

4. Un exemple de production et de procédé biotechnologique : le Quorn®

Les biotechnologies se sont fait connaître du grand public essentiellement à travers des productions de substances d'intérêt qu'il était alors difficile d'obtenir, ne serait-ce que pour étude. Ainsi, grâce au génie génétique, des cellules ont pu être reprogrammées en vue de la synthèse de protéines d'intérêt clinique ; le produit d'intérêt était alors extrait, purifié et, si un marché existait, commercialisé. Ainsi, depuis 1985, furent mis sur le marché *interférons*, *interleukines*, *facteurs divers de croissance et de nécrose*, *EPO*... Si la commercialisation d'hormones de croissance (humaine et bovine) recombinantes relève de ce cas de figure, celle de l'insuline recombinante, plus proche de celle de l'homme et première substance de ce type commercialisée, reste en concurrence avec une production d'hormone animale transformée.

Moins connues, les biotechnologies sont également présentes dans la reprise de procédés anciens de microbiologie industrielle. Celle ci était initialement une culture de microorganismes essentiellement sur milieu solide. Ce n'est qu'à l'issue de la seconde guerre mondiale que se développèrent les *cultures submergées* et les méthodes efficaces d'extraction – purification des produits de fermentation. Ainsi, ces procédés anciens bénéficient maintenant de la mise en oeuvre d'une méthodologie nouvelle (contrôle et régulation des paramètres, conduite de la fermentation). De même, les techniques de biologie moléculaire et de génie génétique (clonage, mutagenèse dirigée) permettent la mise en oeuvre de microorganismes (ou de cellules eucaryotes) nettement plus performants. Ceci pour dire, que, l'extraction / purification de protéines (facteurs protéiques) / hormones / enzymes ou d'autres substances à partir de matières premières naturelle est de plus en plus abandonnée au profit de l'utilisation du clonage et de l'expression du gène du produit d'intérêt. Ceci bouleverse un certain nombre d'habitudes. Les économies des pays en voie de développement sont susceptibles d'être dépossédées d'une possibilité d'exportation.

Sera développé dans ce qui suit une "étude de cas" rassemblant des données d'ordre scientifique, technologique, économique et éthique, ceci illustrant le caractère pluridisciplinaire des biotechnologies. Il s'agira de la production d'un champignon à usage alimentaire, commercialisée sous le nom de Quorn®; il est riche en protéines et pauvre en cholestérol et constitue un substitut de la viande.

Le Quorn® est une "marque d'une gamme d'aliments se positionnant comme une alternative à la viande". Le constituant principal de Quorn® est une protéine issue de la famille des champignons, il a le goût et la texture de la viande blanche et des propriétés nutritionnelles surprenantes : riche en fibres, peu calorique, sans cholestérol (site Web : "<http://www.quorn.com>").

Il est obtenu industriellement par culture d'un champignon (*Fusarium graminearum*) en Grande Bretagne où il est commercialisé ainsi qu'en Belgique, Suisse, Pays Bas, Allemagne et, Suède, USA et très récemment (4 septembre 2001) France.

Le produit d'intérêt est donc ici la biomasse elle même : elle sera commercialisée après traitement, (bio)chimique, mise en forme et après ajout éventuel de saveurs diverses. Cette production, actuellement en expansion, rencontre un accueil favorable dans les pays anglo-saxons où les végétariens sont nombreux, en particulier parmi les jeunes.

La genèse et les modalités d'une telle production sont intéressantes à évoquer, car elle rassemble des éléments économiques, techniques et même éthiques

D'où vient Le Quorn® et comment, techniquement, est-il obtenu ? Quels sont les éléments de ce *procédé biotechnologique* ?

4.1. Les origines du Quorn®

Après avoir été introduite, semble-t-il, en Grande Bretagne et aux USA à la fin du XIXème siècle, la production de levures pour l'alimentation humaine se développa pendant les deux guerres mondiales principalement en Allemagne avec l'utilisation de liqueurs bisulfiteuses de papeteries. De même, il y eut production, pendant la seconde guerre mondiale, d'hydrocarbures à partir de charbon dégradé en monoxyde d'azote et hydrogène par de la vapeur d'eau (*procédé Lurgi*); les gaz étaient utilisés pour la synthèse sous pression de composés paraffiniques (*synthèse de Fischer – Tropsch*) ; ceux ci servaient alors de substrat pour la synthèse de levures. Les Anglais, eux, durant cette même période firent des essais avec comme substrat des sous produits de l'industrie sucrière. Une usine fut construite en 1947 à la Jamaïque. et elle fonctionna pendant 10 ans mais la dénomination de « levure alimentaire » du produit obtenu ne convainquit pas les consommateurs d'autant plus que restait un goût légèrement déplaisant laissé par l'agent antimousse. La production fut arrêtée.

Les projets de production de microorganismes à des fins alimentaires refirent surface dans le secteur de la pétrochimie. L'existence de bactéries susceptibles de se développer sur du pétrole était connu depuis le XIXème siècle. Cependant, en 1955, un Universitaire allemand conclut, que "les connaissances courantes ne pouvaient pas soutenir l'espoir d'un procédé commercialement viable (de production de biomasse). La demande d'oxygène serait très grande et il y avait ce goût tenace dans les levures obtenues". Cela freina l'enthousiasme des chercheurs.

Par contre, dès 1950, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) prit conscience que les sources de protéines allaient manquer dans le monde et une sorte de cahier des charges fut édicté pour la production de ce qui pourrait être de nouvelles protéines pour la consommation humaine. Ainsi fut créé, aux USA, au MIT, le terme de Single Cells Proteins (SCP) (ou de Protéines d'Origine Unicellulaire (POU). Il fallait, en effet, éviter des termes à connotation négative comme "protéines microbiennes" ou "bactériennes".

C'est dans un contexte parallèle, celui d'industriels du pétrole souhaitant participer à des projets leur permettant d'inverser l'image défavorable qui leur était plutôt associée jusqu'alors, que Alfred Champagnat, travaillant pour la *Société Française des Pétroles BP (SFBP)* aidé de Jacques Senez, chercheur en microbiologie au CNRS à Marseille, développa un projet de production de levures alimentaires par croissance sur hydrocarbures. Ainsi Champagnat et Senez s'attelèrent aux aspects technologiques de la culture de levures alimentaires (dénommées *Toprina*) sur hydrocarbures. Ils furent à l'origine de la conception d'une importante usine à Lavera dans le Golfe de Fos (production envisagée : 16 000 t / an). Malheureusement se produisit en 1973 le premier choc pétrolier : la rentabilité du procédé diminua fortement, ce qui amena à l'arrêt de la production en 1975 après obtention de (seulement) quelques milliers de tonnes de levures pour l'alimentation animale. Il n'empêche que les études réalisées furent à l'origine de beaucoup de projets - Grande Bretagne avec le projet *Pruteen* de l'Imperial Chemical Industries¹ (ICI) et Italie, Allemagne (Hoeschst). Ces

¹ Entreprise chimique du Royaume Uni

projets, comme celui de la *SFBP*, furent plus ou moins rapidement abandonnés malgré les investissements énormes en recherche et développement ainsi que la construction d'installations industrielles.

C'est dans ce contexte que Ranks Hovis McDougall (RHM) décida dès 1964 de développer un aliment riche en protéines, d'abord pour la consommation animale, puis humaine. Finalement, il décida de financer l'étude de la culture d'un champignon dans un fermenteur sur un milieu contenant de l'amidon de blé comme source de carbone et source d'énergie, et de modifier la biomasse du champignon pour satisfaire aux exigences nutritionnelles humaines. Si au début, l'idée était de commercialiser les mycobactéries séchées et réduites en poudre, tels la farine de soja et le lait en poudre, RHM décida, ensuite que la texture des mycoprotéines était suffisamment appétissante pour en faire par elles mêmes un produit alimentaire. A cette époque, une installation capable de produire 20 000 - 30 000 tonnes de protéines fongiques par an était estimée rentable si elle mettait en œuvre un fermenteur continu.

En 1984, à la suite du développement du projet (en particulier avec l'identification du micro organisme à cultiver) une "joint Venture" (nommée Marlow Foods) entre RHM et ICI fut constituée en Grande Bretagne à *Bellingham* (Nord de l'Angleterre) avec comme objectif le développement du marché des produits dérivés de la mycoprotéine. *Quorn®* devint alors la marque déposée du produit et "myco-protéine", un terme fondé par le "*Foods Standarts Com*". La nouvelle entreprise bénéficiait de l'expérience d'ICI acquise lors du développement du projet de nourriture animale dénommée *Pruteen*, c'est-à-dire de son expertise des problèmes liés à l'augmentation d'échelle ("scale up") du procédé. Ainsi, compte tenu des études de marché et des considérations techniques, un fermenteur avec une capacité de production de 10 000 tonnes de mycoprotéines par an fut considéré comme raisonnable.

4.2. L'obtention du Quorn®

4.2.1. Première étape technique : l'isolement du champignon et la réalisation de cultures mères

A partir de 1964, les recherches commencèrent en vue de sélectionner un microorganisme ayant, entre autres, des caractères cultureux et une palatabilité intéressants. Ces recherches furent menées, en deux années, par sélection parmi 3000 champignons du sol. Voici comment est décrit l'isolement des diverses souches de moisissures présentes dans des échantillons de terre :

"L'échantillon de sol fut séché, et exposé à des vapeurs de p-dichlorobenzène pour éliminer les mites. Un gramme de sol fut mis en suspension dans 99 mL d'eau distillée stérile dans une fiole d'erlenmeyer et agitée durant 30 minutes. Ensuite 0,1 mL de cette suspension futensemencé sur une boîte de Petri contenant de l'Oxoid Malt extract Agar (MEA Oxoid Référence CM 59) avec un antibiotique (oxytétracycline), cette addition étant réalisée pour supprimer la croissance microbienne. Des dilutions de raison 10 de la suspension furent ensuite inoculées dans des boîtes de Petri contenant du MEA et toutes les boîtes furent ensuite incubées à 30°C jusqu'à ce que les colonies soient bien développées. Approximativement 10-30 souches de champignons furent isolées à partir de chaque échantillon de sol. Ces colonies furent purifiées en éliminant les spores avec une anse stérile et en étalant ces spores sur une des boîtes de MEA. Ceci fut répété jusqu'à ce que seulement une moisissure, ou plus exactement, seulement un type morphologique, soit présent sur ces

boîtes d'isolement. Ceci est une procédure relativement simple, mais elle ne peut être utilisée comme screening préalable pour une production de protéines."

Cela réalisé, deux cultures solides étaient effectuées pour chaque isolement. Furent ensuite mises au point des cultures de travail en milieu liquide.

Le screening dura deux ans pour arriver à la souche sélectionnée : une souche de *Fusarium graminearum* fut isolée, avec d'autres, le premier Avril 1968 du sol de Marlow ; la souche fut dénommée 6 - 3/5A

En Avril 70, les conditions de stockage par lyophilisation et par culture en sol sont standardisées et validées. En 1972-73, fut réalisée l'étude de la stabilité de la souche.

Furent définies également, à l'échelle laboratoire, les conditions expérimentales de réalisation de suspensions stock et des cultures de travail. Un souci également fut le maintien de la souche, c'est-à-dire la vérification de l'absence de mutation. Celle ci fut contrôlée, entre autres, par des critères culturels morphologiques.

Les conditions de conservation de la souche choisie définies, il fut nécessaire de produire des quantités de *Fusarium graminearum* permettant de continuer les investigations dans les domaines de la chimie, de la toxicologie et de la nutrition.

4.2.2. Seconde étape technique : la culture en fermenteur

Cette culture en fermenteur fut réalisée par RHM. Il était nécessaire de conduire des essais en vue de la future production : c'est la phase de *développement*. De plus, et une fois la société Marlow Foods créée, il fallut changer d'échelle passer à la phase de *production*.

4.2.2.1. Le développement de la culture

La souche étant choisie, et les conditions de son maintien définies, il était nécessaire de définir les conditions de culture en plus grand volume. D'essais préliminaires à l'échelle laboratoire, ont été déduites les conditions pour réaliser une culture pilote en bioréacteur agité continu.

Pour ces études de développement, les diverses conditions expérimentales furent celles d'une production industrielle :

- produits chimiques de qualité alimentaire
- eau utilisée directement dans le procédé de qualité « potable »
- eau utilisée pour la fourniture de vapeur traitée par des additifs pour chaudières utilisables dans les industries alimentaires
- air prélevé à l'extérieur du bâtiment et comprimé par un compresseur sans huile et finalement filtré pour le stériliser
- matériaux utilisés pour la construction de l'installation : acier inoxydable de grade 316 ou 304 (EN 58J ou E).

Ainsi, à partir de 1975, fut réalisée une culture continue en fermenteur agité de 1300 L. Cette étape de culture pilote a été suivie par d'autres visant à réduire le contenu en ARN de la biomasse, à séparer le mycélium du milieu de culture et à réaliser la formulation en aliments variés.

Seront envisagés : les éléments théoriques de la culture en continu (valables pour la production), la préparation du milieu de culture, la fermentation.

4.2.2.2. La culture continue : éléments théoriques

La culture continue est un système dynamique dans lequel, à l'état stationnaire, le taux de croissance des micro organismes compense la dilution issue de l'apport du milieu² Le substrat est apporté avec un débit identique au débit de soutirage : le volume reste constant. Ainsi les concentrations de la biomasse et des autres réactants sont elles constantes en fonction du temps (état stationnaire) et le pH, la température, la concentration d'oxygène dissous, la densité de population et la vitesse de croissance peuvent être contrôlées.

La vitesse spécifique de croissance ou taux de croissance népérien μ des micro-organismes dépend de la concentration du substrat limitant la croissance, selon la loi empirique de Monod (1942, 1949) :

$$\text{Equation 1 : } \mu = \mu_{\max} \frac{(S)}{(K_S + (S))}$$

Dans laquelle μ est la vitesse spécifique de croissance en h^{-1} , μ_{\max} est la vitesse spécifique de croissance maximum et (S) la concentration du substrat limitant la croissance. Dans une culture continue dans des conditions d'état stationnaire, le taux de croissance μ est égal au taux de dilution D . De cette égalité, on peut tirer la valeur de la concentration (S) du substrat limitant la croissance en fonction du taux de dilution D .

$$\text{Equation 2 : } (S) = K_S \frac{D}{(\mu_{\max} - D)}$$

La concentration du substrat limitant la croissance est dépendante du taux de dilution, de la vitesse spécifique de croissance et de la constante K . De même, si le rendement du substrat en biomasse est $Y_{X/S}$, ceci signifie que

$$Y_{X/S} = X / (S_0 - S) \text{ soit } X = Y_{X/S} (S_0 - S)$$

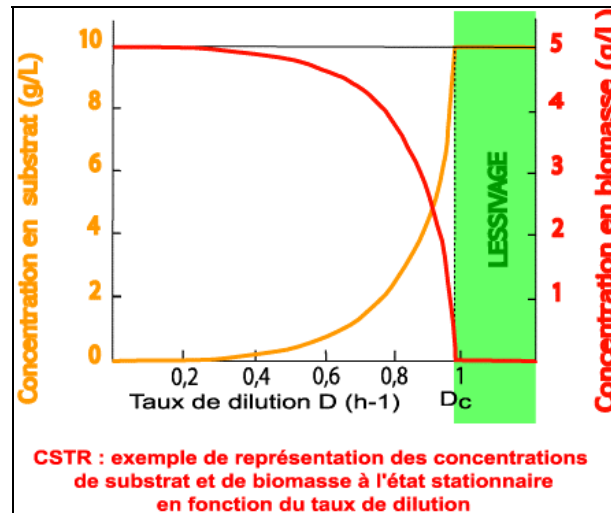
Ainsi peut on obtenir l'expression de la concentration de la biomasse

$$X = Y_{X/S} \cdot \left(S_0 - \frac{K_S}{\frac{\mu_{\max}}{D} - 1} \right)$$

Soit avec les valeurs suivantes des paramètres

$$S_0 = 10 \text{ g/L} \quad K_S = 0,2 \text{ g/L} \quad \mu_{\max} = 1 \text{ h}^{-1} \quad Y_{X/S} = 0,5 \text{ g/g} \cdot \text{h ou } 0,5 \text{ h}^{-1}$$

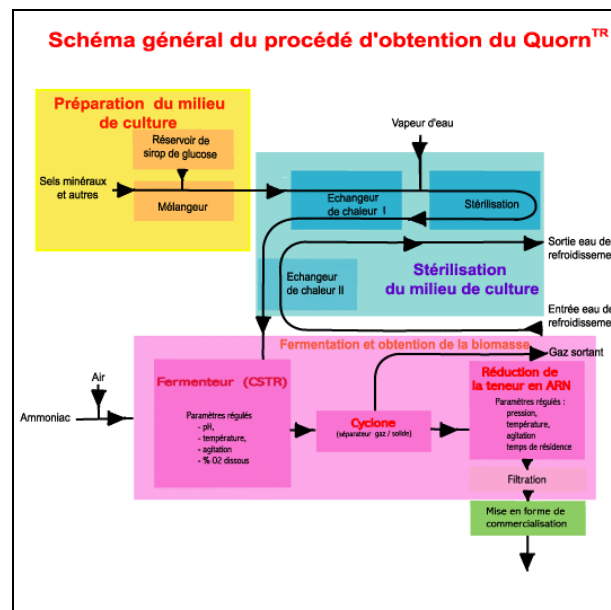
² Cette dilution est quantifiée par le « taux de dilution » appelé D (en h^{-1}) : celui ci se calcule à partir de V volume du fermenteur (en L) et de Q , débit d'alimentation et de soutirage (en L/h) : $D = V / Q$; l'inverse du taux de dilution est le temps de résidence (temps (théorique) passé par la culture dans le bioréacteur). Ainsi dans la fermentation en continu, à l'état stationnaire, le taux de dilution D est-il égal au taux de croissance du microorganisme μ .



Ainsi ces considérations théoriques permettent-elles de faire le calcul des concentrations de substrat restant et de biomasse correspondant à un taux de dilution donné.

Un tel calcul reste néanmoins théorique, en particulier du fait que l'on suppose que le bioréacteur est parfaitement mélangé et qu'il n'y a pas de développement de microorganisme sur les parois. Le modèle doit alors être compliqué pour se rapprocher de la réalité.

4.2.2.3. Les différents temps : schéma général



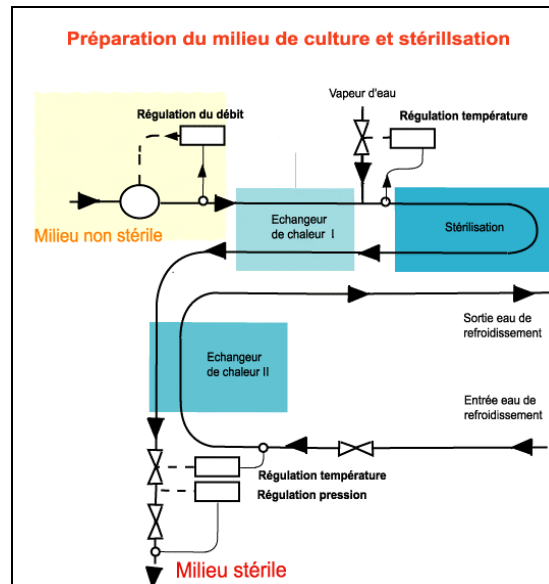
4.2.2.4. La préparation du milieu de culture

Diverses sources de glucides étaient susceptibles d'être utilisées :

- les **mélasses** de betterave ou de canne, sous produits de l'industrie sucrière, riches en saccharose ; elles nécessitent le plus souvent un pré traitement pour éliminer des substances inhibitrices de la croissance du champignon ; ces substances avaient été introduites au cours du procédé d'extraction du saccharose

- le **sirop de glucose** constitué essentiellement de glucose commercial ; le sirop de glucose est issu de l'hydrolyse de l'amidon, par exemple de maïs.

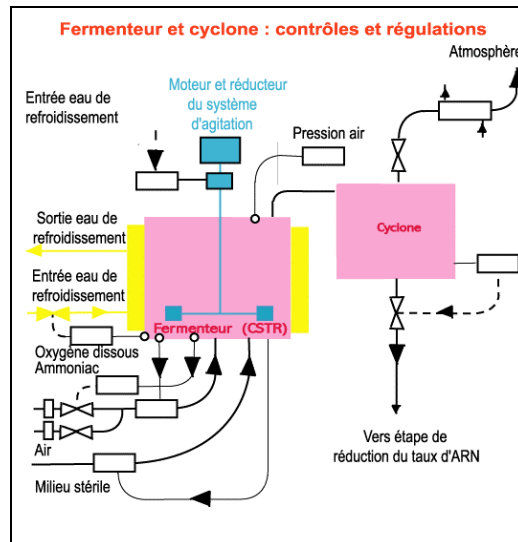
Quelle que soit la source de carbone utilisée, elle est mélangée avec d'autres constituants qui sont des substances minérales et des vitamines. Après mélange, le milieu est stérilisé par un procédé continu.



Pour la stérilisation, on a recours à un procédé continu et les conditions opératoires utilisées dérivent d'une étude de la cinétique de l'inactivation bactérienne réalisée au laboratoire. La preuve de son efficacité est montrée par la capacité à réaliser des périodes de fermentation de plus de 1000 h sans contamination.

4.2.2.5. La fermentation

Le milieu de culture stérile est introduit en continu depuis le réservoir de milieu stérile jusqu'au fermenteur ; de même sont introduits de l'air et du gaz ammoniac à un débit et à une pression déterminés. Dans le fermenteur, la croissance des cellules se produit aux dépens des nutriments apportés et la biomasse formée quitte le fermenteur en continu à un débit égal à celui de l'entrée du milieu de culture. En quittant le fermenteur, la biomasse en suspension dans le milieu de culture est séparé du gaz utilisé dans un *cyclone* et ensuite passe à l'étape de réduction de la quantité d'ARN. Un diagramme schématisant le flux du procédé et les principales boucles de contrôle est donné dans les figures suivantes



Dans ce procédé de culture continue, le micro-organisme se développe dans des conditions d'état stationnaire, c'est-à-dire la constance des concentrations des divers réactants en fonction du temps. Ceci est obtenu par contrôle et régulation de divers paramètres :

Paramètre régulé	par action sur
température	le débit de l'eau de refroidissement
pH	le flux d'ammoniac
pression	la position de la valve contrôlant la pression de couverture
flux d'air (oxygène dissous)	le débit d'entrée d'air
vitesse d'agitation	le taux de réduction

Pour vérifier que la culture se déroule comme prévu, et commencer à assurer l'historique du développement - en attendant la traçabilité - , la vitesse de consommation de glucose, oxygène et ammonium , la vitesse de production de biomasse et de dioxyde de carbone, la morphologie des hyphes et la contamination de la culture font l'objet d'enregistrement en fonction du temps.

Dans ces conditions, la productivité, le rendement, la composition et la morphologie de cette culture sont-ils maintenus constants grâce aux régulations précédentes.

Ainsi, une campagne de culture continue pouvait durer plusieurs semaines sans interruption significative et sans contamination. À l'issue de cette campagne, l'installation était arrêtée, nettoyée et soumise à maintenance.

Au cours des 10 années où ces études furent menées (1975-1985), les valeurs optimales des paramètres physico-chimiques furent déterminées et, une fois l'AMM donnée, il était alors possible de passer à l'échelle industrielle.

4.2.2.6. La culture à l'échelle industrielle

Après autorisation de commercialisation de la mycoprotéine en 1985, une "joint venture", *Marlow Foods*, fut créée en 1986 entre Imperial Chemical Industries (ICI) et RHM pour développer le marché. C'est à ce moment qu'apparurent le nom commercial Quorn® et la première préparation culinaire : une tarte végétarienne.

Pour augmenter la production finale, il fallait augmenter la quantité de mycoprotéines produites et récupérées. Par rapport à ce qui a été décrit précédemment, il s'agit d'augmenter les volumes de production. Il était possible

- soit de multiplier les appareils (plusieurs fermenteurs de 1300 l.)
- soit d'augmenter la taille de l'appareillage.

En fait, la solution retenue pour le fermenteur a été d'augmenter sa taille ("scale-up"), alors que nous verrons que pour l'appareillage de récupération, c'est la multiplication qui sera retenue.

4.2.2.6.1. Le "scale-up" du fermenteur

Pour augmenter la production, il fallait augmenter le volume du fermenteur.

L'augmentation de taille des fermenteurs, comme de tout bioréacteur n'est pas sans revêtir un aspect paradoxal : en effet plus la taille augmente, plus les performances par unité de volume, par exemple, la productivité volumique (g de produit / litre de bioréacteur et par heure) diminue.

Pourquoi alors mettre en œuvre une telle solution ?

La raison de poursuivre dans cette voie est liée aux très importantes économies de main d'œuvre réalisées à grande échelle... Celles-ci compensent largement les pertes précédemment citées. De plus, une discipline technologique générale nouvelle, le génie des procédés, cherche, avec succès, des solutions techniques pour minimiser cette baisse de performances. Le génie des procédés se décline, selon le type de procédé étudié, sous le vocable de génie biochimique, génie fermentaire ou génie biologique. Globalement, cet argument de la perte de performance ne tient donc pas

Quelles sont les origines de cette baisse de performance à grande échelle ? Ou encore, sur quoi faut-il faire porter ses efforts pour éviter cette baisse de performance ?

Pour un bioréacteur agité, elles sont de deux ordres :

1. Plus le volume augmente, moins l'hypothèse d'homogénéité des concentrations dans le bioréacteur est vérifiée : le catalyseur n'est pas partout au contact de la même concentration de réactants. Cette concentration est inférieure pour les substrats (d'où une diminution de vitesse de réaction) et supérieure pour les produits (d'où risque d'une inhibition).

2. La concentration des réactants réellement au contact du catalyseur (défini comme le micro-environnement) est différente de celle qui est accessible à la mesure (défini comme le macro-environnement) : là encore, elle est inférieure pour les substrats et supérieure pour les produits. Là encore, si on modélise en considérant les concentrations dans le macro-environnement, on croit observer une diminution d'activité ; ces effets sont liés à deux phénomènes physiques : le partage et la diffusion. En effet, avec l'augmentation de volume, la diffusion des réactants aux interfaces peut être le facteur limitant du procédé ; ceci a été particulièrement étudié dans le cas de l'aération des fermenteurs où la possibilité de fournir les quantités d'oxygène nécessaires (satisfaire la demande en oxygène) a été reconnue dès le début des cultures submergées comme susceptible d'être limitante.

Un des aspects importants du "scale up" est donc celui de la fourniture de l'oxygène. L'oxygène est un gaz peu soluble³, et la demande en oxygène augmente lorsque la concentration en biomasse augmente. Or le but d'une production industrielle est justement d'obtenir une grande concentration finale. De plus *Fusarium graminearum* est un champignon filamenteux : sa croissance augmente la viscosité du milieu dans lequel il se développe et diminue la capacité de transfert de l'oxygène.

Un moyen d'augmenter la quantité d'oxygène dissous est d'augmenter la pression d'introduction de l'air. Il n'est cependant pas possible d'augmenter indéfiniment cette pression.

À pression constante, un des moyens d'augmenter le transfert d'oxygène est d'augmenter l'agitation qui fractionne les bulles. Avec l'augmentation de volume prévue, l'agitation mécanique tellement importante à fournir pour assurer un transfert d'oxygène satisfaisant ne saurait convenir du fait d'un coût exorbitant et surtout des forces de cisaillement ainsi créées qui endommageraient le mycélium.

Ainsi, il fut fait appel à un autre type de technologie de fermenteur continu : le fermenteur *air lift*.

4.2.2.6.2. Le fermenteur air lift

Un fermenteur air-lift est un fermenteur sous pression sans mobile d'agitation, qui utilise la montée des bulles d'air pour mélanger la culture et pour réaliser le transfert de chaleur et de matière. Ce type d'agitation de la culture conduit à une formation moindre de chaleur (et ainsi moins de refroidissement est nécessaire) que dans un fermenteur agité.

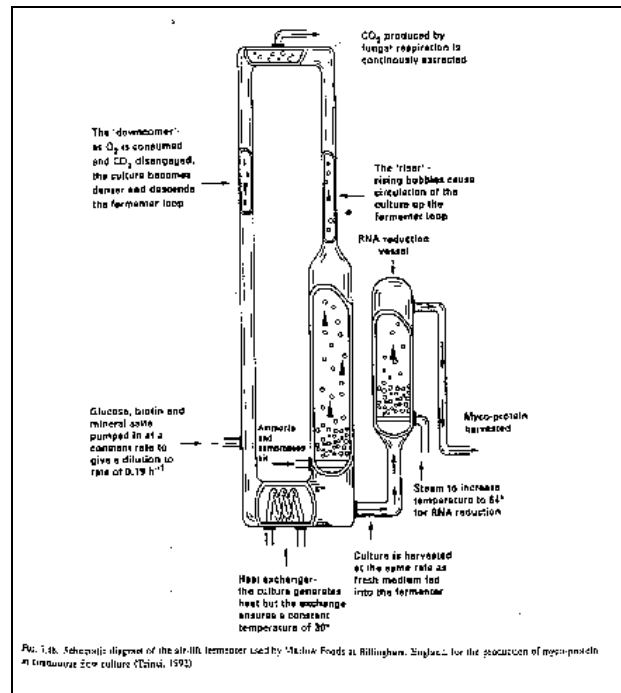
La nouvelle société put utiliser un fermenteur air lift de 40 m³ situé à *Billingham*, fermenteur qui avait été construit précédemment par ICI comme pilote pour le développement de leur projet Pruteen

Le fermenteur air lift de **Billingham** est une boucle allongée de 30 m de haut dans laquelle la culture circule continuellement. L'air est insufflé en bas et c'est lui qui cause le mouvement de la biomasse.

La solution nutritive est introduite dans la culture à un taux de dilution de 0,17 à 0,20 h⁻¹, bien en dessous du μ_{\max} (0,28 h⁻¹).

La fourniture d'ammoniac pour la croissance est assurée en même temps que l'air stérile comprimé ; la vitesse d'introduction d'ammoniac dans la culture est régulée par un dispositif de surveillance permettant de maintenir le pH à 6,0. La culture est maintenue à 30°C par un dispositif d'échange de chaleur situé dans la partie descendante et est recueillie en continu.

³ l'oxygène a une très faible solubilité dans l'eau (7 mg / L) à 30 °C) mais la production d'un gramme de *Fusarium graminearum* nécessite l'apport de 0,78 g de O₂ !



Les forces de cisaillement auxquelles est soumis le mycelium dans des réacteurs agités mécaniquement (méthode du RHM) et air lift (Marlow Foods) diffèrent sensiblement, mais la morphologie et la croissance de *Fusarium graminearum* dans les deux types de fermenteurs sont similaires. Les mutants morphologiques vont survenir dans les types de systèmes approximativement au même moment après inoculation.

Le dispositif permettant l'élimination de l'ARN est couplé au fermenteur.

4.2.3. Troisième étape technique : la réduction du taux d'ARN

La présence d'ARN donne à la biomasse un goût désagréable. Il importe donc de les éliminer. Cette élimination se réalise en conditions stériles. Que ce soit à l'échelle pilote ou à l'échelle production, elle utilise les propriétés de l'ARNase cellulaire.

4.2.3.1. Le principe

En 1970, il fut mis en évidence qu'un choc thermique appliqué aux cellules aboutit à une série complexe de réponses biochimiques par la cellule, à savoir :

- une inactivation des protéases cellulaires,
- la décomposition des ribosomes aboutissant à la libération des ARN,
- l'inactivation d'un inhibiteur thermo-sensible de l'ARNase.

Ce traitement cause également une perte de la viabilité cellulaire. Dans la mesure où les ARNases sont thermo-résistantes, ce processus aboutit à permettre la désinhibition des ARNases pour dégrader les ARN en nucléotides et nucléosides qui diffusent à travers à travers la paroi cellulaire.

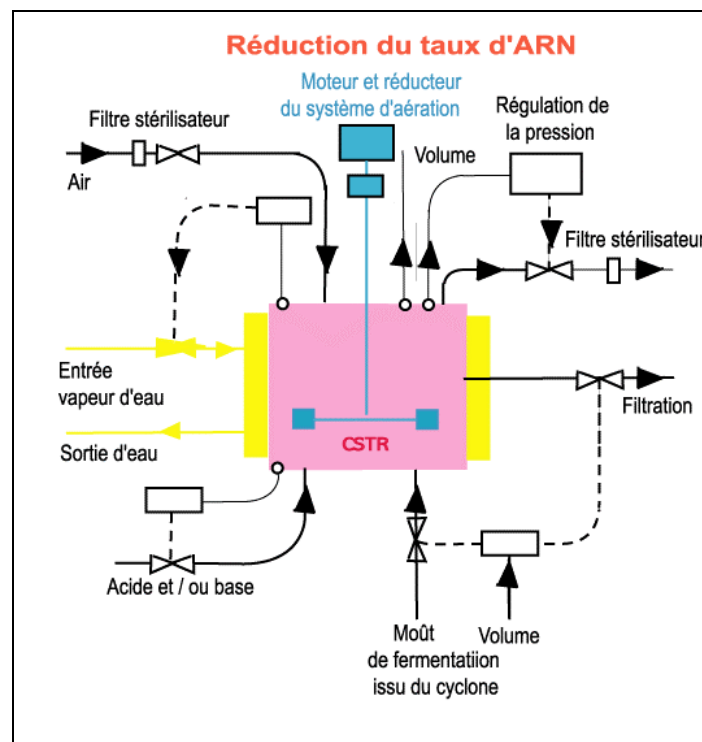
Les conditions de chauffage sont critiques : d'un côté il faut que la température de chauffage soit suffisamment haute pour que les protéases soient dénaturées et de l'autre il faut

empêcher la dénaturation des RNAses. Durant ce processus, le pH initial du fermenteur (6,0) est optimal et ne varie pas significativement en raison du pouvoir tampon du milieu. Ce pH est enregistré mais non contrôlé.

4.2.3.2. Le développement du procédé de réduction d'ARN

Durant ce processus, les composés de faibles poids moléculaire tels les acides aminés et les intermédiaires du cycle de Krebs diffusent également hors de la cellule si bien qu'approximativement 35 % du poids sec initial est perdu. A cause de cela, et parce qu'il y a peu d'hydrolyse de protéines, le pourcentage de protéines est alors augmenté par le processus de réduction d'ARN.

Le procédé mis au point résulte d'une modification d'un procédé original en plusieurs étapes : il est réduit à une seule étape prenant 20 - 30 minutes pour être complet. Le procédé a été breveté en 1976 et permet de réduire chez A3/5 le contenu d'approximativement 10% à environ 1% (les deux chiffres sur une base de poids sec) par un simple procédé d'élévation de la température ne nécessitant donc pas l'ajout d'aucun additif chimique.



La culture et le milieu issus du séparateur cyclone passent, dans des conditions aseptiques, dans une cuve agitée dans laquelle la réduction du taux d'ARN a lieu.

Les essais au laboratoire ont été effectués avec un réacteur tubulaire, mais un réacteur agité a été préféré pour ses capacités de "scale up" et pour la facilité de nettoyage.

Les conditions opératoires sont dérivées de celles d'expériences de laboratoire. Il fut trouvé que la température optimum du procédé est de 64°C, à savoir suffisamment élevée pour dénaturer toutes les protéases cellulaires, mais pas assez élevée pour dénaturer les

ribonucléases endogènes. Un temps de résidence moyen⁴ d'environ trente minutes, dans un réacteur agité ou dans un réacteur tubulaire, est optimal.

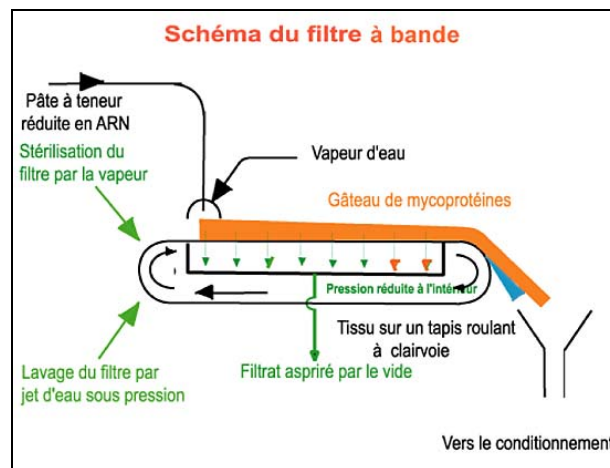
Dans la mesure où il s'agit d'un procédé aseptique, les règles appliquées au fermenteur en ce qui concerne la stérilisation et la maintenance préventive s'appliquent également ici.

Des mesures on line⁵ de pH, température, pression et volume sont effectuées automatiquement, dix fois par heure. Des échantillons sont prélevés pour des mesures off line⁶ au moins une fois par jour et des analyses sont effectuées (pH, contamination, par exemple) sur la suspension, le solide.

4.2.4. Récupération des mycoprotéines

La pâte issue de l'étape de réduction de l'ARN comprend le mycélium de teneur réduite en ARN, les produits solubles issus de la réduction en ARN et le milieu de culture utilisé. L'étape de récupération vise à éliminer de la pâte appauvrie en ARN les liqueurs de réduction d'ARN. Ce qui est récupéré (mycélium de teneur réduite en ARN) est dénommé mycoprotéine et est ensuite utilisable pour la formulation alimentaire.

L'étape de récupération peut être réalisée grâce à un filtre à bande.



Le *filtre à bande* comprend un tissu sur un tapis roulant qui est situé au dessus d'une chambre à pression légèrement réduite : la partie solide de la pâte (champignon) reste collée sur le tissu filtrant sous forme de ce qui est appelé "gâteau". Cette couche continue est ensuite détachée du tambour grâce à un couteau. Pour maintenir les standards d'hygiène, le tissu du filtre est lavé à l'eau et séché à chaque révolution.

Le "gâteau" issu du filtre est analysé à l'issue de chaque période de 8 heures de production en terme de comptage de micro-organismes totaux viables . Ces dispositions sont

⁴ Le temps de résidence est l'inverse du taux de dilution ($D = Q / V$); à savoir V / Q ; il s'agit du temps (théorique) passé par le liquide dans le bioréacteur. Le temps de résidence moyen est un paramètre expérimental exprimant le temps de séjour réel du liquide. Il est déterminé expérimentalement à partir de la distribution des temps de séjour.

⁵ mesures effectuées directement sur le fermenteur, sans prélèvement, grâce à des capteurs (essentiellement des électrodes)

⁶ mesures effectuées sur des prélèvements

valables tant pour le développement que pour la production. En production, cependant, plusieurs filtres tambour peuvent être utilisés en parallèle.

Le "gâteau" passe ensuite par une étape de mise en forme de commercialisation.

4.2.5. Conditionnement et conservation

Le gâteau humide de Quorn® mycoprotéin doit être traité comme tout autre aliment périssable. Ceci est dû à son grand degré d'humidité et à sa grande valeur nutritive pour les micro-organismes contaminants. Il a été montré que le Quorn® mycoprotéines humide peut être gardé jusqu'à 16 h dans des récipients non fermés hermétiquement à 25°C, 48 h à 4°C et plus d'un an si fermés hermétiquement et à - 25°C. Après déshydratation, cependant, le produit est assez stable pour être stocké plusieurs années, à température ordinaire. Il peut alors encore être consommé.

4.3. Composition chimique et aspects nutritionnels

Outre de définir les conditions optimales de culture en grand volume, un des objectifs de la phase de développement a été de produire les quantités de mycoprotéines nécessaires aux diverses analyses chimiques, nutritionnelles, toxicologiques. L'ensemble des résultats obtenus aura permis l'établissement du dossier d'autorisation de mise sur le marché.

Parmi les analyses effectuées, figurent les aspects chimiques et nutritionnels.

Le Quorn® est un aliment basses calories (80 kcal / 100 g), sans acides gras d'origine animale, sans cholestérol, à faible teneur en acides gras saturé et riche en fibres diététiques. Le contenu en protéines est comparable à celui du lait et du fromage.

Pour 100 g	Quorn®	Poulet sans peau	Bœuf émincé	Pomme de terre (baked)	(Mince) végétarien
Energie (kJ)	335	621	955	581	1441
Energie (kcal)	85	148	229	136	345
Protéines (g)	12,3	24,8	23,1	3,9	32,6
Glucides (g)	1,8	0	0	31,7	15,5
Lipides (g)	3,2	5,4	15,2	0,2	16,9
Fibres (g)	4,8	0	0	2,7	3,8

Information nutritionnelle

4.4. Les aspects commerciaux

4.4.1. L'accueil réservé au Quorn®

Au moment où la vente au public fut autorisée, la pénurie annoncée en protéines à la fin des années 70 ne s'est pas produite. L'objectif de Lord Rank n'était donc pas atteint. Pourtant, dans les pays de l'Ouest, la mycoprotéine Quorn® satisfaisait les besoins des années 1990, c'est-à-dire qu'elle fournit des aliments basses calories (80 kcal / 100 g) sans acides gras d'origine animale et sans cholestérol et faible en acides gras saturé et riche en fibres diététiques.

La publicité de Quorn® est ciblée sur les femmes âgées de 25-45 ans qui souhaitent réduire leurs apports de viande dans leur alimentation. On peut penser que les jeunes qui consomment de moins en moins de viande sont ou seront des consommateurs potentiels.

Vu le succès rencontré en Angleterre, Le Quorn® est également commercialisé dans d'autres pays : Pays-Bas, Belgique, Allemagne, Suisse, USA... et même France depuis le 4 septembre 2001.

4.4.2. Les formes commerciales du Quorn®

Le premier produit à base de mycoprotéines Quorn® fut une tarte vendue par Sainsbury en janvier 1985. Pour susciter l'intérêt du consommateur, il valait mieux, en effet, présenter Le Quorn® sous forme d'un mets traditionnel plutôt que sous une forme inconnue. Dans cette logique, diverses préparations ont été développées⁷ sous forme de plats tout prêts, ceci incluant des entrées, des ragoûts ("casseroles"), des desserts et des salades. Cette possibilité de diversification est liée aux importantes capacités d'absorption et de restitution de saveurs que possèdent les mycoprotéines Quorn® : ainsi peut-on préparer du Quorn® "aromatisé" au goût d'herbe, d'épices, de viande. Toutefois aucun additif correspondant au goût de poisson n'est disponible.

Ainsi, bien que le temps ait été long pour arriver à sa mise sur le marché (1963-1985), Quorn® est le seul "survivant" des programmes de POU initiés après 1960 et peut être regardé comme une "success story".

4.5. Bibliographie concernant le Quorn®

Angold Roger, Beech Gordon, Taggart, Food Biotechnology, Cambridge studies in Biotechnology 7, Cambridge University Press, 1988, chapters 5 and 6

Trinci Antony P. J., 1992, Myc. Res. 96 (1), 1 - 13, Myco-protein : A twenty-year overnight success story

Trinci Antony P. J., 1994, Microbioloy, 140, 2181 - 2188, Evolution of the Quorn myco-protein fungus : *Fusarium graminearum* A3/5

Information disponible (concerne plutôt l'aspect diététique) auprès de :

The Quorn Education Service
PO Box 361
Stockton on Tees
TS23 4YE - UK

⁷ En 1989, il y a 35 produits contenant des mycoprotéines offerts au consommateur pour un chiffre d'affaire annuel de 1,2 M GBP.