



HAL
open science

Etude et modélisation de la fermentation IBE en biofilm

Maxime Carrié

► **To cite this version:**

Maxime Carrié. Etude et modélisation de la fermentation IBE en biofilm. Biotechnologies. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASB053 . tel-03545640

HAL Id: tel-03545640

<https://pastel.hal.science/tel-03545640>

Submitted on 27 Jan 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Étude et modélisation de la fermentation
IBE en biofilm

*Study and modeling of the IBE fermentation
using biofilm.*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n°581 : agriculture, alimentation, biologie,
environnement et santé (ABIES)
Spécialité de doctorat: Biotechnologies

Unité de recherche : IFPEN direction conception et modélisation de procédés. Rond-
point de l'échangeur, 69360 Solaize
Référent : AgroParisTech

Thèse présentée et soutenue à l'Université Paris-Saclay,

le 09/11/2021, par

Maxime CARRIÉ

Composition du Jury

Sophie LANDAUD

Professeur, AgroParisTech – Université Paris-Saclay

Présidente

Nicolas BERNET

Directeur de recherche, INRAE Centre Occitanie Montpellier

Rapporteur & Examineur

Cédric BRANDAM

Professeur, ENSIACET

Rapporteur & Examineur

Laetitia FAURE

Cadre scientifique, Lesaffre

Examinatrice

Direction de la thèse

Fadhel BEN-CHAABANE

Cadre scientifique des EPIC (HDR), IFP Énergies Nouvelles

Directeur de thèse

Jean-Christophe GABELLE

Ingénieur de recherche, IFP Énergies Nouvelles.

Co-Encadrant & Examineur

Hélène VELLY

Ingénieur de recherche, IFP Énergies Nouvelles

Co- Encadrante & Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Philippe Maurel ainsi que Antoine Margeot pour m'avoir accueilli au sein de leurs départements respectifs (Génie Chimique et technologies, Biotechnologies) au cours de cette thèse.

Je remercie Cédric Brandam, professeur à l'ENSIACET de Toulouse et Nicolas Pernet directeur de recherche à l'INRAE de Narbonne d'avoir accepté le rôle de rapporteur de ce cette thèse ainsi que pour la pertinence de leurs remarques et leurs questions au cours de la soutenance. Je tiens à remercier vivement Sophie Landaud pour avoir accepté d'être la présidente de ce jury de thèse ainsi que Laetitia Faure pour avoir acceptée d'être examinatrice de ce travail de thèse.

Je souhaite également remercier vivement mes encadrants de thèse sans qui j'aurais eu bien du mal à maîtriser tous les différents aspects de ce projet. Merci Jean-Christophe pour tes conseils organisationnels et rédactionnels ainsi que pour ta culture scientifique dans le domaine du génie chimique. Je me souviendrai de tes règles (un peu arbitraire, il faudra bien que tu l'admettes.) à chaque fois que je devrais retracer un graphe.

Merci Hélène pour ta disponibilité et ta réactivité à chaque fois que je suis venu réaliser des expériences à Rueil-Malmaison. Merci également pour tous les conseils prodigués sur la rédaction scientifique et la physiologie bactérienne. J'ai beaucoup apprécié nos discussions sur les problématiques scientifiques de ce projet. Je te remercie pour m'avoir transmis ta passion pour le domaine du génie microbiologique, et pour avoir toujours fait preuve de bienveillance au cours de cette thèse.

Merci à mon directeur de thèse Fadhel, pour son optimisme et pour ses nombreuses bonnes idées pour l'amélioration des procédés. Je tiens également à te remercier pour tes précieux conseils pour le développement des modèles cinétiques appliqués à la fermentation IBE. Je pense que ta gentillesse et ta patience m'ont aidé à m'intéresser à ce domaine que j'ai trouvé passionnant au cours de mon doctorat.

Je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont aidé à réaliser cette thèse. Merci à Amandine et Séverine pour leurs aides à la mise en place des systèmes de fermentation continue au sein du laboratoire de Solaize. Un grand merci à Aurélien Coquard pour son aide (et sa persévérance !) dans le développement des méthodes analytiques par CPG. Merci à Sandra et Angélique de l'équipe fermentation *Clostri* pour leurs accueils et leurs disponibilités lors de mes expériences à Rueil.

Merci à Giulia (éminente professeure en devenir) et à Gabriel (futur millionnaire) pour m'avoir supporté dans leur bureau au cours des trois années de thèse, particulièrement pendant la

période de rédaction. Bien que nos sujets de recherche soient très différents, j'ai beaucoup apprécié nos réunions préparatoires pour les animations scientifiques nos pause-café, nos sorties à Lyon ainsi que nos réunions en visio pendant le confinement. Merci à Gaurav, Laura, Aleksandra, Gianluca, Christina, Lucas pour les pauses, les sorties au théâtre, dans les restaurants et tous les bons moments passés à l'IFPEN.

Merci aux thésards de Rueil, Alexandre, Teddy et Sarah que j'ai pu revoir régulièrement tout au long de ma thèse lors de mes sessions expérimentales à Paris. Je les remercie de m'avoir fait découvrir le fameux café Leffe et de m'avoir intégré au groupe lors de mes visites. J'en profite également pour remercier Simon et Simon, partenaires des footings midi dans les bois de Rueil.

Je souhaite remercier mes parents, ainsi que mes frères Mathieu et Théo ainsi que ma sœur Noémie pour leurs soutiens tout au long de cette thèse. Je tiens également à remercier ma belle-mère Anne Thierry pour sa formation accélérée à la rédaction scientifique ainsi que pour sa relecture assidue des articles soumis lors de cette thèse.

Enfin, j'aimerais remercier ma compagne Félicie qui m'a supporté et aidé tout au long de ces trois années de thèse.

Liste des publications et communications

Liste des publications dans des revues à comité de lecture

- M. Carrié, J-C. Gabelle, N. Lopes-Ferreira, H. Velly. Enzymatic breakdown of biofilm matrix to allow flow cytometry viability analysis of *Clostridium beijerinckii* cells, soumis à *Journal of Applied Microbiology*, le 07/07/2021
- M. Carrié, H. Velly, F. Ben-Chaabane, J-C. Gabelle. Modeling fixed bed bioreactors for IBE production using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 immobilized on polyurethane foams, soumis à *Biochemical Engineering Journal* le 17/09/21
- M. Carrié, J-C. Gabelle, F. Ben Chaabane , H. Velly Evolution of biofilm cells viability in fixed bed biofilm reactor during isopropanol-butanol fermentation, en cours de rédaction, à soumettre dans *Letters in biotechnology*.

Liste des communications en congrès :

Communications affichées

- M. Carrié, J-C. Gabelle, *Characterization of a natural isopropanol producer, Clostridium beijerinckii, during continuous biofilm fermentation* 5th European Congress of Applied Biotechnology Florence 15-19 Septembre 2019
- M. Carrié, H. Velly, J-C Gabelle, F. Ben Chaabane. *Viability of mono-specie biofilm formed by the solvent producer Clostridium beijerinckii during continuous fermentation in packed bed bioreactor*. Biofilm K9, 28/09/2020-01/10/2020, Karlsruhe, Allemagne.

Communications orales

- M. Carrié, H. Velly, F. Ben-Chaabane, J-C. Gabelle, *Modeling immobilized cell process for isopropanol and butanol production* 6th European Congress of Applied Biotechnology 20-23 Septembre 2021.
- M. Carrié, J-C Gabelle, F. Ben Chaabane, H. Velly. Étude de viabilité par cytométrie en flux d'un biofilm formé par *Clostridium beijerinckii* au cours d'une fermentation continue en lit fixe,

24^{eme} Congrès de l'association Française de cytométrie en flux 6-8 Octobre 2021, Strasbourg, France.

Table des matières

REMERCIEMENTS	2
LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	4
Liste des publications dans des revues à comité de lecture	4
Liste des communications en congrès :	4
TABLE DES MATIERES	6
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES TABLEAUX	14
INTRODUCTION ET ENJEUX	15
1.1 Les bioproduits, une industrie d’avenir pour l’Europe.	15
1.2 Le marché de l’isopropanol et du butanol.....	15
1.3 Les bioprocédés pour la production de molécules pour l’industrie chimique	16
1.4 Le projet IBIS.....	17
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	18
1 Les clostridia solvantogènes	18
1.1 Métabolisme.....	19
1.2 Cycle de vie des Clostridia solvantogènes	22
1.3 La formation des biofilms chez les clostridia	26
2 Les procédés de fermentation batch, fed batch, continus et continus à cellules immobilisées pour la fermentation IBE	31
2.1 Fermentation A-IBE à cellules libres : avantages et limites	33
2.2 Procédés de fermentation à cellules immobilisées pour la fermentation A-IBE	37
2.3 Influence des propriétés physico chimiques des supports sur le procédé de fermentation A/IBE à biofilm	43
3 La modélisation des procédés de fermentation A/IBE	49
3.1 Les modèles structurés et les modèles non structurés	49
3.2 Démarche de la modélisation	50
3.3 Modélisation de la fermentation A/IBE en biofilm	55
4 Objectifs de la thèse	62

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES 64

1	Souches et modes de culture 64
1.1	Souche 64
1.2	Milieux de culture 64
1.3	Conditions de culture 66
1.4	Description des systèmes expérimentaux 67
2.	Analyses des fermentations 72
2.1	Mesures pour le suivi 72
2.2	Dosage des métabolites 73
2.3	Analyses de la viabilité 75
3.	Analyse des performances et modélisation des procédés de fermentation 78
3.1	Analyse des Performances de la fermentation 78
3.2	Modélisation des procédés de fermentation 80

CHAPITRE 3 : MODELISATION DE LA FERMENTATION ISOPROPANOL BUTANOL ÉTHANOL 84

1.	Introduction 84
2	Développement du modèle batch pour la fermentation IBE 85
2.1	Démarche de modélisation. 85
2.2	Description du modèle batch 86
2.3	Identification des paramètres de fermentation lors de la fermentation en batch 88
2.4	Validation de l'identification des paramètres et du modèle 91
2.5	Étude de sensibilité sur les paramètres 95
3	Construction du modèle à cellules immobilisées 97
3.1	Structure du modèle 97
3.2	Identification des paramètres liés à l'attachement et au détachement de la biomasse du biofilm 100
3.3	Validation du modèle 104
3.4	Étude de sensibilité sur les paramètres du modèle à cellules immobilisées 110
4	Conclusion 112

CHAPITRE 4 : CARACTERISATION DU BIOFILM FORME PAR *CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII* 114

1.	Introduction 114
2.	Caractérisation du biofilm par microscopie confocale 115
2.1	Caractérisation du biofilm dans les mousses en polyuréthane 115
2.2	Analyse de viabilité 119

Table des matières

3. Caractérisation du biofilm par cytométrie en flux	121
3.1 Détachement mécanique du biofilm de la mousse en polyuréthane employée lors des fermentations avant analyse par cytométrie en flux.	121
3.2 Mise au point d'un prétraitement enzymatique du biofilm formé par <i>C. beijerinckii</i>	123
3.3 Optimisation du temps de traitement enzymatique	128
4. Conclusion du chapitre	130

CHAPITRE 5 : ÉTUDE DE LA VIABILITE CELLULAIRE AU COURS DES FERMENTATIONS IBE..... **132**

1. Introduction	132
2. Relation entre viabilité et productivité volumique en bioréacteur batch	133
2.1 Cinétique de production des métabolites en fermentation batch.....	133
2.2 Analyse de la viabilité	135
3 Cas de la croissance en bioréacteur à lit fixe	141
3.1 Cinétique de croissance du biofilm dans les bioréacteurs à lit fixe	141
3.2 Analyse de la viabilité du biofilm	147
4 Stratégie de contrôle de croissance du biofilm en ligne	150
4.1 Production de gaz et viabilité cellulaire au cours des fermentation en batch.	150
4.2 Validation de l'estimation via une analyse d'une fermentation continue à cellules libres	151
5 Conclusion du chapitre	153

DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALE..... **132**

PERSPECTIVES..... **156**

1 Modélisation	156
1.1 Modèle cinétique.....	156
1.2 Taux de purge et taux de cisaillement.....	156
2 Conduite de procédé	157
2.1 Analyse en ligne.....	157
2.2 Automatisation de la montée en débit.....	157
3 Performance du procédé	158
3.1 Optimisation des OPEX.....	158
3.2 Robustesse du procédé	158
3.3 Choix du solide support	159
4 Montée en échelle	159

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	161
ANNEXES	175
Annexe 1 : Fiche technique de la mousse en polyuréthane utilisée pour l'immobilisation cellulaire	175
Annexe 2 : Nomenclature pour la construction des modèles cinétiques.....	176
Annexe 3 : Code python développé pour effectuer les analyses de sensibilité des modèles dynamiques développés.....	176
Annexe 4 : Code python développé pour résoudre le système d'équations différentielles qui composent le modèle ainsi que le critère de régression utilisé pour obtenir le jeu optimal de paramètres.	188
Annexe 5 : profil FSC-SSC des populations cellulaires au cours d'une fermentation batch à 34°C à pH libre marquée à A) cFDA seul B) IP seul C) non marquées.....	206

Liste des figures

FIGURE 1 : PHOTOGRAPHIE DE <i>CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII</i> P-3 PRISE AU MICROSCOPE ELECTRONIQUE A BALAYAGE GROSSISSEMENT x20 000 (NOPARAT ET AL. 2011)	18
FIGURE 2: REPRESENTATION SIMPLIFIEE DU METABOLISME DES <i>CLOSTRIDIA</i> SOLVANTOGENES (HOCQ ET AL. 2019).....	19
FIGURE 3 : CYCLE DE VIE DE <i>CLOSTRIDIUM BEIJERINCKII</i> (PATAKOVA ET AL. 2014).....	26
FIGURE 4 : REPRESENTATION DES DIFFERENTES ETAPES DE FORMATIONS D'UN BIOFILM (MAUNDERS AND WELCH 2017).....	28
FIGURE 5 : SCHEMA REPRESENTANT LES DIFFERENTS PARAMETRES QUI INFLUENCENT L'ADHESION MICROBIENNE ET LA FORMATION DE BIOFILM (MUFFLER AND ULBER 2014).....	29
FIGURE 6 SCHEMA DU NOMBRE DE REACTEURS REQUIS AFIN DE PRODUIRE 100 KILO TONNES D'UN MELANGE ISOPROPANOL-BUTANOL-ETHANOL PAR ANNEE EN FONCTION DE LA PRODUCTIVITE VOLUMIQUE DES PROCEDES ETUDIES(DOS SANTOS VIEIRA ET AL. 2019) ..	33
FIGURE 7 : SCHEMA D'UN BIOREACTEUR AGITE UTILISE POUR LA FERMENTATION A CELLULES IMMOBILISEES.....	37
FIGURE 8 : SCHEMA D'UN BIOREACTEUR A LIT FIXE	38
FIGURE 9 : SCHEMA D'UN BIOREACTEUR A LIT FLUIDISE, LE GAZ UTILISE EST DU DIAZOTE.	42
FIGURE 10: SCHEMA DU REACTEUR A BIOFILM BIOSURFACE TECHNOLOGIES	68
FIGURE 11: SCHEMA DU MONTAGE DE FERMENTATION EN FLACONS SCHOTT POUR ANALYSE DU BIOFILM PAR CYTOMETRIE EN FLUX	69
FIGURE 12 SCHEMA REPRESENTATIF DU BIOREACTEUR COLONNE	70
FIGURE 13 : PHOTOGRAPHIE DES BIOREACTEURS SARTORIUS D'UN VOLUME UTILE DE 500 ML UTILISES POUR LES ETUDES CINETIQUES BATCHS	71
FIGURE 14 : RELATION ENTRE MASSE SECHE CELLULAIRE PESEE ET DENSITE OPTIQUE MESUREE A 600NM (LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT LES ECARTS TYPES MESURES SUR TROIS MESURES).....	73
FIGURE 15 : DESCRIPTION DE LA METHODE DE DEVELOPPEMENT DES MODELES CINETIQUES EN BIOPROCEDES.	82
FIGURE 16 : RESULTATS DE LA SIMULATION REALISEE AVEC LES PARAMETRES IDENTIFIES COMPARES AUX DONNEES EXPERIMENTALES OBTENUES LORS D'UNE FERMENTATION BATCH EFFECTUEE A 34°C ET SANS REGULATION DU PH. A) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN ISOPROPANOL (ETOILES BLANCHES), BUTANOL (RONDS BLANCS) ET EN SOLVANTS TOTAUX (LOSANGES BLANCS) B) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION SIMULEE ET EXPERIMENTALE EN ACETATE (CARRS BLANCS) ET BUTYRATE (LOSANGES BLANCS) C) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION SIMULEE ET EXPERIMENTALE EN BIOMASSE (LOSANGES BLANCS) ET GLUCOSE RESIDUEL (CARRS BLANCS) (N=3).	90
FIGURE 17 : GRAPHIQUE REPRESENTANT LA MASSE CARBONE REPARTIE PAR METABOLITE DE FERMENTATION EN DEBUT ET EN FIN DE FERMENTATION EN BATCH.....	91
FIGURE 18 : VALIDATION STATISTIQUE POUR L'IDENTIFICATION DES PARAMETRES CINETIQUES DU MODELE BATCH. A) ECART ENTRE DONNEES DU MODELE ET POINTS EXPERIMENTAUX (CROIX BLEUES) ET ECART TYPE DES RESIDUS (TRAITS POINTILLES BLEUS). B) DISTRIBUTION DES RESIDUS EN FONCTION DES QUANTILES DE LA LOI NORMALE (QQ-PLOT).....	93
FIGURE 19 : VALIDATION DES PARAMETRES IDENTIFIES COMPARES AUX DONNEES EXPERIMENTALES OBTENUES LORS D'UNE FERMENTATION BATCH EFFECTUEE A 34°C ET SANS REGULATION DE PH. A) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN ISOPROPANOL (ETOILES BLANCHES), BUTANOL (RONDS BLANCS) ET EN SOLVANTS TOTAUX (LOSANGES BLANCS) SIMULEE ET EXPERIMENTALE B) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN ACETATE (CARRS BLANCS), BUTYRATE (LOSANGES BLANCS) SIMULEE ET EXPERIMENTALE C) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE (LOSANGES BLANCS) ET GLUCOSE RESIDUEL (CARRS BLANCS) SIMULEE ET EXPERIMENTALE.....	94
FIGURE 20 : ÉTUDE DE SENSIBILITE SUR CHACUNE DES VARIABLES D'ETAT DU MODELE. X : BIOMASSE EN SUSPENSION, S : GLUCOSE RESIDUEL, I : ISOPROPANOL, B : BUTANOL, AA : ACETATE, AB : BUTYRATE.	96
FIGURE 21 : CINETIQUES DE LA FERMENTATION A CELLULES IMMOBILISEES MODELISEES COMPAREES AUX DONNEES EXPERIMENTALES A) ÉVOLUTION DU TAUX DE DILUTION (CERCLES ET LIGNE CONTINUE), CONCENTRATION EN BUTANOL (CERCLES BLANCS ET TRAIT POINTILLE), ISOPROPANOL (ETOILES BLANCHES ET TRAIT CONTINU) ET SOLVANTS TOTAUX (LOSANGES BLANCS ET TRAIT CONTINU). B) ÉVOLUTION DE LA PRODUCTIVITE VOLUMIQUE EXPERIMENTALE ET SIMULEE (POINTS NOIRS ET TRAIT CONTINU). C) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EXPERIMENTALE ET SIMULEE EN ACETATE (CARRS BLANC ET TRAIT CONTINU) ET EN BUTYRATE (LOSANGES BLANCS ET TRAITS POINTILLES) D) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EXPERIMENTALE ET SIMULEE EN GLUCOSE (CARRE BLANC ET TRAIT	

POINTILLE) ET EN BIOMASSE EN SUSPENSION (LOSANGE BLANC ET TRAIT CONTINU). E) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EXPERIMENTALE ET MODELISEE EN BIOMASSE EN SUSPENSION (CARRES BLANCS ET TRAIT CONTINU) ET BIOMASSE IMMOBILISEE (RONDS NOIRS ET TRAIT DISCONTINUS).LA FERMENTATION A ETE EFFECTUEE AVEC LE BIOREACTEUR A BIOFILM A 34 °C ET SANS REGULATION DE PH.....	101
FIGURE 22 : MASSE CARBONE REPARTIE PAR METABOLITE DE FERMENTATION EN APPORTEE AU SYSTEME ET SORTIE DU SYSTEME AU COURS D'UNE FERMENTATION CONTINUE A CELLULES IMMOBILISEE.	105
FIGURE 23 : VALIDATION STATISTIQUE POUR L'IDENTIFICATION DES PARAMETRES CINETIQUE DU MODELE DE FERMENTATION A CELLULES IMMOBILISEES. A) ECART ENTRE DONNEES DU MODELE ET POINTS EXPERIMENTAUX (CROIX BLEUES) ET ECART TYPES DES RESIDUS (TRAITS POINTILLES BLEUS. B) DISTRIBUTION DES RESIDUS EN FONCTION DES QUANTILES DE LA LOI NORMALE (QQ-PLOT).	106
FIGURE 24 : ÉVOLUTION DES DONNEES MODELISEES COMPAREES AUX DONNEES EXPERIMENTALES PENDANT UNE FERMENTATION AVEC LE BIOREACTEUR A COLONNE EFFECTUEE A 34 °C ET SANS REGULATION DE PH. A) ÉVOLUTION DU TAUX DE DILUTION (CERCLES ET LIGNE CONTINUE) ET DE LA CONCENTRATION EN BUTANOL (CERCLES BLANCS ET TRAIT POINTILLE), ISOPROPANOL (ETOILES BLANCHES ET TRAIT CONTINU) ET SOLVANTS TOTAUX (LOSANGES BLANCS ET TRAIT CONTINU). B) ÉVOLUTION DE LA PRODUCTIVITE VOLUMIQUE EXPERIMENTALE ET SIMULEE (POINTS NOIRS ET TRAIT CONTINU). C) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN ACETATE (CARRES BLANC ET TRAIT CONTINU) ET EN BUTYRATE (LOSANGES BLANCS ET TRAITS POINTILLES) EXPERIMENTALE ET SIMULEE D) ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE (CARRE BLANC ET TRAIT POINTILLE) ET EN BIOMASSE EN SUSPENSION (LOSANGE BLANC ET TRAIT CONTINU) EXPERIMENTALE ET SIMULEE. E) ÉVOLUTION DE LA BIOMASSE IMMOBILISEE EXPERIMENTALE ET MODELISEE (RONDS NOIRS ET TRAIT DISCONTINUS).....	107
FIGURE 25 : ÉTUDE DE SENSIBILITE SUR CHACUNE DES VARIABLES D'ETAT DU MODELE Xi : BIOMASSE IMMOBILISEE, Xs : BIOMASSE EN SUSPENSION, S : GLUCOSE RESIDUEL, I : ISOPROPANOL, B : BUTANOL, AA : ACETATE, AB : BUTYRATE, E : ETHANOL	111
FIGURE 26 A) RECONSTRUCTION D'IMAGES 3D OBTENUES APRES ANALYSE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE DU BIOFILM FORME PAR <i>C. BEIJERINCKII</i> AU COURS D'UNE FERMENTATION CONTINUE AVEC IMMOBILISATION CELLULAIRE (GROSSISSEMENT X 100). LES ECHANTILLONS ONT ETE TRAITES AVEC UN MELANGE DE SYTO 9 (VERT), MARQUEUR DES CELLULES TOTALES ($\lambda_{EXCITATION} = 488$ NM, $\lambda_{EMISSION} : 495-536$ NM), COMBINE AVEC DE LA CONACAVALINE A (ROUGE), MARQUEUR DES POLYSACCHARIDES COMPOSANT LES EPS ($\lambda_{EXCITATION} = 488$ NM, $\lambda_{EMISSION} : 550-600$ NM). SUR LES MICROPHOTOGRAPHIES PRISES A T= 24H, SEULE LA MOUSSE EN POLYURETHANE EST VISIBLE A CAUSE DE SON AUTO-FLUORESCENCE. B) ANALYSE DU POURCENTAGE DE L'IMAGE RECOUVERTE PAR LA FLUORESCENCE DU SYTO 9 ET DE LA CONACAVALINE A EN FONCTION DE LA PROFONDEUR ANALYSEE AU COURS DE LA FERMENTATION A CELLULES IMMOBILISEES.	116
FIGURE 27 : PHOTOGRAPHIE PRISE AU MICROSCOPE CONFOCALE A BALAYAGE LASER D'UNE MOUSSE EN POLYURETHANE (GROSSISSEMENT X200 - $\lambda_{EXCITATION} = 488$ NM - $\lambda_{EMISSION} = 495-536$ NM)	117
FIGURE 28 : ANALYSE DE VIABILITE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE (GROSSISSEMENT X250) EFFECTUEE SUR UN BIOFILM DE <i>C. BEIJERINCKII</i> FORME SUR MOUSSE EN POLYURETHANE APRES 200 H DE FERMENTATION CONTINUE. A) MARQUAGE DE VIABILITE AVEC LE SYTO 9™ (VERT) ET L'IP (ROUGE) B) ANALYSE DE LA SURFACE DE CHAMP RECOUVERT PAR LES DIFFERENTS CANAUX UTILISES APRES MARQUAGE AU SYTO9™ ET A L'IP EN FONCTION DE LA PROFONDEUR DU BIOFILM ANALYSE C) MARQUAGE DE VIABILITE AVEC LE CFDA (VERT) ET L'IP (ROUGE) D) ANALYSE DE LA SURFACE DE CHAMP RECOUVERT PAR LES DIFFERENTS CANAUX UTILISES APRES MARQUAGE AU CFDA ET A L'IP EN FONCTION DE LA PROFONDEUR DU BIOFILM ANALYSE.	119
FIGURE 29 : A) BIOFILM DETACHE DU SUPPORT PAR AGITATION AU VORTEX PENDANT DEUX MINUTES ET OBSERVE EN MICROSCOPIE OPTIQUE A CHAMP CLAIR(GROSSISSEMENT X200) B) CELLULES DETACHEES DU BIOFILM PAR AGITATION AU VORTEX PENDANT DEUX MINUTES, MARQUEES A L'IP ET AU CFDA PUIS OBSERVEES PAR MICROSCOPIE A EPIFLUORESCENCE (GROSSISSEMENT X400). C) CELLULES DU BIOFILM DETACHEES DU SUPPORT APRES AGITATION AU VORTEX SUIVI D'UN TRAITEMENT ENZYMATIQUE SUCCESSIF DE DNASE I ET DE PROTEINASE K. DES AGREGATS CELLULAIRES SONT OBSERVES SUR LA FIGURE 2A ET 2B AINSI QUE DE L'ADN EXTRACELLULAIRE MARQUE PAR DE L'IP SUR LA FIGURE 2-B.	122
FIGURE 30 ; PROFILS FSC-SSC OBTENUS APRES ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE OBTENUE APRES A) DECROCHEMENT DES CELLULES PAR AGITATION AU VORTEX B) DECROCHEMENT DES CELLULES APRES AGITATION AU VORTEX ET	

TRAITEMENT A LA CAYLASE C) DECROCHEMENT DES CELLULES APRES AGITATION AU VORTEX ET TRAITEMENT A LA CAYLASE + ANTI-PROTEASE.	123
FIGURE 31 : PROFILS FSC-SSC OBTENUS APRES ANALYSE PAR CYTOMETRIE EN FLUX D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE OBTENUE APRES A) DECROCHEMENT DES CELLULES APRES AGITATION AU VORTEX ET TRAITEMENT A LA DNASE I B) DECROCHEMENT DES CELLULES APRES AGITATION AU VORTEX ET TRAITEMENT A LA PROTEINASE K C) DECROCHEMENT DES CELLULES APRES AGITATION AU VORTEX ET TRAITEMENT A LA DNASE I PUIS A LA PROTEINASE K	124
FIGURE 32 : POURCENTAGE DE CELLULES VIABLE (cFDA ⁺ /IP ⁻), ALTEREES (cFDA ⁺ /IP ⁺), MORTES (cFDA ⁺ /IP ⁻) ET EVENEMENTS NON FLUORESCENTS (cFDA ⁻ /IP ⁻) OBTENUS APRES AGITATION AU VORTEX DES MOUSSES EN POLYURETHANE SUR LESQUELLES EST FORME UN BIOFILM DE <i>C. BEIJERINCKII</i> APRES 300H DE FERMENTATION CONTINUE EN BIOREACTEUR ET TRAITEMENT (C) TEMOIN SANS AJOUT D'ENZYMES (D) UTILISATION DE DNASE I, (P) UTILISATION DE PROTEINASE K (D+P) UTILISATION DE DNASE I ET DE PROTEINASE K (CAY) UTILISATION DU COCKTAIL CAYLASE. TOUS LES ECHANTILLONS ONT ETE INCUBES A 34°C PENDANT 1H POUR CHAQUE TRAITEMENT ENZYMATIQUE. A,B,C REPRESENTENT LES DIFFERENCES SIGNIFICATIVES (p < 0.05) ENTRE LES DIFFERENTS TRAITEMENTS SUR LE POURCENTAGE DES CELLULES VIABLES, MORTES ET ALTEREES (N=3).....	125
FIGURE 33 ; ANALYSES DES CELLULES MARQUEES A L'IODURE DE PROPIDIUM APRES TRAITEMENT A LA DNASE I. LES CELLULES FRAICHES ONT ETE ANALYSEES APRES 30 H DE CULTURE EN FIOLE. LES CELLULES ONT ETE TUEES PAR CHAUFFAGE AU BAIN MARIE A 80°C PENDANT 2 MINUTES. APRES REFROIDISSEMENT DE LA SUSPENSION CELLULAIRE, LE TRAITEMENT ENZYMATIQUE A LA DNASE A ETE EFFECTUE. LES CELLULES SONT ENSUITE MARQUEES A L'IP ET ANALYSEES PAR CMF. DES CELLULES FRAICHES MARQUEES A L'IODURE DE PROPIDIUM SONT UTILISEES COMME TEMOIN (N=3)	126
FIGURE 34 : RESULTATS DU DENOMBREMENT DES CELLULES VIABLES DU BIOFILM OBTENUES APRES DECROCHAGE PAR AGITATION AU VORTEX ET (C) INCUBATION A 34°C PENDANT 1H (D) TRAITEMENT A LA DNASE I A 34°C PENDANT 1H (P) TRAITEMENT A LA PROTEINASE K A 34°C PENDANT 1H (D+P) TRAITEMENT A LA DNASE I A 34°C PENDANT 1H SUIVI D'UN TRAITEMENT A LA PROTEINASE K A 34°C PENDANT 1 H. (N=3)	128
FIGURE 35 : POURCENTAGE DES CELLULES VIABLES (cFDA ⁺ /PI ⁻), MORTES (cFDA ⁻ /PI ⁻), ALTEREES (cFDA ⁺ /PI ⁺) DES CELLULES PROVENANT D'UN BIOFILM DE <i>C. BEIJERINCKII</i> APRES 300H DE FERMENTATION CONTINUE ET ANALYSEE PAR CMF APRES DIFFERENTS TEMPS D'INCUBATION DE CHAQUE ENZYME (DNASE I PUIS PROTEINASE K). * REPRESENTE LA DIFFERENCE STATISTIQUE (p < 0.05) DE L'EFFET DU TEMPS DE TRAITEMENT SUR LE POURCENTAGE DE CELLULES VIABLES, MORTES ET ALTEREES.	129
FIGURE 36 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BUTANOL (RONDS STRIES GRIS), BUTYRATE (CROIX NOIRES), ACETATE (LOSANGES NOIRS), ISOPROPANOL (CARRÉS GRIS), AINSI QUE LA DENSITE OPTIQUE MESUREE A 600 NM (ETOILES GRIS) AU COURS D'UNE FERMENTATION BATCH A 34°C ET A PH NON REGULE (LES POINTS REPRESENTENT LA MOYENNE ET LES BARRES D'ERREURS REPRESENTENT LES ECARTS TYPES SUR TROIS EXPERIENCES).	133
FIGURE 37 : ÉVOLUTION DU PROFIL FSC-SSC AU COURS D'UNE FERMENTATION BATCH A 34°C ET SANS REGULATION DE PH	135
FIGURE 38 : ÉVOLUTION DE LA VIABILITE , D'UNE SUSPENSION CELLULAIRE MARQUEE AU CFDA ET A L'IP AU COURS D'UNE FERMENTATION BATCH A 34°C ET A PH NON REGULE (LES BARRES D'ERREURS REPRESENTENT LES ECARTS TYPES SUR TROIS EXPERIENCES).....	137
FIGURE 39 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN CELLULES VIABLES ET MORTES PAR ML DE CULTURE AINSI QUE L'EVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN BUTANOL ET BUTYRATE AU COURS D'UNE FERMENTATION EN BATCH A 34°C ET A PH NON REGULE (LES POINTS REPRESENTENT LES MOYENNES ET LES BARRES D'ERREURS REPRESENTENT LES ECARTS TYPES SUR TROIS EXPERIENCES).....	138
FIGURE 40 PRODUCTIVITE SPECIFIQUE EN BUTANOL EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN BUTANOL DANS LE MILIEU LORS D'UNE FERMENTATION EN BATCH A 34°C ET A PH NON REGULE. A) PAR MASSE DE CELLULES TOTALES DANS LE BIOREACTEUR B) PAR NOMBRE DE CELLULES ACTIVES.ML ⁻¹	139
FIGURE 41 PRODUCTIVITE EN BUTANOL EN FONCTION DE A) LA CONCENTRATION EN BIOMASSE SECHE B) EN CELLULES ACTIVES (cFDA ⁺ /IP ⁻) MESUREES PAR CYTOMETRIE EN FLUX AU COURS D'UNE FERMENTATION BATCH	140
FIGURE 42 :ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN SOLVANTS ET EN ACIDES AINSI QUE DU TAUX DE DILUTION APPLIQUE AU SYSTEME AU COURS D'UNE FERMENTATION IBE A CELLULES IMMOBILISEES.....	142
FIGURE 43 : ÉVOLUTION DE LA CONCENTRATION EN GLUCOSE RESIDUEL, DE LA CONCENTRATION EN BIOMASSE SECHE EN SUSPENSION AINSI QUE DE LA PRODUCTIVITE VOLUMIQUE AU COURS D'UNE FERMENTATION IBE A LIT FIXE EFFECTUEE A 34°C ET A PH NON REGULE.	143

Liste des figures

FIGURE 44 : NOMBRE DE CELLULES ACTIVES EN SUSPENSION ET IMMOBILISEES PAR VOLUME DE BIOREACTEUR AU COURS D'UNE FERMENTATION A CELLULES IMMOBILISEES.....	144
FIGURE 45 PRODUCTIVITE EN BUTANOL EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN CELLULES ACTIVES IMMOBILISEES DETECTEES PAR CYTOMETRIE EN FLUX.	145
FIGURE 46 : ÉVOLUTION DU POURCENTAGE DE CELLULES VIABLES, ALTEREES MORTES ET NON MARQUEES IMMOBILISEES SUR LES MOUSSES EN POLYURETHANE (LES POINTS REPRESENTENT LES MOYENNES ET LES BARRES D'ERREURS REPRESENTENT LES ECARTS TYPES SUR TROIS EXPERIENCES)	147
FIGURE 47 : ÉVOLUTION DU POURCENTAGE DE CELLULES VIABLES, ALTEREES MORTES ET NON MARQUEES EN SUSPENSION	148
FIGURE 48 : REPRESENTATION DU DEBIT GAZEUX PAR VOLUME UTILE DE BIOREACTEUR (L) AINSI QUE DE LA CONCENTRATION EN CELLULES MARQUEES AU CFDA AU COURS D'UNE FERMENTATION TYPE BATCH, A PH NON REGULE ET A TEMPERATURE REGULEE A 34°C. ...	150
FIGURE 49 : EVOLUTION DU NOMBRE DE CELLULES ACTIVES PAR ML DE BIOREACTEUR MESURE PAR CYTOMETRIE EN FLUX (POINTS NOIRS) ET ESTIME GRACE A LA MESURE EN CONTINU DE LA MOYENNE LISSEE DU DEBIT DE GAZ (TRAIT POINTILLES NOIRS) AU COURS D'UNE FERMENTATION CONTINUE A CELLULES LIBRES A 34°C, AVEC CONSIGNE DE PH MINIMAL FIXE A 5.	151
FIGURE 50 : COMPARAISON ENTRE CELLULES ACTIVES EN SUSPENSION MESUREE EXPERIMENTALEMENT AU COURS D'UNE FERMENTATION CONTINUE A CELLULES LIBRES A PH FIXE A 5 ET TEMPERATURE REGULEE A 34 °C ET CONCENTRATION EN CELLULES ACTIVES ESTIMEE A PARTIR DU DEBIT DE GAZ.	152

Liste des tableaux

TABLEAU 1 : PERFORMANCES DE FERMENTATION OBTENUES EN CULTURES BATCH A CELLULES LIBRES CHEZ LES PRINCIPALES SOUCHES DE <i>CLOSTRIDIA SOLVANTOGENES</i> . EN BLEU CLAIR, SONT PRESENTEES DES PERFORMANCES DE LA FERMENTATION IBE ET EN BLEU FONCE DES PERFORMANCES POUR LA FERMENTATION ABE.....	35
TABLEAU 2 : LISTE DES PERFORMANCES OBTENUES DANS DES PROCEDES CONTINUS A CELLULES IMMOBILISEES (<i>PACKED BIOFILM BIOREACTOR</i>) EN FONCTION DES SOUCHES EMPLOYEES, DES SUPPORTS D'IMMOBILISATION CHOISIS ET DES SUBSTRATS UTILISES POUR LA FERMENTATION A-IBE. EN BLEU CLAIR, SONT PRESENTEES LES PERFORMANCES DE LA FERMENTATION IBE ET EN BLEU FONCE LES PERFORMANCES POUR LA FERMENTATION ABE	41
TABLEAU 3 : RENDEMENTS ET PRODUCTIVITES OBTENUS EN FONCTION DE LA SURFACE SPECIFIQUE PRESENTE DANS LE REACTEUR. EN BLEU CLAIR, SONT PRESENTES LES PERFORMANCES DE LA FERMENTATION IBE ET EN BLEU FONCE LES PERFORMANCES POUR LA FERMENTATION ABE.....	46
TABLEAU 4 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE CALAM.....	65
TABLEAU 5 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE GAPES	66
TABLEAU 6 : COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE GAPES SOLIDE	66
TABLEAU 7 : LONGUEURS D'ONDE D'EXCITATION ET D'EMISSION LORS DES ANALYSES DU BIOFILM EN MCBL	76
TABLEAU 8 : DIFFERENTES METHODES TESTEES POUR LA DECONSTRUCTION ENZYMATIQUE DU BIOFILM DE <i>C. BEIJERINCKII</i>	77
TABLEAU 9 : VALEURS DES PARAMETRES UTILISEES POUR LA SIMULATION DE LA FERMENTATION IBE EN BATCH A 34°C ET A PH LIBRE.	89
TABLEAU 10 : VALEUR DES PARAMETRES POUR L'ESTIMATION DU TAUX DE DILUTION AU COURS DES FERMENTATIONS CONTINUES A LIT FIXE	100
TABLEAU 11 : VALEUR ET INTERVALLE DE CONFIANCE DES PARAMETRES K_A ET K_D ESTIMES APRES REGRESSION NON LINEAIRE	100
TABLEAU 12 : RENDEMENTS OBTENUS AU COURS DE LA FERMENTATION IBE EN BATCH APRES 72 H DE FERMENTATION, LES BARRES D'ERREUR REPRESENTENT LES ECARTS TYPES MESURES SUR TROIS EXPERIENCES.	134

Introduction et enjeux

1.1 Les bioproduits, une industrie d'avenir pour l'Europe.

L'Union Européenne est fortement dépendante de l'import de produits pétroliers pour fabriquer des biens de consommations courants. Selon la Commission Européenne, le développement de produits à partir de ressources renouvelables possédant un fort potentiel de croissance pourrait rendre plus soutenable l'économie tout en réduisant la dépendance de l'Europe aux produits fossiles (Sodhi et al. 2022). Selon le rapport présenté dans la référence ci-contre (Spekreijse Luxembourg), le marché des molécules bio-sourcées peut être structuré en dix catégories de molécules : les molécules plateformes, les solvants, les polymères pour les matières plastiques, les peintures et encres, les surfactants, les cosmétiques, les adhésifs, les lubrifiants, les plastifiants et les fibres.

Les molécules bio-sourcées sont déjà fortement utilisées dans le marché des surfactants (50 %) et des cosmétiques (44 %). Pour autant, de nombreux autres produits comme les molécules plateformes (0,3 %) ou les polymères pour le plastique (0,4 %) sont encore majoritairement synthétisés à partir de ressources fossiles. Bien que la part totale des produits issus de la biomasse soit encore faible dans de nombreux secteurs, en 2020 la prévision de croissance pour certains marchés comme les molécules plateformes semble prometteuse. En effet, la Commission Européenne prévoit dans son rapport une croissance nette annuelle de 10 % pour ce secteur jusqu'à 2025 (Spekreijse Luxembourg).

Dans ce contexte IFP Énergies Nouvelles cherche à développer un bioprocédé pour la production butanol et d'isopropanol à partir de ressources renouvelables. Le butanol et l'isopropanol peuvent en effet être employés à la synthèse de nombreuses autres molécules et peuvent donc être définis comme des molécules plateformes (Cheng et al. 2019; Avérous 2019).

1.2 Le marché de l'isopropanol et du butanol.

Environ 2,8 MT de butanol sont produites chaque année dans le monde. Le marché mondial est estimé à 5,7 Md\$ par an, avec une croissance annuelle de 4,7 % en moyenne (Mark Mascal 2012; Green 2011). Les esters et éthers formés à partir du n-butanol sont utilisés en tant que solvants dans l'industrie. Par exemple, l'acétate de butyle, produit par estérification de l'acide acétique avec le butanol, est un solvant utilisé dans la fabrication des encres et des peintures. Il représente 16 % du marché final du butanol en volume. Les butyles glycols éthers sont produits, quant à eux, par la réaction du butanol avec l'oxyde d'éthylène et représentent 27 % du marché total du butanol. Enfin, les esters de butyle représentent la plus grande utilisation en volume (44 % du volume du marché) (Mark Mascal 2012).

En ce qui concerne l'isopropanol, il peut être valorisé en propylène (aussi connu sous le nom de propène) après avoir été déshydraté. En effet, cette molécule est le deuxième synthon le plus produit en volume après l'éthylène. Actuellement, cette molécule est produite par voie chimique, et plus particulièrement par les procédés de FCC (Fluidized Catalytic Cracking) et de vapocraquage afin de valoriser les parties les plus lourdes des bruts pétroliers (Kim et al. 2019). Ce monomère est polymérisé par la suite en polypropylène, un matériau employé dans de nombreux secteurs. Il est également employé pour la fabrication d'oxyde de propylène, un précurseur à la synthèse de polyuréthane, ainsi qu'en cumène, molécule entrant dans la synthèse du benzène. En 2014, 100 MT de propylène ont été produites dans le monde, dont 12,7 MT en Europe. Le prix à la tonne était alors de 1000€/T.

Les molécules issues de la biomasse sont en règle générale mieux adaptées à des produits à plus fortes valeurs ajoutés, car ces dernières sont plus coûteuses à synthétiser (Gu et al. 2011). Ce coût élevé peut être expliqué par les modes de production particuliers de ces molécules.

1.3 Les bioprocédés pour la production de molécules pour l'industrie chimique

La production de molécules issues de la biomasse peut s'effectuer de plusieurs manières. Parmi celle-ci, la transformation de matière organique par des microorganismes a été particulièrement étudiée et employée à l'échelle industrielle pour la production de nombreuses molécules (acide lactique, éthanol, gomme xanthane, surfactants etc.) (Koutinas et al. 2014). En effet, ces types de procédés permettent la catalyse de nombreuses réactions chimiques à faible température et à basses pressions et sont plus économes en énergie comparés aux procédés pétrochimiques.

Certaines souches bactériennes ont été utilisées à partir du XX^{ème} siècle afin de synthétiser un mélange de butanol, d'acétone et d'éthanol à partir d'amidon (Jones et al 1986). Toutefois, l'acétone et l'éthanol sont des coproduits moins valorisables que le butanol, car en trop forte concurrence avec des équivalents pétro-sourcés. D'autres souches bactériennes sont capables de synthétiser du butanol, de l'isopropanol et des traces d'éthanol à partir de sucres simples, on parle alors de fermentation IBE. Ce sont ces dernières qui sont alors employées afin de synthétiser un mélange de butanol et d'isopropanol à partir de ressources renouvelables.

Ce type de procédé possède toutefois des limitations. Les procédés microbiologiques sont souvent opérés de manière discontinue afin de maîtriser la stérilité du procédé. Ce mode de conduite engendre de forts coûts de purification causés par des concentrations finales faibles en produits (Sodhi et al. 2022). Les fermentations ABE et IBE possèdent encore des limitations structurelles qui freinent leur développement à l'échelle industrielle (Patakova et al. 2013). En effet, le butanol produit possède un fort effet inhibiteur sur la croissance des bactéries ce qui limite la productivité du procédé lorsque ce dernier est opéré en batch. Tous ces verrous rendent,

pour le moment, les coûts de production prohibitifs pour une industrialisation (dos Santos Vieira et al. 2019).

1.4 Le projet IBIS

Le projet de recherche IBIS a été développé avec l'objectif de lever les verrous technologiques qui freinent la compétitivité des procédés de production de butanol et d'isopropanol biosourcés. Ce projet de recherche comporte un axe focalisé sur l'amélioration de la productivité du procédé en employant un mode de conduite innovant : La fermentation continue à cellules immobilisées. En effet, le procédé et la conception de nouveaux bioréacteurs peuvent permettre d'intensifier la productivité et ainsi améliorer la compétitivité de la technologie. Bien que ces types de réacteur soient employés avec succès à l'échelle laboratoire, de nombreux défis se posent quant à leur extrapolation (Qureshi et al. 2005).

Les recherches déjà effectuées sur le projet IBIS ont permis d'identifier une souche sauvage de bactérie qui produit naturellement un mélange de butanol, d'isopropanol et d'éthanol à partir de glucose. Un screening de différents matériaux a également été réalisé et a permis d'identifier un solide support adapté pour le développement d'un biofilm par cette souche. Des premiers essais de fermentations continues à cellules immobilisées ont permis d'obtenir des performances du procédé plus élevées que des fermentations continues à cellules libres. Les productivités maximales ont été atteintes en employant le bioréacteur colonne avec recirculation. Ce dispositif a permis d'atteindre une productivité maximale de $2,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ à un taux de dilution de $0,2 \text{ h}^{-1}$ après environ 800 h de fermentation continue. Ces productivités sont 11 fois supérieures à ce qui a été obtenu lors des fermentations en batch.

Toutefois, la vitesse d'accumulation de la biomasse active sur les supports au cours de la fermentation continue à cellules immobilisée n'est pas connue dans le procédé développé. Ainsi les performances du procédé sont difficilement prédictibles, ce qui complexifie son extrapolation à plus grande échelle. Par conséquent, le projet de thèse a été proposé afin de caractériser le biofilm formé, pour mieux comprendre l'influence de ce dernier sur les performances des fermentations continues à cellules immobilisées. Dans un premier temps une étude bibliographique a été réalisée pour mieux comprendre comment s'intègre ce projet de thèse dans l'état des connaissances actuelles concernant ce type de fermentation.

Chapitre 1 : Étude bibliographique

1 Les clostridia solvantogènes

La fermentation A/IBE est effectuée par des bactéries de la branche des firmicutes et plus précisément du genre *Clostridium*. Ce sont des bacilles à Gram positif, anaérobie stricte, motiles et sporulantes. Le genre *Clostridium* comprend plus de 120 espèces, dont plusieurs pathogènes tels que *C. tetani*, *C. botulinum* ou encore *C. difficile*. Au sein de ce genre, plusieurs espèces sont naturellement productrices de solvants : *C. acetobutylicum*, *C. beijerinckii*, *C. pasteurianum* et *C. saccharobutylicum* sp.nov. (Stefanie Keis, Ranad Shaheen, David T. Jones 2001). Ces dernières sont naturellement présentes dans le sol, saprophytes et GRAS (Generally Recognized As Safe).

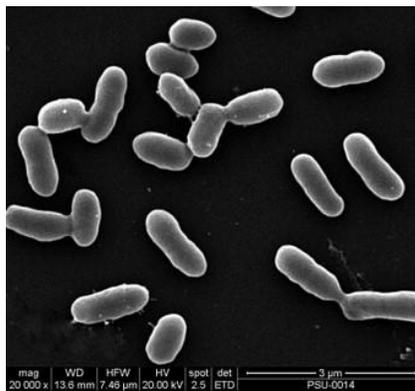


figure 1 : Photographie de *Clostridium beijerinckii* P-3 prise au microscope électronique à balayage grossissement x20 000 (Noparat et al. 2011)

Alors l'organisme modèle étudié chez les souches solvantogènes soit *Clostridium acetobutylicum* (ATCC824) pour la fermentation acétone-butanol-éthanol (ABE), la souche *C. beijerinckii* DSM6423 (anciennement NRRL B-593) fait office de référence pour la fermentation isopropanol-butanol-éthanol (IBE) et a été choisie dans le cadre de cette thèse (cf. figure 1). Cette dernière a la particularité de posséder le gène *sadh* codant pour une enzyme alcool déshydrogénase primaire/secondaire NADPH dépendante. Cette enzyme catalyse la réduction de l'acétone vers l'isopropanol, ce qui fait de *C. beijerinckii* un producteur naturel d'isopropanol (Ismail et al. 1993). Étant donné que de nombreux mécanismes étudiés chez *C. acetobutylicum* ATCC824 n'ont pas fait l'objet d'étude chez *C. beijerinckii* DSM6423, des références à *C. acetobutylicum* ATCC824 seront faites dans les prochaines parties de ce rapport car ces deux souches ont un métabolisme très similaire.

1.1 Métabolisme

Le métabolisme est l'ensemble des réactions chimiques et biologiques qui se déroulent au sein d'un organisme. Le schéma simplifié du métabolisme de *Clostridium beijerinckii* est présenté figure 2.

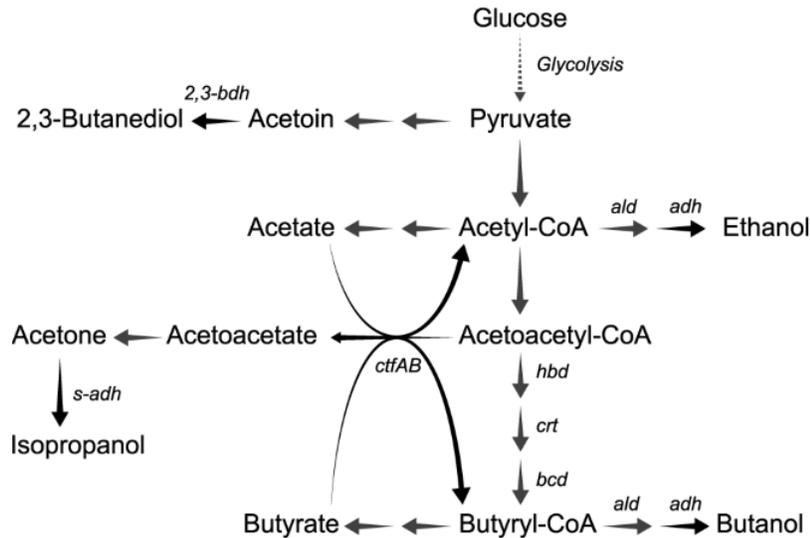


figure 2: Représentation simplifiée du métabolisme des *Clostridia* solvantogènes (Hocq et al. 2019)

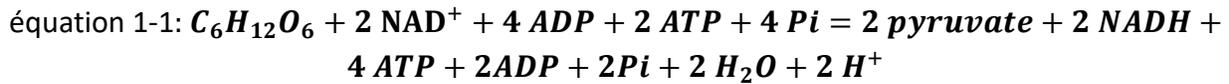
Dans le cadre de cette thèse, le glucose est utilisé comme source de carbone, bien que les *Clostridia* solvantogènes puissent utiliser, entre autres, du lactose, des pentoses et du glycérol comme source de carbone (Patakova et al. 2013). Elles sont également capables de sécréter des enzymes sous forme de cellulosomes ou des amylases permettant de dégrader certains polysaccharides.

Le métabolisme de *C. beijerinckii* est biphasique. En effet, cette souche possède la particularité de produire de l'acide acétique ainsi que de l'acide butyrique lors de la phase acidogène qui est associée à une phase de croissance exponentielle de la bactérie en batch. Ces acides sont ensuite consommés conjointement avec le glucose afin d'être convertis en isopropanol, butanol et en éthanol lors d'une seconde phase appelée phase solvantogène. Les mécanismes de ce métabolisme particulier sont détaillés dans la partie suivante.

1.1.1 Catabolisme des hexoses

Afin de pénétrer dans la cellule, le glucose présent dans le milieu extérieur va passer dans la cellule par le système phosphotransférase (Mitchell 2015). Ce système permet sa phosphorylation par des enzymes de transport situées sur la membrane plasmique. Le glucose

phosphorylé va ensuite suivre la voie de la glycolyse ou voie d'Embden-Merhof-Parnas (EMP) dont le rendement est le suivant :

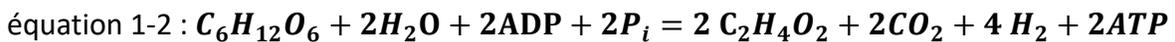


La voie de la glycolyse donne comme principal intermédiaire métabolique le pyruvate. Ce dernier peut être catabolisé par la souche afin de synthétiser les métabolites finaux de la fermentation. Le pyruvate est transformé en acétyl-CoA par une décarboxylation oxydative catalysée par l'enzyme pyruvate ferrédoxine oxydoréductase entraînant la production de CO₂. L'enzyme passe alors de sa forme oxydée à sa forme réduite (Charon et al. 1999).

La ferrédoxine sous forme réduite peut ensuite suivre deux voies. Cette enzyme peut transférer son électron, via une enzyme deshydrogénase, à de l'hydrogène moléculaire, entraînant la production de H₂ et permettant ainsi à la cellule de gérer l'excès de pouvoir réducteur généré pendant la glycolyse. La ferrédoxine réduite peut également transférer son électron aux molécules de NADP⁺ afin de produire du NADPH par la NADPH ferrédoxine oxydoréductase, seul moyen pour cette souche de régénérer ce cofacteur. L'acétyl coenzyme A est le métabolite central de *Clostridium beijerinckii*, ce dernier va être principalement transformé dans les voies de production de l'acétate et du butyrate pendant l'acidogénèse, à travers les réactions détaillées lors de la partie suivante.

1.1.2 Anabolisme des acides

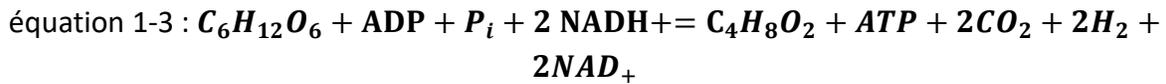
L'acétyl-CoA peut être utilisé pour synthétiser de l'acétate-phosphate. Ce dernier sera déphosphorylé par l'acétate kinase afin de donner de l'acétate et de l'ATP. Le rendement à partir du glucose est exprimé dans l'équation 1-2 ci-dessous :



La production d'acétate est la voie qui présente le plus grand rendement énergétique pour la cellule, puisque, combinée à l'énergie libérée lors de la glycolyse, la cellule génère 4 molécules d'ATP pour une molécule de glucose consommée.

Deux molécules d'acétyl-CoA peuvent également être condensées par une enzyme de type thiolase en acétoacétyl-CoA, puis suivre une série de réductions catalysées par la β-hydroxybutyryl-CoA deshydrogénase, la crotonyl-CoA puis la butyryl-CoA deshydrogénase afin de donner le butyryl-CoA. Il est à noter que cette étape oxyde deux molécules de NADH en NAD⁺ (Hartmanis and Gatenbeck 1984; Sommer et al. 2013). Le butyryl-CoA va être ensuite déphosphorylé de la même manière que l'acétyl-phosphate afin de donner du butyrate et de

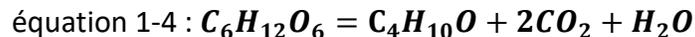
l'ATP. L'équation bilan de la réaction à partir du glucose peut être décrite selon la relation suivante :



L'anabolisme du butyrate permet de générer 3 molécules d'ATP à partir d'une molécule de glucose ce qui est moins efficace d'un point de vue énergétique que la synthèse de l'acétate. Néanmoins, la synthèse de butyrate permet de palier à l'excès de pouvoir réducteur généré pendant la glycolyse, en générant du NAD⁺, ce qui explique son utilité d'un point de vue métabolique. La production de solvants peut être effectuée directement à partir de glucose ou conjointement avec la ré-assimilation des acides produits comme expliqué ci-dessous.

1.1.3 Production de solvants à partir de glucose

Lors de la solvantogénèse, les enzymes propres à cette phase (alcool deshydrogénase adhE1, adhE2 ainsi que ctfAB) sont produites par la bactérie et l'acétyl-CoA va être utilisé d'une manière différente que lors de l'acidogénèse (Wiesenborn et al. 1989; Yoo et al. 2016). En effet, ces enzymes catalysent la transformation de l'acétyl-CoA vers l'éthanol, mais également du butyryl-CoA vers le butyraldéhyde et enfin vers le butanol. La stœchiométrie de la synthèse du butanol à partir du glucose est décrite dans l'équation ci-dessous.



L'acétoacétyl-CoA est, quant à lui, converti en acétoacétate à l'aide de l'enzyme ctfAB. L'acétoacétate ainsi obtenu est converti en acétone grâce à une acétoacétate décarboxylase, ce qui engendre le dégagement d'une mole de CO₂ pour chaque mole d'acétone produite. L'acétone a la particularité d'être réduite encore une fois en isopropanol par une enzyme alcool deshydrogénase secondaire (s-adh) NADPH dépendante présente chez *C. beijerinckii* (Dürre et al. 1995). La stœchiométrie de la synthèse de l'isopropanol à partir du glucose est décrite dans l'équation ci-dessous.



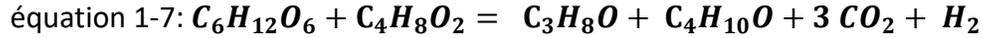
1.1.4 Consommation des acides organiques vers la production des solvants

Un deuxième mécanisme survient lors du changement de métabolisme de *C. beijerinckii* puisque les acides présents dans le cytoplasme peuvent être de nouveau assimilés afin d'être convertis en solvants par la voie des enzymes CoA transférase, ctfA et ctfB. Le butyrate ainsi que l'acétate peuvent donc être assimilés afin de donner de l'acétyl-CoA et du butyryl-CoA. D'après. (Jones et al 1986), les acides sont reconsommés et utilisés en tant que co-substrat conjointement avec le

glucose pour former le butanol, l'éthanol et l'isopropanol (Lütke-Eversloh and Bahl 2011). La consommation de l'acétate peut donc être décrite selon l'équation suivante.



La consommation de butyrate peut, quant à elle être décrite selon l'équation ci-dessous :



C. beijerinckii a donc à sa disposition plusieurs voies métaboliques afin de synthétiser les mêmes métabolites de la fermentation. Si le glucose est considéré comme unique source de substrat, alors il est possible d'écrire une relation stœchiométrique entre ce dernier et les principaux solvants produits lors de la fermentation et en prenant en compte les différentes voies possibles :



Les rendements massiques théoriques pour le butanol, l'isopropanol et l'éthanol à partir du glucose sont alors de 0,24 g. g⁻¹, 0,1 g. g⁻¹ et 0,05 g. g⁻¹, respectivement. Toutefois, dans le cas de la fermentation IBE avec *C. beijerinckii*, des traces d'éthanol sont obtenues en fin de fermentation, loin des rendements théoriques estimés à partir de l'équation 1-8 précédente. Ceci modifie l'équation bilan de la fermentation de la façon suivante :



Les rendements massiques théoriques limites pouvant être obtenus à partir du glucose sont ainsi de 0,16 g.g⁻¹ pour l'isopropanol et de 0,2 g.g⁻¹ pour le butanol. En résumé, le métabolisme biphasique de *Clostridium beijerinckii* lui confère la capacité d'utiliser les acides carboxyliques que la souche produit afin de synthétiser des solvants et réoxyder les cofacteurs réduits. L'assimilation des acides se fait conjointement avec la consommation de glucose, ce qui rend difficile l'étude de la stœchiométrie des réactions du métabolisme par la somme de chacune des réactions détaillées au cours des derniers paragraphes.

1.2 Cycle de vie des Clostridia solvantogènes

1.2.1 Cycle de vie et production des métabolites principaux

Comme développé en partie 1.1, le métabolisme de *C. beijerinckii* est biphasique. Dans un premier temps, et lorsqu'elle est cultivée en mode batch, la bactérie produit de l'acide butyrique et de l'acide acétique lors des 8 premières heures de la fermentation concomitant à la phase de croissance exponentielle. Ce phénomène entraîne la baisse du pH du milieu jusqu'à environ 5.

Une fois ce seuil atteint, une consommation des acides produits est observée. Ce phénomène est corrélé à la production de solvants ainsi qu'au commencement de la sporulation (Máté de Gérando et al. 2018). Au bout d'environ 50 h, la fermentation s'arrête à cause de l'inhibition causée par le butanol. Dans cette étude, avec la souche DSM6423, les rendements obtenus sur glucose sont de $0,34 \text{ g}_{\text{solvants}}/\text{g}_{\text{glucose consommé}}^{-1}$ et le titre final en solvants atteint entre 5 et 7 g.L^{-1} (Ferreira dos Santos Vieira et al. 2019; Survase et al. 2011).

1.2.2 Toxicité du butanol

La membrane plasmique des bactéries est composée d'une bicouche de phospholipides dont les têtes polaires sont orientées vers le cytoplasme et le milieu extérieur. Les chaînes carbonées apolaires se font face. Cette bicouche lipidique est traversée par des protéines membranaires jouant un rôle dans le transport des métabolites ou des substrats, vers le milieu extérieur ou vers le cytoplasme. En effet, la membrane des bactéries possède une perméabilité sélective permettant uniquement le transport de substances solubles ou de petites molécules par diffusion vers l'intérieur de la bactérie. Elle joue également le rôle de barrière osmotique.

La toxicité du butanol intervient sur cette partie de la cellule. En effet, les alcools primaires ont la faculté de pouvoir solubiliser les lipides membranaires. Des mécanismes de résistance sont ainsi apparus au cours de l'évolution afin de rigidifier la membrane plasmique et ainsi de résister à la solvatation. Un mécanisme de résistance observé chez *C. acetobutylicum* ATCC824 est l'augmentation du ratio acide gras saturé/acide gras insaturé (Vollherbst-Schneck et al. 1984). Cependant, ce mécanisme de résistance n'a pas été observé chez *C. beijerinckii* NRRL-B598 (Lepage et al. 1987). Le butanol a également un effet inhibiteur sur les protéines membranaires, en altérant leur structure (Patakova et al. 2018; Sandoval and Papoutsakis 2016). Des études ont également été menées sur l'amélioration de la résistance de *C. acetobutylicum* à des fortes concentrations (jusqu'à 20 g.L^{-1}) en butanol par ingénierie génétique. Les auteurs ont exprimé certaines protéines chaperonnes (grOESL, grPE et htpG) qui ont permis un meilleur taux de survie après l'ajout de butanol. Toutefois, les mutants obtenus ne produisent pas plus de butanol que les souches sauvages (Mann et al. 2012).

Le butanol possède une toxicité plus importante que l'éthanol ou l'isopropanol. Sa valeur seuil d'inhibition est relativement basse. La vitesse maximale de croissance de *C. acetobutylicum* utilisant le glucose comme substrat est réduite de 50 % lorsque la concentration en butanol dans le milieu de culture est comprise entre $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ et 10 g.L^{-1} (Ounine K et al. 1985). L'éthanol a un effet inhibiteur sur la croissance à partir de 20 g.L^{-1} pour les bactéries gram positive. Toutefois, *C. beijerinckii* DSM6423 peut tolérer des concentrations en isopropanol pouvant atteindre 35 g.L^{-1} lorsqu'elle est cultivée sur boîte de Pétri (Gérando et al. 2016). Bien que la production de butanol

ait un fort effet inhibiteur sur la croissance des bactéries, ce dernier intervient afin de palier à la toxicité des acides carboxyliques synthétisés lors de la phase de croissance de la bactérie. Les effets de ces composés seront donc détaillés dans les prochains paragraphes.

1.2.3 Toxicité liée à la production des acides carboxyliques.

Le pH est un élément central pour le métabolisme des bactéries. En effet la structure et l'activité des enzymes sont régulées par ce dernier. Une forte baisse du pH intracellulaire (pH_i) peut dénaturer les enzymes et impacter la physiologie des bactéries (Trček et al. 2015). La bactérie maintient une différence de pH entre le milieu extérieur (pH_e) et le milieu intracellulaire afin d'assurer un gradient électrochimique nécessaire pour une génération d'énergie. La différence de pH entre le milieu extérieur et le cytoplasme reste constante malgré la baisse de pH_e au cours de la fermentation chez *C. acetobutylicum* (Gottwald and Gottschalk 1985a).

Or, comme abordé précédemment, les *Clostridia* solvantogènes produisent des acides lors de la phase exponentielle de croissance de la bactérie. Seuls les acides non-dissociés peuvent traverser la membrane plasmique des bactéries par diffusion. En outre, si le pH_e est supérieur au pK_a de l'acide produit, alors les acides dans le milieu extérieur sont majoritairement présents sous formes dissociées. Or, les acides sous forme non dissociés peuvent diffuser du milieu intracellulaire vers le milieu extérieur à travers la membrane plasmique. Ce phénomène évite une accumulation d'acides non dissociés dans le cytoplasme. Toutefois, lorsque le pH_e baisse, la concentration en acides non dissociés dans le milieu extérieur augmente. Dans ce cas, la diffusion des acides non dissociés vers le milieu extérieur n'est plus effective, et ces derniers s'accumulent dans le cytoplasme. Les bactéries possèdent plusieurs mécanismes afin de réguler le pH_i . L'excès de proton généré par la production d'acides carboxylique peut être excrété via des pompes ATPase dans le milieu extérieur. Cependant, ce processus consomme de l'ATP et freine les autres fonctions qui nécessitent de l'énergie comme la division cellulaire (Mitchell 1998). Afin de palier au fort pouvoir inhibiteur causé par l'accumulation des acides carboxyliques dans le milieu, les clostridia solvantogène ont mis en place une stratégie originale. Ces dernières opèrent une bascule métabolique et consomment les acides afin de les transformer en solvants. La baisse de la concentration en acide fait remonter le pH_e et permet à la souche de survivre assez longtemps pour sporuler (Long et al. 1983; Grupe and Gottschalk 1992).

Le déclenchement de la production des enzymes *ctfa* et *ctfb* qui permettent une consommation des acides est encore mal compris (Girbal et al. 1995). En effet cette bascule métabolique est causée par la phosphorylation d'un facteur de transcription appelé Spo0A. Ce dernier est un activateur de la transcription de nombreux gènes responsables de la production de solvants et de la sporulation (Ravagnani et al. 2000; Harris et al. 2002). Les phénomènes qui peuvent causer

phosphorylation de ce facteur sont à l'étude, mais les pistes de l'accumulation en acides non dissociés (Gottwald and Gottschalk 1985b) ainsi que d'une réponse au déséquilibre redox (Girbal et al. 1995) ont été avancées. La régulation du pH ainsi que le pH initial du milieu de fermentation peuvent donc influencer sur le déclenchement du switch métabolique, selon la stratégie de régulation choisie (Holt et al. 1984).

Néanmoins, un phénomène peut venir mettre à mal cette stratégie de détoxification. Dans certains cas, la croissance de la bactérie est telle que les acides sont produits trop rapidement par rapport à leur vitesse de consommation (Monot et al. 1984). L'augmentation rapide de la concentration en acides non dissociés (jusqu'à 57-60mmol.L⁻¹) fait alors chuter le pH_i (Maddox et al. 2000). Cette chute ne peut pas être compensée par les processus de détoxification classiques. Ces phénomènes peuvent être évités en limitant la vitesse de croissance des bactéries lors de la phase de production d'acides. Deux phénomènes distincts sont constatés concernant l'accumulation des acides dans le milieu de fermentation. D'une part, les crashes acides sont observés au cours des fermentations types batch. D'autre part, la part de cellules productrices d'acides peut augmenter au fur et à mesure au cours de procédés de fermentation continus. Ce phénomène engendre une baisse de pH dans le bioréacteur. Toutefois, ce phénomène est lié à une dégénérescence de la souche plutôt qu'à un crash acide (Maddox et al. 2000; Hayashida and Yoshino 1990).

Toutefois, deux phénomènes inhibiteurs sont donc à prendre en compte lors d'un développement d'un procédé de fermentation avec ces souches : l'inhibition par les acides et celle par les solvants. En effet, la trop forte concentration en acides non dissociés inhibe complètement la croissance de la bactérie. Les acides non dissociés peuvent s'accumuler plus rapidement que la vitesse à laquelle ils sont consommés pour synthétiser les solvants. En outre, une fois la synthèse des solvants enclenchée, la concentration de ces derniers devient rapidement inhibitrice et met un terme à la fermentation à cause de son effet sur la fluidité membranaire et sur les protéines de la membrane.

1.2.4 Sporulation

De plus, lors d'une fermentation en batch, la production de solvants est associée à la sporulation des bactéries. Celles-ci commencent à accumuler des réserves sous forme de granulose, un polymère composé de glucopyranose branché en α 1-4. Cette accumulation de réserves leur fait prendre une forme dite « clostridiale ». Ces dernières se transforment ensuite en pré spore, puis en endospore, avant que les parois soient complètement lysées afin de libérer la spore mature (cf. figure 3) (Dürre 2005). En parallèle, l'autolyse des cellules inactives chez *C. acetobutylicum* ATCC824 a été observée à la fin de la phase de croissance exponentielle (Liu et al. 2015). Ce

phénomène serait utile afin de libérer des nutriments pour la sporulation et pourrait jouer un rôle dans la formation des biofilms de *Clostridium*.

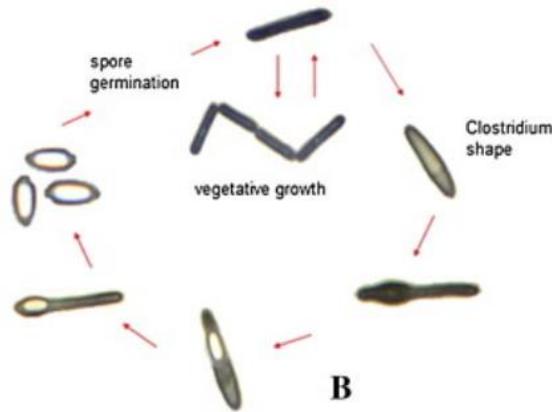


figure 3 : Cycle de vie de *Clostridium beijerinckii* (Patakova et al. 2014)

Toutefois, le lien entre phénotype présent dans le milieu de culture, viabilité cellulaire, production de solvants et enclenchement du processus de formation de spores n'est pas encore bien compris (Al-Hinai et al. 2015). En effet, il a été admis que la sporulation et la synthèse de solvants sont déclenchés par le même facteur de transcription Spo0A. Par conséquent, la production de solvants a été attribuée à un phénotype particulier appelé « forme clostridiale » dont l'apparition semble corrélée à la production de solvants (Jones et al. 1982). Néanmoins, des études plus récentes ont permis de décrire deux phénomènes qui contredisent cette interprétation.

D'une part, l'étude plus précise des populations cellulaires par cytométrie en flux a permis de mettre en avant que la production de solvants est corrélée au nombre de bacilles plutôt qu'au nombre de formes clostridiales (Tracy et al. 2011). D'autre part, des mutants peuvent produire des solvants sans sporuler ont également été obtenus (Jones et al. 2011). Ces deux phénomènes ont toutefois été étudiés chez la souche de référence pour la fermentation ABE : *C. acetobutylicum*. Les bactéries solvantogène peuvent se regrouper afin de former une structure appelée biofilm qui peut être utilisé dans les procédés de fermentation afin de palier en partie aux problèmes relatifs à l'inhibition et à la faible vitesse de croissance de la souche. Dans la prochaine partie de cette étude, les propriétés de ces biofilms seront détaillées.

1.3 La formation des biofilms chez les clostridia

Le biofilm est un agrégat de bactéries attachées à un support. À l'état naturel, plus de 70 % des microorganismes se développent de cette manière, attachés à un support plutôt qu'en suspension dans un milieu liquide (Vasudevan 2014; Watnick and Kolter 2000). Ce mode de vie

confère de nombreux avantages aux bactéries : une meilleure résistance aux antibiotiques, aux antiseptiques, un partage de matériel génétique et de métabolites en sont les principaux exemples.

Chez les firmicutes, plusieurs espèces ont la faculté de pouvoir former des biofilms mono-espèce. *Clostridium perfringens* et *Clostridium botulinum* ont cette capacité, ce qui peut engendrer des difficultés, lors de désinfection ou de stérilisation menées peu efficacement ou trop espacées dans le temps (Pantaléon et al. 2014). Ces résistances sont le fruit, d'une part d'un changement de métabolisme de la part des bactéries aptes à former des biofilms, et d'autre part à la synthèse de structures extracellulaires propres : les *Extra Polymeric Substances* (EPS).

La formation des biofilms chez les *Clostridia* solvantogène comme *C. acetobutylicum* (Liu et al. 2016; Zhou et al. 2018), *C. thermocellum* (Dumitrache et al. 2017; Dumitrache et al. 2013) ou encore *C. beijerinckii* (Krouwel et al. 1983b) a été étudiée dans le cadre de l'intensification de la production de butanol, d'acétone et d'isopropanol par voie biotechnologique. En effet, la formation d'un biofilm permet de retenir une concentration élevée de biomasse active dans le bioréacteur et d'obtenir ainsi des productivités volumiques élevées (Qureshi et al. 2005; Muffler and Ulber 2014). Toutefois, le processus de formation de biofilm chez les souches de clostridia solvantogène reste toutefois peu étudié et les paramètres qui influencent la formation de biofilms chez ces espèces restent encore à explorer.

1.3.1 Les étapes de formation des biofilms

Les biofilms se forment lors de quatre étapes principales qui sont résumées sur la figure 4 :

1. l'adhésion réversible à un support
2. la sécrétion des EPS et l'attache irréversible au matériau.
3. la formation d'une microcolonie
4. la maturation.

Enfin, des bactéries sont décrochées du biofilm mature afin d'aller coloniser d'autres surfaces.

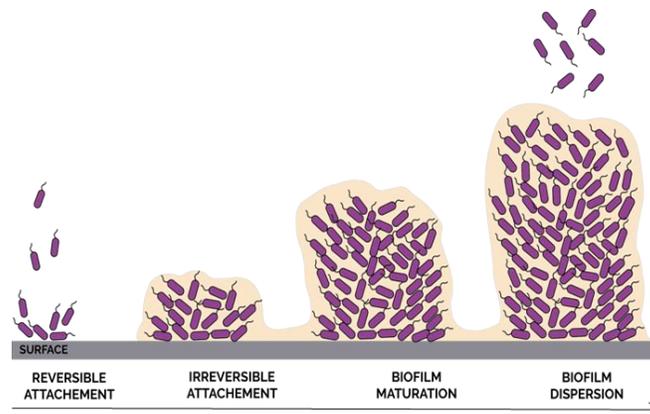


figure 4 : Représentation des différentes étapes de formations d'un biofilm (Maunder and Welch 2017)

De très nombreux phénomènes, résumés en figure 5, influencent l'adhésion microbienne initiale. Les forces de Van Der Waals, les interactions de doubles couches électriques et les interactions stériques sont les forces qui gouvernent l'adhésion réversible de la bactérie au solide support. L'adhésion irréversible est le résultat de l'augmentation des interactions de type liaisons faibles (ions-dipôles, liaisons hydrogènes, liaisons hydrophobes) lorsque la bactérie s'approche du solide.

Une fois que la bactérie est attachée de manière irréversible au support, elle commence à se multiplier pour former une monocouche de cellules et à produire des EPS. Les bactéries se multiplient au sein de la matrice obtenue et forment une micro-colonie où des gradients de concentration en substrats et en produits commencent à apparaître au sein de la structure (Rosche et al. 2009).

Après un temps compris entre 300 h et 1000 h de fermentation, le biofilm formé devient mature. Son épaisseur peut varier d'une dizaine de micromètres à quelques millimètres, selon les conditions environnementales. Des phénomènes de détachement unicellulaire (érosion), ainsi que de décrochement mécanique (sloughing) sont alors observés (Gross et al. 2007). La densité du biofilm, sa composition en EPS, ainsi que sa forme dépendent en partie de l'hydrodynamique du système dans laquelle ce dernier se développe (Saur et al. 2017).

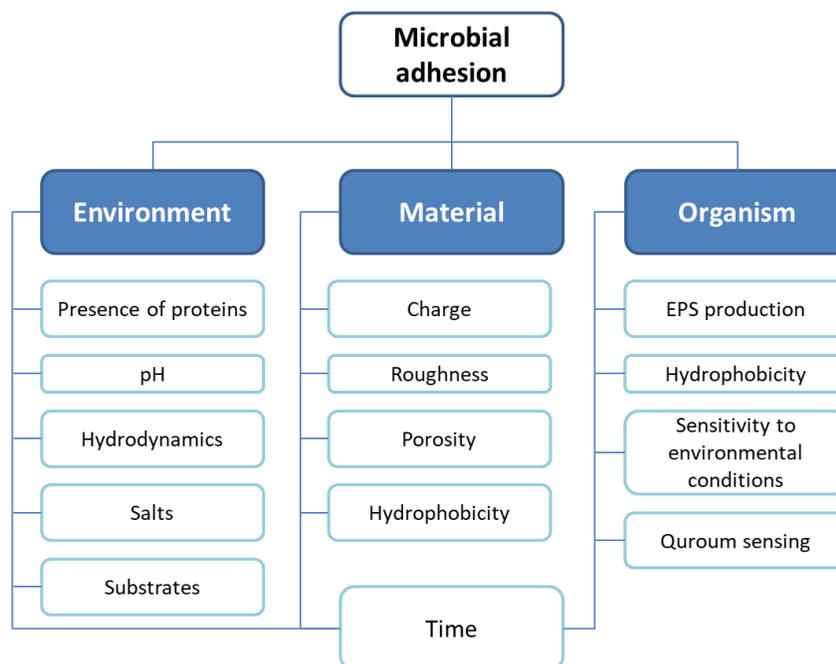


figure 5 : Schéma représentant les différents paramètres qui influencent l'adhésion microbienne et la formation de biofilm (Muffler and Ulber 2014)

1.3.2 Les EPS : composition, structure et fonctions

Les EPS peuvent représenter jusqu'à 90 % de la masse sèche d'un biofilm mature. Ils sont composés d'une part variable d'ADN extracellulaire (ADNe), de lipides, de polysaccharides, d'humines et de protéines (Flemming and Wingender 2010). Ce mélange de polymères est essentiel pour le maintien de la structure du biofilm ainsi que pour ses propriétés de résistance à plusieurs phénomènes (dessiccation, antibiotique, désinfectant, etc.).

L'ADN extracellulaire améliore l'adhésion initiale des bactéries au solide support (Whitchurch et al. 2002). En effet, il permet à la cellule de s'affranchir de la répulsion électrostatique et de pouvoir adhérer à des supports anioniques ou hydrophobes (Das et al. 2011). Pendant longtemps, son rôle a été négligé jusqu'à ce que Whitchurch *et al.* parviennent à disperser des biofilms ou à prévenir leur formation par ajout d'une endonucléase : la DNase I (Whitchurch et al. 2002; Nijland et al. 2010). Ces ADN extracellulaires proviennent en majorité de cellules lysées dans les biofilms matures. De plus, cette macromolécule permet aux bactéries de résister aux antibiotiques. L'ADN est en effet chargé négativement et peut donc former des complexes avec les molécules chargées positivement, comme certains antibiotiques (Jones et al. 2013). Ce polymère a également un rôle de soutien de la structure tridimensionnelle du biofilm (Whitchurch et al. 2002; Okshevsky and Meyer 2015).

Les protéines possèdent plusieurs fonctions dans la matrice formée par le biofilm. Tout d'abord, elles forment avec les polysaccharides et l'ADNe une structure de type gel hydraté, assurant la cohésion mécanique du biofilm. De plus, certaines enzymes sont présentes dans la matrice des biofilms. Ces enzymes servent à la dégradation des polysaccharides composant la matrice des EPS. Ce phénomène sert à la fois dans le relargage des cellules du biofilm mais aussi à utiliser les EPS comme réserve de nutriments (Wingender et al. 1999).

Dans la majorité des biofilms, les polysaccharides sont le composant majeur des EPS (Frølund et al. 1996). La taille et la composition de ces polymères peuvent varier selon les souches et les conditions environnementales. Cependant, les hétéropolysaccharides dérivés de la paroi des bactéries forment les principaux constituants de ces polysaccharides. Ces macromolécules assurent le maintien mécanique de la structure du biofilm.

Une étude a été menée afin d'étudier la fonction des EPS dans le biofilm formé par *C. acetobutylicum* B3 (Zhuang et al. 2016). Les auteurs de cette dernière ont analysé la résistance à l'acide acétique et au butanol des cellules sessiles et planctoniques de *C. acetobutylicum* par microscopie confocale à plusieurs temps de fermentation. Les résultats de cette étude montrent que l'addition d'acide ne provoque pas de sporulation chez les cellules sessiles, et que ces dernières sont moins sensibles au butanol que les cellules planctoniques. En effet, les auteurs ont observé une inhibition de la croissance en batch avec cellules immobilisées dès que la concentration en butanol atteint 4-5 g.L⁻¹. Toutefois, lorsque ces derniers ajoutent du butanol après 8 h de fermentation afin d'atteindre la concentration de 10 g.L⁻¹, la viabilité du biofilm observée par microscopie confocale, ne semble pas être altérée, comparée au témoin sans ajout de butanol.

Les auteurs suggèrent que les EPS du biofilm auraient un effet protecteur vis-à-vis de ces substances toxiques pour la cellule. Malgré le rôle essentiel de ces EPS, peu d'études ont été menées, à ce jour, sur le biofilm formé par les *Clostridia* solvantogènes (Zhang et al. 2021). Les prochains paragraphes feront un résumé de l'état des connaissances actuelles sur les mécanismes de formation de ce dernier ainsi que sur sa viabilité.

1.3.3 Le biofilm formé par les *Clostridia* solvantogènes.

C. acetobutylicum B3 est la principale souche dont le biofilm a fait l'objet d'études physiologiques et transcriptomiques. Liu *et al.* ont décrit la composition des EPS du biofilm formé par *C. acetobutylicum* B3 sur des serviettes en coton en cultures batch successives (Liu et al. 2018). Les résultats obtenus montrent que les EPS formés par la souche dans ces conditions sont composés d'hétéropolysaccharides, de protéines issues de la lyse des cellules et d'ADNe.

Plus spécifiquement, les polysaccharides du biofilm sont composés en majorité de glucose (47 % de la masse totale), de mannose (13-15 %), de rhamnose (10 %), de galactose (10 %), d'aminogluucose (13 %) et de ribose (4-5 %). Les protéines purifiées sont, pour la plupart, des protéines intracellulaires, comme par exemple la GroEL, une protéine chaperonne. Ces protéines sont des « *moonlighting protein* », elles exercent une fonction biochimique principale à l'intérieur de la cellule, et joueraient un rôle d'adhésine bactérienne dans le milieu extérieur (Liu et al. 2018; Yang et al. 2017).

Contrairement à ce qui a été proposé par Qureshi et al. (2004), le phénomène de sporulation serait minoritaire dans les biofilms formés par *C. acetobutylicum*. Plusieurs auteurs ont corrélé la production de solvants avec le phénomène de sporulation, et plus particulièrement à l'apparition de « formes clostridiales » chez les *Clostridia* solvantogène. Néanmoins, Liu et al. (2018) ont observé que les cellules sessiles de *C. acetobutylicum* B3 ne sporulent pas, mais produisent tout de même des solvants. Or, cet état physiologique a été mis en évidence par Tracy et al. (2008) au cours d'une fermentation en batch avec des cellules en suspension. Des mutants qui ne sporulent pas mais qui produisent des solvants ont également été obtenus après l'inactivation d'un facteur de sporulation σF chez *C. acetobutylicum* (Jones et al. 2011). Liu et al. (2018) proposent alors que les cellules qui composent le biofilm sont dans le même état physiologique que celles décrites par Tracy et al. (2008). Ce phénomène serait corrélé avec l'apparition de longues chaînes de cellules non motiles observées dans le biofilm formé lors de leurs expériences. Les auteurs concluent que les cellules sessiles de *C. acetobutylicum* B3 ont une physiologie différente des cellules planctoniques, amenant à un nouveau phénotype encore peu décrit dans la littérature (Dumitrache et al. 2017).

Les *Clostridia* ont la faculté de former des biofilms sur de nombreuses surfaces différentes. Ce mode de vie leur confère de nombreux avantages. Dans cette configuration, les bactéries sont naturellement plus résistantes aux conditions environnementales. Dans la prochaine partie, nous verrons comment les bactéries solvantogènes sont employées dans les procédés de production de butanol. Cette partie sera également portée sur les avantages d'utiliser les biofilms pour améliorer les performances des procédés de fermentation A/IBE.

2 Les procédés de fermentation batch, fed batch, continus et continus à cellules immobilisées pour la fermentation IBE.

Les procédés de fermentation pour la production de molécules biosourcées à l'usage de la chimie sont avantageux d'un point de vue environnemental. En effet, les microorganismes peuvent effectuer une série de transformations biocatalytiques à pression atmosphérique et à faible température (30-40°C) en milieu aqueux. Cependant, des verrous freinent encore l'utilisation de

cette voie dans le cas de la fermentation IBE à l'échelle industrielle, notamment en termes de compétitivité économique comparée à des procédés de production classiques.

Le choix de la technologie de fermentation pour la production d'isopropanol et de-butanol dépend de plusieurs paramètres technico-économiques qui vont influencer sur le coût du procédé de production. L'analyse de la compétitivité des procédés s'effectue en calculant des dépenses d'investissement (CAPEX) ainsi que des dépenses d'exploitation (OPEX).

Le type de substrat employé, le titre final en produit, ainsi que les rendements du microorganisme vis-à-vis de ce substrat ont un impact important sur les OPEX. Le CAPEX, quant à lui, dépend du type de technologie de fermentation choisi (batch, fed-batch, continu, continu à immobilisation cellulaire) mais également de la stratégie choisie pour l'extraction et la purification des molécules produites (pervaporation, distillation, extraction liquide-liquide, *gas stripping* etc.).

En effet, la particularité de l'étape de fermentation est qu'elle influe majoritairement sur les dépenses d'investissement. En effet, lors du dimensionnement d'unité de transformation, le volume total des réacteurs est calculé en fonction de la quantité de solvants à produire par année mais aussi de la quantité de substrat à disposition (Dantas et al. 2020). Si la productivité volumique de la fermentation est faible, il faut par conséquent augmenter le volume de réaction et donc le nombre de réacteurs afin de produire suffisamment de solvants comme montré sur la figure ci-dessous (dos Santos Vieira et al. 2019).

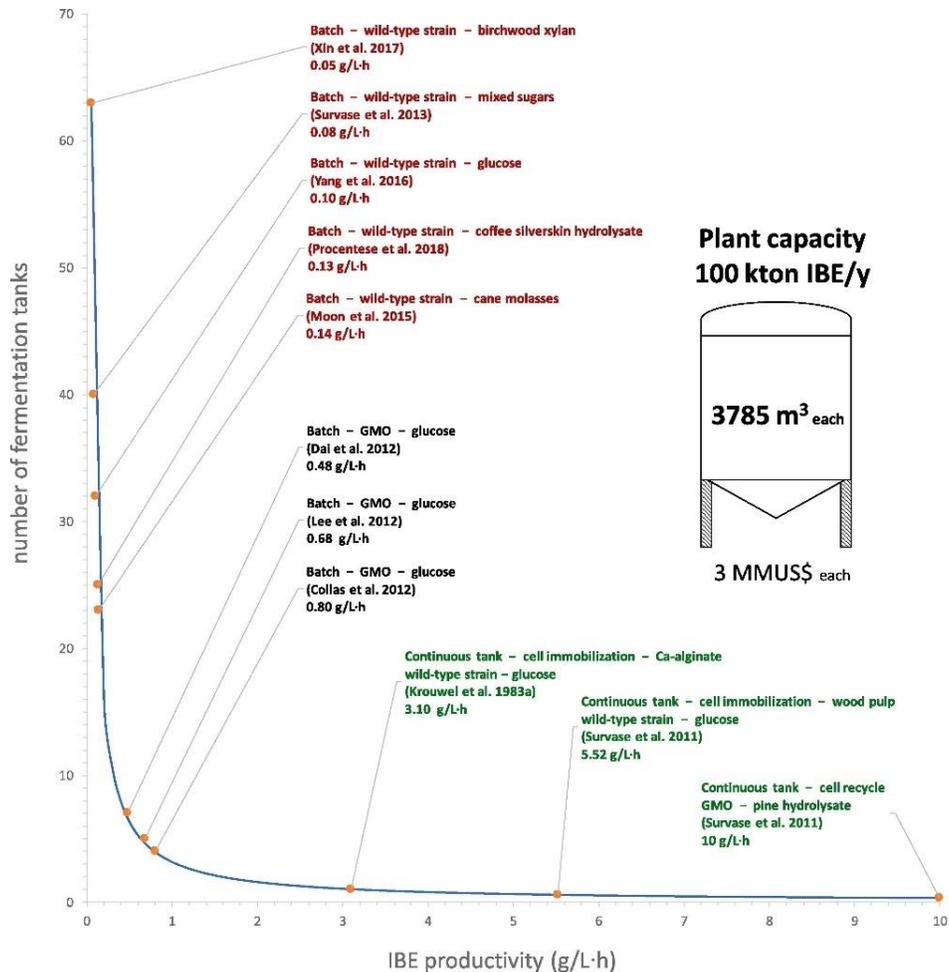


figure 6 Schéma du nombre de réacteurs requis afin de produire 100 kilo tonnes d'un mélange isopropanol-butanol-éthanol par année en fonction de la productivité volumique des procédés étudiés(dos Santos Vieira et al. 2019)

L'augmentation du nombre de réacteurs se répercute majoritairement sur le CAPEX, car l'investissement initial pour l'usine sera plus important. Cependant, la maintenance et la quantité d'énergie nécessaire pour opérer chaque réacteur (chauffage, agitation, main d'œuvre, etc) seront également plus important. Au cours des prochains paragraphes, les différents types de procédés appliqués aux fermentations ABE et IBE seront donc détaillés.

2.1 Fermentation A-IBE à cellules libres : avantages et limites

2.1.1 Procédé de fermentation batch

Le procédé de fermentation discontinu ou « batch » est un système dans lequel un substrat stérile contenant les éléments nécessaires pour la croissance du microorganisme (carbone, azote phosphate, etc.) est placé dans une cuve agitée. La température, le pH et l'agitation sont

contrôlés. Après inoculation du fermenteur, le système est fermé et les réactions biologiques commencent. Les bactéries consomment le substrat, se multiplient et produisent les métabolites de fermentation. La productivité volumique de ce type de procédé est calculée en divisant le titre final en solvants obtenu par la durée de fermentation. Les performances de différents procédés de fermentation discontinus pour les fermentations ABE et IBE sont présentées dans le tableau 1.

Le procédé batch a été historiquement utilisé pour la fermentation ABE au niveau industriel (David T. Jones and David R. Woods 1986). Ce dernier consiste en une série de réacteurs d'un volume compris entre 190 m³ et 760 m³ inoculés séquentiellement et permettant d'alimenter une colonne à distiller dimensionnée pour la purification des produits de fermentation. Toutefois, la productivité volumique maximale en solvants d'un réacteur est faible, de l'ordre de 0,25 g.L⁻¹.h⁻¹. Cette dernière valeur engendre, à l'échelle industrielle, une augmentation des coûts d'investissements car il est nécessaire d'avoir plusieurs fermenteurs de gros volumes pour réaliser la production souhaitée à l'échelle industrielle.

La caractéristique de la fermentation A/IBE est que l'inhibition par le butanol est forte dans ce type de procédé. Cette inhibition, couplée à d'autres phénomènes (sporulation et lyse cellulaire), engendre un faible titre en solvants en fin de fermentation. Les rendements obtenus lors de la fermentation IBE avec la souche DSM6423 en présence de glucose sont d'environ 0,34 g de solvants totaux produits pour 1 g de glucose consommé (Ferreira dos Santos Vieira et al. 2019). Les titres finaux en solvants atteignent entre 6 et 7 g.L⁻¹ et la productivité volumique du procédé en batch est de 0,15 g.L⁻¹.h⁻¹ (Survase et al. 2011). Au cours de la fermentation ABE avec la souche ATCC824 et en utilisant le glucose comme source de carbone, les titres en solvants sont plus élevés (20 g.L⁻¹), et la productivité volumique maximale atteinte est 0,26 g.L⁻¹.h⁻¹ (Di Cai et al. 2017). Dans le cas étudié, le rendement en solvants totaux produits par gramme de glucose consommé reste comparable entre la fermentation ABE et la fermentation IBE (0,36 g.g⁻¹ contre 0,34 g.g⁻¹).

Toutefois, comme présenté dans le tableau 1, les rendements observés peuvent changer en fonction du type de substrat utilisé ou de la souche employée. Lorsque la souche *C. acetobutylicum* DSM1731 est utilisée avec le glucose comme substrat, les rendements observés sont plus faibles que lorsque la souche ATCC824 est employée avec ce même substrat au cours d'un batch (0,36 g.g⁻¹ contre 0,21 g.g⁻¹) (Dolejš et al. 2014a). De la même manière, les rendements et les productivités volumiques peuvent varier en fonction du substrat employé lorsque la même souche est utilisée. Par exemple, les rendements sont divisés par deux (de 0,36 g.g⁻¹ à 0,18 g.g⁻¹) et la productivité par presque quatre (de 0,26 g.L⁻¹.h⁻¹ à 0,07 g.L⁻¹.h⁻¹) lorsque du xylose est

employé à la place du glucose au cours du procédé batch utilisant la souche *C. acetobutylicum* ATCC 824 (Sun and Liu 2012). Ces deux effets sont à prendre en compte lors des comparaisons des procédés de fermentation entre eux.

tableau 1 : Performances de fermentation obtenues en cultures batch à cellules libres chez les principales souches de *Clostridia* solvantogènes. En bleu clair, sont présentées des performances de la fermentation IBE et en bleu foncé des performances pour la fermentation ABE.

Souche	Substrat	Rendement (Yp/s)	Productivité	Titre final en solvants	Source
-	-	g.g ⁻¹	g.L ⁻¹ .h ⁻¹	g.L ⁻¹	-
<i>C. beijerinckii</i> DSM6423	Glucose	0,34	0,15	7,0	(Ferreira dos Santos Vieira et al. 2019)
<i>C. beijerinckii</i> DSM6423	Glucose	0,3	0,12	5,9	(Survase et al. 2011)
<i>C. acetobutylicum</i> DSM1731	Glucose	0,21	0,14	4,0	(Dolejš et al. 2014a)
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Lactose	0,33	0,08	7,7	(Qureshi and Maddox 2005)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Glucose	0,36	0,26	20	(Di Cai et al. 2017)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Xylose	0,18	0,07	13,8	(Sun and Liu 2012)

2.1.2 Procédés de fermentation continu

Le procédé de fermentation continu suit les mêmes étapes initiales que le procédé batch : stérilisation du réacteur en présence du substrat, inoculation et suivi de la fermentation. Toutefois une fois la fermentation démarrée, un flux de substrat stérile alimente continuellement le bioréacteur. Le moût de fermentation est, quant à lui, soutiré au même débit que le flux d'alimentation, ce qui a pour effet d'éviter une accumulation de métabolites toxiques pour les bactéries dans le bioréacteur. Dans cette configuration, l'inhibition par le butanol peut être levée, ce qui engendre une meilleure productivité volumique pour la fermentation IBE (0,45 g.L⁻¹.h⁻¹) (Survase et al. 2011). Toutefois, lors d'une fermentation continue, la productivité volumique est corrélée au taux de dilution D (h⁻¹).

En outre, lors d'un procédé de fermentation continu à l'état stationnaire, le taux de croissance de la souche est déterminé par le taux de dilution. Or, *C. beijerinckii* a un faible taux de croissance en phase solvantogène (de l'ordre de $0,05 \text{ h}^{-1}$) (Ahmed et al. 1988). Une diminution de la concentration en biomasse dans le réacteur jusqu'à devenir nulle peut alors survenir si le taux de dilution devient plus élevé que la vitesse de croissance maximale de la souche, ce phénomène est appelé lessivage cellulaire (Ahmed et al. 1988). Ce faible taux de croissance lors de la production de solvants implique donc que le procédé continu ne peut être conduit qu'à faible taux de dilution.

En effet, la vitesse de production de solvants est corrélée à la concentration en biomasse active dans le réacteur. Si la fermentation est conduite au-dessus du taux de croissance maximal de la souche étudiée une baisse de productivité volumique est alors obtenue (Survase et al. 2011; Napoli et al. 2011).

La vitesse de croissance de *C. beijerinckii* NRRLB-593 a été caractérisée lors des deux phases de son métabolisme. Lorsque la souche se trouve en phase de production de solvant, son taux de croissance est de $0,05 \text{ h}^{-1}$ (Ahmed et al. 1988). Lors d'une fermentation continue à cellules libres avec *C. beijerinckii* DSM6423 et en présence de glucose, Survase *et al.* ont ainsi obtenu une productivité volumique maximale de $0,47 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à un taux de dilution de $0,09 \text{ h}^{-1}$ et un titre en solvants faible ($5,2 \text{ g. L}^{-1}$) (Survase et al. 2011). Outre les performances de la souche en phase solvantogène, la bactérie produit également des acides lorsque sa croissance est plus forte. Ce métabolisme biphasique entraîne une instabilité des procédés continus chez certaines souches solvantogènes qui peuvent facilement passer sur un métabolisme acidogène.

Bien que les procédés continus aient une utilité pour contrer la toxicité du butanol envers les bactéries, le gain de productivité reste relativement faible lors de leurs mises en œuvre. Une stratégie utilisée pour améliorer les performances est d'utiliser un système d'immobilisation cellulaire. Les cellules étant fixées dans le réacteur, elles ne sont plus sensibles au lessivage et le système peut donc être opéré à de plus grands taux de dilution, augmentant ainsi sa productivité volumique. L'enjeu pour une fermentation industrielle est de pouvoir maximiser le nombre de cellules productrices de solvants dans le fermenteur. Au cours de la prochaine partie, les différentes stratégies développées dans la littérature seront détaillées. Cette prochaine partie sera également l'occasion d'aborder les avantages liés à l'utilisation des biofilms plutôt que des cellules planctoniques pour la fermentation A/IBE.

2.2 Procédés de fermentation à cellules immobilisées pour la fermentation A-IBE

Dans le cas de la fermentation ABE et IBE, l'immobilisation naturelle sous forme de biofilm est privilégiée puisque, comme vu précédemment, les bactéries adhérentes à un support ont un temps de séjour décorrélé du temps de séjour hydraulique du bioréacteur (Dolejš et al. 2014b). Une fois l'installation du biofilm effectuée, le procédé continu peut être opéré pendant une longue période, plus de 3000 h dans certains cas (Raganati et al. 2016). Le système acquiert, selon les auteurs, une plus grande stabilité ainsi qu'une hausse significative des productivités volumiques. Les prochaines parties feront l'état de l'art des performances obtenues en utilisant la technique d'immobilisation par adsorption.

2.2.1 Bioréacteur agité continu

Le réacteur agité ou CSTR pour *continuous stirred tank reactor* est une cuve équipée d'un mobile d'agitation qui assure le mélange des microorganismes en suspension (cf. figure 7). La première utilisation d'un réacteur à cellules immobilisées pour la fermentation ABE remonte aux années 80 (Krouwel et al. 1983a; Qureshi and Maddox 1988b). Ce type de réacteur a été employé afin de maximiser la biomasse présente et de limiter les problèmes relatifs à la diffusion du substrat au sein des couches du biofilm.

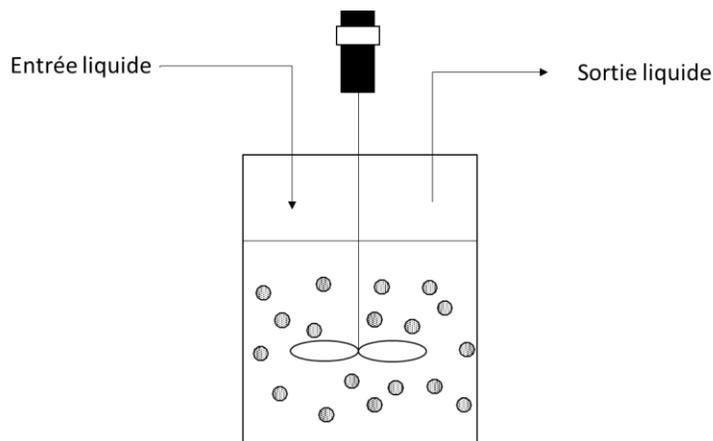


figure 7 : Schéma d'un bioréacteur agité utilisé pour la fermentation à cellules immobilisées

Dans le cas de la fermentation IBE, cette configuration a été utilisée en immobilisant *Clostridium beijerinckii* encapsulée dans des billes d'alginate (Schoutens et al. 1985). La productivité volumique maximale obtenue au cours de cette étude est de $1 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en utilisant le lactose comme source de carbone, à un taux de dilution de $0,1 \text{ h}^{-1}$. Cette configuration de réacteur a également été employée en utilisant des cellules de *C. acetobutylicum* immobilisées sur des briques et du glucose comme source de carbone (Yen and Li 2011). La productivité maximale

obtenue au cours de cette étude était de $1,2 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à un taux de dilution de $0,107 \text{ h}^{-1}$ et avec un rendement de 0,24 grammes de solvants par gramme de glucose.

Toutefois, les productivités obtenues au cours de ces deux études sont plutôt basses comparées aux autres essais avec cellules immobilisées. En effet, le mobile d'agitation prend beaucoup de volume dans ce type de configuration, ce qui rend difficile le placement d'un grand nombre de solides supports dans le réacteur par rapport au volume utile disponible. Un des moyens pour palier à ces problèmes techniques est d'avoir recours à des colonnes à lit fixe.

2.2.2 Bioréacteur à lit fixe

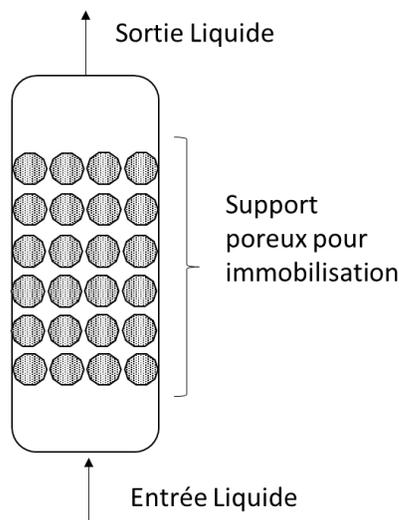


figure 8 : Schéma d'un bioréacteur à lit fixe

Les bioréacteurs à lit fixe sont généralement des colonnes dans lesquelles sont placées des solides supports qui sont fixe dans le bioréacteur (cf .figure 8). Les cellules adhèrent sur les solides supports et forment un biofilm. Dans le cas de la fermentation A-IBE, de nombreux types de supports ont été testés et dans des configurations de colonne très différentes. Le tableau 2 résume les différents types de solides utilisés ainsi que les performances obtenues lors des fermentations. L'avantage d'utiliser un tel système est que le transfert de matière dans le réacteur ne se fait pas à l'aide d'un mobile d'agitation mais par le flux de liquide passant à travers le lit fixe.

Dans ces conditions, les biofilms développent une plus grande surface spécifique et peuvent coloniser une large portion de la surface mise à leur disposition. Les principaux inconvénients de

ce type de technologie sont que des bouchages peuvent survenir, causés par l'accumulation trop importante de biomasse entre les particules et entraîner des hétérogénéités de mélange. En effet, des bouchages locaux créés par la biomasse peuvent donner lieu à l'apparition de chemins préférentiels dans le lit fixe et entraîner l'apparition de zones mortes dans le réacteur (Germec et al. 2020).

Dans ce type de configuration, des montées progressives du débit d'alimentation et donc de soutirage doivent être mises en œuvre afin d'éviter l'accumulation de solvants toxiques au fur et à mesure que la bactérie colonise les supports poreux du lit fixe. Krouwel *et al.* sont les premiers à l'avoir employé lors d'une fermentation continue ABE conduite pendant 100 h avec *C. butylicum*, encapsulées dans de l'alginate puis placées dans une colonne sont Krouwel et al. (1983b). Ces derniers ont obtenu une multiplication par quatre des productivités volumiques par rapport au procédé discontinu à cellules libres (de 0,20 g.L⁻¹.h⁻¹ pour le procédé discontinu à cellules libres à 0,8 g.L⁻¹.h⁻¹ pour le procédé continu à cellules immobilisées).

De nombreux autres auteurs, notamment Qureshi *et al.* (Qureshi and Maddox 1988b, 1995; Qureshi et al. 2000; Qureshi et al. 2004) ont étudié ce procédé de fermentation avec des configurations de réacteurs différentes. L'augmentation de la biomasse adhérente sur des supports a permis une amélioration considérable des productivités volumiques. Ces dernières sont en effet jusqu'à 20 fois supérieures par rapport au procédé batch à cellules libres (*cf.* tableau 2). Les meilleures productivités (10,0 g.L⁻¹.h⁻¹) ont été obtenues par cette équipe en utilisant le glucose comme source de carbone, la brique comme solide support dans un réacteur colonne à lit fixe et en présence d'une souche hyper productrice, *C. beijerinckii* BA 101.

Dans le cas de la fermentation IBE, Survase *et al.* ont obtenu des productivités volumiques maximales de 5,6 g.L⁻¹.h⁻¹ à un taux de dilution de 0,75 h⁻¹ dans un réacteur colonne en utilisant de la pulpe de bois comme support d'immobilisation et un mélange de différents sucres (glucose, mannose, galactose, arabinose et xylose). Une souche modifiée génétiquement de *C. acetobutylicum* a été utilisée pour cette étude, ce qui peut expliquer en partie les performances obtenues. Une liste non-exhaustive des différents types de réacteurs employés ainsi que les souches et les substrats utilisés pour les procédés de fermentation ABE et IBE sont donnés dans le tableau 2.

Dans le cas des fermentations lits fixes, comme pour les fermentations en batch, la souche utilisée ainsi que le type de substrat employé ont un impact sur les performances du procédé (titre en solvants, productivité volumique *etc.*). Les solides supports utilisés peuvent également avoir une influence significative sur la quantité de biomasse adhérente ainsi que sur sa vitesse d'adsorption. La comparaison entre différentes études de procédé à cellules immobilisées devient alors

complexe. En effet, les souches employées, les substrats utilisés, ainsi que le type et la quantité de solide support placé dans les bioréacteurs varient selon la plupart des études.

tableau 2 : Liste des performances obtenues dans des procédés continus à cellules immobilisées (*Packed Biofilm Bioreactor*) en fonction des souches employées, des supports d'immobilisation choisis et des substrats utilisés pour la fermentation A-IBE. En bleu clair, sont présentées les performances de la fermentation IBE et en bleu foncé les performances pour la fermentation ABE

Souche	Substrat	Support utilisé	Type de réacteur	[A/IBE] max	Productivité maximale	Yp/s	Source
-	-	-	-	g.L ⁻¹	g.L ⁻¹ .h ⁻¹	g.g ⁻¹	-
<i>C. beijerinckii</i> DSM6423	Glucose, mannose, galactose, arabinose, and xylose	Pulpe de bois	PBBR	12,0	5,6	0,45	(Survase et al. 2013)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Amidon	Alginate	PBBR	7,8	1,0	0,19	(Badr et al. 2001)
<i>C. acetobutylicum</i> DSM792	Glucose, arabinose, xylose	Pulpe de bois	PBBR à deux étages	20,3	10,9	0,38	(Bankar et al. 2013)
<i>C. beijerinckii</i> BA101	Glucose	Briques d'argile	PBBR	6,9	10,5	0,38	(Lienhardt et al. 2002)
<i>C. acetobutylicum</i> P262	Lactosérum	Charbon	PBBR	7,1	4,8	ND	(Qureshi and Maddox 1988b)
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	Lactose	Anneau Tygon	PBBR à quatre étage	10,8	9,2	ND	(Raganati et al. 2016)

2.2.3 Bioréacteur à lit fluidisé

Dans les bioréacteurs à lit fluidisé, les supports ne sont pas dans un lit fixe, mais en suspension dans le milieu liquide, la plupart du temps à l'aide d'un système propulsant du gaz dans le réacteur (cf. figure 13). Ce système a été relativement peu étudié, car malgré ses bonnes performances, la montée en échelle et le coût de ces bioréacteurs est prohibitif comparé aux lits fixes précédemment décrits dans la partie 2.2.2 de ce chapitre. Dans le cas de la fermentation ABE, un système de lit fluidisé a été développé à l'échelle laboratoire et a été conduit à fort taux de dilution (1 h^{-1}) pendant 2000 h atteignant une productivité volumique de $4,8 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (Qureshi and Maddox 1988a; Schoutens et al. 1986a). Un système similaire a été mis en place pour la fermentation IBE, atteignant des productivités volumiques de $2,7 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à un taux de dilution de $0,4 \text{ h}^{-1}$ (Schoutens et al. 1986a).

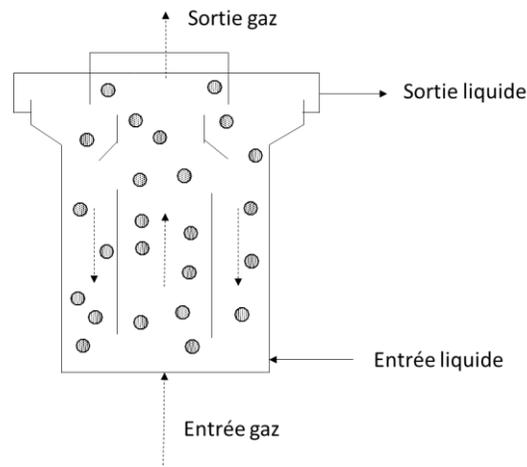


figure 9 : Schéma d'un bioréacteur à lit fluidisé, le gaz utilisé est du diazote.

Les bioréacteurs à cellules immobilisées parviennent à compenser l'effet toxique du butanol ainsi que l'instabilité observée lors des fermentations continues dû au faible taux de croissance de la souche en phase solvantogène. Toutefois, la viabilité des cellules qui forment le biofilm, et le rôle du support dans le procédé doivent être étudiés afin de mieux comprendre les paramètres qui influent sur le développement du biofilm sur le lit fixe, et sur les performances du réacteur. De plus, les bioprocédés de fermentation à lit fixe appliqués à la fermentation A-IBE manquent encore d'une meilleure compréhension des échanges de cellules entre phase liquide et biofilm. Qureshi et Maddox (1995) ont émis l'hypothèse que, à fort taux de dilution ($> 1 \text{ h}^{-1}$), seules les cellules immobilisées produisent des solvants. En effet, le flux de biomasse en sortie de réacteur est insuffisant pour expliquer les cinétiques de production d'acétone et de butanol observées expérimentalement. Cependant, selon leur étude, la majorité de la biomasse immobilisée dans le réacteur est inactive (Qureshi et al. 1988). Cette inactivité est considérée comme étant le résultat

d'une sporulation ou d'une mortalité cellulaire au cours de la fermentation (Qureshi et al. 2004). D'après (Qureshi et al. 1988), jusqu'à 90 % de la biomasse immobilisée dans les réacteurs serait inactive.

Les études ont été orientées vers l'intensification des procédés de production et le screening de supports (F.W. Welsh, R.E. Williams, I.A. Veliky 1987; Qureshi et al. 2004). Peu d'études se sont intéressées aux propriétés physico-chimiques des supports d'immobilisation, mais plutôt à leurs caractéristiques économiques et leurs potentiels rôles en tant que supports industriels. Dans la prochaine partie, les études sur les interactions entre solide support et fermentation ABE seront détaillées, afin de trouver un lien entre propriétés physico-chimiques du support et performances du procédé.

2.3 Influence des propriétés physico chimiques des supports sur le procédé de fermentation A/IBE à biofilm

Lors du procédé de fermentation continue, l'immobilisation cellulaire peut être réalisée selon différentes techniques. L'encapsulation dans des matrices poreuses comme l'alginate (Schoutens et al. 1985; Dolejš et al. 2014a), la filtration sur membrane (Survase et al. 2019) ou encore l'adhésion à des surfaces par liaison covalente grâce à des agents chimiques (Dzionek et al. 2016) comme le glutaraldéhyde (Mehta et al. 1991), sont ainsi des méthodes couramment utilisées en laboratoire. Cependant, la voie la plus répandue consiste à faire adsorber les cellules à un matériau choisi. Cette méthode a l'avantage d'être peu onéreuse, non toxique pour les microorganismes et rapide (Scotcher et al. 2005). Toutefois, les performances observées à la suite de l'adsorption sont très variables en fonction des matériaux choisis pour l'immobilisation. Néanmoins, le coût des matériaux choisis a également un effet important sur la conception du bioréacteur (Kourkoutas et al. 2004).

En effet, Kourkoutas et al. (2004) décrivent que l'adsorption des bactéries et leur capacité à former des biofilms dépendent de la surface spécifique disponible du support, sa porosité, sa charge et de son hydrophobicité. Le matériau utilisé doit également être biocompatible et ne pas dégager de composés toxiques lors du processus de fermentation. De plus, les supports employés doivent être résistants aux enzymes produites par les souches cultivées, mais également à la stérilisation. Afin d'assurer un procédé économiquement viable, les supports doivent être également facilement régénérables et bon marché (Dolejš et al. 2014b).

2.3.1 Surface spécifique disponible et porosité

La surface spécifique d'un support est le rapport entre la surface réelle d'un objet et sa masse ou son volume. Une des méthodes de caractérisation de la surface spécifique est appelée la méthode BET pour (Brunauer, Emmett et Teller). Cette méthode consiste à déterminer le volume de gaz

nécessaire afin de former une monocouche sur le solide étudié et ainsi calculer la surface recouverte (Żywicka et al. 2019).

La surface spécifique disponible sur le support influence la quantité de cellules qui peuvent adhérer au support et donc les performances du procédé. En effet, plus la surface spécifique sera grande et plus la quantité de biofilm pourra être importante. He et al. (2017). ont ainsi étudié l'influence de la surface spécifique disponible sur la formation du biofilm de la souche *C. acetobutylicum*. Un polymère, le 3-hydroxybutyrate, a été synthétisé dans ce but de trois manières afin d'obtenir des surfaces spécifiques différentes à partir du même matériau: «*électrofilage*», «*coulé avec solvant*» et «*aspersion liquide*». Les surfaces spécifiques des solides créés ont été caractérisées *via* la méthode BET. Des fermentations en batch, utilisant ces supports plongés dans du milieu de culture ont été conduites. Les résultats de cette étude montrent que les performances de fermentation sont meilleures avec le solide possédant la plus grande surface spécifique. Zeng et al. (2017) ont également étudié le lien entre surface spécifique et performances de fermentation en batch chez *C. acetobutylicum* ATCC824. Ces derniers ont utilisé des fibres de charbon ainsi qu'une fibre textile appelée le modal comme support de croissance pour le biofilm étudié. Les auteurs ont mesuré la masse de biofilm immobilisée sur le support ainsi que les performances de fermentation. Ces derniers ont observé que les fibres de charbon possèdent une surface spécifique plus importante ($18,3 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) que des fibres de modal utilisées ($0,03 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$) pour immobiliser les bactéries. Ces derniers ont toutefois remarqué que la masse de bactéries immobilisées par mètre carré de support disponible était plus importante pour le modal que pour les fibres de charbon ($570 \text{ mg}.\text{m}^{-2}$ contre $4,8 \text{ mg}.\text{m}^{-2}$). L'hydrophobicité de ces matériaux pourrait expliquer les différences observées. Toutefois, aucune différence significative sur la productivité en batch n'a été mesurée lors des essais avec ces deux types de support. Afin de comparer les essais issus de différentes publications, les données les surfaces spécifiques fournies par les publications ont été divisées par le volume utile du réacteur utilisé. (cf. tableau 3).

Le diamètre des pores influence, quant à lui, les limites de diffusion de substrat au sein du matériau et le potentiel de développement du biofilm à son sein. En effet, si les pores sont trop petits (diamètre compris entre 1 et $10 \mu\text{m}$), la cellule peut adhérer mais ne peut pas former de biofilm. Si le diamètre des pores est compris entre $10\text{-}100 \mu\text{m}$, ces derniers vont se boucher rapidement lors de la formation du biofilm engendrant une baisse de l'accès aux substrats. Un diamètre de pores compris entre $500 \mu\text{m}$ et $1000 \mu\text{m}$ rendrait favorable le développement d'un biofilm de *Saccharomyces cerevisiae* (Kourkoutas et al. 2004). Toutefois, la morphologie des levures est différente de celle des bactéries utilisées pour la production de solvants. Par

conséquent, la taille optimale de pore pour le développement d'un biofilm bactérien pour ces applications devrait être différente.

Ferreira dos Santos Vieira et al. (2019) ont caractérisé les performances d'un procédé batch à cellules immobilisées utilisant *C. beijerinckii* DSM6423 et la bagasse de canne à sucre comme support. Cette équipe s'est intéressée à l'effet du ratio liquide/solide utilisé sur les performances de fermentation (cf. tableau 3). Ces derniers n'ont pas trouvé de différences significatives entre les productivités de fermentation en batch effectuées avec des concentrations en solide support différent (entre $8,4 \cdot 10^4 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ et $2,1 \cdot 10^5 \text{ m}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ de support placé dans les bioréacteurs). Cet effet a été de nouveau vérifié quand ces derniers ont effectué des fermentations répétées avec différentes concentration en solide support en laissant le temps d'incubation de chaque batch à 55 h. Toutefois, les productivités volumiques sont augmentées comparées à la fermentation en batch à cellules libres ($0,13 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ avec cellules en suspension contre $0,22\text{-}0,28 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ avec des batchs répétés avec des cellules immobilisées).

He, Chen *et al.* ont étudié à la fois l'impact de la porosité et de la surface spécifique par rapport au volume utile disponible dans le réacteur lors d'une fermentation batch avec la souche *C. acetobutylicum* ATCC824. Ces derniers démontrent que plus le ratio liquide/solide est faible, plus la concentration finale en butanol est élevée. Cependant, si ce dernier atteint une valeur seuil, le transfert de masse ne se fait plus efficacement au sein des pores, ce qui gêne l'accès des bactéries à ce dernier (He and Chen 2013).

tableau 3 : rendements et productivités obtenus en fonction de la surface spécifique présente dans le réacteur. En bleu clair, sont présentés les performances de la fermentation IBE et en bleu foncé les performances pour la fermentation ABE.

Support	Souche utilisée	Surface spécifique disponible/ Volume utile	Titre final butanol ^a ABE/IBE ^b	Rendement butanol/glucose ^a A-IBE/ glucose ^b	Productivité volumique butanol ^a / IBE ^b	Source
		(m ² .m ⁻³)	(g.L ⁻¹)	(g/g)	(g.L ⁻¹ .h ⁻¹)	
Bagasse canne à sucre	<i>C. beijerinckii</i> DSM6423	2,1 x 10 ⁵	11,7 ^b	0,29 ^b	0,23 ^b	(Ferreira dos Santos Vieira et al. 2019)
Bagasse canne à sucre	<i>C. beijerinckii</i> DSM6423	1,26 x 10 ⁵	13,5 ^b	0,36 ^b	0,21 ^b	(Ferreira dos Santos Vieira et al. 2019)
Bagasse canne à sucre	<i>C. beijerinckii</i> DSM6423	8,4 x 10 ⁴	13,2 ^b	0,33 ^b	0,24 ^b	(Ferreira dos Santos Vieira et al. 2019)
PHB wj	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	9,4 x 10 ⁵	8,5 ^a	0,28 ^a	0,118 ^a	(He et al. 2017)
PHB es	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	2,4 x 10 ⁵	9,5 ^a	0,18 ^a	0,13 ^a	(He et al. 2017)
PHB sc	<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	8,5 x 10 ³	5,5 ^a	0,25 ^a	0,07 ^a	(He et al. 2017)
Briques	<i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461	1,4 x 10 ⁶	5,8 ^a	0,16 ^a	0,12 ^a	(Vichuviwat et al. 2014)

Zéolite	<i>C. beijerinckii</i> TISTR 1461	1,06 x 10 ⁸	8,58 ^a	0,16 ^a	0,12 ^a	(Vichuiv at et al. 2014)
Modal fiber	<i>C. acetobutylic</i> <i>um</i> ATCC824	ND	11,0 ^a	ND	0,115 ^a	(Zeng et al. 2017)
Canne de maïs traitée	<i>C. acetobutylic</i> <i>um</i> ATCC824	2,3 x 10 ⁶	14,55 ^b	0,4 ^b	0,3 ^b	(He and Chen 2013)

D'après le tableau 3, ces études tendent à montrer que le lien entre le ratio surface spécifique sur volume utile et la productivité d'un procédé discontinu à cellules immobilisées prête à discussion. Le diamètre des pores ainsi que la charge des matériaux sont d'autres facteurs pouvant expliquer les différences obtenues entre les expériences. En outre, ces études sont menées sur des fermentations en batch, peu adaptées à l'étude de la formation de biofilms de *Clostridium* solvantogènes. En effet, le temps d'installation d'un biofilm peut durer plusieurs centaines d'heures. Or lors d'un procédé de fermentation discontinu, la concentration en butanol devient inhibitrice au bout d'environ 48 h. Ce phénomène engendre un arrêt de la croissance des cellules et empêche la formation d'un biofilm mature.

De plus, ni la viabilité du biofilm formé, ni la masse de cellules accumulées sur les supports n'ont été mesurées dans la majorité des études. Ce manque de données rend difficile les interprétations proposées quant à la hausse de productivité sur le procédé à cellules immobilisées par rapport au procédé à cellules libres. Kerčmar *et al.* ont caractérisé plusieurs solides avec des porosités et des surfaces spécifiques variables lors du démarrage d'un réacteur à lit fixe inoculé avec un *consortium* de bactéries productrices d'hydrogène (Kerčmar and Pintar 2017). Cette étude a permis de mettre en évidence que pour le *consortium* producteur d'hydrogène, le polyéthylène est le support le plus adapté car le support composé de polyéthylène employé dans cette étude a un diamètre de pore compris entre 50-300 µm et une surface spécifique inférieure à 0,01 m².g⁻¹. Toutefois, les auteurs de cette étude n'ont pas pris en compte les caractéristiques physico-chimiques du support qui auraient pu expliquer une partie de l'adhésion observée tel l'hydrophobicité ou la charge de surface. Dans le prochain chapitre ces points seront abordés afin de mieux comprendre l'influence des propriétés des matériaux sur l'adhésion des cellules dans le cadre de procédés de fermentation à cellules immobilisées.

2.3.2 Charge du support et hydrophobicité

La charge du support ainsi que son hydrophobicité sont des paramètres clés dans l'étape d'adhésion réversible des bactéries aux supports (Dolejš et al. 2014b). La surface des bactéries est chargée négativement et les membranes de ces dernières sont hydrophobes. Les matériaux hydrophobes chargés positivement à leur surface sont par conséquent de bons candidats pour l'immobilisation (Zhuang et al. 2017; Terada et al. 2005).

Zhuang *et al.* se sont intéressés à l'effet de la charge du support ainsi que son hydrophobicité sur la formation de biofilm par *C. acetobutylicum* CGMCC 5234 (Zhuang et al. 2017). Ces derniers ont modifié les propriétés de surface d'une fibre textile : le lin. Les auteurs ont effectué une greffe de polyetherimide (PEI) et d'acide stérique (SA) afin d'augmenter la charge du matériau et son hydrophobicité. Les auteurs ont observé l'adhésion au support par la baisse de densité optique une fois les cellules mises en contact avec le support. Après modification du support par le PEI et le SA, 55 % et 60 % du total des cellules se sont fixées au support contre 28 % sans modification. Une hausse de la productivité volumique de 15 % a été observée par rapport aux cellules libres après modification par le SA. Les mécanismes de formation des biofilms par les *clostridia* solvantogènes sont multifactoriels. Ils dépendent à la fois de la souche utilisée, du type de substrat, des caractéristiques physico-chimiques des supports utilisés et de l'hydrodynamique dans les bioréacteurs.

Différents modèles ont d'ailleurs été écrits afin de mieux comprendre le rôle que jouent les différents phénotypes au sein des réacteurs à cellules immobilisées (Qureshi et al. 1988; Raganati et al. 2016). Le travail sur ces modèles pourrait amener à une meilleure compréhension des paramètres influençant la colonisation et la productivité d'un réacteur à lit fixe. Dans la prochaine partie la modélisation des bioprocédés sera abordée ainsi que son application sur des réacteurs à lit fixe pour les fermentations ABE et IBE.

3 La modélisation des procédés de fermentation A/IBE

3.1 Les modèles structurés et les modèles non structurés

Afin d'être économiquement viables les procédés à cellules immobilisées doivent être opérés sur des temps longs pour maximiser l'utilisation des réacteurs et avoir des productivités volumiques importantes durant plusieurs mois. Or, le processus d'établissement du biofilm au sein d'un lit fixe est un phénomène lent (plusieurs jours à plusieurs semaines). Différentes configurations doivent donc être testées à l'échelle laboratoire ainsi qu'à l'échelle pilote afin d'optimiser la formation d'un biofilm productif. Dans ce contexte, le développement d'un modèle peut s'avérer utile afin d'étudier les paramètres de la fermentation qui peuvent avoir une influence sur la croissance du biofilm et par conséquent sur la productivité volumique du procédé. Le modèle permettrait ainsi de déterminer la conduite optimale. De plus, pour des études procédées, il est souvent indispensable de posséder un simulateur pour chaque opération afin d'optimiser l'ensemble (l'amont et l'aval : prétraitement, préparation, downstream ...).

Plusieurs approches permettent de modéliser les réactions biochimiques qui se déroulent dans un microorganisme. La première vise à modéliser l'ensemble des réactions principales du métabolisme sous la forme d'équations de cinétiques enzymatiques. Toutefois, les paramètres cinétiques de chacune des enzymes ne sont pas aisément identifiables. En effet, les cinétiques de chacune des enzymes doivent être étudiées *in vitro* afin de modéliser les réactions. De plus, les cinétiques *in vitro* peuvent différer des conditions *in vivo*. Les paramètres du modèle peuvent ensuite être identifiés par régression si les données s'ajustent bien au modèle. Toutefois, cette approche nécessite une bonne connaissance préalable du métabolisme de la souche et de sa régulation ainsi que d'une grande quantité de données (Almquist et al. 2014; Millat and Winzer 2017).

Dans le cadre du développement de bioprocédés, d'autres approches ont été mises en œuvre. Afin de simplifier les systèmes étudiés, des modèles appelés « modèles non structurés », ont ainsi été développés. Ces modèles décrivent les voies métaboliques simplifiées et sous la forme d'équations cinétiques. Les cellules dans ce système sont représentées par une seule variable d'état, notée en général X. Les cellules sont alors assimilées à des particules dont la composition moléculaire est stable dans le temps et connue. Ces dernières ont une croissance exponentielle lorsqu'elles ne sont pas limitées en substrat. Une fois la structure de la cinétique de croissance du microorganisme décrit, il reste à déterminer les vitesses spécifiques de consommation de substrat et de production de métabolites. Des bilans matières sont enfin écrits pour chaque composé du système étudié et les équations sont résolues numériquement en donnant l'évolution en fonction du temps de tous les composés chimiques de la fermentation. Comme

expliqué auparavant, les modèles non structurés simplifient les réseaux métaboliques des microorganismes au maximum afin de décrire les cinétiques chimiques observées dans les bioréacteurs. Bien que ces modèles soient peu fiables pour représenter la complexité de toutes les interactions présentes dans le microorganisme étudié, ils sont bien adaptés pour la conception des procédés de fermentation (Almquist et al. 2014).

3.2 Démarche de la modélisation

3.2.1 Définition des bilans matières

La première étape de la modélisation est de décrire les bilans matières du système étudié. Ces derniers peuvent être définis selon l'équation-3-1.

$$\text{équation-3-1 : } \mathbf{Accumulation = Entrée - Sortie + Production}$$

Par exemple, les bilans matières sur la biomasse au cours d'un procédé continu peuvent s'écrire selon l'équation 3-2.

$$\text{équation 3-2 : } \frac{dXV}{dt} = F \cdot X_{in} - F \cdot X_{out} + r_x \cdot V$$

- F : flux hydraulique (L.h⁻¹)
- V : volume utile du réacteur (L)
- X : biomasse (g.L⁻¹)
- r_x : vitesse de production de biomasse (g.L⁻¹.h⁻¹)

Les bilans matières doivent être écrits pour chacune des variables d'état définies par le système.

3.2.2 Modélisation de la cinétique de croissance

Les fermentations ABE et IBE possèdent une cinétique de croissance relativement complexe. Le métabolisme biphasique de la souche a favorisé le développement de modèles structurés pour l'étude des cinétiques de fermentation (Liao et al. 2016; Millat and Winzer 2017; Mayank et al. 2013). Toutefois, certains auteurs ont développé des modèles non structurés ou mixtes pour la description des cinétiques de croissance afin d'optimiser ces procédés fermentaires. La plupart des modèles non structurés développés l'ont été pour décrire la fermentation ABE effectuée par *Clostridium acetobutylicum* en batch. Le nombre de modèle disponible pour la fermentation IBE est faible, bien que cette fermentation soit d'un intérêt industriel. La croissance de la biomasse a ainsi été décrite de différentes manières dans la littérature. Cependant, la manière la plus simple de décrire la croissance d'un microorganisme est présentée dans l'équation ci-dessous :

$$\text{équation 3-3 : } rX = \mu \cdot X$$

- r_x : vitesse de production de biomasse ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- X , : concentration en biomasse (g.L^{-1})
- μ : taux de croissance (h^{-1})

Le taux de croissance μ représente la vitesse spécifique de production de biomasse du microorganisme étudié. Une équation modélisant la croissance (équation 3-4) des microorganismes a été définie par (Monod 1942). Ces derniers définissent le taux croissance comme limité par la disponibilité en substrat. Ils définissent également un paramètre appelé μ_{\max} qui représente le taux de croissance maximal de l'organisme sans limitation par la disponibilité en substrat. Le paramètre k_s représente la constante de saturation en substrat. Cette dernière représente la difficulté du microorganisme à maintenir les conditions optimales de croissance lorsque la concentration en substrat est basse. En effet si $S = k_s$ alors $\mu = 0,5.\mu_{\max}$. L'équation 3-4 représente la loi de Monod pour la croissance d'un microorganisme à partir d'un substrat limitant pour la croissance.

$$\text{équation 3-4 : } \mu = \mu_{\max} \left(\frac{S}{S+k_s} \right)$$

- μ_{\max} : taux de croissance maximal (h^{-1})
- k_s : constante de saturation pour le substrat (g.L^{-1})
- S : concentration en substrat (g.L^{-1})

Cette modélisation du taux de croissance est très simple et d'autres auteurs ont proposé des modèles plus adaptés pour définir les cinétiques de croissances de la fermentation ABE. Une structure de modèle qui prend en compte une inhibition du substrat par le butanol et l'acide butyrique (BBA) est présentée dans les équation 3-6 à 3-7 (A. Mulchandani and B. Volesky 1986). La fonction d'inhibition $f(I)$ est différente selon la concentration en butanol et en acide butyrique dans le milieu de fermentation. Cette cinétique de croissance a été proposée lors de l'étude de fermentations continues avec rétention cellulaire.

$$\text{équation 3-5 : } \mu = \mu_{\max} \cdot \left(\frac{S}{k_s+S} \right) \cdot f(I)$$

$$\text{équation 3-6 : } f(I) = \exp(-0.01 \cdot \text{BBA}) \text{ si } \text{BBA} < 8,0 \text{ g.L}^{-1}$$

$$\text{équation 3-7 : } f(I) = -0.15 \text{ BBA} + 2.16 \text{ si } 8.0 < \text{BBA} < 13,9 \text{ g.L}^{-1}$$

- BBA concentration en butanol et en acide butyrique (g.L^{-1})

Srivastava et Volesky (1990) ont défini un autre modèle non structuré pour la croissance de *C. acetobutylicum* en batch. La croissance du microorganisme suit une loi de Monod modifiée afin de prendre en compte l'inhibition sommée de l'acide butyrique, l'acide acétique et du butanol. L'équation 3-8 représente le taux de croissance modélisé par les auteurs, l'équation 3-9 représente la fonction d'inhibition par l'acide butyrique, l'acide acétique et le butanol.

$$\text{équation 3-8 : } \mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{k_s + S} \right) \cdot f(I)$$

$$\text{équation 3-9 : } f(I) = \left(1 - \left(\frac{P}{P_{max}} \right)^n \right)$$

- P_{max} : concentration inhibitrice en solvants totaux (g.L^{-1})

Ici la concentration maximale en produits inhibiteurs, P_{max} , trouvée par les auteurs est de $17,4 \text{ g.L}^{-1}$ et le taux de croissance maximal est de $0,48 \text{ h}^{-1}$. Lim et al. (2019b), quant à eux, ont défini un modèle non structuré simple dans le but de prédire les concentrations en butanol et en acétone dans le milieu à partir d'un milieu de culture composé à la fois de glucose et de xylose. Les auteurs ont utilisé les équations définies par Luedeking et Piret (1959) afin de déterminer les cinétiques de production des métabolites. Dans cette étude, les taux de croissance sont modélisés pour chacun des substrats utilisés selon l'équation 3-10 suivante :

$$\text{équation 3-10 : } \mu_{g,Gl} = \frac{\mu_{gl}^{max} Gl}{K_{S,Gl} + Gl + \frac{Gl^2}{K_{L,Gl}}} \cdot \left(1 - \frac{C_B}{P_{B,Gl}} \right)^{i_{b,cb}} \cdot \left(1 - \frac{X}{P_X} \right)^{i_x}$$

- P_X : concentration inhibitrice en biomasse (g.L^{-1})
- $K_{L,Gl}$: constante d'inhibition pour le glucose (g.L^{-1})
- $P_{B,Gl}$: concentration inhibitrice en butanol (g.L^{-1})
- $i_{b,cb}$: puissance de l'inhibition par le butanol
- i_x : puissance de l'inhibition par la biomasse

Les auteurs ont décidé d'utiliser une équation de Monod modifiée afin de décrire la croissance de *C. acetobutylicum*. Ici un terme d'inhibition par le glucose ainsi qu'un terme d'inhibition par la biomasse et par le butanol seul interviennent. Bien que ne prenant pas en compte tous les phénomènes d'inhibition, ce modèle s'est avéré suffisant pour décrire le procédé de fermentation avec le glucose comme substrat.

À l'inverse, Yang et Tsao (1994) ont testé l'effet inhibiteur de chacun des métabolites produits par la souche et ont complexifié le modèle de croissance prenant en compte tous les produits de fermentation. Ces derniers ont également pris en considération l'effet du pH sur la croissance des bactéries. Le taux de croissance est donc défini selon l'équation 3-11 et la fonction d'inhibition est définie selon l'équation 3-12 ci-dessous :

$$\text{équation 3-11 : } \mu_t = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{k_s + S} \right) \cdot F_x(I)$$

$$\text{équation 3-12 : } F_x(I) = 1 - \left(\frac{C_{aa}}{C_{maa}} \right)^{maa} - \left(\frac{C_{ba}}{C_{mba}} \right)^{mba} - \left(\frac{C_b}{C_{mb}} \right)^{mb} - m_1 \left(\frac{C_{aa}}{C_{maa}} \right)^{maa} \cdot \left(\frac{C_b}{C_{mb}} \right)^{mb} - m_2 \left(\frac{C_{ba}}{C_{mba}} \right)^{mba} \cdot \left(\frac{C_b}{C_{mb}} \right)^{mb} - m_3 \left(\frac{5.6 - pH}{1.6} \right)$$

Ici les paramètres m_{aa} , m_{ba} , m_b représentent la puissance de l'inhibition par l'acétate, le butyrate et le butanol respectivement. Dans l'équation 3-12, l'inhibition par l'acide acétique (C_{aa}), le butyrate (C_{ab}), et le butanol (C_b), sont pris en compte. L'effet couplé des acides avec le butanol est modélisé par les paramètres m_1 et m_2 . L'effet du pH est également décrit par les auteurs. Dans l'équation proposée, plus le pH s'éloigne du pH optimal, plus le taux de croissance est influencé négativement. Ce modèle de croissance contient ainsi 11 paramètres et deux constantes. Ce modèle est très utile pour définir l'effet de chacun des composés inhibiteurs et du pH sur la croissance du microorganisme mais n'a pas été utilisé pour prédire les cinétiques de concentration en produits de fermentation.

Tous les modèles non structurés utilisés pour modéliser la fermentation ABE se basent donc sur une loi de Monod modifiée intégrant un terme d'inhibition plus ou moins développé afin de prendre en compte l'inhibition de la fermentation par le butanol et les acides carboxyliques produits. Les cinétiques de production de ces métabolites sont en règle générale couplées à la croissance des bactéries. Dans la prochaine partie les lois des cinétiques de productions des produits de fermentation A/IBE seront donc détaillés.

3.2.3 Modélisation de la cinétique de production des métabolites

La cinétique de production de métabolites peut être décrite de différentes manières dans le cas des modèles non structurés. Un des moyens de modéliser la cinétique de production est d'employer l'équation 4-13 développée par Luedeking et Piret (1959). Cette équation modélise à la fois les produits synthétisés pendant la croissance ainsi que ceux synthétisés pendant la phase de maintenance cellulaire.

$$\text{équation 3-13 : } \frac{dP}{dt} = \alpha \cdot \mu \cdot X + \beta \cdot X$$

α représente une constante relative à la vitesse de production du métabolite associée à la croissance et β représente la vitesse de production du métabolite non associée à la croissance cellulaire. Ce type de structure a été choisi par tous les modèles décrits dans la partie précédente (Lim et al. 2019b; A. Mulchandani and B. Volesky 1986; Srivastava and Volesky 1990). Toutefois, cette structure a été adaptée dans certains modèles afin de décrire la consommation des acides pour produire des solvants. Ces derniers modélisent la consommation de substrat par la relation écrite dans l'équation 3-14.

$$\text{équation 3-14 : } r_s = k_3 \cdot \mu \cdot X + k_4 \cdot X$$

- r_s : vitesse spécifique de consommation de substrat ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- k_3 : inverse du rendement biomasse sur substrat (g.g^{-1})
- k_4 : coefficient de maintenance (h^{-1})

Dans le cas de la consommation des acides vers la production de butanol et d'acétone, le phénomène est modélisé de la manière suivante. Le butanol synthétisé provient à la fois de l'utilisation du glucose en tant que substrat et de la conversion de l'acide butyrique en butanol. La cinétique de consommation de l'acide butyrique s'écrit donc selon l'équation 3-15 présentée ci-dessous :

$$\text{équation 3-15 : } r_{BAp} = k_5 \cdot (k_3 \cdot \mu \cdot f(I)X + k_4 \cdot X)$$

- r_{BAp} : vitesse de production du butyrate ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- k_5 : rendement acide butyrique sur substrat (g.g^{-1})
- k_3 : inverse du rendement biomasse sur substrat (g.g^{-1})
- μ : Taux de croissance (h^{-1})
- $f(I)$: fonction d'inhibition
- k_4 : coefficient de maintenance (h^{-1})

$$\text{équation 3-16 : } r_{BAc} = k_6 \cdot \frac{BA}{BA+K_{BA}} \cdot \frac{S}{S+K_s} \cdot X$$

- r_{BAc} : vitesse de consommation du butyrate ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)
- k_6 : vitesse maximale de consommation du butyrate
- K_{BA} : constante de saturation du butyrate (g.L^{-1})
- S : concentration en biomasse (g.L^{-1})
- BA : concentration en acide butyrique (g.L^{-1})

Ici, la production du butyrate est modélisée selon l'équation de Luedeking & Piret. Néanmoins, la consommation des acides suit une cinétique de type Monod, en fonction de la vitesse maximale de consommation, de la concentration en glucose ainsi qu'en acide butyrique. Dans le cas de la production de solvants, les cinétiques de productions d'acétone et d'isopropanol ont la même structure que celle de production de butanol. Cette dernière est représentée dans l'équation 3-17.

$$\text{équation 3-17 : } r_B = k_7 \cdot (k_3 \cdot \mu \cdot f(I)X + k_4 \cdot X) + k_{14} \cdot r_{bac}$$

- r_B : vitesse de production du butanol ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
- k_7 : rendement butanol sur substrat ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
- k_3 : inverse du rendement biomasse sur substrat ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
- μ : Taux de croissance (h^{-1})
- $f(I)$: fonction d'inhibition
- k_4 : coefficient de maintenance (h^{-1})
- k_{14} : rendement butyrate sur butanol ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)
- r_{bac} : vitesse de consommation du butyrate ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Les cinétiques de production et de consommation de l'acide acétique et la cinétique de production de l'acétone suivent la même structure que celles de l'acide butyrique et du butanol, respectivement. Tous ces modèles non structurés ont été utilisés pour décrire les productions de solvants ABE ou des différents métabolites (acides et solvants) au cours d'un batch. Cependant, ces modèles n'ont pas été utilisés pour décrire la dynamique de croissance des biofilms lors des fermentations continues à cellules immobilisées. Certains auteurs ont tenté différentes approches pour modéliser la fermentation ABE à cellules immobilisées, principalement pour des lits fixes. Ces approches seront détaillées dans la partie suivante.

3.3 Modélisation de la fermentation A/IBE en biofilm

Comme exposé dans la partie 2.2 il a été montré que l'utilisation de lits fixes permettent d'améliorer significativement les performances des procédés de fermentation ABE et IBE. Afin de mieux comprendre et dimensionner les unités de production et de purification et par conséquent mieux estimer le coût global du procédé, plusieurs structures de modèles cinétiques ont été proposées pour décrire les fermentations ABE et IBE en lit fixe.

3.3.1 *Modèle de Raganati*

Raganati et al. (2016) ont proposé un modèle afin de déterminer les différents types de biomasse présentes au sein du réacteur à cellules immobilisées. La souche utilisée pour cette étude est *C.*

acetobutylicum ATCC824 la source de carbone est le lactose. Les supports placés dans les bioréacteurs pour favoriser la croissance du biofilm sont des anneaux de Tygon®. Le système est composé de quatre réacteurs à biofilm opérés en parallèle pendant sept jours. Lors de la phase de croissance du biofilm chacun des bioréacteurs a été opéré en continu, ces derniers ont ensuite été raccordés entre eux en série.

Dans ce modèle, les auteurs ont distingué différents types de biomasse. La biomasse totale X_{TOT} est composée de plusieurs groupes de cellules distinctes : $X_{A,actives}$ la concentration en cellules productrices d'acides, $X_{S,actives}$ la concentration en cellules productrices de solvants et enfin $X_{inactive}$ la part de biomasse non productive. La relation entre les différentes biomasses est décrite dans l'équation 3-18 ci-dessous.

$$\text{équation 3-18 : } X_{inactive} = X_{TOT} - X_{A,actives} - X_{S,actives}$$

La productivité volumique en acide dans chaque réacteur est décrite ainsi :

$$\text{équation :3-19 } W_{acids}^{TOT} = D_i \cdot X_{A,active} \cdot Y_{Acids/X}$$

- D : taux de dilution appliqué à chaque réacteur (h^{-1})
- W_{acids}^{TOT} : vitesse de production en acides ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
- $X_{A,actives}$: concentration en cellules productrices d'acides ($g \cdot L^{-1}$)
- $Y_{acids/X}$: rendements acides sur biomasse ($g \cdot g^{-1}$)

Le rendement acides sur substrat ainsi que la cinétique de production d'acides ont été déterminés dans des expériences préliminaires (Procentese et al. 2015; Napoli et al. 2012). Cependant, cette équation ne prend pas en compte les acides convertis en solvants. Et les auteurs ont donc ajouté un terme dans l'équation :3-19.

$$\text{équation 3-20 : } W_{Acids}^{TOT} = (W_{Acids}^{Net} + W_{acids}^{UP})$$

- W_{Acids}^{Net} : vitesse de production des acides par les bactéries actives ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)
- W_{acids}^{UP} : vitesse de consommation des acides ($g \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$)

La vitesse de consommation des acides, W_{acids}^{UP} , est estimée grâce à une relation stœchiométrique décrite par Desai et al. (1999). La masse d'acétone produite est égale à la somme des acides butyriques et acétiques convertis selon les équation 3-21 et l'équation 3-23 présentées ci-dessous :

$$\text{équation 3-21 : } A = AA^{UP} + BA^{UP} \text{ et } \frac{BA^{UP}}{AA^{UP}} = 0,315 \frac{BA}{AA}$$

$$\text{équation 3-22 : } W_{Acids}^{UP} = D_i \cdot (AA^{UP} + BA^{UP})$$

$$\text{équation 3-23 : } W_{Acids}^{Net} = D_i(AA + BA)$$

- A : concentration en acétone (g.L⁻¹)
- BA, AA : concentration en acide butyrique et acide acétique produits (g.L⁻¹)
- BA^{UP}, AA^{UP} : concentration en acide consommé (g.L⁻¹)

D'après ces trois équations, il est possible de déduire la concentration de cellules productrices d'acides ($X_{A,active}$) dans le réacteur grâce à la relation décrite dans l'équation 3-24.

$$\text{équation 3-24 : } X_{A,active} = \frac{W_{Acids}^{TOT}}{D_i \cdot Y_{Acids/X}}$$

Afin de déterminer la concentration en cellules productrices de solvants, X_s , le bilan matière sur le butanol est effectué tel que présenté dans l'équation 3-25 :

$$\text{équation 3-25 : } D_i \cdot (B_{OUT} - B_{IN}) = r_B \cdot X_{S,active}$$

- B_{OUT} : concentration en solvants en sortie du réacteur (g.L⁻¹)
- B_{IN} : concentration en solvants en entrée du réacteur (g.L⁻¹)
- r_B : vitesse spécifique de production de solvants (g.L⁻¹.h⁻¹)
- X_{S, active} : concentration en cellules de biofilm productrices (g.L⁻¹)

La productivité spécifique en butanol, r_B peut être calculée à partir d'un modèle écrit selon l'équation 3-26 suivante (2015; Procentese et al. 2015):

$$\text{équation 3-26 : } r_B = r_{B,max} \left(\frac{C_L}{K_{L,B} + C_L} \right) \left(\frac{AA}{K_{AA} + AA} \right) \left(\frac{BA}{K_{BA} + BA} \right) \left(\frac{K_B}{K_B + B} \right)$$

- C_L : concentration en lactose (g.L⁻¹)
- AA : concentration en acide acétique (g.L⁻¹)
- BA : concentration en acide butyrique (g.L⁻¹)
- B : concentration en butanol (g.L⁻¹)
- K_{L,B} : constante de saturation en lactose et butanol (g.L⁻¹)
- K_{AA} : constante d'inhibition par l'acide acétique (g.L⁻¹)
- K_{BA} : constante d'inhibition par l'acide butyrique (g.L⁻¹)
- K_B : constante d'inhibition par le butanol (g.L⁻¹)

L'hypothèse principale avancée par les auteurs afin de simplifier le système est que la population cellulaire totale X^{TOT} est constante le long de l'expérience. Ces derniers font également l'hypothèse que le système étudié se trouve à l'état stationnaire pendant toute la phase de production de solvants. Il est alors possible de calculer les concentrations des différentes populations présentes dans le réacteur selon les différents taux de dilutions appliqués au système. Le modèle ici proposé est utile pour l'interprétation des performances d'un réacteur à biofilm, mais présente quelques désavantages. En effet, l'hypothèse simplificatrice se basant sur le fait que la biomasse totale X^{TOT} ne varie pas pendant la durée du test n'a pas été vérifiée par les auteurs. Le test a duré au total 3 mois, et la phase de lancement initiale n'a pris que 7 jours. Le biofilm a donc pu se développer pendant la phase de production. Il n'existe pas de données sur la croissance initiale d'un biofilm formé par les *Clostridia* solvantogènes. En effet, la masse totale de cellules adhérentes dépend à la fois de la structure du support, de la physico-chimie de ce dernier, ainsi que des conditions hydrodynamiques présentes dans le bioréacteur.

3.3.2 Modèle de Qureshi

Qureshi *et al.* ont également proposé un modèle pour décrire l'évolution de la composition du biofilm dans un bioréacteur à lit fixe (Qureshi *et al.* 1988). La souche utilisée pour l'expérience est *C. acetobutylicum* P262, la source de carbone est le lactose et le support d'immobilisation est le charbon. Les auteurs ont observé que, malgré une augmentation permanente de la biomasse totale dans le réacteur, la productivité volumique et la vitesse de consommation en substrat restent les mêmes. Ces derniers ont donc émis la série d'hypothèses suivantes :

- Le système observé se trouve à l'état stationnaire
- Lors des états stationnaires, la biomasse active reste stable contrairement à la biomasse totale.
- La biomasse productrice de solvants ne croit plus ($\mu_{BS}=0$).

La biomasse est ici représentée selon l'équation 3-27 :

$$\text{équation 3-27 } B_T = B_S + B_G + B_M + B_I.$$

- B_G représente la biomasse en croissance (g.L^{-1}),
- B_T la biomasse totale (g.L^{-1}),
- B_S La concentration en bactéries productrices de solvants (g.L^{-1}),
- B_M la masse bactérie vivantes mais non productives (g.L^{-1}),
- B_I la biomasse inactive (g.L^{-1}),

Les différents types de biomasses possèdent des vitesses de consommation de substrat différentes : r_{LS} , r_{LG} , r_{LM} . La vitesse totale d'utilisation du lactose s'écrit $r_L = r_{LS} + r_{LG} + r_{LM}$. La vitesse

de consommation du lactose par les bactéries en phase de croissance (r_{LG}) et en phase solvantogènes (r_{LS}) suit une loi de Monod présenté dans l'équation 3-28 et l'équation 3-29 présentées ci-dessous :

$$\text{équation 3-28 : } r_{LS} = \frac{B_s \cdot V_{max} \cdot C}{Y_s(C+K_m)} \left(1 - \frac{C_s}{C_{smax}}\right)$$

$$\text{équation 3-29 : } r_{LG} = \frac{B_G \cdot \mu_{max} \cdot C}{Y_G(C+K_s)} \left(1 - \frac{C_s}{C_{smax}}\right)$$

Les paramètres suivants ont été déterminés dans d'autres publications (Kanchanatawee and Maddox 1991; Schoutens and F. Kossen 1986)

- C : concentration en lactose (g.L^{-1})
- C_s : Concentration en solvants (g.L^{-1})
- C_{smax} : Concentration maximale des solvants (g.L^{-1})
- Y_s : rendements en solvants (g.g^{-1}),
- V_{max} : vitesse de production spécifique maximale ($\text{g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$),
- K_m : constante de Michaelis Menten (g.L^{-1})
- K_s : constante de saturation (g.L^{-1})
- μ_{max} : Taux de croissance maximal de la souche (h^{-1})

La vitesse de consommation de substrat par les bactéries en maintenance (r_{LM}) est écrite comme ceci :

$$\text{équation 3-30 : } r_{LM} = m(B_s + B_G + B_M)$$

- m : coefficient de maintenance $\text{g}_{\text{lactose}} \cdot \text{g}_{\text{biomasse}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

Le système décrit par les auteurs agit comme un réacteur à piston, il existe donc un gradient de concentration en substrat et en produits en fonction de la hauteur de la colonne. Ces gradients sont exprimés par les équations suivantes :

- Concentration en solvants selon la hauteur de la colonne

$$\text{équation 3-31 : } \frac{dC_s}{dh} = \frac{A}{F} \cdot r_{LS} \cdot Y_s$$

- Concentration en biomasse en suspension selon la hauteur de la colonne :

$$\text{équation 3-32 : } \frac{dC_B}{dh} = \frac{A}{F} \cdot r_{LG} \cdot Y_G - \Delta B_G / HF$$

- A : aire de la section du réacteur (m²)
- F : débit d'entrée (L.h⁻¹)
- Δ_{BG} : accumulation de biomasse dans le réacteur (g biomasse.h⁻¹)
- H : hauteur de la colonne (m)

Les variables d'entrées utilisées pour résoudre ces équations sont la biomasse résiduelle (C_B) ainsi que le lactose en entrée de réacteur (C). Les différentes populations peuvent donc être estimées en fonction de la biomasse totale immobilisée dans le réacteur ainsi que par la consommation en substrat. Ce modèle, comme celui développé par Raganati, est utilisé dans un but d'interprétation des phénomènes se déroulant dans le réacteur.

Le modèle développé arrive correctement à estimer les titres en solvants finaux en sortie de réacteur en fonction de la biomasse immobilisée finale. Les différents types cellulaires sont estimés à partir des vitesses de consommation de substrat lors de l'état stationnaire correspondant à l'arrêt du réacteur pour analyse de la biomasse. Toutefois, comme l'approche proposée par Raganati et al. (2016), les auteurs n'ont pas cherché à corréliser les données sur la biomasse obtenues par modélisation à des données expérimentales.

3.3.3 *Modèle de Schoutens*

Schoutens *et al.* ont développé un modèle afin de décrire la production de butanol et d'isopropanol par *C. beijerinckii* immobilisée dans un lit d'alginate lors d'un procédé de fermentation continu (Schoutens and F. Kossen 1986; Schoutens et al. 1986b). Il est à noter que le modèle proposé par ces auteurs est une simplification de celui proposé par Krouwel et al. (1983a). En effet, ce dernier faisait appel à un trop grand nombre de paramètres, dont certains non mesurables.

Le modèle développé a pour but de simuler les productivités volumiques maximales en fonction du taux de dilution imposé au système ainsi qu'à la fraction de solide placé dans le réacteur. Les hypothèses simplificatrices sont les suivantes :

- Le réacteur est à l'état stationnaire,
- la masse de cellules en suspension est négligeable par rapport à celle immobilisée dans les billes d'alginate.

Le bilan matière sur le réacteur s'écrit donc ainsi :

$$\text{équation 3-33 : } \frac{Dt(C_{s0}-C_s)}{1-\varepsilon} = \sigma \cdot r_s$$

$$\text{équation 3-34 : } C_b = Y_{sb}(C_{s0} - C_s)$$

$$\text{équation 3-35 : } C_{IP} = \frac{C_B}{k}$$

- D_t : taux de dilution appliqué au système (h^{-1})
- C_{s0} : concentration initiale en substrat ($g.L^{-1}$)
- C_s : concentration en substrat au cours du temps ($g.L^{-1}$)
- C_{IP} : concentration en isopropanol ($g.L^{-1}$)
- $1-\varepsilon$: fraction volumique de bille d'alginate dans le réacteur
- r_s : vitesse de consommation du substrat ($g.L^{-1}h^{-1}$)
- σ : coefficient d'efficacité.

Le coefficient d'efficacité est le rapport entre le taux de conversion réel du substrat au sein des billes d'alginate sur le taux calculé si les limitations par diffusion ne sont pas prises en compte. C_{IP} et C_b représentent respectivement la concentration en isopropanol et en butanol calculées en sortie de réacteur ($g.L^{-1}$). La consommation de substrat s'écrit selon l'expression suivante :

$$\text{équation 3-36 : } r_s = \frac{\mu_{max} \cdot C_{xs}}{Y_{sx}} \cdot \frac{C_s}{C_s + K_s} \left(1 - \frac{C_p}{C_{p,max}}\right)^n + m_s C_{xs}$$

Les paramètres présentés ci-dessous ont été déterminés expérimentalement. Le facteur d'efficacité a été calculé pour chaque C_s observé expérimentalement. Le modèle le plus proche des valeurs calculées en sortie du réacteur est celui ne présentant pas le terme de l'équation de Monod ainsi que celui de la maintenance.

- μ_{max} : taux de croissance maximale de la souche (h^{-1})
- K_s : constante de saturation ($g.L^{-1}$)
- $C_{p,max}$: concentration inhibitrice en butanol ($g.L^{-1}$)
- n : ordre de la réaction
- m_s : coefficient de maintenance ($g \text{ glucose} \cdot g \text{ biomasse} \cdot h^{-1}$)

Les modèles développés pour la fermentation ABE à cellules immobilisées et présentés dans cette partie ont plusieurs objectifs. Tout d'abord, Raganati *et al.* ont utilisé leur modèle afin de décrire la composition de la biomasse immobilisée en faisant l'hypothèse que la masse totale de biofilm est constante à l'état stationnaire. Qureshi *et al.* ont développé un modèle qui permet de décrire les cinétiques de production de métabolites à l'état stationnaire à partir du taux de dilution, de la concentration en substrat en entrée du système et de la biomasse totale immobilisée dans le réacteur. Schoutens *et al.* ont, quant à eux, modélisé les productivités du procédé de fermentation en prenant en compte la teneur en solide dans le réacteur utilisé. Néanmoins, seul

un de ces modèles décrit la fermentation IBE, et tous font l'hypothèse que la biomasse ne varie pas au cours des procédés de fermentation à lit fixe. Un travail sur la description de la croissance du biofilm sur les solides supports utilisés au cours de la fermentation doit donc être effectué afin de décrire avec plus de précision les procédés de fermentation IBE à cellules immobilisée. En effet, la croissance du biofilm est un phénomène long qui peut avoir un impact majeur sur la productivité de ces procédés. Le développement de modèles cinétiques qui prennent en compte ces phénomènes pourrait permettre de mieux comprendre les phénomènes qui influent sur le démarrage des fermentations à lit fixe.

4 Objectifs de la thèse

Comme mentionné au cours de l'étude bibliographique, dans certains cas, la fermentation continue à cellules immobilisées est un excellent moyen d'augmenter la productivité volumique du procédé. Toutefois, de nombreux paramètres bloquent encore la montée en échelle de cette technologie. En effet afin d'opérer les procédés sur le long terme et ainsi maximiser le taux d'utilisation du bioréacteur, la biomasse immobilisée doit être active. Néanmoins, la quantité de cellules immobilisées ainsi que la quantité de cellules actives au sein du biofilm ne sont pas connues, ce qui rend la conduite et la compréhension du procédé complexe. De plus, la formation d'un biofilm mature peut prendre entre plusieurs jours et plusieurs semaines, selon les conditions étudiées. La dynamique de formation du biofilm dépend de nombreux facteurs comme les propriétés physico-chimiques des solides supports ainsi que les conditions hydrodynamiques dans le bioréacteur.

Le premier objectif de cette thèse vise à comprendre les cinétiques de formation des biofilms au cours des fermentations continues à cellules immobilisées et comment la croissance du biofilm influe sur la performance du procédé de fermentation étudié. Par conséquent un modèle cinétique doit être développé afin de décrire les principaux phénomènes qui influent sur la croissance du biofilm et qui permettrait de décrire les phénomènes observés à l'échelle laboratoire. En outre, la répartition de la biomasse active dans le bioréacteur au cours des différentes étapes du procédé est un paramètre important afin de conduire et d'extrapoler au mieux les bioréacteurs à lit fixe. Par conséquent, le deuxième objectif de cette thèse est de développer des méthodes de caractérisation de la viabilité du biofilm formé par *C.beijerinckii*. Ces méthodes doivent permettre de mesurer et de situer les cellules actives qui composent le biofilm tout au long de son développement au cours des procédés de fermentations continus à lit fixe.

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

1 Souches et modes de culture

1.1 Souche

1.1.1 Préparation des cryotubes de spores

La souche utilisée dans la thèse est *Clostridium beijerinckii* DSM6423. Afin de conserver la souche et s'assurer de l'unicité du lot utilisé tout au long des trois ans, une banque de spores a été créée de la manière suivante : un volume de 0,5 mL d'une suspension cellulaire est étalé sur boîte de Pétri contenant du milieu GAPES solide réduit en chambre anaérobie (Bactron, Cornélius, Oregon, États-Unis). Les boîtes sont placées en condition anaérobie à 34°C pendant 5 à 7 semaines. Après vérification de la présence de spores au microscope, 7 mL d'une solution de glycérol stérile à 20 %v/v est ajouté à chaque boîte. Les spores sont décrochées de l'agar à l'aide d'un étaloir stérile.

La suspension de spores ainsi obtenue est répartie dans des tubes Eppendorf par volume de 250 µL. Les tubes sont ensuite stockés à -80°C sur le site de l'IFPEN de Rueil-Malmaison. Les spores sont transmises par colis sur le site de Solaize et stockées dans de la carboglace pendant le transport. Elles sont conservées sur le site de Solaize à -20°C avant utilisation dans les deux semaines.

1.2 Milieux de culture

1.2.1 Milieu CALAM

Le milieu CALAM (Nimcevic et al. 1998); est un milieu de remise en culture des spores dont la composition est décrite dans le tableau ci-dessous :

tableau 4 : Composition du milieu de culture CALAM

Composant	Concentration (g.L ⁻¹)
Pomme de terre	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	2,0
CaCO ₃	2,0
Glucose	10,0

Les pommes de terre sont mises à cuire pendant 20 minutes dans de l'eau bouillante, puis épluchées et mixées en présence d'eau à l'aide d'un homogénéiseur de type Ultra-Turrax® T25 (IKA, Staufen, Allemagne). La purée est ensuite filtrée afin de retirer les grumeaux résiduels de pomme de terre. Les autres composants, décrit dans le tableau 4, sont enfin ajoutés au filtrat. Le milieu est réparti dans des tubes à essai (10 mL) puis ces derniers sont autoclavés à 120°C pendant 20 min et stockés à 4°C avant utilisation.

1.2.2 Milieu GAPES

Le milieu GAPES (tableau 5) est un milieu de culture et de croissance pour les bactéries du genre *Clostridia* qui a été décrit par Gapes et al. (1996). Ce milieu est utilisé à la fois pour la chaîne d'ensemencement ainsi que pour les essais en fermenteur en milieu défini. Parmi les composants, l'acide *p*-amino-benzoïque est une vitamine nécessaire à la croissance des *Clostridia* et l'acétate d'ammonium sert à la fois de source d'azote et de tampon acido-basique pour la bactérie. Le milieu est stérilisé par filtration avec une unité de filtration Thermo Scientific™ Nalgene™ Rapid-Flow™ de 0,2 µm de diamètre de pore (Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, États-Unis).

tableau 5 : Composition du milieu de culture GAPES

Composant	Concentration (g.L ⁻¹)
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,0066
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,0
KH ₂ PO ₄	1,0
K ₂ HPO ₄	0,6
CH ₃ COONH ₄	2,9
Acide <i>p</i> -amino-benzoïque	0,1
Extrait de levure granulé	2,5
Glucose	45 ou 60

tableau 6 : Composition du milieu de culture GAPES solide

Composant	Concentration (g.L ⁻¹)
Agar	20
FeSO ₄ , 7H ₂ O	0,5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1,0
KH ₂ PO ₄	0,76
K ₂ HPO ₄	2,9
CH ₃ COONH ₄	2,9
acide- <i>p</i> -aminobenzoïque	0,1
extrait de levure	5,0

1.3 Conditions de culture

1.3.1 Mise en culture des spores

Les spores de la souche de *Clostridium beijerinckii* DSM6423 sont stockées sur le site de Solaize à -20°C dans 1 mL de solution composée à 20% v/v de glycérol contenu dans un cryotube. Quatre

tubes à essai contenant 10 mL de milieu CALAM sont placés en condition anaérobie, dans une jarre hermétique dans laquelle est placée un réactif Anaerocult® (Merck, Darmstadt, Allemagne), pendant une nuit. Après réduction du milieu, les spores sont activées par un choc thermique à 100°C au bain-marie pendant une minute. Le milieu de culture est ensuite refroidi sur glace pendant trois minutes. L'inoculation est effectuée en transférant stérilement un volume de 250 µL du cryotube dans 10 mL de milieu CALAM. Le tube est ensuite placé dans une jarre hermétique en présence d'une autre plaquette d'Anaerocult®. La jarre qui contient les tubes est elle-même placée dans un incubateur HT Multitron cell® (Infors, Bottmingen, Suisse) à 34°C et sous agitation à 100 rpm pendant 24 h.

1.3.2 Précultures

Une préculture en milieu GAPES est effectuée avant l'ensemencement final du fermenteur. Les 10 mL de milieu CALAM fermentés sont introduits dans 90 mL de milieu GAPES stérile dans un flacon en verre (Schott Duran, Colombes, France) de 250 mL préalablement stérilisé à l'autoclave (120°C pendant 20 minutes). Ce milieu GAPES a préalablement été balayé à l'azote pendant 30 minutes afin de chasser l'oxygène du milieu. Le flacon de préculture est muni d'un évent équipé d'un filtre stérile. Cet évent est fermé lors des 5 premières heures de la fermentation puis ouvert afin de pouvoir permettre le dégagement des gaz produits pendant la fermentation. La préculture est mise à incuber pendant 24 h avant ensemencement dans les réacteurs finaux (Pérez-Bibbins et al. 2018).

1.4 Description des systèmes expérimentaux

1.4.1 Support utilisé pour l'immobilisation des cellules et la formation des biofilms.

Au cours de la thèse, des mousses en polyuréthane ont été choisies comme support pour la croissance du biofilm. En effet, ces dernières ne sont pas toxiques pour les bactéries cultivées, ont une grande surface spécifique disponible pour l'adhésion, sont résistantes à la stérilisation, et ont une porosité ouverte. Toutes ces caractéristiques permettent aux cellules de croître à l'intérieur des pores sans être lessivées. Des mousses en polyuréthane ISP4452 (Industrie Schaum Produkte, Limbourg, Allemagne) d'une densité de pore de 40 ppi (*pore per inch*), de densité apparente de 40 kg.m⁻³ et de dimension 20 mm x 20mm x 7 mm sont utilisées comme solide support. La fiche technique de la mousse est disponible dans l'Annexes-1 de ce rapport. La masse solide par volume utile de bioréacteur pour chacun des essais est de 7,0 g.L⁻¹.

1.4.2 Fermenteur à biofilm CBR-90-3 anaerobic bioreactor

Afin d'étudier le développement de biofilm, un nouvel outil expérimental a été acquis auprès de Biosurface technologies®. Ce dernier permet d'étudier de la croissance du biofilm sur différents types de supports plans. Ces supports, appelés coupons, peuvent être retirés de manière stérile au cours d'une fermentation continue. Ainsi, la fermentation peut continuer et la cinétique d'adhésion de biomasse peut être étudiée au sein d'un même réacteur. Ce bioréacteur a déjà été

utilisé dans la littérature afin d'étudier les caractéristiques des biofilms formés sur différents types de support au cours de fermentations continues (Honraet et al. 2005; Paredes et al. 2012; Williams and Bloebaum 2010; Yoon and Lee 2017).

Ce dernier est en verre et possède un volume utile de 350 mL. La platine du réacteur dispose de 8 ouvertures servant à insérer 8 barreaux qui plongent dans le milieu de fermentation. Chaque barreau peut accueillir, lui-même, 3 coupons de matériaux choisis. Les barreaux peuvent être retirés de manière stérile (sous PSM ou à la flamme) et la biomasse adhérente sur ces derniers peut ensuite être analysée.

La platine de ce bioréacteur est équipée d'une entrée pour l'alimentation en substrat d'un plongeant pour les prélèvements, la sortie liquide est assurée par un système de débordement. Un schéma de l'outil expérimental est présenté en figure 10. Tous les essais sont effectués à 34°C, et le pH de la fermentation n'est pas contrôlé.

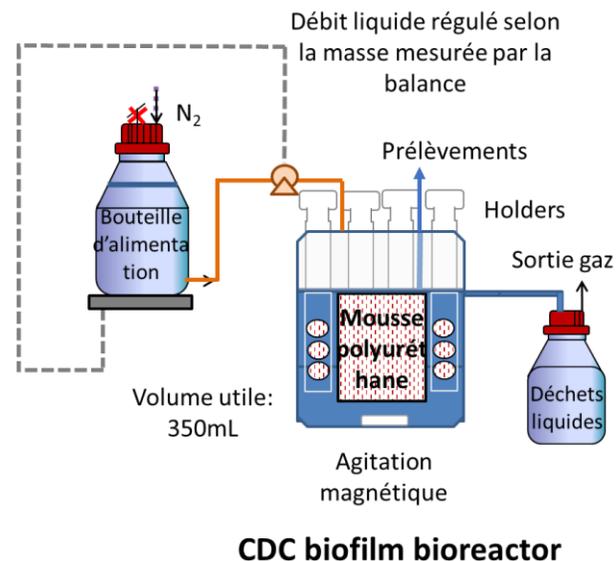


figure 10: Schéma du réacteur à biofilm BioSurface Technologies

Le bioréacteur à biofilm est rempli avec 305 mL de milieu GAPES stérile puis est placé sous chambre anaérobie pendant une nuit afin de chasser l'oxygène du milieu de culture. Un volume de 45 mL de préculture est inoculé dans le bioréacteur (10 % v/v) et le bioréacteur est placé dans un incubateur Multitron cells (Infors HT, Bottmingen, Suisse) à 34 °C. L'agitation est effectuée à l'aide d'un barreau aimanté sur une plaque d'agitation réglée à 200 rpm. Le bioréacteur est ensuite connecté à la bouteille d'alimentation ainsi qu'au contenant recevant les déchets liquides.

Après une phase de croissance des bactéries d'une durée de 8 h, le flux d'alimentation est mis en route. La solution d'alimentation composée également de milieu GAPES stérile est amenée au fermenteur à l'aide d'une pompe péristaltique SciLog® ChemTec™ (Parker Hannifin, Cleveland,

Ohio, États-Unis). Cette dernière est programmable et reliée à une balance ICS425k-35L (Mettler Toledo, Columbus, Ohio, États-Unis) disposée sous la bouteille d'alimentation en substrat. Il est ainsi possible de réguler les débits d'entrées de substrat dans le fermenteur. L'alimentation est démarrée à un taux de dilution de $0,03 \text{ h}^{-1}$ avant d'être progressivement augmentée selon différents types de pente en fonction de l'expérience réalisée.

1.4.3 Fermentation en flacons Schott

Le système de fermentation en flacon schott permet de paralléliser un grand nombre de fermentations continues. Ainsi, avec ce type de système, il est par exemple, possible d'effectuer des répliques biologiques pour le screening de solides ou la validation des méthodes d'analyses de la viabilité du biofilm. Le système d'étude est composé de 8 flacons Schott de volume utile 100 mL. Les flacons sont alimentés par une nourrice, reliés par une pompe péristaltique multi-têtes (Cole-Parner, Vernons Hills, Illinois, États-Unis). Chaque flacon Schott est équipé d'une platine munie d'un plongeur sur lequel sont fixées 4 mousses en polyuréthane. Chaque platine est équipée d'une sortie composée d'un tuyau plongeant permettant un soutirage par débordement (hauteur de tuyau correspondant à un volume liquide de 80 mL). La platine est également munie d'une entrée reliée à la bouteille d'alimentation en substrat ainsi que d'un événement équipé d'un filtre stérile de porosité $0,2 \mu\text{m}$. L'agitation est assurée par un barreau magnétique dans chaque flacon. Un schéma du montage est représenté figure 11.

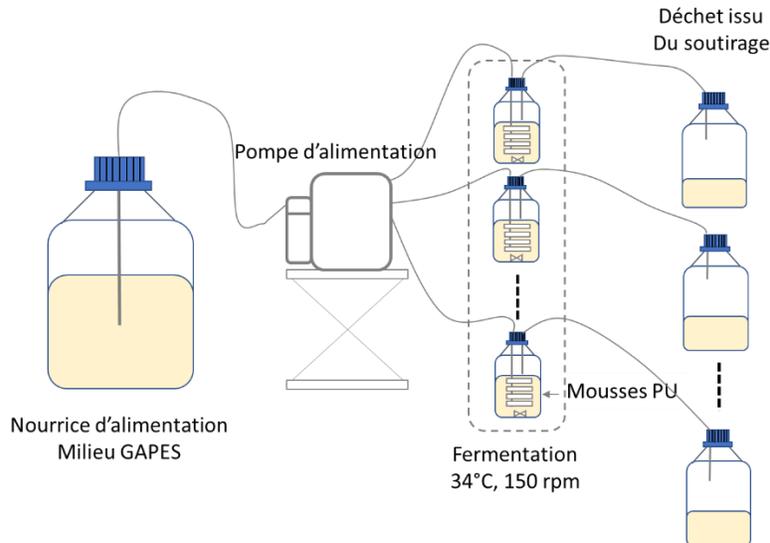


figure 11: Schéma du montage de fermentation en flacons Schott pour analyse du biofilm par cytométrie en flux

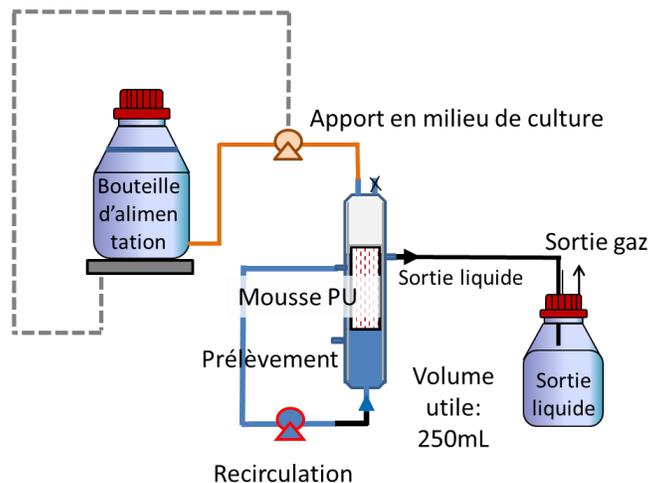
Une fois les flacons et tuyaux stérilisés, 90 mL de milieu GAPES est ajouté dans chaque flacon, puis ces derniers sont incubés dans la chambre anaérobie pendant la nuit. Les flacons sont inoculés à 10% v/v et incubés pendant 7 h à 34°C dans la chambre anaérobie. Ils sont sortis de la chambre, les tuyaux d'alimentation et de soutirage sont raccordés et le système entier est placé

dans une étuve à 34°C sur un agitateur magnétique. Le substrat est amené via la pompe jusqu'aux flacons. Le taux de dilution initial imposé est compris entre 0,01 h⁻¹ et 0,03 h⁻¹.

1.4.4 Fermentation en colonnes lit fixe

Le bioréacteur à colonne lit fixe est conçu pour favoriser l'adhésion et la croissance du biofilm sur les supports étudiés et ainsi favoriser les productivités du procédé de fermentation développé. Le bioréacteur à colonne à lit fixe est une colonne en verre d'un diamètre interne de 4,3 cm et d'une hauteur de 20 cm. Son volume utile est de 200 mL tandis que son volume total est de 315 mL. Une grille métallique est placée dans la colonne afin de retenir les mousses dans le milieu de culture au cours de la fermentation. La sortie du gaz de fermentation est assurée par un évent muni d'un filtre stérile monté sur la bouteille contenant le milieu fermenté sorti de la colonne. Une représentation schématique de la colonne est montrée sur la figure 12.

Une masse de 1,5 g de mousses en polyuréthane, coupées en quatre parties égales, est utilisée comme support de développement pour le biofilm. Les mousses sont rincées à l'eau distillée puis sont placées dans une grille métallique adaptée au diamètre de la colonne afin de bloquer les supports dans le milieu de culture. La colonne est stérilisée à 120°C pendant 20 minutes à vide en présence des mousses en polyuréthane (PU), préalablement disposées dans le réacteur.



Colonne à lit fixe

figure 12 Schéma représentatif du bioréacteur colonne

Une pompe péristaltique SciLog® ChemTec™ (Parker Hannifin, Cleveland, OH, États-Unis) est utilisée afin de transférer le milieu GAPES préalablement réduit à l'azote. Cette pompe est programmable et reliée à une balance Mettler Toledo ICS425k-35L (Mettler-Toledo, Columbus, OH, États-Unis). Le débit volumique de la pompe est régulé de manière continue en prenant en compte la perte de masse de la bouteille d'alimentation. Le débit de sortie est égal au débit d'entrée et est assuré par un système de débordement.

L'inoculation est effectuée en transférant 25 mL de préculture (10 %v/v) dans les colonnes à l'aide d'une seringue stérile à travers un entrant muni d'un clapet anti-retour. Après inoculation, une pompe de recirculation est mise en route. Elle permet un mélange homogène du milieu liquide dans la colonne. En effet le débit de recirculation est réglé entre 500 mL.h⁻¹ en début de fermentation, et jusqu'à 3400 mL.h⁻¹ lors des fins de tests. Le débit d'entrée en substrat est de 7,5 mL.h⁻¹ et atteint un maximum de 50 mL.h⁻¹ en fin de test.

Une phase de batch est d'abord respectée pendant 8 h afin de permettre la colonisation des supports et une croissance des bactéries. Une fois cette phase respectée le taux de dilution est fixé à 0,03 h⁻¹. La pente d'augmentation est initialement fixée à 3,0.10⁻⁴ h⁻² car des expériences préalables ont montré qu'elle permettait de garder une concentration stable en solvants pendant le démarrage de la fermentation. Cette dernière est ensuite augmentée de 20 % si la concentration en solvants totaux est au-dessus de 12 g.L⁻¹. De la même manière, la pente du taux de dilution est diminuée de 20 % si la concentration en solvants totaux en sortie de réacteur est inférieure à 10 g.L⁻¹.

1.4.5 Fermentation en bioréacteurs

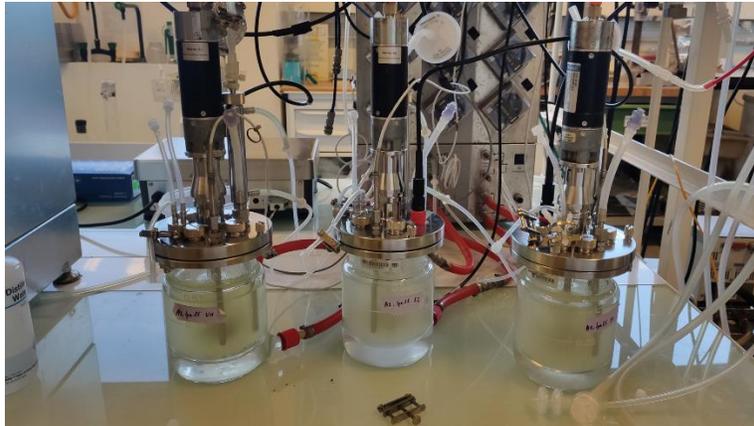


figure 13 : Photographie des bioréacteurs Sartorius d'un volume utile de 500 mL utilisés pour les études cinétiques batchs

Trois bioréacteurs Biostat-Q plus (Sartorius, Aubagne, France) d'un volume utile de 0,5 L ont été utilisés pour réaliser des fermentations en batch. Les bioréacteurs sont équipés d'une platine munie d'une sonde de température, d'un emplacement pour une sonde pH, d'une entrée munie d'une valve anti-retour pour les inoculations ainsi que de deux autres plongeurs afin de pouvoir prélever régulièrement du milieu de culture et injecter du gaz si besoin. La platine est également équipée d'une sortie gaz thermostatée à 4°C. Elle est munie d'un filtre de porosité 0,45 µm et reliée à un compteur volumétrique de gaz (Ritter MilliGascounter, Bochum, Allemagne).

Le réacteur est stérilisé à vide à 121°C pendant 20 minutes. Les trois bioréacteurs sont remplis avec 405 mL de milieu GAPES stérile. Une fois le milieu de culture transféré stérilement dans les

bioréacteurs, de l'azote est injecté dans le milieu de culture (bullage entre 0,1 et 0,5 vvm) pendant une nuit afin d'assurer des conditions anaérobies. Le chauffage est assuré par une double enveloppe remplie d'eau, maintenu à 34°C à l'aide d'un thermostat. Une fois l'inoculation effectuée, l'acquisition des données en ligne (pH, agitation, température) est effectuée via le boîtier de contrôle des bioréacteurs.

2. Analyses des fermentations

2.1 Mesures pour le suivi

2.1.1 *Mesure de la densité optique par spectrophotométrie*

La densité optique (DO) de la suspension cellulaire est mesurée par absorbance à 600 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV mini 1240 (Shimadzu, Kyoto, Japon). Si nécessaire, la suspension cellulaire est diluée dans de l'eau distillée de manière que l'absorbance soit comprise entre 0,15 et 0,7. Les mesures de DO sont effectuées une fois par jour contre le milieu avant ensemencement.

2.1.2 *Détermination de la masse sèche*

La masse sèche en suspension est obtenue par filtration de 10 mL d'échantillons sur une membrane de nylon de porosité 0,45 µm (VWR® ou Schleicher & Schuell®). Le filtrat est rincé avec une solution physiologique stérile (NaCl 9 g.L⁻¹). Les filtres sont pesés avant utilisation et après le séchage de la biomasse pendant 24 h à 105°C. La masse sèche correspond à la différence de masse entre les deux pesées. Une corrélation entre la DO et la masse sèche a été déterminée comme montré sur la figure 14. Ainsi, une unité d'absorbance équivaut à 0,52 g.L⁻¹ de masse cellulaire sèche.

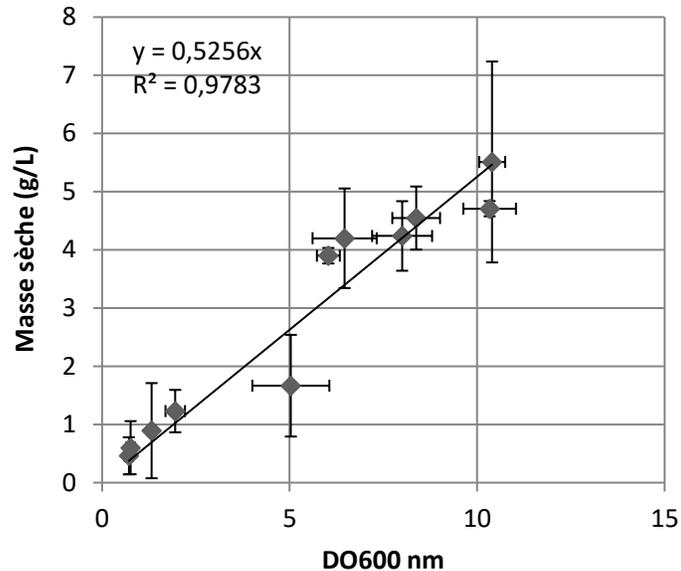


figure 14 : Relation entre masse sèche cellulaire pesée et densité optique mesurée à 600nm (les barres d'erreur représentent les écarts types mesurés sur trois mesures)

En ce qui concerne le biofilm, les solides supports sont mis à l'étuve à 100°C pendant 24 h avant chaque fermentation. Ces derniers sont ensuite placés dans un dessiccateur à température ambiante avant pesée. Une fois l'expérience terminée, le support sur lequel le biofilm s'est développé est analysé de la même manière. La masse sèche de biofilm immobilisée sur le support correspond à la différence de masse entre les deux pesées.

2.2 Dosage des métabolites

Des prélèvements du milieu de culture sont effectués une à deux fois par jour lors des fermentations continues et toutes les deux heures pour les fermentations batch. Afin de séparer les cellules de la phase aqueuse, l'échantillon est d'abord centrifugé à 5000 rpm pendant dix minutes. Après centrifugation, l'échantillon peut être stocké à -20°C avant de le traiter pour des analyses ultérieures. Avant les analyses, l'échantillon est filtré sur un filtre de porosité 0,2 µm et dilué au 20^{ème} dans une solution de 1-propanol à une concentration à 0,5 g.L⁻¹. Le 1-propanol sert à la fois d'étalon interne et externe pour les analyses

Le mélange obtenu après fermentation est composé d'un mélange d'acide acétique, d'acide butyrique, de butanol, d'acétone, d'isopropanol, d'éthanol et de 1-propanol (l'étalon interne) dans de l'eau. La phase aqueuse récoltée et diluée est ensuite analysée à l'aide de plusieurs appareils afin de connaître la concentration résiduelle des différents métabolites produits par la bactérie ainsi que la concentration en glucose non consommé.

2.2.1 Dosage de l'acétone, de l'isopropanol, de l'éthanol et du butanol en chromatographie phase gazeuse.

La concentration en solvants produits au cours de la fermentation (acétone, isopropanol, butanol et éthanol) est mesurée par chromatographie en phase gazeuse. Un volume de 0,2 µL d'échantillon est injecté et analysé dans un chromatographe équipé d'une colonne porabond-Q (Agilent, Santa-Clara, Californie, États-Unis). Les dimensions de la colonne sont les suivantes : 25 m de long, 0,32 mm de diamètre et 5 µm d'épaisseur de film. Les éléments séparés sont quantifiés à l'aide d'un détecteur à ionisation de flamme. L'hélium est utilisé comme gaz vecteur à un débit de 1,6 mL.min⁻¹. Après injection, la colonne est graduellement chauffée de 50°C à 250°C pendant 30 minutes. Des solutions de référence ayant une concentration en solvants connue sont passées en même temps que les échantillons afin de valider ou non les résultats.

2.2.2 Dosage de l'acide acétique et de l'acide butyrique par HPLC.

Un volume de 10 µL est injecté dans une chaîne HPLC CC20A (Shimadzu ; Kyoto, Japon) équipée d'une colonne HPX-87H (Bio-Rad, Hercules, CA, États-Unis), chauffée à 60°C et éluée avec une solution aqueuse concentrée à 0,01 N d'acide sulfurique à un débit volumique de 0,6 mL.min⁻¹. La détection des composants est effectuée à l'aide d'un détecteur UV Waters 2487 dual λ réglé à 220 nm.

2.2.3 Dosage du glucose

Le glucose est mesuré de deux manières différentes. Une fois le prélèvement effectué, une mesure de glucose résiduel au glucoSTAT est effectuée afin de pouvoir suivre l'évolution de la fermentation de manière journalière. Le glucose résiduel est mesuré de manière plus précise en fin d'expérience par HPLC afin de calculer les rendements et les cinétiques de consommation de substrat.

La concentration en glucose est mesurée une fois par jour à l'aide d'un glucoSTAT YSI 2900 (Xylem, Nanterre, France). Avant d'être analysés, les échantillons sont d'abord dilués au 20^{ème} dans du tampon fourni par YSI afin d'entrer dans la gamme de lecture de l'appareil (compris entre 1 g.L⁻¹ et 5 g.L⁻¹). La calibration est vérifiée en début et en fin de séquence, en passant une solution témoin de concentration en glucose connue. Les résultats sont corrélés avec les dosages de glucose par HPLC, dont la méthode est décrite dans le paragraphe ci-dessous.

Le glucose résiduel est analysé par une chaîne HPLC Ultimate 3000 Series (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, États-Unis). Un volume de 20 µL est injecté dans une colonne Metacarb 87P (Agilent) chauffée à 80°C. L'eau est utilisée comme phase mobile à un débit de 0,4 mL.min⁻¹. Le glucose résiduel est analysé avec un détecteur d'indice de réfraction Varian 350 RI. Une pré colonne Micro-Guard de Ashing (Bio-Rad, Hercules, Californie, États-Unis) est ajoutée au système chromatographique afin de dessaler les échantillons.

2.3 Analyses de la viabilité

2.3.1 Microscopie confocale à balayage laser (MCBL)

Afin d'étudier la répartition des cellules viables dans l'épaisseur du biofilm, une méthodologie de caractérisation par microscopie confocale à balayage laser (MCBL) a été développée. Elle permet d'effectuer une série de coupes optiques à travers des structures tridimensionnelles.

- Prélèvement des coupons en milieu stérile dans le fermenteur à biofilm CBR-90-3

Pour réaliser le prélèvement des coupons dans le fermenteur à biofilm CBR-90-3, le système a besoin d'être déplacé sous le poste de sécurité microbiologique (PSM). Les tuyaux d'entrées et sorties de ce dernier sont alors bouchés à l'aide de pinces de Mohr et débranchés de manière stérile à la flamme afin d'éviter toutes contaminations. Le réacteur est ensuite placé dans un poste de sécurité microbiologique. Un des barreaux est alors retiré et remplacé par un autre barreau témoin, préalablement stérilisé à 120°C pendant 20 minutes. Les coupons colonisés par le biofilm sont précautionneusement retirés du barreau afin d'être analysés par microscopie confocale. Le réacteur est ensuite replacé sur la paillasse, les tuyaux d'entrée et de sortie sont rebranchés de manière stérile et les pinces de Mohr sont retirées afin de rétablir le débit d'alimentation. La durée de l'opération dure environ 15 minutes et n'a par conséquent pas d'impact important sur la cinétique de la fermentation.

- Marquage du biofilm formé sur les coupons par Syto 9/IP

Le SYTO™ 9 (Invitrogen™, ThermoFischer, Waltham, MS, États-Unis) est perméable à la membrane plasmique des bactéries. Lorsqu'il est présent dans le cytoplasme il se lie à l'ADN intracellulaire des bactéries. Une fois lié, ce dernier émet de la fluorescence dans le vert (λ excitation : 485 nm, λ émission : 498 nm). L'iodure de propidium (Invitrogen™, ThermoFischer, Waltham, MS, États-Unis), quant à lui, est imperméable à la membrane plasmique des bactéries étudiées. Si cette dernière est altérée alors le marqueur peut pénétrer dans le cytoplasme, se lier à l'ADN et émettre une fluorescence de couleur rouge (λ excitation : 535 nm, λ émission : 617 nm). Lorsque les deux sondes sont employées en même temps, l'iodure de propidium possède une meilleure affinité à l'ADN que le SYTO™ 9. Ainsi, les cellules dont la membrane est altérée fluorescent en rouge tandis que les cellules totales sont marquées en vert.

Pour analyser la viabilité du biofilm formé, les coupons sont immergés dans un bain de tampon phosphate salin (PBS 1X) d'un volume total de 3 mL (tube Falcon® de 25mL). Les solutions d'iodure de propidium et de SYTO™ 9 sont introduites de manière à obtenir une concentration finale de 3 mM pour chaque composé. Le montage est ensuite incubé 15 min à l'obscurité et à température ambiante. Une fois le temps d'incubation respecté, les coupons sont placés sur une lamelle de verre et analysés à l'aide d'un microscope confocal LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne).

- Marquage de viabilité du biofilm par cFDA/IP

Le diacétate de carboxyfluorescéine (chemchrome V8, Biomérieux, Marcy l'étoile, France) est un marqueur de l'activité estérasique intracellulaire (λ excitation : 485 nm, λ émission : 540 nm). Ce dernier est perméable à la membrane plasmique des bactéries et peut donc diffuser dans le cytoplasme des cellules. Dans le cytoplasme le cFDA peut être clivé par des estérases intracellulaires non spécifiques. Une fois cette molécule clivée, la fluorescéine obtenue émet une fluorescence ce qui indique la viabilité de la bactérie étudiée. Pour effectuer l'analyse de viabilité, les coupons sont immergés dans un tampon PBS 1X contenant l'iodure de propidium et le cFDA à une concentration finale de $10 \mu\text{g. mL}^{-1}$ (Patakova et al. 2014; Branska et al. 2018). Une fois une incubation de 10 min à 40°C à l'obscurité respectée, le coupon est placé sur une lamelle puis observé avec le microscope confocal.

- Observation en microscopie confocale à balayage laser

Les observations en MCBL sont effectuées sur la plateforme technique CT μ située à Villeurbanne. Le microscope utilisé est un modèle LSM 800 (Zeiss, Oberkochen, Allemagne). Les objectifs utilisés sont le Plan-NeoFluar 40x/1.30 OIL DIC (Zeiss, Oberkochen, Allemagne) ainsi que le Plan-NeoFluar 10X/0.3 (Zeiss). Le tableau 7 ci-dessous récapitule les longueurs d'ondes (λ) à laquelle les fluorochromes ont été excités ainsi que les longueurs d'ondes mesurées lors des analyses.

tableau 7 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission lors des analyses du biofilm en MCBL

Sonde utilisée	λ excitation (nm)	λ récoltées (nm)
Syto 9	488	495-536
Iodure de propidium	488	650-700

Les images acquises ont une superficie de $159,7 \mu\text{m} \times 159,7 \mu\text{m}$ (1496 pixels x 1496 pixels) et la résolution est de 9,3 pixels par micron.

- Analyse d'image

Les images récoltées sont stockées sous le format TIFF (*Taged Image File Format*) et sont ensuite exportées dans le logiciel de traitement d'image « Image J ». Les images sont séparées pour les deux canaux d'acquisition (vert et rouge) puis sont seuillées à l'aide de la méthode Otsu. Une opération d'addition AND est ensuite effectuée afin d'obtenir une image contenant tous les pixels marqués à la fois en vert et en rouge. Chaque canal d'acquisition est soustrait à l'image ainsi créée afin de comptabiliser uniquement les pixels marqués soit en rouge soit en vert. Le pourcentage

de recouvrement est mesuré dans chaque canal acquis en fonction de la profondeur du biofilm étudié.

2.3.2 Cytométrie en flux.

- Traitement enzymatique des biofilms avant analyse par cytométrie en flux

Les supports en mousse de polyuréthane sont sortis des bioréacteurs et apportés dans la chambre anaérobie puis placés dans des tubes Falcon 25mL remplis de 20mL tampon PBS 1X préalablement réduit (8,0 g.L⁻¹ NaCl, 0,2 g.L⁻¹ KCl, 1,42 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 0,24 g.L⁻¹ KH₂PO₄). Différentes déconstructions enzymatiques sont testées. Chaque méthode (nature de l'enzyme, concentration, temps d'incubation) est décrite dans le tableau 8 récapitulatif ci-dessous :

tableau 8 : Différentes méthodes testées pour la déconstruction enzymatique du biofilm de *C. beijerinckii*

Cocktail enzymatique	Fournisseur	Activité	Concentration	Tampon utilisé	Temps d'incubation
Caylase®	Cayla	Cellulase, protéase, chitinase	10 mg.mL ⁻¹	MES	1h
Vinotaste®	Lamothe ABIET	Polygalacturonase, β-glucanase.	30 mg.mL ⁻¹	KPAm	1h30
Glucanex®	Sigma Aldrich	β-glucanase, cellulases, protéases,	10 mg.mL ⁻¹	KPAm	1h30
Dnase I	Qiagen	DNase	5,45 U.mL ⁻¹	PBS	1h
Protéinase K	Qiagen	Protease	0,1 mg.mL ⁻¹	PBS	1h

- Marquage pour étude de viabilité

Après traitement enzymatique, les supports sont retirés des tubes Falcon en chambre anaérobie. La suspension cellulaire obtenue est centrifugée pendant 10 min à 4000 g et à 4°C. Le culot cellulaire obtenu est re-suspendu dans 20 mL de tampon Mac Ilvaine à pH 7,2 (18,2 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 9,6 g.L⁻¹ acide citrique). La suspension est ensuite diluée dans ce même tampon jusqu'à obtenir une concentration cellulaire comprise entre 5.10⁵ et 2.10⁶ cellules.mL⁻¹. Les solutions d'iodure de propidium (IP) (Invitrogen, fisher scientific, Hampton, NA, États-Unis) et de di-acétate de carboxyfluorescéine (cFDA) (Chemchrome V8, Biomérieux, Marcy l'étoile, France) sont

introduites de manière à obtenir une concentration finale de 10 µg.mL⁻¹ pour chaque composé. Le mélange est enfin incubé 10 min à 40°C (Patakova et al. 2014; Branska et al. 2018).

- Analyses par cytométrie en flux

Après le double marquage effectué au cFDA et à l'IP, la fluorescence des cellules est mesurée sur un cytomètre en flux CyFlow Space (Sysmex, Roissy, France). Le cytomètre est équipé d'un laser à Argon dont la longueur d'onde d'émission est de 488 nm et de quatre filtres optiques pour la détection de la lumière diffusée: la lumière collectée dans l'axe du laser (Forward scatter, FSC), la lumière diffusée aux grands angles et collectée perpendiculairement au laser (Side scatter, SSC), un filtre passe-bande (de 530 nm ± 15 nm) pour collecter la fluorescence verte (FL1) et un filtre passe-haut (> 630 nm) pour collecter la fluorescence rouge (FL3). Par ailleurs, le cytomètre est équipé d'un système de comptage volumétrique qui permet de dénombrer les cellules contenues dans un volume de 200 µL.

Les données de fluorescence sont collectées et analysées par le logiciel d'analyse Flomax, qui fournit des histogrammes (nombre de cellules en fonction du signal d'un détecteur) et des cytogrammes (nombre de cellules en fonction de l'intensité de fluorescence), auxquels sont associés des tableaux statistiques qui recensent le nombre et le pourcentage de cellules présentes dans chaque zone du cytogramme ainsi que leur moyenne d'intensité de fluorescence. Un réglage préalable des gains et de la compensation est nécessaire pour analyser les différents échantillons.

2.3.3 Mesure de la cultivabilité par étalement sur boîte

Afin de vérifier les données obtenues par cytométrie en flux, une série de dilutions ainsi qu'un dénombrement sont effectués. Une série de suspension au 10^{ème} est effectuée dans des tubes Eppendorf d'un volume de 1,5 mL contenant chacun 900 µL de tampon PBS stérile placés dans la chambre anaérobie. Après étalement sur boîte de pétri contenant du milieu 2YTG (0,35 g.L⁻¹ Na₂HPO₄, 2 H₂O, 0,35 g.L⁻¹ KCl, 10 g.L⁻¹ extrait de levure, 10 g.L⁻¹ tryptone, 10 g.L⁻¹ Glucose, 20 g.L⁻¹ agar). Les boîtes sont ensuite incubées à 34°C pendant 24 h dans la chambre anaérobie. Les colonies formées sont ensuite dénombrées. Chaque résultat exprimé en unité formant colonie par millilitre (UFC.mL⁻¹), est le résultat de la moyenne d'au moins trois dénombrements.

3. Analyse des performances et modélisation des procédés de fermentation

3.1 Analyse des Performances de la fermentation

3.1.1 Description des performances

Lors des fermentations continues le débit d'alimentation est mesuré par perte de masse du flacon d'alimentation. Le taux de dilution est calculé selon la relation suivante :

$$D = \frac{F}{V}$$

- D : taux de dilution (h⁻¹)
- F : débit d'alimentation (L.h⁻¹)
- V, volume utile du réacteur étudié (L)

La productivité volumique totale en solvants est le produit entre le taux de dilution (h⁻¹) du réacteur et la concentration en sortie des solvants produits (g.L⁻¹) et dont la formule est décrite ci-dessous : La productivité volumique est mesurée à chaque point de mesure en solvants.

$$P = D \cdot [IBE]_{out} + \frac{d[IBE]}{dt}$$

Les modes de conduite de la fermentation, font que les concentrations en solvants sont stables lors des cas étudiés. Dans ces cas, la productivité en solvants à chaque instant peut être calculée de la manière suivante :

$$P = D \cdot [IBE]_{out}$$

Le rendement en solvants lors des fermentations continues peut être calculé de la manière suivante :

$$Y_{ps} = \frac{r_p}{r_s} = \frac{D \cdot [IBE]_{out} + \frac{d[IBE]}{dt}}{D(S_0 - S) - \frac{dS}{dt}}$$

Dans les cas étudiés, la variation de la concentration solvants est faible et $\frac{d[IBE]}{dt} = 0$. Il en va de même avec la concentration en glucose résiduel et $\frac{dS}{dt} = 0$. Par conséquent, le rendement en solvants peut se calculer de la manière suivante :

$$Y_{ps} = \frac{[IBE]_{out}}{S_0 - S}$$

- r_p : vitesse de production en solvants
- r_s : vitesse de consommation du substrat
- $[IBE]_{out}$: concentration en solvants en sortie de réacteur (g.L⁻¹)
- S_0 : concentration en substrat initiale (g.L⁻¹)
- S : concentration en substrat en sortie de réacteur (g.L⁻¹)

3.1.2 Tests statistiques

Des tests d'analyse de la variance ont été utilisés afin de déterminer l'effet significatif des différents traitements effectués sur le pourcentage de cellules viables analysées après les traitements enzymatiques détaillés au cours de la partie 2.3.2 de ce chapitre. Des tests de Student ont également été réalisés afin de comparer les moyennes des échantillons obtenus et ainsi

conclure ou non sur l'efficacité d'un traitement comparé au témoin ou aux autres traitements. Les résultats sont considérés significatif lorsque la p-value calculée est inférieure à 0,05.

3.2 Modélisation des procédés de fermentation

Les modèles sont développés sur la version 3.7 du logiciel python. Un système d'équations différentielles est résolu numériquement par la méthode de Runge-Kutta d'ordre 4 à l'aide de la fonction « odeint » disponible dans la librairie « scipy.integrate » du logiciel.

3.2.1 Algorithme de Levenberg-Marquardt.

Dans la plupart des modèles dynamiques, les paramètres du modèle peuvent être trouvés à partir des conditions expérimentales. Toutefois, certaines contraintes (complexité d'échantillonnages pas de possibilité d'observer une variable, faible qualité de mesures) font que certains paramètres sont en pratique non indentifiables. L'indentification des paramètres peut alors s'écrire comme un problème d'optimisation, à savoir trouver le jeu de paramètres optimal du modèle décrit afin de minimiser la somme du carré des écarts entre valeurs expérimentales et valeurs simulées. Il est décrit formellement dans l'équation présentée ci-dessous :

$$\begin{aligned}
 r(\theta) &= \sum_{i=1}^m \left[\frac{y(t_i) - \hat{y}(t_i; \theta)}{\sigma_{yi}} \right]^2 \\
 &= (y - \hat{y}(\theta))^T W (y - \hat{y}(\theta)) \\
 &= y^T W y - 2y^T W \hat{y} + \hat{y}^T W \hat{y}
 \end{aligned}$$

Ici $\hat{y}(t_i; \theta)$ représente le vecteur des valeurs du modèle au $i^{\text{ème}}$ point avec les paramètres estimés. Le terme $y(t_i)$ représente le vecteur des données expérimentales au i ème point. La matrice W est la matrice de pondération. Cette matrice est une matrice diagonale qui contient l'inverse des variances des mesures au point i , notées σ_{ii} .

La fonction $r(\theta)$ est non linéaire dans le modèle de paramètre θ , donc la minimisation de $r(\theta)$ s'effectue de manière itérative. Le but de chaque itération est de trouver une perturbation h du vecteur de paramètres θ qui réduit $r(\theta)$. L'algorithme développé par Levenberg-Marquardt est décrit ci-dessous (Levenberg 1944; Marquardt 1963). Il permet, grâce au calcul des dérivées partielles des résidus vis-à-vis de chaque paramètre, de trouver des valeurs de θ qui permettent de baisser la fonction objective à chaque itération. La matrice J représente le calcul des dérivées partielles sur les résidus en fonction de chaque paramètre.

$$J = \begin{pmatrix} \frac{\partial r_1(\theta)}{\partial(\theta_1)} & \dots & \frac{\partial r_1(\theta)}{\partial(\theta_n)} \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \frac{\partial r_n(\theta)}{\partial(\theta_1)} & \dots & \frac{\partial r_n(\theta)}{\partial(\theta_n)} \end{pmatrix}$$

$$[J(\omega^i)^T W J(\omega^i) + \lambda \text{diag}(J(\omega^i)^T W J(\omega^i))] h_{im} = J(\omega^i)^T W r(\omega^i)$$

$$\omega^{i+1} = h^i + v^i$$

Dans cette équation, λ représente un paramètre d'amortissement, fixé par le modélisateur. Ce paramètre est initialisé à une grande valeur afin que les premières itérations soient petites dans la direction du gradient de descente. Si les résultats d'une itération se révèlent être pires que les précédentes ($r(\theta + h) > r(\theta)$) alors λ est augmenté. Lorsque la solution s'améliore, λ est baissé et la recherche de la solution s'accélère jusqu'au minimum local. Cet algorithme est disponible dans les bibliothèques scientifiques de python en utilisant la fonction optimize.

3.2.2 Identification de paramètres

Une fois le jeu de paramètre optimal trouvé, il est possible de calculer la matrice de covariance tel que montré dans la relation ci-dessous.

$$V_p = [J^T W J]^{-1}$$

L'erreur de l'estimation sur les paramètres peut alors être calculée selon la relation suivante.

$$\sigma_p = \sqrt{\text{diag}[J^T W J]^{-1}}$$

L'intervalle de confiance pour chacun des paramètres peut alors être calculé de la manière suivante. T représente la statistique de student avec (n-p) degrés de liberté, n étant le nombre de points expérimentaux et p le nombre de paramètres du modèle.

$$\theta_i \pm \sigma_{pi} \cdot T_{1-\alpha}(n-p)$$

Afin de pouvoir effectuer une estimation de paramètre fiable, il est essentiel de respecter certaines hypothèses. En effet, les intervalles de confiance des paramètres ne peuvent être construits que si :

- Les résidus suivent une loi normale.
- Les résidus ont une moyenne nulle (pas de biais dans les mesures).
- Les résidus sont indépendants.

Ces vérifications peuvent être effectuées *a posteriori* de l'identification mais sont essentielles afin d'obtenir des valeurs de paramètres ayant un sens physique et un intervalle de confiance acceptable. Les étapes de l'identification de paramètres sont résumées dans le diagramme présenté ci-dessous. Si les paramètres sont mal estimés, il est possible de que des minima locaux aient été atteints lors de la régression non linéaire. Il est alors possible de borner les valeurs des paramètres afin de passer ces minima et atteindre le minimum réel du critère de régression. Il est également possible d'effectuer des nouvelles expériences afin de faire baisser la variance ou encore de modifier la structure du modèle développé. Les étapes relatives à l'identification des paramètres d'un modèle cinétique sont récapitulées dans la figure 15.

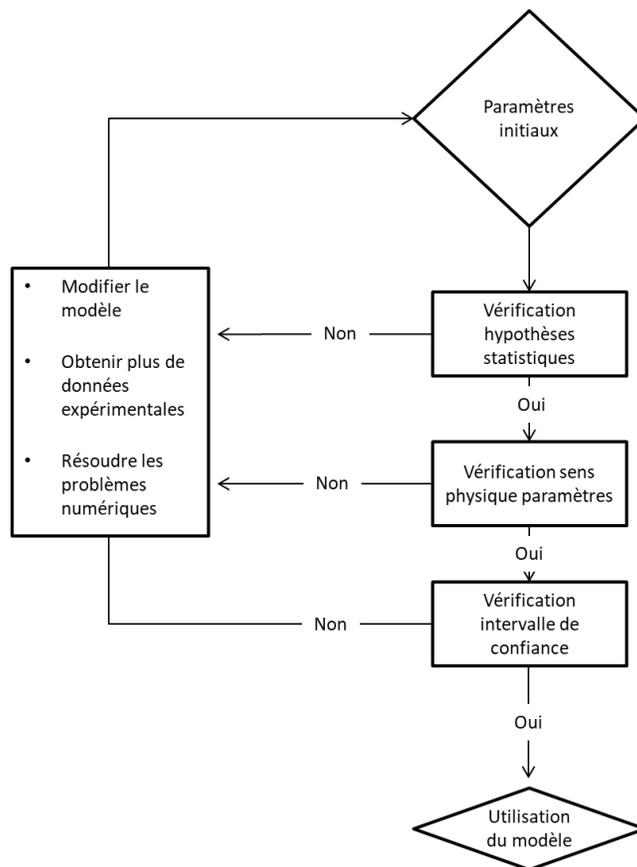


figure 15 : description de la méthode de développement des modèles cinétiques en bioprocédés.

L'indicateur « $\text{red-}\chi^2$ » représente l'ajustement des données simulées par rapport aux points expérimentaux. Si la valeur de l'indicateur est proche de un, alors le modèle est bien ajusté aux données. Si $\text{red-}\chi^2 \gg 1$ le modèle développé ne décrit pas correctement les points expérimentaux. Enfin si le $\text{red-}\chi^2 < 1$, alors le modèle est sur-paramétré et qu'il commence à décrire le bruit de fond des mesures.

3.2.3 Analyse de sensibilité

La connaissance de l'impact de chacun des paramètres sur les sorties du modèle permet de mieux comprendre l'influence de ces derniers sur les variables clés du procédé. Une étude de sensibilité vise à calculer pour chaque variable les dérivées partielles en fonction de chacun des paramètres du modèle selon la relation présentée sur l'équation 3-1 :

$$\text{équation 3-1 : } S_{\theta_j}^{x_i}(t) = \frac{\partial x_i(t)}{\partial \theta_j}$$

Pour un système d'équations avec $j = 1, \dots, p$ paramètres et $i = 1, \dots, n$ variables d'états une matrice composée de $n \times p$ valeurs de sensibilité est alors obtenue. Les valeurs de la matrice de sensibilité peuvent être calculées par la méthode de l'approximation des différences finies comme montré sur l'équation 3-2.

$$\text{équation 3-2 } S_{ij}(t) = \frac{x_i(p_j + \Delta p_j, t) - x_i(p_j - \Delta p_j, t)}{2\Delta p_j}$$

Dans le cas étudié, Δp_j a été fixé à 5 % de la valeur du paramètre. Cette valeur a été choisie arbitrairement afin de comprendre l'influence de la variation de 5% de chacun des paramètres sur les sorties du modèle. Il est à noter que d'autres méthodes existent afin de calculer la matrice de sensibilité comme le calcul des équation différentielles direct. Cette étude de sensibilité ne prend toutefois pas en compte la possible interaction entre les paramètres. Toutefois, ces interactions peuvent être fréquentes dans le cas des modèles décrivant les phénomènes biologiques.

Chapitre 3 : Modélisation de la fermentation Isopropanol Butanol Éthanol

1. Introduction

Comme précédemment mis en avant au cours de l'étude bibliographique, le procédé de fermentation discontinu a une faible productivité causée par l'accumulation de butanol à des concentrations inhibitrices pour la croissance de la bactérie. Bien que les procédés de fermentation continus soient mis en œuvre pour palier à ces inhibitions, la souche est facilement lessivée au cours de ce type de fermentation. Par conséquent, l'adsorption des bactéries sur un support peut être un moyen utilisé pour décorrélérer le temps de séjour de la bactérie du temps de séjour hydraulique appliqué au système.

Afin de maximiser la vitesse de croissance du biofilm, plusieurs stratégies de démarrage ont été testées. Certains auteurs ont choisi de faire circuler une culture en phase stationnaire dans les solides supports pendant 24 h (Yang et al. 2016). D'autres auteurs ont concentré une culture cellulaire par centrifugation avant ensemencement dans la colonne à lit fixe (Bankar et al. 2014). Enfin certains auteurs ont choisi d'effectuer des inoculations plus classiques (10% v/v) mais ont opéré le bioréacteur à fort taux de dilution et à pH fixé afin de favoriser la croissance de la souche. Cette stratégie est efficace mais dans cette configuration le biofilm met 9 jours à se développer sans produire de solvants. Toutefois, d'autres stratégies de démarrage ont été employées dans le domaine de la digestion anaérobie pour le traitement des eaux. Escudié *et al.* ont trouvé qu'une augmentation progressive du taux de dilution a permis la croissance d'un biofilm à l'échelle pilote tout en produisant du méthane (Escudié et al. 2011). Cette stratégie n'a jamais été testée au cours de la fermentation IBE à cellules immobilisée mais pourrait être adaptée pour la conduite d'un tel procédé.

Les modèles cinétiques sont utilisés pour décrire la fermentation ABE. Les modèles non structurés sont en général préférés pour la conception des procédés de fermentation alors que les modèles structurés sont utilisés pour la compréhension de la régulation des voies métaboliques chez *C. acetobutylicum*. Peu de modèles décrivent, dans la littérature la fermentation IBE. Les modèles développés pour la fermentation A/IBE à cellules immobilisées sont utilisés pour décrire la composition de la biomasse après maturation du biofilm et l'observation d'un état stationnaire. Or, bien que la croissance de la biomasse soit lente dans les bioréacteurs à lit fixe, sa concentration augmente au cours du temps et les états stationnaires ne sont pas toujours observés.

Au cours de l'étude décrite dans ce chapitre, des mousses en polyuréthane sont utilisées comme support de croissance pour le biofilm formé par *C. beijerinckii* DSM6423. Il est donc proposé

d'augmenter progressivement le taux de dilution appliqué au système afin de développer une nouvelle stratégie pour le démarrage des procédés de fermentation. Un modèle non structuré a été développé afin de décrire la cinétique de ce procédé de fermentation.

Pour établir un tel modèle, les paramètres cinétiques relatifs à la production des métabolites principaux, à la consommation en substrat ainsi qu'à la croissance de la souche ont tout d'abord été identifiés au cours d'expériences en batch. Deux nouveaux paramètres relatifs à l'attachement et au détachement de la biomasse du solide support ont ensuite été identifiés au cours d'une fermentation continue en cuve agitée effectuée avec le bioréacteur à biofilm. Tous les paramètres identifiés ont enfin été utilisés pour prédire la performance d'un bioréacteur colonne à lit fixe avec recirculation.

2 Développement du modèle batch pour la fermentation IBE

2.1 Démarche de modélisation.

L'objectif de la modélisation du procédé de fermentation à cellules immobilisées développé par IFPEN est de mieux comprendre les différents phénomènes qui influent sur la productivité volumique du procédé. La connaissance de la vitesse de croissance du biofilm au sein des supports poreux peut s'avérer essentielle afin de gérer au mieux la montée du taux de dilution lors des démarrages des expériences en lits fixes. Les modèles présentés dans ce chapitre ont plus spécifiquement les objectifs suivants:

- Décrire les cinétiques de production des métabolites principaux lors des fermentations en bioréacteurs à lit fixe en fonction de l'apport en substrat et du taux de dilution appliqué au système.
- Comprendre l'influence des paramètres procédés et biologiques sur la productivité du système.
- Optimiser la conduite et optimiser le schéma procédé de l'unité complète

Un modèle décrivant les cinétiques de production de la souche dans les fermenteurs à lit fixe, basé sur les bilans matières avec des paramètres aisément identifiables et interprétables, a donc été développé. Nous avons fait le choix d'utiliser un modèle cinétique non structuré. Les cellules dans ce système sont assimilées à une particule de composition moléculaire connue représentée par une seule variable. Pour l'établissement des bilans matières et du modèle cinétique nous avons considéré les hypothèses simplificatrices suivantes pour les procédés batchs ainsi que ceux à lit fixe :

- 1) Les bioréacteurs sont parfaitement mélangés
- 2) Le butanol est le produit inhibiteur principal produit par la souche étudiée

- 3) Le glucose est l'unique source de carbone limitante pour la croissance dans les expériences étudiées
- 4) Les cellules du biofilm ont la même composition moléculaire que les cellules en suspension
- 5) Le bioréacteur à lit fixe n'atteint pas d'états stationnaires due à la croissance continue du biofilm
- 6) Les réactions de diffusions ne sont pas considérées dans le système étudié

2.2 Description du modèle batch

2.2.1 Loi de croissance du microorganisme et consommation du substrat

La loi de croissance du microorganisme étudié est décrite comme une loi de Monod (Monod 1949) modifiée et comprenant un terme d'inhibition par le butanol (Ghose and Tyagi 1979). L'équation qui décrit le taux de croissance est présentée dans l'équation 2-1. La vitesse de production de biomasse est donnée par l'équation 3-2. La nomenclature relative aux paramètres et aux variables d'états du modèle sont disponibles dans l'Annexe 2 : Nomenclature pour la construction des modèles cinétiques de ce document.

$$\text{équation 2-1 : } \mu = \mu_{max} \cdot \left(\frac{S}{k_s + S} \right) \cdot \left(1 - \left(\frac{B}{B_{max}} \right) \right)$$

$$\text{équation 2-2 : } r_X = \mu \cdot X$$

Le glucose est la source de carbone limitante dans le milieu de culture et sa consommation est corrélée à la croissance de la bactérie comme montré dans l'équation 2-3.

$$\text{équation 2-3 : } r_S = \frac{-\mu \cdot X}{Y_{xs}}$$

2.2.2 Cinétique de production des métabolites

Le butanol et l'isopropanol sont produits pendant la croissance des bactéries et les cinétiques de production associées sont donc décrites par les équations 2-4 et 2-5.

$$\text{équation 2-4 : } r_B = r_X \cdot \left(\frac{Y_{but_s}}{Y_{xs}} \right)$$

$$\text{équation 2-5 : } r_I = r_X \cdot \left(\frac{Y_{i_s}}{Y_{xs}} \right)$$

Ces cinétiques suivent une loi de type Luedeking & Pirret. Ces derniers décrivent des cinétiques de production des métabolites associés à la croissance des bactéries. Cependant, selon leur modèle, une partie de la production de métabolites est décorrélée de la croissance. Dans le cas étudié dans cette thèse, les coefficients de production associés à la croissance de la bactérie sont

déterminés par le calcul des rendements une fois la phase stationnaire de croissance atteinte. Il est ainsi possible d'estimer la masse de solvants produite par la masse de bactéries nouvellement formée au cours de la croissance en batch. De plus, la production de métabolites non associée à la croissance n'a pas été observée. La production de solvants non associée à la croissance n'est donc pas représentée dans les équations de production du butanol et de l'isopropanol.

De la même manière, la production et la consommation de l'acide butyrique et de l'acide acétique sont modélisées avec une structure similaire. D'une part, la production des acides est associée à la croissance de la bactérie dans le bioréacteur. D'autre part, la consommation de ces deux composés est dépendante de la concentration en acétate et en butyrate dans le milieu de culture ainsi que de la vitesse de production d'isopropanol et de butanol, comme décrit chez Velázquez-Sánchez et al. (2019). Les cinétiques de production et de consommation de l'acétate du butyrate sont présentées dans les équations ci-dessous :

$$\text{équation 2-6 : } r_{AA-prod} = \alpha \cdot r_X$$

$$\text{équation 2-7 : } r_{AA-c} = r_I \cdot \frac{\left(\frac{AA}{AA+k_{AA}}\right)}{Y_{I/AA}}$$

$$\text{équation 2-8 : } r_{AB-prod} = \beta \cdot r_X$$

$$\text{équation 2-9 : } r_{AB-c} = r_B \cdot \frac{\left(\frac{AB}{AB+k_{AB}}\right)}{Y_{B/AB}}$$

2.2.3 Bilans matières

Un bilan matière sur les six variables d'état du modèle simplifié par le volume utile du réacteur étudié pour les cultures en mode batch est ensuite établi et est décrit dans les équation 2-10 à 2-15 présentées ci-dessous :

$$\text{équation 2-10 : } \frac{dX}{dt} = r_X$$

$$\text{équation 2-11 : } \frac{dS}{dt} = r_S$$

$$\text{équation 2-12 : } \frac{dB}{dt} = r_B$$

$$\text{équation 2-13 : } \frac{dI}{dt} = r_I$$

$$\text{équation 2-14 : } \frac{dAA}{dt} = r_{AA-prod} - r_{AA-c}$$

$$\text{équation 2-15 : } \frac{dAB}{dt} = r_{AB-prod} - r_{AB-c}$$

Le système présenté est composé de six variables d'états et de 13 paramètres à identifier afin de pouvoir simuler un tel système. Une démarche d'identification des paramètres du modèle a été réalisée afin d'obtenir le meilleur jeu de paramètres pour simuler le système d'équations.

2.3 Identification des paramètres de fermentation lors de la fermentation en batch

2.3.1 Identification des paramètres de la fermentation

Les paramètres du modèle ont été estimés en ajustant le modèle aux données obtenues lors d'une fermentation batch effectuée à 34°C et à pH non régulé. Deux séries d'expériences en batch ont été réalisées en triplicat avec des heures d'inoculations décalées de 13 h afin d'avoir une cinétique complète de la fermentation. Les résultats de l'identification des paramètres sont présentés dans le tableau 9. Ici, les paramètres relatifs à la production d'acides ont été estimés à partir de l'étude effectuée par Velázquez-Sánchez et al. (2019). Les autres paramètres ont été estimés grâce à l'algorithme de Levenberg (1944) et Marquardt (1963) afin de trouver le jeu de paramètres optimal qui minimise la somme du carré des écarts entre les données expérimentales et les données simulées.

tableau 9 : Valeurs des paramètres utilisées pour la simulation de la fermentation IBE en batch à 34°C et à pH libre.

Nom des paramètres	Valeur	Intervalle de confiance à 95%	Unités	Source
μ_{\max}	0,14	$\pm 0,004$	h^{-1}	Cette étude
Y_{xs}	0,14	$\pm 0,009$	$g.g^{-1}$	Cette étude
Y_{buts}	0,22	$\pm 0,01$	$g.g^{-1}$	Cette étude
Y_{es}	0,004	$\pm 0,006$	$g.g^{-1}$	Cette étude
Y_{is}	0,12	$\pm 0,01$	$g.g^{-1}$	Cette étude
k_s	3	$\pm 0,56$	$g.L^{-1}$	Cette étude
B_{\max}	6,9	$\pm 0,31$	$g.L^{-1}$	Cette étude
k_{AA}	0,10	$\pm 0,002$	$g.L^{-1}$	Cette étude
k_{AB}	0,74	$\pm 0,32$	$g.L^{-1}$	Cette étude
α	1	-	h^{-1}	(Velázquez-Sánchez et al. 2019)
β	0,5	-	h^{-1}	(Velázquez-Sánchez et al. 2019)
Y_{B_AB}	0,7	-	$g.g^{-1}$	(Velázquez-Sánchez et al. 2019)
YI_{AA}	1	-	$g.g^{-1}$	(Velázquez-Sánchez et al. 2019)

L'intervalle de confiance à 95 % des paramètres représente la probabilité de ces derniers de se trouver dans l'intervalle décrit. Lorsque les intervalles de confiance des paramètres sont faibles, les paramètres obtenus par la régression non linéaire sont bien identifiés. Dans le cas opposé, une forte variation du paramètre fait peut varier les valeurs de sortie du modèle. Dans le cas étudié, les paramètres estimés présentés dans le tableau 9 ont un intervalle de confiance faible au regard de leurs valeurs estimés (entre 2,5 % et 50,1 %), ce qui indique qu'ils sont relativement bien identifiés.

2.3.2 Résultat de la simulation et interprétation du modèle batch

Afin de visualiser les résultats obtenus par le modèle, les données simulées comparées aux valeurs expérimentales sont présentées sur la figure 16.

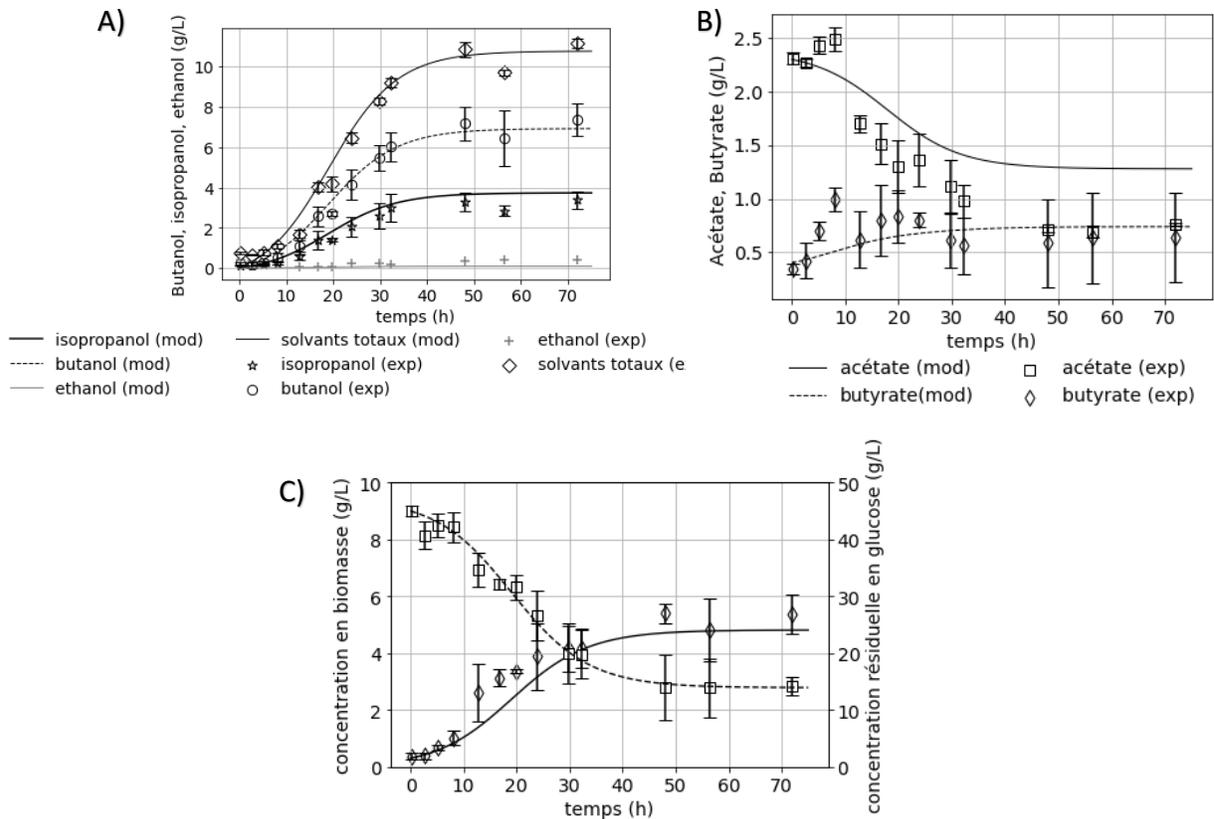


figure 16 : Résultats de la simulation réalisée avec les paramètres identifiés comparés aux données expérimentales obtenues lors d'une fermentation batch effectuée à 34°C et sans régulation du pH. A) Évolution de la concentration en isopropanol (étoiles blanches), butanol (ronds blancs) et en solvants totaux (losanges blancs) B) Évolution de la concentration simulée et expérimentale en acétate (carrés blancs) et butyrate (losanges blancs) C) Évolution de la concentration simulée et expérimentale en biomasse (losanges blancs) et glucose résiduel (carrés blancs) (n=3).

Le red- χ^2 a été calculé afin de représenter l'adéquation du modèle aux données expérimentales. Cet indicateur prend la valeur de 0,5 ce qui indique que les données simulées sont proches des données expérimentales. La figure 16 montre les résultats de la simulation du modèle comparés aux données expérimentales utilisées pour estimer les paramètres. Dans le cas de la production de solvants, le modèle s'ajuste bien aux données et parvient à décrire la dynamique de la fermentation batch au cours du temps (figure 16-A). Les concentrations en biomasse et en glucose résiduel sont également bien prédites par le modèle (figure 16-C). Un point d'amélioration concerne la production et la consommation de l'acide acétique et de l'acide butyrique montrées sur la figure 16-C. En effet la vitesse de consommation de l'acide acétique est sous-estimée au cours de la fermentation en batch. La production en acide butyrique, quant à elle, n'est pas bien estimée lors de la phase de croissance de la bactérie. Afin de confirmer la justesse du modèle, plusieurs vérifications ont été réalisées. Tout d'abord, un bilan sur le carbone a été effectué afin de vérifier que le modèle respecte les lois de conservations de la matière. Les hypothèses statistiques à vérifier afin d'effectuer le calcul des intervalles de confiances des

paramètres seront également détaillées. Une étude de sensibilité sur les paramètres du modèle a également été réalisée afin de comprendre l'impact de ces derniers sur les variables du procédé modélisé. Enfin, le modèle a été utilisé pour décrire une autre fermentation en batch avec des conditions initiales différentes afin de valider les paramètres identifiés.

2.4 Validation de l'identification des paramètres et du modèle

2.4.1 Bilan carbone

Un bilan sur le carbone a été établi pour vérifier le respect des lois de conservation de la matière. C'est-à-dire que le carbone consommé dans les substrats (sucres) correspond au carbone généré dans les produits (Biomasse, acides, alcool, CO₂). Le CO₂ émis n'étant pas mesuré au cours des expériences, il a été calculé de manière théorique en fonction de l'équation stœchiométrique du produit généré. La composition massique élémentaire de la biomasse de *C. beijerinckii* a été analysée dans les laboratoires SGS France après lavage de la biomasse avec une solution saline (NaCl 9 g.L⁻¹) et séchage à l'étuve à 105°C. Cette dernière est composée de la manière suivante : 47,1 ± 2,0 % C, 6,8 ± 0,05 % H, 26,3 ± 1,3 % O et 12,8 ± 0,3 % N. Les résultats du bilan carbone obtenus en batch sont présentés sur la figure 17.

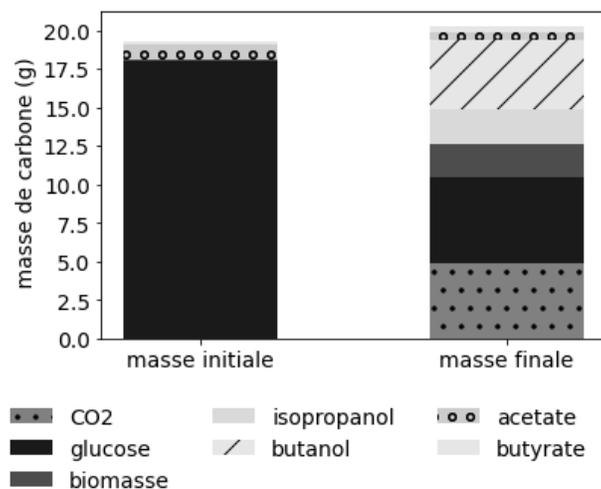


figure 17 : Graphique représentant la masse carbone répartie par métabolite de fermentation en début et en fin de fermentation en batch

Au total, 18,2 g de carbone étaient présents au début de la fermentation et 19,3 g ont été retrouvés à la fin de l'expérience. Le bilan s'élève donc à 106,1 % de carbone recouvert, ce qui est acceptable pour le système simulé. Le surplus de carbone simulé en fin de fermentation est probablement dû à la surestimation de la concentration en acétate modélisée comparée aux valeurs expérimentales.

2.4.2 Validation des hypothèses statistiques

Le calcul des intervalles de confiance pour les paramètres du modèle peut être effectué seulement si plusieurs hypothèses statistiques sont vérifiées. Les résidus du modèle doivent être homoscédastiques, c'est-à-dire que la variance observée soit la même pour chaque observation. Les résidus du modèle doivent également suivre une répartition normale et doivent être sans biais. Les graphes qui montrent les résidus ainsi que leurs adéquations à la loi normale sont présentés sur la figure 18.

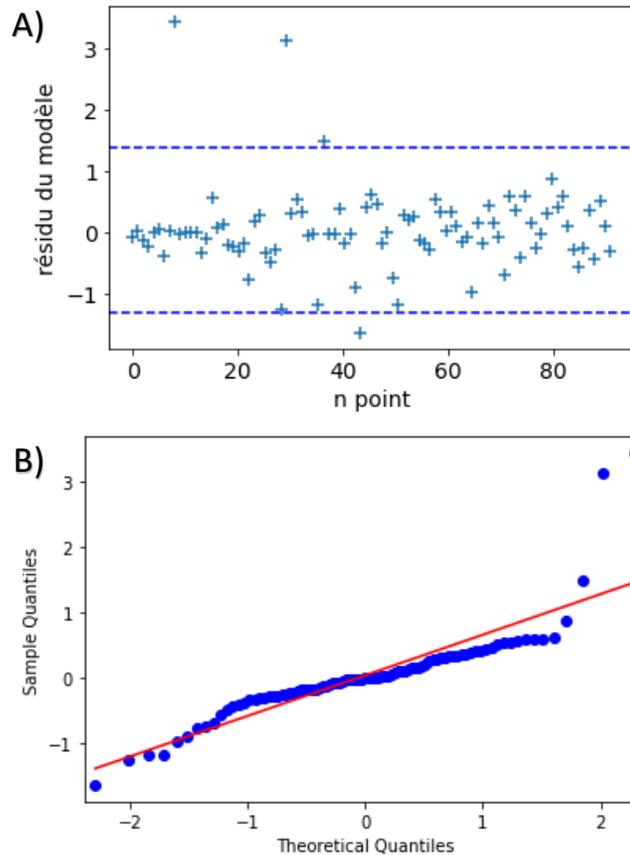


figure 18 : Validation statistique pour l'identification des paramètres cinétiques du modèle batch. A) écart entre données du modèle et points expérimentaux (croix bleues) et écart type des résidus (traits pointillés bleus). B) distribution des résidus en fonction des quantiles de la loi normale (qq-plot).

Dans le cas de la régression effectuée, les résidus sont bien homoscedastiques car l'erreur observée est constante tout au long des mesures faites au cours de l'expérience (figure 3-A). L'hypothèse de normalité est également vérifiée. En effet, comme montré sur la figure 18-B, la répartition des résidus suit une loi normale. Vu que les hypothèses statistiques sont vérifiées, alors les paramètres peuvent être utilisés pour la simulation d'autres expériences. Afin de vérifier la justesse du modèle développé, une autre expérience de fermentation en batch a donc été réalisée avec des conditions initiales différentes. Puis, les résultats obtenus ont été comparés avec les données obtenues par modélisation.

2.4.3 Validation expérimentale

Cette expérience a été réalisée à 34°C et à pH non régulé mais avec une concentration initiale en glucose et en acide acétique de 45 g.L⁻¹ et 3,5 g.L⁻¹, respectivement. Les concentrations en substrat, biomasse et métabolites mesurés ont été comparées aux données obtenues par simulation sur la figure 19.

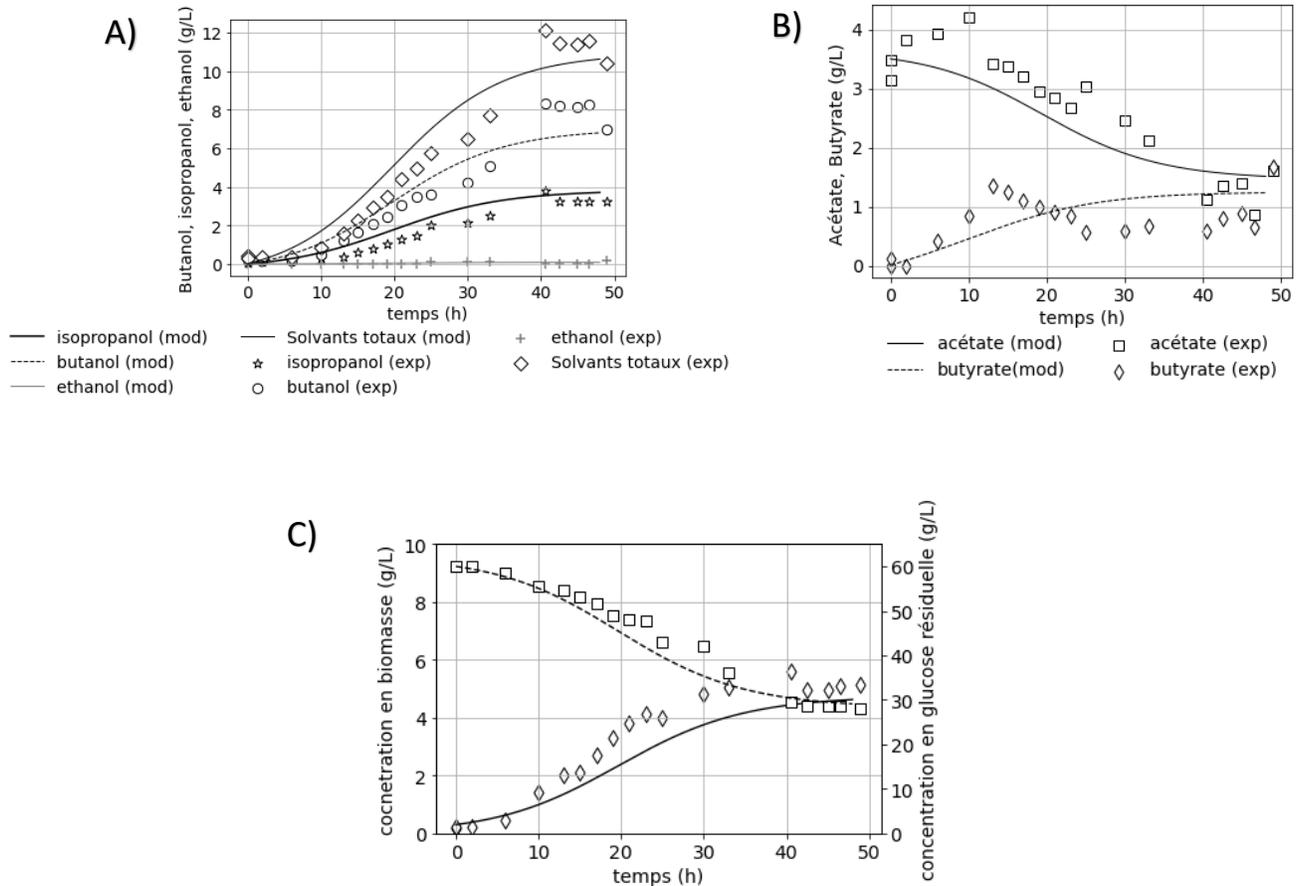


figure 19 : Validation des paramètres identifiés comparés aux données expérimentales obtenues lors d'une fermentation batch effectuée à 34°C et sans régulation de pH. A) Évolution de la concentration en isopropanol (étoiles blanches), butanol (ronds blancs) et en solvants totaux (losanges blancs) simulée et expérimentale B) Évolution de la concentration en acétate (carrés blancs), butyrate (losanges blancs) simulée et expérimentale C) Évolution de la concentration en biomasse (losanges blancs) et glucose résiduel (carrés blancs) simulée et expérimentale.

Sur cette figure, la dynamique de fermentation est correctement prédite par le modèle. La dynamique de production des solvants est représentée sur la figure 19-A. Les concentrations en butanol et en isopropanol mesurées expérimentalement commencent à augmenter à partir de la 10^{ème} heure de fermentation pour atteindre une concentration finale de 8 et 3,9 g.L⁻¹, respectivement. Le modèle proposé simule une augmentation de la production de solvants dès le début de la fermentation ce qui engendre un décalage entre valeurs simulées et valeurs expérimentales. Toutefois les concentrations finales sont bien simulées par le modèle à la fois pour le butanol (6,8 g.L⁻¹ simulé contre 8,1 g.L⁻¹ mesuré expérimentalement) et l'isopropanol (3,7 g.L⁻¹ simulé contre 3,2 g.L⁻¹ mesuré au cours de l'expérience).

D'après la figure 19-B, l'acétate commence à être consommé à partir de la 10^{ème} heure de fermentation. Sa concentration baisse jusqu'à atteindre 1,6 g.L⁻¹ après 50 h de fermentation. Le

modèle proposé simule une consommation de ce composé dès le début de la fermentation. De la même manière que pour les solvants, la concentration simulée finale est de $1,5 \text{ g.L}^{-1}$, ce qui est proche de la valeur mesurée expérimentalement ($1,6 \text{ g.L}^{-1}$). L'acide butyrique, quant à lui, est produit entre 0 et 11 h de fermentation. Sa concentration atteint $1,3 \text{ g.L}^{-1}$ après 12 h de fermentation puis baisse au cours du temps pour atteindre $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ à la fin de l'expérience. Le modèle ne parvient toutefois pas à simuler avec précision les phases de production puis de consommation de ce métabolite. La valeur finale de butyrate simulée est de $1,2 \text{ g.L}^{-1}$.

En ce qui concerne la consommation du glucose, elle est arrêtée après environ 48 h de fermentation (figure 20-C). La concentration en substrat atteint alors 28 g.L^{-1} . La dynamique de consommation du glucose est correctement décrite par le modèle et la concentration finale en glucose résiduel simulée est de $29,1 \text{ g.L}^{-1}$. Enfin, la concentration en biomasse augmente à partir de 5 h de fermentation, puis la croissance des cellules est ralentie à partir de la 20^{ème} heure de fermentation. La concentration totale en biomasse atteint $5,2 \text{ g.L}^{-1}$ après 48 h de fermentation. La dynamique de croissance est bien simulée par le modèle et la concentration en biomasse simulée finale atteint $4,6 \text{ g.L}^{-1}$. Toutes les vérifications valident que le modèle prédit bien les dynamiques de production des métabolites au cours de la fermentation étudiée. Le modèle ainsi que la valeur des paramètres sont ainsi validés.

2.5 Étude de sensibilité sur les paramètres

Afin de vérifier l'impact de chacun des paramètres sur les sorties du modèle, une analyse de sensibilité a été effectuée. Cette dernière consiste à calculer les dérivées partielles des variables du modèle pour chaque paramètre utilisé. Ces calculs ont été effectués à chaque pas de temps avec la valeur des paramètres précédemment identifiés. Ici les dérivées partielles ont été calculées numériquement grâce à la relation présentée dans la partie 3.2.2 du chapitre 2 de ce rapport.

Les résultats de l'analyse sont présentés sur la figure 20. Ces données servent à représenter l'impact de chaque paramètre sur chaque variable à tous les instants de la simulation. Les résultats du calcul indiquent à quel point les variables d'état du modèle sont modifiées pour un changement fixe de paramètre au cours du temps étudié.

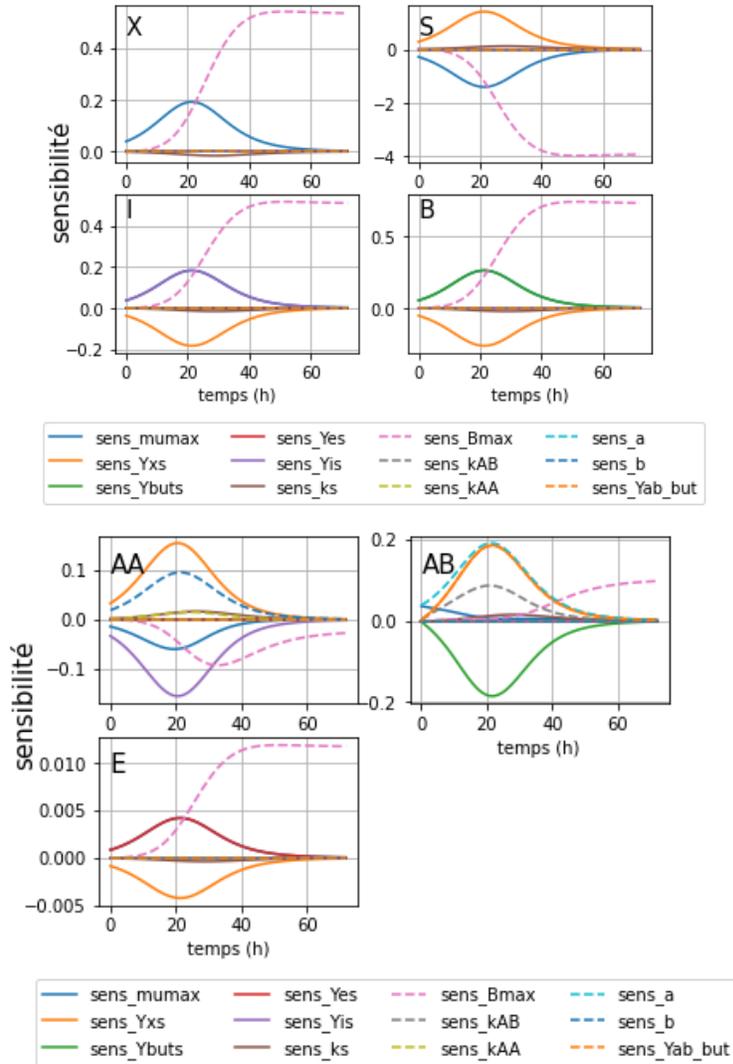


figure 20 : Étude de sensibilité sur chacune des variables d'état du modèle. X : biomasse en suspension, S : glucose résiduel, I : isopropanol, B : butanol, AA : acétate, AB : butyrate.

Le taux de croissance maximal « μ_{\max} » est le paramètre ayant le plus d'influence sur la consommation de substrat, la production de biomasse et de solvants. Le paramètre « Y_{xs} » qui représente la masse de substrat utilisée pour produire un gramme de biomasse est également un paramètre critique pour les métabolites produits. Sa variation a un impact positif sur la production d'acides mais un impact globalement négatif sur la production de solvants. De plus, la sensibilité pour le paramètre B_{\max} augmente en fin de fermentation car ce dernier a le plus d'effet sur les variables du modèle lorsque la concentration en butanol est élevée. La sensibilité des paramètres du modèle relatifs à la production de solvants (μ_{\max} , Y_{buts} , Y_{is} etc.) atteint son maximum après 20 h de fermentation en batch. Ces données indiquent que les variations de ces paramètres ont un impact majeur sur les variables de sorties observées après 20 h de fermentation en batch.

3 Construction du modèle à cellules immobilisées

Dans le cas de procédés de fermentation à lit fixe, l'accumulation de la biomasse au sein des solides supports peut prendre du temps et être influencée par de nombreux phénomènes tels que les propriétés des solides supports. Un modèle qui décrit l'accumulation de la biomasse au sein des solides supports ainsi que son détachement est proposé dans cette partie. Ce dernier permet de modéliser la dynamique de croissance du biofilm ainsi que son impact sur les performances du procédé de fermentation étudié.

Le bioréacteur à biofilm a tout d'abord été utilisé afin de connaître les cinétiques de formation du biofilm sur les mousses en polyuréthane. La concentration massique en solide support a été fixée à $7 \text{ g.L}_{\text{bioréacteur}}^{-1}$ pour la durée du test comme explicité dans la partie 1.4.2 de ce rapport. La vitesse d'augmentation du taux de dilution a été fixée à $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-2}$ tout au long de la durée du test suite à des essais préliminaires réalisés à IFPEN. L'objectif de cette augmentation continue est de garder une concentration en butanol inférieur au seuil inhibiteur et ainsi assurer une croissance optimale des cellules immobilisées. Ce premier essai a pour objectif d'estimer la valeur des paramètres cinétiques relatifs à l'attachement des cellules en suspension au solide support ainsi que le détachement des cellules du biofilm vers le milieu liquide.

3.1 Structure du modèle

3.1.1 Cinétique de consommation du substrat, et de production des métabolites et de la biomasse

Le modèle proposé différencie la biomasse en suspension présente dans le milieu liquide (X_s en g.L^{-1}) de la biomasse immobilisée (X_i en g.L^{-1}). Les vitesses de croissance suivent les mêmes cinétiques comme présenté dans les équations 3-1 et 3-2. Le taux de croissance, μ est le même que celui présenté dans l'équation 2-1. La nomenclature relative aux paramètres et aux variables d'états du modèle sont disponibles dans l'Annexe 2 : Nomenclature pour la construction des modèles cinétiques de ce document.

$$\text{équation 3-1 : } r_{X_i} = \mu \cdot X_i$$

$$\text{équation 3-2 : } r_{X_s} = \mu \cdot X_s$$

La vitesse à laquelle la biomasse est détachée du biofilm est considérée comme proportionnelle à la concentration en cellules immobilisées par volume utile de bioréacteur. La cinétique de détachement est décrite par l'équation 3-3. De même, la vitesse d'attachement, notée r_{at} , de la biomasse est considérée comme proportionnelle à la concentration en biomasse en suspension comme présenté sur l'équation 3-4.

$$\text{équation 3-3 : } r_{det} = k_d \cdot X_i$$

$$\text{équation 3-4 : } r_{at} = k_a \cdot X_s$$

Les cinétiques de productions des métabolites doivent alors prendre en compte les deux types de biomasses différentes au cours du temps. Par conséquent, les cinétiques de production des métabolites et de consommation des substrats sont de nouveau décrites dans les équations 3-5 à 3-11 ci-dessous.

$$\text{équation 3-5 : } r_s = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot \frac{1}{Y_{x,s}}$$

$$\text{équation 3-6 : } r_b = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot \frac{Y_{b,s}}{Y_{x,s}}$$

$$\text{équation 3-7 : } r_I = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot \frac{Y_{i,s}}{Y_{x,s}}$$

$$\text{équation 3-8 : } r_{AA-prod} = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot \alpha$$

$$\text{équation 3-9 : } r_{AA-c} = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot r_I \cdot \frac{\left(\frac{AA}{AA+k_{AA}}\right)}{Y_{I/AA}}$$

$$\text{équation 3-10 : } r_{AB-prod} = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot \beta$$

$$\text{équation 3-11 : } r_{AB-c} = (r_{Xi} + r_{Xs}) \cdot r_I \cdot \frac{\left(\frac{AB}{AB+k_{AB}}\right)}{Y_{B/AB}}$$

Ces cinétiques ont la même structure que celles présentées dans la partie 2.2.2 de ce chapitre. Les cinétiques ont ici été modifiées afin de prendre en compte de la présence des deux types de biomasse dans le système étudié.

3.1.2 Bilan matière

Le bilan matière sur les différents types de biomasses présentes à chaque moment de la fermentation est présenté dans les équations 3-12 et 3-13. Le bilan matière sur la biomasse est donc décrit de la même manière que celui proposé par Brück et al. (2020). Ici, la biomasse immobilisée (X_i), n'est pas sensible au taux de dilution mais est détachée du biofilm à la vitesse r_{det} .

$$\text{équation 3-12 : } \frac{dX_i}{dt} = r_{Xi} - r_{det} + r_{at}$$

$$\text{équation 3-13 : } \frac{dX_s}{dt} = r_{Xs} + r_{det} - r_{at} - D \cdot X_s$$

La consommation de glucose (équation 3-14) suit les mêmes cinétiques pour les cellules en suspension et les cellules du biofilm. Le bilan matière sur le glucose prend également en compte l'apport de substrat, noté S_f , au cours du temps.

$$\text{équation 3-14 : } \frac{dS}{dt} = -r_s + D \cdot (S_f - S)$$

De même, les cinétiques de production spécifique de l'acide acétique, l'acide butyrique, le butanol et l'isopropanol sont considérées égales pour les cellules du biofilm et les cellules en suspension. Les bilans matières pour ces composés sont décrits dans les équations 3-15 à 3-18. Il est à noter que de l'acétate est continuellement amené dans le bioréacteur. La concentration en acétate dans la bouteille d'alimentation est notée AA_f .

$$\text{équation 3-15 : } \frac{dB}{dt} = r_b - D \cdot B$$

$$\text{équation 3-16 : } \frac{dI}{dt} = r_I - D \cdot I$$

$$\text{équation 3-17 : } \frac{dAA}{dt} = r_{AA-prod} - r_{AA-c} + D \cdot (AA_f - AA)$$

$$\text{équation 3-18 : } \frac{dAB}{dt} = r_{AB-prod} - r_{AB-c} - D \cdot AB$$

3.1.3 Modélisation de l'augmentation du taux de dilution

Au cours de la fermentation en bioréacteur à biofilm, le taux de dilution a été augmenté de manière linéaire à $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-2}$ afin de garder une concentration en solvants stable au cours de l'expérience. Des expériences préliminaires ont permis d'estimer la croissance du biofilm au cours des 300 premières heures de fermentation dans les mousses en polyuréthane et ainsi proposer cette stratégie d'augmentation. Dans le but d'estimer ce dernier à tous les instants de la fermentation, une régression linéaire est effectuée à partir du taux de dilution mesuré au cours de l'expérience. L'équation de la régression est présentée ci-dessous :

$$\text{équation 3-19 : } D(t) = a \cdot t + b$$

Les paramètres de la régression sont présentés dans le tableau 10 et le coefficient de détermination calculé est de 0,99 ce qui indique une bonne estimation du taux de dilution par le modèle.

Une autre stratégie d'augmentation du débit a été implémentée lors des essais effectués avec le bioréacteur colonne. Le taux de dilution a également été augmenté en fonction de la

concentration en solvants mesurée en sortie comme indiqué dans le chapitre 2, partie 1.4.4. Le taux de dilution est alors plus complexe à modéliser. Par conséquent, une régression polynomiale de degrés 4 a été effectuée comme montrée dans l'équation 3-20. Le coefficient de détermination calculé pour la régression est de 0,97 et la valeur des paramètres est résumé dans le tableau 10.

$$\text{équation 3-20 : } D(t) = c \cdot t + d \cdot t^2 + e \cdot t^3 + f \cdot t^4$$

tableau 10 : valeur des paramètres pour l'estimation du taux de dilution au cours des fermentations continues à lit fixe

Parameters	Value
a	$2,0 \cdot 10^{-4}$
b	0,025
c	$-8,10^{-10}$
d	$1,0 \cdot 10^{-6}$
e	$-1,1 \cdot 10^{-4}$
f	0,05

3.2 Identification des paramètres liés à l'attachement et au détachement de la biomasse du biofilm

3.2.1 Identification des paramètres du modèle

Les paramètres estimés dans la partie 2 de ce chapitre ont été réutilisés pour prédire les cinétiques de fermentation. Les paramètres k_a et k_d ont été estimés par régression non linéaire afin de trouver le jeu de paramètres optimal décrivant les données observées. Les résultats de l'identification de ces deux paramètres sont montrés dans le tableau 11 ci-dessous.

tableau 11 : Valeur et intervalle de confiance des paramètres k_a et k_d estimés après régression non linéaire

Nom des paramètres	Valeurs	Intervalle de confiance à 95%	Unités
k_a	2,01	$\pm 0,54$	h^{-1}
k_d	0,072	$\pm 0,038$	h^{-1}

Les intervalles de confiance calculés sont faibles. Ce qui indique une bonne estimation des paramètres du modèle. Afin de vérifier les résultats de l'identification, les données simulées sont comparées aux données expérimentales sur la figure 21.

3.2.2 Résultats de la simulation

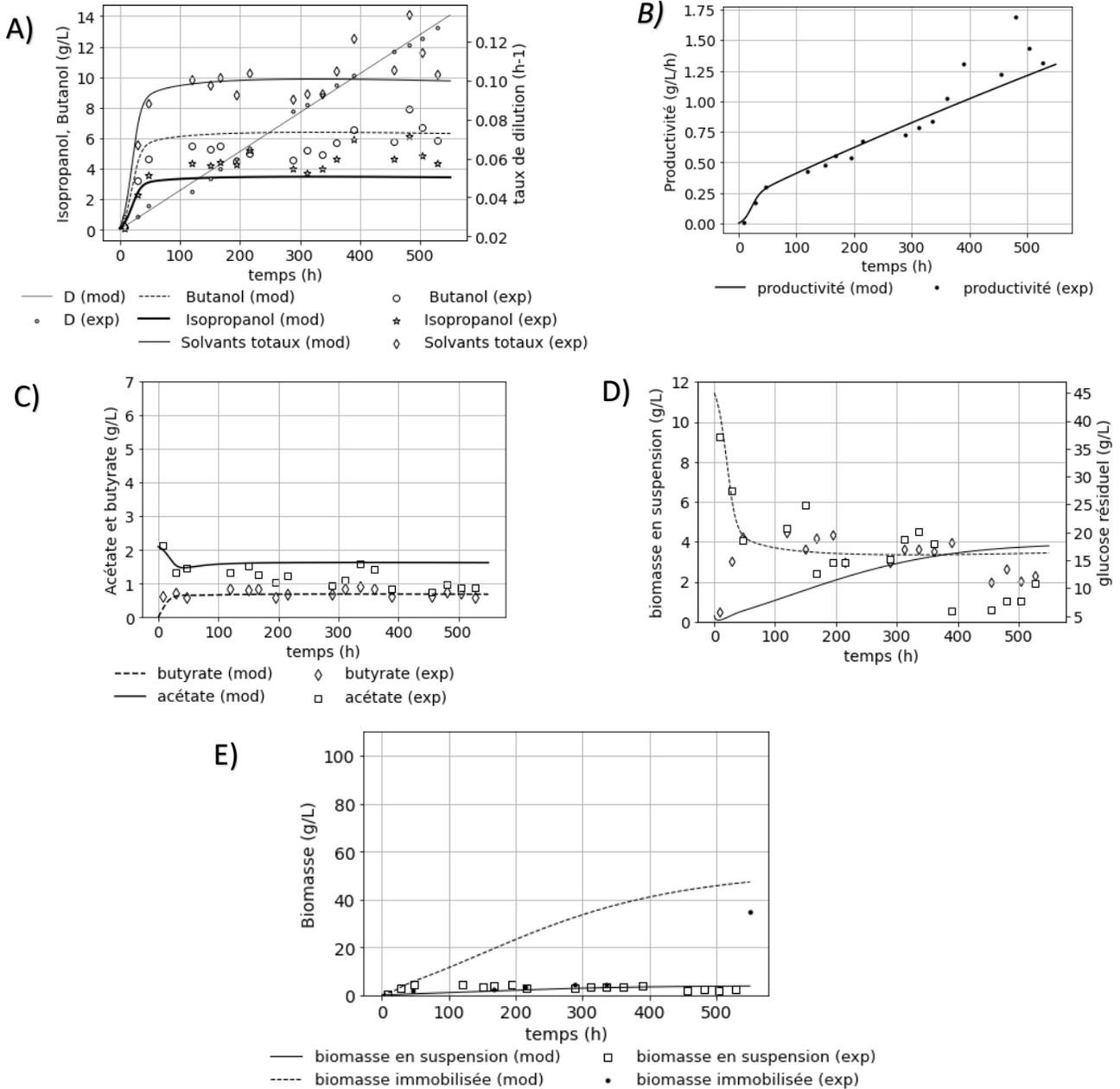


figure 21 : Cinétiques de la fermentation à cellules immobilisées modélisées comparées aux données expérimentales A) Évolution du taux de dilution (cercles et ligne continue), concentration en butanol (cercles blancs et trait pointillé), isopropanol (étoiles blanches et trait continu) et solvants totaux (losanges blancs et trait continu). B) Évolution de la productivité volumique expérimentale et simulée (points noirs et trait continu). C) Évolution de la concentration expérimentale et simulée en acétate (carrés blanc et trait continu) et en butyrate (losanges blancs et traits pointillés) D) Évolution de la concentration expérimentale et simulée en glucose (carré blanc et trait pointillé) et en biomasse en suspension (losange blanc et trait continu). E) Évolution de la concentration expérimentale et modélisée en biomasse en suspension (carrés blancs et trait continu) et biomasse immobilisée (ronds noirs et trait discontinus). La fermentation a été effectuée avec le bioréacteur à biofilm à 34 °C et sans régulation de pH.

Après l'inoculation du bioréacteur à biofilm, une période d'incubation en batch d'une durée de 8 h est respectée afin que les bactéries puissent adhérer aux mousses en polyuréthane. Le taux de dilution est fixé initialement à $0,03 \text{ h}^{-1}$ puis est continuellement augmenté à vitesse fixe ($2,0 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-2}$) afin d'atteindre $0,13 \text{ h}^{-1}$ après 550 h de fermentation (figure 21-A). Lors de l'essai, la concentration en butanol est restée stable à $5,5 \text{ g.L}^{-1}$ entre 72 et 336 h. La concentration de ce composé a ensuite augmenté d'environ 30 % après 350 h de fermentation jusqu'à atteindre $7,2 \text{ g.L}^{-1}$. La concentration en isopropanol a suivi la même dynamique que celle du butanol. La concentration de ce composé est restée stable à 4 g.L^{-1} entre 72 et 336 h de fermentation puis a augmenté jusqu'à atteindre 6 g.L^{-1} à 480 h de fermentation.

Cette hausse de la concentration en solvants à partir d'environ 350 h de fermentation pourrait être causée par une croissance rapide du biofilm au sein des mousses en polyuréthane disposées dans le bioréacteur. Au cours de l'expérience réalisée, la croissance du biofilm ne serait donc pas linéaire au cours du temps. Or, le débit d'alimentation en substrat doit être augmenté en suivant la croissance de ce dernier. Autrement, les solvants risquent de s'accumuler jusqu'à atteindre des concentrations toxiques comme observé après 350 h de fermentation.

La productivité volumique, montrée sur la figure 21-B, a continuellement augmentée car cette dernière suit la dynamique du taux de dilution tandis que les concentrations en solvants ont stagné puis augmenté. Le pic de productivité a été atteint après 480 h et est de $1,7 \text{ g.L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La productivité volumique maximale observée est sept fois plus grande que la productivité maximale du procédé batch décrit dans la partie 2.2.2.

Les résultats de l'expérience présentés sur la figure 21-C montrent que la concentration en acétate est stable et comprise entre $1,0 \text{ g.L}^{-1}$ et $1,5 \text{ g.L}^{-1}$ au cours de la fermentation étudiée. La concentration en butyrate a augmentée de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ à $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ pendant la durée de l'expérience. Les cellules en suspension connaissent une croissance lors des 72 premières heures de l'essai et atteignent la concentration de 4 g.L^{-1} . Puis cette concentration décroît au fur et à mesure de la fermentation pour être finalement diminuée de moitié par rapport à son niveau à 72 h pour atteindre 2 g.L^{-1} à 550 h de fermentation (figure 21-D). La concentration en glucose résiduel baisse au fur et à mesure de la croissance de la biomasse dans le bioréacteur et est comprise entre 15 et 20 g.L^{-1} . Après 340 h de fermentation, la consommation en glucose augmente et la concentration résiduelle en glucose est comprises entre 7 et 10 g.L^{-1} .

Le red- χ^2 est de 6,6 pour les données présentées sur la figure 21 ce qui indique que les données simulées décrivent bien les données expérimentales. Lorsque les paramètres identifiés lors des fermentations en batch sont utilisés les concentrations simulées en solvants et en acides sont proches des données lors des 350 h premières heures de fermentation. Après 350 h, les concentrations résiduelles en solvants mesurées expérimentalement augmentent malgré la

constante augmentation du taux de dilution. Cette augmentation n'est pas prise en compte par le modèle.

La concentration en biomasse immobilisée mesurée expérimentalement à 550 h de fermentation est de $35,3 \pm 0,8 \text{ g.L}^{-1}$ contre 47 g.L^{-1} simulée. L'écart est d'environ 30 % entre biomasse simulée et biomasse mesurée expérimentalement. Cet écart peut être causé par la simplicité du modèle développé. En effet, ce dernier ne prend pas en compte de nombreux paramètres qui peuvent influencer sur la formation du biofilm (hydrodynamique, propriétés des matériaux, etc). La biomasse en suspension simulée est, quant à elle, sous-estimée en début d'expérience ($0,5 \text{ g.L}^{-1}$ simulé contre $4,2 \text{ g.L}^{-1}$ simulé à 47 h de fermentation), puis de mieux en mieux estimée au fur et à mesure de la fermentation ($2,6 \text{ g.L}^{-1}$ simulé contre $2,6 \text{ g.L}^{-1}$ mesuré expérimentalement à 455 h de fermentation).

Les concentrations en butanol et isopropanol simulées sont proches de ce qui a été obtenu de manière expérimentale entre 0 et 350 h de fermentation. La concentration en isopropanol simulée est toutefois légèrement sous-estimée par rapport au modèle développé alors que celle en butanol simulée est surestimée. Le modèle ne parvient pas à décrire la hausse de la concentration en solvants totaux observée à partir de 450 h de fermentation. La concentration en glucose résiduel est également bien décrite par le modèle jusqu'à 350 h de fermentation avant d'être sûrement estimée par le modèle.

Ces résultats pourraient indiquer que la concentration en cellules immobilisée simulée est sous-estimée par rapport aux données expérimentales. Toutefois, cela ne semble pas être le cas lorsque les concentrations en cellules immobilisées simulée et expérimentales sont comparées (47 g.L^{-1} contre 35 g.L^{-1}). Une des hypothèses qui pourrait expliquer ce phénomène est que les productivités spécifiques des cellules du biofilm pourraient être différentes de celles des cellules en suspension. Ainsi, une première piste pour l'amélioration de ce modèle consisterait à vérifier si les paramètres Y_{xs} , Y_{buts} , Y_{is} et μ_{max} sont constants au cours du temps entre cellules en suspension et cellules immobilisées.

Afin de s'assurer de la justesse du modèle développé et des nouveaux paramètres identifiés, plusieurs vérifications doivent être effectuées. Un bilan carbone sur l'ensemble des composants du système doit être effectué pour vérifier que le modèle respecte bien les lois de conservation de la matière. Puis les hypothèses statistiques effectuées pour le calcul des intervalles de confiance des paramètres k_a et k_d doivent être vérifiées. Enfin, tous les paramètres identifiés sont utilisés pour simuler une expérience avec une stratégie de montée en débit plus complexe dans le but de valider le modèle. Toutes ces vérifications seront développées dans la partie suivante.

3.3 Validation du modèle

3.3.1 Bilan carbone

Afin de vérifier le respect des lois de conservation de la matière, un bilan massique sur le carbone a été effectué de la manière suivante. Ce bilan consiste à calculer la masse totale de carbone simulée apportée dans le bioréacteur au cours de la fermentation et de comparer à la masse totale simulée en sortie. Les fractions massiques en carbone de chaque composé ont donc été calculées.

La masse de carbone en entrée du système a été calculée à partir des concentrations en glucose et en acétate dans la cuve d'alimentation. Le débit de carbone en entrée est connu car le débit volumique peut être estimé à tous les temps de l'expérience selon l'équation 4-12. La somme de tout le carbone entré dans le système a été calculée de la manière suivante :

$$3-21 C_e = \int_0^t (mC_{glu_e} + mC_{acétate_e}) \cdot F(t) \cdot dt$$

- mC_{glu_e} : fraction massique du carbone qui compose le glucose en entrée à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $mC_{acétate_e}$: fraction massique du carbone qui compose l'acétate à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $F(t)$: débit volumique à l'instant t ($L \cdot h^{-1}$)

De la même manière, la masse de carbone en sortie du système a été calculée selon l'équation 3-22. Le CO_2 a été estimé de la même manière que dans la partie.2.4.1. à l'aide des équations stœchiométriques de production des différents métabolites.

$$3-22 C_s = \int_0^t (mC_{glu_s} + mC_{acétate_s} + mC_{Butanol} + mC_{isopropanol} + mC_{butyrate} + mC_{biomasse} + mC_{CO_2}) \cdot F(t) \cdot dt + mC_{biofilm}$$

- mC_{glu_s} : fraction massique du carbone qui compose le glucose en sortie à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $mC_{acétate_s}$: fraction massique du carbone qui compose l'acétate en sortie à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $mC_{butanol}$: fraction massique du carbone qui compose le butanol à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $mC_{isopropanol}$: fraction massique du carbone qui compose l'isopropanol à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $mC_{butyrate}$: fraction massique du carbone qui compose l'butyrate à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- $mC_{biomasse}$: fraction massique du carbone qui compose la biomasse en suspension à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$).
- mC_{CO_2} : fraction massique du carbone qui compose le CO_2 à l'instant t ($g \cdot L^{-1}$)
- $mC_{biofilm}$: fraction massique du carbone qui compose le biofilm en fin de fermentation (g).

- $F(t)$:débit volumique à l'instant t ($L.h^{-1}$)

Au cours du procédé, la biomasse s'accumule dans le bioréacteur. La masse de carbone retenue dans le réacteur a donc été calculée puis ajoutée au bilan en sortie. Le bilan carbone peut alors s'écrire de la manière suivante :

$$\text{équation 3-23 } \mathbf{Bilan} (\%) = \frac{c_e}{c_s} \cdot 100$$

Le résultat du bilan carbone est présenté sur la figure 22. Au total 283,7 g de carbone est amené dans le bioréacteur et 303,1 g de carbone en sort. Le pourcentage de carbone recouvré est ainsi de 93,6 %.

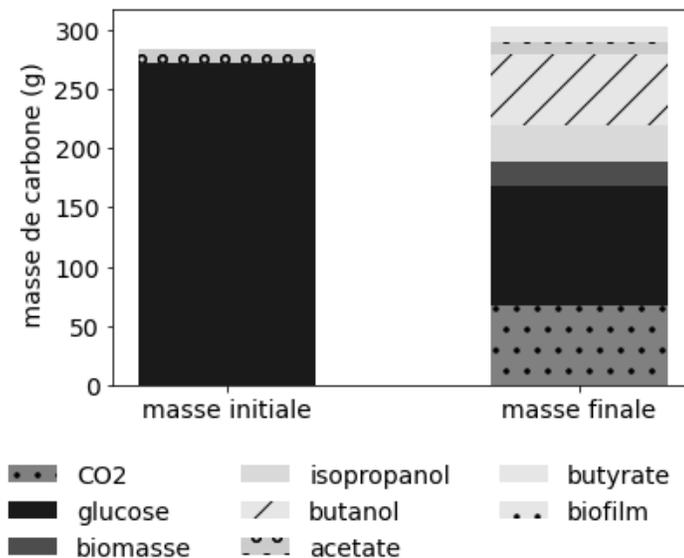


figure 22 : Masse carbone répartie par métabolite de fermentation en apportée au système et sortie du système au cours d'une fermentation continue à cellules immobilisée.

Le bilan carbone simulé indique que le modèle respecte les lois de conservation de la matière et peut être utilisé pour décrire les procédés de fermentation à lit fixe. Toutefois, les hypothèses statistiques effectuées afin de calculer les intervalles de confiance des paramètres k_a et k_d identifiés à l'aide des données décrites dans la partie 3.2 doivent être validées.

3.3.2 Validation des hypothèses statistiques

Pour rappel, ces hypothèses statistiques sont au nombre de trois : L'homoscédasticité, la répartition normale des résidus ainsi que l'absence de biais dans les résidus.

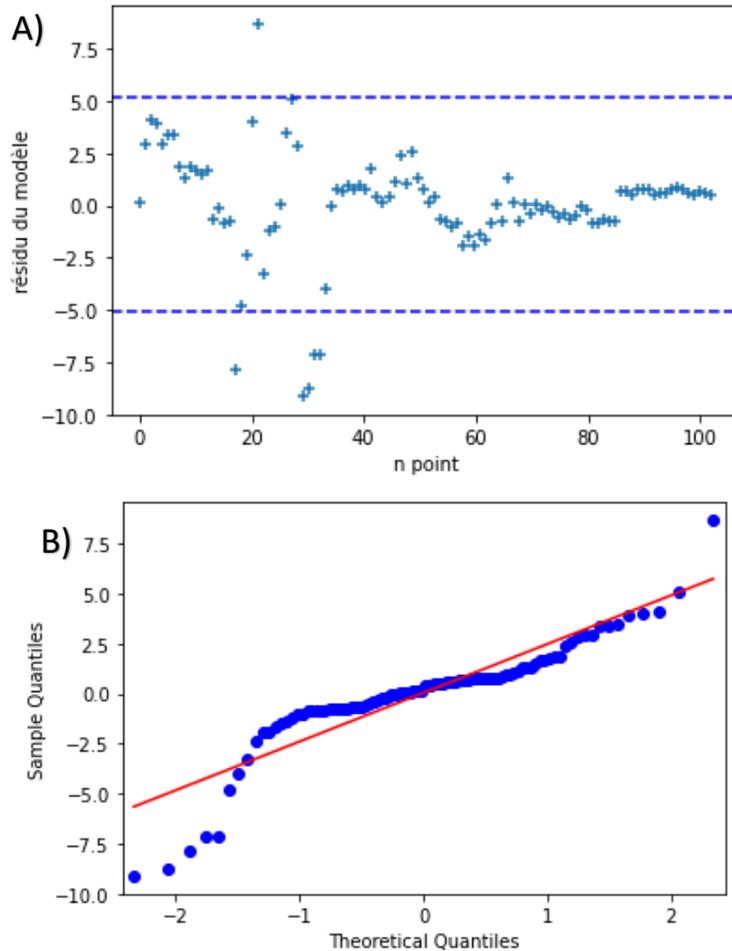


figure 23 : Validation statistique pour l'identification des paramètres cinétique du modèle de fermentation à cellules immobilisées. A) écart entre données du modèle et points expérimentaux (croix bleues) et écart types des résidus (traits pointillés bleus. B) distribution des résidus en fonction des quantiles de la loi normale (qq-plot).

Sur la figure 23-A, il est montré que les résidus sont homogènes. Sur la figure 23-B, il est montré que ces derniers suivent une répartition normale bien qu'une partie des résidus soit éloigné des quantiles prédits. Les hypothèses statistiques pour l'identification des deux paramètres sont donc acceptées.

3.3.3 Validation expérimentale

Afin de valider les paramètres estimés, une autre expérience de fermentation continue a été réalisée. Cette dernière a été effectuée dans une colonne lit fixe avec des concentrations en solide support égale à celle effectuée dans le bioréacteur à biofilm.

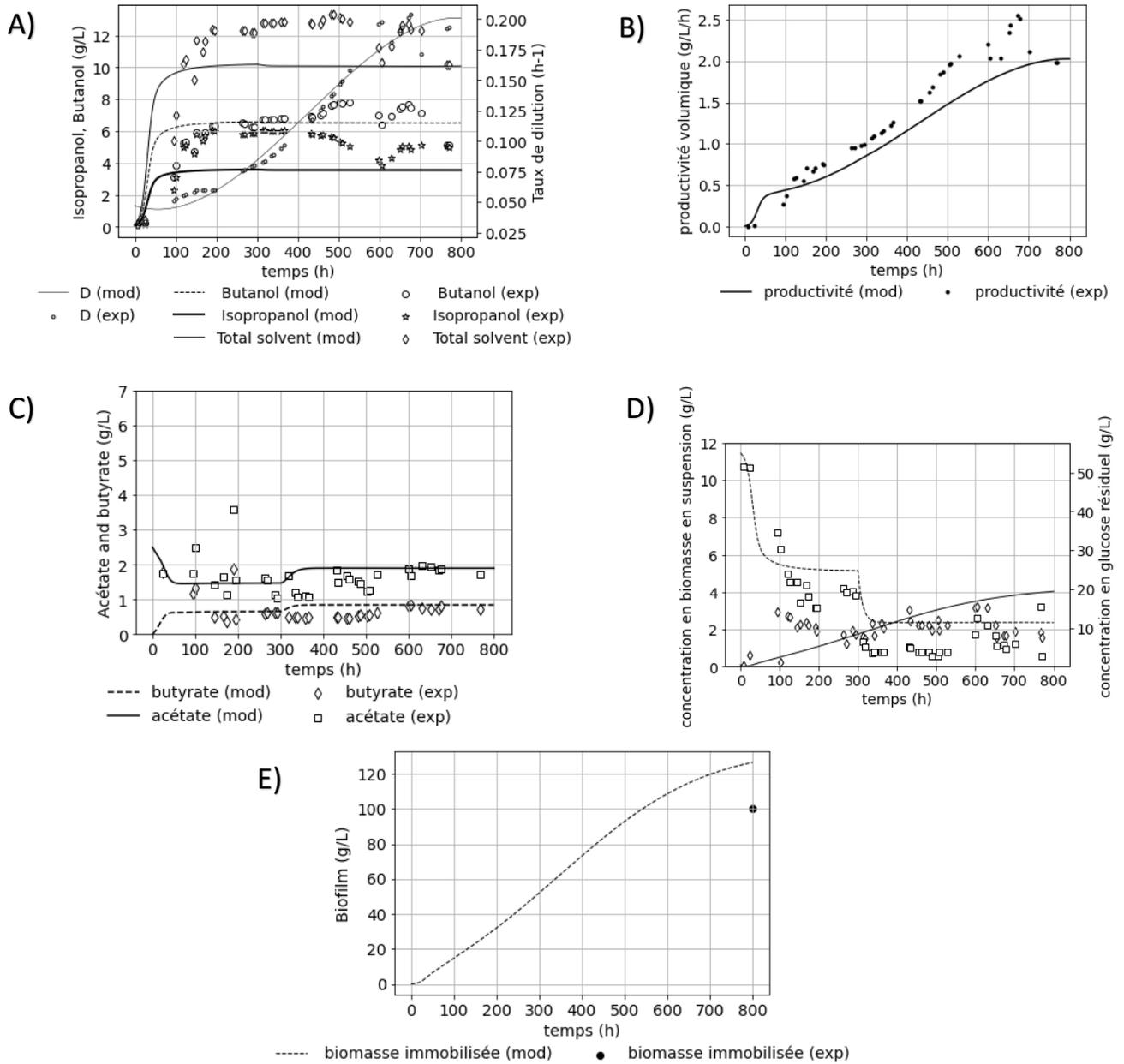


figure 24 : Évolution des données modélisées comparées aux données expérimentales pendant une fermentation avec le bioréacteur à colonne effectuée à 34 °C et sans régulation de pH. A) Évolution du taux de dilution (cercles et ligne continue) et de la concentration en butanol (cercles blancs et trait pointillé), isopropanol (étoiles blanches et trait continu) et solvants totaux (losanges blancs et trait

continu). B) Évolution de la productivité volumique expérimentale et simulée (points noirs et trait continu). C) Évolution de la concentration en acétate (carrés blanc et trait continu) et en butyrate (losanges blancs et traits pointillés) expérimentale et simulée D) Évolution de la concentration en glucose (carré blanc et trait pointillé) et en biomasse en suspension (losange blanc et trait continu) expérimentale et simulée. E) Évolution de la biomasse immobilisée expérimentale et modélisée (ronds noirs et trait discontinus).

Cette fois ci une stratégie de montée en débit différente a été testée. En effet, comme montrée dans la partie 3.2.2, une augmentation de débit linéaire peut entraîner une trop forte accumulation de solvants dans le bioréacteur. Par conséquent, le débit volumique a été augmenté en fonction de la concentration en butanol mesurée en sortie de réacteur, comme explicité dans la partie 1.4.4 du chapitre 2. Les résultats de cette stratégie de conduite ainsi que ceux obtenus lors de la simulation effectuée avec le modèle sont présentés sur la figure 24.

Les résultats expérimentaux de la stratégie de montée du débit ainsi que les concentrations en solvants obtenues sont présentés sur la figure 24-A. Le taux de dilution simulé est proche de celui observé expérimentalement ($R^2 = 0,97$). La concentration en solvants totaux augmente au fur et à mesure de l'expérience et atteint 12 g.L^{-1} après environ 200 h de fermentation. Cette concentration reste ensuite stable tout au long de l'expérience de fermentation malgré l'augmentation continue du taux de dilution. Toutefois, la concentration en solvants est 20 % plus élevée que lors de l'expérience présentée dans la partie 3.2.2 de ce chapitre (12 g.L^{-1} contre 10 g.L^{-1}). De plus, les rendements en butanol et en isopropanol ne sont pas constants au cours de l'expérience. En effet, le rendement en butanol augmente de $0,16 \text{ g.g}^{-1}$ à $0,22 \text{ g.g}^{-1}$ à partir de la 450^{ème} heure de fermentation. Le rendement en isopropanol, quant à lui, décroît et passe de $0,16 \text{ g.g}^{-1}$ à $0,13 \text{ g.g}^{-1}$ à partir de la 450^{ème} heure de fermentation. Cependant le rendement en solvants totaux reste quant à lui globalement stable au long de l'expérience (entre $0,31$ et $0,36 \text{ g.g}^{-1}$)

Le procédé a été simulé avec les paramètres préalablement identifiés lors des procédés batch et de l'expérience présentée dans la partie 3.2.2 de ce chapitre. La concentration en solvants simulée est sous-estimée d'environ 20 % par rapport aux données expérimentales tout au long de l'expérience. De plus, la structure du modèle proposé ne prend pas en compte d'éventuels changements de rendements au cours du procédé. Ainsi un écart important est observé entre le modèle proposé et les données expérimentales obtenues, plus particulièrement entre 100 h et 400 h de fermentation.

Les productivités volumiques simulées et expérimentales sont présentées sur la figure 24-B. Sur cette figure, la productivité volumique augmente de manière constante entre 0 et 500 h de fermentation. Cette dernière atteint un plateau après 500 h de fermentation et stagne autour de $2,0 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ entre 500 et 800 h de fermentation. Un pic de productivité de $2,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ est atteint à 650 h de fermentation. Toutefois, la productivité volumique simulée est sous-estimée par

rapport aux données expérimentales. En effet, bien que le taux de dilution soit bien estimé, la concentration en solvants simulée est sous-estimée par rapport aux données réelles d'où cette répercussion sur la productivité volumique simulée ce qui explique l'erreur du modèle.

Les concentrations en acides sont présentées sur la figure 24-C. La concentration en acétate mesurée au cours de la fermentation diminue de moitié de 2 g.L^{-1} à 1 g.L^{-1} entre 24 h et 350 h de fermentation. À partir de 350 h de fermentation, cette dernière augmente jusqu'à atteindre de nouveau 2 g.L^{-1} après 800h de fermentation continue. La concentration en butyrate augmente continuellement de $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ à $0,85 \text{ g.L}^{-1}$ entre 150 h et 800 h de fermentation. Les résultats de la simulation décrivent bien ces mêmes dynamiques de production et de consommations de ces deux acides au cours de l'expérience.

La concentration en glucose baisse entre 0 h et 120 h, puis se stabilise vers 20 g.L^{-1} jusqu'à 300 h de fermentation (figure 24-D). Après 300 h de fermentation la concentration en glucose dans la nourriture d'alimentation est changée et passe de 60 g.L^{-1} à 45 g.L^{-1} , ce qui entraîne une baisse de la concentration en glucose résiduel en sortie de bioréacteur. Cette dernière est alors stable jusqu'à la fin de l'expérience et atteint 5 g.L^{-1} . La concentration en glucose résiduel simulée sur la figure 24-D est surestimée d'environ 20 % tout le long de la fermentation bien que le changement de concentration en glucose dans la nourriture soit bien pris en compte par le modèle.

L'évolution de la concentration en biomasse en suspension est également présentée sur la figure 24-D. La concentration en cellules en suspension est multipliée par 10 entre 0 et 100 h pour passer de $0,3$ à 3 g.L^{-1} . La concentration en cellules en suspension reste ensuite stable entre 2 et 3 g.L^{-1} jusqu'à la fin de la fermentation. La biomasse simulée est sous-estimée en début de fermentation (3 g.L^{-1} mesuré expérimentalement contre $0,5 \text{ g.L}^{-1}$ simulé à 100 h de fermentation), puis surestimée à la fin de l'expérience (2 g.L^{-1} mesuré contre 4 g.L^{-1} simulé à 800 h de fermentation).

La mesure de la masse de cellules immobilisées sur les mousses en polyuréthane a été effectuée à la fin de l'expérience. Cette dernière est comparée avec la dynamique de croissance du biofilm sur la figure 24-E. La concentration en biomasse totale modélisée est surestimée d'environ 20 % par rapport à la masse de biofilm mesurée expérimentalement (120 g.L^{-1} contre 100 g.L^{-1}). Toutefois l'erreur de l'estimation de la masse finale de biofilm est comparable avec celle obtenues lors de l'estimation des paramètres 3.2.2 de ce chapitre.

Le $\text{red-}\chi^2$ est de 12,4 ce qui indique que le modèle ne décrit pas les données expérimentales de manière satisfaisante. En effet l'erreur entre le modèle et l'expérience pour la concentration en solvants est importante. Toutefois, la dynamique de production est, quant à elle, globalement bien décrite. Les paramètres k_a et k_d , bien qu'identifiés de manière satisfaisante, ne sont certainement pas fixes au cours de la fermentation. En effet, le détachement du biofilm peut dépendre de nombreux facteurs, notamment des taux de cisaillement causés par l'agitation. De

la même manière, l'attachement des cellules au biofilm n'est vraisemblablement pas linéaire. Ces deux paramètres pourraient être complexifiés afin de mieux décrire les fermentation IBE à lit fixe.

3.4 Étude de sensibilité sur les paramètres du modèle à cellules immobilisées

Afin de mieux comprendre l'impact de chaque paramètre sur chaque variable d'état simulée par le modèle, une analyse de sensibilité sur les paramètres a été réalisée. Cette dernière vise à faire varier la valeur de chacun des paramètres de 5 % et mesurer la variation de chacune des variables d'états en sortie. Cette analyse permet de comprendre quels paramètres peuvent avoir une influence sur le procédé de fermentation.

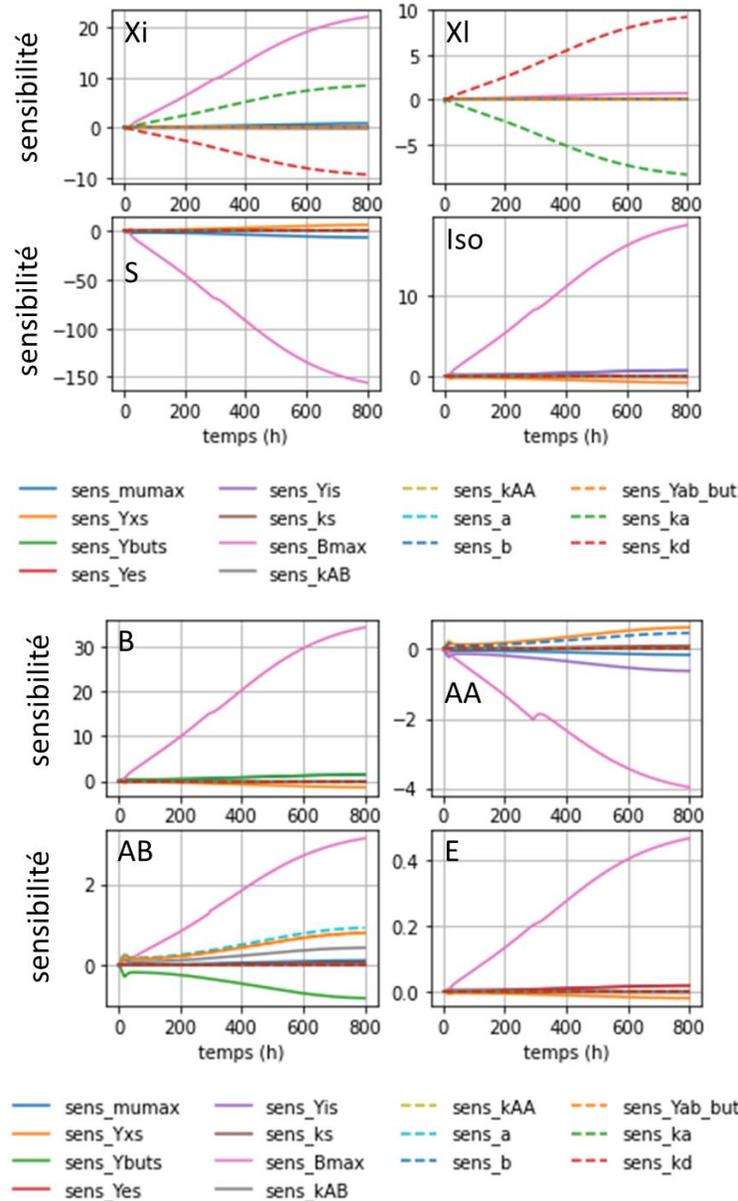


figure 25 : Étude de sensibilité sur chacune des variables d'état du modèle Xi : biomasse immobilisée, Xs : biomasse en suspension, S : glucose résiduel, I : isopropanol, B : butanol, AA : acétate, AB : butyrate, E : éthanol

Les résultats de l'analyse de sensibilité sont présentés sur la figure 25. Les paramètres B_{max} et k_{a} influent de manière positive sur la concentration en cellules immobilisée au fur et à mesure du temps. De la même manière, le taux de décrochage k_{d} va également avoir un impact plus important que les autres paramètres sur la concentration en biomasse immobilisée dans le bioréacteur. Contrairement à l'analyse de sensibilité effectuée sur le modèle batch présentée dans la partie 2.5, le taux de croissance μ_{max} a peu d'influence sur la croissance de la biomasse immobilisée et en suspension. Le paramètre B_{max} a beaucoup d'influence sur les concentrations

en biomasse immobilisée, substrat, acides et solvants. Ces résultats indiquent que les performances du procédé continu à lit fixe sont influencées par l'inhibition de la souche vis-à-vis des solvants produits.

Le modèle développé ne prévoit pas d'effet de saturation du support, mais il existe vraisemblablement un seuil de concentration en biomasse immobilisée élevée pour laquelle la vitesse de décrochement du biofilm est égale à la croissance de ce dernier. Il est théoriquement possible d'atteindre un état stationnaire, même si ce n'est pas ce qui a été observé expérimentalement dans le cas étudié. Le modèle pourrait donc être amélioré. Il pourrait en effet prendre en compte les phénomènes de diffusion dans l'épaisseur du biofilm formé sur les solides supports. Des modèles plus ségrégués pourraient être développés, prenant en compte les vraisemblables différences de productivités spécifiques entre biomasse immobilisée et biomasse en suspension.

4 Conclusion

Au cours de ce chapitre une stratégie innovante de démarrage de bioréacteurs à lit fixe appliquée à la fermentation IBE a été mis en œuvre. Cette dernière consiste à augmenter le taux de dilution du système de manière continue afin de maintenir une concentration résiduelle en solvants en dessous du seuil inhibiteur. Cette stratégie est efficace pour favoriser la croissance du biofilm tout en produisant des solvants au cours de la fermentation. En effet, la productivité maximale ($2,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) est obtenue après environ 600 h de fermentation continue en utilisant le glucose comme substrat. Cette valeur est comprise entre celles obtenues par Yang et al. (2016) ($1,03 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et Survase et al. (2013) ($4,5 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Ces deux auteurs ont employé des lits fixes composés de solides supports différents (pulpe de bois et anneaux de céramique) de ce qui a été utilisé dans cette thèse. La quantité de supports placés dans le système, ainsi la surface spécifique disponible par volume utile de bioréacteur varient selon les supports employés. Ces paramètres pourraient expliquer une partie des différences de productivité maximales obtenues entre les études de ces deux auteurs et la nôtre. De plus, la vitesse de croissance des biofilms formés peut dépendre de nombreux facteurs (taux de cisaillement, mode de conduite du procédé, concentration en solvants etc). Chacune de ces études a employé un système propre dont de nombreux facteurs peuvent ainsi expliquer la différence de productivité obtenue par rapport aux résultats obtenus dans cette thèse.

La mise en place de cette stratégie nécessite toutefois de connaître la dynamique de croissance du biofilm au sein des matériaux supports utilisés pour l'immobilisation cellulaire. En effet, la vitesse de production des solvants est alors dépendante de la concentration en biomasse active dans le bioréacteur. Le taux de dilution appliqué au système doit alors être augmenté au fur et à mesure de la croissance du biofilm.

Les paramètres relatifs à l'attachement des cellules aux mousses en polyuréthane ont été identifiés au cours d'une fermentation continue effectuée avec le bioréacteur à biofilm. Ces deux derniers paramètres permettent de décrire la croissance du biofilm lors de cette expérience. Lors de la validation des paramètres propres aux biofilms, une erreur globale de 20 % est observée entre productivité prédite et productivité expérimentale. De la même manière, la biomasse finale prédite est surestimée d'environ 20 % par le modèle comparé à la biomasse immobilisée expérimentale.

Ainsi, plusieurs aspects du modèle pourraient être améliorés. Les paramètres relatifs à l'attachement et au détachement de la biomasse dépendent de nombreux facteurs. La vitesse d'attachement peut par exemple varier en fonction de la surface de solide déjà colonisée ainsi que les propriétés physico chimiques des supports étudiés (Krsmanovic et al. 2021). La vitesse de détachement du biofilm peut être influencée par l'épaisseur du biofilm mais également par les conditions d'agitation du bioréacteur (Saur et al. 2017). Tous ces phénomènes pourraient être pris en compte pour l'élaboration d'un modèle plus complexe décrivant mieux la fermentation en lit fixe.

L'activité de la biomasse pourrait également baisser au fur et à mesure de la fermentation à cause de l'accumulation de débris cellulaires, de substances polymériques extracellulaires ou de spores bloquées dans les couches du biofilm. La biomasse non productive peut en effet représenter jusqu'à 90% de la masse totale d'un biofilm (Qureshi et al. 2005). Ainsi la productivité spécifique du biofilm dépendrait à la fois de la concentration en butanol dans le bioréacteur ainsi que du temps. Afin de mieux comprendre comment ces derniers phénomènes pourraient agir sur le procédé, la viabilité des cellules du biofilm formé sur les mousses en polyuréthane doit être caractérisée et suivi au cours de la fermentation. Par conséquent, deux approches complémentaires ont été développées et sont présentées dans le chapitre suivant.

Chapitre 4 : Caractérisation du biofilm formé par *Clostridium beijerinckii*

1. Introduction

Au cours du chapitre précédent, il a été montré que le modèle développé pour simuler la dynamique de croissance du biofilm surestimait la concentration en biomasse immobilisée d'environ 20 % par rapport aux données expérimentales. La composition de la biomasse n'est vraisemblablement pas homogène au sein des biofilms formés. En effet, les biofilms sont constitués à la fois de cellules et d'une matrice de polymères appelés EPS pour « *Extra Polymeric Substances* ». Cette substance représente entre 50 % et 90 % en masse des biofilms et est composée de protéines, de polysaccharides et de d'ADN extracellulaire (Vu et al. 2009). Les modèles décrits ne prennent pas en compte l'accumulation de cette substance, ce qui pourrait poser un problème pour estimer la concentration en biomasse totale au cours de la fermentation.

Pour pallier ce problème, le modèle peut se baser sur la vitesse d'accumulation des cellules viables dans les mousses en polyuréthane. En effet, la productivité volumique du procédé dépend de la concentration en cellules, et plus particulièrement en cellules actives. Or très peu d'études se sont focalisées sur l'étude de la croissance des biofilms au sein des solides supports pour les procédés de fermentation IBE à lit fixe (Zhang et al. 2021). En effet, ce phénomène peut se dérouler pendant plusieurs jours, voire plusieurs semaines et nécessite l'emploi d'outils bien particulier pour étudier la dynamique de colonisation du support par le biofilm mais aussi pour distinguer les cellules viables des cellules mortes et des EPS.

Dans ce contexte, deux méthodes ont été développées afin de suivre la croissance des biofilms. D'une part, des analyses ont été effectuées par microscopie confocale afin de comprendre la répartition des cellules et des EPS au sein des mousses en polyuréthane au cours de la fermentation à lit fixe. Un marqueur spécifique des glycanes qui composent les polysaccharides des EPS, la conacavoline A, a été employé afin de mieux suivre la production de ces derniers au cours des fermentations à cellules immobilisées. Différentes stratégies d'étude de la viabilité compatibles avec l'emploi de ce type de microscopie ont également été mises au point afin de mieux comprendre les dynamiques de formation du biofilm étudié. D'autre part, la cytométrie en flux, couplée à l'emploi de cFDA (un marqueur d'activité estérasiqque intracellulaire) ainsi et de IP (un indicateur d'intégrité membranaire) a été utilisée afin d'analyser la quantité de cellules totales, actives et mortes des suspensions cellulaires et des biofilms. Toutefois, pour effectuer cette analyse, les cellules du biofilm doivent être détachées du solide support. Une méthode permettant de remettre les cellules en suspension, tout en minimisant les biais liés au traitement a donc été développée. Cette méthode couple un traitement par agitation mécanique avec l'emploi d'enzymes afin d'hydrolyser certains EPS du biofilm sans altérer la viabilité des cellules qui le compose.

2. Caractérisation du biofilm par microscopie confocale

A l'instar de la cytométrie en flux, la microscopie confocale peut être couplée à des sondes chimiques fluorescentes afin de visualiser des phénomènes liés à la viabilité cellulaire. Par exemple, l'iodure de propidium peut être utilisé comme indicateur de l'intégrité membranaire des cellules alors que le SYTO™9 est utilisé afin d'illuminer toutes les cellules présentes dans le milieu de fermentation.

2.1 Caractérisation du biofilm dans les mousses en polyuréthane

Des premières analyses ont été effectuées afin de comprendre comment les cellules du biofilm se répartissent au sein des mousses étudiées. Le bioréacteur à biofilm développé par BioSurfaceTechnologies (CDC, Montana, États-Unis^o) a été utilisé afin de pouvoir prélever des supports au fur et à mesure de leur colonisation par les bactéries (figure 10). Des coupons d'un diamètre de 12,7 mm et d'une épaisseur de 3,8 mm, découpés dans de la mousse en polyuréthane, ont été placés dans les barreaux du bioréacteur puis insérés dans la platine du bioréacteur. Le taux de dilution a été fixé à $0,03 \text{ h}^{-1}$ tout au long de l'expérience. Cette dernière a duré 330 h afin d'assurer le développement complet d'un biofilm.

L'objectif de ces premiers tests est de comprendre la dynamique de colonisation du support poreux utilisé pour la croissance du biofilm ainsi que de visualiser son organisation (répartition des cellules totales par rapport aux EPS). Après prélèvement, les mousses en polyuréthane ont été plongées dans des solutions contenant du SYTO™9 (ThermoFischer, Waltham, MS, États-Unis), un marqueur de l'ADN intercellulaire, ainsi qu'une lectine, la conacavaline A (Biotium, San Francisco, CA, États-Unis). Cette dernière marque les résidus α -D-mannosyl, α -D-glycosyl et glycane des polysaccharides composant la matrice extracellulaire des biofilms. Les deux sondes ont été incubées en mélange pendant 10 minutes à l'obscurité. Les mousses contenant le biofilm marqué sont ensuite analysées par microscopie confocale dont les résultats des analyses sont présentés sur la figure 26-A.

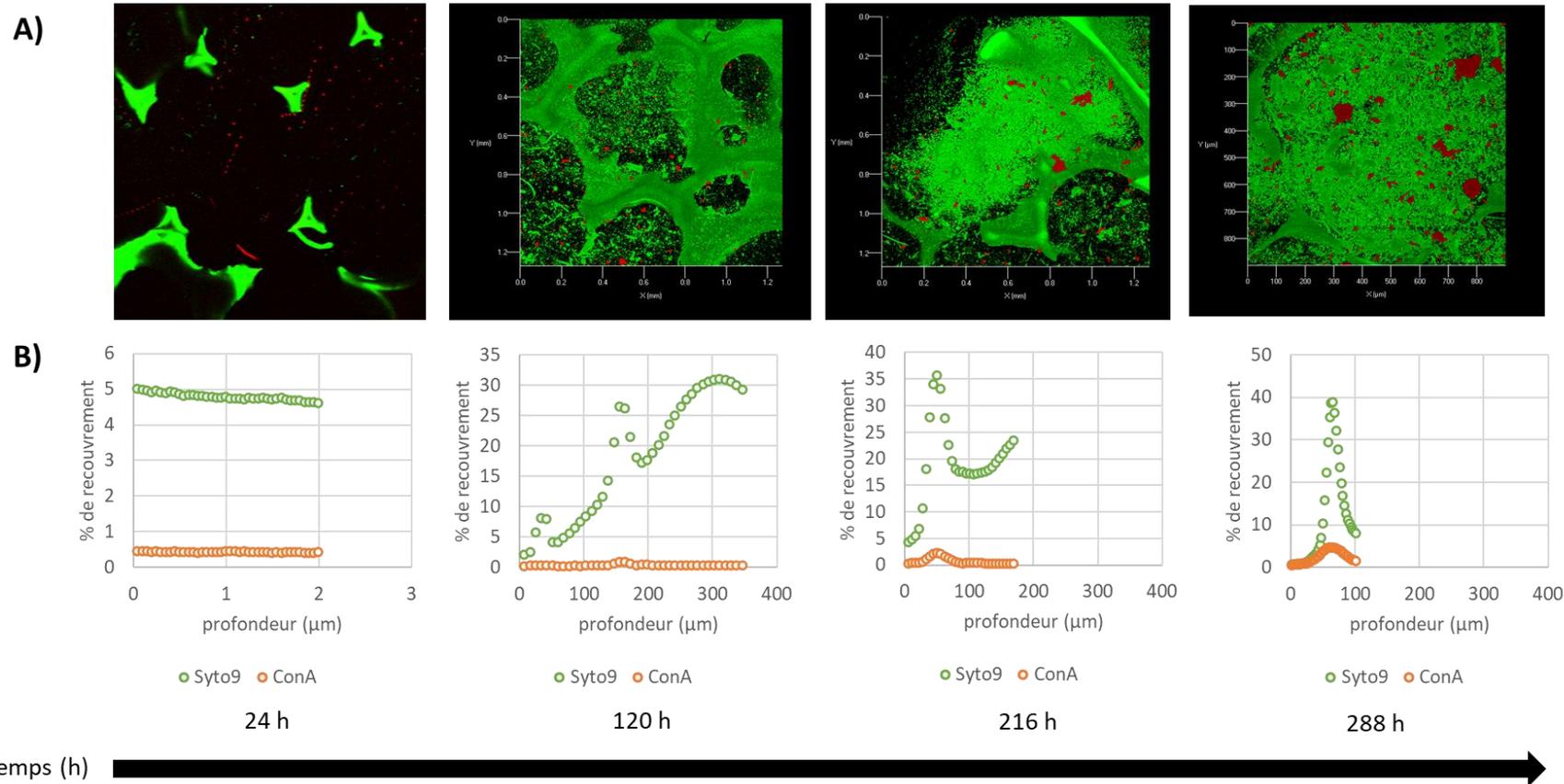


figure 26 A) Reconstruction d'images 3D obtenues après analyse par microscopie confocale du biofilm formé par *C. beijerinckii* au cours d'une fermentation continue avec immobilisation cellulaire (grossissement x 100). Les échantillons ont été traités avec un mélange de Syto 9 (vert), marqueur des cellules totales ($\lambda_{excitation} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{émission} : 495\text{-}536 \text{ nm}$), combiné avec de la conacavoline A (rouge), marqueur des polysaccharides composant les EPS ($\lambda_{excitation} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{émission} : 550\text{-}600 \text{ nm}$). Sur les microphotographies prises à $t = 24\text{h}$, seule la mousse en polyuréthane est visible à cause de son auto-fluorescence. B) Analyse du pourcentage de l'image recouverte par la fluorescence du Syto 9 et de la conacavoline A en fonction de la profondeur analysée au cours de la fermentation à cellules immobilisées.

Afin de mieux visualiser la répartition des différents éléments marqués en fonction de la profondeur observée, une analyse d'image a été réalisée en utilisant le logiciel image J (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, États-Unis). La surface de l'image recouverte par chaque canal de fluorescence correspondant aux différentes sondes fluorescentes a été calculée. Chaque canal d'acquisition a été converti en image binaire à l'aide d'une méthode automatique de seuillage. Le pourcentage de surface recouverte par chacun des canaux a ensuite été calculé grâce à la fonction « *analyze particule* » du logiciel. L'opération a été répétée pour toutes les images prises pour la réalisation de la « coupe optique » aussi appelée Z-stack.

Sur la figure 26 il est montré que, au cours des premières 24 h, un élément géométrique fluorescent est détecté par microscopie. Il pourrait s'agir de la mousse en polyuréthane employée comme support du biofilm. Cependant, aucune cellule ne semble adsorbée sur la surface du solide. Afin de confirmer que le solide est autofluorescent, une analyse du support en microscopie confocale sans ajout de sondes fluorescentes et sans présence de biofilm a été réalisée et est présentée sur la figure 27. Les mêmes motifs sont alors observés, ce qui confirme que le solide support émet de la fluorescence aux longueurs d'ondes utilisées lorsque que ce dernier est analysé à l'aide d'un laser avec une excitation à 488 nm.

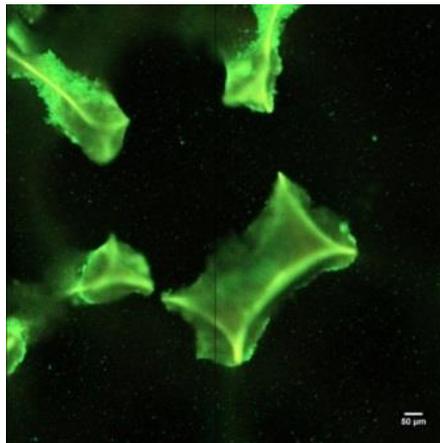


figure 27 : Photographie prise au microscope confocale à balayage laser d'une mousse en polyuréthane (grossissement x200 - $\lambda_{excitation} = 488 \text{ nm}$ - $\lambda_{émission} = 495-536 \text{ nm}$)

À partir de 120 h de fermentation, les espaces dans les pores commencent à être colonisés par des cellules (figure 26-A). Toutefois, la formation d'un biofilm dense n'est pas encore observée. Le résultat des analyses de recouvrement de surface, disponible sur la figure 26-B, montrent que, à partir de 120 h de fermentation, des cellules sont détectées en profondeur (jusqu'à 350 μm) dans la mousse en polyuréthane. De plus, moins de 1% de la surface analysée est alors marquée par la conacavaline A. Des cellules sont donc présentes dans l'épaisseur du support analysé et plus la profondeur augmente, plus les bactéries occupent de surface (de 8 % à 30 μm de profondeur et jusqu'à 30 % à 300 μm de profondeur).

À partir de 216 h de fermentation, des structures cellulaires denses marquées en vert ainsi que des EPS sous forme d'agrégats colorés en rouge sont observés au sein du biofilm formé sur les microphotographies présentées sur la figure 26-A). L'analyse de recouvrement en fonction de la profondeur étudiée montre que de la fluorescence est détectée jusqu'à 200 μm de profondeur bien que le pic de recouvrement (35 %) par les cellules soit détecté à environ 50 μm de profondeur.

Enfin, à 288 h de fermentation, la concentration cellulaire est très importante à l'entrée des pores de la mousse. La majorité des cellules détectées se trouvent entre 50 μm et 100 μm de profondeur. Ce phénomène pourrait être causé par le bouchage progressif des pores de la mousse par le biofilm.

En début de fermentation, les cellules peuvent diffuser librement au sein des pores de la mousse. Cependant au fur et à mesure de la colonisation de ce support, des gradients de concentration en substrat et en produit peuvent apparaître au sein du solide support (Raganati et al. 2016; Olivieri et al. 2011). Ces gradients pourraient engendrer une concentration cellulaire plus importante aux emplacements où l'accès au substrat est le plus aisé, c'est à dire à l'entrée des pores. Cette même accumulation des cellules à l'entrée des pores pourrait bloquer l'accès au substrat des cellules situées plus en profondeur dans la mousse. Par conséquent, de moins en moins de cellules sont observées à des profondeurs supérieures à 100 μm après 288 h de fermentation. De plus, les graphiques présentés sur la figure 26-B montrent également que le pourcentage de surface recouverte de polysaccharides extracellulaires tend à augmenter au cours de la fermentation. Ces polysaccharides sont détectés aux mêmes profondeurs que les maximums de recouvrement pour les cellules. Ces résultats mettent en lumière que la production d'EPS et la densité cellulaire sont corrélées.

Ces résultats sont cependant à nuancer, vu que les analyses n'ont pu être menées que jusqu'à 350 μm de profondeur dans les mousses en polyuréthane alors que les coupons de mousse ont une épaisseur de 3,8 mm ainsi qu'une porosité ouverte. De plus, le biofilm formé est très lâche et se disperse facilement lors des marquages avec les sondes fluorescentes et pendant l'observation, ce qui engendre systématiquement une perte de matériel au cours de l'analyse. Cette perte peut même s'avérer problématique lorsque le biofilm n'est pas encore bien développé. Enfin, le support utilisé pour la croissance du biofilm est auto-fluorescent dans les conditions d'analyses utilisées. Ce phénomène gêne l'analyse de la répartition des cellules dans la profondeur des mousses car la fluorescence des mousses est aussi prise en compte lors des analyses.

Ces observations ont toutefois permis de mieux connaître la part de polysaccharides qui composent le biofilm et à quel moment ces derniers apparaissent au cours d'une fermentation continue à biofilm. Toutefois, un des paramètres les plus utiles pour la conduite de procédé de

fermentation étant l'étude de la répartition entre cellules mortes et actives au sein du biofilm formé, de nouvelles analyses ont été réalisées après 200 h de fermentation continue à biofilm.

2.2 Analyse de viabilité

La répartition des cellules viables peut donner une information importante afin d'optimiser les performances du procédé de fermentation par le choix d'un solide support adapté à la colonisation des bactéries. Au cours des prochains paragraphes, des mesures de viabilité ont été menées à l'aide de différentes techniques afin de caractériser au mieux ce phénomène sur les biofilms matures formés par *C. beijerinckii*.

2.2.1 Utilisation du kit baclight et du cFDA

Un premier marquage combinant SYTO™9 et IP a été réalisé sur les mousses en polyuréthane après 200 h de fermentation continue. Les détails de cette méthode sont présentés dans le chapitre 2 partie 2.3.1. Le marqueur Syto™ 9 (émission entre 498 et 550 nm) pénètre dans toutes les cellules tandis que l'iodure de propidium (émission entre 600 et 700 nm) ne pénètre que dans les cellules dont la membrane est altérée. Les cellules qui fluorescent en vert sont donc viables tandis que celles qui fluorescent en rouge sont considérées mortes. Les résultats de ces analyses sont montrés dans les figure 28-A et figure 28-B.

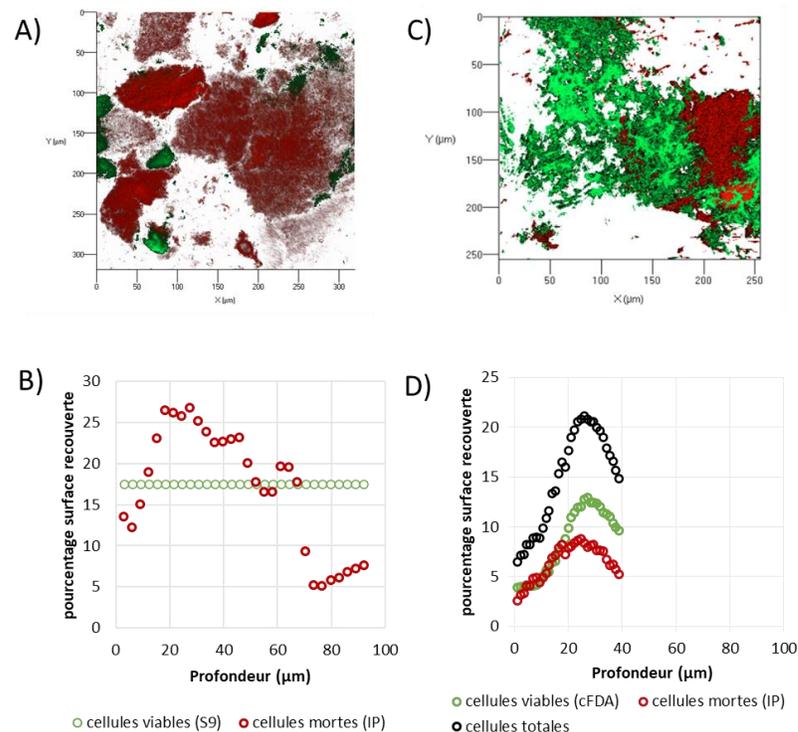


figure 28 : Analyse de viabilité par microscopie confocale (grossissement x250) effectuée sur un biofilm de *C. beijerinckii* formé sur mousse en polyuréthane après 200 h de fermentation continue. A) marquage de viabilité avec le SYTO 9™ (vert) et l'IP (rouge) B) Analyse de la surface de champ recouvert par les différents canaux utilisés après marquage au SYTO9™ et à l'IP en fonction de la profondeur du biofilm

analysé C) marquage de viabilité avec le cFDA (vert) et l'IP (rouge) D) Analyse de la surface de champ recouvert par les différents canaux utilisés après marquage au cFDA et à l'IP en fonction de la profondeur du biofilm analysé.

Ces deux sondes combinées sont efficaces afin de discriminer les cellules mortes des cellules totales, et ont été employées au cours de différentes études en microscopie confocale pour analyser la viabilité de nombreux biofilms (Chen and Chang 2010; Collins et al. 2010; Danielsen et al. 2014). Comme observé sur la microphotographie présentée sur la figure 28-A et prise après 200 h de fermentation, le biofilm observé semble réparti sur le support de manière hétérogène. En effet, des blocs de cellules sont marqués à l'iodure de propidium ou au SYTO™9 et les cellules ne forment pas une couche homogène sur les mousses. Une analyse du pourcentage de surface recouverte par chacune des sondes dans la profondeur du biofilm étudié a été réalisée et est présentée sur la figure 28-B. Cette analyse révèle que la proportion de biofilm marqué par le SYTO™9 reste constante tout le long de la profondeur (17,5 % de surface recouverte sur 100 µm).

Lorsque le biofilm issu du même bioréacteur que celui préalablement analysé est marqué avec un indicateur de l'activité estérasiq ue intracellulaire (cFDA) combiné à de l'IP, un résultat différent est obtenu. En effet, comme montré sur la figure 28-C, la répartition des cellules viables au sein de la mousse en polyuréthane semble aussi hétérogène que celle observée sur la figure 28-A. Cependant, l'analyse de la répartition de la viabilité dans la profondeur montre que le pourcentage de surface recouverte par les éléments marqués au cFDA n'est pas constant le long de la profondeur du biofilm. En effet, la densité des cellules viables du biofilm augmente le long de la profondeur jusqu'à atteindre 13 % de surface recouverte à 30 µm de profondeur, puis décroît progressivement jusqu'à atteindre 8 % à 40 µm de profondeur.

Les marquages au cFDA et IP permettent d'analyser plus finement la viabilité cellulaire dans la profondeur du biofilm formé dans les mousses en polyuréthane. En effet, le SYTO™9 comme l'IP se lie à l'ADN des cellules afin d'émettre de la fluorescence. Toutefois, la matrice de certains biofilms peut contenir de grandes quantités d'ADN extracellulaire (Flemming and Wingender 2010; Okshevsky and Meyer 2015). L'emploi du cFDA permet d'éviter de détecter ces ADN extracellulaires et d'analyser uniquement les cellules viables en fonction de leur activité estérasiq ue intracellulaire. Toutefois, le contremarquage à l'IP possède *in fine* les mêmes problèmes que le SYTO™9 vis-à-vis du marquage de l'ADN extracellulaire.

Pour conclure, l'étude du développement du biofilm formé par *C. beijerinckii* par microscopie confocale a permis de mieux comprendre comment le biofilm se développe et se répartit au sein des mousses en polyuréthane lors des fermentations continues à cellules immobilisées. Toutefois, les informations recueillies concernant la viabilité cellulaire analysée soulèvent des questions quant à la nature des éléments détectés. En effet, l'autofluorescence du support utilisé ainsi que la présence d'ADN extracellulaire peut être à l'origine d'une surestimation des cellules mortes ou

vivantes présentes dans les mousses. Afin de mieux estimer la viabilité du biofilm formé et ainsi pouvoir suivre sa croissance au cours de la fermentation IBE, le biofilm a été décroché des mousses puis analysé par cytométrie en flux.

3. Caractérisation du biofilm par cytométrie en flux

Comme vu au cours de la partie précédente, la microscopie confocale n'apparaît pas adaptée à l'étude du support poreux utilisé pour la croissance du biofilm de *C. beijerinckii*. Afin d'obtenir des données sur la proportion de cellules viables qui compose le biofilm formé, une technique utilisant la cytométrie en flux a été mise au point. En effet, cet outil permet de dénombrer le nombre de cellules totales en suspension ainsi que de mesurer plusieurs paramètres en lien avec la viabilité cellulaire. Les cellules du biofilm doivent donc être décrochées du solide support afin d'être analysées, ce qui pose plusieurs défis pour limiter les biais, car la méthode employée doit être non destructive pour les bactéries.

Le biofilm analysé au cours de ces expériences a été cultivé dans des flacons Schott d'un volume utile de 100 mL et équipés d'une platine munie d'un plongeur. Quatre mousses en polyuréthane sont fixées sur ce dernier. Les mousses sont ainsi en contact avec le milieu de culture et servent de support pour le développement du biofilm comme détaillé dans la partie 1.4.3 de ce document. L'agitation est assurée par des barreaux magnétiques, et les flacons Schott sont placés dans un incubateur afin d'assurer un maintien de la température à 34°C. Le système est opéré en continu, à un faible taux de dilution ($0,03 \text{ h}^{-1}$) afin d'éviter les crashes acides. Pour chaque test en cytométrie en flux, quatre flacons sont arrêtés après 300 h de fermentation, une fois que le biofilm devient visible à l'œil nu. Les réplicats de chaque expérience ont été effectués sur des mousses en provenance de différents flacons.

3.1 Détachement mécanique du biofilm de la mousse en polyuréthane employée lors des fermentations avant analyse par cytométrie en flux.

Les biofilms bactériens, en particulier ceux utilisés pour les procédés de traitement des eaux, ont déjà été analysés par cytométrie en flux afin de dénombrer le pourcentage de bactéries viables et mortes dans la boue activée (Collado et al. 2017; Yoshida and Hiraishi 2004; Benito et al. 2020). Pour y parvenir, des traitements physiques, comme l'agitation mécanique ou la sonication, ont été employés afin de détacher les biofilms des supports et disperser ces derniers (Karbysheva et al. 2020; Close et al. 2020; Collado et al. 2017). Cependant, la sonication pourrait être nocive pour les cellules et doit donc être utilisée avec soin.

Afin de détacher le biofilm de *C. beijerinckii* de la mousse en polyuréthane, un traitement mécanique a donc d'abord été effectué à l'aide d'un agitateur vortex pendant 2 minutes. Les

cellules détachées ont été marquées au cFDA ainsi qu'à l'IP puis observées à l'aide d'un microscope à épifluorescence. Ces dernières révèlent la présence d'agrégats cellulaires (figure 29-A). Après marquage, l'observation au microscope à épifluorescence révèle également la présence d'ADN extracellulaire dans les agrégats détectés (figure 29-B).

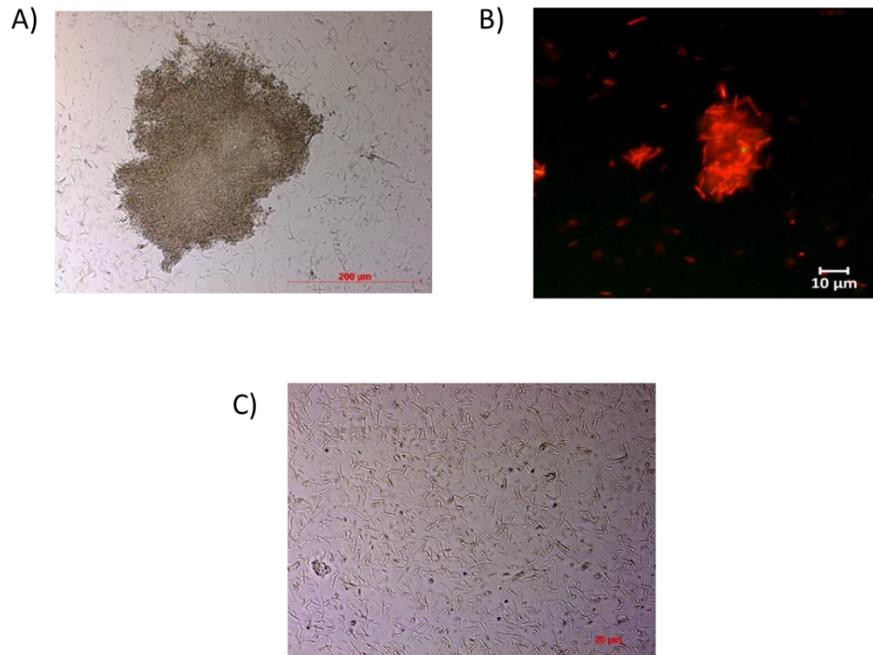


figure 29 : A) Biofilm détaché du support par agitation au vortex pendant deux minutes et observé en microscopie optique à champ clair (grossissement x200) B) cellules détachées du biofilm par agitation au vortex pendant deux minutes, marquées à l'IP et au cFDA puis observées par microscopie à épifluorescence (grossissement x400). C) Cellules du biofilm détachées du support après agitation au vortex suivi d'un traitement enzymatique successif de DNase I et de protéinase K. Des agrégats cellulaires sont observés sur la figure 2A et 2B ainsi que de l'ADN extracellulaire marqué par de l'IP sur la figure 2-B.

L'analyse de la suspension cellulaire obtenue après décrochage du biofilm par agitation au vortex a permis d'observer plusieurs phénomènes. Premièrement, le biofilm formé par *C. beijerinckii* sur les mousses en polyuréthane après 300 h de fermentation continue peut-être analysé par cytométrie en flux, sans risque de boucher l'appareil, malgré la présence d'agrégats cellulaires (figure 29-A). Deuxièmement, le nombre de cellules viables (cFDA⁺/IP⁻) comptées par cytométrie en flux après agitation au vortex n'est pas significativement différent du nombre d'UFC.mL⁻¹ dénombrées par dilution et étalement successif sur boîte de pétri ($3,2 \cdot 10^7 \pm 1,8 \cdot 10^7$ et $2,0 \cdot 10^7 \pm 1,1 \cdot 10^7$ cellules. mL⁻¹ respectivement). L'incertitude de mesure de la méthode de référence est toutefois importante, ce qui peut compliquer l'identification de la pertinence d'une méthode par rapport à l'autre.

Troisièmement, l'analyse de viabilité par CMF révèle un très faible pourcentage de cellules viables, altérées et mortes ($2,6 \pm 0,9$ %, $17,6 \pm 3,6$ % et $0,9 \pm 0,6$ %, respectivement). En effet, les

événements non fluorescents, composés de débris cellulaires et de bruit de fond, constituent le plus grand nombre d'événements détectés par cytométrie en flux.

Afin d'estimer un pourcentage correct de cellules viables, il est nécessaire, d'effectuer une hydrolyse efficace de la matrice d'EPS dans laquelle les bactéries sont piégées. En effet, les traitements enzymatiques ont été choisis pour leurs capacités à hydrolyser sélectivement les EPS qui peuvent être présents dans un biofilm formé par *C. beijerinckii* (polysaccharides, ADN extracellulaire et protéines). De plus, le traitement enzymatique a été choisi en raison de sa biocompatibilité à température douce (30 à 40 °C) qui maintient de manière optimale l'état physiologique des cellules bactériennes par rapport à d'autres techniques comme la sonication.

3.2 Mise au point d'un prétraitement enzymatique du biofilm formé par *C. beijerinckii*

3.2.1 Utilisation et étude des effets du cocktail caylase

Le traitement à la caylase a été employé afin d'hydrolyser spécifiquement les composants de la matrice extracellulaire du biofilm (protéines, ADN extracellulaire et polysaccharides), sans porter atteinte à la viabilité cellulaire. En effet, les traitements enzymatiques ont l'avantage d'être sélectif et de catalyser des réactions d'hydrolyses à des températures et à des pH compatibles pour les bactéries. Lorsque ce cocktail enzymatique a été utilisé (figure 30-B), le profil FSC-SSC du cytogramme a montré une sous-population qui se dégage du bruit de fond. En effet, cette sous-population n'apparaît pas lorsque l'analyse est effectuée sur des cellules décrochées par agitation et sans traitement enzymatique, comme montré sur la figure 30-A.

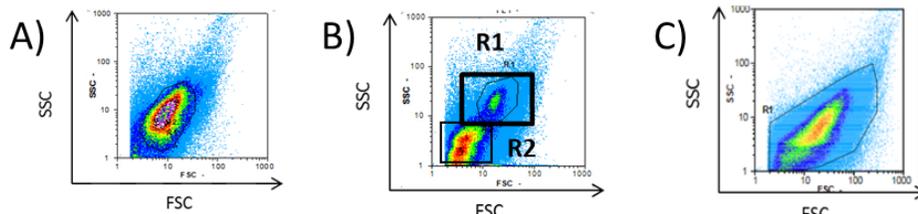


figure 30 ; Profils FSC-SSC obtenus après analyse par cytométrie en flux d'une suspension cellulaire obtenue après A) décrochement des cellules par agitation au vortex B) décrochement des cellules après agitation au vortex et traitement à la caylase C) décrochement des cellules après agitation au vortex et traitement à la caylase + anti-protéase.

L'analyse de la viabilité de la sous-population cellulaire détectée en R1 (figure 30-B) révèle que, après traitement enzymatique à la caylase, la proportion de cellules viables est augmentée de $2,6 \pm 0,9\%$ à $45,8 \pm 12,8\%$. De plus, la quantité de cellules marquées au cFDA dans la région R1 n'est pas significativement différente du nombre de colonies dénombrées sur boîtes de Pétri après dilutions successives et étalement ($1,2 \cdot 10^8 \pm 7 \cdot 10^7$ contre $1,6 \cdot 10^8 \pm 7,5 \cdot 10^7$). Ces données indiquent que la sous-population qui apparaît dans la région R1 après le traitement à la caylase correspond bien à des cellules. Toutefois, ce cocktail enzymatique n'est plus disponible dans le commerce. Une alternative d'une efficacité équivalente a donc dû être trouvée.

Un des composants majeurs qui constitue les biofilms formés par certaines *Clostridia* solvantogènes sont les protéines extracellulaires (Liu et al. 2018). Ces dernières assurent notamment la cohésion mécanique du biofilm. Or, le cocktail caylase possède une activité protéasique. Cette activité en particulier devait être déterminante afin d'hydrolyser la matrice extracellulaire du biofilm. Afin de vérifier ou d'infirmer cette hypothèse, un traitement enzymatique à la caylase en présence d'inhibiteurs de protéases a été effectué sur du biofilm décroché par agitation au vortex. Les résultats obtenus, disponibles sur la figure 30-C, montrent que le cocktail caylase, en présence d'anti-protéase, ne parvient pas à séparer les cellules du bruit de fond car aucune population cellulaire n'est observée sur la figure 30-C.

3.2.2 Effet de la DNase I et de la protéinase K

Au vu des résultats obtenus ci-dessus, l'utilisation d'une protéase pourrait être suffisante pour séparer les cellules du bruit de fond. La protéinase K a déjà été employée pour disperser efficacement les biofilms formés par *Listeria monocytogenes* (Nguyen and Burrows 2014) et *Escherichia coli* (Lim et al. 2019a) en visant spécifiquement les EPS de ces biofilms. Par conséquent, cette enzyme a été choisie afin d'hydrolyser les protéines qui constituent la matrice extracellulaire du biofilm obtenu au cours de cette étude. Sur la figure 31-B, il est montré que, après traitement à la protéinase K du biofilm décroché par agitation au vortex, une sous-population est de nouveau observable dans la région R1 du cytogramme.

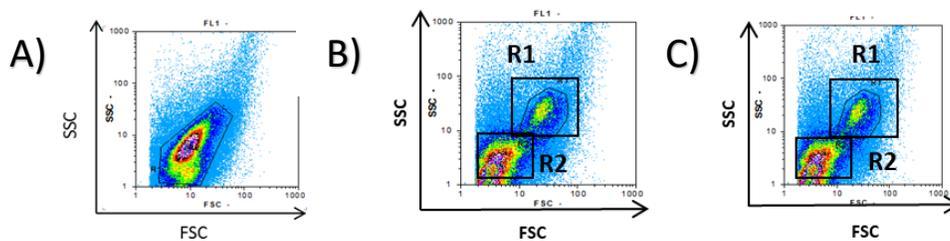


figure 31 : Profils FSC-SSC obtenus après analyse par cytométrie en flux d'une suspension cellulaire obtenue après A) décrochement des cellules après agitation au vortex et traitement à la DNase I B) décrochement des cellules après agitation au vortex et traitement à la protéinase K C) décrochement des cellules après agitation au vortex et traitement à la DNase I puis à la protéinase K

Lors de l'emploi de la protéinase K, le pourcentage d'événements non fluorescents dans la région R1 diminue significativement par rapport au témoin sans enzymes (de $78,9 \pm 3,3$ % pour le témoin à $41,1 \pm 16,4$ % pour le traitement à la protéinase K). Toutefois, le pourcentage de cellules viables détectées dans la région R1 n'est pas aussi élevé qu'avec le traitement caylase ($22,8 \pm 8,6$ % comparé à $45,8 \pm 12,7$ %).

Les EPS sont en effet composés d'autres substances que les protéines qui ne sont pas totalement hydrolysées par la protéinase K. Le cocktail caylase pourrait alors être plus efficace, car ce dernier combine à la fois des activités protéasique, cellulolytique et chitinolytique. Cependant, deux

glucanases (Vinotaste et Glucanex) ont été testées au cours de cette thèse sans résultats probants. Ainsi, ce cocktail enzymatique est peut-être plus efficace que l'emploi de protéinase K seule pour hydrolyser les nombreux polymères qui constituent la matrice du biofilm.

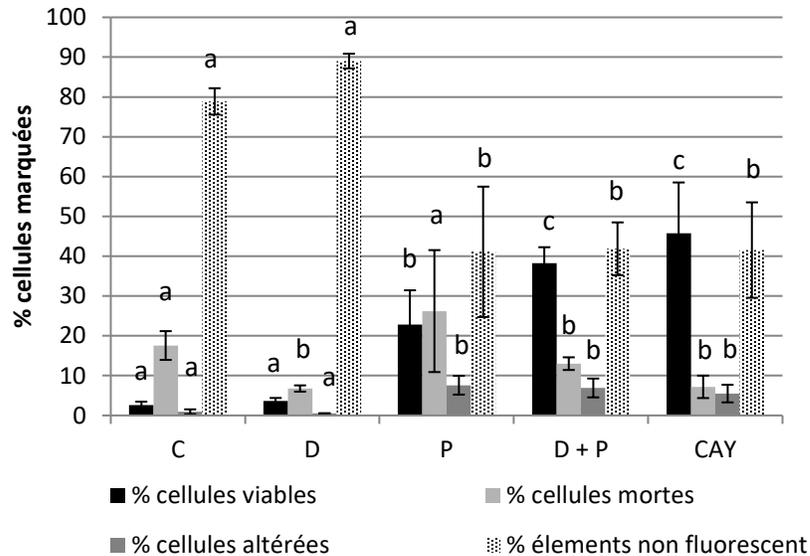


figure 32 : Pourcentage de cellules viable (cFDA⁺/IP⁻), altérées (cFDA⁺/IP⁺), mortes (cFDA⁺/IP⁻) et évènements non fluorescents (cFDA⁻/IP⁻) obtenus après agitation au vortex des mousses en polyuréthane sur lesquelles est formé un biofilm de *C. beijerinckii* après 300h de fermentation continue en bioréacteur et traitement (C) Témoin sans ajout d'enzymes (D) Utilisation de DNase I, (P) Utilisation de protéinase K (D+P) Utilisation de DNase I et de protéinase K (CAY) Utilisation du cocktail caylase. Tous les échantillons ont été incubés à 34°C pendant 1h pour chaque traitement enzymatique. a,b,c représentent les différences significatives ($p < 0.05$) entre les différents traitements sur le pourcentage des cellules viables, mortes et altérées (n=3)

La microphotographie présentée sur la figure 29-B montre que la matrice extracellulaire autour des cellules fluoresce dans le rouge et est donc marquée à l'iodure de propidium. Ce résultat pourrait indiquer la présence de l'ADN extracellulaire (ADNe). En effet, l'ADNe est un composant majeur de la matrice extracellulaire des biofilms (Flemming and Wingender 2010; Whitchurch et al. 2002). Sa présence a déjà été révélée en microscopie à épifluorescence par des marquages à l'iodure de propidium lors du développement de biofilm chez différentes souches de bactéries (Okshevsky and Meyer 2014; Sena-Vélez et al. 2016). La présence d'ADN extracellulaire marqué par l'IP pourrait ainsi amener à la surestimation du nombre de cellules mortes présentes dans les biofilms (Rosenberg et al. 2019).

De plus, la forte activité nucléasique de la DNase I a déjà été employée afin de disperser des biofilms formé par *Listeria monocytogenes* (Nguyen and Burrows 2014; Nijland et al. 2010). La présence d'ADNe pourrait jouer un rôle dans le maintien de la structure du biofilm chez *C.*

beijerinckii, par conséquent, une nucléase, l'emploi de la DNase I a également été testée afin d'hydrolyser ce composant de la matrice extracellulaire du biofilm.

Le cytogramme présenté sur la figure 31-A, montre que l'emploi de la DNase I seule ne permet pas de faire apparaître une sous-population cellulaire du bruit de fond sur le profil FSC-SSC. De plus, les pourcentages de cellules viables, altérées et de débris cellulaires ne sont pas significativement différents de ceux du témoin obtenu uniquement après détachement par agitation au vortex (figure 32). En revanche, le pourcentage d'évènements marqués à l'iodure de propidium baisse significativement (de $17,6 \pm 3,6$ % pour le témoin à $6,8 \pm 0,8$ % pour le traitement à la DNase I). Cette baisse de pourcentage d'évènements marqués à l'IP pourrait être causée par l'hydrolyse d'une partie de l'ADN extracellulaire du biofilm. Cependant, la DNase I pourrait également hydrolyser l'ADN intracellulaire des cellules mortes. Ce phénomène a été mis en évidence par Villarreal et al. (2013) avec des bactéries présentes dans les systèmes de distribution des eaux. Afin de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse, des cellules ont été cultivées en fioles pendant 24h en batch et tuées en les plongeant dans un bain-marie chauffé à 80°C pendant 2 minutes. Une fois refroidie, la suspension cellulaire a été traitée à la DNase I dans les mêmes conditions que les traitements effectués sur biofilm formé par *C. beijerinckii*. Les résultats de cette expérience sont présentés sur la figure 33.

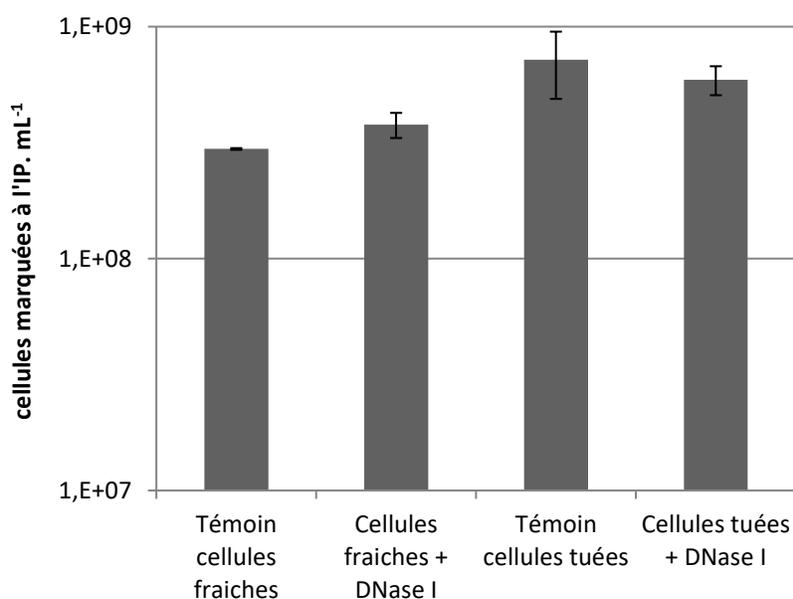


figure 33 ; Analyses des cellules marquées à l'iodure de propidium après traitement à la DNase I. Les cellules fraîches ont été analysées après 30 h de culture en fiole. Les cellules ont été tuées par chauffage au bain marie à 80°C pendant 2 minutes. Après refroidissement de la suspension cellulaire, le traitement enzymatique à la DNase a été effectué. Les cellules sont ensuite marquées à l'IP et analysées par CMF.

Des cellules fraîches marquées à l'iodure de propidium sont utilisées comme témoin (n=3)

La figure 33 montre que l'ajout de DNase I n'a pas d'impact significatif sur le nombre d'événements marqués à l'iodure de propidium pour une culture cellulaire fraîche de *C. beijerinckii* en suspension à 34°C. Après traitement à la chaleur, aucune différence significative n'est observée entre les cellules traitées et non traitées à la DNase I. Dans le cas étudié ici, il est alors vraisemblable que la concentration en DNase I employée n'ait pas d'effet sur l'hydrolyse de l'ADN intracellulaire des cellules dont la membrane est altérée. Cette dernière pourrait néanmoins avoir un rôle essentiel dans l'hydrolyse de l'ADN extracellulaire et par conséquent entraîner une baisse du pourcentage d'éléments marqués à l'IP lorsqu'elle est employée.

Vu que ni la DNase I, ni la protéinase K seule ne sont aussi efficaces que le traitement enzymatique à la caylase, un emploi séquentiel de ces deux enzymes a été testé. En effet, Lim et al. (2019a) ont montré qu'un emploi séquentiel de DNase I, protéinase K et cellulase avait un effet synergique sur la dispersion des biofilm formés par *Escherichia coli* O157 :H7.

Dans cette étude, la DNase I a été employée en premier car la protéinase K est une inhibitrice connue de la DNase I. Sur le profil FSC-SSC présenté sur la figure 31-C, l'emploi séquentiel de ces deux enzymes permet d'obtenir une sous-population cellulaire dans la région R1. De plus, il est montré sur la figure 32 que le pourcentage de cellules viables augmente significativement par rapport à celui obtenu avec l'emploi de la protéinase K ou de la DNase I seule ($38,2 \pm 4,0$ % pour DNase I + Protéinase K, $3,6 \pm 0,8$ pour la DNase I seule et $22,8 \pm 8,6$ % pour la protéinase K seule). Enfin, ce même pourcentage n'est pas significativement différent du résultat obtenu lors du traitement à la caylase ($38,2 \pm 4,0$ % pour DNase I combinée à la protéinase K contre $45,8 \pm 12,8$ % pour la caylase).

L'utilisation séquentielle de la DNase I et de la protéinase K est donc aussi efficace que le traitement avec le cocktail enzymatique caylase afin de séparer la sous-population cellulaire du bruit de fond et ainsi amener à une meilleure analyse de la viabilité des cellules du biofilm.

3.2.3 Validation du dénombrement cellulaire et non toxicité des enzymes employées.

Après la sortie du biofilm du bioréacteur, les cellules sont soumises à divers stress liés aux prétraitements effectués mais également aux changements de conditions physico chimiques lors du passage dans le tampon PBS (pH, concentration en oxygène, température, disponibilité en substrat, etc.). Afin de valider le dénombrement des cellules viables (cFDA⁺/IP⁻) obtenu par cytométrie en flux ainsi que d'étudier les effets de chaque traitement enzymatique sur la viabilité cellulaire, des étalements sur boîtes de Pétri ont été effectués. Les analyses ont été réalisées après décrochage par agitation au vortex d'un biofilm mature et traitements enzymatiques. Les suspensions cellulaires obtenues ont été à la fois analysées par CMF et dénombrées par dilutions successives et étalement sur boîte.

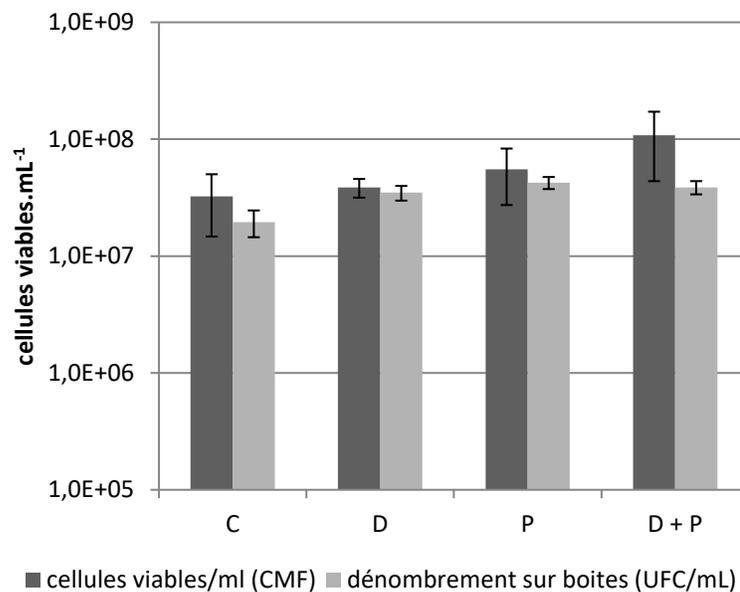


figure 34 : Résultats du dénombrement des cellules viables du biofilm obtenues après décrochage par agitation au vortex et (C) Incubation à 34°C pendant 1h (D) Traitement à la DNase I à 34°C pendant 1h (P) Traitement à la protéinase K à 34°C pendant 1h (D+P) Traitement à la DNase I à 34°C pendant 1h suivi d'un traitement à la protéinase K à 34°C pendant 1 h. (n=3)

La figure 34 montre qu'il n'y a pas de différences significatives ($p > 0,05$) entre la concentration en cellules viables dénombrées par CMF et la concentration en unité formant colonie obtenues après étalement sur boîte pour tous les traitements effectués. Cependant, la concentration en cellules viables comptées par CMF est en moyenne supérieure à ce qui est obtenu par dilution et étalement sur boîte. Ce phénomène peut être dû au fait que toutes les cellules marquées au cFDA ne sont peut-être pas cultivables. De plus, la concentration en cellules marquées au cFDA et dénombrées par étalement sur boîte, n'est pas significativement différentes entre les différents traitements ($p > 0,05$). Ce résultat indique que les différents traitements enzymatiques ne semblent pas avoir d'effets négatifs sur la viabilité des cellules du biofilm.

3.3 Optimisation du temps de traitement enzymatique

Afin d'obtenir la mesure de viabilité la plus proche de celle du bioréacteur étudié, le temps de traitement enzymatique doit donc être optimisé. Trois temps de traitement pour la DNase I et la protéinase K ont donc été testés afin d'étudier son impact sur la viabilité cellulaire analysée par CMF.

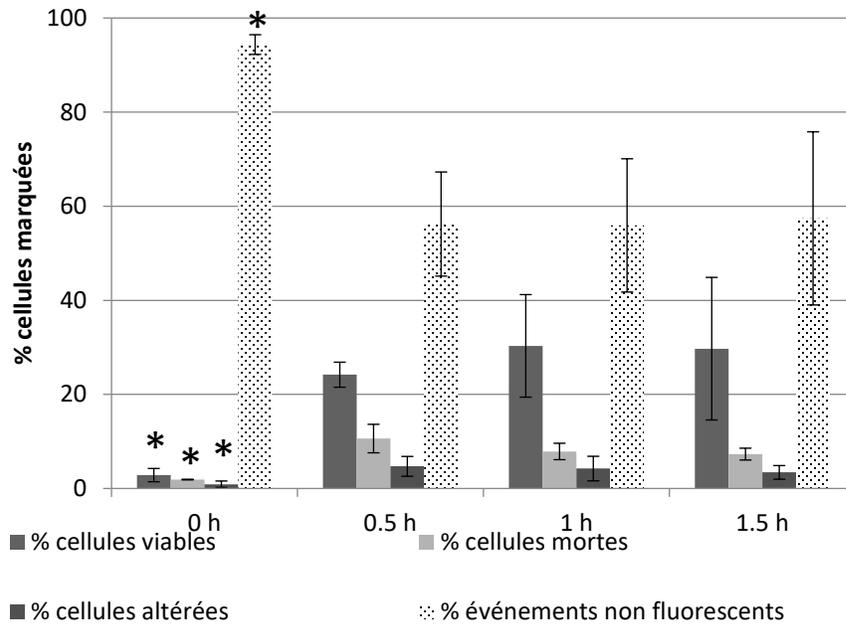


figure 35 : Pourcentage des cellules viables (cFDA⁺/PI⁻), mortes (cFDA⁻/PI⁻), altérées (cFDA⁺/PI⁺) des cellules provenant d'un biofilm de *C. beijerinckii* après 300h de fermentation continue et analysée par CMF après différents temps d'incubation de chaque enzyme (DNase I puis protéinase K). * représente la différence statistique ($p < 0.05$) de l'effet du temps de traitement sur le pourcentage de cellules viables, mortes et altérées.

Lim et al. (2019a) ont effectué un traitement enzymatique avec de la protéinase K (1%v/v) de la cellulase (10 mg.mL⁻¹) avec un temps d'incubation de 1 h pour chaque enzyme pour disperser un biofilm formé par *E. coli* après 24 h d'incubation en batch. D'un autre côté, Shukla et Subba Rao (2017) ont utilisé un temps de traitement de 24 h avec une concentration de 2 µg.mL⁻¹ en protéinase K afin de disperser un biofilm formé par *Staphylococcus aureus* après une nuit de croissance sur des microplaques. Dans le cas étudié au cours de cette thèse, le biofilm a été récolté après 300 h de fermentation continue, par conséquent, la concentration en protéinase K a été augmentée jusqu'à 100 µg.mL⁻¹ comparée aux conditions étudiées par (Shukla and Subba Rao 2017).

La figure 35 montre qu'un temps de traitement compris entre 30 min et 1 h 30 pour chaque enzyme n'a pas d'effet significatif ($p > 0.05$) sur le pourcentage de cellules viables détectées par CMF. De la même manière, la concentration en cellules viables analysées reste constante quel que soit le temps de traitement. Vu que ce dernier n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire, le temps d'hydrolyse le plus court a donc été choisi afin de minimiser le temps des analyses.

En résumé, le décrochage du biofilm par agitation au vortex des mousses en polyuréthane a rendu possible l'analyse de la suspension cellulaire obtenue par cytométrie en flux sans provoquer de bouchage de l'appareil. Afin d'extraire une population cellulaire du bruit de fond sur les profils

FSC-SSC des cytogrammes obtenus, des traitements enzymatiques ont été employés. L'activité des protéases s'est révélée être déterminante pour hydrolyser la matrice du biofilm, toutefois l'emploi de protéinase K seule n'a pas permis d'obtenir des résultats similaires au cocktail caylase. Un emploi séquentiel de la DNase I et de la protéinase K s'est révélé plus efficace que ces deux enzymes seules afin d'étudier la viabilité des cellules qui composent le biofilm. La validité du dénombrement a été vérifiée en comparant la concentration en cellules viables détectées par cytométrie en flux après traitement enzymatique à un dénombrement sur boîte de pétri. Enfin, le temps de traitement pour chaque enzyme a été optimisé afin d'éviter les phénomènes de dégradation de viabilité et de gagner du temps sur la réalisation des expériences.

4. Conclusion du chapitre

La viabilité cellulaire est un paramètre essentiel pour comprendre les performances des bioprocédés. Elle a été peu étudiée dans le cadre des fermentations IBE à lit fixe. L'analyse de la viabilité cellulaire au cœur de la matrice qui compose le biofilm est complexe à effectuer car cette dernière peut interférer avec les méthodes d'analyses choisies. Deux méthodologies distinctes ont donc été explorées dans ce chapitre afin de mieux comprendre l'évolution de la viabilité dans le biofilm.

Une analyse de la répartition des cellules ainsi que des polysaccharides qui composent les EPS a été effectuée par microscopie confocale au cours d'une fermentation IBE à biofilm. Cette analyse a permis de décrire la colonisation des cellules au sein de la mousse en polyuréthane. Néanmoins, la microscopie confocale révèle ses limites quand il s'agit d'étudier la viabilité de *C. beijerinckii* au sein de ces solides supports. En effet, l'autofluorescence de la mousse en polyuréthane ainsi que la perte de matériel empêchant notamment le lavage après marquage nous ont poussé à mettre au point d'autres méthodes d'étude de la viabilité cellulaire.

La cytométrie en flux qui est utilisé communément pour effectuer un dénombrement cellulaire multiparamétrique rapide des cellules en suspension a été employée pour étudier la viabilité des cellules qui composent le biofilm. Un traitement innovant a ainsi été développé afin de pouvoir utiliser cet outil pour l'étude des biofilms formés par *C. beijerinckii*. Un décrochage par agitation mécanique ainsi qu'un traitement enzymatique ont été développés. Pour baisser le bruit de fond causé par l'accumulation des débris cellulaire dans le biofilm, plusieurs stratégies d'hydrolyse enzymatique ont en effet été testées. Le cocktail caylase est efficace pour hydrolyser les EPS et permet d'analyser la viabilité des cellules du biofilm sans impact sur la viabilité de ces dernières. Afin de remplacer le cocktail caylase mais aussi de mieux comprendre les activités essentielles pour l'hydrolyse des EPS qui composent le biofilm, d'autres enzymes ont été employées. L'emploi de DNase I suivi de protéinase K s'est avéré aussi efficace que la caylase pour l'étude de la viabilité des cellules qui composent le biofilm. Toutefois, l'incertitude de mesure des cellules viables qui composent le biofilm demeure élevée. Cette dernière pourrait être causée par des

hétérogénéités de colonisation sur les solides supports dans le système étudié. Pour mieux comprendre l'influence de la viabilité cellulaire du biofilm sur les performances des procédés de fermentation, les méthodologies développées ici ont été appliquée pour suivre le développement des cellules actives qui composent le biofilm. Les conditions de l'essai étudié sont semblables à celles du bioréacteur colonne à lit fixe présenté dans le chapitre 3 de ce document.

Chapitre 5 : Étude de la viabilité cellulaire au cours des fermentations IBE

1. Introduction

La formation des biofilms est un phénomène complexe. La vitesse de formation de ces derniers dépend à la fois de la capacité de la souche à croître et former des EPS, des propriétés physico-chimiques des solides supports placés dans le bioréacteur ainsi que du taux de cisaillement dans le bioréacteur (Saur et al. 2017; Pantaléon et al. 2014). Afin de maximiser la productivité des bioréacteurs à lit fixe, un maximum de cellules viables doit être immobilisé dans le bioréacteur le plus longtemps possible.

Malheureusement, dans la majorité des études concernant les fermentations IBE à lit fixe, les quantités de biomasse immobilisée et en suspension n'ont pas été mesurées. Or, cette donnée permettrait de mieux comprendre quelles conditions opératoires favorisent la croissance du biofilm sur les solides supports. De même, le pourcentage de cellules actives qui composent le biofilm ainsi que leurs renouvellements au sein des supports sont des paramètres inconnus, car difficile à quantifier. Pourtant, ces paramètres sont critiques afin d'assurer l'opérabilité de ce type de procédé sur le long terme et ainsi permettre un taux d'utilisation élevé des bioréacteurs développés.

Comme explicité lors du chapitre précédent, la cytométrie en flux permet une analyse quantitative et multiparamétrique des suspensions cellulaires. Une fois cette technique adaptée à la quantification des cellules viables qui composent le biofilm, elle peut servir à étudier la dynamique de croissance du biofilm au cours des étapes de démarrage des procédés à lit fixe.

L'enjeu de ce chapitre est tout d'abord de comprendre les relations entre viabilité cellulaire et production de solvants au cours d'une fermentation en batch. Le deuxième objectif de ce chapitre est de mettre en œuvre cet outil pour décrire la dynamique de formation du biofilm. Cette étude est réalisée en prélevant de manière stérile et en conditions anoxiques des échantillons de solides supports (mousses en polyuréthane). Sur ces prélèvements, la viabilité des cellules qui composent le biofilm est mesurée par cytométrie en flux. La viabilité des cellules immobilisées et en suspension ainsi que leur effet sur la productivité volumique du procédé de fermentation à cellules immobilisées seront donc présentés au cours de ce chapitre.

Cependant, le prélèvement des solides supports dans les bioréacteurs en phase de lancement peut, pour l'analyse de biofilm, entraîner de nombreux biais ou problèmes (contaminations, entrée d'oxygène dans les bioréacteurs, etc.). Une nouvelle piste pour estimer le développement du biofilm à l'aide d'une analyse en ligne du débit de gaz couplée à une analyse de la viabilité des cellules en suspension par cytométrie en flux sera donc également proposée dans ce chapitre.

2. Relation entre viabilité et productivité volumique en bioréacteur batch

2.1 Cinétique de production des métabolites en fermentation batch

Afin d'étudier au mieux les cinétiques de fermentation, deux séries d'expériences en batch ont été menées en triplicats sur le bioréacteur Biostat-Q plus (le système est décrit partie 1.4.5 du chapitre 2). Les lancements sont décalés de 13 h dans le temps afin d'avoir une cinétique complète de la fermentation. La concentration en glucose initiale est de 45 g.L^{-1} . La concentration en glucose résiduel ainsi que la concentration des différents métabolites produits ont été mesurées au cours de la fermentation. Des analyses de viabilité cellulaire par cytométrie en flux ont également été réalisées pour chaque prélèvement.

2.1.1 Vitesse de croissance et production des métabolites

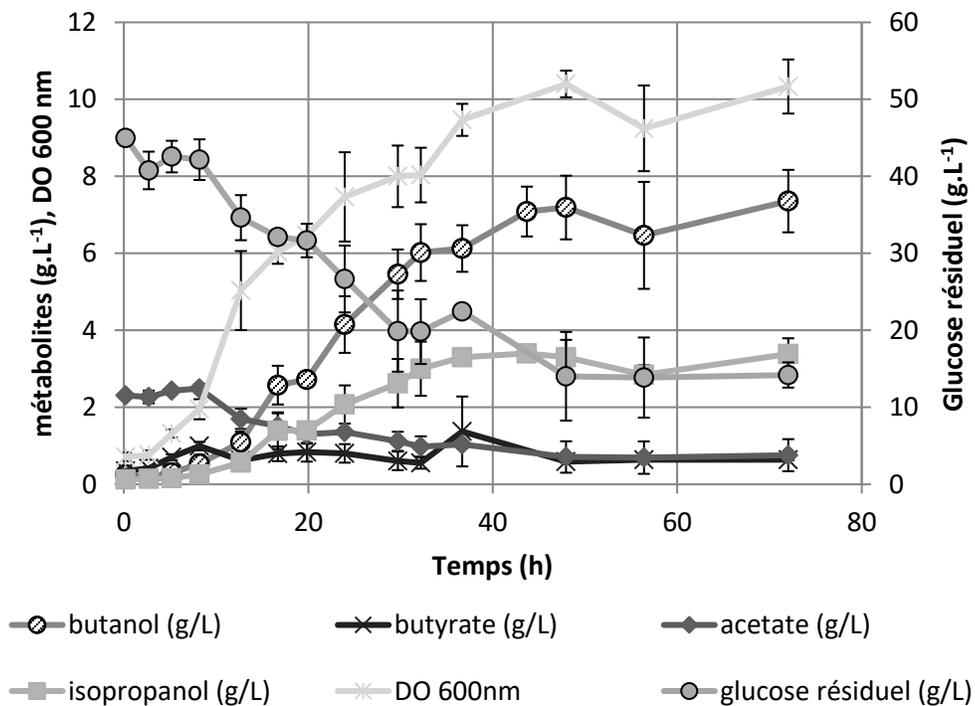


figure 36 : Évolution de la concentration en butanol (ronds striés gris), butyrate (croix noires), acétate (losanges noirs), isopropanol (carrés gris), ainsi que la densité optique mesurée à 600 nm (étoiles grises) au cours d'une fermentation batch à 34°C et à pH non régulé (les points représentent la moyenne et les barres d'erreurs représentent les écarts types sur trois expériences).

L'évolution des concentrations des métabolites produits en fermentation batch est présentée sur la figure 36. Au cours de la fermentation, plusieurs phénomènes sont observés. Tout d'abord, la concentration en butyrate augmente lors des dix premières heures de la fermentation, passant de $0,35$ à 1 g.L^{-1} . Ce dernier est ensuite consommé en même temps que l'acétate et le glucose à partir de la dixième heure de la fermentation pour atteindre respectivement $0,6 \text{ g.L}^{-1}$ pour le butyrate et $0,8 \text{ g.L}^{-1}$ pour l'acétate en fin de fermentation.

La production de solvants commence à partir de la 5^{ème} heure fermentation. Les concentrations en isopropanol et en butanol augmentent de manière constante entre 13 h et 37 h de fermentation jusqu'à atteindre 3,3 et 6,1 g.L⁻¹ respectivement. Une fois ces concentrations atteintes, les concentrations en solvants et en acides ne changent plus. La concentration maximale pour les solvants (butanol et isopropanol) est atteinte à partir de 48 h de fermentation et est de 10,4 g.L⁻¹. Les rendements de fermentation sont présentés dans le tableau 12 et sont comparés aux résultats obtenus dans la littérature pour la même souche, naturellement productrice d'isopropanol (*C. beijerinckii* DSM6423). Dans ce travail, les rendements obtenus en batch sont similaires à ceux observés par Survase *et al.* (2011) bien que la quantité totale de solvants produits soit plus élevée (10,6 g.L⁻¹ contre 5,9 g.L⁻¹ et 6,7 g.L⁻¹ pour les auteurs cités).

tableau 12 : Rendements obtenus au cours de la fermentation IBE en batch après 72 h de fermentation, les barres d'erreur représentent les écarts types mesurés sur trois expériences.

Rendements et performances du procédé	Cette étude	Survase et al. (2011)	dos Santos Vieira et al. (2019)
Rendement biomasse sur glucose (g.g ⁻¹)	0,16 ± 0,02	0,19	ND
Rendement butanol sur glucose (g.g ⁻¹)	0,23 ± 0,03	0,19	0,27
Rendement isopropanol sur glucose (g.g ⁻¹)	0,11 ± 0,013	0,11	0,09
Rendement solvants totaux sur glucose (g.g ⁻¹)	0,34 ± 0,043	0,3	0,36
Consommation totale en glucose (g.L ⁻¹)	31,4 ± 2,1	20	18,3
Concentration finale en solvants (g.L ⁻¹)	10,6 ± 1,2	6,7	5,9

La densité optique mesurée à 600 nm est corrélée à la masse sèche pesée au cours de l'expérience (l'étalonnage est disponible dans le matériel et méthode, sur la figure 14). La figure 36 montre

que la densité optique augmente de manière exponentielle lors de douze premières heures de la fermentation. La croissance des bactéries est ensuite ralentie lors de la synthèse des solvants.

Malgré une densité optique finale mesurée élevée ($10,4 \pm 0,7$), les concentrations en butanol et en isopropanol restent stables après 48 h de fermentation. Deux hypothèses sont proposées pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, le butanol a un effet toxique marqué en solvantant la membrane plasmique des bactéries ce qui stoppe la fermentation. Un autre phénomène est la sporulation effectuée par les *Clostridia* solvantogènes. En effet, le changement métabolique opéré par la souche déclenche à la fois la production de solvants ainsi que l'enclenchement de la sporulation (Kolek et al. 2017; Branska et al. 2018). Or, toute activité métabolique cesse lorsque les étapes de formation des spores sont complètes. Afin de mieux comprendre la dynamique et l'influence de ces deux phénomènes sur la baisse de la productivité au cours de la fermentation batch, une étude par cytométrie en flux a donc été effectuée.

2.2 Analyse de la viabilité

2.2.1 Analyse des cytoigrammes obtenus

La suspension cellulaire est analysée par cytométrie en flux lors de chaque prélèvement. Les particules analysées par cytométrie en flux sont tout d'abord représentées en fonction du paramètre FSC, relatif à la taille des éléments détectés, ainsi que du signal SSC, relatif à la granulométrie des éléments détectés. Les résultats de l'évolution de ce profil au cours de la fermentation en batch sont présentés figure 37.

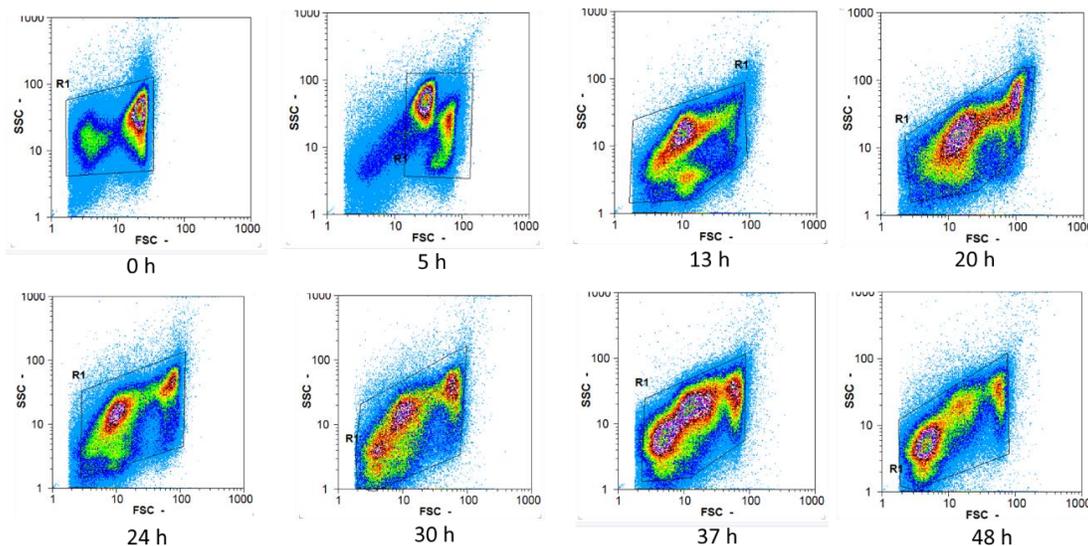


figure 37 : Évolution du profil FSC-SSC au cours d'une fermentation batch à 34°C et sans régulation de pH

Le profil FSC-SSC n'est pas constant au cours de la fermentation IBE en batch. Ce phénomène est probablement dû au déclenchement de la sporulation qui est un phénomène conjoint à la production de solvants chez la plupart des *Clostridia* solvantogènes (Jones et al 1986; Patakova

et al. 2013). Plusieurs types cellulaires apparaissent en plus des bacilles (formes clostridiales, préspores, endospores et spores) et la cytométrie permet, en partie, d'observer ce phénomène (Branska et al. 2018; Patakova et al. 2014; Tracy et al. 2008; González-Peñas et al. 2015). Le profil FSC-SSC se stabilise après 48 h de fermentation et aucune nouvelle population cellulaire n'est alors détectée.

En effet, de nouveaux phénotypes (formes clostridiales) ont été observés par microscopie après l'apparition du changement métabolique qui survient environ 10 h après le début de l'inoculation. À partir de 24 h de fermentation, des préspores et des endospores ont été observés en microscopie. Jusqu'à cinq phénotypes différents peuvent ensuite être observés au sein d'une même culture (bacilles, formes clostridiales, préspores, endospores et spores) tandis qu'au maximum trois populations sont observables sur les cytogrammes à partir de 30 h de fermentation (figure 37). Ces résultats indiquent que le profil FSC-SSC n'est pas suffisant pour distinguer tous les phénotypes en mélange dans le milieu de culture.

Toutefois, la cytométrie en flux pourrait être employée pour identifier les populations cellulaires qui produisent des solvants par rapport à celles qui produisent des acides à l'aide de souches génétiquement modifiées pour produire des protéines fluorescentes par la méthode dite Y-FAST. Streett et al. (2019) ont en effet employé un cytomètre en flux équipé d'un trieur cellulaire ainsi qu'un microscope à épifluorescence afin de relier phénotypes et expression des gènes au cours du cycle de vie de *C. acetobutylicum* ATCC824. L'emploi de ces technologies permettrait de mieux comprendre les relations entre phénotypes observés et expression du métabolisme dans notre étude. La cytométrie apparaît donc comme un outil pertinent à utiliser dans le cadre de la fermentation IBE car elle permet une analyse rapide et multi-paramétrique d'une suspension cellulaire. En effet, combinée avec l'utilisation de marqueurs cellulaires, elle peut permettre d'obtenir des informations sur l'évolution de la viabilité au cours de la fermentation.

2.2.2 Analyse de la viabilité par cytométrie en flux au cours de fermentations batch

La figure 38 montre l'évolution de la viabilité cellulaire au cours d'une fermentation batch effectuée à 34°C et sans régulation de pH. Lors de cette expérience, la proportion de cellules viables initiale ne représente que $11,6 \pm 2,1$ % du total des cellules lors de l'inoculation. Une phase de latence est observée pendant les trois premières heures de la fermentation, puis le pourcentage de cellules altérées augmente, passant de $26,7 \pm 5,3$ % après 5 h de fermentation à $40,6 \pm 9,9$ % après 8 h de fermentation. Ce phénomène peut être expliqué par le fort taux de division cellulaire observé lors de cette phase de la fermentation. En effet, lorsque la vitesse de multiplication des cellules est élevée, la membrane plasmique devient plus perméable. L'iodure de propidium peut alors plus facilement rentrer dans le cytoplasme et marquer les cellules, même

si ces dernières sont viables. Ce phénomène a également été observé par Kolek et al. (2016) lors des fermentations batch chez une souche productrice de solvants : *Clostridium pasteurianum*.

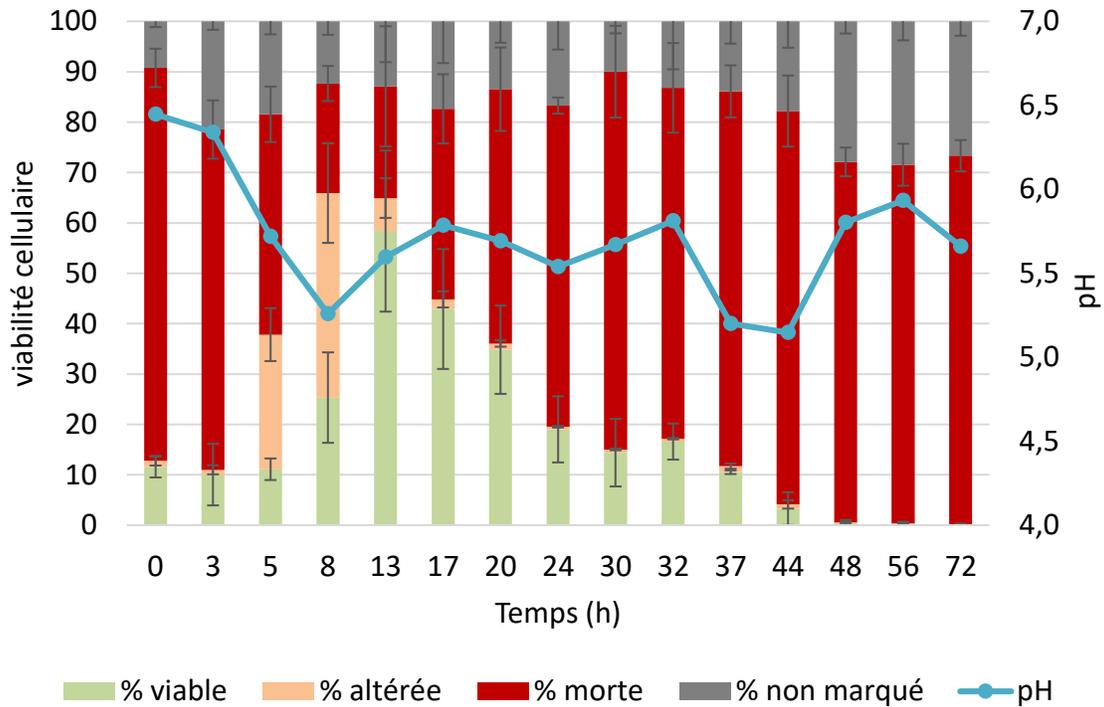


figure 38 : Évolution de la viabilité , d'une suspension cellulaire marquée au cFDA et à l'IP au cours d'une fermentation batch à 34°C et à pH non régulé (les barres d'erreurs représentent les écarts types sur trois expériences).

Après 13 h de fermentation, le pourcentage de cellules viables en suspension atteint son maximum ($58,4 \pm 16\%$). Ce pic de viabilité est observé peu après le passage de la phase acidogène à la phase solvantogène (après 10 h de fermentation). Le switch métabolique des cellules se déroule lorsque le pH atteint une valeur seuil comprise entre 5 et 5,2. Cette dernière est obtenue après environ 10h de fermentation en batch dans les conditions étudiées. Après que la valeur seuil en pH ait été obtenue, le pourcentage de cellules viables ne fait que décroître et atteint 0,5 % après 48 h de fermentation. La viabilité cellulaire commence donc à décroître avant que la concentration en solvants atteigne un seuil toxique.

Ce phénomène a également été mis en lumière chez une autre souche de *Clostridium beijerinckii* non-productrice d'isopropanol (NRL 598) (Branska et al. 2018). Toutefois, le phénomène qui cause cette perte de viabilité n'a pas été élucidé par ces auteurs. Une des hypothèses avancées par ces derniers est que le déclenchement de la sporulation et de la synthèse des solvants entraînerait la production d'autolysines ce qui pourrait faire baisser la viabilité cellulaire.

La part d'évènements non marqués varie peu jusqu'à 48 h de fermentation batch (entre 10 et 20 % des évènements totaux analysés). Après 44 h de fermentation, une augmentation de la

proportion d'évènements non fluorescents est observée (27 % en moyenne). Cette augmentation pourrait être causée par l'apparition des spores, non marqués en fin de la fermentation. Ce phénomène coïncide avec l'apparition d'une nouvelle population sur le profil FSC-SSC composée d'évènements non marqués présenté sur l'Annexes 5.

Afin de mieux comprendre comment la viabilité cellulaire peut expliquer les cinétiques de production de solvants, la concentration en cellules marquées au cFDA ainsi qu'en cellules marquées uniquement à l'IP ont été représentées conjointement à la production de butyrate et de butanol au cours de la fermentation en batch sur la figure 39. Sur ce graphique, il est montré que la concentration en cellules actives (marquées au cFDA et au cFDA + IP) croît de manière exponentielle entre 3 h et 8 h de fermentation, passant de $4,0.10^6 \pm 1,5.10^5$ cellules.mL⁻¹ à $7,4.10^7 \pm 2,6.10^7$ cellules.mL⁻¹. La concentration en cellules actives atteint un pic après 17 h de batch qui est de $2,0.10^8 \pm 6,0.10^7$ cellules.mL⁻¹. Puis, cette dernière stagne avant de décliner après 36 h de fermentation en batch. Le début du déclin de la concentration en cellules actives correspond à l'atteinte de la concentration inhibitrice en butanol (6,5 - 7 g.L⁻¹).

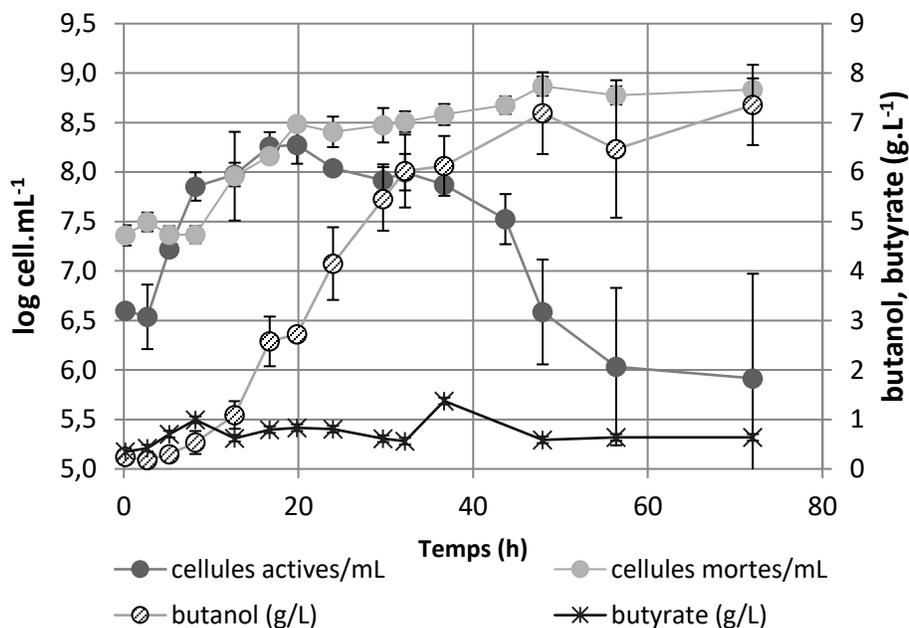


figure 39 : Évolution de la concentration en cellules viables et mortes par mL de culture ainsi que l'évolution de la concentration en butanol et butyrate au cours d'une fermentation en batch à 34°C et à pH non régulé (Les points représentent les moyennes et les barres d'erreurs représentent les écarts types sur trois expériences)

Les cellules actives représentent toutes les cellules marquées au cFDA. La figure 39 montre que la concentration en cellules actives stagne entre 13 h et 36 h de fermentation ($9,7.10^7 \pm 2,4.10^7$ cellules.mL⁻¹ à $7,5.10^7 \pm 1,0.10^7$ cellules.mL⁻¹ sur cette période) tandis que la proportion de cellules actives, montré sur la figure 38, est divisée par près de six (passant de $58,4 \pm 16$ % à $10,5 \pm 0,4$ %). La quantité de cellules mortes est en effet multipliée par cinq au cours de cette même période,

passant de $2,4 \cdot 10^7 \pm 4,7 \cdot 10^6$ à 13 h de fermentation à $4,8 \cdot 10^8 \pm 1,0 \cdot 10^8$ cellules.mL⁻¹ après 36 h de fermentation. L'atteinte d'une concentration seuil en butanol (entre 6 et 7 g.L⁻¹) augmente effectivement la vitesse à laquelle les cellules meurent et met rapidement un terme à la fermentation.

L'augmentation de la concentration en butanol est constante entre 8 et 32 h de fermentation (0,24 g.L⁻¹.h⁻¹). L'analyse de la concentration en cellules actives dans le bioréacteur permet de mettre en lumière que, bien que la biomasse totale augmente, la concentration en cellules actives reste elle constante entre 8 et 32 h de fermentation. Elle atteint en moyenne $1,2 \cdot 10^8 \pm 2,7 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹ sur cette période.

2.2.3 Productivité spécifique cellulaire

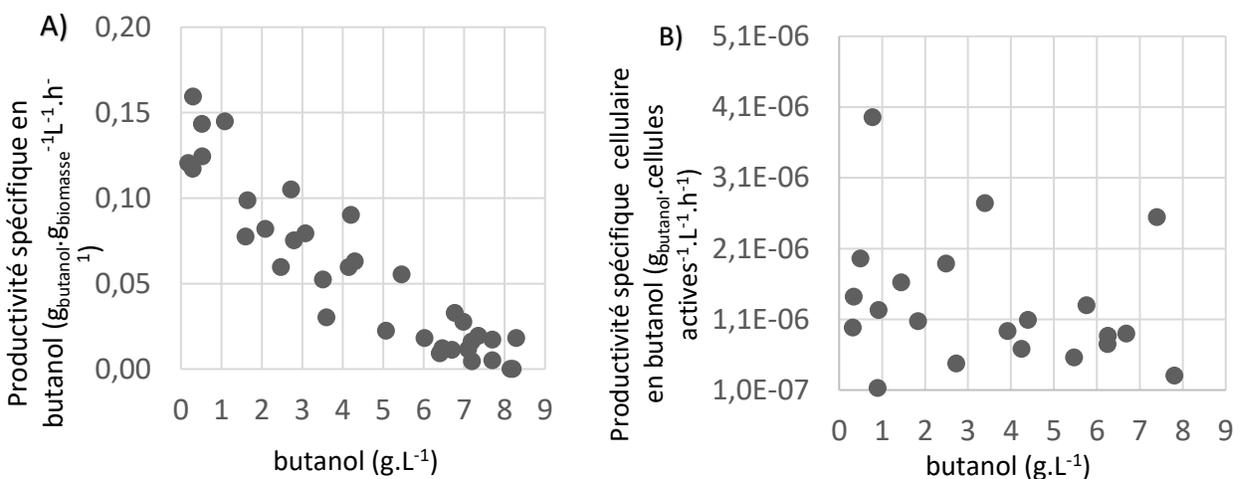


figure 40 Productivité spécifique en butanol en fonction de la concentration en butanol dans le milieu lors d'une fermentation en batch à 34°C et à pH non régulé. A) par masse de cellules totales dans le bioréacteur B) par nombre de cellules actives.mL⁻¹

La figure 40-A présente l'évolution de la productivité spécifique en butanol calculée en fonction de la biomasse totale en fonction de la concentration en butanol dans le milieu de culture. La figure 40-B représente, quant à elle, la productivité spécifique en butanol des cellules actives (marquées au cFDA) en fonction de la concentration en butanol dans le milieu de culture. Ces graphiques montrent que plus la concentration en butanol dans le milieu augmente, plus la productivité spécifique en butanol liée à la biomasse totale diminue alors que la productivité spécifique en butanol des cellules actives reste stable. La diminution de la productivité spécifique en butanol de la biomasse semble être liée à l'augmentation de la concentration en butanol dès 1 g.L⁻¹ alors que la figure 39 montrée précédemment montre une baisse de viabilité seulement à partir de 6 g.L⁻¹.

Branska et al. (2018) ont proposé qu’au cours de la fermentation batch, la perte de viabilité lors de la phase de production de solvants est corrélée au *switch* métabolique plutôt qu’à la concentration en butanol lorsque cette dernière est comprise entre 0 et 5 g.L⁻¹. Ces derniers ont effectué un suivi de la viabilité de *C. beijerinckii* NRLL-B598 en utilisant les mêmes fluorochromes que pour cette étude. Le milieu de culture utilisé contenait 5 g.L⁻¹ de butanol avant inoculation. Pendant la croissance de la souche en batch, sa viabilité n’a commencé à décroître que lorsque le *switch* métabolique a été atteint, à partir de 10 h de fermentation. D’après ces auteurs, ce composé a bien un effet toxique sur les bactéries mais uniquement lorsque sa concentration dépasse les 6 g.L⁻¹.

Dans les expériences décrites dans ce chapitre, la concentration en cellules actives reste constante tout au long de la phase de production de solvants. Par conséquent, la productivité spécifique cellulaire en butanol observée varie peu en fonction de la concentration en butanol. Au contraire, la productivité spécifique en butanol liée à la biomasse totale baisse en fonction de la concentration en butanol. Cette baisse est causée par l’accumulation de cellules mortes au cours de la fermentation. Or, la cause de la perte de viabilité et de l’accumulation de cellules mortes ne semble qu’en partie liée au butanol au cours des fermentations en batch. Ces résultats indiquent donc que la concentration en butanol n’est pas la cause ou du moins la seule cause de la baisse de productivité spécifique totale observée entre 1 et 6 g.L⁻¹ de butanol. Au cours de la fermentation IBE effectuée avec la souche sauvage DSM 6423, il est mis en évidence que des concentrations en butanol supérieures à 6 g.L⁻¹ entraînent une baisse de la viabilité cellulaire. Par conséquent, le taux de dilution des fermentations continues devrait être ajusté afin que la concentration en butanol ne dépasse pas cette valeur.

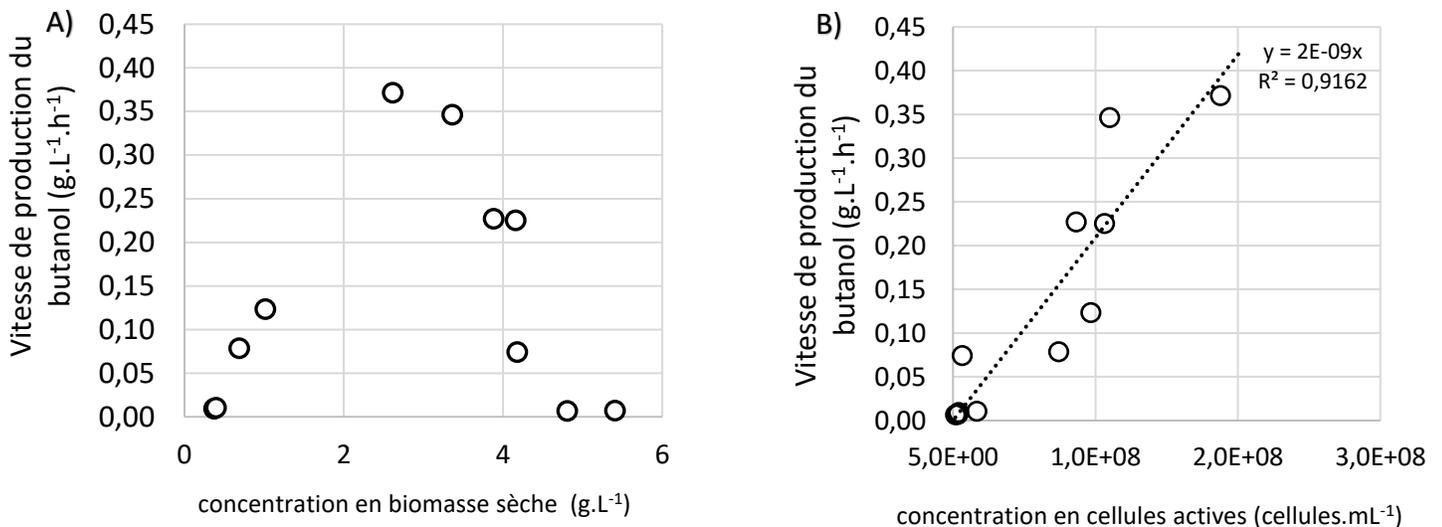


figure 41 Productivité en butanol en fonction de A) la concentration en biomasse sèche B) en cellules actives (cFDA⁺/IP⁺) mesurées par cytométrie en flux au cours d’une fermentation batch

Le graphique présenté en figure 41-A montre que la productivité en butanol n'est pas toujours corrélée à la concentration en biomasse totale. Or, la concentration en cellules actives détectées par cytométrie en flux est, quant à elle, corrélée à la productivité en butanol au cours de la fermentation batch figure 41-B. De la même façon, il est probable que pour le cas de la fermentation à cellules immobilisées, la biomasse adhérente sur les supports pourrait être en grande majorité inactive car composée de cellules mortes et d'EPS. Ainsi, l'analyse du biofilm en masse sèche ne permettrait pas de comprendre efficacement les performances des procédés de fermentation en lit fixe.

Dans le cas de la fermentation continue à biofilm, le suivi de la concentration en cellules actives immobilisées pourrait ainsi permettre de mieux comprendre les différents phénomènes qui se déroulent au sein des bioréacteurs afin d'en améliorer la conduite et font ainsi l'objet des chapitres suivants.

3 Cas de la croissance en bioréacteur à lit fixe

3.1 Cinétique de croissance du biofilm dans les bioréacteurs à lit fixe

Le bioréacteur CDC a été utilisé pour ces expériences. Ce dernier permet le prélèvement au cours du temps de supports du bioréacteur en conditions stériles et anoxiques. Une fois le bioréacteur inoculé à 10 % v/v, une période d'incubation en batch de 8 h à 34 °C est respectée afin d'assurer la croissance initiale des cellules. Puis, le taux de dilution est réglé à $0,03 \text{ h}^{-1}$, ce dernier est ensuite augmenté de manière continue avec une pente fixée à $2,0 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-2}$. L'objectif de cette constante augmentation du taux de dilution est de maintenir la concentration en butanol en dessous de la concentration toxique estimée à $6,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ puisque le biofilm se développe sur les supports au fur et à mesure de la fermentation.

Les barreaux plongeants dans le milieu de fermentation et sur lesquels sont fixés trois solides supports sont retirés sous la chambre anaérobie de manière régulière afin de suivre la croissance du biofilm. Au total, 24 supports poreux sont placés dans le réacteur, ce qui représente un volume total de 12 mL de support disponible pour la colonisation du biofilm. Afin d'augmenter la surface totale disponible dans le bioréacteur, 80 mL de mousse supplémentaire sont ajoutés. Les supports fixés aux barreaux représentent 13 % du volume total, les volumes de mousses prélevés ont ainsi un impact limité sur les performances du procédé étudié.

Le prétraitement enzymatique développé pour l'analyse de la viabilité du biofilm par cytométrie en flux a été effectué avant chaque analyse. À chaque prélèvement, la viabilité des cellules en suspension a également été étudiée dans le but de comparer les deux populations. L'essai a duré 550 h afin d'obtenir un biofilm mature, observable à l'œil nu sur les mousses en polyuréthane.

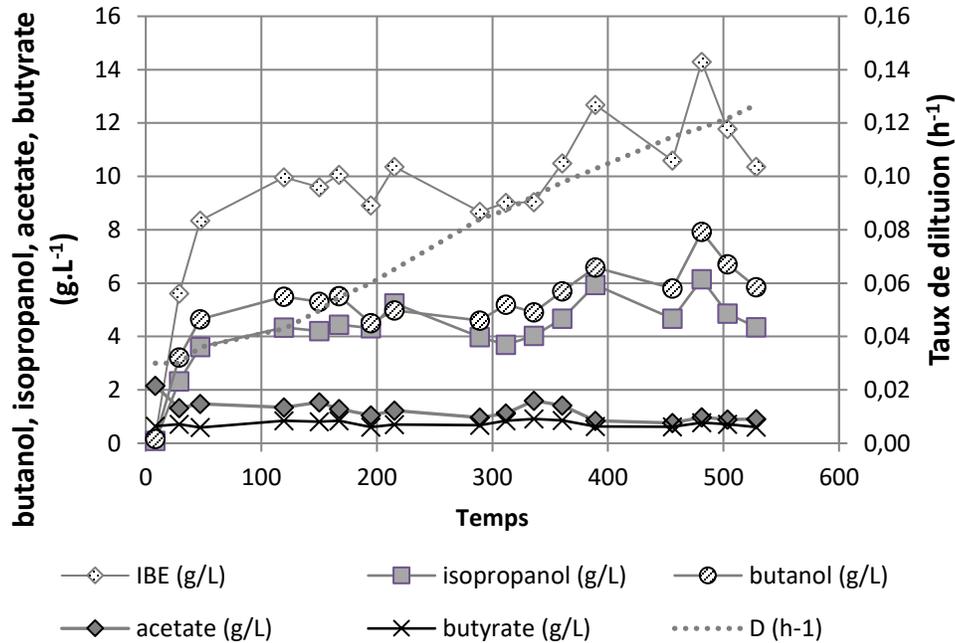


figure 42 :Évolution de la concentration en solvants et en acides ainsi que du taux de dilution appliqué au système au cours d’une fermentation IBE à cellules immobilisées

Les résultats de l’évolution des concentrations en métabolites produits sont présentés sur la figure 42. Après la phase de croissance initiale, la concentration totale en solvants est stable entre 120 h et 336 h de fermentation continue (9,5 g.L⁻¹ en moyenne). Toutefois, une augmentation de la concentration en butanol ainsi qu’en isopropanol sont observées après 312 h de fermentation. L’évolution de la productivité en solvants totaux au cours de l’essai est présentée sur la figure 43. Cette dernière augmente au fur et à mesure de l’expérience et suit la même dynamique que l’augmentation du taux de dilution. La productivité totale maximale est atteinte à la 481^{eme} heure de fermentation et est de 1,7 g.L⁻¹.h⁻¹.

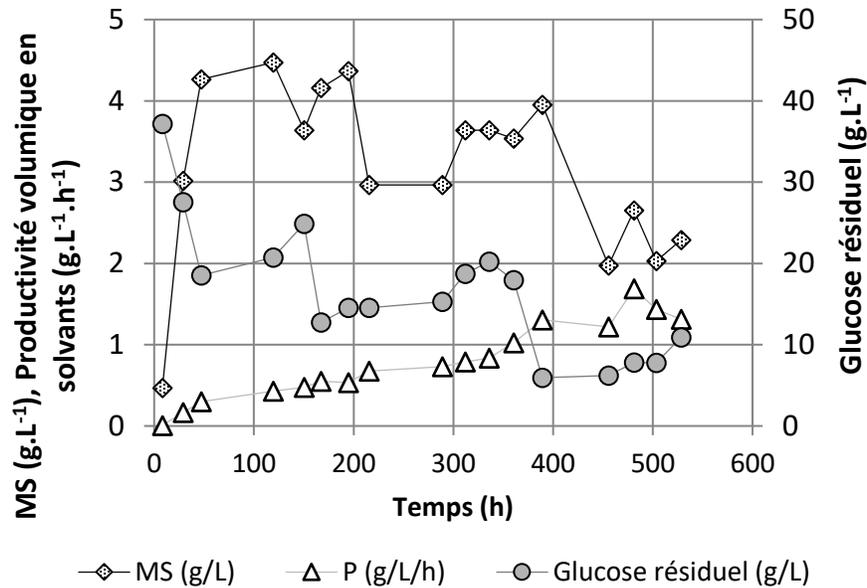


figure 43 : Évolution de la concentration en glucose résiduel, de la concentration en biomasse sèche en suspension ainsi que de la productivité volumique au cours d'une fermentation IBE à lit fixe effectuée à 34°C et à pH non régulé.

Toutefois, bien que la concentration en solvants soit stable lors de la fermentation et que la productivité volumique augmente, la concentration en biomasse en suspension est divisée par deux au fur et à mesure que le taux de dilution augmente. Cette dernière passe de 4,5 g.L⁻¹ à 120 h de fermentation à 2,3 g.L⁻¹ à 528 h de fermentation. Le mode de conduite du bioréacteur à biofilm permet donc l'augmentation de la productivité volumique, tout en faisant baisser la concentration en biomasse en suspension dans le réacteur au cours de l'essai étudié. L'augmentation de la productivité volumique est en effet due à la croissance du biofilm au sein des mousses en polyuréthane.

Toutefois, afin de mieux comprendre son influence sur la productivité du procédé, la dynamique de croissance de ce dernier a été étudiée et les résultats sont représentés sur la figure 44. La concentration en cellules actives immobilisées est rapportée au volume utile de bioréacteur. Ainsi, il est possible de comparer la concentration en cellules actives en suspension et immobilisées par rapport au volume utile du bioréacteur utilisé.

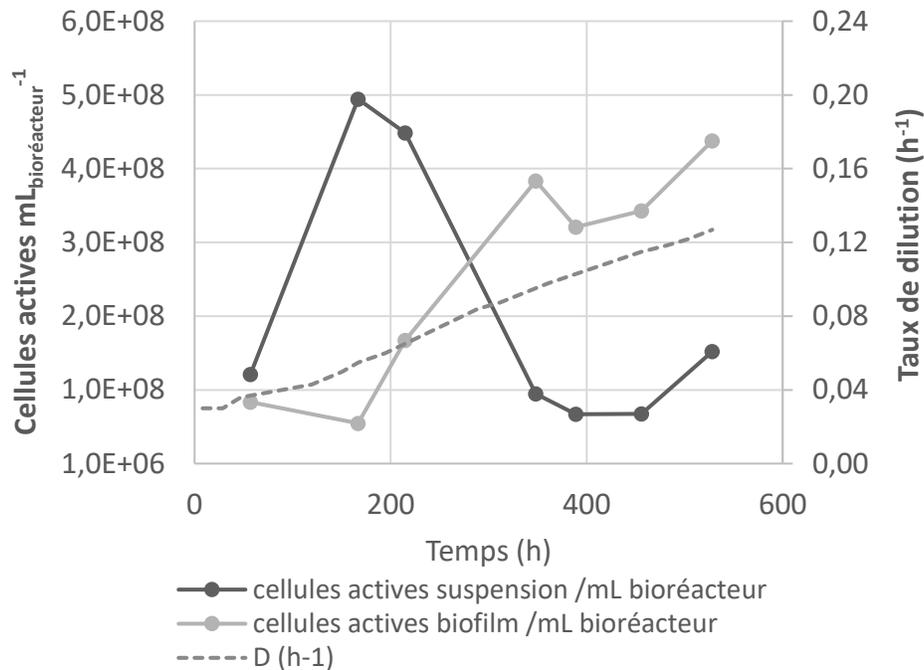


figure 44 : Nombre de cellules actives en suspension et immobilisées par volume de bioréacteur au cours d'une fermentation à cellules immobilisées.

La croissance du biofilm suit une dynamique en trois phases distinctes. En effet, lors des 150 premières heures de fermentation, le taux de dilution est compris entre $0,03 \text{ h}^{-1}$ et $0,05 \text{ h}^{-1}$ et la concentration en cellules actives immobilisées sur les mousses en polyuréthane stagne (elle représente entre $5,6 \cdot 10^7$ et $8,5 \cdot 10^7$ cellules actives.mL⁻¹). Lors de cette première phase, la concentration en cellules actives en suspension est plus importante que celle en cellules immobilisées et est comprise entre $1,2 \cdot 10^8$ et $5,0 \cdot 10^8$ cellules actives.mL⁻¹.

La deuxième phase du procédé se déroule entre 167 h et 316 h de fermentation. Le taux de dilution est augmenté linéairement de $0,05 \text{ h}^{-1}$ à $0,1 \text{ h}^{-1}$ pendant cette période et dépasse le taux de croissance maximale des cellules en phase solvantogène en suspension dans le bioréacteur. La concentration en cellules actives en suspension est alors divisée par près de 6 et passe de $5,0 \cdot 10^8$ cellules.mL⁻¹ à $9,0 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹. Au cours de cette période, la concentration en cellules actives immobilisées augmente de manière significative. Elle est multipliée par environ 7 et passe de $5,6 \cdot 10^7$ à $3,8 \cdot 10^8$ cellules actives immobilisées par mL de bioréacteur. Le taux de croissance des cellules actives du biofilm est de $0,01 \text{ h}^{-1}$ au cours de cette période.

Enfin, une phase de stagnation de la croissance des cellules actives immobilisées est observée après 336 h de fermentation. La concentration en cellules actives qui composent le biofilm oscille entre $3,8 \cdot 10^8$ et $4,4 \cdot 10^8$ cellules.mL⁻¹ tandis que la concentration en cellules actives en suspension varie entre $9,6 \cdot 10^7$ et $1,5 \cdot 10^8$ cellules.mL⁻¹. La forte concentration en butanol atteinte (jusqu'à 8 g.L^{-1}) pourrait expliquer pourquoi la croissance du biofilm est subitement

freinée après 350 h de fermentation. La concentration en cellules actives totales (immobilisées et en suspension) est stable tout au long de la fermentation et atteint en moyenne $4,6.10^8 \pm 1,4.10^8$ cellules.mL⁻¹. Toutefois ces cellules actives totales sont présentes à 90 % dans la phase liquide à 157 h de fermentation, puis elles sont majoritairement composées de cellules immobilisées (80 %), à partir de 348 h de fermentation.

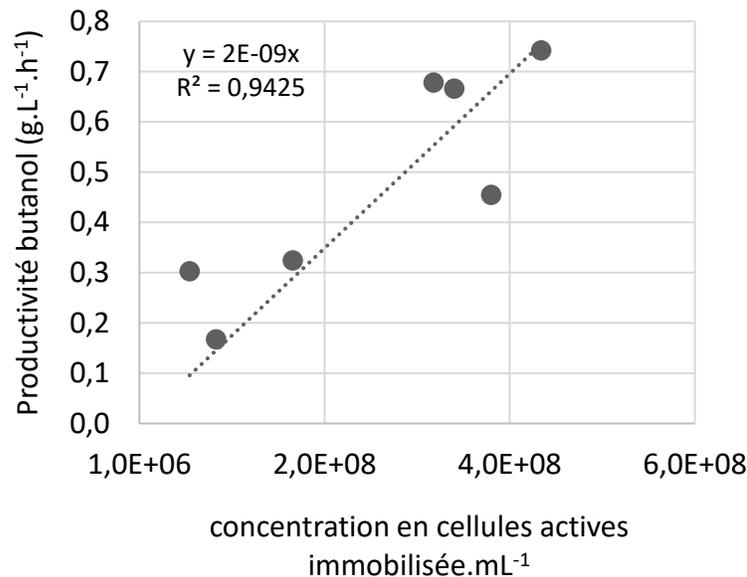


figure 45 Productivité en butanol en fonction de la concentration en cellules actives immobilisées détectées par cytométrie en flux.

La figure 45 montre l'évolution de la productivité volumique en butanol en fonction de la concentration en cellules actives immobilisées dans le bioréacteur. Sur cette figure, il est montré que la productivité volumique en butanol du bioréacteur à lit fixe est linéairement corrélée à la concentration en cellules actives immobilisées dans le bioréacteur. Cependant la productivité volumique en butanol n'est pas corrélée à la concentration des cellules actives en suspension lors des étapes de démarrage (données non présentées) . L'accumulation de biomasse active immobilisée a un impact important sur la productivité volumique du procédé. En effet, contrairement à la biomasse en suspension, cette dernière possède un temps de séjour décorrélié du temps de séjour hydraulique.

Toutefois, il est montré sur la figure 44 que, lorsque le taux de dilution appliqué au système est compris entre 0,05 h⁻¹ et 0,07 h⁻¹ (entre 195 et 289 h de fermentation), la concentration en cellules actives en suspension est maximale. Or le taux de croissance maximale des cellules en suspension productrices de solvants est de 0,05 h⁻¹ (Ahmed et al. 1988). Ainsi, malgré une forte concentration en cellules actives en suspension dénombrées par cytométrie en flux entre 170 h et 215 h de fermentation, la productivité volumique en solvants totaux reste faible (0,5-0,6 g.L⁻¹.h⁻¹). Cette forte concentration en cellules actives en suspension pourrait alors correspondre à un mélange

entre cellules en phases solvantogène et acidogène. En effet, l'augmentation du taux de croissance liée à la hausse du taux dilution pourrait entraîner une bascule métabolique des cellules en suspension. Ainsi, rapidement après le début de l'expérience, la majorité des cellules actives productrices de solvants seraient présentes dans le biofilm plutôt qu'en suspension dans le milieu liquide.

Si cette hypothèse était amenée à être vérifiée, le coefficient directeur de la droite de régression présentée figure 45 permettrait d'estimer la productivité spécifique en butanol des cellules du biofilm à l'aide de l'équation présentée ci-dessous. Cette dernière serait alors de $2.10^{-9} \text{ g}_{\text{butanol}} (\text{cellules.mL}^{-1})^{-1} . \text{L}^{-1} . \text{h}^{-1}$.

$$\underbrace{r_B}_{\text{vitesse de production de butanol}} \quad = \quad \underbrace{q_G}_{\text{productivité spécifique cellulaire}} \cdot \underbrace{X_v}_{\text{cellules actives}}$$

$(\text{g}_{\text{butanol}} . \text{L}^{-1} . \text{h}^{-1})$
 $(\text{g}_{\text{butanol}} . (\text{cellules.mL}^{-1})^{-1} . \text{L}^{-1} . \text{h}^{-1})$
 $(\text{cellules.mL}^{-1})$

De manière surprenante, la valeur de cette productivité spécifique cellulaire en butanol est la même que celle estimée pour les cellules en suspension dans le cas des fermentations en batch présenté sur la figure 41-B. Ces données permettraient donc de calculer à posteriori le développement du biofilm dans les bioprocédés à cellules immobilisées à partir des productivités volumiques en butanol obtenues.

L'étude de la concentration en cellules actives immobilisées dans les mousses en polyuréthane a permis de mettre en lumière la dynamique de colonisation des solides supports par *Clostridium beijerinckii* et de montrer que la concentration en cellules actives immobilisées détectées par cytométrie en flux est corrélée à la productivité volumique obtenue dans le bioréacteur à cellules immobilisées.

Le maintien d'une biomasse active au cours du temps est essentiel pour l'opérabilité des fermentations à lit fixe sur des longues périodes. En effet, des cellules lysées, ne participant plus à la production, peuvent s'accumuler dans les solides supports. L'accumulation d'une trop grande quantité de biomasse inactive peut également provoquer des bouchages. Afin de mieux comprendre ces phénomènes, l'évolution de la part de cellules viables, altérées et mortes au cours de la fermentation a été étudiée

3.2 Analyse de la viabilité du biofilm

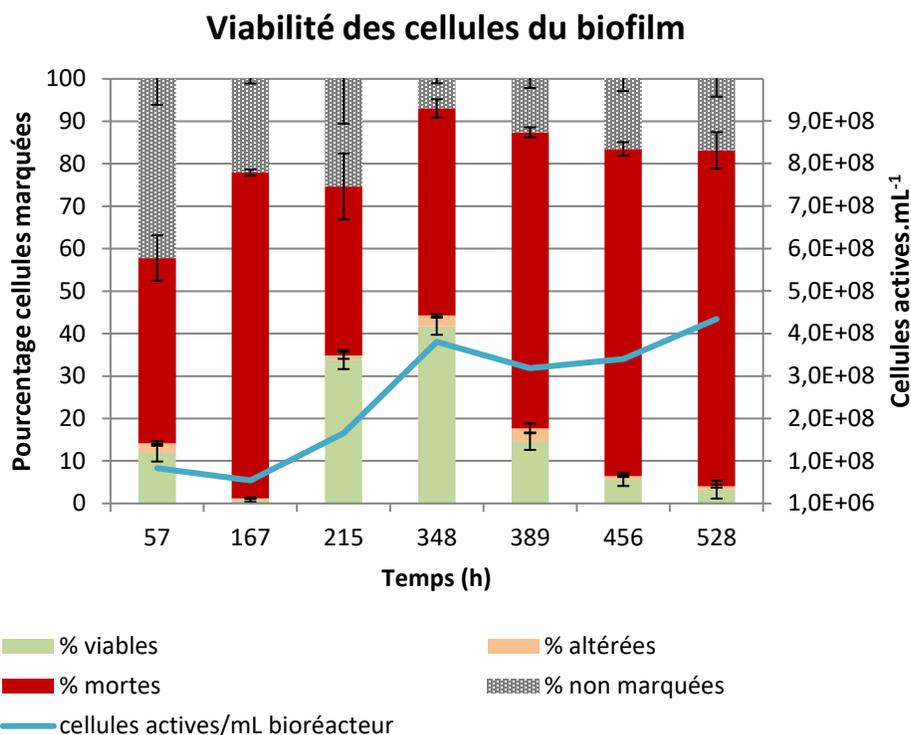


figure 46 : Évolution du pourcentage de cellules viables, altérées mortes et non marquées immobilisées sur les mousses en polyuréthane (Les points représentent les moyennes et les barres d'erreurs représentent les écarts types sur trois expériences)

La figure 46 montre l'évolution du pourcentage de cellules viables, altérées, mortes et non marquées qui composent le biofilm au cours de l'essai. La part de cellules viables qui composent le biofilm baisse entre 57 h et 167 h de fermentation pour passer de $11,9 \pm 2,2$ % à $0,8 \pm 0,4$ %. Le pourcentage remonte pour atteindre un pic de $41,7 \pm 2,5$ % à 348 h de fermentation puis baisse de nouveau pour atteindre $3,3 \pm 0,8$ % à la fin de l'expérience. Ces données nous indiquent que, bien que la concentration en cellules actives immobilisées soit en augmentation au cours de la fermentation, les cellules mortes s'accumulent dans les solides supports utilisés après 300 h de fermentation dans les conditions étudiées. Cette accumulation semble d'autant plus rapide que les concentrations en butanol sont élevées et s'approchent du seuil de toxicité entre 350 h et 390 h de fermentation.

L'analyse de la viabilité des cellules en suspension, présentée figure 47, montre que ces dernières suivent une dynamique bien distincte des cellules immobilisées. En début d'essai, lors des 215 premières heures de la fermentation continue, le pourcentage de cellules viables analysées par cytométrie en flux est compris entre 20,5 et 40 %. Or, une fois que le taux de dilution dépasse $0,07 \text{ h}^{-1}$ à partir de 220 h, le pourcentage de cellules viables en suspension baisse drastiquement

pour atteindre 10 % après 350 h d'essai. Toutefois, le pourcentage de cellules viables en suspension remonte progressivement entre 348 h et 528 h de fermentation. Ce dernier passe en effet de 6,6 % à 33,9 % au cours de cette période.

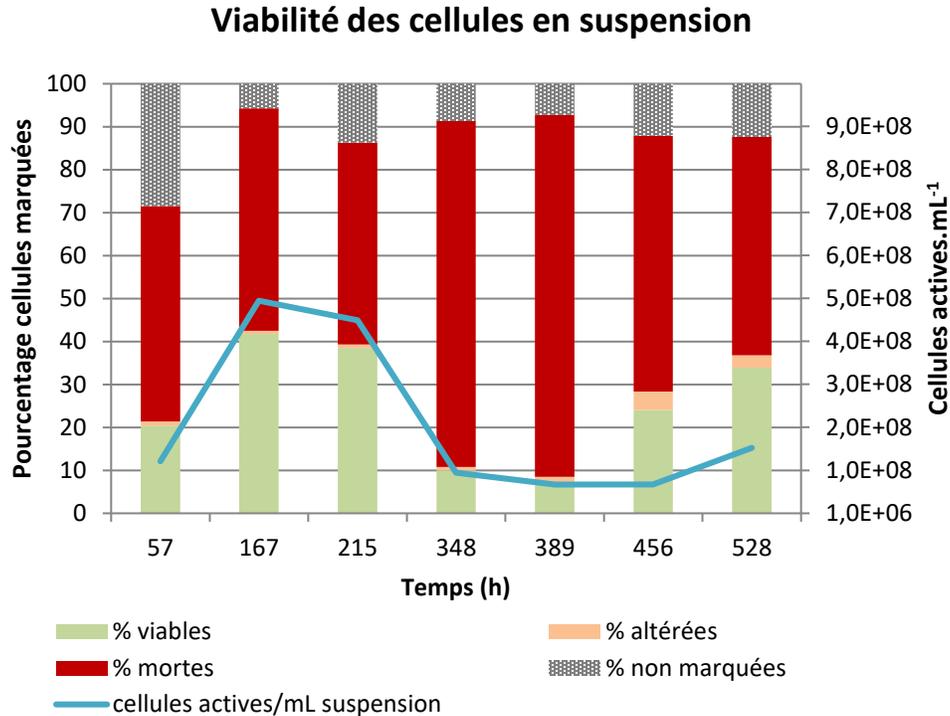


figure 47 : Évolution du pourcentage de cellules viables, altérées mortes et non marquées en suspension

Dans les conditions étudiées, la part de cellules actives qui composent le biofilm semble influencée par la concentration en butanol dans le bioréacteur étudié. Malgré l'accumulation importante de cellules mortes, aucune baisse de performance n'a été observée au cours de l'essai.

Lorsque le taux de dilution appliqué au système dépasse $0,07 \text{ h}^{-1}$, les cellules en suspension commencent à être lessivées (figure 43). La part importante de cellules mortes en suspension lorsque les taux de dilution appliqués au système sont élevés ($> 0,1 \text{ h}^{-1}$) indique que les cellules en suspension observées pourraient provenir de cellules décrochées du biofilm. En effet, comme le temps de séjour est court, les cellules mortes auraient un temps de séjour trop court pour s'accumuler dans le bioréacteur. Par conséquent, une part importante des cellules analysées en suspension après 300 h de fermentation proviendrait du biofilm.

Toutefois, une concentration importante en cellules actives en suspension (entre $7,0 \cdot 10^7$ et $1,5 \cdot 10^8 \text{ cellules.mL}^{-1}$) est ensuite observée à partir de 456 h de fermentation bien que le taux de dilution soit élevé ($> 0,1 \text{ h}^{-1}$). Ces dernières devraient alors en majorité provenir du décrochement des cellules du biofilm. Cependant, au cours de cette même période, le pourcentage de cellules

viables en suspension augmente (de 10 % à 33,9 %) tandis que le pourcentage des cellules viables immobilisées baisse (de 41,7 % à 3,3 %). Ces résultats pourraient indiquer que plus de cellules viables que de cellules mortes sont décrochées lorsque le biofilm étudié est plus mature. Néanmoins, bien que le pourcentage de cellules viables soit plus important chez les cellules en suspension que dans le biofilm, la concentration de cellules actives immobilisées reste entre trois et cinq fois plus importante que la concentration en cellules actives en suspension après 350 h de fermentation.

Gallazzi et al. (2015) ont étudié la viabilité des cellules de *C. pasteurianum* DSM525 par cytométrie en flux en suspension au cours d'une fermentation à lit fixe en utilisant les mêmes sondes fluorescentes que celles employées dans cette étude (cFDA et IP). Ces derniers ont observé des phénomènes différents que ceux présentés dans cette étude. En effet, ils ont obtenu deux états stationnaires au cours de leur essai pour des taux de dilution de $0,13 \text{ h}^{-1}$ et $0,44 \text{ h}^{-1}$. Les auteurs ont uniquement analysé la viabilité des cellules en suspension dans le bioréacteur. La viabilité cellulaire baisse lorsque que le taux de dilution est augmenté de $0,13 \text{ h}^{-1}$ à $0,44 \text{ h}^{-1}$ tandis que la concentration en cellules totales augmente. Les auteurs proposent également que la viabilité des cellules en suspension décrochées du biofilm donne des indications sur l'état du système tout entier.

Toutefois, l'expérience réalisée au cours de cette thèse semble montrer que la viabilité cellulaire des cellules en suspension peut varier en fonction de nombreux facteurs dépendant de l'âge et de la viabilité des cellules qui composent le biofilm, ainsi que de leur emplacement au sein des solides supports. Ainsi, la viabilité des cellules qui composent le biofilm diffère de celles des cellules en suspension. Ces interprétations sont toutefois à nuancer, car la dynamique de formation des biofilms varie vraisemblablement en fonction des souches utilisées, des systèmes développés, de la conduite du procédé (taux de dilution et concentration en butanol) et des supports utilisés pour la croissance du biofilm. Au cours de l'étude présentée dans ce chapitre, l'analyse des cellules du biofilm par cytométrie en flux tout au long de la fermentation immobilisée a permis de décrire plusieurs phénomènes.

- Les cellules actives en suspension représentent la majorité des cellules actives dans le bioréacteur à lit fixe lors des 300 premières heures de fermentation.
- La productivité volumique en butanol est corrélée linéairement à concentration en cellules immobilisées.
- La proportion de cellules viables qui composent le biofilm décroît au cours de la fermentation à lit fixe après 350 h de fermentation.
- La biomasse inactive s'accumule sur le support au cours du temps.
- Les cellules viables en suspension après 350 h de fermentation proviendraient en majorité du biofilm. Leur proportion tend à augmenter avec le temps. Ce phénomène indiquerait un

décrochage plus important des cellules viables que des cellules mortes du biofilm. Ce phénomène pourrait être expliqué par la disposition des cellules actives sur les couches externes du biofilm, à l'endroit où l'accès au substrat est le plus aisé.

Comme développé tout au long de ce chapitre, lors des démarrages des fermentations immobilisées, la dynamique de colonisation des solides supports par les cellules viables joue un rôle prépondérant sur les performances du procédé. Toutefois, l'analyse et le prélèvement des solides supports sur lesquels le biofilm se développe sont complexes à mettre en œuvre à des échelles laboratoires et pilotes. Un moyen de monitorer la croissance du biofilm en continu a donc été proposé lors de la partie suivante.

4 Stratégie de contrôle de croissance du biofilm en ligne

4.1 Production de gaz et viabilité cellulaire au cours des fermentation en batch.

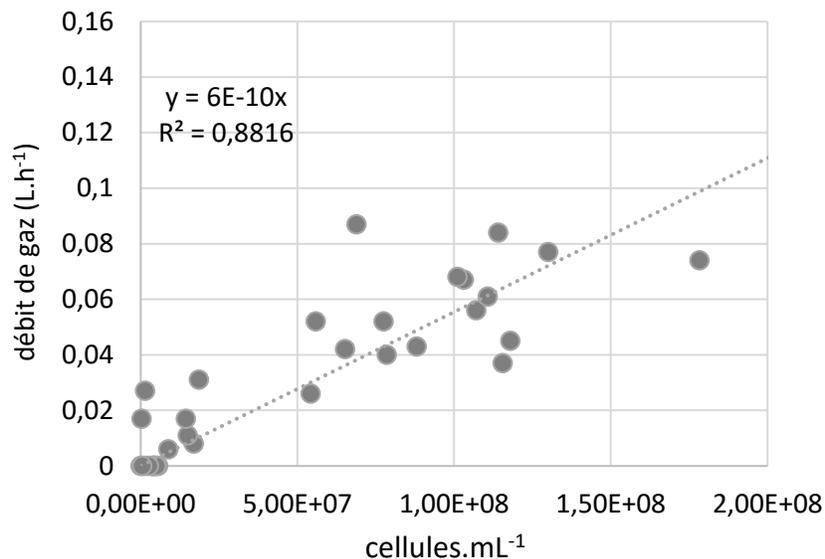


figure 48 : Représentation du débit gazeux par volume utile de bioréacteur (L) ainsi que de la concentration en cellules marquées au cFDA au cours d'une fermentation type batch, à pH non régulé et à température régulée à 34°C.

Au cours des essais en fermentations discontinues décrits au cours de la partie 2.1.1, le débit de gaz produit par les bactéries est mesuré à l'aide d'un compteur volumétrique Ritter. La figure 48 montre qu'une relation linéaire entre débit de gaz et concentration en cellules actives mesurée par cytométrie en flux a été trouvée. Cette dernière permet d'estimer la productivité spécifique cellulaire en gaz de fermentation. La cytométrie en flux, contrairement à la mesure de la concentration en masse sèche, permet de mesurer les cellules actives parmi la biomasse totale, ce qui permet de calculer avec plus de précision les productivités spécifiques du procédé.

La productivité spécifique mesurée de manière expérimentale peut notamment être utilisée dans des modèles dynamiques afin d'estimer la quantité totale de gaz de fermentation produits au cours du temps. Ce paramètre peut également être utilisé afin de calculer la quantité totale de cellules actives à partir des débits de gaz observés selon la relation suivante :

$$\underbrace{r_G}_{\text{vitesse de production de gaz}} \quad (L_{\text{gaz}}.h^{-1}) = \underbrace{q_G}_{\text{productivité spécifique cellulaire}} \cdot \underbrace{X_v}_{\text{cellules actives}} \quad (L_{\text{gaz}}.(cellules.mL^{-1})^{-1}.h^{-1}) \quad (cellules.mL^{-1})$$

Ainsi il est possible d'estimer X_v si q_G est connu et constant dans le temps. La valeur du paramètre q_G identifiée expérimentalement sur la figure 48 est donc conservée et peut être utilisée afin d'estimer la concentration en cellules actives au cours d'une fermentation continue à cellules libres.

4.2 Validation de l'estimation via une analyse d'une fermentation continue à cellules libres

Afin de savoir si cette relation peut être appliquée à un autre jeu de données, une fermentation continue à cellules libres a été effectuée. Le pH est fixé par une consigne au cours de ce test afin de ne pas descendre en dessous de 5 et la température du test a été fixée à 34°C. Le débit de gaz est mesuré en ligne à l'aide d'un compteur volumétrique Ritter. Des prélèvements ont été effectués tous les jours afin d'analyser le glucose résiduel, ainsi que les métabolites de fermentation (acides et solvants). Au cours de ces prélèvements, la viabilité des cellules en suspension a également été étudiée par cytométrie en flux.

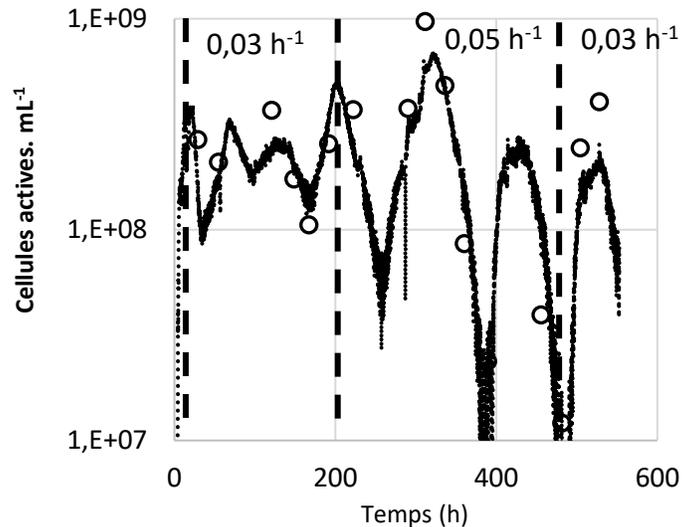


figure 49 : évolution du nombre de cellules actives par mL de bioréacteur mesuré par cytométrie en flux (points noirs) et estimé grâce à la mesure en continu de la moyenne lissée du débit de gaz (trait pointillés noirs) au cours d'une fermentation continue à cellules libres à 34°C, avec consigne de pH minimal fixé à 5.

La concentration en cellules actives expérimentale ainsi que celle estimée par la relation linéaire décrite sur la figure 48 sont présentées sur la figure 49. Sur la figure 49 représentant la concentration en cellules actives estimée par rapport aux données expérimentales, le coefficient de détermination obtenu est élevé ($R^2 = 0,87$) et le coefficient directeur de la droite de régression est de 1,3. Ces données indiquent que la concentration en cellules actives est sous-estimée. Toutefois, l'évolution de la concentration est correctement prédite par cette relation linéaire, malgré les changements des taux de dilution ainsi que les états non-stationnaires observés au cours de la fermentation continue.

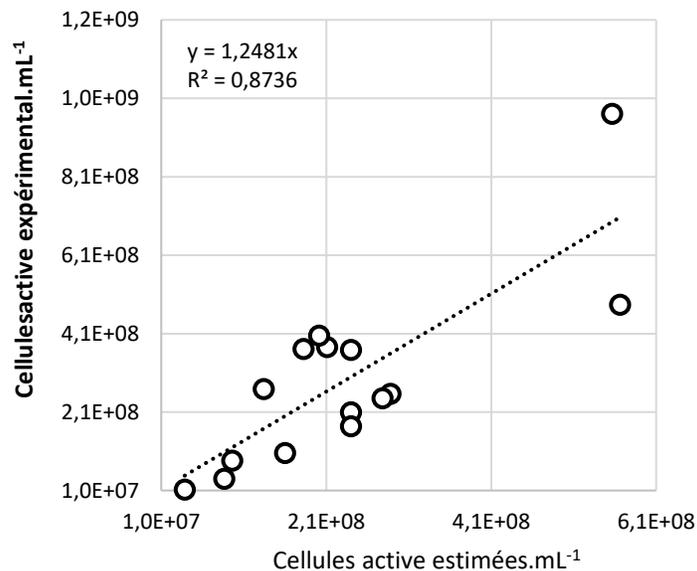


figure 50 : Comparaison entre cellules actives en suspension mesurée expérimentalement au cours d'une fermentation continue à cellules libres à pH fixé à 5 et température régulée à 34 °C et concentration en cellules actives estimée à partir du débit de gaz.

Le débit de gaz est donc une mesure en ligne bien adaptée pour estimer la concentration en cellules actives totales dans le bioréacteur. Afin de vérifier si ces mesures peuvent s'appliquer au suivi de la croissance du biofilm au cours du temps, une mesure du débit de gaz au cours de la croissance du biofilm doit être effectuée. Les cellules totales estimées devraient alors correspondre à la somme entre cellules actives en suspension et cellules actives immobilisées. Ainsi, une analyse de viabilité par cytométrie en flux des cellules en suspensions permettrait d'estimer grâce au débit de gaz, la quantité de cellules actives qui composent le biofilm et ainsi mieux opérer ces procédés de fermentation.

Cette méthode pourrait permettre de mesurer et de suivre le développement des biofilms au sein des bioréacteurs à cellules immobilisées sans effectuer de prélèvement de solides supports dans le bioréacteur. Ceci permettrait de s'affranchir des biais liés à ces prélèvements (risque de contamination, entrée d'oxygène dans le réacteur, etc.). L'emploi de cette méthode nécessite

toutefois, que la productivité spécifique cellulaire en gaz des cellules en suspension soit égale à celle des cellules qui composent le biofilm. La productivité spécifique cellulaire en butanol semble être constante entre cellules en suspension et cellules immobilisées, ce qui pourrait indiquer que le même phénomène pourrait être observé pour la productivité spécifique en gaz.

5 Conclusion du chapitre

L'étude de la cinétique de production des métabolites en batch a permis de mettre en avant plusieurs phénomènes. La viabilité cellulaire au cours du temps a été mesurée pour deux essais, décalés dans le temps, et réalisés en triplicats. La concentration en cellules actives stagne entre 13 et 40 h de fermentation alors que le pourcentage de cellules viables diminue à partir de la 13^{ème} heure de fermentation jusqu'à la fin de la fermentation ($9,7 \cdot 10^7 \pm 2,4 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹ à $7,5 \cdot 10^7 \pm 1,0 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹ sur cette période). La mortalité cellulaire observée pourrait augmenter au moment du passage de la phase acidogène à la phase solvantogène (Branska et al. 2018). Elle est accélérée une fois que la concentration seuil en butanol (environ 7 g.L⁻¹) est atteinte. La concentration en cellules actives est mieux corrélée à la productivité en butanol au cours de la fermentation IBE en batch que la masse sèche cellulaire. Les résultats montrent que la productivité spécifique cellulaire est stable pour les cellules actives. Cette étude confirme ce qui a déjà été observé par Branska et al. (2018), à savoir que le switch métabolique semblerait avoir un impact sur la viabilité cellulaire en plus de celui de la toxicité des acides carboxyliques et du butanol.

Or, au cours des fermentations à cellules immobilisées de nombreuses cellules mortes et donc non productrices de solvants s'accumulent sur le solide support. La biomasse totale mesurée peut donc être, dans une certaine mesure, décorrélée de la productivité du bioréacteur. Afin de mesurer l'impact de la formation du biofilm sur la productivité du bioréacteur étudié, la concentration en cellules actives qui composent le biofilm a été étudiée.

Au cours de cet essai, les cellules actives en suspension représentent la majorité des cellules actives dans le bioréacteur à lit fixe lors des 300 premières heures de fermentation. La productivité volumique en butanol est corrélée linéairement à la concentration en cellules immobilisées au cours du procédé étudié. La proportion de cellules viables qui composent le biofilm décroît au cours de la fermentation à lit fixe après 350 h de fermentation. Ce phénomène est causé par l'accumulation de cellules mortes et de débris cellulaires. Les cellules en suspension observées après 350 h de fermentation, à des taux de dilution supérieurs à 0,1 h⁻¹, sont issues du décrochage des cellules du biofilm. Or, ces dernières ont un pourcentage de viabilité plus élevé que les cellules du biofilm. Ce phénomène pourrait être causé par le lessivage rapide des cellules mortes dans le bioréacteur, ainsi qu'à un décrochage préférentiel des cellules actives situées sur les couches externes du biofilm.

Afin de simplifier les suivis de développement du biofilm et d'estimer la part de cellules productives immobilisées une méthode d'estimation de cellules viables par le suivi du débit de gaz en ligne a été développée. Cette méthode a été validée en estimant de manière continue avec succès la concentration en cellules actives en suspension dans un bioréacteur continu à cellules libres. Cette méthode doit être validée lors d'un essai en bioréacteur à cellules immobilisées. Cette dernière permettrait d'estimer la concentration en cellules actives immobilisées à partir de la mesure du débit de gaz et d'une analyse de viabilité des cellules en suspension par cytométrie en flux.

Discussion et conclusion générale

L'étude bibliographique a permis de mettre en évidence que les bioréacteurs à biofilm sont employés à l'échelle laboratoire afin d'augmenter les productivités du procédé de production de butanol et d'isopropanol par voie fermentaire. Cependant, la plupart de ces études se focalisent sur la phase stationnaire et ne s'intéresse donc pas à la phase de montée en débit qui peut prendre entre plusieurs jours et plusieurs semaines selon la configuration du réacteur étudié. Afin d'optimiser la production de butanol et d'isopropanol, la montée en débit des procédés de fermentation à lit fixe a été plus particulièrement étudiée au cours de cette thèse.

En effet, la formation d'un biofilm est un phénomène dynamique et multicritères. Par conséquent, un modèle cinétique a été développé afin de décrire l'évolution du système étudié. Ce type de modèle simplifie les cinétiques du métabolisme afin de décrire seulement les réactions principales observées dans le bioréacteur. Deux populations cellulaires ont ainsi été décrites : les cellules immobilisées ainsi que les cellules en suspension. Premièrement, les paramètres cinétiques propres à la production des métabolites ont été identifiés à l'aide d'expériences réalisées en batch. Les paramètres relatifs à l'attachement des cellules en suspension au support ainsi qu'au détachement du biofilm vers le milieu liquide ont ensuite été estimés grâce à l'emploi d'un bioréacteur à biofilm. Le modèle a ainsi permis de décrire les cinétiques de production et d'estimer la masse de biofilm finale immobilisée lors d'une fermentation en bioréacteur colonne avec une erreur d'environ 20 % comparée aux données expérimentales. Bien qu'imparfait, ce modèle est une première piste pour décrire les dynamiques de croissance des biofilms dans les bioréacteurs à lit fixe et appliqué à la fermentation IBE.

Afin d'aller plus loin, Raganati et al. (2016) ainsi que Qureshi et al. (1988) ont proposé des modèles qui décrivent la part des cellules productrices de solvants et d'acides ainsi que la part de cellules inactives du biofilm à l'état stationnaire dans des bioréacteurs à lit fixe. Bien que ces modèles soient utiles pour comprendre les phénomènes qui se déroulent une fois un état stationnaire obtenu, ces derniers ne décrivent pas la dynamique de formation de ces biofilms au cours de tels procédés. De plus, la biomasse pourrait devenir inactive au cours du temps. En effet, la biomasse

inactive représenterait une part non-négligeable de la masse du biofilm (Qureshi et al. 1988; Halan et al. 2012). Afin d'étudier plus en détail ce phénomène d'inactivation et éventuellement améliorer la structure des modèles, la part de cellules viables et actives qui composent le biofilm doit être caractérisée.

Deux pistes ont alors été proposées pour analyser la viabilité du biofilm. D'une part, la microscopie confocale, qui permet de réaliser des analyses en trois dimensions de la biomasse répartie sur les solides supports, a été employée afin de caractériser la viabilité cellulaire des biofilms formés par des clostridia solvantogènes en batch (Zhang et al. 2021; Zhuang et al. 2017). D'autre part, la cytométrie en flux permet une analyse multi-paramétrique de chaque cellule composant une suspension. Cette technique a été utilisée pour caractériser les cellules en suspension de plusieurs souches de *Clostridia* solvantogènes (Linhová et al. 2010; González-Peñas et al. 2015; Patakova et al. 2014). Toutefois, une méthode de décrochage et déstructuration du biofilm doit être développée afin de pouvoir analyser avec cet outil les cellules qui le composent.

Bien que les premiers essais réalisés afin de distinguer les EPS des cellules composant le biofilm aient été encourageants, la microscopie confocale présente plusieurs inconvénients pour être utilisée pour des analyses quantitatives. En effet, le support utilisé est auto-fluorescent dans les conditions d'étude ce qui entrave les analyses quantitatives obtenues. De plus, de larges pertes de matières ont été observées au cours de la préparation de l'échantillon, ce qui rend l'analyse du biofilm complexe à réaliser. Par conséquent, le développement d'une méthode d'analyse de la viabilité par cytométrie en flux a été préférée. Cette dernière vise à décrocher le biofilm par agitation au vortex, puis à déstructurer les agrégats obtenus par un traitement enzymatique afin d'extraire les cellules composant le biofilm. La technique présentée dans cette thèse a permis de mettre en évidence que lorsque la DNase I et la protéinase K sont employés séquentiellement, les cellules et le bruit de fond généré par les EPS et débris cellulaires peuvent être séparés par cytométrie en flux. En effet, ces deux enzymes ont déjà été utilisées seules ou séquentiellement afin de disperser les biofilms formés par de nombreuses espèces bactériennes (Villarreal et al. 2013; Nguyen and Burrows 2014; Nijland et al. 2010; Lim et al. 2019a).

Ce traitement enzymatique a ensuite permis de réaliser un suivi, par cytométrie en flux, de la cinétique de colonisation des mousses en polyuréthane, utilisées comme support, par les cellules composant le biofilm. Ces analyses ont mis en lumière la diminution de la quantité de cellules actives en suspension au profit de celles immobilisées au cours de la fermentation à lit fixe. La part de cellules actives qui composent le biofilm décroît au fur et à mesure de la fermentation bien que la concentration en cellules actives du biofilm, elle, augmente. Par conséquent, le pourcentage de cellules mortes qui composent le biofilm augmente. Les cellules mortes s'accumulent donc dans le biofilm, ce qui pourrait causer, à des temps plus longs, une baisse de performance du système. L'analyse de la viabilité des cellules en suspension montrerait que ces

dernières proviendraient des détachements du biofilm après que le taux de dilution ait été augmenté à une valeur seuil d'environ $0,7 \text{ h}^{-1}$.

Les dynamiques de colonisation des solides supports pour la fermentation IBE n'avaient jamais été décrites pour les procédés continus à cellules immobilisées. De la même manière, la viabilité du biofilm formé au cours de ce processus complexe n'avait encore jamais été étudiée. Cette étude a permis de donner de nouvelles pistes quant à la conduite à effectuer lors des montées en régime des bioréacteurs à lit fixe afin de maximiser la biomasse viable au sein des mousses en polyuréthane utilisées.

Perspectives

1 Modélisation

1.1 Modèle cinétique

Les travaux de cette thèse ouvrent ainsi de nombreuses perspectives. Tout d'abord, le modèle cinétique développé pourrait être enrichi. Idéalement, il pourrait prendre en compte l'effet du pH sur la croissance des bactéries comme ce dernier n'est pas fixé au cours des fermentations étudiées. De plus, les phénomènes de diffusion peuvent survenir au sein des solides supports étudiés, le modèle pourrait être complexifié pour prendre en compte les phénomènes de transports au sein des solides poreux ainsi qu'au sein du biofilm formé. Enfin, les cinétiques d'attachement et de détachement pourraient être mieux décrites en menant des expériences plus approfondies sur les cinétiques d'adhésion et de détachement par exemple.

La cytométrie en flux s'est révélée être un outil pertinent pour dénombrer les cellules viables qui composent le biofilm. Les données obtenues ont permis de calculer la productivité spécifique cellulaire. Ces données permettraient de mieux estimer la biomasse immobilisée active dans les bioréacteurs à lit fixe au cours des montées en régime. Des modèles cinétiques pourraient être créés à partir de ces données afin de mieux comprendre et décrire les phénomènes qui entraînent une hausse de la mortalité ou de la sporulation dans les bioréacteurs employés.

1.2 Taux de purge et taux de cisaillement

Lorsque des procédés à rétention cellulaire sont employés, le taux de purge représente la fraction de cellules viables sorties du réacteur comparé à la biomasse totale immobilisée dans le bioréacteur. Dans le cas du bioréacteur à cellules immobilisées ce taux de purge n'est pas connu. Pourtant, la connaissance de ce paramètre est essentielle pour éviter une accumulation en biomasse non active dans le bioréacteur. Le taux de purge pourrait alors être modélisé en fonction de plusieurs paramètres relatifs à l'âge et l'épaisseur du biofilm étudié ainsi qu'à la vitesse d'écoulement dans le bioréacteur. Ces modèles pourraient alors mieux décrire la vitesse de

décrochage des cellules des biofilms et ainsi permettre une meilleure prédiction de la productivité des procédés à cellules immobilisées.

2 Conduite de procédé

Lors des phases de montée en débit, les cellules en suspension et les cellules du biofilm cohabitent. La stratégie de montée en débit proposée consiste à augmenter le taux de dilution au fur et à mesure de la croissance des cellules immobilisées. En effet, au fur et à mesure que le biofilm s'installe, la production de butanol dans le bioréacteur augmente. Si le taux de dilution est augmenté à la même vitesse que la croissance du biofilm, la concentration en solvants reste alors stable au cours du temps, si possible en dessous de la concentration inhibitrice. Toutefois, comme observé au cours des essais en bioréacteur à lit fixe, la croissance du biofilm n'est pas linéaire et sa cinétique de croissance est difficilement prédictible. En effet, cette dernière dépend à la fois de la croissance des cellules actives, de la vitesse de décès de ces dernières ainsi que du détachement des cellules du biofilm.

2.1 Analyse en ligne

Ainsi, de nouvelles méthodes de mesure en ligne permettraient de mieux estimer la part de biomasse active immobilisée dans les bioréacteurs à lit fixe au cours du temps. Les travaux de cette thèse ont montré que la mesure du débit de gaz en ligne est corrélée à la concentration en cellules actives dans le bioréacteur. Ainsi, cette mesure permettrait d'estimer le nombre total de cellules actives dans le système. Une simple mesure de viabilité des cellules en suspension permettrait alors de remonter à la part de cellules actives immobilisées. Toutefois, cette hypothèse doit encore être vérifiée expérimentalement au cours des suivis de fermentation à cellules immobilisées.

2.2 Automatisation de la montée en débit

Une fois les analyses en lignes validées, une automatisation de la montée en débit pourrait être envisagée. Cette dernière consisterait à fixer une consigne sur le rapport entre le débit de gaz et le débit d'alimentation en entrée du bioréacteur. L'automatisation consisterait alors à paramétrer un contrôleur PID agissant sur le débit d'alimentation de manière à que ce dernier puisse s'adapter à l'augmentation constante de la production de gaz au cours de la colonisation du solide support par le biofilm. Le contrôleur devra alors être paramétré de sorte que le débit d'alimentation n'oscille pas autour d'une valeur, mais augmente de manière constante. La mise au point de ce contrôleur permettrait de simplifier la montée en débit pour ce type de procédé. Une fois les problèmes relatifs au pilotage de ce type de procédé réglés, d'autres sujets permettant l'amélioration de la compétitivité du procédé pourraient être étudiés.

3 Performance du procédé

3.1 Optimisation des OPEX

Au cours de ce manuscrit de thèse, l'amélioration de la productivité volumique a été de nombreuses fois abordée afin d'améliorer le coût d'investissement pour la production industrielle. Cependant le coût opératoire du procédé doit également être abordé. Un des aspects clé du coût opératoire est le substrat industriel choisi. Au cours de cette thèse, du milieu de culture contenant des sucres de première génération (issus de la biomasse alimentaire) ont été utilisés. Toutefois, ce dernier pourrait être remplacé par un autre type de substrat dans le cas d'une production à plus grande échelle afin d'éviter une compétition avec la biomasse alimentaire.

Par conséquent, des sucres issus de la biomasse lignocellulosique (substrat 2G) pourraient être employés dans un futur procédé de production. Toutefois, ces substrats industriels possèdent des propriétés physico chimiques différentes des milieux utilisés au cours de cette thèse. Ces substrats pourraient avoir un impact sur la capacité de la souche à former un biofilm sur le matériau choisi. L'influence du type de substrat choisi sur la capacité de la souche à former un biofilm doit donc être étudiée afin de vérifier si les rendements obtenus et le développement du biofilm sont encore optimaux dans les conditions opératoires choisies.

Afin de maximiser l'utilisation du substrat, la concentration résiduelle en sucre en sortie de bioréacteur doit être le plus proche possible de zéro. Toutefois, il est possible que ce mode de conduite ait un impact sur le biofilm. En effet si la concentration en substrat mesurée en sortie de réacteur est proche de zéro, il est possible que les couches les plus profondes du biofilm se retrouvent en situation de carence en substrat. Ce mode de conduite pourrait alors avoir un effet délétère sur la viabilité du biofilm. Si cette hypothèse est confirmée, un compromis entre rendement, productivité et titre final doit être trouvé afin d'optimiser le procédé.

3.2 Robustesse du procédé

De la même manière, le procédé développé doit être peu sensible aux contaminations et opérable sur un temps long afin de maximiser le taux d'utilisation des bioréacteurs. Dans la configuration actuelle, du milieu riche est utilisé pour l'alimentation du bioréacteur à cellules immobilisées. Ce dernier est propice au développement de microorganismes étrangers qui pourrait altérer les performances du bioréacteur en cas de contamination. Pour éviter cet inconvénient, la source de carbone ainsi que les sels minéraux/ source d'azote pourraient être séparés dans deux cuves d'alimentation distinctes afin de limiter le risque de contamination et ainsi améliorer la robustesse du procédé.

3.3 Choix du solide support

Le choix du solide support est critique pour le développement d'un tel bioprocédé. En effet, ce dernier doit posséder une surface spécifique importante et favoriser l'adhésion initiale des cellules. Le solide support choisi doit également être en mesure d'accueillir une grande quantité de biomasse active et permettre le renouvellement de celle-ci tout au long du procédé. Les mousses en polyuréthane choisies ont permis d'obtenir de bonnes productivités maximales après une phase de montée en débit. Toutefois, l'effet de certains paramètres du solide sur la productivité (tels, la densité de pore ou le diamètre des pores) pourrait être étudié. En effet, dans le cas étudié au cours de cette thèse, l'impact de la structure poreuse du support choisi sur les performances du procédé est encore peu clair. Lorsque les mousses en polyuréthane sont utilisées, les pores semblent être comblées relativement rapidement par le développement du biofilm. La tomographie par cohérence optique (TCO) permettrait de comprendre ce phénomène à l'échelle du solide étudié (de l'ordre du millimètre) et serait complémentaire à la microscopie confocale utilisée pour caractériser ces phénomènes. Des solides comme les anneaux Kaldnes pourraient être employés en lit fixe afin d'étudier la relation entre surface spécifique et porosité sur les performances des procédés de fermentations à cellules immobilisées appliqués à la production de butanol et d'isopropanol. Ces derniers ont l'avantage d'être déjà caractérisés et de pouvoir être analysés par TCO et par microscopie confocale.

4 Montée en échelle

La meilleure compréhension de la vitesse de colonisation du biofilm ainsi que sa répartition au sein des solides supports choisis doivent aider à la montée en débit du procédé étudié. En effet, les phénomènes de transport doivent être maîtrisés afin d'assurer un mélange homogène et éviter l'apparition de zones mortes au sein des solides supports. Ces phénomènes pourraient être causés par l'apparition de conditions défavorables à la croissance des bactéries (forte concentration en butanol, faible concentration en substrat etc) engendré par le faible renouvellement du milieu de culture à cet endroit du bioréacteur. Ainsi un travail pourrait être effectué afin de s'assurer de l'effet du diamètre interne du bioréacteur pour un volume utile égal et une concentration en solide support constante sur les phénomènes de transport au sein du lit fixe développé.

La croissance du biofilm au sein des bioréacteur à lit fixe engendre une augmentation de la production de gaz de fermentation (un mélange H_2/CO_2) au cours du temps. Ainsi plusieurs phénomènes devraient être étudiés au cours de la montée en débit. La vitesse de sortie de gaz à travers la section de la colonne devrait être analysée afin d'éviter des phénomènes de rétention de gaz dans le bioréacteur. Cette rétention pourrait à la fois diminuer le volume utile du bioréacteur, mais également avoir un impact sur la physiologie de la souche étudiée dû à l'augmentation de la pression partielle en H_2 dans le bioréacteur.

Pour résumer, il reste de nombreux défis à relever afin d'utiliser le procédé de fermentation à cellules immobilisées présenté dans cette thèse à l'échelle industrielle. De nombreux paramètres pourraient encore être étudiés afin de transposer les performances encourageantes obtenues à l'échelle laboratoire vers l'échelle pilote puis industrielle.

Références bibliographiques

- A. Mulchandani, B. Volesky (1986) Modelling of the acetone-butanol fermentation with cell retention. *The Canadian Journal of Chemical Engineering* 64
- Ahmed I, Ross RA, Mathur VK, Chesbro WR (1988) Growth rate dependence of solventogenesis and solvents produced by *Clostridium beijerinckii*. *Appl Microbiol Biotechnol* 28:182–187
- Al-Hinai MA, Jones SW, Papoutsakis ET (2015) The *Clostridium* Sporulation Programs: Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. *Diversity and Preservation of Endospore Differentiation. Microbiology and Molecular Biology Reviews* 79:19
- Almquist J, Cvijovic M, Hatzimanikatis V, Nielsen J, Jirstrand M (2014) Kinetic models in industrial biotechnology - Improving cell factory performance. *Metabolic Engineering* 24:38–60
- Avérous L (2019) Les synthons biosourcés porteurs d'innovations dans le domaine des polymères. *L'Actualité chimique* 437:59
- Badr H, Toledo R, Hamdy M (2001) Continuous acetone–ethanol–butanol fermentation by immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum*. *Biomass and Bioenergy* 20:119–132
- Bankar SB, Jurgens G, Survase SA, Ojamo H, Granström T (2014) Enhanced isopropanol–butanol–ethanol (IBE) production in immobilized column reactor using modified *Clostridium acetobutylicum* DSM792. *Fuel* 136:226–232
- Bankar SB, Survase SA, Ojamo H, Granström T (2013) The two stage immobilized column reactor with an integrated solvent recovery module for enhanced ABE production. *Bioresour Technol* 140:269–276
- Benito V, Etxebarria J, Goñi-de-Cerio F, Gonzalez I, Brettes P, Urkiaga A (2020) Better understanding of the activated sludge process combining fluorescence-based methods and flow cytometry: A case study. *Journal of Environmental Sciences* 90:51–58. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074219333625>
- Branska B, Pechacova Z, Kolek J, Vasylikivska M, Patakova P (2018) Flow cytometry analysis of *Clostridium beijerinckii* NRRL B-598 populations exhibiting different phenotypes induced by changes in cultivation conditions. *Biotechnol Biofuels* 11:99
- Brück HL, Coutte F, Dhulster P, Gofflot S, Jacques P, Delvigne F (2020) Growth Dynamics of Bacterial Populations in a Two-Compartment Biofilm Bioreactor Designed for Continuous Surfactin Biosynthesis. *Microorganisms* 8
- Charon M-H, Volbeda A, Chabriere E, Pieulle L, Fontecilla-Camps JC (1999) Structure and electron transfer mechanism of pyruvate. Ferredoxin oxidoreductase. *Current Opinion in Structural Biology* 9:663–669
- Chen N-T, Chang C-W (2010) Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR: ORIGINAL ARTICLE. *Journal of Applied Microbiology* 109:623–634. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

77954488286&doi=10.1111%2fj.1365-

2672.2010.04678.x&partnerID=40&md5=ae21e46ff78af681220713329bf4d041

Cheng C, Bao T, Yang S-T (2019) Engineering Clostridium for improved solvent production. Recent progress and perspective. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:5549–5566

Close M, Abraham P, Webber J, Cowey E, Humphries B, Fenwick G, Howard S, Huynh K, Grace T, Dupont P-Y, Weaver L (2020) Use of Sonication for Enhanced Sampling of Attached Microbes from Groundwater Systems. *Groundwater*. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85079879192&doi=10.1111%2fgwat.12984&partnerID=40&md5=fb086476c09194dda7cc38da4513c4d5>

Collado S, Oulego P, Alonso S, Díaz M (2017) Flow cytometric characterization of bacterial abundance and physiological status in a nitrifying-denitrifying activated sludge system treating landfill leachate. *Environmental Science and Pollution Research* 24:21262–21271. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9596-y>

Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB (2010) The effect of a cationic porphyrin on pseudomonas aeruginosa biofilms. *Curr. Microbiol.* 61:411–416. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-78149409814&doi=10.1007%2fs00284-010-9629-y&partnerID=40&md5=acb2638283a093184730feb93814ad2c>

Danielsen KA, Eskeland Ø, Fridrich-Aas K, Orszagh VC, Bachmann-Harildstad G, Burum-Auensen E (2014) Bacterial biofilms in patients with chronic rhinosinusitis: A confocal scanning laser microscopy study. *Rhinology* 52:150–155. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84903391653&doi=10.4193%2fRhino13.053&partnerID=40&md5=12133379edba18597d0454ffe0881ead>

Dantas ERS, Bonhivers J-C, Maciel Filho R, Mariano AP (2020) Biochemical conversion of sugarcane bagasse into the alcohol fuel mixture of isopropanol-butanol-ethanol (IBE): Is it economically competitive with cellulosic ethanol? *Bioresour. Technol.* 314:123712

Das T, Sharma PK, Krom BP, van der Mei HC, Busscher HJ (2011) Role of eDNA on the Adhesion Forces between Streptococcus mutans and Substratum Surfaces. Influence of Ionic Strength and Substratum Hydrophobicity. *Langmuir* 27:10113–10118

David T. Jones, David R. Woods (1986) Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews* 50:484–524

Desai RP, Nielsen LK, Papoutsakis ET (1999) Stoichiometric modeling of Clostridium acetobutylicum fermentations with non-linear constraints. *J. Biotechnol.* 71:191–205

Di Cai, Hu S, Miao Q, Chen C, Chen H, Zhang C, Li P, Qin P, Tan T (2017) Two-stage pervaporation process for effective in situ removal acetone-butanol-ethanol from fermentation broth. *Bioresource Technology* 224:380–388

- Dolejš I, Krasňan V, Stloukal R, Rosenberg M, Rebroš M (2014a) Butanol production by immobilised *Clostridium acetobutylicum* in repeated batch, fed-batch, and continuous modes of fermentation. *Bioresource Technology* 169:723–730
- Dolejš I, Rebroš M, Rosenberg M (2014b) Immobilisation of *Clostridium* spp. for production of solvents and organic acids. *Chemical Papers* 68:1–14
- dos Santos Vieira CF, Maugeri Filho F, Maciel Filho R, Pinto Mariano A (2019) Acetone-free biobutanol production. Past and recent advances in the Isopropanol-Butanol-Ethanol (IBE) fermentation. *Bioresour. Technol.* 287
- Dumitrache A, Klingeman DM, Natzke J, Rodriguez, M., Jr., Giannone RJ, Hettich RL, Davison BH, Brown SD (2017) Specialized activities and expression differences for *Clostridium thermocellum* biofilm and planktonic cells. *Sci. Rep.* 7
- Dumitrache A, Wolfaardt GM, Allen DG, Liss SN, Lynd LR (2013) Tracking the cellulolytic activity of *Clostridium thermocellum* biofilms. *Biotechnol Biofuels* 6
- Dürre P (2005) *Handbook on clostridia*. CRC Press
- Dürre P, Fischer R-J, Kuhn A, Lorenz K, Schreiber W, Stürzenhofecker B, Ullmann S, Winzer K, Sauer U (1995) Solventogenic enzymes of *Clostridium acetobutylicum*. Catalytic properties, genetic organization, and transcriptional regulation. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:251–262
- Dzionek A, Wojcieszynska D, Guzik U (2016) Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology* 23:28–36. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0717345816300732>
- Escudí R, Cresson R, Delgenès J-P, Bernet N (2011) Control of start-up and operation of anaerobic biofilm reactors: An overview of 15 years of research. *Water Research* 45:1–10. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410005646>
- F.W. Welsh, R.E. Williams, I.A. Veliky (1987) Solid carriers for a *Clostridium acetobutylicum* that produces acetone and butanol. *Enzyme and Microbial Technology* 9:500–502. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0141022987901050/pdf?md5=ecfa384e94a4a0775e7a17dae6eae2a7&pid=1-s2.0-0141022987901050-main.pdf>
- Ferreira dos Santos Vieira C, Maugeri Filho F, Maciel Filho R, Pinto Mariano A (2019) Isopropanol-butanol-ethanol (IBE) production in repeated-batch cultivation of *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 immobilized on sugarcane bagasse. *Fuel*:116708
- Flemming H-C, Wingender J (2010) The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 8:623–633
- Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH (1996) Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Water Research* 30:1749–1758
- Gallazzi A, Branska B, Marinelli F, Patakova P (2015) Continuous production of n-butanol by *Clostridium pasteurianum* DSM 525 using suspended and surface-immobilized cells. *Journal of Biotechnology* 216:29–35

- Gapes JR, Nimcevic D, Friedl A (1996) Long-Term Continuous Cultivation of *Clostridium beijerinckii* in a Two-Stage Chemostat with On-Line Solvent Removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3210–3219
- Gérando HM de, Fayolle-Guichard F, Rudant L, Millah SK, Monot F, Ferreira NL, López-Contreras AM (2016) Improving isopropanol tolerance and production of *Clostridium beijerinckii* DSM 6423 by random mutagenesis and genome shuffling. *Appl Microbiol Biotechnol* 100:5427–5436
- Germec M, Demirci A, Turhan I (2020) Biofilm reactors for value-added products production. An in-depth review. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 27:101662. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818119313568>
- Ghose TK, Tyagi RD (1979) Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentor design. *Biotechnol. Bioeng.* 21:1401–1420
- Girbal L, Croux C, Vasconcelos I, Soucaille P (1995) Regulation of metabolic shifts in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *FEMS Microbiol. Rev.* 17:287–297
- González-Peñas H, Lu-Chau TA, Moreira MT, Lema JM (2015) Assessment of morphological changes of *Clostridium acetobutylicum* by flow cytometry during acetone/butanol/ethanol extractive fermentation. *Biotechnol Lett* 37:577–584
- Gottwald M, Gottschalk G (1985a) The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Archives of Microbiology* 143:42–46
- Gottwald M, Gottschalk G (1985b) The internal pH of *Clostridium acetobutylicum* and its effect on the shift from acid to solvent formation. *Archives of Microbiology* 143:42–46
- Green EM (2011) Fermentative production of butanol—the industrial perspective. *Current Opinion in Biotechnology* 22:337–343
- Gross R, Hauer B, Otto K, Schmid A (2007) Microbial biofilms: new catalysts for maximizing productivity of long-term biotransformations. *Biotechnology and bioengineering* 98:1123–1134
- Grupe H, Gottschalk G (1992) Physiological Events in *Clostridium acetobutylicum* during the Shift from Acidogenesis to Solventogenesis in Continuous Culture and Presentation of a Model for Shift Induction. *Applied and Environmental Microbiology* 58:3896–3902
- Gu Y, Jiang Y, Wu H, Liu X, Li Z, Li J, Xiao H, Shen Z, Dong H, Yang Y, Li Y, Jiang W, Yang S (2011) Economical challenges to microbial producers of butanol. Feedstock, butanol ratio and titer. *Biotechnology journal* 6:1348–1357
- Halan B, Buehler K, Schmid A (2012) Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in Biotechnology* 30:453–465
- Harris LM, Welker NE, Papoutsakis ET (2002) Northern, morphological, and fermentation analysis of *spo0A* inactivation and overexpression in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Bacteriology* 184:3586–3597

- Hartmanis MG, Gatenbeck S (1984) Intermediary Metabolism in *Clostridium acetobutylicum*. Levels of Enzymes Involved in the Formation of Acetate and Butyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:1277–1283
- Hayashida S, Yoshino S (1990) Degeneration of solventogenic clostridium caused by a defect in nadh generation. *Agric. Biol. Chem.* 54:427–435
- He C-R, Lee M-C, Kuo Y-Y, Wu T-M, Li S-Y (2017) The influence of support structures on cell immobilization and acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation performance. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers* 78:27–31
- He Q, Chen H (2013) Improved efficiency of butanol production by absorbent fermentation with a renewable carrier. *Biotechnology for biofuels* 6:121
- Hocq R, Bouilloux-Lafont M, Lopes Ferreira N, Wasels F (2019) σ_{54} (σ_L) plays a central role in carbon metabolism in the industrially relevant *Clostridium beijerinckii*. *Sci. Rep.* 9:7228
- Holt RA, Stephens GM, Morris JG (1984) Production of Solvents by *Clostridium acetobutylicum* Cultures Maintained at Neutral pH. *Applied and Environmental Microbiology* 48:1166
- Honraet K, Goetghebeur E, Nelis HJ (2005) Comparison of three assays for the quantification of *Candida* biomass in suspension and CDC reactor grown biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 63:287–295.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770120500103X>
- Ismaiel AA, Zhu CX, Colby GD, Chen JS (1993) Purification and characterization of a primary-secondary alcohol dehydrogenase from two strains of *Clostridium beijerinckii*. *Journal of Bacteriology* 175:5097
- Jones DT, van der Westhuizen A, Long S, Allcock ER, Reid SJ, Woods DR (1982) Solvent Production and Morphological Changes in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43:1434–1439
- Jones EA, McGillivray G, Bakaletz LO (2013) Extracellular DNA within a nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced biofilm binds human beta defensin-3 and reduces its antimicrobial activity. *Journal of innate immunity* 5:24–38
- Jones SW, Tracy BP, Gaida SM, Papoutsakis ET (2011) Inactivation of σ_F in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 Blocks Sporulation Prior to Asymmetric Division and Abolishes σ_E and σ_G Protein Expression but Does Not Block Solvent Formation. *Journal of Bacteriology* 193:2429
- Jones et al (1986) Acetone-Butanol Fermentation Revisited. *Microbiological Reviews* 50:484–524
- Kanchanatawee S, Maddox IS (1991) Effect of biomass concentration on the specific solvent productivity of *Clostridium acetobutylicum* in chemostat culture. *J. Ind. Microbiol.* 7:151–154
- Karbysheva S, Di Luca M, Butini ME, Winkler T, Schütz M, Trampuz A (2020) Comparison of sonication with chemical biofilm dislodgement methods using chelating and reducing agents. Implications for the microbiological diagnosis of implant associated infection. *PLoS one* 15. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0->

85083071541&doi=10.1371%2fjournal.pone.0231389&partnerID=40&md5=2a7a70eb3b123f64651217c317234780

- Kerčmar J, Pintar A (2017) Support material dictates the attached biomass characteristics during the immobilization process in anaerobic continuous-flow packed-bed bioreactor. *Anaerobe* 48:194–202
- Kim S, Jeong S, Heo E (2019) Effects of the shale boom on ethylene and propylene prices. *Energy Sources, Part B: Economics, Planning, and Policy* 14:49–66
- Kolek J, Branska B, Drahekoupil M, Patakova P, Melzoch K (2016) Evaluation of viability, metabolic activity and spore quantity in clostridial cultures during ABE fermentation. *FEMS microbiology letters* 363
- Kolek J, Diallo M, Vasytkivska M, Branska B, Sedlar K, Lopez-Contreras AM, Patakova P (2017) Comparison of expression of key sporulation, solventogenic and acetogenic genes in *C. beijerinckii* NRRL B-598 and its mutant strain overexpressing *spo0A*. *Appl Microbiol Biotechnol* 101:8279–8291
- Kourkoutas Y, Bekatorou A, Banat I, Marchant R, Koutinas A (2004) Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production. A review. *Food Microbiology* 21:377–397
- Koutinas AA, Vlysidis A, Pleissner D, Kopsahelis N, Lopez Garcia I, Kookos IK, Papanikolaou S, Kwan TH, Lin CSK (2014) Valorization of industrial waste and by-product streams via fermentation for the production of chemicals and biopolymers. *Chemical Society reviews* 43:2587–2627
- Krouwel PG, Groot WJ, Kossen N (1983a) Continuous IBE fermentation by immobilized growing *Clostridium beijerinckii* cells in a stirred-tank fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 25:281–299
- Krouwel PG, Groot WJ, Kossen N, van der Laan W (1983b) Continuous isopropanol-butanol-ethanol fermentation by immobilized *Clostridium beijerinckii* cells in a packed bed fermenter. *Enzyme and Microbial Technology* 5:46–54
- Krsmanovic M, Biswas D, Ali H, Kumar A, Ghosh R, Dickerson AK (2021) Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science* 288:102336. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868620306059>
- Lepage C, Fayolle F, Hermann M, Vandecasteele JP (1987) Changes in membrane lipid composition of *Clostridium acetobutylicum* during acetone-butanol fermentation. Effects of solvents, growth temperature and pH. *Microbiology* 133:103–110
- Levenberg K (1944) A method for the solution of certain non-linear problems in least squares. *Quart. Appl. Math.* 2:164–168
- Liao C, Seo S-O, Lu T (2016) System-level modeling of acetone-butanol-ethanol fermentation. *FEMS microbiology letters* 363
- Lienhardt J, Schripsema J, Qureshi N, Blaschek HP (2002) Butanol production by *Clostridium beijerinckii* BA101 in an immobilized cell biofilm reactor: Increase in sugar utilization. *Appl. Biochem. Biotechnol. Part A Enzyme Eng. Biotechnol.* 98-100:591–598

- Lim ES, Koo OK, Kim M-J, Kim J-S (2019a) Bio-enzymes for inhibition and elimination of *Escherichia coli* O157:H7 biofilm and their synergistic effect with sodium hypochlorite. *Sci. Rep.* 9:9920
- Lim J, Byun H-E, Kim B, Park H, Lee JH (2019b) Mathematical Modeling of Acetone–Butanol–Ethanol Fermentation with Simultaneous Utilization of Glucose and Xylose by Recombinant *Clostridium acetobutylicum*. *Energy Fuels* 33:8620–8631
- Linhová M, Patáková P, Lipovský J, Fribert P, Paulová L, Rychtera M, Melzoch K (2010) Development of flow cytometry technique for detection of thinning of peptidoglycan layer as a result of solvent production by *Clostridium pasteurianum*. *Folia Microbiologica* 55:340–344
- Liu D, Xu J, Wang Y, Chen Y, Shen X, Niu H, Guo T, Ying H (2016) Comparative transcriptomic analysis of *Clostridium acetobutylicum* biofilm and planktonic cells. *J. Biotechnol.* 218:1–12
- Liu D, Yang Z, Chen Y, Zhuang W, Niu H, Wu J, Ying H (2018) *Clostridium acetobutylicum* grows vegetatively in a biofilm rich in heteropolysaccharides and cytoplasmic proteins. *Biotechnol Biofuels* 11:563
- Liu Z, Qiao K, Tian L, Zhang Q, Liu Z-Y, Li F-L (2015) Spontaneous large-scale autolysis in *Clostridium acetobutylicum* contributes to generation of more spores. *Front. Microbiol.* 6:950
- Long S, Jones DT, Woods DR (1983) Sporulation of *Clostridium acetobutylicum* P262 in a defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1389–1393
- Luedeking R, Piret EL (1959) A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. *Biotechnol. Bioeng.* 1:393–412
- Lütke-Eversloh T, Bahl H (2011) Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum*: recent advances to improve butanol production. *Current Opinion in Biotechnology* 22:634–647. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911000255>
- Maddox I, Steiner E, Hirsch S, Wessner S, Gutierrez NA, Gapes J, Schuster K (2000) The cause of “Acid crash” and “Acidogenic fermentations” during the batch Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) fermentation process. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2:95–100
- Mann MS, Dragovic Z, Schirmacher G, Lütke-Eversloh T (2012) Over-expression of stress protein-encoding genes helps *Clostridium acetobutylicum* to rapidly adapt to butanol stress. *Biotechnol Lett* 34:1643–1649
- Mark Mascal (2012) Chemicals from biobutanol: technologies and markets. *Biofuels, Bioprod. & Biorefining*:483–493
- Marquardt DW (1963) An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* 11:431–441. <http://www.jstor.org/stable/2098941>
- Máté de Gérando H, Wasels F, Bisson A, Clement B, Bidard F, Jourdir E, López-Contreras AM, Lopes Ferreira N (2018) Genome and transcriptome of the natural isopropanol producer *Clostridium beijerinckii* DSM6423. *BMC genomics* 19:242
- Maunder E, Welch M (2017) Matrix exopolysaccharides; the sticky side of biofilm formation. *femsle* 364

- Mayank R, Ranjan A, Moholkar VS (2013) Mathematical models of ABE fermentation: review and analysis. *Critical reviews in biotechnology* 33:419–447
- Mehta PK, Ghose TK, Mishra S (1991) Methanol biosynthesis by covalently immobilized cells of *Methylosinus trichosporium*: Batch and continuous studies. *Biotechnol. Bioeng.* 37:551–556
- Millat T, Winzer K (2017) Mathematical modelling of clostridial acetone-butanol-ethanol fermentation. *Applied microbiology and biotechnology* 101:2251–2271
- Mitchell WJ (1998) Physiology of carbohydrate to solvent conversion by clostridia. *Advances in microbial physiology* 39:31–130
- Mitchell WJ (2015) The Phosphotransferase System in Solventogenic Clostridia. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 25:129–142
- Monod J (1942) Recherches sur la croissance des cultures bacteriennes
- Monod J (1949) The growth of bacterial cultures. *Annual review of microbiology* 3:371–394
- Monot F, Engasser J-M, Petitdemange H (1984) Influence of pH and undissociated butyric acid on the production of acetone and butanol in batch cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Appl Microbiol Biotechnol* 19:422–426
- Muffler K, Ulber R (2014) *Productive Biofilms*. Springer International Publishing, Cham
- Napoli F, Olivieri G, Russo ME, Marzocchella A, Salatino P (2011) Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* – Assessment of acidogenesis kinetics. *Bioresource Technology* 102:1608–1614
- Napoli F, Olivieri G, Russo ME, Marzocchella A, Salatino P (2012) Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum*—Assessment of energetics and product yields of the acidogenesis. *Enzyme and Microbial Technology* 50:165–172
- Nguyen UT, Burrows LL (2014) DNase I and proteinase K impair *Listeria monocytogenes* biofilm formation and induce dispersal of pre-existing biofilms. *International Journal of Food Microbiology* 187:26–32
- Nijland R, Hall MJ, Burgess JG (2010) Dispersal of biofilms by secreted, matrix degrading, bacterial DNase. *PloS one* 5:e15668
- Nimcevic D, Schuster M, Gapes JR (1998) Solvent production by *Clostridium beijerinckii* NRRL B592 growing on different potato media. *Appl Microbiol Biotechnol* 50:426–428
- Noparat P, Prasertsan P, O-Thong S (2011) Isolation and characterization of high hydrogen-producing strain *Clostridium beijerinckii* PS-3 from fermented oil palm sap. *International Journal of Hydrogen Energy* 36:14086–14092
- Okshevsky M, Meyer RL (2014) Evaluation of fluorescent stains for visualizing extracellular DNA in biofilms. *Journal of Microbiological Methods* 105:102–104. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770121400195X>
- Okshevsky M, Meyer RL (2015) The role of extracellular DNA in the establishment, maintenance and perpetuation of bacterial biofilms. *Critical reviews in microbiology* 41:341–352

- Olivieri G, Russo ME, Marzocchella A, Salatino P (2011) Modeling of an aerobic biofilm reactor with double-limiting substrate kinetics: Bifurcational and dynamical analysis. *Biotechnol. Prog.* 27:1599–1613
- Ounine K, Petitdemange H, Raval G, Gay R (1985) Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Applied and Environmental Microbiology* 49:874–878
- Pantaléon V, Bouttier S, Soavelomandroso AP, Janoir C, Candela T (2014) Biofilms of *Clostridium* species. *Anaerobe* 30:193–198
- Paredes J, Becerro S, Arizti F, Aguinaga A, Del Pozo JL, Arana S (2012) Real time monitoring of the impedance characteristics of Staphylococcal bacterial biofilm cultures with a modified CDC reactor system. *Biosens. Bioelectron.* 38:226–232
- Patakova P, Kolek J, Sedlar K, Koscova P, Branska B, Kupkova K, Paulova L, Provaznik I (2018) Comparative analysis of high butanol tolerance and production in clostridia. *Biotechnology Advances* 36:721–738
- Patakova P, Linhova M, Rychtera M, Paulova L, Melzoch K (2013) Novel and neglected issues of acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation by clostridia. *Clostridium metabolic diversity, tools for process mapping and continuous fermentation systems. Biotechnology Advances* 31:58–67
- Patakova P, Linhova M, Vykydalova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K (2014) Use of fluorescent staining and flow cytometry for monitoring physiological changes in solventogenic clostridia. *Anaerobe* 29:113–117
- Pérez-Bibbins B, Gonzalez Peñas H, Toth E, Coupard V, Lopes-Ferreira N (2018) Hybrid in situ product recovery technique applied to (A)IBE fermentation. *Process Biochemistry* 65:21–27. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511317310735>
- Procentese A, Raganati F, Olivieri G, Russo ME, Salatino P, Marzocchella A (2015) Continuous lactose fermentation by *Clostridium acetobutylicum* – Assessment of solventogenic kinetics. *Bioresource Technology* 180:330–337
- Qureshi N, Annous BA, Ezeji TC, Karcher P, Maddox IS (2005) Biofilm reactors for industrial bioconversion processes: employing potential of enhanced reaction rates. *Microbial Cell Factories* 4:24
- Qureshi N, Lai LL, Blaschek HP (2004) Scale-Up of a High Productivity Continuous Biofilm Reactor to Produce Butanol by Adsorbed Cells of *Clostridium Beijerinckii*. *Featuring Tissue Engineering* 82:164–173
- Qureshi N, Maddox IS (1988a) Reactor design for the ABE fermentation using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Bioprocess Eng.* 3:69–72. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-0002164654&doi=10.1007%2fBF00369330&partnerID=40&md5=9abb1b368b6e830acb57142efb47936d>

- Qureshi N, Maddox IS (1988b) Reactor design for the ABE fermentation using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Bioprocess Eng.* 3:69–72
- Qureshi N, Maddox IS (1995) Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. *J. Ferment. Bioeng.* 80:185–189
- Qureshi N, Maddox IS (2005) Reduction in Butanol Inhibition by Perstraction. *Featuring Tissue Engineering* 83:43–52
- Qureshi N, Paterson AHJ, Maddox IS (1988) Model for continuous production of solvents from whey permeate in a packed bed reactor using cells of *Clostridium acetobutylicum* immobilized by adsorption onto bonechar. *Appl Microbiol Biotechnol* 29:323–328
- Qureshi N, Schripsema J, Lienhardt J, Blaschek HP (2000) Continuous solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101 immobilized by adsorption onto brick. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 16:377–382
- Raganati F, Procentese A, Olivieri G, Götz P, Salatino P, Marzocchella A (2015) Kinetic study of butanol production from various sugars by *Clostridium acetobutylicum* using a dynamic model. *Biochemical Engineering Journal* 99:156–166
- Raganati F, Procentese A, Olivieri G, Russo ME, Gotz P, Salatino P, Marzocchella A (2016) Butanol production by *Clostridium acetobutylicum* in a series of packed bed biofilm reactors. *Chemical Engineering Science* 152:678–688
- Ravagnani A, Jennert KCB, Steiner E, Grünberg R, Jefferies JR, Wilkinson SR, Young DI, Tidswell EC, Brown DP, Youngman P (2000) Spo0A directly controls the switch from acid to solvent production in solvent-forming clostridia. *Molecular microbiology* 37:1172–1185
- Rosche B, Li XZ, Hauer B, Schmid A, Buehler K (2009) Microbial biofilms. A concept for industrial catalysis? *Trends in Biotechnology* 27:636–643
- Rosenberg M, Azevedo NF, Ivask A (2019) Propidium iodide staining underestimates viability of adherent bacterial cells. *Sci. Rep.* 9. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85064897048&doi=10.1038%2fs41598-019-42906-3&partnerID=40&md5=82e7c6efc422cdcb38a4bc54434f5c60>
- Sandoval NR, Papoutsakis ET (2016) Engineering membrane and cell-wall programs for tolerance to toxic chemicals. *Beyond solo genes. Curr. Opin. Microbiol.* 33:56–66
- Saur T, Morin E, Habouzit F, Bernet N, Escudié R (2017) Impact of wall shear stress on initial bacterial adhesion in rotating annular reactor. *PloS one* 12:e0172113
- Schoutens GH, F. Kossen N (1986) A simple model for the continuous production of butanol by immobilized Clostridia: II: *Clostridium* species DSM 2152 on glucose and whey permeate. *The Chemical Engineering Journal* 32:B51-B56
- Schoutens GH, Guit RP, Zieleman GJ, Luyben K, Kossen N (1986a) A comparative study of a fluidised bed reactor and a gas lift loop reactor for the ibe process. Part III. Reactor performances and scale Up. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 36:565–576

- Schoutens GH, Nieuwenhuizen M, Kossen N (1985) Continuous butanol production from whey permeate with immobilized *Clostridium beyerinckii* LMD 27.6. *Appl Microbiol Biotechnol* 21
- Schoutens GH, van Beelen PN, Luyben K (1986b) A simple model for the continuous production of butanol by immobilized clostridia: I: *Clostridium beyerinckii* on glucose. *The Chemical Engineering Journal* 32:B43-B50
- Scotcher MC, Rudolph FB, Bennett GN (2005) Expression of *abrB310* and *sinR*, and Effects of Decreased *abrB310* Expression on the Transition from Acidogenesis to Solventogenesis, in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:1987
- Sena-Vélez M, Redondo C, Graham JH, Cubero J (2016) Presence of Extracellular DNA during Biofilm Formation by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Strains with Different Host Range. *PloS one* 11:e0156695-e0156695. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27248687>
- Shukla SK, Subba Rao T (2017) *Staphylococcus aureus* biofilm removal by targeting biofilm-associated extracellular proteins. *Indian J. Med. Res. Suppl.* 146:1–8
- Sodhi AS, Sharma N, Bhatia S, Verma A, Soni S, Batra N (2022) Insights on sustainable approaches for production and applications of value added products. *Chemosphere* 286:131623. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653521020956>
- Sommer B, Garbe D, Schrepfer P, Brück T (2013) Characterization of a highly thermostable β -hydroxybutyryl CoA dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 98:138–144
- Spekreijse (Luxembourg) Insights into the European market for bio-based chemicals. Publications Office of the European Union. <https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC112989>
- Srivastava AK, Volesky B (1990) Updated model of the batch acetone-butanol fermentation. *Biotechnol Lett* 12:693–698
- Stefanie Keis, Ranad Shaheen, David T. Jones (2001) Emended descriptions of *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, and description of *Clostridium saccharoperbutylacetonium* sp.nov and *Clostridium saccharobutylicum* sp.nov. *international journal of systematic and evolutionary microbiology* 51:2095–2103
- Streett HE, Kalis KM, Papoutsakis ET (2019) A Strongly Fluorescing Anaerobic Reporter and Protein-Tagging System for *Clostridium* Organisms Based on the Fluorescence-Activating and Absorption-Shifting Tag Protein (FAST). *Appl. Environ. Microbiol.* 85
- Sun Z, Liu S (2012) Production of n-butanol from concentrated sugar maple hemicellulosic hydrolysate by *Clostridia acetobutylicum* ATCC824. *Biomass and Bioenergy* 39:39–47. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0961953410002503>
- Survase SA, Jurgens G, van Heiningen A, Granström T (2011) Continuous production of isopropanol and butanol using *Clostridium beijerinckii* DSM 6423. *Applied microbiology and biotechnology* 91:1305–1313

- Survase SA, van Heiningen A, Granström T (2013) Wood pulp as an immobilization matrix for the continuous production of isopropanol and butanol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40:209–215
- Survase SA, Zebroski R, Bayuadri C, Wang Z, Adamos G, Nagy G, Pylkkanen V (2019) Membrane assisted continuous production of solvents with integrated solvent removal using liquid-liquid extraction. *Bioresour. Technol.* 280:378–386
- Terada A, Yuasa A, Tsuneda S, Hirata A, Katakai A, Tamada M (2005) Elucidation of dominant effect on initial bacterial adhesion onto polymer surfaces prepared by radiation-induced graft polymerization. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 43:99–107
- Tracy BP, Gaida SM, Papoutsakis ET (2008) Development and Application of Flow-Cytometric Techniques for Analyzing and Sorting Endospore-Forming Clostridia. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:7497–7506. <https://aem.asm.org/content/aem/74/24/7497.full.pdf>
- Tracy BP, Jones SW, Papoutsakis ET (2011) Inactivation of σ^E and σ^G in *Clostridium acetobutylicum* illuminates their roles in clostridial-cell-form biogenesis, granulose synthesis, solventogenesis, and spore morphogenesis. *Journal of Bacteriology* 193:1414–1426
- Trček J, Mira NP, Jarboe LR (2015) Adaptation and tolerance of bacteria against acetic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 99:6215–6229
- Tyagi S, Kramer FR (1996) Molecular Beacons. Probes that Fluoresce upon Hybridization. *Nature Biotechnology* 14:303–308
- Vasudevan R (2014) Biofilms. *Microbial Cities of Scientific Significance.* JMEN 1
- Velázquez-Sánchez HI, Dominguez-Bocanegra AR, Aguilar-López R (2019) Modelling of the pH dynamic and its effect over the Isopropanol-Butanol-Ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* pIPA3-Cm2. *Fuel* 235:558–566
- Vichuviwat R, Boonsombuti A, Luengnaruemitchai A, Wongkasemjit S (2014) Enhanced butanol production by immobilized *Clostridium beijerinckii* TISTR 1461 using zeolite 13X as a carrier. *Bioresource Technology* 172:76–82
- Villarreal JV, Jungfer C, Obst U, Schwartz T (2013) DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *Journal of Microbiological Methods* 94:161–169
- Vollherbst-Schneck K, Sands JA, Montenecourt BS (1984) Effect of butanol on lipid composition and fluidity of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl. Environ. Microbiol.* 47:193–194
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP (2009). *Molecules*
- Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, city of microbes. *Journal of Bacteriology* 182:2675–2679
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS (2002) Extracellular DNA Required for Bacterial Biofilm Formation. *Science* 295:1487
- Wiesenborn DP, Rudolph FB, Papoutsakis ET (1989) Coenzyme A transferase from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and its role in the uptake of acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:323–329

- Williams DL, Bloebaum RD (2010) Observing the biofilm matrix of *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 grown using the CDC biofilm reactor. *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 16:143–152
- Wingender J, Neu TR, Flemming HC (1999) Microbial Extracellular Polymeric Substances. Characterization. *Structure and Function* 279
- Yang J, Zhuang W, Wu J-L, Ying H-J (2017) Structure and composition analysis of *Clostridium acetobutylicum* biofilm. *Gao Xiao Hua Xue Gong Cheng Xue Bao* 31:111–118
- Yang X, Tsao GT (1994) Mathematical Modeling of Inhibition Kinetics in Acetone–Butanol Fermentation by *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Prog.* 10:532–538
- Yang Y, Hoogewind A, Moon YH, Day D (2016) Production of butanol and isopropanol with an immobilized *Clostridium*. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 39:421–428
- Yen H-W, Li R-J (2011) The effects of dilution rate and glucose concentration on continuous acetone-butanol-ethanol fermentation by *Clostridium acetobutylicum* immobilized on bricks. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 86:1399–1404
- Yoo M, Croux C, Meynial-Salles I, Soucaille P (2016) Elucidation of the roles of adhE1 and adhE2 in the primary metabolism of *Clostridium acetobutylicum* by combining in-frame gene deletion and a quantitative system-scale approach. *Biotechnol Biofuels* 9:92
- Yoon HY, Lee SY (2017) Establishing a laboratory model of dental unit waterlines bacterial biofilms using a CDC biofilm reactor. *Biofouling* 33:917–926
- Yoshida N, Hiraishi A (2004) An Improved Redox Dye-Staining Method Using 5-Cyano-2,3-Ditoyl Tetrazolium Chloride for Detection of Metabolically Active Bacteria in Activated Sludge. *Microbes and Environments* 19:61–70
- Zeng H-S, He C-R, Yen A, Wu T-M, Li S-Y (2017) Assessment of Acidified Fibrous Immobilization Materials for Improving Acetone-Butanol-Ethanol (ABE) Fermentation. *Fermentation* 3:3
- Zhang H, Yang P, Wang Z, Li M, Zhang J, Liu D, Chen Y, Ying H (2021) *Clostridium acetobutylicum* Biofilm: Advances in Understanding the Basis. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 9. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-85108088348&doi=10.3389%2ffbioe.2021.658568&partnerID=40&md5=19489345c14adc8c2a3ab400b72e47f3>
- Zhou W, Liu J, Fan S, Xiao Z, Qiu B, Wang Y, Li J, Liu Y (2018) Biofilm immobilization of *Clostridium acetobutylicum* on particulate carriers for acetone-butanol-ethanol (ABE) production. *Bioresource Technology Reports*
- Zhuang W, Liu X, Yang J, Wu J, Zhou J, Chen Y, Liu D, Ying H (2017) Immobilization of *Clostridium acetobutylicum* onto natural textiles and its fermentation properties. *Microb. Biotechnol.* 10:502–512

- Zhuang W, Yang J, Wu J, Liu D, Zhou J, Chen Y, Ying H (2016) Extracellular polymer substances and the heterogeneity of *Clostridium acetobutylicum* biofilm induced tolerance to acetic acid and butanol. *RSC Adv.* 6:33695–33704
- Zwirgmaier K (2005) Fluorescence in situ hybridisation (FISH) – the next generation. *femsle* 246:151–158
- Żywicka A, Banach A, Junka AF, Drozd R, Fijałkowski K (2019) Bacterial cellulose as a support for yeast immobilization – Correlation between carrier properties and process efficiency. *J. Biotechnol.* 291:1–6

Annexes

Annexe 1 : Fiche technique de la mousse en polyuréthane utilisée pour l'immobilisation cellulaire



TECHNICAL DATAS

- ISP 4452 PHH - reticuliert -

<i>Description:</i>	Polyurethane foam – ISP 4452 PHH – reticulated
<i>Raw Material:</i>	Polyurethane on the base of Polyether
<i>Structure:</i>	totally open porous
<i>Pores per linear Inch:</i>	40 Pores / 1 Inch
<i>Specific Density:</i> <i>(DIN EN ISO 845)</i>	40 kg/m ³
<i>Tensile strength:</i> <i>(DIN EN ISO 1798)</i>	110 kPa
<i>Compression load deflection at 40 %:</i> <i>(DIN EN ISO 3386-1)</i>	4,4 – 6,6 kPa
<i>Elongation:</i> <i>(DIN EN ISO 1798)</i>	130 %
<i>Temperature limits:</i>	-40 °C till +100°C
<i>Colours:</i>	light, other colours by request
<i>Available Forms:</i>	blocks, sheets, cuts, tapes, stamped pieces etc.
<i>Application Fields:</i>	Filters, Cubes for biological fields , acoustic insulation

This technical brochure reflects our present knowledge – to advise our customers – without assuming any legal responsibility.
1210/08

ISP GmbH & Co. KG, Hoenbergstraße 13, 65555 Limburg, Germany
Tel. +49 (0) 64 31 / 52 99-0 Fax: +49 (0) 64 31 / 52 99-33
www.isp-schaum.de info@isp-schaum.de

Annexe 2 : Nomenclature pour la construction des modèles cinétiques

- X: concentration en biomasse (g.L^{-1})
- X_s: concentration en biomasse en suspension (g.L^{-1})
- X_b: concentration en biomasse en immobilisée (g.L^{-1})
- S: concentration en glucose résiduel (g.L^{-1})
- S_f: concentration en glucose dans l'alimentation (g.L^{-1})
- B: concentration en butanol (g.L^{-1})
- I: concentration en isopropanol (g.L^{-1})
- AA: concentration en acétate (g.L^{-1})
- AA_f: concentration en acétate dans l'alimentation (g.L^{-1})
- AB: concentration en butyrate (g.L^{-1})
- B_{max}: concentration seuil inhibitrice en butanol (g.L^{-1})
- μ_{max} : taux de croissance maximal (h^{-1})
- k_s: constante de saturation du glucose (g.L^{-1})
- α : production d'acétate associée à la croissance (h^{-1})
- β : production de butyrate associée à la croissance (h^{-1})
- kAA: constante de saturation pour l'acétate (g.L^{-1})
- kAB: constante de saturation pour le butyrate (g.L^{-1})
- Y_{xs}: rendement biomasse/substrat (g.g^{-1})
- Y_{but_s}: rendement butanol/substrat (g.g^{-1})
- Y_{i_s}: rendement isopropanol/substrat (g.g^{-1})
- Y_{I/AA}: rendement acetate/isopropanol (g.g^{-1})
- Y_{B/AB}: rendement butyrate/butanol (g.g^{-1})
- k_d: constante de détachement du biofilm (h^{-1})
- k_a: constante d'attachement du biofilm (h^{-1})
- D: Taux de dilution (h^{-1})
- t: temps (h)
- P: productivité volumique ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

Annexe 3 : Code python développé pour effectuer les analyses de sensibilité des modèles dynamiques développés.

```
import scipy
```

```
import numpy as np
```

```
import matplotlib.pyplot as plt
```

```

from scipy.integrate import odeint

from lmfit import minimize, Parameters, Parameter, report_fit

import pandas as pd

from numpy.linalg import inv

params=Parameters()

X0 = 0.3

S0 = 60

Iso_0 = 0.01

But_0 = 0.01

AB_0 = 0.01

AA_0 = 2.1

E_0 = 0.01

x0 = [X0,S0,Iso_0,But_0,AA_0,AB_0,E_0]

params.add('X0', value=X0, vary=False)

params.add('S0', value=S0, vary=False)

params.add('Iso_0', value=Iso_0, vary=False)

params.add('But_0', value=But_0, vary=False)

params.add('AA_0', value=AA_0, vary=False)

params.add('AB_0', value=AB_0, vary=False)

params.add('E_0', value=E_0, vary=False)

params.add('mumax',value = 0.134, vary = True)

params.add('Yxs', value = 0.1359, vary = True)

params.add('Ybuts',value = 0.186,min =0,max =0.3, vary = True)

```

```

params.add('Yes',value = 0.003,min = 0, max = 0.05, vary = False)
params.add('Yis',value = 0.13,min =0, max =0.3, vary = True)
params.add('ks',value = 2,min=0.5, max =5, vary = False)
params.add('Bmax', value = 7.6 ,min = 0, vary= True)
params.add('kAB',value = 0.39, min = 0.05, max = 5,vary = True)
params.add('kAA',value =0.15,min = 0.1, max = 1, vary = True)
params.add('a',value = 1, min = 0.01, max = 30, vary = False)
params.add('b',value = 0.5, max = 30, vary = False)
params.add('Yab_but',value = 0.7, max = 0.85, min = 0.65, vary = False)
def f(y,t, paras):
    X = y[0]
    S = y[1]
    Iso = y[2]
    B = y[3]
    AA= y[4]
    AB = y[5]
    E = y[6]

    mumax = paras[0]
    Yxs = paras[1]
    Ybuts = paras[2]
    Yes = paras[3]
    Yis = paras[4]

```

$ks = \text{paras}[5]$

$B_{\max} = \text{paras}[6]$

$k_{AB} = \text{paras}[7]$

$k_{AA} = \text{paras}[8]$

$a = \text{paras}[9]$

$b = \text{paras}[10]$

$Y_{ab_but} = \text{paras}[11]$

#cinétiques

$\mu = \mu_{\max} * (1 - (B/B_{\max})) * (S/(ks+S))$

$r_{but} = \mu * (Y_{but}/Y_{xs})$

$r_i = \mu * (Y_i/Y_{xs})$

$r_{bs} = (\mu) * X * a - r_{but} * (AB/(AB+k_{AB})) * (S/(ks+S)) * X / Y_{ab_but}$

$r_{aa} = (\mu) * X * b - r_i * (AA/(AA+k_{AA})) * (S/(ks+S)) * X$

$r_e = \mu * X * (Y_e/Y_{xs})$

```
#bilan matière
```

$$dX_{dt} = \mu * X$$

$$dS_{dt} = (-1/Y_{xs}) * (\mu) * X$$

$$dB_{dt} = r_{but} * X$$

$$dI_{dt} = r_i * X$$

$$dAA_{dt} = r_{aa}$$

$$dAB_{dt} = r_{bs}$$

$$dE_{dt} = r_e$$

```
F= np.array([dX_dt,dS_dt,dI_dt,dB_dt,dAA_dt,dAB_dt,dE_dt])
```

```
return F
```

```
def df(t,x, paras):
```

```
J = np.zeros([len(x), len(paras)], dtype = float)

for i in range(len(paras)):

    p = paras.copy()

    eps = 0.05*p[i] #variation de 0.05 % de la valeur du parametre

    params_1 = paras.copy()

    params_2 = paras.copy()

    params_1[i] += eps

    params_2[i] -= eps

    f1 = f(x, t, params_1)

    f2 = f(x, t, params_2)
```

```
J[:, i] = (f1 - f2) / (2 * eps)
```

```
return J
```

```
def df2(t,x, paras):
```

```
J2 = np.zeros([len(x), len(paras)], dtype = float)
```

```
for k in range (len(x)):
```

```
    p1 = paras.copy()
```

```
    p2 = paras.copy()
```

```
    eps = 0.05*p1[k]
```

```
    p1[k] +=eps
```

```
    p2[k] -= eps
```

```
    f1 = f(x, t, p1)
```

```
f2 = f(x, t, p2)
```

```
J2[:, k] = (f1 - f2) / (2 * eps)
```

```
return J2
```

```
t = 0
```

```
X0 = 0.3
```

```
S0 = 45
```

```
Iso_0 = 0.01
```

```
But_0 = 0.01
```

```
AB_0 = 0.01
```

```
AA_0 = 2.3
```

```
E_0 = 0.01
```

```
x0 = [X0,S0,Iso_0,But_0,AA_0,AB_0,E_0]
```

```
paras =  
np.array([params['mumax'].value,params['Yxs'].value,params['Ybuts'].value,params['Yes'].value,  
params['Yis'].value,params['ks'].value,params['Bmax'].value,params['kAB'].value,params['kAA'].  
value,params['a'].value,params['b'].value,params['Yab_but'].value], dtype = float)
```

```
params_name =  
np.array([params['mumax'].name,params['Yxs'].name,params['Ybuts'].name,params['Yes'].nam
```

```
e,params['Yis'].name,params['ks'].name,params['Bmax'].name,params['kAB'].name,params['kA  
A'].name,params['a'].name,params['b'].name,params['Yab_but'].name])
```

```
Jacobian = df(t, x0, paras)
```

```
J_T = Jacobian.T
```

```
calcul = np.dot(J_T,Jacobian)
```

```
cov= inv(calcul)
```

```
nt = 100
```

```
t = np.linspace(0,72,nt)
```

```
def g (t,x0,params):
```

```
    sol = odeint(f,x0,t,args = (paras,))
```

```
    return sol
```

```
class Sens :
```

```
    def __init__(self,t,var,paras,l) :
```

```
        self.paras = paras
```

```

self.t = t

self.var = var

self.l = l

def sx (self) :

    jac = np.zeros(len(self.t))

    A = np.zeros(len(self.t)) #stockage de chacun des paramètres

    B = np.zeros(shape=(len(self.t), len(self.paras))) # t ligne, paras colonnes

# stockage de tout les calculs

    for i in range(len(self.paras)) :

        for j in range(len(self.t)) :

            x0_i = self.var[j]

            t_i = self.t[j]

            jac = df(t_i,x0_i,self.paras)

            A[j] = jac[self.l,i] # 0 correspond uniquement à la variable X

            B[:,i] = A

    return B

```

```

sol = g(t,x0,params)

#On itère une boucle afin de représenter graphiquement chacun des paramètres

plt.figure()

plt.ylabel('sensibilité')

for i in range (len(np.arange(0,4,1))) :

    sens = Sens(t,sol,paras,i)

    X = sens.sx()

    plt.subplot(2,2,i+1)

    plt.xlabel('temps (h)')

    plt.grid()

    for p in range(len(paras)) :

        if p<6 :

            plt.plot(t,X[:,p],"-",label ='sens_{}'.format(params_name[p]))

        else:

            plt.plot(t,X[:,p],"--",label ='sens_{}'.format(params_name[p]))

```

```

plt.text(-120, 0.5, 'sensibilité', fontsize = 15, rotation = 90)

plt.text(-95, 0.63, 'I', fontsize = 15)

plt.text(-95, 1.9, 'X', fontsize = 15)

plt.text(-0, 0.63, 'B', fontsize = 15)

plt.text(-0, 1.9, 'S', fontsize = 15)

plt.legend(bbox_to_anchor=(0.95, -1.0, 0.3, 0.2), loc='lower right', ncol =4)

plt.show()

plt.figure(2)

plt.ylabel('sensibilité')

w =4

while w <7:

    print(w)

    sens = Sens(t,sol,paras,w)

    X = sens.sx()

plt.subplot(2,2,w-3)

plt.xlabel('temps (h)')

```

```

plt.grid()

for z in range(len(paras)) :

    if z<6 :

        plt.plot(t,X[:,z],"-",label ='sens_{}'.format(params_name[z]))

    else:

        plt.plot(t,X[:,z],"--",label ='sens_{}'.format(params_name[z]))

w= w+1

plt.text(-30, 0.01, 'sensibilité', fontsize = 15, rotation = 90)

plt.text(0, 0.03, 'AA', fontsize = 15)

plt.text(95, 0.03, 'AB', fontsize = 15)

plt.text(0, 0.009, 'E', fontsize = 15)

plt.legend(bbox_to_anchor=(2.2, -1.0, 0.3, 0.2), loc='lower right', ncol =4)

plt.show()

```

Annexe 4 : Code python développé pour résoudre le système d'équations différentielles qui composent le modèle ainsi que le critère de régression utilisé pour obtenir le jeu optimal de paramètres.

```

""""import des librairies""""

import scipy

import numpy as np

import matplotlib.pyplot as plt

```

```
from scipy.integrate import odeint
from lmfit import minimize, Parameters, Parameter, report_fit
import pandas as pd
import pylab
import statsmodels.api as sm
```

```
"""
```

Définition du modèle et résolution

```
"""
```

```
def f(y, t, paras):
```

```
    X = y[0]
```

```
    S = y[1]
```

```
    Iso = y[2]
```

```
    B = y[3]
```

```
    AA = y[4]
```

```
    AB = y[5]
```

E = y[6]

try:

mumax = paras['mumax'].value

Yxs = paras['Yxs'].value

Ybuts = paras['Ybuts'].value

Yes = paras['Yes'].value

Yis = paras['Yis'].value

ks = paras['ks'].value

Bmax = paras['Bmax'].value

kAB = paras['kAB'].value

kAA = paras['kAA'].value

a = paras['a'].value

b = paras['b'].value

```
Yab_but = paras['Yab_but'].value
```

```
#ABmax = paras['ABmax'].value
```

```
except KeyError:
```

```
    mumax, Yxs, Ybut, Yes, Yis, ks, Bmax, kAB, kAA, a, b, Yab_but = paras
```

```
# cinétiques
```

```
 $\mu = \text{mumax} * (1 - (B/B_{\text{max}})) * (S / (k_s + S))$ 
```

```
 $r_{\text{but}} = \mu * (Y_{\text{but}} / Y_{\text{xs}})$ 
```

```
 $r_{\text{i}} = \mu * (Y_{\text{is}} / Y_{\text{xs}})$ 
```

```
 $r_{\text{b}} = (\mu) * X^a * r_{\text{but}} * (AB / (AB + k_{AB})) * (S / (k_s + S)) * X / Y_{\text{ab\_but}}$ 
```

```
 $r_{\text{a}} = (\mu) * X^b * r_{\text{i}} * (AA / (AA + k_{AA})) * (S / (k_s + S)) * X$ 
```

```
 $r_{\text{e}} = \mu * X * (Y_{\text{es}} / Y_{\text{xs}})$ 
```

```
# Bilan matière
```

```
 $dX_{\text{dt}} = \mu * X$ 
```

$$dS_dt = (-1/Y_{xs}) * (\mu) * X$$

$$dB_dt = r_{but} * X$$

$$dI_dt = r_i * X$$

$$dAA_dt = r_{aa}$$

$$dAB_dt = r_{bs}$$

$$dE_dt = r_e$$

```
F= np.array([dX_dt,dS_dt,dI_dt,dB_dt,dAA_dt,dAB_dt,dE_dt])
```

```
return F
```

```
"""
```

```
Solution to the ODE  $x'(t) = f(t,x,k)$  with initial condition  $x(0) = x_0$ 
```

```
"""
```

```
def g(t, x0, paras):
```

```
    x = odeint(f, x0, t, args=(paras,))
```

```
    return x
```

```
"""
```

```
Minimisation des résidus normalisés
```

```
"""
```

```
def residual(paras, t, data):
```

```
    x0 = (paras['X0'].value,  
          paras['S0'].value, paras['Iso_0'].value, paras['But_0'].value, paras['AA_0'].value, paras['AB_0'].value,  
          paras['E_0'].value)
```

```
    model = g(t, x0, paras)
```

```
    res1 = len(t)
```

```
    res2 = len(x0)
```

```
    res = np.zeros((res1, res2), dtype = float)
```

```
    for l in range(len(x0)):
```

```
var = np.var(model[:,l]) # calcul de la variance de chaque variable
```

```
dX = ((model[:,l]-data[:,l])**2)*1/var # calcul du critère de régression pour chaque point
```

```
res[:,l] = dX
```

```
res = res.ravel()
```

```
# you only have data for one of your variables
```

```
#return (model - data).ravel()
```

```
return(res)
```

```
"intervalle d'étude du modèle"
```

```
# initial conditions
```

```
X0 = 0.3
```

```
S0 = 45
```

```
Iso_0 = 0.01
```

```
But_0 = 0.01
```

```
AB_0 = 0.4
```

```
AA_0 = 2.3
```

```
E_0 = 0.01
```

```
x0 = [X0,S0,Iso_0,But_0,AA_0,AB_0,E_0]
```

```
tf = 72 # temps final de l'expérience
```

```
ti = 1000 # intervalle
```

```
ts = np.linspace(0, tf, ti)
```

```
"importation données expérimentales"
```

```
#Lecture du fichier csv
```

```
data_1 = pd.read_csv("data_B18_1.csv",sep=';')#,index_col = 0, header= 0)
```

```
data_2 = pd.DataFrame()
```

```
data_2=data_1[['MS (g/L)', 'Glucose i', 'Isopropanol (g/L)', 'Butanol (g/L)', 'Acetate (g/L)', 'Butyrate (g/L)', 'Ethanol (g/L)']]
```

```
#Transformation du data frame en matrice
```

```
data_exp= data_2.to_numpy()
```

```
t_exp = data_1.loc[:, 'Temps (h)']
```

```
t_exp = t_exp.values
```

```
data_std = pd.read_csv("ET_B18.csv", sep= ';')
```

```
data_std = data_std.to_numpy()
```

```
ET_DO = data_std[:,1]
```

```
ET_Glu = data_std[:,2]
```

```
ET_AA = data_std[:,3]
ET_AB = data_std[:,4]
ET_iso = data_std[:,5]
ET_but = data_std[:,6]
ET_IBE = data_std[:,7]
```

"Paramétrisation"

```
params = Parameters()
```

```
params.add('X0', value=X0, vary=False)
```

```
params.add('S0', value=S0, vary=False)
```

```
params.add('Iso_0', value=Iso_0, vary=False)
```

```
params.add('But_0', value=But_0, vary=False)
```

```
params.add('AA_0', value=AA_0, vary=False)
```

```
params.add('AB_0', value=AB_0, vary=False)
```

```
params.add('E_0', value=E_0, vary=False)
```

```
params.add('mumax', value = 0.134, vary = True)
```

```
params.add('Yxs', value = 0.1359, vary = True)
```

```
params.add('Ybuts', value = 0.186, min = 0, max = 0.3, vary = True)
```

```
params.add('Yes', value = 0.003, min = 0, max = 0.05, vary = False)
```

```
params.add('Yis', value = 0.13, min = 0, max = 0.3, vary = True)
```

```

params.add('ks',value = 2,min=0.5, max =5, vary = False)
params.add('Bmax', value = 7.6 ,min = 0, vary= True)

params.add('kAB',value = 0.39, min = 0.05, max = 5,vary = True)
params.add('kAA',value =0.15,min = 0.1, max = 1, vary = False)

params.add('a',value = 1, min = 0.01, max = 30, vary = False)
params.add('b',value = 0.5, max = 30, vary = False)

params.add('Yab_but',value = 0.7, max = 0.85, min = 0.65, vary = False)
#params.add('ABmax',value = 1.5, max =4, vary = False)

```

"Fit du modèle"

```

result = minimize(residual, params, args=(t_exp,data_exp), method='leastsq') # leastsq nelder
paras = result.params

```

check results of the fit

```

data_fitted2 = g(t_exp,x0,result.params)
data_fitted = odeint(f,x0,ts,args=(paras,))
dssim = data_fitted

IBEsim = data_fitted[:, 6] + data_fitted[:, 3] + data_fitted[:, 2]
IBExp = data_exp[:, 6] + data_exp[:, 3]+ data_exp[:, 2]

```

```
data_fitted2 = odeint(f,x0,t_exp,args=(params,))
```

```
#Etude des résidus du fitit
```

```
t_leg =14 #taille des légendes
```

```
t_tick = 70 # taille données expérimentales
```

```
'''Calcul bilan carbone'''
```

```
MC_X = 0.471 #gC/g
```

```
MC_S = 12*6/180
```

```
MC_B = 4*12/74.12
```

```
MC_I = 3*12/60
```

```
MC_AA = 2*12/60
```

```
MC_AB = 4*12/88
```

```
MC_CO2 = 12/44
```

```
MC_E = 24/45
```

```
# calcul du CO2 théorique
```

```
largeur_barre = 0.2
```

```
Glu_i = params['S0'].value
```

```
AA_i = params['AA_0'].value
```

```
Glu_c = Glu_i-data_fitted[:,1]
```

```
CO2 = 2*(Glu_c/180) + data_fitted[:,2]/60 #mol CO2/L
```

```
CO2 = CO2*44*MC_CO2 #gC
```

```
Glu = data_fitted[:,1]* MC_S #gC
```

```
mX = data_fitted[:,0]*MC_X #gC
```

```
ml = data_fitted[:,2]*MC_I #gC
```

```
mB = data_fitted[:,3]*MC_B #gC
```

```
mAA = data_fitted[:,4] *MC_AA #gC
```

```
mAB = data_fitted[:,5]*MC_AB #gC
```

```
mE = data_fitted[:,6]*MC_E #gC
```

```
# plot des résultats
```

```
CO2_C = [CO2[0], CO2[ti-1]]
```

```
Glu_C = [Glu[0], Glu[ti-1]]
```

```
mX_C = [mX[0], mX[ti-1]]
```

```
ml_C = [ml[0], ml[ti-1]]
```

```
mB_C = [mB[0], mB[ti-1]]
```

```
mAA_C = [mAA[0], mAA[ti-1]]
```

```
mAB_C = [mAB[0],mAB[ti-1]]
```

```
mE_C = [mE[0], mE[ti-1]]
```

```
Init = CO2[0]+Glu[0]+mX[0]+ml[0]+mB[0]+mAA[0]+mAB[0]+mE[0]
```

```
Fin = CO2[ti-1]+ Glu[ti-1]+mX[ti-1] +mB [ti-1] +mAA[ti-1] + mAB[ti-1] + mE[ti-1]
```

```
Bil = Init/Fin*100
```

```
print(Bil)
```

```
# Premier histogramme
```

```
x = [0.3,0.7]
```

```
plt.bar(x,CO2_C, width =largeur_barre,align = 'center', color = "0.5", hatch = '.', label="CO2")
```

```
plt.bar(x,Glu_C, width =largeur_barre,align = 'center',bottom =CO2_C, color = "0.1", label="glucose")
```

```
plt.bar(x,mX_C,width =largeur_barre,align = 'center', bottom = np.array(CO2_C) + np.array(Glu_C), color = "0.3", label = "biomasse")
```

```
plt.bar(x,ml_C,width =largeur_barre,align ='center', bottom = np.array(CO2_C) + np.array(Glu_C)+ np.array(mX_C), color = "0.85", label ="isopropanol")
```

```
plt.bar(x,mB_C,width =largeur_barre,align ='center', bottom = np.array(CO2_C) + np.array(Glu_C)+ np.array(mX_C) + np.array(ml_C), color = "0.9", hatch='/', label ="butanol")
```

```
plt.bar(x,mAA_C,width =largeur_barre,align ='center', bottom = np.array(CO2_C) + np.array(Glu_C)+ np.array(mX_C) + np.array(ml_C)+ np.array(mB_C),hatch ='o', color = "0.8", label = "acetate")
```

```
plt.bar(x,mAB_C,width =largeur_barre, align ='center', bottom = np.array(CO2_C) +
np.array(Glu_C)+ np.array(mX_C) + np.array(mI_C)+ np.array(mB_C)+ np.array(mAA_C), color =
"0.9", label = "butyrate")
```

```
plt.xticks(x, ['masse initiale', 'masse finale'], size = t_leg)
```

```
plt.yticks(size =t_leg)
```

```
plt.ylabel(" masse de carbone (g)", size = t_leg)
```

```
plt.legend(bbox_to_anchor=(1, -0.15),loc='best',frameon= False,ncol =3,prop={'size': t_leg})
```

```
plt.show()
```

```
« Statistique du fit »
```

```
res = result.residual
```

```
std = np.std(res)
```

```
resm = np.mean(res)
```

```
nres = np.linspace(0,len(res),len(res))
```

```
plt.figure()
```

```
plt.scatter(nres,res,s = t_tick,marker ='+')
```

```
plt.xlabel("n point", size = t_leg)
```

```
plt.ylabel('résidu du modèle', size = t_leg)
```

```
plt.xticks(size =t_leg)
```

```
plt.yticks(size =t_leg)
plt.axhline(y = resm + 2*std, color = 'b', linestyle = '--')
plt.axhline(y = resm - 2*std, color = 'b', linestyle = '--')
plt.show()
```

```
#stats.probplot(res, dist="norm", plot=pylab)
sm.qqplot(res,line='r')
pylab.show()
```

```
# representation des statistiques des paramètres
report_fit(result)
```

```
print("la moyenne des résidus est de : ",np.mean(res))
norm = scipy.stats.shapiro(res)
print("la statistique de test p.value est égale à",norm)
```

"Représentation graphique du modèle et des données expérimentales"

```
plt.figure(1)
fig, ax1 = plt.subplots()
plt.grid()
plt.xticks(size =t_leg)
plt.yticks(size =t_leg)
plt.ylim(0,10)
```

```

ax2 = ax1.twinx()

ax1.errorbar(t_exp, data_exp[:,0], yerr = ET_DO,fmt= 'none',ecolor = 'black',capsize=5)

ax1.plot(ts, data_fitted[:, 0], '-', linewidth=1.3, color='black', label='biomass (mod)')

ax1.scatter(t_exp,data_exp[:,0], s = t_tick,color = 'white',marker='d',edgecolor='black', label =
'biomass(exp)')

ax2.plot(ts, data_fitted[:, 1], '--', linewidth=1.3, color='black', label='glucose (mod)')

ax2.errorbar(t_exp, data_exp[:,1], yerr = ET_Glu,fmt= 'none',ecolor = 'black',capsize=5)

ax2.scatter(t_exp,data_exp[:,1],s = t_tick,color = 'white',marker='s',edgecolor='black',label =
'glucose (exp)')

ax1.set_xlabel('temps (h)', size = t_leg)

ax1.set_ylabel('concentration en biomasse (g/L)', color='black',size = 14)

plt.yticks(size =t_leg)

ax2.set_ylabel('concentration résiduelle en glucose (g/L)', color='black', size =t_leg)

plt.yticks(size =t_leg)

plt.ylim(0,50)

plt.show()

plt.figure()

plt.grid()

plt.plot(ts, data_fitted[:, 4], '-', linewidth=1, color='black', label='acétate (mod)')

plt.errorbar(t_exp,data_exp[:,4], yerr= ET_AA,fmt= 'none',ecolor = 'black',capsize=5)

```

```
plt.scatter(t_exp,data_exp[:,4],s =t_tick,color = 'white',marker='s',edgecolor='black', label = 'acétate (exp)')
```

```
plt.errorbar(t_exp,data_exp[:,5], yerr= ET_AB,fmt= 'none',ecolor ='black',capsize=5)
```

```
plt.plot(ts, data_fitted[:, 5], '--', linewidth=1, color='black', label='butyrate(mod)')
```

```
plt.scatter(t_exp,data_exp[:,5],s =t_tick,color = 'white', marker ='d',edgecolor='black', label = 'butyrate (exp)')
```

```
plt.xlabel("temps (h)", size = t_leg)
```

```
plt.ylabel('Acétate, Butyrate (g/L) ', size = t_leg)
```

```
plt.xticks(size =t_leg)
```

```
plt.yticks(size =t_leg)
```

```
plt.legend(bbox_to_anchor=(1, -0.15),loc='best',frameon= False,ncol =2,prop={'size': t_leg})
```

```
plt.show()
```

```
plt.figure(3)
```

```
plt.grid()
```

```
plt.errorbar(t_exp,data_exp[:,2], yerr= ET_iso,fmt= 'none',ecolor ='black',capsize=5)
```

```
plt.plot(ts, data_fitted[:, 2], '-', color='black', label='isopropanol (mod)')
```

```
plt.scatter(t_exp,data_exp[:,2],color = 'white',s =t_tick,marker='*', edgecolor = 'black',label = 'isopropanol (exp)')
```

```
plt.errorbar(t_exp,data_exp[:,3], yerr= ET_but,fmt= 'none',ecolor ='black',capsize=5)
```

```
plt.plot(ts, data_fitted[:, 3], '--', linewidth=1, color='black', label='butanol (mod)')
```

```
plt.scatter(t_exp,data_exp[:,3],s = t_tick,color = 'white',marker = 'o',edgecolor='black', label = 'butanol (exp)')
```

```

plt.plot(ts, data_fitted[:, 6], '-', linewidth=1, color='grey', label='ethanol (mod)')
plt.scatter(t_exp,data_exp[:,6],s = t_tick,color = 'grey',marker = '+', label = 'ethanol (exp)')

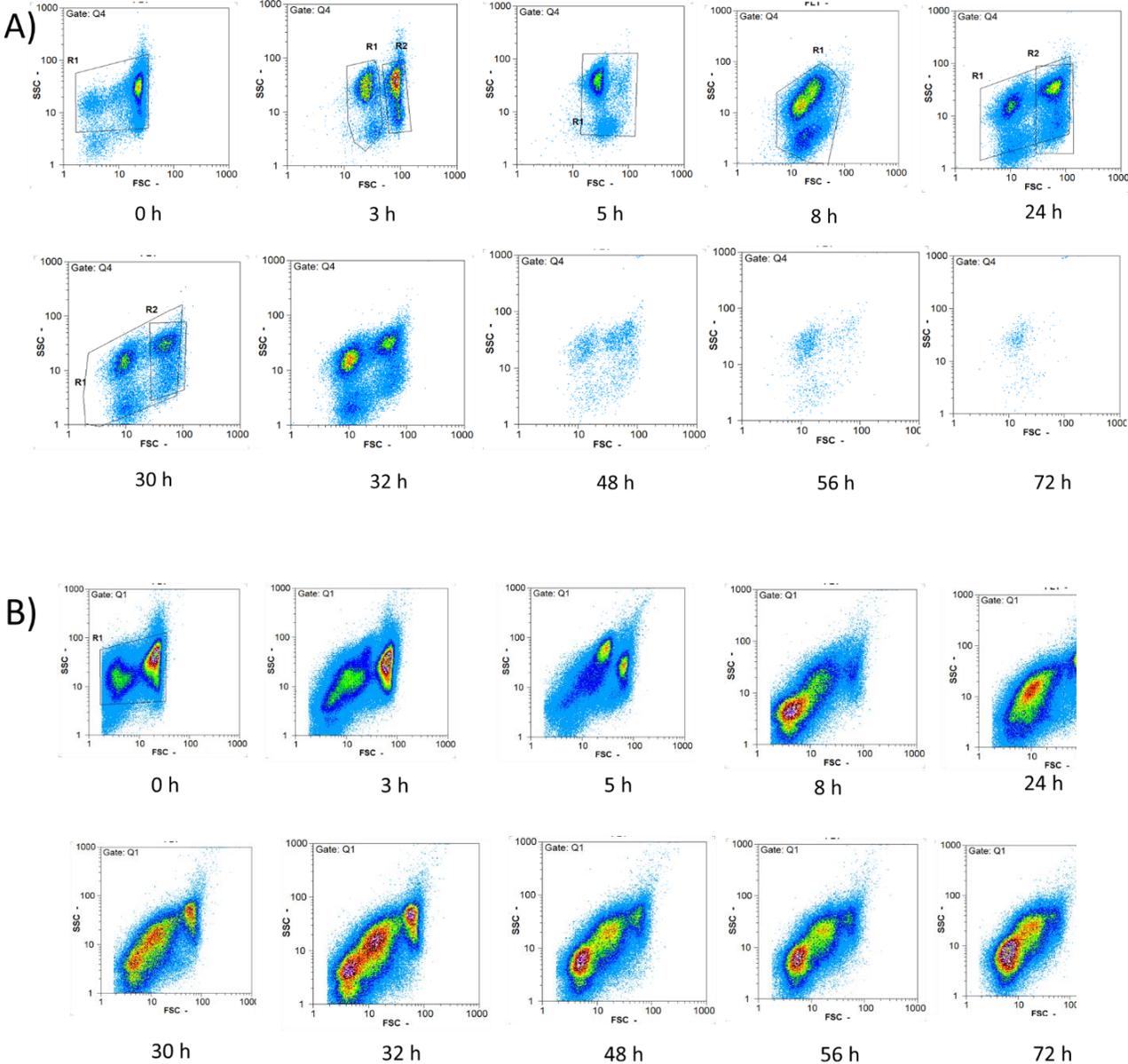
plt.errorbar(t_exp,IBEexp, yerr= ET_IBE,fmt= 'none',ecolor = 'black',capsize=5)
plt.plot(ts, IBEsim, '-', linewidth=1, color='black', label='solvants totaux (mod)')
plt.scatter(t_exp,IBEexp,color = 'white',s = t_tick, marker = 'D',edgecolor='black', label = 'solvants
totaux (exp)')

plt.xlabel("temps (h)", size = t_leg)
plt.xticks(size =t_leg)
plt.ylabel('Butanol, isopropanol, ethanol (g/L)', size = t_leg)
plt.yticks(size =t_leg)

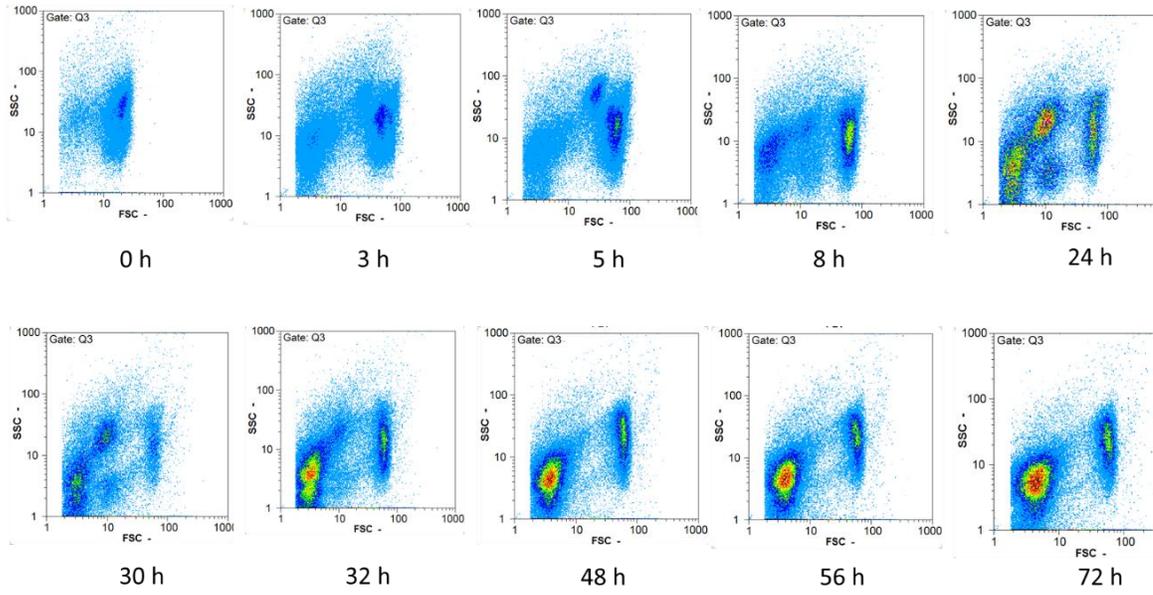
plt.legend(bbox_to_anchor=(1.3, -0.15),loc='best',frameon= False,ncol =3,prop={'size': t_leg})
plt.show()

```

Annexe 5 : profil FSC-SSC des populations cellulaires au cours d'une fermentation batch à 34°C à pH libre marquée à A) cFDA seul B) IP seul C) non marquées.



C)



Titre : Étude et modélisation de la fermentation IBE en biofilm

Mots clés : *Clostridium*, biofilm, isopropanol, butanol, cytométrie en flux, viabilité, fermentation, microscopie confocale, modélisation, bioprocédé.

Résumé : Depuis de nombreuses années, les biotechnologies sont employées dans la conception de nombreux biens de consommation à partir de ressources renouvelables. En effet, ces technologies sont capables de synthétiser des molécules d'intérêts à partir de ressources agricoles. Par exemple, la bactérie *Clostridium beijerinckii*, mise en culture dans cette thèse, dégrade naturellement des hexoses pour synthétiser des molécules plateformes : du butanol et de l'isopropanol. Cette bactérie souffre malheureusement, en mode « batch », d'une inhibition causée par le butanol, amenant à de faibles productivités. De nouveaux modes de fermentation continue ont donc été développés pour lever cette inhibition en soutirant le produit de réaction et augmenter la productivité volumique. Ils consistent à immobiliser les bactéries au sein d'un support pour maintenir une forte concentration en biomasse dans le réacteur. Ainsi, ce système permet de découpler le temps de séjour de la biomasse du temps de séjour hydraulique, et d'augmenter la productivité volumique du procédé. Pour autant, de nombreux paramètres de fermentation doivent encore être optimisés et compris afin de maximiser les performances et d'assurer la montée en échelle.

En effet, la croissance des cellules immobilisées au sein du matériau support dépend de nombreux facteurs comme les propriétés du solide support, la conduite du procédé, ainsi que les conditions hydrodynamiques. Ces propriétés peuvent donc influencer le développement du biofilm et donc la productivité volumique du procédé. Par conséquent, les recherches de cette thèse ont porté sur le développement d'outils expérimentaux et numériques permettant de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu. Les modèles dynamiques mis en place dans ce travail sont capables de décrire la croissance du biofilm et permettent de simuler les performances du procédé en prenant en compte les phénomènes de détachement et d'attachement des cellules. De plus, de nouvelles méthodologies de cytométrie en flux et microscopie confocale, appliquées à l'étude des biofilms, ont été mises au point. Elles permettent de quantifier la viabilité des cellules adhérentes aux supports. Ces méthodologies permettent de décrire la viabilité du biofilm formé ainsi que de mesurer la croissance des cellules viables qui composent ce dernier. Ces résultats ont ainsi permis d'envisager de nouvelles stratégies de contrôle et/ou de conduite du procédé.

Title : Study and modeling of the IBE fermentation using biofilm.

Keywords : *Clostridium*, biofilm, isopropanol, butanol, flow cytometry, viability, fermentation, confocal microscopy, kinetic modeling, bioprocess.

Abstract : For many years, biotechnologies have been employed to design numerous consumers commodities from renewable resources. Those technologies allow to synthesize industrial interest molecules from agricultural commodities. The bacteria *Clostridium beijerinckii* can consume hexoses to produce two platform chemicals : isopropanol and butanol. However, this bacterium suffers from an inhibition caused by butanol accumulation which causes low productivities in batch fermentation. New continuous fermentation strategies have thus been developed. Bacteria were immobilized on porous support to maintain high cellular concentration and therefore enhance the process productivity. Numerous process parameters must be optimized and understood to maximize the process productivity and ensure the scale-up efficiency. The physicochemical properties of the solid support as well as the hydrodynamic conditions can influence the biofilm development and thus the productivity of the developed process.

Consequently, this PhD research is focused on the development of numerical and experimental tools which allow to better understand these phenomena . Kinetic models were used to describe the biofilm development and allowed the simulation of the process performances while taking cells attachment and detachment from biofilm into account. Moreover, new methodologies using flow cytometry and confocal microscopy were developed to characterize biofilm cells viability. Those methodologies are powerful to measure the immobilized cells viability and to describe active cells accumulation within the solid support used during time. The use of flow cytometry to characterize biofilm cells viability also helped to consider new strategies for process control and operation.