



NUMERO DE PUBLICATION : 1004042A5

NUMERO DE DEPOT : 8900693

Classif. Internat.: C12M C02F

MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

Date de délivrance : 15 Septembre 1992

Le Ministre des Affaires Economiques,

Vu la loi du 28 Mars 1984 sur les brevets d'invention, notamment l'article 22;

Vu l'arrêté royal du 2 Décembre 1986 relatif à la demande, à la délivrance et au maintien en vigueur des brevets d'invention, notamment l'article 28;

Vu le procès verbal dressé le 23 Juin 1989 à 24h00
à l'Office de la Propriété Industrielle

ARRETE:

ARTICLE 1.- Il est délivré à : FACULTE POLYTECHNIQUE DE MONS
rue de Houdain 9, 7000 MONS(BELGIQUE)

représenté(e)(s) par : VAN MALDEREN Michel, OFFICE VAN MALDEREN, Avenue J.-S. Bach,
22 bte 43 - B 1080 BRUXELLES.

un brevet d'invention d'une durée de 20 ans, sous réserve du paiement des taxes annuelles, pour : PROCEDE ET APPAREILLAGE POUR LA MISE EN CONTACT SIMULTANEE D'UNE PHASE LIQUIDE ET D'UN FLUIDE GAZEUX AVEC UNE BIOMASSE IMMOBILISEE.

INVENTEUR(S) : De Meyer Michel, rue des Wagons 107, 7380 Quievrain (BE);Levert Jean Marie, Drève du Prophète 19, 7000 Mons (BE);Vanthournhout Maxime, avenue de la Wallonie 48, 7900 Leuze (BE)

ARTICLE 2.- Ce brevet est délivré sans examen préalable de la brevetabilité de l'invention, sans garantie du mérite de l'invention ou de l'exactitude de la description de celle-ci et aux risques et périls du(des) demandeur(s).

Bruxelles, le 15 Septembre 1992
PAR DELEGATION SPECIALE :

WUYTS L.
Directeur.

PROCEDE ET APPAREILLAGE POUR LA MISE EN CONTACT SIMULTANEE
D'UNE PHASE LIQUIDE ET D'UN FLUIDE GAZEUX AVEC UNE BIOMASSE
IMMOBILISEE

La présente invention se rapporte à un nouveau procédé pour l'introduction, la distribution d'une phase liquide dans une enceinte où elle est mise en contact simultané et de manière continue avec un fluide gazeux et une biomasse immobilisée sur les deux faces de supports minces texturés bidimensionnels, tendus ou rigides, ainsi qu'à l'appareillage pour la réalisation de ce procédé.

La configuration donnée à l'appareillage est telle que le liquide qui s'écoule, sous l'effet de la gravité, sur la biomasse s'étale sous la forme d'un film continu qui à la fois épouse de manière permanente l'ensemble de la surface de la biomasse immobilisée et présente une interface de contact importante avec le fluide gazeux.

L'écoulement par gravité du liquide et le déplacement tangentiel du fluide gazeux à la surface du liquide assurent en tout point un renouvellement des surfaces de contact liquide-biomasse, gaz-liquide.

5 Le procédé se rapporte à la réalisation de toute transformation physique, toute réaction biochimique, biologique faisant intervenir la biomasse immobilisée.

10 Le terme biomasse lorsqu'il se rapporte à la biomasse confinée dans un réacteur, doit ici être compris dans un sens très large et englobe des cellules ou des constituants extraits de ces cellules : organites, complexes enzymatiques, enzymes ou ces mêmes constituants modifiés ou synthétisés par voie artificielle.

15 Le terme phase liquide signifie tout liquide pur ou en mélange, toute solution ou suspension de composés minéraux ou organiques d'origine naturelle ou artificielle, toute suspension cellulaire.

20 Le terme fluide gazeux désigne tout gaz, vapeur, brouillard, soit à l'état pur soit en mélange avec d'autres composés.

20 Le terme enceinte est utilisé dans un sens général et est relatif à tout espace totalement ou partiellement délimité et qui est le siège de transformation et ou de réaction.

25 Dans les réactions biochimiques et biologiques, le terme substrat signifie tout milieu liquide ou solide renfermant tout ou partie des constituants nécessaires aux réactions biochimiques et biologiques, par exemple, la croissance d'une biomasse, son maintien et l'excrétion de métabolites.

30 L'utilisation d'une biomasse confinée dans une enceinte siège de réactions ou bioréacteur est recherchée dans la bioindustrie pour réaliser des transformations enzymatiques, pour produire des métabolites excrétés par des cellules, pour épurer des eaux résiduaires, pour produire du méthane.

35 Le maintien de la biomasse "outil" dans le bioréacteur entraîne parmi d'autres avantages, la possibilité de la mise en oeuvre d'un régime de fonctionnement continu avec un taux de dilution élevé ainsi que la simplification de l'ensemble du processus biotechnologique.

La biomasse peut être confinée soit :

- dans des réacteurs complètement submergés, sous forme floculée ou immobilisée par adsorption, piégeage dans un gel réticulé, micro-encapsulation. Les supports d'immobilisation.
5 peuvent être des particules granulaires d'une densité supérieure à celle de la phase liquide, des billes de carragénane, d'alginate de calcium, d'échangeur d'ions, des mousses de polyuréthanes, ...
- dans des réacteurs partiellement submergés, types biodisques
10 ou lits bactériens, utilisés pour l'épuration aérobie d'eaux résiduaires.

Les bioréacteurs submergés peuvent être du type colonne à garnissage, lit fluidisé, colonne à bulles.

- Un souci évident de productivité conduit à rechercher une
15 concentration aussi importante que possible de la biomasse confinée. Dans les colonnes à garnissage, la libération de gaz qui accompagne de nombreuses réactions biologiques, entraîne la formation de poches gazeuses qui empêchent une irrigation uniforme de la biomasse ; d'une manière similaire, l'aération
20 du substrat par dispersion de gaz au sein du liquide dans la colonne conduit au même inconvénient. Cette aération doit alors se faire dans un dispositif périphérique au réacteur lui-même et la réserve d'oxygène disponible est alors limitée à
25 l'oxygène dissous dans le substrat liquide ; ceci est un facteur limitatif de la taille des réacteurs pour un bon fonctionnement aérobie.

Par rapport aux colonnes à garnissage, les lits fluidisés présentent l'avantage d'une élimination aisée des gaz produits par la réaction. Les colonnes à bulles, de par leur principe,
30 réalisent une alimentation gazeuse in situ, un mélange efficace de la suspension de biomasse et une élimination des gaz produits. Toutefois :

- dans les lits fluidisés, le taux de dilution en fonctionnement continu est limité par la vitesse de
35 sédimentation de la biomasse confinée.

- dans les colonnes à bulles, le caractère homogène ne permet pas un fonctionnement continu du réacteur, sans extraire la biomasse qui devra être décantée dans un séparateur annexe et réintroduite dans la colonne.

5 Dans les lits bactériens partiellement submergés, la biomasse est adsorbée sur des garnissages poreux de formes diverses usuellement constitués en matière plastique et arrosés par un liquide dispersé par des pulvérisateurs soit fixes, soit liés à des bras rotatifs. La circulation ascendante du gaz
10 s'effectue au travers du garnissage par tirage naturel ou forcé.

Ces lits bactériens présentent des inconvénients tels que:

- les transferts eau résiduaire-biomasse, eau résiduaire-air,
15 ne s'effectuent pas de manière continue et uniforme en tout point du lit
- la masse du support solide et le ruissellement désordonné sont à l'origine de pertes de charges d'autant plus élevées que la réaction biologique exige une aération intense de la
20 biomasse confinée
- ils ne fonctionnent pas en milieu stérile.

Dans une éventuelle adaptation de ce procédé en milieu stérile, la matière plastique du garnissage qui ne résiste pas à la stérilisation à la vapeur, devrait être remplacée par des
25 matériaux minéraux : céramique, roche poreuse, beaucoup plus lourds, ce qui exigerait la réalisation d'infrastructure et de superstructure d'un coût élevé.

Le principe même du système d'épuration des eaux à bio-disques rotatifs ne permet qu'une immersion alternée, périodique de la biomasse dans la phase liquide et le fluide gazeux.
30 Le fluide gazeux n'est donc pas en contact permanent avec la phase liquide. Dans la partie aérée du cycle de rotation, le film liquide à la surface de la biomasse n'est pas renouvelé et il y a dès lors risque de voir la cinétique d'épuration ralentie sur une partie du cycle de rotation. Le système exige une
35 dépense d'énergie importante, liée à la rotation de la batterie du biodisque.

Ces différents bioréacteurs présentent tous un ou plusieurs des inconvénients suivants :

- irrigation irrégulière et non permanente de la biomasse
- éclatement des microcapsules de biomasse sous la pression des gaz occlus provenant de l'activité de la biomasse
- limitation imposée à la diffusion du substrat et des métabolites dans les gels réticulés
- aération et élimination difficile des gaz produits par la réaction
- difficulté voire impossibilité de travailler en milieu stérile
- nécessité d'immobiliser la biomasse dans une opération préliminaire exécutée dans une enceinte stérile différente du réacteur
- conditions d'échange phase liquide-biomasse, phase liquide-fluide gazeux, mal définies et variables d'un endroit à l'autre du support
- difficulté de vidange et de nettoyage des éléments supports de la biomasse.

Préalablement à la description de l'invention nous précisons le sens à donner à certains termes.

Tissu : surface obtenue par l'assemblage régulier de fils ou de fibres soit enchevêtrés par mailles (tricot, tulle, guipure), soit disposés en deux séries croisées à angle droit, soit encore solidarisés les uns des autres par un procédé quelconque (voir non tissé).

Armure : mode d'entrecroisement des fils de chaîne et de trame constituant un tissu. Ex. : toile, sergé, satin.

Texture : genre, mode d'entrecroisement des fils de tissage ; état de ce qui est tissé.

Tricot : tissu de mailles tricotées.

Non tissé : produit ayant l'apparence d'une étoffe mais obtenu sans filage ni tissage et qui présente un relief. Ex. : feutre.

Le procédé faisant l'objet de l'invention, consiste dans le fait qu'on réalise la mise en contact simultanée et continue d'un liquide avec une biomasse immobilisée et un fluide gazeux. La phase liquide s'écoule sur la biomasse sous l'effet de la gravité en forme de film continu qui épouse de manière permanente l'ensemble de la biomasse immobilisée sur les deux faces d'un support mince bidimensionnel tendu ou rigide qui présente une armure ou un relief. Le fluide gazeux est animé d'une vitesse relative propre par rapport à la phase liquide qui s'écoule. Les supports peuvent être fabriqués en matériaux d'origine naturelle ou artificielle, minérale, organique ou métallique.

On établit ainsi pour chaque face du support mince bidimensionnel, deux interfaces idéalement parallèles, biomasse-phase liquide, phase liquide-fluide gazeux, continuellement renouvelées en ce qui concerne les phases mobiles et qui assurent d'excellentes conditions de transfert des substrats, solvants, gaz et produits participant aux réactions biologiques et biochimiques.

La phase liquide peut jouer plusieurs rôles, par exemple:

- véhiculer les réactifs ou le substrat nécessaires à la transformation biochimique ou biologique mise en oeuvre
- rincer la biomasse avant un changement de substrat, par exemple lorsque le milieu de croissance cellulaire est différent du milieu induisant la production de métabolites
- désorber les produits fortement adsorbés sur la biomasse ; dans ce cas le choix de la force ionique de la phase liquide est un facteur déterminant.

La phase gazeuse continue apporte l'oxygène et élimine des produits : CO_2 , H_2 , CH_4 , NH_3 , H_2S , ...

Il est essentiel que les supports minces bidimensionnels aient des caractéristiques de surface: relief, propriétés physicochimiques, favorisant l'accrochage de la biomasse, qu'ils résistent aux sollicitations mécaniques et à l'agressivité de leur environnement et qu'ils n'interfèrent pas avec la réaction mise en oeuvre par exemple en relarguant des produits inhibiteurs en milieu liquide.

L'écoulement régulier et continu de la phase liquide sur le support (pendant la période de sa colonisation par exemple, par des cellules) doit être réalisé en tout point du support ou de la biomasse et suppose une bonne mouillabilité, condition
5 nécessaire à l'accrochage régulier de la biomasse.

Ces considérations soulignent l'importance des propriétés physicochimiques de surface des supports.

Les supports minces bidimensionnels souples sont choisis parmi les étoffes tissées, non tissées ou tricotées.

10 Le choix des étoffes est influencé :

- d'une manière générale par :

- . la nature des fibres et des fils constitutifs, leur texturation, leur résistance à un éventuel traitement de surface destiné à améliorer l'adhérence de la biomasse
- 15 . les caractéristiques mécaniques des tissus : résistance à la traction, élasticité, déformation

- et en particulier :

pour les tissus par :

- . l'armure ; toile, satin, sergé ou toute combinaison de ces
20 trois armures de base
- . l'état du surface du tissu : bouclé, cotelé, cloqué, crêpe, doupion, ...
- . l'espacement donné aux fils de chaîne et de trame

pour les tricots par :

- 25 . le type de maille, cueillies ou jetées, la dimension des mailles : lâches ou serrées

pour les non-tissés par :

- . l'adhésion entre les fibres, les dimensions des mailles dans le cas particulier des filets réalisés selon cette
30 technique.

Les supports minces bidimensionnels rigides continus doivent présenter une surface spécifique importante avec de nombreux pores ouverts ou encore être constitués par une armature en treillis dont la dimension des mailles est appropriée. Ils doivent pouvoir subir un éventuel traitement de
35 surface destiné à améliorer l'adhésion de la biomasse.

La texture du support et son relief sont deux paramètres qui permettent d'influencer de manière considérable, le poids de biomasse immobilisée et les transferts de masse entre les phases par la création de turbulence locale à la surface de la biomasse.

5

Dans certaines applications particulières, le support est constitué en tout ou partie par le substrat solide d'une culture de cellules. C'est par exemple le cas d'un substrat cellulosique qui est alors emprisonné dans un filet souple tendu, aux mailles d'une dimension appropriée et dans un film enveloppe sous-jacent au filet et qui possède la propriété d'être rapidement biodégradable.

10

Dans un premier temps, le filet est colonisé, par un organisme cellulolytique croissant sur un substrat liquide glucosé qui s'écoule sur le filet. Après obturation des mailles du filet par la biomasse, on modifie le substrat de manière à induire la production de cellulases ; le film enveloppe est rapidement détruit et la production de cellulases se poursuit par attaque du substrat cellulosique emprisonné : copeaux de bois, paille hachée, ...

15

20

Ce dispositif n'est pas limitatif des moyens d'emprisonnement qui peuvent aussi avoir recours à toute forme de réticulation incluant le substrat.

25

L'invention consiste aussi en ce que l'on met en oeuvre un ensemble de supports disposés parallèlement les uns aux autres de manière ordonnée de sorte que les surfaces de contact liquide-biomasse, liquide-gaz soient propres à chaque support pris individuellement.

30

La réalisation de l'invention a nécessité la construction d'un bâti, d'un système de distribution et de collecte des fluides et d'un système de positionnement des supports.

35

Le bâti de forme prismatique, largement ouvert pour permettre la circulation des fluides à la surface de la biomasse, sert de base au système d'introduction, de distribution et de collecte des fluides liquides et gazeux et au positionnement des supports.

La conception du système d'introduction et de distribution de la phase liquide, la position relative, la forme, les cotes données aux diverses pièces et découpes doivent répondre aux conditions suivantes :

- 5 - l'écoulement doit s'effectuer de manière régulière, continue en tout point de la biomasse fixée sur chacune des deux faces du support
- la biomasse ne doit pas adhérer dans le système de distribution, ni l'obstruer au cours de la phase
- 10 d'immobilisation qui se déroule de manière stérile.

L'écartement des supports doit être tel qu'une croissance de la biomasse ne puisse interrompre l'écoulement de la phase liquide et du fluide gazeux sur deux faces adjacentes de supports voisins.

- 15 L'écoulement du liquide s'effectuant par gravité, il est essentiel que chaque support soit vertical ; le bâti est donc muni à cet effet d'un système de mise à niveau.

- 20 L'ensemble de l'appareillage utilisé pour la mise en contact simultanée et continue d'une phase liquide avec une biomasse immobilisée et un fluide gazeux, dénommé ci-après biocontacteur est logé dans une enceinte stérile munie des connexions internes et externes permettant l'introduction, la distribution et l'évacuation des fluides liquides et gazeux.

- 25 La circulation du fluide gazeux s'effectuera de préférence à contre courant parallèle à l'écoulement du liquide.

Le procédé et l'appareillage de mise en contact simultanée et continue d'une phase liquide avec une biomasse et un fluide gazeux seront mieux compris à l'aide de figures qui ne limitent en aucun cas la présente invention.

- 30 La figure n° 1 présente une vue générale du biocontacteur : sa partie supérieure est constituée d'un dispositif de distribution de la phase liquide comprenant un réservoir primaire (1) qui alimente des chenaux secondaires (2) parallèles qui surplombent les supports (3) d'immobilisation de
- 35 la biomasse disposés verticalement.

A leur partie supérieure, les supports sont maintenus en place sous chaque chenal secondaire par l'intermédiaire de guides (4), rigides et fixes. Des guides de même nature (4'), mobiles ou fixes complètent le positionnement et éventuellement la tension des supports par l'intermédiaire du cadre de tension (5). Les orifices (9) et (9') servent à l'écoulement du liquide ; les canalisations tubulaires (10) amènent le liquide dans le réservoir primaire.

L'introduction et la distribution uniforme du milieu liquide sur les deux faces du support, nécessitent la mise à niveau de l'ensemble à l'aide de vérins (6) fixés sur le bâti (7) du biocontacteur.

L'alimentation en gaz s'effectue par des rampes (8) de distribution situées en bas du biocontacteur.

Dans la figure 2, sont présentés les détails relatifs à la distribution continue de la phase liquide (1) et du fluide gazeux (g) sur les deux faces du support (3) d'immobilisation.

L'alimentation et la distribution, uniformes et régulières, sont assurées par le double débordement de la phase liquide du réservoir primaire (1) qui joue le rôle de tampon et de nourrice vers les chevaux secondaires (2), et de ces derniers sur les supports (3).

Remarquons que dans la configuration présentée, seul un côté des chenaux secondaires est muni d'orifices (9).

Sur cette figure, le gaz (g) s'écoule à contre-courant parallèle du liquide (1).

Les figures 3 et 4 montrent respectivement une vue en plan et une vue en élévation et de profil du biocontacteur.

La figure 5 présente une vue en élévation du contacteur logé dans une cuve (11) utilisée pour les cultures stériles. Les vérins (6) reposent sur des socles (11') solidaires de la paroi latérale de la cuve (11). Les canalisations tubulaires d'alimentation (10) du liquide sont reliées au couvercle (12) de la cuve. La collecte du liquide s'effectue par la tubulure (10') située à la partie inférieure du fond de cuve de profil cônique.

Les figures 6a et 6b détaillent la fixation des supports souples (3') sur les guides (4) et (4'). Deux types de distribution du liquide sur les supports sont présentés. En 6a, le support (3') est enfilé sur les guides (4) et (4') au moyen d'ourlets (13) et le liquide s'écoule directement sur le support. En 6b, le support (3') est relié au guide (4) par l'intermédiaire d'un tricot à mailles lâches (14) et d'oeillets (15) répartis le long du côté supérieur du support ; ce tricot sert d'intermédiaire dans l'écoulement du liquide vers le support ; l'extrémité inférieure du support est enfilée au moyen d'un ourlet sur le guide (4').

Les supports rigides (3'') sont représentés aux figures 7a et 7b. Ils sont disposés sous les chenaux secondaires (2) et parallèlement à ceux-ci en glissant les têtes supérieures (16) et inférieures (16') des supports rigides dans les guides fixes (4) et (4'). La tête supérieure (16) des supports rigides est rainurée de manière à assurer la distribution uniforme du liquide sur les deux faces du support.

Le dispositif de tension (5) des supports souples (3') est représenté à la figure 8. Le cadre de tension (17) est mobile et guidé par les montants du bâti (7) ; la tension des supports est réglée par un jeu d'écrous et contre-écrous (18). La tension des supports (3') souples s'effectue vers le bas dans la présente configuration.

La figure 9 présente le biocontacteur (19) inséré dans un ensemble de périphériques pour la mise en oeuvre d'une production industrielle de métabolites excrétés.

Le biocontacteur (19) est placé dans l'enceinte d'une cuve (11) qui est munie des alimentations du fluide gazeux (20) et de la phase liquide (10) ; à l'intérieur du bioréacteur la distribution de fluide gazeux par l'intermédiaire de la rampe (8) permet la circulation à contre-courant parallèle de la phase liquide ; le gaz s'échappe par un orifice (21) et le liquide est recueilli dans le fond de la cuve par la tubulure (10').

Le réacteur auxiliaire (22) muni d'un système d'agitation (23), sert à contrôler les paramètres physicochimiques du substrat liquide : température, pH, concentration en oxygène dissous, ... au moyen des sondes adéquates et des moyens connus de la régulation. La concentration en oxygène dissous est ajustée par le débit de fluide gazeux, en l'occurrence, l'air dans la cuve (11). Le réacteur auxiliaire (22) est relié à la cuve par une boucle de recirculation (24).

Une boucle d'extraction (25), éventuellement munie d'un module de filtration (26), permet d'extraire en continu les produits de la bioréaction.

D'autres accessoires importants mais qui ne sont pas nécessaires à la compréhension du rôle du biocontacteur sont adjoints au système ; ils permettent notamment de réaliser à volonté, le changement de phase liquide et de fluide gazeux dans le biocontacteur, l'alimentation continue en substrat frais et l'extraction des produits selon un taux de dilution choisi. L'ensemble fonctionne dans des conditions stériles en respectant les règles de l'art en la matière.

La séquence des opérations pour la mise en route et le déroulement d'une culture cellulaire est la suivante :

- a) Préparation des supports (qui comporte un éventuel traitement de surface)
- b) Fixation des supports (3) sur le bâti (7)
- c) Placement du biocontacteur (19) dans la cuve (11)
- d) Mise à niveau du biocontacteur (19)
- e) Stérilisation de la cuve, biocontacteur en place, du réacteur auxiliaire (22) rempli de substrat et des boucles de recirculation (24) et d'extraction (25)
- f) Connexion stérile des boucles de recirculation (24) et d'extraction (25)
- g) Inoculation du substrat par une porte adéquate située dans le couvercle du réacteur auxiliaire (27)
- h) Mise en circulation du substrat liquide dans la boucle de circulation fermée sur elle même et alimentation en gaz saturé en eau par (20) pour l'immobilisation in situ et la croissance de la biomasse sur le support

- i) Eventuellement changement de substrat pour la production de métabolite
- j) Mise en service de l'alimentation continue du substrat et de l'extraction des produits suivant un taux de dilution imposé tout en maintenant un taux de circulation du substrat au travers de la boucle de recirculation (24).

L'ensemble permet une gestion souple des conditions de fonctionnement du réacteur. Ainsi, selon le taux de recirculation, le biocontacteur peut se comporter en réacteur parfaitement mélangé (taux de recirculation élevé) ou tubulaire dans le cas contraire.

La matérialisation de l'invention sera mieux comprise à l'aide des exemples suivants qui n'ont aucun caractère limitatif.

1) Adsorption d'une biomasse sur différents supports :

Nature du support	Type de tissu	Traitement	Nature du microorganisme	g de cellules adsorbées/g de support
Gaze	Tissé armure toile	Néant	Levure	0,09
Gaze	Tissé armure toile	gel TiO ₂	Levure	0,19
Gaze	Tissé armure toile	gel TiO ₂ + KA	Levure	1,2
Fibre de verre	Tissé armure toile	gel TiO ₂ + KA	Levure	1
Jute	Tissé armure toile	NaOH	Aspergillus	1,2
Jute	Tissé armure toile	NaOH	Streptomyces	1,5

Les résultats montrent l'intérêt indéniable de l'introduction d'un polymère KA cationique dans l'immobilisation des microorganismes. Le choix du support est aussi fonction du type de microorganisme. La fibre de verre présente l'intérêt de mieux résister chimiquement au traitement d'immobilisation.

2) Production continue de cellulases :

Conditions de l'essai :

- Durée de l'essai : 14 jours
- Souche Streptomyces EC₁
- 5 - Milieu de culture
 - Base minérale
 - (NH₄)₂SO₄
 - K₂HPO₄
 - KH₂PO₄
 - 10 MgSO₄ 7H₂O
 - CaCl₂
- Substrat carboné : carboxyméthylcellulose
- pH = 7,5
- Température : 37°
- 15 - Nature du support d'immobilisation : tissu de jute armure
 - toile
- Surface du biocontacteur/volume de culture = 100 m²/m³
- Taux de recirculation du milieu de culture : 43 h⁻¹
- Débit d'air : 4 m³/h par m³ de bioréacteur
- 20 - Taux de dilution : variable entre 0,09 h⁻¹ et 0,45 h⁻¹

Fonctionnement continu du bioréacteur : Tableau des résultats

	Temps (jours)	D (h ⁻¹)	Activité cellulasique U x 10 ⁶ /m ³	Productivité du bioréacteur U x 10 ⁶ /m ³ x h
25	ensemencement	-	-	-
	1	-	-	-
	2	-	-	-
30	3	-	-	-
	4	0,09	2,25	0,20
	5	0,09	2,2	0,20
	6	0,18	2,3	0,20
	7	0,18	2,05	0,37
35	8	0,27	2,3	0,62
	9	0,27	2	0,54
	10	0,27	2,2	0,59
	11	0,36	1,8	0,65
	12	0,36	1,7	0,61
40	13	0,45	1,2	0,54
	14	0,45	1,1	0,50

U = Unité cellulasique exprimée en micromoles de glucose libérées par heure lors d'un dosage normalisé de l'activité enzymatique.

A titre de comparaison, la productivité du biocontacteur en régime continu est deux fois plus élevée que celle du même biocontacteur fonctionnant en discontinu et vingt fois supérieure à celle obtenue dans un bioréacteur cuve conventionnel parfaitement mélangé mettant en oeuvre la souche EC₁.

Au cours des essais, il a été constaté l'extrême facilité d'adsorption des organismes filamenteux sur le support utilisé qui joue réellement le rôle de "filtre" de biomasse sans présenter les inconvénients de pertes de charges rencontrés dans les systèmes de filtration habituels.

Un autre aspect intéressant du système réside dans l'importante surface de contact gaz-liquide qui confère au système des propriétés d'évaporateur qui permettent la concentration des produits de la réaction en admettant de l'air sec dans le bioréacteur tout en maintenant un taux de recirculation élevé de la phase liquide sur le biocontacteur.

3) Production de xylanases

Les conditions sont identiques aux conditions de production de cellulases, à l'exception du substrat carboné qui est ici le xylane.

La figure 10 montre une courbe caractéristique de la production de xylanase qui est sept fois plus élevée que la production de cellulase.

La figure 11 montre une courbe caractéristique de production de xylanase par une biomasse dont la croissance a été effectuée dans un premier temps sur glycérol et ensuite sur xylane. La figure montre l'effet inductif de l'introduction de ce dernier et l'amélioration de la production de xylanase.

4) Application du biocontacteur pour l'aération de cultures d'Aspergillus

Le biocontacteur est tout indiqué pour l'aération de cultures de microorganismes très aérobies filamenteux. La production d'acide citrique par *Aspergillus niger* en est un exemple.

Deux procédés sont actuellement utilisés industriellement pour cette production : ils mettent en oeuvre, l'un un bioréacteur à plateaux, l'autre un bioréacteur aéré mélangé. Dans ces deux procédés la biomasse en suspension dans le milieu liquide lui confère une viscosité importante qui pose des problèmes de diffusion du gaz en phase liquide limitant l'épaisseur du substrat dans le procédé à plateaux et entraînant des dépenses d'énergie importantes dans les réacteurs aérés agités.

Outre les avantages propres à l'immobilisation d'*Aspergillus*, il a été constaté lors de la mise en oeuvre du biocontacteur, dans les conditions de production d'acide citrique par *Aspergillus niger*, une adsorption rapide et efficace. Le liquide circulant ne présente aucune viscosité et on réalise une aération suffisante avec une faible dépense d'énergie. D'autre part, la configuration du biocontacteur se compare favorablement à celle du système à plateaux en ce qui concerne la surface nécessaire à l'installation, de plus le renouvellement des supports est plus aisé que le nettoyage des plateaux.

Bien qu'on ait décrit une forme d'exécution particulièrement préférée de l'invention, il doit être bien entendu que de nombreuses variantes peuvent y être introduites, notamment l'utilisation d'autres substrats que ceux mentionnés précédemment.

De même, le procédé peut également s'appliquer à titre exemple à la production de lysosymes par des levures manipulées génétiques à cet effet.

REVENDECATIONS

1. Procédé pour la mise en contact simultanée et permanente d'un liquide avec une biomasse immobilisée et un
5 fluide gazeux continu, caractérisé en ce que le liquide qui s'écoule sur la biomasse sous l'effet de la gravité, s'étale sous la forme d'un film continu qui épouse de manière permanente l'ensemble de la surface de la biomasse immobilisée sur un support.
- 10 2. Procédé suivant la revendication 1, caractérisé en ce que la biomasse est immobilisée sous forme d'un film sur les deux faces d'un support mince bidimensionnel, tendu ou rigide, qui guide et contrôle l'écoulement du liquide.
- 15 3. Procédé suivant les revendications 1 et 2, caractérisé en ce que le support puisse être constitué en tout ou en partie par le substrat solide d'une culture d'organismes vivants.
- 20 4. Procédé selon les revendications 1 et 3 caractérisé en ce que le substrat solide d'une culture de microorganismes est emprisonné dans une enveloppe rigide ou souple et tendue résistant aux microorganismes, qui comporte des mailles appropriées et qui est perméable à la phase liquide et aux gaz.
- 25 5. Procédé selon les revendications 1 et 3 caractérisé en ce que l'enveloppe est double et est constituée d'un treillis ou filet externe aux mailles appropriées, perméable à la phase liquide et aux gaz résistant aux microorganismes et d'une seconde enveloppe interne à la première et qui est biodégradable.
- 30 6. Procédé selon les revendications 1, 3, 4, 5, caractérisé en ce que la culture est d'abord développée de manière à coloniser l'enveloppe extérieure et qu'ensuite les conditions sont modifiées de manière à induire le développement de la culture sur l'enveloppe biodégradable et le support
35 solide.
7. Procédé selon les revendications 2, 4, 5, caractérisé en ce que l'immobilisation de la biomasse peut être réalisée de manière stérile sur le biocontacteur mis en

station à l'intérieur de la cuve.

8. Procédé selon les revendications 2 et 7, caractérisé en ce que l'adsorption de la biomasse sur le support peut être améliorée par l'usage d'un polymère cationique.

5 9. Procédé suivant les revendications 1 et 2, 4, 5, caractérisé en ce que la phase gazeuse et la phase liquide s'écoulent parallèlement à contre courant, parallèlement à co-courant, à courant croisé avec renouvellement constant des deux phases sur l'intégralité de la surface du support qui
10 assure un excellent échange massique et calorifique entre ces phases et la biomasse.

10. Procédé selon les revendications 1, 2, 4, 5 et 9, caractérisé en ce que les supports de forme plane bidimensionnels sont disposés parallèlement les uns aux autres de
15 manière à former un ensemble ordonné et qu'ils sont espacés entre eux par une distance telle que les surfaces de contact liquide-biomasse, liquide gaz soient propres à chaque support pris individuellement.

11. Dispositif selon les revendications 1, 2, 6 et
20 7, caractérisé en ce qu'il est constitué d'un bâti ouvert de forme prismatique permettant l'écoulement des fluides liquide et gazeux, d'un système d'alimentation de la biomasse immobilisée par double débordement et d'un système de mise à niveau du type vérin à vis et qui peut être muni d'un système de
25 tension des supports.

12. Dispositif selon les revendications 1, 9, 10 et 11 caractérisé en ce que le système d'alimentation par double débordement comporte un réservoir primaire qui joue le rôle de tampon et de nourrice qui alimente des chenaux
30 secondaires.

13. Dispositif selon les revendications 1 à 5, 9 à 12 caractérisé en ce que les chenaux secondaires irriguent la biomasse fixée sur les supports rigides ou tendus.

14. Dispositif selon les revendication 1 à 5 et 9
35 à 13 caractérisé en ce qu'à chaque chenal secondaire est associé un support rigide ou tendu.

15. Dispositif selon les revendications 1 à 5 et 9 à 14 caractérisé en ce que l'écoulement du liquide du

réservoir primaire vers les chenaux et l'irrigation des supports s'effectue par des orifices calibrés alignés sur les parois latérales du réservoir primaire et une paroi latérale de chaque chenal secondaire.

5 16. Dispositif suivant les revendications 1, 2, 4 et 11, caractérisé en ce que le système de tension comporte sous chaque chenal un guide, qui lui est parallèle, et un cadre de tension coulissable sur l'extérieur des montants du bâti et réglable en hauteur.

10 17. Dispositif selon les revendications 1, 2, 4, 11 et 16, caractérisé en ce que la longueur du guide, ainsi qu'une dimension du cadre de tension doivent être au moins égales à la largeur du support tendu.

15 18. Dispositif suivant les revendications 1, 2, 4 et 11 caractérisé en ce que la vis de chaque vérin assurant la mise à niveau du bâti, coulisse à l'intérieur d'un montant du bâti et tourne à l'intérieur d'un écrou solidaire de ce même montant.

20 19. Dispositif suivant les revendications 1, 2 et 3, 4 caractérisé en ce que chaque support tendu comporte à sa partie supérieure une coulisse et des oeillets régulièrement espacés.

25 20. Procédé suivant les revendications 1, 2, 3, 4, 11, 16 et 19, caractérisé en ce que chaque support, terminé à sa partie supérieure par une coulisse, est enfilé sur le guide situé sous le chenal d'alimentation.

30 21. Procédé suivant les revendications 1, 2, 3, 4, 11, 16 et 19, caractérisé en ce que chaque support comportant à sa partie supérieure des oeillets régulièrement espacés, est relié au guide situé sous le chenal d'alimentation par un tricot à mailles lâches.

22. Dispositif suivant les revendications 1, 2, 3, 4 et 19, caractérisé en ce que chaque support tendu comporte à sa partie inférieure une coulisse.

35 23. Procédé suivant les revendications 1, 2, 3, 4, 11, 16, 19 à 22, caractérisé en ce que les coulisses inférieures des supports sont enfilées dans des guides qui sont placés ensuite dans le cadre de tension.

24. Procédé suivant les revendications 1, 2, 3, 4, 11, 16, 19 à 23, caractérisé en ce que le déplacement du cadre de tension sur le bâti permet la mise sous tension et le réglage de la tension des supports.

5 25. Procédé et dispositif suivant les revendications 1 à 24 caractérisé en ce que l'ensemble du système décrit est logé dans une cuve dont la paroi latérale comporte à sa partie inférieure, des socles destinés à recevoir les pieds des vérins de mise à niveau du bâti.

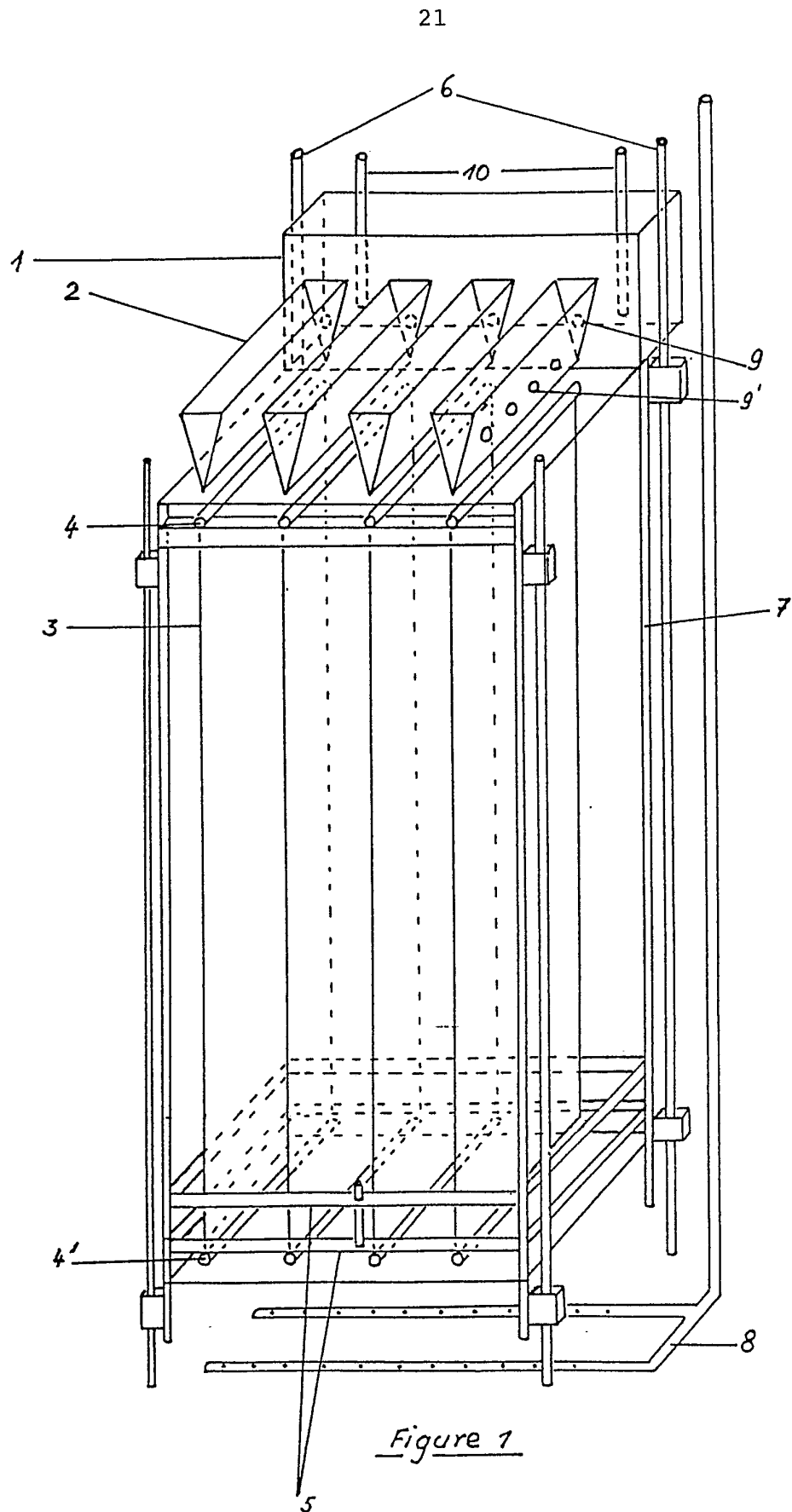
10 26. Procédé et dispositif suivant les revendications 18 et 25, caractérisé en ce que la mise à niveau du bâti peut être réalisée après son installation dans l'enceinte.

15 27. Procédé et appareillage suivant les revendications 1 à 26 caractérisé en ce que le fond de cuve doit être incliné.

20 28. Procédé et dispositif suivant les revendications 1 à 27 utilisés pour le développement de cultures dans des conditions stériles en vue de l'immobilisation de biomasse et la production biochimique ou biologique.

 29. Procédé et dispositif suivant les revendications 1 à 27 utilisés pour la filtration stérile de suspensions cellulaires.

25 30. Procédé et dispositif suivant les revendications 1 à 27 utilisés pour la concentration stérile de solutions.



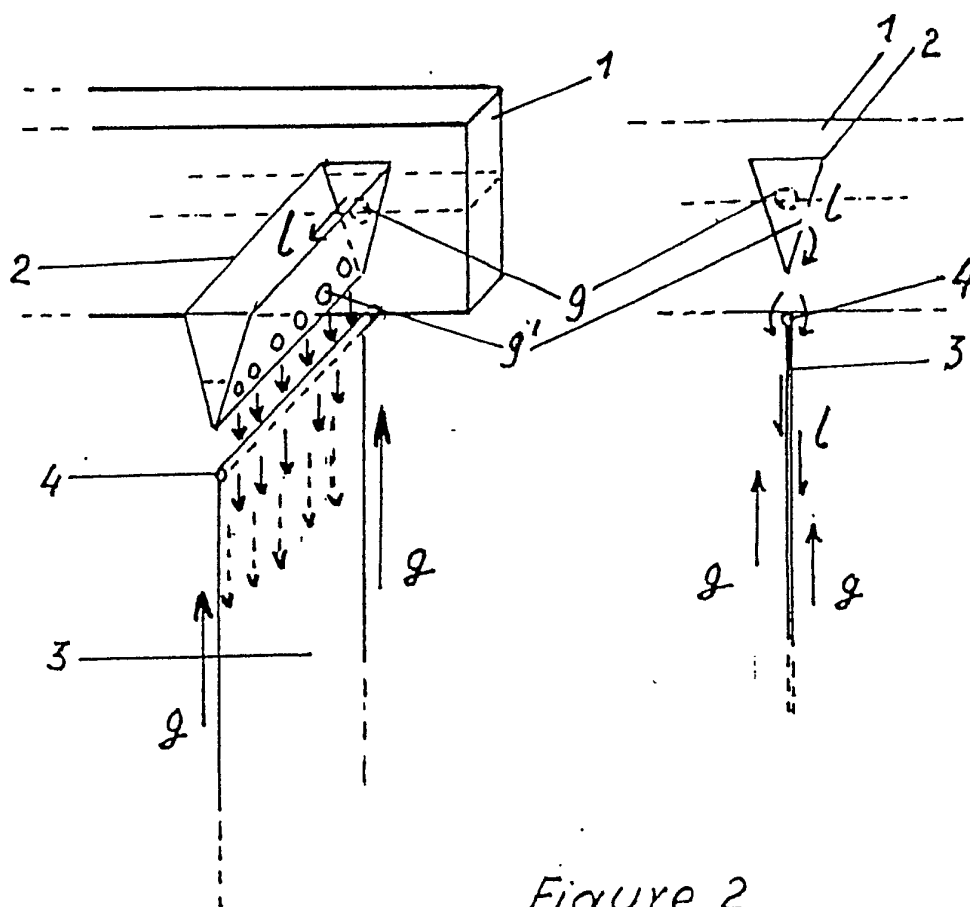


Figure 2

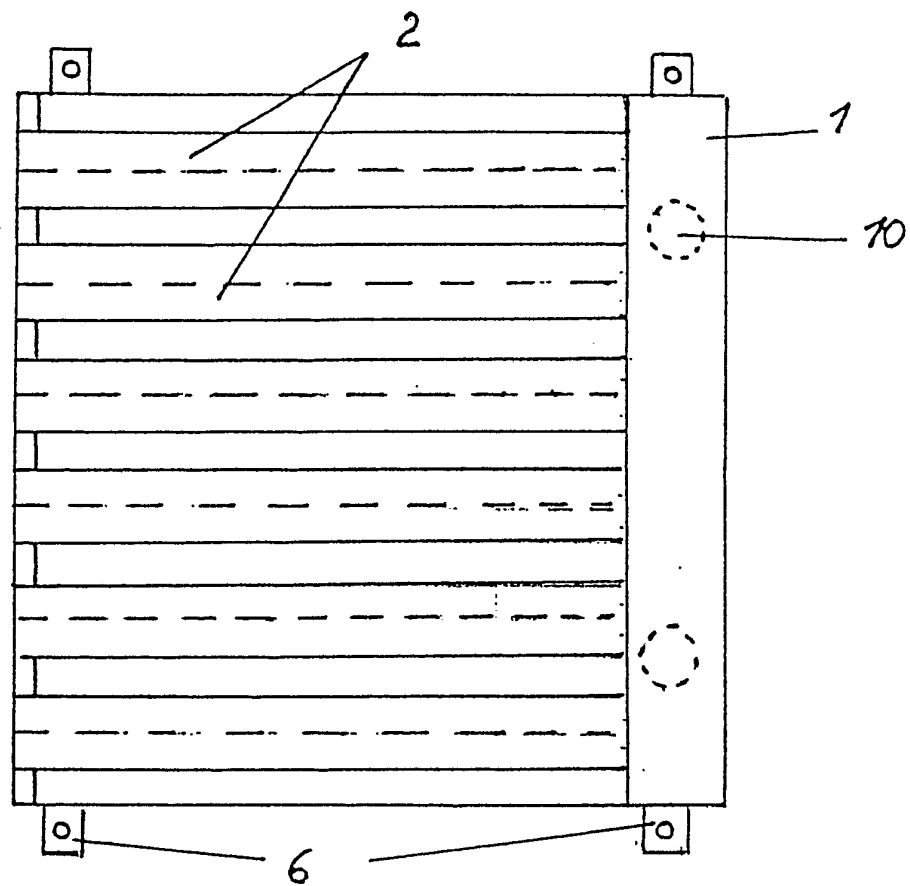


Figure 3

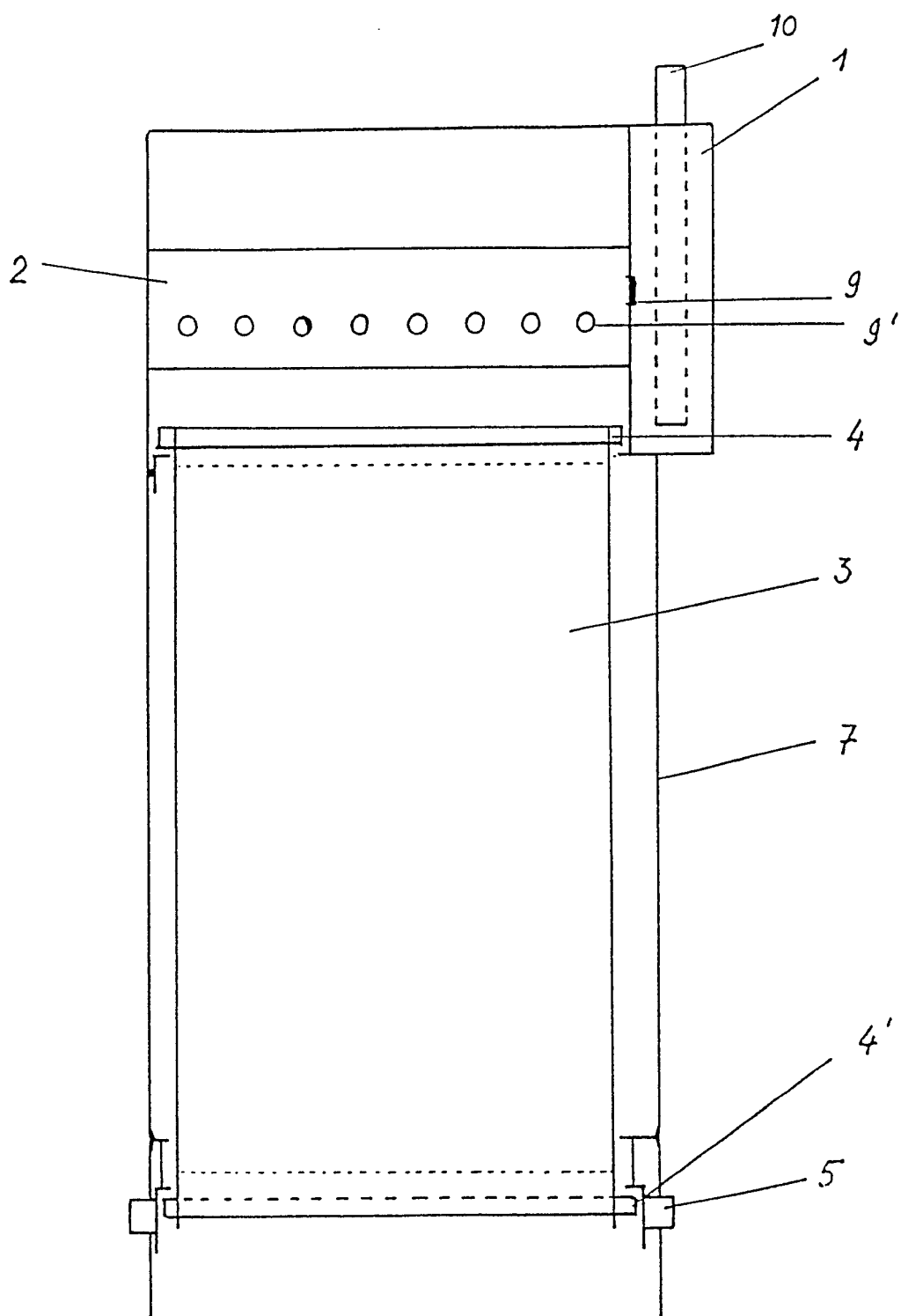
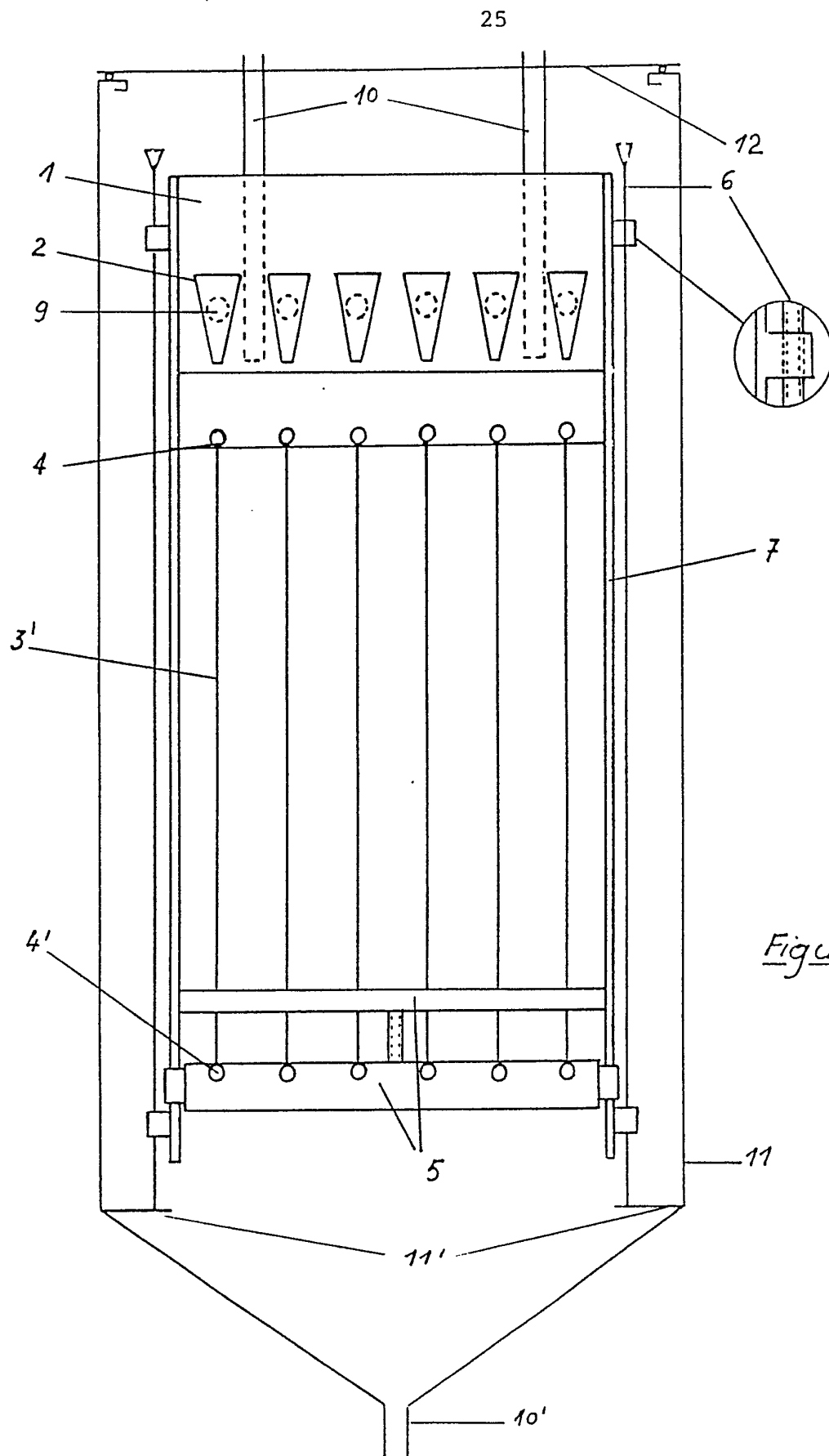


Figure 4



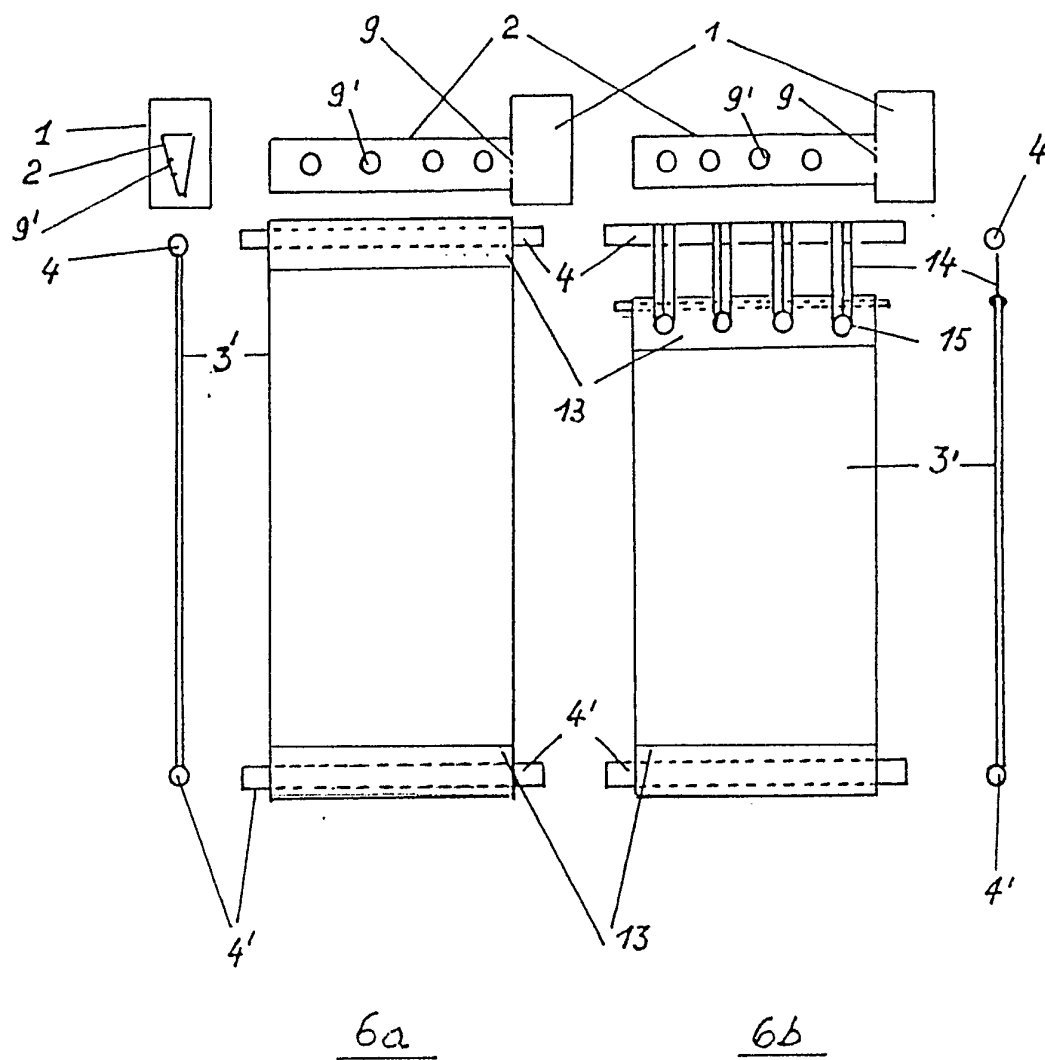


Figure 6

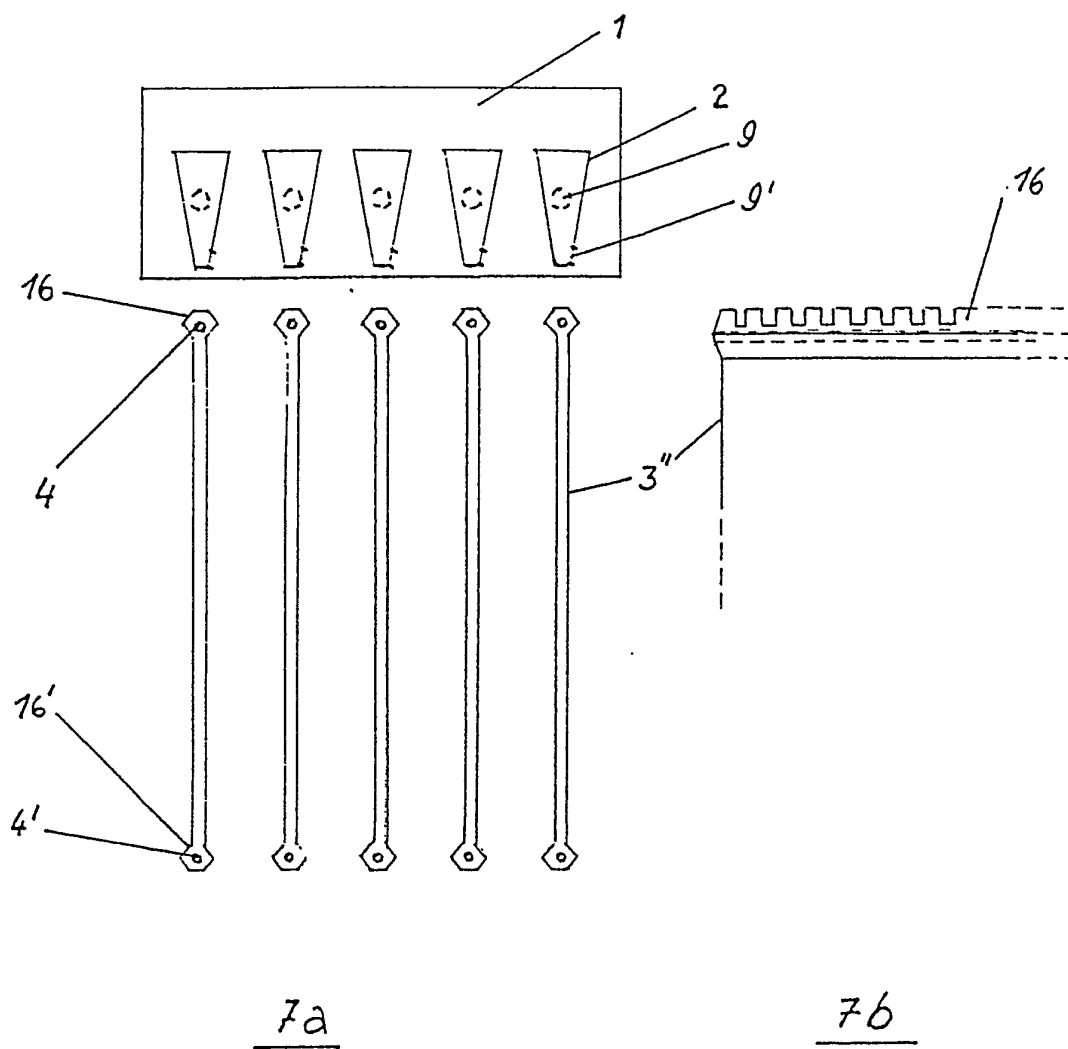


Figure 7

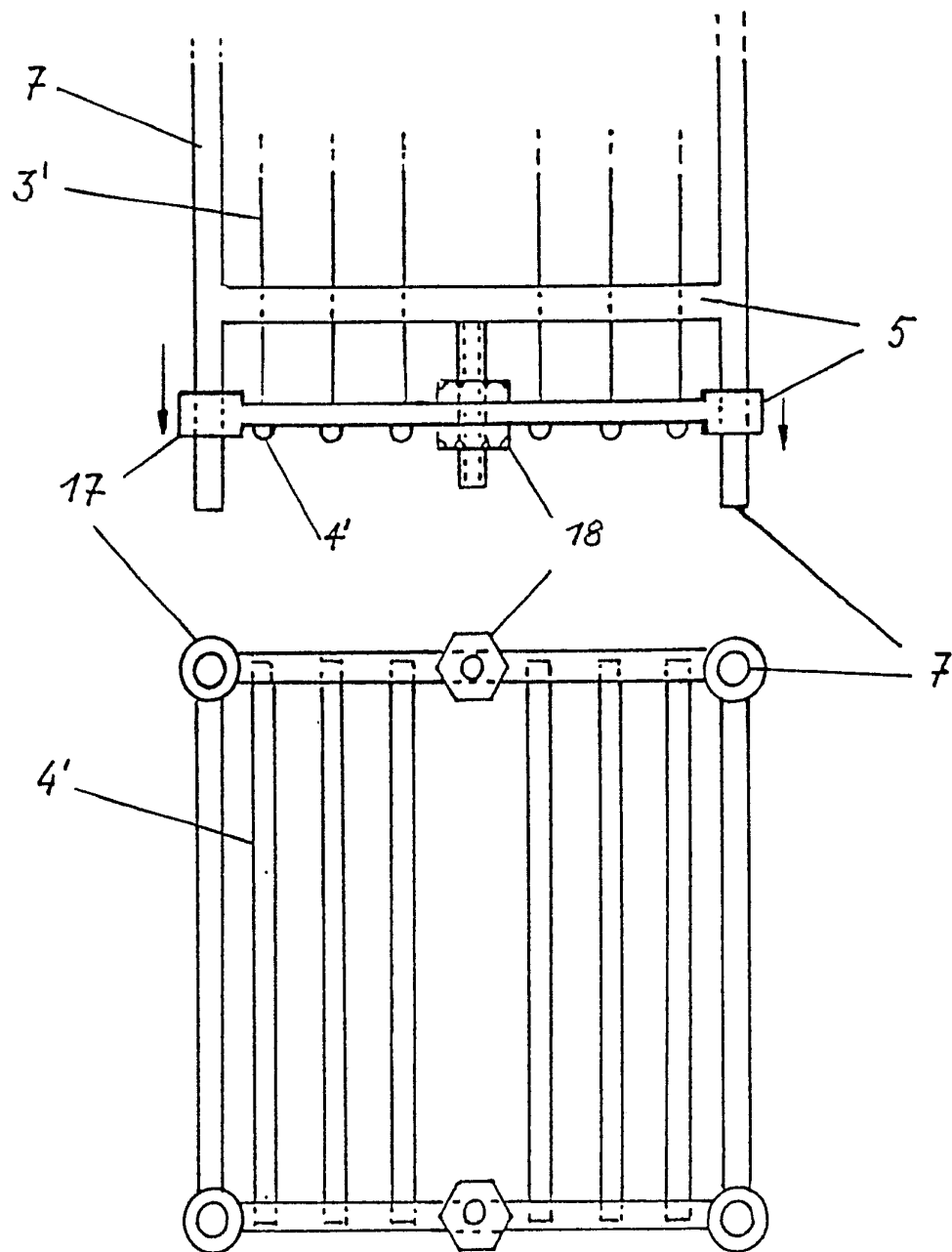


Figure 8

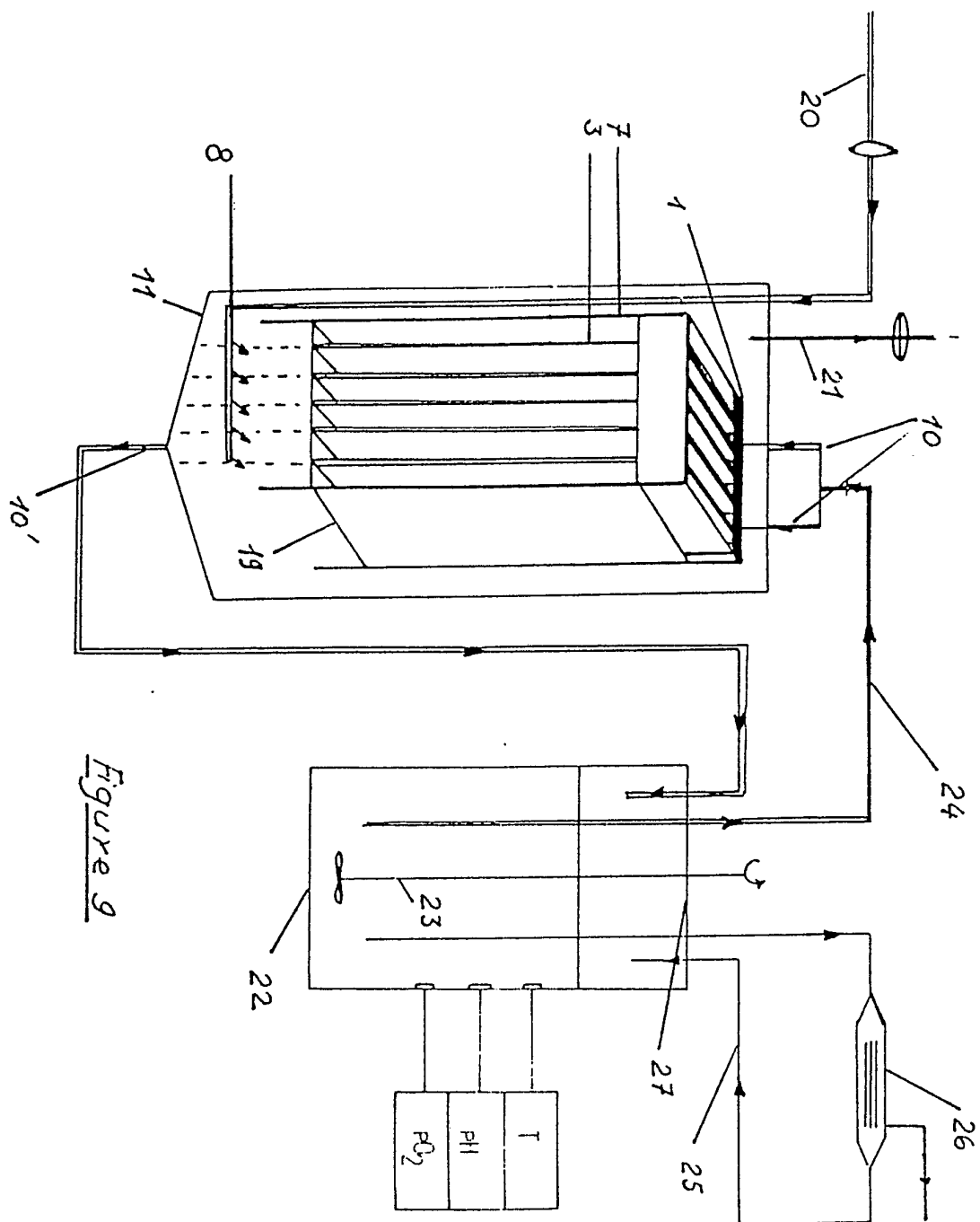
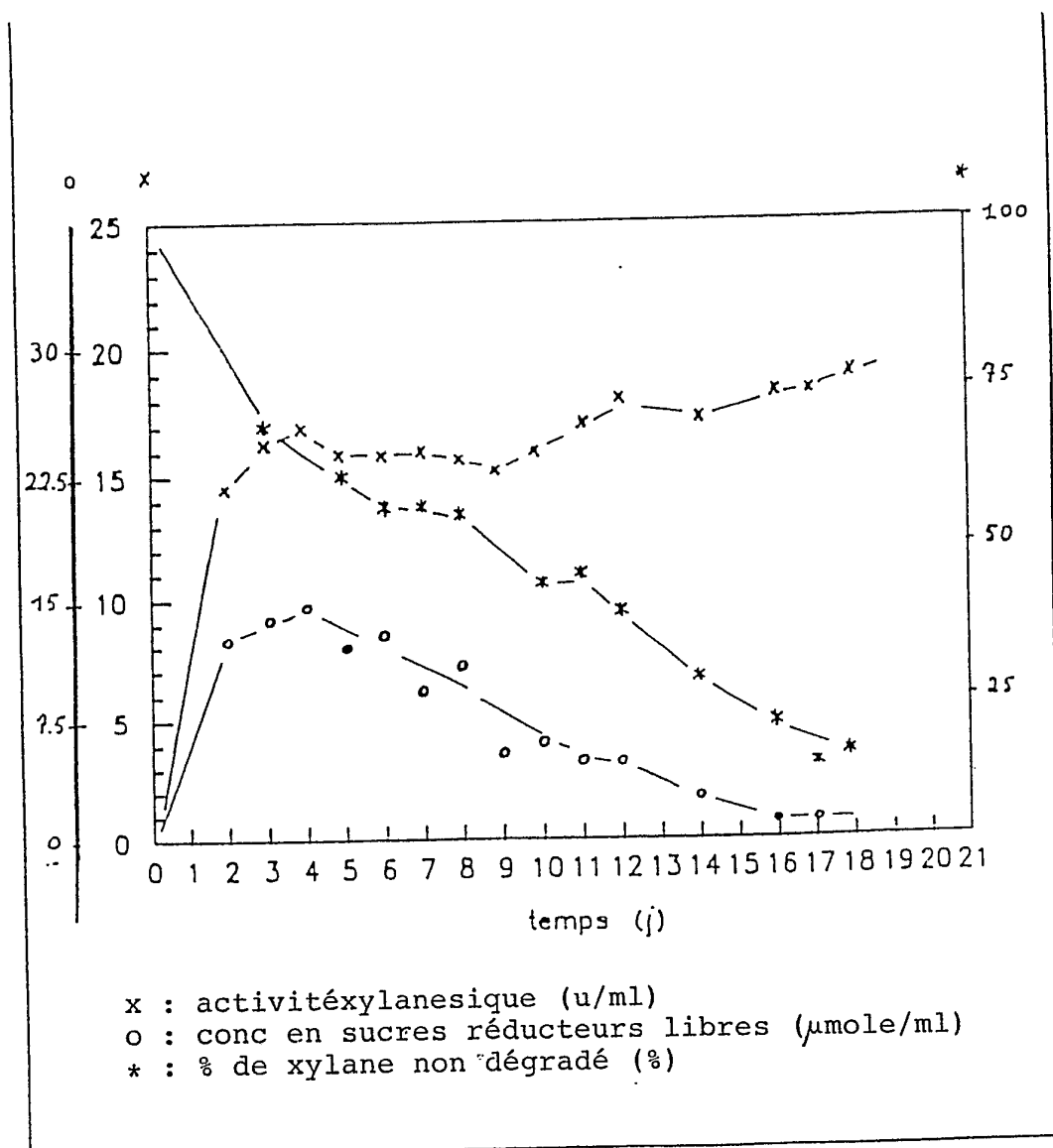
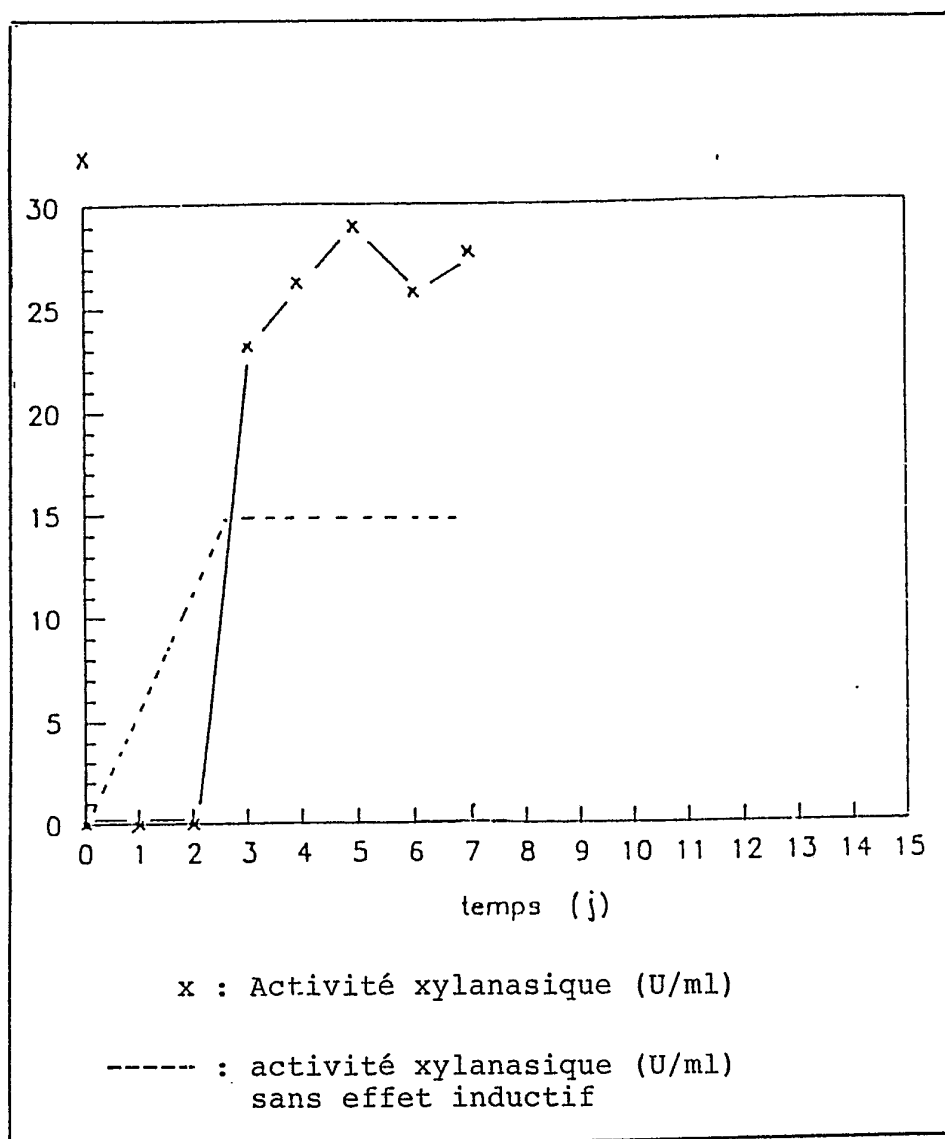


Figure 9

Figure 10

Figure 11



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE

établi en vertu de l'article 21 § 1 et 2
de la loi belge sur les brevets d'invention
du 28 mars 1984

Numero de la demande
nationale

BE 8900693

B0 1937

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
X	FR-A-2 175 737 (NIPPON RENSUI K.K.) * Page 2, ligne 28 - page 3, ligne 30; figures 1-5; revendications 1-2,7-17 *	1,2,6,7 ,9-11	C 12 M 1/14 C 02 F 3/04 C 02 F 3/10
Y	----	8,13-23	
Y	FR-A-2 587 918 (MILCAP FRANCE S.A.) * Revendications 1-15; figures 1-5 *	8,13-23	
X	DE-A- 731 657 (SCHULZE) * En entier *	1-4,7, 10,11, 24-27	
X	US-A-3 301 401 (HALL) * En entier *	1,2,7	
X	US-A-3 231 490 (FRY) * Revendications 1-11; figures 1-2 *	1,2,6,7	

			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			C 12 M C 02 F
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
12-03-1990		EPAILLARD P.J.H.M.	
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ----- & : membre de la même famille, document correspondant	

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET BELGE NO.**

BE 8900693
BO 1937

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche visé ci-dessus.

Lesdits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 23/03/90

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets.

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR-A- 2175737	26-10-73	JP-A, B, C48092950	01-12-73
		JP-A- 49010552	30-01-74
		JP-A- 49044552	26-04-74
		DE-A- 2301076	13-09-73
		GB-A- 1401780	30-07-75
FR-A- 2587918	03-04-87	Aucun	
DE-A- 731657		Aucun	
US-A- 3301401		Aucun	
US-A- 3231490		Aucun	