oxygène volumétrique adimensionnel k_{LA}^* et du nombre de Sherwood.

Le plan d'expérience a permis d'obtenir des relations de procédés, de forme monomiale ou polynomiale, avec un bon niveau de précision. Des expériences supplémentaires ont été réalisées pour élargir le domaine de validité menant à deux équations empiriques (ayant une déviation standard inférieure à 11%) décrivant les performances de transfert d'oxygène. La validité de la corrélation décrivant le k_{LA} à petite échelle a été prouvée adaptée à la prédiction d'expériences menées à plus grande échelle.

De ces équations, il a pu être déduit comment choisir les paramètres opératoires pour améliorer les performances d'aérations dans un bioréacteur aéré par membrane microporeuse à fibre creuse. Ils doivent être choisis comme suit : (i) utiliser le débit de liquide maximal techniquement possible, (ii) choisir la pression de gaz minimale permettant d'éviter la déformation de la membrane et (iii) minimiser le volume de liquide dans la cuve. Les relations adimensionnelles guident également le choix de la bonne taille de la membrane, du débit de liquide et de la géométrie de la cuve lors du design d'un bioréacteur aéré par membrane à une échelle différente pour une valeur de k_{LA} voulue.

Au-delà de l'étude vouée aux performances d'aération seules, ces travaux illustrent l'intérêt de coupler analyse dimensionnelle et plan d'expérience pour identifier

rapidement si un paramètre adimensionnel est significativement influent et pour établir une corrélation gouvernant un nombre sans dimension tout en réduisant l'effort expérimental.

La caractérisation du biofilm par des analyses biochimiques du milieu et par cytométrie en flux nous a permis de définir la configuration de limitation dans laquelle se trouvent les cellules dans des conditions de cultures de référence. L'oxygène et la source de carbone principale, le glucose, apparaissent comme limitant, plaçant le biofilm en double limitation en contre-diffusion.

L'augmentation de la concentration en glucose apparaît comme délétère pour la production de surfactine. Elle a pour effet d'augmenter la taille du biofilm sans permettre simultanément une augmentation de la profondeur de pénétration de l'oxygène, réduisant ainsi la taille de la couche de biofilm ayant accès à l'oxygène. L'augmentation de la pression de gaz semble avoir un léger impact positif sur la production de surfactine mais les résultats doivent être complétés par la prise en compte de la position de l'interface gaz-liquide à l'intérieur des pores.

La production de surfactine peut être accrue en augmentant le débit de liquide qui a pour double effet d'améliorer la disponibilité de la source de carbone principale (par la réduction de la couche limite) et de maintenir une taille de biofilm réduite (grâce au cisaillement). De même, il est possible d'améliorer la disponibilité de l'oxygène en augmentant sa concentration dans la phase gaz. L'enrichissement de l'air en oxygène jusqu'à 38% a permis d'obtenir les meilleurs résultats de production de surfactine atteignant $1,2 \text{ g.m}^{-2}.\text{h}^{-1}$ en régime d'alimentation en continu. Ces résultats n'avaient jusqu'ici jamais été atteints avec aucun autre type de bioréacteur.

Grâce à la modularité apportée par l'utilisation de membranes, la montée en échelle peut se faire de façon progressive avec une large gamme de taille de membranes disponibles. De plus, les membranes peuvent être montées en série sur un même bioréacteur. Une des perspectives, à la suite de cette étude, sera de démontrer la reproductibilité des résultats obtenus sur une membrane de 24 cm^2 à plus grande échelle tout en utilisant les paramètres définis comme optimaux.

La question se pose également sur le rôle de la cuve étant donné que les réaction d'intérêt et la croissance du biofilm se trouvent dans les membranes. La cuve sert,

entre-autre, à maintenir la température, le pH, l'alimentation et le soutirage. Un montage pourrait être imaginé permettant de s'affranchir de la cuve pour ne garder qu'une boucle de circulation du milieu de culture à travers une ou plusieurs membranes.

Une des principales difficultés de la culture de bactéries en biofilm est le suivi en continu de l'état du biofilm. Dans cette étude, la cytométrie en flux a été démontré comme étant un outil efficace pour apporter des informations sur l'état physiologique des cellules. La cytométrie en flux en ligne, appliquée à la culture de biofilm, permettra d'obtenir des données supplémentaires, en continu, comme par exemple l'activité respiratoire des cellules décrochées. Cela offre de belles perspectives qui pourraient permettre de réagir en temps réel aux variations mesurées.

RÉFÉRENCES

- Ahmed, T., Semmens, M.J., 1992a. The use of independently sealed microporous hollow fiber membranes for oxygenation of water: model development. *J. Membr. Technol.* 69, 11–20. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(92\)80163-E](https://doi.org/10.1016/0376-7388(92)80163-E)
- Ahmed, T., Semmens, M.J., 1992b. Use of sealed end hollow fibers for bubbleless membrane aeration: experimental studies. *J. Membr. Sci.* 69, 1–10. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(92\)80162-D](https://doi.org/10.1016/0376-7388(92)80162-D)
- Albal, R.S., Shah, Y.T., Schumpe, A., Carr, N.L., 1983. Mass transfer in multiphase agitated contactors. *Chem. Eng. J.* 27, 61–80. [https://doi.org/10.1016/0300-9467\(83\)80053-7](https://doi.org/10.1016/0300-9467(83)80053-7)
- Aparecida Giro, M.E., Lima Martins, J.J., Ponte Rocha, M.V., Melo, V.M.M., Gonçalves, L.R.B., 2009. Clarified cashew apple juice as alternative raw material for biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in a batch bioreactor. *Biotechnol. J.* 4, 738–747. <https://doi.org/10.1002/biot.200800296>
- Arima, K., Kakinuma, A., Tamura, G., 1968. Surfactine, a crystalline peptidolipid surfactant produced by *Bacillus subtilis*: isolation, characterisation and its inhibition of fibrin clot formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31, 488–494.
- Bacchin, P., 2005. Principes de bases de la filtration membranaire. Toulouse, France.
- Barros, F.F.C.F., Ponezi, A.N., Pastore, G.M., 2008. Production of biosurfactant by *Bacillus subtilis* LB5a on a pilot scale using cassava wastewater as substrate. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1071–1078. <https://doi.org/10.1007/s10295-008-0385-y>
- Bonmatin, J.-M., Genest, M., Labbé, H., Ptak, M., 1994. Solution three-dimensional structure of surfactin: A cyclic lipopeptide studied by ¹H-nmr, distance geometry, and molecular dynamics. *Biopolymers* 34, 975–986. <https://doi.org/10.1002/bip.360340716>
- Box, G.E.P., Hunter, J.S., Hunter, W.G., 2005. Statistics for experimenters : design, innovation, and discovery. Wiley-Interscience. <https://doi.org/10.1198/000313006X152991>

- Burdett, I.D.J., Kirkwood, T.B.L., Whalley, J.B., 1986. Growth-Kinetics of Individual *Bacillus-Subtilis* Cells and Correlation with Nucleoid Extension. *J. Bacteriol.* 167, 219–230.
- Cagri-Mehmetoglu, a, Kusakli, S., van de Venter, M., 2012. Production of polysaccharide and surfactin by *Bacillus subtilis* ATCC 6633 using rehydrated whey powder as the fermentation medium. *J. Dairy Sci.* 95, 3643–9. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5385>
- Casey, E., Glennon, B., Hamer, G., 2000a. Biofilm development in a membrane-aerated biofilm reactor: Effect of flow velocity on performance. *Biotechnol. Bioeng.* 67, 476–486. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000220\)67](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(20000220)67)
- Casey, E., Glennon, B., Hamer, G., 2000b. Biofilm development in a membrane-aerated biofilm reactor: effect of intra-membrane oxygen pressure on performance. *Bioprocess Eng.* 23, 457–465. <https://doi.org/10.1007/s004499900175>
- Catapano, G., Hornscheidt, R., Wodetzki, A., Baurmeister, U., 2004. Turbulent flow technique for the estimation of oxygen diffusive permeability of membranes for the oxygenation of blood and other cell suspensions. *J. Memb. Sci.* 230, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2003.10.040>
- Chaix, E., Guillaume, C., Guillard, V., 2014. Oxygen and Carbon Dioxide Solubility and Diffusivity in Solid Food Matrices: A Review of Past and Current Knowledge. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 261–286. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12058>
- Chen, H., Chen, Y., Juang, R., 2008. Flux decline and membrane cleaning in cross-flow ultrafiltration of treated fermentation broths for surfactin recovery 62, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2007.12.015>
- Chen, H., Juang, R., 2008. Extraction of surfactin from fermentation broth with n - hexane in microporous PVDF hollow fibers : Significance of membrane adsorption 325, 599–604. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2008.08.017>
- Chenikher, S., Guez, J.S., Coutte, F., Pekpe, M., Jacques, P., Cassar, J.P., 2010.

- Control of the specific growth rate of *Bacillus subtilis* for the production of biosurfactant lipopeptides in bioreactors with foam overflow. *Process Biochem.* 45, 1800–1807.
- Chollet-Imbert, M., Gancel, F., Slomianny, C., Jacques, P., 2008. Differentiated pellicle organization and lipopeptide production in standing culture of *Bacillus subtilis* strains. *Arch. Microbiol.* 191, 63–71. <https://doi.org/10.1007/s00203-008-0429-8>
- Chtioui, O., 2011. Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à disques tournants. Université de Lille.
- Chtioui, O., Dimitrov, K., Gancel, F., Dhulster, P., Nikov, I., 2014. Selective fengycin production in a modified rotating discs bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 37, 107–114. <https://doi.org/10.1007/s00449-013-0964-9>
- Costerton, J.W., 1999. Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(99\)00018-7](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(99)00018-7)
- Côté, P., Bersillon, J.-L.L., Huyard, A., 1989. Bubble-free aeration using membranes : mass transfer analysis. *J. Memb. Sci.* 47, 91–106. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(00\)80862-5](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(00)80862-5)
- Coutte, F., 2012. Production sélective de lipopeptides par *Bacillus subtilis* en bioréacteur à membrane. Université de Lille.
- Coutte, F., Lecouturier, D., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Dhulster, P., 2013. New integrated bioprocess for the continuous production, extraction and purification of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis* in membrane bioreactor. *Process Biochem.* 48, 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.10.005>
- Coutte, F., Lecouturier, D., Yahia, S.A., Leclère, V., Béchet, M., Jacques, P., Dhulster, P., 2010. Production of surfactin and fengycin by *Bacillus subtilis* in a bubbleless membrane bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2504-8>
- Cruz Ramos, H., Hoffmann, T., Marino, M., Nedjari, H., Presecan-Siedel, E., Dreesen, O., Glaser, P., Jahn, D., 2000. Fermentative metabolism of *Bacillus subtilis*: physiology and regulation of gene expression. *J. Bacteriol.* 182, 3072–80.

- Dali Youcef, B., Bouchaour, T., Bouberka, Z., Bigan, M., Maschke, U., 2017. Swelling behavior of poly(n-butyl acrylate/1,6-hexane-diol-di-acrylate)/nematic liquid crystal E7 systems: Experimental measurements and modeling by factorial design method. *J. Appl. Polym. Sci.* 134, 1–6. <https://doi.org/10.1002/app.45230>
- De Napoli, I.E., Zanetti, E.M., Fragomeni, G., Giuzio, E., Audenino, A.L., Catapano, G., 2014. Transport modeling of convection-enhanced hollow fiber membrane bioreactors for therapeutic applications. *J. Memb. Sci.* 471, 347–361. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2014.08.026>
- Debus, O., Baumgärtl, H., Sekoulov, I., 1994. Influence of fluid velocities on the degradation of volatile aromatic compounds in membrane bound biofilms. *Water Sci. Technol.* 29, 253–262. <https://doi.org/10.2166/wst.1994.0768>
- Delaplace, G., Loubière, K., Ducept, F., Jeantet, R., 2015. Dimensional analysis of food processes. ISTE Press - Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2014-0-04744-2>
- Dohren, H., 1997. Genetics on the move into natural-product chemistry. *Trends Biotechnol.* 15.
- Ducommun, P., Ruffieux, P.-A., Furter, M.-P., Marison, I., Von Stockar, U., 2000. A new method for on-line measurement of the volumetric oxygen uptake rate in membrane aerated animal cell cultures. *J. Biotechnol.* 78, 139–147.
- Dupuy, A., Athès, V., Schenk, J., Jenelten, U., Souchon, I., 2011. Experimental and theoretical considerations on breakthrough pressure in membrane-based solvent extraction: Focus on citrus essential oil/hydro-alcoholic solvent systems with low interfacial tension. *J. Memb. Sci.* 378, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2011.05.005>
- Esato, K., Eiseman, B., 1975. Experimental evaluation of Gore-Tex membrane oxygenator. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 69, 690–7.
- Fahim, S., Dimitrov, K., Vauchel, P., Gancel, F., Delaplace, G., Jacques, P., Nikov, I., 2013. Oxygen transfer in three phase inverse fluidized bed bioreactor during biosurfactant production by *Bacillus subtilis*. *Biochem. Eng. J.* 76, 70–76.
- Frahm, B., Brod, H., Langer, U., 2009. Improving bioreactor cultivation conditions for

- sensitive cell lines by dynamic membrane aeration. *Cytotechnology* 59, 17–30.
<https://doi.org/10.1007/s10616-009-9189-9>
- Gabelman, A., Hwang, S.-T., 1999. Hollow fiber membrane contactors. *J. Memb. Sci.* 159, 61–106. [https://doi.org/10.1016/S0376-7388\(99\)00040-X](https://doi.org/10.1016/S0376-7388(99)00040-X)
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.* 27, 153–176.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.10.006>
- Grangemard, I., Peypoux, F., Wallach, J., Das, B.C., Labbé, H., Caille, A., Genest, M., Maget-Dana, R., Ptak, M., 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.* 3, 145–154.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1387\(199703\)3:2<145::AID-PSC96>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1387(199703)3:2<145::AID-PSC96>3.0.CO;2-Y)
- Grasmick, A., Cabassud, C., Sperandio, M., Wisniewski, C., 2007. Bioréacteurs à membranes et traitement des eaux usées. Ref TIP860WEB - “Technologies l’eau.”
- Guez, J.S., Müller, C.H., Danze, P.M., Büchs, J., Jacques, P., 2008. Respiration activity monitoring system (RAMOS), an efficient tool to study the influence of the oxygen transfer rate on the synthesis of lipopeptide by *Bacillus subtilis* ATCC6633. *J. Biotechnol.* 134, 121–126.
- Hassan, R., Loubiere, K., Legrand, J., Delaplace, G., 2012. A consistent dimensional analysis of gas–liquid mass transfer in an aerated stirred tank containing purely viscous fluids with shear-thinning properties. *Chem. Eng. J.* 184, 42–56.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2011.12.066>
- Hou, F., Li, B., Xing, M., Wang, Q., Hu, L., Wang, S., 2013. Surface modification of PVDF hollow fiber membrane and its application in membrane aerated biofilm reactor (MABR). *Bioresour. Technol.* 140.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.056>
- Huang, H., Peng, C., Peng, P., Lin, Y., Zhang, X., Ren, H., 2019. Towards the biofilm characterization and regulation in biological wastewater treatment. *Appl.*

- Microbiol. Biotechnol. 103, 1115–1129. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9511-6>
- Ito, H., Mori, F., Tabata, K., Okura, I., Kamachi, T., 2014. Methane hydroxylation using light energy by the combination of thylakoid and methane monooxygenase. RSC Adv. 4, 8645–8648. <https://doi.org/10.1039/C3RA46870D>
- Jantaporn, W., 2016. Technologies membranaires innovantes pour la réutilisation des eaux. Génie des procédés. <https://doi.org/10.1016/j.procs.2016.03.004>.<tel-01686282>
- Jouenne, T., 2016. Biofilms bactériens. Ref TIP140WEB - “Bioprocédés.”
- Karoor, S., Sirkar, K.K., 1993. Gas Absorption Studies in Microporous Hollow Fiber Membrane Modules. Ind. Eng. Chem. Res. 32, 674–684. <https://doi.org/10.1021/bk-1993-0311>
- Kavousi, F., Syron, E., Semmens, M.J., Casey, E., 2016. Hydrodynamics and gas transfer performance of confined hollow fibre membrane modules with the aid of computational fluid dynamics. J. Memb. Sci. 513, 117–128.
- Kell, H., Holzwarth, J.F., Boettcher, C., Heenan, R.K., Vater, J., 2007. Physicochemical studies of the interaction of the lipoheptapeptide surfactin with lipid bilayers of 1- α -dimyristoyl phosphatidylcholine. Biophys. Chem. 128, 114–124. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2007.03.005>
- Kirouani, T., 2016. Etude expérimentale et modélisation de l'hydrodynamique et du transfert de l'oxygène dans un bioréacteur à disques rotatifs. Université de Lille 1 Sciences et Technologies.
- Kovács, Á.T., Dragoš, A., 2019. Evolved Biofilm: Review on the Experimental Evolution Studies of *Bacillus subtilis* Pellicles. J. Mol. Biol. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.02.005>
- Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessières, 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., Cummings,

- N.J., Daniel, R.A., Denizot, F., Devine, K.M., Düsterhöft, A., Ehrlich, S.D., Emmerson, P.T., Entian, K.D., Errington, J., Fabret, C., Ferrari, E., Foulger, D., Fritz, C., Fujita, M., Fujita, Y., Fuma, S., Galizzi, A., Galleron, N., Ghim, S.-Y., Glaser, P., Goffeau, A., Golightly, E.J., Grandi, G., Guiseppi, G., Guy, B.J., Haga, K., Haiech, J., Harwood, C.R., Hénaut, A., Hilbert, H., Holsappel, S., Hosono, S., Hullo, M.-F., Itaya, M., Jones, L., Joris, B., Karamata, D., Kasahara, Y., Klaerr-Blanchard, M., Klein, C., Kobayashi, Y., Koetter, P., Koningstein, G., Krogh, S., Kumano, M., Kurita, K., Lapidus, A., Lardinois, S., Lauber, J., Lazarevic, V., Lee, S.-M., Levine, A., Liu, H., Masuda, S., Mauël, C., Médigue, C., Medina, N., Mellado, R.P., Mizuno, M., Moestl, D., Nakai, S., Noback, M., Noone, D., O'Reilly, M., Ogawa, K., Ogiwara, A., Oudega, B., Park, S.-H., Parro, V., Pohl, T.M., Portetelle, D., Porwollik, S., Prescott, A.M., Presecan, E., Pujic, P., Purnelle, B., Rapoport, G., Rey, M., Reynolds, S., Rieger, M., Rivolta, C., Rocha, E., Roche, B., Rose, M., Sadaie, Y., Sato, T., Scanlan, E., Schleich, S., Schroeter, R., Scoffone, F., Sekiguchi, J., Sekowska, A., Seror, S.J., Serror, P., Shin, B.-S., Soldo, B., Sorokin, A., Tacconi, E., Takagi, T., Takahashi, H., Takemaru, K., Takeuchi, M., Tamakoshi, A., Tanaka, T., Terpstra, P., Tognoni, A., Tosato, V., Uchiyama, S., Vandenbol, M., Vannier, F., Vassarotti, A., Viari, A., Wambutt, R., Wedler, E., Wedler, H., Weitzenegger, T., Winters, P., Wipat, A., Yamamoto, H., Yamane, K., Yasumoto, K., Yata, K., Yoshida, K., Yoshikawa, H.-F., Zumstein, E., Yoshikawa, H., Danchin, A., 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249–256. <https://doi.org/10.1038/36786>
- Landy, M., Warren, G.H., Rosenman, S.B., Colio, L.G., 1948. Bacillomycin An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active against Pathogenic Fungi. *Exp. Biol. Med.* 67, 539–541. <https://doi.org/10.3181/00379727-67-16367>
- Leclère, V., Béchet, M., Adam, A., Wathelet, B., Ongena, M., Thonart, P., Gancel, F., Chollet-imberty, M., Jacques, P., 2005. Mycosubtilin Overproduction by *Bacillus subtilis* BBG100 Enhances the Organism's Antagonistic and Biocontrol Activities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4577. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4577>
- Li, T., Liu, J., Bai, R., 2008. Membrane aerated biofilm reactors: a brief current review. *Recent Pat. Biotechnol.* 2, 88–93. <https://doi.org/10.2174/187220808784619739>

- Lomander, A., Schreuders, P., Russek-Cohen, E., Ali, L., 2004. Evaluation of chlorines' impact on biofilms on scratched stainless steel surfaces. *Bioresour. Technol.* 94, 275–283. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2004.01.004>
- Maier, U., 2002. Gas-Flüssigkeits-Stofftransfer im Schüttelkolben. RWTH Aachen University. <https://doi.org/hbz13431421x>
- Martin, K.J., Nerenberg, R., 2012. The membrane biofilm reactor (MBfR) for water and wastewater treatment: Principles, applications, and recent developments. *Bioresour. Technol.* 122, 83–94. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.02.110>
- Montgomery, D.C., 2013. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/qre.458>
- Motta Dos Santos, L.F., Coutte, F., Ravallec, R., Dhulster, P., Tournier-couturier, L., Jacques, P., 2016. An improvement of surfactin production by *B. subtilis* BBG131 using design of experiments in microbioreactors and continuous process in bubbleless membrane bioreactor. *Bioresour. Technol.* 218, 944–952.
- Moussa, M., Souchon, I., Athès, V., 2015. Pervaporative dehydration of binary ethanol/water and ternary ethanol/water/methanol mixtures using a methylated silica membrane: a mechanistic approach. *Sep. Sci. Technol.* 150725091307008. <https://doi.org/10.1080/01496395.2015.1071849>
- Net, S., Dumoulin, D., El-Osmeni, R., Delcourt, V., Bigan, M., Ouddane, B., 2014. Experimental design approach to the optimisation of hydrocarbons extraction from the sediment: Method development and application. *Appl. Geochemistry* 40, 126–134. <https://doi.org/10.1016/j.apgeochem.2013.11.009>
- Nitschke, M., Pastore, G.M., 2004. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using cassava-processing effluent. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 112, 163–72. <https://doi.org/10.1385/ABAB:112:3:163>
- Ohno, A., Ano, T., Shoda, M., 1996. Use of soybean curd residue, okara, for the solid state substrate in the production of a lipopeptide antibiotic, iturin A, by *Bacillus subtilis* NB22. *Process Biochem.* 31, 801–806. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(96\)00034-9](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(96)00034-9)

- Ongena, M., Jacques, P., 2008. Bacillus lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends Microbiol.* 16, 115–125. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.12.009>
- Painmanakul, P., Loubière, K., Hébrard, G., Mietton-Peuchot, M., Roustan, M., 2005. Effect of surfactants on liquid-side mass transfer coefficients. *Chem. Eng. Sci.* 60, 6480–6491. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2005.04.053>
- Pankhania, M., Brindle, K., Stephenson, T., 1999. Membrane aeration bioreactors for wastewater treatment: Completely mixed and plug-flow operation. *Chem. Eng. J.* 73, 131–136. [https://doi.org/10.1016/S1385-8947\(99\)00026-1](https://doi.org/10.1016/S1385-8947(99)00026-1)
- Pen, N., Soussan, L., Belleville, M.P., Sanchez, J., Charmette, C., Paolucci-Jeanjean, D., 2014. An innovative membrane bioreactor for methane biohydroxylation. *Bioresour. Technol.* 174, 42–52. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.001>
- Peypoux, F., Bonmatin, J.M., Wallach, J., 1999. Recent trends in the biochemistry of surfactin. *Appl Microbiol Biotechnol* 51, 553–563.
- Picard, C., 2011. Transfert de matière dans un biofilm aéré sur membrane. Université Toulouse III - Paul Sabatier.
- Piciooreanu, C., Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., 1998. Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential- discrete cellular automaton approach. *Biotechnol. Bioeng.* 58, 101–116. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19980405\)58:1<101::AID-BIT11>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980405)58:1<101::AID-BIT11>3.0.CO;2-M)
- Pierlot, C., Pawlowski, L., Bigan, M., Chagnon, P., 2008. Design of experiments in thermal spraying: A review. *Surf. Coatings Technol.* 202, 4483–4490. <https://doi.org/10.1016/j.surfcoat.2008.04.031>
- Qi, H.N., Goudar, C.T., Michaels, J.D., Henzler, H.J., Jovanovic, G.N., Konstantinov, K.B., 2003. Experimental and theoretical analysis of tubular membrane aeration for mammalian cell bioreactors. *Biotechnol. Prog.* 19, 1183–1189. <https://doi.org/10.1021/bp025780p>
- Rocha, M.V.P., Barreto, R.V.G., Melo, V.M.M., Gonçalves, L.R.B., 2009. Evaluation of cashew apple juice for surfactin production by bacillus subtilis LAMI008. *Appl.*

- Biochem. Biotechnol. 155, 366–378. <https://doi.org/10.1007/s12010-008-8459-x>
- Schaffer, R.B., Ludzack, F.J., Ettinger, M.B., 1960. Sewage Treatment by Oxygenation through Permeable Plastic Films. J. (Water Pollut. Control Fed. <https://doi.org/10.2307/25034243>
- Schneider, M., Reymond, F., Marison, I.W., von Stockar, U., 1995. Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. Enzyme Microb. Technol. 17, 839–847. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(94\)00113-6](https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00113-6)
- Sen, R., Swaminathan, T., 2004. Response surface modeling and optimization to elucidate and analyze the effects of inoculum age and size on surfactin production. Biochem. Eng. J. 21, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.006>
- Seyhi, B., Droguil, P., Buelna, G., Blais, J.-F., Heran, M., 2011. État Actuel Des Connaissances Des Procédés De Bioréacteur À Membrane Pour Le Traitement Et La Réutilisation Des Eaux Usées Industrielles Et Urbaines. Rev. des Sci. l'eau 24, 283. <https://doi.org/10.7202/1006478ar>
- Sharahi, J.Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M.K., Hashemi, A., 2019. Advanced strategies for combating bacterial biofilms. J. Cell. Physiol. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>
- Simões, M., Pereira, M.O., Sillankorva, S., Azeredo, J., Vieira, M.J., 2007. The effect of hydrodynamic conditions on the phenotype of *Pseudomonas fluorescens* biofilms. Biofouling 23, 249–258. <https://doi.org/10.1080/08927010701368476>
- Slivinski, C.T., Mallmann, E., De Araújo, J.M., Mitchell, D.A., Krieger, N., 2012. Production of surfactin by *Bacillus pumilus* UFPEDA 448 in solid-state fermentation using a medium based on okara with sugarcane bagasse as a bulking agent. Process Biochem. 47, 1848–1855. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.06.014>
- Syron, E., Casey, E., 2008. Model-based comparative performance analysis of membrane aerated biofilm reactor configurations. Biotechnol. Bioeng. 99, 1361–1373. <https://doi.org/10.1002/bit.21700>
- Van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J., Eberl, H., Kreft, J., Picioreanu, C., 2002.

- Mathematical modelling of biofilm structures 245–256.
<https://doi.org/10.2166/wst.2010.076>
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugregard, P., Losick, R., Kolter, R., 2013. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 157–168.
<https://doi.org/10.1038/nrmicro2960>
- Vollenbroich, D., Pauli, G., Ozel, M., Vater, J., Özel, M., Vater, J., 1997. Antimycoplasma properties and application in cell culture of surfactin, a lipopeptide antibiotic from *Bacillus subtilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 44–49.
- Wei, Y.H., Chu, I., 2002. Mn²⁺ improves surfactin production by *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Lett.* 24, 479–482. <https://doi.org/10.1023/A:1014534021276>
- Wei, Y.H., Lai, C.C., Chang, J.S., 2007. Using Taguchi experimental design methods to optimize trace element composition for enhanced surfactin production by *Bacillus subtilis* ATCC 21332. *Process Biochem.* 42, 40–45.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.07.025>
- Wei, Y.H., Wang, L.F., Chang, J.S., 2004. Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Prog.* 20, 979–983. <https://doi.org/10.1021/bp030051a>
- White, F.M., 2011. *Fluid Mechanics*, 7th ed. ed. McGraw-Hill, University of Rhode Island.
- Whitman, W.G., 1923. The Two-Film Theory of Gas Absorption. *Chem. Metall. Eng.* 29.
- Wickramasinghe, S.R., Semmens, M.J., Cussler, E.L., 1992. Mass transfer in various hollow fiber geometries. *J. Memb. Sci.* 69, 235–250. [https://doi.org/10.1016/0376-7388\(92\)80042-I](https://doi.org/10.1016/0376-7388(92)80042-I)
- Wiesmann, U., Choi, I.S., Dombrowski, E.-M., 2007. *Fundamentals of biological wastewater treatment*. Wiley-VCH.
- Williamson, K., Woods, S., Strand, S., 1992. Support aerated biofilm reactor. *US Pat.* 5, 116, 506.

- Yasuda, H., Lamaze, C.E., 1972. Transfer of gas to dissolved oxygen in water via porous and nonporous polymer membranes. *J. Appl. Polym. Sci.* 16, 595–601. <https://doi.org/10.1002/app.1972.070160306>
- Yeh, M.S., Wei, Y.H., Chang, J.S., 2006. Bioreactor design for enhanced carrier-assisted surfactin production with *Bacillus subtilis*. *Process Biochem.* 41, 1799–1805. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2006.03.027>
- Yeh, M.S., Wei, Y.H., Chang, J.S., 2005. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Addition of Solid Carriers. *Biotechnol. Prog.* 21, 1329–1334. <https://doi.org/10.1021/bp050040c>
- Zdziennicka, A., Krawczyk, J., Jańczuk, B., 2018. Volumetric properties of rhamnolipid and surfactin at different temperatures. *J. Mol. Liq.* 255, 562–571. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2018.02.015>
- Zhou, C., Ontiveros-Valencia, A., Cornette de Saint Cyr, L., Zevin, A.S., Carey, S.E., Krajmalnik-Brown, R., Rittmann, B.E., 2014. Uranium removal and microbial community in a H₂-based membrane biofilm reactor. *Water Res.* 64, 255–264. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.07.013>
- Zlokarnik, M., 2001. *Stirring : theory and practice*. Wiley-VCH.
- Zune, Q., Soyeurt, D., Toye, D., Ongena, M., Thonart, P., Delvigne, F., 2014. High-energy X-ray tomography analysis of a metal packing biofilm reactor for the production of lipopeptides by *Bacillus subtilis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 89, 382–390. <https://doi.org/10.1002/jctb.4128>

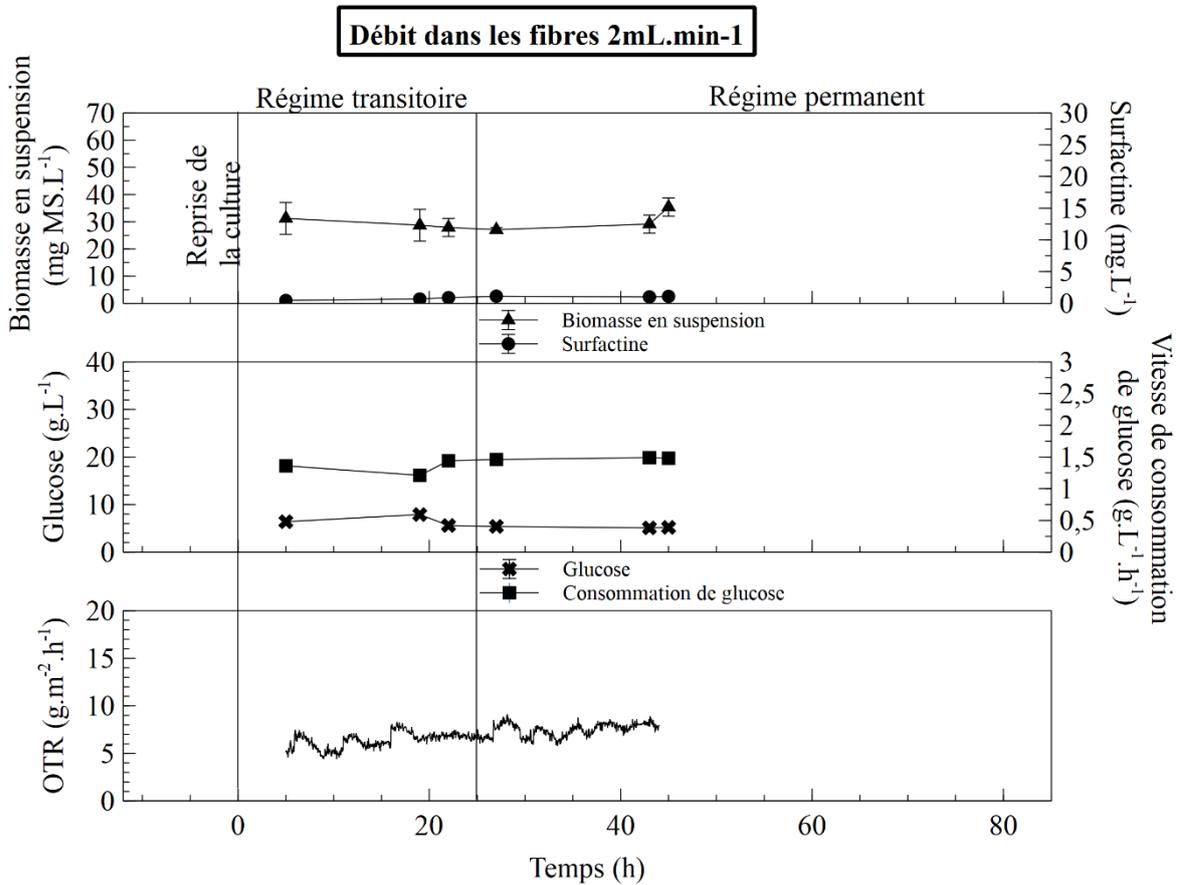
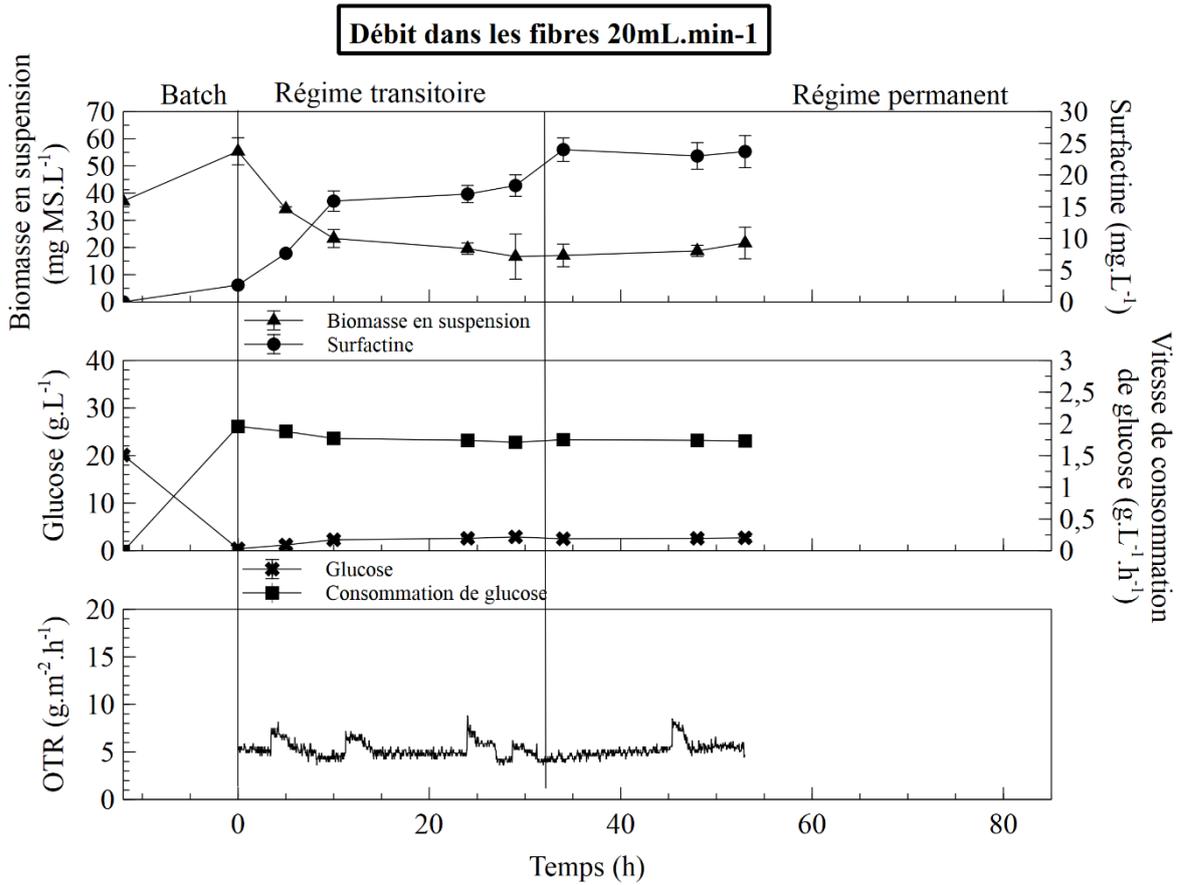
ANNEXES

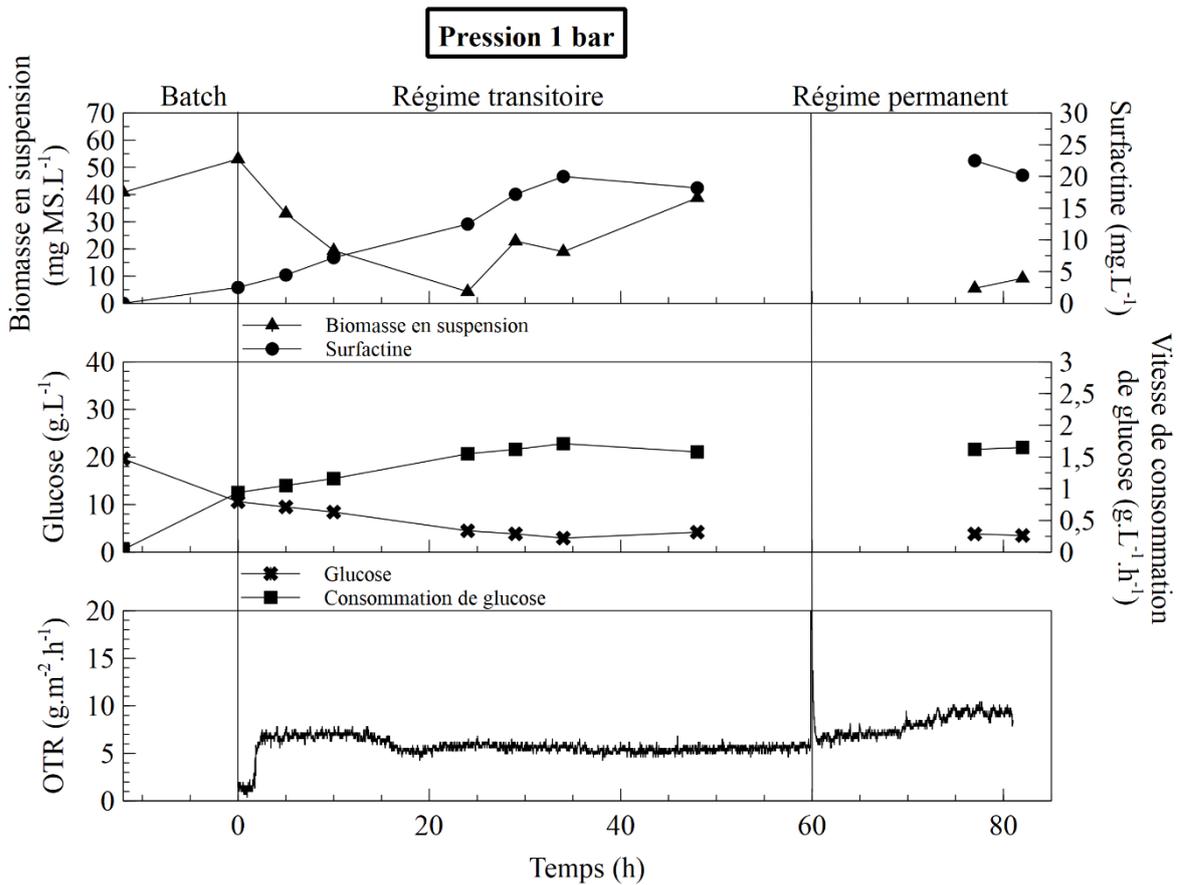
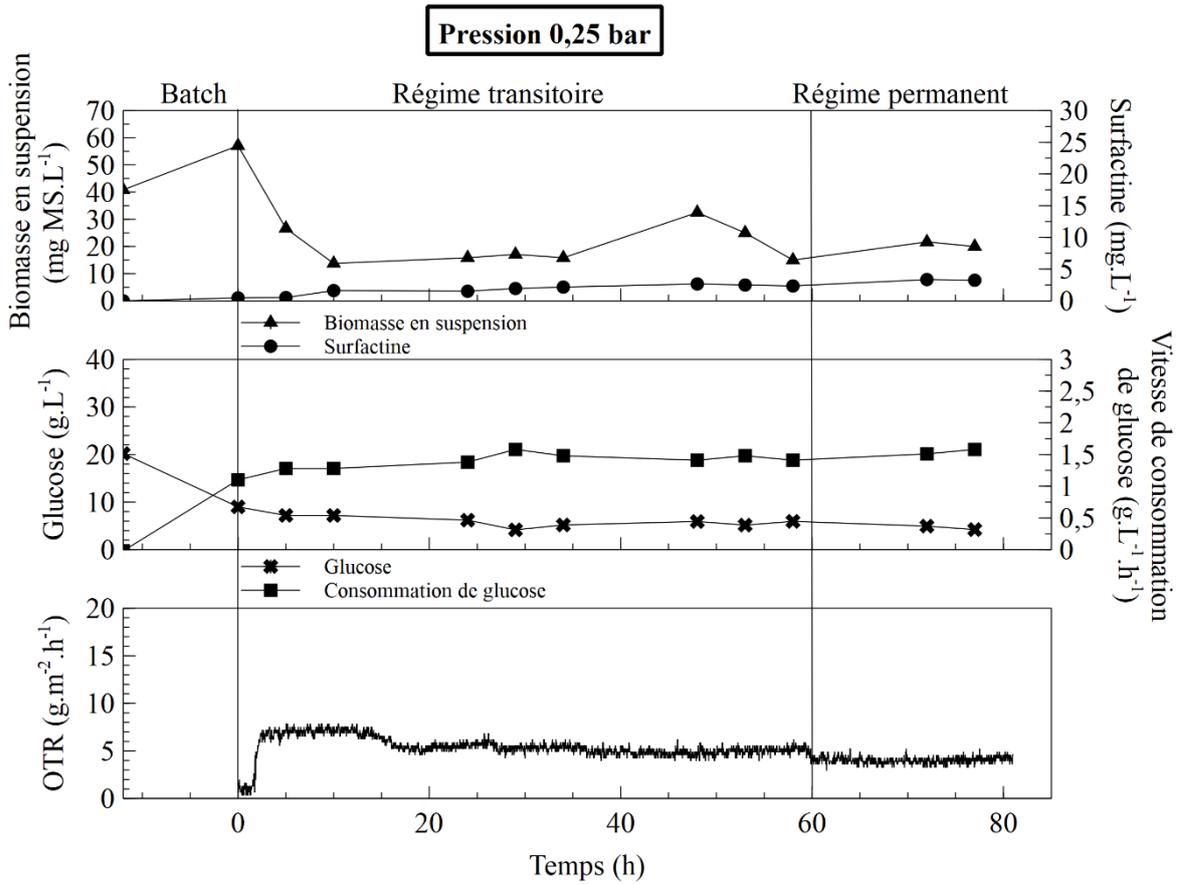
Annexe 1 : Cinétiques de culture en bioréacteur à biofilm aéré par membrane

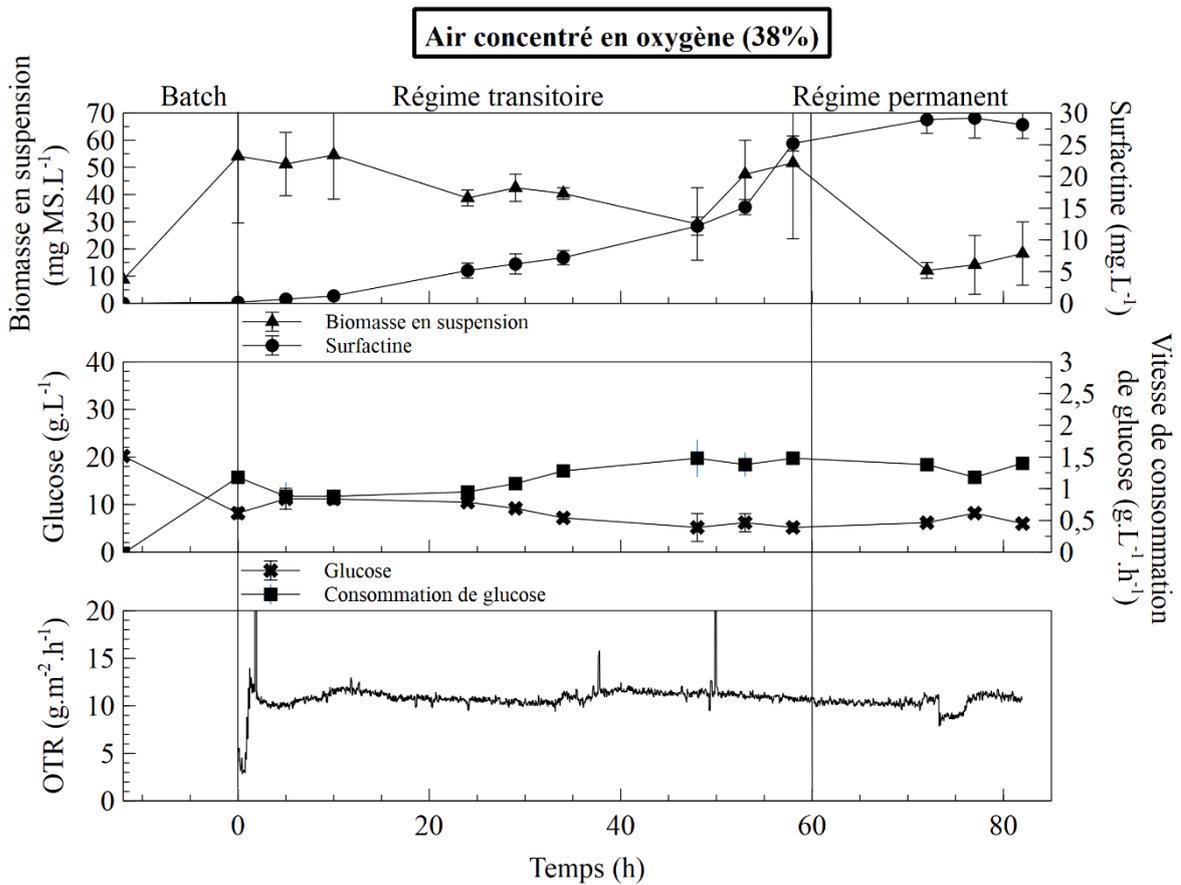
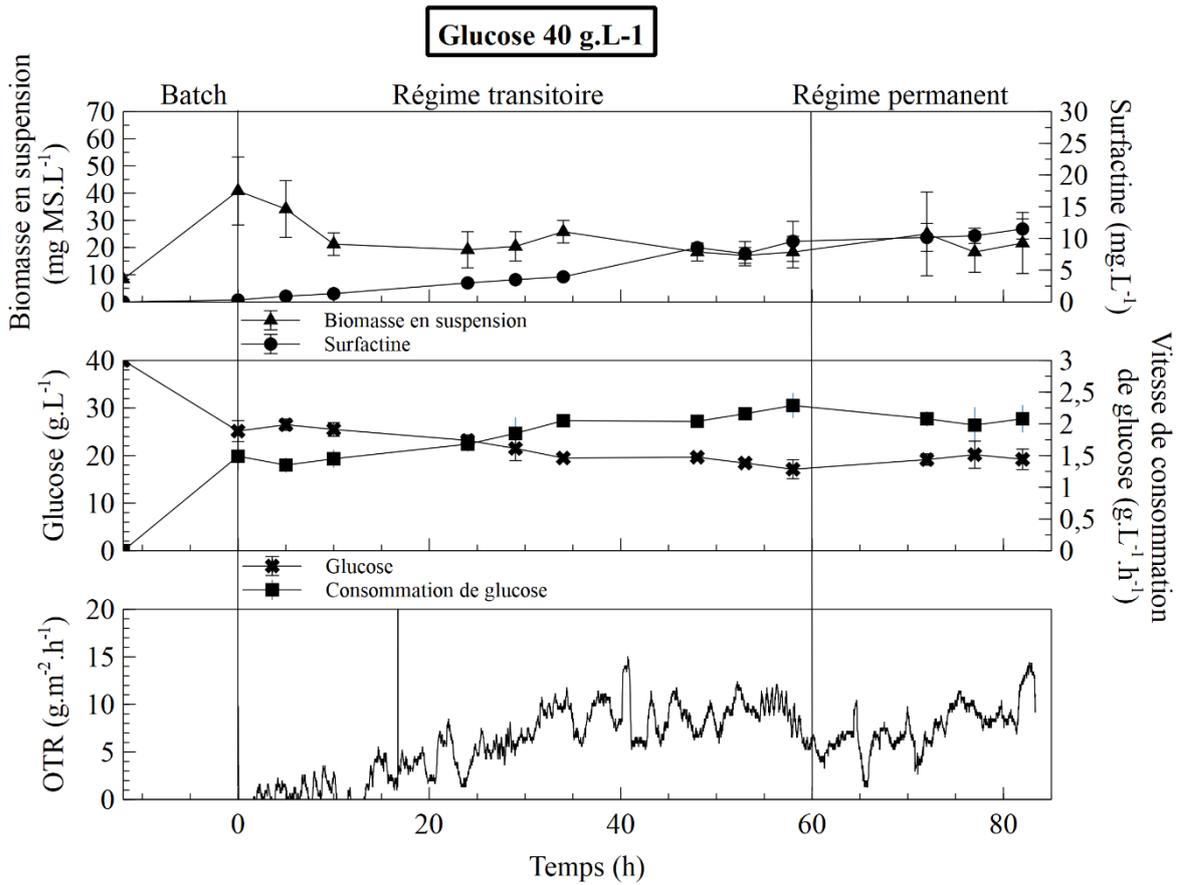
Les résultats des différentes cultures de *B. subtilis* en bioréacteur à biofilm aéré par membrane sont présentés ci-après.

Les résultats des expériences faisant varier le débit de liquide sont issus d'une même culture dont la biomasse a été décrochée mécaniquement de la membrane entre les deux conditions sans arrêt de la manipulation. Le décrochage a été réalisé en augmentant le débit de liquide dans les fibres au maximum (20 mL.min⁻¹) et en augmentant la pression d'air à l'extérieur des fibres de façon à déstabiliser l'interface jusqu'à faire passer de l'air dans le milieu. Ces conditions sont maintenues pendant 30 minutes puis le bioréacteur est vidé puis rempli avec du milieu neuf. Les nouvelles conditions expérimentales sont alors mises en place.

Les résultats des expériences faisant varier la pression n'ont pas d'écart-type car ces résultats sont issus d'un seul bioréacteur. La mise en place de ces expériences étant lourde, il arrive malencontreusement que des contaminations aient lieu. Dans ces deux cas ($p=0,25$ bar et $p=1$ bar), seul un bioréacteur n'a pu être utilisé. Cela explique le manque de relevé entre $t=50$ et $t=75$ minutes car le bioréacteur utilisé a été vidé par suite d'un problème de régulation de la mise en continue. Ce problème ne semble pas avoir impacté significativement les résultats.







Annexe 2 : Tableaux récapitulatifs des paramètres et résultats de culture en bioréacteur à biofilm aéré par membrane

Tableau 18 : Récapitulatifs des paramètres de culture de *B. subtilis* en bioréacteur à biofilm aéré par membrane. Comparaison avec les travaux de (Coutte, 2012)

PARAMÈTRES EXPÉRIENCES									
		(Coutte, 2012)	Référence	$Q_L=20$ $mL.min^{-1}$	$Q_L=2$ $mL.min^{-1}$	$p_G=0,25$ bar	$p_G=1 bar$	[Glucose] =40g.L ⁻¹	[O ₂]=38 %
D	h ⁻¹	0,1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
S	m ²	2,5	2,4.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³	2,4.10 ⁻³
Nombre de fibres	-	1925	4	4	4	4	4	4	4
[Glucose]i	g.L ⁻¹	20	20	20	20	20	20	40	20
Volume	L	3,0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Rapport S/V	m ⁻¹	8,3.10 ⁻⁴	1,2.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁵	1,2.10 ⁻⁵
Q_G	m ³ .h ⁻¹	2.10 ⁻¹	6.10 ⁻³	6.10 ⁻³	6.10 ⁻³	6.10 ⁻³	6.10 ⁻³	6.10 ⁻³	6.10 ⁻³
p_G	Pa	5.10 ⁴	5.10 ⁴	5.10 ⁴	5.10 ⁴	3.10 ⁴	10 ⁵	5.10 ⁴	5.10 ⁴
[Oxygène]i	g.L ⁻¹	-	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,50
Q_L	L.h ⁻¹	60	0,6	1,2	0,12	0,6	0,6	0,6	0,6
v_L	m.h ⁻¹	71	340	679	68	340	340	340	340
Re	-	15	71	141	14	71	71	71	71

Tableau 19 : Récapitulatifs des résultats de culture de *B. subtilis* en bioréacteur à biofilm aéré par membrane d'un point de vue bioréacteur. Comparaison avec les travaux de (Coutte, 2012)

		<i>PARAMÈTRES BIORÉACTEUR (rapportés au volume)</i>							
		(Coutte, 2012)	Référence	$Q_L=20$ $mL.min^{-1}$	$Q_L=2$ $mL.min^{-1}$	$p_G=0,25$ bar	$p_G=1$ bar	[Glucose] j=40g.L ⁻¹	[O ₂]=38 %
Biomasse planctonique (X)	mgXp.L ⁻¹	2500	25±3	19±3	31±5	19±4	7±3	22±4	15±4
Surfactine (P)	mgP.L ⁻¹	315	18±3	24±1	1±1	3±1	21±2	11±1	29
Glucose (S)	gS.L ⁻¹	1	10±1	3±1	5±1	5±1	4±1	20±1	7±2
rXp	mgXp.L ⁻¹ .h ⁻¹	250	13±1	10±2	15±3	9±2	4±2	11±2	7±2
rP	mgP.L ⁻¹ .h ⁻¹	31,5	8,8±1,2	11,8±0,3	0,5±0,1	1,5±0,3	10,7±0,8	5,3±0,4	14,4±0,3
rS	gS.L ⁻¹ .h ⁻¹	1,9	4,8±0,3	8,7±0,1	7,4±0,1	7,5±0,4	8,2±0,1	10,2±0,3	6,6±0,6
Y_{P/S}	mgP.gS ⁻¹	16,6	1,8	1,4	0,1	0,2	1,3	0,5	2,2

Tableau 20 : Récapitulatifs des résultats de culture de *B. subtilis* en bioréacteur à biofilm aéré par membrane d'un point de vue membrane. Comparaison avec les travaux de (Coutte, 2012)

		<i>PARAMÈTRES MEMBRANE (rapportés à la surface)</i>							
		(Coutte, 2012)	Référence	$Q_L=20$ $mL.min^{-1}$	$Q_L=2$ $mL.min^{-1}$	$p_G=0,25$ bar	$p_G=1$ bar	[Glucose]]=40g.L ⁻¹	[O ₂]=38 %
Biomasse fixée (Xf)	mgXf.m ⁻²	3640	4000 ±1100	5000 ±2600	21000 ±1700	18000 ±900	11000 ±2700	15400 ±1800	5000 ±1400
Surfactine (P)	mgP.m ⁻²	378	1500 ±200	1960 ±50	89 ±5	250 ±50	1780 ±140	890 ±60	2400 ±50
Glucose (S)	gS.m ⁻²	1	870 ±60	220 ±10	440 ±20	420 ±80	310 ±20	1630 ±50	570 ±110
rXp	mgXp.m ⁻² .h ⁻¹	364	2000 ±1300	2500 ±900	10500 ±500	9100 ±1400	5500 ±900	7700 ±700	2510
rP	mgP.m ⁻² .h ⁻¹	38	730 ±100	980 ±30	50 ±10	120 ±30	890 ±70	450 ±30	1200 ±30
rS	gS.m ⁻² .h ⁻¹	0,1	440 ±30	110 ±10	220 ±10	210 ±40	150 ±10	810 ±30	280 ±60
OTR	gO ₂ .m ⁻² .h ⁻¹	-	14±1	5±1	8±1	4±1	8±2	7±2	11±1
OTR selon modèle	gO ₂ .m ⁻² .h ⁻¹	0,002	0,7	1,0	0,3	0,8	0,7	0,7	0,7

ANNEXES

Tableau 21 : Récapitulatifs des résultats de culture de *B. subtilis* en bioréacteur à biofilm aéré par membrane d'un point de vue biofilm. Comparaison avec les travaux de (Coutte, 2012)

<i>PARAMÈTRES BIOFILM (rapportés à la quantité de biomasse fixée)</i>									
		(Coutte, 2012)	Référence	$Q_L=20$ $mL.min^{-1}$	$Q_L=2$ $mL.min^{-1}$	$p_G=0,25$ bar	$p_G=1$ <i>bar</i>	[Glucose]]=40g.L ⁻¹	[O ₂]=38 %
Biomasse fixée (X_f)	mgX _f	9100	10±2	12±6	50±4	44±2	26±6	37±4	12±3
Pourcentage de biomasse fixée	%	55%	66%	76%	89%	92%	95%	89%	80%
Y_{X/X_f}	gX _p .gX _f ⁻¹ .h ⁻¹	82	262	160	61	43	28	59	123
Y_{P/X_f}	mgP.gX _f ⁻¹ .h ⁻¹	10	183	196	2	7	81	29	239
Y_{O₂/X_f}	gO ₂ .gX _f ⁻¹ .h ⁻¹		3,5	1,1	0,4	0,2	0,7	0,5	2,1