

Le méthanol et l'éthanol, matières premières pour la fabrication de protéines*

par Gérard Goma,
(Laboratoire de génie biochimique, Institut National
des Sciences Appliquées, Avenue de Rangueil, 31077
Toulouse cedex)



Devant la pénurie mondiale de protéines alimentaires traditionnelles et les difficultés d'approvisionnement qui en résultent, des technologies doivent être développées pour produire de nouvelles sources de protéines utilisables tant en alimentation humaine qu'animale.

Les productions de protéines d'organismes unicellulaires (P.O.U.) entrent dans le cadre des actions pouvant conduire à combattre les carences protéiques et, plus modestement, au

niveau national doivent pouvoir alléger la charge de notre balance commerciale et la dépendance vis-à-vis du soja américain. Les P.O.U. offrent des possibilités très grandes. Il s'agit de faire croître des micro-organismes à partir de sources d'azote simples (nitrate, urée, ammoniac, etc.), de source de phosphate et d'autres sels minéraux et de matières organiques capables d'assurer leurs besoins carbonés et énergétiques de croissance. Les micro-organismes peuvent être des bactéries, des levures, des champignons filamenteux, des algues. Le choix de l'organisme ira dans le sens de l'obtention de la meilleure valeur nutritionnelle possible en relation avec des coûts de production minimaux et compatibles avec le prix des protéines traditionnelles. Dans cette industrie plus que dans toute autre, le facteur économique est primordial car c'est un difficile défi que de devoir concurrencer le soja à son prix actuel. Il faut donc choisir à la fois des micro-organismes, des substrats et des technologies permettant une consommation minimale d'énergie pour une production maximale.

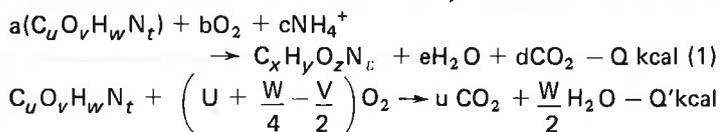
L'importance du choix du substrat carboné est très grande. Pour une production de P.O.U. donnée, il conditionne les différences de coût des matières premières, les exigences stœchiométriques (demande d'oxygène, azote, frigories) qui fixent les coûts de production et les nécessités de purification ultérieure des produits obtenus (par exemple : élimination des hydrocarbures résiduels).

Dans la suite de cet exposé nous allons montrer l'intérêt de l'utilisation d'alcools dans la production de P.O.U. et rappeler les travaux réalisés sur le sujet.

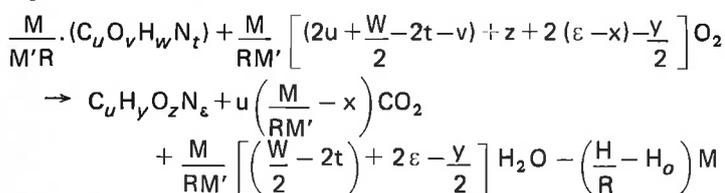
**Communication présentée à la Journée d'étude "Méthanol et éthanol, produits d'hier et de demain", organisée par la Société des Ingénieurs Civils de France, en liaison avec la Société des Ingénieurs de l'Automobile, l'Association Française des Ingénieurs et Techniciens du Pétrole et la Société de Chimie Industrielle. Paris, 24 novembre 1977.*

I. Équations stœchiométriques décrivant la production de P.O.U.; contraintes et technologies en résultant.

La production d'organismes unicellulaires s'effectue à partir de l'assimilation de substrats de masse molaire moyenne M' de formule brute $C_uO_vH_wN_t$. Ce substrat sert à l'élaboration de la biomasse et au maintien en vie des cellules proliférantes. La réaction globale est résumée par les deux équations stœchiométriques suivantes (on considère que la biomasse a une masse moléculaire M et une formule brute $C_xH_yO_zN_e$).



Si l'on considère le taux de conversion R , l'enthalpie de combustion du substrat H , l'enthalpie de combustion du microorganisme H_o , l'équation (1) s'écrit :



Les divers coefficients stœchiométriques varient de manière inversement proportionnelle au taux de conversion R . Ce terme est relié aux taux de croissance μ ou, en chemostat monoétagé, au taux de dilution D par la relation :

$$R = \frac{\mu Y}{\mu + mY} = \frac{DY}{D + mY}$$

Y étant le taux de conversion limite et m le coefficient de maintenance. On observera que les exigences métaboliques diminuent avec le taux de croissance, alors que le taux de conversion augmente. Il faudra donc, pour une productivité donnée μX , faire en sorte que celle-ci soit atteinte, plutôt par un taux de croissance élevé que par une concentration en biomasse forte, mais cette stratégie entraîne une plus grande concentration en acides nucléiques.

Les réacteurs permettant la production d'organismes unicellulaires devront assurer la mise en œuvre de ces réactions dans des conditions optimales de température et de concentration en réactifs et produits au moyen de techniques simples, peu consommatrices en énergie et en investissement.

Les techniques utilisées doivent répondre aux quatre impératifs suivants :

- Satisfaction des exigences stœchiométriques de la productivité des réacteurs sur le plan :
 - de la dissolution de l'oxygène aux coûts minimaux,
 - de l'élimination de la chaleur,
 - de l'élimination du gaz carbonique par une ventilation suffisante.
- Simplification des techniques de séparation des cellules.
- Optimisation de la mise en œuvre des réactions continues (génie de la réaction biologique) sur des critères physiologiques et hydrodynamiques.
- Activation de la croissance.

II. Choix du substrat : intérêt du méthanol et de l'éthanol.

Excepté pour la production d'algues, traditionnellement tous les substrats utilisés en production de P.O.U. étaient des oses ou des polysides. Depuis les années 1960, avec ce qu'il a été convenu d'appeler les "protéines de pétrole", d'autres sources carbonées ont été proposées. Le tableau I résume l'ensemble des substrats potentiels et leurs avantages ou inconvénients respectifs.

II. 1. Arguments en faveur du méthanol et de l'éthanol.

Les substrats tels que l'éthanol et le méthanol sont particulièrement intéressants car ils offrent un excellent compromis entre les avantages des substrats glucidiques (substrats solubles, oxygénés, non contaminés par des substances chimiques) et hydrocarbonés (culture axénique aisée, rendements en biomasse plus élevés). Les arguments en faveur de leur utilisation comme substrat de P.O.U. sont résumés dans le tableau II.

L'adoption du méthanol comme substrat évite les difficultés techniques inhérentes à l'utilisation directe du méthane. Le

Tableau I. Substrats de P.O.U.

Matière première	Disponibilité	Prétraitement	Taux de conversion kg P.O.U./kg substrat	Utilisation concurrentielle
<u>Oses</u>				
<ul style="list-style-type: none"> Mélasses Lactosérum Liqueurs sulfiteuses 	grande, mais saison. grande, mais saison. grande, mais saison.	simple simple simple	0,25 - 0,30 0,03 0,008	alimentation animale
<u>Polysides</u>				
<ul style="list-style-type: none"> Amidon Dérivés ligno-cellulosiques 	grande, mais saison. très grande	hydrolyse élaboré	0,50 - 0,60 0,10 - 0,30	alimentation énergie-aliment. animale
<u>Hydrocarbures</u>				
<ul style="list-style-type: none"> CH₄ n-paraffines 	grande mais localisée grande	non non	0,25 - 1,40 1	énergie - produit chimique énergie - produit chimique
<u>Acides organiques</u>				
<ul style="list-style-type: none"> Acétate 	limitée actuellement	non	0,35	produit chimique
<u>Alcools</u>				
<ul style="list-style-type: none"> Méthanol Éthanol Propanol 	grande grande limitée	non non non	0,25 - 0,50 0,60 - 0,70 0,40	énergie - produit chimique énergie - produit chimique énergie - produit chimique

Tableau II. Arguments en faveur du méthanol et de l'éthanol comme substrat de P.O.U.

Arguments favorables	Arguments défavorables
Solubles dans l'eau Non dangereux, stockage facile Disponibilités à de très grandes quantités Prix compatibles avec P.O.U. (CH ₃ OH) Pureté Stœchiométrie plus avantageuse que pour les hydrocarbures Faible constante de Monod, faible concentration résiduelle Possibilité de cultures non stériles	Coût de l'éthanol dans certains pays Caractère inhibiteur Volatilité Ces deux derniers arguments sont moins sensibles en culture continue

développement de nouvelles technologies de production du méthanol a contribué à l'essor des recherches microbiologiques sur l'assimilation des composés carbonés à un seul atome de carbone (cf : Symposium on microbial growth on C₁ compounds).

L'éthanol est l'un des substrats les plus attrayants pour la production des P.O.U.; en effet sa volatilité, son caractère inhibiteur sont moins marqués que pour le méthanol alors que sa stœchiométrie est nettement plus favorable (0,6 kg/kg d'éthanol). A l'heure actuelle les potentialités d'utilisation énergétiques accentuent l'intérêt que l'on doit porter à ce produit. Il faut toujours se souvenir que toute matière première qui peut fournir du glucose est un substrat potentiel pour produire à la fois des protéines et de l'éthanol. Dans ce dernier cas le rendement global est le produit des rendements de deux réactions consécutives soit 0,3. A notre avis et compte tenu de l'expérience acquise au laboratoire, une solution élégante consisterait à produire simultanément P.O.U. et éthanol puisque c'est lorsque le taux de croissance des levures est le plus élevé que la production d'éthanol par les levures est maximale : Strehaiano et al. (1978).

II. 2. Données stœchiométriques

Sans attacher une valeur absolue aux équations stœchiométriques, rappelons celle relative à la croissance de bactéries sur méthanol.

$$1,72 \text{ CH}_3\text{OH} + 0,23 \text{ NH}_3 + 1,51 \text{ O}_2 \rightarrow (\text{CH}_{1,68}\text{O}_{0,36}\text{N}_{0,23}) + 0,72 \text{ CO}_2 + 2,94 \text{ H}_2\text{O} - 185 \text{ 000 cal}$$

Afin de comparer les demandes en oxygène et en frigories des cultures sur méthanol et éthanol nous indiquons sur le tableau III les divers rendements et exigences en prenant pour hypothèse que la productivité est de 3,5 gl⁻¹h⁻¹) et pour diverses sources carbonées. En dehors de substrats conventionnels tels que le glucose (dont l'utilisation en production de P.O.U. est à l'heure

Tableau III. Production de P.O.U. à partir de divers substrats carbonés : comparaison des rendements par rapport au substrat et à l'oxygène et des demandes en oxygène et en capacité de réfrigération si l'on suppose la productivité de biomasse égale à 3,5 gl⁻¹h⁻¹. Δ d'après C.L. Cooney, Engineering considerations in the production of single cell protein from methanol, in "Microbial growth on C₁ compounds", 1975, 183-187, éd. The Society of Fermentation Technology, Japon.

Source carbonnée	Rendement substrat g cell./g substrat	Rendement oxygène g cell./g O ₂	Demande en oxygène moles/l.h (productivité 3,5 gl ⁻¹ h ⁻¹)	Production de chaleur kcal/l.h
Glucose Δ	0,5	1,3	84	10
n-alcane Δ	1,0	0,47	232	28
Méthane Δ	0,62	0,20	549	66
Méthanol Δ	0,5	0,6	182	22
Éthanol Δ	0,75	0,7	156	19
Acétate	0,36	0,70		
Maléate	0,34	1,02		

actuelle impensable) l'éthanol, puis le méthanol sont des substrats intéressants, les possibilités de cultures non stériles rendent leur utilisation encore plus compétitive.

S'il n'existe que peu de données stœchiométriques sur la production de P.O.U. sur éthanol : Laskin (1977), de nombreuses relations ont été proposées sur méthanol : Cooney (1975). Ces données sont résumées sur les tableaux IV et V.

Tableau IV. Relations entre le taux de conversion de méthanol en biomasse R et la demande en oxygène.

$$R_{\text{O}_2} \frac{\text{g O}_2}{\text{g cell.}} = \frac{1,5}{R} - 1,33$$

levures

$$R_{\text{O}_2} \frac{\text{g O}_2}{\text{g cell.}} = \frac{1,5}{R} - 1,6$$

bactéries

Tableau V. Évaluation de la production de chaleur en production de P.O.U. à partir de CH₃OH.

Chaleur de réaction

$$H^R \frac{\text{k. cal}}{\text{l.h}} = 0,12 \cdot Q_{\text{O}_2} \frac{\text{m. mole O}_2}{\text{l.h}}$$

$$H^R = 0,12 \cdot R_{\text{O}_2} \cdot P \frac{\text{g.cell}}{\text{l.h}}$$

Chaleur métabolique par gramme de cellules formées

$$\frac{\text{k. cal}}{\text{g. cell}} = \frac{5,6}{R} - 4,99$$

levure

$$\frac{\text{k. cal}}{\text{g. cell}} = \frac{5,6}{R} - 6,0$$

bactéries

II. 3. Conditions de culture. Micro-organismes utilisés.

a. Méthanol

L'essentiel des efforts de recherche ont portés sur le méthanol. Plusieurs firmes étrangères et françaises, notamment I.C.I. en Grande-Bretagne et Mitsubishi Gas Co. au Japon, l'Institut Français du Pétrole, Pechiney-Ugine-Kuhlmann ont activement exploré ces possibilités et mis au point des procédés dont certains sont en voie d'industrialisation (I.C.I.). Une mise au point sur la microbiologie des organismes utilisant le méthanol a été récemment publiée [actes du Symposium "On microbial growth on C₁" (1975)].

Tableau VI. Caractéristiques cinétiques de quelques micro-organismes se développant sur méthanol.

Micro-organisme	tg (h)	θ_{opt} °C	R_{max} g.cell/gCH ₃ OH
Culture mixte thermophile	3	56	0,42
<i>Pseudomonas methanica</i>	3,5	30	0,40
<i>Pseudomonas AM₁</i> (I.C.I.)	6,9	30	0,45
<i>Kloeckera</i> 22 01	9	30	0,29
<i>Torulopsis glabrata</i>	8	30	0,45
<i>Candida boidinii</i>		38	0,29
<i>Hansenula polymorpha</i>	3	37-42	0,37

Le tableau VI rassemble quelques-unes des caractéristiques des diverses bactéries et levures explorées. L'importance du taux de conversion au niveau de l'économie du procédé est prouvée par la figure 1 montrant le coût relatif des P.O.U. en fonction du rendement. Des populations méthylophiles thermophiles ont été isolées et étudiées. D'après certains auteurs une production de vitamine B 12 accompagnerait la croissance microbienne.

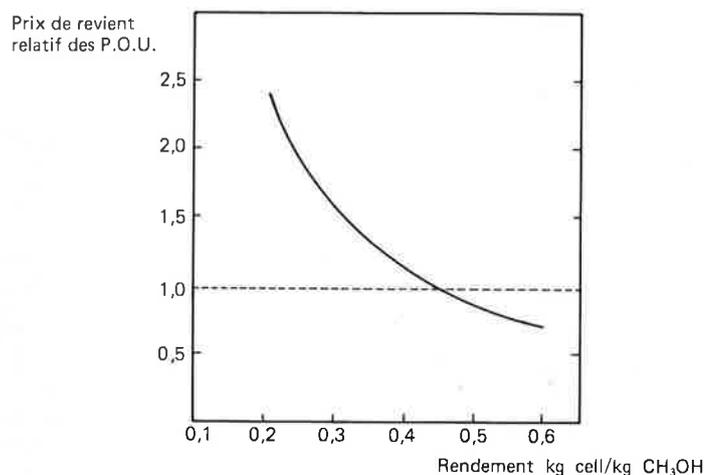


Figure 1. Effet du taux de conversion du méthanol en biomasse sur le coût relatif de la production de P.O.U.

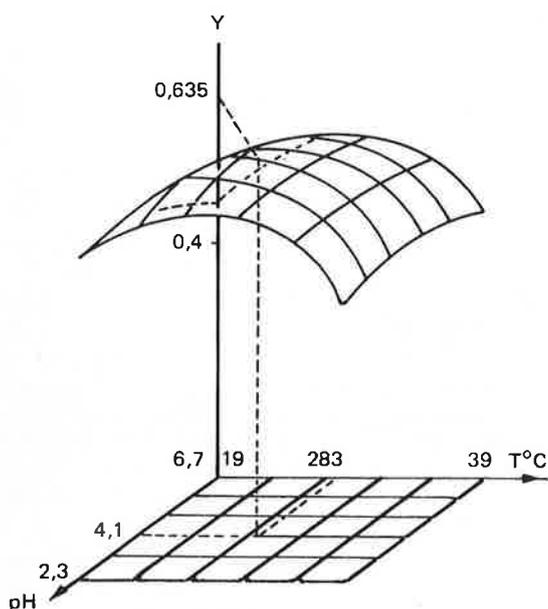


Figure 2. Influence de la température et du pH sur le taux de conversion de l'éthanol en biomasse (d'après V. K. Eroshin, I.S. Utking, Yeast growth on low alcohols, 1976, p. 206, in "Fifth International fermentation symposium", Berlin 1976, éd. Dellweg).

b. L'éthanol

Ce sont essentiellement les levures qui sont utilisées dans ce cas. Une étude très intéressante de la croissance de *Saccharomyces cerevisiae* sur éthanol montre que le rendement optimal $R = 0,635$ est atteint à pH 4,1 et $\theta = 28,3$ (figure 2) : Eroshin et Utking (1976). Ces résultats concordent avec ceux de Machek et al. (1976) relatant la croissance de *Candida utilis*; ils trouvent un optimum à pH 4,0 et $\theta = 32$ °C. Ces derniers auteurs ne préconisent pas une culture en chemostat mais en "Nutristat" dans lequel l'apport de source carbonée est effectué en quantité suffisante et optimale. Le procédé Standard Oil utiliserait une levure du type *Candida utilis* tandis que Mitsubishi aurait développé une levure du type *Candida ethanophilum*.

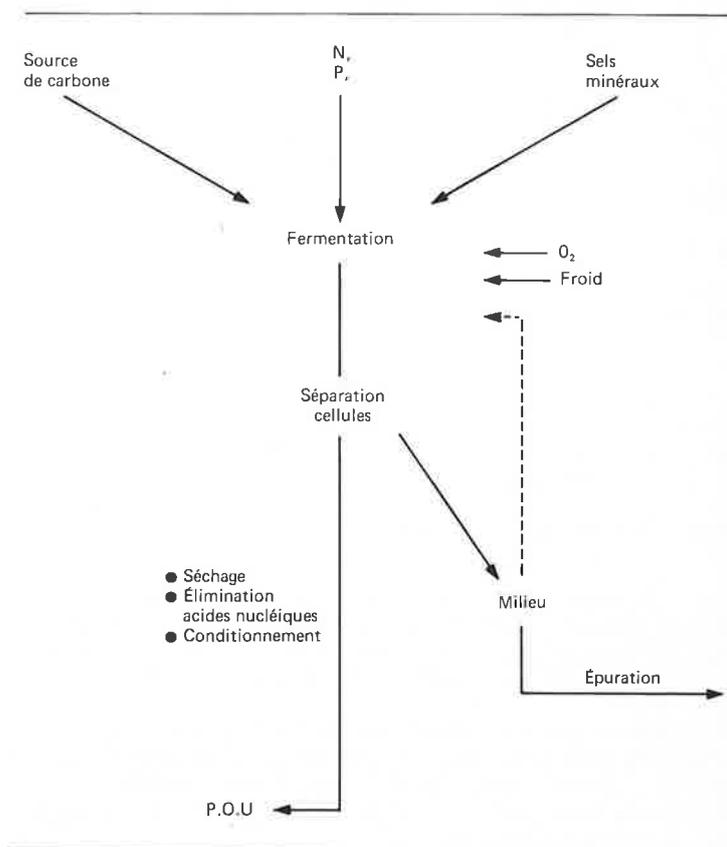
Abbott (1973) a isolé une bactérie, *Acinetobacter calcoaceticus* potentiellement utilisable. Le taux de croissance maximal est $0,7 \text{ h}^{-1}$ (pH 7,0, $\theta : 35$ °C), la concentration en éthanol pouvant atteindre 1,5 %.

III. Aspect technologique

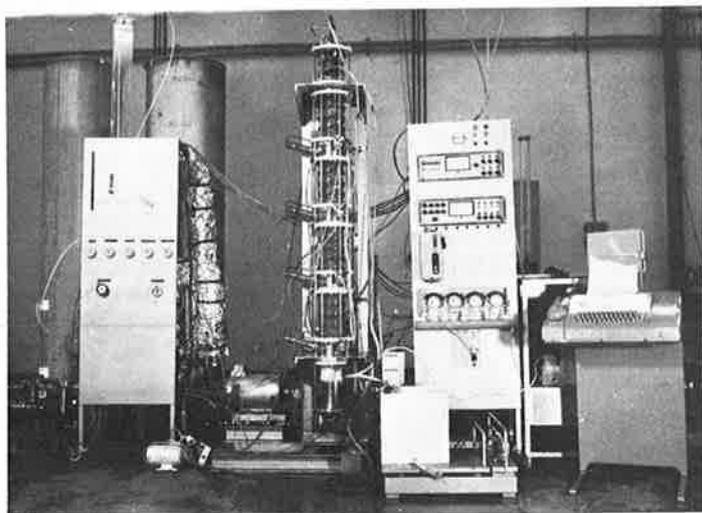
Sur le plan technologique, la méthode de production de P.O.U. reste classique. Toutefois, la pureté des substrats permet d'envisager des utilisations spécifiques de protéines et les procédés peuvent comporter une phase d'extraction des protéines des micro-organismes.

Le tableau VII représente les étapes nécessaires à la production de P.O.U. :

Tableau VII. Étapes technologiques de production de P.O.U.



● l'étape de fermentation discutée par Moo Young peut s'effectuer : en colonne à bulle, en cuve brassée par des dispositifs mécaniques, en fermenteur gazosiphon (type Lefrançois), I.C.I. a développé une technologie spéciale (figure 3) testée au stade pilote (production 1 000 tonnes/an) ; elle combine le principe des fermenteurs gazosiphon et des fermenteurs à boucle.



Pilote de production de protéines d'organismes unicellulaires.

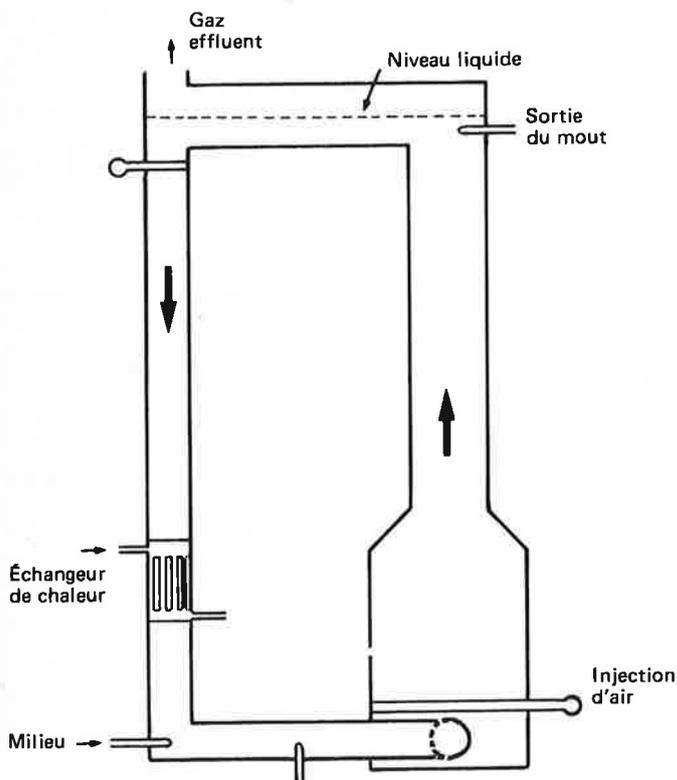


Figure 3. Fermenteur à boucle I.C.I.

Pour notre part, nous avons montré (Goma G. et Serieys M. 1976) que l'utilisation de fermenteurs tubulaires pulsés (figure 4) entraîne des productivités plus élevées qu'en chemostat classique, à des coûts énergétiques d'agitation aération plus faibles.

- l'étape de séparation et séchage des cellules dépend du micro-organisme cultivé. Cet aspect a été étudié en particulier par Labusa (1975). Les techniques les plus couramment utilisées sont la floculation, la centrifugation et la filtration suivie de séchage par l'air chaud ou par atomisation.

- l'étape de séparation des protéines, ou d'élimination des acides nucléiques s'effectue suivant des techniques décrites par exemple par Sinskey et Tannenbaum (1975) et Dunnill et Lilly (1975).

Le procédé "Heat Shock" semble le plus intéressant; il comprend un choc thermique des cellules: dès leur sortie du chemostat de la température de croissance à 68 °C, puis une phase d'autolyse

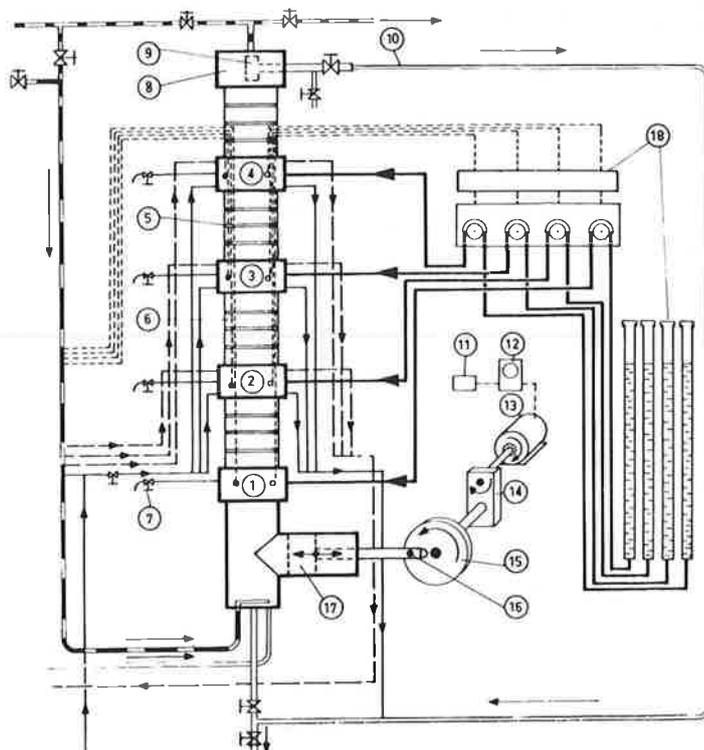


Figure 4. Fermenteur tubulaire pulsé. 1 à 9 : éléments constitutifs du réacteur tubulaire, 10 : recyclage éventuel, 11 à 17 : système de pulsation du liquide, 18 : régulation de pH.

à 52,5 °C, suivie d'une floculation des protéines à 0 °C. Les techniques de broyage mécanique sont consommatrices d'énergie. Cette aspect a été discuté par Loyland et al. (1976).

De nombreuses sociétés travaillent et mettent au point des procédés de production de P.O.U. à partir soit de méthanol, soit d'éthanol. Nous avons résumé, sur les tableaux VIII et IX les noms de ces sociétés, le pays dans lequel s'effectuent ces recherches.

Tableau VIII. Principaux travaux réalisés par des sociétés privées en production de P.O.U. à partir d'éthanol.

Pays	Société	Remarques
États-Unis	Amao	Levure <i>Torula</i> Projet d'usine 7500 tonnes/an, Hutchinson (Minnesota)
Japon	Mitsubishi Petro Chemical Co. Mitsui Kanegafuchi Sanraku-Ocean	Levure <i>Candida ethanophilum</i> ; pilote 100 tonnes/an
Espagne	Instituto de fermentaciones industriales	Levure <i>Hansenula anomala</i> pilote 100 kg j ⁻¹ ; accords avec Schick Chemie Technik GmbH (Cologne, Allemagne Ouest) pour usine 100 000 tonnes/an
Tchécoslovaquie		pilote 1 000 tonnes/an Kojetin (Moravie); projets 50 000 tonnes/an
Suisse États-Unis	Exxon, Nestlé	Bactérie <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ; pilote

Tableau IX. Principaux travaux réalisés par des sociétés privées en production de P.O.U. à partir du méthanol.

Pays	Société	Remarques
Angleterre	I.C.I.	annoncé 1976, 75 000 tonnes/an (Billingham); en fonctionnement 1 000 tonnes/an
	Shell	actuellement localisent leurs efforts sur la production de P.O.U. à partir de méthane.
Italie	Societa Italiana Resine (S.I.R.)	pilote : <i>Candida boidinii</i>
Allemagne	Hoechst AG et Friedrich Uhde GmbH	pilote, bactéries
Norvège Suède	Nord Protein	pilote, Sundbyberg (Suède)
Israël	Yissum Research Development Co. Hebrew University Dor Chemicals	pilote
États-Unis	Phillips Petroleum Co. Tennico	pilote projet utilisant des bactéries thermophiles, actuellement abandonné
U.R.S.S.	—	
Japon	Mitsubishi gas chemical	pilote
France	Groupe Français des Protéines (ELF, IFP)	procédé utilisant des bactéries ou des populations mixtes très stables.

IV. Conclusion

L'éthanol et le méthanol sont des substrats très intéressants en production de P.O.U. Le comité P.O.U. de la D.G.R.S.T. évoquant les perspectives d'avenir des P.O.U. indiquait dans le "Progrès Scientifique", numéro spécial, avril 1977, que "les substrats qui paraissent devoir être retenus en priorité sont le méthanol, les substrats amylicés, le lactosérum...". Seul, l'aspect économique peut permettre de prouver l'intérêt. Dans une étude sur la production de P.O.U. en Israël, Mateles (1975) a comparé les coûts de production lorsque les substrats sont des mélasses, des n-paraffines, du gas-oil et du méthanol. Le tableau X résume l'essentiel de ses calculs et prouve l'intérêt des cultures sur méthanol. Dans tous les cas, les protéines obtenues à partir de méthanol sont les plus économiques. La compétitivité avec le soja n'est pas actuellement prouvée, mais des considérations politiques d'économie de devises, d'indépendance nationale sont à prendre en compte pour développer les productions de P.O.U.

Nomenclature

Concentration en biomasse : X	(gl ⁻¹)
Concentration en substrat : S	(gl ⁻¹)
Taux de conversion : $R = \frac{dX}{dS}$	
Taux de conversion de l'oxygène : $R_{O_2} = \frac{dX}{dO_2}$	
Taux de croissance : $\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$	(h ⁻¹)
Taux de maintenance : m	(h ⁻¹)
Rendement limite : Y, avec $R = \frac{\mu}{\frac{\mu}{Y} + m} = f(\mu)$	
Constante de Monod : K_S	(gl ⁻¹)
Taux de dilution : $D = \frac{Q}{V}$	(h ⁻¹)
Enthalpie de combustion du substrat : H	(kcal)
Enthalpie de la réaction : H ^R	(kcal)
Masse molaire du substrat : M'	(g)
Pseudo masse molaire de la biomasse : M	(g)

Tableau X. Influence des matières premières sur les principaux coûts de production des P.O.U. d'après R.I. Mateles, Production of S.C.P. in Israël, p. 208-224, in "Single cell protein II", éd., Tannenbaum and Wang, M.I.T. Press, 1975.

	Mélasse	n-paraffine	Gas-oil	Méthanol
Investissements pour produire 10 000 tonnes/an P.O.U. livres israéliennes (1 \$ = 4,2 I.L.) x 1000	28 489,5	37 125	45 353,5	25 339
Coût annuel de production : (I.L. x 1000	25 928	20 925	17 503,8	15 585,7
Prix de la matière première I.L./t	250	655	140	280
Coût final I.L./t de produit brut	2 593	2 092	1 750	1 558
Coût des protéines pures I.L./t protéine	5 186	4 184	3 500	3 116

Bibliographie

B.J. Abbott, *J. Gen. Microbiol.*, 1973, **75**, 383-389.
 C.L. Cooney, in "Microbial growth on C₁ compounds", éd. The Society of fermentation Technology, Japon, 1975.
 P. Dunnill, M. Lilly, in "Single cell proteins II", éd. S.R. Tannenbaum, D.I.C. Wang, M.I.T. Press, 1975.
 V.K. Eroshin, I.S. Utking, in "Fifth International Fermentation Symposium", Berlin, 1976, éd. Dellweg, 1976.
 T.P. Labusa, in "Single cell proteins II", éd. S.R. Tannenbaum, D.I.C. Wang, M.I.T. Press, 1975.
 J. Loyland, J.M. Marjer, A.L. Frey, *Lebensm. Wiss. u. Technology*, 1976, **9**, 131-142.
 A. Laskin, in "Single cell proteins from renewable and non

renewable resources", *Biotechnol. Bioeng. Symposium*, 7, 1977.
 R.I. Mateles, in "Single cell proteins II", éd. S.R. Tannenbaum, D.I.C. Wang, M.I.T. Press, 1975.
 M. Moo-Young, *Can. J. Chem. Eng.*, 1975, **53**, 113-118.
Le Progrès Scientifique, 1977, avril, p. 14, éd. La Documentation Française.
 M. Serieys, G. Goma, *Biotechnol. Bioeng.*, sous presse.
 P. Streaihan, M. Moreno, G. Goma, *Compte Rendu Acad. Sci.*, D 912 (sous presse), 1977.
 A.J. Sinskey, S.R. Tannenbaum, in "Single cell proteins II", éd. S.R. Tannenbaum, D.I.C. Wang, M.I.T. Press, 1975.