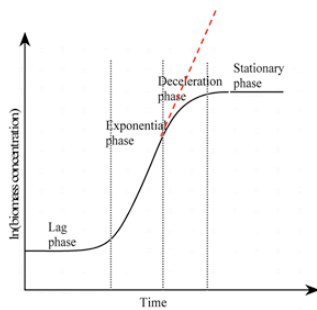


STRATEGIES NUTRITIONNELLES

BATCH

Mode de culture le plus simple, il est caractérisé par un **volume constant**. L'inoculum est ajouté au milieu et on laisse se dérouler la culture. La biomasse évolue selon la courbe de croissance caractéristique des micro-organismes. La culture est terminée lorsque tout le substrat est consommé et le produit attendu est formé. On intervient sur la vitesse de rotation, sur l'aération ou encore l'ajustement du pH. Mais aucun milieu nutritif n'est ajouté en cours de fermentation et rien n'est retiré.

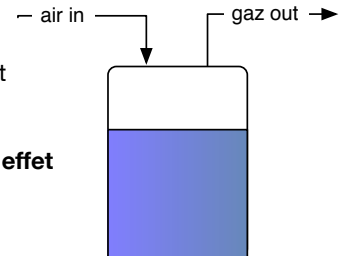
AVANTAGES



- Méthode la plus utilisée en industrie, **historiquement importante** (pratiquement toutes les fermentations alimentaires sont en mode BATCH)
- Mise en place et gestion aisée
- Coûts d'installation relativement faibles
- Chaque "run" utilise un nouveau seed train (pas d'épuisement de la lignée)
- Peu de chance de mutation car la fermentation est de faible durée
- Risque de contamination peu élevée car peu de manipulations
- Facilement intégrable avec le DSP
- Validation facilitée (car procédé éprouvé)
- Evite la perte de l'ensemble de la production en cas de problème (car généralement plusieurs réacteurs sont utilisés)

DESAVANTAGES

- Downtime très importants impliquant une productivité moindre. Il est nécessaire de nettoyer et de stériliser entre deux run. Le temps entre 2 batchs peut être très important, surtout si GMP.
- Coûts de personnel important (prise échantillon et analytique)
- Risques de répressions de la croissance ou de la production par le substrat (**Crabtree effect, effet Pasteur**)
- **Faible densité maximale** (pas le temps de pousser!)
- **Accumulation de produits toxiques**



FED-BATCH

Culture dite discontinue alimentée, le Fed-Batch est caractérisé par un **volume variable**. La fermentation se fait dans un premier temps sous forme d'un batch normal dans un volume réduit (ped de cuve). Du milieu frais est ensuite ajouté pour maintenir les cellules dans l'état souhaité (phase exponentielle, phase stationnaire). Cette stratégie est très utile pour les cas de **répression de croissance ou de production du au substrat (ou toxicité de ce dernier)**. En effet il est possible d'adapter le feed pour ne jamais dépasser les valeurs limites.

Le feed peut être linéaire ou exponentielle. Pour déterminer la meilleure stratégie il faut connaître la cinétique de la souche utilisée. C'est pour cela qu'on utilise le plus souvent cette méthode avec des souches caractérisées telles qu'Escherichia coli.

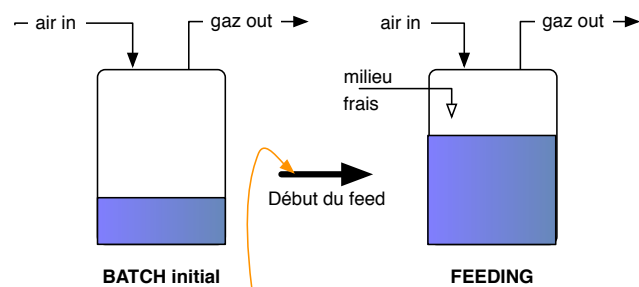
AVANTAGES

- Coûts opérationnels inférieurs à ceux du batch mais supérieurs à ceux d'une culture continue
- Il est possible de combiner 2 ou plus réacteurs pour obtenir une culture plus ou moins continue
- Taux de croissance et de production plus élevée qu'en batch tout en maintenant un niveau de substrat bas (proche de 0), **1 fed-batch est plus ou moins égal à 2 batchs**
- Moins de risque d'inhibition due au substrat, de toxicité d'un produit accumulé ou de stress osmotique car il est possible d'adapter les stratégies de feed en conséquence.
- **Il est possible de séparer les phases de croissance et de production**, des précurseurs peuvent être ajoutés
- Moins de risque de limitations due à l'oxygène (taux de croissance = OUR maintenu en dessous de l'OTR)

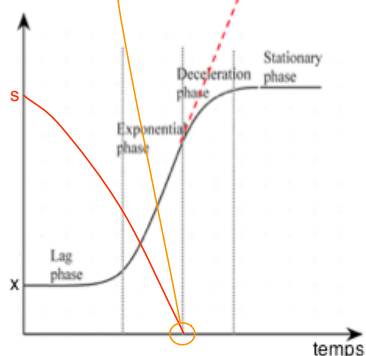
DESAVANTAGES

- Coûts d'installation supérieurs à ceux d'un batch
- Grande quantité de milieu nécessaire ce qui implique sa stérilisation en continu
- La souche utilisée doit être totalement caractérisée (cinétique, physiologie) pour pouvoir développer une stratégie de feeding.
- Des capteurs sophistiqués et un ordinateur sont nécessaires pour contrôler le feed et maximiser la productivité.

STRATEGIE



Le feed peut être démarré à plusieurs moments, en fonction du type de production envisagée (biomasse ou produit du métabolisme secondaire). Si le but est de maintenir les cellules dans leur phase exponentielle, on attend généralement que le substrat devienne limitant avant d'en introduire du frais. Pour se faire on étudie la **pO₂** qui est directement liée à la consommation de substrat. Si le substrat n'est pas limitant, il est possible d'utiliser le pH comme indication.



EXEMPLES

- Pour la **production d'un métabolite secondaire (ex : protéine recombinante)**, il faut garder la culture en phase stationnaire. Pour se faire il est intéressant d'ajouter continuellement du substrat tout en restant à un niveau presque limitant. Cela force la cellule à utiliser son métabolisme secondaire qui est très souvent inhibé par une trop grosse concentration de substrat.
- La production de **S. cerevisiae** se fait en fed-batch pour augmenter la productivité tout en évitant l'effet Crabtree
- **Production de protéines recombinantes à l'aide d'hybridomas** : si la concentration de glucose dépasse les 4 g/l, les enzymes respiratoires sont inhibées. Même en ayant une pO₂ élevée, du lactate se forme. Il faut donc maintenir le glucose à une concentration inférieure à 4 g/l (feed contrôlé par analyse de gaz : O₂, CO₂, RQ, sonde à glucose) et un RQ entre 0.95 et 1 (c'est à dire que la production de CO₂ soit similaire à la consommation d'O₂ (signe d'une respiration cellulaire normale))
- La **production d'hormones recombinantes** se fait en 2 étapes :
 - La première partie sert à optimiser la croissance pour atteindre une densité cellulaire optimale. On contrôle le feed en mesurant l'OUR et le pH (formation de lactate et/ou accumulation d'ammonium)
 - La production est ensuite induite avec un agent chimique ou un choc thermique. Cette partie de la fermentation n'est contrôlée qu'avec la mesure de l'OUR

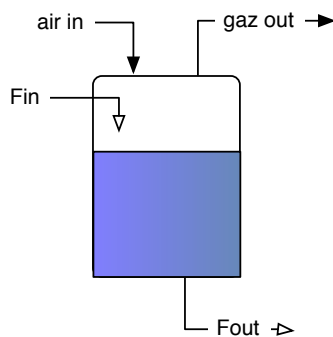
RESPIRATORY QUOTIENT (RQ)

$$RQ = \frac{\text{moles de CO}_2 \text{ formées}}{\text{moles d'O}_2 \text{ consommées}}$$

Le CO₂ produit peut être mesuré à l'aide d'une sonde pCO₂ infrarouge

CULTURE CONTINUE

Une culture continue est caractérisée par un **volume constant** (après la phase initiale) et un flux entrant qui est égal au flux sortant. Ainsi l'excès (cellules, produit, déchets, etc..) quitte le système à la même vitesse que le milieu frais est introduit.



Soit F_{in} la vitesse du milieu entrant et F_{out} la vitesse du milieu sortant. Le début de la fermentation est un batch conventionnel puis le mode continu est enclenché. On arrive alors à un état appelé "Steady State", c'est à dire que **toutes les variables mesurables du système (Biomasse, production, substrat, etc...) sont constantes**. L'équation qui décrit cet état d'équilibre est la suivante :

$$F_{in} = F_{out}$$

Une fois cette équilibre atteint, il est possible de modifier un paramètre physique (le débit D) pour ajuster un paramètre biologique (taux de croissance μ)

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

Il est donc possible de maintenir les cellules dans l'état désiré (par exemple en phase de croissance ou alors en phase stationnaire dans le cas de production d'une métabolite secondaire)

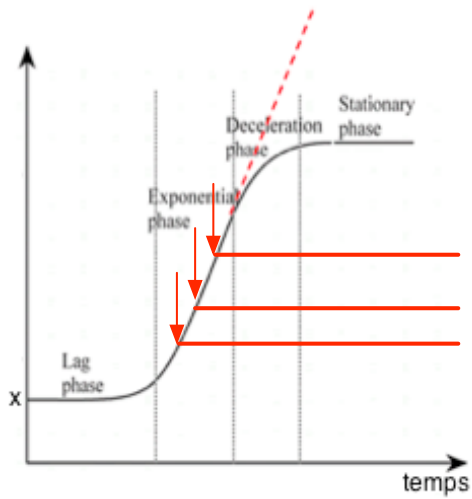
AVANTAGES

- Cultures de longue durées (production d'anticorps 3-4 mois), peu de temps morts
- Les coûts opérationnels et de main d'oeuvre sont faibles (car il faut seulement prendre environ 1 échantillon par jour et un peu d'étapes de nettoyage et de stérilisation)
- **Il est possible de maintenir la culture à un taux de croissance constant mais également d'avoir un rendement, une productivité et un facteur de conversion constants**
- A productivité équivalente, le volume est plus faible que pour les procédés batchs
- Possibilité d'avoir une productivité très élevée

DESAVANTAGES

- Equipement très cher, car il faut une installation fiable et de haute qualité (pas seulement le réacteur mais toute l'infrastructure)
- De grande réserves de milieu sont nécessaires et ce dernier a besoin d'être continuellement stérilisés. De plus le produit doit être isolé et purifié en continu **ce qui pose de gros problèmes au niveau du DSP (=bottleneck)**.
- Le milieu est changé continuellement, éliminant le risque d'accumulation de composés toxiques pour la cellule
- Risque de contamination important (à cause de la longue durée du procédé)
- Des mutations peuvent apparaître (risque d'avoir des non-producteurs) à cause de la longue durée de fermentation
- Instabilité des plasmides
- La conversion totale du substrat nécessite souvent l'utilisation d'un système "multi-stage", l'immobilisation des cellules ou encore leur recyclage (particulièrement utile pour cellules animales car la densité maximale est relativement faible)
- Le produit obtenu n'est pas très concentré, ce qui implique des étapes supplémentaires lors du DSP
- La validation d'un tel système est très compliquée

STRATEGIE



On peut débuter la culture continue à plusieurs points différents du batch initial. Néanmoins on choisit en général **le milieu de la phase exponentielle** de la croissance.

SOURCES

Eyer K., Dubuis P. « Development of an Industrial Biotechnology Process : Nutritional strategies », HES-SO Valais. Sion, Mars 2008