



Cours GCH8650
GÉNIE BIOCHIMIQUE

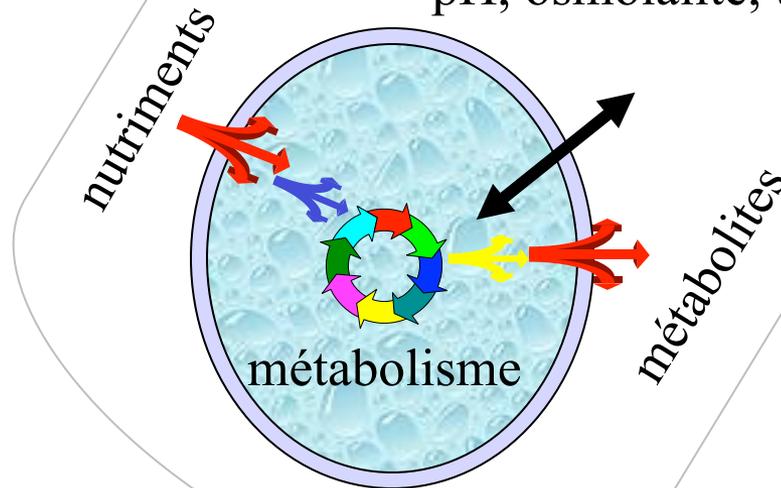
Les bioréacteurs

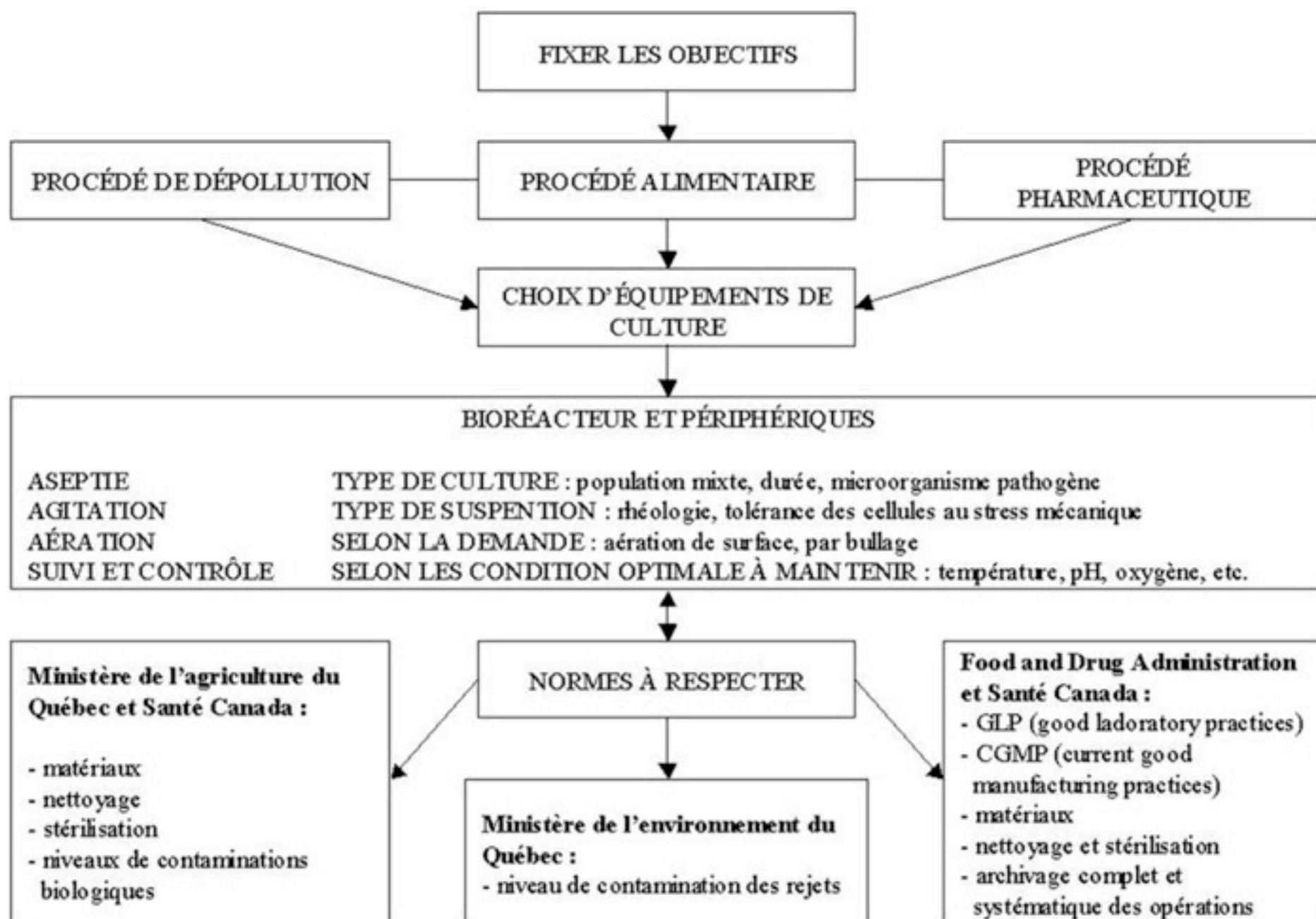
Mario Jolicoeur, ing., Ph.D.
Professeur titulaire

Paramètres de mise en culture aseptique

- Besoins nutritionnels: **homogénéité de l'environnement**
- Caractéristiques physiques des cellules:
 - **respiration et cisaillement**

Action-réaction face à l'environnement:
pH, osmolalité, température, cisaillement





LES BIORÉACTEURS

Outils de production biotechnologique

1. Les configurations
2. Les impératifs particuliers de conception
3. Les outils de suivi d'une culture

1- Les configurations

Bioréacteurs agités mécaniquement

Avantages :

Excellent transfert d'oxygène

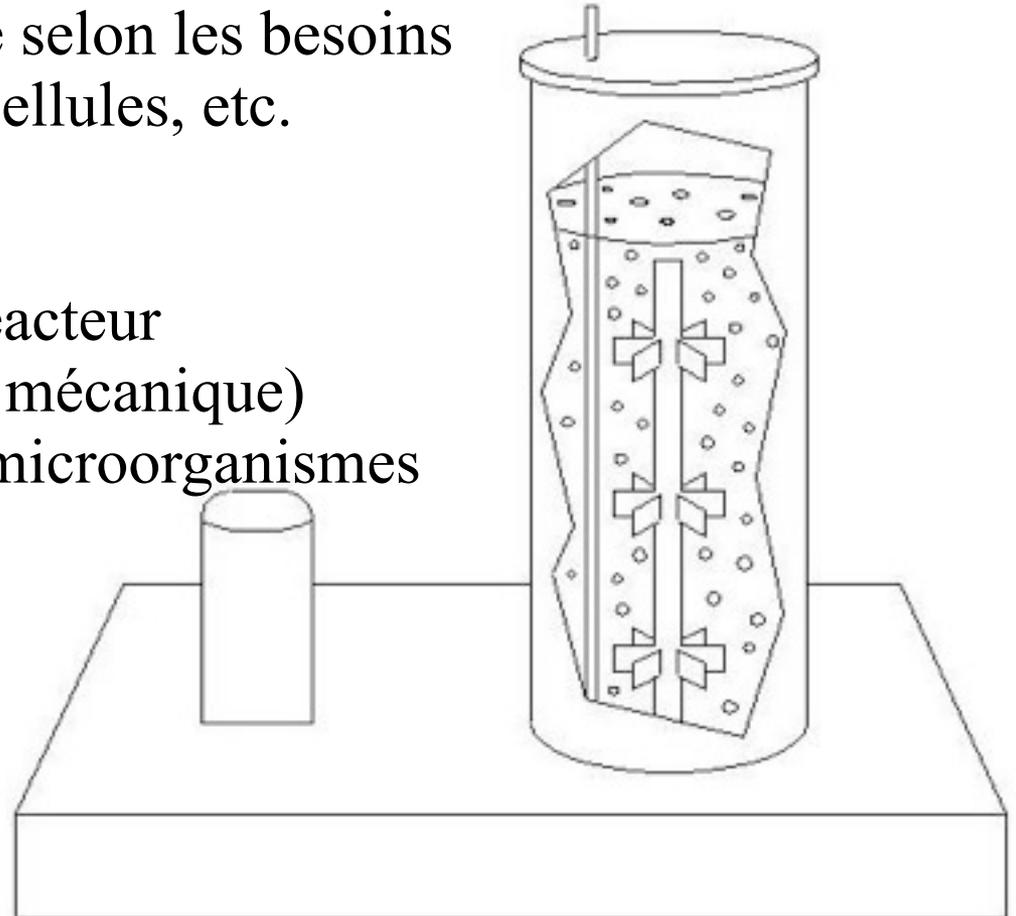
L'agitateur peut être sélectionné selon les besoins (type de fluide, résistance des cellules, etc.

Désavantages :

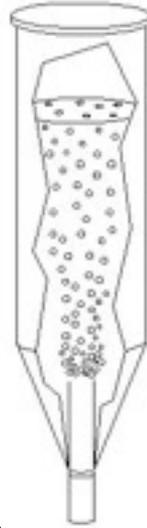
Complexité mécanique du bioréacteur

(entretien du joint d'étanchéité mécanique)

Stress mécanique élevé sur les microorganismes



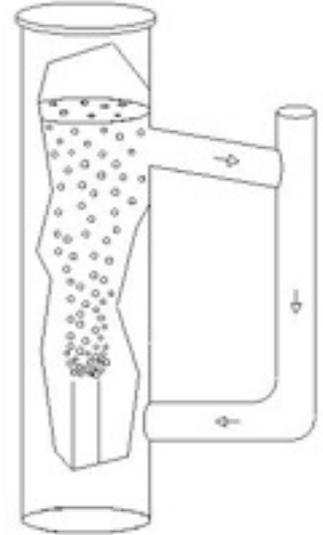
1- Les configurations



Colonne à bulles



Recirculation interne



Recirculation externe

Bioréacteurs gazo-syphon

Avantages :

Excellent transfert d'oxygène et autres gaz

Simplicité mécanique du bioréacteur

Peut comporter une biomasse immobilisée (fluidisée)

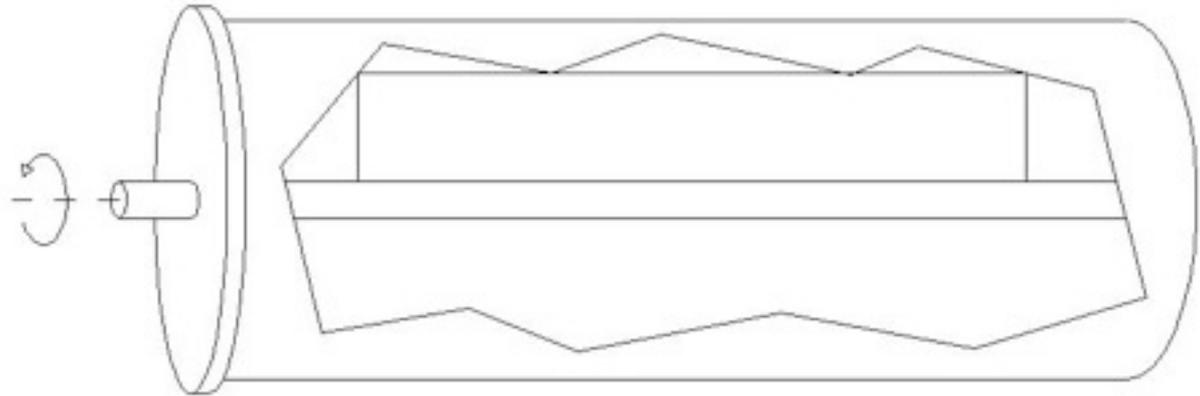
Désavantages :

Mauvaise qualité de mélange pour les fluides visqueux

Formation de mousse

Entretien du compresseur

1- Les configurations



Cylindre rotatif

Avantages :

Mélange efficace avec les fluides visqueux ou des solides en suspension

Désavantages :

Complexité mécanique pour des volumes industriels

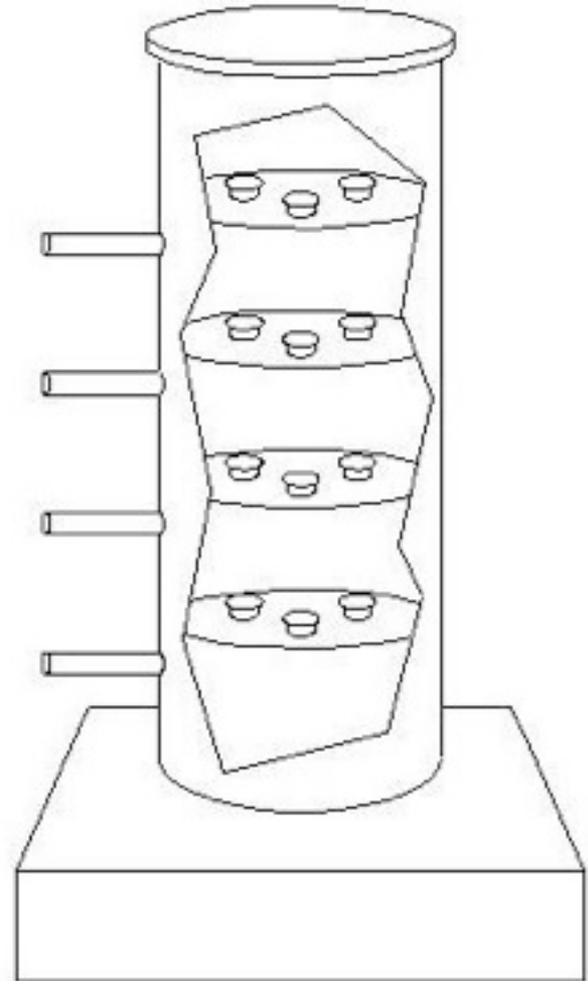
Petite fraction de volume utile par rapport au volume total

Faible aire interfaciale

1- Les configurations

Bioréacteurs à plateaux

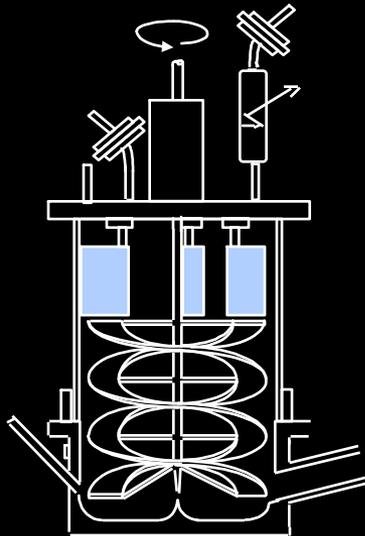
- Efficace pour des procédés opérés en mode anaérobie
- Grande surface d'immobilisation des microorganismes



1- Les configurations

Les bioréacteurs spéciaux conçus ici

rubans
hélicoïdaux



Cellules
végétales, animales

gazo-siphon



brouillard



Garnissages



Racines transformées

Cellules sensibles au cisaillement

1- Les configurations

Dimensionnement

Particularités des cellules

- CSTR (agitation mécanique) 1 - 10 000 L
bactéries, levures, cellules végétales et animales
- AIRLIFT (agitation par bullage) 1 - 300 000 L
bactéries, levures, cellules animales (max 1000 L)

2-Les impératifs particuliers de conception

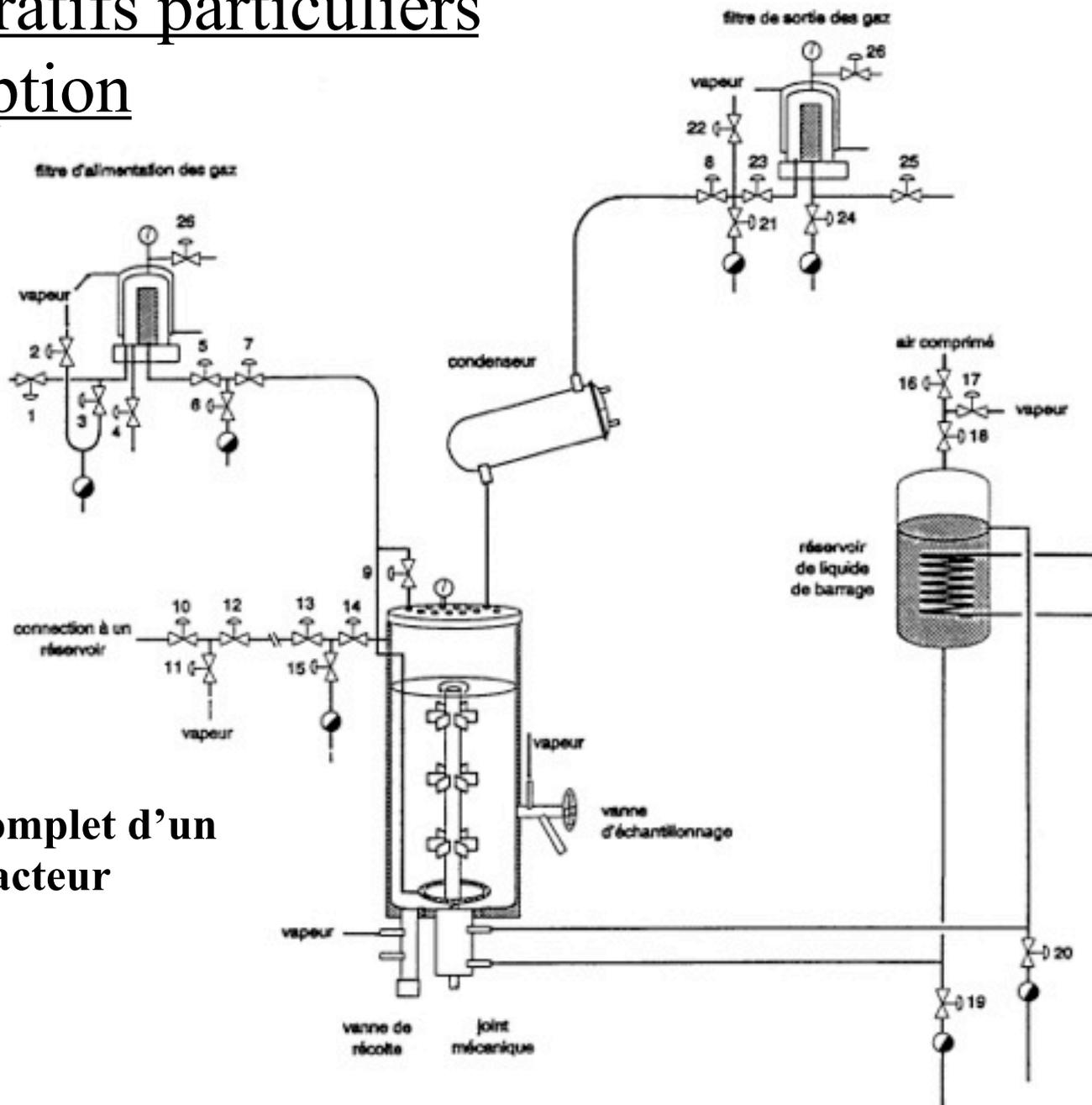
- Asepsie
empêcher une contamination microbienne
- La production est catalysée par des cellules vivantes:
 - consommation de nutriments en solution, O₂
 - sensibilité au cisaillement
 - produit intracellulaire ou extracellulaire
- Normes et réglementations: DGPS, FDA
cGMP : « current good manufacturing practices »

2-Les impératifs particuliers de conception

L'ensemble des composantes d'un bioprocédé doivent:

- être neutres face aux cellules et aux produits (la culture)
- protéger la culture de l'environnement: contaminations microbiennes, particules
- rencontrer les exigences des cellules en culture: °T, cisaillement, alimentation en nutriments
- être facilement nettoyables
- être validables (DGPS, FDA) : un incontournable à l'homologation d'un produit

2-Les impératifs particuliers de conception



**Montage complet d'un
bioréacteur**

2-Les impératifs particuliers de conception

Maintient de l'asepsie: étanchéité contrôlée

- chaque point de contact:
 - joint d'étanchéité plat ou torique
- point d'ouverture ponctuelle sur l'extérieur:
 - ex. vanne d'échantillonnage:
filet de vapeur continu

2-Les impératifs particuliers de conception

Matériaux d'étanchéité polymériques

Matériau	Plage de température	Résistance thermique	Champs d'application	Prix
Buna-N (nitrile, NBR)	-54 à 150 °C	Faible < 10 heures	Général	Bas
Éthylène-propylène (PDM, EPR)	-55 à 150 °C	Bon < 100 heures	Alimentaire et pharmaceutique	Moyen
Silicone	-65 à 250 °C	Excellent < 100 heures	Alimentaire et pharmaceutique	Élevé
Fluorocarbone (viton, fluoral)	-54 à 260 °C	Excellent < 100 heures	Alimentaire et pharmaceutique	Élevé
Téflon	-54 à 260 °C	Excellent (danger de fluage)	Alimentaire et pharmaceutique	Élevé

2-Les impératifs particuliers de conception

Composition des différents aciers inoxydables

Grade	Composition (%)								
	C	Mn	P	S	Si	Cr	Ni	Mo	Cu
302	0.15	2.00	0.045	0.03	1.00	16.00 18.00	6.00 8.00	-	-
304	0.08	2.00	0.045	0.03	1.00	18.00 20.00	8.00 10.50	-	-
304 L	0.03	2.00	0.045	0.03	1.00	18.00 20.00	8.00 12.00	-	-
316	0.08	2.00	0.045	0.03	1.00	16.00 18.00	10.00 14.00	2.00 3.00	0.50
316 L	0.03	2.00	0.045	0.03	1.00	16.00 18.00	10.00 14.00	2.00 3.00	0.50
904 L	0.02	2.00	0.045	0.03	0.70	19.00 21.00	24.00 26.50	4.20 4.70	1.20 1.70

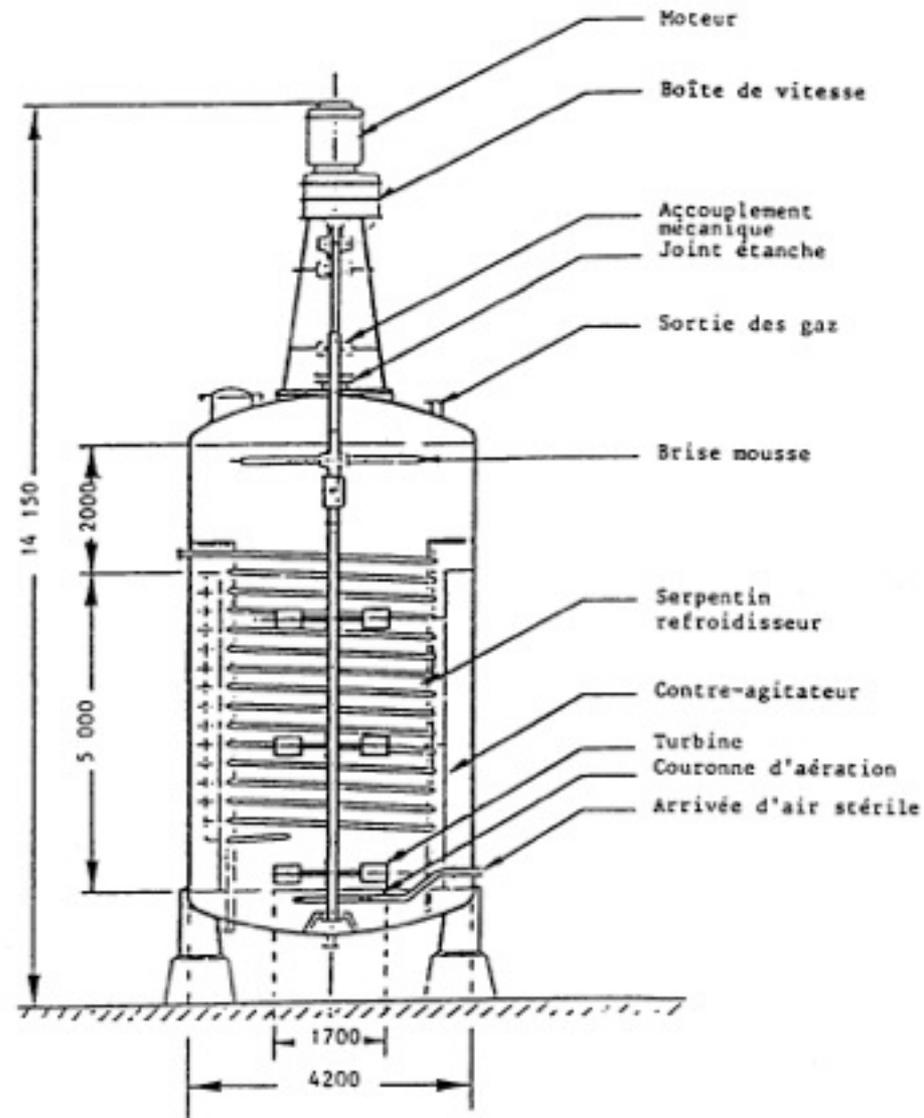
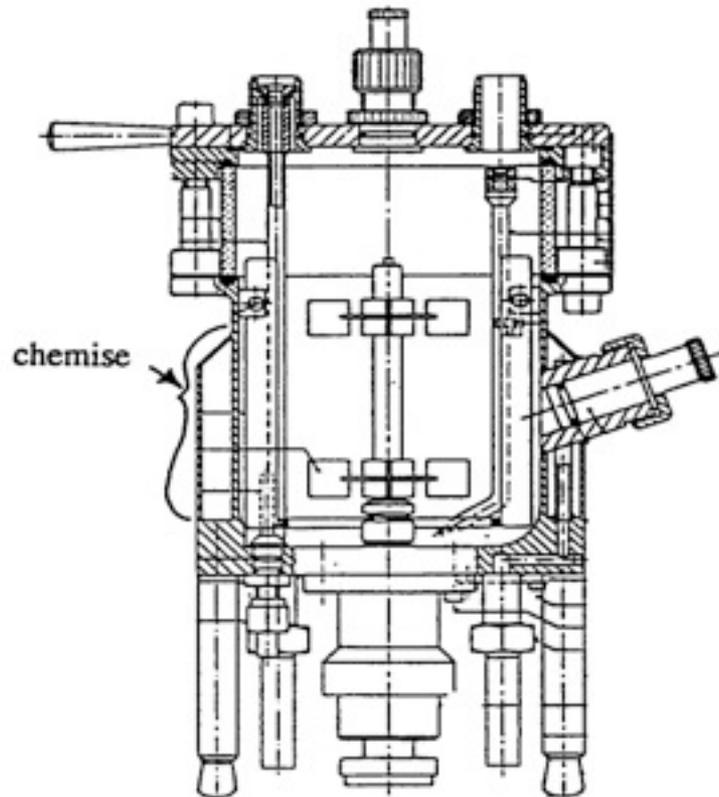
2-Les impératifs particuliers de conception

Stérilisation

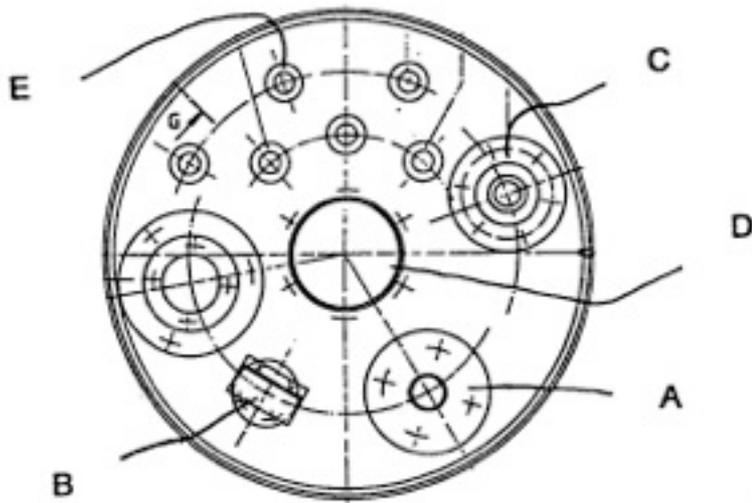
- matériaux supportant 121°C en vapeur saturée
- supportant 1 atm sous 121°C: normes ASME
- munis d'une alimentation efficace en chaleur:
chemise, serpentin, élément chauffant
- relié adéquatement à son réseau de canalisations:
réservoirs, lignes d'ajouts
- pas de volumes morts:
réacteur, soudures, raccords, etc.

2-Les impératifs particuliers de conception

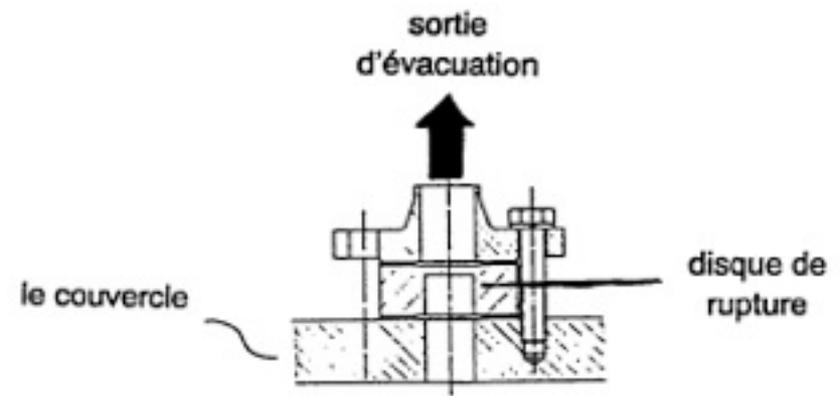
Stérilisation



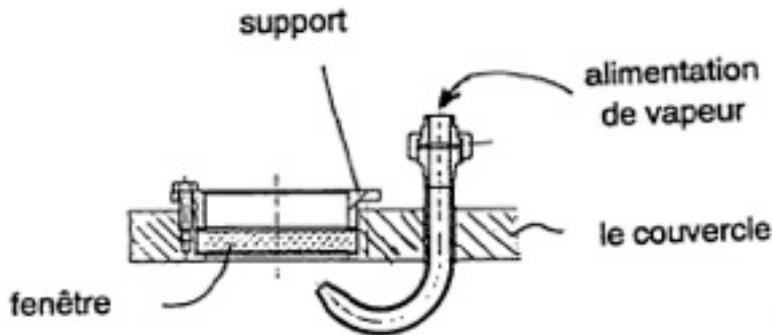
2-Les impératifs particuliers de conception



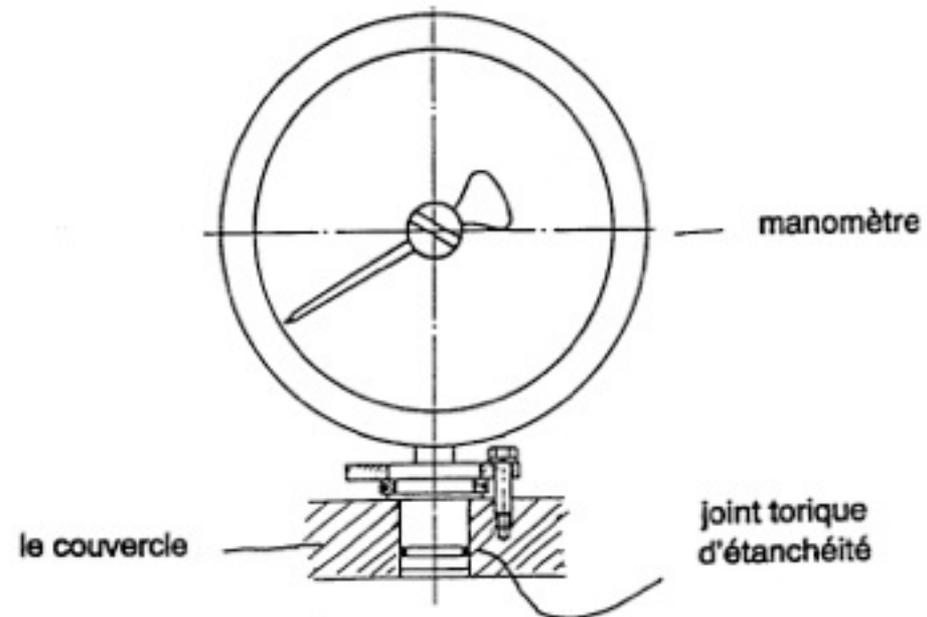
Le couvercle



Disque de rupture



Fenêtre au couvercle



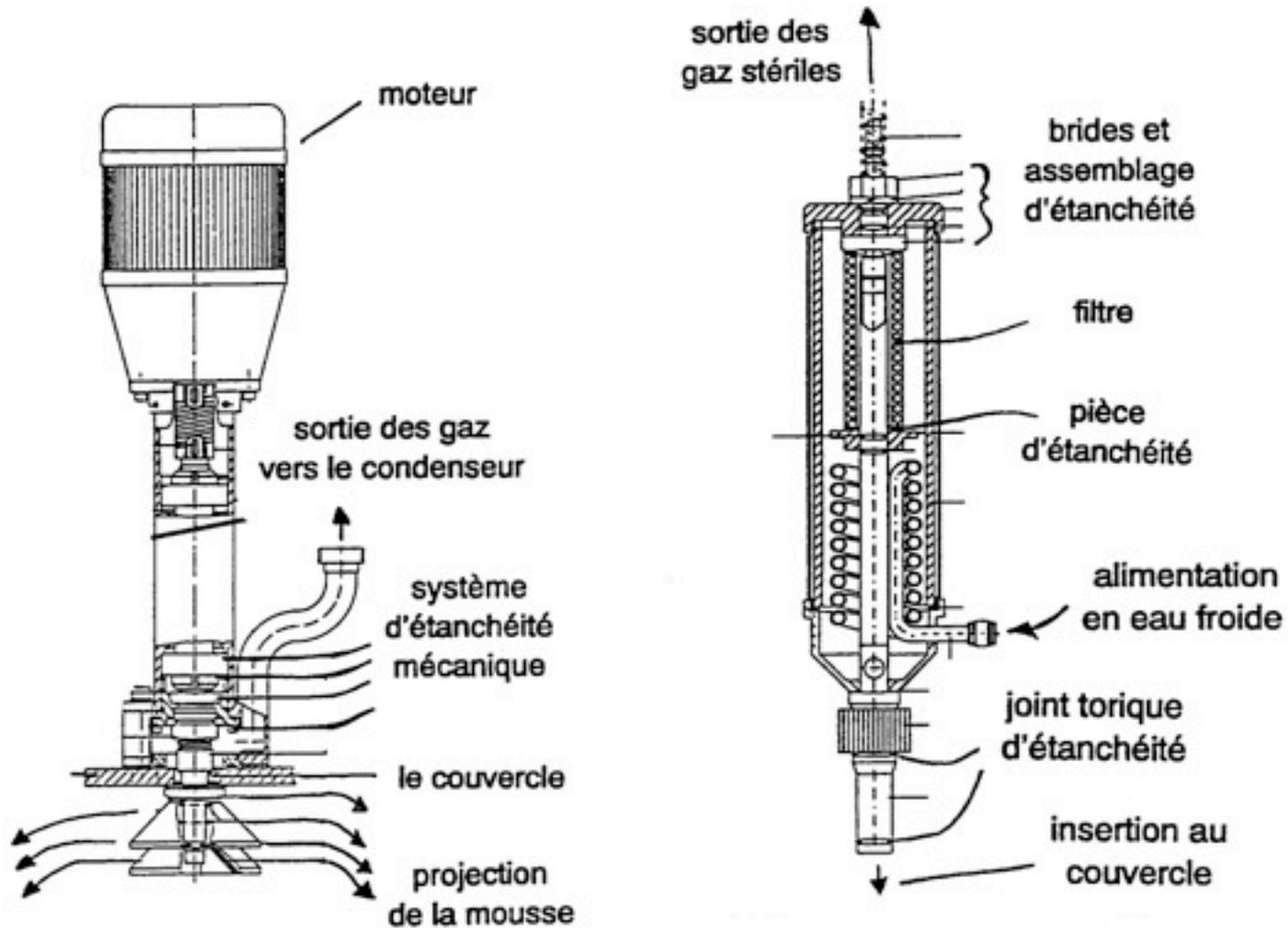
Manomètre

2-Les impératifs particuliers de conception

Contrôle de la mousse

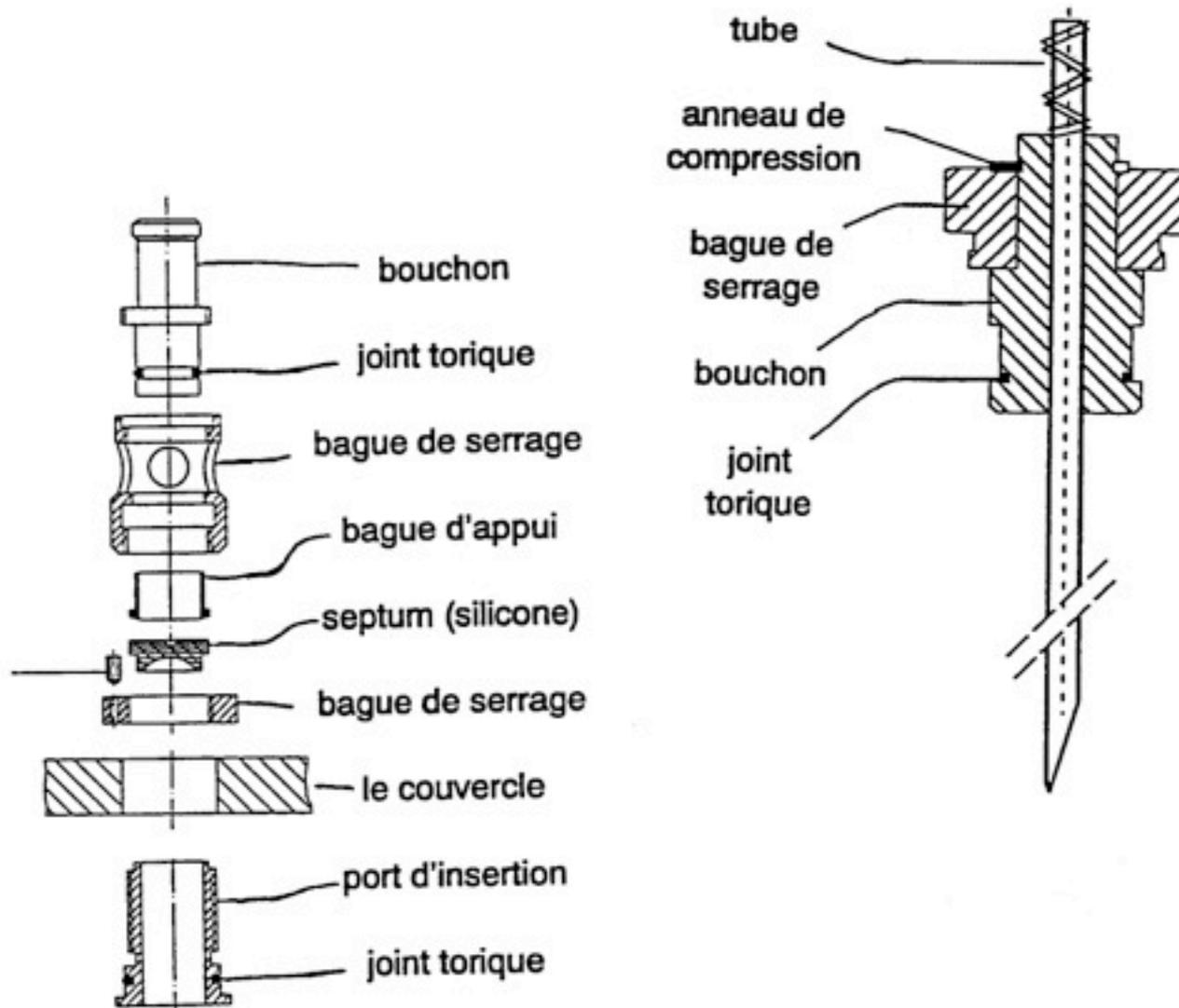
- agents chimiques
- brise-mousse mécanique

2-Les impératifs particuliers de conception



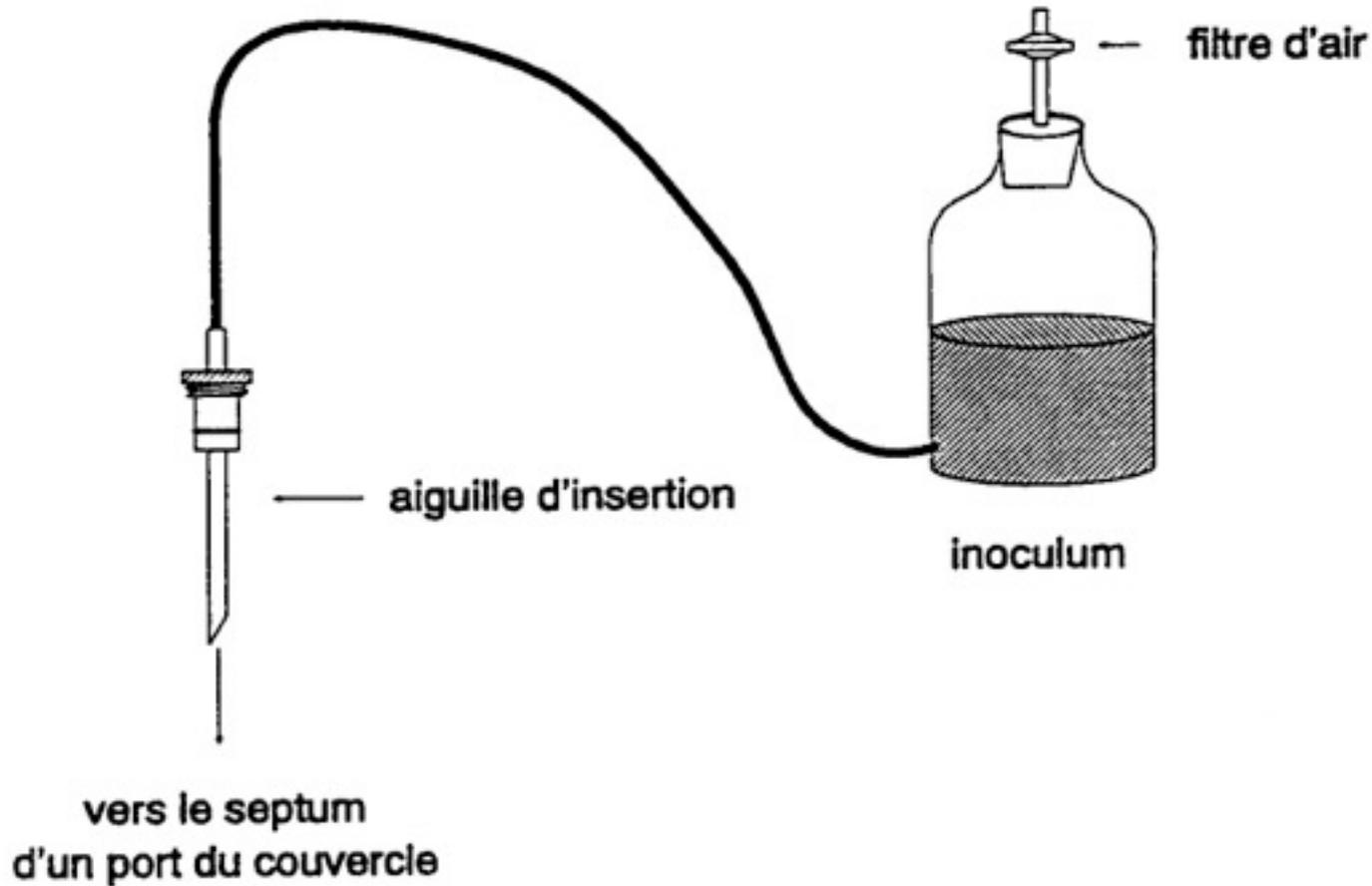
Brise-mousse mécanique et condenseur

2-Les impératifs particuliers de conception



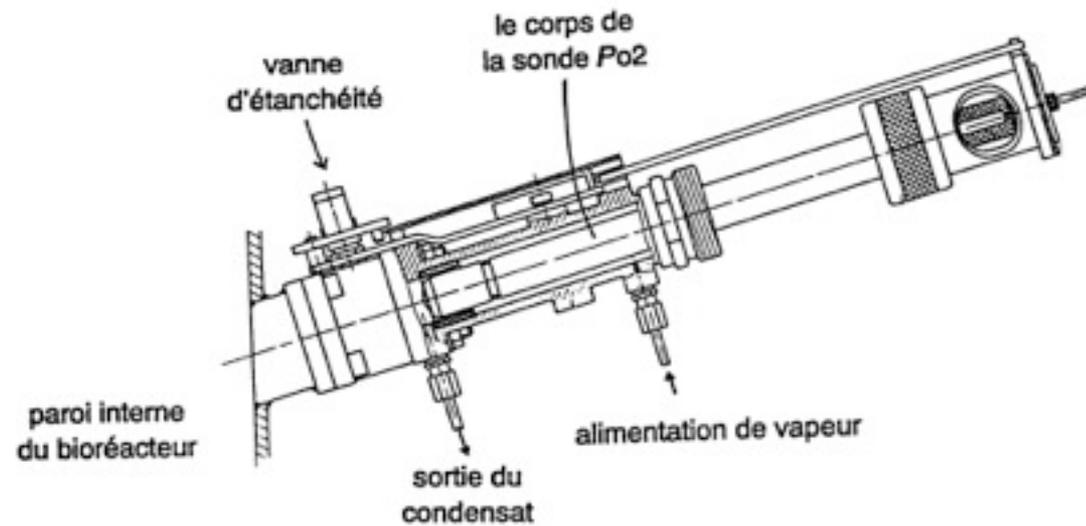
Assemblage des ports d'insertion et aiguille

2-Les impératifs particuliers de conception

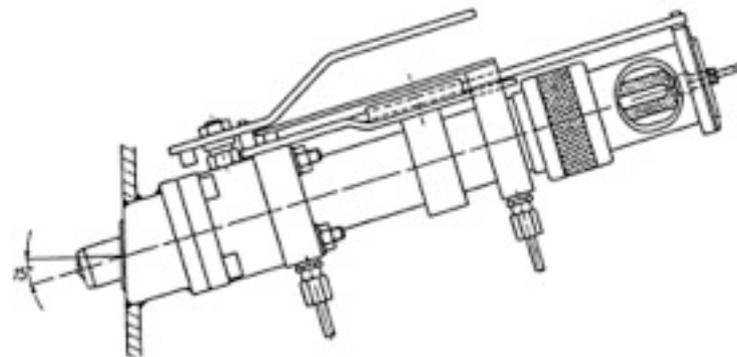


Montage d'inoculation de petits bioréacteurs

2-Les impératifs particuliers de conception



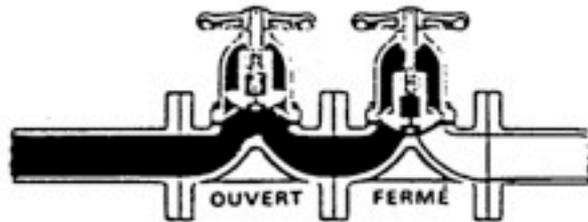
POSITION SORTIE



POSITION INSÉRÉE

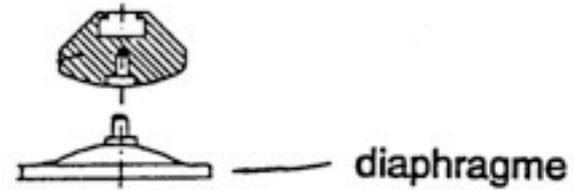
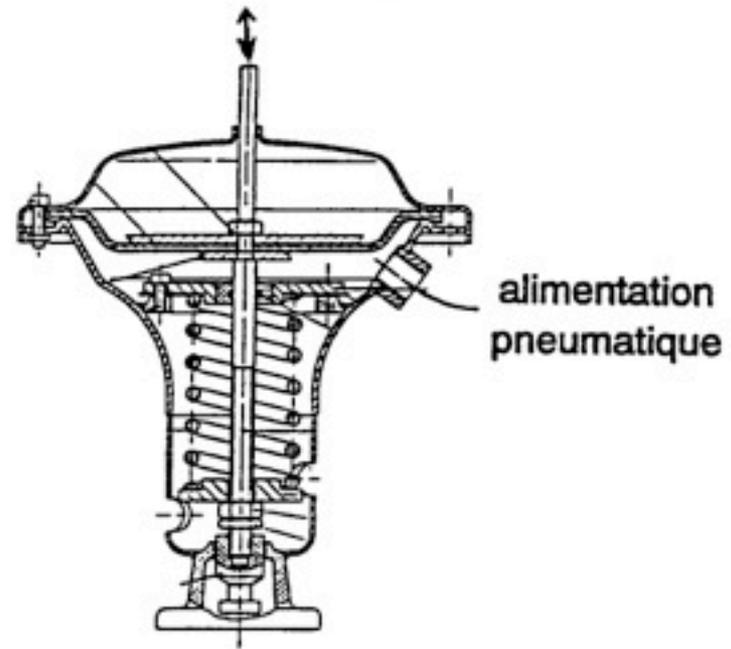
Manchons de sondes à oxygène rétractables

2-Les impératifs particuliers de conception

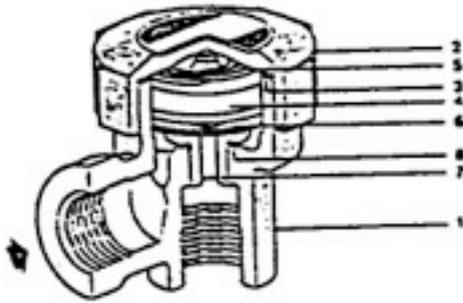


Vanne à diaphragme

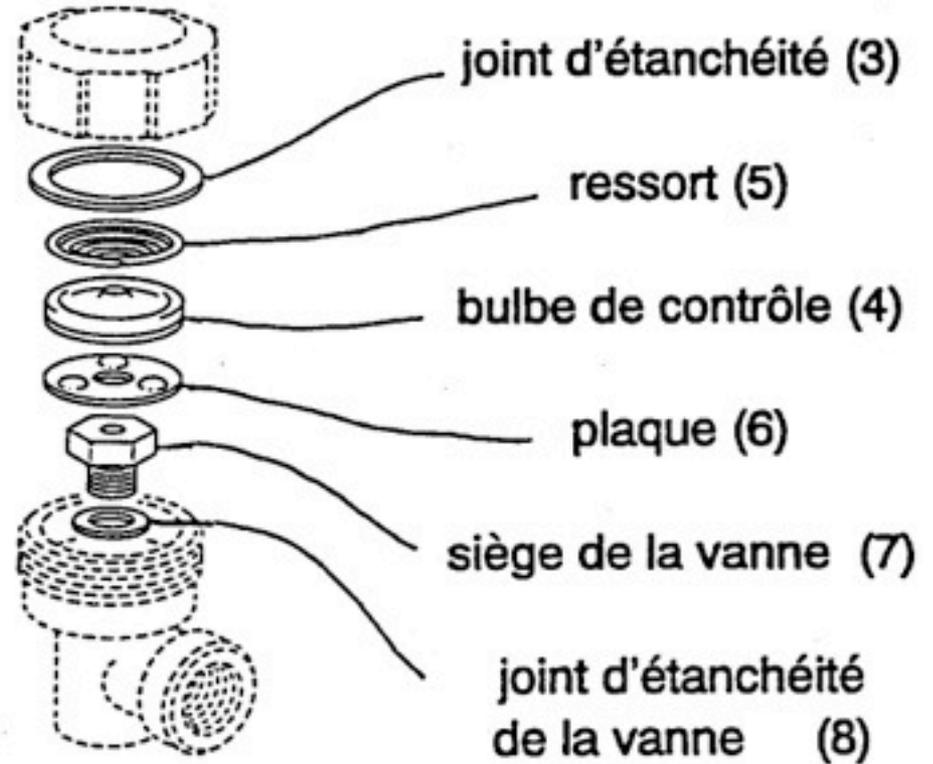
piston indiquant
la position
(ouvert ou fermé)



2-Les impératifs particuliers de conception

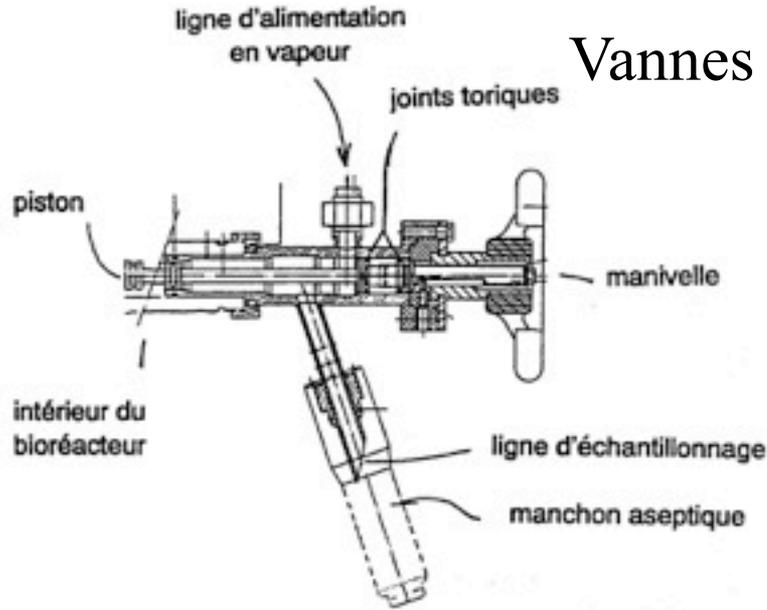


Trappe à vapeur



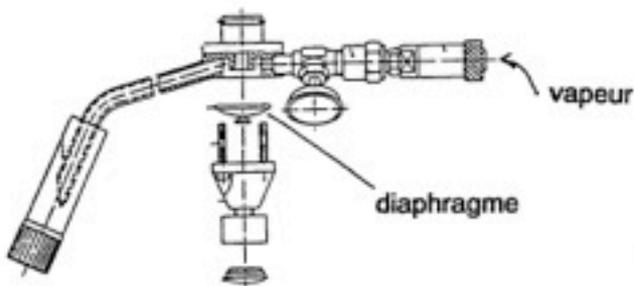
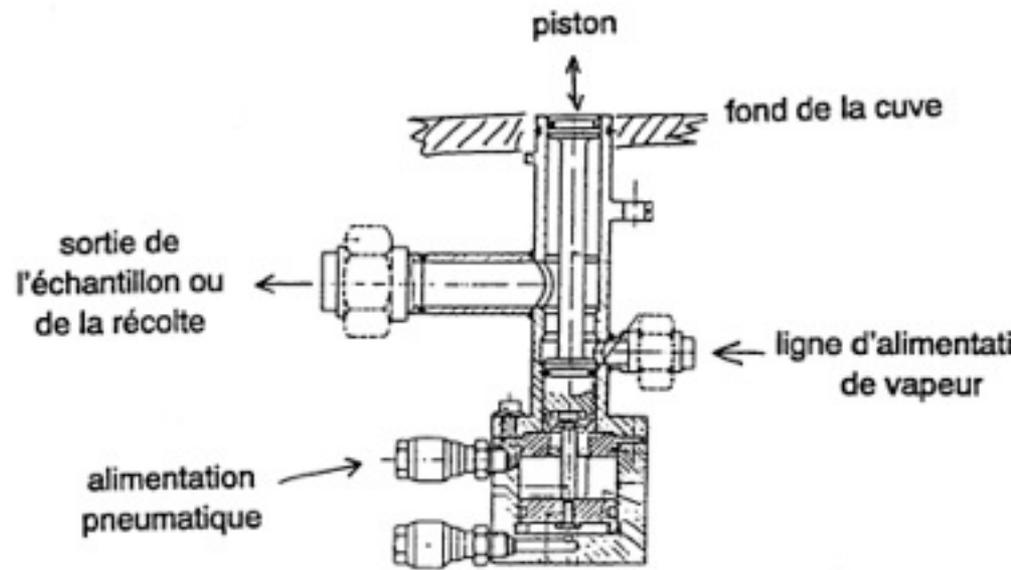
2-Les impératifs particuliers de conception

Vannes d'échantillonnage

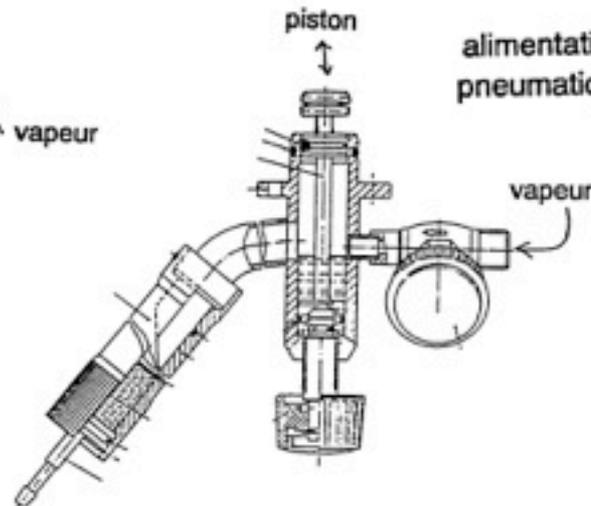


vanne piston pour grands volumes

Vanne de récolte



vanne à diaphragme:
petits bioréacteurs



vanne piston:
petits bioréacteurs

2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur

Puissance consommée pour l'agitation

Puissance alimentée (W/litre)	Échelle de bioréacteur
8 à 10	Laboratoire (< 20 litres)
3 à 5	Pilote (< 75 litres)
1 à 3	Industrielle

2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur

Transfert en O₂ suffisant et cisaillement sous-critique

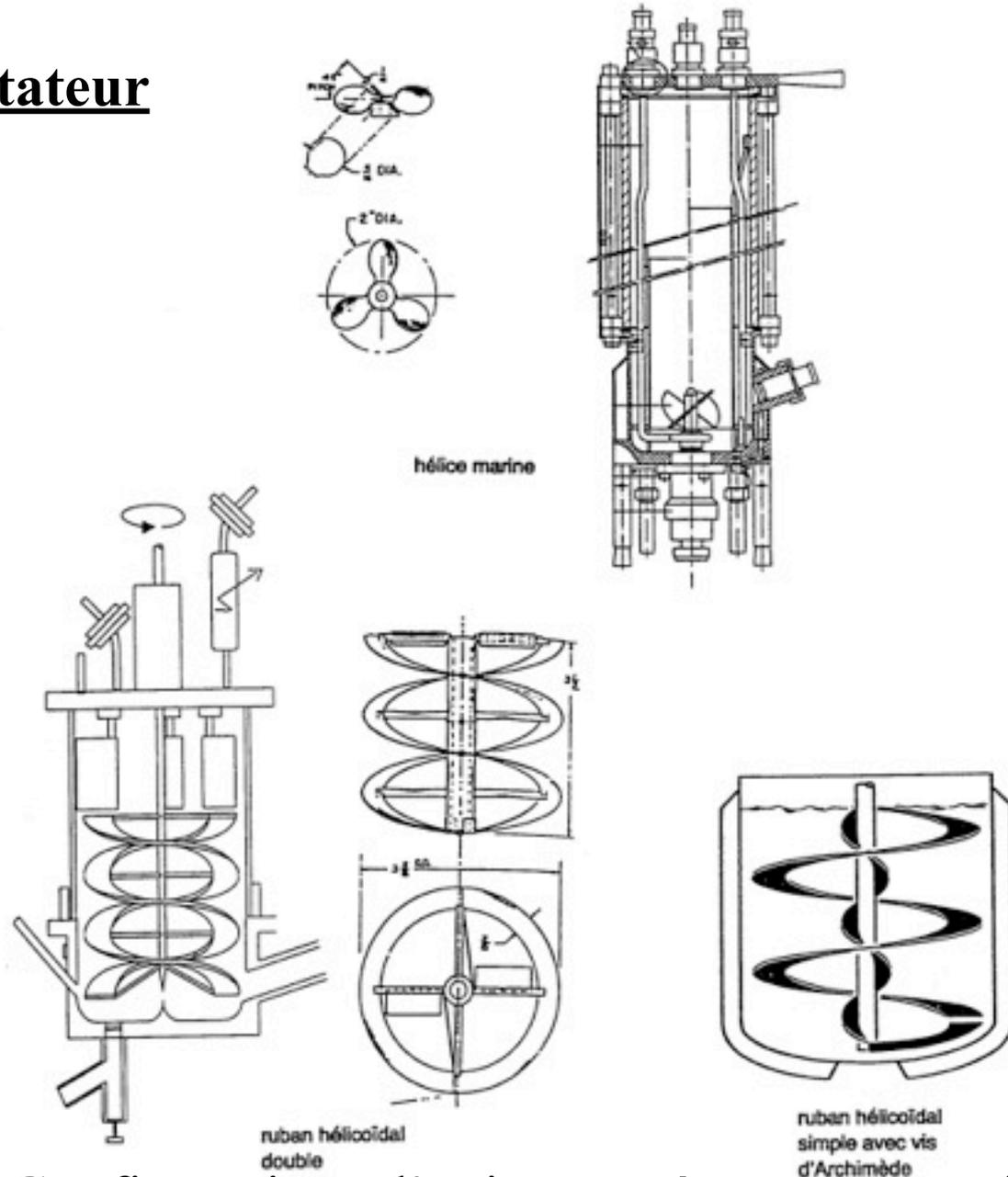
Choix de l'agitateur et des conditions d'opération

Particularités des cultures

- résistance au stress mécanique
bactéries > levures >>> cellules végétales > cellules animales
- niveau de la consommation en oxygène
bactéries ≈ levures >>> cellules végétales ≈ cellules animales
- cellules immobilisées ou en suspension

2-Les impératifs particuliers de conception

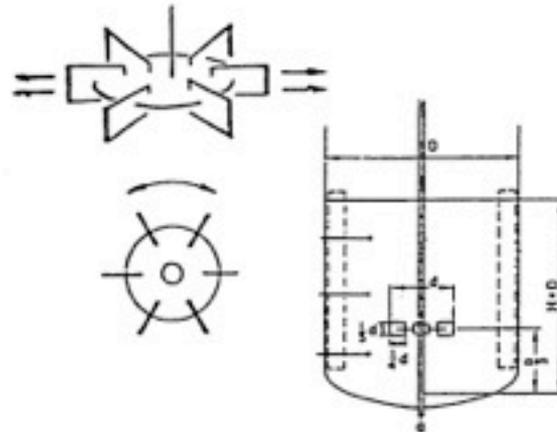
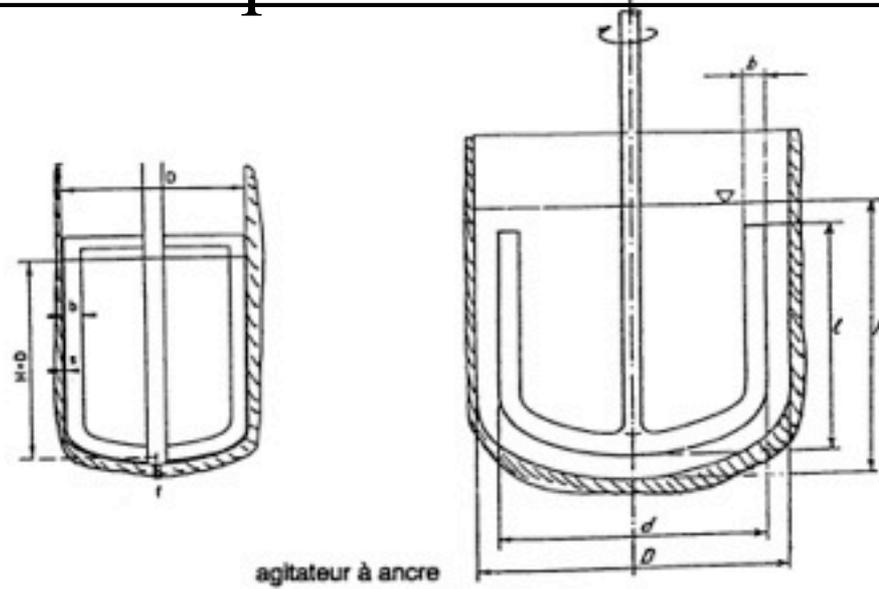
Groupe agitateur



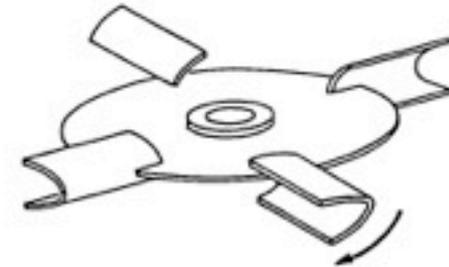
Configurations d'agitateurs à pompage axial

2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur



turbine Rushton



turbines "Scaba"

Configurations d'agitateurs à pompage radial

Rappel: Caractéristiques des bouillons de culture

Les seuls posant problème sont les cultures en suspension de cellules végétales et de moisissures avec un comportement fortement non-newtonien à haute densité cellulaire:

ex. suspensions de cellules de plantes

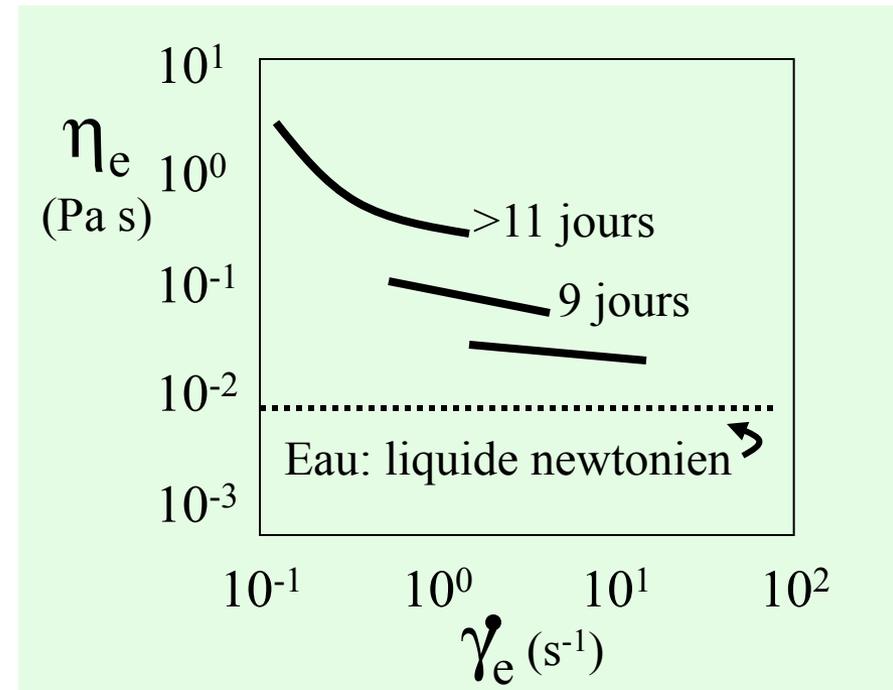
$$\eta_e = m |\dot{\gamma}_e|^{n-1}$$

η_e : viscosité effective (Pa s)

m : indice de consistance du fluide

$\dot{\gamma}_e$: taux de cisaillement (s^{-1})

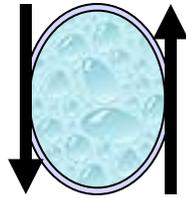
n : indice de comportement en écoulement



Tiré de: Jolicoeur et al., 1992, Biotechnol. Bioeng., **39**: 511-521

Rappel: Cisaillement : Effet secondaire de l'alimentation

Application d'une **contrainte** tangente à la paroi cellulaire



- Interaction entre les cellules et des eddies (**micro vortex**) turbulents
- Collision entre les cellules, avec l'**agitateur** ou des surfaces immobiles d'une enceinte de culture
- Génération de forces de **cisaillement** dans des couches limites et films stagnants
- Génération de forces de cisaillement lors de la montée d'une **bulle** de gaz
- Génération de forces de cisaillement lors de l'**éclatement** d'une **bulle** de gaz à la surface du volume de culture

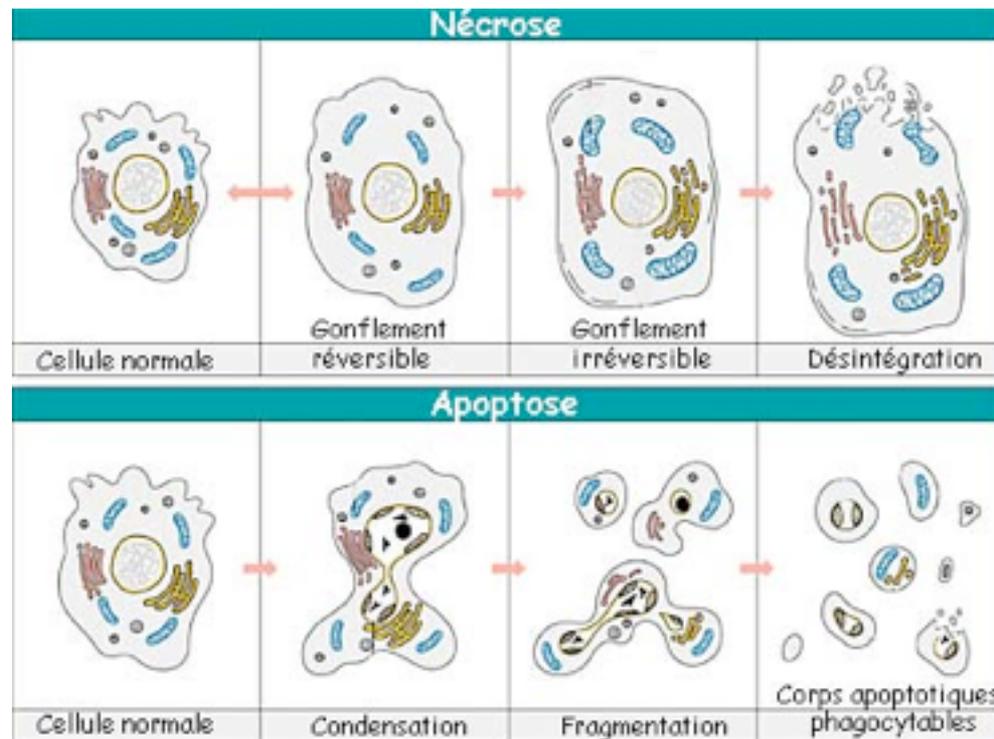
Rappel: Impératifs de la culture *in vitro*

Nécessité d'agiter le milieu de culture

- homogénéisation des conditions dans le volume

Mais...risques de cisaillement excessif :

- culture adhérente : détachement et perte des cellules
- culture en suspension : lyse cellulaire
 - relargage de toxines
 - **apoptose**



Rappel: Cisaillement : Effet secondaire de l'alimentation

Solutions utilisées pour réduire le cisaillement:

- augmentation de la **viscosité** du milieu de culture
- ajout de PEG (polyéthylène glycol)
- ajout de **Pluronic F-68** (agent tensio-actif)
- **sélection** des équipements de culture
- sélection des conditions d'**opération** de la culture et du bioprocédé

2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur

Maintient de l'asepsie: arbre d'agitation

- point de contact MOBILE:

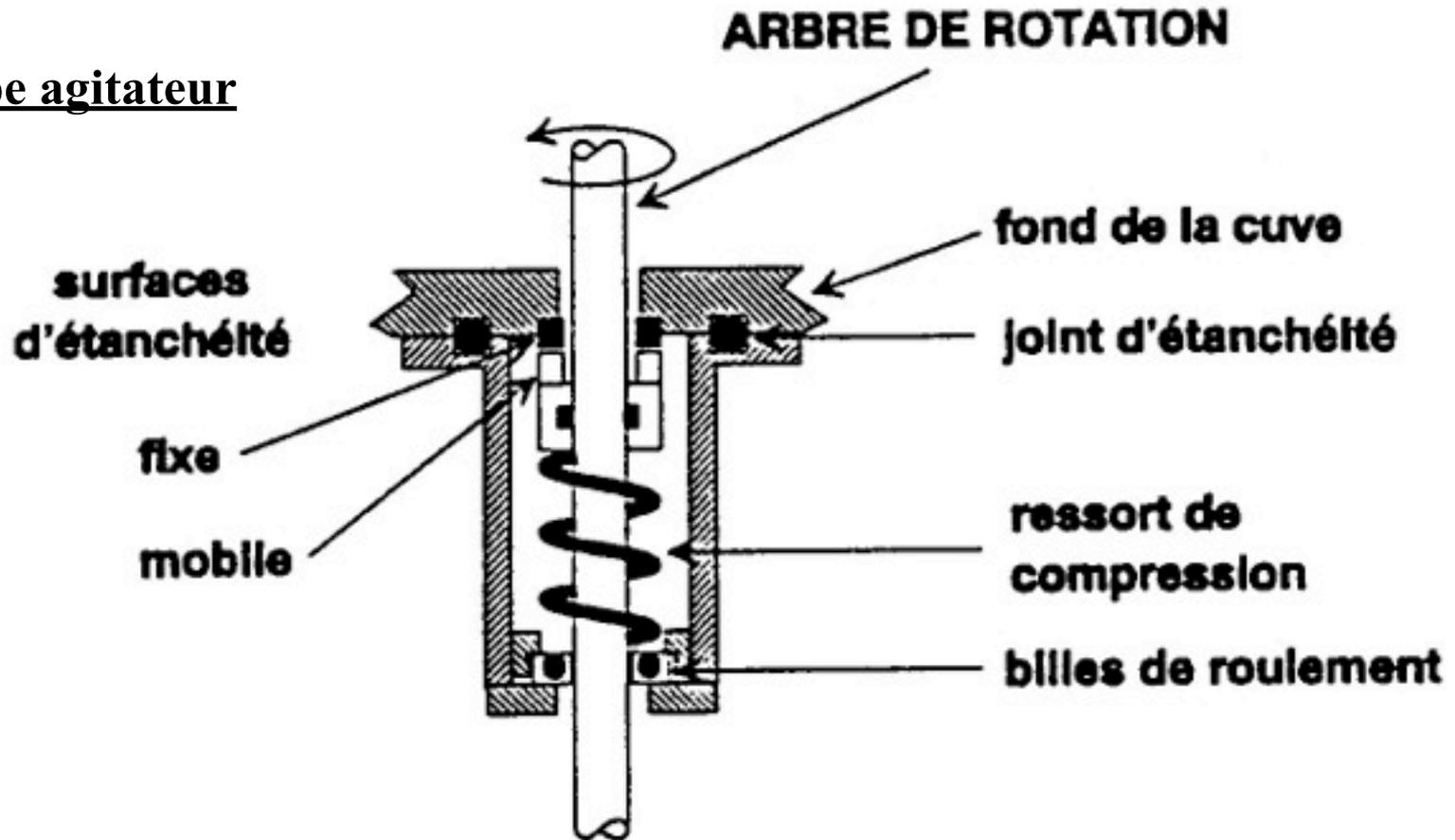
- joint d'étanchéité mécanique
- domaine alimentaire: joint simple accepté
- domaine pharmaceutique:

joint double (en tandem) avec un fluide stérile assurant la lubrification (généralement de la vapeur condensée)

- installation au bas: si les particules d'abrasion ne posent pas de problèmes

2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur

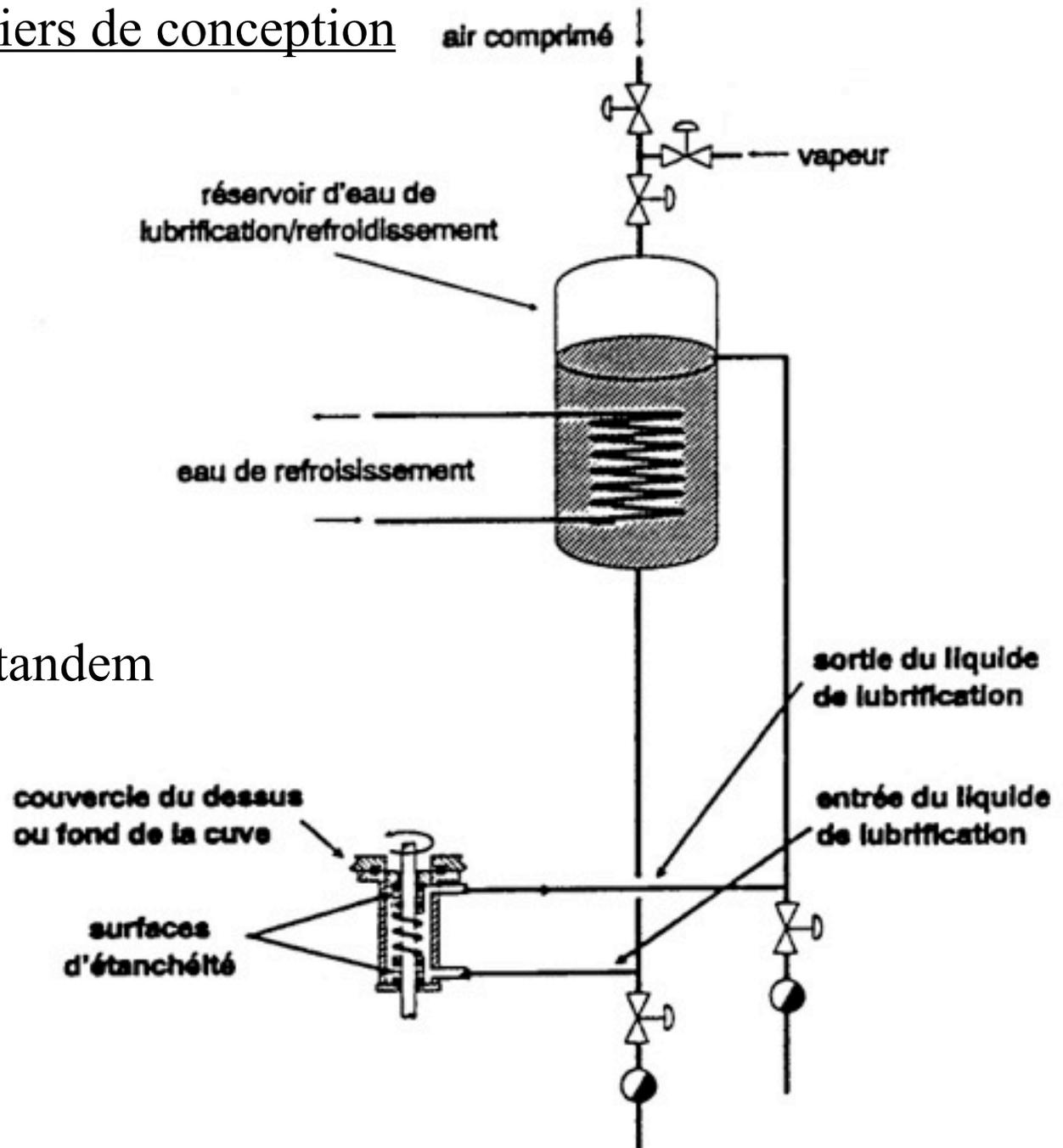


Assemblage d'un joint mécanique d'étanchéité

2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur

Joint mécanique en tandem



2-Les impératifs particuliers de conception

Groupe agitateur: joint mécanique

Matériaux des surfaces d'un joint mécanique d'étanchéité et applications

Matériaux des faces d'étanchéité	Application	Prix
Secteur alimentaire		
Carbone graphité / oxyde métallique (céramique)	<ul style="list-style-type: none">• Fromage blanc• Lait• Pâte de levures• Vin• Yaourt	Bas
Carbure de tungstène / oxyde métallique (céramique)	<ul style="list-style-type: none">• Bière	Élevé
Secteur pharmaceutique		
Carbure de silicone / carbure de silicone	<ul style="list-style-type: none">• Cas extrêmes de température• Résidu minimum d'abrasion	Très élevé

2-Les impératifs particuliers de conception

Les canalisations

Comparaison entre les lignes soudées et raccordées

Lignes soudées	Lignes avec raccords sanitaires
<p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none">• Opérations de stérilisation et d'utilisation facilité• Les joints soudés offrent une étanchéité excellente• Requièrent peu d'entretien	<p>Avantages :</p> <ul style="list-style-type: none">• Nettoyage et stérilisation faciles• Flexibilité de modifications• Faciles d'entretien
<p>Inconvénients :</p> <ul style="list-style-type: none">• Les soudures ne peuvent être polies qu'à l'extérieur : cordons difficiles à nettoyer et stériliser• La configuration ne peut être modifiée facilement• Difficile d'entretien lors du bris d'une soudure	<p>Inconvénients :</p> <ul style="list-style-type: none">• Entretien fréquent

2-Les impératifs particuliers de conception

Les canalisations

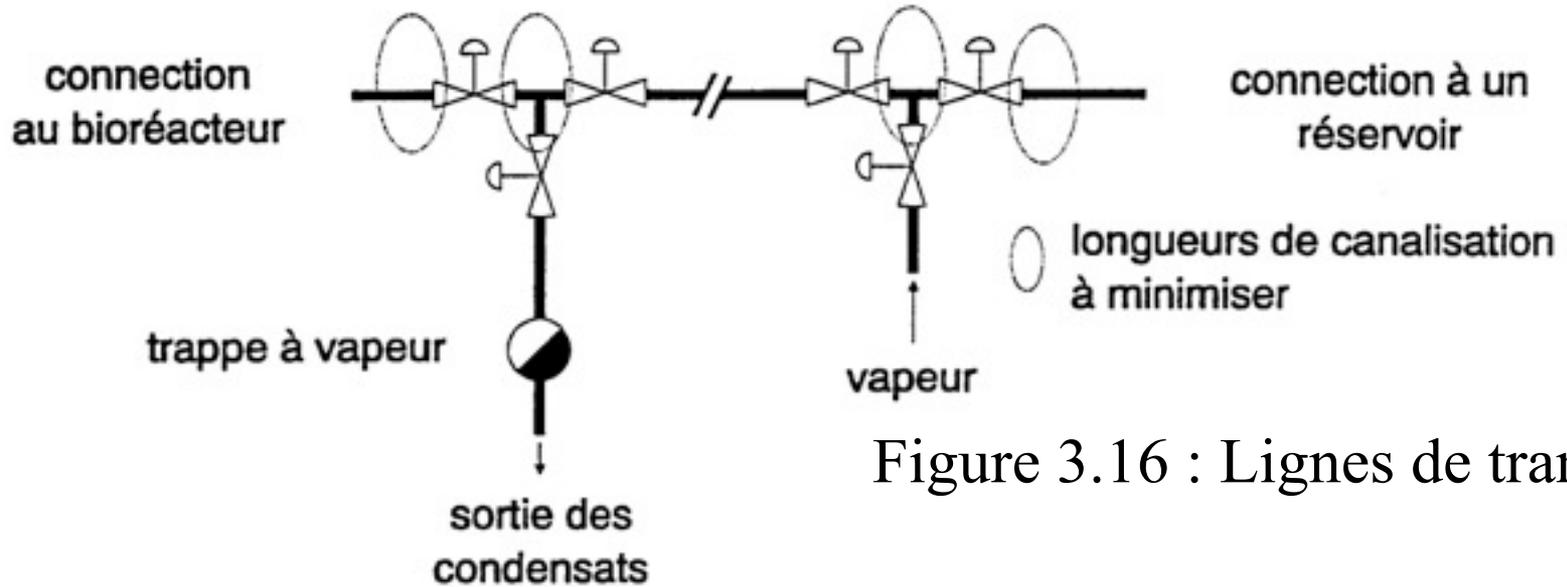
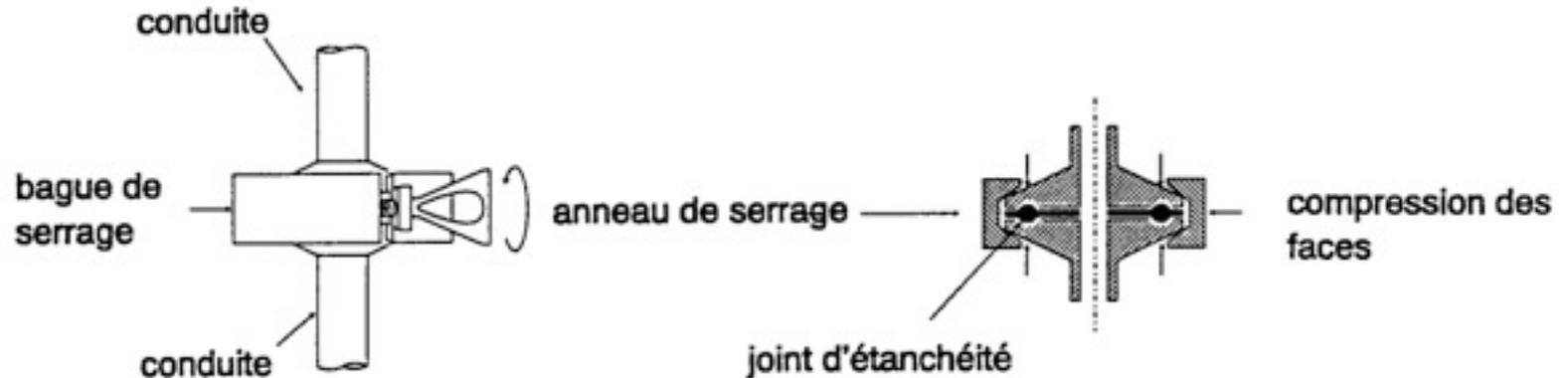


Figure 3.16 : Lignes de transfert

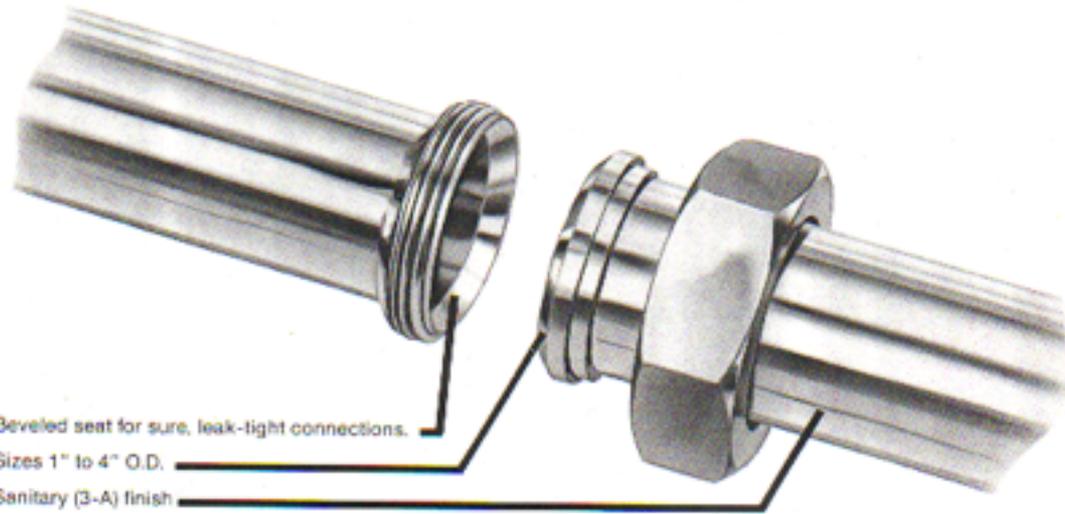


Connexion Tri-Clamp^{MC}

2-Les impératifs particuliers de conception

Les canalisations

Make the Right Connection with Cherry-Burrell Fluid Handling Bevel Seat Fittings



Beveled seat for sure, leak-tight connections.

Sizes 1" to 4" O.D.

Sanitary (3-A) finish

Precision engineered Bevel Seat Fittings are leak-tight without the use of a gasket. Stainless steel T304 and T316L materials with sanitary (#7) finishes are standard. Fittings from 1" to 4" O.D. are easily installed for years of dependable service. For fittings not listed, contact the factory with your specifications. We can custom craft fittings to meet your individual needs.

2-Les impératifs particuliers de conception

Nettoyage

- joints de soudures polis
- surfaces polies
- pas de volumes morts:
réacteur, soudures, raccords, etc.

2-Les impératifs particuliers de conception

Nettoyage

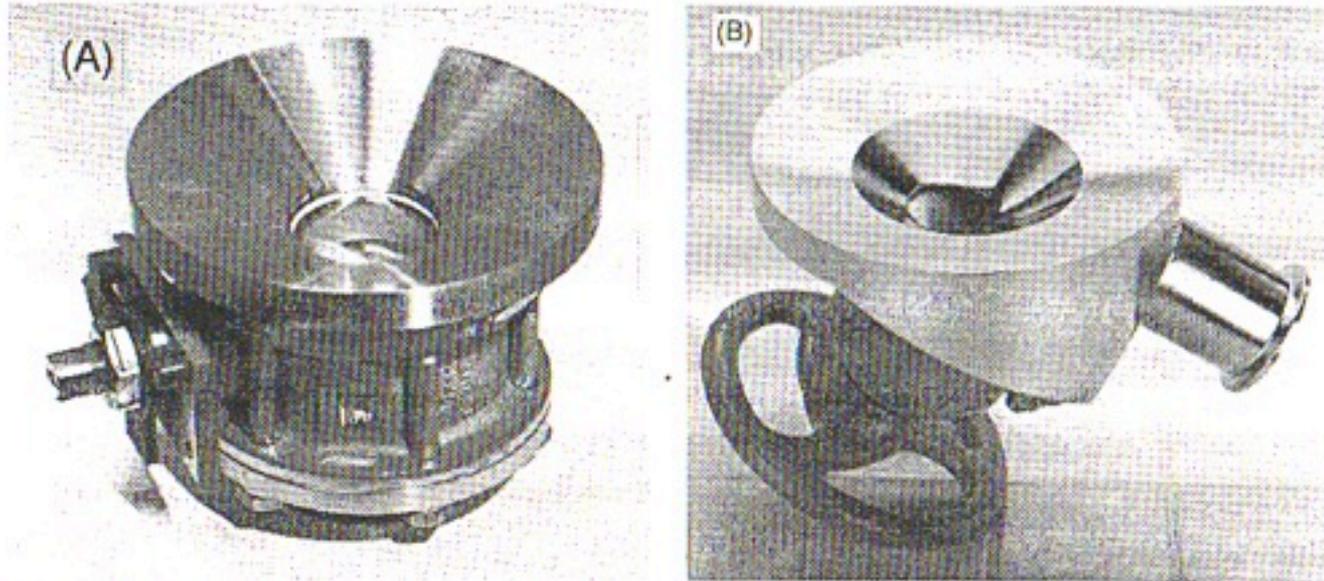
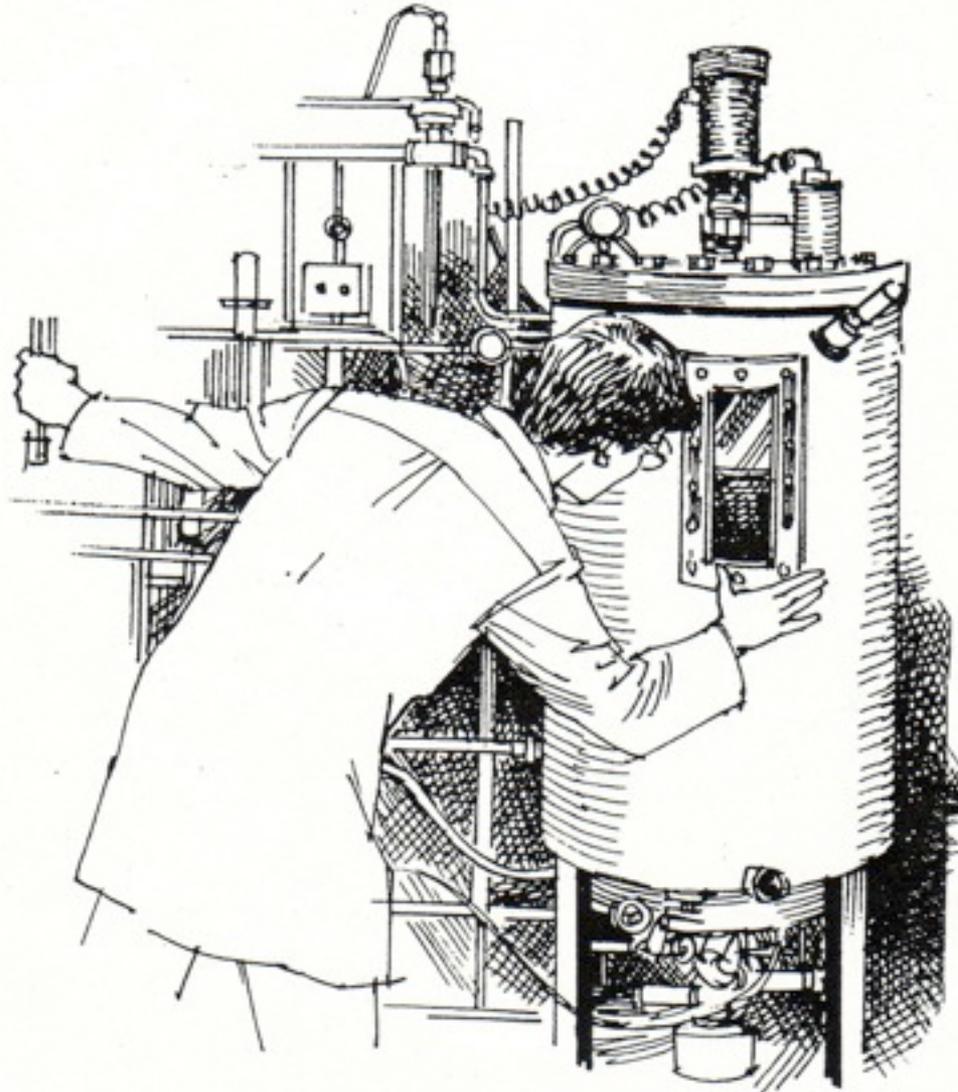


Figure 7.11 Tank-Bottom Valves: (A) ball valve with weld-in flange (courtesy of Worcester Controls Corp.); (B) diaphragm valve with weld-in flange (courtesy of I.T.T. Engineered Valves).

3- Les outils de suivi d'une culture



3- Les outils de suivi d'une culture

- En premier : l'humain!
 - Inspection visuelle
 - Apparence des cellules
 - Odeur (pour détecter des contaminations)
 - Pondérer un ensemble de facteurs
 - Prise de décisions



3- Les outils de suivi d'une culture

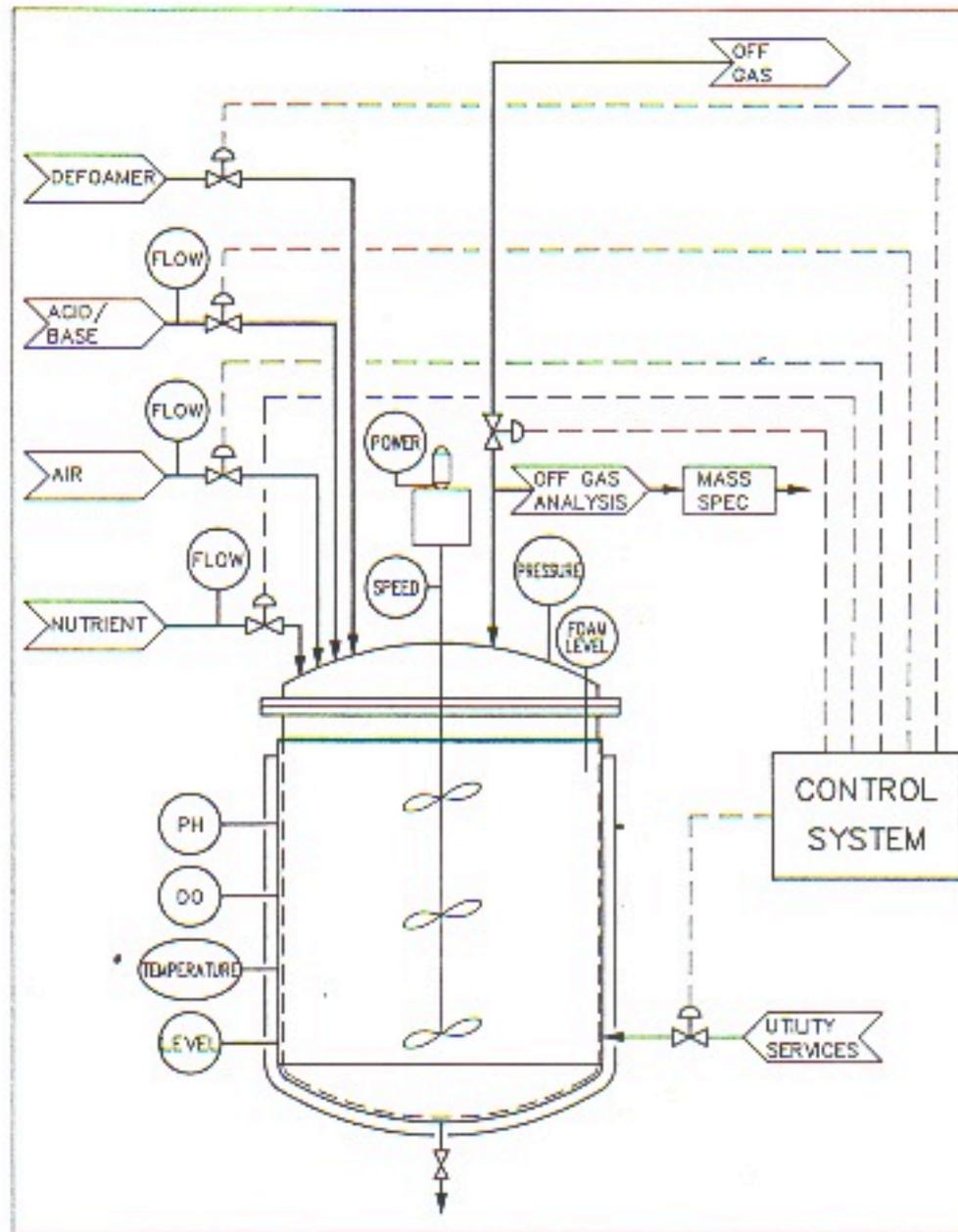


Figure 11.1 Well-Instrumented Fermentor. While such complete instrumentation is not necessary in all applications, it provides a good basis for a flexible bioreactor installation.

Paramètres importants à mesurer

Paramètre	Moyen utilisé
Physique	
Température	RTD (détecteur à résistance thermique, pt-100), thermistor
Pression	Capteur électrique avec soufflet (pharmaceutique)
Moussage	Boucle électrique
Niveau de liquide	Boucle électrique
Vitesse de rotation de l'agitateur	Tachymètre
Puissance consommée à l'agitateur	Puissance au moteur d'agitation
Masse du milieu de culture	Capteur de poids
Viscosité	Puissance au moteur d'agitation
Turbidité	Densité optique (boucle recirculée), spectrophotomètre
Conductivité du milieu de culture	Sonde de conductivité
Débits gazeux	Rotamètre à bille, débitmètre massique (contrôleur et/ou lecteur)
Chimiques	
Oxygène dissous	Sonde mesurant la pression partielle de l'oxygène (galvanométrique ou polarographique)
CO ₂ dissous	Électrode à CO ₂
pH	Électrode à pH, papier pH
Potentiel redox	Sonde redox
Oxygène dans la phase gazeuse	Appareils externes : chromatographie (GC), analyse paramagnétique, spectrogramme de masse
CO ₂ dans la phase gazeuse	Appareils externes : chromatographie (GC), spectrophotomètre infrarouge, spectrogramme de masse
Concentrations des nutriments :	
• Sources de carbone	• Papier à glucose, chromatographie
• Ions : cations et anions	• Test par colorimétrie, sondes spécifiques, chromatographie
• Vitamines, etc.	• Chromatographie. électrophorèse
Concentration des produits, métabolites	Test par colorimétrie, chromatographie, électrophorèse

3- Les outils de suivi d'une culture

Biologiques

Biomasse

- Compte au microscope, compte par dilutions sur plaques
- Masse humide, masse sèche
- Mesure de la densité optique : sonde dans le bioréacteur, spectrophotomètre
- Relation avec la viscosité (puissance consommée à l'agitateur)
- Contenu en protéines, ADN, ARN, NADH, ATP, activité enzymatique, chaleur métabolique (micro-calorimétrie)

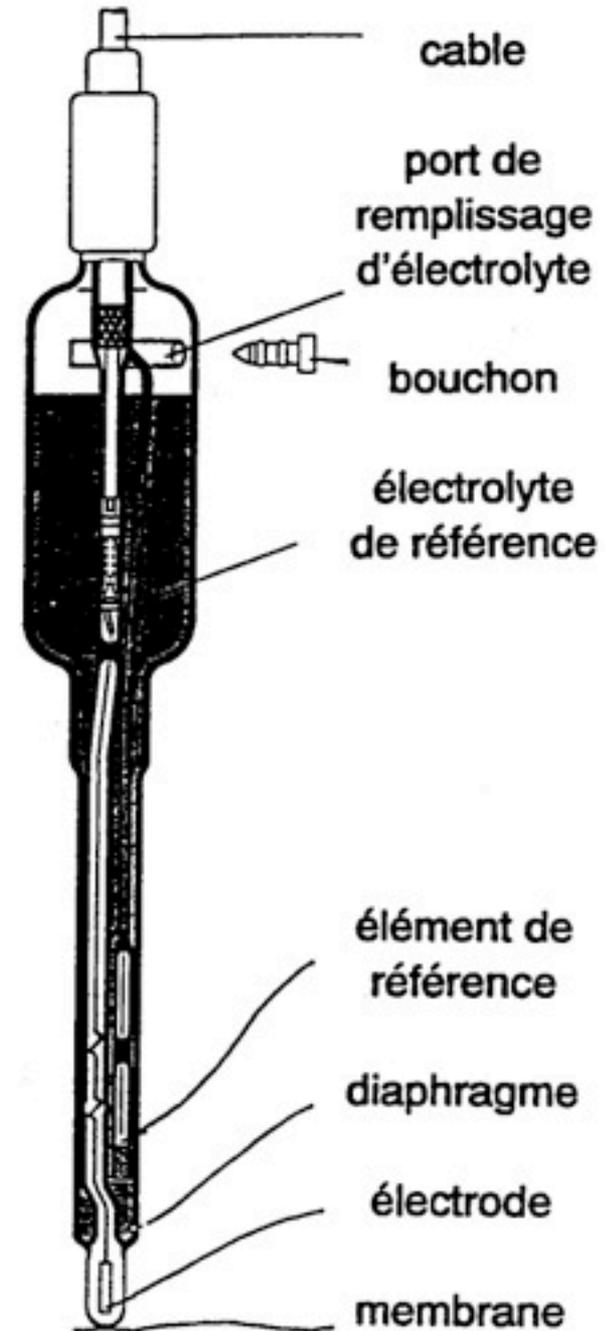
Viabilité

- NADH (sonde à fluorescence)
- Consommation en oxygène, production de CO₂
- Calcul du OUR, RQ, CER
- Suivi du taux de consommation des nutriments

Paramètres importants à mesurer

pH

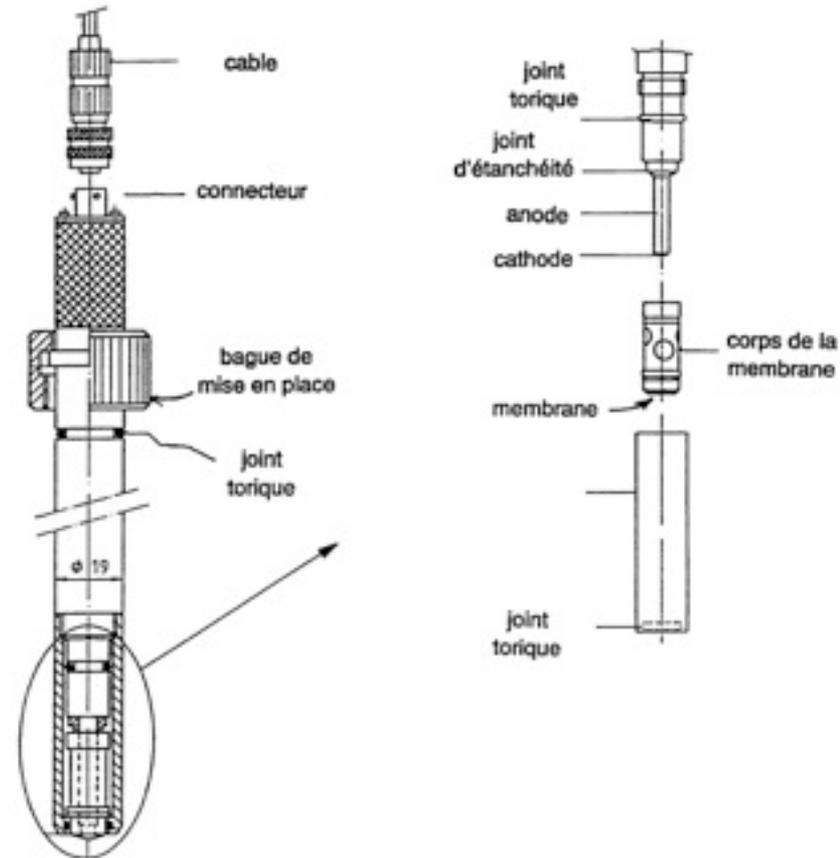
- Le pH peut être critique pour le bon déroulement d'une culture
- Mesure du pH par une sonde
 - Suivi en continu
 - Contrôle par ajout de base ou d'acide
- Donne une information qui peut s'avérer très riche (contamination, évolution de la biomasse)



Paramètres importants à mesurer

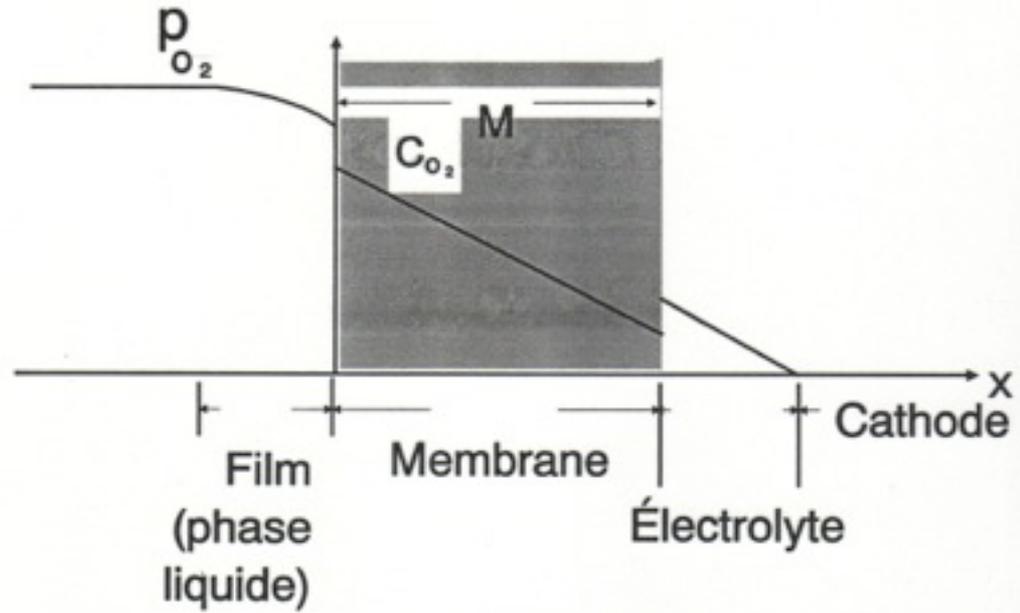
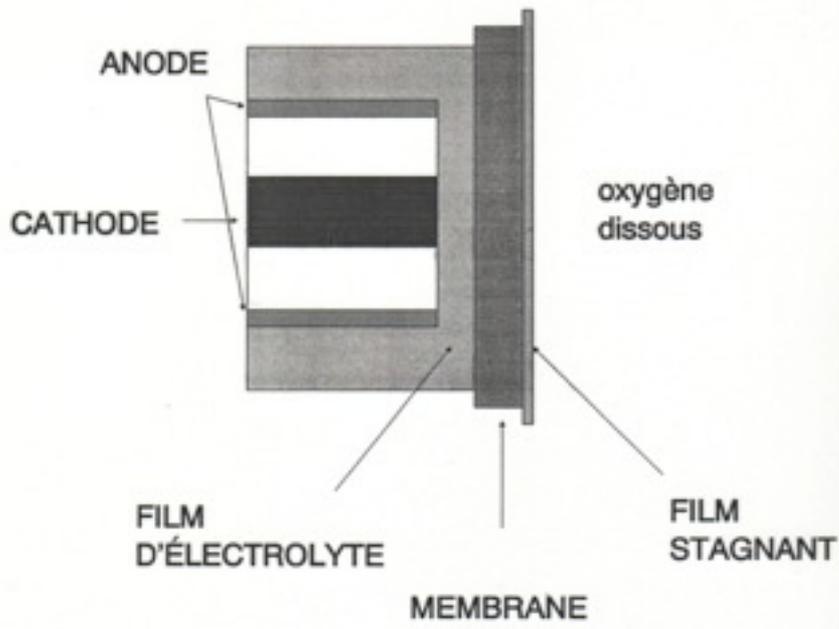
Oxygène dissous

- Critique pour tous les procédés aérobés (sinon, risques de mort cellulaire)
- Peut être riche en information si bien utilisée
 - Respiration cellulaire
 - Étude du transfert gazeux
 - Déterminer des paramètres métaboliques



Paramètres importants à mesurer

Oxygène dissous



4. La problématique cellulaire et les bioréacteurs

Peut-on utiliser une plate-forme bioréacteur unique?

bactérie

levure

moisissure

cellule
de mammifère

cellule
de plante

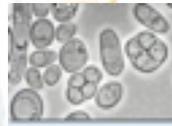
?

?

?

?

?



E. coli

P. pastoris

P. chrysogenum

CHO

tabac

Caractéristiques des cellules

	<u>bactéries</u>	<u>levures</u>	<u>champignon</u>	<u>cellules végétales</u>	<u>animales</u>
Groupe	procaryotes	eucaryotes			
Taille	0,5 - 3 μm	~5 μm	~5 μm - km	~20-150 μm	5- 20 μm
Formes	unicellulaire et associées	unicellulaire	uni et pluricellulaires et même tissulaire		
Paroi	gram+: peptidoglycane gram-: membrane externe peptidoglycane	glucane chitine	chitine	cellulose rigide fragile	aucune
Membrane plasmique	double couche phospholipides	double couche de phospholipides (ex. cholestérol) flexible			
Cytosquelette	aucun	aucun	structure - signalisation - mobilité		
Organelles	aucunes	noyau défini - appareil de Golgi - mitochondrie réticulum endoplasmique			

4. La problématique cellulaire et les bioréacteurs

Peut-on utiliser une plate-forme bioréacteur unique?

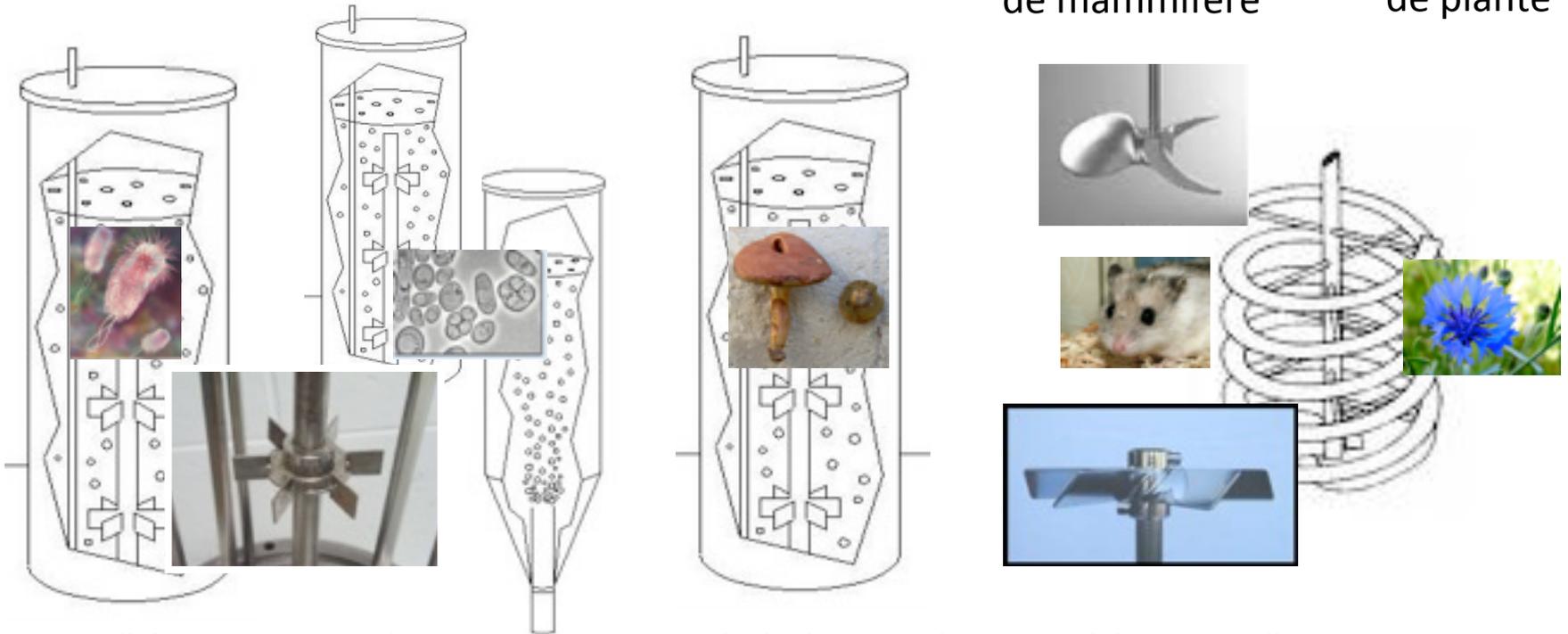
bactéries

levures

moisissures

cellules
de mammifère

cellules
de plante



cellules résistantes et hautement
consommatrices en O₂

Contrôle du diamètre des
pelotes

Sensibilité au cisaillement

Suspension visqueuse

E. coli

P. pastoris

P. chrysogenum

CHO

tabac

Prochain cours

- Mixing
- Transfert entre la phase gazeuse et la phase liquide (chapitre 10: Shuler/Kargi) et bilans entre l'offre et la demande...