

n° d'ordre: 892

Transfert d'oxygène en condition de culture microbienne intensive

Mathias FYFERLING

Ingénieur Génie des Procédés-ENSIACET, Toulouse
Master of Science Bioreactor Systems-UMIST, Manchester, RU

Thèse présentée le Jeudi 25 Octobre 2007 devant la commission d'examen pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Toulouse, délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

Spécialité : Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingenieries

Filière : Microbiologie et Biocatalyse Industrielles

Jury:

Claude-Gilles Dussap	Professeur, Université B.P. de Clermont Ferrand II	Rapporteur
Jack Legrand	Professeur, Université de Nantes	Rapporteur
Jean-Philippe Steyer	Directeur de Recherche, INRA, Université de Narbonne	Rapporteur
Michel Roustan	Professeur, INSA-Toulouse	Examineur
Carole Jouve-Molina	Maître de Conférences, INSA-Toulouse	Examineur
<u>Gérard Goma</u>	Professeur, INSA-Toulouse	Directeur de thèse

Thèse préparée au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, INSA, UMR CNRS 5504, UMR INRA 792, dans le cadre de l'Ecole Doctorale des Sciences Ecologiques Vétérinaires Agronomiques Bioingénieries.

Titre. Transfert d'oxygène en conditions de culture microbienne intensive.

Résumé. L'objectif des travaux est la quantification et la modélisation du transfert d'oxygène en condition de production microbienne afin de contribuer à l'intensification des performances des bioprocédés. Les travaux expérimentaux sont réalisés en bioréacteur, en milieux minéraux exempt de réaction biologique, puis lors de cultures fed-batch d'*Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Aspergillus niger*. Le domaine d'investigation est original de par les fortes consommations volumiques d'oxygène ($0,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et puissances dissipées (35 kW.m^{-3}) utilisées. Le coefficient de transfert d'oxygène est déterminé à l'aide de différents modèles non structurés (pour la prise en compte du mode d'écoulement des phases, de l'entraînement de surface et de la rétention gazeuse) sur des régimes transitoires ou permanents. Il est notamment observé que, en présence de réaction biologique, (i) les valeurs du coefficient de transfert K_T sont 5 à 10 fois supérieures à celles mentionnées dans la littérature relative au transfert d'oxygène, (ii) par comparaison aux milieux de culture avant ensemencement, K_T et K_L (la conductance de transfert) sont divisés d'un facteur 4 à 6. Les effets de l'activité cellulaire sur le transfert d'oxygène sont caractérisés par la quantification des facteurs d'accélération relatifs aux modifications chimiques du milieu, à la consommation d'oxygène, et à la présence physique de cellules. Les limites des modèles du transfert d'oxygène en culture microbienne intensive sont discutées, et des nouvelles voies d'investigation sont proposées.

Mots clés : transfert d'oxygène ; culture microbienne ; aération ; bioréacteur ; kla ; coefficient de transfert d'oxygène ; accélération du transfert ; aération de surface

Title. Oxygen transfer in intensive microbial cultures

Abstract. This work aims to quantify and model oxygen transfer in microbial cultures with an objective of intensification of bioprocess performances. Labworks in bioreactors are achieved in mineral media, free from biological reaction, then in fed-batch cultures of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger*. The fieldwork is original because of the high oxygen consumption rates ($0,6 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) and the high dissipated power (35 kW.m^{-3}) used. The oxygen transfer coefficient is determined from continuous and dynamic methods, using several unstructured models, to take into account the profile of the dispersed gaseous flow, the gas entrained from the surface, and hold-up. Among the observations, in biological media, (i) values of the oxygen transfer coefficient K_T are 5 to 10 times higher than values from the literature on oxygen transfer, (ii) compared with the initial medium prior to inoculation, K_T and K_L (the oxygen transfer conductance) are 4 to 6 times smaller. Effects of microbial activity on oxygen transfer are characterised and quantified according to enhancement factors related to chemical modifications of the medium, oxygen consumption, and physical presence of cells. Limits of mass transfer models in intensive microbial cultures are discussed and new areas of investigation are proposed.

Key words: oxygen transfer; microbial culture; aeration; bioreactor; kla ; oxygen transfer coefficient; oxygen transfer enhancement; surface aeration.

Merci,

Merci tout particulièrement à Gérard Goma pour m'avoir fait partager sa perception des biotechnologies, son sens de l'intuition catalyseur d'idées, et aussi pour l'énergie qu'il a su me transmettre, l'ouverture d'esprit qu'il m'a apportée et la confiance qu'il m'a accordée,

Merci à Hans Hollander (DSM-Delft) d'avoir encouragé financièrement cette étude, de m'avoir fait partager son expertise scientifique et de m'avoir accueilli dans son équipe, merci à Joost Beekman (DSM-Delft) pour son soutien et ses commentaires constructifs sur mon travail, merci à Bruno Cabane (DSM-Séclin) d'avoir initié cet étude,

Merci à Carole Jouve pour la rigueur scientifique et le formalisme qu'elle m'a apportés au travers des relectures de mon tapuscrit,

Merci à Claude Maranges pour son soutien, merci à Christian Fonade pour ses expertises en mécanique de transfert,

Merci à Gilles Roux, Carine Bideaux et Fadhel Ben Chaabane pour l'aide précieuse qu'ils m'ont apportée en modélisation,

Merci à Christophe Ellero, Michel Bruche, François Rizzeto et Henry Feau pour leur soutien technique efficace,

Merci à Sébastien Leduc et Vincent Colombier pour leur assistance en fermentation,

Merci à Hélène, Pierre-Alain, et Anne-Sophie pour leurs commentaires constructifs,

Merci au personnel de la médiathèque de l'ENSIACET pour la gestion exemplaire de ce lieu de documentation impressionnant.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	10
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	14
I.1. Absorption physique	16
I.1.1. Schéma théorique du transfert d'oxygène du gaz au microorganisme.....	16
I.1.2. Solubilité des gaz en phase liquide	18
I.1.3. Flux de matière.....	19
I.1.4. La conductance de transfert.....	19
I.1.5. Modèles locaux de transfert	20
I.1.6. Le coefficient volumique de transfert	22
I.1.6.1. Théorie.....	22
I.1.6.2. K_La et dimensionnement	23
I.1.6.3. Relation entre K_La et concentration en CO_2	24
I.2. Influences physiques, chimiques, et mécaniques sur K_La.....	27
I.2.1. Effet de la puissance dissipée sur K_La	27
I.2.1.1. Corrélations empiriques	27
I.2.1.2. Influence de la puissance dissipée sur k_L , approches théoriques.....	29
I.2.1.3. Influence de la puissance dissipée sur l'aire interfaciale.....	31
I.2.2. Effet du débit d'aération sur K_La	35
I.2.2.1. Aération par le diffuseur.....	35
I.2.2.2. Aération de surface.....	35
I.2.3. Effet des solutés sur K_La (force ionique)	38
I.2.4. Effet des agents de surface sur K_La (tension de surface)	41
I.2.5. Effet de la viscosité sur K_La	43
I.2.5.1. Modèles de viscosité	43
I.2.5.2. Modélisation de K_La en système visqueux	44
I.2.6. Effet de la température sur K_La	46
I.2.7. Effet de la présence de particules solides sur K_La	47
I.2.7.1. Effet de blocage de l'interface sur k_L	47
I.2.7.2. Effet hydrodynamique (boule de neige) sur k_L	48

I.3. Absorption avec consommation simultanée de l'oxygène	48
I.3.1. Absorption en présence de réaction chimique.....	48
I.3.2. Absorption en présence de consommation par la biomasse.....	51
I.3.2.1. <i>Thèse de Tsao : répartition hétérogène à l'interface (double zone)</i>	56
I.3.2.2. <i>Effet d'affinité, effet de navette</i>	58
I.3.2.3. <i>Transfert direct du gaz dans la cellule</i>	59
I.3.2.4. <i>L'apport des modèles de connaissance</i>	60
I.3.3. Généralisation du facteur d'accélération.....	62
I.3.3.1. <i>Modification du milieu</i>	63
I.3.3.2. <i>Production de gaz dans la couche limite</i>	63
I.4. Détermination de K_{La}	64
I.4.1. Méthodes "dynamiques".....	65
I.4.1.1. <i>Mise en œuvre de la réoxygénation</i>	65
I.4.1.2. <i>Mesure de la rétention gazeuse</i>	66
I.4.1.3. <i>Sur la différence de potentiel (x^*-x)</i>	67
I.4.1.4. <i>Prise en compte de la biomasse active</i>	69
I.4.1.5. <i>Conclusions sur les méthodes dynamiques</i>	69
I.4.2. Méthodes "statiques".....	70
I.4.2.1. <i>Méthodes au sulfite</i>	70
I.4.2.2. <i>Hypothèse du profil axial de concentration du gaz</i>	71
I.4.2.3. <i>Comparaison entre les méthodes statiques et dynamiques</i>	71
I.4.3. Méthodes de détermination des facteurs d'accélération	72
I.4.4. Synthèse des grandeurs caractéristiques	73
I.4.4.1. <i>K_{La} et facteur d'accélération</i>	73
I.4.4.2. <i>Autres paramètres du transfert</i>	74
I.4.4.3. <i>Cas des réacteurs multi-turbines</i>	75
I.5. Conclusions et perspectives	76
II. MATERIEL ET METHODES	80
II.1. Souches et milieux de cultures.....	81
II.2. Conditions de culture	83
II.2.1. Conditions de culture d' <i>E. coli</i>	83
II.2.2. Conditions de culture de <i>S. cerevisiae</i>	85
II.2.3. Conditions de culture d' <i>Aspergillus niger</i>	85
II.3. Détermination de K_{La}	85

II.3.1.	Choix des méthodes expérimentales	85
II.3.2.	Méthodes du bilan gazeux: BG et BG+OS	86
II.3.3.	Méthode de réoxygénation	87
II.3.3.1.	<i>La sonde à oxygène à réponse rapide</i>	87
II.3.3.2.	<i>Mise en œuvre expérimentale de la réoxygénation et analyse du signal</i>	91
II.3.3.3.	<i>Identification paramétrique de K_{La}</i>	93
II.3.3.4.	<i>Détermination de K_{La} en présence de cellules à l'état stationnaire et en milieu de culture épuré en microorganisme</i>	94
II.3.3.5.	<i>Détermination de K_{La} en conditions de production de microbulles</i>	94
II.4.	Détermination de paramètres mécaniques et physico-chimiques.....	95
II.5.	Statistiques et calcul d'erreurs.....	97
III.	MODELISATIONS ET ETUDES EXPERIMENTALES ...	98
III.1.	Modélisation du transfert d'oxygène pour la détermination de K_{La}	100
III.1.1.	Modèle homogène pour la phase gazeuse (MH).....	101
III.1.2.	Modèle piston pour la phase gazeuse (MP)	103
III.1.3.	Comparaison des modèles homogène et piston en régime transitoire	104
III.1.4.	Modèles MH et MP utilisés en régime quasi-stationnaire	107
III.1.5.	Modèles considérant l'entraînement de surface	109
III.1.5.1.	<i>Développement des modèles</i>	109
III.1.5.2.	<i>Etude théorique des modèles ME1 et ME5</i>	115
III.1.6.	Synthèse	116
III.2.	Quantification du transfert en réacteur en milieux minéraux de référence.....	118
III.2.1.	Résultats préliminaires	118
III.2.1.1.	<i>Détermination de la puissance dissipée</i>	118
III.2.1.2.	<i>Vitesse critique d'entraînement de surface</i>	122
III.2.1.3.	<i>Rétention gazeuse des milieux minéraux</i>	123
III.2.2.	Quantification de K_{La} par la méthode du bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite (BG+OS).....	125
III.2.3.	Quantification de K_{La} par réoxygénation et modèles simples (MH et MP)...	129
III.2.3.1.	<i>Résultats préliminaires</i>	129
III.2.3.2.	<i>Valeurs de K_{La} et comparaison avec la littérature</i>	134
III.2.4.	Quantification de K_{La} par réoxygénation et modèles considérant l'entraînement de surface	137
III.2.4.1.	<i>Pertinence des modèles considérant l'entraînement de surface</i>	137

III.2.4.2. Valeurs de $K_L a$ et comparaison avec la littérature.....	141
III.2.5. Synthèse et conclusions.....	150
III.3. Quantification du transfert en réacteur en condition de culture microbienne ..	153
III.3.1. Cultures de microorganismes en condition de forte productivité	153
III.3.1.1. Cinétiques microbiennes.....	153
III.3.1.2. Comportement rhéologique des milieux microbiens.....	159
III.3.2. Coefficient de transfert d'oxygène et dynamique microbienne	161
III.3.2.1. Résultats.....	161
III.3.2.2. Confrontation avec les modèles existants.....	164
III.3.3. Analyse et modélisation des effets biologiques	165
III.3.3.1. Rétention gazeuse et aire interfaciale.....	165
III.3.3.2. Coefficient de transfert d'oxygène.....	167
III.3.3.3. Conductance de transfert d'oxygène	169
III.3.3.4. Influence de l'évolution de α sur la modélisation « $K_L a = \chi \cdot e^\alpha \cdot U_S^\beta$ »	173
III.3.3.5. Etude hors ligne sur milieux réels	174
III.3.3.6. Accélération due aux modifications chimiques du milieu (E_{chem}).....	174
III.3.3.7. Accélération due à la présence physique de particules (E_{pp})	177
III.3.3.8. Accélération due à la consommation d'oxygène (E_{qO_2}).....	178
III.3.3.9. Contrôle du transfert par l'antimousse	182
III.3.3.10. Contrôle visqueux du transfert : modèle d'étude <i>Aspergillus niger</i>	183
III.3.4. Analyse de la détermination de K_T	186
III.3.4.1. Modification de l'écoulement gazeux par entraînement de surface	186
III.3.4.2. Modification de l'écoulement gazeux par la ventilation du CO_2	189
III.3.4.3. Influence des dynamiques physico-biologiques.....	192
III.3.5. Conclusions	195
IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	198
V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	206
VI. ANNEXES.....	220
VI.1. Calcul de la solubilité de l'oxygène.....	221
VI.1.1. Dans l'eau pure.....	221
VI.1.2. Calcul de la solubilité de l'oxygène en milieu salin.....	222
VI.2. Méthodes de détermination de $K_L a$	223
VI.3. Techniques analytiques.....	226

VI.3.1. Biomasse	226
VI.3.2. Glucose.....	226
VI.3.3. Ammonium.....	227
VI.3.4. Phosphate	227
VI.3.5. Acides organiques volatils	227
VI.3.6. Acides organiques non-volatils	228
VI.4. Lissage et réconciliation des données expérimentales.....	229
VI.5. Calcul de la moyenne logarithmique	230
VI.6. Programmation MATLAB	231
VI.6.1. Programme pour la détermination de $K_L a$ par le modèle MH.....	231
VI.6.2. Programme pour la détermination de $K_L a$ par le modèle MP	232
VI.6.2.1. <i>Ecriture du système sous forme matricielle</i>	232
VI.6.2.2. <i>Programme MATLAB</i>	233
VI.7. Conditions de culture	235
VI.7.1. <i>Culture E. coli C</i>	235
VI.7.2. <i>Culture E. coli E</i>	236
VI.8. Matériel et méthodes complémentaires.....	237
VI.8.1. Microscopie in-situ.....	237
VI.8.2. Méthode au gaz traceur (R134a)	239
VI.9. Liste des symboles	240

INTRODUCTION

Pour associer des capacités de production importantes et la réduction des coûts de production, l'enjeu des bioindustries consiste aujourd'hui en l'intensification des performances des bioprocédés en termes de productivité, titres et rendements. Il est par ailleurs parfaitement établi que l'obtention de hautes performances résulte des interactions entre les processus biologiques et les transferts multiphasiques (matière et chaleur) au sein du bioréacteur. Chacun de ces phénomènes, caractérisé par une constante de temps propre, contribue à la dynamique du système bioréacteur. Les interactions doivent être identifiées et quantifiées afin de maîtriser les facteurs limitants et réduire leurs impacts sur les performances des bioprocédés.

Le transfert d'oxygène, facteur limitant primordial sur le métabolisme microbien, fait l'objet des travaux de nombreuses équipes de recherche. Cependant, les données de la littérature sur le transfert de gaz en culture microbienne sont obtenues à des concentrations cellulaires inférieures à 10 g.L^{-1} (masse sèche), et dans des situations qui ne visent pas un objectif d'optimisation de la productivité. La microbiologie moderne, au contraire, recherche les hautes performances avec des concentrations cellulaires supérieures à 50 g.L^{-1} (masse sèche), des taux de croissance élevés, des cinétiques maîtrisées et des modes de conduite optimisés. C'est dans ce cadre, commun aux industriels, et quelque peu étranger à la littérature académique, que s'inscrit ce travail. Dans cette confrontation, les problèmes fondamentaux auxquels nos travaux ont l'ambition de contribuer sont les suivants :

- Dans un bioréacteur, comment modéliser le transfert d'oxygène en conditions de fortes productivités ?
- Quelles sont les influences de l'activité cellulaire sur le transfert, dans des conditions de production compatibles avec une transposition industrielle?

Ces deux questions structurent ce document et cette activité de recherche. Notre travail a donc pour objectif de contribuer à la maîtrise et l'intensification des performances de procédés biotechnologiques par la connaissance des relations entre les dynamiques relatives aux microorganismes et le transfert d'oxygène, au sein d'un bioréacteur. Peut-être pourrons nous aussi apporter des éléments de réponse à Tsao et Lee qui concluaient en 1975 « même aujourd'hui il n'existe pas de schéma clair et fondamental du mécanisme de transfert de gaz en fermentation ».

Ceci passe par l'acquisition de données expérimentales fiables, reproductibles, et d'outils d'investigation adaptés pour une caractérisation qualitative et quantitative des

processus biologiques et physiques en condition de production intensive. Devant la complexité des phénomènes, la démarche expérimentale vise l'étude du transfert d'oxygène en bioréacteur :

- en présence de différents milieux minéraux, par référence aux travaux antérieurs mentionnés dans la littérature.
- lors de cultures en mode fed-batch d'*Escherichia coli*, de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Aspergillus niger* en cuve agitée. Ces microorganismes sont des modèles d'étude privilégiés par le monde industriel et académique pour leurs nombreux domaines d'utilisation et l'ensemble des connaissances biologiques disponibles à ce jour. L'étude in-situ, en condition de culture et production intense, est privilégiée afin de rendre compatibles ces travaux avec une mise en œuvre industrielle.

L'ensemble de la démarche associe expérimentation et modélisation.

Ces travaux s'inscrivent dans une collaboration entre le laboratoire DSM Food Specialties de DSM-Delft et le Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés de l'INSA-Toulouse (LISBP). Par rapport à la culture scientifique du LISBP, ces travaux bénéficient des études de Rols (1990) et Rainer (1992), et poursuivent l'objectif commun de maîtriser les processus biologiques et physiques pour l'obtention de hautes performances en culture cellulaire.

Ce document est organisé en quatre chapitres.

L'étude bibliographique rassemble l'état des connaissances sur le transfert gaz-liquide en culture cellulaire, en insistant sur la modélisation et l'interprétation des phénomènes : les modèles décrivant les influences de l'environnement sur le coefficient de transfert d'oxygène, K_{La} , sont analysés ; les effets d'accélération que peut avoir la réaction biologique sur le transfert d'oxygène sont présentés ; les méthodes permettant la détermination de K_{La} sont détaillées.

L'ensemble du matériel et des méthodes est précisé dans le chapitre éponyme.

Les résultats s'ouvrent sur le développement des modèles du transfert d'oxygène en bioréacteur fortement agité (chapitre III.1) : nous considérons le type d'écoulement du gaz, les effets de l'entraînement de surface, et la présence de la rétention gazeuse. Ces modèles sont utilisés sur des régimes transitoires ou permanents pour définir des corrélations de référence, propres au réacteur, caractérisant le transfert d'oxygène sur des milieux minéraux de référence

(chapitre III.2). Puis, le transfert d'oxygène est quantifié lors de cultures cellulaires en condition de production intensive (chapitre III.3) : les paramètres du transfert d'oxygène en milieu biologiques sont comparés aux corrélations de référence, ce qui permet de faire apparaître les effets de la dynamique cellulaire sur le transfert d'oxygène ; des modèles sont développés pour permettre la discussion des résultats et l'interprétation des phénomènes en argumentant des dynamiques quantifiées des phénomènes biologiques, physico-chimiques et mécaniques.

Les conclusions et perspectives rassemblent les résultats originaux obtenus dans ce travail et de nouvelles voies d'investigations sont proposées.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'intensification des productions microbiennes nécessite la gestion optimale des flux de matière et des écoulements afin d'éviter les limitations et maintenir le microorganisme à son potentiel optimal. Le transfert de matière le plus complexe à caractériser et à maîtriser est le transfert des gaz. L'oxygène consommé et le dioxyde de carbone produit sont les gaz majoritairement présents dans les milieux de cultures cellulaires aérobies.

L'oxygène est un gaz peu soluble. En ce sens, le transfert d'oxygène apparaît fréquemment comme un facteur limitant les performances des bioprocédés et l'utilisation des hautes densités cellulaires. Au sein du bioréacteur, la concentration en oxygène dissous résulte de la combinaison des dynamiques des phénomènes de transfert (matière, quantité de mouvement) et des phénomènes biologiques (consommation d'oxygène par la réaction microbienne). En condition de forte consommation d'oxygène, l'apport d'oxygène doit être parfaitement maîtrisé.

Le dioxyde de carbone joue souvent un double rôle en culture cellulaire : à faible concentration, le CO_2 est essentiel à la cellule, notamment dans les voies anaplerotiques ; à plus forte concentration, le CO_2 dissous et les ions HCO_3^- perturbent l'activité des microorganismes en réduisant la croissance et en limitant l'activité métabolique centrale (Jones et Greenfield, 1982 ; McIntyre et McNeil, 1998). La ventilation (« stripping ») permet de limiter sa concentration : le flux d'air injecté dans le bioréacteur apporte l'oxygène nécessaire à la croissance et assure la ventilation (Royce et Thornhill, 1991).

Les similitudes entre l'absorption de l'oxygène et la désorption non-nucléée du CO_2 permettent de transposer les connaissances établies pour l'oxygène au transfert du CO_2 (Roizard et coll., 1997). En ce sens, il a été choisi de focaliser ces travaux sur le transfert d'oxygène.

Afin de rendre compte de l'état de l'art du domaine, quatre volets sont proposés en insistant sur la description et la modélisation des phénomènes :

- Dans un premier temps l'absorption purement physique est présentée pour permettre l'introduction des théories et des lois fondamentales.
- Dans un deuxième temps les influences physiques, chimiques et mécaniques portant sur le coefficient de transfert d'oxygène, K_{La} , sont développées.

- Puis les effets de la présence et de l'activité microbienne sur l'absorption sont introduits.
- Le dernier volet, plus technologique, présente les méthodes permettant la détermination de $K_L a$.

I.1. Absorption physique

L'étude est réalisée dans le cas de liquides mécaniquement agités, c'est-à-dire mettant en jeu, à l'échelle macroscopique, des mouvements convectifs, et à l'échelle microscopique, la diffusion moléculaire.

I.1.1. Schéma théorique du transfert d'oxygène du gaz au microorganisme

En culture submergée, selon la théorie la plus répandue (Arnold et Steel, 1958), le transfert d'oxygène depuis la phase gazeuse jusqu'au microorganisme peut être décomposé en une série d'étapes, comme l'illustre la Figure 1, pour un profil de concentration d'oxygène correspondant à des conditions standard de culture cellulaire. A chaque étape correspond une résistance au transfert (Tableau 1) qui induit un gradient de concentration. Ces étapes sont supposées survenir en série, c'est-à-dire que l'oxygène ne transfère pas via des mécanismes parallèles. On peut alors calculer une résistance globale Z , somme des résistances en série. Si une des résistances est largement plus petite que les autres alors l'étape correspondante n'est pas limitante. Pour le transfert d'oxygène on considère que la résistance dans le film liquide, Z_4 , est limitante :

$$Z = \sum i \approx Z_4 \quad (1)$$

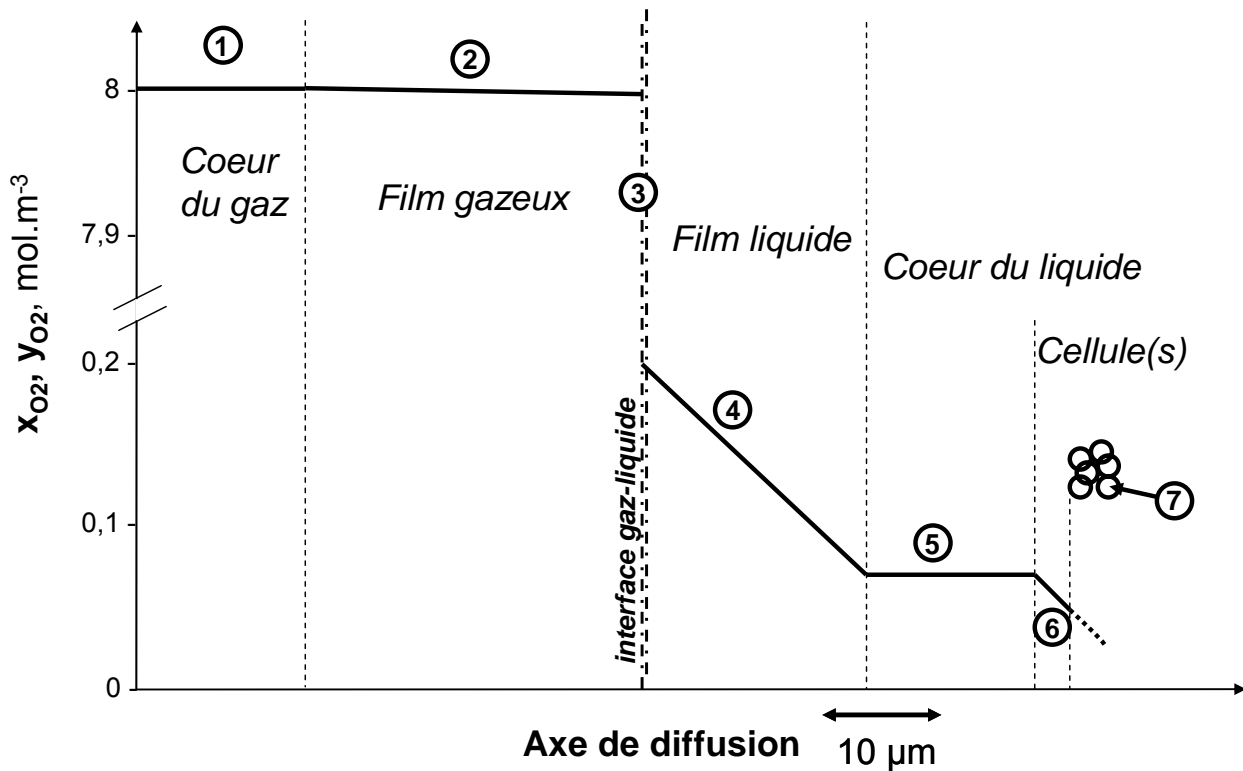


Figure 1. Schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire en régime stationnaire (d'après Arnold et Steel, 1958). Les résistances successives au transfert (1 à 8) sont décrites dans le Tableau 1. x_{O_2} , y_{O_2} : concentrations en oxygène en phases liquide et gazeuse, respectivement.

Tableau 1. Description des résistances au transfert d'oxygène en culture microbienne. Les numéros des résistances correspondent aux numéros sur la Figure 1.

Résistance	Localisation	Remarques
Z1	Au sein de la bulle de gaz	≪ Z4 ; le cœur de la bulle est homogène à cause des recirculations internes dues aux mouvements dans le liquide et au mouvement brownien
Z2	Dans le film gazeux	≪ Z4 si le gaz est peu soluble (Bartholomew, 1950), sauf pour des bulles d'un diamètre inférieur à l'épaisseur théorique du film de diffusion
Z3	Au passage de l'interface	=0 implique que la relation de Henry est applicable ≠0 en présence d'agents de surface ≪ Z4 en général, si le gaz est peu soluble dans le liquide
Z4	Dans le film liquide	Résistance principale au transfert
Z5	En phase liquide	=0 si le réacteur est parfaitement agité ≠0 si des gradients de concentration sont présents, par exemple dans un réacteur aéré par la surface, ou en présence de milieu liquide fortement visqueux
Z6	Dans le film liquide autour des cellules	≪ Z4 car les cellules se trouvent à l'intérieur du champ turbulent
Z7	Dans l'enceinte cellulaire	L'oxygène est à la disposition de la cellule mais doit encore diffuser jusqu'au site de consommation. Il existe une résistance supplémentaire pour atteindre une cellule au centre d'une micelle, d'un floque, ou d'un agrégat.

I.1.2. Solubilité des gaz en phase liquide

A l'interface gaz-liquide, la concentration de l'espèce soluble en phase liquide est généralement décrite par une relation d'équilibre. Dans le cas de gaz peu solubles, comme l'oxygène, la relation d'équilibre est décrite par la loi de Henry (Annexe VI.1) :

$$x_A^* = H.p_A \quad (2)$$

où x_A^* est la concentration du gaz A dissous, en équilibre avec sa pression partielle p_A dans le gaz en contact de l'élément de fluide. La constante de Henry, H, décroît en fonction de la température, et est une fonction de la composition du milieu (Annexe 1). x_A^* dépend donc de la température et de la pression partielle en gaz, mais aussi de la composition du milieu.

L'effet des électrolytes est le plus souvent de réduire la solubilité du gaz (« salting out effect »). La relation de Sechenov (1892) permet de calculer x_A^* à partir de la solubilité dans l'eau pure, $x_{A,0}^*$, et de la concentration x_i de l'ion i :

$$\log\left(\frac{x_{A,0}^*}{x_A^*}\right) = \sum_{Ai} Se_{Ai} x_i \quad (3)$$

où la constante de Sechenov Se_{Ai} dépend à la fois de la nature du gaz A et de l'ion i. Les premiers travaux de Schumpe généralisant les formules de Sechenov (1892) pour la prise en compte de plusieurs électrolytes sont basées sur la force ionique des sels (Quicker et coll., 1981 ; Schumpe et coll., 1978). La formulation la plus récente (Weisenberger et Schumpe, 1996) (Eq. 4), plus facile d'utilisation, est basée sur la concentration en sel :

$$\log\left(\frac{x_{A,0}^*}{x_A^*}\right) = \sum (h_i + h_A) x_i \quad (4)$$

où h_i est le paramètre spécifique à l'ion i, et h_A le paramètre spécifique au gaz. Le domaine d'application de Eq. 4 est très étendu (22 gaz, 24 cations, 26 anions), et prend en compte les variations de température.

La présence de sucres diminue également la solubilité des gaz (Sablayrolles et Barre, 1986) selon la relation de Sechenov (1892) (Eq. 4) mais l'effet est moins prononcé que celui des électrolytes. D'une manière générale, l'influence des substances organiques (alcools, sucres...) sur la solubilité peut être modélisée en additionnant les effets de chaque substance par rapport à l'eau pure (Quicker et coll., 1981) :

$$\log\left(\frac{x_{A,0}^*}{x_A^*}\right) = \sum_{sel\ i} (h_i + h_A) x_i + \sum_{organique\ j} Se_{Aj} x_j \quad (5)$$

L'équation de Popovic (1979) ne fait pas de distinction entre les sucres et donne une approximation de la solubilité en solution sucrée, convenable lorsque la concentration est

inférieure à 30 g.L^{-1} : $x_A^* = x_{A,0}^*(1 - 0,0012 x_{\text{sucrose}})$. Il est noté que pendant des cultures de *Penicillium chrysogenum*, la solubilité de l'oxygène chute de 4 à 17% par rapport à l'eau pure : cette variation est due à la consommation du sucre et à la régulation du pH par KOH (Quicker et coll., 1981) (mode batch, sucre (lactose, sucrose) 50 g.L^{-1} , concentration en biomasse $< 25 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$, 200 h de fermentation).

I.1.3. Flux de matière

Si la concentration en gaz dissous dans le cœur du liquide est différente de celle de l'interface, le réarrangement chaotique des molécules tend à réduire la différence de concentration d'une manière décrite par les lois de diffusion. On dit abusivement que le potentiel de transfert est moteur de la diffusion. La première loi de Fick (1855) indique que la densité de flux de diffusion, \vec{R} , est proportionnelle au gradient de concentration :

$$\vec{R} = -D_A \overrightarrow{\text{grad}} x_A \quad (6)$$

où D_A est le coefficient de diffusion de l'espèce A dans la phase d'intérêt.

A partir de la première loi de Fick et de l'équation de continuité relative au constituant A établie sur un volume V , on obtient :

$$-\text{div} \vec{N}_A \pm q_A = \frac{\partial x_A}{\partial t} \quad (7)$$

où q_A est le terme de réaction, et \vec{N}_A la densité de flux de transfert (diffusion + transport), il est possible de déterminer le profil de concentration en fonction du temps, soit en supposant D_A constant sur l'espace et en négligeant le terme de transport :

$$D_A \Delta x_A \pm q_A = \frac{\partial x_A}{\partial t} \quad (8)$$

Cette équation est fréquemment utilisée en régime instationnaire et en présence de réaction chimique ou biologique. En l'absence de réaction, c'est la seconde loi de Fick.

I.1.4. La conductance de transfert

La conductance de transfert est introduite de manière pragmatique pour exprimer que le flux de matière est égal au produit d'un coefficient de proportionnalité par une différence de potentiel d'échange. On peut exprimer la densité de flux molaire à l'interface, N_0 ($\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), pour le transfert en phase liquide :

$$N_{A0} = k_L (x_{A0} - x_A) \quad (9)$$

où k_L est la conductance de transfert du composé A en phase liquide (m.s^{-1}), x_{A0} est la

concentration à l'interface et x_A la concentration au cœur de la phase liquide. Et pour le transfert en phase gazeuse :

$$N_{A0} = k_G (p_A - p_{A0}) \quad (10)$$

où k_G est la conductance de transfert en phase gazeuse ($\text{mol.bar}^{-1}.\text{m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), p_A est la pression partielle au sein de la phase gazeuse et p_{A0} la pression partielle à l'interface.

Notons que les conductances de transfert dépendent aussi d'une contribution liée au mouvement d'ensemble des molécules, qui a lieu indépendamment du gradient de concentration, et qui est en partie générée par la diffusion elle-même. Cette contribution est négligée pour les faibles intensités de transfert, comme par exemple pour la diffusion de l'oxygène dans l'eau.

Les conductances individuelles relatives à chaque phase ainsi que les concentrations interfaciales sont difficiles à mesurer. Une conductance globale de transfert est donc définie par rapport à la phase d'intérêt : la phase liquide :

$$N_{A0} = K_L (x_A^* - x_A) \quad (11)$$

où K_L est la conductance globale de transfert du composé A définie par rapport à la phase liquide, x_A^* est la concentration du constituant A dans la phase liquide, à l'interface gaz-liquide, et donc supposée en équilibre avec sa pression partielle p_A dans la phase gazeuse (Eq. 2). A partir de cette définition il est possible d'écrire Eq. 1 en termes de conductance, inverse de la résistance :

$$\frac{1}{K_L} = \frac{H}{k_G} + \frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_L} \quad (12)$$

où sont considérées respectivement les résistances du film gazeux, de l'interface, et du film liquide.

I.1.5. Modèles locaux de transfert

L'objectif des modèles locaux de transfert est de relier k_L aux grandeurs caractéristiques du système. Les trois modèles principaux (Whitman, Higbie, Danckwerts) reposent sur les trois hypothèses communes suivantes :

- 1/ A l'interface l'équilibre de concentration est atteint.
- 2/ La résistance interfaciale au transfert est nulle.
- 3/ Il n'y a pas de réaction entre le liquide et le gaz.

et des hypothèses complémentaires, spécifiques à chaque modèle.

Le modèle du double film (Whitman, 1923) est schématisé sur la Figure 1 (en omettant la résistance interfaciale) ; il est basé sur les hypothèses suivantes :

- Il existe un double film stagnant de part et d'autre de l'interface gaz-liquide.
- La résistance au transfert est localisée dans les deux films.

Le gaz franchit donc le double film par diffusion moléculaire uniquement. En utilisant la forme unidimensionnelle de Eq. 6, selon un axe z perpendiculaire à l'interface, on peut écrire :

$$R = \frac{D_A}{\delta} (x_A^* - x_A) \quad (13)$$

où δ est l'épaisseur du film liquide, x_A^* est la concentration de l'espèce A à l'interface et x_A la concentration dans le liquide homogène. Par identification avec Eq. 9 :

$$k_L = \frac{D_A}{\delta} \quad (14)$$

δ reflète l'hydrodynamique du système ainsi que certaines de ses propriétés physiques.

Le modèle du film est par hypothèse applicable uniquement en régime stationnaire, où lorsque le temps de contact entre le gaz et le liquide est supérieur au temps de pénétration, c'est-à-dire au temps nécessaire à l'établissement du profil stationnaire de concentration dans le film.

L'improbabilité de l'existence d'une telle discontinuité hydrodynamique entre un film stagnant et un milieu agité, et la volonté de prendre en compte l'effet de la turbulence sur l'interface gaz-liquide a poussé au développement d'autres modèles, dits de renouvellement de surface : les éléments de volume de l'interface demeurent à l'interface pendant un certain temps avant d'être remplacés par de nouveaux éléments de volume en provenance du cœur du liquide. Les interfaces gaz-liquide sont donc composées d'éléments d'âges différents. La différence entre les modèles de renouvellement de surface réside dans la répartition des temps de séjours de ces éléments autour du temps de séjour moyen.

Le modèle de pénétration de Higbie (1935) est basé sur l'hypothèse suivante :

- Chaque élément de liquide est exposé à l'interface pendant la même durée de temps t_e avant d'être remplacé par un élément ayant la composition du cœur du liquide.

Le gaz diffuse dans les éléments de liquide selon la loi de Fick. Dans ces conditions l'intégration de l'équation de continuité donne, par identification avec Eq. 9:

$$k_L = 2\sqrt{\frac{D_A}{\pi \cdot t_e}} \quad (15)$$

Cette équation est valable pour $t_e > 0,2$ s. La durée d'exposition, t_e , reflète les conditions hydrodynamiques du milieu. Il a été montré expérimentalement (Higbie, 1935) que pour des temps d'exposition très courts k_L ne croît pas indéfiniment mais tend vers une valeur limite.

Le modèle de renouvellement de surface de Danckwerts (1951) est basé sur une hypothèse qui contredit l'hypothèse de Higbie (1935) :

-Une même fraction de l'interface renouvelée par unité de temps, s , indépendamment de l'âge des éléments la constituant.

Par identification avec Eq. 9 :

$$k_L = \sqrt{D_A \cdot s} \quad (16)$$

Le paramètre s qui désigne la fraction renouvelée par unité de temps (exprimée en s^{-1}) est une fonction des conditions hydrodynamiques du système. Tsao et Lee (1975) ont vérifié expérimentalement à l'aide d'une micro-sonde à oxygène (diamètre 1 μm , longueur 2 μm) que k_L est proportionnel à \sqrt{s} . Cependant, les auteurs, sans présenter de méthode de calcul, mesurent un nombre de renouvellements de l'élément de liquide par unité de temps qui correspondrait plus au paramètre t_e de Higbie qu'à la fraction de l'interface renouvelée par unité de temps.

Dans chacun des trois modèles un seul paramètre, δ , t_e ou s , prend en compte l'hydrodynamique du système. Il existe d'autres modèles d'absorption mais leur utilisation est soit plus complexe que les modèles présentés ici, soit mal appropriée pour l'étude de réacteurs agités (Danckwerts, 1970). Les prédictions de vitesses d'absorption auxquelles conduisent les modèles sont souvent voisines, notamment en condition de consommation simultanée du gaz absorbé (Danckwerts, 1970). C'est pourquoi le modèle du film, plus simple, reste le plus utilisé.

I.1.6. Le coefficient volumique de transfert

I.1.6.1. Théorie

En pratique l'aire interfaciale des contacteurs gaz-liquide est souvent inconnue ; la conductance globale de transfert est donc définie sous la forme d'une grandeur volumique, $(K_L a)_{\text{loc}}$, directement mesurable par une expérience d'absorption :

$$dW_A = K_{L,loc} a_{loc} (x_A^* - x_A) dV \quad (17)$$

où dW_A est le flux transféré (mol.s^{-1}) dans l'élément de volume dV et a_{loc} est l'aire interfaciale incluse dans l'élément de volume dV . $K_{L,loc}$ et a_{loc} sont fonctions de la puissance dissipée localement, et donc de la position dans le réacteur (Lopes de Figueiredo et Calderbank, 1979 ; Royce et Thornhill, 1991). Le problème de leur détermination est simplifié en intégrant sur l'ensemble du réacteur et en proposant un coefficient volumique de transfert global, valeur moyenne définie sur l'ensemble du réacteur :

$$W_A = K_L a (x_A^* - x_A) V_L \quad (18)$$

W_A est le flux transféré par l'ensemble du réacteur (mol.s^{-1}), V_L le volume de liquide dans le réacteur, et $K_L a$ (s^{-1}) est le coefficient volumique de transfert global défini par rapport à la phase liquide. Cette équation est valable en l'absence de réaction chimique et pour une température et un coefficient de diffusion à l'interface proche de celui du coeur du liquide. Son utilisation implique que le réacteur soit considéré comme un réacteur homogène en terme de puissance dissipée.

L'oxygène étant un gaz peu soluble, le terme de résistance en phase gaz H/k_G (Eq. 12), peut presque toujours être négligée (van't Riet et Tramper, 1991 ; Royce et Thornhill, 1991). En effet, Bartholomew et coll. (1950) ont démontré ($V_L=3,2$ L, aération=1,8 vvm, $N=375$ rpm, $27 < T < 32^\circ\text{C}$) que l'énergie d'activation de $K_L a$ vaut $E^\ddagger=17600$ J.mol^{-1} ce qui correspond à un phénomène de diffusion en phase liquide, et ce qui prouve que l'étape limitante du transfert d'oxygène est bien localisée dans la phase liquide, car en phase gazeuse E^\ddagger serait 10 fois plus petit.

1.1.6.2. $K_L a$ et dimensionnement

Les méthodes classiques de dimensionnement à l'échelle supérieure (« scale-up ») reposent sur la conservation d'un paramètre essentiel à la culture cellulaire ; lorsqu'il s'agit de l'oxygène dissous ce paramètre est souvent la puissance dissipée par unité de volume ou $K_L a$ (Aiba et coll., 1973 ; Junker, 2004). Or, on remarque souvent une inadéquation entre la production en réacteur de laboratoire et la production industrielle car ces méthodes de scale-up considèrent le réacteur comme un système homogène et ne tiennent pas compte des hétérogénéités propres aux réacteurs industriels (Bylund et coll., 1998).

Le dimensionnement assisté par méthode numérique comme le pratique Reuss (Schmalzriedt et coll., 2002) est une approche intégrée, qui permet d'associer l'idéalité des réacteurs de laboratoire à la complexité des grands réacteurs, en combinant l'hydrodynamique

et la réponse microbienne au stress. L'approche numérique intégrée permet un calcul plus fin du scale-up à partir de l'étude de la réponse microbienne au stress, obtenue en laboratoire par une approche opposée au scale-up, le scale-down. L'objectif du scale-down est de détecter les conditions d'hétérogénéités auxquelles les microorganismes sont soumis à l'échelle industrielle et de les reproduire à l'échelle du laboratoire (Naubauer et coll., 1995). Pour cela le réacteur de scale-down est composé de réacteurs idéaux en série (Bylund et coll., 1999).

1.1.6.3. Relation entre $K_L a$ et concentration en CO_2

La cinétique de désorption du CO_2 est très lente, contrôlée par la réaction d'hydratation ($CO_{2\text{aq}} + H_2O \xrightleftharpoons{k_1} H_2CO_3$; $k_1=2,6.10^{-3}$; Sander, 1999). L'équilibre entre les espèces dissoutes et le gaz n'est donc pas instantané, et puisque le CO_2 est produit en phase liquide, il est souvent en sursaturation dans le milieu. Des dérivés du CO_2 présents en phase liquide, seul le CO_2 dissous participe au transfert à l'interface gaz-liquide. Comme pour le transfert d'oxygène, le transfert de CO_2 obéit à l'équation suivante en régime permanent :

$$\frac{W_{CO_2}}{V_L} = K_L a_{CO_2} \cdot (x_{CO_2} - x_{CO_2}^*) \quad (19)$$

où $K_L a_{CO_2}$ est le coefficient de transfert global du CO_2 , rapporté à la phase liquide, x_{CO_2} et $x_{CO_2}^*$ sont les concentrations de CO_2 dissous et en équilibre avec la phase gaz, respectivement. x_{CO_2} est supérieur à $x_{CO_2}^*$ du fait de la production de CO_2 en phase liquide. Si on suppose pour les deux gaz que l'aire d'échange est identique (soit que la désorption de CO_2 ne s'effectue qu'au travers de l'interface gaz-liquide, c'est-à-dire sans nucléation de bulle de CO_2), $K_L a_{CO_2}$ peut être exprimé en fonction de $K_L a_{O_2}$ (calculé pour l'oxygène). On peut en effet approximer le coefficient de transfert d'un gaz i , k_{Li} , à partir du coefficient de transfert d'un gaz de référence, k_{Lref} , en utilisant une relation de transfert local (Eq. 14, Eq. 15, Eq. 16) (Linek et coll., 1987) car le rapport des coefficients de diffusion, à même température et composition du milieu, est constant (in Royce et Thornhill, 1991). Par exemple à partir du modèle de Higbie (Eq. 15) :

$$k_{Li} = k_{Lref} \sqrt{\frac{D_i}{D_{ref}}} \quad (20)$$

A partir de la dynamique de transfert du CO_2 (supposée évoluer similairement à celle de l'oxygène), Royce et Thornhill (1991) calculent l'excès de CO_2 , ξ , qui représente le rapport entre le CO_2 dissous et la valeur de l'équilibre (Figure 2). ξ diminue lorsque la valeur du $K_L a$

de l'oxygène augmente (à plus forte agitation le transfert est meilleur : la concentration dans le liquide tend à s'équilibrer avec celle du gaz); ξ diminue aussi lorsque l'aération diminue (une plus faible quantité d'air est saturée plus rapidement en CO_2). D'autre part, pour un couple de valeurs du coefficient respiratoire et du $K_L a$ de l'oxygène, il est possible de calculer l'excès de CO_2 maximum, obtenu en minimisant la valeur de l'oxygène dissous : l'excès diminue avec l'augmentation de la fraction de CO_2 en sortie de fermenteur (Royce et Thornhill, 1991). En conclusion du travail de Royce et Thornhill (1991), lorsque la valeur du $K_L a$ de l'oxygène est élevée ($>0,1 \text{ s}^{-1}$) et que la concentration en CO_2 en sortie de fermenteur est élevée ($>5\%$ pour $QR=1$), la valeur du CO_2 dissous peut être approximée avec un minimum d'erreur par la concentration en équilibre avec le gaz de sortie. Le CO_2 étant très soluble dans l'eau, le potentiel de transfert en entrée de fermenteur est très grand. Ainsi, dans les fermenteurs industriels l'équilibre est atteint rapidement dans le bas du fermenteur ; la concentration de CO_2 dissous peut donc être considérée comme étant à l'équilibre avec la fraction de CO_2 dans le gaz de sortie (Yagi et Yoshida, 1977 ; Royce et Thornhill, 1991).

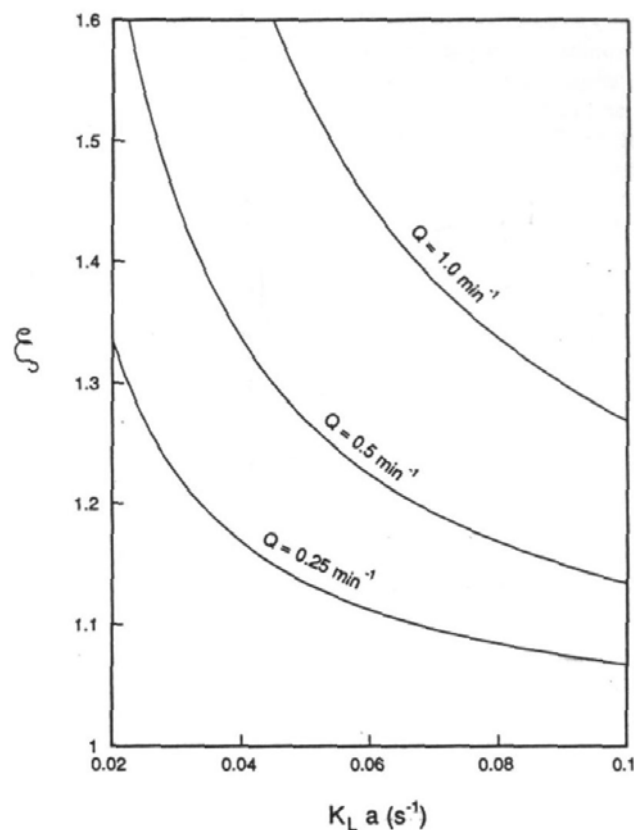


Figure 2. Effet des paramètres de transfert sur la sursaturation en CO_2 (d'après Royce et Thornhill, 1991). La sursaturation $\xi = [\text{CO}_2]/[\text{CO}_2]_{\text{eq}}$ est donnée en fonction du flux d'aération Q , et du coefficient de transfert de l'oxygène $K_L a$, à 30°C et à pression atmosphérique dans l'eau.

Les résultats expérimentaux de Dahod (1993) confortent les tendances prévues par l'analyse théorique de Royce et Thornhill (1991) : la sursaturation en CO₂ dissous en culture de *Streptomyces* (600 L, 3 Rushton, 0,2<vvm<1, 170<N<290 rpm) diminue lorsque l'agitation augmente et le flux d'aération diminue. Dahod (1993) réalise deux cultures, la première faiblement visqueuse (< 100 cp), la seconde plus visqueuse (2000-3000 cp) ; les conditions opératoires étant fixées, la sursaturation dans la culture la plus visqueuse est toujours plus élevée et peut atteindre 1,9 contre 1,3 dans la culture moins visqueuse : la sursaturation augmente avec la viscosité de la culture. Cette tendance est aussi prévue par Royce et Thornhill (1991) car l'augmentation de la viscosité entraîne la diminution de K_La (Figure 2). Par contre Dahod (1993) conteste l'hypothèse d'un rapport K_La_{O2}/K_La_{CO2} constant, qu'il estime expérimentalement à 0,33 à faible viscosité, et à 0,6 à forte viscosité, mais sans détailler sa méthode de calcul de K_La.

Dans la couche limite autour d'une bulle, la concentration de CO₂ passe de la valeur moyenne présente au cœur du fluide, à la valeur en équilibre avec la phase gazeuse. Près de l'interface gaz-liquide, l'équilibre de la réaction d'hydratation-déshydratation peut donc se déplacer vers la production de CO₂ (déshydratation). Une possible accélération de la désorption de CO₂ peut alors avoir lieu dans le cas où le flux de la réaction de déshydratation vers la production de CO₂ est significatif comparé au flux désorbé. Ce cas, rare en cultures microbiennes, n'apparaît que si le système contient un catalyseur tel que l'anhydrase carbonique. L'accélération de la désorption est alors d'autant plus forte que le pH est élevé (Yagi et Yoshida, 1977). Autrement il est démontré que l'accélération de la désorption est négligeable (Yagi et Yoshida, 1977 ; Royce et Thornhill, 1991). La désorption est donc placée sous l'unique contrôle diffusionnel et ne dépend pas du pH.

Dans la plupart des milieux de fermentation la désorption du CO₂ s'effectue facilement lorsque la concentration en CO₂ dépasse la concentration de saturation, mais elle peut devenir limitante en milieu complexe. Le CO₂ peut alors être évacué par nucléation. La nucléation du CO₂ est favorisée par la présence de bulles, de surfaces irrégulières, mais aussi de particules solides comme les cellules elles mêmes, et par l'augmentation de l'agitation (Jones et Greenfield, 1982).

I.2. Influences physiques, chimiques, et mécaniques sur $K_L a$

La valeur de $K_L a$ n'est pas une donnée intrinsèque des échangeurs gaz-liquide car en plus de dépendre de la configuration et des paramètres opératoires de l'échangeur, elle dépend des propriétés des fluides en contact. Pour identifier et quantifier les paramètres ayant une influence sur $K_L a$, il est nécessaire de dissocier le produit $K_L a$ en ses facteurs : K_L la conductance globale définie par rapport à la phase liquide, et a l'aire interfaciale. K_L et a varient de manière différente en fonction de l'hydrodynamique (type de réacteur, géométrie, conditions opératoires), des propriétés physiques et chimiques du liquide (présence d'agents de surface, viscosité, ...) et de la température.

I.2.1. Effet de la puissance dissipée sur $K_L a$

Le réacteur agité (« stirred tank reactor », STR) est, avec la colonne à bulles, le réacteur le plus utilisé en culture microbienne. En réacteur agité la puissance est fournie au liquide par l'intermédiaire des turbines d'agitation. Le réacteur agité est fondamentalement différent de la colonne à bulles car c'est au niveau de l'agitateur que la dispersion gazeuse se forme, et non au niveau du distributeur d'air. La puissance dissipée assure donc la dispersion gazeuse et la mise en contact du gaz avec le liquide. Par contre le système d'apport de gaz (canne ou diffuseur) n'a pas d'importance sur le transfert gazeux en réacteur agité, pourvu que le gaz arrive sous l'agitateur et que celui-ci ait une vitesse assez importante pour disperser tout le gaz. Le réacteur agité est préféré à la colonne à bulles pour privilégier l'homogénéité du mélange et le transfert de matière, en particulier le transfert gazeux, avec l'obtention de surfaces d'échange très importantes entre le gaz et le liquide.

I.2.1.1. Corrélations empiriques

$K_L a$ est le plus souvent modélisé de manière empirique à partir de la puissance dissipée par unité de volume, e , et de la vitesse superficielle du gaz, U_s (van't Riet, 1979 ; Ho et coll., 1987 ; Linek et coll., 1987 ; Montes et coll. 1999 ; Gogate et Pandit, 1999 ; Garcia-Ochoa et Gomez, 2004) :

$$K_L a = \chi \cdot e^\alpha \cdot U_s^\beta \quad (21)$$

où $e = P_G / V_L$, avec P_G la puissance dissipée dans le réacteur en condition d'aération, et V_L le volume liquide.

Compte tenu du grand nombre de modèles permettant le calcul de $K_L a$, les valeurs des coefficients α et β sont très dispersées ($0,4 < \alpha < 1,3$; $0 < \beta < 0,7$). χ est en général dépendant de

α : à une faible valeur de α correspond une forte valeur de χ (Robinson et Wilke, 1973 ; Linek et coll., 1988b). Il est une convention établie de distinguer les milieux non ioniques (ou coalescents) des milieux ioniques (ou non coalescents), ainsi que les milieux non-visqueux des milieux visqueux (coalescents ou non). Conformément aux travaux d'une dizaine d'auteurs, van't Riet (1979) propose pour un système agité (sans engorgement et sans aération de surface), les relations suivantes, validées avec 20 à 40% d'erreur :

- en solution non ionique, pour $500 < e < 10000 \text{ W.m}^{-3}$ et $0,002 < V_L < 2,6 \text{ m}^{-3}$:

$$K_L a = 2,6 \times 10^{-2} \cdot e^{0,4} \cdot U_S^{0,5} \quad (22)$$

- en solution ionique, pour $500 < e < 10000 \text{ W.m}^{-3}$; $0,002 < V_L < 4,4 \text{ m}^{-3}$:

$$K_L a = 2,0 \times 10^{-3} \cdot e^{0,7} \cdot U_S^{0,2} \quad (23)$$

Pour s'affranchir de la mesure de la puissance dissipée, Yawalkar et coll. (2002) proposent de corréler $K_L a$ à la dispersion relative, N/N_{DC} , où N_{DC} est la vitesse d'agitation minimum permettant la dispersion complète de la phase gaz dans tout le volume du réacteur. Ainsi ils obtiennent :

$$K_L a = 3,35 \left(\frac{N}{N_{DC}} \right)^{1,464} U_S \quad (24)$$

$K_L a$ dépend de la puissance dissipée par unité de volume, indépendamment du type et du nombre d'agitateurs pour un système non visqueux (van't Riet, 1979). Cependant, pour une même vitesse d'agitation, la puissance dissipée dépend du type d'agitateur. En régime turbulent c'est la turbine Rushton à disque qui, à même vitesse d'agitation, fournit le plus de puissance au liquide ; c'est une des raisons pour laquelle elle est très utilisée en fermentation. On peut lui trouver le désavantage de générer une dispersion radiale, créant ainsi, le long du fermenteur, des zones de mélange hétérogènes entre elles, lorsque plusieurs turbines Rushton sont utilisées dans un même réacteur. Dans certains cas on observe même l'augmentation du temps de mélange avec l'augmentation du nombre de turbines (Vasconcelos et coll., 1995). Il est possible de remédier au problème en intercalant une turbine à dispersion radiale (Schmalzriedt et coll., 2003). La place des agitateurs est importante : un agitateur placé à une distance du fond inférieure à celle de son diamètre peut diminuer la puissance dissipée, et donc le transfert, de même pour un agitateur placé trop près de la surface libre (Nienow et coll., 1977).

1.2.1.2. Influence de la puissance dissipée sur k_L , approches théoriques

Cette partie théorique présente des modèles de la conductance en phase liquide, k_L (et non de la conductance globale K_L). Les théories diffèrent sur la manière dont s'opère le transfert interfacial. C'est une des controverses les plus disputées en matière d'aération. On distingue deux groupes de modèles :

- Les modèles d'eddy, indépendants du diamètre de bulle.
- Les modèles de vitesse de glissement, dépendants du diamètre de bulle.

a) Dans les modèles d'eddy, il est supposé que le renouvellement de l'interface est dû aux tourbillons de petite échelle du champ turbulent (Lamont et Scott, 1970). Ces tourbillons existent à des échelles inférieures à celle des bulles : dans ce cas le diamètre de bulle n'est pas un paramètre déterminant du calcul de k_L :

$$k_L = c_1 \sqrt{D_L} \left(\frac{e}{\mu} \right)^{\frac{1}{4}} \quad (25)$$

où c_1 est une constante estimée différemment selon les auteurs ($2/\sqrt{\pi}$, Garcia-Ochoa et Gomez, 2004 ; 0,523, Linek et coll., 2004 ; 0,448, Linek et coll., 2005), et D_L le coefficient de diffusion du gaz dans le liquide. Eq. 25 est établie à partir du model de Higbie (1935), mais tous les modèles locaux de transfert prédisent l'augmentation de K_L avec e , soit par la réduction de la couche limite (Eq. 14), soit par la réduction du temps d'exposition de l'élément de volume (Eq. 15), ou par l'augmentation de la fraction renouvelée par unité de temps (Eq. 16). Linek et coll. (2005) valident la proportionnalité entre k_L et $e^{1/4}$ pour toutes sortes de milieux non-coalescents, excepté pour l'ajout de longues fibres de carboxyméthyl cellulose de sodium CMC TS.20 et pour l'océnol (agent antimousse), avec lequel les exposants sont inférieurs (0,09 et 0,188, respectivement).

Garcia-Ochoa et Gomez (2004) proposent une valeur de $K_L a$ basée sur des approches théoriques, utilisant d'une part Eq. 25 pour le calcul de k_L , et d'autre part l'évaluation de l'aire interfaciale a à partir de la rétention gazeuse et d'une taille de bulle moyenne. Le développement de Garcia-Ochoa et Gomez (2004) est validé pour différents fluides visqueux et converge très bien vers la corrélation empirique décrite par Eq. 21. Cependant le domaine de validation reste restreint ($e < 2 \text{ kW.m}^{-3}$; $10^{-3} < U_S < 5.10^{-3} \text{ m.s}^{-1}$; $3,6 \text{ h}^{-1} < K_L a < 100 \text{ h}^{-1}$) et les valeurs de la littérature servant de validation sont discutables : le travail de Linek et coll. (1987) est cité pour valider une corrélation en milieu newtonien, mais la même publication est écartée lorsqu'elle propose, en milieu non-newtonien, un coefficient pour la viscosité

apparente au moins trois fois inférieur à celui de Garcia-Ochoa et Gomez. Un développement similaire est proposé par Kawase et Moo-Young (1990, 1991) pour le calcul de $K_L a$ en colonne à bulles dans le cas de fluides présentant une contrainte seuil («yield stress»).

b) Pour les modèles de vitesse de glissement, le transfert interfacial dépend de la nature de l'interface, selon qu'elle est mobile ou rigide. Pour ces modèles k_L diminue avec le diamètre de bulle selon une relation du type (Midoux et coll., 1980) :

$$k_L = \overline{k_L} \delta_0^\omega \quad (26)$$

où δ_0 est un diamètre relatif et $\overline{k_L}$ la valeur de k_L pour $\delta_0=1$; ω vaut en général -0,5.

Alves et coll. (2004) proposent, pour l'interface mobile, le modèle de Higbie (Eq. 15), avec $t_e=d_b/v_g$ où d_b est le diamètre de bulle et v_g la vitesse de glissement (vitesse relative du liquide par rapport à la bulle) :

$$k_L^{\text{mobile}} = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \sqrt{\frac{v_g D_L}{d_b}} \quad (27)$$

et pour l'interface rigide, une équation établie par Frössling (1938) :

$$k_L^{\text{rigide}} = c \sqrt{\frac{v_g}{d_b}} \cdot D_L^{2/3} \cdot \nu^{-1/6} \quad (28)$$

où ν est la viscosité cinématique et c une constante évaluée entre 0,42 et 0,95. Eq. 27 prévoit des valeurs de k_L entre 4 et plus de 8 fois supérieures à celles issues de Eq. 28.

Alves et coll. (2004) présentent un modèle de transfert basé sur une cinétique de contamination de l'interface par des surfactants. Les bulles arrivent dans le liquide avec une interface libre qui est peu à peu contaminée par les surfactants, depuis la zone de traînée jusqu'à une certaine hauteur de transition sur la hauteur de la bulle. Lorsque cette hauteur est atteinte, l'interface devient subitement rigide. Le temps de contamination pour les petites bulles est très court, ce qui explique l'idée répandue que les petites bulles ($d_b < 1$ mm) ont une interface rigide, tandis que les grosses bulles ($d_b > 2,5$ mm) ont une interface mobile (Calderbank et Moo-Young, 1961). Dans les modèles antérieurs à celui d'Alves et coll. (2004) la transition entre les deux types d'interface n'est ni expliquée, ni modélisée. Alves et coll. (2004) relie la rigidité de l'interface à la taille de la bulle et à son temps de séjour dans le réacteur, et calculent k_L comme une moyenne pondérée entre les équations Eq. 27 et Eq. 28 : le profil de k_L est donc décrit de manière continue entre la première et la seconde équation, à taille de bulle décroissante, ou à temps de séjour de bulle croissant. Similairement, Benedek et Heideger (1971) établissent que $K_L a$ dépend du diamètre de bulle ($K_L a = f(d_b^{-0,5})$),

lui-même dépendant de l'agitation ($d_b=f(N^{-0,24})$). Par contre Benedek et Heideger (1971) concluent que k_L est contrôlé par le renouvellement de surface qui diminue avec la diminution du diamètre de bulle. Ils proposent donc une relation continue –dépendante des propriétés du milieu– entre k_L et le diamètre de bulle. Contrairement aux modèles d'eddy, la taille de bulle est un paramètre très important des modèles de glissement.

Ho et coll. (1987) démontrent expérimentalement la proportionnalité entre k_L et $D_L^{2/3}$ en cuve agitée dans des solutions d'électrolytes ($V_L=14$ L, 2 turbines, $N=400-800$ rpm).

c) Conclusions.

Les deux modèles théoriques sont contradictoires : à agitation croissante, le modèle d'eddy prévoit une augmentation de k_L , alors que le modèle des vitesses de glissement, puisque la taille de bulle diminue, prévoit le passage de k^{mobile} vers k^{rigide} , c'est-à-dire une diminution de k_L .

Linek et coll. (2004 et 2005) estiment que seul le modèle d'eddy est valable, même en présence de surfactant et d'agent viscosant. Ils soutiennent ardemment depuis plusieurs années que les publications qui établissent le contraire en cuves agitées sont basées sur une mauvaise évaluation de $K_L a$ (puisque K_L est souvent mesuré par le rapport $K_L a/a$), (Linek et coll., 1987, 1988b, 2004, 2005).

La présence de ces deux conceptions, eddy et vitesse de glissement, ouvre un débat plus large. En effet le modèle d'eddy semble s'appliquer aux dispersions avec agitation mécanique, tandis que le modèle de vitesse de glissement s'applique aux dispersions non-agitées (parmi les 11 auteurs que citent Ho et coll. (1987) pour avoir trouvé une proportionnalité entre k_L et $D_L^{2/3}$, un seul a travaillé en cuve agitée). Le mécanisme de transfert serait donc différent selon qu'il y ait agitation ou pas (Bouaifi et coll., 2001 ; Linek et coll., 2005).

1.2.1.3. Influence de la puissance dissipée sur l'aire interfaciale

Dans le prolongement directe de l'influence de la puissance dissipée sur l'aire interfaciale, l'aire interfaciale étant dépendante du diamètre de bulle, les corrélations permettant d'évaluer le diamètre théorique des bulles seront exposées, suivies des mesures expérimentales réalisées en cuve agitée, et de l'influence des microbulles sur la détermination de $K_L a$.

a) Corrélations

Le modèle utilisé pour décrire $K_L a$ (Eq. 21) est aussi utilisé pour décrire l'aire interfaciale a (Ho et coll., 1987 ; Takahashi et coll., 1992) : $a = \chi_1 \cdot e^{\alpha_1} \cdot U_s^{\beta_1}$

L'aire interfaciale s'exprime géométriquement en fonction de la rétention gazeuse ε (« hold-up »), et du diamètre moyen de bulle d_b :

$$a = \frac{6\varepsilon}{d_b} \quad (29)$$

avec $\varepsilon = V_G/V_L$, V_G étant le volume de gaz dispersé.

L'augmentation de la puissance dissipée permet d'une part de réduire le diamètre moyen des bulles et d'autre part d'augmenter la rétention gazeuse en maintenant plus de bulles dans le liquide. Il existe aussi une vitesse d'agitation limite qui permet une répartition optimum de gaz dans l'ensemble du réacteur (Nienow et coll., 1977), estimée en terme de vitesse de cisaillement (vitesse du bout de pale) entre 2 et 2,5 m.s^{-1} (van't Riet, 1979). Enfin, que ce soit en système coalescent ou non, à puissance dissipée équivalente, aucune influence évidente du type de turbine sur la taille des bulles n'est remarquée (Alves et coll., 2002) (sont comparées Rushton, Prochem Maxflo et lame plate (« flat blade »)).

b) Diamètre théorique de bulle

La relation entre la taille de bulle et la puissance dissipée est d'abord développée par Hinze (1955) pour les gouttes, pour ensuite être vérifiée par Calderbank (1958) pour les bulles.

Hinze (1955) suppose que la taille des gouttes dans le flux turbulent est contrôlée d'un côté par les phénomènes de rupture générés par la turbulence, et de l'autre par les forces de cohésion de tension de surface qui s'opposent à la rupture. A partir du nombre de Weber il définit un nombre de Weber critique :

$$(N_{We})_{crit} = \frac{\overline{\rho v^2} d_{MAX}}{\sigma} \quad (30)$$

où $\overline{v^2}$ est la moyenne, sur le volume considéré, du carré des gradients de vitesse sur une distance égale à d_{MAX} , le diamètre stable maximum, et σ la tension de surface. L'addition de sels augmente la tension de surface (jusqu'à quelques pourcents seulement) alors que l'addition de substances organiques la diminue dans la majorité des cas (jusqu'à plusieurs dizaines de pourcents) (Marrucci et Nicodemo, 1967). La goutte est stable si son nombre de Weber est inférieur à son nombre de Weber critique, et se désintègre dans le cas contraire.

Dans le cas d'une turbulence homogène isotrope, Hinze (1955) propose un diamètre stable maximum, appliqué aux émulsions de liquides :

$$d_{MAX} = C \left(\frac{\sigma}{\rho} \right)^{3/5} e_d^{-2/5} \quad (31)$$

où e_d est le taux de dissipation de l'énergie turbulente par unité de masse.

Par similitude, à partir de la distribution de taille des bulles, il est possible de calculer un diamètre moyen de Sauter, d_s :

$$d_s = \frac{\sum n_i d_i^3}{\sum n_i d_i^2} \quad (32)$$

Il est couramment supposé que le diamètre de Sauter est proportionnel à d_{MAX} :

$$d_s = C' d_{MAX} \quad (33)$$

e_p est souvent estimé comme étant la puissance dissipée par unité de masse, $P_G/\rho V_L = e/\rho$. Alves et coll. (2002) vérifient la relation en reliant la taille de bulle à la puissance dissipée par unité de volume :

$$d_s = C'' e^\phi \quad (34)$$

avec, pour un système non-coalescent $\phi = -0,52$ en décharge de turbine (c'est-à-dire en bout de pale, là où les bulles sont formées, et avant qu'elles ne coalescent), et $-0,37$ dans le cœur du fluide ; et pour un système coalescent $\phi = -0,24$ en décharge de turbine, et $-0,14$ dans le cœur du fluide. Les exposants sont différents de la valeur théorique $\phi = -0,4$ liée à l'analyse de Hinze (1955). Il semble donc que le diamètre théorique des bulles dépende largement des phénomènes de coalescence, non considérés par Hinze.

Enfin, d_s augmente légèrement avec la masse moléculaire du gaz M_g : d_s est une fonction linéaire de $M_g^{0,11}$ (Takahashi et coll., 1992) :

c) Mesure de la taille des bulles en cuve agitée

Les méthodes de mesure de la taille des bulles sont directes (visuelles) ou indirectes. Les méthodes directes par film vidéo ou photographies sont les plus sensibles et détectent des diamètres de bulle minimum d_{bm} de 40 μm (Alves et coll., 2002). Elles peuvent présenter l'avantage d'être non-intrusives mais alors elles ne permettent que d'effectuer une mesure en bordure de paroi à cause de la gêne optique (Takahashi et coll., 1992). Les méthodes indirectes sont très nombreuses (Alves et coll., 2002). On peut citer, par sensibilité décroissante, les méthodes par sonde conductimétrique ($d_{bm} = 0,98$ mm) et par sonde

photoélectrique capillaire à succion ($d_{bm}=550 \mu\text{m}$ par Morão et coll., 1999 ; $300 \mu\text{m}$ par Alves et coll., 2002).

Alves et coll. (2002 et 2004) ont mesuré la distribution de taille des bulles dans un réacteur biétagé de 40 L en réalisant des prélèvements dans 31 zones représentatives de l'hydrodynamique du réacteur. On remarque que quelle que soit la zone, la répartition de taille n'est pas symétrique et les plus petites bulles sont majoritaires. D'autre part la taille moyenne de bulle croît très rapidement dans le flux de décharge de la turbine : dans le plan de l'agitateur, d_s mesuré en limite de pale est de 2 à 6 fois plus petit que mesuré en bordure de paroi, selon les conditions expérimentales (également vérifié par Takahashi et coll., 1992). Enfin, les bulles produites par la turbine du bas sont plus grosses que celles produites par la turbine du haut : la turbine du bas étant plus engorgée de gaz, elle dissipe une puissance inférieure à celle du haut (en accord avec Linek et coll., 2004). A partir de l'ensemble des diamètres de Sauter locaux, il est possible de définir un diamètre moyen sur le réacteur ; le diamètre moyen mesuré en paroi est une bonne approximation du diamètre moyen global, bien que légèrement inférieur (Alves et coll., 2002).

d) Impact des microbulles sur la détermination de $K_L a$

Les microbulles sont des bulles de diamètre largement inférieur au millimètre, stabilisées mécaniquement par une couche de surfactants, laquelle forme une double couche électrique qui réduit la coalescence (Worden and Bredwell, 1998a). L'augmentation de l'épaisseur de la couche de surfactants autour des plus petites microbulles leur confèrerait une plus grande stabilité (Worden and Bredwell, 1998b). Ainsi, l'interface des microbulles est immobile et leur coefficient de transfert, K_L , diminue avec la taille de la microbulle (Eq. 28). La stabilisation des microbulles leur confère des propriétés de colloïdes (elles sont parfois nommées « colloidal gas aphrons »).

En système aéré visqueux des microbulles constituent une rétention gazeuse résiduelle (Heijnen et coll., 1980 ; Vasconcelos et Alves, 1991). Ces microbulles s'échappent très lentement du liquide lorsque l'apport de gaz est arrêté (de l'ordre de l'heure) ; elles sont donc considérées en équilibre avec le liquide (obéissant à la loi de Henry : $x_{O_2}(t)=RTH_{y_{O_2}}(t)$). A cause de la rétention résiduelle, la capacité d'absorption gazeuse d'un élément de liquide 'homogène' peut être faussée car le gaz a tendance à s'accumuler dans la phase gazeuse des microbulles. C'est par exemple le cas de l'oxygène qui est 32 fois plus concentré (en mol.L^{-1} , à 25°C) dans le gaz que dans la phase liquide en rapport d'équilibre. Cet effet est responsable de réduire jusqu'à quatre fois les valeurs apparentes de la vitesse de respiration, q_{O_2app} , et de

$K_{L,a}$, $K_{L,a_{app}}$, calculées par la méthode dynamique de réoxygénation, par rapport aux mêmes valeurs calculées par la méthode continue des bilans gazeux, pendant une fermentation de *Streptomyces aureofaciens* (300 L, 0,8 vvm, 280 rpm) (Vasconcelos et Alves, 1991). Dans la méthode dynamique les microbulles ont un rôle tampon en alimentant le milieu en oxygène pendant l'arrêt de l'aération et en se régénérant en oxygène en même temps que la phase liquide dès le retour de l'aération. Il est montré que les rapports q_{O_2}/q_{O_2app} et $K_{L,a}/K_{L,a_{app}}$ sont proportionnels à $\varepsilon_p/(1 - \varepsilon_p)$ où ε_p est la rétention gazeuse permanente (Vasconcelos and Alves, 1991).

I.2.2. Effet du débit d'aération sur $K_{L,a}$

On distingue l'aération par le diffuseur, classiquement employée, de l'aération de surface, généralement ignorée.

I.2.2.1. Aération par le diffuseur

L'augmentation du débit d'aération injecté par le diffuseur peut permettre d'augmenter l'aire interfaciale et donc $K_{L,a}$ (Eq. 21) (Ho et coll., 1987). Pour cela le choix du débit d'aération doit être envisagé de manière coordonnée avec la puissance dissipée par l'agitation. Si le gaz impose l'écoulement dans le réacteur il y a engorgement (« flooding ») (Nienow et coll., 1977) et l'aire interfaciale est considérablement réduite, alors qu'au dessus d'une vitesse d'agitation critique l'aire interfaciale est indépendante du flux de gaz dispersé ($N_{crit}=600$ rpm, pour $d_T=19$ cm, $d_D=7,5$ cm, en solution de sulfite) (Linek et coll., 2005).

I.2.2.2. Aération de surface

L'aération de surface s'effectue avec ou sans entraînement de bulles. En cuve agitée l'aération de surface sans entraînement de bulle, c'est-à-dire par diffusion depuis le ciel à travers la surface libre du liquide, peut souvent être négligée devant $K_{L,a}$ (Veljković et coll., 1991). Par contre l'aération de surface avec entraînement de bulles peut générer une large aire interfaciale et devenir significative pour le transfert gazeux.

a) Description du phénomène d'entraînement de bulles

En cuve agitée sans dispositif d'aération submergé et pour un agitateur placé près de la surface statique du fluide, Wu (1995) décrit une vitesse d'agitation critique au dessous de laquelle la dispersion gazeuse ne s'opère qu'autour de l'agitateur, et au dessus de laquelle l'action de pompage de l'agitateur permet l'aspiration du ciel et la dispersion de bulles dans

tout le liquide. Dans une cuve aérée par le bas l'entraînement de surface est plus difficilement détectable mais existe également : Calderbank (1959) remarque que le flux en provenance du ciel peut être jusqu'à dix fois supérieur à celui apporté par l'aérateur. Dans cette même situation, il existe une vitesse d'aération critique relativement élevée ($U_s=6,5 \text{ mm.s}^{-1}$) en dessous de laquelle, pour une même valeur de K_{La} , il est moins coûteux (en terme de puissance d'agitation) d'utiliser l'aération de surface uniquement plutôt que l'aération par le diffuseur (Wu, 1995).

Le flux entraîné augmente avec le rapport d_T/d_D et est optimum pour un agitateur submergé de la moitié de son diamètre (Oldshue, 1980) ; il augmente avec la vitesse d'agitation car les vortex et les circulations internes du liquide sont plus intenses ; par contre il décroît rapidement avec U_s (Chapman et coll., 1980 ; Veljković et coll., 1991) parce que la surface libre devient plus calme (van't Riet, 1979). La présence de biomasse (*P. shermanii*, *S. cerevisiae*, *P. chrysogenum* sous forme de pellets de 1,6-1,75 mm et aussi de mycélium libres) bloque l'interface et peut réduire la valeur de l'aération de surface jusqu'à 20 fois comparé à un milieu synthétique de même viscosité apparente (calculée en terme de K_{La} , sans entraînement de surface ; $V_L=4 \text{ L}$; $N<700 \text{ rpm}$) (Galaction et coll., 2004). La réduction de l'aération de surface est aussi observée en solution électrolytique (Matsumura, 1977).

Le flux entraîné est en général supérieur en réacteur multi-turbines qu'en réacteur mono-turbine ; il dépend en particulier de la position de la turbine supérieure par rapport à l'interface (Veljković et Skala, 1989). L'optimisation du transfert gazeux dans un réacteur multi-turbines peut être réalisée en aérant d'une part au fond du réacteur sous un agitateur radial dans une région munie de contre-pales, et d'utiliser d'autre part l'agitateur du haut, dans une région sans contre-pale, pour favoriser le transfert axial en faisant recirculer depuis le ciel le gaz n'ayant pas réagit (Oldshue, 1980).

L'entraînement de surface, perturbe le schéma gazeux comme illustré sur la Figure 3 : en l'absence d'entraînement de surface le profil piston du gaz, assuré par le flux en provenance du diffuseur Q_d , est représenté en trait plein. En présence d'entraînement de surface le flux entraîné Q_e s'additionne à Q_d , et appauvrit le profil gazeux, représenté en trait pointillé. Dans cet exemple la concentration dans le ciel est inférieure à la concentration y^{off} d'évacuation du gaz de la phase liquide en l'absence d'entraînement de surface, et le gaz en provenance du diffuseur coalesce avec le gaz entraîné, mais plusieurs configurations sont envisageables. Dans la littérature K_{La} est mesuré en l'absence d'entraînement de surface, c'est-à-dire par rapport au flux de gaz en provenance du diffuseur. Lorsque K_{La} est tracé en fonction de la puissance dissipée on observe une rupture de la courbe au moment où

l'entraînement de surface apparaît : la valeur apparente de $K_{L,a}$, mesurée sans tenir compte de l'entraînement de surface, peut se trouver au dessus ou en dessous de la tendance dégagée en l'absence d'entraînement de surface (à faible puissance dissipée), selon que le potentiel de transfert entre le ciel et le liquide homogène est respectivement positif ($K_{L,a}$ mesuré en condition de culture) ou négatif (cas de la réoxygénation $N_2 \rightarrow \text{Air}$).

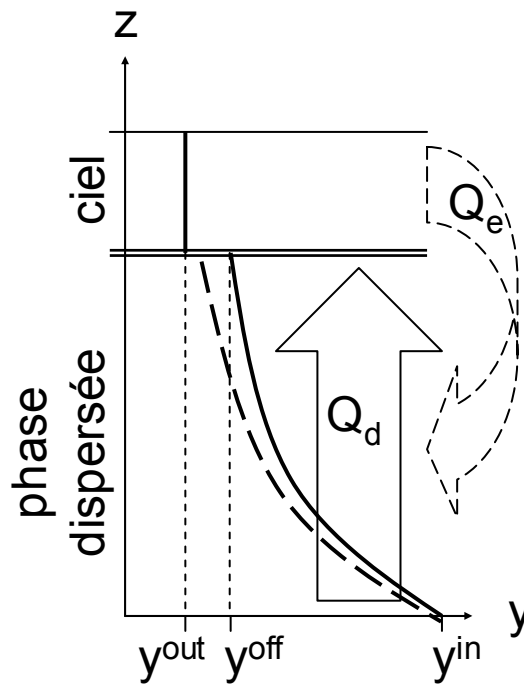


Figure 3. Perturbation du potentiel de transfert en présence d'entraînement de surface. Le gaz entre dans le réacteur à la concentration en oxygène y^{in} , ressort de la phase dispersée à la concentration y^{off} , et du réacteur à la concentration y^{out} . — profil gazeux de concentration en l'absence d'entraînement de surface (aération par le flux Q_d uniquement). — — profil gazeux de concentration en présence d'entraînement de surface (aération par le flux Q_d et Q_e).

En culture cellulaire, l'entraînement de surface peut être avantageux car il permet le ravalement des mousses, et lorsque l'aération est assurée par un diffuseur, l'aération par la surface peut être vue comme un recyclage du gaz qui a déjà traversé le liquide sans s'absorber, et augmenter ainsi l'efficacité du transfert gazeux.

b) Quantification et modélisation

Pour les réacteurs aérés uniquement par la surface avec entraînement de bulles, un $K_{L,a}$ global (diffusion+entraînement) est utilisé ; la méthode dynamique de réoxygénation permet le calcul de cette valeur de $K_{L,a}$ de la même manière que pour une aération par un diffuseur (Kamen et coll., 1995). Lorsque l'aération de surface a lieu en complément de l'aération par

un diffuseur, des modèles sont développés en régime permanent et dans l'hypothèse d'homogénéité totale entre toutes les bulles (Chapman et coll., 1980 ;). Ils font apparaître deux K_{La} : le premier tient compte des échanges entre les bulles homogènes (formées de gaz du diffuseur et de gaz entraîné) et le liquide, le second tient compte des échanges par diffusion entre le ciel et le liquide, mais les valeurs de ces K_{La} ne sont pas mesurées. Par contre les études se concentrent sur la mesure de trois flux de matière : par le diffuseur, par aspiration à la surface, et par diffusion à la surface. Des fonctions de la puissance dissipée et du flux d'aération sont fréquemment utilisées pour décrire le rapport α_{SA} entre le flux réincorporé et le flux dispersé par l'aérateur, par exemple Veljković et Skala (1989) proposent pour un réacteur à deux turbines ($V_T=14$ L ; $d_T=0,22$ m ; $d_D/d_T=2,75$) :

$$\alpha_{SA} = \frac{Q_e}{Q_d} = 6,2 \times 10^{-14} P_G^{1,5} Q_S^{-2,2} \quad (35)$$

où Q_e est le flux entraîné et Q_d le flux débité par le diffuseur.

Dans une colonne à bulles agitée, Chisti et Jauregui-Haza (2002), estiment l'aération de surface en $e^{1,2N}$ mais la contribution de l'aération de surface ne compte que pour 12% du transfert d'oxygène total.

Sauf exceptions (par exemple pour Robinson et Wilke, 1973) l'existence de l'aération de surface n'est pas considérée dans le calcul de K_{La} : souvent parce que la géométrie du fermenteur et les vitesses d'agitation utilisées écartent expressément toute situation d'entraînement de surface.

I.2.3. Effet des solutés sur K_{La} (force ionique)

Cette partie permet d'identifier :

- La réduction de la coalescence due à l'effet des solutés, et en particulier des sels.
- Une analyse quantitative. Une modification du modèle Eq. 21 est proposé.

a) Réduction de la coalescence.

Il existe une différence fondamentale entre les liquides purs qui permettent une coalescence facile, et les solutions aqueuses qui inhibent la coalescence, sans doute par la répulsion de forces électriques localisées sur les interfaces (Marrucci et Nicodemo, 1967). La coalescence est d'autant plus réprimée que la différence d'hydrophilie entre la partie hydrophile et la partie hydrophobe de la molécule de soluté est forte. Par exemple la coalescence commence à être réprimée à partir de 1M de saccharose, 10^{-2} M de sel, et 10^{-3} M

d'éthanol (Keitel et Onken, 1982). Ceci laisse à penser que la répression de la coalescence serait liée à une stabilisation des interfaces par adsorption des solutés (Linek et coll., 1988b).

Si le système est non-coalescent la distribution des diamètres de bulles est réduite car le diamètre généré par le système de production de bulles (distributeur dans le cas de colonne à bulles, pales dans le cas de réacteur agité) est conservé. Si le système est coalescent la distribution est plus large car des bulles de plus gros diamètres sont produites ; la coalescence a souvent lieu très près du système de production de bulles et les diamètres sont ensuite conservés dans le reste du réacteur (Marrucci et Nicodemo, 1967, colonne à bulles ; Alves et coll., 2002, réacteur agité). Pour l'ensemble des solutés étudiés (sels, alcools, saccharose, carboxyméthyl-cellulose, Tween 20, etc...) la coalescence diminue avec l'augmentation de la concentration en soluté, et il existe une concentration minimale en soluté à partir de laquelle cette décroissance s'amorce, et une concentration limite au dessus de laquelle la coalescence reste pratiquement indépendante de la concentration (Keitel et Onken, 1982, colonne à bulles, diamètre 20 cm, hauteur 2 m ; Marrucci et Nicodemo, 1967, colonne à bulles, diamètre 8 cm, hauteur 1 m). Dans le cas particulier des sels, l'ajout de sels provoque l'augmentation de la force ionique I de la solution :

$$I = \sum_i \frac{1}{2} x_i z_i^2 \quad (36)$$

où l'ion i de charge z_i est présent à la concentration x_i (mol.L^{-1}). L'augmentation de la force ionique induit la répression de la coalescence, ceci jusqu'à une force ionique seuil, située entre 0,25 et 0,4 mol.L^{-1} , selon les auteurs et le système considéré (Figure 4A). Il s'ensuit une diminution de la taille moyenne des bulles (Figure 4B) (Lessard et Zieminski, 1971 ; Keitel et Onken, 1982 ; Ho et coll., 1987), d'où l'augmentation de l'aire interfaciale (Eq. 29). Bien que les tailles de bulles entre colonnes à bulles et réacteurs agités ne puissent pas être comparées, il semblerait que les concentrations minimales et limite en soluté soient identiques dans ces deux systèmes (Keitel et Onken, 1982).

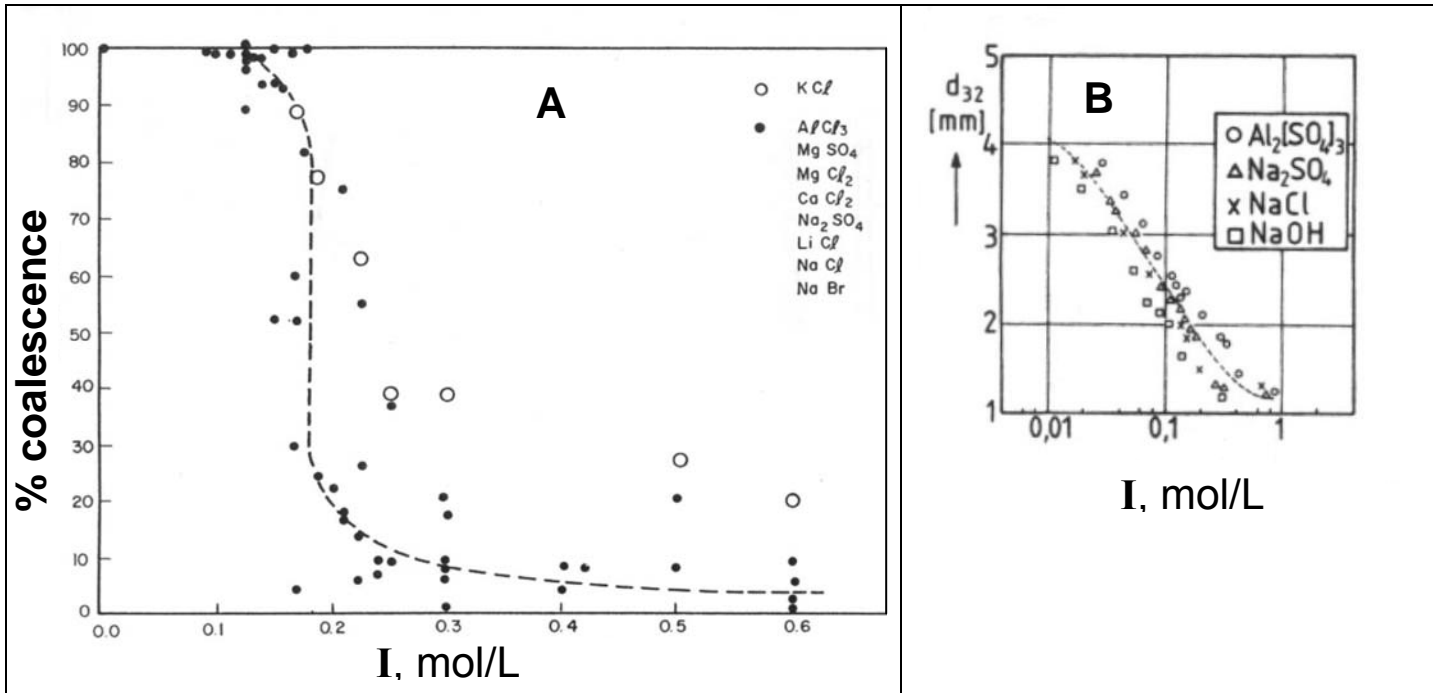


Figure 4. Effet des sels sur la coalescence. **A:** % coalescence en fonction de la force ionique I , d'après Lessard et Zieminski (1971). Expérience réalisée en mettant en contact deux bulles formées au bout de deux aiguilles. **B:** diamètre moyen des bulles en fonction de la force ionique I , d'après Keitel et Onken (1982). Expérience réalisée en colonne à bulle ($d_T=20$ cm), mesure de taille par succion.

b) Analyse quantitative.

L'effet des sels (plus généralement des solutés) sur $K_L a$ porterait essentiellement sur l'augmentation de l'aire interfaciale. L'influence sur k_L , liée à la réduction de la taille moyenne des bulles, est pour le moment incertaine et très discutée (I.2.1.1). On peut lire en effet de nombreux articles aux théories contradictoires, mais on peut toutefois différencier les travaux effectués en colonne à bulle de ceux effectués en cuve agitée. En colonne à bulles l'effet des sels serait ou bien marginal sur k_L (Keitel et Onken, 1982), ou bien pourrait augmenter k_L jusqu'à 25% par rapport à l'eau pure (Lessard et Zieminski, 1971). En cuve agitée par contre, avec des diamètres de bulle plus petits, les sels provoqueraient une diminution de k_L (Benedek et Heideger, 1971 ; $V_L=29$ L, $255 < N < 455$ rpm, 0,4 vvm).

L'ajout de sel augmente la valeur du coefficient α dans Eq. 21 (Robinson et Wilke, 1973). La force ionique de la solution, I (Eq. 36), a souvent été proposée comme paramètre de coalescence ; ainsi Robinson et Wilke (1973) ($V_L=2,5$ L, $400 < N < 2200$ rpm) proposent de corréliser α à I : α croît uniformément puis atteint une saturation à 0,90 pour I supérieur à 0,4 mol.L⁻¹ :

$$\alpha = 0,40 + \frac{0,862I}{0,274 + I}, 0 \leq I \leq 0,4 \text{ mol.L}^{-1} \quad (37)$$

où 0,4 est une valeur de α couramment proposée pour l'eau pure (van't Riet, 1979).

Pour Linek et coll. (1987) l'équation Eq. 21 est très générale (voire universelle), et leurs études en milieux plus ou moins visqueux et coalescents les confortent à penser que la valeur de l'exposant α ne dépend que de la capacité du système à coalescer. La caractéristique des électrolytes et autres solutés étant principalement de réduire la coalescence par rapport au liquide pur, Linek et coll. (1988b) proposent d'intégrer dans la modélisation de $K_L a$ un paramètre de coalescence plus général que I , en supposant comme Marrucci et Nicodemo (1967) que l'inhibition de la coalescence serait proportionnelle à la différence de potentiel électrique créé à l'interface, modélisée par la relation thermodynamique de Gibbs. Cependant la mise en œuvre de l'analyse de Linek est très complexe et n'a été validée que pour les solutions contenant un seul sel. Le paramètre de coalescence de Linek semble néanmoins plus fiable que la force ionique pour corrélérer α à la composition en sels.

Robinson et Wilke (1973) proposent une relation similaire à Eq. 37 pour le coefficient β en signalant des écarts pour certains sels ; pour Linek et coll. (1988b), β est indépendant des propriétés physiques du milieu.

I.2.4. Effet des agents de surface sur $K_L a$ (tension de surface)

De nombreuses substances organiques ont des effets d'agent de surface, comme les protéines et leurs dérivés (Tsao, 1968), c'est-à-dire qu'elles tendent à s'adsorber aux interfaces liquide-solide, ou gaz-liquide. Ces molécules de surfactants (contraction de « surface active agent ») ont une partie polaire et une partie apolaire. La partie polaire, hydrophile, reste en phase liquide tandis que la partie apolaire, hydrophobe, migre vers l'interface.

La présence d'agents de surface –s'ils ne participent pas à l'absorption du gaz (en le consommant, en étant un solvant...)– réduit k_L (Tsao, 1968 ; Lee et Tsao, 1972 ; Linek et coll., 2005). A ce jour deux propositions permettraient de l'expliquer, l'effet barrière et l'effet hydrodynamique, mais elles ne sont pas satisfaisantes. L'effet barrière suppose que les surfactants forment une monocouche à l'interface, ce qui offre une résistance supplémentaire au transfert des molécules de gaz. Cette résistance dépend de nombreux paramètres liés aux interactions gaz-surfactant-liquide, dont la polarité du groupe hydrophile, sa masse molaire, sa longueur, son organisation à l'interface... L'effet hydrodynamique suppose que les surfactants (et même les électrolytes) tendent à organiser l'interface. Cette organisation crée une barrière énergétique qui va limiter la régénération de l'interface, rendant le transfert plus

difficile et donc réduisant la valeur de k_L . Plusieurs quantifications de l'énergie supplémentaire à fournir pour régénérer l'interface ont été proposées, basées sur la pression de surface (différence entre la tension de surface sans et avec surfactants), la force ionique, le potentiel électrique d'interface ou la tension de surface. Linek et coll. (2005) ont démontré que ni la pression de surface seule, ni la tension de surface seule, ne permettait de corrélérer l'effet des surfactants sur k_L .

A l'opposé, en réduisant la tension de surface σ , les agents de surface ont tendance à réduire le diamètre des bulles et donc à augmenter l'aire interfaciale. Ceci apparaît clairement dans Eq. 33 (Calderbank, 1958) ainsi que dans la loi de Laplace :

$$d = \frac{2\sigma}{\Delta P} \quad (38)$$

où ΔP représente la différence de pression entre l'intérieur de la bulle et la phase liquide.

L'effet sur $K_L a$ est donc complexe, par exemple l'addition de 100 ppm (en masse) de PEG permet de doubler l'aire interfaciale mais réduit k_L d'un facteur 4 (Linek et coll., 2005).

Cas des agents antimousse

Les agents antimousse sont nécessaires dans beaucoup de fermentations pour éviter un débordement par les mousses. Ce sont des agents de surface qui ont la double propriété de favoriser la coalescence et de baisser la tension interfaciale. Ces deux effets s'opposent : d'un côté l'action coalescente –qui permet de briser la mousse– réduit l'aire interfaciale au sein du liquide, mais de l'autre côté la baisse de la tension interfaciale provoque la diminution de la taille des bulles, et tend donc à augmenter l'aire interfaciale. L'effet sur $K_L a$ est donc à déterminer au cas par cas.

A concentration faible (< 50 ppm) l'addition de polypropylène glycol (PPG), de silicone ou d'huile de soja ralentit le transfert de matière. Cette diminution est attribuée, pour le PPG à la diminution de k_L , mais pour le silicone et l'huile de soja à l'amplification de la coalescence (Morão et coll., 1999). De même, la présence de 3 ppm d'océnol diminue $K_L a$ en dessous de la valeur mesurée en eau pure, c'est-à-dire déjà en système coalescent (Linek et coll., 2005). En condition de fermentation (culture batch, *Candida tropicalis*, $V_L=5$ L, $200 < \text{rpm} < 600$), Yagi et Yoshida (1977) observent la diminution de la valeur de $K_L a$ de 1/3 après chaque ajout de quelques gouttes d'antimousse (KM 70).

A des concentrations élevées (>50-200 ppm, généralement jamais atteintes en fermentation où les concentrations utilisées sont proches du ppm) les agents antimousse peuvent augmenter le transfert (Morão et coll., 1999). Le phénomène est attribué soit à la

surproduction de petites bulles, soit à un phénomène de navette, l'oxygène étant plus soluble dans le surfactant que dans l'eau (Rols et coll., 1990). L'agitation (400 à 2000 rpm) semble avoir peu d'effet sur le rapport des K_{La} calculés avec et sans antimousse (K_{La}/K_{La0}) (Morão et coll., 1999), ce qui tend à discréditer la thèse de cinétique de contamination de l'interface (effet barrière et effet hydrodynamique), puisqu'à forte agitation les interfaces de bulles étant renouvelées vite, les surfactants n'auraient pas le temps de les contaminer, conduisant à un rapport K_{La}/K_{La0} tendant vers 1 avec l'agitation.

1.2.5. Effet de la viscosité sur K_{La}

La viscosité est souvent proposée comme la cause principale des limitations de transfert. Mais les effets de la viscosité sont complexes, par exemple à même viscosité apparente il peut y avoir ou non une diminution de K_{La} : dans un milieu non-coalescent (Na_2SO_4 0,8 mol.L⁻¹), l'addition de CMC TS.20 (0,6% en masse) provoque une diminution de K_{La} (divisé par 4), alors que pour une même viscosité apparente, l'addition de Sokrat 44 (3% en volume) n'a pas d'effet sur K_{La} (Linek et coll., 2005).

Il faut distinguer la viscosité d'origine moléculaire qui affecte premièrement les échelles microscopiques, de la viscosité apparente qui affecte premièrement l'échelle macroscopique et pas forcément l'échelle microscopique. La viscosité d'origine moléculaire limite la diffusion dans la couche limite et a fortiori aussi, à l'échelle macroscopique. Tandis que la viscosité apparente bloque le mélange convectif. La viscosité moléculaire peut être causée par l'excrétion d'un agent viscosant comme le xanthane, la viscosité apparente par la présence de pellets de tailles supérieures au millimètre. Dans les deux cas l'augmentation de la viscosité réduit le niveau de turbulence du système ($Re_T = d_p^2 N \rho / \mu$) et donc l'intensité du transport de matière convectif (macromélange). Dans le premier cas le transport diffusif peut également devenir limitant. Par rapport à la Figure 1, la résistance Z5 devient significative. Avec la diminution de la turbulence, le diamètre de bulle moyen augmente, et comme la viscosité a tendance à augmenter la coalescence (Pedersen et coll., 1994), l'aire interfaciale tend à diminuer. En général l'augmentation de la viscosité apparente réduit le transfert d'oxygène.

1.2.5.1. Modèles de viscosité

Les fluides newtoniens vérifient la loi de Newton (van't Riet et Tramper, 1991) qui établit la proportionnalité entre la contrainte tangentielle τ induisant un écoulement à la

vitesse v («shear stress») et le gradient de vitesse dv/dz («shear rate»), normal à la direction de l'écoulement :

$$\tau = -\mu \frac{dv}{dz} = \mu \dot{\gamma} \quad (39)$$

où μ est la viscosité dynamique. Pour les fluides newtoniens uniquement, μ est indépendant de $\dot{\gamma}$. Les principaux modèles utilisés en culture cellulaire sont la loi puissance, le modèle de Casson, et pour les fortes concentrations cellulaires, le modèle d'Einstein.

La loi puissance (ou modèle d'Ostwald-de-Waele) est très générale :

$$\tau = K_C \dot{\gamma}^n \quad (40)$$

où K_C est l'indice de consistance, et n l'indice de puissance qui décrit un fluide dilatant pour $n > 1$, un fluide newtonien pour $n = 0$, et un fluide pseudoplastique pour $n < 1$. Une viscosité apparente peut être calculée à partir de Eq. 39 et Eq. 40 :

$$\mu_{app} = K_C \dot{\gamma}^{n-1} \quad (41)$$

Le modèle de Casson est souvent utilisé en milieu micellaire concentré :

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + K \sqrt{\dot{\gamma}} \quad (42)$$

où τ_0 est la contrainte seuil.

Enfin la loi d'Einstein (Einstein, 1906) décrit la viscosité en présence de particules sphériques solides et convient donc pour les organismes unicellulaires. Originellement la loi s'énonce en fonction de la fraction volumique de la phase dispersée, mais on peut l'écrire en fonction de la concentration en particules :

$$\mu = \mu_0 + kX \quad (43)$$

En cuve agitée on peut estimer le gradient de vitesse à partir de la relation de Metzner (Popovic et coll., 1983 ; Desplanches et Chevalier, 2006) :

$$\dot{\gamma} = k_M N \quad (44)$$

où k_M est la constante de Metzner dépendante du système d'agitation, et calculer une viscosité apparente qui est définie comme la valeur que l'on aurait si le milieu était newtonien :

$$\mu_{app} = \frac{\tau}{\dot{\gamma}} \quad (44b)$$

1.2.5.2. Modélisation de K_{La} en système visqueux

La modélisation de K_{La} en $\chi e^{\alpha} U_s^{\beta}$ (Eq. 21), est aussi utilisée pour les systèmes visqueux (Poizat et coll., 1992), parfois en y intégrant la viscosité apparente. Ainsi Linek et

coll. (1987) valident la relation sur le CMC et le glycérol, jusqu'à $5 \text{ kW}\cdot\text{m}^{-3}$, en intégrant, d'après Calderbank (1958), les propriétés physiques du milieu dans la constante χ :

$$\chi = \frac{\rho^{0,268} D^{1/2}}{\mu^{1/6} \sigma^{3/5}}$$

Une approche théorique de la prédiction de $K_L a$ en milieu visqueux est proposée par Garcia-Ochoa et Gomez (2004) : elle vérifie également le modèle empirique (Eq. 21) qui est complété de la viscosité apparente avec un exposant κ négatif, compris entre -0,5 et -0,9 pour un fluide de type Casson :

$$K_L a = \chi \cdot e^{\alpha} \cdot U_S^{\beta} \cdot \mu_{app}^{\kappa} \quad (45)$$

Cependant pour les milieux non-newtoniens il est très délicat de proposer une corrélation intégrant la viscosité apparente (Pedersen et coll., 1996). Pedersen et coll. (1996) utilisent simplement la modélisation $K_L a = \chi e^{\alpha} U_S^{\beta}$ (Eq. 21) pour décrire $K_L a$ à concentration croissante de xanthane (0,05% ; 0,1% ; 0,2%). Ils remarquent que l'aération a une influence prédominante sur $K_L a$: le coefficient α reste pratiquement inchangé (2,84 ; 2,65 ; 2,71, respectivement), alors que β augmente (0,47 ; 0,56 ; 0,66, respectivement).

Il existe des milieux visqueux dans lesquels de forts $K_L a$ sont atteignables, par exemple en solution contenant du CMC et des électrolytes (Linek et coll., 1987), puisque le coefficient de diffusion du milieu change peu. Par contre dans beaucoup de milieux visqueux les valeurs de $K_L a$ obtenues sont faibles, en solution de glycérol par exemple (Linek et coll., 1987).

Enfin, l'influence de la viscosité du milieu sur le transfert est plus prononcée dans une colonne à bulle que dans un réacteur agité (Figure 5) (van't Riet et Tramper, 1991) ; ce qui peut justifier la préférence donnée au réacteur agité pour les cultures moyennement visqueuses.

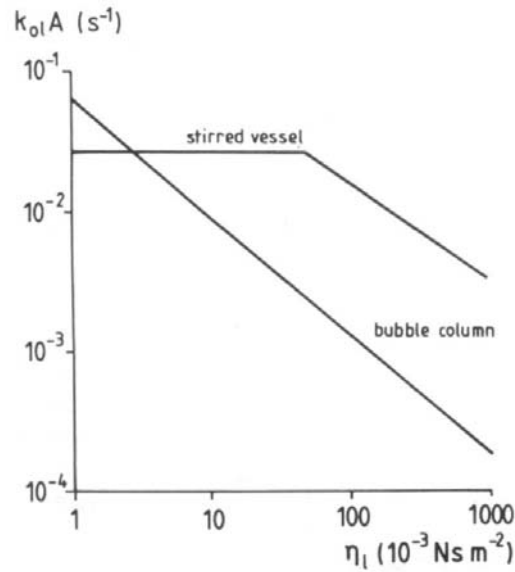


Figure 5. Influence de la viscosité sur K_La en fonction du type de contacteur, d'après van't Riet et Tramper, 1991.

I.2.6. Effet de la température sur K_La

K_La est directement dépendant du coefficient de diffusion (Eq. 14, Eq. 15, Eq. 16) et de la viscosité. Or ces deux paramètres sont fortement liés à la température. Le coefficient de diffusion suit la loi d'Arrhénius :

$$D = D_0 \cdot \exp\left(\frac{-E^\ddagger}{RT}\right) \quad (46)$$

En utilisant les valeurs données par Perry et Green (1984) on calcule $E^\ddagger = 26500 \text{ J} \cdot \text{mol}^{-1}$ pour l'oxygène. O'Connor (Aiba et coll., 1965) propose une équation semi empirique qui tient compte de la température et de la viscosité :

$$\phi = \frac{K_L a(T_1)}{K_L a(T_2)} = \sqrt{\frac{T_1 \mu_2}{T_2 \mu_1}} \quad (47)$$

où μ_1 est la viscosité à la température absolue T_1 (°K). Enfin Stenstorm et Gilbert (1981) proposent :

$$K_{L,T} = K_{L,293} \cdot \theta^{T-293} \quad (\text{ou similairement } (K_L a)_T = (K_L a)_{293} \theta^{T-293}) \quad (48)$$

avec $\theta = 1,024$ (une approximation plus précise donne $\theta = 1,02$ pour une aération diffuse et $\theta = 1,028$ pour une aération de surface).

Enfin il est à noter que l'augmentation de la température en conditions de culture microbienne provoque une faible diminution de la rétention gazeuse (-10 à -15% pour T passant de 22 à 77°C) (Schaper et coll., 2002).

I.2.7. Effet de la présence de particules solides sur $K_L a$

La présence de particules solides peut modifier l'aire interfaciale ainsi que k_L . Le sens de la modification dépend des propriétés des particules (taille, adhésion ou non sur la bulle), des propriétés du milieu, et aussi du type de contacteur gaz-liquide.

Par exemple, l'aire interfaciale en présence de particules de deux millimètres de diamètre, augmente en milieu visqueux par un effet de cassage des plus grosses bulles, mais diminue dans l'eau (Kawase et coll., 1997, étude en réacteur agité). Certaines particules comme la poudre de dioxyde de manganèse (diamètre= 20 μm), utilisée dans certaines méthodes au sulfite comme catalyseur, peuvent favoriser la coalescence en milieu non-coalescent, c'est-à-dire réduire l'aire interfaciale ; mais ces mêmes particules n'ont pas d'effet en eau pure (Linek et coll., 2005).

L'effet des particules sur k_L est plus complexe et deux mécanismes sont proposés : l'effet de blocage réduit sa valeur, mais l'effet hydrodynamique l'augmente. Lorsque les particules sont actives chimiquement, des cellules par exemple, les effets peuvent être bouleversés et sont décrits dans un chapitre ultérieur (I.3.2) (Beenackers et Swaaij, 1993).

I.2.7.1. Effet de blocage de l'interface sur k_L

Il est provoqué par le simple fait que la diffusion à travers les particules, une cellule par exemple, est inférieure à la diffusion dans le liquide. D'après Ho et Ju (1988) le coefficient de diffusion de l'oxygène à travers une suspension cellulaire décroît linéairement avec la concentration cellulaire, et dépend non pas de la gêne stérique, mais bien du rapport du coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau sur le coefficient de diffusion de l'oxygène dans le microorganisme, estimé à 0,31 pour *S. cerevisiae* et 0,30 pour *E. coli*. Galaction et coll. (2004) étudient l'influence de microorganismes (*Propionibacterium shermanii*, *S. cerevisiae*, *Penicillium chrysogenum* sous forme de pellets de 1,6 à 1,75 mm de diamètre et aussi de mycéliums libres) sur $K_L a$. Ils travaillent en bioréacteur de 5 L agité par 2 turbines ($N < 700$ rpm, soit $e < 2000$ $\text{W}\cdot\text{m}^{-3}$). La présence de cellules diminue la valeur de $K_L a$, par rapport à sa valeur mesurée à même viscosité apparente mais sans cellules. L'effet dépend des cellules utilisées et s'accroît avec la concentration cellulaire. Cette diminution est attribuée (hypothétiquement) au blocage des interfaces gaz-liquide par adsorption de cellules sur les bulles. Dans ces conditions $K_L a$ diminue avec l'agitation (résultats similaires obtenus par Ju et Sundararajan, 1995), contrairement à l'évolution normale de $K_L a$ avec e (Eq. 21). Ceci est également attribué à l'adhésion cellulaire, favorisée lorsque la dispersion gazeuse devient plus fine à forte agitation. Par contre l'aération a tendance à réduire le blocage des

interfaces gaz-liquide et a un effet favorable sur K_{La} . En comparant ces valeurs à l'analyse de Linek et coll. (1987) on peut cependant penser que certains phénomènes décrits par Ju et Sundararajan (1995) pourraient s'expliquer par l'utilisation d'une mauvaise méthode de calcul de K_{La} , d'ailleurs très mal détaillée. Similairement, Yagi et Yoshida (1974) notent que K_{La} décroît avec l'ajout de 0 à 4 $g_{MS}.L^{-1}$ de cellules sans activité biologique de *Candida tropicalis*, mais que par contre à 4 $g_{MS}.L^{-1}$ K_{La} atteint un seuil ($K_{La}/K_{La0}=0,85$) conservé jusque 12 $g_{MS}.L^{-1}$.

A l'opposé des ces effets d'adhésion supposés, à partir de considérations hydrodynamiques Andrews et coll. (1984) concluent qu'il est impossible que des cellules s'accumulent à l'interface d'une bulle en mouvement, excepté du côté de la traînée (Vinke et coll., 1993) où le volume relatif des cellules peut avoisiner 50%. Or seulement 20% du gaz est transféré à travers cette zone de la bulle, la majorité du transfert se faisant dans la région frontale de la bulle. Le blocage résultant est donc limité et une réduction de la valeur de k_L de 10% peut être attendue.

I.2.7.2. Effet hydrodynamique (boule de neige) sur k_L

Il s'agit de l'augmentation de K_{La} en présence de particules inertes ou de cellules sans activité biologique. A partir de lois mécanistiques Andrews et coll. (1984) décrivent l'écoulement du fluide autour d'une bulle et la possibilité pour des particules attirées à l'interface gaz-liquide de faire bouger l'interface à l'encontre des agents de surface qui tendent à la maintenir immobile et qui bloquent ainsi le transfert d'oxygène. Cette mise en mouvement provoque à son tour l'attraction de nouvelles particules ; cet effet boule de neige (« snowball effect ») assure la mobilité de l'interface et donc l'augmentation de k_L . A forte concentration en surfactants Andrews et coll. (1984) pointent également l'existence d'une concentration critique en cellule pour laquelle l'interface bloquée devient subitement mobile, avec l'augmentation de k_L par trois. Contrairement à l'effet de blocage, ici la présence de cellules considérées en tant que particules solides contribue à l'augmentation de K_{La} .

I.3. Absorption avec consommation simultanée de l'oxygène

I.3.1. Absorption en présence de réaction chimique

L'absorption d'oxygène en culture microbienne peut être comparée à l'absorption en présence de réaction chimique car l'oxygène est consommé simultanément à sa diffusion à

travers l'interface gaz-liquide. L'absorption avec consommation simultanée du soluté par réaction chimique (Danckwerts, 1970) ne concerne pas directement notre propos. Cependant elle a été théorisée avant l'absorption avec réaction biologique, qui en découle donc. La réaction biologique se différencie de la réaction chimique par deux points essentiels : la biomasse qui réagit avec le gaz diffusant ne disparaît pas après absorption du gaz mais peut être un produit de la réaction, et la réaction biologique de consommation d'oxygène est irréversible (Tableau 2).

Tableau 2. Comparaison des facteurs cinétiques de l'absorption avec consommation dans le cas d'une réaction chimique et d'une réaction biologique.

	Réaction chimique	Réaction biologique
Réactifs	A gazeux dissous B soluté	A gazeux dissous (O ₂) B biomasse
Réaction	$A + zB \xrightarrow{k_{mn}} \text{produits}$	$A + zB \xrightarrow{k_1} wB + \text{produits}$
Loi de vitesse $\left(q_A = -\frac{d(x_A)}{dt} \right)$	$q_A = k_{mn} \cdot (x_A)^m \cdot (x_B)^n$	$q_A = k_1 \cdot x_B, x_A > x_{crit}$ $q_A = k_1 \cdot x_A, x_A \ll x_{crit}$ (Yagi et Yoshida, 1975)

Si le gaz absorbé réagit avec le liquide ou avec une espèce en solution, Eq. 8 présenté sous sa forme unidirectionnelle selon un axe z perpendiculaire à l'interface s'écrit :

$$D_A \frac{d^2 x_A}{dz^2} = \frac{d x_A}{dt} + q_A \quad (49)$$

Si par exemple la réaction de dégradation est du premier ordre par rapport à A, $q_A = k_1 \cdot x_A$:

$$D_A \frac{d^2 x_A}{dz^2} = \frac{d x_A}{dt} + k_1 x_A \quad (50)$$

La résolution de cette équation permet de calculer le profil de concentration de A. Si il est établi dans l'hypothèse du film (c'est-à-dire en posant $\delta = D_A/k_L$), en régime permanent, et avec les conditions aux limites :

$$\begin{cases} x_A = x_A^*, z = 0 \\ x_A = x_L, z = \delta \end{cases}$$

il permet de calculer le flux transféré (Eq. 13) suivant :

$$R = k_L \frac{Ha}{\tanh Ha} \left(x_A^* - \frac{x_0}{\cosh Ha} \right) \quad (51)$$

où $Ha^2 = \frac{D_A k_1}{k_L^2}$ est un groupe adimensionnel d'intégration de l'équation de continuité, appelé

nombre de Hatta. Contrairement au cas de l'absorption physique, ce flux n'est pas proportionnel à $(x_A^* - x_L)$, x_L étant la concentration au cœur du liquide.

Le nombre de Hatta au carré correspond physiquement au rapport de la conversion maximale possible dans le film par la quantité traversant le film par diffusion :

$$Ha^2 = \frac{D_A k_l}{k_L^2} = \frac{k_l x_A^* \delta}{D_A \frac{x_A^* - 0}{\delta}} \quad (\text{en posant } k_L = D_A / \delta)$$

Le nombre de Hatta renseigne sur le lieu de la réaction. On peut distinguer trois régimes de réaction (Roizard et coll., 1997) : lorsque $Ha^2 \ll 1$ (ou $Ha < 0,3$) la réaction est lente, la réaction dans le film est négligeable et a principalement lieu dans le cœur du liquide, la réaction est contrôlée par la vitesse de consommation de A ; lorsque $Ha^2 \gg 1$ (ou $Ha > 3$) la réaction est rapide et a lieu entièrement dans le film, la réaction est contrôlée par les paramètres de transfert (aire interfaciale et K_L) ; autrement le régime est intermédiaire.

Le nombre de Hatta dépend de l'ordre de la réaction. Il a été calculé de manière générale pour une réaction d'ordre m, n par Hikita et Asai (1964) (voir Tableau 2 pour les symboles) :

$$Ha^2 = \frac{2D_A k_{mn} (x_A^*)^{m-1} x_B^n}{(m+1)k_L^2} \quad (52)$$

Il est possible de calculer l'accélération du flux de transfert due à la consommation chimique par rapport au flux purement physique (Eq. 51), appelée E (pour « enhancement factor ») :

$$E = \frac{R}{k_L (x_A^* - x_L)} \quad (53)$$

soit en remplaçant R par son expression (Eq. 51) :

$$E = \frac{Ha}{\tanh Ha} \frac{\left(x_A^* - \frac{x_0}{\cosh Ha} \right)}{(x_A^* - x_0)} \quad (54)$$

Le même calcul de E peut être entrepris dans l'hypothèse de renouvellement de Danckwerts (Eq. 16). Dans ce cas Eq. 50 est intégrée également par rapport au temps pour faire intervenir le temps d'exposition ; le régime permanent est obtenu par un temps d'exposition moyen. On utilise alors les conditions initiales suivantes :

$$(Eq. 55) \quad \begin{cases} x_A=0, & z>0, & t=0 \\ x_A=x^*, & z=0, & t>0 \\ x_A=0, & z=\infty, & t>0 \end{cases}$$

pour obtenir finalement :

$$E = \sqrt{1 + Ha^2} \quad (56)$$

avec la même définition du nombre de Hatta que précédemment. On remarque que le calcul de l'accélération dépend du modèle de transfert utilisé. Cependant les deux modèles convergent vers $E=Ha$ pour $Ha^2 \gg 1$.

I.3.2. Absorption en présence de consommation par la biomasse

Il a souvent été obtenu des valeurs de K_{La} plus élevées en condition de culture que dans le même milieu en l'absence de cellule. Ni et coll. (1995) notent l'augmentation de K_{La} de manière inexplicable de 65 h^{-1} à 87 h^{-1} au cours des quatre premières heures d'une culture de *S. cerevisiae* alors que les paramètres opératoires sont inchangés (cuve agitée 2 L, batch, $N=700 \text{ rpm}$, $X=1,2$ à $4,1 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$).

Le calcul de E dans la littérature dépend de l'ordre 0 ou 1 de la réaction de consommation de l'oxygène par rapport à la concentration de l'oxygène (Tableau 2). Pour x_{O_2} supérieur à une concentration critique, $x_{crit.}$, ce qui est normalement le cas en culture aérobie, le flux de consommation est d'ordre 1 par rapport à la biomasse et d'ordre 0 par rapport à l'oxygène. q_{O_2} est alors supposé uniforme dans toute la phase liquide et indépendant de la concentration en oxygène. (En cultures de *Penicillium chrysogenum* Larsson et Enfors (1988) observent deux concentrations critiques, sans doute dues aux hétérogénéités de la biomasse divisée en mycélium libres et pellets). La concentration critique dépend du microorganisme considéré, elle est parfois évaluée en fonction de la constante de Monod, et peut être estimée à $10^{-5} \text{ mol} \cdot L^{-1}$ (soit 5% de la concentration de saturation à pression atmosphérique ; Bartholomew, 1950 ; Yagi et Yoshida, 1975). Lorsque x_{O_2} est très inférieur à x_{crit} on peut estimer que la consommation d'oxygène est d'ordre 1 par rapport à l'oxygène (Yagi et Yoshida, 1975).

Parmi les auteurs qui supposent un ordre 0 par rapport à l'oxygène (Tableau 3), les développements de Merchuck (1977) et de Yagi et Yoshida (1975 et 1977) sont équivalents. Le développement de Tsao (1970) est soumis à des d'hypothèses qui semblent plus éloignées des cultures intensives (faible rétention gazeuse, faible volume interfacial).

Tableau 3. Relevé de calculs classiques (basé sur un bilan matière) de l'accélération du transfert d'oxygène par consommation biologique : hypothèses du modèle et calcul. x_{O_2} oxygène dissous ; E facteur d'accélération ; Ha nombre de Hatta (Eq. 52).

Référence	Conditions du modèle	Calcul de E
Merchuck (1977)	-ordre 0 par rapport à x_{O_2} et 1 par rapport à la biomasse -répartition homogène, linéaire ou exponentielle des microorganismes -modèle du film	$E = 1 + \frac{D_A \cdot r_{O_2} \cdot X}{2k_L^2 (x_{O_2}^* - x_{O_2})} \xi$ ξ dépend de la répartition de X, $\xi=1$ pour une répartition homogène
Yagi et Yoshida (1975)	-ordre 0 par rapport à x_{O_2} -répartition linéaire ou non des microorganismes (<i>Candida tropicalis</i>) -modèle de renouvellement de surface	résolution numérique à partir de la définition de E (Eq. 53).
Yoshida et Yagi (1977)	-ordre 0 par rapport à x_{O_2} et 1 par rapport à la biomasse	Ha calculé d'après Eq. 52, puis $E=1+Ha^2/4$ (ce qui revient au calcul de Merchuck (1977) avec $\xi=1$)
Tsao (1970)	-ordre 0 par rapport à x_{O_2} -la fraction des cellules contenues dans la zone interfaciale est négligeable -bilan sur le cœur du liquide, hors zone interfaciale -modèle de renouvellement (Higbie)	$E = \frac{1}{1 - \frac{2}{3} K_L a \cdot t^*}$ t^* , temps de renouvellement
Tsao et coll. (1972)	-ordre 1 par rapport à x_{O_2} (catalyseur de platine, glucose oxidase, <i>Acetobacter rancens</i> et <i>A. suboxydans</i>) - x_{O_2} proche de 0 -modèle à 2 zones	$E = \sqrt{1 + \frac{D_A k_L}{k_L^2}}$ prédit par Danckwerts sous estime E ; Tsao propose alors $E=f(K_L, k, K_M, D, x^*, S_0, x_h)$, avec K_M constante de Monod, S_0 concentration particulière à dans la zone de surface d'épaisseur h, x_h concentration en O_2 en h.

Nous développons maintenant le calcul de E. En condition normale de croissance le milieu n'est jamais limité par l'oxygène et la réaction est d'ordre 1 par rapport à la biomasse. Par soucis de simplification nous gardons les mêmes conditions initiales que Danckwerts (Eq. 55) mais avec l'équation de transfert suivante :

$$D_A \frac{d^2 x_{O_2}}{dz^2} = \frac{d x_{O_2}}{dt} + X \cdot r_{O_2}$$

où $X \cdot r_{O_2} = q_{O_2}$, est la consommation en oxygène par unité de volume et par unité de temps, que l'on peut supposer constante sur une période de l'ordre du renouvellement d'un élément de surface. En passant comme Danckwerts par la transformée de Laplace :

$$D_A \frac{d^2 \bar{x}_{O_2}}{dz^2} = \bar{x}_{O_2} \cdot s + X \cdot r_{O_2}$$

que l'on résout en

$$\bar{x}_{O_2} = \left(x_{O_2}^* + \frac{X \cdot r_{O_2}}{s} \right) \cdot \exp\left(-z \sqrt{\frac{s}{D}}\right) - \frac{X \cdot r_{O_2}}{s}$$

puis en tenant compte du modèle de transfert (Eq. 16), soit $s = k_L^2/D$

$$\bar{x}_{O_2} = \left(x_{O_2}^* + \frac{D \cdot X \cdot r_{O_2}}{k_L^2} \right) \cdot \exp\left(-z \frac{k_L}{D}\right) - \frac{D \cdot X \cdot r_{O_2}}{k_L^2}$$

La transformée de Laplace du flux transféré moyen est donc

$$\bar{R} = -D \left(\frac{d\bar{x}_{O_2}}{dz} \right)_{z=0} = k_L \left(x_{O_2}^* + \frac{D \cdot X \cdot r_{O_2}}{k_L^2} \right)$$

et ayant calculé (Danckwerts 1970, p102) le flux transféré moyen en condition d'absorption purement physique ($\bar{R}_{PHY} = \sqrt{D \cdot s} (x_{O_2}^* - x_{O_2}) = k_L (x_{O_2}^* - x_{O_2})$) on peut calculer l'accélération par le rapport \bar{R}/\bar{R}_{PHY} avec la condition $x_{O_2}=0$:

$$E = 1 + \frac{D_A \cdot X \cdot r_{O_2}}{k_L^2 \cdot x_{O_2}^*} \quad (57)$$

Le deuxième terme correspondrait au nombre de Hatta au carré, c'est-à-dire $E=1+Ha^2$. En utilisant les bonnes hypothèses le facteur d'accélération pour une réaction biologique non limitée en substrat est donc supérieur au facteur d'accélération calculé dans le cas d'une limitation en substrat, c'est-à-dire en supposant l'ordre 1 par rapport au substrat (Eq. 56). Ce calcul contredit certains auteurs comme Andrews et coll. (1984) qui écrivent « en phase de culture quand la valeur de k_L n'a pas trop d'importance (à faible concentration cellulaire) l'accélération chimique peut ne pas être possible, par contre dans la phase limitée en oxygène ou même de petites variations de k_L peuvent apporter beaucoup de bénéfices (à forte concentration cellulaire), une telle accélération est possible (à cause de l'ordre de la réaction qui n'est plus nul par rapport à l'oxygène) ».

Le calcul tel que le pose Merchuck (1977) est effectué dans le cadre de l'hypothèse du modèle du film. En supposant une répartition homogène des cellules dans la couche limite (x_B constante par rapport à z), il conduit au profil d'oxygène dissous suivant dans le film interfacial :

$$x_{O_2} = \frac{k_1 \cdot x_X}{2 \cdot D_{O_2}} z^2 + \left[\frac{(x_L - x_{O_2}^*)}{\delta} - \frac{k_1 \cdot x_X \cdot \delta}{2 \cdot D_{O_2}} \right] z + x_{O_2}^* \quad (58)$$

avec pour conditions aux limites :

$$\left\{ \begin{array}{l} x_{O_2} = x_{O_2}^*, z = 0 \\ x_{O_2} = x_L, z = \delta \end{array} \right.$$

La loi de Fick à faible flux donne donc le flux absorbé

$$R = -D_{O_2} \left(\frac{dx_{O_2}}{dz} \right)_{z=0} = \frac{(x_{O_2}^* - x_L)}{\delta} D_{O_2} + \frac{k_1 \cdot X \cdot \delta}{2}$$

Tout comme dans l'absorption avec consommation par réaction chimique, le flux absorbé n'est pas proportionnel à $(x_{O_2}^* - x_L)$. Ceci apparaît clairement sur la Figure 6 qui compare l'absorption physique au profil décrit par Eq. 58. La forme concave des profils de concentration est due à la consommation dans le film. Graphiquement, l'accélération correspond au rapport des dérivées $\left(\frac{dx_{O_2}}{dz} \right)$ en $z=0$. Avec les valeurs choisies pour tracer les profils de la Figure 6 (valeurs pour l'eau pure), on peut calculer $E_{q_{O_2}}=1,08$ pour $q_{O_2}=600$ $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ et $E_{q_{O_2}}=1,84$ pour $q_{O_2}=6000$ $\text{mmol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$.

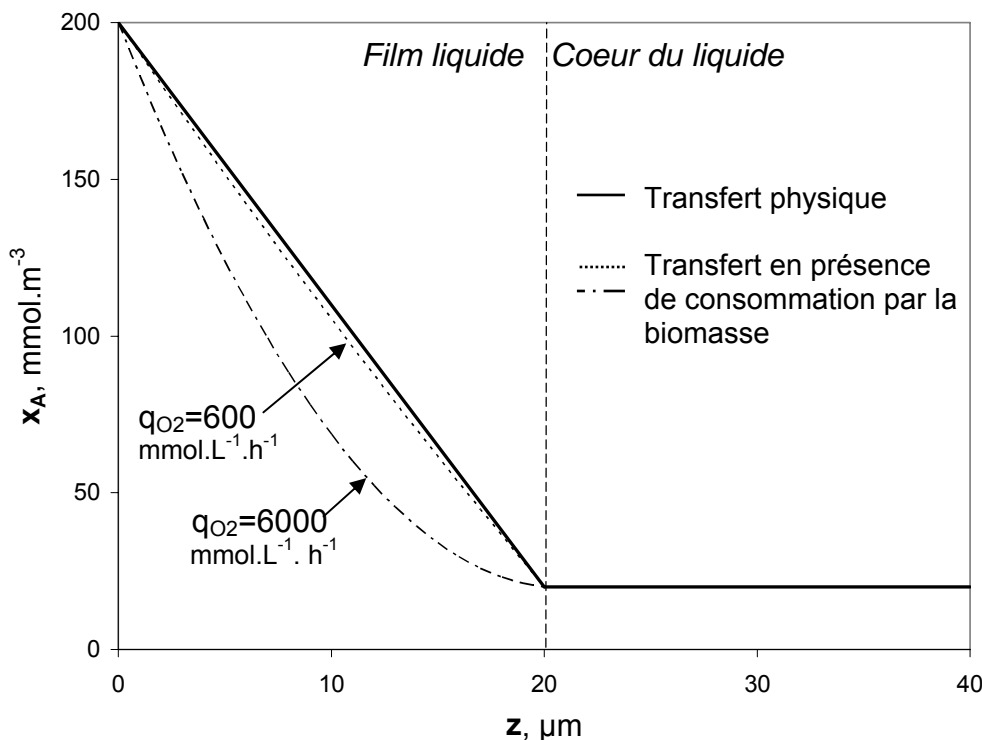


Figure 6. Modification du profil de concentration dans la couche limite par la consommation simultanée de l'espèce absorbée. Calcul réalisé en régime permanent dans le cas d'une diffusion d'oxygène. Eq. 8 modélise le transfert physique, et Eq. 58 le transfert en présence de consommation d'oxygène, en posant $q_{O_2}=k_1 \cdot X$, la consommation volumétrique de l'oxygène. $D_{O_2}=2,1 \times 10^{-9}$ $\text{m}^2.\text{s}^{-1}$, $\delta=20$ μm , $x_{O_2}^*=200$ mmol.m^{-3} (équilibre avec l'oxygène de l'air à $T=37^\circ\text{C}$ et pression atmosphérique), $x_L=20$ mmol.m^{-3} .

L'accélération peut être évaluée dans le modèle du film ($k_L = D_{O_2}/\delta$) :

$$E = 1 + \frac{D_{O_2} \cdot X \cdot r_{O_2}}{2k_L^2 \cdot (x_{O_2}^* - x_L)} \quad (59)$$

Pour cette réaction d'ordre 1 par rapport à la biomasse et 0 par rapport à l'oxygène la constante

$$\gamma = \frac{D_{O_2} \cdot X \cdot r_{O_2}}{2k_L^2 (x_{O_2}^* - x_L)} \quad (60)$$

correspond au nombre de Hatta au carré développé par Merchuck (1977), qui a également calculé E pour une distribution linéaire de la biomasse dans la couche limite comme le suppose Tsao (1969), et pour une distribution exponentielle comme le propose Yagi et Yoshida (1975) ; ces calculs sont présentés sur la Figure 7.

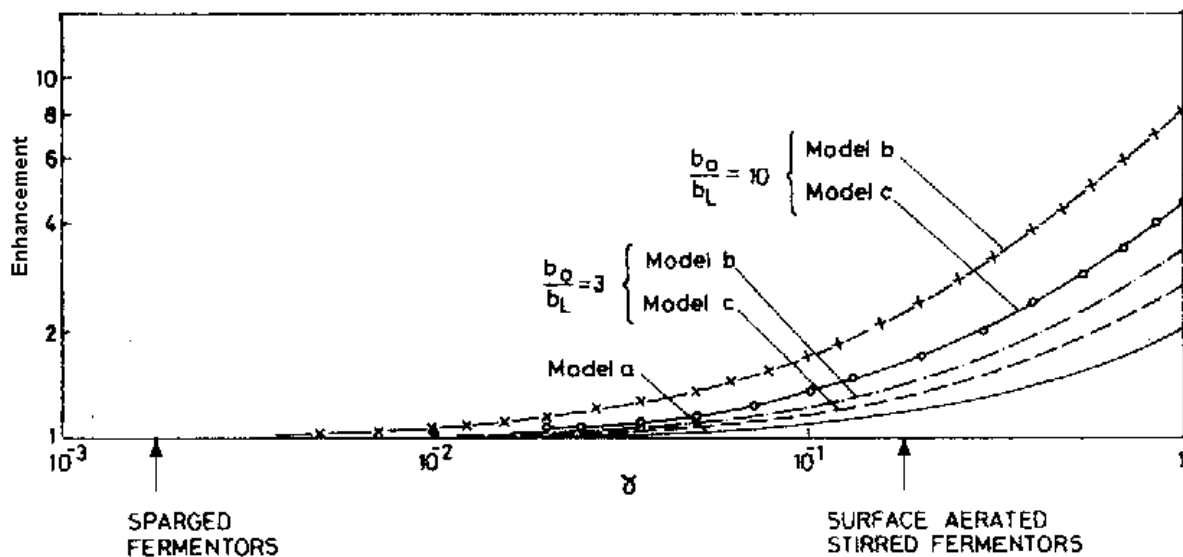


Figure 7. Facteur d'accélération pour l'absorption d'oxygène en culture microbienne, d'après Merchuk (1977). γ est défini par Eq. 60. Le facteur d'accélération, Enhancement, est donné en fonction du rapport entre la concentration en biomasse à l'interface, b_0 , et au cœur du liquide, b_L . Le modèle a correspond à une répartition uniforme de la biomasse, le modèle b à une répartition linéaire, et le modèle c à une répartition exponentielle.

L'évaluation de γ , et donc de E, est extrêmement sensible à la valeur de k_L . Sur la Figure 7 l'indication « sparged fermentors » correspond à $k_L = 3,5 \times 10^{-4} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ qui définit une région où l'accélération du transfert par la consommation simultanée de l'oxygène est impossible, alors que l'indication « surface aerated stirred fermentors » correspond à $k_L = 3,5 \times 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ qui définit une région de faible k_L dans laquelle l'accélération du transfert par la consommation simultanée de l'oxygène est possible.

En culture aérobie la quantité d'oxygène dissous, c'est à dire directement disponible pour le microorganisme, est régi par l'équilibre entre deux flux : le flux de transfert de la

phase gaz vers la phase liquide et le flux de consommation, q_{O_2} . Le facteur γ reflète le rapport entre ces deux flux mais est difficilement utilisable en fermentation car contrairement à K_{La} , k_L est difficile à déterminer.

I.3.2.1. Thèse de Tsao : répartition hétérogène à l'interface (double zone)

A partir de l'étude de l'absorption chimique de CO_2 dans une solution d'anhydrase carbonique Tsao et coll. (1972) modélisent la couche interfaciale par deux zones. La zone proche de l'interface est stagnante, composée de cellules ou de molécules adsorbées, et à travers laquelle les échanges gazeux n'ont lieu que par diffusion moléculaire. Les eddies de la turbulence peuvent atteindre cette zone mais sans la pénétrer. La zone stagnante est immédiatement suivie d'une zone régénérée par renouvellement de surface comme décrite par Danckwerts (1951). Le modèle de la double zone permet à Tsao d'expliquer l'accélération du transfert en milieu biologique, sous-estimé par le modèle de Danckwerts (1970), lequel a été développé en présence de réaction chimique qui suppose donc une répartition homogène des réactifs. En effet, des études menées en cellule d'absorption agitée ($d_T=8,5$ cm ; hauteur 18 cm, barreau aimanté 300 rpm, excès de glucose) ont montré que l'absorption d'oxygène est accélérée en présence de glucose oxydase, de catalyseur de platine sur support carbone (Lee et Tsao, 1972), et aussi en présence d'*Acetobacter rancens* et *Acetobacter suboxydans* (Tsao et coll., 1972) jusqu'à 1,5_2,5_5 et 12 fois, respectivement, alors que dans tous ces cas l'accélération prédite pour une réaction chimique de pseudo premier ordre est proche de 1. Le bilan matière décrivant le profil de concentration dans la zone stagnante nécessite la connaissance de la répartition des agents de surface (cellules) par rapport à l'interface, $\frac{ds}{dz}$ (Tsao et coll., 1969) :

$$\frac{dC_A}{dt} = D_A \frac{d^2C_A}{dz^2} + D_A \frac{dC_A}{dz} \left[\frac{1}{(1-s)} \frac{ds}{dz} \right] - \frac{a_p s R}{(1-s)} \quad (61)$$

où s est la fraction de l'interface occupée par l'agent de surface, R la vitesse de consommation de l'oxygène par unité de surface de particule, a_p la surface de particule par unité de volume de particule. Trois profils de concentration d'agent de surface sont proposés (Tsao et coll., 1968) : constant, linéaire, exponentiel, mais sans vérification, ni visuelle, ni par la comparaison entre la mesure de l'accélération et le calcul correspondant. Tsao et Lee (1975) simplifient le modèle en supposant deux zones à concentrations constantes, la zone la plus

proche de l'interface (zone stagnante) étant plus concentrée en agents de surface, mais toujours sans essayer de retrouver par le calcul la valeur de l'accélération expérimentale.

Il se peut que les études de Tsao ne soient pas représentatives des cultures aérobies car elles ont été réalisées en ordre 1 par rapport à l'oxygène, ce qui est normal pour une réaction enzymatique, mais rare en fermentation où l'ordre par rapport à l'oxygène est normalement 0, et 1 si la concentration en oxygène est largement inférieure à la concentration critique.

Expérimentalement Tsao propose plusieurs preuves de l'existence d'une répartition hétérogène de certaines particules (comme les cellules) en faveur de l'interface gaz liquide. Une microsonde à oxygène (diamètre 1 μm , longueur 2 μm) permet à Tsao et Lee (1975) de prouver l'existence et de mesurer l'épaisseur de la couche stagnante (240 μm) et de la couche renouvelée (360 μm) en cellule d'absorption agitée ($N=200$ rpm) contenant 150 ppm de glucose oxydase non purifié. En effet, dans la traversée de la zone stagnante la concentration en oxygène ne fluctue pas, puis elle chute subitement, signe que la couche stagnante est franchie, puis décroît de manière chaotique jusqu'à atteindre un minimum stable interprété comme la concentration homogène du cœur du liquide agité. Pendant la décroissance chaotique l'amplitude des fluctuations a tendance à diminuer mais à fréquence constante qui est interprétée comme la conséquence du renouvellement d'un élément de liquide (par là, Tsao dit donner une preuve directe de la validité de la théorie du renouvellement de Danckwerts). En eau pure, la zone stagnante n'existe pas et seule la décroissance chaotique de la concentration en oxygène est observée ; cette zone est de même épaisseur qu'en présence de glucose oxydase. Une autre expérience (Tsao et coll., 1972) compare l'accélération de l'absorption du CO_2 en cellule d'absorption agitée contenant de l'anhydrase carbonique selon la position de l'agitateur (turbine 4 pales). Toutes conditions égales par ailleurs, l'accélération lorsque l'agitateur est complètement submergé est supérieure à celle obtenue lorsqu'il frôle l'interface. L'augmentation de l'accélération est interprétée par l'augmentation de la concentration de catalyseur adsorbé à l'interface : le phénomène d'adsorption demande un certain temps et est donc favorisé lorsque la régénération de l'interface est lente. Enfin, bien que Tsao ne considère pas cette possibilité, le fait que l'accélération atteigne une saturation à partir d'une certaine concentration en catalyseur (0,4 g.L^{-1} pour le platine sur carbone ; 1,6 g.L^{-1} pour glucose oxydase ; Lee et Tsao, 1972) peut laisser penser que l'interface est alors saturée (Beenackers et Van Swaaij, 1993).

Les attaques portées contre Tsao sont multiples. Beaucoup viennent du fait que Tsao travaille toujours en cellule d'adsorption qui semble loin des bioréacteurs de laboratoire et de

l'industrie, à cause de leur turbulence réduite et de leur transfert réduit. Un des avantages de la cellule d'adsorption est l'aire interfaciale constante quelque soient les conditions opératoires, ce qui permet d'étudier les effets de l'accélération sur k_L uniquement. Tsao et coll. (1978) reconnaissent que, puisque le facteur d'accélération est la « somme » des contributions de l'absorption physique et chimique par rapport à l'absorption physique, alors si l'absorption physique est déjà très importante le facteur d'accélération sera proche de l'unité. Par là Tsao rejoint le calcul de Merchuck (1977) (Figure 7), et les expériences de Yagi et Yoshida (1975) qui n'observent pas d'accélération du transfert d'oxygène due à sa consommation par *Candida tropicalis* en réacteur agité ($V_L=2,6$ L, $N=400$ rpm). Tsao et coll. (1978) défendent que la surface d'une cellule d'adsorption peut être représentative de bulles en condition industrielle ; ainsi des concentrations cellulaires de l'ordre de $200 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ (masse sèche), comme celles permises à la surface d'une cellule d'adsorption, ne sont pas aberrantes comme le suggèrent Yoshida et Yagi (1977), mais envisageables autour d'une bulle ayant eu le temps d'être contaminée, c'est-à-dire ayant séjourné longtemps dans un grand réacteur.

1.3.2.2. Effet d'affinité, effet de navette

Une situation parallèle à la consommation par la biomasse est décrite par la présence d'une troisième phase –liquide ou solide– finement dispersée (en plus de la phase continue liquide, et de la phase dispersée gazeuse) et ayant une affinité forte pour l'oxygène. Dans ce cas, tout comme dans le cas de consommation par la biomasse, la disparition de l'oxygène à même la couche limite entretient un fort gradient de concentration ce qui accélère le transfert. Une situation extrême est proposée par Vinke et coll. (1993) : dans le cas d'une monocouche de particules de diamètre d_p inférieur à l'épaisseur de la couche limite, δ , ayant une très forte affinité pour le gaz dissous et adhérant à l'interface, la résistance au transfert est alors réduite à une couche d'épaisseur $d_p/4$: derrière la couche de particules la concentration en gaz dissous est pratiquement égale à la concentration du cœur du liquide ; la théorie du film donne la valeur du coefficient de transfert : $k_L=D_{O_2}/(d_p/4)$, qui est supérieure à la valeur initiale sans particule, D_{O_2}/δ .

L'agitation provoque un mouvement de va et vient des particules de la troisième phase entre l'interface et le cœur du liquide. L'accélération est créée par ce mécanisme de navette des particules (« shuttle mechanism ») : lorsque les particules se trouvent dans le film de diffusion à l'interface gaz-liquide elles se chargent en gaz dissous, puis elles sont régénérées par désorption lorsqu'elles retournent au sein du liquide à cause de la différence de concentration (Rols et coll., 1990). La concentration en gaz dissous dans la couche de

diffusion est alors réduite, ce qui accélère le transfert. Le mécanisme fonctionne à deux conditions : que le gaz diffusant soit ou consommé dans la troisième phase ou soit plus soluble dans celle-ci que dans le liquide, et que le diamètre des particules de la troisième phase soit inférieur à l'épaisseur du film de diffusion.

1.3.2.3. Transfert direct du gaz dans la cellule

L'adhésion entre bulles et microorganismes est utilisée en bioprocédés : c'est la base des procédés de flottation pour la séparation des microorganismes du milieu liquide. Bartholomew et coll. (1950), à partir de l'observation microscopique statique du filamentueux *Streptomyces griseus*, supposent l'existence d'une deuxième voie de consommation de l'oxygène par contact du microorganisme avec la couche limite de la bulle. Ainsi les films correspondants aux résistances Z_4 et Z_6 (Tableau 1) se recouvrent et les résistances se fondent. Le mécanisme proposé par Bartholomew a souvent été mal compris, ou réinterprété, en supposant un contact direct entre le microorganisme et l'interface gaz-liquide (Andrews et coll., 1984). Cette dernière hypothèse (attribuée à Bennett et Kempe, par Tsao et coll., 1968) est beaucoup plus intéressante par rapport au transfert car alors les résistances Z_4 et Z_6 disparaissent complètement et les seules résistances se situent en phase gaz et à l'interface gaz-solide. Ce mécanisme s'opère en parallèle avec la voie classique dans laquelle l'oxygène diffuse d'abord à travers le film liquide avant d'être consommé au cœur du liquide. Tsao et coll. (1968) proposent un modèle à deux $K_L a_I$, $K_L a_{II}$ pour le transfert classique, $K_L a_{II}$ pour les transferts (direct ou non) à même l'interface, et un paramètre S représentant la fraction de l'interface bloquée par les particules sur l'interface :

$$\frac{dx}{dt} = K_L a_I (1 - S) (x_i^* - x_i) + K_L a_{II} S f(x_i^*) \quad (62)$$

où $f(x_i^*)$ est une fonction de la concentration à l'interface. Le modèle implique que l'interface colonisée est bloquée par rapport au transfert, en effet, en l'absence de consommation d'oxygène, le transfert physique s'écrit :

$$\frac{dx}{dt} = K_L a_I (1 - S) (x_i^* - x_i) \quad (63)$$

Tsao propose également une simplification de Eq. 62 en :

$$\frac{dx}{dt} = K_L a_e (x_i^* - x_i) \quad (64)$$

où $K_L a_e$ est la valeur effective de $K_L a$ lorsque les deux mécanismes sont opérationnels. C'est cette écriture que nous choisissons pour prendre en compte le facteur d'accélération.

Des conclusions contradictoires sont proposées par Andrews et coll. (1984). L'étude du transfert direct gaz-cellule conduit à une équation bilan du même type que celle obtenue dans le cas de consommation dans la couche limite. Pour cette raison il est difficile expérimentalement de faire la différence entre les deux phénomènes. D'après Andrews le transfert direct conduit à une accélération inférieure (cinq fois) à celle obtenue par consommation dans la couche limite.

1.3.2.4. L'apport des modèles de connaissance

Les modèles décrivant le phénomène d'accélération sont d'une part homogènes –la troisième phase est considérée homogène et continue à l'intérieur de la phase continue– ou hétérogènes –ce qui décrit mieux la réalité expérimentale et a permis de démontrer que la géométrie locale a beaucoup d'influence sur l'accélération du transfert et tend à montrer que le modèle homogène est inapproprié– et d'autre part stationnaires, ou instationnaires, pour prendre en compte l'effet de saturation de la troisième phase au cours du temps d'exposition à l'interface gaz-liquide.

Brilman et coll. (2000) ont construit un modèle hétérogène instationnaire à deux et trois dimensions basé sur les bilans matières entre les phases et le modèle de pénétration de Higbie (1935). Le modèle de Brilman permet de comprendre plusieurs points clés de l'accélération par effet de navette (Brilman et coll., 1998). On note en particulier que plus les particules sont proches de l'interface, plus le flux de transfert augmente ; que le flux de transfert augmente avec le temps d'exposition de la particule dans le film jusqu'à un certain moment où la particule est saturée, alors la vitesse de transfert est contrôlée par la vitesse de diffusion dans la phase homogène ; que l'accélération augmente avec la solubilité relative du gaz dans la particule ; enfin, que l'accélération a lieu sur une surface de l'interface gaz-liquide supérieure au diamètre de la particule et qui augmente avec le diamètre de la particule mais ne dépend pas de la distance de la particule à l'interface. Ce dernier point est déterminant pour le calcul des interactions entre particules, également pris en compte par le modèle de Brilman et coll. (2000) : l'accélération est dominée par la couche de particules la plus proche de l'interface qui joue l'effet d'un bouclier par rapport aux particules situées plus loin ; les particules situées à une distance de l'interface supérieure au tiers de la couche de pénétration sont sans influence sur l'accélération, par contre la disposition des particules autour de l'interface compte peu ; l'accélération moyenne peut être calculée à partir des accélérations individuelles et d'un paramètre, la distance interparticulaire (plus les particules sont proches moins l'accélération résultante est importante, comparé à la somme des accélérations

individuelles dans des configurations monoparticules) ; l'accélération en fonction de la rétention gazeuse a une allure logarithmique, ce qui est montré expérimentalement.

La possibilité que les particules puissent consommer du gaz dissous n'a été considérée par Brilman et coll. (1998) que dans le cas d'une réaction irréversible de premier ordre par rapport au gaz et pour des particules présentant une forte solubilité pour le gaz. Dans ce cas l'accélération augmente avec la constante de réaction, mais de façon très modérée (d'un facteur inférieur à 2 pour $k_{1,0}$ passant de 0 à 100 s^{-1}) comparé avec, par exemple, l'effet de la solubilité relative du gaz dans la particule (facteur 10 pour la solubilité relative passant de 4 à 64). Le travail de Brilman met en évidence la nécessité de l'étude des phénomènes interfaciaux pour l'appréhension des études de transfert gaz-liquide. Cependant, pour que cette étude ait une signification directe en culture cellulaire il faut que la solubilité relative du gaz dans la particule soit proche de 1 et que la vitesse de consommation ne dépende que du nombre de cellules dans la couche de diffusion.

Plus proche de la réalité biologique, Andrews et coll. (1984) à partir d'un bilan matière très simple avec lequel il est considéré que la diffusion opère en parallèle avec le phénomène de consommation dans le film, montrent que l'accélération par consommation n'a lieu qu'à forte surconcentration cellulaire à l'interface : si les cellules à l'interface sont 25 et 50 fois plus concentrées que dans le cœur du liquide, l'accélération résultante est 1,2 et 1,35, respectivement. L'accélération d'autre part est favorisée lorsque l'oxygène devient limitant et que l'ordre de la réaction de consommation par rapport à l'oxygène n'est plus zéro, mais tend vers un. Dans un exemple Andrews pose le rapport de concentration entre l'interface et le cœur du liquide à 600 ; l'analyse conduit à une accélération uniquement dans le cas de cellule d'absorption car une telle surconcentration est difficilement envisageable si le liquide est fortement agité.

L'occurrence des mécanismes de transfert direct et de consommation dans le film dépendrait des probabilités de contact entre bulles et microorganismes et serait donc favorisée à forte aire interfaciale et à forte agitation (Bartholomew et coll., 1950). La possibilité pour la particule ainsi adsorbée de rester sur l'interface suppose qu'il existe une affinité (peut être hydrophobe ou électrostatique) entre la bulle de gaz et la particule. Par exemple, dans des mêmes conditions expérimentales Vinke et coll. (1993) note une accélération du transfert si le catalyseur est supporté par une particule de carbone qui adhère à l'interface gaz-liquide, mais pas d'accélération si le catalyseur est supporté par une particule d'aluminium qui n'adhère pas à l'interface (l'inactivité est peut être due ici à la trop grosse taille des particules d'aluminium, $20 \mu\text{m}$, contre $6 \mu\text{m}$ pour celles de carbone). La taille des particules est aussi importante. Des

observations microscopiques en statique ont montré que *S. griseus*, *P. chrysogenum*, et la levure ont tendance à adhérer aux bulles tandis que des agrégats des mêmes microorganismes adhèrent également mais se détachent de l'interface à cause des forces de frottement appliquées sur l'agrégat (Bartholomew et coll., 1950).

Une analyse microscopique réalisée dans des conditions d'agitation relativement douces a montré que les particules sont mobiles sur l'interface et qu'elles ont tendance à se regrouper du côté de la traînée (Vinke et coll., 1993). Dans des conditions très douces également (flotation) Vinke et coll. (1993) a décrit la relation entre la fraction de bulle recouverte de particules, ξ , et la concentration de particules dans le système, X , comme suivant une isotherme d'absorption de Langmuir :

$$\frac{\xi}{\xi_{\max}} = \frac{i_L \cdot X}{1 + i_L \cdot X} \quad (65)$$

D'autre part la fraction maximum pouvant être recouverte par des particules diminue avec la vitesse d'agitation.

I.3.3. Généralisation du facteur d'accélération

Plus généralement que dans le contexte de transfert avec consommation simultanée, le facteur d'accélération peut être défini comme le rapport entre deux flux d'absorption définis dans deux situations différentes, par exemple en présence ou non de cellules vivantes, en présence ou non de particules, en présence ou non d'agents de surface...

En général l'accélération du flux de transfert est attribuée à l'augmentation de la valeur effective de $K_L a$ (Eq. 64) par rapport à une valeur de $K_L a$ de référence $(K_L a)_{\text{ref}}$, ce qui revient à définir l'accélération comme un rapport de $K_L a$ (Sundararajan et Ju, 1993) :

$$E = \frac{K_L a}{(K_L a)_{\text{ref}}} \quad (66)$$

Certains auteurs pour qui l'accélération décrit strictement l'effet sur k_L (Tsao, 1977 ; Yagi et Yoshida, 1975), refusent cette définition.

Dans le cas de systèmes complexes (culture cellulaire) il est judicieux d'écrire l'accélération globale comme le produit de plusieurs types d'accélération, par exemple en distinguant les phénomènes physiques et biologiques : par rapport à une valeur de $K_L a$ de référence dans le milieu de culture initial on peut considérer séparément l'accélération provoquée par les modifications chimiques du milieu, E_{chem} , l'accélération due à la présence physique des particules (cellules), E_{pp} , l'accélération provoquée par la respiration des cellules, E_{qO_2} (Andrews et coll., 1984 ; Sundararajan et Ju, 1993) :

$$K_L a = (K_L a)_{\text{ref}} E_{\text{chem}} E_{\text{pp}} E_{\text{qO}_2} \quad (67)$$

L'augmentation de $K_L a$ peut bien sûr être due à l'augmentation du coefficient de transfert k_L , ou de l'aire interfaciale a (Vinke et coll., 1992), et les différents types d'accélération ont souvent des effets opposés sur l'accélération globale (Ju et Sundararajan, 1995).

Les mécanismes, autres que la consommation de l'oxygène dans le film, et pouvant être responsables de l'accélération du transfert d'oxygène sont maintenant présentés. Les modifications du transfert par la présence physique de particules ont déjà été traitées dans la section I.2.7, ces résultats sont transposables aux cultures cellulaires, bien que les particules dont il est question soient des cellules, dont la concentration peut croître avec l'avancement de la culture.

I.3.3.1. Modification du milieu

Les modifications du milieu d'origine biologique sont dues à l'excrétion de métabolites. Ces métabolites peuvent être des surfactants (I.2.4). Ainsi, Bandyopadhyay et coll. (1967) attribuent la décroissance de $K_L a$ aux modifications physicochimiques du milieu (batch de levure ; agitation et ventilation constantes ; $K_L a$ passe de $0,066 \text{ s}^{-1}$ à $0,05 \text{ s}^{-1}$ lorsque X croît de $6 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ à $21,5 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$). L'excrétion d'agents viscosants, comme lors de la production de xanthan (Garcia-Ochoa et Gomez, 2005), peut également modifier le milieu. Les modifications rhéologiques induites par la biomasse elle-même peuvent également être prises en compte dans les modifications du milieu.

Par contre il faut faire attention à ne pas confondre les facteurs modifiant la solubilité de l'oxygène (I.1.1), c'est-à-dire le potentiel de transfert, avec les facteurs ayant un rôle sur $K_L a$. Car le flux transféré est le produit de deux facteurs indépendants : le coefficient de transfert et le potentiel de transfert (Eq. 18) : $\frac{W_{\text{O}_2}}{V_L} = K_L a \cdot (x_{\text{O}_2}^* - x_{\text{O}_2})$. D'autre part il faut faire attention à ne pas attribuer à la biomasse des modifications qu'elle n'a pas générées, comme lors de l'utilisation de cellules empaquetées (Ju et Sundararajan, 1995).

I.3.3.2. Production de gaz dans la couche limite

Lorsqu'un gaz est produit en phase liquide, par exemple CO_2 dans la réaction $\text{HCl}_g + \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{CO}_{2d} + \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$, le liquide peut devenir sursaturé. Le gaz sursaturé peut sortir du liquide soit par diffusion dans la phase gazeuse (CO_{2d} peut diffuser dans HCl dans l'exemple précédent), soit par nucléation spontanée pour éventuellement coalescer avec

la phase gazeuse. Il est supposé par deux auteurs (Shah et coll., 1974 ; Linek et coll., 1996) que le phénomène de nucléation et de croissance des microbulles a la possibilité d'accélérer le transfert des échanges gazeux (HCl et CO_{2d} dans l'exemple précédent) en augmentant la turbulence de la phase liquide au niveau de l'interface. C'est à partir de ce phénomène que Shah et coll. (1974) expliquent l'accélération du transfert (k_L) par 2,5 lors de l'absorption de HCl dans une solution de CO₃²⁻ en jet laminaire de 0,97 mm de diamètre.

I.4. Détermination de $K_L a$

Pour obtenir la valeur de $K_L a$ on peut soit mesurer $K_L a$ directement, soit mesurer K_L et a , mais il est difficile de mesurer indépendamment K_L et a . En général k_L est déduit de la mesure de $K_L a$ et de a (van't Riet, 1979), mesuré par une méthode chimique ou optique (I.2.1.3). Cependant la mesure de a est source d'erreurs et il est préférable de mesurer directement $K_L a$ (Linek et coll., 1988a).

Le nombre des méthodes disponibles pour le calcul de $K_L a$ ainsi que les variantes de leur mise en oeuvre est souvent la cause des incohérences entre les données de la littérature. Nous nous limitons ici aux méthodes applicables en cuve agitée.

On distingue les méthodes « dynamiques » des méthodes « statiques ». Les méthodes dynamiques consistent à étudier l'évolution de la concentration en oxygène (habituellement en phase liquide) en réponse à un échelon de concentration dans le gaz entrant. Les méthodes statiques nécessitent la disparition simultanée de l'oxygène absorbé, soit par un système à flux continu, soit par une réaction chimique ou enzymatique de consommation, et reposent sur un bilan matière de l'oxygène.

On distingue également, par rapport aux bioprocédés on distingue (Rainer, 1990) les méthodes indirectes (sans système biologique) des méthodes directes (avec système biologique consommant de l'oxygène). On distingue aussi les méthodes physiques (basées sur l'absorption ou la désorption d'un gaz) des méthodes chimiques (basées sur la consommation d'un gaz et censées, dans certaines conditions, accélérer le transfert d'oxygène à cause de la réaction dans le film et de la modification des propriétés d'interface), et enfin les méthodes locales (photographies pour mesurer une taille de bulle) des méthodes globales (Poughon et coll., 2003).

I.4.1. Méthodes "dynamiques"

Les principales méthodes dynamiques utilisées pour la détermination de $K_L a$ sont rappelées dans le Tableau 18 (Annexe VI.2). La méthode la plus employée est celle nommée « réoxygénation » dans laquelle le réacteur est soumis à un échelon gazeux entre l'azote et l'air (noté $N_2 \rightarrow \text{Air}$), ou avec de l'oxygène pur, pour un réacteur ayant été préalablement dégazé (échelon noté $0 \rightarrow O_2$), mais une désoxygénation (échelon $\text{Air} \rightarrow N_2$) peut être employée également.

Le calcul permettant d'accéder à la valeur de $K_L a$ repose sur la résolution de bilans matière en régime transitoire pour les phases gaz et liquide, ainsi que de la description de la dynamique de l'électrode (Dang et coll., 1977 ; Ruchti et coll., 1981 ; Linek et coll., 1982).

I.4.1.1. Mise en œuvre de la réoxygénation

L'échelon de concentration peut être effectué de deux manières : en modifiant la concentration en oxygène du gaz d'entrée à vitesse d'agitation et débit de gaz constants (procédure A) ; alternativement, en démarrant l'aération alors que le système ne contient pas de bulle (l'agitation doit alors parfois être démarrée au même moment), sous réserve que la concentration en oxygène au départ soit différente de celle de l'équilibre imposé par le gaz d'entrée (procédure B). Si la procédure A est utilisée l'aire interfaciale et $K_L a$ sont supposés rester constants ; le bilan dynamique sur le gaz dispersé devient alors très important puisqu'il décrit le passage des bulles d'azote aux bulles d'air. $K_L a$ mesuré dans l'eau peut varier de 30% selon la durée de la période de transition pendant laquelle l'azote est coupé et l'air n'est pas encore injecté dans le système (Ruchti et coll., 1981). Il est donc recommandé de fixer ce laps de temps. D'autre part cette influence est amplifiée si le calcul ne prend pas en compte la dynamique du gaz (Linek et coll., 1982). Si la procédure B est utilisée la rétention gazeuse (ou de l'aire interfaciale) prend du temps à se construire et $K_L a$ n'est pas constant mais tend vers une valeur stabilisée. Un modèle linéaire (« start-up ») a été proposé par Linek et coll. (1981, 1987) :

$$(Eq. 68) \quad \left\{ \begin{array}{ll} K_L a'(t) = K_L a \frac{t}{\tau_G} & \text{pour } t \in [0 ; \tau_G] \\ K_L a'(t) = K_L a & \text{pour } t > \tau_G \end{array} \right.$$

où $K_L a'$ est la valeur instantané de $K_L a$ pendant la période transitoire, et τ_G le temps de séjour des bulles ($\tau_G = V_G / Q_d$).

Depuis les années 1980 Linek étudie et propose des améliorations aux méthodes de calcul de K_{La} par réoxygénation. Linek et coll. (1981) démontrent que les valeurs de K_{La} calculées par les procédures A et B sont équivalentes à condition de considérer dans le modèle « start-up » les transports simultanés de l'oxygène et de l'azote dans le cas de l'échelon $N_2 \rightarrow \text{Air}$ (Linek et coll., 1982) ainsi que la construction de la rétention gazeuse, bien que l'influence de cette construction ne semble pas jouer sur le résultat (cuve agitée 1 turbine, $V_L=18$ L, jusqu'à 600 rpm, $Q_d=500$ et 1000 L.h⁻¹ : peut-être la rétention gazeuse est-elle très faible ?). Par contre il n'est pas nécessaire de considérer le transfert d'azote si la procédure A est utilisée (Linek et coll., 1981 ; Linek et coll., 1982). Les valeurs de K_{La} obtenues par la procédure B réalisée avec l'échelon $0 \rightarrow O_2$ ($0,005$ s⁻¹ < K_{La} < $0,2$ s⁻¹) sont comparables avec ceux obtenus par la méthode statique au sulfite (Linek et coll., 1982), pour cette raison Linek considère cette variante de la procédure B comme fiable. Par contre, à partir de $K_{La}=0,05$ s⁻¹ (soit à partir d'une puissance volumique dissipée d'environ 400 W.m⁻³), les valeurs de K_{La} calculées par toute autre méthode dynamique deviennent inférieures à celles calculées par la variante fiable (Linek et coll., 1987). Ceci est d'autant plus vrai que le système est non-coalescent, que la puissance dissipée est forte, que la procédure A est utilisée, et que le réacteur est grand (Linek et coll., 1987). A partir de cette observation, Linek et coll. (1987) réfutent nombre d'articles qui n'utilisent pas la variante « correcte » de la méthode dynamique. Cependant la méthode start-up de Linek n'est pas valable si la période de mise en régime est de l'ordre de grandeur du temps nécessaire à la saturation du réacteur (Gogate et Pandit, 1999).

1.4.1.2. Mesure de la rétention gazeuse

Le volume de gaz dispersé, et à fortiori la rétention gazeuse ($\varepsilon=V_G/V_L$), sont difficilement mesurables (Poizat et coll., 1992). Le volume de gaz dispersé permet le calcul du temps de résidence moyen du gaz en phase liquide, τ_G , dont l'impact sur le profil de réoxygénation est important (Chandrasekharan et Calderbank, 1980). Ruchti et coll. (1981) mesurent la rétention gazeuse par flotteur avec une précision de $\pm 5\%$ à $\pm 10\%$, ce qui représente l'erreur expérimentale la plus importante. Linek et coll. (1982) mesurent ε par une méthode à cinq sondes conductrices avec une précision de 1%.

I.4.1.3. Sur la différence de potentiel (x^*-x)

L'évaluation de la différence de potentiel (x^*-x) est la plus grosse source d'erreur dans le calcul de K_La , en particulier à cause de l'évaluation de x^* .

Pour l'oxygène dissous, x , on suppose en général que la phase liquide est parfaitement mélangée grâce au rétro-mélange, et bien que la phase gaz puisse être considérée hétérogène, la phase liquide est supposée homogène et variant dans le temps (Chapman et coll., 1982). Ceci n'est plus vrai dans les grands fermenteurs (Reuss, 1995). La mesure de x peut dépendre cependant du placement et de la réponse de l'électrode.

Pour la concentration x^* à l'équilibre avec la concentration y de l'intérieur de la bulle (Eq. 2), elle peut être différente en chaque point du fermenteur selon le profil de concentration de la phase gaz. Quatre manières de prendre en compte cette évolution spatiale ont été proposées : en négligeant le transfert ($y^{\text{in}}=y^{\text{out}}$, vérifié à faible K_La et forte ventilation), en supposant la phase gaz parfaitement mélangée ($y=y^{\text{out}}$, vérifié dans l'eau pure et à agitation suffisante), en supposant l'épuisement piston du gaz (« plug flow »), ou en appliquant sur l'ensemble des bulles un modèle de distribution des temps de séjours.

On distingue les systèmes coalescents pour lesquels une composition homogène des bulles peut être atteinte, même pour de larges écarts de concentration entre les gaz d'entrée et de sortie, des systèmes non-coalescents pour lesquels ceci n'est vrai que lorsque la composition du gaz reste très similaire entre l'entrée et la sortie et que la distribution des temps de séjour des bulles est très étroite (Linek et coll., 1982). Pour les systèmes visqueux le gaz ne peut pas être supposé homogène non plus. Cependant un mélange homogène semble pouvoir être réalisé à forte concentration ionique à condition que l'agitation soit suffisante ; le phénomène est sans doute dû à la coalescence forcée qui a lieu dans les cavités gazeuses formées derrière les pales (van't Riet, 1979). D'autre part il semble mauvais de considérer la phase gazeuse homogène si la hauteur de liquide dépasse le diamètre du tank et dans ce cas le modèle piston permet une meilleure approximation du profil de la dispersion (van't Riet, 1979). Une alternative au modèle piston est de considérer le réacteur comme une série de N réacteurs parfaitement agités (Chandrasekharan et Calderbank, 1980).

Le modèle de dispersion n'est jamais idéal. Pour des milieux newtoniens en cuve agitée (75 L, 1 turbine), Popovic et coll. (1982) décrivent la dispersion gazeuse avec deux paramètres m et p : m est la fraction volumique du réacteur où le gaz est considéré comme parfaitement mélangé, et p la fraction où le gaz s'écoule de manière piston. Ainsi la fonction F décrivant la réponse du gaz traceur à un échelon s'écrit :

$$F(t) = 1 - \exp\left(-\frac{1}{m}(t-p)\right) \quad (69)$$

Par exemple, pour une culture de levures ($10 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$, $N=360 \text{ rpm}$; $Q_d=20 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$), $m=0,75$ et $p=0,25$. Yagi et Yoshida (1977) viennent qualitativement à la même conclusion d'une dispersion gazeuse à mi-chemin entre l'écoulement piston et le mélange parfait, avec une tendance à tendre vers le mélange parfait à forte agitation (5 L , $250 < N < 500 \text{ rpm}$). Pour les systèmes visqueux le modèle de Popovic et coll. (1982) prend en compte des zones de stagnation du gaz.

Dans un cas seulement la composition des bulles est uniforme : si ce sont des bulles de gaz pur et que le liquide ait été au préalable complètement dégazé (noté $0 \rightarrow \text{O}_2$) ou que l'oxygène ait été consommé par le sulfite (noté $\text{SO}_3^{2-} \rightarrow \text{O}_2$) (Linek et coll., 1982, 1987). En pratique cette méthode est délicate à mettre en place (Nocentini, 1990).

Midoux et coll. (1980) proposent un modèle de distribution des temps de séjour des bulles basé sur deux équations : une équation de distribution de tailles de bulles et une équation de distribution des temps de séjour en fonction de la taille de bulle. Si k_L est aussi décrit en fonction de la taille de bulle, Midoux donne les limites de l'utilisation des modèles parfaitement mélangés et piston. Par exemple, pour la détermination de $K_L a$ par la méthode au sulfite avec l'oxygène de l'air, l'influence du modèle de dispersion gazeuse génère moins de 10% d'erreur si moins de 30% de l'oxygène présent est transféré pendant son passage dans le réacteur. Une condition analogue porte sur un temps maximum de séjour des bulles dans la cuve.

Chapman et coll. (1982) détournent le problème de la distribution des temps de séjour en proposant une méthode qui s'affranchit du profil de distribution gazeuse. L'inconvénient principal de cette méthode est le suivi dynamique des deux phases, la phase liquide, et la réponse dynamique de la phase gazeuse collectée juste en dessous de la surface du liquide. Chapman proposent également une simplification de cette méthode (développée par Gibilaro et coll., 1985) qui permet de ne suivre que l'évolution dans le liquide, mais elle semble délicate d'utilisation car elle repose sur la valeur de la dérivée seconde de l'oxygène dissous en $t=0$: les points doivent donc être très rapprochés, peu dispersés, et le moment $t=0$ doit pouvoir être déterminé avec certitude. En conclusion les valeurs calculées par l'hypothèse de Chapman sont proches de celles calculées par l'hypothèse de distribution piston.

Pour un même flux transféré, les valeurs de $K_L a$ les plus grandes sont obtenues par le modèle des phases parfaitement mélangées, suivi du modèle piston, et du modèle sans consommation d'oxygène (Gogate et Pandit, 1999).

1.4.1.4. Prise en compte de la biomasse active

La méthode la plus simple pour prendre en compte la présence de biomasse consommant de l'oxygène s'effectue en deux étapes : l'aération est coupée ce qui permet d'évaluer q_{O_2} , puis l'aération est rétablie et $K_L a$ est évalué à partir de la courbe de réoxygénation par un calcul qui tient compte de q_{O_2} . Bandyopadhyay et coll. (1967) signalent que la capacité respiratoire diminue avec la durée de privation en oxygène ; ainsi q_{O_2} mesuré dans la première phase peut être supérieur à la valeur utilisée dans la seconde phase. Il est donc conseillé de ne pas descendre au dessous de la concentration critique ; pour cette raison également, cette méthode ne peut pas être utilisée à fort q_{O_2} . Pour une mesure fiable de q_{O_2} Bandyopadhyay et coll. (1967) conseillent de réduire l'agitation et de laver le ciel à l'azote pendant la mesure afin de supprimer l'aération par la surface.

1.4.1.5. Conclusions sur les méthodes dynamiques

Pour la plupart des méthodes dynamiques, la valeur de $K_L a$ dépend des hypothèses utilisées pour décrire le profil gazeux. Ces hypothèses sont difficilement vérifiables et pèsent largement sur la valeur de $K_L a$: elles constituent donc une source principale d'erreur.

Pour cette raison les méthodes dynamiques sont plus précises à faible valeur de $K_L a$ car l'homogénéité du gaz est plus grande. L'effet de la distribution des temps de séjour des bulles peut être éliminé en travaillant dans des conditions telles que la composition du gaz varie peu entre l'entrée et la sortie du réacteur (Chandrasekharan et Calderbank, 1980), mais ceci est impossible en culture cellulaire ou pour la mesure de $K_L a$ élevés.

La méthode DPM est alors souvent conseillée surtout en réacteur multi-turbine (Linek et coll., 1996 ; Gogate et Pandit, 1999) car elle élimine l'influence du profil gazeux. Elle donne des estimations légèrement plus élevées mais comparables (à 15% près) aux méthodes de réoxygénation et de réponse initiale, sur l'intervalle de puissance dissipée [500 ; 5000 kW.m⁻³] et pour des vitesses superficielles du gaz supérieures à 0,008 m.s⁻¹ (Gogate et Pandit, 1999).

Une autre limitation des méthodes dynamiques apparaît pour celles utilisant la procédure A car il est difficile de supposer $K_L a$ et la rétention gazeuse constants pendant la durée de la saturation à cause du passage d'un gaz à l'autre (Gogate et Pandit, 1999).

Il semblerait également que les différentes dynamiques du système qui se produisent sur des échelles de temps comparables, empêchent d'accéder précisément aux valeurs élevées de K_{La} , car la moindre erreur d'estimation de l'une de ces cinétiques provoque une erreur importante sur l'estimation de K_{La} .

Pour certains auteurs (Chandrasekharan et Calderbank, 1980 ; Linek et coll., 1987) les valeurs élevées de K_{La} ne peuvent pas être estimées de manière fiable par une méthode dynamique car à ce moment là les phases gaz et liquide tendent vers l'équilibre et leurs profils de concentration sont pratiquement indépendants de K_{La} .

I.4.2. Méthodes "statiques"

Les principales méthodes statiques utilisées pour l'évaluation de K_{La} sont rappelées dans le Tableau 19 (Annexe VI.2). Par rapport aux méthodes dynamiques elles nécessitent la consommation ou la disparition en continu de l'oxygène qui a transféré en phase liquide.

I.4.2.1. Méthodes au sulfite

Dans la méthode statique au sulfite, Linek et coll. (1989) prônent l'utilisation de l'oxygène pur, comme pour les méthodes dynamiques, seule variante précise selon eux, les autres variantes donnant des valeurs de K_{La} sous-estimées jusqu'à 50%. De plus, le sulfite peut être alimenté en continu pour diminuer la vitesse d'absorption de l'oxygène et ainsi éviter le rétrécissement des bulles et limiter une variation incontrôlée de l'aire interfaciale (Linek et coll., 1989 ; Linek et coll., 1996). Cette méthode est jugée abusivement imprécise par Gogate et Pandit (1999) : si les K_{La} obtenus par cette méthode sont jusqu'à 150% plus grands que ceux obtenus par les autres méthodes, c'est surtout que les autres méthodes retenues par les auteurs correspondent à des K_{La} calculés dans l'eau pure, et non en solution saline ! Cette méthode présente les désavantages de ne pouvoir être utilisée ni en fermentation à cause des fortes concentrations en oxygène défavorables aux cellules, ni en conditions industrielles à cause de son coût élevé (Gogate et Pandit, 1999).

La méthode au sulfite couplée au bilan gazeux (BG+OS) donne des résultats similaires à la méthode statique au sulfite, pour des valeurs de K_{La} inférieures à $0,019 \text{ s}^{-1}$ (Poughon et coll., 2003) ($V_L=5 \text{ L}$). A forte agitation (500 rpm), les valeurs de K_{La} ainsi obtenues sont environ trois fois plus grandes que celles obtenues par la méthode d'enrichissement en continu réalisée avec de l'eau pure ; la différence est bien sûre attribuée à l'effet des sels sur la coalescence. Poughon suggère alors de réduire la concentration en sels de 50 à 10 g.L^{-1} pour obtenir des résultats semblables (confirmation réalisée en colonne à lit fixe). Cette

dernière suggestion est contradictoire avec l'effet des sels en réacteur agité (Linek et coll., 1987). En effet, au delà d'une concentration en sel supérieure à $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, K_{La} dépend de la concentration en sel qui tend à diminuer la taille des bulles et donc l'aire interfaciale (Gogate et Pandit, 1999).

1.4.2.2. Hypothèse du profil axial de concentration du gaz

C'est surtout pour la détermination de K_{La} par les méthodes statiques que l'hypothèse d'écoulement piston du gaz est utilisée. Dans ce cas on utilise une moyenne logarithmique entre l'entrée et la sortie du réacteur (Poughon et coll., 2003).

Comme pour les méthodes dynamiques, l'utilisation d'air au lieu d'oxygène pur tend à sous-évaluer K_{La} à forte agitation surtout en milieu non-coalescent (Linek et coll., 1990 ; Linek et coll., 2005). Ceci est dû en particulier à la présence de microbulles, comptant pour une grosse partie de l'aire interfaciale, mais sans cesse recyclées et donc en équilibre avec le milieu. Or l'aire interfaciale prise en compte dans le modèle de dispersion gazeuse ne tient pas compte de l'aire interfaciale constituée des microbulles, ineffective pour le transfert global.

1.4.2.3. Comparaison entre les méthodes statiques et dynamiques

Les méthodes statiques sont dites plus fiables que les méthodes dynamiques (Rainer 1990 ; Linek et coll., 1982). En effet, l'obtention d'un système qui varie peu, voir stationnaire, permet de s'affranchir des imprécisions difficilement quantifiables que génèrent les méthodes dynamiques (recherche de l'instant initial, hypothèses de rétention gazeuse constante, présence d'une population de bulle hétérogène (N_2 et air), présence d'une rétention gazeuse permanente...). De plus, dans les méthodes statiques, la dynamique de la sonde peut être ignorée.

En milieu non-coalescent la méthode dynamique utilisant l'échelon ($0 \rightarrow O_2$) est la seule qui donne des résultats comparables avec les méthodes statiques au sulfite et au glucose oxydase ce qui tendrait à prouver son entière fiabilité (Linek et coll., 1982 ; Linek et coll., 1987). Par rapport à ces trois méthodes, les autres méthodes dynamiques (procédures A et B confondues) sous-estiment K_{La} , jusqu'à 1,5 et 2 fois pour des valeurs de K_{La} de $0,1 \text{ s}^{-1}$ et $0,2 \text{ s}^{-1}$, respectivement.

Il apparaît en définitive que la méthode doit être choisie par rapport à sa fiabilité et sa facilité de mise en œuvre en fonction des conditions opératoires imposées par le système.

I.4.3. Méthodes de détermination des facteurs d'accélération

L'augmentation du flux de transfert peut être attribuée à l'augmentation de $K_L a$, c'est l'accélération, mais aussi à la diminution de l'oxygène dissous (Eq. 18 :

$$\frac{W_{O_2}}{V_L} = K_L a \cdot (x_{O_2}^* - x_{O_2}).$$

Il est donc important de bien différencier les deux paramètres.

Certains auteurs comme Tsao appellent accélération les variations sur K_L et effectuent donc leurs mesures à aire interfaciale constante, en cellule d'absorption.

La mise en œuvre expérimentale de l'évaluation de E dépend du facteur d'accélération qui désire être évalué (Eq. 67). L'accélération due à la respiration des cellules est calculée par le rapport :

$$E_{qO_2} = \frac{K_L a}{K_L a_{pp}} \quad (70)$$

où $K_L a$ est mesuré en conditions normales de culture cellulaire, avec respiration des microorganismes, et $K_L a_{pp}$ est mesuré dans les mêmes conditions mais avec la respiration inhibée. Pour bloquer la respiration $HgCl_2$ a été testé sur des boues biologiques (Boumansour et Vasel, 1996). L'azide de sodium (5 mM) est plus fréquemment utilisé, par exemple sur *S. cerevisiae* (Sundararajan et Ju, 1995). L'inconvénient principal de cette méthode est l'arrêt définitif de la culture. La méthode au gaz traceur (Boumansour et coll., 1996 et 1998) permet également de calculer $K_L a_{pp}$ indépendamment de l'accélération due à la consommation d'oxygène car le gaz traceur n'est pas consommé. Cette méthode permet de conserver l'intégralité des conditions expérimentales définies en présence de consommation d'oxygène. Par contre $K_L a$ doit alors être calculé par une autre méthode.

L'accélération due à la présence physique des cellules est obtenue par :

$$E_{pp} = \frac{K_L a_{pp}}{K_L a_{chem}} \quad (71)$$

où $K_L a_{chem}$ est calculé dans le même milieu que $K_L a_{pp}$ mais après centrifugation. L'accélération due aux modifications du milieu est obtenue par :

$$E_{chem} = \frac{K_L a_{chem}}{(K_L a)_{ref}} \quad (72)$$

où $(K_L a)_{ref}$ est le milieu de référence.

La difficulté principale de la mesure de E est de trouver une méthode qui soit applicable dans les deux situations à comparer ; ceci est surtout vrai pour E_{qO_2} car un système physique est à comparer avec un système biologique. Doit-on conclure avec Linek et Beneš (1977) qu'aucune méthode expérimentale sûre pour mesurer un facteur d'accélération en

fermentation n'a pas été trouvée, ceci parce qu'il est très difficile de mesurer une valeur de K_L en milieu « physique » dans les mêmes conditions qu'une valeur en condition de réaction biochimique ?

I.4.4. Synthèse des grandeurs caractéristiques

I.4.4.1. $K_L a$ et facteur d'accélération

Des valeurs de $K_L a$ et de facteurs d'accélération relevées dans la littérature sont listées dans le Tableau 4. Notons que Ju et Sundararajan (1995) ont quantifié trois types d'accélération dont les valeurs dépendent de la vitesse d'agitation : $1,64 \langle E_{chem} \rangle^{2,31}$ (probablement dû à l'enrobage des cellules); $0,81 \langle E_{pp} \rangle^{0,93}$; $1,01 \langle E_{qO_2} \rangle^{1,41}$. Boumansour et Vassel (1998) établissent, en bioréacteur à disques rotatifs: $E=1+12,6 q_{O_2}$.

Tableau 4. Transfert d'oxygène dans la littérature. Les conditions expérimentales rapportées sont celles permettant d'accéder aux valeurs de $K_L a$ les plus importantes. Les valeurs de $K_L a$ rapportées sont les plus hautes valeurs atteintes, ou la gamme de valeurs mesurées dans le cas d'accélération. Les valeurs de q_{O_2} rapportées sont les plus hautes valeurs atteintes. Pour le facteur d'accélération E , la gamme de valeurs atteintes est rapportée. Abréviations : SRT réacteur agité, tRu turbine Rushton, vvm renvoie à un volume d'air par volume de liquide par minute, sauf pour Castan et coll. ou il s'agit d'un volume d'air enrichi en oxygène, X_{max} concentration maximale en cellule sèche, E_{chem} , E_{pp} , E_{qO_2} sont les différentes formes d'accélération (Eq. 67).

Auteurs	Conditions opératoires	Microorganisme, X_{max} ; Type de culture ; Milieu	$K_L a$ (s^{-1}), Méthode de calcul	q_{O_2} ($mol.L^{-1}.h^{-1}$)	E
Linek et coll. (1989)	STR, tRu, $V_L=18$ L, 0,9 vvm, 1050 rpm	0,5 M Na_2SO_4	1 Pression dynamique		
Robinson et Wilke (1973)	STR, tRu, $V_L=2,5$ L, 400<rpm<2200 30<e<18000 $W.m^{-3}$ 0,5<vvm<2	eau pure sels 0,1<I<1,5 $mol.L^{-1}$	0,008-0,08 Réoxygénation 0,036-0,42 Continue au sulfite et réoxygénation		
Bandyopadhyay et coll. (1967)	STR, tRu, $V_L=2$, L, 1 vvm, 600 rpm	<i>S. cerevisiae</i> , 21,5 $g_{DW}.L^{-1}$; Culture continue ; Milieu minéral + glucose	0,086 Réoxygénation	0,0174	
Castan et coll. (2002)	STR, $V_L=4$ L, 1 vvm, air enrichi en oxygène, 1000 rpm	<i>E. coli</i> , 80 $g_{DW}.L^{-1}$; Culture fed-batch ; Milieu minéral + glucose	0,28 (estimée par les auteurs)	n. c.	
Jin et Cen, 2004	STR, $V_L=60$ m^3 , e=2780 $W.m^{-3}$ vvm=0,6	culture de <i>Streptomyces</i> ; milieu complexe	3,89 (record absolu !!! peut-être surestimé...) relation empirique	n. c.	
Ni et coll. (1995)	STR, 2 tRu, $V_L=2$ L, 0, vvm, 900 rpm	<i>S. cerevisiae</i> < 5 $g_{DW}.L^{-1}$; Culture batch ; Milieu complexe + glucose	0,018→0,024 réoxygénation	n. c.	1→1,3
Ju et Sundararajan (1995)	STR, agitateur magnétique, $V_L=0,7$ L, vvm<1, 650 rpm	<i>S. cerevisiae</i> <6 $g_{DW}.L^{-1}$; Cellules réhydratées ; Milieu minéral + glucose	0,0036→0,0097 réoxygénation	0,00135	1,6→2,7
Yagi et Yoshida (1975)	STR, tRu, $V_L=2,6$ L, 1<vvm<2, 400 rpm	<i>Candida tropicalis</i> , 10 $g_{DW}.L^{-1}$; Culture batch ; Milieu minéral + glucose + 148 ppm antifoam	0,028 réoxygénation	n. c.	1,07
Boumansour et Vassel (1998)	Disques rotatifs	Boues activées (biofilm) ; Eaux grasses reconstituées	0,0006→0,0042 Traceur gazeux	0,01	1→5
Garcia-Ochoa et Gomez (2005)	STR, 2 tRu, $V_L=1,5$ L, 1 vvm, 600 rpm	<i>Candida bombicola</i> < 7 $g_{DW}.L^{-1}$; Culture batch ; Milieu complexe + glucose	0,012→0,015 réoxygénation	0,054	1→1,15
Tsao et coll. (1972)	Cellule d'absorption, agitateur magnétique, aération de surface	<i>Acetobacter rancens</i> <6 $g_{DW}.L^{-1}$; Lyophilisé resuspendu ; Solution de glucose, limitation en O_2	0,0006→0,0042 réoxygénation	n. a.	1,5→8

I.4.4.2. Autres paramètres du transfert

Une fourchette des valeurs de k_L , k_G , l'épaisseur du film δ , a et $K_L a$ relevées dans la littérature est rappelée dans le Tableau 5. Dans l'eau distillée k_L est mesuré entre 1 et 6×10^{-4} $m.s^{-1}$ et la valeur de 4×10^{-4} $m.s^{-1}$ est souvent considérée comme une bonne estimation ; en milieu salin des valeurs plus petites sont mesurées, entre 1 et 4×10^{-4} $m.s^{-1}$ (van't Riet, 1979).

Tableau 5. Caractéristiques des contacteurs gaz liquide.

Contacteur	$k_L, \text{m.s}^{-1}$	$k_G, \text{mol.m}^{-2}.\text{Pa}^{-1}.\text{s}^{-1}$	$\delta, \mu\text{m}$	$a, \text{m}^{-1}*$	$K_L a, \text{s}^{-1}$
Colonne à bulles*	$10^{-4} - 4.10^{-4}$	$0,5 \times 10^{-5} - 2 \times 10^{-5}$	100	50 – 600	0,005 - 0,12
Cuve agitée	$0,3 \times 10^{-4} - 6 \times 10^{-4}$		10-20	100 - 2000	0,003 - 1

* d'après Roizard et coll..

I.4.4.3. Cas des réacteurs multi-turbines

Pour l'estimation de $K_L a$ en réacteur multi-turbine, une méthode « start up » avec un modèle piston pour le gaz a été validée pour un régime d'agitation inférieur à celui provoquant la dispersion totale des bulles (Gogate et Pandit, 1999). Mais la méthode de la pression dynamique est recommandée (Gogate et Pandit, 1999) car l'augmentation de pression provoque une variation de concentration dans toutes les bulles à la fois, indépendamment du profil des concentrations, car celui-ci est encore plus difficile à définir qu'en réacteur agité par une seule turbine, et est différent du cas classique où les phases gazeuse et liquide peuvent être supposées homogènes.

Dans les réacteurs multi-turbine il est possible de mesurer $K_L a$ dans chaque étage, un étage étant défini comme la portion de réacteur autour d'une turbine. Les auteurs se contredisent sur l'homogénéité des étages par rapport au transfert. Dans un réacteur biétagé ($d_T=29$ cm, 2 Rushton espacées de d_T , hauteur H du liquide= $2d_T$), Alves et coll. (2004) calculent par la méthode statique à l'eau oxygénée une valeur de $K_L a$ dans l'étage inférieur entre 1,5 et 2 fois supérieure à celle de l'étage supérieur, malgré une aire interfaciale supérieure dans le haut du fermenteur. A l'opposé, dans les mêmes conditions expérimentales, Linek et coll. (2004) calculent simultanément par la méthode de la pression dynamique, une valeur de $K_L a$ identique dans chaque étage. Les travaux du même auteur, entrepris avec une autre méthode, viennent proposer une troisième alternative : dans un réacteur équipé de quatre turbines Rushton ($d_T=19$ cm, turbines espacées de d_T , $H=4d_T$), Linek et coll. (1996) mesurent dans l'eau et en solution de sulfite, dans les trois étages du haut comparé à l'étage du bas, une rétention gazeuse supérieure de 15% et une valeur de $K_L a$ supérieure jusqu'à 45% et s'amenuisant avec la puissance dissipée.

I.5. Conclusions et perspectives

L'étude bibliographique focalise sur l'analyse des travaux relatifs au transfert d'oxygène dans les conditions (milieux, technologie, ...) compatibles avec leurs exploitations en cultures microbiennes. Le nombre important de travaux expérimentaux et théoriques dans le domaine témoigne de l'intérêt majeur du transfert d'oxygène dans les bioprocédés.

La théorie la plus répandue du transfert d'oxygène en culture cellulaire (Arnold et Steel, 1958) (Figure 1) suppose que les microorganismes se trouvent au cœur du liquide, et que le flux d'oxygène transféré dépend de résistances en série dans les phases en contact, la principale résistance étant localisée dans le volume interfacial liquide. Le coefficient volumique de transfert d'oxygène global est ainsi défini par rapport à la phase liquide sous la forme du produit $K_L a$ (s^{-1}) où K_L désigne la conductance globale définie par rapport à la phase liquide, et a l'aire interfaciale.

La comparaison des méthodes de détermination de $K_L a$, en distinguant les méthodes dynamiques (Tableau 18) des méthodes statiques (Tableau 19), a permis de dégager les limites et les contraintes de chaque méthode.

En l'absence de réaction microbienne, les paramètres influant le transfert d'oxygène dans les bioréacteurs ont été recensés. Il apparaît qu'il est relativement aisé d'augmenter le flux de transfert d'oxygène par augmentation de la solubilité de l'oxygène dans le liquide, en augmentant la pression, en enrichissant le flux d'alimentation de gaz, ou artificiellement en introduisant des vecteurs d'oxygène (Rols et coll., 1990 ; Ju et coll., 1991). Il est également aisé d'augmenter $K_L a$ en augmentant la puissance dissipée ou le flux d'aération (van't Riet, 1979). Il reste cependant difficile de prédire précisément l'évolution de $K_L a$, comme résultante du produit K_L et a , compte tenu du nombre important des paramètres mis en jeu et de leurs effets croisés. L'analyse des travaux mentionnés dans la littérature permet la synthèse présentée dans le Tableau 6, où l'influence des 8 principaux paramètres physico-chimiques et mécaniques est reportée.

Tableau 6. Influence sur $K_L a$ d'une augmentation de la valeur des paramètres physiques, chimiques et mécaniques. + augmentation de la valeur de $K_L a$; - diminution de la valeur de $K_L a$; 0 sans effet.

Paramètre	Influence sur K_L	Influence sur a	Tendance globale
Puissance dissipée e	+ ou -	+	+
Débit d'aération	0	+	+
Viscosité	0 ou -	-	0 ou -
Température	+	≈ 0	+
Concentration en sels	+ ou -	+	+
Agents de surface	-	+	+ ou -
Agents antimousse	-	-(ou +)	-(ou +)
Particules solides	+ ou -	+ ou -	+ ou -

Les investigations du transfert d'oxygène en bioréacteur en l'absence de réaction biologique sont principalement réalisées dans l'eau et des solutions aqueuses d'un sel, avec des niveaux de puissance dissipée inférieurs à 5000 W.m^{-3} (Gogate et Pandit, 1999). Les auteurs dont les travaux ont été réalisés au-delà de 5000 W.m^{-3} sont en nombre restreint : Linek et coll. (2005) estiment $K_L a$ jusqu'à $e=7000 \text{ W.m}^{-3}$, Robinson et Wilke (1973) et Hassan (1976) mesurent $K_L a$ jusqu'à $e=20000 \text{ W.m}^{-3}$, Veljković et coll. (1991) et Wu (1995) étudient l'entraînement de surface jusqu'à $e=20000 \text{ W.m}^{-3}$. Une attention particulière est accordée aux travaux relatifs au phénomène d'aération de surface, et plus spécifiquement d'entraînement de surface ; les modèles proposés dans la littérature sont explicités et discutés : c'est un phénomène qui perturbe l'écoulement gazeux et qui peut devenir la source principale d'aération, en particulier avec l'utilisation de vitesses d'agitations élevées, et en réacteurs multi-turbines.

Les valeurs de $K_L a$ alors obtenues sont très dispersées, variant d'un facteur 1 à 3 selon la méthode utilisée pour une même configuration de réacteur. Cette incertitude augmente avec $K_L a$, car plus la valeur de $K_L a$ est élevée, plus elle est difficile à déterminer, en particulier à cause de la difficulté à modéliser correctement la phase gazeuse (Linek et coll., 1987). La principale difficulté consiste à concilier une mise en œuvre expérimentale fiable et reproductible avec la complexité des modèles adéquats et des méthodes de résolution. Il semble que la compatibilité des mesures avec Eq. 21: $K_L a = \chi \cdot e^\alpha \cdot U_S^\beta$, comme le suggèrent Linek et coll. (2005), puisse servir de test efficace à la validation des résultats.

En présence de réaction microbienne, le coefficient global de transfert d'oxygène K_T est défini dans la phase liquide conformément aux travaux de Sundararajan et Ju (1993) (Eq. 67) :

$$K_T = (K_L a)_{\text{ref}} E_{\text{chem}} E_{\text{pp}} E_{\text{qO}_2}$$

où $(K_{La})_{ref}$ est déterminé dans un milieu exempt d'influence biologique, et où E_{chem} , E_{pp} et E_{qO_2} désignent respectivement les facteurs d'accélération relatifs aux modifications du milieu par l'activité microbienne, à la présence physique des cellules et à leur respiration. Le domaine d'investigation expérimentale est limité à des concentrations cellulaires inférieures à $10 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$ et des consommations volumiques d'oxygène inférieures à $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tableau 4).

Il apparaît donc que le transfert d'oxygène dans les bioréacteurs mobilise de nombreuses équipes de recherche mais que le champ d'investigation n'est pas compatible avec les conditions de production intensive. De nombreuses questions scientifiques sont en suspens :

Comment quantifier et modéliser le transfert d'oxygène en condition de production intensive? C'est-à-dire lorsque les concentrations cellulaires sont supérieures à $50 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$, les consommations volumiques d'oxygène sont supérieures à $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, en milieux complexes, avec des vitesses d'agitation et des puissances dissipées élevées, avec une hydrodynamique complexe de réacteur, et en présence d'interactions entre les dynamiques des phénomènes physiques et biologiques.

Comment quantifier K_{La} à forte puissance dissipée dans les réacteurs équipés de plusieurs turbines? Fréquemment utilisés pour les cultures cellulaires intensives, et moins étudiés que les réacteurs mono-turbine, ils favorisent l'entraînement de surface, évité dans la littérature à cause de la complexité des écoulements hydrodynamiques induits. Dans ces conditions d'aération par le diffuseur en présence d'entraînement de surface, aucune estimation de K_{La} n'est encore proposée.

Quelles sont les influences de l'activité cellulaire sur le transfert, dans des conditions de production compatibles avec une transposition industrielle? Yagi et Yoshida (1975) écrivent « dans les cas usuels le facteur d'accélération par rapport à l'absorption d'oxygène en milieu de fermentation est très légèrement supérieur à un ou négligeable (...) à moins que le taux de respiration et/ou la concentration en biomasse soit très élevés ».

Comment prendre en compte la présence physique des cellules, lorsque le moût de fermentation est un système triphasique liquide-solide-gaz (Monbouquette, 1987)? Est-il possible que les phénomènes de transfert à l'interface soient modifiés par l'accumulation

des microorganismes et par leur activité, par transposition des travaux de Tsao et Lee (1975) ?

Ces travaux ont l'ambition de contribuer à formuler des éléments de réponse à ces questions scientifiques par une démarche associant expérimentation et modélisation. Devant la complexité des phénomènes, la démarche vise l'étude du transfert d'oxygène en bioréacteur - en présence de différents milieux minéraux, par référence aux travaux antérieurs mentionnés dans la littérature, mais aussi au-delà des valeurs de puissance dissipée investiguées à ce jour ; - lors de cultures en mode fed-batch d'*Escherichia coli*, de *Saccharomyces cerevisiae* et d'*Aspergillus niger* en condition de forte concentration cellulaire et forte consommation volumique d'oxygène.

L'originalité de ce travail repose sur l'étude in-situ en condition de culture et de production intense, compatible avec une mise en œuvre industrielle.

II. MATERIEL ET METHODES

J'ai bénéficié pour mes travaux des résultats issus de cultures de *Saccharomyces cerevisiae* réalisées par Laëtitia Faure (2005) pendant son travail de doctorat, ainsi que de cultures d'*E. coli* et de *Saccharomyces cerevisiae* réalisées par le Professeur Jean-Louis Uribe Larrea. Les méthodes qui ne sont pas directement reliées à mes investigations sont présentées en annexe.

II.1. Souches et milieux de cultures

Souches

Trois microorganismes sont utilisés :

Escherichia coli K12, souche pour la production de β -galactosidase.

Saccharomyces cerevisiae, souche propriété de Lesaffre.

Aspergillus niger, souche propriété de DSM.

Milieux de cultures

Huit milieux sont utilisés, dont 4 milieux de référence et 6 milieux de culture :

Milieux de référence :

R1) L'eau distillée est utilisée comme milieu coalescent de référence.

R2) Une solution de sulfite de sodium (Na_2SO_3) ou de sulfate de sodium (Na_2SO_4) à 50 g.L^{-1} est utilisée comme milieu ionique non-coalescent de référence, selon que la réaction de consommation d'oxygène est nécessaire ou non. La concentration de 50 g.L^{-1} permet dans les deux cas d'inhiber complètement la coalescence en réacteur agité (Linek et coll., 1987). Les forces ioniques correspondant à ces concentrations (Tableau 7) dépassent largement la force ionique minimum de $0,4 \text{ mol.L}^{-1}$ permettant l'inhibition de la coalescence en expériences statiques (Lessard and Zieminski, 1971) (I.2.3).

R3) Une solution de sulfite de sodium (Na_2SO_3) ou de sulfate de sodium (Na_2SO_4) à 10 g.L^{-1} est utilisée comme milieu ionique non-coalescent de référence, selon que la réaction de consommation d'oxygène est nécessaire ou non.

R4) Une solution constituée des trois principaux sels du milieu de culture batch pour *E. coli* (par litre d'eau) : K_2HPO_4 8 g ; Na_2HPO_4 2 g ; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 8 g.

Milieux de culture :

1) Milieu LB (par litre d'eau) : extrait de levure 5 g, peptone 10 g, NaCl 9 g, glucose 10 g. La gélose LB est obtenue de la même façon en ajoutant Agar-agar 15 g (Biokar Diagnostics).

2) Milieu de culture batch pour *E. coli* (par litre d'eau) : acide citrique 6 g ; K₂HPO₄ 8 g ; Na₂HPO₄ 2 g ; (NH₄)₂SO₄ 0,75 g ; (NH₄)₂HPO₄ 8 g ; NH₄Cl 0,13 g ; MgSO₄ 1 g ; CaCl₂·2H₂O 0,04 g ; FeSO₄·7H₂O 0,004 g ; Thiamine·HCl 0,01 g ; MnSO₄·H₂O 0,02 g ; CoCl₂·6H₂O 0,008 g ; ZnSO₄·7H₂O 0,004 g ; Na₂MoO₄·2H₂O 0,004 g ; CuCl₂·2H₂O 0,002 g ; H₃BO₄ 0,001 g.

3) Milieu de culture fed-batch pour *E. coli* (par litre d'eau) : H₃PO₄ (85% m/m) 20,5 mL ; KH₂PO₄ 75 g ; Na₂HPO₄·12H₂O 9 g ; MgSO₄·7H₂O 47 g ; CaCl₂·2H₂O 3,7 g ; FeSO₄·7H₂O 3,7 g ; MnSO₄·H₂O 0,21 g ; Na₂MoO₄·2H₂O 0,022 g ; CoCl₂·6H₂O 0,04 g ; CuCl₂·2H₂O 0,064 g ; ZnSO₄·7H₂O 0,725 g ; H₃BO₄ 0,021 g ; Thiamine 0,8 g.

Les compositions des milieux de pré-culture et de culture pour *E. coli* ont été calculés selon l'approche d'Egli & Fiechter (1981).

4) Milieu salin de référence (par litre d'eau distillée) : il s'agit des trois principaux sels présents dans le milieu initial d'*E. coli* : K₂HPO₄ 8 g, (NH₄)₂HPO₄ 8 g, Na₂HPO₄ 2 g.

5) Milieux de culture batch et fed-batch pour *S. cerevisiae* : milieux industriels définis (propriété de Lesaffre).

6) Milieux de culture batch et fed-batch pour *A. niger* : milieux industriels définis (propriété de DSM).

Les forces ioniques de certains milieux sont reportées dans le Tableau 7.

Tableau 7. Forces ioniques de milieux utilisés.

Milieu	Force ionique (mol.L ⁻¹)
Na ₂ SO ₃ 50 g.L ⁻¹	1,19
Na ₂ SO ₄ 50 g.L ⁻¹	1,06
Na ₂ SO ₃ 10 g.L ⁻¹	0,24
R4	0,3
milieu initial pour <i>E. coli</i>	0,33
milieu initial pour <i>S. cerevisiae</i>	0,2

II.2. Conditions de culture

II.2.1. Conditions de culture d'*E. coli*

Pré-cultures

La souche conservée à 4°C sur gélose LB est mise en culture dans un tube contenant 5 mL de solution LB, incubé pendant 12 h à 37°C sur table agitante. Le contenu est ensuite transvasé dans une fiole d'Erlenmeyer contenant 250 mL de milieu de culture batch et 10 g.L⁻¹ de glucose, incubé pendant 12 h à 37°C sur table agitante. Cette série d'opérations est réalisée en quadruple pour obtenir un volume final d'inoculum de 1 L, utilisé pour inoculer 9 L de milieu de culture batch dans le bioréacteur de 22 L.

Culture en fermenteur de 22 litres

Les cultures sont réalisées dans un fermenteur BRAUN (modèle Biostat E, BRAUN DIESSEL BIOTECH, Melsungen, Allemagne), hauteur 63 cm, diamètre intérieur $d_T=21,3$ cm, volume total une fois équipé 22,86 L, fond plat, bafflé (4 contre-pales largeur 3,25 cm), anneau d'aération placé à 2 cm du fond, trois turbines Rushton-6 pales (diamètre $d_D=8,4$ cm, soit $d_T/d_D=2,54$; hauteur de pale 1,7 cm) placées respectivement à 5, 21 et 37 cm du fond (c'est-à-dire espacées d'une distance $2d_D$). L'arbre d'agitation est entraîné par un moteur de 750 W et la puissance consommée par le moteur d'agitation peut être lue sur le panneau de contrôle, exprimée en pourcentage de la puissance maximum ($\pm 2\%$). La configuration du réacteur nous permet de calculer une vitesse d'agitation limite autour de 450-470 rpm permettant la répartition optimale du gaz dans l'ensemble du réacteur (van't Riet, 1979) ; cette vitesse limite est systématiquement dépassée dans notre étude.

Le bioréacteur est équipé de modules de mesure et régulation du pH (sonde FERMPROBE BROADLEY-JAMES Co., Santa Ana, USA), de la pression, et de l'oxygène dissous (sonde INGOLD, Urdorf, Suisse), la sonde est placée à 8 cm du fond dans un picage incliné de 30°. Le fermenteur est connecté à un ordinateur. Le module d'entrée-sortie permet l'acquisition en ligne des données des capteurs (vitesse d'agitation, température, pH, oxygène dissous, pression), du temps de fonctionnement des pompes de liquides régulateurs de pH et d'antimousse ainsi que la commande des pompes d'alimentation en substrats, la liaison asynchrone reliant la balance (modèle I 12000 S, SARTORIUS, Göttingen, Allemagne) à l'ordinateur permet l'acquisition en ligne de la masse du réservoir contenant la solution de substrat alimentant le bioréacteur. Le volume total de la dispersion est accessible par simple lecture par la fenêtre latérale, s'il ne dépasse pas 17 L.

Le logiciel de gestion de l'alimentation du réacteur en substrat a été développé au laboratoire par P. Perlot (Béghin Say) et J.-L. Uribe Larrea (INSA). Il présente les fonctions suivantes : mesure, filtrage et stockage des données, calcul des variables indirectes, contrôle et représentations graphiques. Il permet en particulier une estimation du taux de croissance à partir de la mesure de la quantité de base ajoutée pour réguler le pH et une estimation du taux de croissance à partir de la mesure de dO_2 , à taux de transfert d'oxygène constant (agitation, aération et pression constantes).

Le milieu contenant les sels est stérilisé dans le fermenteur à 120°C pendant 20 minutes. La solution de calcium et de magnésium est stérilisée séparément en autoclave à 120°C pendant 20 minutes, puis est transvasée dans le fermenteur par piquage stérile. Les solutions de fer et d'oligo-éléments sont ajoutées stérilement à la seringue. Le glucose est préparé séparément en solution concentrée à 700 g.L⁻¹ et autoclavé à 120°C pendant 20 minutes. L'alimentation en substrat carboné est assurée par une pompe péristaltique commandée par le logiciel précité.

Le pH est régulé à 6,8 par addition d'une solution d'ammoniaque à 28%, et la température est régulée à 37°C.

Récupération du moût

Le milieu contenant les cellules à l'état stationnaire est obtenu en fin de culture après avoir prolongé la culture sans alimentation en substrat (afin que d'éventuelles traces d'alcool et d'aldéhyde soient reconsommées pour ne pas fausser la mesure de K_{La}), puis arrêté l'agitation et le flux d'aération (pour permettre l'évacuation des microbulles et la mesure du volume liquide réel).

Le milieu de culture épuré en microorganismes est obtenu par centrifugation de la culture à l'état stationnaire. Les cellules sont conservées à l'état stationnaire dans le réacteur avant d'être centrifugées par lots en pots de 0,5 L pendant 10 min à 5°C à 7000 g (Avanti J-25, Beckman Coulter, Palo Alto, USA).

Les surnageants associés aux moûts sont obtenus après centrifugation des moûts (Avanti J-25, Beckman Coulter, Palo Alto, USA ; 10 min, 5°C, 7000 g).

Analyse des gaz de fermentation

Les gaz de fermentation en entrée et sortie du fermenteur sont analysés par un spectromètre de masse (PRIMA 600S, VG gas, Manchester, Royaume-Uni). Les fractions molaires de CO₂, O₂, N₂ et Ar sont déterminées avec une précision relative de 0,1%. La

mesure de la composition des gaz de sortie est effectuée toutes les minutes ; la composition de l'air en entrée du fermenteur est analysée toutes les heures.

Les techniques analytiques classiquement utilisées en génie microbien sont présentées Annexe VI.3, et la méthode de lissage et de réconciliation des données expérimentales annexe VI.4.

II.2.2. Conditions de culture de *S. cerevisiae*

Les trois turbines Rushton sont placées à 5, 17 et 29 cm du fond.

Le pH est régulé à 4,6 par addition d'une solution concentrée de potasse (5N) ou d'acide phosphorique (5N) et la température est régulée à 30°C.

II.2.3. Conditions de culture d'*Aspergillus niger*

Les cultures d'*Aspergillus niger* ont été réalisées à DSM-Delft et sont soumises à la confidentialité industrielle. Le réacteur cylindrique de 25 L en verre, d'un diamètre $d_T=23$ cm équipé de deux turbines Rushton ($R6$, $d_D=95$ cm, hauteur de pale 5 cm) placées à 4,8 cm et 14,3 cm du fond, d'un disque rotatif pour casser la mousse, et de l'équipement standard de contrôle. Les cultures sont réalisées à 34°C sans surpression. Les gaz sont analysés par spectromètre de masse. L'acquisition des mesures est réalisée toutes les 3 minutes. Les mesures de viscosité sont réalisées à l'aide d'un viscosimètre coaxial TVE-05 (Lamy sas, France).

II.3. Détermination de $K_L a$

II.3.1. Choix des méthodes expérimentales

La méthode idéale permettant la détermination de $K_L a$ devrait pouvoir s'appliquer aussi bien sur les milieux biologiques consommant de l'oxygène, que sur les milieux minéraux -en particulier l'eau pure et les solutions ioniques- afin de permettre une comparaison directe des résultats. Cependant, aucune des méthodes dynamiques ni des méthodes statiques ne peut s'appliquer à la fois dans les deux conditions. Les méthodes dynamiques (Tableau 18) ne sont plus valables aux fortes valeurs de q_{O_2} et de $K_L a$ rencontrées en milieu biologique. Quand aux méthodes statiques, elles ne permettent pas la caractérisation de $K_L a$ en eau pure à cause de l'ajout obligatoire d'éléments dans le milieu (Tableau 19).

Plusieurs méthodes doivent donc être combinées, en fonction des conditions expérimentales.

Pour l'estimation de K_{La} en milieu biologique la seule méthode applicable est la méthode des bilans gazeux, également utilisable pour les solutions de sulfite avec consommation d'oxygène.

Pour le calcul de K_{La} en eau pure et en milieux minéraux différents des solutions de sulfite, la méthode DPM est attirante mais elle est écartée à cause de difficultés de mise en oeuvre. La méthode par réoxygénation est la plus fiable, selon Linek et coll. (1982, 1987), si elle est pratiquée en utilisant de l'oxygène pur, ce qui nécessite un appareillage spécifique (en particulier vierge de toute trace de matière organique), et c'est pourquoi elle est écartée au profit de l'échelon $N_2 \rightarrow \text{Air}$.

II.3.2. Méthodes du bilan gazeux: BG et BG+OS

Le matériel et méthode nécessaire à la détermination de K_{La} par la méthode du bilan gazeux est celui décrit dans les conditions de culture de *E. coli* (II.2.1). Les valeurs de K_{La} sont calculées en ligne toutes les minutes.

L'erreur de mesure la plus significative de cette méthode porte sur l'évaluation de $x_{O_2}^*$ à $\pm 2\%$. Afin de minimiser le report de cette erreur sur gradient $(x_{O_2}^* - x_{O_2})$, la condition $10\% \langle dO_2 \langle 80\%$ est recherchée. Ainsi K_{La} est déterminé à $\pm 10\%$.

La méthode du bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite (BG+OS) pour la détermination de K_{La} découle de la méthode BG. Le réacteur Braun (20 L) est équipé comme pour la culture cellulaire. Les expériences sont réalisées à une pression relative de 0,3 bar et une température de 37°C. La sonde à oxygène n'est pas utilisée pour ne pas être détériorée par le sulfite; elle est débranchée et la valeur correspondante de l'oxygène dissous vaut $-0,25 \pm 0,01\%$ (il est vérifié avec la sonde Electrosense que la concentration en oxygène dissous dans le réacteur est toujours nulle en cours d'expérience). La composition du gaz (N_2 , O_2) en sortie de réacteur est analysée par détection infra rouge (URAS-8 de B. Braun, équipé du module de détection EGAS 10E de Hartmann et Braun).

La méthode est basée sur la consommation du sulfite dans la réaction:



Les expériences sont réalisées avec des concentrations en sulfite de sodium (Na_2SO_3) de 10, 25 et 50 g.L⁻¹ (pour $V_L=10$ L). Le Cobalt est utilisé comme catalyseur : une solution mère de

$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5×10^{-4} M est préparée: l'ajout de 10 mL de cette solution dans le réacteur permet une concentration finale de 5×10^{-7} M. Il est vérifié que le catalyseur n'accélère pas la réaction, ce qui augmenterait artificiellement la valeur de $K_{L,a}$ (Reuss, 1993). Pour cela, plusieurs concentrations en catalyseur sont testées à conditions opératoires fixes (Tableau 8): $K_{L,a}$ n'augmente pas avec la concentration en catalyseur mais reste constant à 3% près.

Tableau 8. Vérification du régime diffusionnel pour le calcul de $K_{L,a}$ par la méthode du bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite.

Conditions opératoires		$K_{L,a}$ (s^{-1}), selon $[\text{Co}^{2+}]$			erreur, %
Us, cm.s^{-1}	N, rpm	10^{-6} M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M	
0,28	600	0,31	0,32		1,64
0,28	1000	0,581		0,578	0,37
0,56	1000		0,84	0,81	2,89

Le sulfite de sodium est ajouté dans l'eau à agitation et aération réduites pour limiter la réaction avec l'oxygène. Une fois l'agitation et l'aération fixées, le cobalt est ajouté. Les valeurs de $K_{L,a}$ sont calculées en ligne. On observe une évolution des valeurs calculées : la valeur de $K_{L,a}$ est d'abord surestimée (due à la mise en régime du réacteur), puis se stabilise, puis chute doucement (à cause de l'épuisement du réactif), puis chute très rapidement (lorsque tout le sulfite est consommé). La valeur de $K_{L,a}$ retenue correspond à celle mesurée en régime permanent (moyenne des points pour lesquels la dérivée $dK_{L,a}/dt$ est constante et le plus proche de 0). En pratique le volume de gaz ventilé avant d'atteindre le régime permanent correspond environ à quatre fois le volume du ciel. Dans ces conditions il n'est pas possible Lorsque la vitesse d'agitation 1500 rpm est testée avec $10 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$ il n'est pas possible d'atteindre le régime permanent ; $25 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_3$ sont donc utilisés au lieu de 10 g.L^{-1} dans ce cas.

II.3.3. Méthode de réoxygénation

La détermination de $K_{L,a}$ par la méthode de réoxygénation nécessite d'abord la modélisation de la réponse de la sonde, puis la mise en œuvre expérimentale de la réoxygénation, et enfin l'identification de $K_{L,a}$ par une méthode numérique de calcul.

II.3.3.1. La sonde à oxygène à réponse rapide

a) Choix

Les qualités d'une sonde pour mettre en œuvre la méthode dynamique sont d'abord sa constante de temps qui doit être réduite, et aussi sa stabilité et sa linéarité par rapport à la

concentration en oxygène (assurées par un faible flux d'oxygène vers la cathode). Ces qualités dépendent essentiellement du matériau de la membrane et de son épaisseur. Les membranes en Téflon, très perméables à l'oxygène, ne fournissent pas toujours un signal linéaire (Linek et coll., 1987). Avec une membrane en polypropylène de 10 μm (même coefficient de diffusion que le Téflon, mais moins perméable), Linek et coll. (2005) obtiennent un temps de réponse inférieur à 1,25 s. Pour que la sonde soit utilisable dans une méthode dynamique il faut impérativement que sa constante de temps τ_S additionnée à la constante de temps du film liquide adjacent à la membrane de la sonde, τ_F , soit inférieure au temps caractéristique du transfert (Ruchti et coll., 1981), autrement la moindre erreur d'appréciation d'un des paramètres cinétiques (τ_G , τ_F , τ_S) entraîne de très larges erreurs sur la valeur de $K_L a$:

$$\tau_S + \tau_F < \frac{1}{K_L a} \quad (74)$$

Une sonde ELECTROSENSE (19 Keswick drive, Frodsham WA6 7LT, R.U.) est utilisée : cathode en or, anode en argent, solution électrolytique à 15 g NaCl complétée à 100 mL d'eau distillée, membrane en Téflon (12,7 μm), temps de polarisation 8 heures. Alimentation en 0,6 V par le boîtier, sortie entre 0 et 10 mV (certaines interférences peuvent être évitées en réduisant au maximum la longueur des connections entre le boîtier et la nappe reliée à l'ordinateur ; 5 cm fonctionne bien), acquisition toutes les 0,1 s. L'anode oxydée est régénérée par immersion dans un bain d'ammoniaque (14%) pendant une dizaine de secondes.

b) Fiabilité de la sonde Electrosense

La sonde Electrosense a été sélectionnée pour sa rapidité, elle présente par contre de nombreux désavantages.

La sonde Electrosense n'est pas linéaire avec la concentration en sels, ni avec la température, et elle dévie dans le temps. Elle est donc difficilement calibrable, c'est pourquoi le signal doit être normalisé pour l'exploitation de chaque réoxygénation.

La valeur indiquée par la sonde Electrosense est influencée par l'agitation, d'une part parce que la sonde consomme énormément d'oxygène comparé à une sonde ordinaire, d'autre part parce que la valeur affichée semble fortement influencée par la pression au niveau de la membrane : l'ensemble des expériences a été réalisé en fixant de manière identique la sonde par rapport aux turbines.

c) Modélisation de la réponse de la sonde

L'étude de la dynamique de la sonde s'effectue en soumettant la sonde à un échelon de concentration (Linek et coll., 1987) : un liquide appauvri en oxygène (fiolle Erlenmeyer avec barbotage de N_2 ; le rétrécissement du col permet d'empêcher l'entrée d'air) et un liquide saturé par l'oxygène de l'air (bêcher avec barbotage d'air). La permutation (d'une durée de l'ordre de la seconde) a lieu après que la valeur mesurée ait atteint une valeur constante.

La caractérisation de la dynamique de la sonde s'opère dans des conditions opératoires différentes des conditions expérimentales de culture, or les conditions opératoires (agitation, viscosité, température), et en particulier l'importance du film liquide adjacent à la membrane, influencent la réponse de la sonde (Dang et coll., 1977). Ainsi, la caractérisation du réacteur ayant lieu en conditions turbulentes, un régime turbulent est garanti dans la fiolle Erlenmeyer et dans le bêcher par des barreaux magnétiques tournant à 750 rpm ; le flux liquide arrive tangentiellement à la membrane ce qui permet la régénération de la couche limite adjacente à la membrane (comme dans le réacteur agité) et le balayage d'éventuelles bulles d'air. D'autre part un support permet de maintenir la sonde telle que, dans les deux récipients, la membrane soit à égale distance du barreau d'agitation (2 cm). L'expérience est réalisée à 1 atm et à 37°C (température de culture).

La modélisation la plus répandue (Dang et coll., 1977), est constituée de deux premiers ordres en série, modélisant la diffusion dans le film liquide :

$$\frac{d x_F}{dt} = \frac{x_{O_2} - x_F}{\tau_F} \quad (75)$$

suivie de la diffusion dans la membrane :

$$\frac{d x_S}{dt} = \frac{x_F - x_S}{\tau_S} \quad (76)$$

où x_{O_2} est la concentration en oxygène au cœur du liquide, x_F la concentration en oxygène dans le film liquide, x_S la concentration en oxygène mesurée par la sonde, τ_F la constante de temps relative au film liquide, et τ_S la constante de temps de la sonde. Il existe des modèles plus complexes de diffusion à travers la membrane, basés sur la seconde loi de Fick (Rainer, 1990 ; Ruchti et coll., 1981).

D'après Linek et coll. (1987), pour des vitesses de rotations supérieures à 1000 rpm (2 m.s^{-1} en bout de pale) l'influence de la diffusion dans le film liquide devient nulle (ou négligeable devant τ_S) et la réponse de la sonde peut être modélisée par un premier ordre (en remplaçant x_F par x_{O_2} dans Eq. 76), alors que pour des vitesses de rotation inférieures à 1000

rpm ou pour des systèmes visqueux, τ_F n'est plus négligeable ($\tau_F=1,9$ s à 500 rpm dans l'eau ; Linek et coll. (1987)). Dang et coll. (1977) conseillent de déterminer τ_F expérimentalement pour chaque condition utilisée dans la détermination de $K_L a$; ce qui est pratiquement impossible dans nos conditions car il faudrait pouvoir plonger instantanément la sonde dans le réacteur. Dans nos conditions (milieu non visqueux, turbulent), la réponse de la sonde Electrosense à un échelon de concentration d'oxygène est approximée par un retard suivi d'un premier ordre (Nocentini, 1990).

Le retard dû à la résistance de la membrane est mesuré en utilisant un échelon gazeux (Linek et coll., 1987), la résistance du film étant alors négligeable, et l'échelon de concentration quasi-instantané. La sonde est fixe, l'alimentation en gaz (alternativement N_2 et Air) est positionnée en face de la membrane (à environ 1 cm). L'acquisition est déclenchée à l'instant t_{00} correspondant au changement de la nature du gaz ; le retard pur de la sonde, R_1 , correspond au premier instant pour lequel la dérivée de la mesure de la sonde est différente de 0 : mesuré à 25°C, R_1 vaut $0,34 \pm 0,11$ s (moyenne sur 23 valeurs).

Cette réponse à un échelon $N_2 \rightarrow$ Air en phase aqueuse à 37°C est présentée sur la Figure 8. A l'instant t_{00} la sonde est déplacée de la concentration 0 à la concentration 1 (la concentration en oxygène dissous, \bar{x}_{O_2} , est normalisée entre 0 pour un système ne contenant pas d'oxygène, et 1 pour un système saturé par l'oxygène de l'air à la température et à la pression expérimentale). A l'instant t_{01} la sonde réagit. A l'instant t_{02} la réponse est modélisée par un premier ordre, de constante de temps τ_S . L'instant t_{85} correspond à la valeur de x_S qui vaut 85% de la valeur de l'échelon. Le retard se compose donc du retard pur R_1 (mesuré précédemment) augmenté d'un retard R_2 résultant de la non idéalité entre l'expérience et le premier ordre. L'instant t_{01} est flottant et correspond mathématiquement à l'instant tel que la dérivée $\frac{x_{t_{01}+\Delta t} - x_{t_{01}}}{\Delta t}$ s'écarte de la valeur nulle. L'instant t_{02} correspondrait au premier instant tel que $\frac{x_{t_{02}+\Delta t} - x_{t_{02}}}{\Delta t} \neq 0$ dans l'hypothèse où la sonde suivrait un premier ordre parfait. On définit ainsi le retard $R_2 = t_{02} - t_{01}$.

Le modèle représentant la dynamique de la sonde est défini par les deux paramètres τ_S et t_{02} , calculés par identification paramétrique en minimisant la fonction $\sum_{t_{02}+R_2}^{t_{85}} (x_S - x_{SM})^2$ définie pour $t \in [t_{02} + R_2, t_{85}]$ afin de représenter au mieux les expériences ; x_S est la valeur mesurée par la sonde et x_{SM} la valeur modèle calculée par la fonction :

$$\frac{dx_{SM}(t)}{dt} = \frac{\bar{x}_{O_2} - x_{SM}(t)}{\tau_S}, t \in [t_{02}, t_{85}]. \quad (77)$$

Les valeurs de R_2 et de τ_S dépendent du sens dans lequel est effectué l'échelon : le retard R_2 est plus grand dans le sens $N_2 \rightarrow \text{air}$ ($R_2^{N_2 \rightarrow \text{air}}/R_2^{\text{air} \rightarrow N_2}=1,5$), alors que la constante de temps de la sonde est plus petite dans le sens $N_2 \rightarrow \text{air}$ ($\tau_S^{N_2 \rightarrow \text{air}}/\tau_S^{\text{air} \rightarrow N_2}=0,5$). Puisque $K_{L,a}$ est mesuré dans le sens $N_2 \rightarrow \text{air}$, seule cette dynamique est considérée, soit à 37°C , $R_2=0,32 \pm 0,13$ s et $\tau_S=0,80 \pm 0,16$ s (moyenne sur 5 valeurs). La réponse de la sonde dépend de la température : à 25°C , $R_2=0,2$ s et $\tau_S=1,15 \pm 0,10$ s.

Enfin, les mesures de R_2 et τ_S données précédemment ont été effectuées après avoir régénéré la sonde dans une solution d'ammoniaque à 14% (utilisation normale). La même mesure effectuée avec une sonde polarisée depuis 10 jours donne R_2 4,5 fois plus grand et τ_S 1,4 fois plus grand, à 25°C .

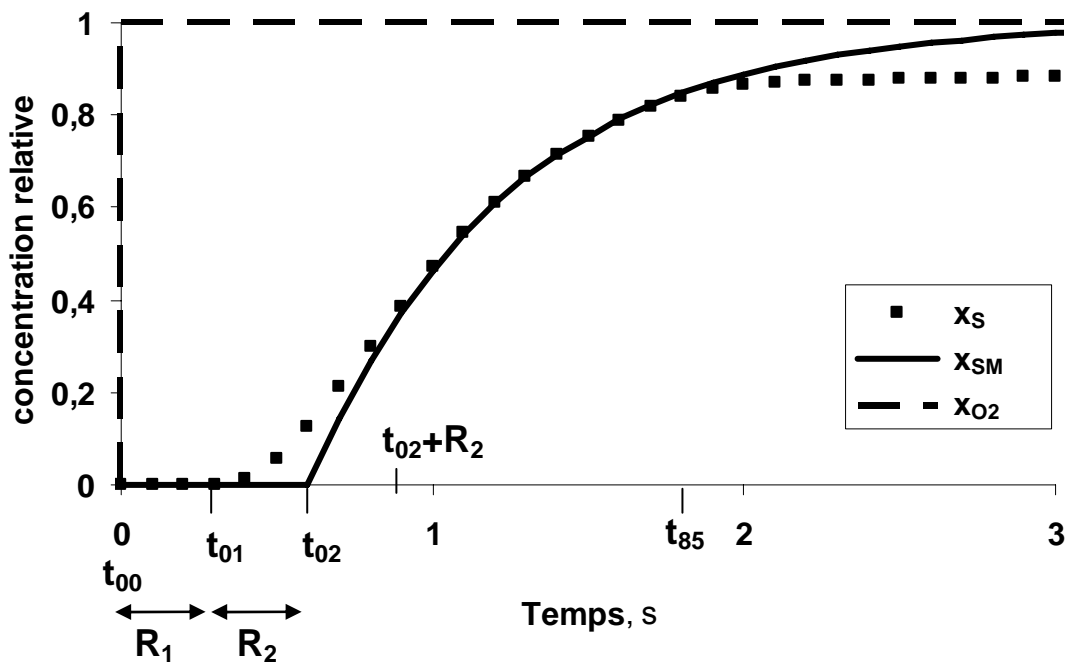


Figure 8. Caractérisation de la réponse de la sonde Electrosense. Réponse à un échelon dans le sens $N_2 \rightarrow \text{Air}$ en phase aqueuse à 37°C . x_{O_2} échelon de concentration (signal d'entrée), x_S réponse de la sonde, x_{SM} modèle proposé (Eq. 77).

II.3.3.2. Mise en œuvre expérimentale de la réoxygénation et analyse du signal

$K_{L,a}$ est calculé à partir de la modélisation d'une expérience de réoxygénation, réalisée en suivant la mesure dynamique de l'oxygène dissous au cours d'un échelon de concentration du gaz d'alimentation où l'air est injecté à la suite de l'azote. On appelle courbe de

réoxygénation la courbe $\bar{x} = f(t)$. Les expériences sont réalisées dans des conditions d'agitation et d'aération rencontrées en culture cellulaire, et (sauf spécification particulière) à $T=37^\circ\text{C}$ et $P=0,3$ bar. Le fermenteur est d'abord dégazé à l'azote jusqu'à un niveau d'oxygène dissous inférieur à 0,5 % (mesuré par la sonde Ingold). Ce dégazage a lieu à une pression d'alimentation et un débit en azote identiques à la pression d'alimentation et au débit d'air utilisés ultérieurement pour réoxygéner le liquide. (Cette recommandation permet d'une part de travailler avec une aire interfaciale constante tout au long de l'expérience, et d'autre part de s'affranchir de la mise en régime oscillatoire et relativement longue (10 s) du débitmètre massique lorsqu'il est soumis à une variation de pression d'alimentation.) Puis, le flux d'azote est remplacé instantanément par le flux d'air.

La sonde à oxygène est placée à mi-hauteur de la phase dispersée pour obtenir une valeur moyenne de dO_2 (Nocentini 90). Le positionnement de la sonde dans le réacteur peut devenir important si les bulles sont de l'ordre de grandeur de la cathode, ou si elles ont tendance à adhérer à la membrane. Selon Linek et coll. (1987), le flux dispersé doit arriver tangentiellement à la cathode (notre sonde est placée dans le plan de la turbine médiane) et la sonde doit être dirigée vers le ciel (ce placement est communément employé chez DSM, mais n'a pu être pratiqué avec notre matériel).

La dynamique de la sonde par rapport à la concentration réellement présente dans le liquide est modélisée par une réponse du premier ordre (0) qui tient compte du retard global $R=R_1+R_2$:

$$\frac{dx_s(t)}{dt} = \frac{x_{O_2}(t - t_{02}) - x_s(t)}{\tau_s} \quad (78)$$

avec pour condition à $t=t_{02}$ dans le cas d'un échelon $N_2 \rightarrow \text{Air}$: $x'_{O_2}(0)=x_s(t_{02})=0$. Cependant il est plus facile d'exploiter les mesures en prenant un instant t_0 flottant qui correspond mathématiquement à l'instant 't' tel que la dérivée $\frac{x_s(t + \Delta t) - x_s(t)}{\Delta t}$ s'écarte de la valeur de

base (généralement 0 pour un échelon $N_2 \rightarrow \text{Air}$ normalisé). On résout alors Eq. 78 en effectuant le changement de variable $x_{O_2}(t - t_{02}) = x_{O_2}(t)$ pour obtenir :

$$\frac{dx_s(t)}{dt} = \frac{x_{O_2}(t) - x_s(t)}{\tau_s} \quad (79)$$

avec pour condition initiale à $t=0$ dans le cas d'un échelon $N_2 \rightarrow \text{Air}$: $x_{O_2}(0)=x_s(0)=0$. Pour tracer la réponse réelle de la sonde par rapport à x_{O_2} il suffit après calcul de décaler la courbe x_s de $+t_{02}$.

La Figure 9 présente la mesure brute d'une réoxygénation, c'est-à-dire la mesure dynamique de la sonde, x_S . Contrairement aux expériences permettant la mesure de la constante de temps de la sonde, le signal d'entrée n'est plus ici un échelon de concentration, mais la fonction représentée par la courbe x_{O_2} décrivant l'enrichissement de la phase liquide en oxygène (Eq. 8). t_{95} correspondant à l'instant pour lequel x_S atteint 95% de la saturation, x_S^{sat} qui est une moyenne sur les valeurs de l'intervalle $t \in [200 ; 300s]$, qui permet, avec la valeur minimum x_S^0 , la normalisation du signal.

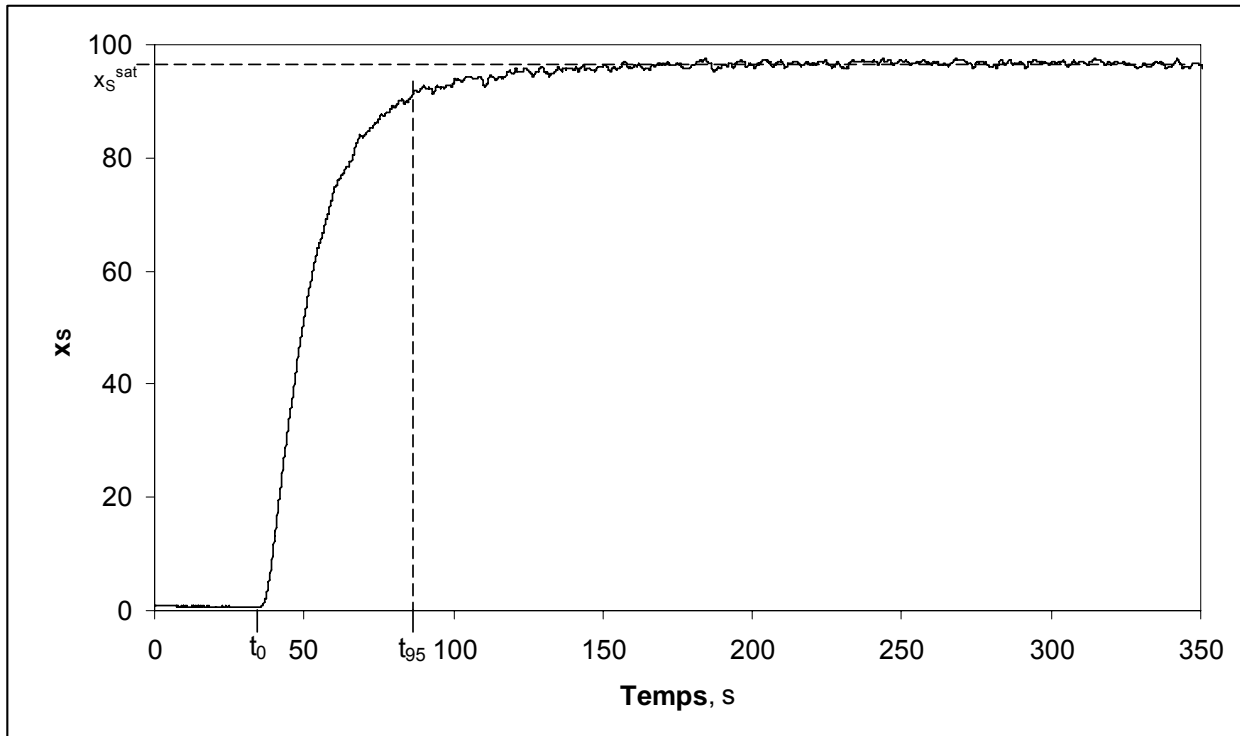


Figure 9. Réoxygénation. Mesure de la sonde x_S , valeur de saturation x_S^{sat} , localisation des instants initial t_0 et final t_{95} . Eau pure, $V_L=10$ L, $e=2350$ $W.m^{-3}$ (600 rpm), $U_s=0,42$ $cm.s^{-1}$.

II.3.3.3. Identification paramétrique de $K_L a$

Le calcul de la valeur de $K_L a$ est obtenu par identification paramétrique. Le principe consiste à déterminer $K_L a$ par minimisation de l'écart entre la courbe théorique calculée à partir du modèle et la courbe expérimentale. La courbe théorique, qui représente l'évolution du modèle, est décrite à partir de variables (la concentration dans le liquide, dans le gaz, la valeur mesurée par la sonde...), de constantes (le volume liquide, le flux d'aération, la solubilité de l'oxygène...) et des paramètres ($K_L a$...). Afin de quantifier l'écart entre la courbe expérimentale et le modèle, on définit des erreurs relatives où N représente le nombre de points expérimentaux, ceci afin de pouvoir comparer les expériences entre elles car toutes les réoxygénations ne contiennent pas le même nombre de points :

$$Er_{\text{abs}} = \frac{\sum_n \text{abs}(x_s - x_{\text{mod}})}{N} \quad (80)$$

$$Er = \frac{1}{N} \sum_n \frac{(x_s - x_{\text{mod}})^2}{x_s} \quad (81)$$

avec en chaque point $n \in [1 ; N]$, x_s la mesure de la sonde, et x_{mod} la valeur issue du modèle. Er_{abs} donne autant de poids à chaque point. Er permet de donner plus d'importance à la réponse initiale qui caractérise à elle seule la vitesse de transfert (Gibilaro et coll., 1985). Sauf spécification particulière, l'erreur Er est utilisée. La réoxygénation est normalisée et le modèle est ajusté entre l'instant initial $t=0$, et l'instant t_{95} , ceci afin d'effectuer l'optimisation sur la réoxygénation elle-même et non sur la dispersion des points autour de la valeur de saturation. Nous noterons Er_m l'erreur caractérisant l'écart entre la courbe théorique issue du modèle m et la courbe expérimentale, par exemple Er_{MP} pour le modèle MP.

II.3.3.4. Détermination de K_{La} en présence de cellules à l'état stationnaire et en milieu de culture épuré en microorganisme

La mesure de K_{La} en milieu de culture épuré en microorganisme est réalisée consécutivement à la mesure de K_{La} en présence de cellules à l'état stationnaire. La présence de quelques cellules dans le surnageant peut nécessiter la prise en compte d'une faible respiration.

Afin de travailler avec le même volume total dans les deux situations, un soutirage du moût est effectué avant la caractérisation de l'état stationnaire, et conservé pour centrifugation pour la caractérisation du surnageant (le volume cellulaire humide à 80 g_{MS}/L représente 1/5 du volume total du moût).

II.3.3.5. Détermination de K_{La} en conditions de production de microbulles

Les microbulles sont produites par l'utilisation détournée du « Flotateste » de Reali. Cet appareil permet de saturer un volume d'eau par du gaz à une pression pouvant atteindre 6 bars. La libération du liquide saturé à pression atmosphérique permet la nucléation spontanée de microbulles. Pour la production de microbulles d'azote, 4 L d'eau sont introduits dans la bombonne de saturation puis dégazés à l'azote pendant 5 min. La bombonne est fermée et le bullage d'azote prolongé pendant 20 min sous 6 bars ; l'alimentation en azote pendant toute l'expérience garantit une pression constante du liquide saturé. La bombonne est directement reliée à la purge du fermenteur par un tuyau hydrophile (pour éviter la coalescence sur les

parois du tuyau) ; les microbulles arrivent donc sous la turbine inférieure. Deux fermenteurs ont été utilisés : un fermenteur CHEMAP (Mânnedorf, Suisse ; $V_L=25$ L, $d_T=26$ cm) et un fermenteur SETRIC (Toulouse, France ; $V_L=2$ L, $d_T=12$ cm). La production de microbulles de CO_2 s'effectue de manière identique en remplaçant l'azote par du CO_2 .

La mesure de K_{La} par la méthode dynamique se déroule comme suit. Une pompe permet de maintenir constant le niveau de la phase dispersée du réacteur pendant l'introduction des microbulles et des 4 L de liquide porteur. En fin de cycle de dégazage du réacteur à l'azote, les microbulles sont admises à un débit régulé par l'ouverture de la vanne de purge ; la pompe de régulation de niveau est mise en marche simultanément. La permutation entre le flux d'azote et le flux d'air dans le diffuseur est initiée lorsque les microbulles semblent être réparties de manière homogène dans le réacteur (les microbulles donnent un aspect laiteux au liquide), c'est-à-dire entre 5 s et 20 s après l'admission des premières microbulles. L'expérience prend fin lorsque les 4 L de liquide saturé ont été injectés dans le réacteur.

L'expérience de réoxygénation en présence de microbulles est comparée à une expérience témoin réalisée dans les mêmes conditions, mais avec une pression de 2 bar dans la bombonne, ce qui permet d'alimenter le réacteur par un flux Q_L de liquide porteur, sans production de microbulle.

II.4. Détermination de paramètres mécaniques et physico-chimiques

Sont présentées les définitions et les méthodes de détermination des paramètres suivants, d'intérêt pour l'étude du transfert d'oxygène: la rétention gazeuse, la vitesse critique d'entraînement de surface, les mesures de rhéologie et de tension de surface.

a) Rétention gazeuse

La rétention gazeuse (« hold-up ») est calculée par

$$\varepsilon = \frac{V_T - V_L}{V_L} = \frac{V_G}{V_L} \quad (82)$$

où V_T est le volume total de la dispersion (Cette mesure est précise à $\pm 0,1$ L pour $0 < V_G \leq 0,5$ L, et à $\pm 0,2$ L pour $V_G > 0,5$ L), V_L le volume de liquide, et V_G le volume de gaz dispersé.

b) Vitesse critique d'entraînement de surface

N_E est la vitesse d'agitation à partir de laquelle a lieu l'entraînement de surface. Elle est définie comme la vitesse d'agitation à partir de laquelle on observe une baisse relative de la puissance consommée relative, P_{cr} , par rapport à la puissance consommée relative de référence, $P_{cr_{ref}}$, c'est à dire mesurée en l'absence de tout entraînement de surface (Veljković et coll., 1991). P_{cr} est la puissance électrique consommée par le moteur d'agitation, exprimée en pourcentage de la puissance maximale (746 W).

On observe une autre vitesse d'agitation critique, voisine de 400 rpm pour $V_L=10$ L, à partir de laquelle la première bulle est entraînée dans le liquide par la surface (Veljković et coll., 1991), mais la définition macroscopique de N_E basée sur la chute de puissance est plus appropriée pour notre étude.

$P_{cr_{ref}}$ est obtenue en remplissant le réacteur avec 18 L de milieu : pour les vitesses d'agitation considérées ($0 < N < 1500$ rpm), en condition non-aérée, il est vérifié qu'aucune bulle n'est entraînée à travers la surface.

La vitesse critique d'entraînement est mesurée pour 10 L de milieu. L'expérience est réalisée à pression atmosphérique, 37°C, en milieu coalescent (eau du robinet) et non coalescent (Na_2SO_3 , 10 g.L⁻¹). Seules les deux turbines placées à 5 et 21 cm du fond sont utilisées. En condition d'aération 600 NL.h⁻¹ sont débités par le diffuseur. A vitesse d'agitation et aération fixées la puissance consommée par le moteur ainsi que le volume total sont relevés une fois le système stabilisé.

c) Rhéologie

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un rhéomètre coaxial (Haake vt550, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), thermostaté à 37°C. La mesure est réalisée avec une rampe de gradient de vitesse à $\dot{\gamma}$ croissant puis décroissant entre 500 et 1000 s⁻¹ ; $\dot{\gamma}$ étant maintenu à une valeur fixe pendant 30 s avant d'effectuer la mesure.

Les mesures de viscosité apparente et de thermodépendance sont réalisées par un rhéomètre coaxial Rheomat 15T, mieux adapté que le Haake vt550 aux faibles valeurs de viscosité à mesurer. L'étalonnage du rhéomètre est réalisé à l'eau distillée : la courbe mesurée est comparée à celle de la littérature : $\mu_{\text{eau}} = 0,00121 e^{16354/RT}$ (www.NIST) et la différence mesurée (0,09 cp/V T) sert à corriger les valeurs obtenues sur les suspensions de levures.

d) Tension de surface

La tension de surface entre le moût et l'air, ou entre le surnageant et l'air, est mesuré par un tensiomètre automatique (Prolabo) par la méthode statique à lame de platine.

II.5. Statistiques et calcul d'erreurs

Les moyennes sur une série de valeurs sont des moyennes arithmétiques ; les écarts correspondants sont des écarts types ; les erreurs correspondantes (%) sont le rapport de l'écart type sur la moyenne.

Les courbes de tendance de type puissance sont calculées en minimisant par la méthode des moindres carrés la fonction suivante :

$$R^2 = 1 - \frac{a}{b}$$

$$a = \sum (y_i - \hat{y}_i)^2$$

où

$$b = \sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n}$$

et $\hat{y} = cx^d$ est la courbe modèle, c et d étant des constantes.

III. MODELISATIONS ET ETUDES EXPERIMENTALES

L'utilisation de temps caractéristiques (Tableau 9) permet de comparer sur une échelle de temps les phénomènes physiques et biologiques qui interagissent avec le transfert d'oxygène. Pour ce faire, les temps caractéristiques des différents phénomènes sont donnés de manière relative par rapport au temps de diffusion τ_d , lequel dépend du paramètre central du transfert d'oxygène : $K_L a$ (Figure 10).

Tableau 9. Temps caractéristiques en culture cellulaire.

Temps caractéristique	Définition	Référence
τ_d temps de diffusion	$\frac{D}{k_L^2}$ ou $\frac{1}{K_L a}$	Tsao (1970)
τ_m temps de mélange de la phase liquide	Temps nécessaire pour atteindre 95% d'homogénéité en réponse à un échelon	van't Riet (1979)
τ_G temps de séjour du gaz en phase liquide	$\tau_G = \frac{V_G}{Q_G}$	
τ_S constante de temps de la sonde	Temps nécessaire pour atteindre 63% du signal en réponse à un échelon	Tsao (1970)
τ_r temps de réaction	$\tau_r = \frac{x_{O_2}}{q_{O_2}}$	
τ_B temps biologique	Fraction du temps de doublement, choisissons $1/10^e$ $\tau_B = \frac{1 \ln 2}{10 \mu}$	Tsao (1970)

Le temps de diffusion $\tau_d = D / k_L^2$ correspond à l'inverse du paramètre « s » du modèle de Danckwerts (1951) (Eq. 16) et reflète le temps que passe un élément liquide à l'interface gaz-liquide. Mais en culture cellulaire la détermination des paramètres D et k_L étant délicate, il est plus facile d'utiliser la définition $\tau_d = 1/K_L a$. La définition du temps de réaction τ_r (Tsao et coll., 1970) correspond au temps que mettent les microorganismes à consommer tout l'oxygène dissous disponible.

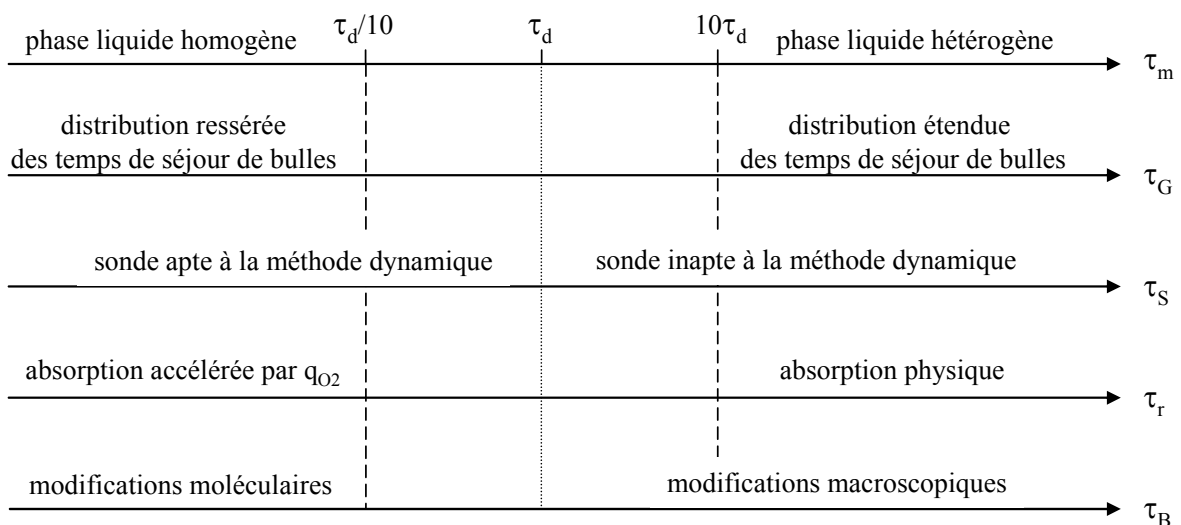


Figure 10. Temps caractéristiques par rapport au temps de diffusion. Les temps caractéristiques définis dans le Tableau 9 sont comparés sur une échelle logarithmique commune, exprimée en fonction du temps de diffusion τ_d .

Aux vues des ces considérations, trois axes de recherche sont proposés :

- la modélisation du transfert d'oxygène pour la détermination de K_La . Les modèles développés seront adaptés aux différentes dynamiques mises en jeu, et aux contraintes expérimentales choisies.
- la quantification du transfert en milieux minéraux de référence, afin de pouvoir comparer la capacité de transfert du réacteur à la littérature et de créer un cadre de référence pour la suite de l'étude.
- la quantification du transfert en condition de culture microbienne; elle permettra d'intégrer l'ensemble des résultats préliminaires pour étudier les interactions entre les phénomènes physiques et biologiques.

III.1. Modélisation du transfert d'oxygène pour la détermination de K_La

L'analyse des temps caractéristiques du bioréacteur (Figure 10) soutient l'élaboration des modèles et le travail expérimental présenté dans ce chapitre en signalant les points forts suivants :

- Selon la valeur du temps de mélange τ_m par rapport au temps de diffusion τ_d , la phase liquide peut être homogène ($\tau_m < \tau_d/10$) ou hétérogène ($\tau_m > 10\tau_d$) (la zone intermédiaire sur la Figure 10 correspondant en théorie à une situation intermédiaire).

Conformément à la littérature (Chapman et coll., 1982), il est adopté dans les modèles que la phase liquide est homogène.

- Pour la phase gazeuse, plus τ_G est élevé, plus il est nécessaire de considérer la dynamique du gaz dans les théories de transfert pour pouvoir déterminer K_La avec précision (Dang et coll., 1977).

Il est proposé dans les modèles de décrire l'épuisement des bulles pendant leur passage dans le réacteur en considérant la phase gazeuse homogène (correspondant aux faibles valeurs de τ_G), ou hétérogène en proposant un écoulement piston (correspondant aux fortes valeurs de τ_G).

- Lorsque $\tau_S < 10\tau_d$, la dynamique de la sonde peut être ignorée dans le modèle de transfert (Poughon et coll., 2003). Mais les valeurs de τ_S et τ_D pouvant être proches, la dynamique de la sonde est prise en compte dans les modèles.

- Par rapport à une éventuelle accélération du transfert d'oxygène par la consommation d'oxygène, si $\tau_r \gg \tau_d$, alors l'absorption est purement physique, par contre si τ_r est proche de τ_d alors l'absorption peut être influencée par la consommation de l'oxygène (Tsao, 1970).

Bien que jamais observé en réacteur agité, l'éventualité d'une telle accélération sera considérée dans l'étude.

- Les temps biologiques macroscopiques (modification du milieu, croissance cellulaire) peuvent interagir avec la détermination de $K_L a$ et seront pris en compte dans l'analyse.

Les modèles sont basés sur le bilan matière sur l'oxygène en phases liquide et gazeuses sur des systèmes du réacteur. Les hypothèses suivantes sont utilisées pour tous les modèles :

H 1: La phase liquide est homogène en composition.

H 2: La concentration en oxygène dans la phase liquide est en équilibre avec la concentration en oxygène dans la phase gazeuse en contact selon la loi de Henry :

$$x_{O_2}^* = RTH y_{O_2} \quad (83)$$

où $x_{O_2}^*$ et y_{O_2} sont les concentrations molaires en oxygène en phase liquide et gazeuse, respectivement, et la constante de Henry H dépend de la température (Kavanaugh and Trussell, 1980) et de la composition du liquide (Weisenberger and Schumpe, 1996). Le calcul des solubilités de l'oxygène dans les milieux utilisés est donné annexe VI.1.2.

Les modèles mathématiques représentent le transfert d'oxygène dans le réacteur en régime transitoire et en régime permanent, mais pour être utilisés en accord avec des méthodes expérimentales spécifiques, des hypothèses et des conditions aux limites spécifiques aux méthodes expérimentales sont nécessaires. Nous distinguons la méthode de réoxygénation (dynamique), et la méthode du bilan gazeux (quasi-statique).

III.1.1. Modèle homogène pour la phase gazeuse (MH)

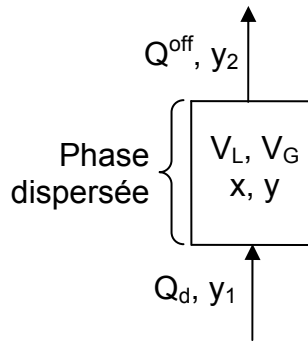
Dans ce modèle l'écoulement de la phase gazeuse est défini par l'hypothèse suivante :

H 3: La composition de la phase gazeuse dispersée est homogène.

Pour l'utilisation du modèle MH avec la méthode de réoxygénation utilisant l'échelon gazeux $N_2 \rightarrow \text{Air}$, il est supposé :

H 4: La valeur de $K_L a$ est constante durant l'expérience.

H 5 Le transfert interfacial d'azote peut être négligé (Linek et coll., 1981) et le flux gazeux dispersé par le diffuseur à l'entrée du réacteur égale celui de la sortie ($Q_d=Q_{off}$).



A partir de ces hypothèses, le bilan matière sur l'oxygène de la phase gazeuse contenue dans la phase dispersée s'écrit (en mol.s^{-1}) :

$$\frac{dn}{dt} = (\dot{n}_1 - \dot{n}_2) - K_L a V_L (x^* - x)$$

avec \dot{n}_1 le flux molaire en entrée de réacteur, \dot{n}_2 le flux molaire en sortie de phase dispersée, soit, en utilisant

l'hypothèse que le gaz circulant dans le fermenteur est parfait :

$$\frac{dy}{dt} = \frac{Q_d}{V_G} (y_1 - y) - K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH \left(y - \frac{x}{HP} \right)$$

où Q_d est le flux dispersé par le diffuseur, V_G le volume de gaz dispersé, P la pression totale dans le réacteur. Soit, en utilisant des variables adimensionnelles de concentration :

$$\frac{d\bar{y}}{dt} = \frac{Q_d}{V_G} (1 - \bar{y}) - K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH (\bar{y} - \bar{x}) \quad (84)$$

avec $\bar{x} = \frac{x}{x^{\text{Air}}} = \frac{x}{HP y_1}$, $\bar{y} = \frac{y}{y_1}$, et y_1 la concentration en oxygène dans l'air (T et P expérimentales) ; ainsi à l'équilibre en condition anaérobie $\bar{x} = \bar{y} = 0$, et en présence d'air $\bar{x} = \bar{y} = 1$.

Le bilan matière sur l'oxygène dissous dans la phase liquide (en $\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$) s'écrit :

$$\frac{dx}{dt} = K_L a (x^* - x)$$

soit sous forme adimensionnelle :

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = K_L a (\bar{y} - \bar{x}) \quad (85)$$

Avec les mêmes notations, l'équation de la réponse dynamique de la sonde (Eq. 79) devient :

$$\frac{d\bar{x}_s}{dt} = \frac{\bar{x} - \bar{x}_s}{\tau_s} \quad (86)$$

La résolution du système d'équations différentielles {Eq. 84, Eq. 85, Eq. 86} est effectuée par une méthode de Runge-Kutta explicite (Programmation sur MATLAB en Annexe VI.6.1).

III.1.2. Modèle piston pour la phase gazeuse (MP)

Dans ce modèle l'écoulement de la phase gazeuse est défini par l'hypothèse suivante :

H 6 : L'écoulement de la phase gazeuse dispersée est de type piston.

Le modèle d'écoulement piston a été présenté dans la littérature (Shioya et Dunn, 1979 ; Chandrasekharan et Calderbank, 1980). Il est justifié pour notre configuration du fait de la présence de trois turbines, du ratio important entre la hauteur de liquide dispersé et le diamètre du réacteur (Z/d_T est compris entre 1,3 et 2,4 en culture cellulaire, et pour $V_L=13$ L, $Z/d_T=2$) (van't Riet, 1979), et du fait de l'appauvrissement prononcé du gaz lors de son passage dans le réacteur (Poughon et coll., 2003).

Pour l'utilisation du modèle MP avec la méthode de réoxygénation utilisant l'échelon gazeux $N_2 \rightarrow \text{Air}$, les hypothèses H 4 et H 5 sont conservées, et il est supposé :

H 7 : Les variables locales dV_L et dV_G représentant respectivement le volume de liquide et le volume de gaz sur une hauteur dz de phase dispersée, sont constantes sur la hauteur de la dispersion gazeuse, et $dV_L/dV_G=V_L/V_G$.

A partir de ces hypothèses, le bilan sur la phase gazeuse sur une portion de hauteur de réacteur d'épaisseur dz , s'écrit, en utilisant les variables adimensionnelles :

$$\frac{\partial \bar{y}}{\partial t} = -\frac{Q_d}{\partial V_G} \partial \bar{y} - (K_L a)_z \frac{\partial V_L}{\partial V_G} RTH(\bar{y} - \bar{x})$$

Soit la coordonnée adimensionnelle le long de l'axe du réacteur : $\bar{z} = z/Z$, avec Z la hauteur totale de la dispersion (la hauteur relative 0 correspond au fond du réacteur, et la hauteur relative 1 à la hauteur totale de la dispersion), on obtient :

$$\frac{\partial \bar{y}}{\partial t} = -\frac{Q_d}{V_G} \frac{\partial \bar{y}}{\partial \bar{z}} - K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH(\bar{y} - \bar{x}) \quad (87)$$

Le liquide étant supposé homogène, similairement à Eq. 85, le bilan sur la phase liquide s'écrit :

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = K_L a \int_0^1 (\bar{y} - \bar{x}) d\bar{z} \quad (88)$$

L'équation de la réponse dynamique de la sonde reste inchangée (Eq. 86). Le modèle d'écoulement piston du gaz (modèle MP) est donc défini par le système suivant :

(Eq. 89) {

$$\frac{\partial \bar{y}}{\partial t} = -\frac{Q_d}{V_G} \frac{\partial \bar{y}}{\partial \bar{z}} - K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH(\bar{y} - \bar{x})$$

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = K_L a \int_0^1 (\bar{y} - \bar{x}) d\bar{z}$$

$$\frac{d\bar{x}_s}{dt} = \frac{\bar{x} - \bar{x}_s}{\tau_s}$$

Conditions initiales :

$\bar{x}(0) = \bar{y}(0, \bar{z}) = \bar{x}_s(0) = 0$, car le système est préalablement ventilé par un flux d'azote de telle sorte que la concentration initiale en oxygène est nulle.

Conditions aux limites :

$\bar{y}(t, 0) = 1$, car le système est alimenté en air par le bas.

Il n'existe pas pour ce système de résolution littérale. Une approximation est proposée par Chandrasekharan et Calderbank (1980), mais s'avère inutilisable dans nos travaux. Une résolution numérique du système est alors proposée par une méthode utilisant une discrétisation de l'opérateur différentiel par une approximation d'Euler (programme MATLAB en Annexe VI.6.2).

III.1.3. Comparaison des modèles homogène et piston en régime transitoire

L'identification paramétrique réalisée avec les modèles MP et MH considère comme variables du problème la concentration en oxygène dans le liquide \bar{x} , la concentration en oxygène dans le gaz \bar{y} , et la mesure de la sonde \bar{x}_s . Les constantes sont V_L , V_G , Q_d , RTH et τ_s . Le seul paramètre est $K_L a$.

Les modèles de courbes de réoxygénation montrent que pour le modèle MH (Figure 11A) le temps permettant d'atteindre la saturation (ou de passer de $\bar{x} = 0$ à $\bar{x} = 0,95$) est une fonction décroissante de $K_L a$. Pour le modèle MP (Figure 11B), à $K_L a$ plus élevé la saturation peut être atteinte plus tardivement. Le phénomène est surtout visible à partir de $K_L a = 1 \text{ s}^{-1}$.

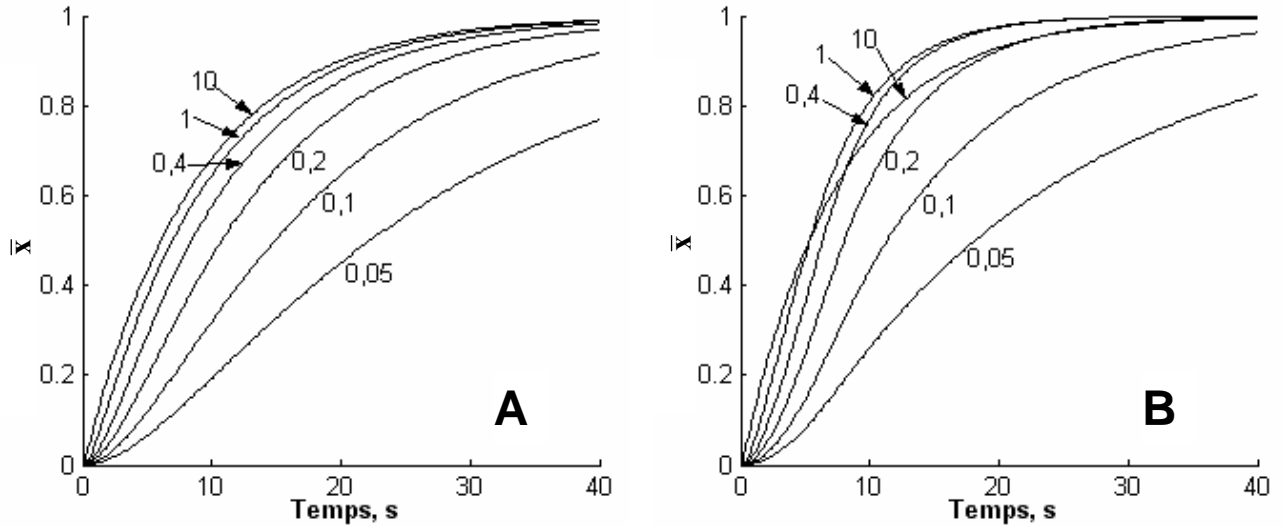


Figure 11. Influence de la valeur de K_La sur la réoxygénation modélisée par le modèle MH (A) et par le modèle MP (B). K_La varie de $0,05 \text{ s}^{-1}$ à 10 s^{-1} . Eau pure, $V_L=10 \text{ L}$, $V_G=1 \text{ L}$, $U_s=0,422 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$.

La Figure 12 présente le profil des concentrations relatives en oxygène le long de l'axe vertical du réacteur en phases gaz (\bar{y}) et liquide (\bar{x}). Le potentiel de transfert correspondant est égale à $\bar{y} - \bar{x}$. Il existe en début de réoxygénation une hauteur relative critique z_{crit} , fonction croissante du temps et telle que $z_{\text{crit}}=0$ à $t=0$, à laquelle les bulles atteignent l'équilibre avec le liquide ($\bar{y} - \bar{x} = 0$). Dans la zone située entre z_{crit} et le haut de la dispersion, le liquide est plus concentré que le gaz ($\bar{y} - \bar{x} < 0$), donnant lieu à un transfert inverse d'oxygène du liquide vers le gaz. Le phénomène est dû aux hypothèses d'écoulement du modèle MP, c'est-à-dire l'épuisement des bulles dans un liquide toujours homogène en composition et tel que $\bar{y}(0, \bar{z}) = 0$. Ainsi les bulles qui atteignent l'équilibre avec le liquide à la hauteur $\bar{z} = \bar{z}_{\text{crit}}$, continuent leur ascension et atteignent la hauteur $z=z_{\text{crit}}+dz$; entre temps les bulles fraîchement entrées dans le réacteur ont enrichi la phase liquide, homogène. Les bulles situées à la hauteur $\bar{z} = \bar{z}_{\text{crit}} + d\bar{z}$ ne sont donc plus en équilibre avec le liquide, mais sont moins concentrées. Le flux de transfert inverse est d'autant plus important que K_La est grand (le potentiel de transfert négatif est plus important sur la Figure 12C que sur la Figure 12A), et le phénomène est d'autant plus prolongé dans le temps que K_La est grand (à $t=12 \text{ s}$ le transfert inverse n'a plus lieu pour $K_La=0,1 \text{ s}^{-1}$ (Figure 12B) alors qu'il est effectif pour $K_La=1 \text{ s}^{-1}$ (Figure 12D)). A faible valeur de K_La le transfert inverse est donc négligeable (jusqu'à $K_La=0,4 \text{ s}^{-1}$). A fort K_La le transfert impose l'épuisement du gaz très tôt dans le bas du réacteur et la majorité du réacteur fonctionne donc en transfert inverse, d'où une

réoxygénation ralentie et le croisement des courbes de réoxygénation à valeurs croissantes de K_La (Figure 11B). Ce point n'a pas été soulevé par les auteurs proposant le modèle piston d'écoulement du gaz, sans doute parce que la gamme des fortes valeurs de K_La n'a pas été étudiée.

Ce transfert inverse est à rapprocher de la dilution des bulles d'air par l'azote dans le modèle MH en début de réoxygénation car les deux phénomènes limitent la vitesse de transfert de l'oxygène. Dans le modèle MH l'intensité de cette limitation dépend de la rétention gazeuse et du flux d'aération ; dans le modèle MP elle dépend en plus de la valeur de K_La .

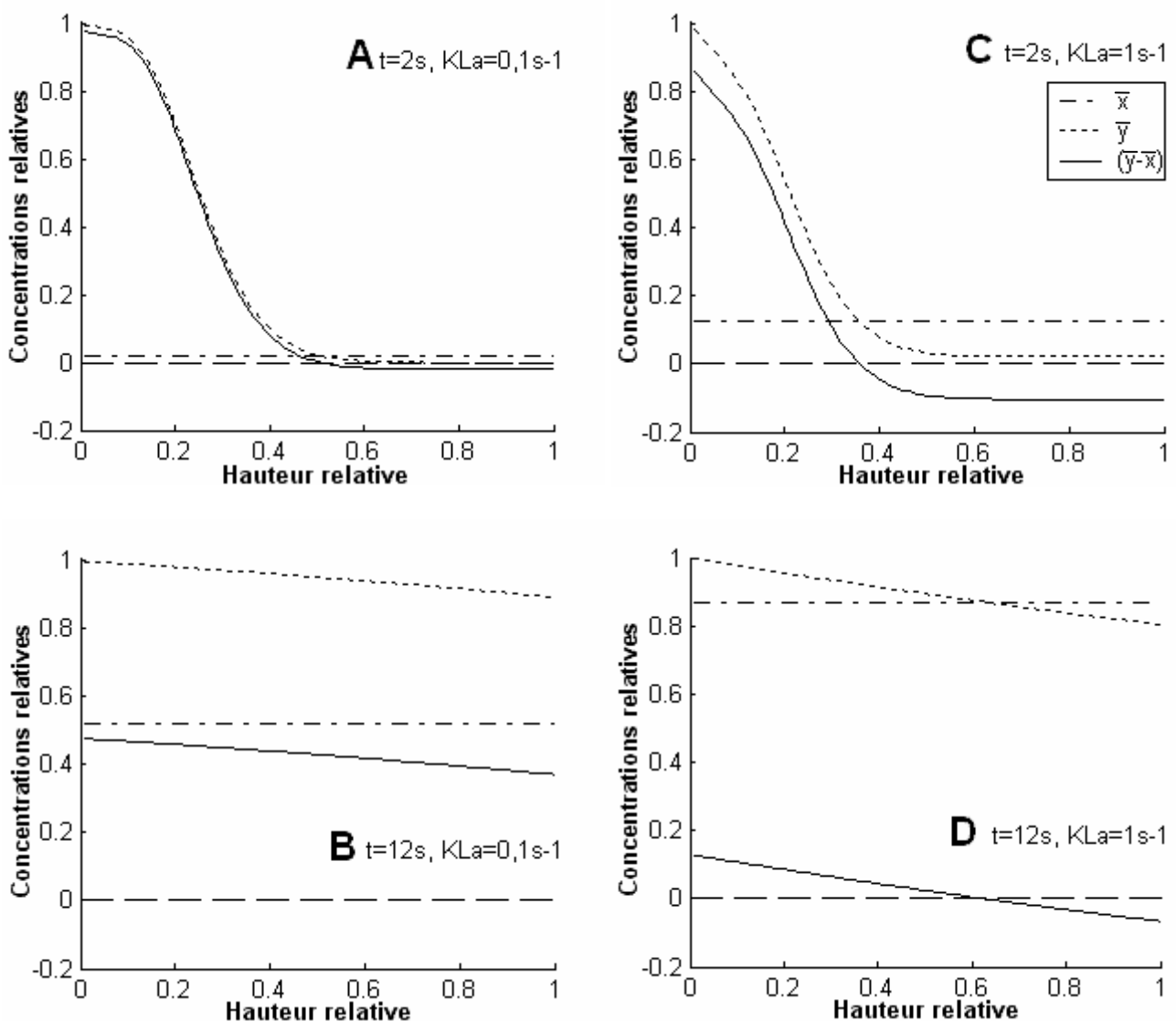


Figure 12. Détection de potentiel de transfert négatif dans le modèle MP. Profils instantanés de concentration le long de la hauteur relative de la dispersion aux instants $t=2$ s (figures A et C) et $t=12$ s (figures C et D) après le début de la réoxygénation. \bar{x} , \bar{y} : concentrations normalisées dans le liquide et dans le gaz, respectivement. $V_L=10$ L (eau pure), $V_G=1$ L, $U_s=0,422$ cm.s⁻¹, $K_La=0,1$ s⁻¹ (figures A et B), et $K_La=1$ s⁻¹ (figures C et D).

La réalité de l'écoulement gazeux dans le réacteur est sans doute plus complexe : on peut supposer l'hétérogénéité de la phase liquide et l'existence d'une zone liquide moins concentrée en oxygène en haut du réacteur ce qui permettrait de conserver un potentiel de transfert positif. Dans le cadre de ce travail, limitons la modélisation des phénomènes physiques au sein du bioréacteur aux modèles homogène et piston, les plus répandus dans la littérature.

III.1.4. Modèles MH et MP utilisés en régime quasi-stationnaire

Ces modèles sont utilisés en conditions de culture avec la méthode du bilan gazeux (BG), et en présence de consommation d'oxygène par le sulfite avec la méthode BG+OS.

L'hypothèse suivante est ajoutée :

H 8. Le système défini par le ciel gazeux est homogène en composition.

En condition de culture cellulaire, les hypothèses suivantes sont ajoutées :

H 9. Les variations de la composition du milieu en cours de culture n'influencent pas la valeur de la constante de Henry.

H 10 : Le volume liquide vers lequel le gaz transfert est $V_{L-c}=V_L-V_c$: la phase biotique (volume V_c des cellules humides) est distinguée de la phase abiotique qui l'entoure (volume V_{L-c} du milieu liquide) (Monbouquette, 1987).

La fraction d'eau des cellules est supposée constante et égale à 62% pour *E. coli* –mesure déterminée par thermogravimétrie d'après Uribe et coll. (1985)– et 60% pour *S. cerevisiae* (Aldigui, 2006). Le volume des cellules est calculé ainsi :

$$V_c = \frac{XV_L}{(1-0,62)\rho_c} \quad (90)$$

avec pour densité des cellules humides $\rho_c=1030 \text{ g.L}^{-1}$ (Aiba et coll., 1979). L'hypothèse H 10 ne modifie pas la définition de la concentration cellulaire, donnée par litre de volume liquide total V_L (en $\text{g}_{MS}.\text{L}^{-1}$).

En s'appuyant sur ces hypothèses, K_T est calculé à partir d'un bilan matière sur l'oxygène gazeux dans le système défini par le réacteur :

$$K_T = \frac{1}{V_{L-c}(x_{O_2}^* - x_{O_2})} \left(Q_d y_{O_2}^{in} - Q^{out} y_{O_2}^{out} - \frac{d(V_{gaz} y_{O_2}^{out})}{dt} \right) \quad (91)$$

où V_{gaz} est le volume total de gaz dans le réacteur, Q^{out} le flux gazeux sortant du réacteur, calculé à partir du flux gazeux entrant par le diffuseur Q_d par un bilan matière sur l'azote :

$$Q^{\text{out}} = \left(Q_d y_{\text{N}_2}^{\text{in}} - \frac{d(V_{\text{gaz}} \cdot y_{\text{N}_2}^{\text{out}})}{dt} \right) \cdot \frac{1}{y_{\text{N}_2}^{\text{out}}} \quad (92)$$

où $y_{\text{N}_2}^{\text{in}}$ est la concentration en azote ($\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$) dans le flux entrant.

x_{O_2} et $y_{\text{O}_2}^{\text{out}}$ sont directement liés aux mesures effectuées en ligne de l'oxygène dissous ($d\text{O}_2$), et du pourcentage d'oxygène mesuré dans le gaz en sortie du réacteur (O_2out) :

$$x_{\text{O}_2} = x_{\text{O}_2}^* \cdot d\text{O}_2 / 100 \quad (93)$$

$$y_{\text{O}_2}^{\text{out}} = \frac{P \cdot \text{O}_2\text{out} / 100}{RT} \quad (94)$$

où P est la pression absolue dans le réacteur.

Si l'hypothèse H 3 est utilisée (la phase gazeuse dispersée est homogène en composition), la différence de potentiel de transfert ($x_{\text{O}_2}^* - x_{\text{O}_2}$) dans Eq. 91 s'écrit :

$$(x_{\text{O}_2}^* - x_{\text{O}_2}) = (y_{\text{O}_2}^{\text{off}} - y_{\text{O}_2}^*) RTH \quad (95)$$

où $y_{\text{O}_2}^*$ est en équilibre avec x_{O_2} selon Eq. 83, et $y_{\text{O}_2}^{\text{off}}$ est la concentration en oxygène dans le gaz en sortie de la phase dispersée, calculée à partir de $y_{\text{O}_2}^{\text{out}}$ en tenant compte de l'hypothèse H 8.

Si à la place de l'hypothèse H 3, l'hypothèse H 6 est utilisée (la phase gazeuse s'écoule de manière piston), la différence de potentiel de transfert ($x_{\text{O}_2}^* - x_{\text{O}_2}$) dans Eq. 91 est calculée par une moyenne logarithmique (calcul détaillé dans l'annexe VI.5) :

$$(x_{\text{O}_2}^* - x_{\text{O}_2})_{\text{ln}} = \frac{y_{\text{O}_2}^{\text{in}} - y_{\text{O}_2}^{\text{off}}}{\ln \left(\frac{y_{\text{O}_2}^{\text{in}} - y_{\text{O}_2}^*}{y_{\text{O}_2}^{\text{off}} - y_{\text{O}_2}^*} \right)} RTH \quad (96)$$

A partir des mêmes hypothèses, un bilan matière sur l'oxygène, réalisé sur l'ensemble du réacteur, est utilisé pour calculer la consommation volumique d'oxygène q_{O_2} (par volume de suspension) :

$$q_{\text{O}_2} \cdot V_L = Q_d y_{\text{O}_2}^{\text{in}} - Q^{\text{out}} y_{\text{O}_2}^{\text{out}} - \frac{d(V_{\text{gaz}} \cdot y_{\text{O}_2}^{\text{out}})}{dt} - \frac{d(V_L \cdot x_{\text{O}_2})}{dt} \quad (97)$$

La consommation volumique de CO_2 , q_{CO_2} , est calculée de la même manière, mais par un bilan matière sur le CO_2 :

$$q_{\text{CO}_2} \cdot V_L = Q_d y_{\text{CO}_2}^{\text{in}} - Q^{\text{out}} y_{\text{CO}_2}^{\text{out}} - \frac{d(V_{\text{gaz}} \cdot y_{\text{CO}_2}^{\text{out}})}{dt} - \frac{d(V_L \cdot x_{\text{CO}_2})}{dt} \quad (98)$$

Le quotient respiratoire QR vaut $QR = q_{\text{CO}_2} / q_{\text{O}_2}$.

Lorsque la méthode BG+OS est utilisée, de part l'oxydation du sulfite en sulfate pendant l'expérience, la solubilité de l'oxygène considérée est la moyenne des valeurs calculées pour $(2\text{Na}^+ + \text{SO}_3^{2-})$ et pour $(2\text{Na}^+ + \text{SO}_4^{2-})$ par l'analyse de Weisenberger et Schumpe (1996) (annexe VI.1.2). Les rapports de solubilité avec l'eau pure à même température sont, pour 10, 25, 50 g.L⁻¹ de Na₂SO₃ ajoutés, respectivement 0,938 0,851 et 0,725.

III.1.5. Modèles considérant l'entraînement de surface

Pour $N > N_E$, le ciel gazeux est entraîné vers le liquide : le flux gazeux devient bidirectionnel (flux Q_d et Q_e sur la Figure 3).

Le phénomène d'entraînement de surface en condition d'aération simultanée par le diffuseur a été peu étudié dans la littérature et est modélisé de manière incomplète ; il dépend de nombreux paramètres dont les principaux sont la vitesse d'agitation, le flux d'aération, la hauteur de liquide entre la surface libre et la turbine, et la composition du milieu. La caractérisation du flux entraîné est mesurée dans la littérature par des moyens relativement complexes mettant en œuvre deux gaz (le premier pour l'alimentation du diffuseur, l'autre pour l'alimentation du ciel), la capture et l'analyse de la composition des bulles, ainsi qu'un régime permanent de transfert, mais les valeurs de $K_L a$ correspondantes ne sont jamais calculées.

L'objectif du travail présenté dans ce chapitre est de définir un paramètre $K_L a$ en condition d'entraînement de surface qui soit comparable au paramètre $K_L a$ défini dans la littérature en l'absence d'entraînement de surface, et d'essayer de calculer ce nouveau paramètre $K_L a$ défini en condition d'entraînement de surface par une méthode plus simple que celles de la littérature. Une méthode dynamique à la sonde à oxygène est testée, qui pourrait permettre également de quantifier l'aération de surface et d'aboutir à un schéma complet du transfert de gaz à forte puissance dissipée.

III.1.5.1. Développement des modèles

La littérature sur le transfert d'oxygène en présence d'entraînement de surface considère toujours l'homogénéité totale des gaz, et en particulier l'homogénéité entre le flux gazeux Q_d en provenance du diffuseur et le flux gazeux Q_e entraîné à partir du ciel gazeux (Chapman et coll., 1980 ; Veljković et coll., 1991). Dans notre étude ce modèle d'entraînement (ME) est nommé ME1, mais quatre autres modèles d'entraînement de surface sont testés (ME2 à ME5), correspondants à plusieurs hypothèses possibles d'écoulement des gaz.

Il est observé dans les solutions non-coalescentes salines une rétention gazeuse constituée de microbulles. Cette rétention gazeuse peut être considérée comme permanente et sa prise en compte dans les modèles testés pourrait permettre d'accéder à la valeur réelle de $K_L a$ (Vasconcelos et Alves, 1991). La présence d'une rétention gazeuse permanente est donc considérée en complément du modèle MP (modèle MP+mb ; l'abréviation mb tient pour microbulle), et en complément du modèle ME5 (modèle ME5+mb).

Les modèles ME sont basés sur les modèles MH et MP, mais en prenant en compte plusieurs populations de bulles. Le bilan matière sur l'oxygène est donc effectué sur plusieurs systèmes : le gaz dispersé en provenance du diffuseur, le gaz dispersé entraîné depuis le ciel, le gaz dans le ciel, le gaz des microbulles.

A ce stade, les hypothèses suivantes sont ajoutées :

H 11 c : Il y a coalescence entre les bulles du diffuseur et les bulles entraînées. Un seul système est donc considéré pour le gaz dispersé.

H 11 nc: Il y a non-coalescence entre les bulles du diffuseur et les bulles entraînées. Le bilan matière est donc effectué sur les deux systèmes séparément et deux paramètres $K_L a$ sont définis : $K_{L a_d}$ pour le transfert d'oxygène entre les bulles issues du diffuseur et la phase liquide, et $K_{L a_e}$ pour le transfert d'oxygène entre les bulles formées par entraînement de surface et la phase liquide. Le système contenant le gaz entraîné est homogène de composition.

H 12 : Le transfert par diffusion entre la surface libre du liquide et le liquide est négligé devant le transfert entre les bulles et le liquide (Chapman et coll., 1980).

H 13 : Le ciel gazeux est homogène en composition.

Enfin, le volume de gaz dispersé V_G (mesuré expérimentalement) est la somme des volumes de gaz (estimés numériquement) en provenance du diffuseur V_{Gd} , entraîné V_{Ge} , et des microbulles V_{Gmb} :

$$V_G = V_{Gd} + V_{Ge} + V_{Gmb}$$

Le volume du ciel gazeux vaut :

$$V_C = V_T - V_L - V_G$$

où V_T est le volume total du réacteur, et V_L le volume de liquide.

La Figure 13 schématise les modèles développés avec leurs paramètres (Q_d et V_G sont des constantes connues). L'intérêt des modèles ME1 à ME4 réside dans la prise en compte du flux entraîné Q_e , unique paramètre utilisé dans la littérature pour caractériser l'aération de surface en présence d'aération simultanée par le diffuseur.

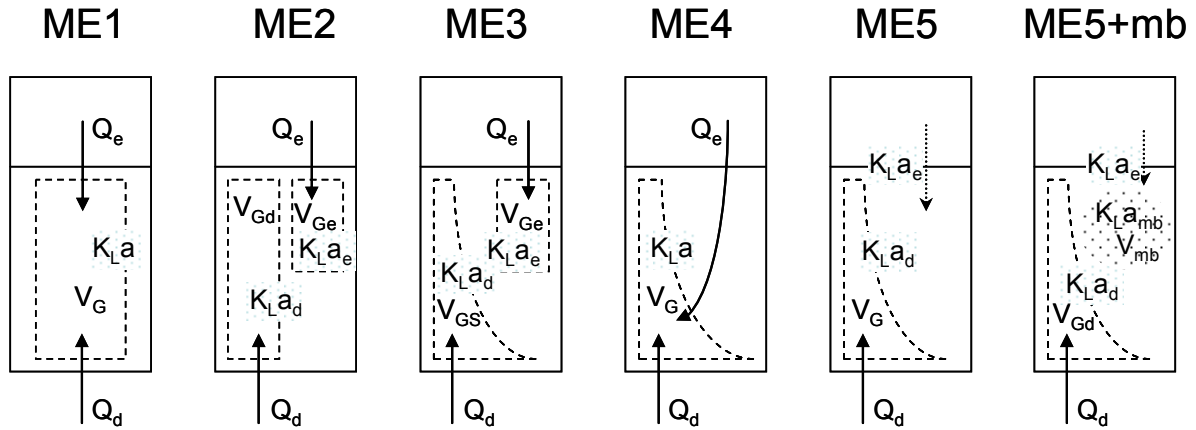


Figure 13. Schématisation des modèles d'entraînement de surface en présence d'aération par le diffuseur.

Les équations propres aux modèles ME sont développées ci-dessous.

Modèle ME1

Le modèle ME1 est basé sur le modèle MH et les hypothèses H 11 c et H 12, ainsi le bilan sur l'oxygène dans le système défini par le gaz dispersé (homogène) s'écrit :

$$\frac{d\bar{y}}{dt} = \frac{1}{V_G} \left(Q_d + Q_e \cdot \bar{y}_c - (Q_d + Q_e) \bar{y} - K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH(\bar{y} - \bar{x}) \right)$$

Le bilan sur l'oxygène dans le système défini par le ciel gazeux (homogène) s'écrit :

$$\frac{d\bar{y}_c}{dt} = \frac{1}{V_C} (Q_d + Q_e)(\bar{y} - \bar{y}_c)$$

où \bar{y}_c est la concentration normalisée de l'oxygène présent dans le gaz du ciel.

Modèle ME2

Le modèle ME2 est basé sur le modèle MH et les hypothèses H 11 nc et H 12.

Le bilan matière sur l'oxygène contenu dans le système défini par le ciel gazeux s'écrit :

$$\frac{d\bar{y}_c}{dt} = (Q_d(\bar{y}_{z=1} - \bar{y}_c) - Q_e(\bar{y}_e - \bar{y}_c)) \frac{1}{V_C} \quad (99)$$

où $\bar{y}_{z=1} = \bar{y}$ car le gaz dispersé est homogène.

Le bilan matière sur l'oxygène contenu dans le système défini par le gaz dispersé issu de l'entraînement de surface s'écrit :

$$\frac{d\bar{y}_e}{dt} = (Q_e(\bar{y}_c - \bar{y}_e) - K_L a_e V_L RTH(\bar{y}_e - \bar{x})) \frac{1}{V_{Ge}} \quad (100)$$

où \bar{y}_e est la concentration normalisée de l'oxygène présent dans le gaz entraîné.

Le bilan matière sur l'oxygène contenu dans le système défini par le gaz dispersé issu du diffuseur est la même que pour le modèle MH (Eq. 84) mais écrit avec le paramètre $K_L a_d$ au lieu de $K_L a$.

Le bilan matière sur l'oxygène contenu dans la phase liquide s'écrit :

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = K_L a_d (\bar{y}_d - \bar{x}) + K_L a_e (\bar{y}_e - \bar{x}).$$

Modèle ME3

Le modèle ME3 est basé sur le modèle MP et les hypothèses H 11 nc et H 12, ainsi le bilan matière sur l'oxygène dans le système défini par le gaz dispersé issu du diffuseur (Eq. 87) devient :

$$\frac{\partial \bar{y}_d}{\partial t} = -\frac{Q}{V_{Gd}} \frac{\partial \bar{y}_d}{\partial \bar{z}} - K_L a_d \frac{V_L}{V_{Gd}} RTH(\bar{y}_d - \bar{x}) \quad (101)$$

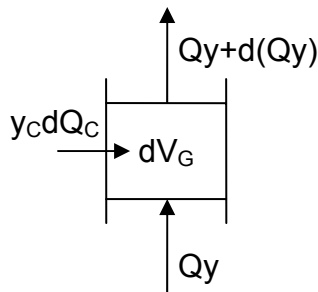
Et le bilan sur l'oxygène contenu dans la phase liquide (Eq. 88) s'écrit maintenant :

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = K_L a_d \int_0^1 (\bar{y}_d - \bar{x}) d\bar{z} + K_L a_e (\bar{y}_e - \bar{x})$$

Les bilans matière sur l'oxygène contenu dans le ciel gazeux et dans le gaz entraîné sont décrits par les équations Eq. 99 et Eq. 100, respectivement.

Modèle ME4.

Le modèle ME4 est basé sur le modèle MP et les hypothèses H 11 c et H 12.



Dans le modèle ME4 le gaz du diffuseur s'écoule de manière piston et est dilué en chaque point de sa remonté par une fraction du gaz entraîné, à la concentration du ciel. Le gaz entraîné se répartit de manière homogène sur l'ensemble de la hauteur du réacteur de telle sorte que le flux de gaz s'écrit :

$$Q(\bar{z}) = Q_d + Q_e \bar{z}$$

Le bilan matière sur l'oxygène dans un élément de volume dV_G de gaz s'écrit :

$$\frac{\partial \bar{y}}{\partial t} = -\frac{\partial(Q\bar{y})}{\partial V_G} + \frac{\bar{y}_c dQ_e}{dV_G} - K_L a \frac{\partial V_L}{\partial V_G} RTH(\bar{y} - \bar{x})$$

En posant : $\partial V_G = V_G \partial \bar{z}$ et $Q(\bar{z}) = Q_d + Q_e \cdot i \cdot \Delta \bar{z}$, on obtient la forme suivante intégrable numériquement :

$$\frac{\bar{y}_i^{n+1} - \bar{y}_i^n}{\Delta t} = - \left(\frac{(Q_d + Q_e \cdot i \cdot \Delta \bar{z}) \bar{y}_i^{n+1} - (Q_d + Q_e \cdot (i-1) \cdot \Delta \bar{z}) \bar{y}_{i-1}^{n+1}}{V_G \Delta \bar{z}} \right) + \frac{Q_e}{V_G} \bar{y}_C - K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH (\bar{y}_i^{n+1} - \bar{x}^{n+1})$$

qui est ensuite traitée comme le système Eq. 136 avec $a_2(i) = \frac{\Delta t}{V_G \Delta \bar{z}} (Q_d + Q_e \cdot i \cdot \Delta \bar{z})$.

Le bilan sur l'oxygène contenu dans le système défini par le ciel s'écrit :

$$\frac{d\bar{y}_C}{dt} = (Q_{\bar{z}=1} \cdot \bar{y}_{\bar{z}=1} - \bar{y}_C (Q_d + Q_e)) \frac{1}{V_C}$$

Le bilan sur l'oxygène en phase liquide est le même que pour le modèle piston (Eq. 88).

Modèle ME5

Le modèle ME5 est basé sur le modèle MP et l'hypothèse H 11 nc, mais contrairement aux autres modèles, le flux entraîné n'est pas spécifié : $K_L a_e$ modélise un transfert entre le liquide et le gaz du ciel par la surface libre ou par des bulles issues du ciel et de composition identique au du gaz du ciel. L'hypothèse H 12 n'est donc pas utilisée ici car le modèle ME5 englobe la diffusion à travers la surface libre.

Le bilan sur l'oxygène dans le système défini par le gaz issu du diffuseur est décrit par Eq. 101.

Le bilan sur l'oxygène dans la phase liquide s'écrit :

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = K_L a_d \int_0^1 (\bar{y}_d - \bar{x}) d\bar{z} + K_L a_e (\bar{y}_C - \bar{x})$$

Le bilan sur l'oxygène dans le système défini par le ciel gazeux s'écrit :

$$\frac{d\bar{y}_C}{dt} = (Q_d (\bar{y}_{\bar{z}=1} - \bar{y}_C) - K_L a_e V_L RTH (\bar{y}_C - \bar{x})) \frac{1}{V_C} \quad (102)$$

Modèles MP+mb et ME5+mb

L'échange gazeux entre une microbulle et le liquide est régit par l'équation suivante du premier ordre :

$$\frac{dy_{mb}}{dt} = K_L a_{mb} RTH \left(\frac{x}{HP} - y_{mb} \right) \quad (103)$$

où, pour le transfert d'oxygène, y_{mb} est la concentration en oxygène à l'intérieur de la microbulle, x la concentration en oxygène dissous dans la phase liquide en contact avec la

microbulle, K_L la conductance global de transfert d'oxygène définie par rapport à la phase liquide, a_{mb} le rapport de l'aire sur le volume de la microbulle, soit : $a_{mb} = \frac{6}{d_{mb}}$ où d_{mb} est le diamètre moyen de la microbulle supposée sphérique.

Le temps nécessaire à une microbulle gazeuse pour que sa concentration en oxygène atteigne l'équilibre avec la phase liquide est estimé en résolvant Eq. 103. Le temps le plus long est calculé en supposant $y_{mb}=0$ à $t=0$:

$$y_{mb} = \frac{x}{HP} \left(1 - \exp \frac{-t}{\tau_{mb}} \right)$$

où $\tau_{mb} = \frac{d_B}{6K_L RTH}$ est la constante de temps du phénomène. Elle correspond au temps

nécessaire à une microbulle pour que sa concentration atteigne 63% de la valeur de x/HP , et peut être comparée aux temps caractéristiques du système. Avec $K_L=10^{-4} \text{ m.s}^{-1}$ (valeur moyenne en cuve agitée dans la littérature) et $d_{mb}=10 \text{ }\mu\text{m}$, $\tau_{mb}=0,6 \text{ s}$. τ_{mb} est inférieur au temps de diffusion (Figure 58) et d'autre part le temps de résidence de la microbulle dans le liquide est supérieur à τ_{mb} , ce qui permet de conclure que la microbulle est à l'équilibre avec le liquide. Pour une microbulle de $50 \text{ }\mu\text{m}$ $\tau_{mb}=3,2 \text{ s}$, donc pour les valeurs de $K_L a$ élevées (supérieures à $0,3 \text{ s}^{-1}$) la composition d'une telle microbulle n'est pas en équilibre avec la composition du liquide. Dans la modélisation nous utilisons les hypothèses suivantes :

H 14 : Les microbulles sont en équilibre avec le liquide. Ainsi une valeur de $K_L a$ élevée, de 2 s^{-1} , leur est attribuée.

H 15 : Les microbulles ne coalescent pas avec les autres bulles du système, et occupent un volume V_{mb} constant durant chaque expérience.

Les modèles MP+mb et ME5+mb sont composés à partir des modèles MP et ME5 en ajoutant d'une part le terme $K_L a_{mb} (\bar{y}_{mb} - \bar{x})$ dans le bilan sur l'oxygène dans la phase liquide, et d'autre part le bilan sur l'oxygène contenu dans le système défini par l'ensemble des microbulles :

$$\frac{d\bar{y}_{mb}}{dt} = K_L a_{mb} \frac{V_L}{V_{mb}} RTH (\bar{x} - \bar{y}_{mb})$$

où V_{mb} est le volume des microbulles, calculé par identification paramétrique en même temps que $K_L a$.

III.1.5.2. Etude théorique des modèles ME1 et ME5

Un paramètre d'aération de surface est défini : pour le modèle ME1 c'est le rapport Q_e/Q_d (déjà utilisé par Veljković et coll. (1991)), et pour le modèle ME5, le rapport K_{La_e}/K_{La_d} . Ces paramètres traduisent l'influence relative de l'aération de surface par rapport à l'aération par le diffuseur.

La Figure 14 présente des courbes de réoxygénation calculées par les modèles ME1 (Figure 14A) et ME5 (Figure 14B). Pour chaque valeur de K_{La} ou K_{La_d} (0,5 et 0,05 s^{-1}), trois valeurs du paramètre d'aération de surface sont utilisées : 0,001 qui traduit la quasi absence d'aération de surface, 0,05 et 0,5 qui traduit une aération de surface très présente dans l'aération globale du réacteur.

A la fin de la réoxygénation ($\bar{x}_{SM} \in [0,6; 1]$) les courbes calculées pour une même valeur du paramètre d'aération de surface convergent, indépendamment de la valeur de K_{La} ou K_{La_d} .

Au début de la réoxygénation par contre ($\bar{x}_{SM} \in [0; 0,3]$), pour une valeur donnée de K_{La} ou K_{La_d} , le faisceau de courbes formé en faisant varier la valeur du paramètre d'aération de surface est très resserré, et est donc proche de la courbe que donneraient le modèle MH ou MP, c'est-à-dire en l'absence d'entraînement de surface, soit pour un paramètre d'aération de surface réduit à 0,001.

Deux conclusions s'imposent à cette observation. Premièrement, pour un modèle à deux valeurs de K_{La} comme le modèle ME5, il semble possible de pouvoir comparer directement K_{La_d} avec les valeurs de K_{La} de la littérature mesurées en l'absence d'entraînement de surface. Cette comparaison n'a jamais été entreprise dans la littérature où le transfert par l'entraînement de surface n'est pas caractérisé en terme de K_{La} . Deuxièmement, la valeur de K_{La} en présence d'aération de surface peut être approchée en modélisant la réponse expérimentale sur l'intervalle $\bar{x}_{SM} \in [0; 0,3]$ par un simple modèle MH ou MP: les modèles MH30% et MP30% sont ainsi respectivement définis. Notons que lorsque le paramètre d'aération de surface est très important ($Q_e/Q_d > 0,5$ ou $K_{La_e}/K_{La_d} > 0,5$), il influence aussi la réponse initiale de la réoxygénation.

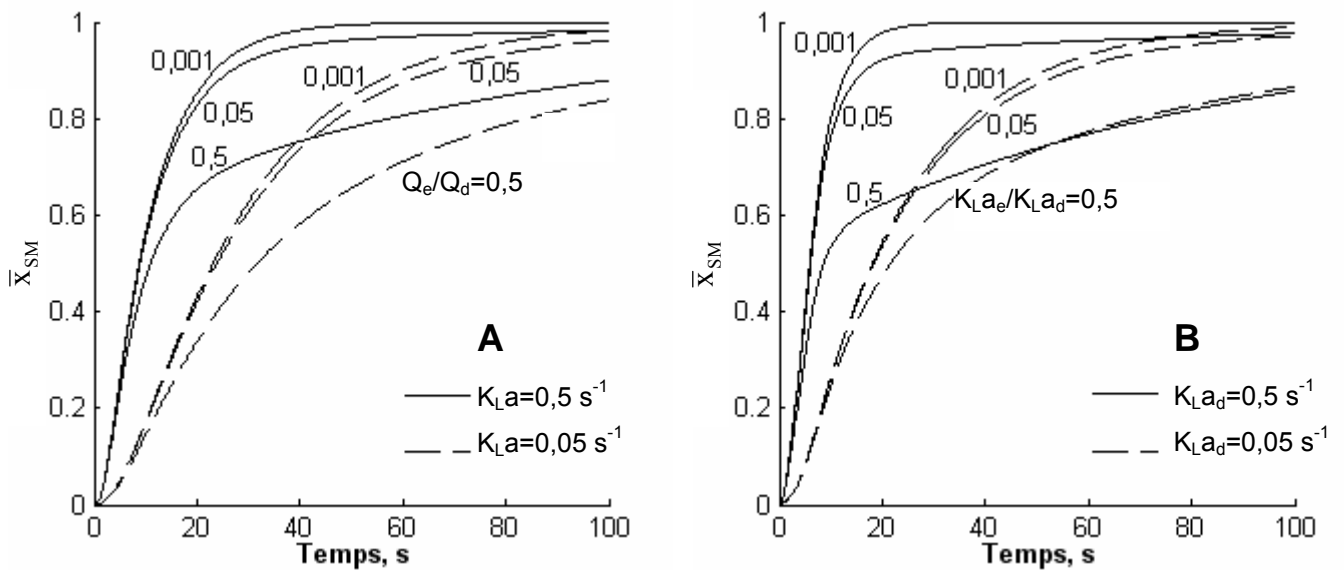


Figure 14. Influence de la valeur du $K_L a$ du diffuseur et du paramètre d'entraînement de surface dans le modèle ME1 (A) et ME5 (B). Courbes théoriques calculées pour : $V_L=10 \text{ L}$, $Q_d=0,146 \text{ L.s}^{-1}$ ($U_s=0,42 \text{ cm.s}^{-1}$), $V_G=1 \text{ L}$.

III.1.6. Synthèse

Dans ce chapitre, des modèles du transfert d'oxygène dans le réacteur sont développés à partir de modèles de la littérature (Shioya et Dunn, 1979 ; Veljković et coll., 1991) pour permettre la détermination du coefficient de transfert d'oxygène. Ces modèles, non-structurés, sont basés sur les bilans matière sur l'oxygène en phases liquide et gazeuse. La concentration en oxygène de la phase liquide est considérée homogène. Les modèles se distinguent de par la modélisation de la phase gazeuse : systèmes considérés (gaz dispersé issu du diffuseur, gaz dispersé issu de l'entraînement de surface, gaz du ciel, gaz des microbulles permanentes), et distribution des concentrations d'oxygène (système homogène ou piston).

➤ Les modèles MH et MP sont issus de la littérature (Shioya et Dunn, 1979) :

- le modèle MH, décrit une phase gazeuse dispersée homogène de composition.
- le modèle MP, décrit une phase gazeuse s'écoulant de manière piston dans le liquide.

Ces points sont résumés dans le Tableau 10.

Tableau 10. Modèles développés pour le calcul de $K_L a$. Les systèmes en phase gazeuse sur lesquelles sont effectués les bilans matière sur l'oxygène sont indiqués, en précisant : H concentration homogène dans le système, P écoulement piston dans le système.

Modèle	S y s t è m e			
	Gaz dispersé issu du diffuseur	Gaz dispersé issu de l'entraînement de surface	Gaz du ciel	Gaz des microbulles permanentes
MH	H			
MP	P			
MP+mb	P			H
ME1	H		H	
ME2	H	H	H	
ME3	P	H	H	
ME4	P		H	
ME5	P	H		
ME5+mb	P	H		H

➤ Les modèles MH et MP sont étudiés numériquement : il est remarqué en particulier que dans une même configuration, pour le modèle MP, contrairement au modèle MH, le temps permettant d'atteindre la saturation en oxygène lors d'une réoxygénation (échelon gazeux $N_2 \rightarrow \text{Air}$) n'est pas une fonction croissante de $K_L a$.

➤ Les modèles MH et MP sont développés pour leur application expérimentale en régime transitoire (méthode de réoxygénation), et pour leur application en régime permanent (méthode du bilan gazeux).

➤ Les modèles MH et MP sont complétés, de manière originale par rapport à la littérature, pour s'appliquer aux conditions intensives de culture :

- les modèles d'entraînement ME1, ME2, ME3, ME4, ME5 sont développés afin de déterminer la valeur du coefficient de transfert d'oxygène en condition d'entraînement de surface avec aération simultanée par le diffuseur : en plus de la phase gazeuse dispersée par le diffuseur, une seconde phase gazeuse dispersée est considérée, ayant pour origine l'entraînement de surface ; le système constituée par le ciel gazeux doit donc être considéré aussi. Les systèmes considérés dans chaque modèle d'entraînement sont résumés dans le Tableau 10 : lorsqu'il est considéré que les gaz de deux systèmes coalescent, le symbole H (système homogène) ou P (écoulement piston dans le système) est placé entre les deux colonnes d'intérêt ; le bilan matière correspondant est alors effectué sur un seul système commun.
- les modèles MP+mb et ME5+mb, développés respectivement à partir des modèles MP et ME5, tiennent compte de la présence d'une phase gazeuse « permanente » (Vasconcelos et Alves, 1991) constituée de microbulles (Tableau 10).

III.2. Quantification du transfert en réacteur en milieux minéraux de référence

La capacité du réacteur à transférer l'oxygène est caractérisée dans des milieux minéraux, en l'absence de réaction biologique. Ses milieux, utilisés dans la littérature, servent à l'établissement de point de comparaison avec la littérature, et de cadre de référence pour la suite de l'étude.

Les valeurs de K_La obtenues par la méthode du bilan gazeux avec oxydation par le sulfite, BG+OS, sont présentées en premier. Puis une méthode dynamique basée sur la réoxygénation du réacteur est proposée ; plusieurs modélisations de la réoxygénation $N_2 \rightarrow \text{Air}$ sont testées afin d'appréhender au mieux les dynamiques d'écoulement dans le réacteur, et d'obtenir en fin de compte les valeurs les plus justes de K_La .

III.2.1. Résultats préliminaires

Les résultats préliminaires visent :

- La détermination de la puissance dissipée.

Elle est nécessaire pour la modélisation en fonction de e des variables caractéristiques du transfert (K_La , ε , K_L). Elle est calculée à partir de la vitesse d'agitation.

- La détermination de la vitesse critique d'entraînement de surface.

Elle est réalisées en milieux coalescent et non coalescent, aéré et non aéré.

- La mesure de la rétention gazeuse.

Elle est réalisée pour les milieux minéraux de référence et l'influence du nombre de turbines immergées est étudiée.

III.2.1.1. Détermination de la puissance dissipée

a) Rappels bibliographiques

La puissance dissipée en condition aérée, P_G , est la somme de la puissance dissipée par l'agitateur et de la puissance dissipée par le gaz ($p_G = \rho g U_s$, en $W.m^{-3}$). Cette dernière est négligée pour une puissance dissipée par l'agitation supérieure à 1 kW.m^{-3} (van't Riet, 1979). Les valeurs de K_La sont habituellement présentées (tant graphiquement que dans les corrélations) en fonction de la puissance dissipée par unité de volume liquide aéré, e , $e = P_G/V_L$.

L'utilisation d'un torque mètre s'avère impossible sur le réacteur Braun car l'axe de l'arbre d'agitation n'est pas accessible. L'énergie électrique consommée est donnée,

cependant le rendement du système d'agitation (ratio de la puissance dispersée dans le liquide par la puissance consommée) est inconnu. Il dépend des pertes du moteur et de la transmission par courroie sous forme de chaleur, de la charge du fermenteur, de la dispersion gazeuse et de la vitesse d'agitation (van't Riet et Tramper, 1991). Certains auteurs calculent la puissance dissipée en soustrayant la puissance électrique consommée à vide de la puissance électrique consommée dans les conditions expérimentales (Veljković et Skala, 1989 ; Wu, 1995), ce qui suppose, en première approximation, que les pertes énergétiques ne dépendent que de la vitesse d'agitation. Cette solution ne nous convient pas ; nous choisissons d'approximer e à partir de la vitesse d'agitation N par une corrélation de la littérature.

Dans la littérature deux corrélations font autorité pour le calcul de P_G en fonction des conditions opératoires : la corrélation de Michel et Miller (1962) :

$$P_G = c \left(\frac{P_0^2 N d_D^3}{Q_d^{0,56}} \right)^{0,45} \quad (104)$$

où c est une constante, N est la vitesse d'agitation, d_D le diamètre de turbine, Q_d le flux d'aération par le diffuseur ;

et la corrélation de Hughmark (1980) :

$$P_G = 0,1 P_0 \left(\frac{Q_d}{N V_L} \right)^{-1/4} \left(\frac{N^2 d_D^4}{g h_p V_L^{2/3}} \right)^{-1/5} \quad (105)$$

où le premier groupe adimensionnel est un nombre d'aération modifié ($Na = Q_d / Nd_D^3$ définit le nombre d'aération mais la corrélation est meilleure avec le volume liquide V_L au lieu de d_D^3), et le deuxième groupe adimensionnel est un nombre de Froude, h_p est la hauteur de pale.

P_0 peut être estimé en fonction du nombre de puissance N_p :

$$P_0 = N_p \rho N^3 d_D^5 \quad (106)$$

N_p est donné dans des abaques par le constructeur en fonction du nombre de Reynolds. Pour une turbine Rushton (disque 6 pales) en régime turbulent ($Re_t = d_D^2 N / \nu > 10^4$), N_p prend une valeur comprise entre 4,5 et 6, selon la configuration du réacteur (van't Riet et Tramper, 1991 ; Roustan et coll., 1997). Une hélice marine, avec un nombre de puissance $N_p = 0,4$, fournit moins de puissance au liquide.

La puissance dissipée en condition aérée, P_G , est systématiquement inférieure à la puissance dissipée en condition non-aérée, P_0 : la résistance hydrodynamique à la rotation de la pale est réduite en présence de bulles (van't Riet et Tramper, 1991).

En réacteur multi-turbines, l'estimation de la puissance dissipée par n turbines en système non-aéré, $(P_0)_n$, est obtenue en multipliant le nombre de puissance Np relatif à une turbine par n (Eq. 106), à condition que les turbines soient au moins espacées d'un diamètre de turbine (Nienow et Lilly, 1979). En système aéré par contre, la décroissance du rapport P_G/P_0 en fonction du nombre d'aération Na atteint 0,5 à $Na=0,05$ en système mono-turbine pour seulement 0,8 en système bi-turbine (Hudcova et coll., 1989 ; Nienow et Lilly, 1979). Il a été vérifié pour deux turbines la relation (Nienow et Lilly, 1979) :

$$\left(\frac{P_G}{P_0}\right)_n = \frac{(P_G/P_0)_1 + (n-1).(1-\varepsilon)}{n} \quad (107)$$

où $n=1$ renvoie à la turbine du bas lorsqu'elle est utilisée seule, et $n=2$ à deux turbines actives. L'originalité de cette relation est sa prise en compte de la rétention gazeuse, ε , qui peut devenir importante en réacteur multi-turbine. La rétention gazeuse n'étant pas mesurable en condition de culture, cette relation ne peut pas être utilisée.

La corrélation de de Michel et Miller est une fonction de $N^{2,85}Q_d^{-0,25}d_D^{5,85}$, et la corrélation de Hughmark une fonction de $N^{3,15}Q_d^{-0,25}d_D^{4,2}$; les deux relations sont donc proches. Kamen et coll. (1995) proposent simplement pour des fermenteurs de 3,5 L et 16 L une fonction de $N^3d_D^2$. Nous choisirons la corrélation de Hughmark, car elle semble la mieux adaptée aux cultures fed-batch en tenant compte de la variation de volume.

b) Méthode

Expérimentalement le régime d'écoulement est toujours turbulent ($Re > 10^4$). En fixant le nombre de puissance à 5, la puissance dissipée en système non aéré, e_0 , calculée pour deux turbines actives, vaut : $e_0 = P_0/V_L = 2Np \cdot \rho \cdot N^3 d_D^5 / V_L$. Le calcul réalisé pour 10 L d'eau est présenté sur la Figure 15. Il est vérifié qu'à la vitesse d'agitation maximum, 1500 rpm, la valeur de e_0 (653 W), est inférieure à la puissance du moteur (746 W). En conditions aérées, la puissance dissipée e_H est calculée par la formule de Hughmark (1980), pour prendre en compte l'évolution de V_L . La Figure 15 montre que le rapport e_H/e_0 vaut en moyenne 0,5 pour un nombre d'aération (Q_d/Nd_D^3) toujours compris entre 1,5 et 3 en condition de culture. Cette valeur du rapport e_H/e_0 , un tiers plus faible que celle rapportée dans les travaux de Nienow (Hudcova et coll., 1989 ; Lilly et Nienow, 1979), peut être justifiée du fait que Nienow travaille à 200 rpm maximum alors que nous travaillons entre 400 et 1500 rpm : à forte agitation, la rétention gazeuse importante peut expliquer la moindre dissipation d'énergie. On peut proposer une deuxième justification du modèle choisi en calculant le

rendement R du système d'agitation à partir de valeurs de puissance électrique consommée, P_e , relevées en milieu non coalescent ($V_L=10$ L, Na_2SO_4 10 g.L^{-1} , $Q_d=0,16 \text{ L.s}^{-1}$) :

$$R = \frac{P_G}{P_e} \quad (108)$$

où P_G est calculé par la relation de Hughmark. Les valeurs de rendement sont portées sur la Figure 15 : elles sont compatibles avec un rendement classique de moteur électrique.

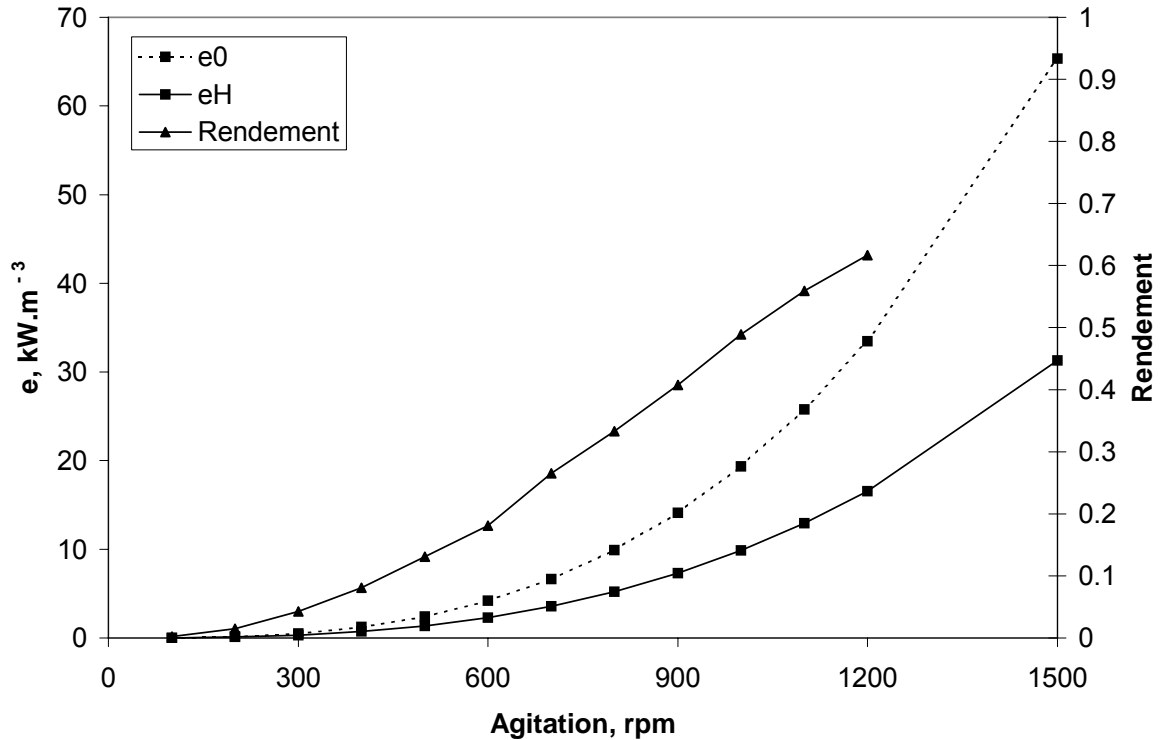


Figure 15. Evaluation de la puissance dissipée en fonction de l'agitation. Puissance volumique dissipée en l'absence d'aération, e_0 ; puissance volumique dissipée en condition de fonctionnement ($V_L=10$ L, $Q_d=0,16 \text{ L.s}^{-1}$), calculée par la relation de Hughmark (1980), e_H . Le rendement du système d'agitation est calculé par Eq. 108.

Le passage de deux à trois turbines actives s'effectue en conditions de culture avec un accroissement de la puissance électrique consommée négligeable : $P_{e,3t}/P_{e,2t} = 1,07 \pm 0,05$ (où $P_{e,3t}$ et $P_{e,2t}$ sont les puissances électriques mesurées avec 3 et 2 turbines actives, respectivement). Cette faible différence s'explique par une importante croissance de la rétention gazeuse pendant la transition (ϵ augmente 1,5 fois). En effet, notre surcoût énergétique est largement inférieur à la prédiction de 1,58 de Linek (1996), qui ne tient pas compte de la rétention gazeuse. Il semblerait par contre coïncider avec la formule rapportée par Nienow et Lilly (1979) (Eq. 107), laquelle tient compte de la rétention gazeuse. La

rétenion gazeuse n'étant pas mesurable en condition de culture, il n'est donc pas tenu compte de la transition de deux à trois turbines dans le calcul de la puissance dissipée, et il est supposé que le nombre de puissance pour trois turbines actives est équivalent à celui calculé pour deux turbines actives : $N_{p3}=N_{p2}=2 \times 5$.

L'adoption de ce calcul de la puissance dissipée ne change en rien les valeurs de $K_L a$ obtenues mais permet simplement la présentation des résultats et la comparaison avec la littérature.

III.2.1.2. Vitesse critique d'entraînement de surface

La vitesse critique d'entraînement de surface, N_E , est déterminée ici pour 10 L de milieu, en utilisant que les deux turbines du bas. La puissance consommée de référence, $P_{cr,ref}$, déterminée en l'absence de tout entraînement de surface, est mesurée avec 18 L de liquide (Figure 16).

La détermination de N_E dépend donc des hypothèses suivantes :

- la réduction de la puissance consommée par rapport à $P_{cr,ref}$ est due à l'augmentation de la rétenion gazeuse ε , attribuée à l'incorporation de bulles par la surface libre.
- la réduction de la puissance consommée par rapport à $P_{cr,ref}$ est importante comparée à l'excès de puissance dissipée dans le système due à l'augmentation du volume de 10 à 18 L.

Il apparaît que la fonction $P_{cr,ref}(N)$ déterminée dans l'eau se superpose parfaitement à celle déterminée dans la solution Na_2SO_4 10 g.L⁻¹, ceci en condition non-aérée (aucune bulle n'est présente dans le liquide) (Figure 16A) et en condition aérée (présence de bulles du diffuseur, mais pas de bulle entraînée) (Figure 16B). L'évolution des fonctions $P_{cr,ref}(N)$ sur la Figure 16 ne dépend donc pas des propriétés de coalescence du milieu.

En présence d'aération par le diffuseur (Figure 16B) ou non (Figure 16A), en milieu coalescent et non-coalescent, les fonctions $P_{cr}(N)$ se démarquent des fonctions $P_{cr,ref}(N)$ pour les valeurs de N supérieures ou égales à 700 rpm. Dans tous ces cas, N_E vaut donc 700 rpm, pour 10 L de milieu.

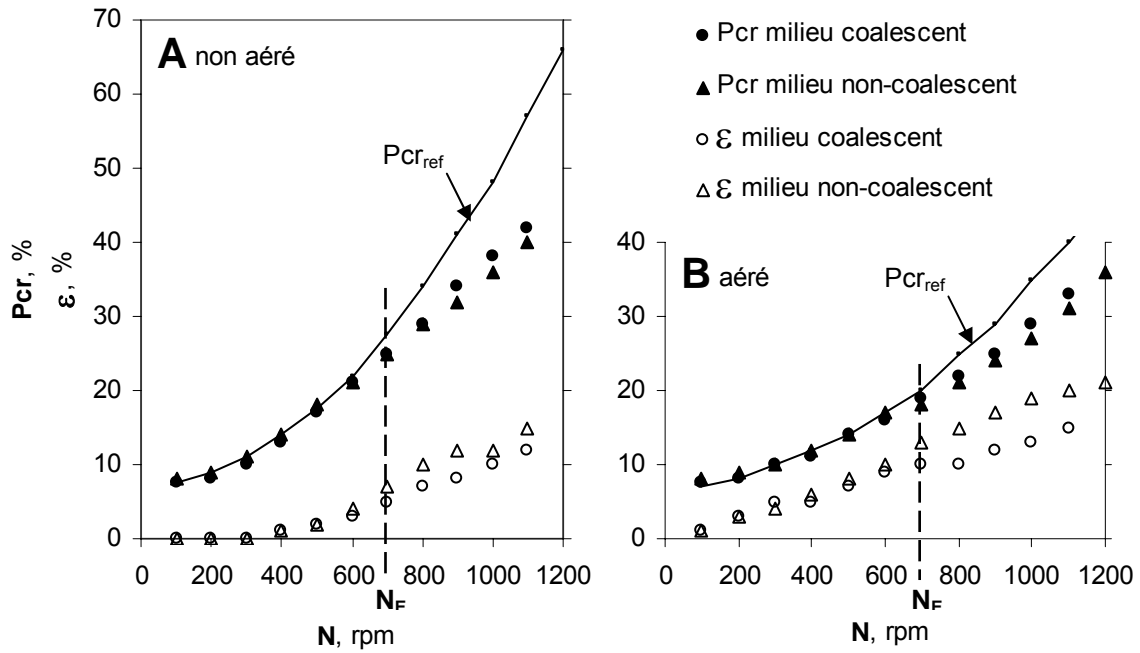


Figure 16. Détermination de la vitesse critique d'entraînement de surface N_E . **A** condition non-aérée ; **B** condition aérée. $V_L=10$ L ; milieu coalescent : eau du robinet ; milieu non-coalescent : Na_2SO_3 10 g.L^{-1} . ϵ : rétention gazeuse.

En culture microbienne, lorsque la concentration cellulaire dépasse $20 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$, les vitesses d'agitation utilisées sont comprises entre 1000 et 1500 rpm, pour un volume liquide compris entre 9 et 12 L. Il est alors probable que l'entraînement de surface intervienne dans le transfert d'oxygène, d'autant que les trois turbines sont utilisées, ce qui favorise le phénomène.

III.2.1.3. Rétention gazeuse des milieux minéraux

La Figure 17 représente une fonction de la rétention gazeuse, $\epsilon/Us^{0.4}$, en fonction de la puissance dissipée, pour l'eau et pour les trois autres milieux de référence (II.1).

Il apparaît, conformément à la littérature, que la rétention gazeuse augmente avec la force ionique du milieu (Tableau 7), c'est-à-dire en fonction de la capacité du milieu à inhiber la coalescence. La solution Na_2SO_4 50 g.L^{-1} ($I=1,06 \text{ mol.L}^{-1}$) inhibe complètement la coalescence (Linek et coll., 1987) et permet une rétention gazeuse en moyenne deux fois supérieure à celle obtenue pour la solution Na_2SO_4 10 g.L^{-1} ($I=0,24 \text{ mol.L}^{-1}$). Les valeurs maximales de ϵ atteignent 15% dans l'eau (pour $e=1000 \text{ W.m}^{-3}$) et 40 à 50% dans la solution Na_2SO_4 50 g.L^{-1} (pour $e=1500 \text{ W.m}^{-3}$). A partir de la Figure 17, la rétention gazeuse peut être exprimée en fonction de e pour les systèmes coalescent et non-coalescent ionique, respectivement :

$$\varepsilon_c = 0,062e^{0,32}U_s^{0,4} \quad (109)$$

$$\varepsilon_{nci} = 0,031e^{0,47}U_s^{0,4} \quad (110)$$

La dispersion des points autour de chaque modèle est réduite ($R^2=0,98$). L'exposant 0,4 est utilisé pour élever U_s car il corrèle le mieux nos résultats.

Lorsque trois turbines sont utilisées on remarque pour la solution Na_2SO_4 50 g.L^{-1} une augmentation de la rétention gazeuse à partir de $e=10000 \text{ W.m}^{-3}$ (pour cette configuration les points reliés par les pointillés remplacent donc les points reliés par Eq. 110 sur la Figure 17). Il faut en effet un milieu fortement non-coalescent et une puissance dissipée assez forte pour que le volume total de la suspension atteigne la troisième turbine ; la rétention gazeuse augmente alors subitement. Avec la solution Na_2SO_4 10 g.L^{-1} la formation d'une rétention gazeuse suffisante pour l'utilisation de la troisième turbine a lieu vers $e=20000 \text{ W.m}^{-3}$. Avec l'eau pure, la troisième turbine n'est jamais atteinte.

En milieu non-coalescent, la décroissance de ε à forte puissance dissipée est attribuée à un effet de saturation qui fait apparaître l'existence d'un volume dispersé maximum pouvant être retenu au dessus de la turbine supérieure.

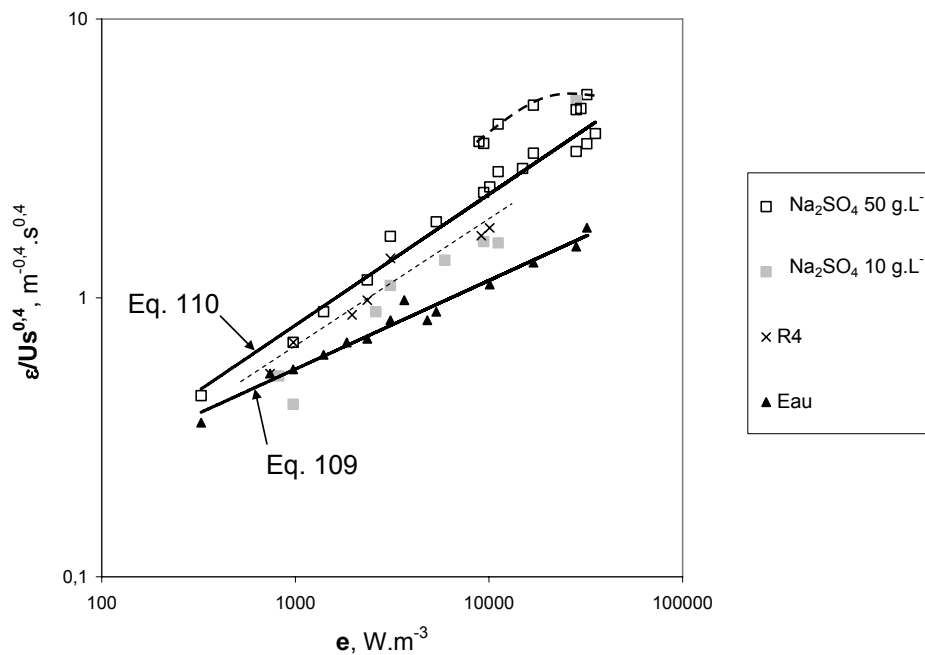


Figure 17. Rétention gazeuse en milieux minéraux. $V_L=10 \text{ L}$, $U_s=0,14, 0,42 \text{ et } 0,70 \text{ cm.s}^{-1}$, 2 turbines sont actives, sauf pour les points reliés par - - - où 3 turbines sont actives.

III.2.2. Quantification de $K_L a$ par la méthode du bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite (BG+OS)

a) Préambule.

Les valeurs de $K_L a$ déterminées par la méthode statique BG+OS sont présentées Figure 18 sous la forme de Eq. 21 ($K_L a / U_S^\beta$ en fonction de e). La valeur $\beta=0,4$ est utilisée car elle corrèle convenablement nos résultats en milieux coalescent et non-coalescent. De plus, la fonction $\frac{\varepsilon}{U_S^{0,4}}$ ayant déjà été étudiée en fonction de e (Figure 17), l'exposant $\beta=0,4$ permet d'écrire $\frac{K_L a}{U_S^{0,4}} = K_L \frac{6}{d_b} \frac{\varepsilon}{U_S^{0,4}}$, où les facteurs K_L et $1/d$ sont aussi étudiés en fonction de e dans la littérature (Linek et coll., 2005 ; Alves et coll., 2002). Enfin l'exposant 0,4 est conforme à la littérature, en particulier aux travaux de Linek et coll. (1987) ($d_T=29$ cm, 1tRu, $d_D/d_T=1/3$). Ces travaux sont basés sur une analyse bibliographique complète du domaine et sont donc choisis comme référence ; ils proposent, pour l'eau :

$$K_L a = 0,00495 e^{0,593} U_S^{0,4} \quad (111)$$

et pour une solution non-coalescente ionique ($28 \text{ g.L}^{-1} < [\text{Na}_2\text{SO}_4] < 71 \text{ g.L}^{-1}$) :

$$K_L a = 0,00135 e^{0,946} U_S^{0,4} \quad (112)$$

Les corrélations de Linek et coll. (1987) ayant été validées pour $100 < e < 3000 \text{ W.m}^{-3}$, leurs courbes représentatives sont extrapolées jusqu'à $e=35000 \text{ W.m}^{-3}$; elles sont représentées en trait pointillé sur le domaine d'extrapolation dans les figures concernées.

L'utilisation des corrélations de Linek et coll. (1987) comme référence suppose que :

1. l'évolution de $K_L a$ avec e est indépendante de l'écoulement de la phase gazeuse dispersée (piston, homogène...). Ceci est vérifié car $K_L a$ ne dépend pas de la concentration en oxygène dans le gaz.
2. l'évolution de $K_L a$ avec e est indépendante du nombre de turbines. Ceci est vérifié par Linek et coll. (1990 ; 2004) ($d_T=29$ cm, $d_D/d_T=1/3$) en solution non-coalescente ionique, avec $K_L a$ mesuré par la méthode de pression dynamique. Lorsque le réacteur est équipé d'une seule turbine Rushton, Linek et coll. (1990) proposent :

$$K_L a = 0,000311 e^{1,24} U_S^{0,4} \quad (113)$$

et lorsque le réacteur est équipé de deux turbines Rushton et rempli d'un volume deux fois plus important, Linek et coll. (2004) proposent :

$$K_L a = 0,00978 e^{1,233} U_S^{0,55} \quad (114)$$

Les corrélations conduisent à la même valeur de $K_L a$ à 20% près, et l'évolution de $K_L a$ en fonction de e est la même.

Remarque. Le coefficient α est 30% plus élevé que celui calculé par Linek et coll. (1987) pour la même configuration de réacteur. Ceci montre l'influence de la méthode de mesure sur la valeur de $K_L a$. 87 : Ces corrélations sont obtenues en évaluant $K_L a$ par réoxygénation en dégazant le liquide sous vide, puis en injectant un flux d'oxygène pur ($O \rightarrow O_2$) ; la phase gazeuse est donc homogène dans le réacteur.

b) Comparaison des modèles MH et MP

Sur la Figure 18, les valeurs de $K_L a$ calculées en supposant l'écoulement du gaz de type homogène (courbe BG+OS_MH) ou piston (courbe BG+OS_MP) sont portées en fonction de e . La différence entre les deux modèles réside dans le calcul du potentiel de transfert défini pour le profil homogène par : $(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{MH} = HP y_{O_2}^{off}$

et pour le profil piston par : $(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{MP} = HP (y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^{off}) / \ln(y_{O_2}^{in} / y_{O_2}^{off})$

L'hypothèse du profil homogène conduit à des valeurs de $K_L a$ supérieures à celles obtenues avec l'hypothèse du profil piston, puisque $(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{MH} < (x_{O_2}^* - x_{O_2})_{MP}$. L'écart est une fonction croissante de e , et atteint un facteur deux pour $e=30 \text{ kW.m}^{-3}$.

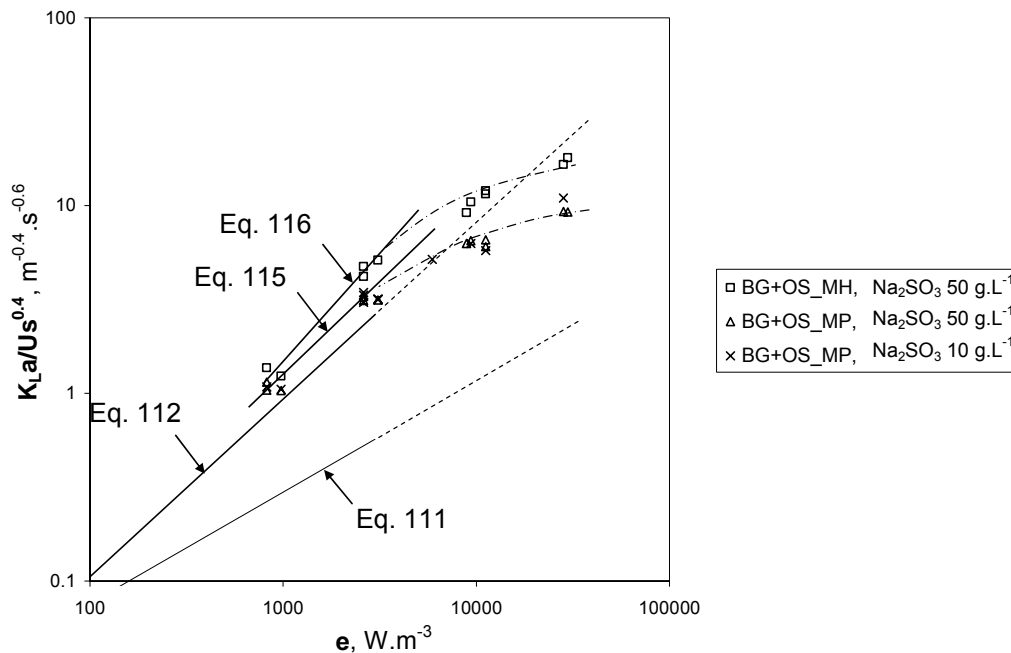


Figure 18. Comparaison des valeurs de $K_L a / U_s^{0.4}$ calculées par la méthode BG+OS avec les corrélations de Linek et coll. (1987). $V_L=10 \text{ L}$, $400 < N < 1500 \text{ rpm}$, $0,14 < U_s < 0,7 \text{ cm.s}^{-1}$.

c) Résultats pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$

Sur la gamme de puissance dissipée investiguée par Linek et coll. (1987), c'est-à-dire pour $e < 3000 \text{ W.m}^{-3}$, $K_L a$ calculé par le modèle MP (courbe BG+OS_MP) suit l'évolution mentionnée par Linek et coll. (1987) en fonction de e (Eq. 112) et peut être décrit par :

$$K_L a = 0,0022 e^{0,92} U_s^{0,4} \quad (115)$$

Cependant la valeur du facteur χ est 1,5 fois plus élevée que dans Eq. 112, mais χ dépend en particulier de la géométrie du fermenteur : Linek et coll. (1987) utilisent un fermenteur monoturbine de 29 cm de diamètre, le notre est multi-turbine de 21 cm de diamètre. D'autre part les températures de travail sont différentes (I.2.6).

Sur la même gamme de puissance dissipée, la courbe BG+OS_MH obtenue par le modèle MH a une pente supérieure à celle obtenue par de Linek et coll. (1987) (Eq. 112) :

$$K_L a = 0,0007 e^{1,12} U_s^{0,4} \quad (116)$$

d) Résultats pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$

A forte puissance dissipée ($e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$), les dérivées des courbes BG+OS_MH et BG+OS_MP diminuent avec e . Pour Linek et coll. (1982, 1987) cette évolution est artificielle : elle traduit l'écart entre les résultats expérimentaux et le modèle de calcul, en particulier par rapport à la description de la phase gazeuse (homogène ou piston). Cet écart est d'autant plus important que la puissance dissipée est élevée (Figure 18), alors que Linek considère que les valeurs réelles de $K_L a$ devraient toujours se situer sur une courbe qui pourrait être extrapolée à partir de la tendance mesurée à faible puissance dissipée.

La méthode de calcul de e (III.2.1.1) peut être mise en cause pour expliquer la diminution des valeurs de $K_L a$ à forte puissance dissipée, mais il semble improbable que e soit surestimé du facteur trois nécessaire pour que les points situés vers 30000 W.m^{-3} soient recalés sur la droite théorique à 8000 W.m^{-3} . Il est plus raisonnable de considérer, comme le suggèrent Linek et coll. (1987), que les profils gazeux utilisés dans la méthode BG+OS peuvent effectivement être altérés avec l'augmentation de la puissance dissipée qui provoque l'élargissement de la distribution des temps de séjour des bulles et compartimente le réacteur.

Le phénomène d'entraînement de surface ne peut pas être l'unique cause du fléchissement des valeurs de $K_L a$. En effet, l'incorporation dans la phase dispersée de gaz en provenance du ciel agit ici en faveur de l'enrichissement de la phase liquide car le potentiel de transfert entre le ciel et le liquide est positif ; le potentiel de transfert apparent, tel qu'il est considéré dans le présent calcul de $K_L a$ qui omet l'entraînement de surface, est plus petit que

si l'entraînement était considéré (Figure 3). La valeur apparente de K_{La} est donc plus grande que sa valeur réelle calculée en tenant compte de l'entraînement de surface.

e) Comparaison des valeurs obtenues avec Na_2SO_3 10 et 50 g.L^{-1}

Les valeurs de K_{La} obtenues pour Na_2SO_3 10 g.L^{-1} et 50 g.L^{-1} sont comparées sur la Figure 18 pour le modèle MP (courbe BG+OS_MP) : elles sont identiques à 10% près ; ce même résultat est obtenu pour le modèle MH, de part l'écriture du modèle. Similairement, Linek et coll. (2004) ($d_T=29$ cm, $2tRu$, $d_D/d_T=1/3$) obtiennent les mêmes valeurs de K_{La} pour Na_2SO_4 30 g.L^{-1} et 70 g.L^{-1} dans un réacteur de configuration similaire à la notre. En colonne à lit fixe par contre, Poughon et coll. (2003) proposent de réduire la concentration en Na_2SO_3 , de 50 g.L^{-1} à 10 g.L^{-1} , pour retrouver une valeur de K_{La} proche de celle mesurée dans l'eau. "L'astuce" ne vaut donc pas en réacteur agité. La méthode du bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite permet donc uniquement de caractériser le transfert d'oxygène dans le fermenteur en milieu non-coalescent.

Remarque. En vertu de l'influence directe de ε sur l'aire interfaciale (Eq. 29), il est surprenant que le passage de deux à trois turbines actives, correspondant à une rétention gazeuse 2 à 2,5 fois supérieure pour la solution Na_2SO_3 50 g.L^{-1} comparé à la solution Na_2SO_3 10 g.L^{-1} (Figure 17), ne se traduise pas également par une différence importante de K_{La} pour $e=10000$ W.m^{-3} . Les bulles de la solution à 50 g.L^{-1} sont-elles plus petites et plus résistantes au transfert ? L'écart à l'idéalité du profil gazeux limite-t-il la capacité globale de transfert ? Nous ne sommes pas en mesure de répondre à ces questions pour le moment. Une mesure in-situ de la taille des bulles permettrait d'obtenir de premiers éléments de réponse.

Ces résultats nous permettent d'affirmer que la méthode BG+OS est reproductible avec moins de 3% d'erreur (Tableau 8). La principale limitation de cette méthode semble provenir de la nécessité de connaître l'écoulement de la phase gazeuse dispersée, en particulier à forte puissance dissipée. Cet écoulement, pour $e<4000$ W.m^{-3} , est convenablement représentée par un écoulement piston; à plus forte puissance dissipée, par contre, l'écoulement du gaz en solution non-coalescente ne semble pas être modélisable par les modèles simples considérés ici.

III.2.3. Quantification de $K_L a$ par réoxygénation et modèles simples (MH et MP)

Les modèles simples de la littérature décrivent l'écoulement homogène ou piston de la phase gaz, avec un flux d'air unidirectionnel, c'est à dire globalement ascendant depuis le diffuseur vers le ciel gazeux, représenté par le flux Q_d sur la Figure 3.

Les modèles MH et MP sont testés ici avec la méthode dynamique de réoxygénation, d'une part pour sa simplicité expérimentale, et d'autre part parce qu'elle est applicable aussi bien en eau pure, qu'en milieu ionique, et en milieu biologiquement actif.

III.2.3.1. Résultats préliminaires

a) Reproductibilité de la mesure expérimentale

L'étude de reproductibilité est réalisée sur quatre réoxygénations, réalisées à plusieurs jours d'intervalle, dans les conditions suivantes : $V_L=10$ L, eau distillée, $e=2350$ $W.m^{-3}$ (c.a.d. $N=600$ rpm), $U_s=0,42$ $cm.s^{-1}$ (c.a.d. $Q_d=0,9$ vvm).

La reproductibilité de la mesure de l'oxygène dissous lors de la réoxygénation de l'eau est démontré sur la Figure 19 : l'écart type moyen en chaque point vaut 0,010.

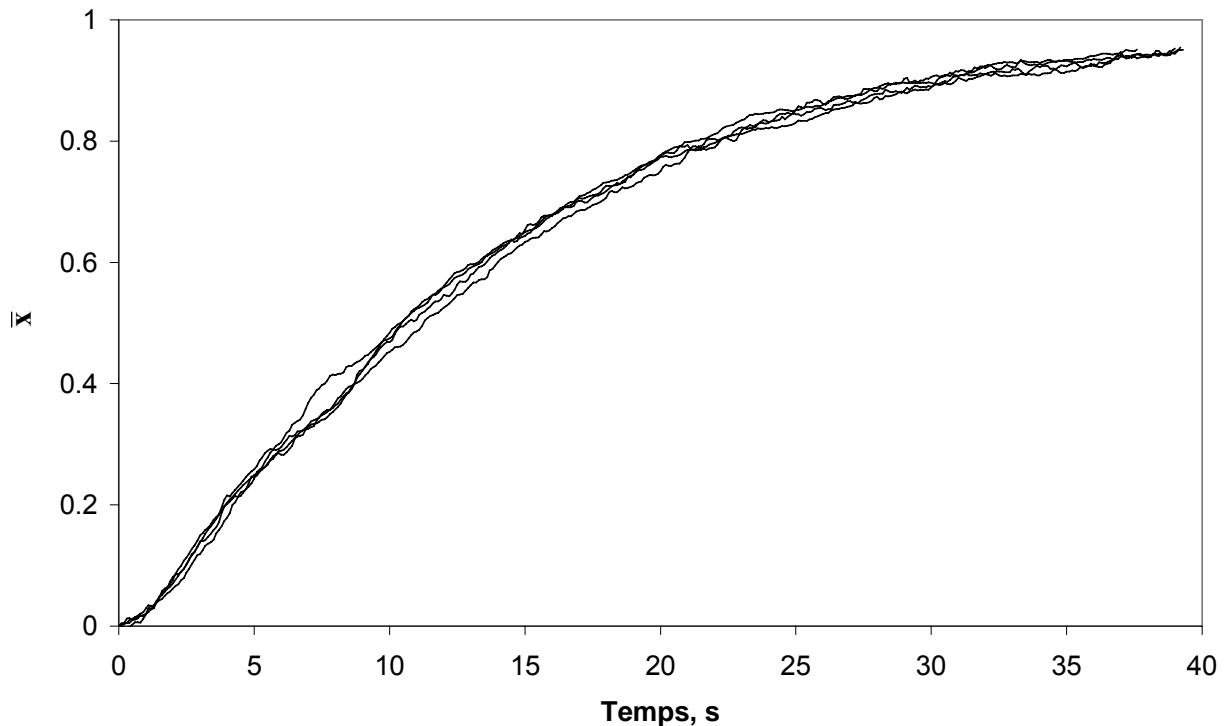


Figure 19. Reproductibilité de la mesure de l'oxygène dissous lors de la réoxygénation du réacteur. Eau pure, $V_L=10$ L, $e=2350$ $W.m^{-3}$ (600 rpm), $U_s=0,42$ $cm.s^{-1}$. 10 mesures sont relevées par seconde.

Remarque. La comparaison des réoxygénations expérimentales de la Figure 19 avec les réoxygénations calculées numériquement de la Figure 11 fait apparaître que la précision des

courbes expérimentales permet difficilement la détermination de valeurs de K_{La} supérieures à 1 s^{-1} par les méthodes dynamiques MH et MP.

b) Justification de la prise en compte de la rétention gazeuse

Il est montré expérimentalement (Figure 20) que pour des faibles vitesses d'agitation, plus la vitesse d'agitation est élevée, plus la réoxygénation du réacteur est plus rapide. La tendance s'inverse vers $N=700 \text{ rpm}$ pour le milieu coalescent (eau distillée) (Figure 20A), et $N=500 \text{ rpm}$ pour le milieu non-coalescent ($\text{Na}_2\text{SO}_4 \text{ } 50 \text{ g.L}^{-1}$) (Figure 20B). Alors que K_{La} augmente avec la vitesse d'agitation N (I.2.1.1), et que la vitesse de transfert de l'oxygène augmente avec K_{La} , pourquoi le temps nécessaire à la réoxygénation du réacteur n'est-il pas une fonction croissante de N ? Cette observation nous interroge sur l'effet de l'aération de surface, et du volume de gaz dispersé sur la valeur de K_{La} .

Dans les conditions de l'étude, l'aération de surface ne devrait intervenir qu'à partir de $N=700 \text{ rpm}$ (cf. III.2.1) : en milieu coalescent l'inversion de la tendance a lieu à ce moment là ; en milieu non-coalescent par contre, l'inversion de la tendance a lieu à $N=500 \text{ rpm}$. La Figure 21 présente une simulation de la réoxygénation du réacteur, calculée pour une même valeur de K_{La} et pour plusieurs valeurs de V_G . Il apparaît que le temps nécessaire à la réoxygénation du réacteur augmente avec V_G .

Ce résultat pourrait donc aussi expliquer le fait qu'à forte vitesse d'agitation ($N>600 \text{ rpm}$) la réoxygénation du réacteur est plus lente en milieu non-coalescent qu'en milieu coalescent (Figure 20), à cause de l'augmentation de V_G avec la non-coalescence du milieu (Figure 16B).

La prise en compte du bilan matière sur la phase gazeuse augmente la complexité du modèle ainsi que sa résolution quand certains auteurs se contentent du seul bilan matière en phase liquide. Cependant cette complexité est nécessaire et apparaît comme un facteur majeur de la modélisation en milieu fortement agité.

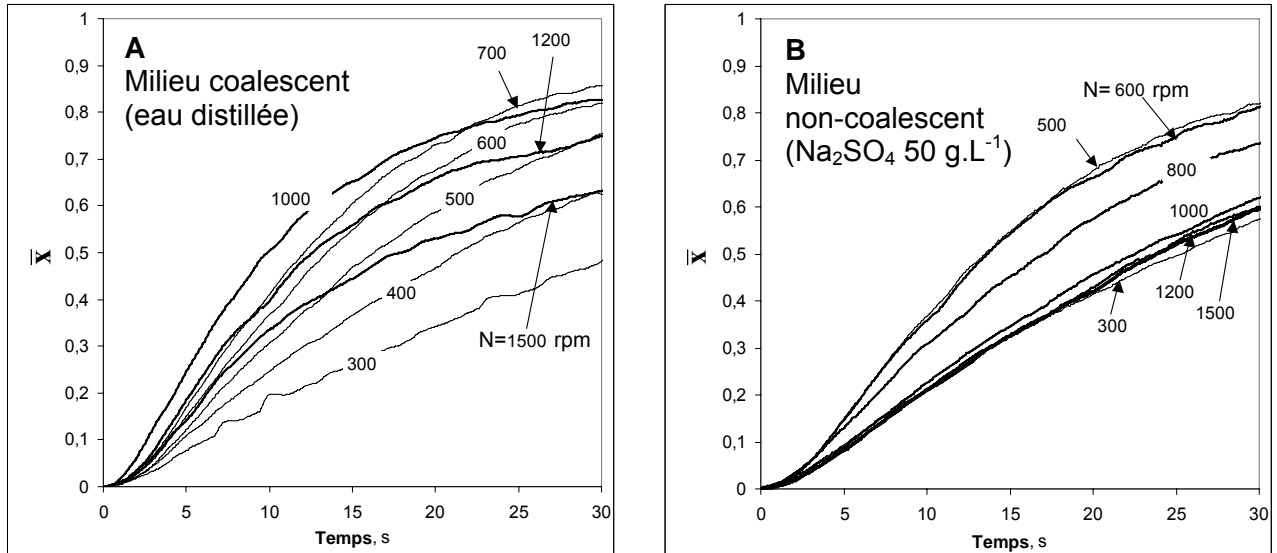


Figure 20. Réoxygénations expérimentales en fonction de la vitesse d'agitation (rpm) en milieu coalescent (A) et non-coalescent (B). $V_L=10$ L, $U_s=0,42$ cm.s⁻¹.

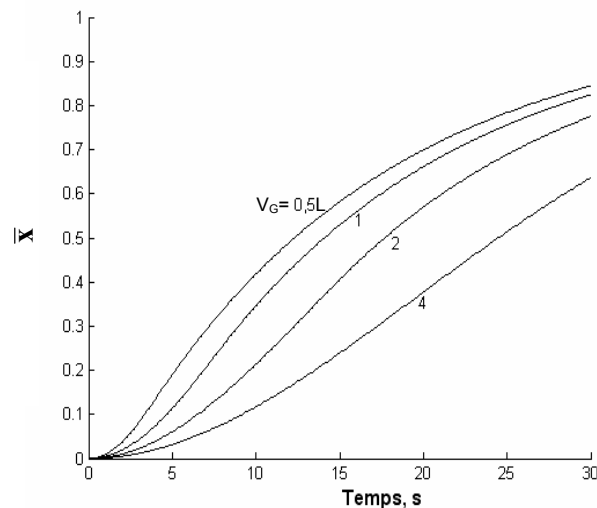


Figure 21. Réoxygénations simulées par le modèle MP en fonction du volume de gaz dispersé V_G (L). $V_L=10$ L, $U_s=0,42$ cm.s⁻¹, $K_L a=0,07$ s⁻¹.

c) Confrontation modèle - expérience

A faible flux de transfert, les diagrammes de parité (Figure 22A et B) montrent que les modèles MP et MH sont tous les deux pertinents et équivalents : l'écart entre les concentrations relatives mesurées par la sonde, \bar{x}_s , et les concentrations relatives estimées par le modèle, \bar{x}_{SM} , est inférieur à 10%, et les erreurs Er_{MP} et Er_{MH} sont équivalentes. A flux de transfert moyen (Figure 22C et D), la pertinence des modèles est moins bonne, surtout en solution saline, au départ de la réoxygénation, lorsque les concentrations relatives mesurées

sont inférieures à 0,4. A fort flux de transfert on remarque que les modèles MP et MH tendent à sous-estimer les concentrations en début de réoxygénation ; le phénomène s'amplifie en solution saline et lorsque les conditions de transfert deviennent plus intenses. Cet écart souligne que l'expérience s'éloigne des hypothèses de mélange du modèle. La sonde étant placée au niveau de la turbine centrale, on peut supposer que le liquide commence à s'enrichir autour de la turbine inférieure puis arrive subitement sur la seconde turbine. Il aurait fallu pour vérifier cela mesurer l'oxygène dissous simultanément dans les deux étages.

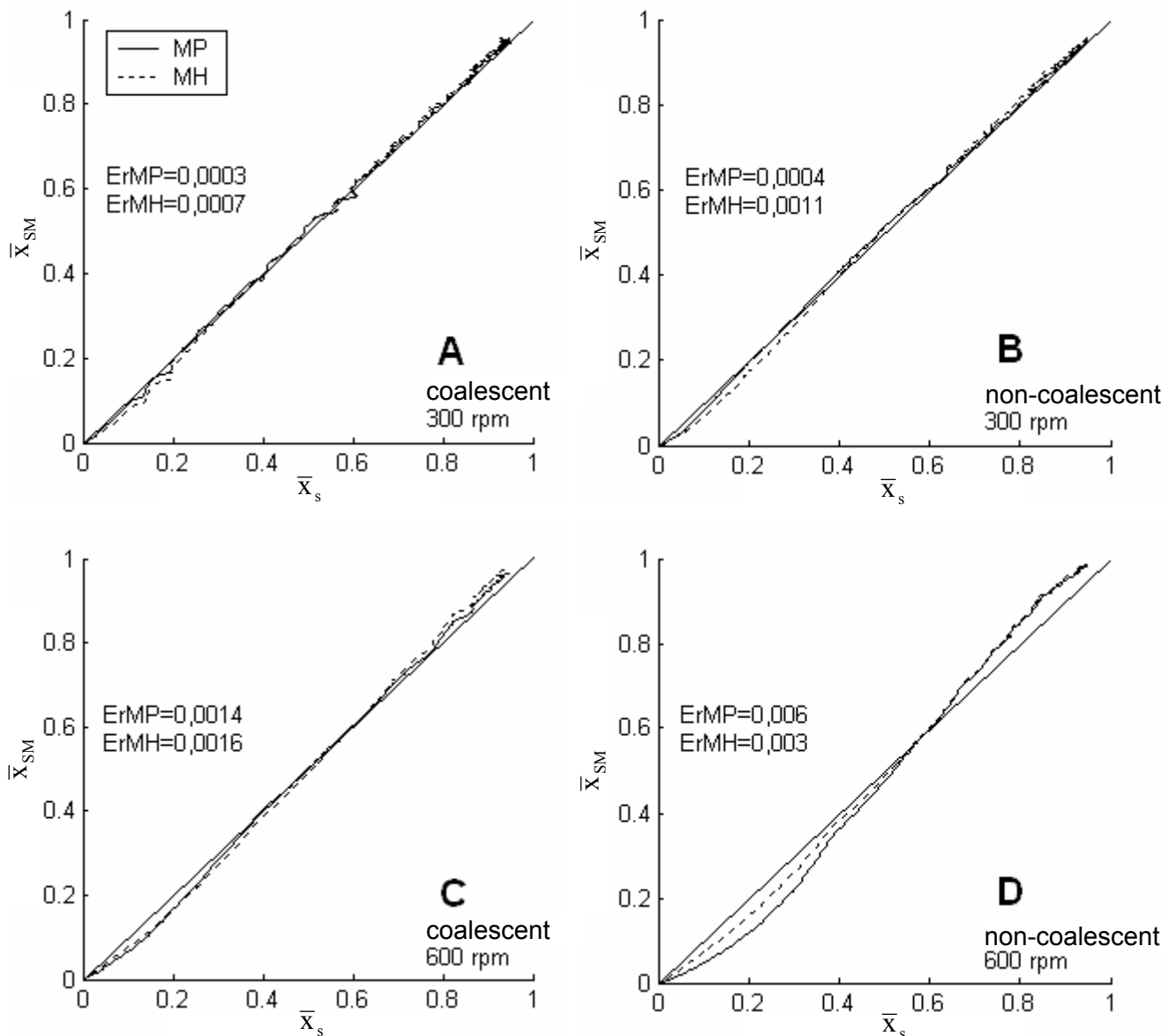


Figure 22. Confrontation des modèles piston et homogène avec des expériences de réoxygénation. Expériences réalisées en milieu coalescent (eau distillée) (A et C) et en milieu non-coalescent (Na_2SO_4 50 g.L^{-1}) (B et D), à faible flux de transfert (A et B) et à flux de transfert moyen (C et D). Les conditions d'agitation sont rappelées sur les figures ; $V_L=10 \text{ L}$; $U_s=0,42 \text{ cm.s}^{-1}$. Er_{MP} et Er_{MH} sont les erreurs relatives des identifications paramétriques réalisées par les modèles MP et MH, respectivement.

L'écart type sur la valeur de K_{La} calculée par le modèle MP sur quatre expériences similaires à celle de la Figure 22C, vaut $0,0026 \text{ s}^{-1}$, pour une valeur moyenne de K_{La} de $0,096 \text{ s}^{-1}$, soit une erreur de $\pm 2,7\%$; la convergence ne dépend pas de l'initialisation, effectuée sur l'intervalle $[0,005 ; 1 \text{ s}^{-1}]$, car les mêmes valeurs de K_{La} (à 10^{-4} s^{-1} près) sont obtenues.

A ce stade de l'investigation il apparaît que les modèles MP et MH sont pertinents à faible vitesse d'agitation et à vitesse d'agitation moyenne en milieu coalescent. Les deux modèles présentent des erreurs similaires ce qui ne permet pas d'identifier l'écoulement dans le réacteur ; l'étude se poursuit donc sur les deux modèles.

d) Etude de sensibilité

L'étude de sensibilité est réalisée en faisant varier les valeurs du paramètre K_{La} et des constantes V_G et τ_s . L'exemple présenté est représentatif de l'ensemble des réoxygénations étudiées et correspond à l'emploi du modèle MP pour représenter l'expérience de la Figure 22C.

Les domaines de variation de K_{La} et des constantes sont présentés sur le Tableau 11. Les valeurs utilisées pour la variation des constantes correspondent à des limites expérimentales réelles.

Tableau 11. Variation des paramètres pour l'étude de sensibilité du modèle MP en milieu coalescent. $V_L=10 \text{ L}$, $e=2350 \text{ W.m}^{-3}$ (600 rpm), $U_s=0,42 \text{ cm.s}^{-1}$.

Paramètre	Valeur centrale	Valeur inférieure	Valeur supérieure
$V_G, \text{ L}$	0,9	0,7 (-25%)	1,1 (+25%)
$\tau_s, \text{ s}$	0,8	0,6 (-25%)	2 (+250%)
$K_{La}, \text{ s}^{-1}$	0,0762	0,053 (-30%)	0,099 (+30%)

La constante de temps de la sonde, τ_s , varie de 0,8 s (valeur utilisées dans les modèles) à 2 s, soit une augmentation de 250%, à cause de plusieurs effets : le vieillissement de la sonde, le calcul de l'approximation du premier ordre qui pourrait être calculée à partir de l'instant t_{01} au lieu de l'instant t_{02} (Figure 8), la viscosité dans la couche liquide de diffusion qui peut augmenter en présence de cellules.

La mesure de V_G est précise à $\pm 0,1 \text{ L}$ pour $V_G \leq 0,5 \text{ L}$, et $\pm 0,2 \text{ L}$ pour $V_G > 0,5 \text{ L}$. V_G est fixé à la valeur lue (0,9 L), mais peut donc se situer sur l'intervalle $[0,7 ; 1,1]$ (en L). Nous avons essayé de calculer les valeurs de V_G par identification paramétrique en même temps que K_{La} : il ressort que les valeurs obtenues correspondent toujours à une des bornes de l'intervalle de définition de V_G , et que la valeur de la borne (inférieure ou supérieure) peut être différente selon le modèle utilisé. La valeur de V_G ainsi obtenue n'est donc pas liée à une

réalité expérimentale ; il nous a donc semblé préférable de fixer la valeur de V_G à la valeur lue.

La Figure 23 présente l'étude de sensibilité sous forme graphique : les courbes continues sont tracées à partir des valeurs centrales, et les courbes discontinues à partir des bornes des intervalles de définition. Il apparaît que K_{La} est le paramètre le plus sensible, ce qui nous permet de valider à posteriori la modélisation proposée. En effet, puisque K_{La} est le paramètre cherché, plus sa sensibilité est forte, plus l'approximation converge vers une valeur précise.

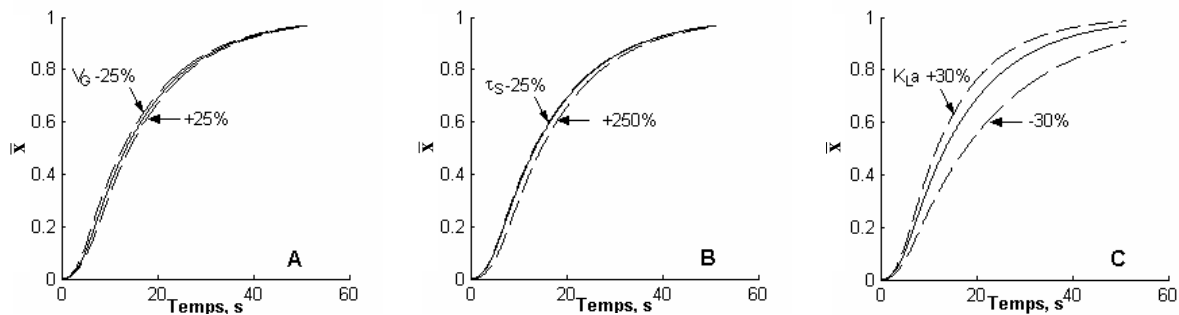


Figure 23. Etude de sensibilité du modèle MP. Les valeurs centrales des paramètres sont modifiées une à une. **A** sensibilité de V_G ; **B** sensibilité de τ_S ; **C** sensibilité de K_{La} . Eau distillée, $V_L=10$ L, $e=2350$ $W.m^{-3}$ (600 rpm) ; $U_s=0,42$ $cm.s^{-1}$.

A partir des intervalles de définition de τ_S et V_G , il est possible de calculer l'erreur de mesure avec laquelle est évalué la valeur de K_{La} . Sur l'expérience de la Figure 22C, K_{La} est évalué avec une erreur de mesure inférieure à 3%.

III.2.3.2. Valeurs de K_{La} et comparaison avec la littérature

En milieu coalescent (Figure 24A), pour $e < 4000$ $W.m^{-1}$, les évolutions de $K_{La}/U_s^{0,4}$ en fonction de e décrites par les modèles MH et MP, suivent le modèle décrit par Eq. 21, conformément à Linek et coll. (1987). La courbe décrite par le modèle MP sur la Figure 24A pour $e < 4000$ $W.m^{-3}$ a pour équation :

$$K_{La}=0,0076e^{0,56}U_s^{0,4} \quad (117)$$

et pour le modèle MH :

$$K_{La}=0,0015e^{0,83}U_s^{0,4} \quad (118)$$

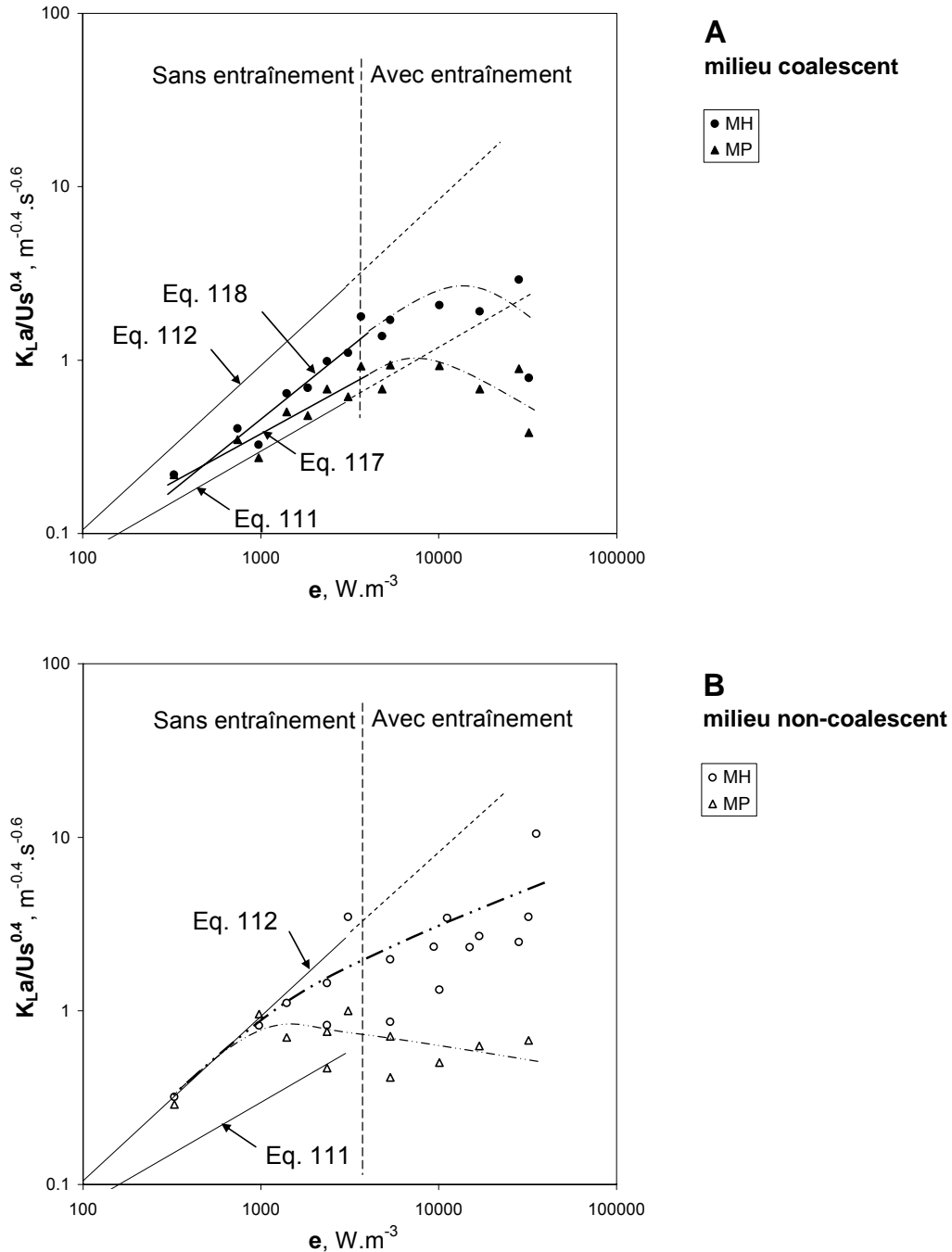


Figure 24. Comparaison des valeurs de $K_L a / Us^{0.4}$ obtenues par les modèles MH et MP, en milieu coalescent (eau distillée) (A) et non-coalescent (Na_2SO_4 50 g.L^{-1}) (B), avec les corrélations proposées par Linek et coll. (1987). MP : modèle piston ; MH modèle homogène. Tendence pour le modèle homogène — · —, et piston — · · —.

Pour le modèle MP, l'exposant $\alpha=0,56$ est proche de la valeur 0,6 obtenue par Linek et al. (1987). Par contre, le coefficient χ identifié pour notre réacteur est 1,5 fois plus grand que celui de Linek. Le même facteur 1,5 a été identifié précédemment en milieu non-coalescent (III.2.2), argumenté par l'influence de la configuration du réacteur et de sa géométrie sur χ , et de l'influence de la température.

Pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$, les valeurs de $K_{L,a}$ chutent. La puissance dissipée correspondant à la valeur de N_E mesurée précédemment (III.2.1) (avec $N_E = 700 \text{ rpm}$ et $U_s = 0,42 \text{ cm.s}^{-1}$, soit $e = 3600 \text{ W.m}^{-3}$) permet l'établissement de deux zones (séparées par le trait pointillé) selon l'existence (pour $e > 3600 \text{ W.m}^{-3}$) ou non (pour $e < 3600 \text{ W.m}^{-3}$) d'entraînement de surface. Il semble donc que l'entraînement de surface soit une explication possible à la chute des valeurs de $K_{L,a}$ pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$: de part le dégazage à l'azote avant la réoxygénation, le potentiel de transfert entre le ciel et le liquide est toujours négatif ($y_{O_2}^{\text{off}} - y_{O_2}^* < 0$), le gaz entraîné à partir du ciel s'enrichit donc au contact du liquide, et réduit alors la vitesse apparente de la réoxygénation. (Pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$ les courbes de réoxygénation présentent les caractéristiques de celle présentée sur la Figure 25.)

En milieu non-coalescent, le décalage entre les pentes mesurées par les modèles MH et MP et Eq. 112 a lieu pour $e > 1000 \text{ W.m}^{-3}$ (Figure 24B). La divergence pour le modèle MP est telle que les $K_{L,a}$ estimés à forte puissance dissipée deviennent inférieurs à ceux estimés dans l'eau, ce qui est aberrant. L'aération de surface peut difficilement expliquer l'écart à la tendance de référence car la divergence est déjà très prononcée alors que l'aération de surface est négligeable. Le phénomène observé est peut-être l'effet d'une rétention gazeuse résiduelle, modélisée ultérieurement.

Dans nos conditions opératoires les modèles MH et MP permettent de dégager l'évolution de $K_{L,a}$ en milieu coalescent pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$. Par contre les modèles MH et MP ne sont pas adaptés au calcul de $K_{L,a}$ en présence d'entraînement de surface, ni au calcul de $K_{L,a}$ en milieu non-coalescent.

Remarques. La condition sur la constante de temps de la sonde $\tau_S < \tau_d$ (Ruchti et coll., 1981) nécessaire pour la détermination de $K_{L,a}$ par la méthode dynamique de réoxygénation est respectée (Figure 10), puisque $\tau_S = 0,8 \text{ s}$ et que la valeur minimale de τ_d vaut 1 s (mesurée en milieu non-coalescent pour la valeur maximale de $K_{L,a}$: 1 s^{-1} pour $e = 35500 \text{ W.m}^{-3}$). D'autre part les valeurs de τ_S et τ_D étant proches, la prise en compte de la dynamique de la sonde dans les modèles est justifié. De même, en solution non-coalescente, l'obtention de valeurs telles que $\tau_G > \tau_d$ justifie la considération de la dynamique de la phase gazeuse dans les modèles.

III.2.4. Quantification de $K_L a$ par réoxygénation et modèles considérant l'entraînement de surface

III.2.4.1. Pertinence des modèles considérant l'entraînement de surface

Il apparaît que les modèles ME2 et ME3 ne sont pas exploitables mathématiquement à cause du trop grand nombre de paramètres inconnus ; ils sont donc abandonnés.

Sur la Figure 25, les courbes MP, MP50% et ME5 représentent les fonctions $\bar{x}(t)$ calculées par les modèles de mêmes noms en minimisant l'erreur E_r entre la courbe théorique et la courbe expérimentale. Le modèle MP50% est issu du modèle MP en minimisant l'erreur E_{rMP} sur l'intervalle $\bar{x}_s \in [0;0,5]$ au lieu de $\bar{x}_s \in [0;0,95]$. La courbe ME5ciel qui représente la fonction $\bar{y}_c(t)$, la concentration relative en oxygène dans le ciel gazeux, est calculée par le modèle ME5 à partir de Eq. 102. La réoxygénation expérimentale dont la courbe représentative est portée sur la Figure 25 est influencée de manière caractéristique par l'aération de surface : pour $t \in [0;20s]$ la courbe de réoxygénation peut être modélisée par un second ordre, représenté par la courbe MP50%, puis elle présente une rupture (ici vers $t=25$ s). Par rapport à un second ordre (représenté par les courbes MP50% ou MP), la saturation est atteinte expérimentalement avec un retard, qui correspond au temps nécessaire permettant la saturation simultanée du liquide et du ciel en interaction avec lui.

Sur la Figure 25 le modèle MP ne représente pas l'expérience et sous-estime la valeur de $K_L a$ (on obtient $K_L a=0,04 \text{ s}^{-1}$). Il est possible que le même modèle utilisé sur la première partie de la réoxygénation, MP50%, prédise correctement la valeur de $K_L a$ (on obtient $K_L a=0,32 \text{ s}^{-1}$). Mais un modèle prenant en compte l'aération de surface, comme le modèle ME5, est plus intéressant car il renseigne sur les deux types de transfert : d'une part entre le gaz du diffuseur et le liquide, d'autre part entre le ciel gazeux et le liquide.

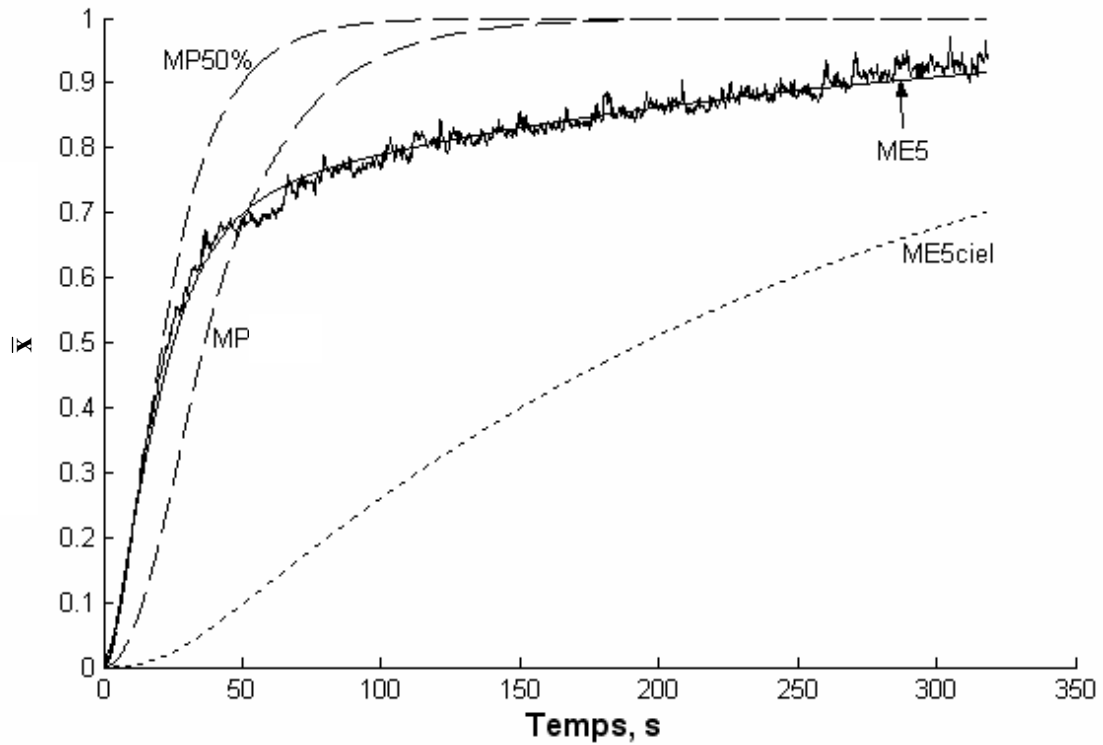


Figure 25. Influence de la concentration en oxygène dans le ciel gazeux lors d'une réoxygénation avec entraînement de surface. Comparaison entre une courbe expérimentale et les modèles MP et ME5. $V_L=10$ L, eau distillée, $N=1000$ rpm, $Q_d=0,0485$ L.s⁻¹, $V_G=1,4$ L, $V_C=11,4$ L.

La Figure 26 compare pour des conditions opératoires fixées ($e=10100$ W.m⁻³; $U_s=0,42$ cm.s⁻¹) la pertinence des modèles prenant en compte l'entraînement de surface, sur milieu coalescent (Figure 26A et B) et sur milieu non-coalescent (Figure 26C et D). Les modèles MP et MH sont reportés à titre de comparaison. Les graphes A et C présentent les modèles pour lesquels l'écoulement du gaz du diffuseur est de type homogène ; les graphes B et D les modèles pour lesquels l'écoulement du gaz du diffuseur est de type piston.

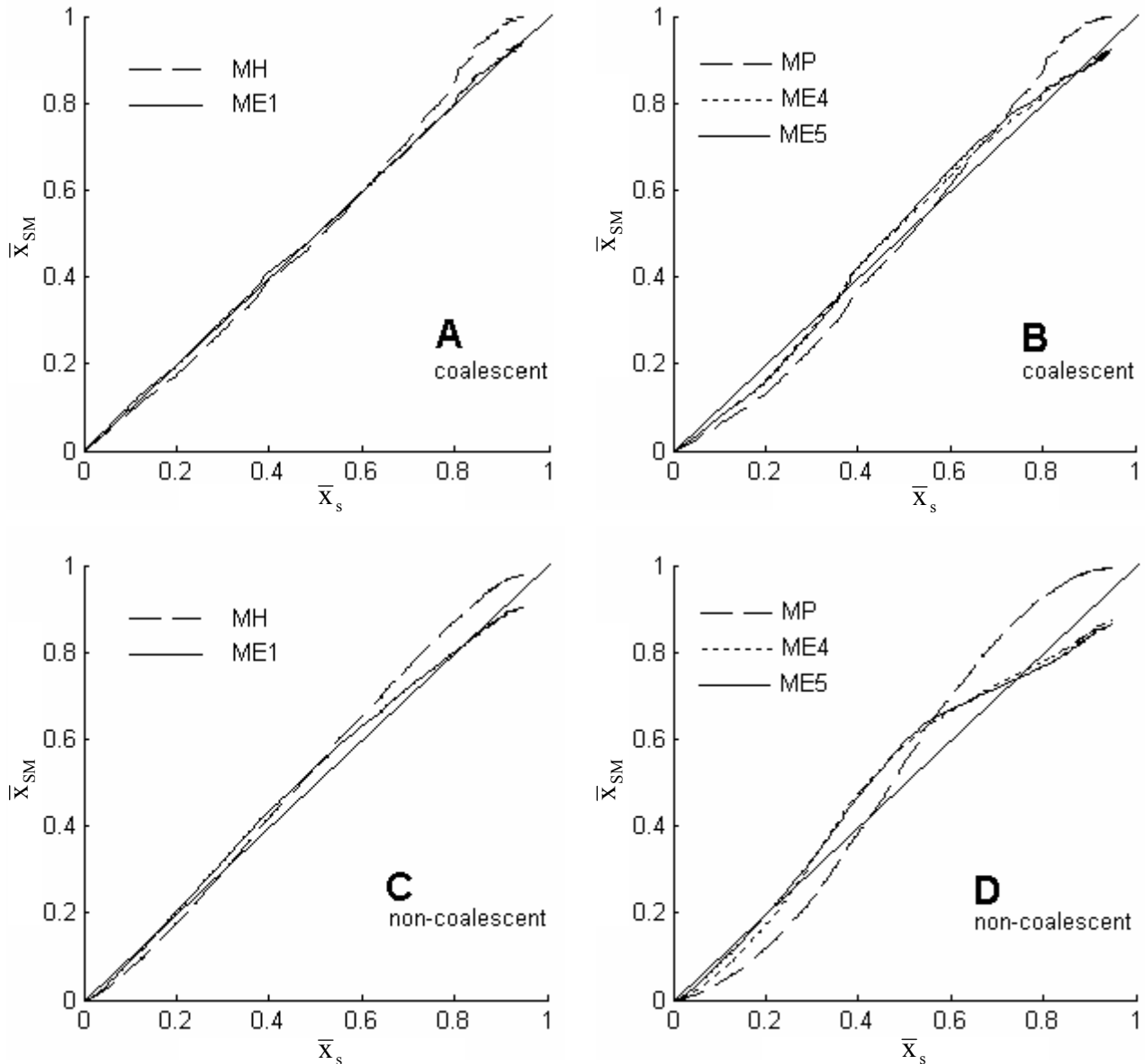


Figure 26. Pertinence des modèles d'entraînement de surface pour la modélisation d'une réoxygénation. Milieu coalescent (eau) (A, B) et milieu non-coalescent (Na_2SO_4 50 g.L^{-1}) (C, D). Modèles de type homogènes (A, C) et de type piston (B, D). $V_L=10$ L, $e=10100$ W.m^{-3} (soit $N=1000$ rpm), $U_s=0,42$ cm.s^{-1} .

Il apparaît que les modèles prenant en compte l'entraînement de surface sont plus proches des réoxygénations expérimentales que les modèles MH et MP. Ceci est confirmé par la lecture des erreurs de minimisation E_r (Eq. 81) entre courbe expérimentale et courbe théorique, reportées sur le Tableau 12 pour le milieu coalescent et le Tableau 13 pour le milieu non-coalescent. Cependant ces erreurs sont 4 à 12 fois supérieures en milieu non-coalescent qu'en milieu coalescent.

En milieu coalescent, les erreurs E_{rME4} et E_{rME5} sont 12 et 17 fois plus grandes que l'erreur E_{rME1} ; elles sont 4 fois plus grandes en milieu non-coalescent : le modèle ME1

proposant l'homogénéité du gaz du diffuseur semble donc mieux représenter les réoxygénations que les modèles ME4 et ME5 de type piston.

Le Tableau 12 et le Tableau 13 rapportent également les paramètres des l'identifications paramétriques. Les bornes des intervalles de définition de chaque paramètre sont des valeurs extrêmes de la littérature ; elles sont rapportées dans la première ligne du tableau (par exemple la valeur de K_{La} permettant de minimiser l'écart entre la courbe théorique et la courbe expérimentale, c'est-à-dire de minimiser la valeur de l'erreur ErMP, est recherchée sur l'intervalle $[0,01 \text{ s}^{-1} ; 2 \text{ s}^{-1}]$).

Tableau 12. Paramètres et erreurs relatives des modèles présentés pour le milieu coalescent (Figure 26A et B). $V_L=10 \text{ L}$, $e=10100 \text{ W.m}^{-3}$, $U_s=0,42 \text{ cm.s}^{-1}$, $V_G=1,25 \text{ L}$, $V_C=11,55 \text{ L}$. K_{La} exprimés en s^{-1} . Er erreur relative de la minimisation entre théorie et expérience (Eq. 81).

Modèle	$0,01 < K_{La} < 2$	$0,01 < K_{La_d} < 2$	$0,01 < K_{La_e} < 1$	$0,01 < Q_e/Q_d < 1,5$	Er
MP	0,1042	-	-	-	0,0013
MH	0,2313	-	-	-	0,0038
ME1	0,3084	-	-	0,13	0,00007
ME4	0,1558	-	-	0,38	0,00087
ME5	-	0,156	0,0262	-	0,0012

Tableau 13. Paramètres et erreurs relatives des modèles présentés pour le milieu non-coalescent (Figure 26C et D). $V_L=10 \text{ L}$, $e=10100 \text{ W.m}^{-3}$, $U_s=0,42 \text{ cm.s}^{-1}$, $V_G=2,8 \text{ L}$, $V_C=10 \text{ L}$. K_{La} exprimés en s^{-1} . Er erreur relative de la minimisation entre théorie et expérience (Eq. 81).

Modèle	$0,01 < K_{La} < 2$	$0,01 < K_{La_d} < 2$	$0,01 < K_{La_e} < 1$	$0,01 < Q_e/Q_d < 1,5$	Er
MP	0,0566	-	-	-	0,013
MH	0,1482	-	-	-	0,0043
ME1	0,2196	-	-	0,19	0,00099
ME4	0,103	-	-	0,78	0,004
ME5	-	0,1455	0,0593	-	0,0042

Le modèle ME4 donne des valeurs de K_{La} très petites par rapport à la littérature (Eq. 111 ; Eq. 112). D'autre part les valeurs du rapport Q_e/Q_d entre le flux entraîné et le flux diffusé semblent très élevées par rapport aux travaux de Veljković et Skala (1989). Le modèle ME4 n'est donc par retenu.

Les modèles ME1 et ME5 semblent donner des valeurs cohérentes avec la littérature, bien que très différentes et difficilement comparables entre elles. A ce stade de l'investigation, les modèles ME1 et ME5 sont donc retenus pour être comparés entre eux et avec la littérature.

III.2.4.2. Valeurs de K_La et comparaison avec la littérature

Nous présenterons consécutivement

- les résultats en milieu coalescent
- les résultats en milieu non-coalescent, dans une configuration de réacteur à deux ou trois turbines, et en ajoutant la prise en compte dans le modèle de la rétention gazeuse permanente.

a) Milieu coalescent

En milieu coalescent, les expériences de réoxygénation ayant servies à l'établissement de la Figure 24A sont ici réexploitées par les modèles prenant en compte l'entraînement de surface ; les valeurs de $K_La/U_S^{0,4}$ ainsi obtenues sont présentées sur la Figure 27 en fonction de e . Les corrélations obtenues pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$ sur la Figure 24A par le modèle MP (Eq. 117) et par le modèle MH (Eq. 118) sont extrapolées pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$ sur la Figure 27 ; le domaine d'extrapolation est représenté en trait pointillé.

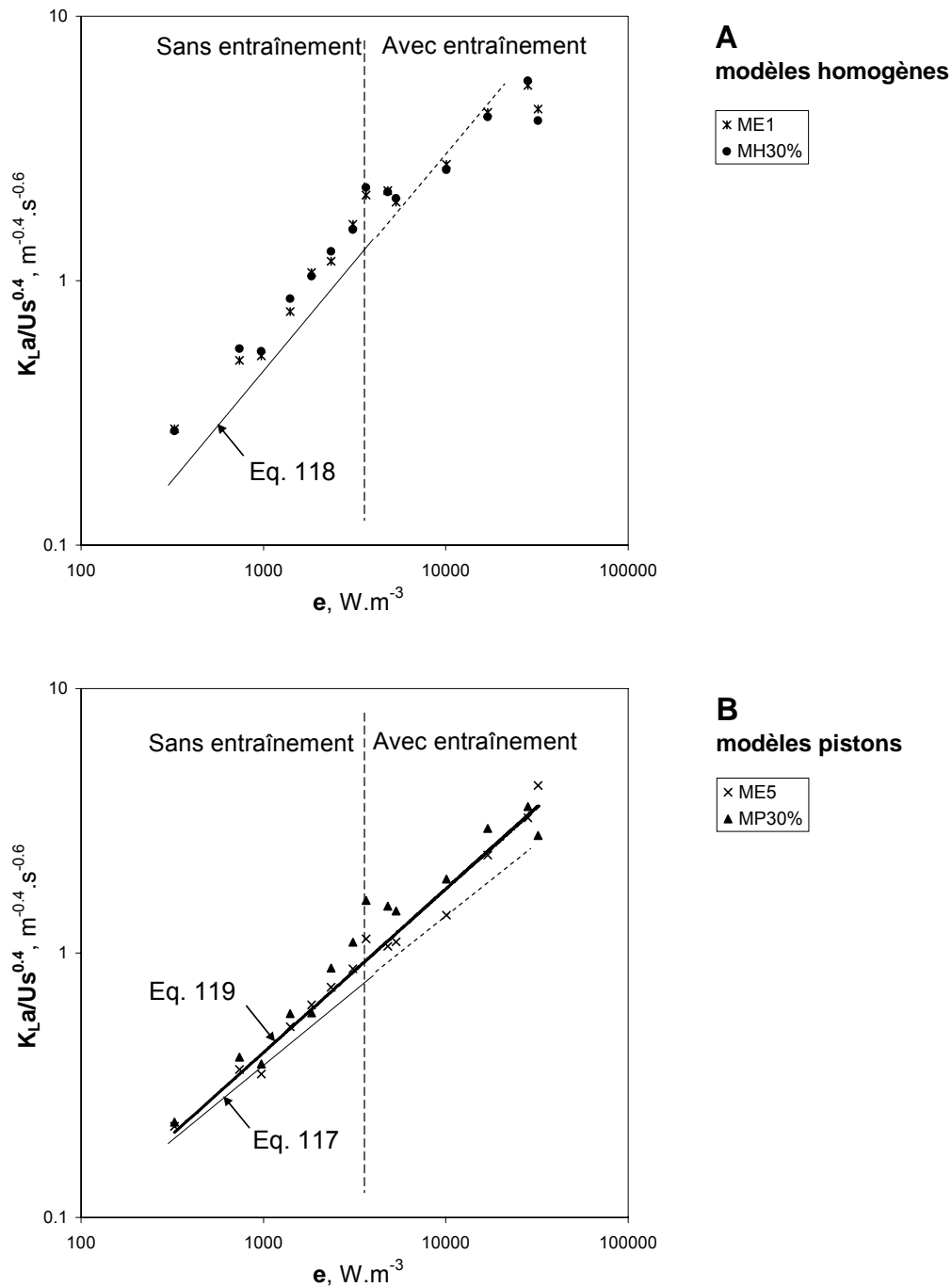


Figure 27. Comparaison des valeurs de K_{La} obtenues par les modèles d'entraînement de surface en milieu coalescent avec les valeurs obtenues sans entraînement de surface à faible puissance dissipée. **A** modèles de type homogène, **B** modèles de type piston.

Les valeurs de K_{La} obtenues par les modèles prenant en compte l'entraînement de surface (ME1 et ME5) et par la modélisation de la réponse initiale (MH30% et MP30%) suivent les corrélations établies à faible puissance dissipée (Eq. 117 et Eq. 118). Contrairement aux modélisations qui ne prennent pas en compte l'entraînement de surface, présentées Figure 24A, la décroissance des valeurs de K_{La} à forte puissance dissipée n'est plus observée.

Cependant, l'évolution en fonction de e des valeurs de $K_{La}/U_s^{0,4}$ calculées par les modèles de type homogène (Figure 27A) et le modèle MP30% (Figure 27B) présente une rupture vers $e=4000 \text{ W.m}^{-3}$. Par contre, les valeurs de $K_{La,d}$ identifiées par le modèle ME5 évoluent uniformément en fonction de e et peuvent être représentés par l'équation ($R^2=0,98$) :

$$K_{La,d}=0,0059e^{0,62}U_s^{0,4} \quad (119)$$

La littérature ne fait pas état d'une telle relation pour $K_{La,d}$, mais nous avons la conviction que cette équation établie sans entraînement de surface et à faible puissance dissipée, peut être utilisée pour le K_{La} du diffuseur, et continue d'être valable à forte puissance dissipée.

Les erreurs Er_{ME1} et Er_{ME5} sont présentées sur la Figure 28 en comparaison avec les erreurs des modèles ne considérant pas l'aération de surface. Pour $e>4000 \text{ W.m}^{-3}$, c'est-à-dire en présence d'entraînement de surface, les erreurs obtenues par les modèles ME sont au moins 10 fois inférieures à celles des modèles MH et MP, et inférieures ou similaires à celles des modèles basés sur la réponse initiale. Il apparaît que les erreurs obtenues par les modèles de types homogène, $Er_{MH30\%}$ et Er_{ME1} , sont plus petites que celles obtenues par les modèles de type piston, $Er_{MP30\%}$ et Er_{ME5} .

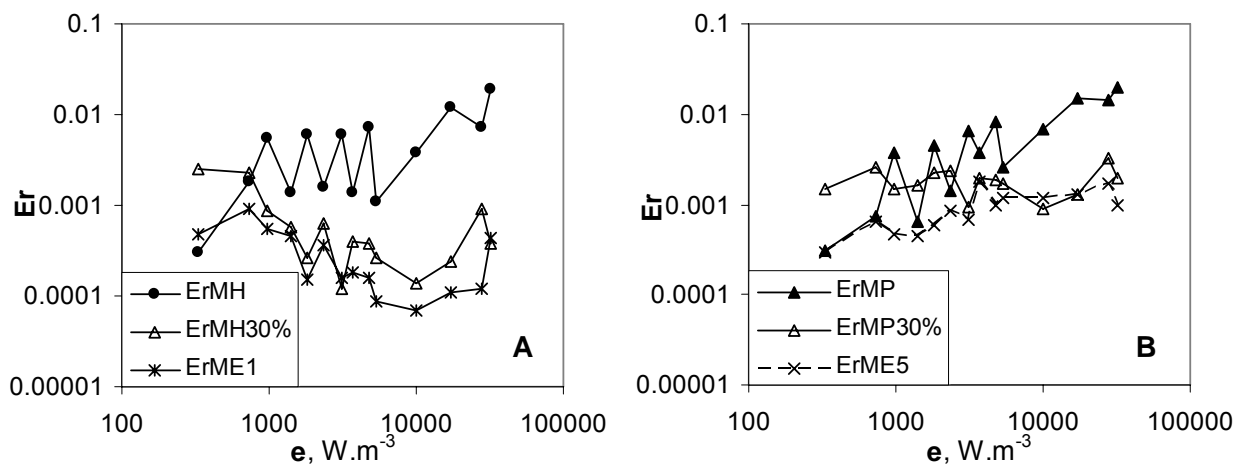


Figure 28. Comparaison des écarts relatifs entre les courbes de réoxygénation expérimentales et les courbes obtenues par les modèles de type homogène (A) et piston (B) en milieu coalescent.

La Figure 29 compare les paramètres d'aération de surface des modèles ME1 (Q_e/Q_d) et ME5 ($K_{La,e}/K_{La,d}$) aux résultats de Veljković et coll. (1991) (1 tRu ; $d_T=0,2 \text{ m}$). Les paramètres d'aération de surface sont présentés en fonction de e et U_s qui sont les paramètres les plus influents sur l'aération de surface. Pour les deux modèles on note une similitude de l'évolution du paramètre d'entraînement de surface : il augmente surtout à partir de la vitesse d'entraînement critique vers $e=4000 \text{ W.m}^{-3}$, et diminue avec le flux d'aération. Cette évolution est en accord avec la littérature (les différences peuvent être imputées aux

différences de configuration), ce qui valide l'estimation du paramètre Q_e calculé par le modèle ME1, et qui donne au paramètre K_{Lae} , introduit dans le modèle ME5, un sens cohérent avec le phénomène d'aération de surface.

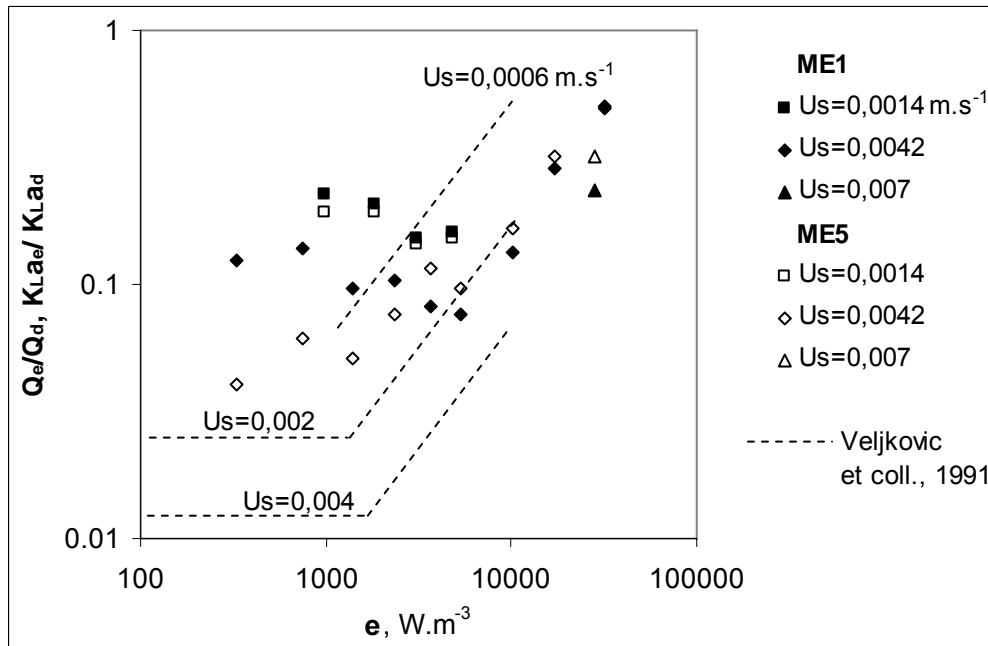


Figure 29. Comparaison des paramètres d'aération de surface en milieu coalescent avec les courbes de Veljković et coll. (1991), en fonction de la vitesse superficielle d'aération U_s ($m.s^{-1}$). $V_L=10 L$.

Il peut être remarqué que les valeurs de K_{La} obtenues par le modèle MP (Figure 24A) auraient été mieux corrélées par la relation :

$$K_{La}=0,0028e^{0,61}U_s^{0,68} \quad (120)$$

pour laquelle $R^2=0,99$, que par Eq. 117, pour laquelle $R^2=0,88$. Cependant, les valeurs de $K_{La}/U_s^{0,4}$ calculées par le modèle MP et qui étaient situées en dessous de Eq. 117 pour $e < 4000 W.m^{-3}$ sur la Figure 24A ont été mesurées à faible flux d'aération ($U_s=0,0014 m.s^{-1}$), alors que les valeurs situées au dessus de Eq. 117 ont été mesurées à fort flux d'aération ($U_s=0,0042 m.s^{-1}$). Les valeurs de $K_{La_d}/U_s^{0,4}$ calculées pour $e < 4000 W.m^{-3}$ par le modèle ME5 sont maintenant parfaitement corrélées par Eq. 119. On remarque alors que les réoxygénations réalisées à $U_s=0,0014 m.s^{-1}$, la valeur du paramètre d'aération de surface est plus élevée que pour les réoxygénations correspondant à $U_s=0,0042 m.s^{-1}$ (Figure 29). Les modèles d'entraînement de surface signalent donc la présence d'aération de surface par diffusion à travers la surface libre du liquide à faible puissance dissipée. Ce phénomène est souvent ignoré dans la littérature, en particulier parce que l'utilisation d'un modèle de

transfert simple couplé à une corrélation très flexible telle que Eq. 120, masque une non-idéalité, présenté Figure 24A, qui signale l'aération de surface.

Le choix du modèle d'entraînement de surface en condition d'aération simultanée par le diffuseur repose sur trois points : pour chaque réoxygénation l'écart entre la courbe expérimentale et la courbe du modèle est minimum ; l'ensemble des valeurs du K_{La} du diffuseur suit la relation Eq. 21 établie en l'absence d'entraînement de surface ; le paramètre d'entraînement de surface correspond aux relations décrites dans la littérature. Pour toutes ces raisons, le modèle ME5 est choisi dans la suite de l'étude en milieu coalescent.

b) Milieu non-coalescent

En milieu non-coalescent, les expériences de réoxygénation ayant servies à l'établissement de la Figure 24B sont ici réexploitées par les modèles prenant en compte l'entraînement de surface ; les valeurs de $K_{La}/U_s^{0.4}$ ainsi obtenues sont présentées sur la Figure 30 en fonction de e . Les équations obtenues pour $1000 < e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$ sur la Figure 18 par le modèle MP (courbe BG+OS_MP, Eq. 115) et par le modèle MH (courbe BG+OS_MH, Eq. 116) sont extrapolées pour $e < 900 \text{ W.m}^{-3}$ et $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$ sur la Figure 30 ; le domaine d'extrapolation est représenté en trait pointillé.

Par rapport à la Figure 24B, la déviation des valeurs de K_{La} par rapport à Eq. 21 à forte puissance dissipée est légèrement corrigée pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$, surtout pour le modèle piston, mais cette tendance existe encore largement pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$: les valeurs de K_{La} calculées sont jusqu'à plus de 10 fois plus petites que l'extrapolation à forte puissance dissipée de Eq. 115 et Eq. 116.

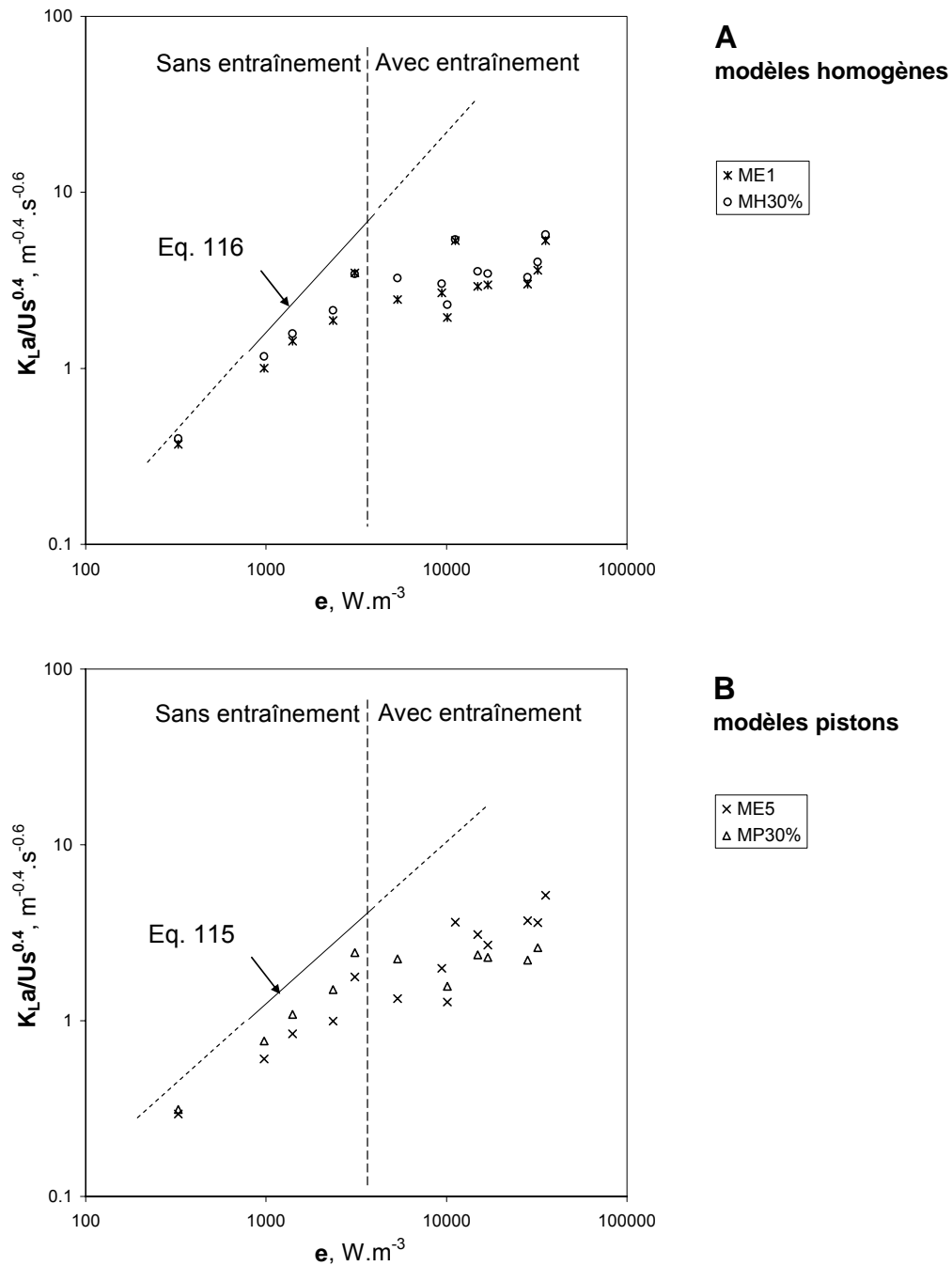


Figure 30. Comparaison des valeurs de $K_L a$ obtenues par les modèles d'entraînement de surface en milieu non-coalescent avec les valeurs obtenues sans entraînement de surface à faible puissance dissipée. **A** modèles de type homogène, **B** modèles de type piston.

ErME1 et ErME5 (Figure 31) sont globalement plus élevées que les erreurs mesurées en milieu coalescent. Bien que les erreurs des modèles de type homogène (Figure 31A) soient globalement très faibles, ces modèles ne sont pas représentatifs du phénomène d'entraînement de surface en présence d'aération par le diffuseur car l'évolution de $K_L a$ en fonction de e est en désaccord avec la littérature (Eq. 21). Contrairement au milieu coalescent, les paramètres

d'entraînement de surface (Figure 32) ont tendance à diminuer à partir de $e=10000 \text{ W.m}^{-3}$: cette diminution est envisageable à forte puissance dissipée à cause de l'augmentation de la hauteur de phase dispersée plus de 15 cm au dessus de la turbine, ce qui limite l'entraînement de surface.

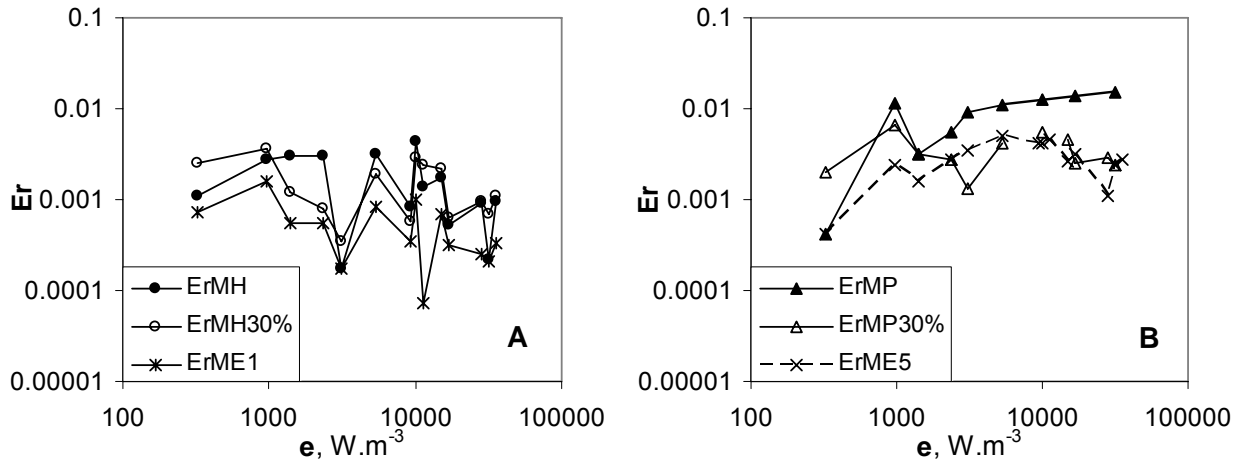


Figure 31. Comparaison des écarts relatifs entre les courbes de réoxygénation expérimentales et les courbes obtenues par les modèles de type homogène (A) et piston (B) en milieu non-coalescent.

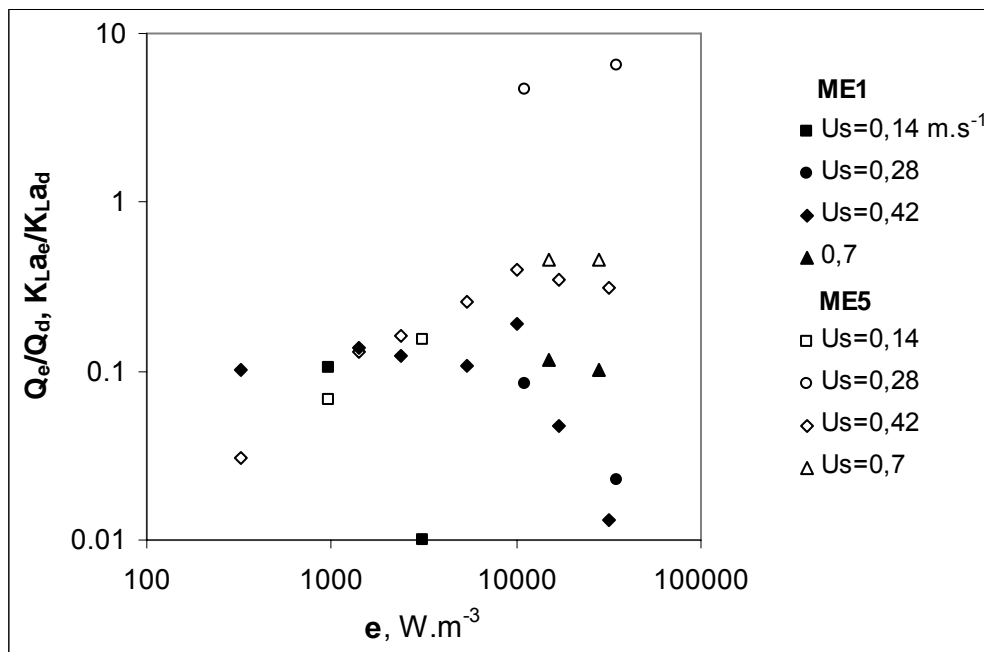


Figure 32. Paramètres d'aération de surface en milieu non-coalescent en fonction de la vitesse superficielle d'aération U_s (cm.s^{-1}). $V_L=10 \text{ L}$.

c) Modification de l'entraînement de surface par l'ajout d'une troisième turbine

Sur la Figure 33 les paramètres K_{La} et Q_e/Q_d calculés par le modèle ME1 sont comparés pour deux et trois turbines Rushton, en milieu non-coalescent (Na_2SO_4 50 g.L^{-1} , $V_L=10$ L). Il a été vu que le modèle ME1 ne donne pas satisfaction en milieu non-coalescent, cependant l'étude de la Figure 33 permet de pointer une tendance générale : l'ajout d'une troisième turbine favorise toujours l'aération de surface, même si la turbine supérieure ne plonge pas dans le liquide, comme c'est le cas pour $e \leq 10000 \text{ W.m}^{-3}$. Sur la Figure 33 le rapport Q_e/Q_d augmente avec le nombre de turbines même en l'absence d'entraînement de surface ; les courbes de réoxygénation (non-montré) atteignent toujours la saturation plus rapidement en présence de deux turbines qu'en présence de trois turbines. D'autre part, alors que le rapport Q_e/Q_d décroît avec e en présence de deux turbines, il croît avec e en présence de trois turbines. Il est possible qu'en présence de deux turbines l'entraînement de surface diminue à forte puissance dissipée à cause du très fort volume de gaz dispersé : pour la plus forte valeur de puissance dissipée sur la Figure 33, avec un volume de gaz dispersé de 4 L, la surface libre se trouve à 19 cm au dessus de la turbine, l'effet de pompage du ciel par la turbine est donc considérablement réduit. Avec trois turbines, le volume de gaz dispersé est plus élevé (6 L), mais la distance entre la turbine et la surface libre est réduite (9 cm), et donc l'effet de pompage du ciel est plus fort.

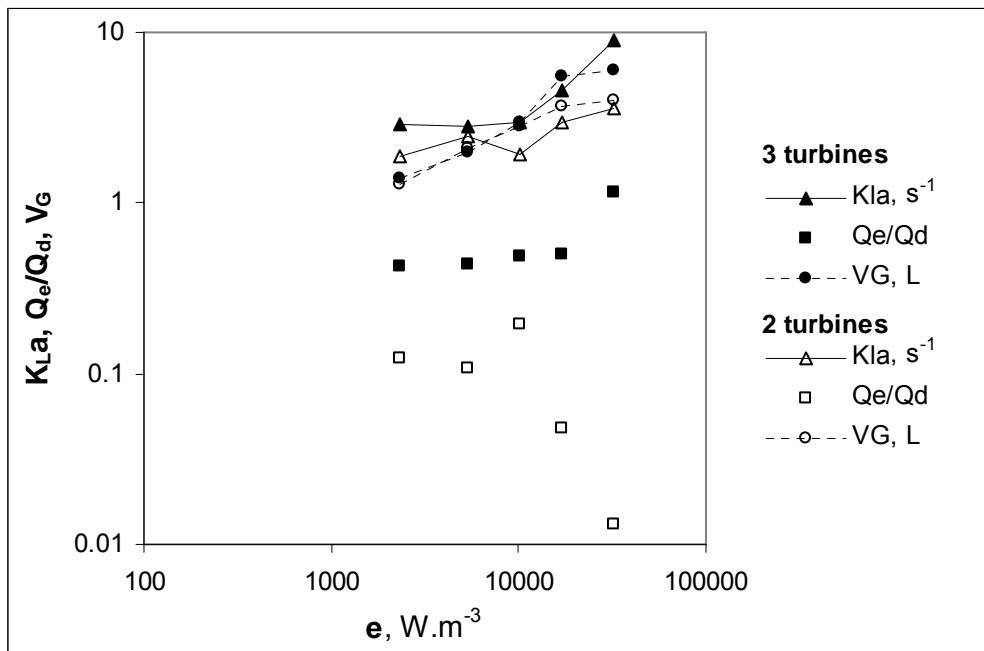


Figure 33. Modification du transfert par l'ajout d'une troisième turbine. Détermination par le modèle ME1. Na_2SO_4 50 g.L^{-1} , $V_L=10$ L, $U_s=0,42 \text{ cm.s}^{-1}$.

d) Prise en compte de la rétention gazeuse permanente

Il est supposé à ce niveau que le décalage entre les valeurs de $K_L a$ obtenues en milieu non-coalescent par le modèle MP et la courbe décrite par Eq. 115 est dû d'une part à la présence d'entraînement de surface –ce transfert à été pris en compte en modifiant le modèle MP pour le modèle ME5– et d'autre part à la présence d'une rétention gazeuse permanente formée de microbulles.

Les modèles MP+mb et ME5+mb découlent respectivement des modèles MP et ME5, et prennent en compte la présence de microbulles pour la détermination de $K_L a$. A l'opposé, les valeurs de $K_L a$ obtenues par la méthode BG+OS sont indépendantes de la présence de microbulles, car c'est une méthode statique (I.2.1.3). Les valeurs de $K_L a$ obtenues par l'ensemble des modèles sont comparées sur la Figure 34. Comme sur la Figure 30, la courbe décrite par Eq. 115 est extrapolée sur l'ensemble des valeurs de e .

Le modèle MP+mb donne des valeurs de $K_L a$ (déterminées par une méthode dynamique) proches de celles corrélées par Eq. 115 (modèle MP, méthode BG+OS). Cette similitude entre les deux situations est attendue : la prise en compte de la rétention gazeuse permanente corrige la méthode dynamique pour retrouver les résultats obtenus par la méthode statique (Vasconcelos et Alves, 1991).

Par contre, le modèle d'entraînement ME5+mb donne les mêmes valeurs de $K_L a$ que le modèle MP+mb en estimant $K_L a_e$ au minimum de son intervalle de définition, ce qui simplifie le modèle ME5+mb en le modèle MP+mb. Contrairement aux erreurs obtenues sans tenir compte des microbulles (Figure 31B), les erreurs Er_{MP+mb} et Er_{ME5+mb} sont très faibles, toujours inférieures à 10^{-3} .

La courbe décrite par Eq. 115 n'est pas atteignable par le modèle ME5+mb. Il a été démontré par ailleurs que si la méthode BG+OS ne permet pas non plus d'atteindre les valeurs corrélées par Eq. 115 pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$, ce n'est pas faute d'ignorer l'entraînement de surface, car dans ce cas l'entraînement de surface augmente les valeurs déjà affichées. Il semble donc que le profil gazeux en milieu non-coalescent soit très complexe et qu'une modélisation plus fine soit nécessaire. Les mêmes conclusions sont obtenues en étudiant les modèles de type homogène (MH+mb, ME1+mb, comparés avec la courbe BG+OS_MH).

Par analogie avec le milieu coalescent, Eq. 115 établie en supposant un écoulement piston du gaz est extrapolée sur l'ensemble des puissances dissipées utilisées pour décrire l'évolution de $K_L a$ en milieu non-coalescent.

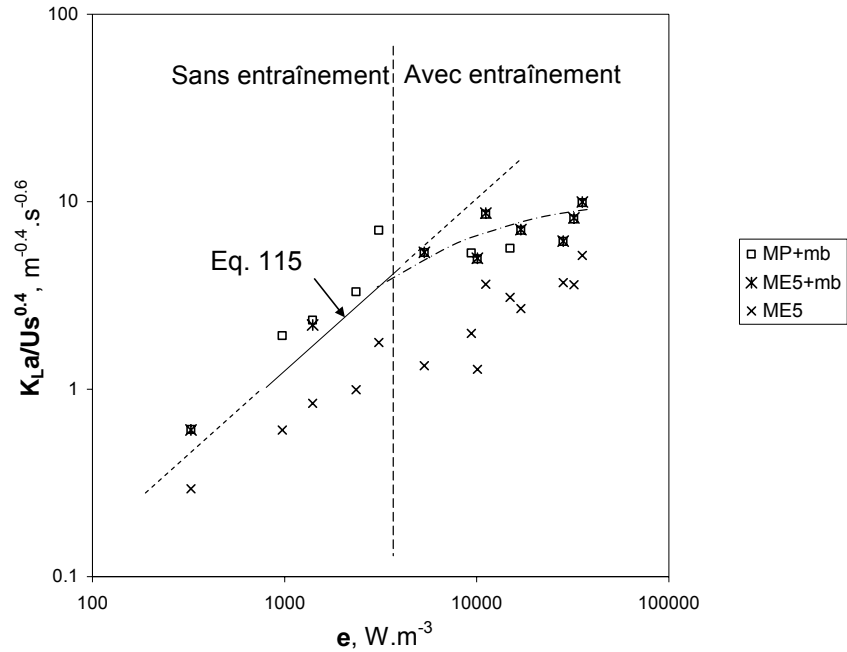


Figure 34. Correction du modèle MP par la prise en compte des microbulles.
 — · — tendance décrite par le modèle BG+OS_MP pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$.

III.2.5. Synthèse et conclusions

Les travaux préliminaires, nécessaires à l'étude du transfert d'oxygène dans le réacteur, ont permis d'établir :

➤ La puissance dissipée dans le liquide aéré, agité par deux ou trois turbines Rushton, peut être calculée par la relation de Hughmark (1980) en prenant pour nombre de puissance total pour les trois turbines $N_p=10$.

➤ L'étude des fortes puissances dissipées révèle l'existence :

- d'une vitesse critique d'entraînement de surface (Veljković et coll., 1991) : $N_E=700$ rpm, soit $e=3650 \text{ W.m}^{-3}$ (pour $V_L=10 \text{ L}$).
- une hauteur de liquide au dessus de la turbine la plus haute à partir de laquelle l'entraînement de surface devient inexistant dans les conditions d'agitation considérées : 19 cm pour une solution Na_2SO_4 50 g.L⁻¹.

➤ Dans les milieux de référence, la rétention gazeuse ε augmente avec la force ionique de la solution, et s'exprime en fonction de la puissance dissipée, par analogie avec la modélisation de $K_L a$ (Linek et coll., 1987), selon une relation du type :

$$\varepsilon = \chi e^\alpha U_s^{0.4}$$

où χ et α dépendent de la force ionique du milieu.

La quantification du coefficient de transfert K_{La} en milieux minéraux de références a été entreprise en milieux coalescent et non-coalescent sur la gamme de puissance dissipée $e \in [300 ; 35000 \text{ W.m}^{-3}]$. Les résultats sont comparés à Eq. 21 : $K_{La} = \chi e^\alpha U_s^\beta$ (Linek et coll., 1987). Au regard des expériences réalisées, il apparaît que :

➤ La méthode statique BG+OS ne permet la quantification de K_{La} que sur les milieux non-coalescents : les valeurs obtenues sont cohérentes avec Eq. 21 pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$, mais pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$ les valeurs obtenues décroissent avec e .

➤ La méthode dynamique de réoxygénation est testée avec les modèles MH et MP : les valeurs de K_{La} obtenues sont cohérentes avec Eq. 21 en milieu coalescent uniquement, pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$; pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$ les valeurs obtenues décroissent avec e .

➤ Parmi les 5 modèles prenant en compte l'entraînement de surface, seul le modèle ME5 est capable d'estimer correctement K_{La} sur toute la gamme de puissance dissipée, mais seulement en milieu coalescent. En milieu non-coalescent l'écart entre les valeurs obtenues et Eq. 21 pourrait s'expliquer par la présence de microbulles qui n'est pas prise en compte par le modèle. La présence des microbulles a été modélisée mais l'identification paramétrique échoue à cause de la difficulté d'obtention des données expérimentales, comme le volume total occupé par les microbulles.

En conclusion, les méthodes qui estiment des valeurs de K_{La} en accord avec la littérature (Eq. 21) sont rappelées dans le Tableau 14, selon la coalescence ou non du milieu, et le niveau de puissance dissipée.

Dans la littérature le domaine $e \in [4000 ; 35000 \text{ W.m}^{-3}]$ étant peu exploré, il a été possible de comparer nos résultats avec ceux de Linek et coll. (1987) en supposant qu'ils étaient extrapolables sur le domaine $e \in [3000 ; 35000 \text{ W.m}^{-3}]$. Il ressort que les modèles utilisant l'écoulement piston du gaz sont plus proches des travaux de Linek et coll. (1987) que ceux considérant la phase gazeuse homogène. Dans la suite de l'étude les modèles suivants seront donc utilisés pour décrire K_{La} :

– pour le milieu coalescent, Eq. 119 : $K_{La,d} = 0,0059 e^{0,62} U_s^{0,4}$ (régression des valeurs obtenues par le modèle ME5).

– pour le milieu non-coalescent, Eq. 115 : $K_{La} = 0,0022 e^{0,92} U_s^{0,4}$ (régression des valeurs obtenues par le modèle MP avec la méthode BG+OS), extrapolée pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$.

Tableau 14. Récapitulatif des modèles et méthodes expérimentales qui estiment des valeurs de $K_L a$ en accord avec Eq. 21. + / - : estimation respectivement en accord ou en désaccord avec Eq. 21. Si nécessaire une distinction est faite entre les faibles puissances dissipées ($e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$) dans la partie gauche de la case et les fortes puissances dissipées ($e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$) dans la partie droite de la case. Les méthodes expérimentales sont (R) la réoxygénation et (BG+OS) le bilan gazeux avec oxydation par le sulfite.

	MH	MP	ME5
Milieu coalescent (R)	+ -	+ -	+
Milieu non-coalescent (R et BG+OS)	+ (BG+OS) -	+ (BG+OS) -	+ (R) -

La difficulté à estimer correctement $K_L a$ souligne que le modèle de l'écoulement gazeux en réacteur multiturbine est très complexe, et d'autant plus complexe que le milieu est non-coalescent et que la puissance dissipée est forte. En milieu coalescent le modèle ME5 est adopté car il représente suffisamment bien la situation pratique ; un modèle plus satisfaisant mécaniquement et qui s'approcherait plus de la réalité hydrodynamique, introduirait un nombre de paramètres élevés auxquels il serait difficile dans nos conditions expérimentales minimales d'assigner une valeur.

III.3. Quantification du transfert en réacteur en condition de culture microbienne

Dans ce chapitre, le transfert d'oxygène est étudié en présence de réaction biologique. L'analyse s'appuie sur la comparaison avec les résultats obtenus dans le chapitre précédent sur milieux minéraux afin de dégager l'impact des cellules –considérées en tant que phase solide réactive– sur le transfert. Les propriétés physico-chimiques du milieu (viscosité, composition...) et leurs évolutions tiennent un rôle clé dans cette analyse. De ces propriétés dépendent les phénomènes de coalescence, les diamètres de bulles, et la composition des interfaces. Parallèlement à ces phénomènes physiques, l'activité biologique des cellules (consommation d'oxygène, excrétion de molécules...) interfère aussi avec le transfert d'oxygène.

S. cerevisiae et *E. coli* sont utilisés comme microorganismes modèles. Des cultures d'*A. niger* sont proposées en complément afin d'intégrer les modifications rhéologiques du moût sur le transfert d'oxygène. Notre investigation se base sur 6 cultures d'*E. coli* (réalisées par J.-L. Uribelarrea), 3 cultures de *S. cerevisiae* (réalisées par par L. Faure), et 3 cultures d'*A. niger* (réalisées à DSM-Delft).

Les coefficients de transfert d'oxygène calculés en ligne, K_T , sont interprétés par rapport à la dynamique microbienne et l'évolution des propriétés des milieux biologiques en vue de proposer une modélisation de K_T .

III.3.1. Cultures de microorganismes en condition de forte productivité

Pour mettre en avant l'influence de la réaction biologique sur le transfert d'oxygène, les résultats de trois cultures en mode fed-batch, représentatives de cultures "non visqueuses" à fort flux de transfert d'oxygène, sont ici détaillées : deux cultures d'*E. coli*, désignées A et B, présentées Figure 35 et Figure 36, respectivement, et une culture de *S. cerevisiae*, désignée *S. cerevisiae* G, présentée Figure 37.

III.3.1.1. Cinétiques microbiennes

Les hautes densités cellulaires sont obtenues dans une stratégie en plusieurs étapes. Dans la première étape, nommée phase 1, le taux de croissance est élevé, ceci jusqu'à ce que la concentration cellulaire X atteigne 30 ou 40 $g_{MS}.L^{-1}$. A ce moment, la capacité de transfert du bioréacteur devient limitante car les paramètres de contrôle du transfert, la vitesse d'agitation et le flux d'aération, sont à leur niveau maximum alors que l'oxygène dissous dO_2

atteint la concentration critique en dessous de laquelle l'oxygène est limitant pour la croissance. Dans la seconde étape, nommée phase 2, ou bien une limitation en substrat (*E. coli* A, *S. cerevisiae* E) ou bien une baisse de température (*E. coli* B) est utilisée pour ralentir le métabolisme et donc réduire la consommation volumique d'oxygène q_{O_2} , ce qui permet de retrouver une concentration en oxygène supérieure à la concentration critique, et finalement de poursuivre la croissance cellulaire jusqu'aux hautes concentrations, mais à un taux de croissance réduit par rapport à la phase 1.

Les valeurs maximales des concentrations cellulaires X , des consommations volumiques d'oxygène q_{O_2} , et des coefficients de transfert d'oxygène K_T obtenues dans nos cultures sont indiquées dans le Tableau 15. En comparaison des travaux de la littérature sur le transfert d'oxygène en condition de culture cellulaire (Tableau 4), les valeurs obtenues ici sont 5 à 10 fois supérieures. Seuls Castan et coll. (2002) considèrent le transfert d'oxygène dans des conditions proches des nôtres –mais sans que ce soit l'objet de leur étude– c'est-à-dire pour une concentration maximum en biomasse de $80 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$ et une consommation volumique d'oxygène maximum de $0,35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (estimée à partir des travaux des auteurs en prenant pour taux de conversion de l'oxygène en biomasse $1 \text{ g O}_2/\text{g}_{MS}$ et en négligeant l'énergie de maintenance). Notre étude de transfert s'inscrit donc en conditions de haute concentration cellulaire et de fort flux de transfert. De plus, les travaux présentés sont menés dans la dynamique des cultures fed-batch alors que la littérature préfère les systèmes continus et détachés de toute condition de culture.

Tableau 15. Résultats expérimentaux : valeurs maximales de X , q_{O_2} et K_T . Cultures réalisées en mode fed-batch.

Culture	X , $\text{g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$	q_{O_2} , $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	K_T , s^{-1}
<i>E. coli</i> A	52	0,38	0,70
<i>E. coli</i> B	64	0,60	1,18
<i>E. coli</i> C	32	0,30	0,66
<i>E. coli</i> D	81	0,5	0,85
<i>E. coli</i> E	78	0,42	0,81
<i>E. coli</i> F	69	0,45	0,87
<i>S. cerevisiae</i> G	55	0,35	0,75
<i>S. cerevisiae</i> H	75	0,16	0,47
<i>S. cerevisiae</i> I	50	0,18	0,38
<i>A. niger</i> J	40	0,06	0,22

La phase 1 de la culture *E. coli* A (Figure 35a) dure 7 heures pendant lesquelles la biomasse croît avec un taux de croissance μ compris entre $0,5$ et $0,65 \text{ h}^{-1}$ de $0,7$ à $34 \text{ g}_{MS} \cdot \text{L}^{-1}$. La consommation volumique d'oxygène q_{O_2} atteint alors $0,38 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ et l'oxygène dissous

dO_2 est proche de la concentration critique de 5% (Figure 35d). La phase 2 est initiée à $t=7$ h en réduisant l'alimentation en substrat. L'alimentation en substrat est ensuite limitée et augmentée de façon exponentielle (Figure 35b); le taux de croissance vaut alors $0,25 \text{ h}^{-1}$. Pendant toute la culture le quotient respiratoire QR vaut $1,05 \pm 0,03$.

La culture *E. coli* B (Figure 36) est similaire à la culture *E. coli* A, mais la phase 1 s'étend sur 8 h au cours desquelles la biomasse croît de 2,4 à $58 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ et q_{O_2} atteint $0,60 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La phase 2 est provoquée par une baisse de température de 37°C à 27°C : le taux de croissance est alors compris entre 0,15 et $0,25 \text{ h}^{-1}$.

La masse d'éthanol dans le milieu (Figure 36d) est utilisée comme indicateur biologique de la limitation en oxygène (Vollbrecht, 1982). La concentration en acide acétique a également été mesurée (sa production atteint 15 g en fin d'expérience) mais sa reconsommation privilégiée en condition de limitation par le substrat interfère avec son emploi comme indicateur. Entre $t=7,5$ et $t=8$ h, dO_2 atteint 5%, et parallèlement la masse d'éthanol dans le réacteur passe de la limite de détectabilité (correspondant à 1,5 g) à 2,5 g. La faible quantité de co-métabolites traduit l'orientation majoritaire du flux de carbone vers la biomasse. Cette production est relativement basse (Neidhardt et coll., 1990) et atteste de la maîtrise de l'aération pour maintenir globalement une production non-limitée en oxygène. En particulier les cultures d'*E. coli* sont conduites à des concentrations en oxygène dissous inférieures à 20% sans réduction apparente ni du taux de croissance, ni de la productivité volumique de biomasse q_X , alors que certains auteurs (Konstantinov et coll. (1990), Castan et coll. (2002)) observent des limitations en oxygène pour des valeurs de dO_2 inférieures à 20% (à une pression de travail de 1 atm).

Remarque. La sonde à oxygène étant située en bas du réacteur, on peut supposer que la concentration en oxygène dissous dans la phase dispersée située dans le haut du réacteur est inférieure à celle mesurée par la sonde, le gaz s'appauvrissant en oxygène lors de son déplacement le long de l'axe du réacteur. Il semble cependant que ce gradient axial soit faible, car même lorsque dO_2 atteint 5% (à $t=5,8$ h et $t=8$ h) (Figure 36d) la production d'éthanol reste nulle ou faible.

Le taux de croissance de la culture *S. cerevisiae* G (Figure 37), compris entre 0,2 et $0,25 \text{ h}^{-1}$ durant la phase 1, est inférieur à celui des cultures d'*E. coli*. Durant cette phase qui se termine à $t=14,5$ h, la concentration en biomasse augmente de 2 à $46 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$ et q_{O_2} atteint $0,35 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. La phase 2 est initiée par une limitation en substrat. Pendant toute la culture, QR est égal à $1,08 \pm 0,03$.

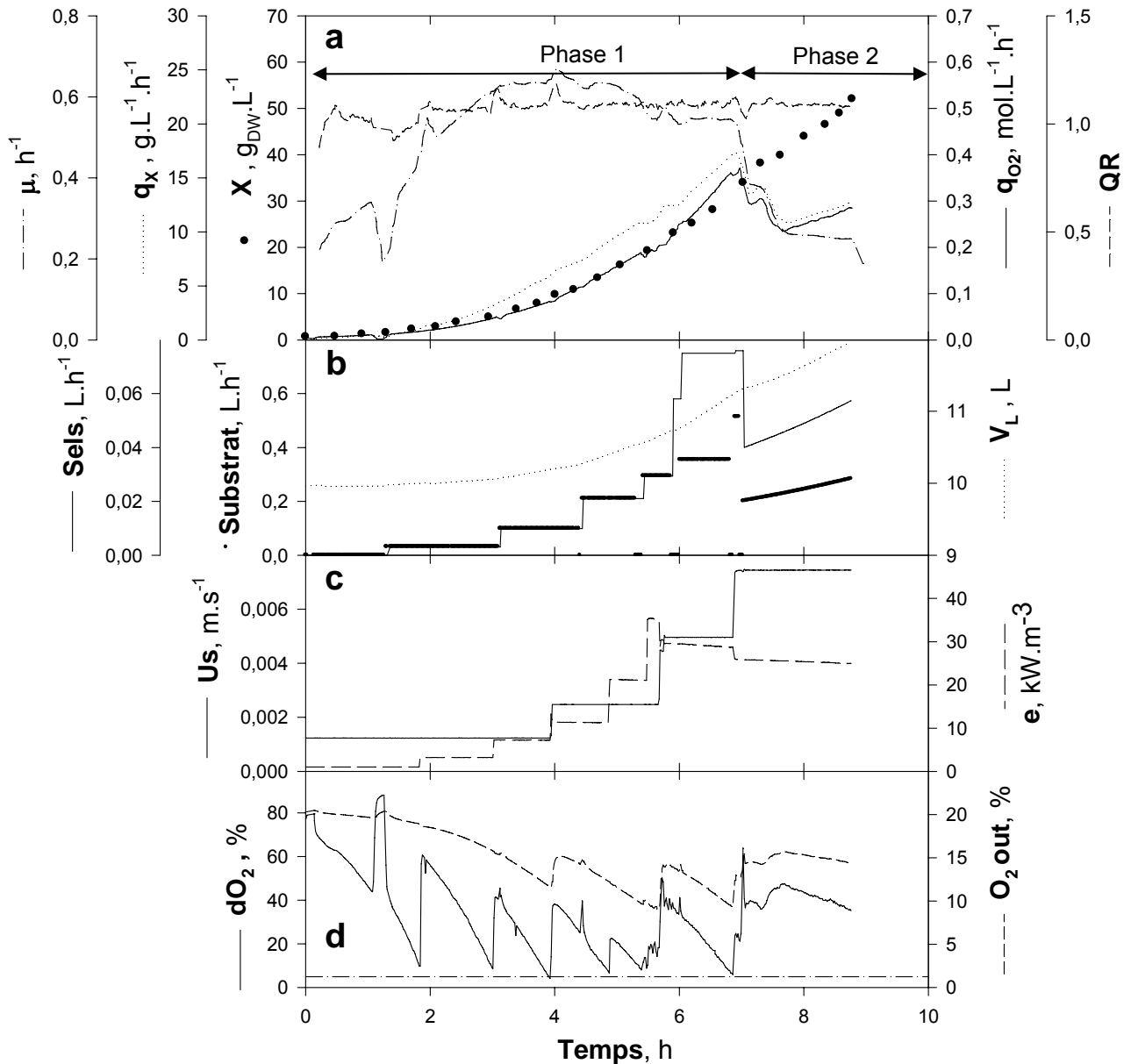


Figure 35 : Culture fed-batch de *E. coli* (culture A).

a) Croissance cellulaire : taux de croissance μ ; productivité volumique de biomasse q_x ; concentration en biomasse X (gramme de cellules sèches par litre de suspension) ; consommation volumique d'oxygène q_{O_2} ; quotient respiratoire QR .

b) Alimentation : débits en solution de sels et en solution de substrat (glucose) ; volume total de la suspension V_L .

c) Paramètres d'aération : vitesse superficielle de l'air U_s ; puissance dissipée e . $T=37^\circ\text{C}$; $P=0,5$ bar.

d) Transfert d'oxygène : oxygène dissous (exprimé comme pourcentage de la saturation) dO_2 ; pourcentage d'oxygène dans le flux gazeux en sortie de réacteur O_2 out. La ligne mixte représente la concentration critique en oxygène (5%).

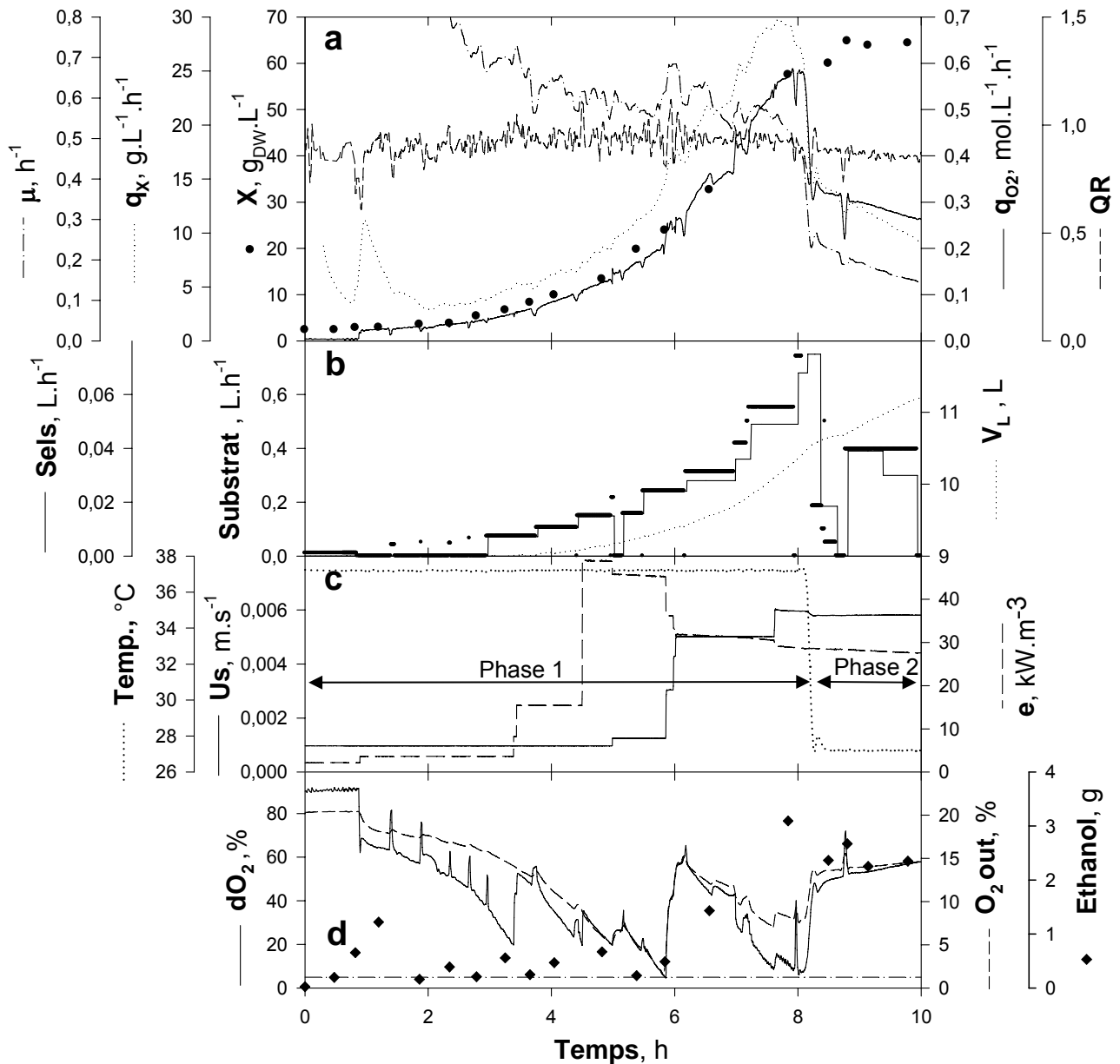


Figure 36 : Culture fed-batch de *E. coli* (culture B).

a) Croissance cellulaire : taux de croissance μ ; productivité volumique de biomasse q_x ; concentration en biomasse X (gramme de cellules sèches par litre de suspension) ; consommation volumique d'oxygène q_{O_2} ; quotient respiratoire QR .

b) Alimentation : débits en solution de sels et en solution de substrat (glucose) ; volume total de la suspension V_L .

c) Paramètres d'aération : température $Temp.$; vitesse superficielle de l'air U_s ; puissance dissipée e . $P=0,5$ bar.

d) Transfert d'oxygène : oxygène dissous (exprimé comme pourcentage de la saturation) dO_2 ; pourcentage d'oxygène dans le flux gazeux en sortie de réacteur O_2 out (la ligne mixte représente la concentration critique en oxygène, 5%) ; masse totale d'éthanol en solution.

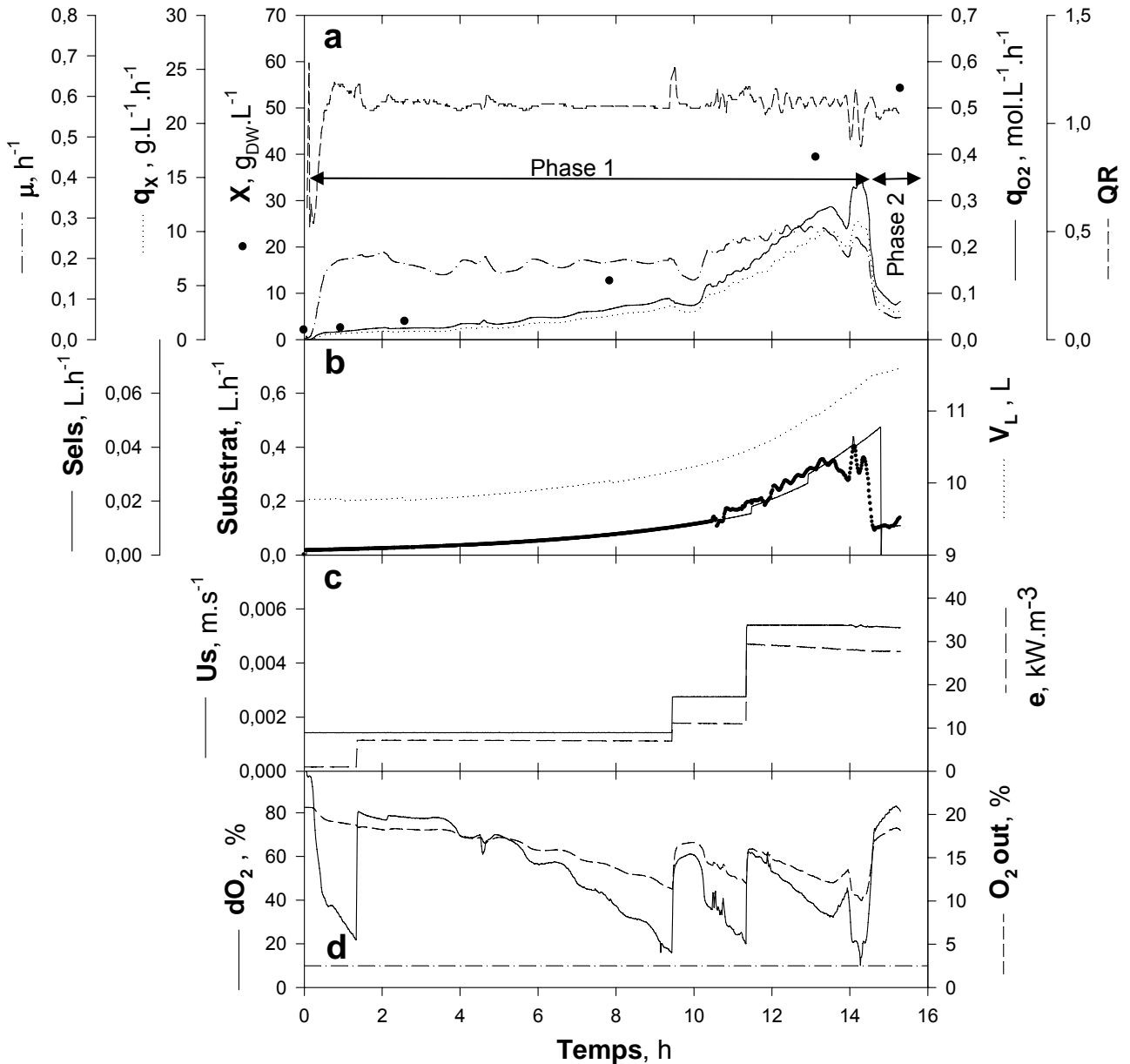


Figure 37 : Culture fed-batch de *S. cerevisiae* G.

a) Croissance cellulaire : taux de croissance μ ; productivité volumique de biomasse q_x ; concentration en biomasse X (gramme de cellules sèches par litre de suspension) ; consommation volumique d'oxygène q_{O_2} ; quotient respiratoire QR.

b) Alimentation : débits en solution de sels et en solution de substrat (glucose) ; volume total de la

c) Paramètres d'aération : vitesse superficielle de l'air U_s ; puissance dissipée e . $T=30^\circ\text{C}$; $P=0,3$ bar.

d) Transfert d'oxygène : oxygène dissous (exprimé comme pourcentage de la saturation) dO_2 ; pourcentage d'oxygène dans le flux gazeux en sortie de réacteur O_2 out. La ligne mixte représente la concentration critique en oxygène (10%).

III.3.1.2. Comportement rhéologique des milieux microbiens

L'étude du comportement rhéologique des milieux microbiens est réalisée pour deux raisons. D'abord parce que la viscosité du milieu doit être prise en compte pour la compréhension des mécanismes de transfert. Aussi parce que les cultures qui sont comparées ici ont chacune été réalisées à leur température optimale de croissance ; les valeurs des coefficients de transfert d'oxygène, K_T , ont donc été calculées en ligne à des températures différentes ; afin de pouvoir comparer ces valeurs entre elles, elles sont rapportées à la température de référence de 37°C en utilisant la relation de O'Connor (Aiba et coll., 1973) (Eq. 47), basée sur la thermodépendance de la viscosité du moût.

III.3.1.2.1. Influence de la concentration en biomasse

Les comportements rhéologiques du moût de culture et du surnageant associé sont simultanément déterminés afin de dégager l'influence de la présence physique des cellules sur le comportement rhéologique du moût.

Les rhéogrammes d'un moût de culture d'*E. coli* à 60 g_{MS}.L⁻¹ et du surnageant associé montrent que la contrainte de cisaillement est proportionnelle au gradient de vitesse et donc que les comportements des milieux suivent la loi de Newton. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus lors de cultures de *S. cerevisiae* dans la même gamme de concentration en biomasse (Aldiguier, 2006).

La viscosité du moût est notée μ_X ; la viscosité du surnageant est notée μ_0 . Sur la Figure 38, les viscosités apparentes des cultures d'*E. coli* (mesures réalisées à 37°C durant la culture *E. Coli* F) et de *S. cerevisiae* (mesures réalisées à 30°C durant la culture *S. cerevisiae* H,) sont rapportées en fonction de la concentration cellulaire. Il apparaît, conformément à Aldiguier (2006), que les moûts suivent la loi d'Einstein (Eq. 43) : $\mu_X = 0,014X + 0,72 \pm 0,15$ (avec X en g_{MS}.L⁻¹ et μ_X en cp). Les viscosités des surnageants associés sont constantes et identiques pour les deux cultures : $\mu_0 = 0,75 \pm 0,02$ cp, valeur légèrement supérieure à la viscosité de l'eau à 30°C. On remarque que la viscosité de la suspension de *S. cerevisiae* obtenue à partir de cellules lyophilisées resuspendues dans l'eau est légèrement inférieure à celle mesurée en condition de culture, à même concentration en biomasse.

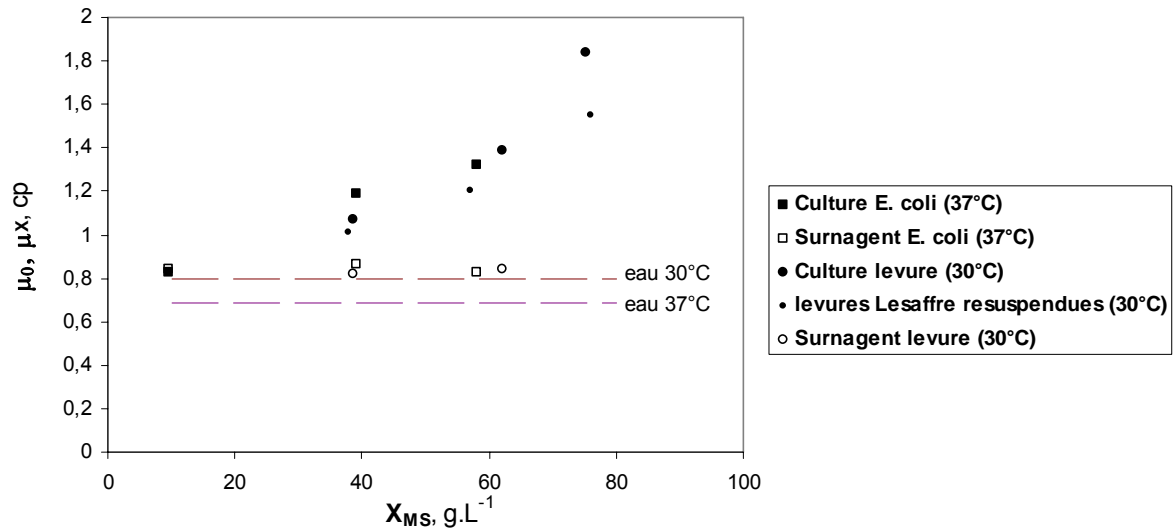


Figure 38. Evolution de la viscosité des moûts de culture et des surnageants associés en fonction de la concentration cellulaire.

III.3.1.2.2. Influence de la température

La thermodépendance de la viscosité est étudiée sur une suspension de levures *S. cerevisiae* (levures sèches actives, Saf-Levure, Lesaffre, dont la masse sèche est évaluée à 95% de la masse totale (Loiez, 2003)) resuspendues dans l'eau. Il apparaît que la loi d'Arrhenius est applicable dans le domaine d'étude (Figure 39) :

$$\mu_x(T, X) = \Psi(X) e^{\frac{-E^\ddagger(X)}{RT}}$$

où Ψ est une constante dépendante de X , et les valeurs de l'énergie d'activation E^\ddagger sont indiquées sur la Figure 39 pour trois valeurs de la concentration en biomasse, en comparaison avec l'eau.

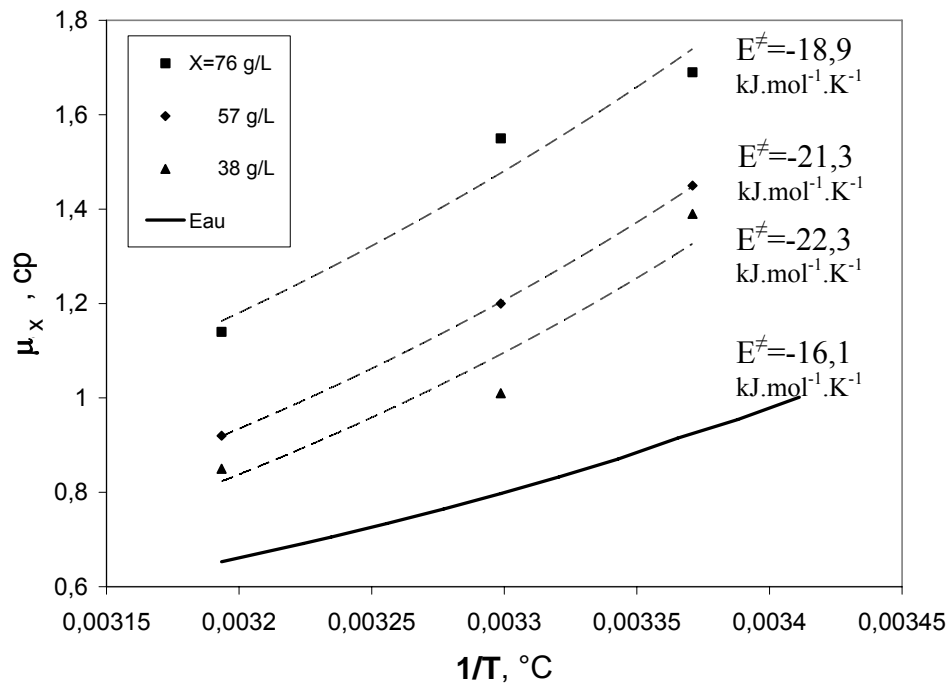


Figure 39. Viscosité d'une suspension de *S. cerevisiae* en fonction de la température et de la concentration en biomasse.

Les valeurs de K_T sont comparées à la température de 37°C. Les valeurs de K_T mesurées en culture de *S. cerevisiae* (30°C) sont rapportées à 37°C par la relation de O'Connor (Aiba et coll., 1973) (Eq. 47) en utilisant $E^\# = 22,3 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ sur toute la durée des cultures. L'erreur commise sur l'évaluation du coefficient de O'Connor ϕ en négligeant la croissance de la biomasse (μ_{app} compris entre la valeur de l'eau et une concentration de 80 $\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$) est inférieure à 2%. Au cours de la culture *E. coli* B la température est réduite de 10°C ; la valeur de K_T est rapportée à 37°C en utilisant le même coefficient que pour la levure : la rhéologie des deux cultures étant voisine, il est supposé que l'erreur commise sur ϕ en culture d'*E. coli* est également inférieure à 2%.

III.3.2. Coefficient de transfert d'oxygène et dynamique microbienne

III.3.2.1. Résultats

L'évolution des coefficients de transfert d'oxygène en fonction du temps est présentée sur la Figure 40 pour les cultures *E. coli* A, *E. coli* B et *S. cerevisiae* A. Des valeurs de K_T élevées de $0,7 \text{ s}^{-1}$ pour *E. coli* A et *S. cerevisiae* A, et $1,2 \text{ s}^{-1}$ pour *E. coli* B sont atteintes. Ces valeurs sont très élevées par rapport à celles mentionnées dans la littérature (Tableau 4). Seuls Linek et coll. (1989, 2004, 2005) mesurent des valeurs de K_L proches de 1 s^{-1} mais toujours en milieu salin (Na_2SO_4) et en l'absence de microorganisme ; Castan et coll. (2002)

obtiennent des valeurs de K_{La} de $0,28 \text{ s}^{-1}$ mais sans exploiter leurs résultats en termes de transfert d'oxygène. Les études de transfert d'oxygène en condition de culture cellulaire sont en général caractérisées par des valeurs de K_{La} inférieures à $0,1 \text{ s}^{-1}$, avec des microorganismes resuspendus dans un milieu synthétique.

Ce travail se démarque donc nettement des études antérieures par des valeurs de K_T une dizaine de fois plus élevées, et mesurées dans la dynamique des cultures microbiennes fed-batch. Ces résultats originaux dans des domaines d'investigation peu exploités justifient des problématiques scientifiques développées dans ce travail.

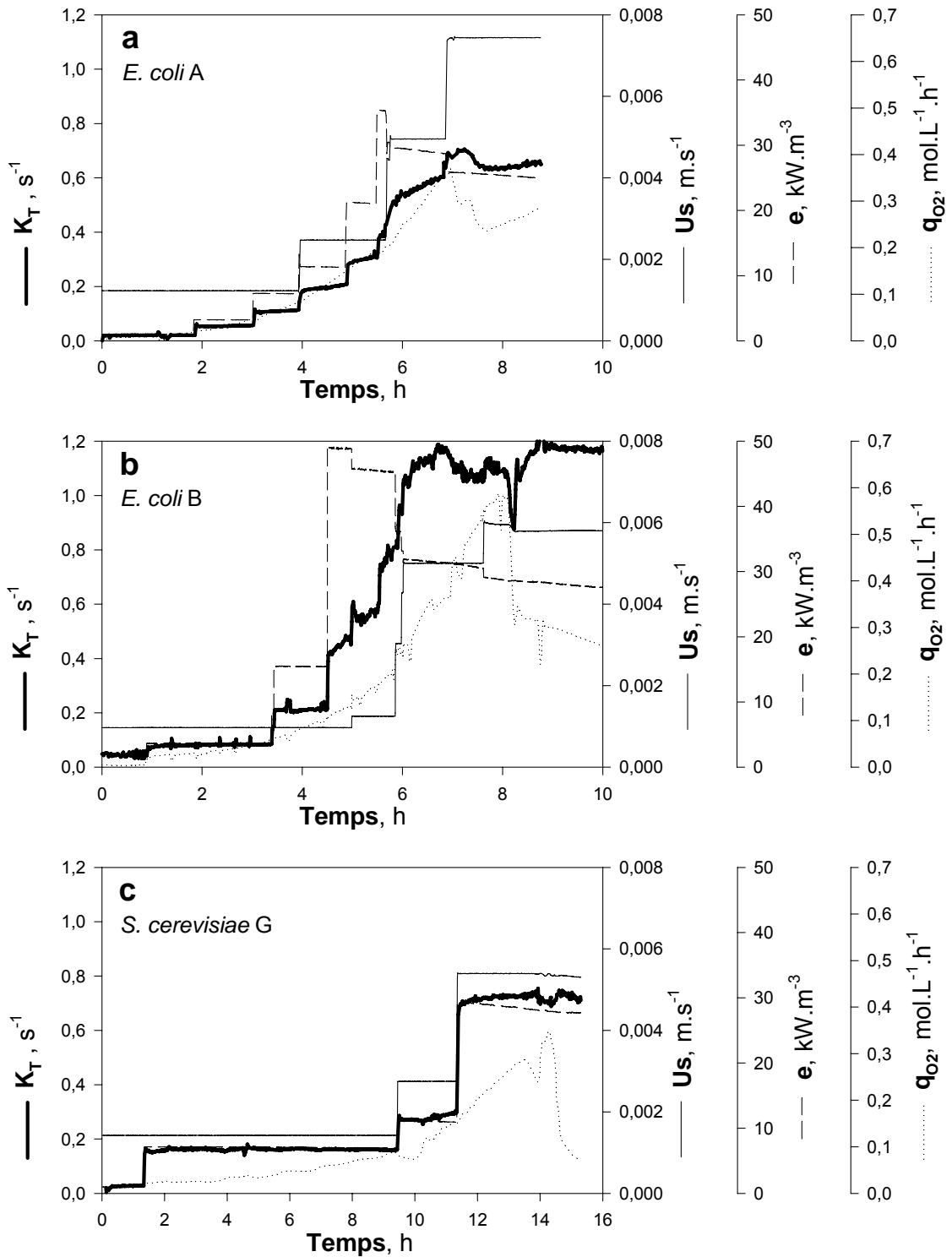


Figure 40. Coefficient de transfert d'oxygène K_T (rapporté à 37°C) calculé en ligne sur trois cultures : **a** *E. coli* A, **b** *E. coli* B, **c** *S. cerevisiae* G.

III.3.2.2. Confrontation avec les modèles existants

De façon très surprenante, il apparaît que K_T varie dans le temps alors que les paramètres de contrôle (e et U_s) sont maintenus constants, ce qui va à l'encontre de Eq. 21 ($K_L a = \chi \cdot e^\alpha \cdot U_s^\beta$). Sur la Figure 40a, entre $t=5$ et $5,5$ h, K_T augmente de 10%, et entre $t=6$ et 7 h, K_T augmente de 20%. Sur la Figure 40b, K_T augmente de 90% entre $t=4,5$ et 6 h ; le passage de 2 à 3 turbines actives explique le palier de K_T à $t=5,5$ h mais pas l'ensemble de l'évolution. Sur la Figure 40c par contre, K_T reste stable lorsque U_s et e restent inchangés, sauf sur l'intervalle $t=10,5$ à $11,5$ h où K_T augmente.

La période de la Figure 40a comprise entre $t=5$ et $5,5$ h est présentée sur la Figure 41 en comparaison avec la courbe théorique décrite par Eq. 21, dont les coefficients ont été calculés pour minimiser l'écart avec les valeurs de K_T , soit $K_L a = 0,001 \cdot e^{0,81} \cdot U_s^{0,4}$.

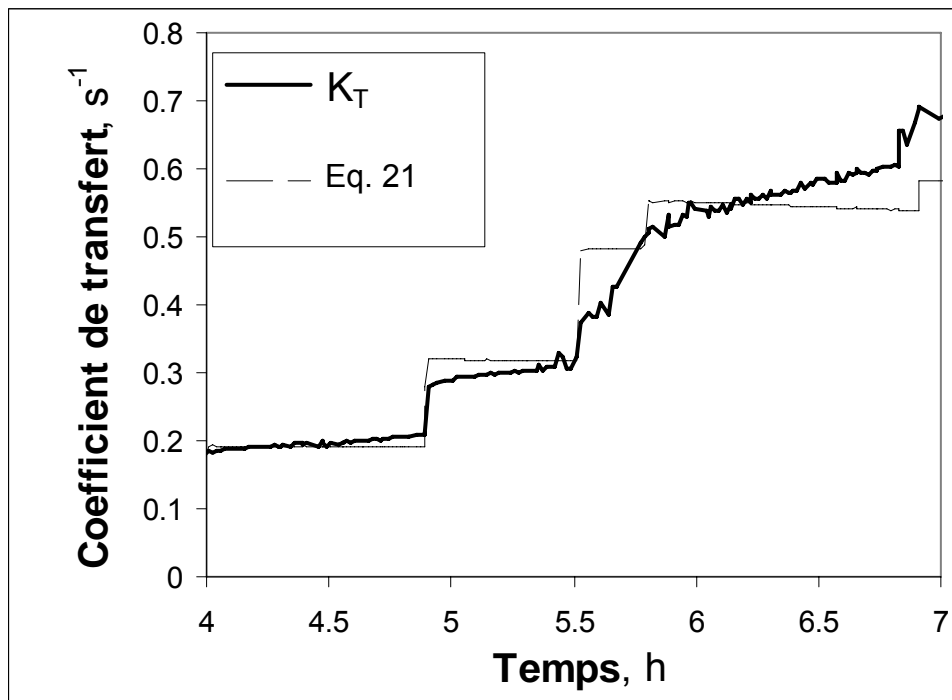


Figure 41. Zoom sur la Figure 40a : écart entre K_T mesuré en ligne et la courbe modèle décrite par Eq. 21.

L'écart entre les valeurs issues de Eq. 21 et les valeurs de K_T met en évidence la nécessité d'améliorer Eq. 21 en tenant compte des effets biologiques (Sundararajan et Ju, 1993), c'est l'objet de la partie III.3.3, et/ou d'améliorer la détermination de K_T , c'est l'objet de la partie III.3.4.

III.3.3. Analyse et modélisation des effets biologiques

III.3.3.1. Rétention gazeuse et aire interfaciale

La Figure 42 compare les fonctions de la rétention gazeuse $\varepsilon/U_s^{0.4}$ mesurées dans les milieux de culture de *S. cerevisiae* et d'*E. coli* (en présence de cellules actives, dont la concentration est comprise entre 20 et 80 g_{MS}.L⁻¹) et dans les surnageants associés (donc en l'absence de cellule) avec les rétentions gazeuses mesurées en milieux minéraux coalescent, ε_c (Eq. 109), et non-coalescent, ε_{nci} (Eq. 110) (Figure 17). En terme de pourcentage, la rétention gazeuse ($\varepsilon=V_G/V_L$) dépasse 70% en culture d'*E. coli* ; pour Nienow et Lilly (1979) la rétention gazeuse est typiquement inférieure à 10 % pour tout flux d'aération « réaliste ».

La rétention gazeuse dans les moûts et dans les surnageants associés est du même ordre de grandeur : il ne semble pas que la présence de cellules de *S. cerevisiae* ou d'*E. coli* modifie sensiblement la rétention gazeuse. A forte puissance dissipée, les rétentions gazeuses mesurées pour la levure sont légèrement inférieures à celles mesurées pour *E. coli* : la position des trois turbines actives, légèrement plus resserrées pour la culture de *S. cerevisiae* que pour la culture d'*E. coli*, peut en être la cause.

La rétention gazeuse dans les moûts et les surnageants associés est du même ordre de grandeur qu'en milieu non-coalescent salin : pour *E. coli* elle est donc 1,5 fois plus grande que dans le milieu R4 constitué des principaux sels du milieu initial (sur la Figure 42, la droite 'milieu R4' est la tendance dégagée de la Figure 17). Cette augmentation est au moins aussi importante pour *S. cerevisiae*, dont la rétention gazeuse dans le milieu initial devrait être plus petite que celle d'*E. coli*, la force ionique de ce milieu de culture de *S. cerevisiae* étant plus petite que celle d'*E. coli* (III.2.1.3).

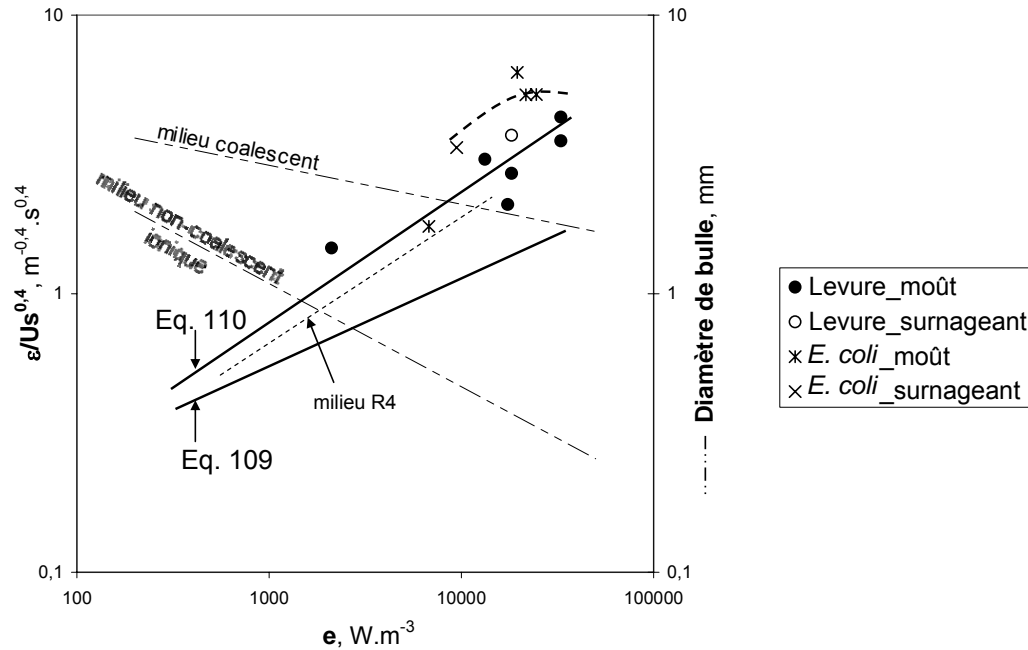


Figure 42. Comparaison entre la rétention gazeuse mesurée sur le moût de culture et celle mesurée sur milieux de référence. Diamètres de bulles d'après Alves et coll. (2002).

Le milieu salin est apporté en continu, et la concentration de chacun de ses constituants a été optimisée de manière à éviter leurs accumulations dans le milieu. Il est donc peu probable que la force ionique du milieu qui vaut $0,3 \text{ mol.L}^{-1}$ puisse atteindre la valeur de 1 mol.L^{-1} qui permet la répression totale de la coalescence (Tableau 7). L'augmentation de la rétention gazeuse par rapport au milieu R4 pourrait être due à la présence de l'acide citrique contenu dans le milieu, ou à des modifications du milieu causées par l'activité de la biomasse. Mentionnons à cet effet la présence d'éthanol à une concentration juste supérieure à 10^{-3} M (Keitel et Onken, 1982) et de CO_2 dissous (Takahashi et coll., 1992) qui peuvent réduire la coalescence, et donc augmenter la rétention gazeuse.

Le paramètre d'intérêt pour l'étude du transfert d'oxygène est l'aire interfaciale a . Il est possible de calculer a à partir de ϵ par Eq. 29 en estimant le diamètre moyen des bulles à partir de corrélations mentionnées dans la littérature en fonction de e ; les diamètres de bulles calculés par les corrélations d'Alves et coll. (2002) sont présentées à cet effet sur la Figure 42 pour les milieux coalescent et non-coalescent ionique. En supposant que les tailles des bulles rencontrées dans les moûts de cultures soient celles des milieux non-coalescents ioniques, c'est-à-dire pour des diamètres compris entre 0,3 et 1 mm, les aires interfaciales dans les

moûts sont donc comprises entre 500 et 12000 m⁻¹ : elles sont 6 fois plus importantes que les valeurs habituellement rencontrées en cuve agitée (Tableau 5).

La Figure 43 présente un calcul théorique du rapport V_{film}/V_L , du volume interfacial sur le volume total de liquide, en fonction de la rétention gazeuse et du diamètre de bulle (l'épaisseur du film liquide est supposée constante, égale à 20 μm). La partie hachurée représente les conditions opératoires de cette étude. Tsao (1969) adopte dans un calcul l'hypothèse que le volume interfacial peut être négligé devant le volume du cœur du liquide. Cependant, sans doute à cause des molécules excrétées par les cellules et des fortes puissances dissipées utilisées, il est commun en culture cellulaire intensive que ε dépasse 40 % avec des bulles inférieures à 500 μm . Le volume du film peut donc représenter 70 % du volume liquide total, c'est-à-dire que 40 % des microorganismes peuvent résider dans le voisinage direct des bulles. Sachant que les résistances au transfert de gaz sont localisées au niveau du film liquide, il semble important d'accorder un intérêt particulier à celui-ci : la visualisation directe par microscopie in situ sera expérimentée.

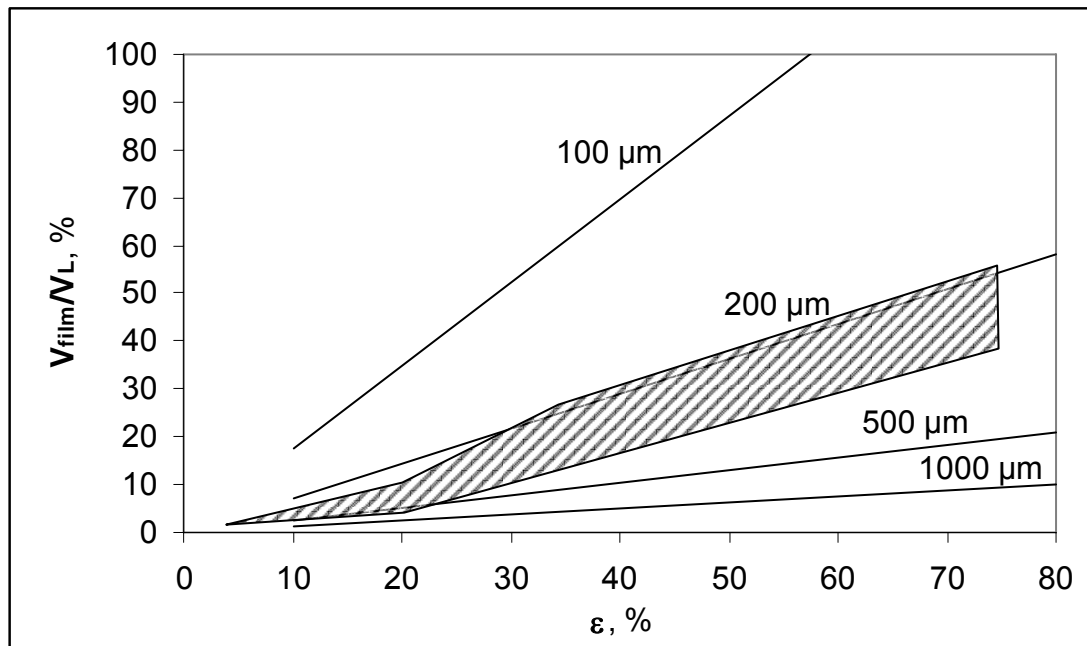


Figure 43. Importance relative du volume du film liquide en condition de culture cellulaire. Calcul en fonction de la rétention gazeuse ε , et du diamètre moyen des bulles (indiqué en μm).

III.3.3.2. Coefficient de transfert d'oxygène

Le coefficient global de transfert d'oxygène défini dans la phase liquide en milieu biologique, K_T , est comparé sur la Figure 44 aux corrélations décrivant les évolutions de $K_L a$ en fonction de e en milieux coalescent (Eq. 119) et non-coalescent (Eq. 115). Les valeurs de

$K_T/U_s^{0.4}$ suivent en fonction de e une évolution similaire à celle de Eq. 115, mais avec des valeurs 4 à 6 fois plus petites, pour les cultures d'*E. coli* (Figure 44A) comme pour celles de *S. cerevisiae* (Figure 44B).

Le moût étant un milieu fortement non-coalescent (Figure 42), il était attendu des valeurs de K_T proches de Eq. 115. A partir de ces deux premières observations, calculons la conductance de transfert dans le milieu de culture.

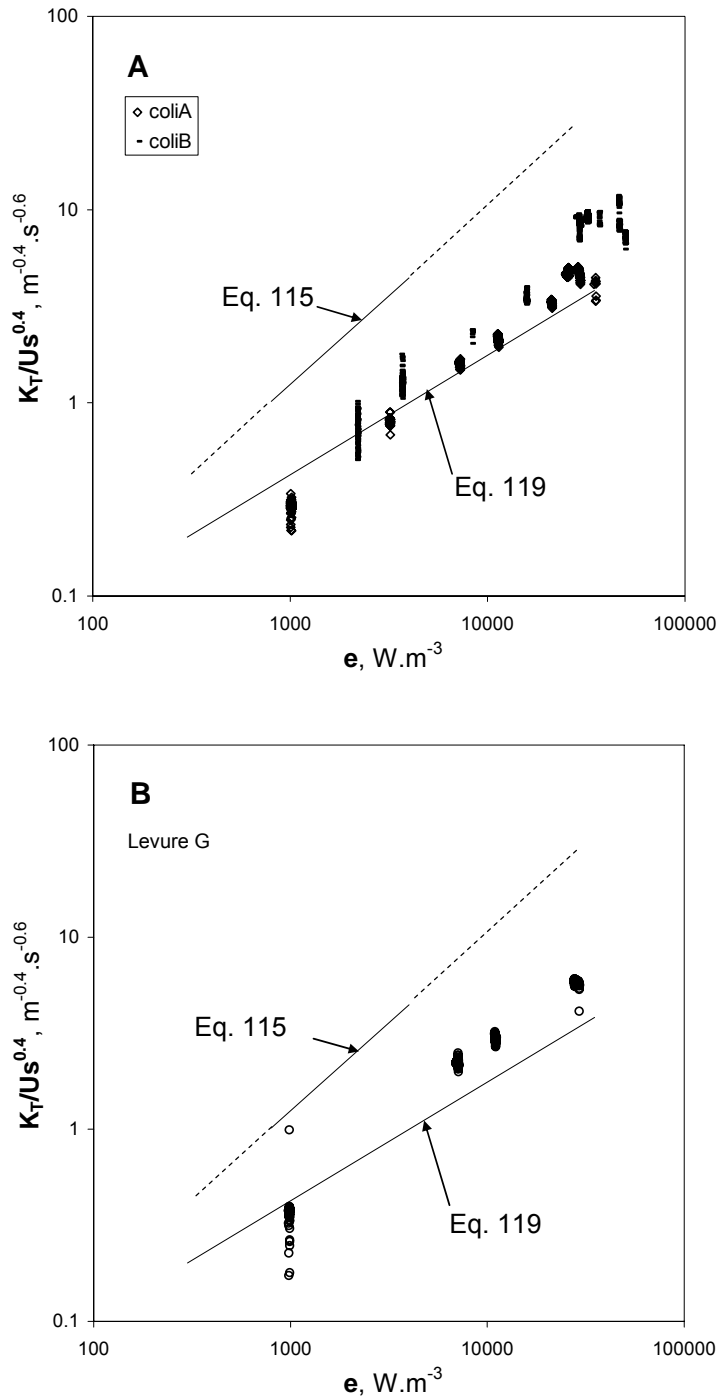


Figure 44. Comparaison des valeurs de $K_L a/U_s^{0.4}$ obtenues en culture cellulaire avec les valeurs obtenues en milieux minéraux. **A** culture d'*E. coli*. **B** culture de levure.

III.3.3.3. Conductance de transfert d'oxygène

Les conductances de transfert d'oxygène sont calculées par le rapport $K_L a/a$ (ou K_T/a) en estimant l'aire interfaciale par Eq. 29. Les hypothèses suivantes sont utilisées :

- H 16. L'influence de la composition du milieu sur le coefficient de diffusion de l'oxygène est négligée, en l'absence de données spécifiques aux cultures microbiennes. Le coefficient de diffusion de l'oxygène retenu est celui mesuré dans l'eau pure : $D=2,1 \times 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Perry et Green, 1884).
- H 17. Pour les mouûts de culture et les surnageants associés, les valeurs de la rétention gazeuse et du diamètre de bulle sont celles du milieu non-coalescent ionique (Figure 42).

La conductance globale de transfert en milieu biologique $K_{L,b}$, calculée à partir des cultures *E. coli* A et B, ainsi que les conductances en milieux coalescent $K_{L,c}$ et non-coalescent ionique $K_{L,nci}$ sont comparées sur la Figure 45.

Les valeurs de $K_{L,c}$ et $K_{L,nci}$ correspondent aux valeurs de la littérature mesurées en réacteur agité (van't Riet, 1979; Bouaifi et Roustan, 1998; Linek et coll., 2005), bien que l'évolution des valeurs en $e^{0,11}$ et $e^{0,08}$, respectivement mesurées à partir de la Figure 45, ne corresponde pas à l'évolution en $e^{1/4}$ du modèle d'eddy (Linek et coll., 2004). La décroissance de $K_{L,nci}$ à $e=10000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$ est due à l'augmentation subite de la rétention gazeuse (pour $V_L=10\text{L}$) causée par l'activation de la turbine supérieure (Figure 42) ; cette situation a été reportée dans un soucis de restitution de la réalité en culture cellulaire. Les valeurs de $K_{L,b}$ sont majoritairement inférieures à $10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$; le rapport $K_{L,b}/K_{L,nci}$ est compris entre 0,12 et 0,25. Pour la culture de *S. cerevisiae* G, k_L est compris entre $10^{-4} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $e < 10000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$ et $7,8 \times 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ pour $e > 10000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$.

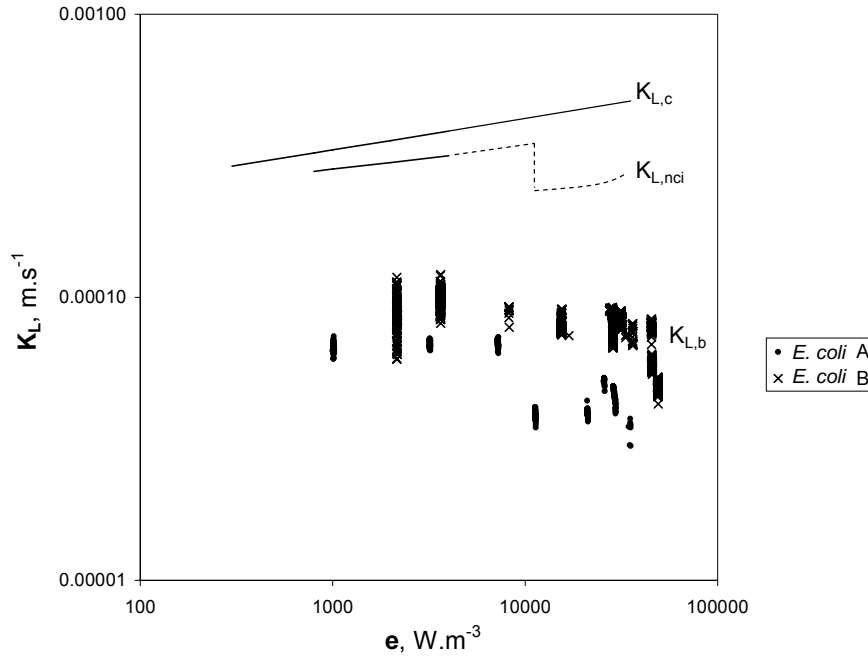


Figure 45. Conductances globales de transfert d'oxygène, estimées en milieux de référence coalescent ($K_{L,c}$), non-coalescent ionique ($K_{L,nci}$) et en milieu biologique ($K_{L,b}$). - - - extrapolation pour $e > 4000 \text{ W.m}^{-3}$.

En comparant les paramètres significatifs du transfert gaz-liquide mesurés en milieux minéraux à ceux mesurés en milieu biologique, il a été constaté :

- c1-des valeurs de rétention gazeuse mesurées dans le moût 1,5 fois supérieures aux valeurs mesurées sur le milieu R4 constitué des principaux sels du milieu salin (Figure 42) ;
- c2-des valeurs de K_T 4 à 6 fois plus petites que les valeurs obtenues avant inoculation (Figure 44) ;
- c3-des valeurs de $K_{L,b}$ 4 à 8 fois inférieures à celles de $K_{L,nci}$ (Figure 45) ;
- c4-il est observé également sur la Figure 46 que la tension de surface σ est supérieure à 72 dynes.cm^{-1} dans les milieux de culture avant inoculation, et de l'ordre de $33 \pm 4 \text{ dynes.cm}^{-1}$ dans les moûts de culture de *E. coli* et *S. cerevisiae* et les surnageants associés.

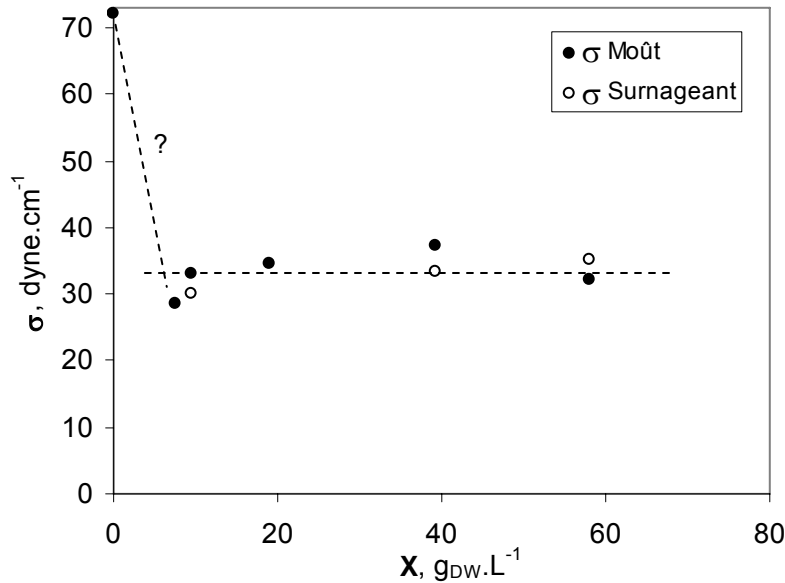


Figure 46. Evolution de la tension de surface σ en fonction de l'avancement de la culture. Culture *E. coli* F. Mesure effectuée à 37°C.

L'ensemble de ces résultats, à la vue de la littérature, évoque l'excrétion possible par les microorganismes de molécules qui agissent comme des molécules de surfactant. En effet :

(c1) Les surfactants sont reconnus pour augmenter l'aire interfaciale, même à des concentrations de quelques ppm (Alves et coll., 2004; Sardeing et coll., 2006). Dans les milieux biologiques, il est également observé la formation de mousse et de microbulles stables, qui ne sont pas observées dans les milieux ioniques purs. La présence de tensioactifs diminue le diamètre des bulles par rapport à celui évalué en milieu non-coalescent ionique (Alves et coll., 2002). D'après Eq. 33, la tension de surface du milieu biologique étant deux fois plus petite que celle du milieu ionique, le diamètre d_b des bulles en milieu biologique peut s'exprimer en fonction de celui mesuré en milieu non-coalescent ionique, d_{nci} :

$$d_b = 0,66d_{nci} \quad (121)$$

D'après cette relation, les valeurs de $K_{L,b}$ présentées sur la Figure 45 seraient donc diminuées d'un tiers.

(c2, c3) En présence de surfactants, la décroissance du coefficient de transfert est observée par rapport à un milieu de même force ionique (Linek et coll., 2005 ; Sardeing et coll., 2006). La valeur du le ratio $K_{L,b}/K_{L,nci}$ est proche du ratio $K_{L,s}/K_{L,nci}$ mesuré par Linek et coll. (2005), où $K_{L,s}$ est mesuré dans une solution Na_2SO_3 100 g.L^{-1} complétée avec 100 ppm (par masse) de polyéthylenglycol 1000 utilisé pour réduire la tension de surface, et $K_{L,nci}$ est mesuré dans une solution Na_2SO_3 100 g.L^{-1} .

(c4) Popovic et coll. (1983) mesurent également $\sigma=35 \text{ dynes.cm}^{-1}$ en culture de *S. cerevisiae* ($10 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$) cultivée en fed-batch, et en culture d'*A. niger* ($10 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$). D'autre part σ est constant durant les cultures ; la quantité de surfactant introduite dans le bioréacteur lors de l'inoculation serait donc assez importante pour imposer la non-coalescence du milieu dès le début de la culture.

La présence de surfactants dans le milieu biologique nous interroge sur la localisation de la résistance principale au transfert. Les résistances au transfert interviennent en série tel que :

$$\frac{1}{K_{L,b}} = \frac{1}{k_i} + \frac{1}{k_{L,s}} \quad (122)$$

où $k_{L,s}$ est la conductance dans la phase liquide contenant des surfactants, et k_i la conductance dans la monocouche de surfactants localisée à l'interface gaz-liquide. En réacteur agité, les surfactants exercent deux effets sur le procédé d'absorption gazeux : l'effet barrière caractérisé par la résistance $1/k_i$, et l'effet hydrodynamique caractérisé par la résistance $1/k_{L,s}$ (Llorens et coll., 1988). Pour Llorens et coll. (1988) l'effet barrière est négligeable comparé à l'effet hydrodynamique.

D'autre part, si des surfactants recouvrent l'interface, alors l'utilisation de la loi de Henry pour décrire l'équilibre de concentration gaz-liquide à l'interface n'est plus possible (Llorens et coll., 1988) car : $x_{\text{O}_2}^* < \text{RTH } y_{\text{O}_2}$.

Enfin, en supposant la présence de surfactants dans le milieu de culture, il est intéressant de comparer nos résultats avec ceux obtenus en colonne à bulle, car ils confortent le fait que le mécanisme de transfert dans ces deux échangeurs ne soit pas mécaniquement semblable (problème soulevé par Bouaifi et coll. (2001) et Linek et coll. (2005)). Avec des diamètres de bulles $d_s < 1,5 \text{ mm}$, les valeurs de $K_{L,b}$ présentées sur la Figure 45 sont 4 à 6 fois plus petites que celles de $K_{L,c}$ mesurées dans l'eau pure. Un tel écart existe aussi en colonne à bulles entre le milieu avec et sans surfactant, mais uniquement pour $d_s > 1,5 \text{ mm}$, car pour $d_s < 1,5 \text{ mm}$, les conductances de transfert sont les mêmes pour les milieux contenant des surfactants et pour l'eau pure.

Notons qu'il serait très intéressant d'évaluer $K_{L,a}$ dans un milieu salin contenant des surfactants tel que $\sigma=34 \text{ dyne.cm}^{-1}$ pour vérifier si les valeurs de $K_{L,a}$ et de K_L ainsi obtenues étaient proches de celles mesurées en milieu biologique.

III.3.3.4. Influence de l'évolution de α sur la modélisation « $K_L a = \chi \cdot e^\alpha \cdot U_S^\beta$ »

Les « constantes » χ , α et β de Eq. 21 dépendent des propriétés physiques du milieu ; en particulier des propriétés de coalescence.

Les valeurs de K_T calculées durant la culture *E. coli* A (Figure 40a), peuvent être parfaitement modélisées par Eq. 21 en gardant le coefficient α flottant mais en fixant χ à 0,001 et β à 0,4. Cette modélisation est présentée sur la Figure 47 par la courbe $K_{L,a}(\alpha)$, avec les valeurs de l'exposant α calculées point par point. Sur la même figure, la courbe en pointillés, $K_{L,a}$, est calculée en utilisant une valeur constante du coefficient α ($\alpha=0,83$, optimisée sur l'ensemble des points). Ce modèle représente mal l'évolution de K_T , en particulier à partir de $t=5$ h.

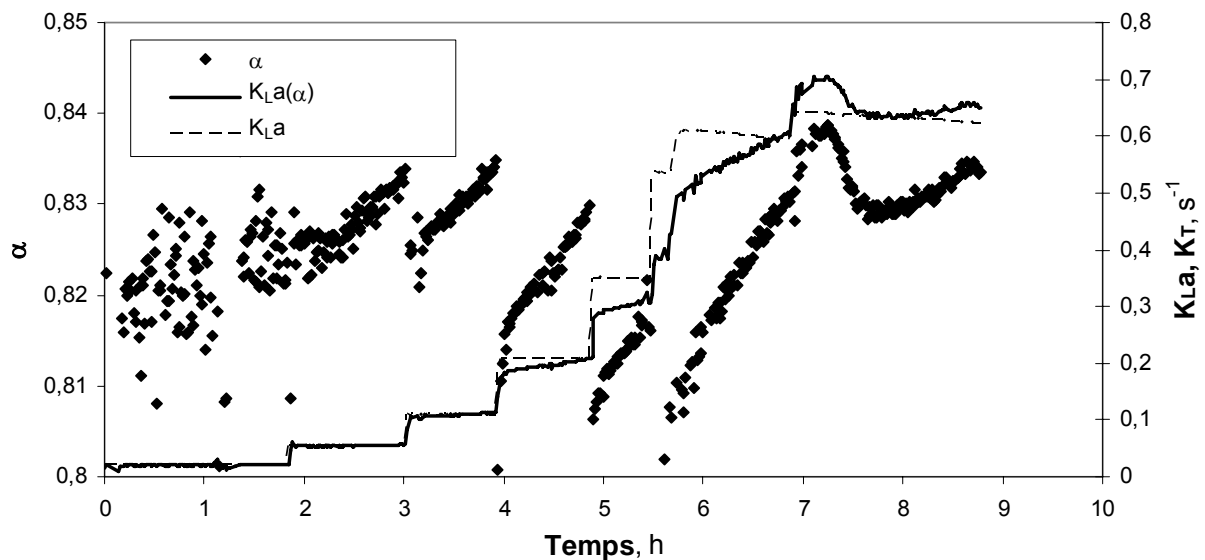


Figure 47. Evolution de l'exposant α pour la modélisation de K_T selon Eq. 21. $K_{L,a}(\alpha)=0,001e^\alpha U_S^{0,4}$ avec α variable, présenté sur l'axe de gauche ; $K_{L,a}$ est calculé avec $\alpha=0,83$, constant.

L'exposant α du modèle $K_{L,a}(\alpha)$ varie de 1 ou 2 pourcents au cours de la culture, ce qui pourrait être explicable par les variations des propriétés physiques du milieu (les discontinuités pouvant être rattrapées par la variation simultanée de la constante χ). Cependant la décroissance puis la croissance de l'exposant α entre $t=7,5$ et $t=9$ h peut difficilement être due à une variation des propriétés physiques du milieu car l'évolution de l'activité métabolique de *S. cerevisiae* est continue durant cette période, parfaitement contrôlée par l'apport de glucose. L'hypothèse de la variation des constantes χ , α et β de Eq. 21 au cours de la culture est donc remise en question.

III.3.3.5. Etude hors ligne sur milieux réels

La modélisation des effets biologiques sur K_T peut être considéré sous trois angles, rappelés dans Eq. 67 : E_{chem} , E_{pp} , E_{qO_2} (Sundararajan et Ju, 1993) ; il est alors supposé que $(K_{La})_{ref}$ est modélisé par Eq. 21, et peut être déterminé dans le milieu salin initial avant inoculation. Les valeurs de ces trois facteurs d'accélération peuvent être déterminées à condition de pouvoir évaluer simultanément au cours de la culture cellulaire la valeur du coefficient de transfert d'oxygène dans trois situations (Ju et Sundararajan, 1995) : avec la biomasse active (c'est la mesure de K_T réalisée en ligne), avec la biomasse à l'état stationnaire (c'est-à-dire pour q_{O_2} réduit ou nul), et dans le surnageant associé.

L'expérience nécessite de conserver les mêmes conditions opératoires (réacteur, configuration, V_L , puissance dissipée, $U_s...$) pour les quatre mesures.

L'expérience nécessite l'arrêt de la culture ; elle est donc réalisée à la fin de la culture.

Les conditions d'agitation étant élevées, l'entraînement de surface est possible.

Pour l'évaluation du coefficient de transfert dans le surnageant et en présence d'une activité biologique réduite, la méthode du bilan gazeux n'est pas réalisable (à cause du gradient $(Q^{in} y_{O_2}^{in} - Q^{out} y_{O_2}^{out})$ trop faible (Eq. 91)) et doit être substituée par une méthode dynamique.

Pour toutes ces raisons, il a donc été envisagé de modifier le modèle ME5 pour tenir compte de la respiration résiduelle. Mais la présence d'une rétention gazeuse résiduelle élevée, déjà rencontrée en milieu non-coalescent ionique (III.2.4.2), rend insolvable la convergence vers des valeurs cohérentes de K_{La_d} .

Les expériences directes de mesure de l'accélération, comme pratiquées par Ju et Sundararajan (1995) à partir de cellules lyophilisées, sont difficiles en culture cellulaire intensive. Il est donc proposé de vérifier les hypothèses d'accélération du transfert indirectement, en étudiant les valeurs de K_T mesurées en ligne dans la dynamique de la culture.

III.3.3.6. Accélération due aux modifications chimiques du milieu (E_{chem})

Au début de la culture *E. coli* A ($t=0$ à 3 h), les valeurs de K_T sont 4 fois plus petites que celles obtenues en milieu coalescent (Figure 44). D'autre part, les valeurs de $K_{L,b}$ sont 4 fois plus petites que dans le milieu salin avant ensemencement (Figure 45). Ces observations peuvent s'expliquer par des modifications chimiques du milieu, ayant pour effet la réduction du coefficient de transfert d'oxygène. Les modifications chimiques du milieu en présence de

biomasse sont aussi observées à travers les valeurs de ε , 1,5 fois plus élevées en milieu biologique que dans le milieu salin avant ensemencement (Figure 42). Au début de la culture *E. coli* A, la très faible concentration en biomasse de $0,7 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ rend négligeable l'effet de E_{pp} ($E_{\text{pp}}=1$). D'autre part la faible valeur de q_{O_2} , $0,006 \text{ mol}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, et la forte supériorité du temps caractéristique de la réaction τ_r devant le temps caractéristique de la diffusion τ_d ($\tau_r \gg \tau_d$) (Figure 10), démontrent que $E_{q_{\text{O}_2}}$ est également négligeable ($E_{q_{\text{O}_2}}=1$). En choisissant pour valeur de $(K_{\text{La}})_{\text{ref}}$ (Eq. 67) la valeur de la référence non-coalescente ionique qui définit le milieu initial avant ensemencement, il suit, pour le début de la culture *E. coli* A : $E_{\text{chem}}=0,25$.

De façon similaire, au début de la culture *E. coli* C, laquelle a été suivie depuis une concentration en biomasse plus faible que les autres cultures (Figure 48), K_T croît de $0,01 \text{ s}^{-1}$ à $0,05 \text{ s}^{-1}$ entre $t=0 \text{ h}$ et $t=13,5 \text{ h}$ alors que e et U_s restent constants. Pendant cette période l'accélération par consommation d'oxygène est peu probable ($\tau_r \gg \tau_d$) ; l'augmentation de K_T pourrait donc s'expliquer par l'augmentation de E_{chem} (dont la valeur resterait néanmoins inférieures à 1). Gao et coll. (1995) observent un phénomène similaire pendant les sept premières heures après ensemencement : X croît de 1 à $4 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$, pendant que K_{La} croît de $0,018$ à $0,024 \text{ s}^{-1}$; l'augmentation de K_{La} est attribuée par les auteurs aux modifications du milieu. (Notons que les modifications de milieu annoncée par certains auteurs comme Ju et Sundararajan (1995) qui utilisent des cellules resuspendues sont à considérer avec précaution car l'essentiel de ces modifications est dû aux composants servant à emballer les cellules sèches et non à l'excrétion de métabolites, comme c'est le cas en culture cellulaire).

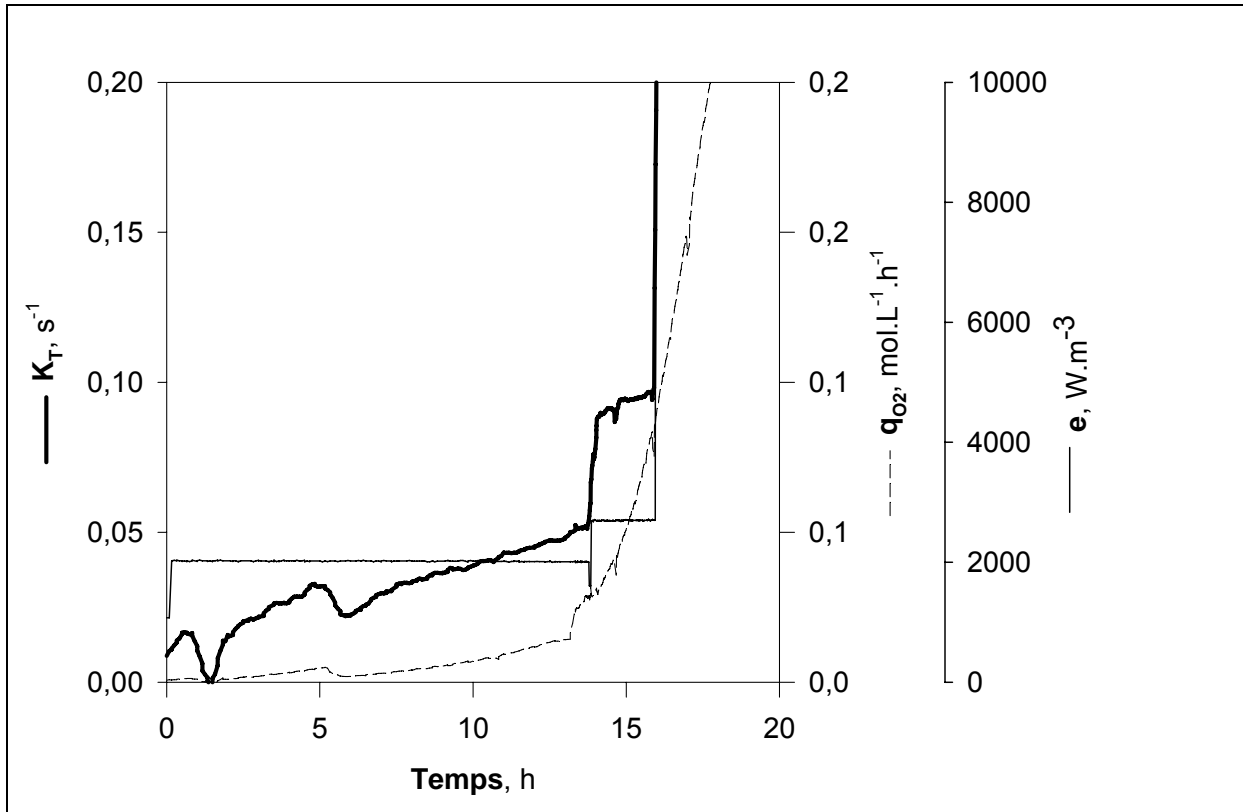


Figure 48. Effet des modifications du milieu sur K_T en début de culture d'*E. coli* (culture C). Conditions de culture en annexe.

Quelles sont les molécules excrétées responsables de l'accélération chimique ? Il semblerait que l'accélération chimique se caractérise par une double modification : modification de la perméabilité des interfaces par rapport à l'oxygène, et modification de la taille des bulles. L'analyse de Hinze (1955) et Calderbank (1958) (Eq. 33) définit la tension de surface et la densité du milieu comme paramètres principaux du contrôle de la taille des bulles. La possibilité que les cellules excrètent des molécules de surfactant a déjà été discutée et il a été vu que la tension de surface reste constante en cours de culture (Figure 46). La densité du moût de culture peut augmenter de 2% par rapport à celle de l'eau à cause de la présence de microorganismes (calculée en supposant que la densité de la biomasse humide est 1030 g.L^{-1} (Aiba et coll., 1979)) mais cette augmentation ne permet pas d'expliquer les accélérations observées sur la Figure 48.

Quand aux autres propriétés physico-chimiques qui ont été mesurées dans le milieu, leurs variations ne permettent pas non plus d'expliquer l'accélération chimique. La force ionique du milieu est maintenue à un niveau constant de part l'alimentation fed-batch et l'accumulation limitée des sels. La viscosité du milieu n'excède pas 2 cp (pour $X=80 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$). Notons également que la variation de $x_{\text{O}_2}^*$ en cours de culture –due aux

variations de la composition du milieu ou à la déviation de la sonde— est négligeable (2% d'écart), ce qui vérifie l'hypothèse H 9.

A partir de ces observations et de l'analyse de Hinze (1955) et Calderbank (1958) on peut supposer qu'à e et U_s constants le diamètre de bulle devrait être stable, à condition que le niveau de coalescence reste inchangé. C'est la mise en défaut de cette dernière condition qui pourrait expliquer l'augmentation du coefficient de transfert en début de culture : il peut être envisagé qu'une production de surfactants, non détectée par une mesure de tension de surface, soit capable de modifier sensiblement le transfert d'oxygène (Michel et Miller, 1962).

Cette production dépendrait en particulier du microorganisme utilisé : il est observé une différence fondamentale entre les cultures d'*E. coli* qui présentent ce type d'accélération en début de culture, et les cultures de *S. cerevisiae* qui ne la présentent pas. D'autre part, ajoutons que malgré les propriétés similaires des deux milieux, les bulles semblent plus petites dans les cultures d'*E. coli* (plus mousseuses) que dans les cultures de *S. cerevisiae* (qui présentent des bulles de l'ordre de 5 mm, très rarement observées en culture d'*E. coli*).

III.3.3.7. Accélération due à la présence physique de particules (E_{pp})

La Figure 49 présente en détail la culture *E. coli* A au moment du passage de la phase 1 à la phase 2. K_T croît à la fin de la phase 1, puis décroît en début de la phase 2, alors que X augmente : l'évolution de K_T n'est donc pas une fonction monotone de la concentration en biomasse. D'autre part, l'augmentation de la concentration cellulaire pourrait être responsable d'une réduction de K_T eu cours de culture, induite par les effets visqueux (Badino Jr. et coll., 2001), car la viscosité du moût suit la loi d'Einstein. Il semble cependant que l'influence de la viscosité soit secondaire dans les cultures de microorganismes unicellulaires présentés.

L'augmentation de la puissance dissipée provoque la réduction de la taille des bulles. Cette réduction de taille provoque l'augmentation de la capacité à capturer les cellules, et en conséquence la réduction de la diffusion à travers l'interface (Galaction et coll., 2004; Ju et Sundararajan, 1995). Ce phénomène est-il responsable de la baisse de $K_{L,b}$ à forte puissance dissipée, visible sur la Figure 45 pour $e > 25000 \text{ W.m}^{-3}$? Il apparaît d'autre part que lors d'un incrément de puissance dissipée la valeur de $K_{L,b}$ diminue (par exemple de 3200 à 7200 W.m^{-3} , ou de 11000 à 21000 W.m^{-3}), est-ce le même phénomène de blocage ?

L'influence de la présence physique des cellules en tant que particules est mal définie aux concentrations cellulaires observées. L'hypothèse favorisée par ce travail serait conforme aux travaux de Galaction et coll. (2004) (I.2.7.1) décrivant le blocage de l'interface par les cellules.

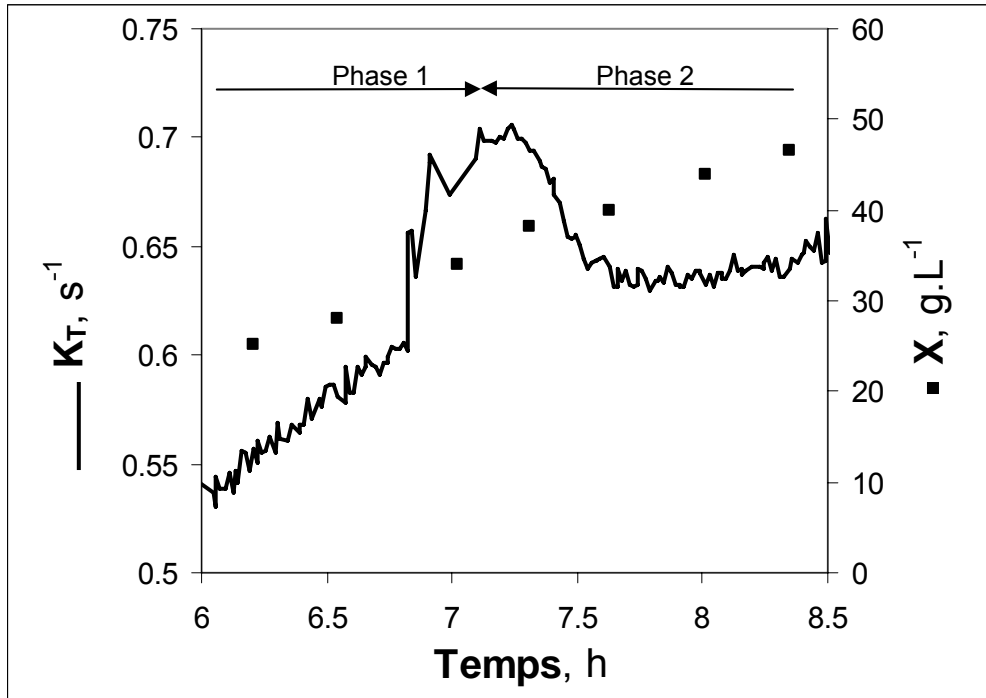


Figure 49. Découplage entre croissance cellulaire et K_T . Culture *E. coli* A.

III.3.3.8. Accélération due à la consommation d'oxygène (E_{qO_2})

Le calcul du facteur d'accélération proposé par Merchuck (1977) dans le cas d'une répartition homogène de la biomasse (Eq. 59) est modifié pour tenir compte de l'hypothèse d'écoulement piston du gaz :

$$E_{qO_2} = 1 + \frac{Dq_{O_2}}{2k_L^2(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{in}} \quad (123)$$

où k_L est la conductance de transfert d'oxygène en phase liquide. En système biologique la conductance de transfert d'oxygène en phase liquide est $k_{L,s}$ (Eq. 122), qui peut être assimilée à la conductance globale, $K_{L,b}$, en négligeant l'effet barrière des surfactants (Llorens et coll., 1988).

Cependant $K_{L,b}$ et a fortiori E_{qO_2} étant calculé à partir de K_T , dans quelle mesure l'utilisation de Eq. 123 est-elle valable pour expliquer les variations de K_T ? Il est donc proposé de calculer E_{qO_2} en cours de culture à partir de deux estimations différentes de $K_{L,b}$. Sur la Figure 50 durant la culture *E. coli* A, la courbe $E_{qO_2}(K_{L,b})$ est déterminée à partir de la valeur $K_{L,b}$ calculée en ligne (Figure 45) alors que la courbe $E_{qO_2}(K_{L,bm})$ est calculée à partir d'une valeur moyenne de $K_{L,b}$, estimée à partir des valeurs de la Figure 45 (recalculées en fonction du nouveau diamètre de bulle, conformément à Eq. 121) : $K_{L,bm} = 7 \times 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}$ pour

$e < 10000 \text{ W.m}^{-3}$ et $K_{L,bm} = 3 \times 10^{-5} \text{ m.s}^{-1}$ pour $e > 10000 \text{ W.m}^{-3}$. Les valeurs de $K_{L,bm}$ ainsi calculée dépendent uniquement de e , conformément à la littérature (I.2.1.2).

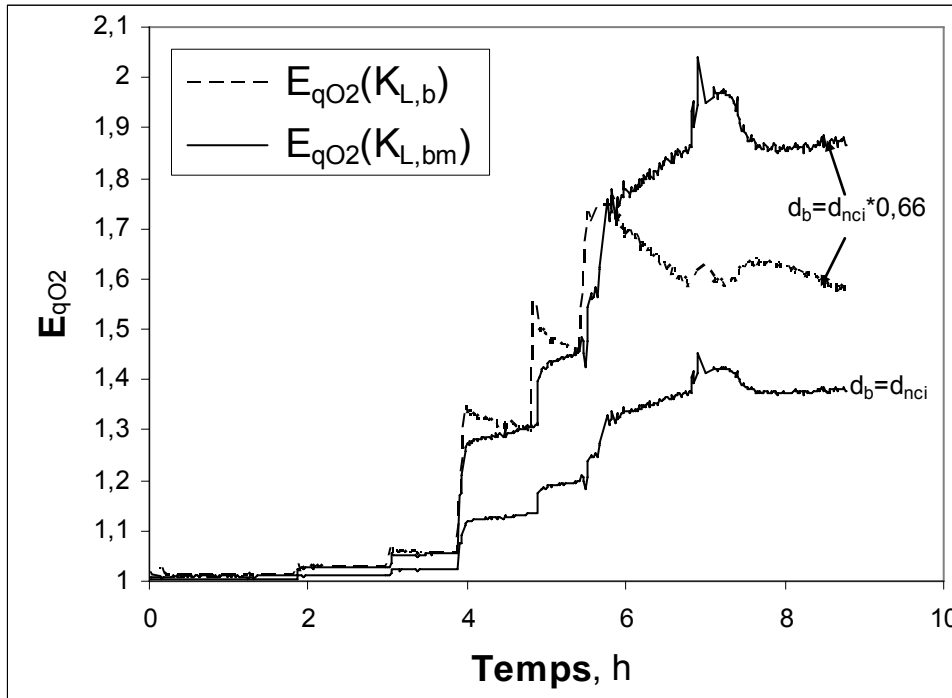


Figure 50. Evolution de E_{qO_2} durant la culture *E. coli* A. $E_{qO_2}(K_{L,b})$ et $E_{qO_2}(K_{L,bm})$ sont calculés en utilisant pour valeur de K_L la valeur $K_{L,b}$ calculée en ligne, et une valeur moyenne, respectivement.

Pour mettre en évidence l'importance de la taille des bulles dans le calcul de E_{qO_2} , la courbe $E_{qO_2}(K_{L,bm})$ a aussi été calculée pour $d_b = d_{nci}$, au lieu de $d_b = 0,66d_{nci}$ pour les autres courbes, conformément à Eq. 121 : avec des bulles un tiers plus petites, l'accélération dans le milieu biologique est largement favorisée par rapport au milieu non-coalescent ionique.

La dérivée de la fonction $E_{qO_2}(K_{L,bm})$ est du signe de la dérivée de q_{O_2} et de la dérivée de K_T , à U_s et e constants, alors que la dérivée de la fonctions $E_{qO_2}(K_{L,b})$ est du signe opposé. Il apparaît par contre que dans tous les cas une accélération faible ($E_{qO_2} > 1,1$) est calculée à partir de $t = 4 \text{ h}$, c'est-à-dire pour les valeurs de $K_{L,b}$ mesurées à puissance dissipée supérieure à 10000 W.m^{-3} (Figure 50). La valeur de E_{qO_2} augmente à chaque incrément de puissance dissipée.

Les valeurs de $K_{L,b}$ calculées ici en milieu biologique (III.3.3.3), permettent d'obtenir $E_{qO_2} > 1$. Merchuck (1977) considère qu'il n'est pas possible d'obtenir $E_{qO_2} > 1$ en réacteur agité (Figure 7). Cependant sa conclusion est obtenue en utilisant des valeurs de k_L mesurées dans l'eau pure. Similairement aux travaux de Merchuck (1977), Tsao et coll. (1978) affirment que le facteur d'accélération est proche de l'unité dans les systèmes pour lesquels l'absorption physique est déjà très importante ; également, Yagi et Yoshida (1975) ont mesuré une valeur

de E_{qO_2} faible en cuve agitée ($E_{qO_2}=1,07$; Tableau 4), mais là encore, les auteurs utilisent des cellules lavées et resuspendues : les propriétés d'un tel milieu ne sont pas comparables à celles du milieu de culture en condition d'activité cellulaire. Dans nos conditions réelles de culture, les valeurs de $K_{L,b}$ sont plus petites que celles mesurées dans l'eau avec la même configuration de bioréacteur.

A partir de la valeur de $E_{qO_2}(K_{L,bm})$ il est possible de calculer une valeur de $K_{L,a}$ de référence, $K_{L,a_{ref}}$, de la forme décrite par Eq. 21, et telle que l'erreur entre la courbe $K_{L,a_{ref}} \times E_{qO_2}(K_{L,bm})$ et la courbe K_T soit minimum. Les trois fonctions sont présentées sur la Figure 51: la période de transition entre la phase 1 et la phase 2 comprise entre $t=6,7$ et $t=7,7$ h, marquée par la division de q_{O_2} par 1,6, est modélisée avec moins de 2% d'erreur. La même transition est modélisée par Eq. 21 (courbe $K_{L,a}$, Figure 47) avec 10% d'erreur. Il a été vu d'autre part que la présence de biomasse avait peu d'effet pendant cette transition (Figure 49). L'influence de E_{qO_2} est donc prépondérante par rapport à celles de E_{chem} et E_{pp} sur cette période de transition.

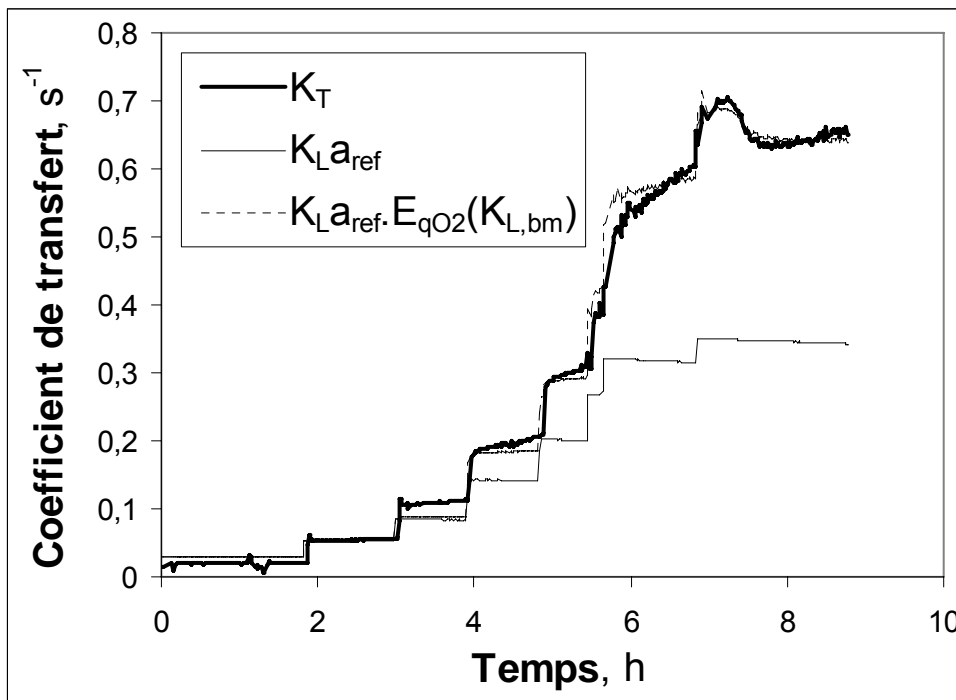


Figure 51. Comparaison de K_T avec la courbe $K_{L,a_{ref}} E_{qO_2}(K_{L,bm})$ durant la culture *E. coli* A.

Par contre, lorsque K_T varie beaucoup à U_s et e constants, par exemple entre $t=6$ et $t=7$ h, la fonction $K_{L,a_{ref}} \times E_{qO_2}(K_{L,bm})$ représente mal les variations expérimentales. Pour Andrews (1984) E_{qO_2} est nulle à moins d'un très fort excès de concentration cellulaire à l'interface par rapport au cœur du liquide (I.3.2.4). Sur la Figure 52 l'excès de concentration interfaciale est

prise en compte en utilisant le développement de Merchuck (1977), appliqué à la culture *E. coli* A entre les instants $t=6$ et $t=7$ h pour un excès nul ($X_0/X=1$), de 3 et de 10 (la fonction $K_{L,a_{ref}}$ est recalculée pour chaque excès de concentration, mais seule la fonction $K_{L,a_{ref}} \times E_{qO_2}(K_{L,bm})$ est représentée). Sur l'exemple considéré, un excès de 10 permettrait d'approcher la modélisation de K_T beaucoup plus finement. Or la concentration cellulaire moyenne à $t=6,2$ h est de $25 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$, ce qui porterait la concentration interfaciale à $250 \text{ g}_{MS} \cdot L^{-1}$, ordre de grandeur jugée acceptable dans la littérature (Yoshida et Yagi, 1977 ; Tsao et coll., 1978) (I.3.2.1).

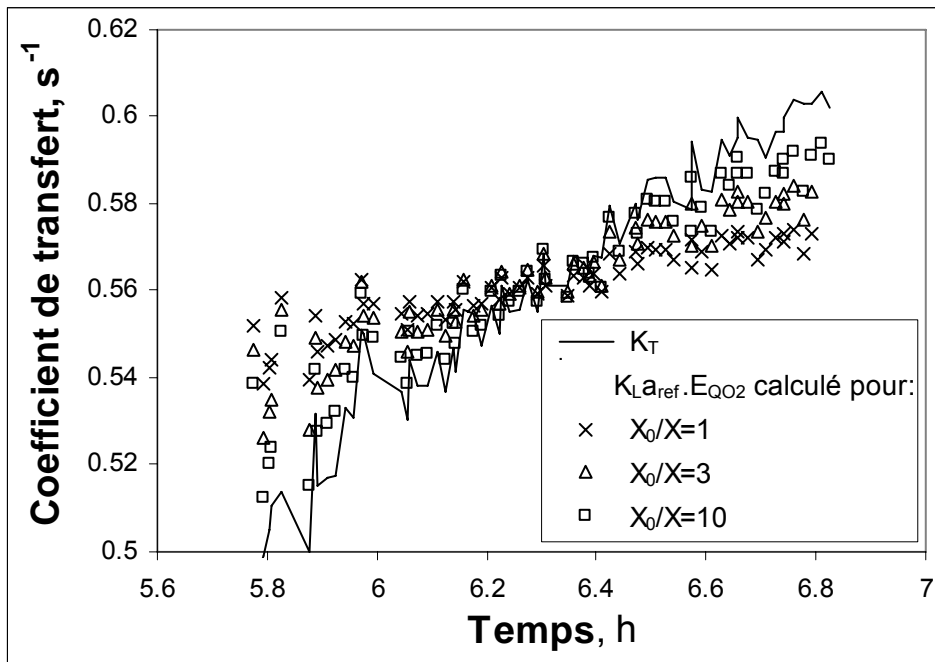


Figure 52. Comparaison de K_T avec la courbe $K_{L,a_{ref}} E_{qO_2}(K_{L,bm})$ calculée pour plusieurs valeurs de concentration interfaciale en biomasse durant la culture *E. coli* A. X concentration moyenne dans le liquide ; X_0 concentration à l'interface gaz-liquide.

Remarque. Comme le laisse supposer l'étude des temps caractéristiques (Figure 10), il semble que lorsque K_T est influencé par q_{O_2} à e et U_s constants, le ratio τ_d/τ_r est supérieur à un. La réciproque ne semble pas être vraie car on observe des cas tels que $\tau_d/\tau_r > 1$ sans que K_T évolue en fonction de q_{O_2} . Tsao et coll. (1970) posent alors une condition de consommation volumique d'oxygène « suffisante » pour permettre l'accélération. Enfin, pour $\tau_d/\tau_r < 1$, aucune situation de couplage n'est observée, ce qui est confirmé par Tsao et coll. (1978). Notons que dans le cas où les définitions suivantes des temps caractéristiques seraient adoptées : $\tau_d = \frac{D}{k_L^2}$

et $\tau_r = \frac{(x_{O_2}^* - x_{O_2})}{q_{O_2}}$, alors le ratio τ_d/τ_r vaudrait deux fois le critère γ défini par Merchuck

(Eq. 60). Le ratio τ_d/τ_r serait donc proche d'un nombre de Hatta défini pour la réaction biologique, ce qui lui donne une certaine légitimité dans la prédiction de l'accélération par consommation d'oxygène.

Des questions restent posées.

Pourquoi $E_{q_{O_2}}$ augmente-t-il par palier avec e ? L'argument de l'adhésion cellulaire utilisé pour justifier de la diminution de E_{pp} dans les mêmes conditions peut-il être utilisé ici ? Certes, l'accumulation de cellules à l'interface peut créer une barrière physique à la diffusion de l'oxygène, mais ces cellules étant actives, elles accélèrent par ailleurs le transfert en augmentant la consommation d'oxygène dans la couche interfaciale.

Dans la culture *E. coli* B, pourquoi $E_{q_{O_2}}$ n'augmente-t-il plus entre $t=6$ et $t=8$ h alors que q_{O_2} continue d'augmenter ? Un palier est-il atteint suite à une saturation des interfaces par les cellules ?

Le très fort volume interfacial (Figure 43) –où la très forte population microbienne consommant de l'oxygène dans la zone interfaciale– permet-il de faciliter l'accélération par consommation d'oxygène ?

Pour détailler les influences particulières de E_{chem} , E_{pp} et $E_{q_{O_2}}$ comme pratiqué par Ju et Sundararajan (1995), des quantifications supplémentaires seraient nécessaires, telles que des mesures in-situ de tailles de bulles et une étude des interactions entre les cellules et les interfaces gaz-liquide.

III.3.3.9. Contrôle du transfert par l'antimousse

Les cultures *E. coli* C et *E. coli* E (Figure 53) se distinguent par des ajouts ponctuels d'antimousse en cours de croissance. Sur la Figure 53, la croissance de K_T entre $t=0,5$ et $t=1,25$ h semble être provoquée par l'augmentation de la consommation d'oxygène, confirmé par le ratio $\tau_d/\tau_r > 1$. Entre $t=2$ et $t=3$ h, après le premier ajout d'antimousse, on observe aussi $\tau_d/\tau_r > 1$ mais K_T n'évolue plus avec q_{O_2} ; K_T décroît même très légèrement alors que q_{O_2} augmente ; avec des valeurs similaires de X , q_{O_2} et K_T , mais sans ajout d'antimousse, K_T évolue avec q_{O_2} dans la culture *E. coli* A (Figure 40a).

Avec 100 ppm d'antimousse, Yoshida et Yagi (1975) n'observent pas non plus d'accélération due à la consommation d'oxygène sur une culture de *Candida tropicalis*. (Cependant il semble que les conditions rassemblées dans le réacteur agité de Yoshida et Yagi (1975) ne conduisent pas à une valeur de E_{qO_2} supérieure à 1, même en l'absence d'antimousse: $K_L a = 0,03 \text{ s}^{-1}$, $q_{O_2} = 0,035 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$).

Il est conclu, avec Yoshida et Yagi (1977), que le contrôle qu'exerce l'antimousse sur le transfert en culture cellulaire est plus fort que le contrôle que peut exercer la biomasse active par l'accélération due à la consommation d'oxygène.

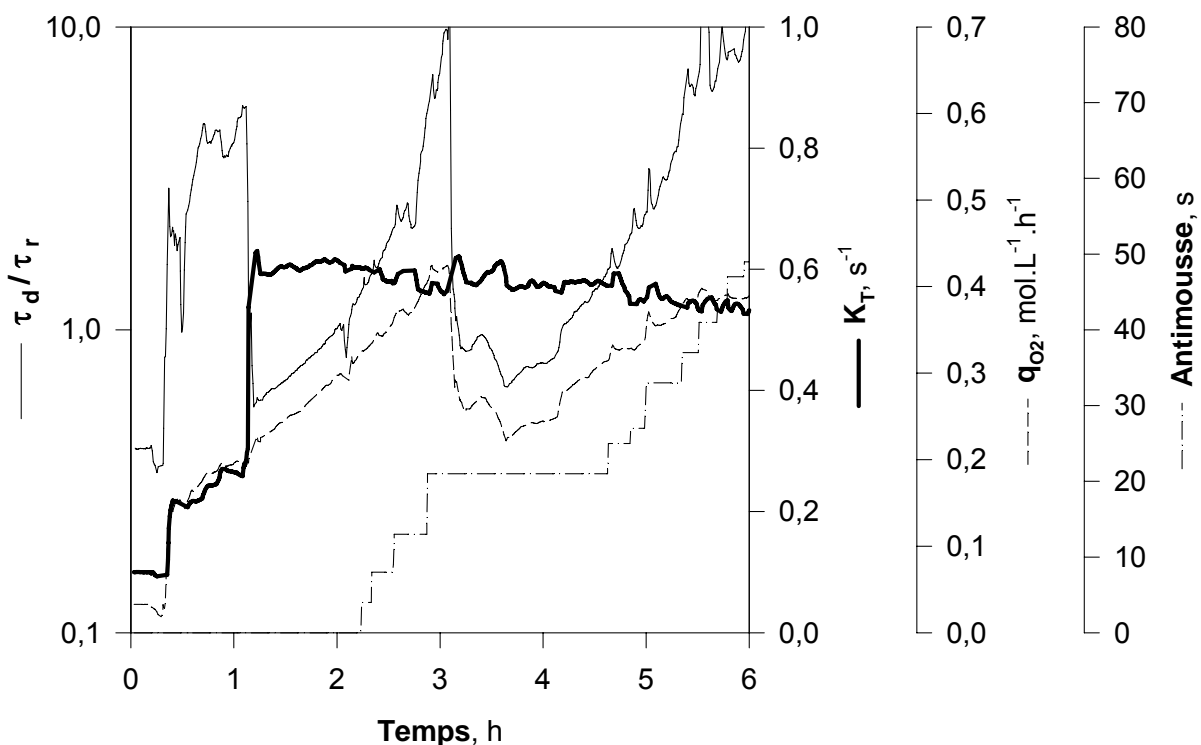


Figure 53. Effet de l'antimousse sur l'accélération du transfert d'oxygène due à la respiration. Culture *E. coli* E (conditions de culture en annexe VI.7.2). K_T coefficient de transfert d'oxygène ; q_{O_2} consommation volumique d'oxygène ; l'antimousse ajouté est donné en fonction du temps de marche de la pompe.

III.3.3.10. Contrôle visqueux du transfert : modèle d'étude *Aspergillus niger*

Les résultats d'une culture fed-batch d'*A. niger* sont présentés Figure 54 afin d'étudier l'influence de la viscosité cellulaire sur le transfert d'oxygène.

La phase 1 commence par une phase batch de 12 h, puis par une phase à taux de croissance maintenu constant ($\mu = 0,07 \text{ h}^{-1}$) par ajout contrôlé de substrat limitant (solution de glucose) de manière exponentielle. La phase 2 commence à $t = 55 \text{ h}$ lorsque le substrat est

alimenté à flux constant à 65 g.h^{-1} . Le taux de conversion du substrat en biomasse est constant durant la culture : $Y_{X/S}=0,16 \text{ g}_{\text{MS}}/\text{g}$. Ainsi, la concentration en biomasse peut être modélisée le long de la culture :

$$X^m = \frac{X_0 + Y_{X/S}S_T}{V_L} \quad (124)$$

où la concentration en biomasse à la fin de la phase batch, X_0 , peut être estimée à $20 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$, et S_T est la masse totale de solution de substrat ajoutée. La concentration en biomasse atteint $30 \text{ g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$ à la fin de la phase 1, ce qui correspond à la valeur de la consommation volumique d'oxygène la plus élevée : $q_{\text{O}_2}=0,06 \text{ mol}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. La vitesse superficielle de l'air est constante durant toute la culture, $U_s=0,35 \text{ cm}.\text{s}^{-1}$, et la vitesse d'agitation est augmentée de 150 à 700 rpm à $t=13 \text{ h}$ (Figure 54B).

La vitesse d'agitation et l'aération étant maintenus constants, à des valeurs où l'entraînement de surface est négligeable ($N \leq 700 \text{ rpm}$), les variations de K_T sont à corrélérer aux modifications induites par la croissance microbienne. De $t=13 \text{ h}$ à $t=35 \text{ h}$ les valeurs de K_T sont cependant très imprécises, compte tenu des valeurs de $d\text{O}_2$ proches de la saturation.

Au cours des 13 premières heures de culture, les valeurs de K_T passent de $0,004$ à $0,008 \text{ s}^{-1}$. Bien que le ratio τ_d/τ_r soit très supérieur à 1 durant cette période, la très faible valeur de q_{O_2} ($<0,006 \text{ mol}.\text{L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) rendrait $E_{q_{\text{O}_2}}$ négligeable. Le doublement des valeurs de K_T serait donc provoqué par des modifications chimiques du milieu.

Au cours de la culture cellulaire, la viscosité apparente du milieu augmente de 1 à 380 cp (Figure 54C). Les observations microscopiques (microscope optique $\times 100$) montrent que la morphologie des microorganismes ne change pas et est essentiellement composée d'hyphe isolés comptant de zéro à trois branches. A partir des mesures il est possible de proposer la modélisation suivante de la viscosité du moût μ_X^m (en cp) en fonction de la concentration en biomasse (X en $\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$) (Figure 54C) :

$$\mu_X = 0,013X^{2,77} \quad (125)$$

De $t=45 \text{ h}$ jusqu'à la fin de la culture, K_T décroît. La décroissance commence lorsque $\mu_X=50 \text{ cp}$ (conformément à van't Riet et Tramper, 1991 ; (Figure 5) et s'accroît avec l'augmentation de la viscosité du moût : K_T est alors proportionnel à $\mu_X^{-0,5}$, conformément à Garcia-Ochoa et Gomez (2004).

Le transfert d'oxygène passe sous le « contrôle de la viscosité du milieu » : sur le schéma théorique du transfert d'oxygène en culture cellulaire (Figure 1) il est possible que la résistance principale au transfert se situe majoritairement à l'interface (4), mais

l'augmentation de la viscosité apparente donne de l'importance au phénomène macroscopique de mélange et donc la résistance (5) n'est plus à négliger.

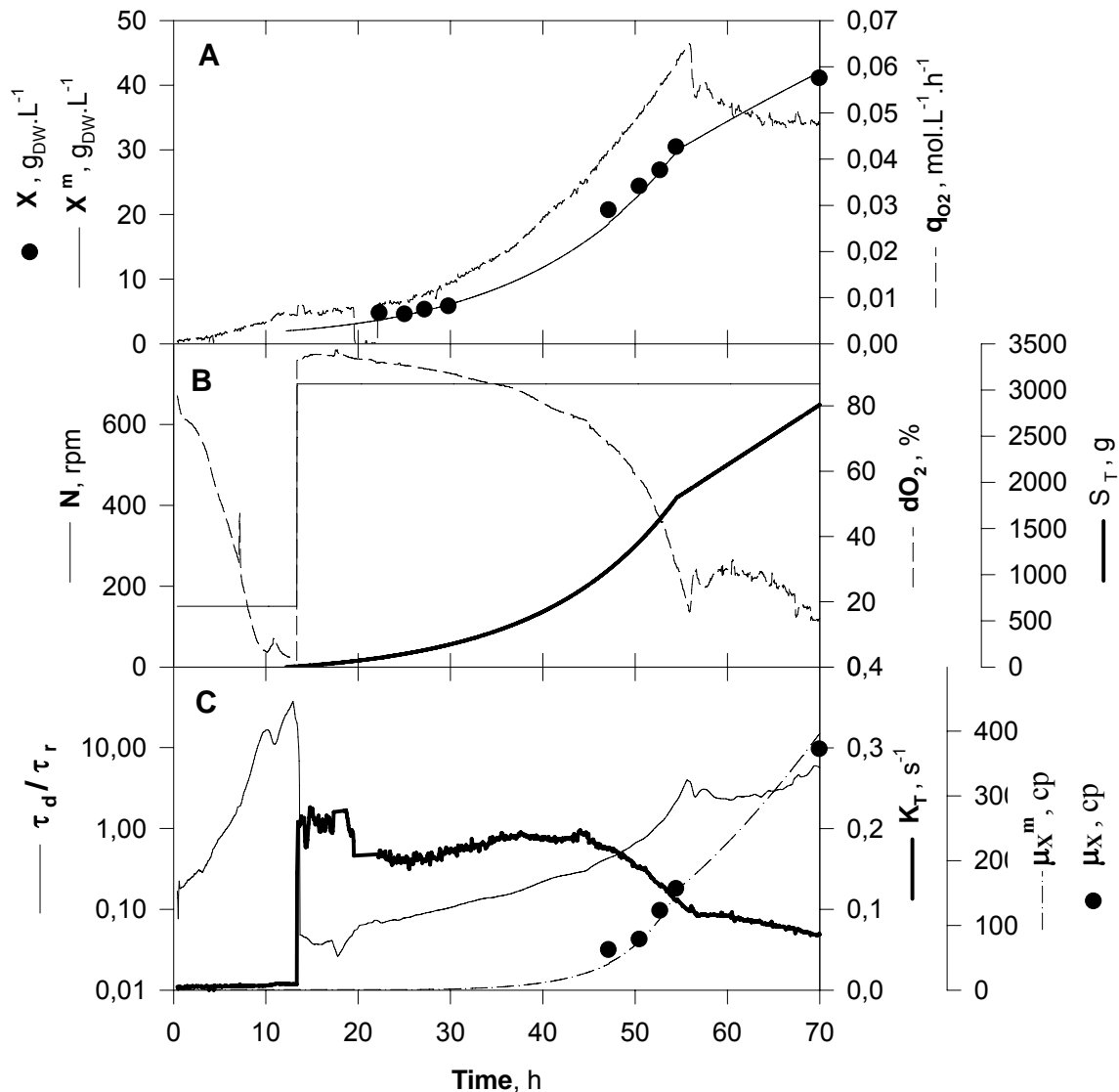


Figure 54. Culture fed-batch d'*Aspergillus niger*.

A) Croissance cellulaire : concentration en biomasse, mesurée expérimentalement, X , et calculée à partir du modèle Eq. 124, X^m ; consommation volumique d'oxygène q_{O_2} .

B) Paramètres de contrôle : vitesse d'agitation N ; oxygène dissous dO_2 ; masse de substrat (glucose) ajoutée S_T . $T=34^\circ\text{C}$, $P=1\text{ atm}$.

C) Transfert d'oxygène : ratio τ_d/τ_r ; coefficient de transfert d'oxygène K_T ; viscosité mesurée μ_X et modélisée à partir de Eq. 125, μ_X^m .

III.3.4. Analyse de la détermination de K_T

K_T est déterminé par la méthode BG à partir d'un bilan matière sur l'oxygène gazeux du réacteur. Réécrivons le bilan matière permettant la détermination de K_T (Eq. 91) sous la forme :

$$K_T = \frac{R}{\Delta} \quad (126)$$

où R est un terme de consommation volumique d'oxygène ($\text{mol.L}^{-1}.\text{s}^{-1}$), et Δ le potentiel de transfert (mol.L^{-1}). Alors que R est mesuré, Δ est estimé en fonction des hypothèses décrivant l'hydrodynamique du réacteur. Peut-on affiner la détermination de K_T en y intégrant les effets d'entraînement de surface, de ventilation du CO_2 , et les dynamiques physico-biologiques?

III.3.4.1. Modification de l'écoulement gazeux par entraînement de surface

L'évolution de l'efficacité du transfert d'oxygène réalisé par le réacteur (Eq. 127) est présentée sur la Figure 55 pour la culture *E. coli* B. L'efficacité du transfert d'oxygène est calculée par:

$$\text{Eff}_{\text{O}_2} = (n_{\text{O}_2}^{\text{in}} - n_{\text{O}_2}^{\text{out}}) / n_{\text{O}_2}^{\text{in}} \quad (127)$$

où $n_{\text{O}_2}^{\text{in}}$ est le flux molaire d'oxygène entrant dans le réacteur et $n_{\text{O}_2}^{\text{out}}$ le flux sortant.

Il apparaît que Eff_{O_2} évolue entre 2% en début de culture et 95 % à $t=5,8$ h, ce qui signifie que la presque totalité de l'oxygène injecté bénéficie aux bactéries, tout en maintenant une concentration en oxygène dissous supérieure à la concentration critique. Alors que Poughon et coll. (2003) signalent, dans une configuration de réacteur proche de la notre et en présence de consommation d'oxygène, que le « profil gazeux importe peu car dans la majorité des cas la composition du gaz à l'entrée est proche de sa composition à la sortie », le profil gazeux est extrêmement changeant dans nos cultures ce qui a des répercussions immédiates sur la valeur et l'évolution de K_T .

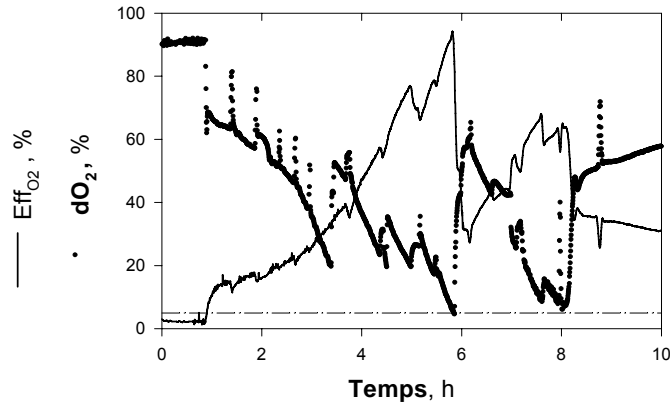


Figure 55. Efficacité du transfert d'oxygène lors d'une culture d'*E. coli* (*E. coli* B ; Figure 36d). Efficacité de l'utilisation de l'oxygène Eff_{O_2} (Eq. 127), oxygène dissous dO_2 .

L'aération de surface qui est ignorée dans le calcul de K_T (Eq. 91) peut-elle expliquer les variations de K_T à e et U_s constants (Figure 41) ? Posons pour y répondre les hypothèses suivantes :

1/ L'aération de surface peut être modélisée par le modèle ME5.

2/ La valeur de $y_{O_2}^{off1}$ peut s'exprimer en fonction de $y_{O_2}^{off}$ en introduisant la fonction r qui exprime le taux de recyclage de l'oxygène assuré par l'entraînement de surface :

$$r = \frac{y_{O_2}^{off1} - y_{O_2}^{off}}{y_{O_2}^{off}}$$

où $y_{O_2}^{off1}$ désigne la concentration en oxygène dans le gaz en sortie de le système défini par la phase dispersée issue du diffuseur, et $y_{O_2}^{off}$ la concentration apparente en sortie de la phase dispersée, telle qu'elle est estimée par un bilan gazeux sur l'oxygène contenu dans le système défini par le ciel en négligeant l'entraînement de surface ($y_{O_2}^{off1} > y_{O_2}^{off}$).

K_T est alors considéré alors comme une valeur « apparente », et le phénomène réel de transfert est décrit par l'équation suivante :

$$K_L a_d \Delta_1 + K_L a_e \Delta_2 = R \quad (128)$$

où Δ_1 est une moyenne logarithmique entre le potentiel à l'entrée du réacteur et le potentiel en sortie de la phase dispersée issue du diffuseur, c'est-à-dire en rapport avec la concentration $y_{O_2}^{off1}$. Le système définit par Eq. 126 et Eq. 128 permet d'écrire :

$$K_T \frac{y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^{off}}{\ln\left(\frac{y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^B}{y_{O_2}^{off} - y_{O_2}^B}\right)} = K_{L,a_d} \frac{y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^{off1}}{\ln\left(\frac{y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^B}{y_{O_2}^{off1} - y_{O_2}^B}\right)} + K_{L,a_e} (y_{O_2}^{out} - y_{O_2}^B)$$

Et finalement K_T peut être exprimé en fonction de K_{L,a_d} , K_{L,a_e} , et des concentrations gazeuses :

$$K_T = d1.K_{L,a_d} + d2.K_{L,a_e} \quad (129)$$

Les fonctions $d1$ et $d2$ calculées pendant la culture *E. coli* A sont présentées sur la Figure 56. Trois valeurs de r sont fixées arbitrairement : 5%, 10% et 20%. La fonction r décrivant le taux de recyclage, il est possible d'envisager que c'est une fonction de e et Us . La fonction r est donc constante à e et Us constants, mais en début de culture, alors qu'une faible puissance dissipée est injectée dans le réacteur, r est proche de 5%, pour augmenter en cours de culture, peut être jusqu'à 20% à forte puissance dissipée.

Il apparaît que la dérivé des fonctions $d1$ et $d2$ est de signe opposé à celle de K_T , à e et Us constants. Et donc les potentiels de transfert pris en compte par l'entraînement de surface ne permettent pas de définir des valeurs de K_{L,a_d} et K_{L,a_e} constantes à e et Us constants, au contraire, la variation de ses valeurs à e et Us constants serait plus forte que ne l'est actuellement K_T . Conformément à la littérature (Galaction et coll., 2004), il peut donc être supposée que l'influence de l'aération de surface est réduite en culture cellulaire et donc que les valeurs de r et de K_{L,a_e} sont faibles. Il est cependant difficile de prédire avec certitude l'influence de l'aération de surface, car elle varie avec les propriétés du liquide et la hauteur de la suspension au dessus de la turbine supérieure, paramètres qui n'ont pas été étudiés.

Notons de plus que la différence de potentiel d'échange à la surface libre du liquide (entre le liquide et le ciel) est la différence de potentiel utilisé dans l'hypothèse de l'homogénéité de la phase dispersée ($y_{O_2}^{off} = y_{O_2}^{out}$). L'évolution de la fonction $d2$ montre que cette hypothèse conduirait aussi à des variations de la valeur de K_T , à e et Us constants, plus prononcées qu'avec l'utilisation du modèle piston.

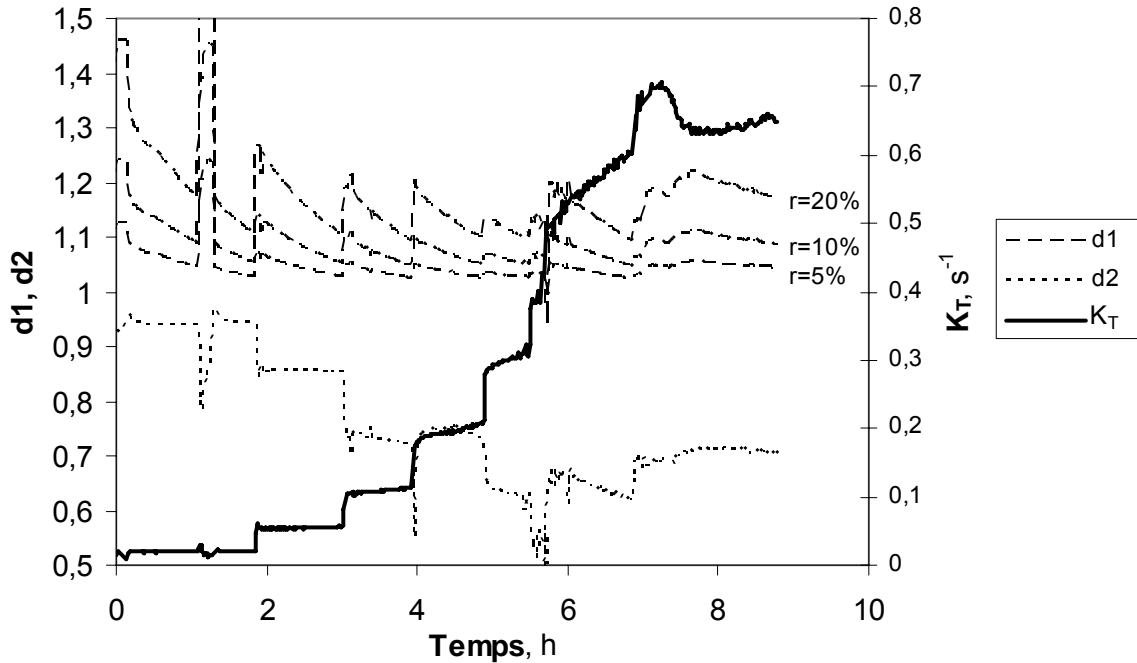


Figure 56. Evolution comparée des fonctions d_1 et d_2 (Eq. 129) et du coefficient de transfert K_T durant la culture *E. coli* A.

III.3.4.2. Modification de l'écoulement gazeux par la ventilation du CO_2

Pour les cultures cellulaires en phase de croissance oxydative, en terme de flux molaire la consommation d'oxygène équivaut à la production de dioxyde de carbone. Quel est l'impact du CO_2 produit sur le transfert de l'oxygène ? La littérature fait état des effets du CO_2 sur la morphologie, suivi des effets de la morphologie sur $K_L a$ (Ju et coll., 1991). L'influence directe du CO_2 sur le transfert de matière n'a jamais été étudiée en culture cellulaire.

Il est toutefois supposé que dans certaines réactions chimiques la production de microbulles dans la couche limite d'une bulle peut agiter l'interface de la bulle au moment de la coalescence au point d'accélérer le renouvellement de la couche limite et donc le transfert global (Shah et coll., 1974 ; Linek et coll., 1996).

Un autre élément est contenu dans la réponse à la question : quel est le mécanisme de ventilation du CO_2 en culture cellulaire agitée et aérée ? En cuve non-agitée (conditions de production de bière), des bulles de CO_2 sont produites par nucléation spontanée hétérogène : elles quittent leur site de nucléation lorsqu'elles atteignent $50 \mu m$ de diamètre, ensuite leur diamètre croît pour atteindre environ $250 \mu m$ après une course de 30 cm (Delente et coll., 1969). En cuve agitée et aérée, après un temps nécessaire à la saturation du milieu par le CO_2 ,

les cultures cellulaires peuvent devenir sursaturées (Dahod, 1993). En culture agitée et aérée on peut donc supposer deux mécanismes de ventilation du CO₂ fonctionnant en parallèle : ou bien le CO₂ dissous passe dans une bulle d'air (hypothèse de ventilation v1), ou bien des bulles de CO₂ pur nucléent (v2), conduisant à une population mixte de bulles d'air macroscopiques et de bulles de CO₂ microscopiques. Si il y a nucléation, les bulles de CO₂ ainsi formées peuvent soit coalescer avec les bulles d'air (v2a), soit rejoindre la surface (v2b).

Ces réflexions suscitent l'étude de l'accélération du transfert par nucléation de CO₂, et l'étude des influences des hypothèses de ventilation sur la quantification de K_T.

a) Accélération du transfert d'oxygène par nucléation du CO₂

On observe dans le gaz de sortie du réacteur un pic de CO₂ à chaque incrément de l'agitation. Sachant que la concentration du CO₂ dans le liquide est supérieure à celle de l'équilibre il est possible que le CO₂ nucléé spontanément, le surplus énergétique apporté par l'incrément d'agitation provoquant la nucléation. Dans le cas où l'hypothèse v2a compterait de manière conséquente dans la ventilation du CO₂ par rapport aux autres hypothèses de ventilation, quel serait l'impact des microbulles de CO₂ sur la diffusion de l'oxygène contenu dans les bulles d'air ?

Une série d'expériences a été menée de manière à mesurer K_La en réacteur agité par la méthode dynamique, tout en introduisant simultanément des microbulles générées en dehors du réacteur. Il n'a pas été possible d'introduire des microbulles de CO₂, dans le réacteur car celles-ci coalescent dans les cinq premiers centimètres après la sortie du saturateur, pour se stabiliser autour d'un diamètre de 3 à 5 mm. Les expériences ont donc été réalisées avec des microbulles d'azote. Le flux de microbulles étant difficilement ajustable, les expériences sont réalisées dans deux réacteurs différents, de 20 et de 2 L ; le changement d'échelle devant permettre de multiplier par 10 la quantité de microbulles par rapport au volume de liquide.

Le modèle utilisé pour calculer K_La dans ces conditions est basé sur le modèle MP+mb (III.1.5.1), complété en considérant la phase aqueuse comme système ouvert (dilution par le flux Q_L constitué de la phase aqueuse porteuse des microbulles; soutirage pour maintenir V_L constant) et en utilisant les hypothèses suivantes :

H 18 : Le volume relatif des microbulles sur le volume total de gaz dispersé, V_{mb}/V_G , est constant durant la réoxygénation.

H 19 : La fraction volumique mb_c des microbulles coalesce avec les bulles d'air (contrairement à H 15). Cette fraction est estimée par le calcul.

Aucune accélération du transfert d'oxygène due à la présence des microbulles d'azote n'a été observée, ni en réacteur de 20L, ni en réacteur de 2L. Cependant les résultats de l'identification paramétrique permettant d'accéder à la valeur de $K_L a$ et de mb_c sont difficilement appréciables à cause des paramètres V_{mb}/V_G et mb_c dont les valeurs n'ont pas été mesurées expérimentalement. Notons également que notre configuration expérimentale se différencie de la littérature car les microbulles n'ont pas été produites dans la couche limite, mais à l'extérieur de celle-ci. La situation serait-elle différente avec une forte concentration de microorganisme produisant du CO_2 dans les couches limites des interfaces gaz-liquide ?

b) Influence des hypothèses de ventilation sur le potentiel de transfert

Les hypothèses de ventilation v1 et v2a conduisent à la dilution des bulles d'air par le CO_2 produit ; en régime permanent la concentration en oxygène des bulles d'air qui sortent de la phase dispersée est alors calculée comme suit :

$$y_{O_2}^{off} = \frac{p_{O_2}}{P} \frac{1}{RT} \quad (130)$$

où p_{O_2} est la pression partielle en oxygène dans le ciel gazeux, et P la pression totale. La concentration $y_{O_2}^{off}$ intervient dans le calcul du potentiel de transfert (Eq. 96). L'hypothèse v2b, décrit l'épuisement de l'oxygène des bulles d'air, sans dilution par le CO_2 produit, lequel rejoint le ciel gazeux sans coalescer. La concentration $y_{O_2, v2b}^{off}$ calculée d'après cette hypothèse est supérieure à celle précédemment calculée :

$$y_{O_2, v2b}^{off} = \frac{p_{O_2}}{p_{N_2} + p_{O_2} + p_{Ar}} \frac{1}{RT} \quad (131)$$

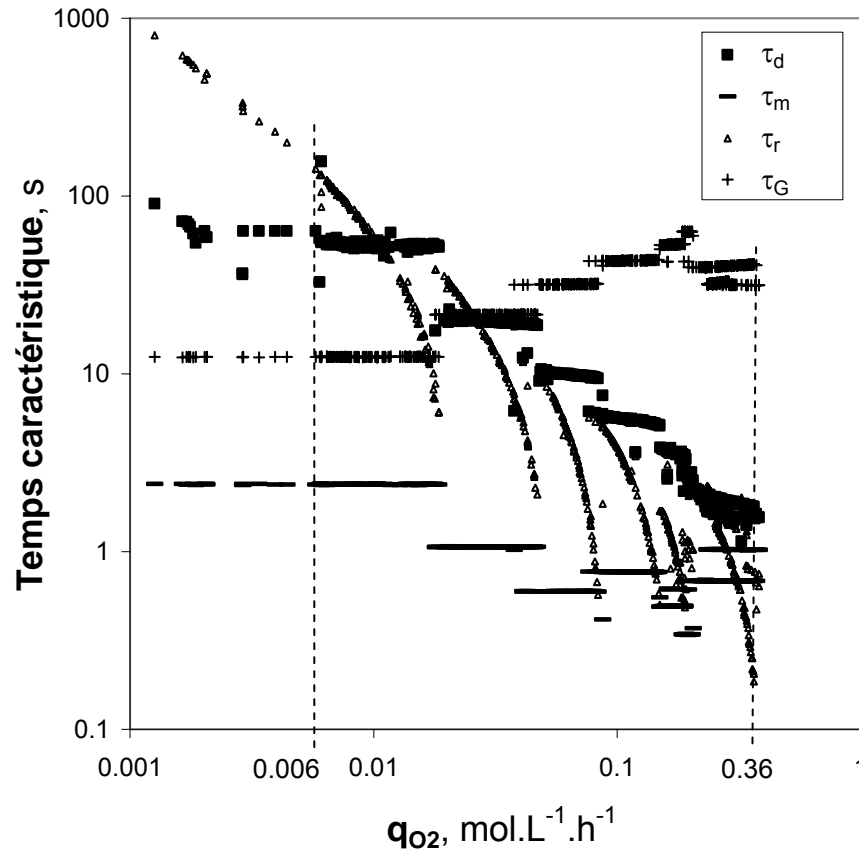
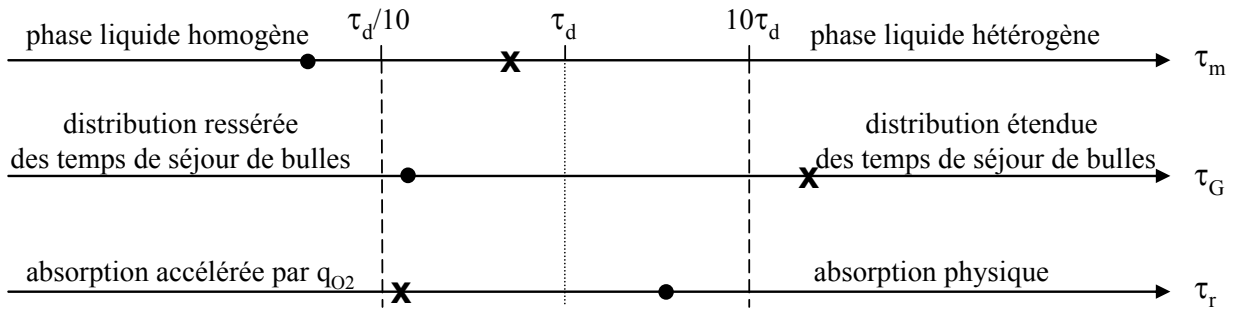
Si K_T est calculé à partir de $y_{O_2}^{off}$ et $K_{T, v2b}$ à partir de $y_{O_2, v2b}^{off}$, le rapport $K_T/K_{T, v2b}$ est compris entre 1,01 et 1,1 pour *E. coli* A et *S. cerevisiae* G.

Les travaux de Strub (2005) ont montré que dans nos conditions, la sursaturation du milieu de culture était faible, ce qui ne permet pas d'envisager une ventilation importante par le mécanisme de nucléation spontanée. L'hypothèse de ventilation v1 est donc favorisée. Mais le mécanisme de ventilation réel est certainement une combinaison de toutes les hypothèses de ventilation considérées.

III.3.4.3. Influence des dynamiques physico-biologiques

La Figure 57 présente les temps caractéristiques τ_d (temps de diffusion), τ_m (temps de mélange), τ_r (temps de réaction) et τ_G (temps de passage du gaz) calculés d'après les définitions du Tableau 9 au cours de la culture *E. coli* A, et portés en fonction de la consommation volumique d'oxygène q_{O_2} , choisie comme paramètre caractéristique de l'évolution des cultures intensives. Les temps de mélange τ_m présentés ont été calculés par le modèle de Vasconcelos et coll. (1995), établi dans une configuration multi-turbine proche de la notre. Les valeurs de τ_m ainsi calculées sont en accord avec les mesures de vérification obtenues dans notre réacteur par la méthode de la sonde conductimétrique (Linek et coll., 1996).

Deux situations extrêmes issues de la Figure 57 sont détaillées: la première située au début de la phase 1 de la culture ($q_{O_2}=0,006 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à $t=0,2 \text{ h}$) ne correspond pas aux conditions de culture intensive, alors que la deuxième, située à la fin de la phase 1 ($q_{O_2}=0,36 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ à $t=6,8 \text{ h}$), leur correspond. Les temps caractéristiques déterminés dans ces deux situations sont comparés aux temps caractéristiques de la diffusion sur la Figure 58, conformément à la Figure 10.


 Figure 57. Temps caractéristiques calculés au cours de la culture *E. coli* A.

 Figure 58. Comparaison des temps caractéristiques entre le début ($q_{O_2}=0,006 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, ●) et la fin ($q_{O_2}=0,36 \text{ mol.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$, X) de la phase 1 dans la culture *E. coli* A, d'après la Figure 57.

Aux vues des temps caractéristiques du bioréacteur, il apparaît sur la Figure 58 que le réacteur fonctionne en début de culture de manière idéale : la phase liquide est homogène, la distribution des temps de séjour des bulles de gaz est resserrée ce qui permet de considérer la phase gazeuse homogène, et l'absorption est physique.

Entre le début et la fin de la phase 1, les ordres de grandeur des rapports τ_d / τ_G , τ_d / τ_r , τ_r / τ_G et τ_r / τ_m sont inversés, ce qui traduit un bouleversement de l'ensemble des phénomènes physiques et biologiques qui interagissent avec le transfert d'oxygène. L'étude de la Figure 57

montre que les différentes influences auxquelles est soumis le transfert d'oxygène ne cessent de fluctuer en cours de culture. Ajoutons que les modifications macroscopiques du milieu dues à la présence de biomasse active, caractérisées par le temps τ_B (Figure 10), se développent également et influencent aussi le transfert. L'étude des temps caractéristiques montre que l'intensification de la cultures pousse vers la perte de l'homogénéité du liquide (accroissement des ratios τ_m / τ_r , τ_d / τ_r et τ_m / τ_d) et vers la perte de l'homogénéité du gaz (accroissement des ratios τ_G / τ_r , τ_G / τ_m et τ_G / τ_d).

Ces considérations incitent à l'utilisation de modèles structurés pour la phase liquide (Schmalzriedt et coll., 2002) (I.1.6.2), et de modèles faisant intervenir la distribution des temps de séjour des bulles pour la phase gaz (Midoux et coll., 1980).

Cependant il apparaît que le temps caractéristique de la diffusion, à partir duquel nous étudions les influences du système sur K_T , est lui-même défini en fonction de K_T ($\tau_d=1/K_T$), or nous avons vu que K_T était susceptible de varier d'un facteur 1 à 8 ($E_{chem}=0,25$ et $E_{qO_2}=2$). Dans ces conditions, quelle crédibilité accorder à l'étude des temps caractéristiques? L'influence des phénomènes physico-biologiques sur le transfert devrait pouvoir être étudié à partir d'un temps caractéristique de la diffusion défini indépendamment de K_T et des différentes dynamiques du système, soit $\tau_d=1/(K_{La})_{ref}$; mais quelle milieu de référence choisir, et dans quelle configuration effectuer sa détermination?

Faces à ces considérations, l'utilisation du modèle que nous utilisons actuellement ne suffit-il pas, à condition d'être lucide par rapport aux limites qu'il peut rencontrer en culture intensive?

III.3.5. Conclusions

Des cultures de *S. cerevisiae* et de *E. coli* (réalisées par L. Faure et J.-L. Uribelarrea) ont été utilisées comme modèle d'étude non visqueux, des cultures d'*A. niger* (réalisées à DSM) comme modèle d'étude visqueux. Toutes les cultures ont été cultivées en mode fed-batch jusqu'à des concentrations dépassant les 40 g.L⁻¹, afin d'élucider les effets de la biomasse et de son activité sur le transfert d'oxygène.

➤ Les valeurs de concentration en biomasse, de consommation volumique d'oxygène, et de coefficient de transfert d'oxygène K_T obtenues dans nos cultures (Tableau 15) sont 5 à 10 fois plus élevées que celles rapportées dans la littérature sur le transfert d'oxygène (Tableau 4).

➤ L'évolution de K_T en cours de culture ne peut pas être corrélée par : $K_T = \chi \cdot e^\alpha \cdot U_S^\beta$, ce qui remet en question, en condition de culture microbienne intensive, ou bien cette corrélation, ou bien la détermination de K_T .

➤ Il est observé que la dynamique microbienne exerce une influence sur le transfert d'oxygène : dans les moûts de culture les valeurs de K_T et de K_L en cours de culture sont 4 à 6 fois plus petites que dans les milieux minéraux constitués des principaux sels des milieux de culture.

➤ Une interprétation des différences entre les valeurs déterminées en milieu biologique (surnageant de culture ou moût de culture) et celles déterminées dans le milieu minéral constitué des principaux sels du milieu de culture est recherchée par des facteurs d'accélération, conformément à la corrélation de Sundararajan et Ju (1993) :

$$K_T = (K_L a)_{\text{ref}} \times E_{\text{chem}} \times E_{\text{pp}} \times E_{\text{qO}_2}$$

où $(K_L a)_{\text{ref}}$ ne dépend que de e et de U_S conformément à la description du coefficient de transfert en milieu minéral reporté dans le chapitre 0.

L'influence des modifications chimiques sur le transfert d'oxygène apparaît dès les premiers instants après ensemencement, en réduisant nettement le transfert par rapport au milieu constitué des principaux sels du milieu de culture ($E_{\text{chem}}=0,25$). Certaines modifications chimiques du milieu permettant aussi une légère augmentation du transfert d'oxygène durant le cours de la culture. Globalement, le moût de culture se comporte vis-à-vis du transfert comme une solution non-coalescente ionique additionnée de surfactants.

La présence physique des particules semble avoir peu d'effet.

Des valeurs de E_{qO_2} aussi élevées que 2 sont évaluées. Ce résultat est tout à fait original par rapport à la littérature, qui ne prévoit pas d'accélération en réacteur agité (Merchuck, 1977).

Il ressort que les trois types d'accélération doivent être considérés pour comprendre l'évolution de K_T , et que l'influence respective des différentes accélérations évolue en cours de culture. Une quantification précise de ces différentes influences nécessite des investigations complémentaires, comme la distribution de taille de bulles.

➤ Les effets sur le transfert d'oxygène induits par l'ajout d'antimousse, ou par l'augmentation de la viscosité cellulaire chez *A. niger*, sont prépondérants par rapport aux mécanismes biologiques d'accélération.

➤ Le complément d'étude sur la détermination de K_T montre que :

- l'influence de l'entraînement de surface est réduite en condition de culture cellulaire, sans doute à cause de la présence de mousses et d'une rétention gazeuse importante.
- la ventilation du CO_2 ne semble pas accélérer le transfert de l'oxygène, et il est supposé que cette ventilation s'effectue principalement par diffusion du CO_2 dissous vers les bulles d'air.
- les interactions entre phénomènes physiques et biologiques au sein du bioréacteur sont tangibles et la maîtrise des bioprocédés intensifs passe par la maîtrise de ses interactions.

IV. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

CONCLUSIONS

L'ensemble de ce travail contribue à la compréhension des phénomènes relatifs au transfert de gaz en condition de culture microbienne intensive.

L'étude bibliographique révèle qu'en complément du schéma du transfert d'oxygène en culture microbienne proposé par d'Arnold et Steel (1958) (Figure 1), des théories, parfois contradictoires, dessinent un schéma beaucoup plus complexe de la réalité du transfert gazeux dans les moûts de culture. Il apparaît aussi que le transfert gazeux en condition de culture microbienne est étudié dans des situations d'école (eau pure, réacteur idéal, faibles concentrations cellulaires, faibles puissances dissipées) qui ne représentent pas les problèmes rencontrés en production intensive, et parallèlement, que la transposition des problématiques de la littérature vers des situations de forte productivité peut ouvrir des champs d'investigation originaux.

Des modèles non-structurés du transfert d'oxygène dans le réacteur sont développés. Ils considèrent la phase gazeuse dispersée par le diffuseur comme étant homogène de composition ou s'écoulant de manière piston, et prennent en compte l'entraînement de surface et l'existence d'une rétention gazeuse permanente.

Ces modèles, alliés à des méthodes expérimentales dynamiques (réoxygénation) ou statiques (bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite), permettent la détermination de $K_L a$ en milieux minéraux de référence.

En milieu coalescent :

- A faible puissance dissipée, pour $e < 4000 \text{ W.m}^{-3}$ (correspondant aux vitesses d'agitation ne permettant pas l'entraînement de surface), les valeurs de $K_L a$ obtenues par le modèle décrivant l'écoulement piston du gaz sont plus proches de la littérature que de celles obtenues par le modèle décrivant l'homogénéité du gaz.

- A forte puissance dissipée, pour $4000 < e < 35000 \text{ W.m}^{-3}$ (correspondant aux vitesses d'agitation permettant l'entraînement de surface), les corrélations de la littérature, établies pour $e \leq 3000 \text{ W.m}^{-3}$, sont extrapolées. Sur ce domaine, seuls certains des modèles prenant en compte l'entraînement de surface gardent une cohérence avec la littérature, en particulier le modèle ME5 qui décrit l'écoulement piston du gaz dispersé par le diffuseur et les échanges par diffusion entre le ciel gazeux et le liquide. **Par rapport à la littérature, le modèle ME5 a l'avantage de permettre la détermination de $K_L a$ en condition d'entraînement de surface et d'aération simultanée par le diffuseur, à des puissances dissipées jusqu'à dix fois**

supérieures à celles communément étudiées, tout en permettant de conserver la même simplicité expérimentale qu'en l'absence d'entraînement de surface.

En milieu non-coalescent :

– A faible puissance dissipée, la méthode expérimentale statique donne des valeurs de K_{La} cohérentes avec la littérature, plus proches de la littérature avec le modèle d'écoulement piston du gaz qu'avec le modèle de composition homogène, alors que les valeurs obtenues par la méthode dynamique s'écartent de la littérature pour $e > 1000 \text{ W.m}^{-3}$.

– A forte puissance dissipée, aucun des modèles testés ne permet d'obtenir des valeurs de K_{La} cohérentes avec la littérature ; il est supposé que les modèles testés ne représentent pas correctement le schéma hydrodynamique du réacteur.

A l'issue de cette étude le modèle d'écoulement piston est adopté pour représenter l'écoulement du gaz dispersé par le diffuseur dans le réacteur, et **des corrélations décrivant l'évolution de K_{La} en fonction de e sont déterminées, spécifiques à la configuration du réacteur, en milieux minéraux de référence (coalescent et non-coalescent), pour $300 < e < 35000 \text{ W.m}^{-3}$ c'est-à-dire en dehors du domaine de la littérature.**

Les cultures cellulaires utilisées comme modèle d'étude se démarquent de la littérature sur le transfert d'oxygène par des concentrations en biomasses, des consommations volumiques d'oxygène et des valeurs du coefficient de transfert de 5 à 10 fois plus élevées. Ces études, menées en conditions réelles de culture et dans un champ de contrainte visant les hautes productivités, permettent une transposition industrielle.

Le transfert d'oxygène sur les moûts de culture et sur les surnageants associés est comparé au transfert d'oxygène caractérisé sur les milieux minéraux de référence. Par rapport aux principaux sels du milieu initial avant inoculation, la rétention gazeuse sur les moûts de culture et sur les surnageants associés est 1,5 fois plus élevée, et les valeurs du coefficient de transfert K_T et de la conductance de transfert $K_{L,b}$ sont entre 4 et 6 fois plus petites. La présence de biomasse influe donc sur les conditions du transfert :

– Les modifications chimiques du milieu sont indéniables : **par rapport au transfert d'oxygène, le milieu biologique peut être représenté par un milieu non-coalescent ionique additionné de surfactants, et non par de l'eau pure comme cela est souvent pratiqué.**

– L'influence de la présence physique des particules est mal définie.

– **L'accélération due à la consommation de l'oxygène, mentionnée ici pour la première fois en réacteur agité, et ce parce que des conditions réelles de culture intensive**

sont utilisées, pourrait augmenter la valeur de K_{La} par 2 et ne serait donc pas à négliger dans le dimensionnement des bioréacteurs.

L'ensemble de la littérature proposant des études du transfert d'oxygène dans les bioréacteurs avec des mesures effectuées en milieux minéraux doit donc être considérée avec intelligence si une transposition en conditions réelles de culture est prévue.

La démarche et les outils d'investigation pour quantifier, modéliser et comprendre les phénomènes du transfert d'oxygène en culture microbienne relèvent de compétences interdisciplinaires du génie des procédés et du génie microbiologique. Ce travail présente des résultats originaux dans des domaines d'investigation peu explorés à ce jour et d'un intérêt majeur pour leur exploitation industrielle, pointe les limites des outils théoriques et expérimentaux utilisés pour appréhender la complexité des moules de culture –milieux polyphasiques, évolutifs, et indéfinis– et ouvre la voie vers d'autres chantiers d'investigation.

PERSPECTIVES

La difficulté à estimer correctement K_{La} apporte une question : pourquoi ne pas étudier le réacteur en terme de flux molaire ($\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$) plutôt qu'en terme de K_{La} ? Le choix du flux molaire permettrait de ne travailler qu'avec des données mesurées, sans émettre d'hypothèse sur l'écoulement de la phase gazeuse, source principale d'erreur dans la détermination de K_{La} . Cette démarche est peu pratiquée (Matsumura et coll., 1979), d'une part parce que sa mise en œuvre nécessite un transfert en régime permanent, d'autre part parce qu'elle ne renseigne pas sur la facilité avec laquelle est effectué le transfert (car cette information est confondue avec la différence de potentiel d'échange), et ne permet donc pas le dimensionnement d'appareils. Le premier prolongement de cette étude serait donc de caractériser plus précisément l'écoulement gazeux dans le réacteur. Bien que le modèle d'écoulement piston ait été préféré au modèle homogène, la question n'a pas été clairement tranchée. L'étude des distributions de temps de séjour des bulles (André et coll., 1981) serait une vérification possible.

Un autre prolongement direct consisterait à lever les relations d'interdépendance des couples de variables K_T et τ_D , K_T et $K_{L,b}$, K_T et E_{qO_2} , utilisés pour justifier les valeurs des facteurs d'accélération. En effet, les évolutions de K_T sont expliquées à partir des variables τ_D , $K_{L,b}$ et E_{qO_2} , or ces variables sont elles-mêmes calculées à partir de K_T . Ces vérifications nécessitent de nouvelles mesures et de nouvelles expériences, nous proposons en outre :

– une mesure de E_{qO_2} en chemostat (plutôt que par Eq. 123, fonction de K_L , donc de K_T) : l'expérience consisterait à atteindre une concentration en biomasse par une stratégie efficace (le mode fed-batch pour les hautes concentrations), puis de stabiliser la culture à e , U_s et X constants. De là, plusieurs valeurs de q_{O_2} pourraient être testées en fonction de l'alimentation en substrat : la mesure de K_T en ligne rendrait alors la relation entre E_{qO_2} ($=K_T/K_L a_{ref}$) et q_{O_2} évidente.

– la mesure de la distribution des tailles de bulles : elle permettrait d'évaluer précisément l'aire interfaciale pour vérifier la relation $K_T=K_L \times a$, en milieux minéraux et biologique, et apporter une validation supplémentaire des valeurs calculées, surtout à forte puissance dissipée. Cette mesure permettrait aussi de connaître la taille réelle des bulles en milieu biologique comparé aux milieux contenant des surfactants (Eq. 121) et donc de réduire l'erreur principale pesant sur l'évaluation de E_{qO_2} (Figure 50). Enfin, la mesure de la distribution des tailles de bulles en fonction de la puissance dissipée permettrait de mieux comprendre l'effet de la troisième turbine sur le transfert (III.2.2).

En supplément de ces vérifications directes de notre travail, deux voies d'investigation ont été abordées au cours de nos recherches de manière exploratoire et pourraient être poursuivies suite aux résultats préliminaires encourageants : l'observation directe des interfaces par le microscope in-situ, et la détermination de l'accélération E_{qO_2} par une méthode au forane.

➤ Microscopie in-situ

L'essentiel des mécanismes de contrôle du transfert de gaz en culture microbienne se localisent dans l'interface gaz-liquide. Actuellement l'observation des interfaces gaz-liquide se limite à l'observation de bulles maintenues dans un écoulement laminaire (Paaschen et Lübbert, 1997), où d'interfaces planes non agitées (Tsao et Lee, 1975). En réacteur agité, ni la topographie des interfaces, ni la dynamique des éléments de fluides et des particules en interaction avec les interfaces n'a pu être observés, en particulier à cause du déficit technologique que cela représente.

Les nouvelles technologies de microscopie in-situ (matériel et méthodes : Annexe VI.8.1) devraient permettre l'observation de bulles en régime turbulent en condition normales de cultures microbiennes. Nous avons réalisé des premiers tests à l'aide du microscope développé par Hajo Suhr (Camisard et coll., 2002). Les attentes ont été grandes, les résultats décevants.

Les observations ont été réalisées sur des levures *S. cerevisiae* lyophilisées resuspendues (Lesaffre) et sur une culture d'*E. coli*. A cause de problèmes d'étanchéité le microscope n'a pas pu être stérilisé. Il apparaît que des levures adhèrent aux interfaces de bulles (Figure 59A). L'observation tend à se confirmer aussi pour *E. coli* mais la taille des microorganismes ($1 \times 2 \mu\text{m}$) ne permet pas une observation précise (Figure 59B). Aux concentrations utilisées et dans les conditions expérimentales, aucune surabondance des microorganismes aux interfaces n'est observée. Le microscope in-situ a aussi été utilisé dans l'espoir d'observer des microbulles de CO_2 en condition de fermentation alcoolique chez la levure. Nos questions étaient d'évaluer la taille des microbulles, et de savoir si la nucléation pouvait être initiée sur les levures elles mêmes. Aucune microbulle n'a pu être observée.

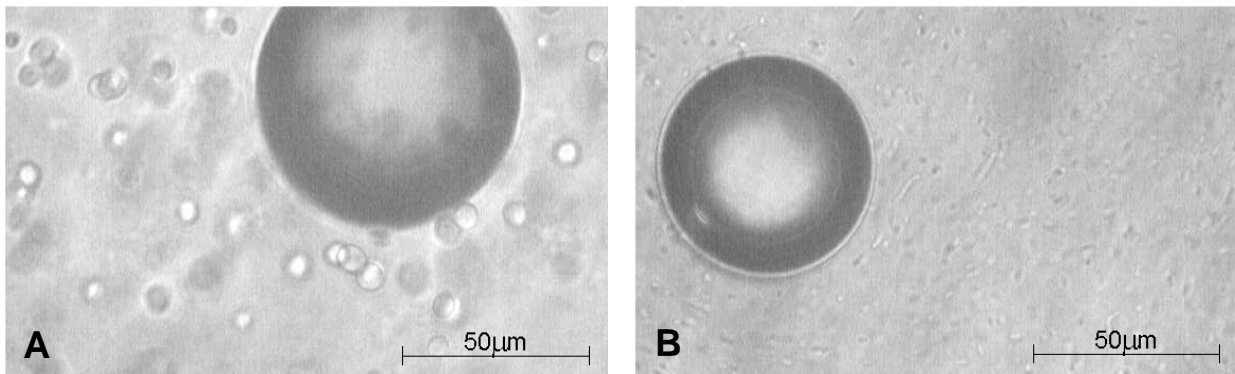


Figure 59. Observation au microscope in-situ d'interfaces de bulles en culture microbienne. **A** Levures lyophilisées resuspendues, **B** culture d'*E. coli*.

Le microscope actuel possède un autre inconvénient : la zone d'observation est loin des conditions de culture. Elle se situe en effet entre deux plans parallèles distants de $300 \mu\text{m}$ (constitués d'un côté par la diode, et de l'autre la fenêtre d'observation ; Figure 61), et constituant donc une zone d'écoulement qui ne représente pas la turbulence du système. Une nouvelle technologie avec éclairage non plus en vis-à-vis mais collatéral devrait permettre d'observer réellement le cœur de la culture, et à des concentrations supérieures à $20 \text{ g}_{\text{MS}} \cdot \text{L}^{-1}$.

Les observations devraient permettre de compléter les connaissances sur les affinités entre les cellules et les bulles.

➤ Détermination de $K_{\text{L}}a$ par la méthode au forane

La méthode de mesure de $K_{\text{L}}a$ au gaz traceur est connue, mais sa mise en œuvre telle qu'elle est décrite dans la littérature n'est pas applicable aux cultures microbiennes. En effet Pedersen et coll. (1994) utilisent du Krypton radioactif, et Boumansour et Vassel (1998) du propane : ces gaz peuvent être toxiques pour la biomasse. L'intérêt de ces méthodes est la

détermination de E_{qO_2} (Eq. 70 où $K_{La_{pp}}$ est la mesure réalisée par la méthode au gaz traceur, en condition de culture normale, le forane n'étant pas consommé).

Le forane (R134a, utilisé en réfrigération) a été choisi dans notre étude car il est non consommé et non toxique, d'autre part il est suffisamment soluble ($0,9 \text{ g.L}^{-1}$) pour permettre l'obtention d'un signal conséquent avec l'injection d'une petite quantité de liquide saturé (50 mL), enfin le coefficient de diffusion du forane est proche de celui de l'oxygène ce qui permet d'obtenir des valeurs de K_{La} du même ordre de grandeur.

Les réponses aux pulses de forane en phase liquide (matériel et méthodes : annexe VI.8.2) sont mal différenciables les unes des autres (Figure 60). La forme des réponses est d'autre part très proche de celle obtenue pour un pulse gazeux (courbe notée « ref ») : les pics obtenus reflètent surtout la dilution dans le ciel et caractérisent mal la vitesse de transfert. Dans nos conditions, le temps caractéristique correspondant au lavage du ciel vaut $V_c/Q_s=87 \text{ s}$, qui est au moins cent fois supérieur au temps caractéristique de la diffusion, $1/K_{La}$, or ces deux phénomènes sont additionnés dans le signal : l'extraction de la valeur de K_{La} est alors impossible. Pour améliorer la précision de la détermination de K_{La} il faudrait réduire le volume du ciel, ce qui est très délicat en culture microbienne à cause des mousses. La raison pour laquelle les pics de forane sont moins importants en milieu salin qu'en eau pure est inconnue ; peut être du forane stagne-t-il dans la phase dispersée sous forme de rétention permanente, et un lent relargage le rendrait indétectable.

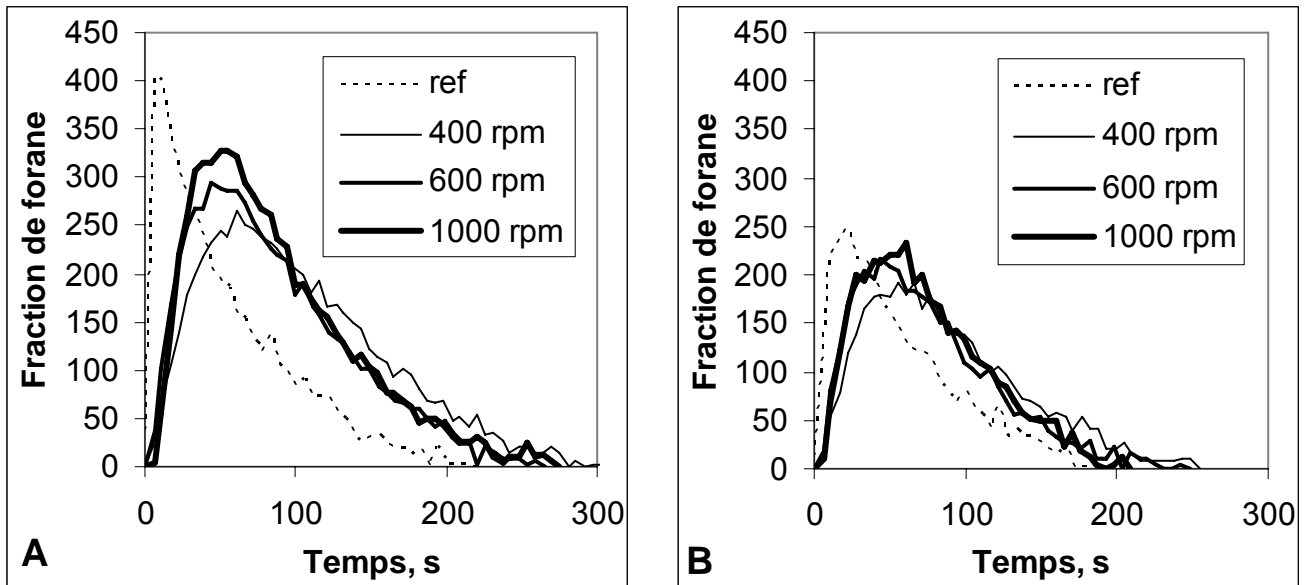


Figure 60. Dynamique de la réponse à un pulse de forane en fonction de l'agitation. **A** eau pure, **B** Na_2SO_4 50 g.L^{-1} . La référence ref est un pulse de 10 mL gazeux introduit dans le ciel gazeux. Pour $N=400, 600,$ et 1000 rpm , un pulse de forane correspondant à 10 mL gazeux (45 mg) est introduit sous forme soluble. La fraction détectée est une fraction relative. $Q_d=0,146 \text{ L.s}^{-1}$, $V_L=10 \text{ L}$, $T=37^\circ\text{C}$, $P=0,3 \text{ bar}$.

Bien qu'inutilisable avec la configuration actuelle du réacteur, le forane semble offrir des potentialités de gaz traceur.

Enfin, de part sa généralité, cette étude est transposable à d'autres applications, comme l'étude de la ventilation du CO₂, l'autre gaz de grande importance en culture cellulaire. Les effets du CO₂ sur les cultures intensives doivent être considérés avec sérieux : la pression partielle en CO₂ dans le ciel du réacteur de la culture *E. coli* B atteint 0,25 bar à t=5,8 h, alors que les premiers effets sur la croissance de la plupart des microorganismes unicellulaires d'intérêt industriel surviennent à partir de 0,15-0,2 bar (Jones et Greenfield, 1982). Les pressions de CO₂ sont accrues à cause de la pression hydrostatique à la base de fermenteurs industriels de très grande taille (Chen et Gutmanis, 1976 ; McIntyre et McNeil, 1998), en particulier en condition d'aération réduite. Cependant les méthodes permettant la mesure du CO₂ dissous en culture cellulaire sont encore à améliorer.

L'ensemble du travail effectué invite à revoir, en condition de culture cellulaire intensive, le mécanisme de transfert tel qu'il apparaît fréquemment dans le schéma simplifié d'Arnold et Steel (1958) (Figure 1). En particulier, la compréhension des interactions entre l'activité biologique et le transfert d'oxygène est fondamentale pour atteindre des hautes performances et pour permettre l'innovation des procédés microbiologiques et l'accès à des performances optimales.

V. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aiba, S., Humphrey, A.E., Millis, N.F. (1973).** Aeration and agitation, in *Biochemical Engineering*, second edition. Academic press, New York, p. 163-194.
- Allen, D.G. and Robinson, C.W. (1990).** Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths, *Chem. Engng. Sci.*, 45, 37-48.
- Aldiguier (2006).** Activité bio-catalytique en haute densité cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* pour l'intensification de la production de bio-éthanol. Thèse n°820, INSA-Toulouse, 265 pp.
- Alves, S.S., Maia, C.I., Vasconcelos, J.M.T. (2004).** Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tanks interpreted through bubble contamination kinetics. *Chemical Engineering and Processing*, 43, 823-830.
- Alves, S.S., Maia, C.I., Vasconcelos, J.M.T., Serralheiro, A.J. (2002).** Bubble size in aerated stirred tanks. *Chemical Engineering Journal*, 89, 109-117.
- André, G., Moo-Young, M., Robinson, C.W. (1981).** Improved method for the dynamic measurement of mass transfer coefficient for application to solid-substrate fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 1611-1622.
- Andrews, G.F., Fonta, J.P., Marrotta, E., Stroeve, P. (1984).** The effects of cells on oxygen transfer coefficients / II: analysis of enhancement mechanisms, *Chem. Eng. J.*, 29, B47-B55.
- Arnold, BH and Steel, R. (1958).** Oxygen supply and demand in aerobic fermentations. In *Biochemical Engineering*, R. Steel, Ed, Heywood & Co., Ltd., London, 328 pp.
- Badino Jr., A.C., Facciotti, M.C.R., Schmidell, W. (2001).** Volumetric oxygen transfer coefficient (kLa) in batch cultivations involving non-Newtonian broths. *Biochemical Engineering Journal*, 8, 111-119.
- Bandyopadhyay, B., Humphrey, A.E., Taguchi, H. (1967).** Dynamic measurement of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation systems. *Biotechnology and Bioengineering*, 9, 533-544.
- Bartholomew, W.H., Karow, E.O., Sfat, M.R., Wilhelm, R.H. (1950).** Oxygen transfer and agitation in submerged fermentations – Mass transfer of oxygen in submerged fermentation of *Streptomyces griseus*. *Industrial and Engineering Chemistry*, 42, 1801-1809.
- Beenackers, A.A.C.M. and Van Swaaij, W.P.M. (1993).** Review article number 42, Mass transfer in gas-liquid slurry reactors, *Chem. Engng. Sci.*, 48, 3109-3139.
- Benedek, A., Heideger, W.J. (1971).** Effect of additives on mass transfer in turbine aeration. *Biotechnology and Bioengineering*, 13, 663-684.
- Bird, R.B., Stewart, W.E., Lightfoot, E.N. (1960).** Transport phenomena. John Wiley & Sons, New York, pp 780.
- Bouaifi, M., Hébrard, G., Bastoul, D., Roustan, M. (2001).** A comparative study of gas hold-up, bubble size, interfacial area and mass transfer coefficients in stirred gas-liquid reactors and bubble columns. *Chemical Engineering and Processing*, 40, 97-111.

Boumansour, B.-E., Vasel, J.-L. (1996). Potentialités d'utilisation des gaz traceurs. *Tribune de l'eau*, 5-6/96, 69-81.

Boumansour, B.-E., Vasel, J.-L. (1998). A new tracer gas method to measure oxygen transfer and enhancement factor on RBC. *Water Research*, 32, 1049-1058.

Boyd, J.V., Mitchell, J.R., Irons, L., Musselwhite, P.R. and Sherman, P. (1973). The mechanical properties of milk protein films spread at the air-water interface, *J. Colloid Interface Sci.*, 45, 478-486.

Brilman, D.W.F., Goldschmidt, M.J.V., Versteeg, G.F., van Swaaij, W.P.M. (2000). Heterogeneous mass transfer models for gas absorption in multiphase systems. *Chemical Engineering Science*, 55, 2793-2812.

Brilman, D.W.F., van Swaaij, W.P.M., Versteeg, G.F. (1998). A one-dimensional instationary heterogeneous mass transfer model for gas absorption in multiphase systems. *Chemical Engineering and Processing*, 37, 471-488.

Burns, S.E., Yiacoumi, S., Tsouris, C. (1997). Microbubble generation for environmental and industrial separations, *Separation and Purification Technology*, 11, 221-232.

Bylund, F., Collet, E., Enfors, S.-O., Larsson, G. (1998). Substrate gradient formation in the large-scale bioreactor lowers cell yield and increases by-product formation, *Bioprocess Engineering*, 18, 171-180.

Bylund, F., Guillard, F., Enfors, S.-O., Trägårdh, C., Larsson, G. (1999). Scale down of recombinant protein production: a comparative study of scaling performance, *Bioprocess Engineering*, 20, 377-389.

Camisard, V., Brienne, J.P., Baussart, H., Hammann, J., Suhr, H. (2002). Inline characterisation of cell-concentration and cell-volume in agitated bioreactors using in situ microscopy: application to volume variation induced by osmotic stress, *Biotechnology and Bioengineering*, 78, 73-80.

Calderbank, P.H. (1958). Physical rate processes in industrial fermentation. Part I: The interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation, *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, 36, 443-463.

Calderbank, P.H. (1958). Physical rate processes in industrial fermentation. Part I: the interfacial area in gas-liquid contacting with mechanical agitation. *Trans. Instn. Chem. Engrs*, 36, 443-463.

Calderbank, P.H. (1959). Physical rate processes in industrial fermentation. Part II: Mass transfer coefficients in gas-liquid contacting with and without mechanical agitation, *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, 37, 173-185.

Carbajal, R.I., Tecante, A. (2004). On the applicability of the dynamic pressure step method for k_La determination in stirred newtonian and non-newtonian fluids, culture media and fermentation broths. *Biochemical Engineering Journal*, 18, 185-192.

- Castan, A., Näsman, A., Enfors, S.-O. (2002).** Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology*, 30, 847-854.
- Chandrasekharan, K., Calderbank, P.H. (1980).** The evaluation of mass transfer product from unsteady-state absorption/desorption. *Chemical Engineering Science*, 35, 1477-1480.
- Chapman, C. M., Gibilaro L. G., Nienow, A. W. (1982).** A dynamic response technique for the estimation of gas—liquid mass transfer coefficients in a stirred vessel. *Chemical Engineering Science*, 37, 891-896.
- Chapman, C. M., Nienow, A. W., Middleton, J.C. (1980).** Surface aeration in small, agitated, and sparged vessel. *Biotechnology and bioengineering*, 22, 981-993.
- Chen, S.L. and Gutmanis, F. (1976).** Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production, *Biotechnol. Bioeng.*, 18, 1455-1462.
- Chisti, Y. and Jauregui-Haza, U.J. (2002).** Oxygen transfer and mixing in mechanically agitated airlift bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 10, 143-153.
- Dahod, S.K. (1993).** Dissolved carbon dioxide measurement and its correlation with operating parameters in fermentation processes. *Biotechnology Progress*, 9, 655-660.
- Danckwerts, P.V. (1951).** Significance of liquid-film coefficients in gas absorption, *Ind. Eng. Chem.*, 43, 1460-1467.
- Danckwerts, P.V. (1970).** Gas-liquid reactions. New York: Mc Graw-Hill. 275pp.
- Dang, N.D.P., Karrer, D.A., Dunn, I.J. (1977).** Oxygen transfer coefficients by dynamic model moment analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 19, 853-865.
- Delente, J., Akin, C., Krabbe, E., Ladenburg K. (1969).** Fluid dynamics of anaerobic fermentation, *Biotechnol. Bioeng*, 11, 631.
- Desplanches, H., Chevalier, J.-L. (2006).** Mélange des milieux pâteux de rhéologie complexe. *Théorie. Techniques de l'Ingénieur*, J 3 860.
- Dumont, E. and Delmas, H. (2003).** Mass transfer enhancement of gas absorption in oil-in-water systems: a review, *Chemical Engineering and Processing*, 42, 419-438.
- Einstein, A. (1906).** Eine neue Bestimmung der Moleküldimensionen. *Annalen der Physic*, 19, 289-306.
- Egli, T. et Fiechter, A. (1981)** Theoretical Analysis of Media Used in the Growth of Yeasts on Methanol. *Journal of General Microbiology* 124, 365-369.
- Faure Laetitia (2002).** Optimisation de la production de lipase recombinante chez *Yarrowia lipolytica*, DEA, INSA Toulouse, France.
- Frössling (1938).** Über die Verdunstung fallender Tropfen, *Beitr. Geophys.* 52, 170-216.

- Galaction, A.-I., Cascaval, D., Oniscu, C., Turnea, M. (2004).** Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, 20, 85-94.
- Galindo, E., Pacek, A.W., Nienow, A.W. (2000).** Study of drop and bubble sizes in a simulated mycelial fermentation broth of up to four phases, *Biotechnol. Bioeng.*, 69, 213-221.
- Ganesh, K., Joshi, J. B., Sawant, S.B. (2000).** Cellulase deactivation in a stirred reactor, *Biochemical Engineering Journal*, 4, 137-141.
- Ganesh, K., Joshi, J.B., Sawant, S.B. (2000).** Cellulase deactivation in a stirred reactor, *Biochemical Engineering Journal*, 4, 137-141.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E. (2004).** Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, 59, 2489-2501.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E. (2005).** Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 92, 761-772.
- Gibilaro, L.G., Davies, S.N., Cooke, M., Lynch, P.M., Middleton, J.C. (1985).** Initial response analysis of mass transfer in a gas sparged stirred vessel. *Chemical Engineering Science*, 40, 1811-1816.
- Gogate, P.R., Pandit, A.B. (1999).** Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 7-15.
- Heijnen, J.J., van't Riet, K., Wolthuis, A.J. (1980).** Influence of very small bubbles on the dynamic k_{La} measurement in viscous gas-liquid systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1945-1956.
- Hickman, A.D. (1988).** Gas-liquid oxygen transfer and scale-up. A novel experimental technique with results for mass transfer in aerated agitated vessels. 6th European Conference on Mixing, Pavia, Italy, 24-26 May, 369-374.
- Higbie, R. (1935).** The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Trans. A.I.Ch.E.*, 31, 365-389.
- Hikita, H. and Asai, S. (1964).** Gas absorption with (m,n)-th order irreversible chemical reaction, *International Chemical Engineering*, 4, 332-340.
- Hinze, J.O. (1955).** Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion process, *AIChE J.*, 1, 289-295.
- Ho, C.S., Ju, L.-K. (1988).** Effects of microorganisms on effective oxygen diffusion coefficients and solubilities in fermentation media. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 313-325.
- Ho, C.S., Stalker, M.J., Baddour, R.F. (1987).** The oxygen transfer coefficient in aerated stirred reactor and its correlation with oxygen diffusion coefficients, *Biotechnology Processes: scale-up and mixing*, Chester et Oldshue edituers, pp. 85-95, AIChE, New York.

- Hudcova, V., Machon, V., Nienow, A.W. (1989).** Gas-liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers. *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 617-628.
- Hughmark, G.A. (1980).** Power requirements and interfacial area in gas-liquid turbine agitated systems, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 19, 638-641.
- Jin, Z. and Cen, P., 2004.** Improved production of spiramycin by mutant *Streptomyces ambofaciens*, *Journal of Zhejiang University SCIENCE*, 5(6), 689-695.
- Jones, R.P., Greenfield, P.F. (1982).** Review: Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme Microb. Technol.*, 4, 210-223.
- Jorge M. T. Vasconcelos and S. S. Alves (1991).** Direct dynamic k_{La} measurement in viscous fermentation broths - the residual gas hold-up problem, *The Chemical Engineering Journal*, 47, B35-B44.
- Ju, L.-K., Ho, C.S., Shanahan, J.F. (1991).** Effects of carbon dioxide on the rheological behavior and oxygen transfer in submerged Penicillin fermentations, *Biotechnol. Bioeng.*, 38, 1223.
- Ju, L.-K., Lee, J. F., Armingier, W. B. (1991).** Enhancing oxygen transfer in bioreactors by perfluorocarbon emulsions. *Biotechnol. Prog.*, 7, 323-329.
- Ju, L.-K., Sundararajan, A. (1992).** Model analysis of biological oxygen transfer enhancement in surface aerated bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1343-1352.
- Ju, L.-K., Sundararajan, A. (1994).** The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors: physical presence of cells as solid particles. *The Chemical Engineering Journal*, 56, B15-B21.
- Ju, L.-K. and Sundararajan, A. (1995).** The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors. *Bioprocess Engineering*, 13, 271-278.
- Ju, Lu-Kwang and Sundararajan, A. (1994).** The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors: physical presence of cells as solid particles, *Chem. Eng. J.*, 56, B15-B21.
- Junker, B.H. (2004).** Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 347-364.
- Kamen, A. A., Garnier, A., André, G., Archambault, J., Chavarie, C. (1995).** Determination of mass transfer parameters in surface aerated bioreactors with bubble entrainment. *The Chemical Engineering Journal and the Biochemical Engineering Journal*, 59, 187-193.
- Kavanaugh, M.C. and Trussell, R.R. (1980).** Design of aeration towers to strip volatile contaminants from drinking water. *Journal - American Water Works Association*, 1980, 72, 684-692.
- Kawase, Y. and Moo-Young, M. (1990).** Liquid-phase mass transfer coefficient in slurry bubble column reactors: theory and experimental data in simulated fermentation media, *Chem. Eng. Comm.*, 96, 177-192.

- Kawase, Y. and Moo-Young, M. (1991).** Oxygen transfer in slurry bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 960-966.
- Kawase, Y., Shimizu, K., Takada, S. (1997).** Gas hold-up and gas-liquid mass transfer in three phase stirred tank bioreactors with simulated non-newtonian fermentation broths, 4th international conference on bioreactors and bioprocess fluid dynamics, ed. A.W. Nienow, MEP, London UK, 434pp.
- Kawase, Y., Shimizu, K., Takada, S. (1997).** Gas hold-up and gas-liquid mass transfer in three phase stirred tank bioreactors with simulated non-newtonian fermentation broths. 4th international conference on bioreactor and bioprocess fluid dynamics, 351-359.
- Keitel, G. and Onken, U. (1982).** The effect of solutes on bubble size in air-water dispersions, *Chem. Eng. Comm.*, 17, 85-98.
- Konstantinov, K., Kishimoto, M., Seki, T., Yoshida T. (1990).** A balanced DO-stat and its application to the control of acetic acid excretion by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 750-758.
- Lamont, J.C. and Scott, D.S. (1970).** An eddy cell model of mass transfer into the surface of a turbulent liquid. *American Institute of Chemical Engineering Journal*, 16, 512-519.
- Larsson, G. and Enfors, S.-O. (1988).** Studies of insufficient mixing in bioreactors: effects of limiting oxygen concentrations and short term oxygen starvation on *Penicillium chrysogenum*, *Bioprocess Engineering*, 3, 123-127.
- Lee, Y.Y. and Tsao, G.T. (1972).** Oxygen absorption into glucose solution, *Chem. Engng. Sci.*, 27, 1601-1608.
- Lessard, R.R. and Zieminski, S.A. (1971).** Bubble coalescence and gas transfer in aqueous electrolytic solutions. *Ind. Eng. Chem. Fundam.*, 10, 260-269.
- Linek, V. and Beneš, P. (1977).** Communication to the editor/ Second response: enhancement of oxygen absorption in biological systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 565-573.
- Linek, V., Beneš, P., Hovorka, F. (1981).** The role of interphase nitrogen transport in the dynamic measurement of the overall volumetric mass transfer coefficient in air-sparged systems, *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 301-319.
- Linek, V., Beneš, P., Vacek, V. (1982).** Analysis of differences in $k_L a$ values by steady state and dynamic methods in stirred tanks. *The Chemical Engineering Journal*, 25, 77-88.
- Linek, V., Beneš, P., Vacek, V. (1988a).** Dynamic pressure method for $k_L a$ measurement in Large-scale bioreactors, *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 1406-1412.
- Linek, V., Beneš, P., Holeček, O. (1988b).** Correlation for volumetric mass transfer coefficient in mechanically agitated aerated vessel for oxygen absorption in aqueous electrolyte solution. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 482-490.
- Linek, V., Beneš, P., Sinkule, J. (1990).** Critical assessment of the steady-state Na_2SO_3 feeding method for $k_L a$ measurement in fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 766-770.

- Linek, V., Beneš, P., Vacek, V. (1989).** Dynamic pressure method for k_La measurement in large-scale bioreactors. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 1406-1412.
- Linek, V., Kordač, M., Fijasová, M., Moucha, T. (2004).** Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tanks interpreted through models of idealized eddy structure of turbulence in the bubble vicinity. *Chemical Engineering and Processing*, 43, 1511-1517.
- Linek, V., Kordač, M., Moucha, T. (2005).** Mechanism of mass transfer from bubbles in dispersions: Part II: Mass transfer coefficients in stirred gas-liquid reactor and bubble column. *Chemical Engineering and Processing*, 44, 121-130.
- Linek, V., Havelka, P., Sinkule, J. (1996).** Supersaturation effect in steady-state and dynamic methods for measuring k_La in gas-liquid dispersions. *Chemical Engineering Science*, 51, 5223-5226.
- Linek, V., Moucha, T., Douová, M., Sinkule, J. (1994).** Measurement of k_La by dynamic pressure method in pilot-plant fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 477-482.
- Linek, V., Moucha, T., Sinkule, J. (1996).** Gas-Liquid mass transfer in vessels stirred with multiple impellers – I. Gas-liquid mass transfer characteristics in individual stages. *Chemical Engineering Science*, 51, 3203-3212.
- Linek, V., Vacek, V., Beneš, P. (1987).** A critical review and experimental verification of the correct use of the dynamic method for the determination of oxygen transfer in aerated agitated vessels to water, electrolyte solutions and viscous liquids. *The Chemical Engineering Journal*, 34, 11-34.
- Loiez, A (2003).** Production de la levure de panification par biotechnologie. *Techniques de l'Ingénieur*, J6013.
- Lopes de Figueiredo, M. and Calderbank, P. (1979).** The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. *Chemical Engineering Science*, 34, 1333-1338.
- Madalasa Mohanty, R. S. Ghadge, N. S. Patil, S. B. Sawant, J. B. Joshi, A. V. Deshpande (2001).** Deactivation of lipase at gas-liquid interface in stirred vessel, *Chemical Engineering Science*, 56, 3401-3408.
- Mancini, M. and Moresi, M. (2000).** Rheological behaviour of baker's yeast suspensions, *Journal of Food Engineering*, 44, 225-231.
- Marrucci, G. and Nicodemo, L. (1967).** Coalescence of gas bubbles in aqueous solutions of inorganic electrolytes. *Chemical Engineering Science*, 22, 1257-1265.
- Matsumura, M., Masunaga, H., Kobayashi, J. (1977).** A correlation for flow rate of gas entrained from free liquid surface of aerated stirred tank, *J. Ferment. Technol.*, 55, 388-400.
- Matsumura, M., Masunaga, H., Kobayashi, J. (1979).** Gas absorption in an aerated stirred tank at high power input, *J. Ferment. Technol.*, 57, 107-116.
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997a).** Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60, *Enzyme Microb. Technol.*, 20, 135-142.

- McIntyre, M. and McNeil, B. (1997b).** Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* A60, *Enzyme Microb. Technol.*, 21, 479-483.
- McIntyre, M. and McNeil, B. (1998).** Morphometric and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi submerged cultivation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 291-298.
- Merchuk, J.C. (1977).** Further considerations on the enhancement factor for oxygen absorption into fermentation broth, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 1885-1889.
- Merchuk, J.C. and Asenjo, J.A. (1995).** Fundamentals of bioreactor design, in Merchuk, J.C., Asenjo, J.A. (Eds), *Bioreactor system design*. Marcel Dekker, New York, 139-205.
- Michel, B.J. and Miller S.A. (1962).** Power requirements of gas-liquid agitated system. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 8, 340-345.
- Midoux, N., Laurent, A., Charpentier, J.C. (1980).** Limits of the chemical method for the determination of physical mass transfer parameters in mechanically agitated gas-liquid reactors. *AIChE Journal*, 26, 157-162.
- Miller, G. L. (1959).** Use of dinitrosalicylic acid reagent for the determination of reducing sugars, *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
- Minkevich, I.G. and Neubert, M. (1985).** Influence of carbon dioxide solubility on the accuracy of measurements of carbon dioxide production rate by gas balance technique. *Acta Biotechnol.*, 5, 137-143.
- Monbouquette H.G. (1987).** Models for high cell density reactors must consider biomass volume fraction: cell recycle example. *Biotechnology and Bioengineering*, 29, 1075-1080.
- Montes, F.J., Catalán, J., Galán, M.A. (1999).** Prediction of k_La in yeast broths, *Process Biochemistry*, 34, 549-555.
- Morão, A., Maia, C.I., Fonseca, M.M.R., Vasconcelos, J.M.T., Alves, S.S. (1999).** Effect of antifoam addition on gas-liquid mass transfer in stirred fermenters. *Bioprocess Engineering*, 20, 165-172.
- Morchain, J. (2000).** Etude et modélisation des couplages entre cinétiques physiques et biologiques dans les réacteurs de grand volume, PhD thesis, INSA Toulouse. 219 pp.
- Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. (1990).** Biosynthesis and fuelling, in: Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Schaechter, M. (Eds.), *Physiology of the bacterial cell, a molecular approach*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, p. 143.
- Neubauer, P., Häggström, L., Enfors, S.-O. (1995).** Influence of substrate oscillations on acetate formation and growth field in *Escherichia coli* glucose limited fed-batch cultivations, *Biotechnology and bioengineering*, 47, 139-146.
- Ni, X., Gao, S., Cumming, R. H., Prichard, D. W. (1995).** A comparative study of mass transfer in yeast for a batch pulsed baffled bioreactor and a stirred tank fermenter, *Chemical Engineering Science*, 50, 2127-2136.

- Nienow, A.W. and Lilly, M.D. (1979).** Power drawn by multiple impellers in sparged agitated vessels, *Biotechnology and Bioengineering*, 21, 2341-2345.
- Nienow, A.W., Wisdom, D.J., Middleton, J.C. (1977).** The effect of scale and geometry on flooding, recirculation and power in gassed stirred vessels. 2nd Eur. Conf. on Mixing, 30th March 1977, Cambridge, England, Paper F1.
- Nocentini, M. (1990).** Mass transfer in gas-liquid, multiple-impeller stirred vessels: A discussion about experimental techniques for K_{La} measurement and models comparison, *Trans IChemE*, 68, 287-294.
- Oldshue, J.Y. (1980).** Mixing in hydrogenation processes. *Chem. Engng. Prog.*, 76, 60-64.
- Olmos Dichara (1997).** Dynamique de croissance de *Lactobacillus casei* et de production d'acide lactique dans différentes conditions de culture, PhD Thesis, INSA Toulouse, France.
- Paalme, T., Tiisma, K., Kahru, A., Vanatalu, K., Vilu, R. (1990).** Glucose-Limited fed-batch cultivation of *Escherichia coli* with computer-controlled fixed growth rate. *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 312-319.
- Paaschen, P. and Lübbert, A (1997).** New experimental results on the mass transfer from single oxygen bubbles into water as the liquid phase, 4th international conference on bioreactors and bioprocess fluid dynamics, ed. A.W. Nienow
- Pandit, A., Sawant, S.B., Joshi, J.B., Perkins, R.A., Sikdar, S.K. (1989).** Two phase aqueous extraction – Rheological properties of dextran, polyethylene glycol, bovine serum albumine and their mixtures, *Biotechnology Techniques*, 3, 125-130.
- Parag R. Gogate and Aniruddha B. Pandit (1999).** Survey of measurement techniques for gas-liquid mass transfer coefficient in bioreactors, *Biochemical Engineering Journal*, 4, 7-15.
- Pedersen A.G. (1997).** K_{La} characterization of industrial fermentors, 4th international conference on bioreactors and bioprocess fluid dynamics, ed. A.W. Nienow.
- Pedersen, A.G., Andersen, H., Nielsen, J., Villadsen, J. (1994).** A novel technique based on ^{85}Kr for quantification of gas-liquid mass transfer in bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 49, 803-810.
- Perry, R.H. and Green, D.W. éditeurs (1984).** Perry chemical engineers' handbook, sixth edition, McGraw-Hill Book Co., Singapore.
- Poizat, T., Jallut, C., Accary, A., Lieto, J. (1992).** A novel experimental technique for measurement of mass transfer between liquids and gas bubbles in agitated vessels: application to highly viscous liquids. *The Chemical Engineering Journal*, 48, 41-48.
- Ponasse, M., Dupre, V., Aurelle, Y., Secq, A. (1998).** Bubble formation by water release in nozzle-II. influence of various parameters on bubble size, *Water Research*, 32, 2498-2506.
- Popovic, M. (1979).** Oxygen solubilities in fermentation fluids. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 8, 1-15.

- Popovic, M., Papalexiou, A., Reuss, M. (1983).** Gas residence time distribution in stirred tank bioreactors. *Chemical Engineering Science*, 38, 2015-2025.
- Poughon, L., Duchez, D., Cornet, J.F., Dussap, C.G. (2003).** K_{La} determination: comparative study for a gas mass balance method. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 25, 341-348.
- Quicker, G., Schumpe, A., König, B., Deckwer, W.-D (1981).** Comparison of measured and calculated oxygen solubilities in fermentation media. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 635-650.
- Quicker, G., Schumpe, A., König, B., Deckwer, W.-D. (1981).** Comparison of measured and calculated oxygen solubilities in fermentation media. *Biotechnology and Bioengineering*, 23, 635-650.
- Rainer, B.W. (1990).** Determination methods of the volumetric oxygen transfer coefficient k_{La} in bioreactors. *Chemical and Biochemical Engineering*, 4, 185-196.
- Rainer, B.W. (1992).** Etude des performances d'aération des bioréacteurs au moyen d'un nouveau type d'hydroéjecteurs, Thèse, INSA Toulouse, France.
- Reuss, M. (1993).** Oxygen transfer and mixing: scale up implication. *Biotechnology*, 2nd edition, vol. 3 : Bioprocessing, Rehm and Reed, New York, 185-218.
- Reuss, M. (1995).** Stirred tank bioreactors, in Merchuk, J.C., Asenjo, J.A. (Eds), *Bioreactor system design*. Marcel Dekker, New York, pp. 224-252.
- Robinson, C.W. and Wilke, C.R. (1973).** Oxygen absorption in stirred tanks: a correlation for ionic strength effects. *Biotechnology and Bioengineering*, 15, 755-782.
- Roizard, C., Wild, G., Charpentier, J.-C. (1997).** Absorption avec réaction chimique, *Techniques de l'Ingénieur*, J1079.
- Rols, J.-L. (1990).** Etude des mécanismes de transfert gazeux en présence de vecteurs d'oxygène, cas des fermentations, Thèse, INSA Toulouse, France.
- Rols, J.L., Condoret, J.S., Fonade, C., Goma, G. (1990).** Mechanism of enhanced oxygen transfer in fermentation using emulsified oxygen-vectors, *Biotechnology and Bioengineering*, 35, 427-435.
- Roustan, M., Pharamond, J-C, Liné, A. (1997).** Agitation mélange, concepts théoriques de base. *Techniques de l'Ingénieur*, J3 800 , 1-22.
- Royce, P.N.C. and Thornhill, N.F. (1991).** Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. *AIChE Journal*, 37, 1680-1686.
- Ruchti, G., Dunn, I.J., Bourne, J.R. (1981).** Comparison of dynamic oxygen electrode methods for the measurement of K_{La} , *Biotechnol. Bioeng.*, 23, 277-290.
- Sablayrolles, J.M. et Barre, P. (1986).** Evolution de la solubilité de l'oxygène au cours de la fermentation alcoolique d'un moût de raisin. Etude sur milieux modèles. *Sciences des Aliments*, 6, 177-184.

- Sardeing, R., Painmanakul, P., Hebrard, G. (2006).** Effect of surfactants on liquid-side mass transfer coefficients in gas-liquid systems: A first step to modelling. *Chemical Engineering Science*, 61, 6249-6260.
- Schaper, R., de Haan, A.B., Smith J.M. (2002).** Temperature effects on the gas hold-up in agitated vessels. *Chemical Engineering Research and Design*, 80, 887-892.
- Schmalzriedt, S., Jenne, M., Mauch, K., Reuss, M. (2003).** Integration of physiology and fluid dynamics. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 19-68.
- Schumpe, A., Alder, I., Deckwer, W.-D. (1978).** Solubility of oxygen in electrolyte solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 145-150.
- Schumpe, A., Alder, I., Deckwer, W.-D. (1978).** Solubility of oxygen in electrolyte solutions. *Biotechnology and Bioengineering*, 20, 145-150.
- Sechenov, M. (ou SETCHÉNOW) (1892).** Action de l'acide carbonique sur les solutions des sels à acides forts ; Étude absorptiométrique. *Annales de chimie et de physique*, 25, 226-271.
- Shah, Y.T., Pangarkar, V.G., Sharma, M.M. (1974).** Criteria for supersaturation in gas-liquid reactions involving a volatile product. *Chemical Engineering Science*, 29, 1601-1612.
- Shioya, S. et Dunn, I.J. (1979).** Model comparisons for dynamic k_La measurements with incompletely mixed phases. *Chem. Engng Commun.*, 3, 41-52.
- Spriet, J.A., Botterman, J., De Buyser, D.R., De Visscher, P.L., Vandamme, E.J. (1982).** A computer-aided noninterfering on-line technique for monitoring oxygen-transfer characteristics during fermentation processes. *Biotechnology and Bioengineering*, 24, 1605-1621.
- Stenstorm, M.K. and Gilbert, R.G. (1981).** Review paper: Effects of alpha, beta, and theta factor upon the design, specification and operation of aeration systems, *Water Research*, 15, 643-654.
- Strub, C. (2005).** Master II, INSA Toulouse.
- Sundararajan, A., Ju, L.-K. (1993).** Biological oxygen transfer enhancement in bioreactors, *TransIChemE*, 71, partC, 221-23.
- Takahashi, K., McManamey, J., Nienow, A.W. (1992).** Bubble size distributions in impeller region in a gas-sparged vessel agitated by a Rushton turbine, *J. Chem.Eng.Japan*, 25, 427-432.
- Tsao, G.T. (1968).** Simultaneous gas-liquid interfacial oxygen absorption and biochemical oxidation, *Biotechnol. Bioeng.*, 10, 765-785.
- Tsao, G.T. (1969).** Simultaneous gas-liquid interfacial mass transfer and uptake by small particles, *Biotechnol. Bioeng.*, 11, 1071-1087.
- Tsao, G.T. (1970).** Oxygen absorption in microbiological systems of zero order reaction rate, *Biotechnol. Bioeng.*, 12, 51-61.

- Tsao, G.T. (1972).** The effect of carbonic anhydrase on carbon dioxide absorption, *Chem. Engng. Sci.*, **27**, 1593-1600.
- Tsao, G.T. (1978).** A further discussion on interfacial oxygen transfer in fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 157-158.
- Tsao, G.T. and Lee, D.D. (1975).** Oxygen transfer in fermentation, *AIChE J*, **21**, 979-985.
- Tsao, G.T., Mukerjee, A., Lee, Y.Y. (1972).** Gas-liquid-cell oxygen absorption in fermentation. *Proceedings of the IVth International Fermentation Symposium: Fermentation Technology Today*, 65-71.
- Uribe Larrea, J.-L., Pacaud, S., Goma, G. (1985).** New method for measuring the cell water content by thermogravimetry. *Biotechnology Letters*, **7**, 75-80.
- van't Riet, K. (1979).** Review of measuring methods and results in nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, **18**, 357-364.
- van't Riet, K. and Tramper, J., 1991.** *Basic bioreactor design*, Marcel Dekker, New York, Bassel, Hong Kong, 465 pp.
- Vasconcelos, J.M.T. and Alves S.S. (1991).** Direct dynamic $k_L a$ measurement in viscous fermentation broths - the residual gas hold-up problem, *Chem. Eng. J.*, **47**, B35-B44.
- Vasconcelos, J.M.T., Alves S.S., Barata, J.M. (1995).** Mixing in gas-liquid contactors agitated by multiple turbines. *Chemical Engineering Science*, **50**, 2343-2354.
- Veljković, V.B., Bicok, K.M., Simonović, D.M. (1991).** Mechanism, onset and intensity of surface aeration in geometrically-similar, sparged, agitated vessels. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*. **69**, 916-926.
- Veljković, V. and Skala, D. (1989).** Effect of number of turbine impellers on surface aeration in laboratory fermentor. *Biotechnology and Bioengineering*, **34**, 207-213.
- Vinke, H., Hamersma, P.J., Fortuin, J.M.H. (1992).** The enhancement of the gas-absorption rate in agitated slurry reactors due to the adhesion of gas-adsorbing particles to gas bubbles, *Chem. Engng Sci*, **47**, 3589-3596.
- Vinke, H., Hamersma, P.J., Fortuin, J.M.H. (1993).** Enhancement of the gas-absorption rate in agitated slurry reactors by gas-adsorbing particles adhering to gas bubbles, *Chem. Engng Sci.*, **48**, 2197-2210.
- Vollbrecht D. (1982).** Restricted oxygen supply and excretion of metabolites. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **15**, 111-116.
- Weber, M.E. and Paddock, D. (1983).** Interceptional and gravitational collision efficiencies for single collectors at intermediate Reynolds numbers. *Journal of Colloid and Interface Science*, **94**, 328-335.
- Weisenberger, S. nad Schumpe, A. (1996).** Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *AIChE Journal*, **42**, 298-300.

Whitman, W.G. (1923). A preliminary experimental confirmation of the two-film theory of gas absorption. *Chem. Metall. Eng.*, 29, 146-148.

Worden, R.M. and Bredwell, M.D. (1998a). Mass-transfer properties of microbubbles. 1. Experimental studies, *Biotechnol. Prog.*, 14, 31-38.

Worden, R.M. and Bredwell, M.D. (1998b). Mass-transfer properties of microbubbles. 2. Analysis using a dynamic model. *Biotechnol. Prog.*, 14, 39-46.

Wu H. (1995). An issue on applications of a disk turbine for gas-liquid mass transfer. *Chemical Engineering Science*, 50, 2801-2811.

Wu, L., Lange, H.C., van Gulik, W.M., Heijnen, J.J. (2003). Determination of in vivo oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates from off-gas measurements under highly dynamic conditions, *Biotechnology and Bioengineering*, 81, 448-458.

Yagi, H. and Yoshida, F. (1974). Oxygen absorption in fermenters –effects of surfactants, antifoaming agents, and sterilized cells, *J. Ferment. Technol.*, 52, 905-916.

Yagi, H. and Yoshida, F. (1975). Enhancement factor for oxygen absorption into fermentation broth, *Biotechnol. Bioeng.*, 17, 1083-1098.

Yagi, H. and Yoshida, F. (1977). Desorption of CO₂ from fermentation broth, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 801-819.

Yagi, H. and Yoshida, F. (1975). Enhancement factor for oxygen absorption into fermentation broth. *Biotechnology and Bioengineering*, 17, 1083-1098.

Yawalkar, A.A., Heesink, A.B.M., Versteeg, G.F., Pangarkar, V.G. (2002). Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tank reactor. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 80, 840-848.

Yoshida, F. and Yagi, H. (1977). Communication to the editor/ First response: interfacial oxygen transfer, *Biotechnol. Bioeng.*, 19, 561-564.

Yoshida, T., Ohasa, S., Taguchi, H. (1980). On-line estimation of $k_L a$ by an analog computer. *Biotechnology and Bioengineering*, 22, 201-214.

Sites internet:

<http://scholar.lib.vt.edu/theses/available/etd-102297-35832/unrestricted/thesis.pdf>

<http://www.sablesys.com/oxelect.html> : site technique de la société Sable Systems International

Sander, R. (1999). Compilation of Henry's law constants for inorganic and organic species of potential importance in environmental chemistry.

<http://www.mpch-mainz.mpg.de/~sander/res/henry.html>

<http://webbook.nist.gov/chemistry/> : base de données physiques et chimiques du National Institute of Standards and Technology.

VI. ANNEXES

VI.1. Calcul de la solubilité de l'oxygène

VI.1.1. Dans l'eau pure

La constante de Henry définissant la solubilité de l'oxygène dans l'eau pure (Eq. 2) est calculée d'après une moyenne des données de Sander (1999). H varie en fonction de la température selon :

$$H = H^{\text{ref}} \cdot \exp\left(\frac{\Delta_{\text{sol}}H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{298,15}\right)\right) \quad (132)$$

où H^{ref} est la constante de Henry de référence, à 25°C : $H^{\text{ref}}=0,00126 \text{ mol.L}^{-1}.\text{atm}^{-1}$, et $\Delta_{\text{sol}}H$ est l'enthalpie de la solution et $\frac{\Delta_{\text{sol}}H}{R} = 1650\text{K}$.

Les valeurs de la constante de Henry et de la solubilité de l'oxygène sont données sur la gamme $T \in [20;40^\circ\text{C}]$ dans le Tableau 16. RTH est le produit de la constante des gaz parfaits, 8,3145 J.mol⁻¹.K⁻¹, de la température en °K et de H en mol.m⁻³.Pa⁻¹, c'est une constante adimensionnelle utilisée dans les équations bilan des modèles de transfert.

Tableau 16. Quelques données relatives à la solubilité de l'oxygène dans l'eau pure en fonction de la température. La solubilité est donnée à l'équilibre avec l'oxygène de l'air et à pression atmosphérique.

T (°C)	H (mol.L ⁻¹ .atm ⁻¹)	Solubilité (mg.L ⁻¹)	RTH (1)
20	1,385E-03	9,28	3,331E-02
21	1,358E-03	9,10	3,279E-02
22	1,333E-03	8,93	3,228E-02
23	1,308E-03	8,76	3,179E-02
24	1,284E-03	8,60	3,130E-02
25	1,260E-03	8,44	3,083E-02
26	1,237E-03	8,29	3,036E-02
27	1,214E-03	8,14	2,991E-02
28	1,192E-03	7,99	2,947E-02
29	1,171E-03	7,85	2,903E-02
30	1,150E-03	7,71	2,861E-02
31	1,130E-03	7,57	2,819E-02
32	1,110E-03	7,44	2,779E-02
33	1,090E-03	7,31	2,739E-02
34	1,071E-03	7,18	2,700E-02
35	1,053E-03	7,06	2,662E-02
36	1,035E-03	6,93	2,625E-02
37	1,017E-03	6,82	2,589E-02
38	9,999E-04	6,70	2,553E-02
39	9,831E-04	6,59	2,518E-02
40	9,666E-04	6,48	2,484E-02

VI.1.2. Calcul de la solubilité de l'oxygène en milieu salin

Nous utilisons le modèle de Weisenberger et Schumpe (1996) (Eq. 4).

Exemple de calcul : milieu salin modèle composé des trois principaux sels du milieu de culture d'*E. coli* : K_2HPO_4 (8 g.L⁻¹), $(NH_4)_2HPO_4$ (8 g.L⁻¹), Na_2HPO_4 (2 g.L⁻¹), et une température de travail de 37°C.

Paramètre spécifique à l'oxygène :

$$\begin{aligned} h_{O_2} &= h_{O_2,0} + h_T(T - 298,15) \\ &= -4.10^{-3} \text{ m}^3.\text{kmol}^{-1} \end{aligned}$$

Rapport des solubilités :

$$\begin{aligned} \log(H_0/H) &= \sum (h_i + h_{O_2})c_i \\ &= 0,0351 \end{aligned}$$

Soit $H=0,922 H_0$, et $RTH=0,0239$, H_0 étant la constante de Henry dans l'eau pure à 37°C.

De la même façon, pour une solution de Na_2SO_3 , 10 g.L⁻¹, à 37°C : $H=0,939 H_0$.

Pour une solution de Na_2SO_3 , 50 g.L⁻¹ à 37°C : $H=0,731 H_0$.

Pour le milieu initial utilisé dans la culture de *S. cerevisiae* : $H=0,97 H_0$, H_0 étant défini ici dans l'eau pure à 30°C.

Tableau 17. Sélection de paramètres du modèle de Weisenberger et Schumpe (1996).

Paramètres des ions	Paramètres de l'oxygène
$\text{m}^3.\text{kmol}^{-1}$	
hK^+	$h_{O_2}=0 \text{ m}^3.\text{kmol}^{-1}$
$hHPO_4^{2-}$	$h_T= -3,34.10^{-4} \text{ m}^3.\text{kmol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
hNH_4^+	
hNa^+	
hSO_3^{2-}	

VI.2. Méthodes de détermination de $K_L a$

Tableau 18. Méthodes dynamiques pour la détermination de $K_L a$. dO_2 oxygène dissous ; $0 \rightarrow O_2$ échelon d'oxygène pur dans un système préalablement dégazé.

Méthode dynamique	Auteurs	Principe et mise en œuvre	Limites d'application
Réoxygénation « dynamic gassing out » ou « electrode momentum » ou «gassing in »	Bandyopadhyay (1967) Dang (1977) Ruchti (1981) Linek (1981) Linek (1982) Linek (1987) Rainer (1990)	Un échelon de concentration en oxygène est appliqué sur le gaz en entrée du réacteur ; une sonde suit l'évolution de dO_2 ; $K_L a$ est calculé par identification paramétrique - $0 \rightarrow O_2$ permet de s'affranchir du transfert multi composants -applicable en fermentation -simple : pas besoin d'analyse de gaz -x* pas nécessaire en travaillant avec des valeurs normalisées	-difficile en systèmes visqueux -les différentes dynamiques prennent de l'importance à $K_L a$ croissant et doivent être évaluées avec précision -difficile à fort q_{O_2}
Echelon de pression « dynamic pressure method », DPM	Zubarev (1977) Linek (1989) Poizat (1992) Gogate et Pandit (1999) Carbajal (2004)	Un échelon de pression d'environ 200 mbar est appliqué (instantanément) à l'ensemble du réacteur ; une sonde suit l'évolution de dO_2 ; $K_L a$ est calculé par identification paramétrique -élimine les effets de mélange non idéal puisque la pression est uniforme donc la concentration en O_2 varie simultanément dans toutes les bulles, donc gaz et liquides peuvent être considérés comme parfaitement mélangés (Gogate et Pandit 1999) et l'absorption d' O_2 pur ou d'air conduit à des résultats similaires (Linek 1989, Gogate et Pandit 1999), le transfert de N_2 peut être négligé (Gogate et Pandit 1999) -applicable aux grands réacteurs -applicable aux systèmes visqueux -ne nécessite pas la mesure de la rétention gazeuse	-la sonde à O_2 ne doit pas réagir à la pression -peu fiable si il y a dégagement de mousse (par exemple en fermentation) -peu fiable si q_{O_2} n'est pas stable (sur une plage de 10 min au moins) -la méthode présentée par Poizat est mise à part car le bilan est réalisé sur un système fermé. Elle est très contraignante par sa durée (5 h).
Absorption gazeuse	van't Riet (1979) André (1981) Rainer (1990) Poizat (1992)	Du CO_2 est absorbé dans un tampon carbonate/bicarbonate ; $K_L a$ relatif au CO_2 est évalué à partir de l'analyse du gaz. CO_2 étant 40 fois plus soluble que O_2 , la remontée du signal s'étend sur une période beaucoup plus longue, ce qui permet une meilleure précision de l'estimation de $K_L a$ (André 1981). -une version existe avec absorption en continu mais elle semble moins fiable (Rainer 90) -en tant que méthode chimique, cette réaction est mieux contrôlable que la méthode au sulfite -sur milieu de fermentation acidifier avec H_2SO_4 plutôt que d'utiliser un tampon très concentré permet de conserver les propriétés physiques du milieu (André 1981)	-fiable si $K_L a < 150 \text{ h}^{-1}$ (Rainer 1990) car sinon l'influence du modèle de dispersion gazeuse devient très important (André 1981) -nécessite la mise en place d'un collecteur de gaz près de la surface libre

Réponse initiale et double réponse	Chapman (1982) Gibilaro (1985) Gogate et Pandit (1999)	Basée sur la distribution des temps de séjour des bulles, la double réponse nécessite le suivi des phases liquide et gazeuse pendant un échelon de concentration, la réponse initiale est dérivée de la double réponse et s'affranchit du suivi de la phase gaz mais en se focalisant sur l'unique variation de dO_2 au départ de l'échelon. -ne nécessitent pas d'hypothèse sur l'état de mélange de la phase gaz	-la réponse initiale nécessite le calcul de la dérivée seconde de x_{O_2} , donc de la dérivée troisième de la réponse de la sonde -ne semble pas fiable en système non-coalescent (Gibilaro 1985)
Gaz traceur	Pedersen (1994) Boumansour (1996 et 1998)	Un gaz traceur est injecté dans le réacteur ; $K_L a$ relatif à sa cinétique de transfert permet de remonter au $K_L a$ relatif à l'oxygène en supposant le rapport des deux $K_L a$ constant. Un gaz traceur doit être inerte, et ni consommé, ni produit dans le milieu, être rare dans l'air, sont utilisés : propane (Boumansour 1996), éthylène, krypton radioactif (Pedersen 1994), argon, hélium -peut être utilisé en fermentation si le gaz traceur n'est pas nocif pour les microorganismes -le ratio $K_L a / K_L a_{\text{propane}}$ est constant à $\pm 5\%$ malgré la variation de nombreux paramètres (T, P, sels...) (Boumansour 1996) -permet l'accès à une valeur de $K_L a$ indépendante de la consommation en O_2	-nécessite des mesures de sécurité pour l'utilisation de gaz radioactif -la méthode telle qu'elle est pratiquée par Boumansour (cinétique du propane dissous) ne convient que pour des $K_L a$ très faibles ($<30 \text{ h}^{-1}$) -l'analyse continue du gaz traceur en sortie de fermenter permet de mesurer des $K_L a$ jusqu'à 1080 h^{-1} (Pedersen 1994).

Tableau 19. Méthodes statiques pour la détermination de $K_L a$.

Méthode statique	Auteurs	Principe et mise en œuvre	Limites d'application
Sulfite	Linek (1989) Rainer (1990) Poughon (2003)	Basé sur la consommation de l'oxygène par le sulfite pour donner le sulfate en présence d'un catalyseur (cobalt ou cuivre) : $\frac{1}{2} O_2 + SO_3^{2-} \xrightarrow{Co^{2+}} SO_4^{2-}$ Le sulfite peut être alimenté en batch ou en continu (Linek 89). $K_L a$ est calculé par un bilan matière en fonction de la vitesse de disparition du sulfite (dosé à l'iode) : $K_L a(x^* - x_L) = r_{O_2} = \frac{r_{SO_3^{2-}}}{2}$ (en régime permanent). -la concentration en catalyseur doit être correctement fixée ($<10^{-5} \text{ M}$, généralement 10^{-6} M) pour que la concentration en oxygène dans le liquide soit nulle ($x_L=0$) et que la réaction ne soit pas accélérée par la réaction chimique mais bien contrôlée par le phénomène de transfert (Reuss, 1993) -cette méthode permet aussi de calculer K_L et a indépendamment	-impose une forte concentration en sels (1 à 2 M) et donc ne permet pas de caractériser tout type de milieu -nécessite le dosage du sulfite hors ligne

Glucose oxydase	Hsieh (1969) Linek (1980) Linek (1981) Rainer (1990)	<p>O₂ est consommé dans une réaction enzymatique :</p> $\frac{1}{2}O_2 + \text{glucose} \xrightarrow{\text{glucose oxydase}} \text{glucono - lactone} + H_2O$ $\text{glucono - lactone} + H_2O \xrightarrow{\text{lactonase}} \text{acide gluconique}$	-possibilité d'accumulation de glucono-lactone
		<p>K_La est ensuite calculé par titration de l'acide. -pour que la vitesse de consommation de O₂ ne soit pas limitante les concentrations des enzymes doivent être assez élevées, en particulier [glucose oxydase]>1,5g.L⁻¹ -le système ne provoque pas d'accélération du transfert (Rainer 1990) -est une simulation d'un système biologique (Rainer 1990)</p>	
Eau oxygénée	Hickman (1988) Gogate et Pandit (1999)	La génération d'oxygène est réalisée au sein du liquide en décomposant H ₂ O ₂ par la catalase. Un système continu est mis en place ; K _L a est calculé lorsque les concentrations en peroxyde et en O ₂ sont stabilisées.	-la catalase peut produire de la mousse -inutilisable en milieu riche à cause de la perte d'activité de la catalase et de la réactivité de H ₂ O ₂
Enrichissement « physical gassing-in »	Poughon (2003)	C'est la version statique de la méthode de réoxygénation. Un flux continu de liquide désoxygéné alimente le réacteur et le quitte enrichi en oxygène. K _L a est calculé par un bilan matière en régime permanent ou transitoire. -le régime transitoire nécessite l'enregistrement de l'évolution de la concentration en oxygène dissous et la prise en compte de la réponse de la sonde	-impossible à forte valeur de K _L a car il devient difficile de produire un déséquilibre entre les phases -intervalle de confiance de 15%
Bilans gazeux	van't Riet (1976) Rainer (1990) Pedersen (1996) Wu et coll. (2003)	Absorption d'O ₂ couplé avec sa consommation au sein du liquide (par les cellules). K _L a calculé par un bilan gazeux entre l'entrée et la sortie du réacteur. -convient particulièrement en fermentation	-nécessite un modèle précis du profil gazeux -nécessite une analyse complète du gaz (N ₂ , O ₂ , CO ₂ , Ar)
Bilan gazeux + oxydation par le sulfite (BG+OS) (semi continue)	Poughon (2003)	Basée sur le même principe que la méthode au sulfite, q _{O2} est évalué par un bilan gazeux, ce qui évite le dosage hors ligne. -méthode rapide et facile	-x* doit être connu -intervalle de confiance de 10% -nécessite la description de la distribution de la phase gaz

VI.3. Techniques analytiques

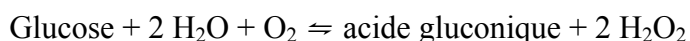
VI.3.1. Biomasse

Après filtration d'un volume connu d'échantillon (4 à 20 mL) sur membrane de porosité 0,45 µm préalablement séchée et pesée, la membrane est rincée à l'acide chlorhydrique 100 mM, séchée à l'étuve sous vide (200 mm Hg, 60°C) pendant 24 heures et enfin pesée. La concentration en masse sèche est déterminée par différence des deux pesées et réajustement par rapport au volume filtré.

VI.3.2. Glucose

YSI

Au cours de la culture, le glucose résiduel est dosé à l'aide d'un analyseur automatique Y.S.I. modèle 2000 (YELLOW SPRING INSTRUMENT Inc., Yellow Spring, Ohio, USA). Le principe de ce dosage est basé sur la libération de peroxyde d'oxygène (H₂O₂) lors de l'oxydation du glucose par la glucose oxydase immobilisée sur une membrane.



L'oxydation de H₂O₂ par une électrode de platine libère un flux d'électrons. Le courant ainsi créé est proportionnel à la concentration en glucose. Après étalonnage de l'appareil, le résultat est directement délivré en g.L⁻¹.

Les échantillons à doser doivent être exempts de cellules (centrifugation) et dilués de sorte que la concentration en glucose soit inférieure ou égale à 2.5 g.L⁻¹.

DNS

Après la culture, les échantillons prélevés sont dosés par la méthode de l'acide 3,5-dinitrosalicylique (DNS) (Miller, 1959).

Préparation du réactif : dissoudre 300 g de tartrate double de sodium et potassium et 16 g de NaOH dans un peu d'eau distillée. Ajouter progressivement 10 g d'acide 3,5-dinitrosalicylique et compléter à 1 L avec de l'eau distillée. Il peut être nécessaire de chauffer la solution pour dissoudre complètement le DNS.

Méthode de dosage : 200 µL de réactif sont ajoutés à 200 µL de surnageant préalablement dilué. Le mélange est porté à ébullition pendant 5 minutes au bain-marie. Après refroidissement dans la glace, 2 mL d'eau distillée sont ajoutés. Un temps de 15 minutes est nécessaire pour que l'échantillon se stabilise à température ambiante. La lecture

spectrophotométrique est réalisée à 500 nm contre un blanc composé de 200 μL de réactif et 200 μL d'eau distillée. La gamme étalon est comprise entre 0 et 2.5 g.L^{-1} de glucose.

VI.3.3. Ammonium

Au cours de la culture, la concentration en ions ammonium est dosée à l'aide d'une électrode (ORION RESEARCH, Boston, USA). Le dosage consiste à transformer les ions ammonium en ammoniaque en milieu alcalin. Le gaz ainsi formé pénètre dans l'électrode en passant à travers une membrane en Téflon. Il s'établit alors une différence de potentiel entre les ions OH^- (libérés par la réaction de l'ammoniaque avec l'électrolyte) et l'électrode. Il existe une relation linéaire entre le logarithme décimal de la concentration en ammonium et la différence de potentiel mesurée.

La sonde est plongée dans 5 mL d'échantillon agité mélangé à 200 μL de tampon ISA (ORION RESEARCH, Boston, USA) de manière à ce que le pH du mélange soit compris entre 11 et 14. La gamme étalon est comprise entre 10^{-1} et 10^{-4} M d' NH_4Cl .

VI.3.4. Phosphate

Après la culture, les échantillons prélevés sont dosés par la méthode utilisant le molybdate d'ammonium.

Préparation du réactif

solution A : 6,4 mL d' H_2SO_4 95% dans 50 mL d'eau distillée

solution B : 0,6 g de molybdate d'ammonium dans 12.5 mL d'eau distillée

solution C : 0,0146 g de tartrate double de potassium et d'antimoine dans 5 mL d' H_2SO_4 5N

Les solutions B et C sont ajoutées à la solution A puis le volume est ajusté à 100 mL avec de l'eau distillée. 2 g d'acide ascorbique sont ajoutés et le mélange se colore en jaune. Le mélange ne se conserve pas plus d'un jour.

Méthode de dosage 4 mL d'étalon ou d'échantillon sont mélangés à 0,8 mL de réactif. Le mélange est agité vigoureusement puis est laissé reposer 15 minutes. La lecture spectrophotométrique est réalisée à 720 nm contre un blanc composé de 4 mL d'eau distillée et 0,8 mL de réactif. La gamme étalon est comprise entre 0 et 5 mg.L^{-1} de glucose.

VI.3.5. Acides organiques volatils

Les produits volatils de fermentation (acides gras à courtes chaînes : acétate, propionate, isobutyrate et butyrate) sont dosés par chromatographie en phase gazeuse sur un

chromatographe (HP 5890, Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) équipé d'une colonne remplie (1 m x 0,32 cm) garnie de Propak Q80-100. L'appareil est muni d'un détecteur à ionisation de flamme couplé à un intégrateur (HP3396-A) qui calcule l'aire des pics. L'azote est utilisé comme gaz vecteur à une pression de 40 kPa en tête de colonne. Les températures de l'injecteur et du détecteur sont égales à 250°C. La température du four est programmée de la façon suivante :

$140^{\circ}\text{C} \xrightarrow{8^{\circ}\text{C.mn}^{-1}} 166^{\circ}\text{C pendant 7 mn} \xrightarrow{32^{\circ}\text{C.mn}^{-1}} 235^{\circ}\text{C pendant 10 mn}$

Les échantillons sont dosés en présence d'un étalon interne (2-méthyl-propan-1-ol, 20 g.L⁻¹ dans H₂SO₄ 0,5N) ajouté au surnageant de culture dans la proportion de 1 volume d'étalon interne pour 4 volumes de surnageant. La calibration est effectuée à l'aide de solutions étalons de concentrations connues.

Pour certains échantillons, l'acidification due à l'ajout d'étalon interne entraîne la formation d'un dépôt blanchâtre qui rend le mélange inhomogène et fausse le dosage. Afin de minimiser la formation de ce dépôt, les protéines présentes dans le surnageant sont précipitées par la méthode suivante : 600 µL d'échantillon sont mélangés avec 200 µL de ZnSO₄ 0,3M et 200 µL de Ba(OH)₂ 0,2M. Le mélange est agité vigoureusement puis centrifugé 20 mn à 13000 rpm. Le surnageant est prélevé et analysé de la manière décrite ci-dessus. Les concentrations en acides sont corrigées de manière à tenir compte du facteur de concentration du à ce traitement.

VI.3.6. Acides organiques non-volatils

Les acides organiques non volatiles formés au cours de la culture (pyruvate et α-cétoglutarate) sont dosés par chromatographie en phase liquide (HPLC) en utilisant un chromatographe (Alliance, modèle Waters 2690) équipé d'une colonne H⁺ échangeuse d'ions (Aminex HPX-87-H, Biorad, USA). Les échantillons sont élués par une solution d'H₂SO₄ 5mM dont le débit est fixé à 0,5 mL.mn⁻¹ et la température à 50°C. Les acides sont détectés à 210 nm (détecteur PDA Alliance, modèle Waters 996) et l'intégration des pics est effectuée par le logiciel Millenium.

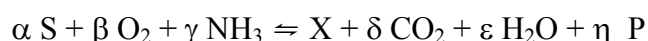
VI.4. Lissage et réconciliation des données expérimentales

Les courbes lissées sont obtenues par interpolation des points expérimentaux par des polynômes sur une fenêtre glissante. Ce lissage permet d'obtenir une continuité de la valeur lissée et de sa dérivée.

Les courbes lissées sont analysées par une méthode développée au laboratoire (Cailler, 1994) dérivée des méthodes décrites par van der Heijden et coll. (Heijden et coll., 1994a ; Heijden et coll., 1994b) pour la détection d'erreur et l'ajustement de données. Cette méthode permet l'ajustement des vitesses de réaction dans leur globalité. Les calculs se font à partir de la matrice élémentaire construite sur l'ensemble des variables d'état définissant le système, du vecteur des vitesses de réaction mesurées et de la matrice de variance associée à ces mesures. On obtient des valeurs qui permettent d'équilibrer les bilans sur les quatre éléments pris en compte : carbone, hydrogène, oxygène et azote. Pour chaque point expérimental, la meilleure estimation des flux de réaction est calculée sur la base d'une vérification des bilans élémentaires sur les vitesses de réaction. Cette estimation est effectuée par minimisation d'un critère d'erreur sur l'ensemble des mesures ou par élimination d'une mesure si le système est surdimensionné. Les variables d'état sont recalculées par intégration des vitesses de réaction estimées, ce traitement permet de ce fait la vérification de la cohérence des données expérimentales.

Bilans carbone et redox

La réaction biologique peut être écrite d'une façon générale de la manière suivante :



où S est le substrat, X la biomasse et P les autres produits. Le bilan carbone est défini par :

$\sum_i \Phi_i = 0$ où Φ_i est le flux en Cmole pour le composé i. On obtient donc :

$$-\Phi_S + \Phi_X + \Phi_{CO_2} + \Phi_P = 0$$

Le bilan redox est défini par : $\sum_i \gamma_i \cdot \Phi_i = 0$ où γ_i est le degré de réduction du composé i. En

posant :

$$\gamma_{NH_3} = 3 \gamma_H + \gamma_N = 0$$

$$\gamma_{CO_2} = 2 \gamma_O + \gamma_C = 0$$

$$\gamma_{H_2O} = 2 \gamma_H + \gamma_O = 0$$

$$\gamma_H = 1$$

on obtient :

$$\gamma_N = -3 ; \gamma_C = 4 \text{ et } \gamma_O = -2$$

d'où :

$$-\gamma_S \cdot \Phi_S + 4 \cdot \Phi_{O_2} + \gamma_X \cdot \Phi_X + \gamma_P \cdot \Phi_P = 0$$

VI.5. Calcul de la moyenne logarithmique

Elle est utilisée pour modéliser l'écoulement piston des bulles dans le réacteur. Elle s'obtient en écrivant le bilan matière sur l'oxygène d'un élément de volume gazeux, à débit constant, en régime permanent, en supposant que le flux gazeux est conservé ($Q^{\text{in}}=Q^{\text{out}}=Q$) :

$$Q y_{O_2} - Q(y_{O_2} + d y_{O_2}) - k_L a \cdot dV \cdot (y_{O_2} - y_{O_2}^B) = 0$$

que l'on peut intégrer en définissant une coordonnée $z \in [0 ; Z]$ le long de l'axe du réacteur, dont la hauteur de liquide aéré est Z :

$$\int_{\text{in}}^z \frac{d y_{O_2}}{y_{O_2} - y_{O_2}^B} = \frac{-k_L a}{Q} \int_0^{S z} dV$$

avec S l'aire de la section du réacteur, et $V=ZS$ le volume de liquide aéré, il est possible de calculer l'intégrale :

$$\ln \frac{y_{O_2}^z - y_{O_2}^B}{y_{O_2}^{\text{in}} - y_{O_2}^B} = \frac{-k_L a}{Q} S z \quad (133)$$

soit,

$$y_{O_2}^z - y_{O_2}^B = (y_{O_2}^{\text{in}} - y_{O_2}^B) \cdot \exp\left(-\frac{k_L a \cdot S \cdot z}{Q}\right) \quad (134)$$

La valeur moyenne du gradient sur le réacteur vaut :

$$\begin{aligned} \overline{(y_{O_2} - y_{O_2}^B)} &= \frac{1}{Z} \cdot \int_0^Z (y_{O_2}^z - y_{O_2}^B) dz \\ &= \frac{(y_{O_2}^{\text{in}} - y_{O_2}^B)}{Z} \cdot \frac{Q}{-k_L a \cdot S} \cdot \left[\exp\left(-\frac{k_L a \cdot S \cdot Z}{Q}\right) - 1 \right] \end{aligned}$$

que l'on réécrit en utilisant Eq. 133 et Eq. 134 en $z=Z$ pour obtenir la forme utilisée dans Eq. 96 :

$$\overline{(y_{O_2} - y_{O_2}^B)} = \frac{(y_{O_2}^{\text{in}} - y_{O_2}^B) - (y_{O_2}^{\text{out}} - y_{O_2}^B)}{\ln\left(\frac{y_{O_2}^{\text{in}} - y_{O_2}^B}{y_{O_2}^{\text{out}} - y_{O_2}^B}\right)} \quad (135)$$

VI.6. Programmation MATLAB

VI.6.1. Programme pour la détermination de $K_L a$ par le modèle MH

Ce programme permet d'approximer $K_L a$ à partir d'une expérience de réoxygénation, dans l'hypothèse où le gaz est homogène dans le réacteur (modèle MH).

La fonction 'erreur' permet de calculer l'écart entre la concentration mesurée d'oxygène dissous et la valeur calculée par le modèle (Eq. 81). La valeur du modèle est calculée par la fonction 'XSmodele'. (En fait, cette valeur est calculée directement par la fonction 'odefun' (vecteur y(3)); la fonction 'XSmodele' est utilisée par volonté de symétrie avec le modèle piston (annexe VI.6.2.2) qui utilise obligatoirement cette fonction ; les deux solutions sont identiques).

```
function kla_modèleMH
%prog principal : permet de calculer kla à partir d'une expérience de réoxygénation, par
identification paramétrique.

close all;
clear all;

%données relatives à l'expérience :
a=load('C:\réoxygénation.dat');%fichier de données à 2 colonnes: temps, concentration mesurée
par la sonde
QG=0.000146;%flux d'aération, m3/s
VG=0.00125;%volume de la rétention gazeuse, m3
VL=0.01;%volume de liquide m3
TS=0.8;%constante de temps de la sonde, s
RTH=0.0259;%paramètre de solubilité à 37°C pour l'eau pure
k=RTH*VL;%variable intermédiaire

%définition des données expérimentales
tmes=a(:,1);%temps mesuré
XSmes=a(:,2);%concentration mesurée par la sonde
N=size(tmes,1);%nombre de pas de temps (l'instant t=0 est contenu dans le premier pas)
tmax=tmes(N);%nombre maximum de pas de temps
dt=tmax/(N-1);%de telle sorte que les pas de temps soient calés sur les valeurs expérimentales

%bornes des paramètres à approximer
klam=0.01;%kla minimum, s-1
klaM=0.5;%kla maximum, s-1

%initialisation des paramètres à approximer
kla=0.1;% s-1

A(1,:)= [1];
b=[klaM];
Aeq=[];%no equality exists
beq=[];%no equality exists
LB=[klam];
UB=[klaM];
x0=[kla];
[x, fval]=fmincon(@erreur,x0,A,b,Aeq,beq, LB, UB, [], optimset, QG, TS, RTH, tmes, XSmes, N, tmax, dt, k)

t=[0:dt:tmax];
kla=x(1)
[XSmod,XL]=XSmodele(QG,TS,N,tmax,dt,k,kla,VG);%concentrations estimées par le modèle

%impression de la courbe de parité
figure(1); hold on;
plot(XSmes,XSmod, ':');
jj=title('courbe de parité');

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

function d=erreur(x,QG,TS,RTH,tmes,XSmes,N,tmax,dt,k)
%calcul de l'erreur entre le modèle et l'expérience

kla=x(1);

[XSmod,XL]=XSmodele(QG,TS,N,tmax,dt,k,kla,VG);
```



```

d=0;
for i=1:N
    d=d+(XSmes(i)-XSmod(i))*(XSmes(i)-XSmod(i))/abs(XSmes(i)+0.0001);
end
d=d/N;%normalisation par le nombre de pas de temps

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function [XSmod,XL]=XSmodele(QG,TS,N,tmax,dt,k,kla,VG)
%fonction permettant de calculer l'évolution de la mesure de la sonde au cours du temps

XSmod=zeros(N,1);
XL=homo(QG,TS,tmax,dt,k,kla,VG);
for i=2:N
    XSmod(i)=(XSmod(i-1)+dt/TS*XL(i,2))/(1+dt/TS);
end

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function XgXlXs=homo(QG,TS,tmax,dt,k,kla,VG)
tspan=[0:dt:tmax];
y0=zeros(3,1);
options=[];
[T,Y]=ode45(@odefun,tspan,y0,options,QG,TS,k,kla,VG);
XgXlXs=Y;

function dy=odefun(t,y,QG,TS,k,kla,VG)
%y(1):concentration dans le gaz
%y(2):concentration dans le liquide
%y(3):mesure de la sonde
dy=zeros(3,1);
dy(1)=(1-y(1))*QG/VG-kla*k/VG*(y(1)-y(2));
dy(2)=kla*(y(1)-y(2));
dy(3)=(y(2)-y(3))/TS;
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

VI.6.2. Programme pour la détermination de $K_L a$ par le modèle MP

VI.6.2.1. Ecriture du système sous forme matricielle

Le système Eq. 89 est résolu par une méthode utilisant une discrétisation de l'opérateur différentiel par une approximation d'Euler sur MATLAB. Réécrivons les équations décrivant les concentrations réelles (l'équation de la sonde est ajoutée dans un deuxième temps) en faisant apparaître l'indice d'espace, $i \in [1 ; I]$ et de temps, $n \in [1 ; N]$, avec les pas correspondants de longueur Δz et durée Δt ; les concentrations sont toutes normalisées mais par soucis de clarté nous omettrons la barre ($\bar{y}(n,i) = y_i^n$) :

$$\text{(Eq. 136)} \quad \left\{ \begin{array}{l} \frac{y_i^{n+1} - y_i^n}{\Delta t} = -\frac{Q}{V_G} \frac{y_i^{n+1} - y_{i-1}^{n+1}}{\Delta z} - K_L a \frac{V_L}{V_G} \text{RTH}(y_i^{n+1} - x^{n+1}), \text{ pour } i \in [2 ; I] \\ \frac{y_1^{n+1} - y_1^n}{\Delta t} = -\frac{Q}{V_G} \frac{y_1^{n+1} - 1}{\Delta z} - K_L a \frac{V_L}{V_G} \text{RTH}(y_1^{n+1} - x^{n+1}), \text{ pour } i=1 \\ \frac{x^{n+1} - x^n}{\Delta t} = K_L a \int_0^1 (y_i^n - x^n) dz, \text{ pour } z \in [1 ; Z] \end{array} \right.$$

On peut donc résoudre l'équation du bilan gazeux matriciellement en posant :

$$A Y^{n+1} = Y^n + a_1 \cdot X^{n+1} + U$$

avec les constantes:

$$a_1 = K_L a \frac{V_L}{V_G} RTH \Delta t$$

$$a_2 = \frac{Q_G}{V_G} \frac{\Delta t}{\Delta z}$$

$$a_3 = 1 + a_1 + a_2$$

et les vecteurs colonne de taille I : Y^n , contenant les points de l'espace à l'instant n, et U, contenant la condition à la limite; ainsi que la matrice carrée A de taille IxI :

$$Y^n = \begin{bmatrix} y_1^n \\ y_2^n \\ \vdots \\ \vdots \\ y_I^n \end{bmatrix}; U = \begin{bmatrix} a_2 \\ 0 \\ \vdots \\ \vdots \\ 0 \end{bmatrix}; A = \begin{bmatrix} a_3 & 0 & \cdots & \cdots & 0 \\ -a_2 & a_3 & \ddots & & \vdots \\ 0 & -a_2 & \ddots & \ddots & \vdots \\ \vdots & \ddots & \ddots & \ddots & 0 \\ 0 & \cdots & 0 & -a_2 & a_3 \end{bmatrix}.$$

L'intégrale du bilan liquide est calculée par la méthode des trapèzes :

$$\int_0^1 (y_i^n - x^n) dz = \frac{(y_1^n - x^n) + (1 - x^n)}{2} \Delta z + \sum_{i=2}^I \frac{(y_i^n - x^n) + (y_{i-1}^n - x^n)}{2} \Delta z$$

$$= \left(-x^n + \frac{(1 + y_1^n)}{2} + \frac{1}{2} \sum_{i=2}^I (y_i^n - x^n) + (y_{i-1}^n - x^n) \right) \Delta z$$

et donc

$$x^{n+1} = x^n + K_L a \Delta t \Delta z \left(-x^n + \frac{(1 + y_1^n)}{2} + \frac{1}{2} \sum_{i=2}^I (y_i^n - x^n) + (y_{i-1}^n - x^n) \right)$$

VI.6.2.2. Programme MATLAB

Ce programme permet d'identifier $K_L a$ à partir d'une expérience de réoxygénation, dans l'hypothèse où le gaz s'épuise selon un modèle d'écoulement piston lors de sa traversée du réacteur.

Le programme principal et la fonction 'erreur' sont identiques à ceux utilisés dans le programme de l'annexe VI.6.1 pour le calcul dans l'hypothèse homogène. Nous reportons donc ici uniquement la fonction permettant de calculer le modèle piston.

```

%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function [XSmod,XL]=XSmodele(QG,TS,N,tmax,dt,k,kla,VG)
%fonction permettant de calculer l'évolution de la mesure de la sonde au cours du temps

XSmod=zeros(N,1);
XL=piston(QG,N,dt,k,kla,VG);
for i=2:N
    XSmod(i)=(XSmod(i-1)+dt/TS*XL(i))/(1+dt/TS);
end
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

```

```

function piston_a_pas=piston(QG,N,dt,k,kla,VG)
%fonction permettant de calculer l'évolution de la concentration en oxygène dissous au cours
du temps
%U contient les concentration en oxygène de la phase gaz du bas vers le haut de du fermenteur
à l'instant t
%V contient la concentration en oxygène dissous à l'instant t ; vecteur de meme taille que U
mais de valeurs toutes identiques, la concentration dans le liquide étant homogène

I=100;%nombre de pas d'espace
dz=1/I;
solnuml=zeros(N,I);%contient la solution

x=[dz:dz:1]';%vecteur colonne des points de l'espace
m=size(x,1);
U=zeros(m,1);%concentration initiale du gaz le long du fermenteur
V=zeros(m,1);%concentration initiale du liquide
un=zeros(m,1);
un(1,1)=1;

for n=2:N%itérations sur le temps, t0=0
    a1=kla/VG*k*dt;%constante issue du bilan matière sur le gaz
    a2=dt/(VG/QG)/dz;%constante issue du bilan matière sur le gaz
    sn=kla*((1+U(1))/2-V(1));%sn donne la valeur de l'intégrale (x*(i)-x)di
    for i=2:I%boucle permettant le calcul le long de la hauteur du réacteur de l'intégrale
        (x*(i)-x)di
            sn=sn+(kla*(U(i)-V(i))+kla*(U(i-1)-V(i-1)))/2;
        end
        V=V+sn*dz*dt;%calcul de XL à l'instant t+1
        solnuml(n,:)=V';

        A=mat1(I,a1,a2);
        U=A\ (U+a1*V+a2*un);%profil du gaz à l'instant t+1
    end
end
piston_a_pas=solnuml(:,2);

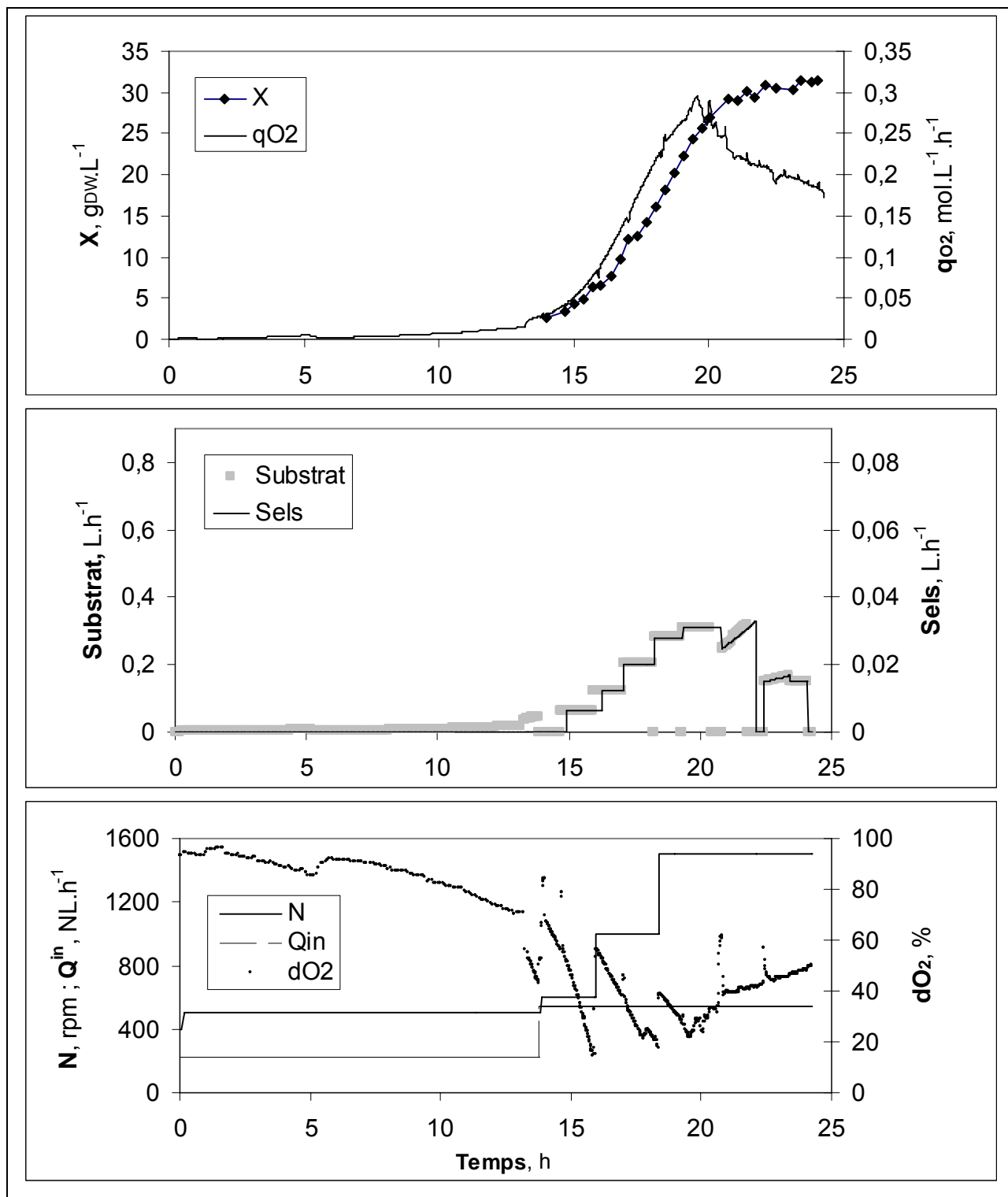
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

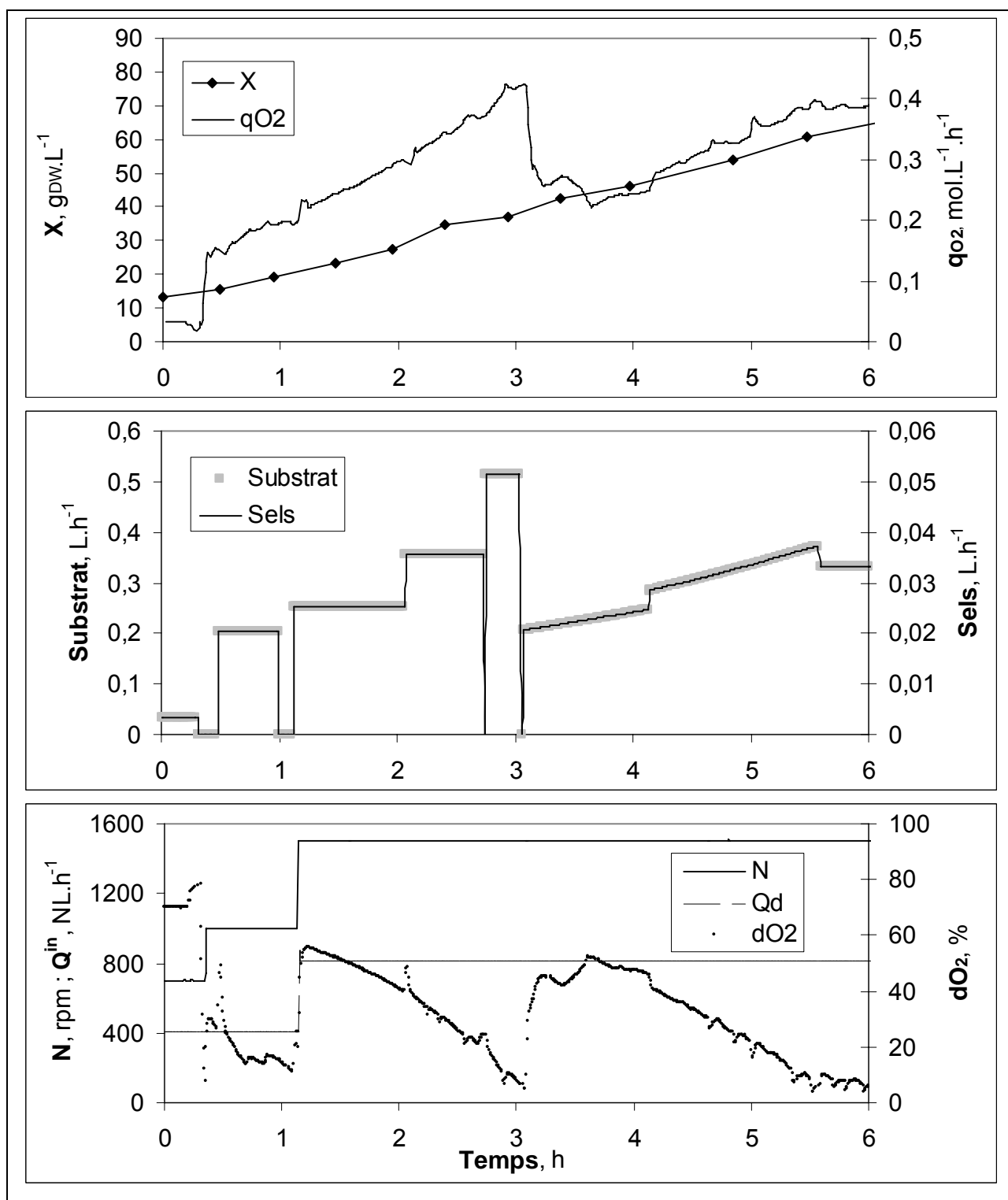
function A=mat1(I,a1,a2)
A=zeros(I,I);
A(1,1)=1+a2+a1;
for i=2:I
    A(i,i)=1+a1+a2;
    A(i,i-1)=-a2;
end

```

VI.7. Conditions de culture

VI.7.1. Culture *E. coli* C



VI.7.2. Culture *E. coli* E

VI.8. Matériel et méthodes complémentaires

VI.8.1. Microscopie in-situ

Le microscope in-situ (Hajo Suhr, Fachhochschule Mannheim, Allemagne) se compose d'un porte sonde muni d'une fenêtre d'observation, fixé sur le fermenteur et stérilisable avec lui, et d'une partie externe composée des optiques et du système de prise de vue vidéo (Figure 61). Le microscope in-situ nécessite un éclairage en vis-à-vis de l'optique si bien qu'une diode est fixée derrière la fenêtre d'observation, dans le milieu de fermentation. L'espace entre la diode et la fenêtre d'observation, 300 μm , délimite la taille maximale des particules pouvant être observées. La quantité de lumière captée par l'optique décroissant avec l'obturation causée par la densité cellulaire du milieu, la concentration cellulaire du milieu ne peut pas dépasser 20 $\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$. La diode fonctionne de manière pulsée et synchrone avec une ouverture du diaphragme de la caméra (choisi par l'utilisateur) pour permettre la netteté des images quelque soit la vitesse de passage des particules. L'information récupérée est donc une série d'images. La mise au point est faite manuellement sur un plan focal situé entre la diode et la fenêtre. Le fait que les éléments d'une image soient nets ou flou dépend de leur position par rapport à la distance focale, sachant que la profondeur de champ est de l'ordre d'un diamètre de levure (4 μm).

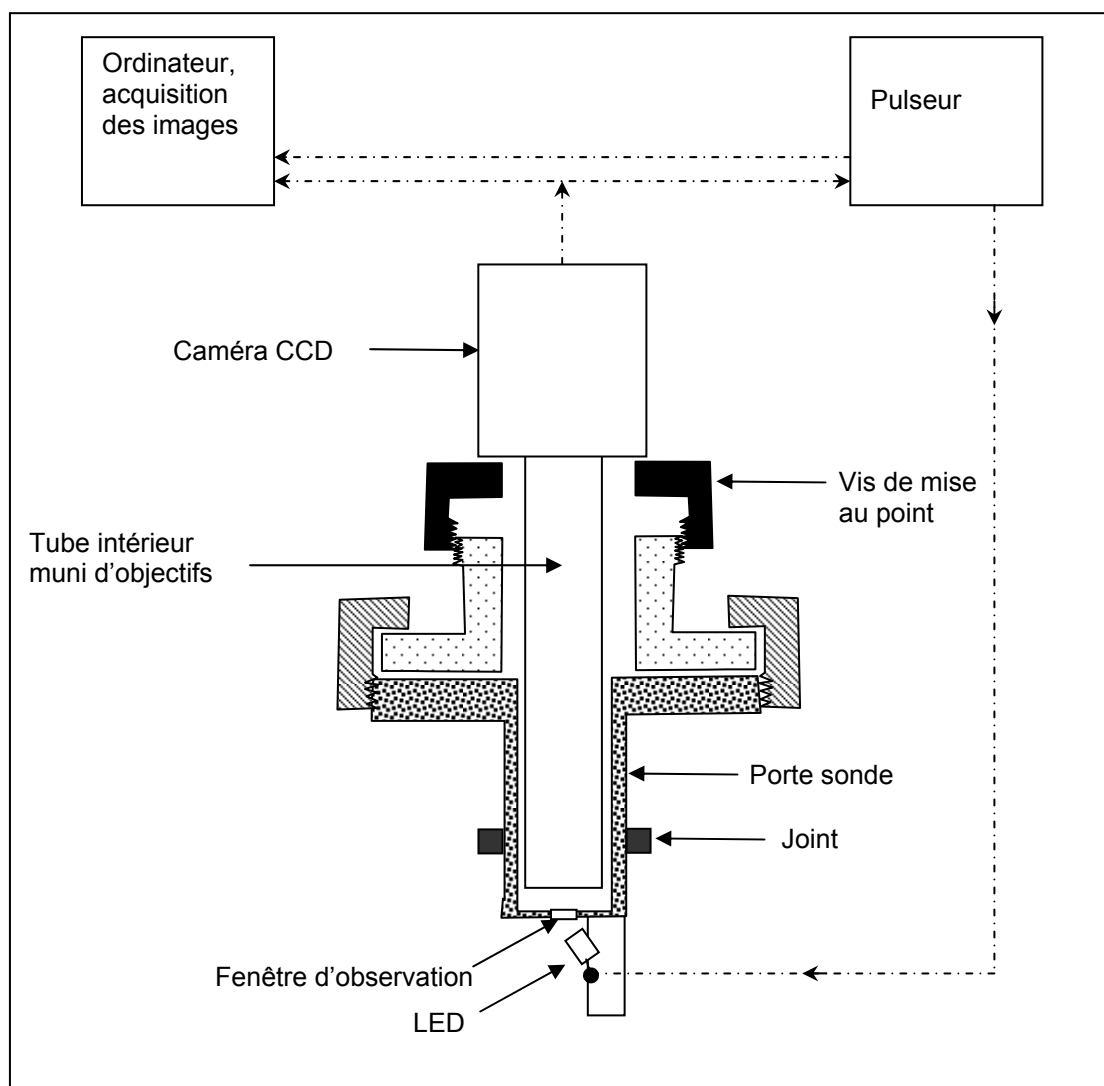


Figure 61. Schéma de principe du microscope in-situ. Les traits mixtes représentent les flux d'information.

Observation d'*E. coli* au microscope in-situ

10 mL d'une culture d'*E. coli* servent à inoculer 2 L de milieu LB stérile (extrait de levure 5 g.L⁻¹ ; peptone 10 g.L⁻¹ ; NaCl 9 g.L⁻¹ ; glucose 10 g.L⁻¹) en fiole Erlenmeyer de 5 L agité pendant 7h à 30°C (la densité optique à 600 nm passe de 0,115 à 2,25). L'ensemble est transvasé dans le réacteur B. Braun de 5 L, non stérile, réglé à 37°C, agité, aéré ($Q_d=2$ L.min⁻¹) et complété avec 300 mL d'eau de manière à ce que la turbine supérieure trempe dans le liquide.

Recherche de microbulles de CO₂ au microscope in-situ

20 g de levures *S. cerevisiae* en poudre (levures sèches actives, Saf-Levure, Lesaffre) sont réhydratées pendant 1h20 à 30°C dans 2 L de milieu LB modifié et stérile (extrait de

levure $2,5 \text{ g.L}^{-1}$; peptone 5 g.L^{-1} ; NaCl $4,5 \text{ g.L}^{-1}$; glucose 50 g.L^{-1}) en fiole Erlenmeyer de 5 L agité. L'ensemble est transvasé dans le réacteur B. Braun de 5 L, non stérile, réglé à 37°C , agité, non aéré.

VI.8.2. Méthode au gaz traceur (R134a)

La détermination de K_{La} par la méthode au gaz traceur est effectuée en deux temps. La valeur $(K_{La})_f$ du coefficient de transfert du forane est calculé par identification paramétrique en comparant la dynamique de désorption d'un pulse de forane effectué en phase liquide et mesuré en sortie de réacteur après désorption, à son modèle. Puis la valeur du K_{La} relatif à l'oxygène est calculée théoriquement à partir de $(K_{La})_f$.

Le bioréacteur Braun 20 L est utilisé dans sa configuration standard (pales à 5, 21, 36 cm du fond, $V_L=10 \text{ L}$, $T=37^\circ\text{C}$, $P=0,3 \text{ bar}$). Deux milieux de référence sont utilisés : l'eau du robinet et $50 \text{ g.L}^{-1} \text{ Na}_2\text{SO}_4$. Un seul flux d'aération est utilisé: $Q_d=0,146 \text{ L.s}^{-1}$. L'analyse de la concentration relative en forane (R134a) est réalisée au spectrophotomètre de masse. Une mesure est effectuée toutes les 6 secondes.

50 mL d'une solution saturée en forane sont préparés à température ambiante (22°C) à l'aide de deux seringues communicantes : l'une contient 50 mL d'eau, l'autre 15 mL de forane. Sous agitation pendant 2 min, le piston de la seringue contenant le forane se rétracte d'environ 10 mL. La solubilité du forane à 25°C étant de $0,9 \text{ g.L}^{-1}$ à 25°C (ATOFINA), et sa masse molaire de 102 g.mol^{-1} , 10,8 mL sont donc théoriquement solubles dans 50 mL. La conductance de transfert du forane est calculée à partir de la conductance de transfert de l'oxygène (Eq. 20).

Un pulse gazeux est utilisé comme référence : 10 mL de forane sont injectés dans le ciel par la platine du haut (l'injection est instantanée). Le pulse liquide est effectué comme suit : 50 mL d'une solution saturée en forane sont injectés dans le liquide, par un port à 10 cm du fond (durée de l'injection=5 secondes).

VI.9. Liste des symboles

symbole	nom	unité
a	aire interfaciale par unité de volume de liquide clair (Eq. 29)	m^{-1}
BG+OS	méthode du bilan gazeux couplé à l'oxydation par le sulfite	
c, C, C' ...	constantes	
D_A	coefficient de diffusion de l'espèce A en phase aqueuse	$m^2.s^{-1}$
d_b	diamètre de bulle	m
d_{bm}	diamètre de bulle minimum	m
d_D	diamètre de turbine à disque	m
d_{MAX}	diamètre stable maximum	m
dO_2	concentration en oxygène dissous mesurée par la sonde	% saturation
d_S	diamètre de Sauter (Eq. 32)	m
d_T	diamètre de réacteur (tank)	m
e	puissance dissipée par unité de volume de liquide, $=P_G/V_L$	$W.m^{-3}$
E	facteur d'accélération (« Enhancement factor »)	
E^\ddagger	énergie d'activation	$cal.g^{-1}$ ou $J.mol^{-1}$
E_{chem}	facteur d'accélération provoquée par les modifications chimiques du milieu	
e_d	taux de dissipation de l'énergie turbulente	$W.kg^{-1}$
Eff_{O_2}	efficacité du transfert d'oxygène (Eq. 127)	
E_{pp}	facteur d'accélération provoquée par la présence physique des particules	
E_{qO_2}	facteur d'accélération provoquée par la respiration des cellules	
E_r	erreur entre courbe expérimentale et modèle	
g	accélération gravitationnelle	$9,81 m.s^{-2}$
H	constante de Henry	$mol.L^{-1}.atm^{-1}$
Ha	nombre de Hatta	
h_G	paramètre spécifique au gaz (Eq. 4)	$m^3.kmol^{-1}$
h_i	paramètre spécifique à l'ion de concentration x_i (Eq. 4)	$m^3.kmol^{-1}$
I	force ionique (Eq. 36)	$mol.L^{-1}$
K_C	indice de consistance (Eq. 40)	$Pa.s^Y$
k_G	conductance de transfert de matière en phase gazeuse	$mol.bar^{-1}.m^{-2}.s^{-1}$
k_i	conductance de transfert de matière au travers de l'interface	$m.s^{-1}$
k_L	conductance de transfert de matière en phase liquide	$m.s^{-1}$
K_L	conductance globale de transfert de matière définie par rapport à la phase liquide	$m.s^{-1}$
K_{La}	coefficient volumique de transfert de matière global défini par rapport à la phase liquide	s^{-1}
$(K_{La})_{ref}$	K_{La} de référence (Eq. 66)	s^{-1}
k_n	constantes cinétiques de réaction d'ordre n	$L^n.mol^{-n}.s^{-1}$
K_T	coefficient global de transfert d'oxygène défini dans la phase liquide en système biologique (Eq. 67)	s^{-1}
MH	phase gazeuse modélisée de manière homogène	
MP	modèle d'écoulement piston du gaz	
m_S	coefficient de maintenance	$g/g_{MS}.s^{-1}$
n	indice de puissance (Eq. 40)	
N	vitesse d'agitation (rotation par minute ou par seconde)	min^{-1} ou s^{-1}
Na	nombre d'aération	

N_A	densité de flux molaire de transfert de l'espèce A	$\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
N_{A0}	densité de flux molaire de l'espèce A à l'interface	$\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
N_E	vitesse critique d'entraînement de surface	s^{-1}
N_p	nombre de puissance	
$O_{2\text{out}}$	pourcentage d'oxygène mesuré dans le gaz en sortie de réacteur	%
P	pression absolue totale	bar ou atm
P_0	puissance dissipée en l'absence de bulle dans le réacteur	W
p_A	pression partielle du gaz A	atm
P_e	puissance électrique consommée par le réacteur	W
P_G	puissance dissipée en condition d'aération	W
p_G	puissance volumique dissipée par le gaz	W.m^{-3}
q_A	terme de production ou consommation de l'espèce A	$\text{mol.m}^{-3}.\text{s}^{-1}$
q_{CO_2}	consommation volumique de CO_2	$\text{mol.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$
Q_d	flux gazeux entrant dans le réacteur par le diffuseur, calculé à pression et température de travail	$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$
q_{O_2}	consommation volumique d'oxygène (Eq. 97)	$\text{mol.m}^{-3}.\text{h}^{-1}$
Q^{out}	flux gazeux sortant du réacteur (à T, P de travail)	$\text{m}^3.\text{s}^{-1}$
QR	quotient respiratoire	
R	densité de flux de diffusion	$\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
R	constante des gaz parfaits= $8,3145 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$	$\text{J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$
R^2	valeur de la fonction de régression	
Re	nombre de Reynolds	
Re_i	nombre de Reynolds calculé par rapport à la pale, $Re_i = d_p^2 N \rho / \mu$	
r_{O_2}	vitesse spécifique de consommation de l'oxygène	$\text{mol.g}_{\text{MS}}^{-1}.\text{h}^{-1}$
tRu	turbine Rushton	
s	fraction de l'interface renouvelée par unité de temps dans le modèle de Danckwerts	s^{-1}
Se_{Ai}	constante de Sechenov pour le gaz A et la substance i	$\text{m}^3.\text{kmol}^{-1}$
T	température	$^{\circ}\text{C}$ ou K
t_e	durée d'exposition dans le modèle de Higbie	s
U_s	vitesse superficielle du gaz, $= Q_d / (\pi d_T^2 / 4)$	cm.s^{-1}
V_c	volume des cellules humides	m^3
V_C	volume du ciel gazeux	m^3
V_G	volume de gaz dispersé	m^3
V_{gaz}	volume total de gaz dans le réacteur	m^3
V_L	volume liquide total (de la suspension, pour un moût)	m^3
V_{L-c}	volume de la phase abiotique	m^3
V_T	volume total du fermenteur	L ou m^3
vvm	volume d'air par volume de liquide par minute	min^{-1}
W_A	flux de l'espèce A	mol.s^{-1}
W_{O_2}	flux de transfert d'oxygène	mol.s^{-1}
X	concentration en biomasse	$\text{g}_{\text{MS}}.\text{L}^{-1}$
x^*	concentration en phase liquide en équilibre avec la concentration en phase gazeuse en contact, selon la loi de Henry	mol.m^{-3}
x_A	concentration de l'espèce A dans la phase liquide	mol.m^{-3} ou g.m^{-3}
x_e	concentration estimée par le modèle	mol.m^{-3}
x_S	concentration mesurée par la sonde	mol.m^{-3}
x_{SM}	modélisation de la concentration de la sonde	mol.m^{-3}

y	concentration molaire dans le gaz	mol.m^{-3}
y_A^*	concentration en phase gazeuse qui serait en équilibre avec la concentration en phase liquide en contact, selon la loi de Henry	mol.m^{-3}
$Y_{X/S}$	rendement en substrat (g de biomasse formée par g de substrat consommé)	
z	distance	m
Z	hauteur de la dispersion gaz-liquide	m
Z	résistance au transfert	s.m^{-1}
z_i	charge de l'ion i	
α, β, χ	coefficients dans Eq. 21	
δ	épaisseur du film stagnant	μm
ε_p	rétention gazeuse permanente	
γ	critère de Merchuck (Eq. 60)	
$\dot{\gamma}$	gradient de vitesse (« shear rate »)	s^{-1}
μ	taux de croissance	h^{-1}
μ	viscosité dynamique	Pa s
μ_{app}	viscosité dynamique apparente	Pa s
μ_{max}	taux de croissance maximum	h^{-1}
ρ	masse volumique	kg.m^{-3}
σ	tension de surface	dyne.cm^{-1}
τ	contrainte tangentielle (« shear stress »)	Pa
τ_0	contrainte tangentielle seuil	Pa
τ_d	temps de diffusion	s
τ_F	constante de temps du film	s
τ_G	temps de séjour du gaz en phase liquide	s
τ_m	temps de mélange	s
τ_r	temps de réaction	s
τ_S	constante de temps de la sonde	s
ξ	fraction de bulle recouverte de particules (Eq. 65)	
ξ	excès de CO_2	

exposants

in	en entrée de réacteur
off	en sortie de phase dispersée
out	en sortie de réacteur

indices

b	milieu biologique
c	milieu coalescent
c	cellule
C	ciel gazeux
d	diffuseur
DC	dispersion complète du gaz
e	entraîné par la surface
F	film liquide
ln	calculé par une moyenne logarithmique
loc	variable locale

M	membrane de la sonde
mb	microbulle
MS	masse sèche
O ₂	oxygène
S	surfactant
S	sonde à oxygène
