



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Institut National des Sciences Appliquées
Discipline ou spécialité : Ingénieries microbienne et enzymatique

Présentée et soutenue par Yannick MANON
Le 08 Février 2012

Titre :

Etude de milieux de culture complexes et évolutifs
par développement de mesures physiques en ligne

JURY

MAINGONNAT Jean François
MORESOLI Christine
LINE Alain
SEYSSIECQ Isabelle
ALLIET Marion
LATRILLE Eric
ANNE-ARCHARD Dominique
FILLAUDEAU Luc

Directeur de recherche INRA
Professeure
Professeur
Maître de conférences
Maître de conférences
Ingénieur de recherche INRA
Chargée de recherche CNRS
Chargé de recherche INRA

Rapporteur
Rapporteuse
Examinateur
Examinatrice
Membre invitée
Membre invité
Directrice de thèse
Directeur de thèse

Ecole doctorale : Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques, Bioingénieries (SEVAB)
Unité de recherche : Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP)
CNRS UMR 5504, INRA UMR 792, INSA – 135 Avenue de Ranguel – 31077 Toulouse, France
Directeur(s) de Thèse : FILLAUDEAU Luc – ANNE-ARCHARD Dominique
Rapporteurs : MORESOLI Christine – MAINGONNAT Jean-François

Remerciements

Je remercie Nic LINDLEY, directeur du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, d'avoir autorisé le déroulement de cette thèse au sein de son laboratoire. Je remercie également Didier MARQUIS et Louis CASTEX, directeur et ex-directeur de l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse, pour m'avoir autorisé à réaliser ses travaux ainsi que mon monitorat de l'enseignement supérieur dans ces différents halls de recherche, salles de TP et autres caves m'ayant permis de rencontrer un grand nombre de personnes aux parcours divers et variés. Sans ces rencontres, je ne serai pas resté intègre scientifiquement, ces travaux n'auraient pas abouti techniquement, et malgré un certain nombre d'obstacles émotionnels, cette aventure fut riche d'expériences.

J'éprouve ma gratitude envers le jury pour avoir évalué le fruit de mon travail réalisé au cours de ces années. Je les remercie d'avoir accepté d'assister à ma soutenance malgré la distance, l'éloignement des thématiques scientifiques de chacun, et le volume du manuscrit.

A mes directeurs de thèse, Dominique ANNE-ARCHARD et Luc FILLAUDEAU, j'éprouve une profonde reconnaissance pour avoir eu l'audace et le courage d'encadrer un jeune chercheur de thématiques, d'approches scientifiques, de savoir-faire et de méthodes différents des leurs. Merci d'avoir eu confiance et de m'avoir permis de développer, sur votre sujet, la passion de la recherche que j'ai, bien au-delà d'un simple travail. Nos réunions et nos échanges parfois colorés et houleux prouvent encore cette motivation commune qui nous avions à vouloir faire avancer ce sujet.

Je remercie l'équipe Génie Microbiologique, encadrée par Carole JOUVE, pour sa réactivité et ses connaissances qu'ils ont su me faire partager avec une telle simplicité. J'adresse une attention particulière à Jean-Louis URIBELARREA qui permis d'avoir accès à ses cours, ses discussions, ses échanges intéressants et ses remarques pertinentes très (voir très très) riches d'informations.

Je souhaiterais montrer ma reconnaissance aux personnes ayant participé au développement de l'outil expérimental présenté dans ce document. Je pense à l'équipe de José MOREAU de l'atelier mécanique de l'INSA et l'équipe de Jean-Marc SFEDJ de l'atelier mécanique de l'IMFT pour leur contribution à la création des parties en inox. Je pense également à Pascal DEBREYNE du LGPTA et Guillaume CHAREIX qui ont travaillé sur le développement électrique et instrumental.

Je remercie également entre autre Sandrine ALFENORE, Nathalie GORRET et Mallorie TOURBIN, pour m'avoir permis d'avoir des conseils et une très grande accessibilité au matériel d'analyse physique, physico-chimique et chimique dans les différents halls et départements du LISBP.

Une reconnaissance spéciale va en direction de Claude MARANGES, à la fois directeur de l'école doctorale SEVAB et tuteur de mon monitorat d'enseignement supérieur. Il a su se rendre disponible, conviviale et diplomate au moment difficile avec toujours une parole réconfortante et remotivante quelques soient les circonstances.

Ces remerciements vont également en direction des personnels techniques du LISBP. Je pense principalement à Eugénie BABORC, Nathalie CLERGERIE, François RIZZETO, Bernard REBOUL, Christophe ELLERO et Michel BRUCHE qui m'ont vu arriver avec un grand nombre d'interrogations ou de problèmes techniques. Merci pour vos conseils avisés.

J'ai une pensée spéciale pour Florence BORDES et Sébastien NOUAILLES. Ils ont su prendre de leur temps pour un soutien émotionnel dans les couloirs du laboratoire ou autour d'un café, ainsi qu'une aide précieuse lors de la préparation de la soutenance.

Un énorme merci aux collègues et amis de galère qui ont partagé, pendant ces mois et années, mon quotidien dans les bureaux, devant les fermenteurs, dans les salles d'analyses, dans les couloirs... voir en dehors du LISBP. Certains ont déjà commencé une vraie vie, pour d'autre, je sais qu'elle arrivera : Ne perdez pas espoir ! Je pense entre autre à Abril, Bébère, Claire, Elise, Estelle, Emilie, Guillaume, Hazar, Jan, Julie B., Julie M., Julien C., Manu, Maud, Mathou, Myriam, Nam, Nam², Nathalie, Naziha, Papy Juju, Sandra, Sandy, Seb, Sirichai, Yoan et Yuri (avec mes excuses pour les oublié(e)s).

Une pensée plus spécifique va en direction des membres du plouple, des habitants du C₁₅T₁₂TC, et différentes personnes du laboratoire qui sont devenues bien plus que de simples collègues de boulot.

Au-delà du labo, je remercie mes amis géographiquement éloignés qui, malgré un manque récurrent de nouvelles de ma part, sont toujours restés proche de moi. Je pense entre autre à Amandine, Cathlyne, Cissou, Didine, Jéjé, Juju, Karen, Ludo, Poulette, Raph et Scout (désolé pour les oublié(e)s).

Ce travail n'aurait jamais abouti sans un soutien plus personnel de quelques personnes :

Un remerciement énorme à Bébère pour avoir pris le temps de me montrer ce qu'est la fermentation, de supporter et de répondre à des questions extraordinairement tordues et statistiquement incompréhensibles, et d'avoir partagé ma thèse bien au-delà de la revalorisation de ses moûts. Merci pour les bons et excellents moments partagés qu'elle que soit l'heure du jour ou de la nuit.

Un énorme remerciement à Seb pour avoir su me secouer et m'encourager quand j'ai usé la patience d'un grand nombre de personnes, y compris ma propre patience. Merci de m'avoir ouvert les yeux à propos de concepts relationnels sur tonalité de mur végétal et boutures en tout genre.

Merci à Greg pour son soutien au cours de toutes ces années, bien au-delà et en dehors de la thèse, pour avoir su m'apporter des coupures popstarisées et supporter des ralages continuels de tranches de vie laborantines.

Une immense reconnaissance à ma moitié qui a subi au quotidien les vagues (voir les tsunamis) et autres ascenseurs émotionnels, pour sa patience difficilement quantifiable tellement elle est énorme, pour ses mots qui m'ont permis de dédramatiser et de voir qu'il n'y a pas que le labo dans la vie. Son soutien a été une force de base sans laquelle ces travaux n'auraient pas abouti. Merci mon chéri !

A mes parents et ma famille qui ont vécu de loin cette aventure sans toujours comprendre ce qui arrivait, mais qui ont toujours maintenu leur soutien. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet.

Et une dernière pensée à mon Jojo...

Verba volant, scripta manent.

Proverbe latin

Comment faire simple quand on peut faire compliqué ?!

Devise Shadok

Shoot for the moon. Even if you miss you'll land among the stars.

Les Brown

A ma famille, à mes amis,
et à tous ceux pour qui la complication
est un obstacle à leur avancée.

Nom : MANON

Prénom : Yannick

Titre : Etude de milieux de culture complexes et évolutifs par développement de mesures physiques en ligne

Date : 08 Février 2012

N° d'ordre : 1114

Nombre de pages : 404

Spécialité : Ingénieries microbienne et enzymatique

Lieu : INSA Toulouse

Résumé

Durant les cultures cellulaires en bioréacteur, la physiologie des micro-organismes et les paramètres physico-chimiques (alimentations en gaz et en substrat, agitation, température, pH, pression) interagissent très fortement. La spécificité des bioréactions microbiennes, en relation avec les couplages irréductibles entre les transferts de chaleur, de matière et de quantité de mouvement, réside dans la complexité (milieu triphasique) et la dynamique (bioréaction autocatalysé) de ces systèmes. L'objectif de ce travail est de progresser dans la compréhension et le contrôle dynamique des interactions entre les aspects biologiques et les aspects physiques à différentes échelles (macro, micro et moléculaire) pour conduire la réaction biologique vers l'objectif défini (production de biomasse, de métabolites intra ou extra cellulaires, ...) et l'optimiser. Les cellules (concentration, forme, dimension, physiologie, ...) affectent fortement les propriétés physico-chimiques des moûts et par conséquent, les performances des bioprocédés (vitesses spécifiques, rendements, productivité). Le comportement rhéologique particulier du moût est souvent utilisé pour comprendre l'impact de la biomasse microbienne sur le rendement et les performances du bioprocédé.

Dans ce travail, des cultures axéniques, définies comme des cultures pures de microorganismes unicellulaires procaryote et eucaryote, sont considérées. Notre approche s'appuie sur des mesures physiques et physico-chimiques en ligne et hors ligne réalisées sur un bioréacteur instrumenté, mesures qui sont mises en place de façon à respecter les conditions imposées par les contraintes biologiques propres aux microorganismes et à la stratégie de culture choisie. Des cultures d'*Escherichia coli* et d'*Yarrowia lipolytica*, à taux de croissance contrôlé par l'apport de substrat, ont été réalisées dans une gamme de concentration allant de 0.1 à 100 g l⁻¹. Le bilan qui peut être dressé pour ce travail, tant sur les aspects scientifiques que technologiques, est le suivant :

- conception et réalisation d'un outil d'investigation original construit sur la base d'un bioréacteur (20 l) et pourvu d'une boucle de recirculation instrumentée pour la mesure,
- identification hydrodynamique (courbes de frottement) de conduites calibrées permettant la viscosimétrie en ligne durant une culture cellulaire,
- conception, développement et validation d'un code, LoCoPREL, permettant simultanément le contrôle de la culture cellulaire suivant une stratégie définie, la gestion de séquences de débit dans la boucle de dérivation et l'acquisition des données issues de l'instrumentation spécifique employée,
- comparaison des mesures réalisées en ligne à débit constant ou selon des séquences de débit,
- mise en évidence du comportement non newtonien des moûts et d'écart entre les mesures en ligne et hors ligne,
- analyse des mesures physiques réalisées en ligne et hors ligne, en lien avec les performances de la culture.

Mots-clés : moût, culture de microorganisme, fed-batch, *Escherichia coli*, *Yarrowia lipolytica*, viscosité en ligne, mesures physiques, caractérisation physico-chimique, fermentation, bioréacteur, rhéométrie.

Last name : MANON

First name : Yannick

Title : Study of complex and evolving culture media by development of on-line physical measurements

Date : 08th February 2012

N° of order : 1114

Number of pages : 404

Speciality : Microbial and enzymatic engineering

Place : INSA Toulouse

Abstract

During cell cultures in bioreactors, micro-organism physiology closely interacts with physico-chemical parameters such as gas and feed flowrates, mixing, temperature, pH, pressure. The specificity of microbial bioreactions in relation with irreducible couplings between heat and mass transfers and fluid mechanics, led into complex (three-phase medium) and dynamic (auto-biocatalytic reaction) systems. Our scientific approach aims to investigate, understand and control dynamic interactions between physical and biological systems at different scales (macro, micro and molecular) for molecules, strains and/or bioprocess innovation. Cells (concentration, shape, dimension, physiology...) strongly affect physico-chemical properties of broth. Then the modification of these characteristics interacts with bioprocess performances (specific rates, yields...) with an improvement or, more frequently, a decrease of yields. Among these properties, rheological behaviour is a strategy widely used to understand the impact of cells and the derivation of bioprocess performances.

In this manuscript, axenic cultures, defined as cultures of a pure and unicellular Prokaryote and Eukaryote microorganisms in bioreactors, are considered. Our approach is based on physical and physico-chemical on-line and off-line measurements in respect with accurate and stringent conditions imposed by cell culture strategy. *Escherichia coli* and *Yarrowia lipolytica* cultures were investigated with a control of growth rate by carbon feed in the range from 0.1 up to 100 g l⁻¹. Our scientific and technical actions and results led:

- to design and realize an original pilot based on a bioreactor (20 l) with a derivation loop including a specific on-line rheometric device as well as additional physical and biological measurements,
- to identify, from a hydrodynamic standpoint, the generalized friction curves of calibrated ducts enabling on-line viscosimetry during cell cultures,
- to conceive and validate a homemade software, named LoCoPREL, enabling simultaneously to control cell cultures under defined strategy and to manage flow sequences within the derivation loop,
- to discuss and compare on-line physical measurements under constant flow rate and various sequence strategy related to investigated shear-rates,
- to highlight about the non-newtonian rheological behaviour of broths and the gap between on-line and off-line measurements,
- to analyse on-line and off-line physical measurements in the light of biological performances during fed-batch cultures (mass balance, specific rate, yield).

Key-words : broth, cell culture, fed-batch, *Escherichia coli*, *Yarrowia lipolytica*, on-line and off-line measurements, physical and physicochemical properties, rheometry.

Valorisation scientifique

PUBLICATION

Yannick MANON, Dominique ANNE-ARCHARD, Jean-Louis URIBELARREA, Carole MOLINA-JOUVE, Luc FILLAUDEAU.

Physical and biological study of cell cultures in a bioreactor: on-line and off-line rheological analyses

Applied Rheology, Volume : 21, Issue : 3, Publié : 2011

COMMUNICATION ORALE

Yannick MANON, Dominique ANNE-ARCHARD, Luc FILLAUDEAU, Jean-Louis URIBELARREA, Carole MOLINA-JOUVE.

On-line Rheology of Cell Cultures in a Bioreactor.

8th World Congress of Chemical Engineering, Montréal, Quebec, Canada, 23-27 août 2009.

Yannick MANON, Jean-Louis URIBELARREA, Carole MOLINA-JOUVE, Dominique ANNE-ARCHARD, Luc FILLAUDEAU

Identification of physical and biological interactions in cell cultures in a bioreactor : on-line and off-line rheological characterisations

XII^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Marseille, France, 14 - 16 octobre 2009

COMMUNICATION ECRITE

Yannick MANON, Luc FILLAUDEAU, Dominique ANNE-ARCHARD

On-line and off-line density and rheometry during cell cultures: investigation on cell concentration thresholds

XIII^{ème} congrès de la Société Française de Génie des Procédés, Lille, France, 29 novembre - 01 décembre 2011

Table des matières

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I - SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE ET CONTEXTE DE L'ÉTUDE	7
INTRODUCTION	11
I. PHYSICO-CHIMIE DES MILIEUX BIOLOGIQUES	12
A. GRANDEURS MESURABLES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES	12
B. FORCES EN JEUX	15
C. FOCUS SUR LA RHEOLOGIE	19
D. INTERACTIONS RHEOLOGIE - PROCÉDE	33
E. MODÈLES DI-PHASIQUES	46
II. LES MESURES PHYSIQUES DANS LES CULTURES	54
A. PRODUCTION DE MÉTABOLITES	54
B. TRANSFORMATION DE MATRICE	58
C. CULTURES AXENIQUES	59
CONCLUSION	73
CHAPITRE II - MATÉRIELS ET MÉTHODES	75
I. MATÉRIEL : L'OUTIL EXPERIMENTAL	79
A. PRÉSENTATION GÉNÉRALE	79
B. BIOREACTEUR ET ENVIRONNEMENT INSTRUMENTAL	85
C. BOUCLE DE DÉRIVATION ET ENVIRONNEMENT	91
D. ALIMENTATION EN FLUIDES UTILITAIRES	94
II. FLUIDES DE MAQUETTE FROIDE ET MILIEUX DE CULTURE	97
A. MILIEUX SYNTHÉTIQUES DE CARACTÉRISATION	97
B. CULTURE D'ESCHERICHIA COLI	98
C. CULTURE D'YARROWIA LIPOLYTICA	102
III. MÉTHODES	107
A. CULTURES EN BIOREACTEUR	107
B. TECHNIQUES ANALYTIQUES HORS-LIGNE	116
IV. TRAITEMENT DES DONNÉES EXPERIMENTALES	131
A. RHEOMETRIE EN LIGNE	131
B. ANALYSE STATISTIQUE DE POPULATIONS CELLULAIRES	144

C.	DONNEES MICROBIOLOGIQUES	149
CHAPITRE III -	PRESENTATION DU LOGICIEL LOCOPREL, INTERFACE INFORMATIQUE DE L'OUTIL EXPERIMENTAL	165
	INTRODUCTION	169
I.	DESCRIPTION GENERALE DE LOCOPREL.....	170
A.	OBJECTIFS.....	170
B.	CONTEXTE ET HISTORIQUE.....	171
C.	ENVIRONNEMENT DE PROGRAMMATION.....	172
D.	SPECIFICITES DU CODE C# DEVELOPPE	173
E.	ARCHITECTURE DE LoCoPREL	178
II.	CONFIGURATION D'UNE EXPERIMENTATION	181
A.	DEMARRAGE ET SAUVEGARDE.....	181
B.	SYSTEME D'ACQUISITION DES CAPTEURS	181
C.	INITIALISATION DE VARIABLES ET DES GAZ	183
D.	BALANCES	185
E.	POMPES.....	188
F.	CROISSANCE MICROBIENNE	191
G.	JOURNAL EVENEMENTIEL ET FIN DES CONFIGURATIONS	194
H.	SYNTHESE DE LoCoPREL SUR LA PREPARATION ET LA CONFIGURATION DU MATERIEL.....	195
III.	CONDUITE DE CULTURES	196
A.	MENU GENERAL.....	196
B.	INOCULUM.....	199
C.	VISUALISATION DES VARIABLES	201
D.	GESTION DU BIOPROCEDE.....	203
E.	GESTION DE LA VISCOSIMETRIE	208
F.	PRELEVEMENTS ET CORRECTIFS AUTOMATISES.....	212
G.	SYNTHESE DE LoCoPREL AU COURS D'UNE EXPERIMENTATION BIOLOGIQUE.....	213
	CONCLUSION.....	214
CHAPITRE IV -	ANALYSE DES CULTURES.....	217
	INTRODUCTION	221
I.	PRESENTATION DES CULTURES	221
A.	EXPERIMENTATIONS SUR PROCARYOTE	222
B.	EXPERIMENTATIONS SUR EUCARYOTE.....	229
C.	DONNEES EXPERIMENTALES ET EXPLOITATION	235

II.	GRANDEURS PHYSIQUES EN LIGNE A DEBIT CONSTANT	240
A.	DENSIMETRIE EN LIGNE	240
B.	CONDUCTIMETRIE EN LIGNE	247
C.	PERTES DE CHARGE LINEIQUES	251
D.	BILAN DES MESURES A DEBIT CONSTANT	261
III.	GRANDEURS PHYSIQUES EN LIGNE LORS DE SEQUENCES.....	265
A.	SCENARII DE CARACTERISATION PONCTUELLE IN SITU	266
B.	ANALYSE DES MESURES PHYSIQUES	274
C.	BILAN DES MESURES A DEBIT SEQUENCE	289
	CONCLUSION.....	291
	CHAPITRE V - MESURES EN LIGNE ET HORS LIGNE LORS DES PHASES DE CROISSANCE : COMPARAISON, ANALYSE ET DISCUSSION	293
	INTRODUCTION	297
I.	CARACTERISATION HORS LIGNE COMPLEMENTAIRE.....	297
A.	ANALYSES MORPHO-GRANULOMETRIQUES DE LA BIOMASSE	298
B.	ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA BIOMASSE ET LE SURNAGEANT	316
C.	ANALYSES CHIMIQUES	320
	CONCLUSION	323
II.	MASSE VOLUMIQUE	325
A.	SUIVI EN LIGNE ET HORS LIGNE	325
B.	DISCUSSION SUR L'ANALYSE HORS LIGNE	327
C.	COMPARATIF	330
III.	EVOLUTION DES ESPECES CHARGEES	333
A.	BILAN DES ANALYSES HORS LIGNE	333
B.	SUIVI DE LA DYNAMIQUE IN SITU	333
IV.	RHEOMETRIE	336
A.	VISCOSIMETRIE EN LIGNE	336
B.	VISCOSIMETRIE HORS LIGNE	341
C.	RHEOMETRIE EN LIGNE ET HORS LIGNE : COMPARAISON	344
	CONCLUSION.....	347
	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	349
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	355
	ANNEXES	373

Liste et index

Liste des symboles

VARIABLES LATINES

A	Aire	[m ²]
c _{susp}	Concentration de suspension solide - liquide	[/]
c[η]	Concentration réduite	[/]
C	Couple	[N m]
C _i	Concentration de l'espèce i	[mol l ⁻¹]
C _i [*]	Concentration de l'espèce i à saturation	[mol l ⁻¹]
d	Diamètre géométrique	[m]
d _{4,3}	Diamètre moyen volumique	[μm]
d _S	Diamètre en surface	[μm]
d _V	Diamètre en volume	[μm]
d _a	Diamètre de l'agitateur	[m]
d _c	Diamètre de la cuve	[m]
d _h	Diamètre hydraulique	[m]
D _{rot}	Coefficient de diffusion brownienne en rotation (matière)	[s ⁻¹]
e	Charge élémentaire = 1.602176565(35) 10 ⁻¹⁹	[C]
E _a	Energie d'activation	[J mol ⁻¹]
F	Force	[N]
f	Force	[N]
G [*]	Module complexe	[Pa]
G'	Module élastique / Module d'accumulation	[Pa]
G''	Module de perte	[Pa]
g	Accélération de la pesanteur	[m s ⁻²]
g(t)	Fonction de relaxation	[Pa]
h	Hauteur	[m]
h _b	Hauteur des chicanes	[m]
h _c	Hauteur de la cuve	[m]
h _p	Hauteur de la pale rushton	[m]
l	Force ionique	[mol l ⁻¹]
J(t)	Complaisance de fluage (fonction de fluage)	[Pa ⁻¹]
K	Indice de consistance	[Pa s ⁿ]
K _C	Indice de consistance de Casson	[Pa s ⁿ]
K _p	Constante de la cellule du densimètre	[g s ⁻²]
k	Constante	
k _h	Fonction de s et Pe _{rot}	
k ₁	Facteur de forme	[/]

Liste des symboles

k_2	Coefficient au second ordre de la relation d'Einstein	[/]
k_B	Constante de Boltzmann = $1.381 \cdot 10^{-23}$	[J K ⁻¹]
k_E	Constante des suspensions concentrées	[/]
$k_{i,a}$	Coefficient de transfert de dioxygène	[h ⁻¹]
L	Longueur de conduite	[m]
l	Longueur	[m]
l_b	Largeur des chicanes	[m]
l_p	Largeur de la pale rushton	[m]
M_i	Masse molaire de l'espèce i	[g mol ⁻¹]
m_i	Masse de l'espèce i	[g]
m_U	Masse de la cellule en U du densimètre	[g]
N	Vitesse de rotation de l'agitation	[tr s ⁻¹]
N_{P0}	Nombre de puissance en régime turbulent	[/]
n	Indice de comportement (d'écoulement ou de structure)	[/]
n_b	Nombre de chicane	[/]
n_i	Nombre de charge sur l'espèce i	[/]
P	Puissance mécanique en cuve agitée ($Re_{agitation} > 10^4$)	[W]
P_g	Puissance mécanique en cuve agitée aéré	[W]
p	Pression	[Pa]
Q_R	Coefficient respiratoire	[/]
Q_v	Débit volumique	[m ³ h ⁻¹]
q	Charge électrique (cf. charge élémentaire)	[C]
q_i	Vitesse spécifique de consommation ou de production de i	[mol Cmol ⁻¹ h ⁻¹]
R	Rayon	[m]
R	Constante des gaz parfait = 8.314472	[J mol ⁻¹ K ⁻¹]
r	Rayon	[m]
r_i	Vitesse instantanée de consommation ou de production de i	[mol h ⁻¹]
S	Surface d'une section	[m ²]
SC	Séquence pyramidale de débit dans la boucle de dérivation	[/]
SP	Séquence en créneaux de débit dans la boucle de dérivation	[/]
s	Rapport d'axe d'une ellipsoïde	[/]
T	Température	[K]
Tu	Taux de turbulence	[/]
t	Temps	[s]
t_c	Temps caractéristique de relaxation d'un matériau	[s]
t_p	Temps caractéristique d'une expérience	[s]
U_g	Vitesse superficielle de gaz	[m ³ s ⁻¹]
V	Volume	[m ³]
V_{cell}	Volume de la cellule de mesure du densimètre	[ml]
v	Vitesse	[m s ⁻¹]
W	Travail	[J]

Liste des symboles

X	Concentration en biomasse (matière sèche)	$[g\ l^{-1}]$
X_H	Concentration en biomasse hydratée	$[g\ l^{-1}]$
X_{MS}	Concentration en matière sèche de la biomasse	$[g\ l^{-1}]$
x_i	Fraction molaire de l'espèce i	$[-]$
z_i	Charge électrique de l'espèce i	$[-]$

VARIABLES GRECQUES

α	Coefficient de réajustement du volume de liquide	$[-]$
α	Teneur en eau des cellules	$[-]$
γ	Déformation	$[-]$
γ_i	Degré de réduction de l'espèce i	$[-]$
$\dot{\gamma}$	Vitesse (taux) de cisaillement, gradient de vitesse	$[s^{-1}]$
$\dot{\gamma}_p$	Vitesse (taux) de cisaillement pariétale (à la paroi)	$[s^{-1}]$
Δp	Perte de charge	$[Pa]$
Δp_1	Perte de charge sur la conduite D1	$[Pa]$
Δp_2	Perte de charge sur la conduite D2	$[Pa]$
δ	Epaisseur de la couche limite	$[m]$
ε	Hauteur moyenne des aspérités de surface	$[m]$
ε_0	Permittivité du vide = $8.854\ 10^{-12}$	$[F\ m^{-1}]$
ε_r	Permittivité relative	$[F\ m^{-1}]$
η	Viscosité dynamique	$[Pa\ s]$
η_{app}	Viscosité dynamique apparente	$[Pa\ s]$
η_D	Viscosité dyn. d'un liquide dispersé dans un fluide porteur	$[Pa\ s]$
η_F	Viscosité dynamique de la phase continue (fluide porteur)	$[Pa\ s]$
η_r	Viscosité dynamique relative	$[-]$
η_{sp}	Viscosité dynamique spécifique	$[-]$
η_0	Viscosité dynamique pour une vitesse de cisaillement nulle	$[Pa\ s]$
η_0^{Ar}	Viscosité dynamique initial d'Arrhenius	$[Pa\ s]$
$[\eta]$	Viscosité dynamique intrinsèque	$[-]$
θ	Angle	$[^\circ]$
λ_D	Longueur de Debye	$[m]$
λ	Coefficient dans l'équation de Taylor	$[-]$
λ_e	Facteur d'encombrement stérique	$[-]$
μ	Vitesse spécifique de croissance (taux de croissance)	$[h^{-1}]$
ξ	Facteur de géométrie	$[-]$
ρ	Masse volumique	$[kg\ m^{-3}]$
ρ_0	Masse volumique en ligne du milieu sans cellule	$[kg\ m^{-3}]$
$\rho_{mesuré}$	Masse volumique en ligne du moût	$[kg\ m^{-3}]$
ρ_{ech}	Masse volumique mesuré par le densimètre	$[g\ ml^{-1}]$
σ	Tension de surface / Energie interfaciale	$[J\ m^{-2}]$

Liste des symboles

σ_0	Conductivité en ligne du milieu sans cellule	[mS cm ⁻¹]
$\sigma_{\text{mesuré}}$	Conductivité électrique en ligne du moût	[mS cm ⁻¹]
τ	Contrainte tangentielle / Contrainte de cisaillement	[N m ⁻²] = [Pa]
τ_0	Contrainte tangentielle critique	[Pa]
τ_p	Contrainte tangentielle pariétale (à la paroi)	[Pa]
τ_{cle}	Contrainte tangentielle dans la couche limite équivalente	[Pa]
ν	Viscosité cinématique	[m ² s ⁻¹]
Φ_i	Flux de l'espèce i	[mol h ⁻¹]
ϕ	Fraction volumique	[/]
ϕ_{CFC}	Fraction volumique de l'arrangement cubique faces centrées	[/]
ϕ_{max}	Fraction volumique d'empilement maximum	[/]
ω	Vitesse de rotation / vitesse de rotation	[rad s ⁻¹]



Liste des abbréviations des souches

ALGUES

H. lacustris *Haematococcus lacustris*

BACTERIES

A. infernus *Alteromonas infernus*
A. vinelandii *Azotobacter vinelandii*
B. cereus *Bacillus cereus*
B. subtilis *Bacillus subtilis*
C. capsulata *Cyanospira capsulata*
E. coli *Escherichia coli*
L. delbrueckii *Lactobacillus delbrueckii*
L. mesenteroides *Leuconostoc mesenteroides*
P. aeruginosa *Pseudomonas aeruginosa*
R. aquatilis *Rahnella aquatilis*
S. aureus *Staphylococcus aureus*
S. thermophilus *Streptococcus thermophilus*
V. diabolicus *Vibrio diabolicus*
X. campestris *Xanthomonas campestris*

CHAMPIGNONS

A. roseorufa *Actinomadura roseorufa*
A. pullulans *Aureobasidium pullulans*
A. niger *Aspergillus niger*
A. sojae *Aspergillus sojae*
A. terreus *Aspergillus terreus*
C. acremonium *Cephalosporium acremonium*
G. fujikuroi *Gibberella fujikuroi*
G. lozoyensis *Glarea lozoyensis*
P. japonica *Paecilomyces japonica*
P. sinclairii *Paecilomyces sinclairii*
P. chrysogenum *Penicillium chrysogenum*
P. baumii *Phellinus baumii*
P. gilvus *Phellinus gilvus*
P. linteus *Phellinus linteus*
S. erytraea *Saccharopolyspora erytraea*
S. clavuligerus *Streptomyces clavuligerus*
S. fradiae *Streptomyces fradiae*

Liste des abréviations des souches

S. olindensis *Streptomyces olindensis*

S. rimosus *Streptomyces rimosus*

LEVURES

C. albicans *Candida albicans*

S. cerevisiae *Saccharomyces cerevisiae*

S. pombe *Schizosaccharomyces pombe*

Y. lipolytica *Yarrowia lipolytica*

PLANTES

B. vulgaris *Beta vulgaris*

C. pyrenoidosa *Chlorella pyrenoidosa*

D. stramonium *Datura stramonium*

N. tabacum *Nicotiana tabacum*

P. somniferum *Papaver somniferum*

P. frutescens *Perilla frutescens*

S. chrysotrichum *Solanum chrysotrichum*



Liste des invariants de similitude

Da	Nombre de Darcy	[/]
Eu	Nombre d'Euler	[/]
Fa	Nombre de Fanning	[/]
Fr	Nombre de Froude	[/]
Ne	Nombre de Newton	[/]
Nu	Nombre de Nusselt	[/]
Re	Nombre de Reynolds	[/]
Sh	Nombre de Sherwood	[/]
We	Nombre de Weber	[/]

Index des figures

Figure 1 : Schéma des forces impliquées sur un microorganisme	15
Figure 2 : Schéma de l'interaction hydrophobe entre deux particules dans l'eau.....	18
Figure 3 : Ecoulement de Couette plan (écoulement de cisaillement pur permanent)	20
Figure 4 : Tenseur des contraintes - Système forces/contraintes d'un volume élémentaire de fluide..	21
Figure 5 : Ecoulement de cisaillement pur permettant d'obtenir des caractérisations rhéologiques complémentaires	22
Figure 6 : Courbes d'écoulement et rhéogrammes caractérisant des fluides newtoniens généralisés	24
Figure 7 : Courbes d'écoulement et rhéogrammes de fluides viscoplastiques.....	26
Figure 8 : Manifestation de l'élasticité : effet Weissenberg	27
Figure 9 : Illustration du comportement thixotrope.....	28
Figure 10 : Schéma de principe d'un tube viscosimétrique.....	29
Figure 11 : Schéma de principe d'une géométrie cône-plan.....	31
Figure 12 : Schéma d'une géométrie plan-plan	32
Figure 13 : Ecoulement de Poiseuille dans une conduite cylindrique de rayon R : représentation de la contrainte tangentielle et des pressions associées.....	34
Figure 14 : Comparatif entre un écoulement laminaire et turbulent (Bimbenet <i>et al.</i> , 2002)	37
Figure 15 : Formation de couches limites à l'entrée d'une conduite amenant à un écoulement laminaire (a) ou turbulent (b) (Bimbenet <i>et al.</i> , 2002)	39
Figure 16 : Profils de vitesse pour un écoulement turbulent dans un tuyau - (a) profil réel, (b) profil simplifié par les hypothèses de la couche limite équivalente.....	40
Figure 17 : Diagramme de Dodge et Metzner (Midoux, 1993).....	45
Figure 18 : Diagramme de Moody - nombre de Darcy en fonction du nombre de Reynolds et de la rugosité (Bimbenet <i>et al.</i> , 2002)	46
Figure 19 : Les différents régimes d'écoulement de suspensions solide-liquide en conduite horizontale	47
Figure 20 : Les différents régimes d'écoulement de suspension liquide-gaz en conduite horizontale .	53
Figure 21 : Fibroblaste d'une souris liée à des particules magnétiques (a) et schéma du complexe particule magnétique - membrane cellulaire - cytosquelette (b) (Bausch <i>et al.</i> , 1998).....	61
Figure 22 : Classification morphologique de <i>Streptomyces olindensis</i> (Pamboukian and Facciotti, 2005)	62
Figure 24 : Microscopie de <i>Solanum chrysotrichum</i> (x4) cultivé en bioréacteur montrant différents facteurs de forme elliptique (EFF) pour une aire projetée constante. A gauche, EFF = 5.5 ; à droite, EFF = 1.2 (Trejo-Tapia <i>et al.</i> , 2001).....	63
Figure 25 : Microscopie électronique à balayage de <i>Yarrowia lipolytica</i> au cours de la transition morphologique de la forme ovoïde à la forme en hyphe, échelle 1 μm (Herrero <i>et al.</i> , 1999)	64
Figure 26 : Changement morphologique entre culture de <i>Cephalosporium acremonium</i> en erlen (à gauche) et en bioréacteur (à droite) (Lim <i>et al.</i> , 2002).....	65

Index des figures

Figure 27 : Evolution morphologique de <i>P. sinclairii</i> en culture batch en bioréacteur sous une aération de (A) 1.5 VVM et (B) 3.5 VVM (Cho <i>et al.</i> , 2002)	66
Figure 28 : Changement morphologique de <i>Paecilomyces japonica</i> au cours du temps (Sinha <i>et al.</i> , 2001)	67
Figure 29 : Modifications morphologiques de <i>Streptomyces fradiae</i> induite par des sources d'azotes différents : (A, B) ion ammonium, (C, D) mélange acide glutamique et acide aspartique (Choi <i>et al.</i> , 2000).....	67
Figure 30 : Modification morphologique de trois basidiomycetes <i>Phellinus</i> au cours d'une production d'exopolysaccharide (Hwang <i>et al.</i> , 2004)	68
Figure 31 : Changements morphologiques de <i>Aspergillus terreus</i> pour différentes conditions hydrodynamiques dans des configurations STR et FBR (Rodríguez Porcel <i>et al.</i> , 2005).....	69
Figure 32 : Schéma expérimental de Akroyd pour son système de rhéométrie continue (Akroyd and Nguyen, 2003).....	71
Figure 33 : Schéma expérimental du dispositif de Seyssiecq <i>et al.</i> permettant une rhéométrie en ligne (Seyssiecq <i>et al.</i> , 2008).....	71
Figure 34 : Schéma du montage expérimental de Kemblowski (Kemblowski <i>et al.</i> , 1990)	72
Figure 35 : Schéma de la plateforme de rhéologie en ligne.....	79
Figure 36 : PID de l'outil expérimental.....	80
Figure 37 : Armoire électrique et localisation des différents étages.....	81
Figure 38 : Schéma récapitulatif des liaisons entre instruments.....	82
Figure 39 : Représentation de la face arrière du module Agilent® 34970A.....	83
Figure 40 : Schéma de la chaîne d'acquisition associée au module Agilent® - De la boucle de courant du capteur à l'acquisition des données sur l'ordinateur	84
Figure 41 : Schéma de principe de l'analyseur gaz INNOVA®.....	89
Figure 42 : Schéma du circuit hydraulique de l'outil expérimental	94
Figure 43 : Schéma du circuit aéraulique de l'outil expérimental.....	95
Figure 44 : Schéma du circuit vapeur de l'outil expérimental.....	96
Figure 45 : Les stades de préculture d' <i>E. coli</i> jusqu'à inoculation dans le bioréacteur.....	109
Figure 46 : Les stades de préculture d' <i>Y. lipolytica</i> jusqu'à inoculation dans le bioréacteur	110
Figure 47 : Schéma général de la partie bioréacteur de l'outil expérimental	115
Figure 48 : Principe du banc optique du granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malvern®).....	118
Figure 49 : Principe de la mesure de distance géométrique sur une particule	120
Figure 50 : Schéma de principe de la mesure du potentiel zeta par effet Doppler	123
Figure 51 : Réaction de dosage du glucose par l'analyseur automatique YSI 2700 Select	127
Figure 52 : Exemple de principe des séquences de débit de la pompe gérant la rhéologie en ligne sur l'outil expérimental.....	132
Figure 53 : Détermination du diamètre hydraulique par suppressions successives de paliers pour la conduite D2 - Comparaison des valeurs en fonction du calcul	135
Figure 54 : Effet de la correction et comparaison des données contenues dans la séquence de débit pour la conduite D1	136

Index des figures

Figure 55 : Courbe de frottement de la conduite D1 : Modèles employés par régime d'écoulement, nombres de Reynolds critiques et modèle de Churchill.....	137
Figure 56 : Courbe de frottement de la conduite D2 : Modèles employés par régime d'écoulement, nombres de Reynolds critiques et modèle de Churchill.....	137
Figure 57 : Du projet visual C# au logiciel utilisé dans le système d'exploitation	173
Figure 58 : Structure des étapes de LoCoPREL aboutissant à la conduite d'une culture	175
Figure 59 : Schéma général de la structuration de LoCoPREL	179
Figure 60 : Fenêtre de configuration initiale des capteurs	182
Figure 61 : Fenêtre de contrôle de l'instrumentation de l'outil expérimental (hors capteurs)	183
Figure 62 : Fenêtre d'initialisation de variable de la plateforme et des gaz	183
Figure 63 : Fenêtre de configuration de l'analyseur gaz (cas du spectromètre de masse)	184
Figure 64 : Fenêtre de configuration de l'analyseur gaz (cas de l'INNOVA®)	185
Figure 65 : Fenêtre de gestion des apports liquides du bioprocédé	185
Figure 66 : Fenêtre récapitulative des balances disponibles à paramétrer	186
Figure 67 : Fenêtre de paramétrage de la balance « Substrat 1 »	186
Figure 68 : Fenêtre de paramétrage de la balance « Sel d'Alimentation »	187
Figure 69 : Fenêtre de paramétrage de la balance « Régulation pH n°1 »	188
Figure 70 : Fenêtre récapitulative des pompes pouvant être étalonnées	189
Figure 71 : Fenêtre de gestion des gammes de tensions des pompes	189
Figure 72 : Fenêtre d'étalonnage de pompe (en manuel à gauche, en automatique à droite)	190
Figure 73 : Fenêtre d'accès pour la configuration des paramètres biologiques.....	191
Figure 74 : Fenêtre de paramétrage pour une estimation et une production de biomasse	192
Figure 75 : Fenêtre de vérification de la configuration des apports	193
Figure 76 : Fenêtre de paramétrage d'information sur le microorganisme employé	193
Figure 77 : Fenêtre d'initialisation du journal évènementiel	194
Figure 79 : Menu général du logiciel LoCoPREL (en cours d'expérimentation)	196
Figure 80 : Fenêtre du menu général du logiciel LoCoPREL (à gauche au moment du démarrage de l'expérimentation biologique / à droite juste avant d'inoculer le bioréacteur)	200
Figure 81 : Fenêtre d'enregistrement des masses initiales.....	200
Figure 82 : Fenêtre des conditions initiales du bioréacteur après inoculation	201
Figure 83 : Fenêtre de l'ensemble des valeurs obtenues en ligne.....	202
Figure 84 : Fenêtre de visualisation graphique des données	203
Figure 85 : Fenêtre des consignes appliquées au bioréacteur	204
Figure 86 : Fenêtre récapitulative de l'état de fonctionnement des pompes d'alimentation	204
Figure 87 : Fenêtre de gestion des débits d'une pompe d'alimentation.....	205
Figure 88 : Fenêtre de gestion des gaz du bioréacteur	207
Figure 89 : Fenêtre de gestion du journal évènementiel	207
Figure 90 : Fenêtre de consultation du contenu du journal évènementiel	208
Figure 91 : Fenêtre des types d'évènement à ajouter.....	208
Figure 92 : Fenêtre d'un ajout de nutriment (à gauche) et d'une information (à droite).....	208
Figure 93 : Fenêtre de gestion de la viscosimétrie en ligne	209

Index des figures

Figure 94 : Fenêtre de gestion manuelle de la pompe de la boucle externe	210
Figure 95 : Fenêtre de gestion de profils programmés de la pompe située sur la boucle externe	210
Figure 96 : Fenêtre de prélèvement d'un échantillon	212
Figure 98 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture I, <i>E. coli</i>)	223
Figure 99 : Flux intrants en fonction du temps (culture I, <i>E. coli</i> , partie A : croissance)	224
Figure 100 : Première culture d' <i>E. coli</i> (culture I, <i>E. coli</i>)	224
Figure 101 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture II, <i>E. coli</i>)	226
Figure 102 : Flux intrants et extrants en fonction du temps (culture II, <i>E. coli</i>)	226
Figure 103 : Première culture d' <i>E. coli</i> avec utilisation de LoCoPREL (culture II, <i>E. coli</i>)	227
Figure 104 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture III, <i>E. coli</i>)	228
Figure 105 : Flux intrants et extrants en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i>)	228
Figure 106 : Seconde culture d' <i>E. coli</i> avec utilisation de LoCoPREL (culture III, <i>E. coli</i>)	229
Figure 107 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture IV, <i>Y. lipolytica</i>)	230
Figure 108 : Flux intrants en fonction du temps (culture IV, <i>Y. lipolytica</i> , partie A : croissance)	230
Figure 109 : Première culture d' <i>Y. lipolytica</i> (culture IV, <i>Y. lipolytica</i>)	231
Figure 110 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture V, <i>Y. lipolytica</i>)	232
Figure 111 : Flux intrants en fonction du temps (culture V, <i>Y. lipolytica</i> , partie A : croissance)	232
Figure 112 : Seconde culture d' <i>Y. lipolytica</i> (culture V, <i>Y. lipolytica</i>)	233
Figure 113 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	234
Figure 114 : Flux intrants et extrants en fonction du temps (culture VI, <i>Y. lipolytica</i> , partie A : croissance)	234
Figure 115 : Culture d' <i>Y. lipolytica</i> avec LoCoPREL (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	235
Figure 116 : Plages de concentrations investiguées en fonction du temps (cultures I, II, III, <i>E. coli</i> - IV, V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	237
Figure 117 : Vérification du bilan carbone en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i>)	238
Figure 118 : Vérification du bilan carbone en fonction du temps (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	238
Figure 119 : Evolution de la masse volumique en ligne lors de l'inoculation du bioréacteur par des « précultures » à haute concentration en cellules (culture I, <i>E. coli</i> - culture IV, V, <i>Y. lipolytica</i>)	240
Figure 120 : Suivi de la masse volumique en ligne et de la ventilation en fonction de la concentration en biomasse lissée interpolée (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	242
Figure 121 : Masse volumique en ligne et vitesse d'agitation du bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	243
Figure 122 : Variation de la masse volumique en ligne en fonction de la concentration en biomasse (culture I, III, <i>E. coli</i> - culture IV, V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	244
Figure 123 : Evolution de la conductivité électrique en ligne lors de l'inoculation en fonction du temps (culture I, III, <i>E. coli</i> - culture V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	247
Figure 124 : Différence de conductivité électrique au cours de l'inoculation (culture I, III, <i>E. coli</i> - culture V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	248
Figure 125 : Evolution de la conductivité électrique et de la ventilation en fonction de la concentration en biomasse (cultures III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	249

Index des figures

Figure 126 : Différence de conductivité électrique équivalente à une suspension solide-liquide en fonction de la concentration en biomasse (culture I, II, III, <i>E. coli</i> - culture IV, V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	250
Figure 127 : Pertes de charge normées en fonction du temps pour la conduite D1 (culture II, III, <i>E. coli</i> - culture V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	252
Figure 128 : Pertes de charge normées en fonction du temps pour la conduite D2 (culture I, II, III, <i>E. coli</i> - culture V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	253
Figure 129 : Pertes de charge normées pour la conduite D1 et ventilation du bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	254
Figure 130 : Pertes de charge normées pour la conduite D2 et ventilation du bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	254
Figure 131 : Pertes de charge normées de la conduite D1 en fonction de la concentration en biomasse, échelle logarithmique (culture II, III, <i>E. coli</i> - culture IV, V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	255
Figure 132 : Pertes de charge normées de la conduite D1 en fonction de la concentration en biomasse, échelle linéaire (culture II, III, <i>E. coli</i> - culture IV, V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	256
Figure 133 : Pertes de charge normées de la conduite D2 en fonction de la concentration en biomasse, échelle logarithmique (toutes les cultures)	257
Figure 134 : Pertes de charge normées de la conduite D2 en fonction de la concentration en biomasse, échelle linéaire (toutes les cultures)	257
Figure 135 : Hypothèse de représentation schématique de la dynamique de la masse volumique et de pertes de charge normées en ligne pour une production de biomasse chez <i>E. coli</i>	262
Figure 136 : Hypothèse de représentation schématique de la dynamique de la masse volumique et de pertes de charge normées en ligne pour une production de biomasse chez <i>Y. lipolytica</i>	264
Figure 137 : Masse volumique et conductivité électrique en fonction du débit volumique, et leurs écart-types associés, pour une séquence pyramidale descendante et ascendante (culture I, <i>E. coli</i> , $t = 5.6 \text{ h}$, $X = 66 \text{ g l}^{-1}$)	267
Figure 138 : Masse volumique et de la conductivité électrique en fonction du débit volumique, et leurs écart-types associés, au cours d'une séquence pyramidale descendante et ascendante (culture I, <i>E. coli</i> , $t = 14.8 \text{ h}$, $X = 102 \text{ g l}^{-1}$)	267
Figure 139 : Masse volumique et conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés, pour des séquences en créneau (rose/orange), pyramidal (bleu) descendant et ascendant (culture I, <i>E. coli</i> , $t = 12.3 \text{ h}$, $X = 108 \text{ g l}^{-1}$)	269
Figure 140 : Conductivité électrique et débit massique mesurés sur le milieu minimum avant inoculation au cours d'une séquence de débit (cultures III, <i>E. coli</i> - culture V, <i>Y. lipolytica</i>)	270
Figure 141 : Masse volumique et pression relative mesurées sur le milieu minimum avant inoculation au cours d'une séquence de débit (cultures III, <i>E. coli</i> - culture V, <i>Y. lipolytica</i>)	271
Figure 142 : Conductivité électrique et débit massique mesurés au cours d'une séquence de débit en présence de biomasse (cultures III, <i>E. coli</i> , $t = 119 \text{ h}$, $X_{\text{inactif}} = 24.9 \text{ g l}^{-1}$ - culture V, <i>Y. lipolytica</i> , $t = 14.5 \text{ h}$, $X = 36 \text{ g l}^{-1}$)	272

Index des figures

Figure 143 : Masse volumique et pression relative mesurées au cours d'une séquence de débit en présence de biomasse (cultures III, <i>E. coli</i> , $t = 119$ h, $X_{\text{inactif}} = 24.9 \text{ g l}^{-1}$ - culture V, <i>Y. lipolytica</i> , $t = 14.5$ h, $X = 36 \text{ g l}^{-1}$).....	273
Figure 144 : Masse volumique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture I-SP, III-SC, <i>E. coli</i>), *biomasse estimée.....	275
Figure 145 : Masse volumique en fonction du débit volumique, et écarts-types associés (culture VI-SC, <i>Y. lipolytica</i>)	277
Figure 146 : Masse volumique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture V-SP, <i>Y. lipolytica</i>)	278
Figure 147 : Masse volumique mesurée et théorique en fonction de la pression relative, et leurs écart-types associés (culture I, III, <i>E. coli</i> - culture V, VI, <i>Y. lipolytica</i>)	279
Figure 148 : Estimation de la masse volumique dans le bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse	280
Figure 149 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture III-SC, <i>E. coli</i>)	281
Figure 150 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique de circulation, et écart-types associés (culture I-SP, <i>E. coli</i>)	282
Figure 151 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture VI-SC, <i>Y. lipolytica</i>)	283
Figure 152 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture IV-SP, <i>Y. lipolytica</i>).....	284
Figure 153 : Pertes de charge sur D1 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture III-SC, <i>E. coli</i>)	285
Figure 154 : Pertes de charge sur D2 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (triangle bleu : culture I-SP, <i>E. coli</i> - carré brun : culture III-SC, <i>E. coli</i>)	286
Figure 155 : Pertes de charge sur D1 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture VI-SC, <i>Y. lipolytica</i>)	287
Figure 156 : Pertes de charge sur D1 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture IV-SP, <i>Y. lipolytica</i>).....	288
Figure 157 : Pertes de charge sur D2 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (triangle vert : culture IV-SP, <i>Y. lipolytica</i> - carré brun : culture VI-SC, <i>Y. lipolytica</i>)	289
Figure 158 : Observation par microscopie optique (x50, sous huile) à $t = 0, 15.3, 36.5$ et 49.7 h, échelle = $10 \mu\text{m}$ (culture III, <i>E. coli</i>).....	299
Figure 159 : Observation par microscopie optique (x50, sous huile) à $t = 0, 8.7, 21.6$ et 32.6 h, échelle = $10 \mu\text{m}$ (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	300
Figure 160 : Taux d'obscuration pondéré par le taux de dilution en fonction de la concentration en biomasse (culture II, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	301
Figure 161 : Distribution volumique du diamètre équivalent pondéré par le taux de dilution et le taux d'obscuration en fonction du diamètre équivalent d_v (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	302
Figure 162 : Diamètre en volume, d_v pour 10, 50 et 90% de la population, $d_{4,3}$, et écart-types associés, en fonction de la concentration en biomasse (Culture II, <i>E. coli</i>).....	303

Index des figures

Figure 163 : Diamètre en volume, d_v , pour 10, 50 et 90% de la population, $d_{4,3}$, et écart-types associés, en fonction de la concentration en biomasse (Culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	304
Figure 164 : Fonction de distribution volumique cumulée des diamètres en surface (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	306
Figure 165 : Fonctions de répartition de la distribution volumique des diamètres équivalents d_v et d_s issus du granulomètre laser et le morphogranulomètre - (a) 25.8 g l ⁻¹ , t = 24.8 h / (b) 0.8 g l ⁻¹ , t = 3.3 h / (c) 58.7 g l ⁻¹ , t = 32.9 h.....	307
Figure 166 : Evolution du diamètre moyen volumique en fonction de la concentration en biomasse (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	308
Figure 167 : Dendrogramme basé sur la largeur des cellules, issu de l'analyse de 107821 objets détectés (culture III, <i>E. coli</i>).....	309
Figure 168 : Fonction de répartition de la largeur des cellules (culture III, <i>E. coli</i>) - en marron, les échantillons de début d'expérimentation.....	310
Figure 169 : Dendrogramme basé sur la longueur des cellules, issu de l'analyse de 66624 objets détectés (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	311
Figure 170 : Fonction de répartition de la longueur des cellules (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>) - en bleu, les échantillons issus de la préculture	311
Figure 171 : Dendrogramme effectué sur le paramètre géométrique « solidité » de la culture VI (nombre total de particules : 40156)	313
Figure 172 : Fonction de répartition de la solidité (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	314
Figure 173 : Augmentation de la solidité par modification de la forme des cellules	314
Figure 174 : Potentiel Zeta en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	317
Figure 175 : Pression osmotique en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>) ..	318
Figure 176 : Force ionique du surnageant en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	319
Figure 177 : Masse molaire de la biomasse en [Cmol] et rapport élémentaire intracellulaire N/C [I] en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	321
Figure 178 : Ratios des concentrations en protéines présentes dans le surnageant par rapport à la concentration en biomasse, et de la quantité de protéine dans le surnageant par rapport à la quantité de protéine dans la biomasse	322
Figure 179 : Teneur de la biomasse en éléments inorganiques [g 100g _x ⁻¹] en fonction du temps (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	323
Figure 180 : Masse volumique en fonction de la concentration en biomasse pour les cultures III et VI	326
Figure 181 : Représentation schématique d'un échantillon de moût après prélèvement du bioréacteur	327
Figure 182 : Cycle de la masse volumique cellulaire de <i>S. cerevisiae</i> Y55 (Baldwin and Kubitschek, 1984)	331
Figure 183 : Conductivité électrique et variation de conductivité électrique <i>in situ</i> en fonction de la concentration en biomasse (culture III, <i>E. coli</i>)	334

Index des figures

Figure 184 : Conductivité électrique et différence de conductivité électrique <i>in situ</i> en fonction de la concentration en biomasse (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	335
Figure 185 : Viscosité estimée sur l'outil expérimental pour les conduites D1 et D2 à débit nominal (culture III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	337
Figure 186 : Comparaison des viscosités déterminées sur l'outil expérimental pour les conduites D1 et D2 (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	338
Figure 187 : Evolution du diamètre hydraulique sur la conduite D1 en fonction de la fraction volumique du moût en séparation de phase.....	340
Figure 188 : Comparaison de rhéogrammes à une concentration en biomasse de 25.7 g l ⁻¹ (culture VI - <i>Y. lipolytica</i>).....	341
Figure 189 : Rhéogrammes des concentrations en biomasse de 49.6 g l ⁻¹ et 58.6 g l ⁻¹ , à des temps de conservation t0 et t0 + 6 jours (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	342
Figure 190 : Evolution des échantillons après prélèvement par la comparaison de la pression osmotique (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	343
Figure 191 : Comparaison des viscosités déterminées sur un rhéomètre et sur l'outil expérimental (culture III, <i>E. coli</i>)	344
Figure 192 : Schéma d'une similitude géométrique	377
Figure 193 : Similitude physique relative aux vitesses.....	378
Figure 194 : Insertion d'un commentaire avant l'initialisation du fichier de sauvegarde.....	390
Figure 195 : Panneau de paramétrage des capteurs.....	390
Figure 196 : Acquisition de données et séquences de débit.....	391
Figure 197 : Récapitulatif des capteurs utilisés.....	392

Index des tableaux

Tableau 1 : Substances synthétisées par les microorganismes	54
Tableau 2 : Liste des pompes d'alimentation utilisées et de leurs spécifications	86
Tableau 3 : Relation entre tête de pompe - tuyau - capacité de pompage	86
Tableau 4 : Liste des balances utilisées et leurs spécifications	87
Tableau 5 : Liste des débitmètres massiques	88
Tableau 6 : Liste des capteurs de température présents sur l'outil expérimental	93
Tableau 7 : Caractéristiques rhéologiques des solutions de xanthane utilisées.....	98
Tableau 8 : Composition du milieu riche LB utilisé pour les boîtes de Pétri et la préculture I _R	99
Tableau 9 : Concentration de chaque oligo-élément concentré 1000 fois préparé séparément dans un flacon.....	99
Tableau 10 : Composition des sels B concentrés 1000 fois (sauf MgSO ₄ , 7H ₂ O _(s) concentré 500 fois) préparés séparément dans un flacon.....	100
Tableau 11 : Composition des sels A à la concentration finale du milieu minimum pour les précultures I, II, III et le fed-batch.....	100
Tableau 12 : Solution saline principale d'alimentation du fed-batch	101
Tableau 13 : Solution saline complémentaire d'alimentation du fed-batch	101
Tableau 14 : Composition du milieu riche YPD.....	103
Tableau 15 : Composition des oligo-éléments concentrés 1000 fois.....	104
Tableau 16 : Composition du milieu minéral à la concentration finale du milieu minimum pour les précultures II, III et le fed-batch.....	104
Tableau 17 : Composition de la solution saline d'alimentation du fed-batch	105
Tableau 18 : Composition de la solution de vitamines concentrée 1000 fois	106
Tableau 19 : Estimation des débits minimum d'alimentation dans le bioréacteur.....	107
Tableau 20 : Liste des mesures en ligne installées sur l'outil expérimental	111
Tableau 21 : Liste des variables récupérées par le logiciel LoCoPREL	112
Tableau 22 : Liste des variables calculées (première partie).....	113
Tableau 23 : Liste des variables calculées (seconde partie)	114
Tableau 24 : Caractéristiques de la caméra du Morphologi® G3S.....	119
Tableau 25 : Liste des paramètres morphologiques intégrée par le Morphologi® G3S	121
Tableau 26 : Configuration des protocoles de mesure du Morphologi G3S	122
Tableau 27 : Paramètres de filtrage permettant de retirer les particules détectées par l'analyse d'image mais ne correspondant pas à des cellules	122
Tableau 28 : Programmation de la température de calcination pour la détermination des cendres de la biomasse	125
Tableau 29 : Temps de rétention des analytes pouvant être présent dans le milieu de culture.....	128
Tableau 30 : Paramètres intégrés dans les courbes de frottement	138

Index des tableaux

Tableau 31 : Incertitudes-type composées relatives sur les invariants de similitude utilisés pour l'établissement de la courbe de frottement de la conduite D2	142
Tableau 32 : Exemples de moments mathématiques	145
Tableau 33 : Définition des classes pour l'expression discrète de populations	146
Tableau 34 : Exemples de diamètres équivalents (Allen, 1997)	147
Tableau 35 : Synthèse des différents rendements calculés par le logiciel LoCoPREL	158
Tableau 36 : Liste des fichiers générés par l'utilisation du logiciel LoCoPREL.....	197
Tableau 37 : Tableau synoptique de l'ensemble des cultures réalisées et des résultats majeurs obtenus (\approx : essai exploratoire, + : essai concluant, ++ : confirmation/validation, *estimation par mesure d'absorbance).....	222
Tableau 38 : Incertitude-type composée relative des facteurs de frottement expérimentaux au cours des expérimentations biologiques pour la conduite D2	222
Tableau 39 : Inventaire des analyses et exploitations potentielles ou effectuées en fonction des cultures (\emptyset : non-réalisée/non maîtrisée, + : réalisé/calculable et \oplus : traitée/exploitée)	236
Tableau 40 : Seuils de concentration identifiés pour les cultures d' <i>E. coli</i> (\emptyset : aucun seuil observé - en grisé : aucune donnée).....	261
Tableau 41 : Seuils de concentration identifiés pour les cultures d' <i>Y. lipolytica</i> (\emptyset : aucun seuil observé - en grisé : aucune donnée)	263
Tableau 42 : Analyses physiques, physico-chimiques et chimiques hors ligne réalisées sur le moût, la biomasse et le surnageant	297
Tableau 43 : Diamètre en volume d_v à 10 %, 50 % et 90% de la population et diamètre volumique moyen $d_{4,3}$ en [μm] pour les différentes cultures d' <i>E. coli</i>	305
Tableau 44 : Diamètre en volume d_v à 10 %, 50 % et 90 % de la population et diamètre volumique moyen $d_{4,3}$ en [μm] pour les différentes cultures d' <i>Y. lipolytica</i>	305
Tableau 45 : Diamètre moyen volumique $d_{4,3}$ issu de diamètres en surface ou en volume (cultures III, <i>E. coli</i> - culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	308
Tableau 46 : Seuils de biomasse identifiés sur l'analyse de la masse volumique en ligne	326
Tableau 47 : Régression linéaire des données de masse volumique hors ligne (culture III, <i>E. coli</i>)..	328
Tableau 48 : Masse volumique et concentration critique en microorganisme déduite (culture III, <i>E. coli</i>)	329
Tableau 49 : Régression linéaire des données de masse volumique hors ligne (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>)	329
Tableau 50 : Masse volumique et concentration critique en microorganisme déduite (culture VI, <i>Y. lipolytica</i>).....	330

Index des équations

Équation 1 : Force de Stokes (cas d'une sphère)	16
Équation 2 : Loi de Coulomb	17
Équation 3 : Longueur de Debye	18
Équation 4 : Energie à fournir par un système pour la création d'une interface	19
Équation 5 : Contrainte tangentielle / contrainte de cisaillement	20
Équation 6 : Définition de la vitesse de cisaillement	20
Équation 7 : Définition de la viscosité dynamique	21
Équation 8 : Définition de la viscosité cinématique	21
Équation 9 : Définition du module complexe	22
Équation 10 : Complaisance de fluage (fonction de fluage).....	23
Équation 11 : Fonction de relaxation	23
Équation 12 : Viscosité dynamique relative.....	23
Équation 13 : Viscosité spécifique.....	23
Équation 14 : Viscosité intrinsèque	23
Équation 15 : Loi d'écoulement d'un fluide newtonien	24
Équation 16 : Comportement newtonien généralisé	24
Équation 17 : Loi d'Ostwald-de Waele	25
Équation 18 : Modèle de Bingham ($\tau \geq \tau_0$)	26
Équation 19 : Loi de Casson	26
Équation 20 : Loi de Herschel-Bulkley	26
Équation 21 : Modélisation de la viscosité apparente selon une loi d'Arrhenius.....	28
Équation 22 : Viscosité dynamique déterminé à partir d'un viscosimètre d'Ostwald	29
Équation 23 : Viscosité dynamique déterminée à partir d'un viscosimètre de Hoepler	30
Équation 24 : Expression de la viscosité dynamique dans un écoulement de Couette entre cylindres coaxiaux - Cas d'un faible entrefer.....	31
Équation 25 : Expression de la viscosité dynamique dans un écoulement de Couette entre cône et plan.....	31
Équation 26 : Bilan des forces appliquées au fluide dans une conduite cylindrique horizontale (projection sur l'axe de l'écoulement).....	34
Équation 27 : Contrainte à la paroi (contrainte pariétale).....	34
Équation 28 : Profil de vitesse d'un fluide newtonien dans une conduite circulaire horizontale	35
Équation 29 : Débit volumique pour un fluide newtonien dans une conduite circulaire horizontale	35
Équation 30 : Loi de Poiseuille	35
Équation 31 : Vitesse de cisaillement pariétale pour un fluide newtonien en conduite circulaire horizontale.....	35
Équation 32 : Profil de vitesse d'un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele dans une conduite circulaire horizontale.....	35

Index des équations

Équation 33 : Débit volumique pour un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele dans une conduite circulaire horizontale.....	36
Équation 34 : Perte de charge pour un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele dans une conduite circulaire horizontale.....	36
Équation 35 : Vitesse de cisaillement pariétale pour un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele en conduite circulaire horizontale	36
Équation 36 : Nombre de Reynolds en conduite.....	36
Équation 37 : Taux de turbulence	38
Équation 38 : Contrainte tangentielle calculée par l'épaisseur de la couche limite	40
Équation 39 : Nombre de Newton	41
Équation 40 : Nombre de Froude	41
Équation 41 : Nombre de Weber.....	41
Équation 42 : Nombre de Deborah.....	42
Équation 43 : Nombre de Reynolds	42
Équation 44 : Nombre d'Euler	42
Équation 45 : Nombre de Rugosité	42
Équation 46 : Nombre de Fannig	42
Équation 47 : Nombre de Darcy.....	43
Équation 48 : Facteur de frottement.....	43
Équation 49 : Nombre de Reynolds pour un écoulement en conduite circulaire horizontale	43
Équation 50 : Facteur de frottement pour un écoulement en conduite circulaire horizontale.....	43
Équation 51 : Expression théorique en régime laminaire du facteur de frottement	43
Équation 52 : Modèle de Blasius pour un écoulement en régime transitoire.....	43
Équation 53 : Modèle de Blasius pour un écoulement en régime turbulent sur la courbe de frottement	44
Équation 54 : Modèle de Churchill	44
Équation 55 : Expression du nombre de Reynolds généralisé pour un fluide suivant une loi en puissance dans le régime laminaire.....	44
Équation 56 : Expression du nombre de Reynolds généralisé pour un fluide suivant une loi en puissance	45
Équation 57 : Relation d'Einstein à l'ordre 1 en \square	48
Équation 58 : Equation de Taylor	49
Équation 59 : Relation d'Einstein à l'ordre 2 en \square	49
Équation 60 : Relation de Batchelor.....	49
Équation 61 : Nombre de Péclet pour la diffusion par rotation.....	50
Équation 62 : Viscosité dynamique de particule de forme quelconque	50
Équation 63 : Viscosité dynamique à cisaillement nul ($\square \rightarrow \square_{\max}$).....	50
Équation 64 : Loi d'Arrhénius	51
Équation 65 : Relation de Brinkman.....	51
Équation 66 : Equation de Mooney (solution monodisperse).....	51
Équation 67 : Equation de Krieger	51

Index des équations

Équation 68 : Equation de Krieger (forme générale).....	51
Équation 69 : Expression de la viscosité dynamique par Ball et Richmond	52
Équation 70 : Expression de la viscosité dynamique par Bedeaux.....	52
Équation 71 : Limite de résolution du microscope optique.....	117
Équation 72 : Relation entre la masse volumique et la période d'oscillation du tube en « U » de mesure.....	125
Équation 73 : Loi de Poiseuille modifiée	133
Équation 74 : Vitesse de cisaillement sur l'outil expérimental.....	139
Équation 75 : Détermination du mesurande Y	139
Équation 76 : Estimation du mesurande y.....	139
Équation 77 : Incertitude-type composée sous forme de variance	140
Équation 78 : Incertitude-type composée relative sous forme de variance	140
Équation 79 : Incertitude-type composée relative	140
Équation 80 : Incertitude-type relative	140
Équation 81 : Incertitude-type composée relative du facteur de frottement pour l'établissement du modèle.....	141
Équation 82 : Incertitude-type composée relative du nombre de Reynolds généralisé pour l'établissement du modèle.....	141
Équation 83 : Incertitude-type composée relative de la viscosité dynamique estimée en ligne en régime laminaire	142
Équation 84 : Incertitude-type composée relative de la viscosité dynamique estimée en ligne en régime turbulent	142
Équation 85 : Incertitude-type composée relative de la viscosité apparente estimée sur le rhéomètre Bohlin.....	143
Équation 86 : Définition d'une fonction de distribution	144
Équation 87 : Expression de la loi normale	146
Équation 88 : Expression de la loi log-normale	147
Équation 89 : Obtention de la moyenne d'une loi log-normale	147
Équation 90 : Définition du diamètre moyen	148
Équation 91 : Principe du bilan matière.....	149
Équation 92 : Bilan de l'espèce A d'un élément présent en phase gazeuse et liquide.....	149
Équation 93 : Flux de transfert global de l'espèce A.....	149
Équation 94 : Différentiel au cours du temps de la concentration d'une espèce A gazeuse	150
Équation 95 : Débit des gaz de sortie du bioréacteur	150
Équation 96 : Volume de liquide dans le bioréacteur.....	151
Équation 97 : Volume du ciel gazeux dans le bioréacteur	151
Équation 98 : Masse de substrat apportée par une solution carbonée.....	151
Équation 99 : Volume de liquide apporté par le substrat dans le bioréacteur.....	152
Équation 100 : Volume de liquide dans le bioréacteur apporté par l'eau contenue dans la solution carbonée	152

Index des équations

Équation 101 : Volume de liquide dans le bioréacteur ajouté par une solution apportant des composés inorganiques.....	152
Équation 102 : Volume de liquide apporté ou soustrait par l'opérateur	153
Équation 103 : Volume de liquide perdu par évaporation	153
Équation 104 : Vitesse instantanée de production/consommation d'un composé i	153
Équation 105 : Vitesse instantanée de consommation de dioxygène [mol h^{-1}].....	153
Équation 106 : Vitesse instantanée de production de dioxyde de carbone [mol h^{-1}]	154
Équation 107 : Vitesse de production instantanée de l'espèce i normalisée par le volume de liquide [$\text{mol l}^{-1} \text{h}^{-1}$].....	154
Équation 108 : Vitesse spécifique d'un composé i	154
Équation 109 : Taux de croissance estimé à partir des sondes à dioxygène dissous.....	154
Équation 110 : Taux de croissance estimé à partir des substrats envoyés	155
Équation 111 : Taux de croissance estimé à partir des vitesses instantanées sur les gaz	155
Équation 112 : Coefficient de transfert de dioxygène estimé.....	155
Équation 113 : Puissance mécanique en cuve agitée aérée	155
Équation 114 : Puissance mécanique en cuve agitée avec vortex pour $\text{Re}_{\text{agitation}} > 10^4$	156
Équation 115 : Nombre de Froude	156
Équation 116 : Vitesse superficielle de gaz.....	156
Équation 117 : Coefficient de transfert de dioxygène expérimental.....	156
Équation 118 : Coefficient de transfert de dioxygène expérimental corrigé.....	157
Équation 119 : Rendement apparent instantané biomasse - substrat	157
Équation 120 : Coefficient respiratoire obtenu par les vitesses instantanées.....	158
Équation 121 : Coefficient respiratoire obtenu à partir des données brutes des analyseurs gaz.....	158
Équation 122 : Relation générale d'une bioréaction aérobie.....	159
Équation 123 : Condition de vérification du bilan carbone	159
Équation 124 : Condition de vérification du bilan élémentaire généralisé	159
Équation 125 : Degrés de réduction des éléments C, H, O, N.....	159
Équation 126 : Quantité de moles de carbone apportée pour un substrat défini.....	160
Équation 127 : Calcul de la quantité de carbone accumulé dans le bioréacteur en [Cmol].....	160
Équation 128 : Concentration du carbone accumulé dans le bioréacteur en [Cmol l^{-1}].....	160
Équation 129 : Estimation de la concentration massique de la biomasse dans le bioréacteur en [g l^{-1}]	161
Équation 130 : Pouvoir réducteur apporté par un substrat	161
Équation 131 : Estimation en ligne du degré de réduction de la biomasse	161
Équation 132 : Quantité d'azote apporté dans le bioréacteur en [mol]	162
Équation 133 : Rapport élémentaire Azote / Carbone	162
Équation 134 : Différence de conductivité électrique équivalente à une suspension solide-liquide ...	250
Équation 135 : Expression de la force ionique	318
Équation 136 : Masse volumique du moût en ligne.....	325
Équation 137 : Somme des fractions volumiques des différentes phases du moût.....	325
Équation 138 : Somme des fractions volumiques du moût hors ligne	327

Index des équations

Équation 139 : Masse volumique hors ligne.....	327
Équation 140 : Masse volumique de la biomasse anhydre.....	328
Équation 141 : Masse volumique de la biomasse hydratée.....	328
Équation 142 : Echelle d'agrandissement relatif aux longueurs	377
Équation 143 : Invariants de similitude relatifs à des longueurs	377
Équation 144 : Invariants de similitude relatifs aux vitesses.....	378



Introduction générale

Parmi les grands enjeux sociétaux mondiaux, une large place est maintenant accordée aux aspects énergétiques et environnementaux. Cette prise de conscience se traduit en particulier par des politiques gouvernementales imposant ou favorisant une meilleure gestion et utilisation des ressources énergétiques et une amélioration du bilan environnemental. Ainsi, des objectifs tels que la diminution des gaz à effet de serre (dioxyde de carbone), la valorisation des déchets et l'obtention de nouvelles ressources s'affranchissant des réserves fossiles sont au premier rang des préoccupations mondiales. Pour chacun des enjeux cités, les stratégies actuelles de développement s'orientent de plus en plus vers des procédés biotechnologiques faisant appel à des microorganismes. Ces bioprocédés peuvent proposer une alternative écologique aux procédés actuels en utilisant des sources de carbone renouvelables plutôt que fossiles. Les biotechnologies blanches (dites industrielles) se caractérisent par l'utilisation de biocatalyseurs microbiens ou enzymatiques pour la production de molécules, ou synthons, à finalité chimique ou énergétique. Elles reposent sur l'utilisation de biocatalyseur à des concentrations élevées, et sur l'intensification des productions. L'obtention d'un bilan environnemental positif permettra de travailler dans une démarche de développement durable, combinant une productivité élevée et une minimisation de la pollution engendrée. Ainsi, les industriels conservent leur pouvoir concurrentiel, tout en intégrant dans leur capacité économique une démarche de développement durable pour les générations futures.

Les biocatalyseurs microbiens sont déjà mis en œuvre dans divers secteurs industriels. Dans l'ensemble des cas, ils sont employés lorsque leur productivité dépasse celle des procédés de synthèse chimique classiques. L'augmentation des connaissances sur les microorganismes ainsi que sur leurs mises en œuvre dans des procédés à grande échelle a permis l'amélioration des performances des procédés microbiens et l'ouverture de nouvelles voies alternatives. La performance d'un bioprocédé peut être améliorée en utilisant les stratégies suivantes :

- Augmentation des connaissances : la compréhension approfondie du fonctionnement d'un microorganisme et de ses caractéristiques permet d'évaluer le potentiel de cette souche pour l'utiliser à son optimum. De plus, ceci permet l'utilisation du microorganisme le plus adapté à la problématique abordée, de manière à se rapprocher au plus près des caractéristiques recherchées.
- Amélioration du patrimoine génétique : la recherche de mutants permet à la souche sauvage d'acquérir de nouveaux outils enzymatiques, ou de déverrouiller certaines voies métaboliques limitant les performances telles que le potentiel de stockage d'un métabolite intracellulaire.
- Optimisation du bioprocédé : la mise en place des conditions optimales d'une échelle laboratoire à une échelle industrielle nécessite une adaptation des outils de gestion de l'activité cellulaire afin de conserver les performances sur une échelle plus importante.
- Limitations à grande échelle : les modifications des installations et/ou des normes de qualité et de sécurité imposent aux industriels d'adapter les bioprocédés déjà en place afin de

Introduction générale

répondre aux nouvelles contraintes gouvernementales pour maintenir leur production. Pour cela, l'adaptation des procédés de grande échelle à un niveau laboratoire permet une meilleure compréhension des problèmes, nécessaire pour mieux appréhender les solutions à trouver.

Quelle que soit la stratégie utilisée, les cellules et leur environnement (chimique ou physique) sont en interaction permanente. Elles modifient leur environnement, engendrant ainsi des perturbations de leurs comportements physiologiques qui peuvent provoquer une réaction néfaste sur les performances du bioprocédé. Ces modifications environnementales s'effectuent sur différentes échelles de temps et doivent être prises en compte lors de la mise en place d'un nouveau bioprocédé de manière à conserver les caractéristiques recherchées pour la culture. La difficulté majeure rencontrée lors des changements d'échelle est la conservation des transferts de matière, de chaleur et de quantité de mouvement entre un bioréacteur de laboratoire et une cuve de plusieurs mètres cube. Le maintien de ces paramètres assure la constance des performances. Or, lors d'un changement d'échelle, ces paramètres sont difficilement maintenus. Par exemple, en culture aérobie, l'une des limitations couramment rencontrées est le transfert d'oxygène. En bioréacteur, le pourcentage en dioxygène dissous est continuellement vérifié et est homogène dans l'ensemble du moût. Sur une cuve de plusieurs mètres cube, la concentration en dioxygène dissous est hétérogène, imposant à une certaine proportion de cellules une limitation modifiant leur comportement, et pouvant les conduire à ne pas atteindre l'objectif initial (production de biomasse, de métabolites intra ou extra cellulaire, dégradation d'un substrat). Ces limitations sont d'autant plus visibles que l'on atteint des concentrations importantes en biomasse, au moment où la productivité est la plus élevée. De plus, à ces concentrations, les changements physiques et physico-chimiques s'effectuent avec une forte amplitude, ce qui permet de mieux les appréhender. On observe alors un couplage fort entre les processus biologiques (liés à la physiologie et au métabolisme cellulaire) et les phénomènes physiques (en rapport avec les transferts de matière et les temps de mélange) liés par les propriétés physico-chimiques du milieu. Cependant, l'analyse de ce couplage reste délicate et contrainte par l'accès à des métrologies *ex situ* et *in situ* pertinentes.

En effet, dans un bioréacteur, le moût a une structure homogène éphémère constituée d'une phase solide (la biomasse), d'une phase liquide (milieu minéral, sources carbonées, vitamines...) et d'une phase gazeuse (due à l'aération et générée par les cellules elles-mêmes). Ces différentes phases peuvent interagir entre elles par différents aspects. Soit la phase liquide fait le lien entre la phase solide et la phase gaz. C'est le cas des différents transferts gazeux allant du gaz vers la biomasse (dioxygène en culture aérobie) et de la biomasse vers la phase gaz (dioxyde de carbone en culture aérobie). De plus, au sein de bioréacteurs de grand volume, des problèmes d'hétérogénéité apparaissent en fonction de la localisation spatiale de l'apport en substrat effectué. Enfin, la biomasse entre également en jeu en ce qui concerne les propriétés électriques et rhéologiques du moût. La dépendance de la taille, de la forme et des propriétés de surface de la membrane des cellules permettent une première approche de la part de l'activité biologique sur les propriétés macroscopiques du moût. La pertinence de la caractérisation est alors limitée lorsque des analyses

Introduction générale

hors ligne sont effectués sur des prélèvements, et ce, malgré le choix réfléchi des outils spécifiques utilisés. En effet, la disparition rapide de la phase gazeuse, les perturbations de la biomasse sur la phase liquide et la modification de l'activité cellulaire sont autant de facteurs pouvant fausser l'analyse des résultats expérimentaux hors ligne suite aux changements difficilement quantifiables des propriétés du moût.

La mise en œuvre de mesures physiques (viscosimétrie, masse volumique, conductivité électrique, consommation de puissance) adaptées à l'analyse de la réponse physique (microscopie, granulométrie, morphologie), physico-chimique (force ionique, pression osmotique) ou biologique (activité biologique, taux de croissance, viabilité) du comportement bactérien ou levurien en bioréacteur n'existe ni à l'échelle industrielle, ni en laboratoire de recherche. Or, ces mesures s'avèrent fondamentales pour comprendre l'évolution des milieux de culture ou pour piloter des bioprocédés de façon optimale.

Pour répondre à ces contraintes, l'objectif de ce travail a été de développer un outil permettant de caractériser *in situ* le milieu de culture, de manière à s'affranchir des problèmes issus des prélèvements. L'approche choisie a consisté à travailler à partir d'un bioréacteur mécaniquement agité où deux aspects ont été développés. Le premier a pour but d'intégrer, sur ce bioréacteur, des moyens de mesure physiques et physico-chimiques, par l'intermédiaire d'une boucle de dérivation. Ce circuit supplémentaire permet ainsi l'obtention d'informations sur différentes variables pertinentes, dont la masse volumique, les pertes de charges ou la conductivité électrique. La boucle de dérivation et les instruments ajoutés doivent prendre en compte les contraintes liées aux cultures biologiques, telles que la mise en place de la stérilité de l'outil expérimental et l'absence de limitation au sein de cette boucle (dioxygène). Le second aspect, apporté par nos travaux, est la mise en place d'un outil de gestion de l'information et des actions pouvant être effectuées en cours d'expérimentation. Cet outil doit être cohérent avec le bon déroulement du bioprocédé (conduite de culture), et compatible avec l'instrumentation mise en place. Il doit, entre autres, permettre la gestion de variables telles que le pH, la concentration en dioxygène dissous, l'agitation, la pression, la température, la gestion des apports en substrats et de la viscosimétrie en ligne. Pour cela, un logiciel spécifique a été développé, afin de répondre aux contraintes liées aux conduites de culture en mode discontinu (batch) et discontinu alimenté (fed-batch), et aux objectifs de l'étude concernant la caractérisation rhéométrique et physico-chimique en ligne du moût. Ce logiciel doit utiliser le matériel déjà en place, de manière à valoriser le potentiel de chaque instrument. De plus, il doit pouvoir intégrer de nouvelles possibilités d'investigation grâce aux options mises en place depuis l'interface.

L'une des difficultés de l'étude des milieux de culture de microorganismes réside dans l'évolution importante des propriétés physiques. Le caractère multiphasique et dynamique de ces milieux complexifie la détermination des paramètres physiques et physico-chimiques de manière fiable, ce qui augmente les difficultés de caractérisation viscosimétrique, et plus généralement, la détermination de leur comportement rhéologique. L'outil expérimental permettra de caractériser au mieux les cultures mises en œuvre de manière à donner des éléments de réponses sur les caractéristiques rhéologiques

Introduction générale

des milieux de culture en condition réelle. Cette approche permettra une meilleure compréhension de l'implication de la rhéologie sur la limitation des transferts, ainsi que l'obtention de données permettant d'expliquer, de quantifier et de modéliser le comportement de ces milieux biologiques tri-phasiques. Globalement, l'intérêt est double. Le premier est de pouvoir identifier les phénomènes se déroulant au cours de l'évolution de ces milieux de culture complexes et évolutifs, permettant une amélioration des connaissances. Le second intérêt est de permettre de progresser vers l'intensification des cultures lors de hautes concentrations cellulaires à partir de l'analyse fine des résultats obtenus.

Par conséquent, le champ d'investigation retenu est la production de biomasse sur une large gamme de concentration, permettant l'obtention d'informations allant des faibles aux fortes concentrations en biomasse. Dans le cadre de ce travail, notre étude s'est bornée à des cultures axéniques, en mode oxydatif, sur milieu minéral, dans un objectif de production de biomasse. Pour cela, la culture s'est effectuée en mode fed-batch, afin de pouvoir atteindre de hautes concentrations en biomasse, tout en contrôlant la vitesse de croissance. Deux microorganismes ont été principalement mis en œuvre. *Escherichia coli* a été choisi comme microorganisme procaryote modèle. Et, afin d'effectuer des comparaisons, *Yarrowia lipolytica* a été employé comme microorganisme eucaryote modèle. Les premiers objectifs techniques visent à réaliser des mesures physiques en ligne (masse volumique, perte de charge, température, conductivité) et hors ligne (rhéologie, microscopie, granulométrie, etc.) sur le moût, tout en s'assurant que la bioréaction se déroule correctement, avant de procéder à des expérimentations plus approfondies.

Notre démarche se singularise par la réalisation d'observations et de mesures *in situ*. De plus, les mesures sur les variables biologiques et physiques sont effectuées conjointement. L'analyse en ligne de la viscosimétrie permet une caractérisation des milieux de culture en condition réelle, tout en prenant en compte la composante diphasique liquide-gaz, issu de l'aération et de l'agitation du milieu, devant satisfaire la demande en dioxygène de la biomasse.

Le premier chapitre présente une revue bibliographique des études faisant intervenir des microorganismes dans le cadre d'une modification des caractéristiques physiques de leurs milieux. Une description des méthodes d'investigations physiques est également effectuée dans cette partie.

Le développement de l'outil expérimental, les méthodologies employées et l'établissement des courbes de frottement sont décrits dans le second chapitre. Celui-ci contient également la description des analyses physiques et chimiques effectuées hors ligne. Enfin, le détail des calculs en ligne est développé à propos de la viscosimétrie et des variables liées à la bioréaction.

Le troisième chapitre présente le logiciel spécifique qui a été développé pour l'étude et le pilotage de l'outil expérimental. Il décrit le choix du langage de programmation, les étapes de préparation de l'outil expérimental et les possibilités d'utilisation de l'interface au cours d'une expérimentation.

Introduction générale

Les chapitres quatre et cinq présentent les résultats obtenus avec l'outil expérimental. Le quatrième chapitre s'attarde sur les dynamiques observées en ligne avec *Escherichia coli* et *Yarrowia lipolytica* comme modèle d'étude. Le chapitre cinq présentera une confrontation des résultats avec les analyses hors ligne effectués.

Enfin, les conclusions et les perspectives identifiées sont présentées sur la base des observations originales réalisées au cours de ce travail.

Chapitre I - Synthèse bibliographique et contexte de l'étude

Table des matières du Chapitre I

INTRODUCTION	11
I. PHYSICO-CHIMIE DES MILIEUX BIOLOGIQUES	12
A. GRANDEURS MESURABLES DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES	12
1. Viscosité.....	12
2. Perte de charge en conduite.....	13
3. Masse volumique	14
4. Propriétés diélectriques.....	14
5. Consommation de puissance.....	14
B. FORCES EN JEUX.....	15
1. Suspensions diluées : interactions fluide-particule	16
2. Suspensions semi-diluées et concentrées : interactions particule - particule	16
C. FOCUS SUR LA RHEOLOGIE	19
1. Définitions	19
2. Les différents types de comportement rhéologique.....	24
3. Les principaux outils de caractérisation rhéologique.....	28
D. INTERACTIONS RHEOLOGIE - PROCEDE	33
1. Régime laminaire	33
2. Régime turbulent.....	36
3. Invariants de similitude.....	40
4. Théorie en conduite	43
E. MODELES DI-PHASIQUES.....	46
1. Suspensions solide-liquide	46
2. Suspensions liquide-gaz.....	52
II. LES MESURES PHYSIQUES DANS LES CULTURES	54
A. PRODUCTION DE METABOLITES.....	54
1. Polysaccharide exo-cellulaire	54
2. Enzymes et protéines.....	56
3. Molécules d'intérêt	57
B. TRANSFORMATION DE MATRICE	58
1. Industrie Agroalimentaire	58
2. Traitement d'effluents.....	59
C. CULTURES AXENIQUES.....	59
1. Biomasse	59
2. Caractérisations in-situ et travaux originaux.....	69
CONCLUSION	73

INTRODUCTION

Les enjeux sociétaux mondiaux abordent actuellement de plus en plus la minimisation de l'impact de l'humain sur son environnement. L'une des stratégies utilisées pour limiter les conséquences de l'activité humaine sur l'environnement est le développement de procédés biotechnologiques permettant de proposer une alternative écologique aux procédés actuels, en utilisant des sources de carbone renouvelables plutôt que fossiles. Ainsi, le bilan environnemental est amélioré, combinant une productivité élevée et une minimisation de la pollution engendrée. L'augmentation des connaissances sur les microorganismes, ainsi que sur leur mise en œuvre dans des procédés, permet l'obtention de nouvelles voies alternatives aux procédés utilisant des ressources fossiles.

Il n'existe pas d'étude mettant en œuvre directement des mesures physiques pour aboutir à une analyse approfondie du couplage avec l'activité microbiologique, autant au niveau des laboratoires de recherche qu'à l'échelle industrielle. Or, ces mesures s'avèrent fondamentales pour comprendre l'évolution des mouls afin que les bioprocédés soient pilotés de façon optimale et complète. Les objectifs généraux de ces travaux sont alors triples. La première étape est de démontrer la faisabilité d'une mesure physique *in situ* simultanément au contrôle de l'activité biologique, jusque dans les hautes concentrations en cellule. La seconde étape est l'analyse et la comparaison des moyens d'investigation rhéologique afin de cibler les informations d'intérêts. Enfin, l'analyse de l'évolution et les possibles corrélations entre diverses variables physiques sont à mettre en avant avec le contrôle de l'activité microbiologique.

En ce sens, le périmètre de notre synthèse bibliographique permet de se focaliser sur différents questionnements : quelles sont les grandeurs physiques mesurables au sein d'un bioprocédé et pour quelle information ? Quels sont les modèles rhéologiques permettant de décrire des milieux de culture, pouvant éventuellement être bi ou tri-phasique ? Et enfin, quels sont les travaux scientifiques relatifs à la caractérisation rhéologique des milieux biologiques au sens large ? La vision de ces investigations permet de montrer l'intérêt de nos travaux ainsi que leur originalité dans le champ d'étude investigué.

I. PHYSICO-CHIMIE DES MILIEUX BIOLOGIQUES

On appelle milieu biologique une matrice dans laquelle évoluent des cellules dans un environnement macroscopiquement homogène mais pouvant être localement multiphasique. Dans ces conditions, les substrats peuvent se trouver de manière inégale dans certaines phases ou mal répartis dans l'espace. Par exemple, lors d'un apport en sirop de glucose, celui-ci sera disponible dans la phase liquide de l'environnement du microorganisme. A contrario, pour des conditions de culture en aérobie, l'oxygène sera dans un premier temps disponible dans la phase gaz, puis dans la phase liquide. La proportion de gaz dissous dépendra de la chimie de la phase liquide, des conditions hydrodynamiques, de la température et de la pression, impactant ainsi l'efficacité du transfert de matière entre ces deux phases.

Ainsi, les milieux biologiques peuvent être perçus comme une somme d'entités physiques présentes sous les trois états (solide, liquide et gaz). Le microorganisme s'apparente à la phase solide, la phase liquide correspond à l'environnement dans lequel les nutriments sont directement disponibles pour le microorganisme, et la phase gaz provient des conditions d'aération et/ou de respiration cellulaire. La complexité des milieux biologiques réside dans le fait que la biomasse est réactive à son environnement, tout en conservant un caractère auto catalytique. Pour obtenir des informations sur ces différentes phases, il est nécessaire d'identifier les paramètres pertinents à quantifier afin de comprendre l'action des différentes phases les unes par rapport aux autres. L'idéal est d'effectuer des mesures intrusives non dénaturantes, expliquant l'impact de chaque phase afin de mieux appréhender le comportement macroscopique du moût. Ainsi, la contribution du comportement rhéologique pourra être mieux abordée, et les mécanismes de transferts seront alors mieux identifiés.

A. Grandeurs mesurables dans les milieux biologiques

L'intérêt porté aux mesures physiques dans les milieux biologiques n'est pas récent et il existe de nombreux travaux proposant un certain nombre de mesures, d'informations physiques, réalisées au cours d'une culture. Nous allons, dans un premier temps, lister et présenter ces variables à travers les études publiées sur ce sujet.

1. Viscosité

La viscosité est un paramètre intervenant dans un grand nombre d'invariants de similitude. Elle peut être limitante pour différents transferts et son étude est impérative pour appréhender et prendre en compte le comportement hydrodynamique réel des milieux biologiques.

La viscosité est une variable sensible à différents facteurs. La production de biopolymères est une origine courante du changement de viscosité du milieu, celle-ci n'étant alors attribuée qu'à la présence d'une ou plusieurs molécules viscogènes (Aguilar *et al.*, 2005; Borges and Vendruscolo, 2007; Landon *et al.*, 1993; Lapasin *et al.*, 1992b; Nery *et al.*, 2008; Sinha *et al.*, 2001; Torres *et al.*, 1993). Cependant, l'apparition de ces molécules, leurs propriétés et leur impact sur le milieu de culture peuvent modifier, parfois de façon importante, les conditions de croissance du microorganisme producteur (Shene *et al.*, 2008).

La viscosité peut également avoir un effet rétroactif sur l'activité de certaines enzymes. Sampedro et Uribe ont ainsi montré que le tréhalose, agent protecteur de stress, avait un effet inhibiteur sur l'activité enzymatique car cette espèce modifiait localement la viscosité de son environnement (Sampedro and Uribe, 2004). Le changement des propriétés physico-chimiques peut également modifier la viscosité du milieu et impacter l'activité enzymatique. Ainsi, Huang et ses collaborateurs ont montré qu'une diminution de la viscosité, induite par un ajout de CaCl_2 , provoque une augmentation de l'activité de trois enzymes, améliorant la production d'acide poly-(γ -glutamique) par *Bacillus subtilis* (Huang *et al.*, 2011).

L'impact d'un changement morphologique du microorganisme sur les modifications de viscosité du moût a également été mis en évidence par Kim et ses collaborateurs (Kim *et al.*, 2005). La forme de la biomasse cultivée peut être induite en fonction des conditions de culture comme cela a été mis en évidence par Choi et ses collaborateurs sur une culture de *Streptomyces fradiae* (Choi *et al.*, 2000).

Les conditions de culture peuvent également modifier l'activité biologique d'une matrice mixte de type boue. Dans ce cadre, Pevere et ses collaborateurs ont montré qu'une modification de source carbonée engendrait un changement de la viscosité limite du milieu. Ils ont expliqué ce changement par une modification de la surface des particules présentes, générant des interactions différentes entre celles-ci (Pevere *et al.*, 2010). Le transfert gazeux peut également être touché par la viscosité. Cela a été mis en évidence lors d'une étude du transfert de dioxygène dans un bioréacteur à membrane via une aération en dioxygène pur (Rodriguez *et al.*, 2010).

La plupart des analyses de viscosité se font par une détermination hors ligne (Choi *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2005; Pevere *et al.*, 2010; Rodriguez *et al.*, 2010; Sampedro and Uribe, 2004; Shene *et al.*, 2008). Cependant, ces mesures peuvent être perturbées et ne plus être représentatives de la culture initiale. Pour se rapprocher des conditions réelles, certains auteurs ont mis en place des systèmes permettant d'avoir une information *in-situ*. On citera en particulier les travaux de Kembrowski et ses collaborateurs sur des cultures de *Aspergillus niger* (Kembrowski *et al.*, 1990; Olsvik *et al.*, 1993; Olsvik and Kristiansen, 1992a; Olsvik and Kristiansen, 1992b) et ceux de Seyssiecq et ses collaborateurs lors d'études sur les boues activées (Barbot *et al.*, 2010; Seyssiecq *et al.*, 2008).

Enfin, certains auteurs s'engagent dans des études abordant la viscosité intracellulaire par de nouvelles méthodes analytiques couplant la microscopie et la fluorescence (Fujino *et al.*, 2008) ou par une approche plus globale pour mieux comprendre la relation entre propriété physique et structure de la cellule (Trepap *et al.*, 2007).

2. Perte de charge en conduite

Il n'existe pas, à notre connaissance, d'étude faisant état de mesures de pertes de charge en conduite lors d'une culture cellulaire. Ce type de mesure étant au cœur de l'instrumentation de notre outil expérimental d'investigation, nous citerons toutefois les travaux de Wang et de ses collaborateurs. Ceux-ci ont proposé, par une validation expérimentale, une modélisation du comportement de suspensions concentrées (40% en fraction volumique) en conduite sur des capillaires. Dans leur

modélisation, Wang *et al.* prennent en compte des effets de migration de particules et de glissement en paroi propres à ces suspensions (Wang *et al.*, 2010).

Dans le cas de travaux sur des microorganismes, Deront et ses collaborateurs ont effectué une étude sur le suivi en ligne du développement de biofilm sur des masses filtrantes au sein d'un bioréacteur à lit fixe pour le traitement des eaux usées. Ils montrent que l'on peut utiliser l'évolution de la perte de charge en ligne pour évaluer la croissance d'un biofilm (Deront *et al.*, 1998). La relation biomasse - perte de charge a également été analysée par l'équipe de Ryu dans un contexte de développement de biofiltre sur un support de polyuréthane (Ryu *et al.*, 2010). Selon la même idée et pour une problématique de transfert thermique, Pu et ses collaborateurs ont analysé l'impact de l'encrassement par un biofilm d'un échangeur de chaleur (Pu *et al.*, 2009).

3. Masse volumique

La masse volumique est une variable intervenant dans un grand nombre d'invariants de similitude et de modélisation de phénomènes. Néanmoins il n'existe pas, à notre connaissance, de travaux sur le suivi ou la modification de cette grandeur physique lors de cultures cellulaires ou lors du traitement des boues activées. L'ensemble des informations qu'il est possible de rencontrer traite de suivis effectués suite à des analyses strictement hors ligne.

4. Propriétés diélectriques

Une cellule se comporte également comme un matériau diélectrique. La littérature montre que les propriétés diélectriques des cellules sont des indicateurs de la viabilité, voire de la mort cellulaire (Patel and Markx 2008; Romanov 2009). Concernant la viabilité, Davey a pu montrer que la spectroscopie diélectrique permettait un suivi de la viabilité des cellules par mesure de leurs propriétés diélectriques. Cette mesure étant rapide, elle permet de mener des études où les mécanismes de lyse sont trop rapides pour être suivis par d'autres méthodes (Davey *et al.*, 1993). En utilisant cette méthodologie, Opel et ses collaborateurs ont pu tester différentes corrélations sur les signaux enregistrés en ligne afin de mieux comprendre la dynamique de la biomasse sur des échelles de temps plus courtes (Opel *et al.*, 2010).

Différents travaux de modélisation sont également proposés. Dans ce contexte, on peut citer les travaux de Di Biasio et ses collaborateurs. Ceux-ci modélisent les suspensions cellulaires et expliquent les phénomènes diélectriques par un impact morphologique des cellules (Di Biasio *et al.*, 2010; Di Biasio and Cametti, 2007; Di Biasio and Cametti, 2011). Plus spécifiquement, Bai et ses collaborateurs ont confronté une modélisation de la structure membranaire de la bactérie *Escherichia coli* avec des mesures des propriétés diélectriques de la suspension bactérienne (Bai *et al.*, 2006).

5. Consommation de puissance

La consommation de puissance, effectuée sur l'arbre d'agitation d'un bioréacteur par exemple, est une mesure intéressante car elle fournit une information globale sur la viscosité du milieu de culture ; De plus, elle est relativement facile à mettre en place. C'est en outre une donnée importante pour un dimensionnement d'installation, notamment dans une démarche de scale-up. Il existe un certain nombre de travaux dans lesquels cette grandeur a été mesurée et analysée. Ainsi Peña et ses

collaborateurs ont étudié la consommation de puissance spécifique et le transfert d'oxygène sur des cultures en erlenmeyer de *Azotobacter vinelandii* produisant de l'alginate. Afin de ne pas perturber la demande en oxygène du microorganisme, la consommation de puissance a été obtenue en reconstituant le milieu du microorganisme, et en ajoutant les mêmes quantités d'alginate de l'âge de la culture étudiée, afin de pouvoir mesurer le couple nécessaire à l'agitation (Pena *et al.*, 2007). Cette démarche de reconstitution du milieu étudié a également été suivie par l'équipe de Sanchez pour le cas de culture de *Xanthomonas campestris* pour la production de xanthane. Leur objectif était d'étudier la qualité du mélange du milieu à viscosité élevée dans un réacteur aéré ou non avec différentes géométries d'agitations (Sanchez *et al.*, 1992). Ces mesures, bien que se rapprochant des conditions de culture, restent déductives, et ne permettent pas une mesure directe.

Certains auteurs se sont penchés sur le développement d'outils permettant une caractérisation *in situ* du milieu de culture. L'équipe de Zhao a effectué une caractérisation d'une culture de *Xanthomonas campestris* en production de xanthane pour différentes géométries de bioréacteurs en suivant *in situ* la consommation de puissance (entre autres). Ils ont pu mettre en évidence un fort impact de l'aération sur ce paramètre (Zhao *et al.*, 1994). Ce développement d'outils *in situ* est également effectué sur des matrices de type boue par l'équipe de Seyssiecq (Seyssiecq *et al.*, 2008). Ces matrices étant en marge des cultures cellulaires, nous reviendrons sur ces travaux dans la suite de ce document.

L'estimation de la puissance consommée dans un procédé lors d'un changement d'échelle peut également être un objectif final. Dans le cas d'un bioprocédé aérobie, un des points limitant couramment rencontré reste le transfert en dioxygène. Ainsi, de manière à avoir un outil permettant d'appréhender au mieux un scale-up, Gill et ses collaborateurs ont développé un bioréacteur miniature afin de faire de la prédiction sur la consommation de puissance d'agitation et sur le transfert en dioxygène (Gill *et al.*, 2008). Cette équipe a validé son outil avec une culture batch en croissance d'*Escherichia coli*. L'équipe de Huang s'est plutôt orientée sur le développement de géométries adaptées pour la mesure de couples sur des bioréacteurs de laboratoire, avec un objectif de développement d'outils d'étude de changement d'échelle (Huang and Chan, 2004).

B. Forces en jeux

Un microorganisme a une taille de quelques micromètres. Par conséquent, les forces qui lui sont appliquées sont de multiples origines. En effet, ces forces peuvent être d'origine moléculaire, surfacique ou hydrodynamique. Dans cette partie, nous allons présenter brièvement les différentes forces intervenant à l'échelle d'un microorganisme d'une taille d'environ 1 μm , comme illustré par la Figure 1.

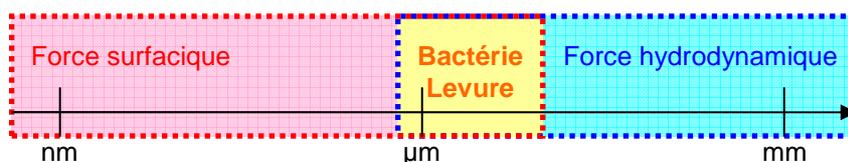


Figure 1 : Schéma des forces impliquées sur un microorganisme

Cette synthèse rassemble des informations provenant de plusieurs sources (Arnaud *et al.*, 2005; Israelachvili, 1991; Quemada, 2006).

1. Suspensions diluées : interactions fluide-particule

On parle de suspension diluée lorsque la concentration en particules est suffisamment faible pour que ces dernières n'interagissent pas entre elles. Le comportement macroscopique de la suspension ne dépend que des seules interactions fluide-particule et, bien sûr, des propriétés du fluide porteur.

a. Forces browniennes

En l'absence d'écoulement, l'agitation thermique provoque des chocs incessants des molécules du fluide suspendant contre la particule. Ces mouvements sont aléatoires dans l'espace et le temps. L'énergie moyenne acquise par la particule est de l'ordre de $k_B T$, k_B étant la constante de Boltzmann et T la température. Le mouvement communiqué à la particule est appelé mouvement brownien, et engendre un phénomène appelé diffusion brownienne.

b. Forces hydrodynamiques

Sous écoulement, des forces hydrodynamiques viennent s'ajouter au mouvement brownien. Il s'agit des forces de pression et de frottement visqueux exercées par le fluide porteur. Ces forces ont deux effets :

- La particule est entraînée par le fluide. Si son inertie est faible, si elle est suffisamment petite, sa vitesse sera celle du fluide environnant ; la présence d'un gradient de vitesse dans le fluide provoquera la rotation de la particule sur elle-même.
- Une particule en rotation perturbera l'écoulement, entraînant une augmentation de l'énergie dissipée par frottement visqueux dans le fluide, ce qui engendrera un accroissement de la viscosité globale de la suspension.

La résultante des forces hydrodynamiques est la force de Stokes. Dans le cas de l'étude d'une sphère de rayon r et se déplaçant à la vitesse v (vitesse relative au fluide) dans une phase continue de viscosité η_F , la force de Stokes aura pour expression l'Équation 1.

$$f_{st} = 6\pi\eta_F r v$$

Équation 1 : Force de Stokes (cas d'une sphère)

Le facteur de frottement (friction) $6\pi\eta_F r$ devient $8\pi\eta_F r^3$ dans le cas de la diffusion brownienne, la rotation de la particule engendrant un phénomène s'apparentant à de la diffusion (Quemada, 2006).

2. Suspensions semi-diluées et concentrées : interactions particule - particule

Lorsque la concentration en particules augmente, les interactions fluide-particule sont toujours présentes et les forces hydrodynamiques conservent un rôle important. Cependant, les distances entre particules diminuant, il faut alors prendre en compte les interactions particule-particule. Ce sont ces dernières que nous passerons en revue dans ce paragraphe.

a. Forces de Van der Waals

Les forces de Van der Waals englobent trois formes distinctes d'interactions.

i. Forces de Keesom

Il s'agit de la force d'interaction entre deux dipôles permanents. En d'autres termes, deux molécules polaires subiront une force d'attraction électrostatique, le pôle positif de l'une attirant le pôle négatif de l'autre de proche en proche.

ii. Forces de Debye

Pour cette force, il s'agit de l'interaction entre un dipôle permanent (molécule polaire) et un dipôle induit (molécule non polaire polarisable). On parle parfois d'effet d'induction.

Une molécule polaire crée autour d'elle un champ électrique. Si une molécule non polaire vient dans son voisinage, elle subit l'influence du champ électrique. Il s'y crée une polarisation induite qui disparaît quand celles-ci s'éloignent.

iii. Forces de London

Cette force est aussi appelée force de dispersion. Au contraire des forces de Keesom et de Debye, les forces de London ne nécessitent pas de dipôle (permanent ou induit). Cette force explique le passage, pour une température suffisamment basse, de l'état liquide à solide d'atomes neutres ou molécules non polaires (gaz rares ou le dihydrogène).

Par exemple, un atome d'hydrogène possède un proton et un électron. A chaque instant, un dipôle se forme avec une orientation et une valeur du moment électrique changeant continuellement. Par conséquent, un moment électrique instantané existe, même si en moyenne, l'atome n'en possède pas. Maintenant, si deux atomes viennent à proximité l'un de l'autre, le moment instantané de l'un crée un moment induit dans l'autre, et réciproquement. Il s'établit une sorte de concordance, ou de couplage, entre les mouvements de leurs électrons respectifs, ce qui diminue l'énergie du système formé par les deux atomes.

b. Force électrostatique

Les interactions électrostatiques résultent des forces attractives ou répulsives entre espèces chargées. Pour des charges q_1 et q_2 distantes de r , dans un milieu de permittivité $\epsilon_0\epsilon_r$, elles sont décrites par la loi de Coulomb (Équation 2) :

$$f_{\text{Coulomb}} = \frac{q_1 \cdot q_2}{4\pi\epsilon_0\epsilon_r} \cdot \frac{1}{r^2}$$

Équation 2 : Loi de Coulomb

Dans l'eau pure, l'interaction coulombienne est l'interaction prédominante sur une particule. Dès qu'un électrolyte est dissous dans le fluide, il s'ionise, et les ions de même signe que la charge de la particule sont repoussés. Les ions de signe contraire (les contre-ions) sont attirés et forment autour de

la particule un nuage de charges appelé double-couche ionique. L'ordre de grandeur de l'épaisseur de cette couche est obtenu avec la longueur de Debye λ_D (Équation 3) :

$$\lambda_D = \left(\frac{\epsilon_0 \epsilon_r \cdot k_B \cdot T}{e^2 \sum_{i=1}^n n_i z_i^2} \right)^{\frac{1}{2}}$$

Équation 3 : Longueur de Debye

Dans cette relation, n_i et z_i sont respectivement le nombre de charge et la charge de l'espèce i . La charge de surface de la particule n'est ressentie qu'à une courte distance, tant que celle-ci est inférieure à la longueur de Debye. Au-delà, les ions de la solution écrantent la surface qui apparaît donc comme non chargée.

c. Interactions hydrophobes

Ce type d'interaction existe à cause d'une résultante thermodynamique. Ce phénomène est schématisé *Figure 2*.

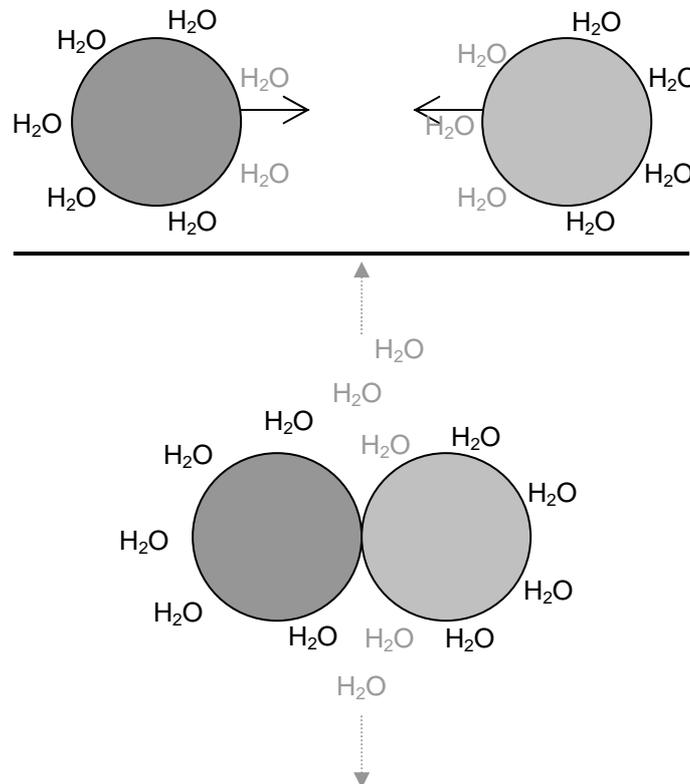


Figure 2 : Schéma de l'interaction hydrophobe entre deux particules dans l'eau

Deux particules plongées dans de l'eau pure ont autour d'elles des molécules d'eau qui s'orientent de manière à écranter les charges de surface¹. Le système tendant à diminuer son énergie totale, aucune interaction de type électrostatique suffisamment forte n'empêche l'approche des deux particules. A leur contact, les molécules d'eau contre les particules se retirent (symbolisées H₂O sur la *Figure 2*), engendrant une augmentation de l'entropie du système, avec pour conséquence une diminution de l'énergie globale, donc une stabilité des deux particules en contact. Ce phénomène explique également la stabilité des micelles ou des membranes lipidiques.

d. Forces surfaciques

Les forces de surface ont pour origine deux types d'interactions : celles de courte portée de type liaisons covalentes, métalliques... et celles à plus longue portée de type Van der Waals. Lors de la création d'une interface, le système doit fournir un travail proportionnel à l'aire créée δA et à la tension de surface du milieu considéré σ selon la relation suivante (*Équation 4*) :

$$\delta W = \sigma \cdot \delta A$$

Équation 4 : Energie à fournir par un système pour la création d'une interface

La tension de surface est à l'origine d'un grand nombre de phénomènes tels que le mouillage, la capillarité ou la coalescence.

C. Focus sur la rhéologie

Pour citer la définition donnée par le Groupe Français de Rhéologie : la rhéologie est la science des écoulements et déformations de la matière, des contraintes qui en résultent et des efforts qu'il faut lui appliquer pour les obtenir. C'est donc, pour un matériau donné, l'étude du lien entre la cinématique (déformation, vitesse,...) et la dynamique (forces, couple, contraintes). Nous allons donc définir les grandeurs usuellement utilisées pour caractériser ce lien, et présenter ensuite les différents types de comportements rhéologiques qui peuvent être observés. Enfin, nous terminerons ce paragraphe par une présentation des outils utilisés pour la mesure des caractéristiques rhéologiques.

1. Définitions

a. Contrainte de cisaillement et vitesse de cisaillement

Les deux principales grandeurs utilisées en rhéologie sont la vitesse de cisaillement, pour caractériser la cinématique, et la contrainte de cisaillement, pour les forces. Prenons l'exemple de l'écoulement le plus simple, soit l'écoulement de Couette plan généré entre deux plans parallèles par l'application d'une force tangentielle sur le plan supérieur (*cf. Figure 3*). Cette action va mettre le fluide en mouvement et, dans l'hypothèse d'un régime laminaire (*I.D.1 Régime laminaire*), le profil de vitesse dans l'entrefer sera linéaire.

¹ Principe identique à la mise en place de la double-couche ionique, à la différence près que des dipôles écrantent les charges de surfaces.

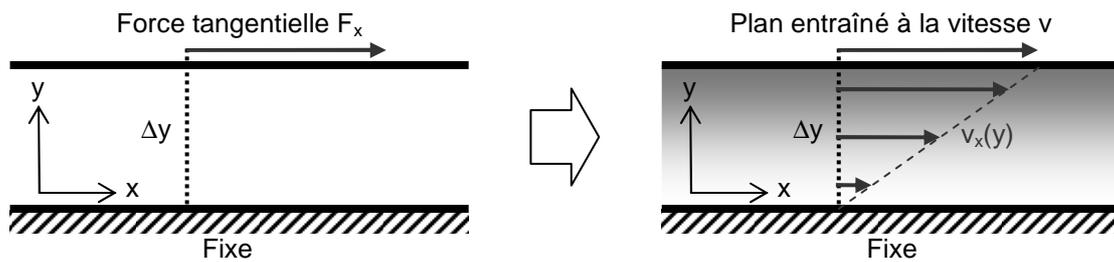


Figure 3 : Écoulement de Couette plan (écoulement de cisaillement pur permanent)

La contrainte de cisaillement τ_{xy} est la force par unité de surface définie par l'Équation 5 :

$$\tau_{xy} = \frac{F_x}{S}$$

Équation 5 : Contrainte tangentielle / contrainte de cisaillement

La vitesse de cisaillement, notée $\dot{\gamma}$, est le gradient de vitesse définie par l'Équation 6 :

$$\dot{\gamma} = \frac{dv_x}{dy}$$

Équation 6 : Définition de la vitesse de cisaillement

Dans l'écoulement de Couette présenté sur la *Figure 3*, le profil de vitesse est linéaire et la vitesse de cisaillement est donc constante. Dans le cas d'un écoulement de Poiseuille en conduite, le profil de vitesse n'est plus linéaire mais, par exemple, parabolique. La vitesse de cisaillement n'est alors plus constante au sein de l'écoulement mais elle sera maximale à la paroi, et nulle sur l'axe de symétrie. Nous verrons dans le paragraphe suivant que ces deux grandeurs, vitesse et contrainte de cisaillement, permettent de définir plusieurs caractéristiques rhéologiques.

Les deux quantités que nous venons de définir sont des quantités scalaires et elles ne permettent pas de caractériser totalement la cinétique et la dynamique d'un écoulement tridimensionnel quelconque. Dans ce cas, chaque volume infinitésimal de fluide est caractérisé par son vecteur vitesse et par le système de force qui lui est appliqué par son voisinage. La description de la cinématique et de la dynamique au sein du fluide nécessite alors l'introduction de grandeurs plus complexes. La cinématique est totalement caractérisée par deux tenseurs. Le premier est le tenseur des vitesses de déformation représentant la partie symétrique du tenseur gradient de vitesse. Le second est le tenseur des contraintes représentant le système de forces et dont les composantes sont présentées sur la *Figure 4*. On notera que ces tenseurs sont symétriques et que la description complète de l'état de contrainte et de la cinématique passe donc par la connaissance de six champs scalaires pour chacun.

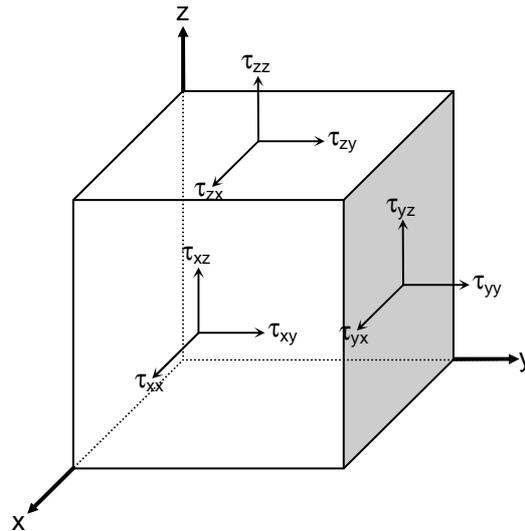


Figure 4 : Tenseur des contraintes - Système forces/contraintes d'un volume élémentaire de fluide

Dans notre étude, nous nous limiterons à l'analyse d'écoulements de type Poiseuille. C'est pour cela que nous n'utiliserons que les deux grandeurs scalaires que sont la vitesse de cisaillement et la contrainte de cisaillement.

b. Viscosité en cisaillement et caractéristiques complémentaires

La viscosité en cisaillement (appelée également simple viscosité ou viscosité dynamique) est définie par le rapport entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement dans un écoulement de cisaillement pur permanent (Équation 7) :

$$\eta = \frac{\tau_{xy}}{\dot{\gamma}}$$

Équation 7 : Définition de la viscosité dynamique

La viscosité varie en général assez fortement avec la température, faiblement avec la pression (pour les solides et les liquides). Nous verrons qu'elle peut également varier avec la vitesse de cisaillement (ou la contrainte), définissant ainsi un comportement « non newtonien » (*I.A.1.b Fluides newtoniens généralisés*).

Pour mémoire, nous mentionnerons la viscosité dite « cinématique », qui est le rapport de la viscosité en cisaillement (viscosité dynamique) par la masse volumique (Équation 8) :

$$\nu = \frac{\eta}{\rho}$$

Équation 8 : Définition de la viscosité cinématique

C'est une grandeur plus adaptée dans certains domaines et donc utilisée préférentiellement à la viscosité dynamique η (pour les écoulements turbulents par exemple). Cependant, il ne s'agit pas d'une caractéristique supplémentaire.

La viscosité est la principale caractéristique rhéologique d'un fluide, mais elle n'est pas la seule et elle est parfois insuffisante pour caractériser totalement un fluide. Les écoulements de cisaillement, même aussi simples qu'un écoulement de type Couette, permettent d'obtenir des caractérisations complémentaires. Les trois principales caractéristiques sont obtenues sur les écoulements présentés sur la *Figure 5*.

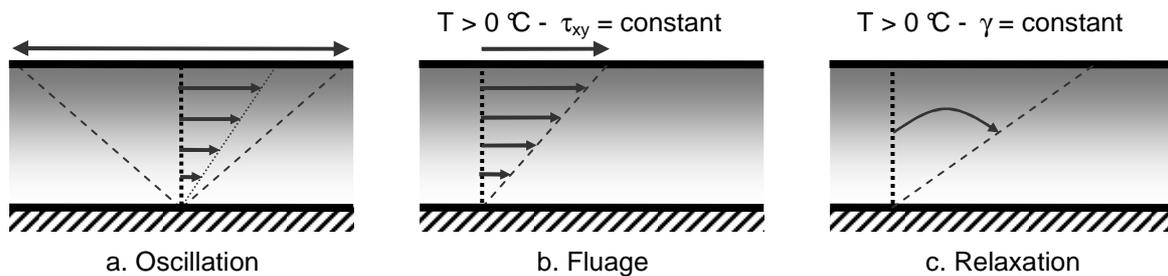


Figure 5 : Ecoulement de cisaillement pur permettant d'obtenir des caractérisations rhéologiques complémentaires

La réalisation d'un écoulement oscillant de faible amplitude, tel que schématisé sur la *Figure 5.a*, permet de rester dans le domaine des petites déformations. Cette sollicitation peut être réalisée en imposant une contrainte de la forme $\tau_{xy} = \tau_a \cos(\omega t)$, ω étant la pulsation. La mesure du déphasage entre la vitesse de cisaillement et la contrainte fournit une information supplémentaire, celle-ci conservant une allure sinusoïdale au cours du temps. La caractérisation la plus utilisée, construite à partir de ces mesures, est le module complexe G^* qui est défini à partir de la déformation γ^1 par l'*Équation 9*.

$$G^* = \frac{\tau_{xy}}{\gamma} = G' + iG''$$

Équation 9 : Définition du module complexe

L'utilisation des nombres complexes permet de traduire le déphasage entre contrainte et déformation. G' est le module élastique (ou module d'accumulation) et G'' le module de perte. Un fluide ne présentant aucune élasticité aura un module élastique nul et un module de perte proportionnel à sa viscosité ($G' = \omega\eta$).

Enfin les écoulements définis sur la *Figure 5.b* et *Figure 5.c* permettent de définir respectivement les fonctions de fluage et relaxation. Dans le premier cas, on observe la déformation que subit le matériau/fluide lorsque, à partir d'un état de repos, on lui impose une contrainte de cisaillement τ_{xy}

¹ La vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ est la dérivée par rapport au temps de la déformation γ .

constante. La fonction de fluage est alors le rapport de la déformation à la contrainte τ_{xy} selon l'Équation 10 :

$$J(t) = \frac{\gamma(t)}{\tau_{xy}}$$

Équation 10 : Complaisance de fluage (fonction de fluage)

Dans le second cas, on impose un échelon de déformation γ à un instant t_0 et on mesure la contrainte de cisaillement qu'il faut appliquer au fluide pour réaliser ce mouvement. La fonction de relaxation est décrite par l'Équation 11.

$$g(t) = \frac{\tau_{xy}(t)}{\gamma}$$

Équation 11 : Fonction de relaxation

La liste de caractéristiques rhéologiques que nous venons de dresser n'est pas exhaustive. Il serait possible de citer les coefficients de contraintes normales ainsi que la viscosité élongationnelle. Toutefois, la viscosité est réellement la caractéristique la plus importante et nous verrons dans le paragraphe suivant, avec la présentation des différents types de comportement rhéologique, qu'elle est suffisante pour décrire correctement une large gamme de fluides. En pratique, dans la suite de ce travail, nous utiliserons essentiellement la viscosité dynamique η .

En présence d'une solution ou d'une suspension, la viscosité varie avec la concentration en soluté ou particules. Pour analyser l'influence de la concentration, les expressions décrivant la viscosité des suspensions sont exprimées en valeurs relatives par rapport à la viscosité de la phase continue η_F . Les études sur les suspensions font ainsi appel à la viscosité relative η_r (Équation 12), à la viscosité spécifique η_{sp} (Équation 13) et à la viscosité intrinsèque $[\eta]$ (Équation 14), permettant ainsi de définir une concentration réduite $c[\eta]$.

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_F}$$

Équation 12 : Viscosité dynamique relative

$$\eta_{sp} = \frac{(\eta - \eta_F)}{\eta_F}$$

Équation 13 : Viscosité spécifique

$$[\eta] = \lim_{c_{susp} \rightarrow 0} \frac{(\eta - \eta_F)}{c_{susp} \cdot \eta_F}$$

Équation 14 : Viscosité intrinsèque

2. Les différents types de comportement rhéologique

a. Fluides newtoniens

Un fluide est dit newtonien lorsque, à température donnée, sa viscosité est constante et ne dépend ni de la vitesse de cisaillement, ni de la contrainte. Il obéit à la loi décrite par l'Équation 15, dans laquelle η est une constante :

$$\tau_{xy} = \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Équation 15 : Loi d'écoulement d'un fluide newtonien

b. Fluides newtoniens généralisés

Dans l'industrie, en particulier dans l'industrie agroalimentaire, plus de 80 % des fluides traités sont rhéologiquement complexes. On parlera généralement de fluide non-newtonien. Ces fluides n'obéissent pas à une loi de comportement telle que l'Équation 15. On peut toutefois établir une gradation dans ces comportements. Ainsi, on parlera de fluide newtonien généralisé lorsque la relation précédente, définissant un fluide newtonien, est étendue à des viscosités non constantes (Équation 16) dépendant de la vitesse de cisaillement telle que :

$$\tau_{xy} = \eta(\dot{\gamma}) \cdot \dot{\gamma}$$

Équation 16 : Comportement newtonien généralisé

$\eta(\dot{\gamma})$ est alors appelée viscosité apparente et se note η_{app} .

Les courbes de viscosité représentent la viscosité apparente en fonction de la vitesse de cisaillement (représentation graphique de l'Équation 16). L'évolution de la viscosité permet de classer ces fluides en deux catégories. Lorsque la viscosité diminue avec la vitesse de cisaillement, le fluide est dit rhéofluidifiant ou pseudoplastique (Figure 6 - courbes en tirets). Lorsqu'elle croît, le fluide est dit rhéoépaississant (Figure 6 - courbes en pointillés).

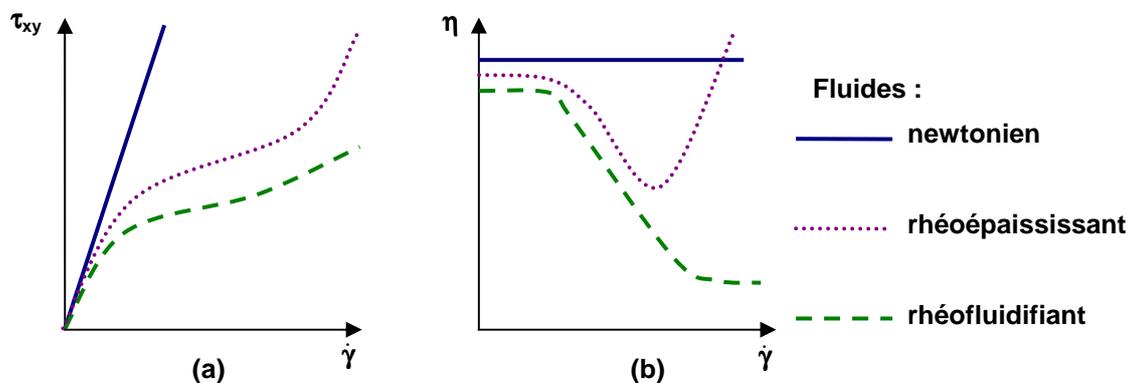


Figure 6 : Courbes d'écoulement et rhéogrammes caractérisant des fluides newtoniens généralisés

Signalons que le comportement rhéoépaississant est relativement rare. Il s'observe essentiellement dans des suspensions fortement concentrées et pour de « grandes » vitesses de cisaillement, c'est-à-dire après avoir généralement montré un comportement rhéofluidifiant aux plus faibles vitesses de cisaillement (voir *Figure 6* - courbes en pointillés).

Il existe de nombreuses lois permettant de modéliser le comportement newtonien généralisé. La plus connue, et la plus utilisée est la loi d'Ostwald-de Waele, appelée également loi puissance (*Équation 17*).

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n$$

Équation 17 : Loi d'Ostwald-de Waele

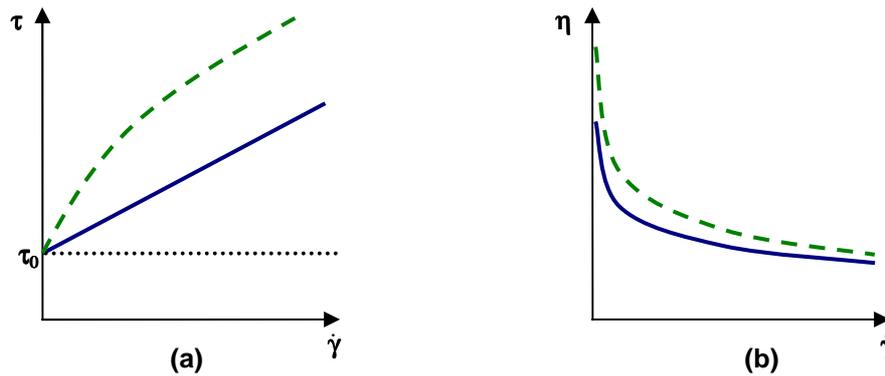
C'est une loi à deux paramètres : K est la consistance et n est l'indice de comportement (d'écoulement ou de structure). Selon la valeur de l'indice n , trois cas se présentent, caractérisant la nature du fluide :

- $0 < n < 1$: fluide rhéofluidifiant ou pseudoplastique,
- $n = 1$: fluide newtonien ($K = \eta$),
- $n > 1$: fluide rhéoépaississant ou dilatant.

Dans le cas d'un fluide rhéofluidifiant, la viscosité apparente baisse lorsque la vitesse de cisaillement augmente. En d'autres termes, plus l'agitation est forte, plus la viscosité est faible. Dans le cas d'une suspension solide-liquide, ce phénomène s'explique par la mise en place d'un ordre interne des matériaux présents dans le fluide. Ceux-ci provoquent une résistance interne importante à l'écoulement, et donc une viscosité élevée. Lors de l'augmentation du gradient de vitesse, les particules en suspension s'orientent dans le sens de l'écoulement, les particules peuvent se mouvoir plus facilement les unes par rapport aux autres, provoquant ainsi une diminution de la viscosité.

c. Fluides viscoplastiques

Les fluides viscoplastiques sont aussi appelés fluides à contrainte seuil ou à seuil critique. Leur comportement se caractérise par la présence d'un seuil d'écoulement (contrainte critique) τ_0 . Toute contrainte inférieure à ce seuil ne créera pas de mouvement permanent au sein du fluide. Les courbes et rhéogrammes types de ce comportement sont présentés sur la *Figure 7*. Il est possible d'expliquer qualitativement ce phénomène en supposant que le fluide étudié présente, au repos, une structure 3D rigide, susceptible de résister à des contraintes inférieures à τ_0 . Dès que cette valeur de contrainte est dépassée, la structure se détruit, et la composante visqueuse du fluide apparaît. En-dessous de ce seuil, le fluide se comporte comme un solide élastique. L'application d'une contrainte inférieure au seuil créera une légère déformation, donc une vitesse de cisaillement non nulle durant un temps court, puis le système se comportera à nouveau comme un solide. Si la contrainte est augmentée et dépasse le seuil, on crée alors un écoulement.



**Figure 7 : Courbes d'écoulement et rhéogrammes de fluides viscoplastiques
(en trait plein : fluide de Bingham)**

Différentes lois permettent de modéliser ce comportement. La loi de Bingham est la plus connue (Équation 18) et présente une vitesse de cisaillement nulle pour $\tau < \tau_0$:

$$\tau = \tau_0 + \eta \cdot \dot{\gamma}$$

Équation 18 : Modèle de Bingham ($\tau \geq \tau_0$)

Ce modèle est le plus simple que l'on puisse proposer pour un fluide viscoplastique mais il est généralement mal adapté à la description des fluides réels qui ne montrent pas un comportement linéaire au-delà du seuil. Parmi les modèles traduisant le mieux le comportement au-delà du seuil, nous citerons la loi de Casson, assez utilisée pour les suspensions dans l'industrie alimentaire (Équation 19) et la loi de Herschel-Bulkley (Équation 20) dans laquelle figure l'indice de comportement n traduisant le comportement rhéofluidifiant :

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + K_c \cdot \sqrt{\dot{\gamma}}$$

Équation 19 : Loi de Casson

$$\tau = \tau_0 + K \cdot \dot{\gamma}^n$$

Équation 20 : Loi de Herschel-Bulkley

d. Fluides viscoélastiques

Les fluides viscoélastiques, comme leur nom l'indique, sont à la fois visqueux et élastiques. Ceci signifie qu'une partie de l'énergie est dissipée par frottements visqueux, et une partie est emmagasinée et peut être restituée. Ainsi, la réponse d'un volume de fluide à un instant donné dépend des sollicitations auxquelles il est soumis, mais également de son « histoire ». Ces fluides sont donc susceptibles de montrer des effets de mémoire dus à leur élasticité. Par rapport à un fluide purement visqueux, cette élasticité peut modifier de façon drastique la structure d'un écoulement et les contraintes au sein du fluide. L'un des effets les plus connus de l'élasticité est sans doute l'effet Weissenberg, présenté sur la Figure 8. L'effet Weissenberg traduit une remontée du fluide autour de

l'arbre d'agitation lorsque celui-ci est entraîné en rotation. Au contraire, un fluide purement visqueux creuse sa surface libre autour de l'arbre d'agitation. Ce phénomène est dû à l'existence, au sein du fluide, de contraintes normales anisotropes.

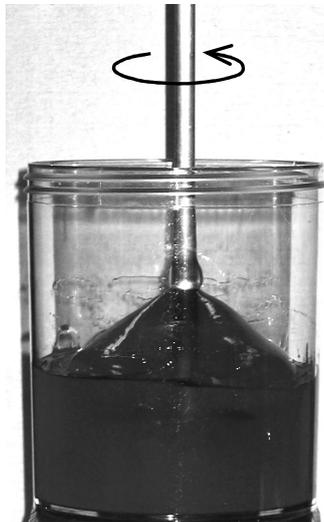


Figure 8 : Manifestation de l'élasticité : effet Weissenberg

D'autres effets spécifiques, comme le gonflement en sortie de filière ou la réalisation d'un siphon sans tube, sont également bien connus. La caractérisation rhéologique de ces fluides est plus complexe et la seule détermination de la viscosité n'est pas suffisante pour les caractériser totalement. Pour la compléter, la caractérisation la plus usuelle, et la plus aisée à réaliser, est la mesure du module complexe (*I.A.1.b Viscosité en cisaillement et caractéristiques complémentaires*). En effet, sur ce type de sollicitation, un matériau parfaitement élastique fournit une réponse pour laquelle contrainte et déformation sont en phase alors qu'il y a un déphasage de $\pi/2$ en fluide purement visqueux. On voit donc que la mesure du déphasage va permettre de quantifier l'importance relative de l'élasticité et de la viscosité. On notera cependant que, hormis pour l'étude des seules petites déformations, cette mesure supplémentaire n'assure pas une caractérisation complète du fluide.

e. Fluides thixotropes

Jusqu'ici, nous avons supposé implicitement une réponse constante du fluide suite à une sollicitation constante au cours du temps. La viscosité obtenue ne dépendait que du cisaillement imposé et ne variait pas dans le temps. Or, certains fluides ne se comportent pas ainsi. Ils sont qualifiés de « fluide à comportement dépendant explicitement du temps ». Ainsi, sur certaines suspensions d'argile, il est possible d'observer une viscosité qui décroît progressivement, alors que le fluide est soumis à une contrainte constante. Dans ce cas, le fluide est dit « thixotrope » (*Figure 9*). Cette appellation suppose que le fluide retrouve ses caractéristiques initiales après un temps de repos suffisant. Dans le cas contraire, on parle de thixotropie partielle. Si, au contraire, on observe une augmentation de la viscosité lorsque le fluide est contraint ou mis en mouvement, on parle de rhéopexie. Ce dernier comportement est beaucoup plus rare.

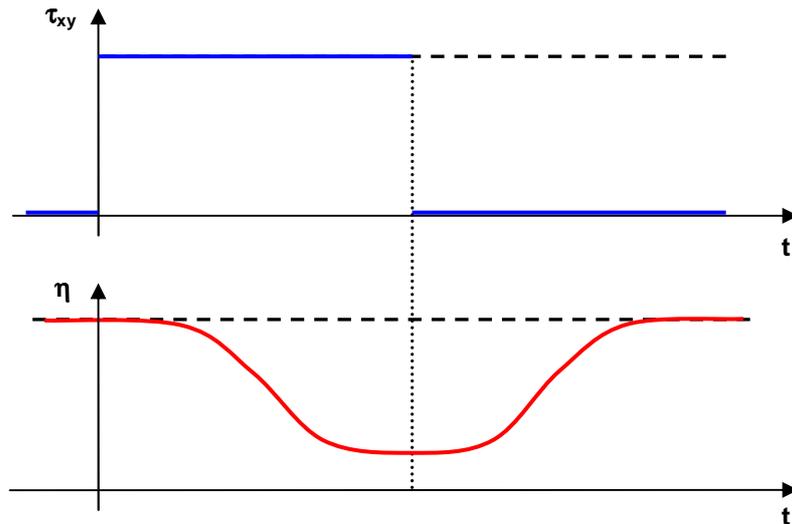


Figure 9 : Illustration du comportement thixotrope

La thixotropie est liée à des phénomènes de désorganisation de structure dus au cisaillement subi. Lorsqu'un fluide thixotrope est soumis à un cisaillement après une période de repos, sa structure se désorganise peu à peu, et sa viscosité apparente décroît avec le temps. La thixotropie se caractérise donc également par la capacité du fluide à reformer sa structure quand il est laissé au repos après une période de déformation. Dans le cas de la rhéopexie, le cisaillement facilite au contraire la formation d'une structure.

f. Cas de la thermodépendance

Lors d'une mesure de viscosité, la température est un paramètre important à prendre en compte. L'effet de la température sur la viscosité d'un échantillon au moment de l'analyse peut être considérable, et doit donc être précisé. Pour modéliser les variations de la viscosité d'un échantillon en fonction de la température, on utilise généralement une loi de type Arrhenius (Équation 21) :

$$\eta_{app} = \eta_0^{Ar} \cdot e^{-\frac{E_a}{R \cdot T}}$$

Équation 21 : Modélisation de la viscosité apparente selon une loi d'Arrhenius

3. Les principaux outils de caractérisation rhéologique

a. Viscosimètre à corps vibrant

Le principe de fonctionnement de ce viscosimètre est basé sur la caractérisation des déformations d'un corps solide (de type fil, lame ou cristal) immergé dans un fluide. Ces déformations sont provoquées par des vibrations générées par un courant électrique alternatif. La fréquence de vibration varie en fonction de la viscosité du fluide dans lequel l'élément vibrant est immergé. Ce viscosimètre présente l'avantage de ne pas avoir de pièce d'usure, et ne nécessite donc qu'une maintenance réduite. Il peut fonctionner dans des conditions difficiles telles que des zones explosives, sous haute

pression ou haute température. De plus, il peut travailler avec de très hautes vitesses de cisaillements et mesurer des fluides très visqueux (jusqu'à 1000 Pa s), colmatants ou fibreux. Néanmoins, la détermination de la viscosité est correcte si le fluide mesuré est newtonien. Dans le cas contraire, il est difficile de distinguer si la réponse de l'élément vibrant est une conséquence du cisaillement causé par la vibration sur le fluide (fréquence et amplitude de l'élément) et/ou par le régime d'écoulement du fluide lui-même. Ce système est alors peu puissant lorsqu'il est confronté à des fluides non-newtoniens.

b. Viscosimètre capillaire

Il existe plusieurs modèles de viscosimètres capillaires : viscosimètre d'Ostwald, viscosimètre type Ubbelohde, etc., ainsi que de multiples tubes viscosimétriques. Le principe consiste à faire s'écouler un volume défini de fluide à travers un tube calibré de faible diamètre (de l'ordre du millimètre). Il est possible d'ajouter une charge donnée pour augmenter la vitesse d'écoulement du fluide (*Figure 10*). Pour les fluides de faible viscosité, la gravité est suffisante pour la mise en écoulement. Ce type de viscosimètre permet de mesurer la viscosité dynamique du fluide à partir de la durée d'écoulement Δt et de la constante k de l'appareil, fournie par le constructeur (*Équation 22*).

$$\eta = k \cdot \rho \cdot \Delta t$$

Équation 22 : Viscosité dynamique déterminé à partir d'un viscosimètre d'Ostwald

L'exploitation de la mesure est faite en faisant l'hypothèse d'un régime d'écoulement laminaire. Les conditions d'utilisation doivent donc respecter cette condition : fortes viscosités, ou faibles vitesses d'écoulement pour les faibles viscosités. En général, le rayon du tube peut être choisi en fonction de la viscosité du fluide étudié afin d'avoir une durée d'écoulement optimale.

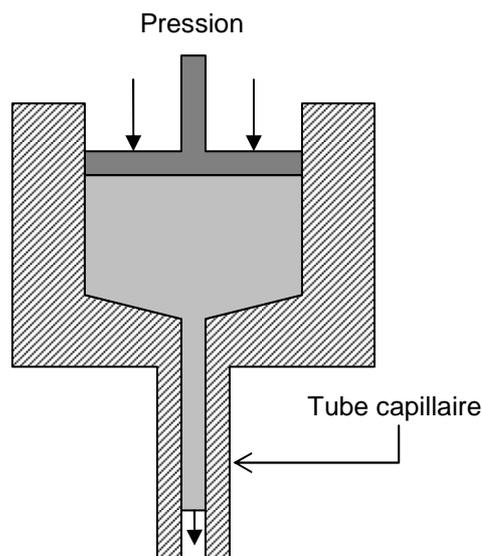


Figure 10 : Schéma de principe d'un tube viscosimétrique

Sur le même principe, il est également possible de mesurer la perte de charge produite par le passage d'un fluide dans une conduite pour en déduire sa viscosité. Le principe de cette mesure sera approfondi dans la partie *I.D Interactions rhéologie - procédé*.

c. Viscosimètre à chute de bille

Le viscosimètre à chute de bille est aussi appelé viscosimètre de Hoepler. Le principe consiste à mesurer le temps que met une bille pour parcourir une certaine distance dans un tube calibré transparent rempli du fluide à caractériser et incliné de 10° par rapport à la verticale. La viscosité dynamique η est alors proportionnelle à la durée de chute Δt de la bille (*Équation 23*).

$$\eta = k \cdot \Delta t$$

Équation 23 : Viscosité dynamique déterminée à partir d'un viscosimètre de Hoepler

L'utilisation de ce genre de viscosimètre est réservée à des fluides newtoniens uniquement. Le type de bille à utiliser doit être adapté en fonction de la viscosité du fluide, afin que la mesure de la durée soit suffisamment précise.

d. Rhéomètres

Nous avons vu que l'un des écoulements les plus simples que l'on puisse imaginer est l'écoulement de Couette. Celui-ci se retrouve mis en œuvre facilement à travers deux configurations généralement utilisées. Un premier type de géométrie utilise deux cylindres coaxiaux, un second utilise un cône et un plan (voire deux plans). Ces écoulements présentent l'avantage d'être des écoulements de cisaillement pur. De plus, si ces écoulements respectent certaines conditions géométriques, ils permettent de soumettre l'ensemble du fluide à la même vitesse de cisaillement. Ceci est un avantage notable pour les fluides non newtoniens pour lesquels la viscosité dépend de la cinématique. Dans ce cas, la viscosité est mesurée pour une vitesse de cisaillement stricte, et non pour une vitesse moyenne estimée sur l'écoulement.

En outre, sur ces deux dispositifs, il est possible de piloter, par exemple, la vitesse de rotation pour accéder à d'autres caractérisations que la seule viscosité : module complexe, fonction de fluage, etc. On parle alors de rhéomètre et non plus de simple viscosimètre.

i. Rhéomètres à cylindres coaxiaux

Dans ce type d'appareil, le fluide est donc contenu dans l'entrefer entre deux cylindres coaxiaux de hauteur h , de rayon R_1 et R_2 . Le cylindre extérieur est généralement immobile et le cylindre intérieur est entraîné à la vitesse de rotation ω par un couple C_{ech} imposé sur l'axe de ce cylindre.

A partir des caractéristiques de la géométrie utilisée, il est alors possible de retrouver la viscosité de l'échantillon. Si l'entrefer est large (exemple : viscosimètre type Brookfield), le système sera difficilement utilisable si le fluide est non-Newtonien. Si le système a un faible entrefer tel que $R_1 \approx R_2$, alors le gradient de vitesse dans l'entrefer est pratiquement constant (il l'est d'autant plus que le rapport R_1/R_2 est proche de 1). La viscosité dynamique a alors pour expression l'*Équation 24* :

$$\eta(\dot{\gamma}) \approx \frac{1}{4\pi \cdot h \cdot R_1^2} \cdot \frac{C_{\text{ech}}}{\omega} \cdot \left(1 - \left(\frac{R_1}{R_2} \right)^2 \right)$$

Équation 24 : Expression de la viscosité dynamique dans un écoulement de Couette entre cylindres coaxiaux - Cas d'un faible entrefer

Dans le cas d'une géométrie à large entrefer, le profil de vitesse dépend de la nature du fluide. Si on fait l'hypothèse d'un comportement de type loi en puissance (modèle d'Ostwald), l'expression de la viscosité fait alors intervenir l'indice de comportement n , soit une quantité que l'on cherche à mesurer. L'interprétation des résultats doit alors se faire par itérations et ces systèmes ne sont généralement pas conçus pour cela.

ii. Cône - plan

Cette géométrie de mesure se compose d'un cône mobile dont la pointe a été tronquée, ainsi que d'un plan inférieur, généralement régulé en température par effet Peltier. Le cône mobile se place au dessus du plan tel que la pointe du cône (si elle était encore présente) soit en contact avec le plan (*Figure 11*). L'entrefer libéré par la troncature du cône est assez faible (de l'ordre de quelques dizaines de micromètres). Lors de l'utilisation de cette géométrie pour des suspensions, la hauteur de l'entrefer doit être compatible avec la taille des plus grosses particules.

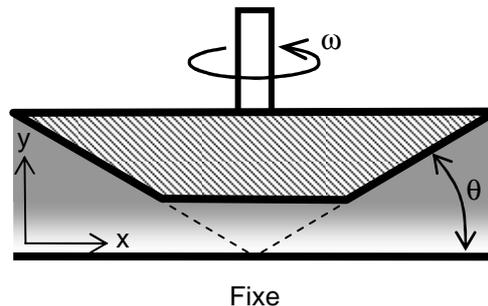


Figure 11 : Schéma de principe d'une géométrie cône-plan

Si l'angle du cône est faible (en pratique 1 à 4°), alors la vitesse de cisaillement est pratiquement constante dans l'entrefer et ne dépend pas des caractéristiques du fluide. Comme dans le cas des cylindres coaxiaux, la constance de la vitesse de cisaillement est un avantage intéressant pour caractériser un fluide, particulièrement quand celui-ci est non newtonien. Lorsque l'angle du cône est faible, $\tan \theta \approx \theta$ (voir *Figure 11*), la viscosité dynamique a pour expression l'Équation 25 :

$$\eta = \frac{3}{2} \cdot \frac{C}{\pi \cdot R^3} \cdot \frac{\theta}{\omega}$$

Équation 25 : Expression de la viscosité dynamique dans un écoulement de Couette entre cône et plan

Cela permet des investigations précises du comportement rhéologique. Le choix de la géométrie (diamètre du cône, angle de la pointe) est effectué en fonction de l'échantillon à analyser et de la gamme de couple mesurable par le rhéomètre.

iii. Plans parallèles

Cette géométrie permet d'avoir un entrefer constant entre les deux éléments, autorisant ainsi l'analyse d'échantillon contenant des particules solides de taille non compatible avec les entrefers des géométries cône-plan. Par contre, la vitesse de cisaillement n'est pas homogène dans l'entrefer : elle est nulle au centre et maximale en périphérie. Il n'existe donc pas une expression unique reliant la viscosité dynamique aux variables instrumentales (C , R , θ et ω). Cette géométrie présente malgré tout un grand intérêt puisqu'elle offre une alternative de mesure permettant de résoudre certaines difficultés telle que la présence d'hétérogénéités (particules de grosse taille, ...) ou l'observation d'un phénomène de glissement sur les parois (voir *I.A.1.a.iv Difficultés de mesure*).

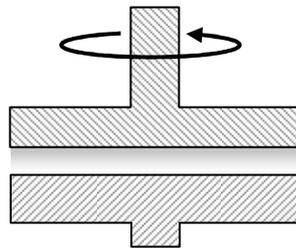


Figure 12 : Schéma d'une géométrie plan-plan

iv. Difficultés de mesure

Les mesures de viscosité ne sont pas exemptes de difficultés et nous citerons ici les principaux problèmes qui peuvent être rencontrés lors de la caractérisation de fluides.

Lorsque l'on souhaite caractériser des fluides hétérogènes, tels que les suspensions ou les émulsions, l'un des premiers soucis est de préserver un caractère macroscopiquement homogène lors de la mesure. Les effets possibles de sédimentation doivent donc être éliminés (en réduisant la durée de mesure par exemple). Cependant, on peut également être confronté à des effets de migration, y compris lorsque les particules ont la même masse volumique que le fluide porteur. Ces effets sont dus à l'existence d'un gradient de la vitesse de cisaillement, aux interactions hydrodynamiques entre particules, ou enfin à l'inertie (Coussot and Ancy, 1999). Sur des mesures « longues », cela peut conduire à une ségrégation marquée au sein de l'échantillon et remet en cause la validité de la mesure effectuée.

Dans le cas de suspensions solide-liquide, il faut également être attentif aux possibles blocages qui interviennent quand des particules forment, entre deux parois, un assemblage solide de type arche. On considère généralement que, pour éviter cet effet, il faut que l'entrefer minimal soit 20 à 50 fois plus grand que la taille des plus grosses particules. Les systèmes cône-plan, dans lesquels les

entrefers sont de l'ordre de quelques dizaines de micromètres, peuvent être restrictifs. Les géométries plan-plan, dont l'entrefer est variable, constituent alors une solution.

Lors d'une mesure de rhéologie, l'objectif est de réaliser l'écoulement théorique servant de base à l'exploitation des données. Ceci peut se trouver en défaut pour diverses raisons : l'échantillon peut, par exemple, se fracturer ou ne pas adhérer suffisamment aux parois (effet de glissement). Si la fracturation est difficilement maîtrisable, les effets de glissement peuvent par contre être supprimés par l'utilisation de géométries rugueuses. Ceci est une technique assez couramment utilisée pour les gels ou les suspensions. On utilise alors essentiellement des plans striés. Les effets d'inertie rentrent également dans cette catégorie. En effet, lorsqu'on souhaite atteindre de fortes vitesses de cisaillement, le régime d'écoulement dans le rhéomètre n'est plus nécessairement laminaire. Dans ce cas, l'écoulement est plus complexe avec, par exemple, la superposition d'un écoulement toroïdal à l'écoulement souhaité. La dissipation visqueuse est alors plus importante et la viscosité calculée sera alors surestimée (pouvant parfois être interprétée à tort comme un comportement rhéoépaississant).

Enfin, une dernière cause d'erreur que l'on peut répertorier est due à l'évaporation au niveau de la surface libre. Celle-ci n'est pas négligeable sur des mesures en 5 à 10 minutes si aucune précaution n'est prise. La quantité de fluide étant moindre, la viscosité est alors sous-estimée.

Si l'échantillon mesuré est une suspension, il y aura une concentration artificielle d'éléments (chimiques ou particulaires) dans l'entrefer, causant ainsi un biais supplémentaire de mesure.

D. Interactions rhéologie - procédé

Dans un procédé, que ce soit lors de l'agitation dans un réacteur ou lors de l'écoulement dans une installation, les forces de frottement visqueux entraînent une perte d'énergie. Celle-ci dépend fortement de la rhéologie du fluide circulant. Afin de mieux comprendre la contribution des forces de viscosité dans un procédé, nous allons présenter rapidement l'étude d'un écoulement de base, en conduite cylindrique. Cet écoulement est réalisé sur l'outil expérimental développé dans ce travail pour accéder à la caractérisation rhéologique du moût au cours de la culture.

1. Régime laminaire

On considère donc un écoulement laminaire isotherme, établi et stationnaire dans une conduite cylindrique droite de rayon R (cf. *Figure 13*).

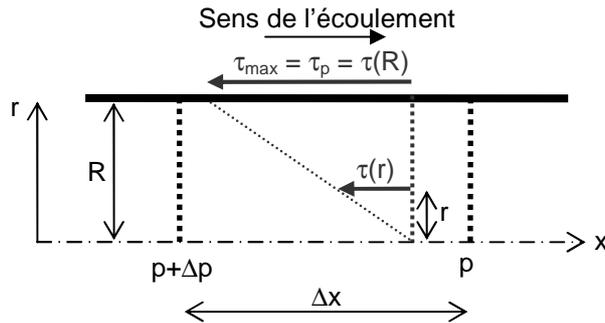


Figure 13 : Ecoulement de Poiseuille dans une conduite cylindrique de rayon R : représentation de la contrainte tangentielle et des pressions associées

Dans ce fluide, si l'on considère un cylindre de longueur Δx et de rayon r (coaxial à la conduite), on peut écrire un bilan des forces appliquées à ce cylindre de fluide. Si l'on fait une projection de ces forces sur l'axe x de l'écoulement, ce bilan se réduit à la résultante des efforts tangentiels sur la périphérie cylindrique, ainsi qu'efforts de pression sur les deux sections droites situées à x et $x+\Delta x$. La contrainte tangentielle τ étant constante sur toute la périphérie du cylindre considéré (écoulement établi et symétrie de révolution), la première partie du bilan est égale au produit de τ par la surface du cylindre. La seconde est liée à la différence de pression entre les deux sections, soit Δp . L'écoulement étant établi, l'écriture des équations du mouvement en projection sur l'axe x conduit à la relation (Équation 26).

$$2\pi \cdot r \cdot \Delta x \cdot \tau(r) = -\Delta p \cdot \pi \cdot r^2$$

Équation 26 : Bilan des forces appliquées au fluide dans une conduite cylindrique horizontale (projection sur l'axe de l'écoulement)

La contrainte tangentielle est donc nulle au centre et augmente linéairement depuis le centre jusqu'à la paroi. Celle-ci s'opposant à l'écoulement, elle est négative. Sur la paroi, elle est maximum. Son module est appelé contrainte pariétale τ_p et a pour expression l'Équation 27.

$$\tau_p = \frac{R}{2} \cdot \frac{\Delta p}{\Delta x}$$

Équation 27 : Contrainte à la paroi (contrainte pariétale)

Remarquons qu'aucune hypothèse sur la nature du fluide n'a été nécessaire pour obtenir cette relation. Elle est donc valable quel que soit le fluide. Par contre, il est nécessaire de connaître le fluide, c'est-à-dire de connaître la relation liant contrainte et vitesse de cisaillement afin de déterminer complètement l'écoulement. La résolution se fait en notant que, dans l'Équation 26, on peut séparer les variables x et r afin d'en déduire que les quantités $2\tau/r$ et $\Delta p/\Delta x$ sont égales à une même constante.

Ainsi, en écoulement newtonien, la loi de comportement est l'Équation 15. Le profil de vitesse dans la conduite prend l'expression de l'Équation 28 :

$$v(r) = \left(\frac{\tau_p}{\eta \cdot R} \right) \cdot \left(\frac{R^2}{2} - \frac{r^2}{2} \right)$$

Équation 28 : Profil de vitesse d'un fluide newtonien dans une conduite circulaire horizontale

Le débit volumique Q_v peut ainsi s'exprimer en fonction du champ de vitesse (*Équation 29*) :

$$Q_v = \frac{\tau_p \cdot \pi}{4 \cdot \eta} \cdot R^3$$

Équation 29 : Débit volumique pour un fluide newtonien dans une conduite circulaire horizontale

Ainsi, en reliant la contrainte pariétale τ_p au débit volumique Q_v pour une longueur $\Delta x = L$ de conduite cylindrique, on peut exprimer une perte de charge linéique en fonction du débit pour un fluide newtonien en régime laminaire. Cette relation, aussi appelée « Loi de Poiseuille », est utilisée pour mesurer la viscosité d'un fluide à partir d'un écoulement en conduite (*Équation 30*) :

$$\Delta p = \frac{8 \cdot L \cdot \eta}{R^4 \cdot \pi} \cdot Q_v$$

Équation 30 : Loi de Poiseuille

Enfin, pour pouvoir croiser les informations par rapport à des données laboratoires obtenues sur un viscosimètre, il est nécessaire de pouvoir déterminer quelle est la vitesse de cisaillement des mesures effectuées. Celle-ci est maximale à la paroi de la conduite et est calculée à partir du profil de vitesse et de la vitesse moyenne \bar{v} (*Équation 31*) :

$$\dot{\gamma}_p = \frac{4 \cdot \bar{v}}{R}$$

Équation 31 : Vitesse de cisaillement pariétale pour un fluide newtonien en conduite circulaire horizontale

Pour un fluide non-newtonien suivant une loi de comportement de type loi d'Ostwald-de Waele (*Équation 17*), le profil de vitesse dans la conduite prend la forme de *Équation 32*) :

$$v(r) = \left(\frac{\tau_p}{K \cdot R} \right)^{\frac{1}{n}} \cdot \left(\frac{n}{n+1} \right) \cdot \left(R^{\frac{n+1}{n}} - r^{\frac{n+1}{n}} \right)$$

Équation 32 : Profil de vitesse d'un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele dans une conduite circulaire horizontale

Le profil de vitesse dépend donc des deux constantes du modèle (K et n). Le débit volumique Q_v prend, lui aussi, une forme plus complexe (*Équation 33*) :

$$Q_v = \pi \cdot \left(\frac{n}{3 \cdot n + 1} \right) \cdot R^3 \cdot \left(\frac{\tau_p}{K} \right)^{\frac{1}{n}}$$

Équation 33 : Débit volumique pour un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele dans une conduite circulaire horizontale

La loi de Poiseuille prend alors la forme suivante (Équation 34) :

$$\Delta p = \left(\frac{2 \cdot L \cdot K}{R} \right) \cdot \left(\frac{3 \cdot n + 1}{\pi \cdot n \cdot R^3} \right)^n \cdot Q_v^n$$

Équation 34 : Perte de charge pour un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele dans une conduite circulaire horizontale

Avec ce modèle, la vitesse de cisaillement pariétale (Équation 35) s'écrit alors :

$$\dot{\gamma}_p = \left(\frac{3 \cdot n + 1}{n} \right) \cdot \frac{\bar{v}}{R}$$

Équation 35 : Vitesse de cisaillement pariétale pour un fluide non-newtonien suivant une loi d'Ostwald-de Waele en conduite circulaire horizontale

2. Régime turbulent

a. Du laminaire au turbulent

Le nombre de Reynolds est un nombre adimensionnel permettant de comparer les forces d'inertie par rapport aux forces visqueuses. Il est défini, pour une conduite cylindrique de diamètre d , par l'Équation 36 :

$$Re = \frac{d \cdot \bar{v}}{\nu} = \frac{\rho \cdot \bar{v} \cdot d}{\eta}$$

Équation 36 : Nombre de Reynolds en conduite

Dans l'Équation 36, ρ et η sont respectivement la masse volumique et la viscosité du fluide et \bar{v} est la vitesse moyenne dans la conduite. Lorsque Re est supérieur à une valeur critique, l'écoulement régulier en nappes (ou filets fluides glissant les uns sur les autres), traduisant le régime laminaire, disparaît. On observe que la vitesse de l'écoulement fluctue localement en intensité et en direction, avec une formation de tourbillons. Ce type d'écoulement est dit turbulent. Pour un écoulement en conduite, Osborne REYNOLDS a montré, en 1883, que la valeur de Re critique est de l'ordre de 2000. Cette valeur de Re critique reste très dépendante de la géométrie dans laquelle se passe l'écoulement et des perturbations auxquelles l'écoulement est soumis

Dans le cas général, le nombre de Reynolds est défini à partir d'une dimension et d'une vitesse, caractéristique de l'écoulement concerné. Dans le cas d'un conduit non circulaire de section constante

et/ou non totalement rempli, le nombre de Reynolds s'exprime en utilisant le diamètre hydraulique D_h . La règle générale du calcul du diamètre hydraulique correspond au rapport de 4 fois la section droite divisée par le périmètre mouillé (c'est-à-dire la longueur de paroi effectivement au contact avec le fluide).

Le passage d'un écoulement laminaire à un écoulement turbulent n'est pas une transition brusque et parfaitement définie, même lorsque la vitesse linéique du fluide croît progressivement. Une description de l'écoulement laminaire et turbulent est résumée sur la *Figure 14*. Entre ces deux écoulements, il y a un régime intermédiaire nommé écoulement de transition. Pour une conduite circulaire, le régime de transition pourra apparaître pour un Re compris entre 2000 et 10000.

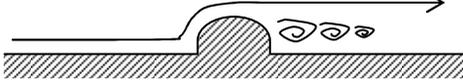
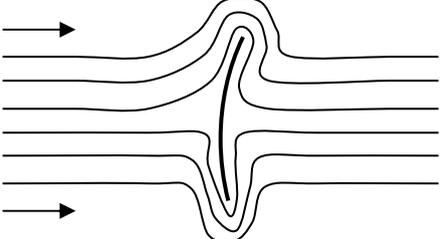
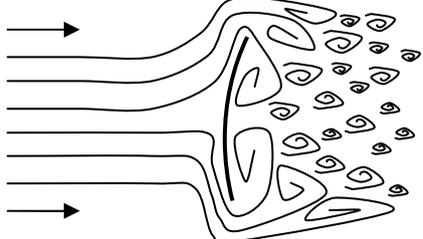
ÉCOULEMENT LAMINAIRE	ÉCOULEMENT TURBULENT
<p>Les forces dues à l'inertie sont faibles : les lignes de courant épousent la forme de l'obstacle</p>	<p>Les forces dues à l'inertie sont importantes : les lignes de courant décollent de l'obstacle</p>
	
<p>Seules jouent les contraintes de viscosité. Le fluide se déplace en filets individualisés</p>	<p>La vitesse du fluide a des fluctuations locales aléatoires.</p>
	
<p>Les vitesses sont toujours et partout calculables : système déterministe (loi de Navier-Stokes). ⇒ Les frottements entre filets de fluides génèrent de la chaleur.</p>	<p>Le plus souvent, les vitesses sont décrites statistiquement. ⇒ L'énergie sous forme de tourbillons se dissipe à travers des tourbillons plus petits, et ainsi de suite jusqu'en agitation moléculaire (donc en chaleur).</p>

Figure 14 : Comparatif entre un écoulement laminaire et turbulent (Bimbenet *et al.*, 2002)

b. Turbulence

Dans un écoulement laminaire, les vitesses sont toujours et en tous points calculables (système déterministe, loi de Navier-Stokes). Dans le cas d'un écoulement turbulent, celui-ci est caractérisé par une description statistique des vitesses que l'on peut mesurer, par exemple, par des systèmes à fils chauds ou par vélocimétrie laser. Ainsi, la mesure des vitesses en module et en direction peut être obtenue de manière localisée et suivie dans le temps. Il est possible alors de caractériser la turbulence en tout point à partir des fluctuations de vitesses. Dans ce cas, le paramètre le plus utilisé lors des études sur les transferts est l'écart-type des fluctuations enregistrées, appelé taux de turbulence (*Équation 37*).

$$Tu = \frac{1}{\bar{v}} \cdot \sqrt{\frac{\overline{\Delta v_x^2} + \overline{\Delta v_y^2} + \overline{\Delta v_z^2}}{3}}$$

Équation 37 : Taux de turbulence

Dans un écoulement laminaire, le taux de turbulence est nul. Comme indiqué précédemment, il est possible de simuler des écoulements laminaires par le calcul en utilisant les lois de Navier-Stokes. Mais en régime turbulent, le système devrait être résolu au niveau de chaque tourbillon, jusqu'à une très petite taille, en prenant en compte les interactions possibles avec le reste de l'écoulement. Ce type de simulation exige des techniques numériques sophistiquées et des puissances de calcul qui sont, pour le moment, réservées à des cas spécifiques. Dans des calculs d'ingénieurs, la turbulence est décrite à partir d'une approche statistique et macroscopique simplifiée, prenant en compte un état moyen à un instant donné. Ces résultats sont souvent assez précis pour être utilisés pour de la prédiction ou de l'optimisation. Cependant, même si ces méthodes progressent sans cesse, il faut être prudent car les phénomènes turbulents sont fortement non linéaires, ce qui entraîne des instabilités dans les écoulements, les solutions obtenues dépendant fortement de l'état initial du système.

c. Couches limites

Dans un fluide en écoulement, la présence d'une surface fixe immobilise généralement la première couche de molécules du fluide (hypothèse de non glissement) qui, par effet de viscosité, ralentit la seconde couche, et ainsi de suite. Au voisinage de la surface fixe, il s'ensuit une perturbation du mouvement dans une petite zone de fluide. La partie de l'écoulement influencée par la surface est appelée couche limite. Celle-ci, laminaire au bord d'attaque, s'épaissit dans le sens de l'écoulement jusqu'à éventuellement devenir instable pour de grands nombres de Reynolds, et donc turbulente (voir *Figure 15*). Au voisinage de la surface, une petite couche en écoulement partiellement laminaire est appelée « film laminaire » ou « sous-couche visqueuse ».

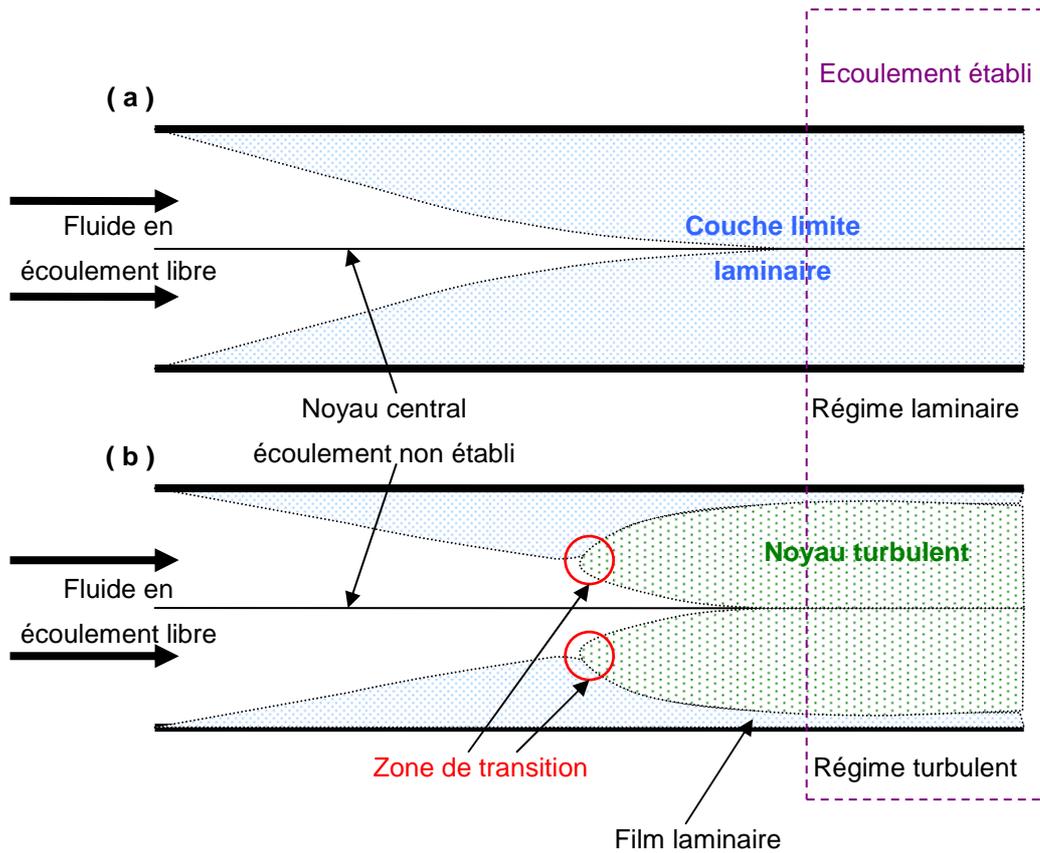


Figure 15 : Formation de couches limites à l'entrée d'une conduite amenant à un écoulement laminaire (a) ou turbulent (b) (Bimbenet *et al.*, 2002)

La séparation entre le film laminaire et l'écoulement libre n'est pas tranchée (voir *Figure 15*). La transition ne vient pas toujours au même endroit du fait de l'instabilité et de la sensibilité du phénomène à de petites perturbations. Dans le cas de l'entrée d'une conduite, si les couches limites laminaires se rejoignent au milieu de la conduite, le régime d'écoulement sera laminaire. Dans le cas où les couches limites turbulentes se rejoignent, l'écoulement dans la conduite sera turbulent. Dans la situation d'un écoulement turbulent établi, il se forme, contre la paroi, un film laminaire (ou « sous-couche visqueuse ») dans lequel les contraintes sont d'origine visqueuse et où la vitesse varie fortement à partir d'une valeur nulle à la paroi. A l'extérieur de ce film se trouve le noyau turbulent où les vitesses moyennes varient beaucoup moins et où les contraintes sont surtout d'origine cinétique. En génie des procédés, le film laminaire est appelé couche limite. Sa caractérisation est capitale pour comprendre les transferts entre les phases, niveau où se situe la résistance aux transferts de chaleur, de matière et de quantité de mouvement (frottement) entre les phases. Or, la mécanique des fluides numérique bute actuellement sur la modélisation de ces couches limites lorsqu'elles sont au contact d'écoulement fortement turbulent. Pour prédire les résistances aux transferts, on a donc recours à des lois empiriques sous forme de relations entre invariants de similitude. La *Figure 16* illustre des profils de vitesse pour un écoulement turbulent dans un tuyau.

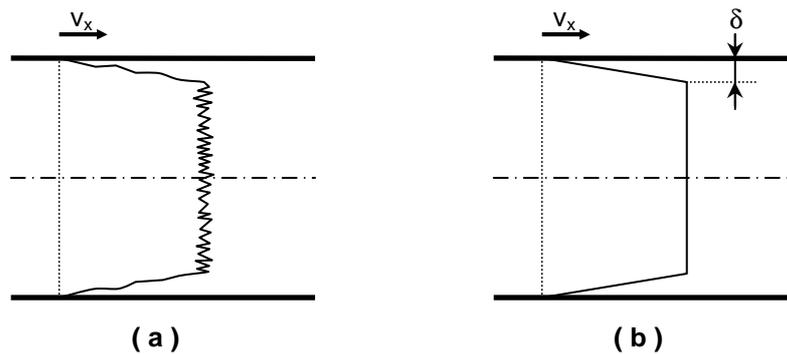


Figure 16 : Profils de vitesse pour un écoulement turbulent dans un tuyau - (a) profil réel, (b) profil simplifié par les hypothèses de la couche limite équivalente

Il est possible de simplifier les explications sur le rôle des couches limites dans les transferts entre phases. On parlera de modèle de la « couche limite équivalente ». Lors d'un écoulement turbulent en conduite, le fluide sera décomposé en deux parties :

- La couche limite : l'écoulement est purement laminaire, les contraintes uniquement visqueuses, sur une épaisseur bien déterminée δ ,
- Le noyau turbulent : l'écoulement est purement turbulent, avec un profil de vitesse v_x plat.

Compte tenu de la simplification, les couches limites étant généralement de très faible épaisseur, on peut admettre que la contrainte tangentielle dans la couche limite équivalente τ_{cle} est égale à la contrainte tangentielle à la paroi τ_p . Cette contrainte étant considérée comme constante, le profil de vitesse y est linéaire (cas illustré par la *Figure 16*). La contrainte tangentielle prend alors une valeur proche de l'Équation 38.

$$\tau_{cle} = \tau_p = \eta \cdot \frac{\bar{v}}{\delta}$$

Équation 38 : Contrainte tangentielle calculée par l'épaisseur de la couche limite

Dans une conduite cylindrique, on peut donc calculer δ à partir de la valeur de la perte de charge. Cependant, l'épaisseur de la couche limite équivalente ne donne qu'une indication sur l'échelle de dimension des phénomènes de couches. Celle-ci ne doit donc pas être utilisée dans les calculs.

3. Invariants de similitude

Un rappel des différentes notions de similitude est effectué en *Annexe 1 : Similitude*.

a. Théorème de VASCHY-BUCKINGHAM (Théorème π)

Soit un phénomène physique comportant n variables, de dimensions faisant intervenir p grandeurs fondamentales. L'équation $f = (x_1, x_2, \dots, x_n)$ qui régit le phénomène peut se mettre sous la forme $F(\pi_1, \pi_2, \dots, \pi_{n-p}) = 0$. $\pi_1, \pi_2, \dots, \pi_{n-p}$ sont les $(n - p)$ produits indépendants sans dimension.

Autrement dit, l'analyse d'un phénomène physique comprenant n variables, dont les dimensions sont définies à partir de p grandeurs fondamentales, permet de définir $(n - p)$ produits sans dimension.

b. Nombres adimensionnels

L'ensemble des nombres sans dimension qu'il est possible de définir est obtenu à partir du théorème de VASCHY-BUCKINGHAM. La modification de certaines écritures des nombres obtenus permet de faire apparaître des grandeurs usuelles pour différents phénomènes scientifiques. Dans cette partie, nous évoquerons les nombres adimensionnels relatifs à l'écoulement d'un fluide et à la perte d'énergie par frottement. D'autres nombres adimensionnels existent, entre autres relatifs à l'élasticité d'un solide ou aux différents transferts. Cependant, ceux-ci n'étant pas utilisés dans ce travail, nous ne développerons pas d'explication à leur sujet.

i. Ecoulement de fluide

Dans le cadre de l'étude de l'écoulement d'un fluide, nous allons décrire quelques nombres adimensionnels qu'il est possible de rencontrer. Nous commençons par le nombre de Newton décrit par l'Équation 39 ci-dessous :

$$Ne = \frac{F}{\rho \cdot v^2 \cdot l^2}$$

Équation 39 : Nombre de Newton

Dans l'Équation 39, F est la force induite par l'accélération du fluide, ρ est la masse volumique, v est la vitesse linéique et l est une longueur. Le nombre de Newton traduit le rapport entre les forces de frottement d'un fluide qui s'écoule et les forces d'inertie appliquées à ce même fluide.

Le nombre de Froude est défini dans l'Équation 40 :

$$Fr = \frac{v^2}{l \cdot g}$$

Équation 40 : Nombre de Froude

L'Équation 40 fait intervenir la vitesse linéique du fluide v , la longueur géométrique considérée et l'accélération de la pesanteur g . Le nombre de Froude correspond au rapport entre les forces d'inerties et la force de pesanteur.

Le nombre de Weber est présenté par l'Équation 41 :

$$We = \frac{\rho \cdot v^2 \cdot l}{\sigma}$$

Équation 41 : Nombre de Weber

L'Équation 41 fait intervenir la tension superficielle σ par rapport aux précédents nombres adimensionnels. Le nombre de Weber est obtenu par le rapport entre les forces d'inerties et les forces de tensions superficielles.

L'Équation 42 introduit le nombre de Deborah :

$$De = \frac{t_c}{t_p}$$

Équation 42 : Nombre de Deborah

Le nombre de Deborah est le rapport du temps de relaxation caractéristique d'un matériau t_c par le temps caractéristique d'une expérience pour l'analyser t_p .

Le nombre de Reynolds est introduit par l'Équation 43 :

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot l}{\eta}$$

Équation 43 : Nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds exprime l'intensité des forces inerties par rapport aux forces de viscosité (frottement), représenté par η dans l'Équation 43.

ii. Perte d'énergie par frottement

Nous allons maintenant aborder les nombres adimensionnels relatifs aux pertes d'énergie par frottement visqueux. Nous commençons par le nombre d'Euler, décrit par l'Équation 44 :

$$Eu = \frac{2 \cdot \Delta p}{\rho \cdot v^2}$$

Équation 44 : Nombre d'Euler

Le nombre d'Euler représente le rapport entre la chute de pression représentée par Δp et l'énergie cinétique.

L'Équation 45 présente le nombre de Rugosité :

$$Rug = \frac{2 \cdot \varepsilon}{d}$$

Équation 45 : Nombre de Rugosité

Le nombre de Rugosité compare la rugosité ε d'une surface au diamètre d'une conduite d .

Le nombre de Fannig est introduit par l'Équation 46 :

$$Fa = \frac{2 \cdot \tau}{\rho \cdot v^2}$$

Équation 46 : Nombre de Fannig

Le nombre de Fannig représente le rapport entre la contrainte tangentielle τ et l'énergie cinétique.

L'Équation 47 représente le nombre de Darcy, et l'Équation 48 décrit le facteur de frottement :

$$Da = 4 \cdot Fa = \frac{8 \cdot \tau}{\rho \cdot v^2}$$

Équation 47 : Nombre de Darcy

$$f/2 = 2 \cdot Fa = \frac{4 \cdot \tau}{\rho \cdot v^2}$$

Équation 48 : Facteur de frottement

Le nombre de Darcy et le facteur de frottement sont des invariants de similitude équivalents au nombre de Fannig.

4. Théorie en conduite

L'écoulement de fluide newtonien a été étudié dans de multiples configurations. Shah et London (Shah and London, 1978) présentent un aperçu de solutions analytiques obtenues en régime laminaire, et de corrélations semi-empiriques pour le régime transitoire et le régime turbulent. Dans le cas d'écoulements en conduite cylindrique horizontale, le facteur de frottement et le nombre de Reynolds sont définis d'après l'Équation 49 et l'Équation 50.

$$Re = \frac{\rho \cdot v \cdot d_h}{\eta}$$

Équation 49 : Nombre de Reynolds pour un écoulement en conduite circulaire horizontale

$$f/2 = \frac{d_h}{4 \cdot \rho \cdot v^2} \cdot \frac{\Delta p}{L}$$

Équation 50 : Facteur de frottement pour un écoulement en conduite circulaire horizontale

En régime laminaire et pour un fluide newtonien, le facteur de frottement suit l'Équation 51.

$$f/2_{lam} = \frac{\xi}{Re}$$

Équation 51 : Expression théorique en régime laminaire du facteur de frottement

A partir de la loi de Poiseuille, il est possible de déterminer le facteur de géométrie ξ pour une conduite cylindrique. Dans nos conditions, le paramètre géométrique ξ est égal à 8. Dans une représentation logarithmique, le régime laminaire se traduit par une droite de pente de -1.

Le régime transitoire et le régime turbulent de la courbe de frottement sont modélisés par des relations semi-empiriques basées sur la forme d'une corrélation de Blasius, soit, respectivement, l'Équation 52 et l'Équation 53 :

$$f/2_{trans} = a \cdot Re^b$$

Équation 52 : Modèle de Blasius pour un écoulement en régime transitoire

$$f/2_{\text{turb}} = c \cdot \text{Re}^d$$

Équation 53 : Modèle de Blasius pour un écoulement en régime turbulent sur la courbe de frottement

La représentation de $f/2$ en fonction du nombre de Reynolds Re_g constitue la courbe de frottement. Deux nombres de Reynolds critiques, Re_{c1} et Re_{c2} , marquent respectivement la sortie du régime laminaire et l'entrée dans le régime turbulent. Le critère de détermination de ces nombres est l'observation d'un écart de 5% par rapport aux modèles précédemment cités (Équation 51 et Équation 53).

Afin de rassembler les différentes expressions du facteur de frottement (dépendantes du régime d'écoulement), Churchill propose une modélisation de cette courbe (Churchill, 1977) valable pour les trois régimes d'écoulement (laminaire, transitoire, turbulent), soit l'Équation 54.

$$f/2_{\text{Churchill}} = \left\{ \left[\left(f/2_{\text{turb}} \right)^n + \left(f/2_{\text{trans}} \right)^n \right]^{1/n} + \left(f/2_{\text{lam}} \right)^m \right\}^{1/m}$$

Équation 54 : Modèle de Churchill

Pour un écoulement en conduite cylindrique, les exposants du modèle de Churchill auront pour valeurs $n = -8$ et $m = 12$.

Dans le cas de fluides non newtoniens, il est nécessaire de généraliser la notion de nombre de Reynolds puisque la viscosité n'est pas constante au sein de l'écoulement. Diverses généralisations sont possibles selon que l'on raisonne sur des écoulements en conduite, ou sur des écoulements de type Couette, par exemple entre cylindres. L'objectif, dans la proposition d'un nombre de Reynolds généralisé, est d'étendre la validité de la courbe de frottement obtenue en régime laminaire et en fluide newtonien, au cas non newtonien. Le nombre de Reynolds généralisé, usuellement employé pour les écoulements en conduite, est issu du concept de Metzner et Reed (Metzner and Reed, 1955). Dans le cas d'un fluide non newtonien modélisé par une loi puissance (cf. Équation 17), ce dernier s'exprime sous l'Équation 55.

$$\text{Re}_g = \xi^{1-n} \cdot \left(\frac{4 \cdot n}{3 \cdot n + 1} \right)^n \cdot \frac{\rho \cdot v^{2-n} \cdot d_h^n}{K}$$

Équation 55 : Expression du nombre de Reynolds généralisé pour un fluide suivant une loi en puissance dans le régime laminaire

Pour l'établissement des courbes de frottement, le nombre de Reynolds sera obtenu après caractérisation rhéologique des fluides afin d'avoir l'indice de consistance K et de structure n . On peut définir une viscosité apparente μ_{app} en égalant le nombre de Reynolds généralisé de l'Équation 55 précédente avec un nombre de Reynolds classique défini par l'Équation 49. La viscosité apparente

est la viscosité équivalente qu'aurait un fluide newtonien conduisant à la même perte de charge sous la même vitesse moyenne, comme défini par l'Équation 56.

$$Re_g = \frac{\rho \cdot v \cdot d_h}{\eta_{app}}$$

Équation 56 : Expression du nombre de Reynolds généralisé pour un fluide suivant une loi en puissance

La notion de nombre de Reynolds généralisé, employé dans le concept de Metzner et Reed (Metzner and Reed, 1955), permet d'illustrer les propriétés de fluides non-newtoniens pour les différents régimes d'écoulement à travers l'allure de leur courbe de frottement. Ainsi, la Figure 17 montre l'allure de courbes de frottement pour des fluides non-newtoniens ayant différents indices de comportement n.

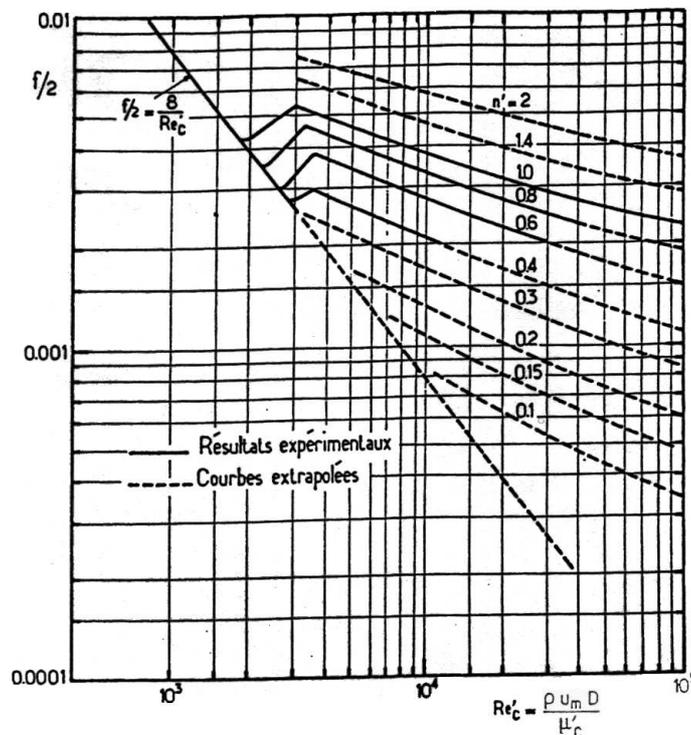


Figure 17 : Diagramme de Dodge et Metzner (Midoux, 1993)

On observe très nettement qu'au-delà du régime laminaire, les courbes de frottement obtenues ne sont plus identiques et dépendent des propriétés du fluide.

Cependant, l'allure des courbes de frottement obtenues en conduite circulaire ne dépend pas seulement des propriétés du fluide, mais également de la rugosité de la surface de l'intérieur de la conduite. Cela est clairement visible sur la Figure 18 où des courbes de frottement sont représentées pour différents rapports rugosité ($\epsilon = l_a$ sur la Figure 18) sur diamètre de conduite ($d = D$ sur la Figure 18).

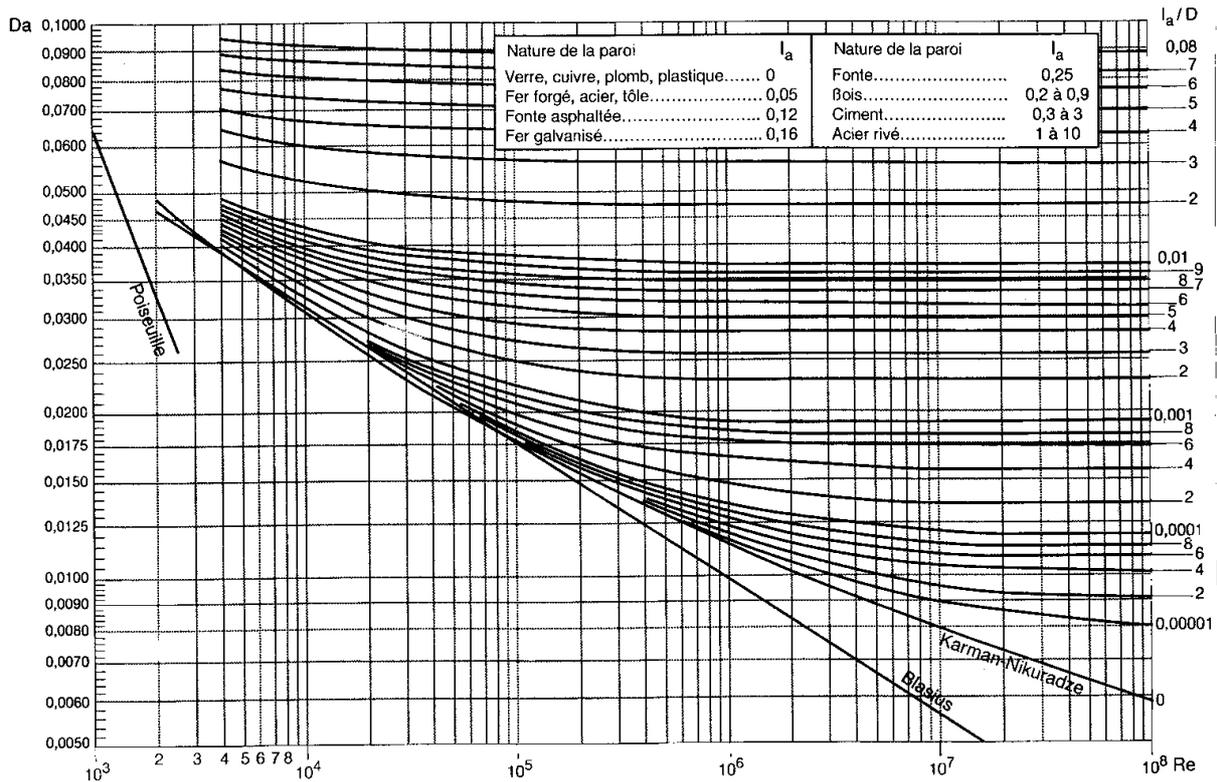


Figure 18 : Diagramme de Moody - nombre de Darcy en fonction du nombre de Reynolds et de la rugosité (Bimbenet *et al.*, 2002)

La rugosité a donc un impact non négligeable sur l'allure de la courbe de frottement obtenue. Cependant, comme pour les propriétés du fluide s'écoulant dans la conduite, seuls les régimes transitoire et turbulent sont impactés par ces deux paramètres.

E. Modèles di-phasiques

1. Suspensions solide-liquide

a. Classification

Les suspensions solide-liquide touchent un grand nombre de secteurs d'activité. L'écoulement d'une suspension est un phénomène complexe, c'est pour cela qu'il n'est pas possible de catégoriser les phénomènes rencontrés simplement par quelques grandeurs. Néanmoins, dans le cas d'écoulements en conduite horizontale, il est possible d'identifier qualitativement quatre familles de suspensions, représentées sur la Figure 19.

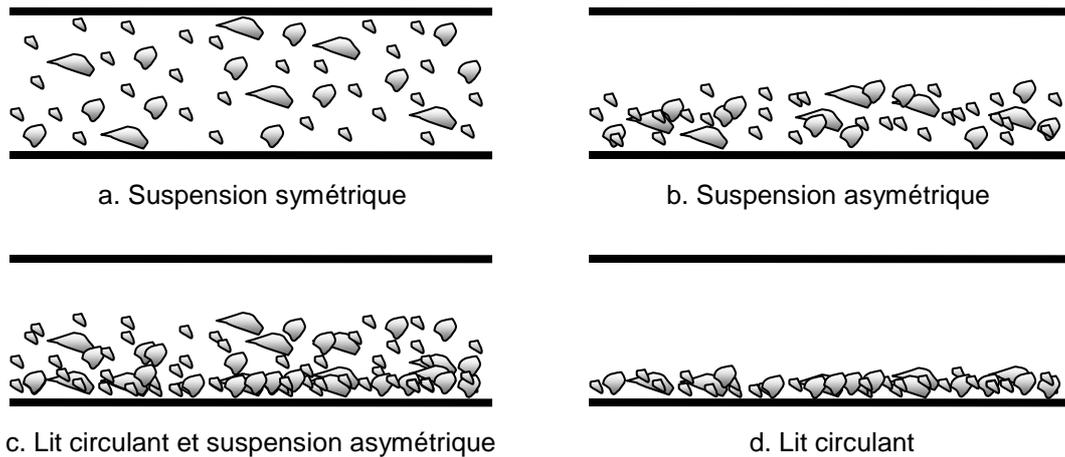


Figure 19 : Les différents régimes d'écoulement de suspensions solide-liquide en conduite horizontale

- Suspension symétrique : Ce régime correspond à une répartition homogène des particules au sein de la suspension. Il peut être obtenu par une turbulence élevée, ou en régime laminaire sous certaines conditions (taille, forme des particules, différentiel de masse volumique...).
- Suspension asymétrique : Le fluide n'est plus homogène et on observe une « stratification » de l'écoulement avec une concentration plus élevée en particules dans la partie inférieure de la conduite (cas de particules dont la masse volumique est plus élevée que celle du fluide porteur). Ce régime s'observe notamment dans le cas de suspensions solides ayant une grande diversité de taille. Ce régime est fortement dépendant de la vitesse limite de chute des particules.
- Lit circulant et suspension asymétrique : Il s'agit d'un régime de transition où l'on a à la fois des particules en suspension au sein de l'écoulement (avec une concentration non homogène), et l'apparition d'un lit de particules dans la partie inférieure de la conduite. Ce lit est en mouvement (« lit circulant »), mais ce mouvement est essentiellement induit par les contacts des particules entre elle au sein du lit. Ces dernières sont simplement entraînées, dans leur partie supérieure, par le fluide situé au-dessus. La vitesse du lit est inférieure à celle de la phase liquide. L'interface est généralement constituée de petites « dunes » de particules.
- Lit circulant : Ce régime est remarqué lorsque les particules ne sont présentes que dans le lit circulant. On observera ce phénomène, par exemple, avec de faibles débits pour lesquels les particules auront toutes sédimenté. La vitesse de déplacement du lit sera de plus en plus faible par rapport à la vitesse du fluide. Si la vitesse de déplacement est trop faible et la pression amont est insuffisante, l'écoulement sera alors bloqué.

b. Viscosité des suspensions

Lorsque la suspension peut être considérée comme homogène au sein de l'écoulement, il est possible d'estimer la viscosité de cette suspension à partir des caractéristiques de ses constituants. Un grand nombre de travaux ont été réalisés sur le sujet, et nous allons présenter les principaux en allant du

comportement le plus simple, pour les suspensions diluées, au plus complexe dans le cas des suspensions concentrées.

i. Suspensions diluées ou semi-diluées

Aux très faibles valeurs de fractions volumiques, la distance moyenne entre particules est grande comparée à leur rayon. Les particules peuvent se déplacer librement à travers le milieu sous l'action des forces browniennes, sans perturbation induite par les particules voisines. On parlera de suspension diluée. En milieu dilué, la suspension reste newtonienne et sa viscosité est donnée par la relation d'Einstein (premier ordre de ϕ) décrite par l'Équation 57 :

$$\eta = \eta_f \cdot (1 + k_1 \cdot \phi)$$

Équation 57 : Relation d'Einstein à l'ordre 1 en ϕ

S'il n'existe aucune force inter-particulaire spécifique, la relation d'Einstein peut s'appliquer jusqu'à des fractions volumiques de quelques pourcents. Toutefois, il existe très souvent, notamment dans les suspensions d'intérêt industriel, des interactions entre particules, y compris pour de très faibles concentrations. Ces interactions peuvent modifier de façon drastique le comportement et rendre la relation d'Einstein totalement inappropriée. Des exemples bien connus sont fournis par les suspensions d'argile (laponite, bentonite,...) pour lesquelles des comportements non newtoniens très marqués (fort seuil d'écoulement, thixotropie) peuvent être observés avec des fractions volumiques inférieures à 0.01. La relation d'Einstein, ainsi que les modèles que nous présenterons ensuite pour les suspensions semi-diluées et concentrées, ne doivent donc être utilisés qu'en toute connaissance de cause.

Dans l'Équation 57, k_1 est un facteur de forme. Dans le cas de particules sphériques, $k_1 = 2.5$ (Einstein, 1906).

Pour des particules ellipsoïdes allongées ou aplaties, k_1 sera supérieur à 2.5. Lorsque les particules ne sont plus sphériques (petits bâtonnets ou petits disques) et de volume V_p (volume de la particule), la perturbation hydrodynamique s'étend sur un volume plus grand que celui associé à une particule sphérique de même volume. La suspension se comporte alors comme une suspension de sphères fictives ayant un volume effectif $V_p' = (k_1/2.5)V_p$ supérieur au volume réel de la particule V_p . Ce volume effectif V_p' est souvent interprété comme étant le volume de la particule, augmenté d'un certain volume de fluide, entraîné avec la particule dans son mouvement de rotation dû à la vorticité de l'écoulement.

Pour les particules non rigides de type gouttelette, l'équation de Taylor permet une évaluation de la viscosité dynamique si le cisaillement subit par la gouttelette est très faible et/ou la tension interfaciale est très grande. Dans ce cas, les gouttelettes auront une forme sphérique. Dans ce cas, un coefficient de forme k_1 a été déterminé (Taylor, 1932). Celui-ci permet l'expression de la viscosité dynamique en prenant en compte l'écoulement visqueux à l'intérieur des gouttelettes (Équation 58).

$$\eta = \eta_F \cdot \left[1 + \left(\frac{1 + 2.5 \cdot \lambda}{1 + \lambda} \right) \cdot \phi \right]$$

Équation 58 : Equation de Taylor

L'équation de Taylor intègre le terme $\lambda = \eta_D/\eta_F$, représentant le rapport de la viscosité dynamique du liquide dispersé η_D par la viscosité dynamique de la phase continue η_F .

Au fur et à mesure de l'augmentation de la fraction volumique d'une suspension, les perturbations de l'écoulement engendrées par la présence d'une particule vont influencer le mouvement des particules voisines. Les interactions hydrodynamiques, ainsi que la probabilité de collision entre particules, deviennent importantes. On parlera alors de suspension semi-diluée. En introduisant un terme du second ordre en ϕ dans l'équation d'Einstein (Équation 57), on peut espérer élargir le domaine de validité de cette relation (Équation 59):

$$\eta = \eta_F \cdot (1 + k_1 \cdot \phi + k_2 \cdot \phi^2)$$

Équation 59 : Relation d'Einstein à l'ordre 2 en ϕ

Les différents travaux publiés sur le sujet conduisent, suivant les phénomènes pris en compte et les hypothèses faites, à des valeurs de k_2 assez différentes. Dans le cas de l'étude de suspensions de particules sphériques, Batchelor et ses collaborateurs ont pu retrouver le facteur de forme $k_1 = 2.5$ (Batchelor, 1977). Avec la prise en compte du cisaillement issu des interactions hydrodynamiques entre deux sphères, Batchelor et Green arrivent à une valeur k_2 égale à 5.2, soit l'Équation 60 (Batchelor and Green, 1972). Un nouveau calcul incluant l'action des effets browniens conduit à 6.2 (Batchelor, 1977) :

$$\eta = \eta_F \cdot (1 + 2.5 \cdot \phi + 6.2 \cdot \phi^2)$$

Équation 60 : Relation de Batchelor

En prenant en compte la totalité des interactions hydrodynamiques d'un nombre arbitraire de particules sphériques présentes dans la suspension, et moyennant quelques hypothèses, Beenakker propose une constante k_2 égale à 4.84 (Beenakker, 1984). Un certain nombre de travaux expérimentaux ont également été menés et ils conduisent à des valeurs de k_2 comprises entre 5 et 15 (Barnes *et al.*, 1989). Donc, si la relation de Batchelor reste l'une des plus connues, il apparaît que ces relations au second ordre ne sont pas d'un grand secours pour décrire le comportement de suspensions semi-diluées.

Dans le cas de particules non sphériques, le facteur de forme k_1 doit être modifié. Contrairement à des particules sphériques, il est nécessaire d'intégrer l'impact de l'orientation des particules dans l'expression de la viscosité dynamique. En effet, les particules engendrent des perturbations hydrodynamiques dépendant de leur orientation. En négligeant les effets browniens, Jeffery a montré que les particules effectuent une rotation périodique quelle que soit leur orientation (Jeffery, 1922). En considérant des suspensions d'ellipsoïdes avec un rapport d'axe nommé s , il est possible de

considérer n'importe quel type de suspension par l'utilisation d'un rapport d'axe équivalent (Goldsmith and Mason, 1967). L'expression du nombre de Péclet permet d'informer de la contribution de la convection par rapport à la diffusion par rotation (Équation 61).

$$Pe_{rot} = \frac{\dot{\gamma}}{D_{rot}}$$

Équation 61 : Nombre de Péclet pour la diffusion par rotation

Ainsi, l'intégration du rapport d'axe s et du nombre de Péclet permet d'exprimer la relation d'Einstein à l'ordre 1 en ϕ (Équation 57) en considérant la superposition des perturbations hydrodynamiques individuelles subit par chaque particule, et présenté dans l'Équation 62.

$$\eta = \eta_F \cdot [1 + k_h(s, Pe_{rot}) \cdot \phi]$$

Équation 62 : Viscosité dynamique de particule de forme quelconque

ii. Suspensions concentrées

Pour des valeurs élevées de fraction volumique, le mouvement de chaque particule est gêné par la présence de ses voisines. Les particules ne peuvent que diffuser lentement dans le milieu. Dans le cas de particules sphériques, monodisperses et rigides, soumises uniquement à des interactions hydrodynamiques, une transition équivalente à une transition vitreuse a lieu lorsque la fraction volumique atteint la valeur $\phi_G \approx 0.58$ (Van Meegen and Underwood, 1994). A ce niveau de concentration, chaque particule est confinée dans une cage transitoire formée par ses plus proches voisins. A ce stade, la relaxation de la structure n'est plus possible (Meeker *et al.*, 1997; Phan *et al.*, 1996). Dans le cas où la fraction volumique de la suspension est supérieure à ϕ_G , seul un mouvement vibratoire reste possible pour chaque particule, jusqu'à atteindre la valeur de l'empilement dense aléatoire pour $\phi_{RCP} = 0.637$ (Segre *et al.*, 1995). La concentration de la suspension peut encore augmenter jusqu'à atteindre la valeur limite de l'arrangement cubique à faces centrées $\phi_{FCC} = 0.74$.

Pour un cisaillement nul, Brady a montré que lorsque la fraction volumique ϕ de la suspension était proche de ϕ_{max} (lui-même voisin de ϕ_{RCP}), il en résulte un comportement suivant l'Équation 63 (Brady, 1993) :

$$\eta_0(\phi) \approx \left(1 - \frac{\phi}{\phi_{max}}\right)^{-2}$$

Équation 63 : Viscosité dynamique à cisaillement nul ($\phi \rightarrow \phi_{max}$)

De plus, si il existe des forces inter-particulaires, Brady a montré que ses résultats ne changent pas si la portée b de ces forces est comparable à la taille a des particules. Si $b \gg a$, la forme de l'Équation 63 est maintenue, mais son exposant sera égal à -1.

Si un faible ajout de particules est effectué à une suspension (n'entraînant qu'une très faible augmentation de la fraction volumique $d\phi$), Arrhénius appliqua la relation d'Einstein sous forme différentielle permettant d'aboutir à la relation suivant l'Équation 64 (Arrhenius, 1917) :

$$\eta = \eta_F \cdot \exp(k_E \cdot \phi)$$

Équation 64 : Loi d'Arrhénius

La modification de la loi d'Arrhénius (Équation 64) effectuée par Brinkman prend en compte l'effet d'encombrement où les particules ajoutées ne disposent que de l'espace $(1-\phi)$ par unité de volume. En considérant l'ajout d'une particule au volume de suspension, Brinkman réutilisa la forme différentielle de la relation d'Einstein pour aboutir à l'Équation 65 (Brinkman, 1952) :

$$\eta = \eta_F \cdot (1 - \phi)^{-k_E}$$

Équation 65 : Relation de Brinkman

Néanmoins, la relation de Brinkman diverge pour $\phi = 1$ au lieu de $\phi = \phi_{\max}$.

Mooney souhaita ne pas recourir à la relation d'Einstein afin d'exprimer la viscosité dynamique d'une suspension à concentration ϕ comme une fonction universelle. Il introduisit un facteur d'encombrement λ_M (λ dans le cas de suspensions monodisperses) dans ses expressions pour obtenir l'Équation 66 (Mooney, 1951) :

$$\eta = \eta_F \cdot \exp\left(\frac{k_E \cdot \phi}{1 - \lambda \cdot \phi}\right)$$

Équation 66 : Equation de Mooney (solution monodisperse)

Cependant, cette relation repose sur le facteur de forme k_E , qui est fixé dans la limite d'utilisation de la relation d'Einstein ($\phi \ll 1$).

Krieger et Dougherty reprirent le calcul développé par Brinkman pour le réajuster et finaliser la relation afin d'aboutir à l'Équation 67 (Krieger, 1972).

$$\eta = \eta_F \cdot (1 - \lambda \cdot \phi)^{\frac{-k_E}{\lambda}}$$

Équation 67 : Equation de Krieger

Comme pour l'équation de Mooney (Équation 66), la constante k_E est fixée par la limite à $\phi \ll 1$. L'équation de Krieger (Équation 67) est plus souvent écrite sous la forme de l'Équation 68.

$$\eta = \eta_F \cdot \left(1 - \frac{\phi}{\phi_{\max}}\right)^{-q} \quad \text{où } q = [\eta] \cdot \phi_{\max}$$

Équation 68 : Equation de Krieger (forme générale)

Ball et Richmond (Ball and Richmond, 1980) ont directement écrit la loi d'Einstein (Équation 57) sous la forme différentielle en ajoutant, par rapport au modèle d'Arrhénius (Équation 64), un terme contenant un facteur d'encombrement λ_e , précédemment introduit par Mooney (Équation 66). Leur modèle est présenté par l'Équation 69.

$$\eta = \eta_F \cdot \left[1 + k_E \cdot \phi + \frac{1}{2} k_E \cdot (k_E + \lambda_e) \cdot \phi^2 \right]$$

Équation 69 : Expression de la viscosité dynamique par Ball et Richmond

Tout comme Batchelor et Green, Ball et Richmond n'ont pas fait intervenir les effets browniens dans leurs études. L'identification du terme à l'ordre 2 en ϕ au terme obtenu par Batchelor et Green ($k_2 = 5.2$) leur a permis de déterminer le facteur d'encombrement λ_e très voisin de 5/3, et donc une viscosité divergente pour $\phi_{\max} = 1/\lambda_e = 0.6$.

Bedeaux, en utilisant la théorie des milieux effectifs, a pu aboutir à l'expression de l'Équation 70 sous condition que la suspension soit constituée de particules sphériques solides dans un matériau de viscosité $\eta \rightarrow \infty$ (Bedeaux, 1983).

$$\eta = \frac{\eta_F}{1 - \frac{5}{2}\phi} \cong \eta_F \cdot \left(1 + \frac{5}{2} \cdot \phi + \left(\frac{5}{2}\right)^2 \cdot \phi^2 + \dots \right)$$

Équation 70 : Expression de la viscosité dynamique par Bedeaux

La première forme de l'expression de Bedeaux est alors bien vérifiée pour une gamme de fractions volumiques ϕ contenue dans l'intervalle $0 < \phi < 0.3$, domaine plus large que celui de Batchelor, pour lequel le coefficient à l'ordre 2 en ϕ est proche de celui de Bedeaux (Équation 70).

2. Suspensions liquide-gaz

L'étude d'une suspension liquide-gaz, à une échelle macroscopique, ne relève pas de simples modèles généraux. Afin d'obtenir des informations sur ces écoulements, il est généralement nécessaire d'opter pour une approche par modélisation. Malgré tout, les modèles obtenus sont généralement très sensibles, et difficilement généralisables à différents types d'écoulements. Des nombres adimensionnels spécifiques sont utilisés pour analyser ces écoulements.

En conduite horizontale, les suspensions liquide-gaz relèvent de quatre groupes différents, illustrés par la Figure 20.

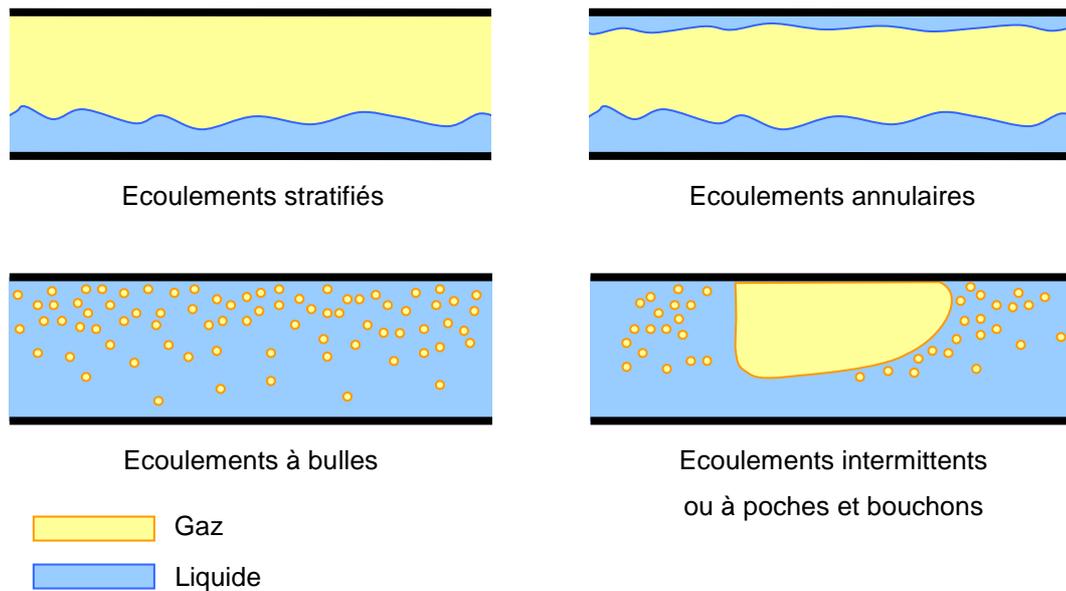


Figure 20 : Les différents régimes d'écoulement de suspension liquide-gaz en conduite horizontale

- Ecoulements stratifiés : A faible flux de gaz, l'interface se présente sous la forme d'une surface continue séparant les deux phases. Sa morphologie est alors contrôlée par les forces d'inertie, de gravité et la tension superficielle. Les forces d'inertie vont déformer la surface liquide en créant des vagues. Les forces de gravité et de tension superficielle vont agir de manière à maintenir l'interface plane. Cet écoulement est dit « à phases séparées ».
- Ecoulements annulaires : Lorsque le flux de gaz augmente, il existe un régime pour lequel les forces d'inertie sont largement prépondérantes vis-à-vis de la gravité. Tout en restant continue, l'interface se courbe progressivement ; le liquide mouille complètement la paroi, comme si la force de gravité devenait négligeable. La phase liquide forme alors un film annulaire autour du noyau de gaz. Cet écoulement fait également partie des écoulements à phases séparées.
- Ecoulements à bulles : A fort débit de liquide, le gaz est dispersé sous la forme de bulles. Sous l'action de la gravité, ces bulles se stratifient partiellement au sommet de la conduite. Avec l'augmentation des forces d'inertie, cette stratification diminue. Cet écoulement appartient aux écoulements dispersés.
- Ecoulements intermittents (ou à poches et bouchons) : La morphologie de l'interface pour des flux de liquide et de gaz intermittents est plus complexe. L'écoulement est constitué d'une séquence de poches de gaz semblant flotter sur un film de liquide. Ces poches sont séparées par des bouchons de liquide contenant de petites bulles. Cet écoulement est une configuration mixte faite d'une succession d'écoulements à bulles et d'écoulements stratifiés.

II. LES MESURES PHYSIQUES DANS LES CULTURES

Les microorganismes sont utilisés au niveau industriel dans de multiples productions de molécules d'intérêt, comme le *Tableau 1* l'illustre ci-dessous :

Catégories chimiques	Catégories fonctionnelles
Alcaloïdes	Antibiotiques
Acides aminés	Arômes
Carbohydrates	Médicaments (hors antibiotiques)
Esters	Enzymes
Lipides	Flaveurs
Acides nucléiques	Exhausteurs de goût
Acides organiques et alcools	Hormones
Peptides	Pesticides
Protéines	Pigments et colorants
	Surfactants
	Vitamines
	Polymères

Tableau 1 : Substances synthétisées par les microorganismes

Parmi les productions ou transformations de matrices faisant intervenir des cellules (et plus particulièrement des microorganismes), certaines propriétés physiques peuvent se modifier. Ces changements peuvent avoir un impact considérable au niveau des performances du bioprocédé ou de la qualité de la production souhaitée.

Dans cette partie, nous développerons les études dans lesquelles les propriétés physiques ont été investiguées. Dans un premier temps, nous nous attarderons sur les productions de métabolites. Nous poursuivrons ensuite sur les études à transformation spécifique de matrice. Enfin, nous terminerons sur des travaux ayant une démarche se rapprochant de notre étude.

A. Production de métabolites

De manière générale, les études sur les propriétés physiques sont principalement axées sur la rhéologie. Le comportement rhéologique d'une suspension/solution de micro-organismes et des produits qu'ils excrètent, dépend de la concentration, de la taille, de la forme et de la déformabilité des micro-organismes. Quant aux polymères excrétés, ils peuvent également être responsables de modifications importantes de la rhéologie, celles-ci dépendant de multiples facteurs tels que la concentration, la masse molaire, la polydispersité, le degré de ramification...etc.

1. Polysaccharide exo-cellulaire

Les productions de polysaccharides exo-cellulaires, appelées souvent EPS (exopolysaccharide), sont étudiées au niveau rhéologique car le pouvoir visco-gène de ces molécules est important, même pour de faibles concentrations. C'est donc une propriété qui va intervenir de façon forte sur les conditions

hydrodynamiques de la culture. Ces molécules trouvent des applications dans le secteur industriel (Survase *et al.*, 2007; Yun and Park, 2003), où leurs propriétés physiques, et donc les propriétés rhéologiques qui en découlent, peuvent être modulées en jouant sur le temps et les conditions de culture (Bueno and Garcia-Cruz, 2001) ou en modifiant la salinité du milieu de culture (Aranda-Selverio *et al.*, 2010; Bueno and Garcia-Cruz, 2001). Ainsi Shene et ses collaborateurs ont pu se rendre compte que la vitesse de croissance de *Streptococcus thermophilus*, et plus généralement les conditions de cultures, peuvent introduire des modifications sur le type de polysaccharide exocellulaire produit. Si la bactérie a un taux de croissance élevé, elle produit des exopolysaccharides de haut poids moléculaire (Shene *et al.*, 2008). Cette famille de molécule est également utilisée pour moduler la texture de certains aliments lactés (Folkenberg *et al.*, 2006). Elles sont également parfois thermodépendantes (Cruz *et al.*, 2011), voir thermosensibles, ce qui nécessite de trouver des solutions alternatives à la stérilisation par haute température lorsque celle-ci est nécessaire (Rederstorff *et al.*, 2011). Le comportement rhéologique observé passe généralement d'un comportement newtonien à un comportement rhéofluidifiant (Aranda-Selverio *et al.*, 2010; Bueno and Garcia-Cruz, 2001) avec parfois un caractère viscoélastique (Folkenberg *et al.*, 2006; Lapasin *et al.*, 1992a). La contribution de la présence physique des cellules n'explique pas les importants changements de viscosité. Seule la présence d'exopolysaccharides permet parfois d'expliquer le comportement rhéologique observé (Leduy *et al.*, 1974).

Certaines de ces molécules, généralement regroupées en fonction du microorganisme producteur, ont été plus largement caractérisées. Le xanthane produit par la bactérie *Xanthomonas campestris* reste le plus rencontré. Il est utilisé comme additif alimentaire sous le code E415. Comme pour les précédents exopolysaccharides, le xanthane confère un comportement rhéofluidifiant en solution, et même un caractère viscoélastique pour des concentrations élevées (à partir 10 g l^{-1} , voire parfois pour des concentrations moindres). Il présente en outre une thermodépendance pouvant aboutir à diverses dénaturations / renaturations du biopolymère (Capron *et al.*, 1998). Pour les souches testées dans l'étude de Borges, ce biopolymère est un polyoside constitué de glucose, rhamnose, mannose et acide glucuronique (Borges and Vendruscolo, 2007). Borges note également l'absence de rhamnose dans le xanthane commercial. En fonction des conditions opératoires de production, la composition de ce biopolymère peut varier (Casas *et al.*, 2000), et créer des complexes intermoléculaires du type xanthane-protéine (Noik *et al.*, 1992).

La production de ce polymère peut être effectuée en utilisant des sources de carbone alternatives. L'une d'elles est présentée dans l'étude de Druzian avec l'utilisation de résidus de jus de pomme (Druzian and Pagliarini, 2007). L'équipe de Nery propose une solution utilisant le lactosérum de la mozzarella comme source de carbone de la culture (Nery *et al.*, 2008). Enfin, Zhang s'est intéressé aux possibilités de production utilisant un substrat mixte contenant à la fois des C6 (glucose) et C5 (xylose) issus de l'hydrolyse de la lignocellulose (Zhang and Chen, 2010).

Dans un cadre de production de xanthane, différentes équipes ont travaillé sur les problèmes liés aux transferts de matière dans le milieu de culture (Borges *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 1994), pour le transfert de dioxygène, et Amanullah *et al.* (Amanullah *et al.*, 1998) pour le transfert de chaleur avec une étude basée sur le suivi de la régulation de la température du bioréacteur. Ces perturbations sont des

conséquences directes de l'augmentation de la concentration en xanthane dans le bioréacteur, qui impacte directement la viscosité dynamique du moût.

D'autres exopolysaccharides portant des dénominations spécifiques ont également été étudiés. Leurs propriétés sont proches de celles du xanthane. Nous pouvons noter le cas de la production de dextrane par *Leuconostoc mesenteroides* (Landon *et al.*, 1993; Veljkovic *et al.*, 1988), d'alginate par *Azotobacter vinelandii* (Pena *et al.*, 2007), de lactane par *Rahnella aquatilis* (Pintado *et al.*, 1998), de pullulane par *Aureobasidium pullulans* (Roukas, 1999) et de biopolymère tel que le PGA (poly[acide glutamique]) produit *Bacillus subtilis* (Richard and Margaritis, 2003).

Il faut également signaler que le changement de rhéologie du moût peut aussi être un indicateur du stress cellulaire. Ainsi, dans le cadre d'une culture de cellules végétales, Rodriguez-Monroy et Galindo ont remarqué qu'une libération de molécules viscogènes exocellulaires était effectuée lors d'une culture de *Beta vulgaris*. Dans leurs cas, le changement de rhéologie du moût était produit par une accumulation extracellulaire d'arabinogalactoprotéines et de polysaccharides, conséquence d'un stress d'origine hydrodynamique créé lors de la culture en réacteur (Rodriguez-Monroy and Galindo 1999).

2. Enzymes et protéines

Les études rencontrées dans le cadre de productions d'enzymes sont effectuées généralement sur des champignons filamenteux. Nous reviendrons sur les aspects de polymorphisme dans les prochains paragraphes.

Dans ce cadre, la croissance et la production d'enzymes sont confrontées à de fortes modifications des transferts pendant les différents stades de cultures. Ces variations sont accentuées si le substrat utilisé est solide pendant la culture (Marten *et al.*, 1996; Marten *et al.*, 1995; Vaz Rossell *et al.*, 1976). Les modifications de viscosité et de morphologie peuvent être induites par de multiples facteurs. La méthode d'apport en substrat peut en être une cause comme le montre l'étude de Bhargava sur une production d'enzyme recombinante (Bhargava *et al.*, 2005).

L'environnement chimique tel que le type de milieu utilisé (Gogus *et al.*, 2006), le type de substrat (Wang and Webb, 1995) ou la présence de certaines espèces chimiques (Huang *et al.*, 2011; Yun *et al.*, 2009) peut également avoir un impact sur la viscosité de moûts impliquant des enzymes. Néanmoins, les contributions physico-chimiques et physiques sont également importantes, comme le témoigne l'étude de l'équipe d'Oncul sur l'effet du pH, de la vitesse d'agitation et de la concentration en dioxygène dissous sur une production de polygalacturonase par *Aspergillus sojae*. (Oncul *et al.*, 2007).

Ces productions sont spécifiques et par conséquent, des modèles ont pu être proposés pour relier biomasse et propriétés rhéologiques (Queiroz *et al.*, 1997).

Dans le cas d'une production intracellulaire, le suivi de la viscosité peut également permettre un suivi direct de la production d'enzyme. Ainsi Ghildyal et ses collaborateurs ont pu mettre en oeuvre cette approche avec une production intracellulaire de glucose isomérase par *Streptomyces fradiae* (Ghildyal *et al.*, 1987).

3. Molécules d'intérêt

Les modifications des propriétés rhéologiques de milieux de culture ont été abordées pour de multiples cultures en environnements contrôlés. Généralement, comme cela a été signalé dans le paragraphe II.A.2 *Enzymes et protéines*, le changement des propriétés rhéologiques est généralement attribué à des modifications morphologiques extrêmes que nous aborderons plus tard.

La majorité des études qui traitent des productions spécifiques de métabolites avec modification des propriétés rhéologiques, est effectuée avec des champignons filamenteux. Il s'agit souvent de production de substances médicamenteuses. Les molécules antibiotiques produites par voie biotechnologique sont un excellent exemple de procédés où la production est impactée par des modifications rhéologiques du moût (Gavrilescu and Roman, 1994; Gavrilescu and Tudose, 1998; Gehrig *et al.*, 1998; Karsheva *et al.*, 1997). Nous pouvons citer les travaux de Gomes et de Lim sur la production de cephalosporine C (antibiotique) par *Cephalosporium acremonium* (Gomes *et al.*, 1997; Lim *et al.*, 2002), ainsi que le travail de Mishra sur le même type de production, en utilisant également *C. acremonium*¹ (Mishra *et al.*, 2005). La production de pneumocandin B0 (antifongique) est également un sujet traité par l'équipe de Pollard avec la culture de *Glarea lozoyensis* (Pollard *et al.*, 2002). Des études sur la production de lovastatine (médicament contre l'hypercholestérolémie) sont également touchées par des modifications morphologiques du microorganisme producteur. Citons également les travaux de Gupta et de Lopez sur la souche *Aspergillus niger* (Casas Lopez *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007), et le travail de l'équipe de Porcel avec la souche *Aspergillus terreus* (Porcel *et al.*, 2006). Enfin, nous pouvons noter le cas des productions d'acide gibberillique (phytohormone) par *Gibberella fujikuroi* (Chavez-Parga *et al.*, 2007), de pigments rouges par *Paecilomyces sinclairii* (Cho *et al.*, 2002) et de pénicilline par *Penicillium chrysogenum* (Jüsten *et al.*, 1998) où les changements hydrodynamiques et rhéologiques impactent les différentes productions.

Les bactéries, comme les champignons précédemment présentés, sont des microorganismes pour lesquels d'importantes modifications morphologiques peuvent être observées. Les études effectuées sur *Streptomyces* en sont une bonne représentation. Nous pouvons citer les travaux de l'équipe de Gouveia dans le cadre d'une production d'acide clavulanique (inhibiteur enzymatique administré avec certaines pénicillines pour étendre leur spectre d'action) par *Streptomyces clavuligerus* (Gouveia *et al.*, 2000) et de Vlaev et ses collaborateurs sur la production de tylosine (antifongique) par *Streptomyces fradiae* (Vlaev *et al.*, 1995).

Les microorganismes ne sont pas les seuls types de cellules rencontrées en culture pour lesquels les modifications des propriétés physiques du moût ont été étudiées. Dans le cadre de l'utilisation de cellules végétales, les molécules produites sont des métabolites secondaires. Lors de l'étude sur une production d'alcanoïde tropanique, Ballica et Ryu ont étudié des cultures de cellules de *Datura stramonium* avec, pour objectif, l'amélioration des performances du bioprocédé (Ballica and Ryu, 1993; Ballica and Ryu, 1994; Ballica *et al.*, 1992). Dans l'étude de Zhong et Yoshida, un seuil de concentration situé à $5 \text{ g}_{\text{matière sèche}} \text{ l}^{-1}$ a pu être mis en évidence avant une réelle augmentation de la viscosité dynamique du moût dans le cas d'une culture de *Perilla frutescens*. Il est également précisé que les propriétés rhéologiques obtenues ne dépendent pas de la taille des agrégats cellulaires, celle-

¹ Nom usuel dans la publication : *Acremonium chrysogenum*

ci étant comprise entre 74 et 500 μm . Les auteurs montrent en outre que, même si la concentration en matière sèche diminue après l'étape de croissance, la viscosité dynamique du milieu continue à augmenter à cause de l'augmentation du volume cellulaire individuel (Zhong and Yoshida, 1994).

B. Transformation de matrice

1. Industrie Agroalimentaire

On peut répertorier un assez grand nombre d'études relatives à l'utilisation de microorganismes dans la transformation de matrices alimentaires. Celles-ci peuvent être assez variées mais il existe néanmoins trois catégories largement représentées : les matrices à base de lait, celles à base de végétaux (fruits et légumes) et enfin celles à base de levain (pâte à pain ou à gâteaux). Le comportement rhéologique de ces matrices est étudié afin d'améliorer la productivité sur des procédés de production spécifiques (amélioration des transferts par un meilleur contrôle de l'hydrodynamique), ou encore pour analyser les interactions spécifiques d'un microorganisme avec certains constituants. Dans le cas de matrices laitières, l'étude peut par exemple être axée sur des laits particuliers issus de producteurs spécifiques tel que des dromadaires (Attia *et al.*, 2001). Citons également Ayala-Hernandez et ses collaborateurs pour leur étude sur les interactions microorganismes / constituants du lait (Ayala-Hernández *et al.*, 2008). Parmi les travaux portant sur des procédés de production spécifiques, nous citerons les études sur la fabrication de fromages blancs (Castillo *et al.*, 2006), de yaourts (Damin *et al.*, 2008; Haque *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 1996; Hassan *et al.*, 2003; Jumah *et al.*, 2001; Niki and Motoshima, 2006; Penna *et al.*, 2006; Rohm and Kovac, 1995; Sodini *et al.*, 2005), de mozzarella (Dave *et al.*, 2003), de lait fermenté (Guizani *et al.*, 2001; Kristo *et al.*, 2003; Meriem *et al.*, 2010; Ozdemir and Kilic, 2004; Torre *et al.*, 2003), de teleme (Pappa *et al.*, 2007) ou de cheddar (Tunick *et al.*, 2003).

Les suspensions de fruits sont également étudiées pour leurs propriétés rhéologiques, comme le montre l'étude de Den Ouden sur des concentrés de tomates (Den Ouden and Van Vliet, 2002), ou sur le développement d'un système de détermination en ligne du comportement rhéologique d'une suspension de débris de tomates par vélocimétrie ultrasonore à effet doppler (Dogan *et al.*, 2002). La viande elle-même a fait l'objet d'études de propriétés rhéologiques (Barbut, 2005).

Enfin, dernière grande famille de matrices alimentaires, on peut répertorier un grand nombre de travaux sur des produits à base de pâte à pain ou à gâteau. L'influence du levain (Angioloni *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2002) ou de la pâte elle-même (Wehrle and Arendt, 1998; White *et al.*, 2008) sont des paramètres souvent étudiés, ainsi que l'impact des conditions de mélange et/ou malaxage (Connelly and McIntier, 2008). Les effets du temps et des conditions d'acidification de la pâte ont également été étudiés (Clarke *et al.*, 2004). Certains travaux proposent même des appareillages spécifiques (rhéofermenteur) pour l'obtention des données pour l'analyse de pâte à pain (Huang *et al.*, 2008; Huiyan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010). Dans le cadre de l'utilisation d'un rhéofermenteur, l'analyse des résultats peut s'effectuer par régression linéaire multiple, afin de mieux appréhender les multiples paramètres, avec la mise en place préalable d'un plan d'expérience (Huang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2008). Afin de pouvoir investiguer les propriétés rhéologiques, de nouveaux instruments sont mis en place comme un outil utilisant des ultrasons développé par Lee et ses collaborateurs (Lee *et*

al., 2004; Mert, 2008; Skaf *et al.*, 2009). L'étude de la rhéologie des pâtes est également utilisée pour la confection de biscuits à la crème (Oliver and Brock, 1997), de nouilles (Yuan *et al.*, 2008) ou pour l'impact de certains constituants spécifiques comme le gluten (Schober *et al.*, 2007).

2. Traitement d'effluents

La rhéologie joue également un rôle dans le traitement des effluents et elle est analysée pour améliorer l'efficacité d'un procédé. L'étude de ces boues peut être abordée de différentes façons. Dans la majorité des cas, l'effluent est étudié dans sa globalité (Barbot *et al.*, 2010; Hasar *et al.*, 2004; Jin *et al.*, 2005; Khongnakorn *et al.*, 2007; Laera *et al.*, 2007; Pevere *et al.*, 2010; Pevere *et al.*, 2007; Pollice *et al.*, 2006; Seyssiecq *et al.*, 2008; Van Kaam *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2007). Cependant, il peut également être étudié sur un usage particulier, en tant que base de culture d'un seul microorganisme (Brar *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2007) ou encore comme une suspension spécifique de particules (Dasari and Berson, 2007).

Dans le cas d'une approche globale, beaucoup d'auteurs travaillent sur l'utilisation des bioréacteurs à membranes et sur les problèmes d'encrassements observés pendant leur utilisation (Khongnakorn *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2007). L'approche rhéologique permet également une description des propriétés physico-chimiques de la boue (Pevere *et al.*, 2007). Dans ce genre de matrices, la rétention solide apparaît comme un paramètre important qui doit être pris en considération (Laera *et al.*, 2007; Pollice *et al.*, 2006).

Certains auteurs se sont intéressés au développement d'outils permettant de caractériser *in-situ* ces milieux spécifiques. Une première solution proposée par Greenwood est la mise en place d'un système utilisant la réflexion d'ultrasons sur une interface solide-liquide, afin de retrouver la viscosité du milieu par une analyse des ondes (Greenwood and Bamberger, 2002). L'équipe de Seyssiecq et Barbot propose l'utilisation d'un bioréacteur doté d'un double ruban pour système d'agitation sur lequel une mesure du couple est effectuée. Ainsi, à partir de la géométrie du système, il est possible d'obtenir la viscosité *in situ* du milieu sous différentes conditions d'agitation (Barbot *et al.*, 2010; Seyssiecq *et al.*, 2008).

C. Cultures axéniques

1. Biomasse

a. Suspensions cellulaires

La rhéologie des suspensions cellulaires est très fortement dépendante du type de cellule. En effet, les tailles caractéristiques et les morphologies d'un microorganisme ovoïde, d'un champignon filamenteux ou d'une cellule animale sont totalement différentes, engendrant des modifications considérables des propriétés rhéologiques.

Dans le cas de suspension de microorganismes, Al-Asheh et ses collaborateurs ont comparé les caractéristiques rhéologiques d'une suspension de *Pseudomonas aeruginosa* et d'une suspension de *Bacillus cereus*. Ils observent un comportement rhéofluidifiant pour la suspension de *Pseudomonas aeruginosa*, et un comportement rhéoépaississant pour la suspension de *Bacillus cereus*. De plus, ils

statuent sur un comportement rhéopectique des suspensions pour un cisaillement constant (Al-Asheh *et al.*, 2002) ce qui est surprenant au regard du reste de la littérature. Pour des suspensions de *Escherichia coli* reconstituées, Toda et ses collaborateurs notent un comportement viscoélastique de l'ensemble des suspensions, quelle que soit la concentration testée, jusqu'à 200 g l^{-1} (Toda *et al.*, 1998).

Ballica et ses collaborateurs se sont intéressés aux cellules végétales de *Datura stramonium*. Leur objectif est d'apporter des éléments de réponse sur les propriétés rhéologiques de ces suspensions afin de pouvoir mieux appréhender les conditions opératoires d'un procédé de production d'alcanoïde tropanique. Ainsi, ils ont pu montrer que les suspensions de cellules ont un caractère élastique, tant que celles-ci peuvent supporter la déformation. Lorsque le point de non retour est atteint, les cellules subissent une déformation plastique irréversible causée par leur propre lyse. De plus, ils observent un caractère rhéofluidifiant de la suspension (Ballica and Ryu, 1993; Ballica *et al.*, 1992). Ce caractère rhéofluidifiant a aussi été remarqué par Curtis sur certaines cultures de cellules végétales de forme allongée (Curtis and Emery, 1993), ainsi que par Trejo-Tapia et ses collaborateurs sur des cultures de *Solanum chrysotrichum* avec des formations d'agrégats (Trejo-Tapia *et al.*, 2001). Pour Wu et Shi, un caractère non newtonien apparaît au-delà d'une concentration de 150 g l^{-1} pour des cultures de *Chlorella pyrenoidosa*, le milieu conservant un caractère newtonien en-dessous de cette valeur avec toutefois une nette augmentation de la viscosité jusqu'à environ 40 mPa s (Wu and Shi, 2008). Enfin, Zhong et ses collaborateurs remarquent que pour une culture de *Perilla frutescens*, la concentration en cellules impacte la viscosité à partir de 5 g l^{-1} , et que celle-ci augmente nettement à partir de 12.8 g l^{-1} , montrant alors les caractéristiques d'un fluide de Bingham (Zhong *et al.*, 1992).

L'équipe de Chen a remarqué, sur des cultures de *Haematococcus lacustris*, que l'activité cellulaire avait un impact sur la viscosité mesurée. Lors de cultures mixotrophiques¹ de cette algue en condition de croissance, le seuil de concentration en biomasse a été identifié à 25 g l^{-1} avant que la viscosité dynamique ne soit impactée. En culture hétérotrophique², le seuil de concentration n'est plus que de 6.5 g l^{-1} . Au-delà de ces seuils respectifs, les suspensions ont un comportement de type fluide de Bingham (Chen *et al.*, 1997).

Mancini et Moresi ont reconstitué des suspensions cellulaires à partir de levures de boulanger commerciales, et ont pu investiguer des plages de concentrations en biomasse allant de 25 à 200 g l^{-1} . Leur étude montre que sur cette plage de concentration, la suspension conserve un caractère newtonien (Mancini and Moresi, 2000). Cependant, dans l'étude de Malinowski, les conclusions sont différentes pour une plage de concentration en *Saccharomyces cerevisiae* allant de 0 à 345 g l^{-1} et obtenue avec un système de recyclage cellulaire utilisant de la microfiltration tangentielle. Dans leur étude, un comportement rhéofluidifiant apparaît à une concentration de 75 g l^{-1} , avec une brusque augmentation de la viscosité dynamique à une concentration de 275 g l^{-1} (Malinowski *et al.*, 1987).

¹ La mixotrophie concerne les organismes autotrophes pour le carbone (capable de synthétiser de la matière organique à partir de matière minérale comme le dioxyde de carbone). En l'absence d'énergie (lumineuse ou chimique), ces organismes vivent comme des hétérotrophes.

² L'hétérotrophie est la nécessité pour un organisme vivant de se nourrir de constituants organiques préexistants.

b. Microrhéologie

Les études en microrhéologie permettent l'obtention d'informations rhéologiques au niveau cellulaire. Cette stratégie est difficilement généralisable pour l'ensemble des cellules cultivables si celles-ci sont en suspension. La littérature rencontrée sur ce sujet traite principalement de cellules animales.

Plusieurs méthodologies sont proposées pour pouvoir réaliser ces mesures. La première méthode consiste à observer des particules greffées sur une cellule, et de soumettre les échantillons à une sollicitation pour mettre en mouvement la particule greffée. La sollicitation peut être un champ magnétique dans le cas de particules magnétiques (Balland *et al.*, 2006; Bausch *et al.*, 1998; Trepap *et al.*, 2007) ou des mouvements induits par l'agitation thermique (Amin *et al.*, 2007). La seconde méthode consiste à suivre le mouvement d'objets intracellulaires (vésicules, organelles) lors d'un cisaillement extracellulaire contrôlé (Dangaria and Butler, 2007; Yamada *et al.*, 2000).

Ces études montrent que différentes parties de la cellule interviennent sur ses propriétés physiques. Trois parties ont pu être identifiées. Trepap et ses collaborateurs ont pu mettre en évidence que le cytosquelette pouvait se fluidiser en fonction de la sollicitation mécanique subie par la cellule, lui donnant ainsi une certaine souplesse (Trepap *et al.*, 2007). L'implication du cytosquelette a pu être confirmée à plusieurs reprises lors de différentes études (Balland *et al.*, 2006; Bausch *et al.*, 1998; Dangaria and Butler, 2007; Yamada *et al.*, 2000). De plus, le cytoplasme (Bausch *et al.*, 1998; Dangaria and Butler, 2007; Yamada *et al.*, 2000) et la membrane (Amin *et al.*, 2007; Bausch *et al.*, 1998; Drochon, 2003) ont également été repérés comme intervenant dans les propriétés physiques cellulaires.

Bausch et ses collaborateurs proposent des mesures locales des propriétés viscoélastiques de cellules adhérentes, et soumettent ainsi l'idée d'un découplage entre la contribution du cytosquelette, la rigidité membranaire et la viscosité cytoplasmique pour expliquer leurs mesures. Nous pouvons voir sur la *Figure 21* un exemple de cellule sur laquelle sont greffées des particules magnétiques (points blancs sur la *Figure 21.a*) accompagnées d'une représentation schématique du complexe cellule-particule, liant ainsi rhéologie et physiologie cellulaire (Bausch *et al.*, 1998).

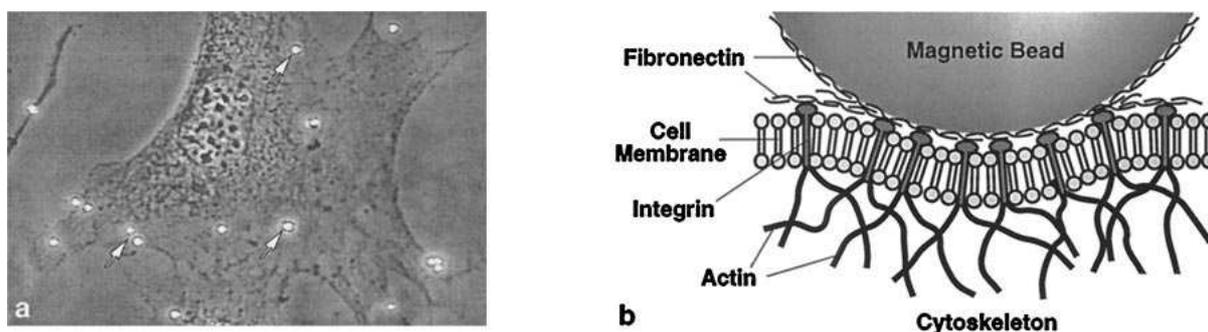


Figure 21 : Fibroblaste d'une souris liée à des particules magnétiques (a) et schéma du complexe particule magnétique - membrane cellulaire - cytosquelette (b) (Bausch *et al.*, 1998)

Les microorganismes sont peu abordés par ce type de méthodologie impliquant un travail au niveau de la cellule. Néanmoins, des approches sur l'étude de biofilm ont été trouvées, comme le montre

l'étude de Rogers sur des biofilms de *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* (Rogers *et al.*, 2008).

c. Modifications morphologiques

Au cours d'une culture, les cellules en suspension peuvent modifier leur forme, s'agréger, engendrant ainsi d'importantes modifications physiques sur le moût et modifiant considérablement ses propriétés. La *Figure 22* montre un exemple de l'étendue des modifications morphologiques pouvant être observées sur la souche *Streptomyces olindensis*.

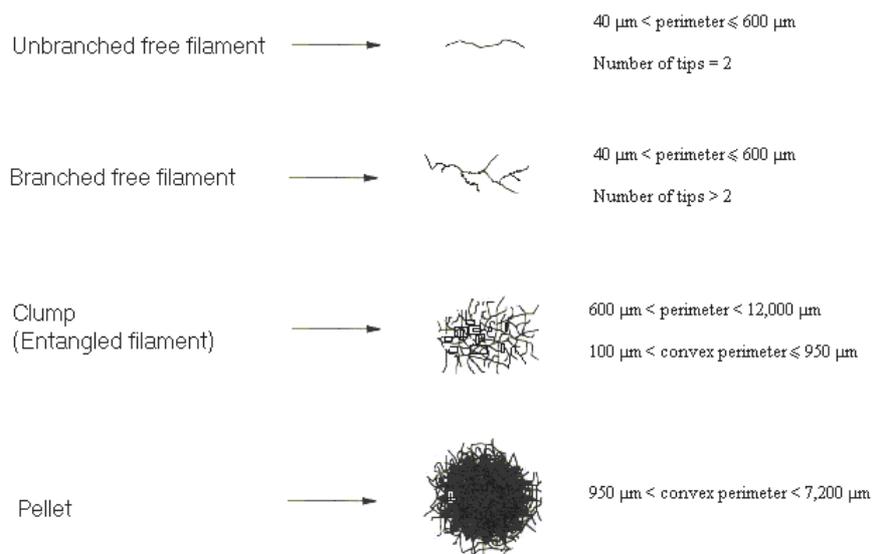


Figure 22 : Classification morphologique de *Streptomyces olindensis* (Pamboukian and Facciotti, 2005)

Les changements morphologiques impliquent alors des investigations spécifiques, dépendant des objectifs de chaque étude. La mise en place de modèles basés sur l'écoulement de suspensions solide-liquide est courante. Néanmoins, des approches statistiques existent, permettant ainsi d'obtenir des outils de prédiction, quelle que soit la suspension considérée. Les travaux de Petersen et ses collaborateurs sur la mise en place de modèles multivariés sont une représentation de ces outils de prédiction (Petersen *et al.*, 2008).

i. Cellules allongées isolées

L'investigation du comportement rhéologique de cellules végétales est importante autant au niveau de la potentialité industrielle qu'elles représentent que des limites de mise en place de procédés, dues à la fragilité des cellules. De plus, les résultats obtenus d'une souche à l'autre sont très disparates, que ce soit au niveau des applications finales envisagées, des outils utilisés pour les analyser ou encore des suspensions utilisées (Kieran *et al.*, 1997).

L'allongement des cellules en cours de culture semble être un paramètre décisif sur le comportement rhéologique final de la suspension. Dans l'étude de Curtis, les cultures de *Nicotiana tabacum* et *Papaver somniferum* ont été particulièrement investiguées. Ces auteurs montrent que le caractère

newtonien ou non newtonien des cultures étudiées peut être attribué à la forme des cellules. Ainsi, sur la *Figure 23*, les suspensions des photos A et C présentent un caractère newtonien, alors que la suspension de la photo B présente un caractère non newtonien. Ces conclusions ont été obtenues en considérant des analyses viscosimétriques à concentrations en biomasses identiques, alors que la même souche de cellule est utilisée pour les cultures B et C (Curtis and Emery, 1993).

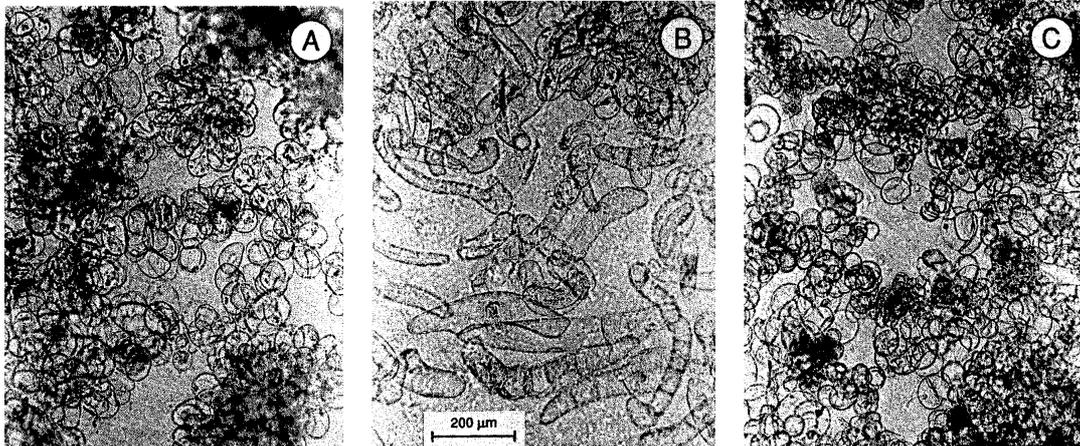


Figure 23 : (A) Culture en batch de *Papaver somniferum*, (B) culture en batch de *Nicotiana tabacum*, (C) culture en semi-continu de *Nicotiana tabacum* (Curtis and Emery, 1993)

L'étude morphologique est un paramètre de plus en plus mis en avant. Dans l'étude de Trejo-Tapia et de ses collaborateurs, le changement de forme des cellules de *Solanum chrysotrichum* *Figure 24* est quantifié par le facteur de forme elliptique (ratio longueur-largeur).

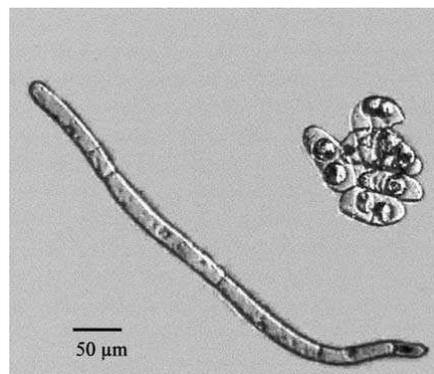


Figure 24 : Microscopie de *Solanum chrysotrichum* (x4) cultivé en bioréacteur montrant différents facteurs de forme elliptique (EFF) pour une aire projetée constante. A gauche, EFF = 5.5 ; à droite, EFF = 1.2 (Trejo-Tapia et al., 2001)

A partir des paramètres géométriques obtenus, Trejo-Tapia et ses collaborateurs montrent que les cellules à faible facteur de forme elliptique restent en amas, alors que les cellules allongées restent isolées. Ils soulignent la nécessité de mieux comprendre la forme des agrégats (majoritaires durant la culture) pour mieux comprendre le comportement rhéofluidifiant de la culture (Trejo-Tapia et al., 2001). Ainsi, Rodriguez-Monroy a pu montrer qu'en fonction de la méthodologie de culture utilisée

(erlen ou bioréacteur), le caractère rhéofluidifiant des cultures était déterminé par la concentration en biomasse et la distribution de taille des agrégats, pour une forme constante de celles-ci (Rodriguez-Monroy *et al.*, 2004).

Or, en fonction des cellules mis en culture, la forme de celle-ci peut naturellement être changeante. Ces modifications ont d'ailleurs été étudiées par Herrero et ses collaborateurs dans le cadre d'un travail sur le dimorphisme des levures *Candida albicans* et *Yarrowia lipolytica* comme modèle d'étude alternatif du bourgeonnement et de formation d'hyphe. Une représentation du changement de morphologique d'*Y. lipolytica* est proposée sur la *Figure 25*.

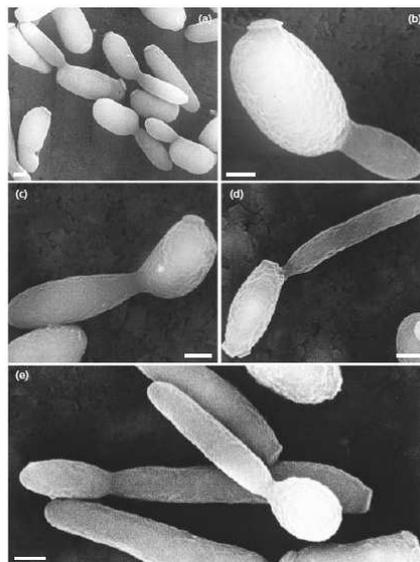


Figure 25 : Microscopie électronique à balayage de *Yarrowia lipolytica* au cours de la transition morphologique de la forme ovoïde à la forme en hyphe, échelle 1 µm (Herrero *et al.*, 1999)

ii. Formation d'hyphes et d'agrégats type clump

Un grand nombre de cellules peuvent être filamentées, voir même former des agrégats entre elles. Dans le cas de certains champignons (entre autres), ces spécificités morphologiques ont une influence sur la biosynthèse de certains métabolites produits (Gupta *et al.*, 2007). La stratégie de culture est également un paramètre conditionnant la morphologie observée, comme cela est représenté sur la *Figure 26* pour une comparaison de culture de *Cephalosporium acremonium*.

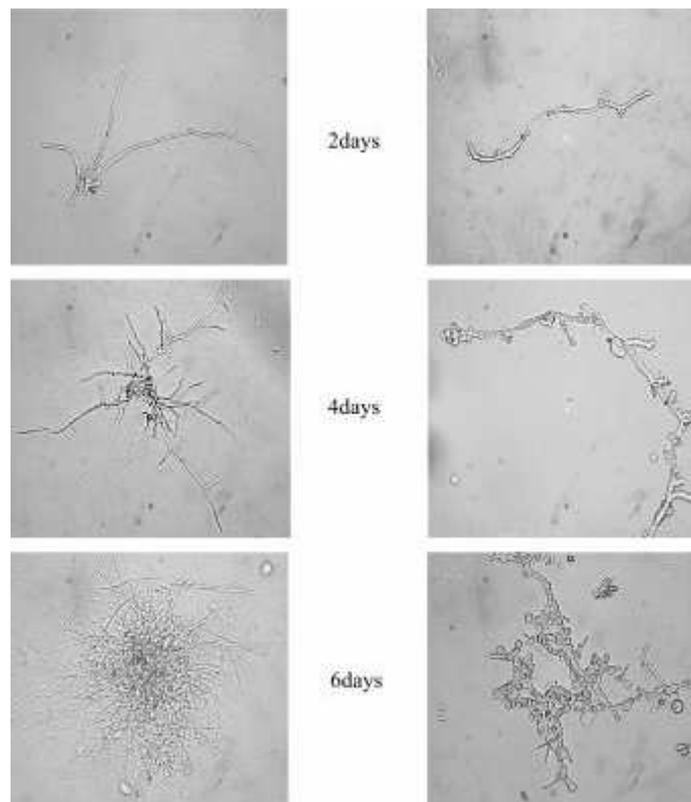


Figure 26 : Changement morphologique entre culture de *Cephalosporium acremonium* en erlen (à gauche) et en bioréacteur (à droite) (Lim *et al.*, 2002)

Dans ces deux cas, ce champignon filamenteux évolue différemment et plus rapidement dans le bioréacteur à cause d'un transfert d'oxygène plus élevé et d'un meilleur mélange par rapport à la culture en erlen (Lim *et al.*, 2002). La morphologie passe progressivement d'un hyphe simple, à une structure branchée, rassemblant plusieurs hyphes ramifiés, avec une épaisseur de plus en plus élevée et la formation d'arthrospores. La formation d'agrégat type clump (voir *Figure 22*) donne également lieu à des études modélisant le comportement rhéologique par des paramètres morphologiques (Riley *et al.*, 2000). Cependant, la génération d'agrégats n'est pas systématique comme en témoigne l'étude de Warren et ses collaborateurs. Dans cette étude, ils montrent sur des cultures d'actinomycètes (*Saccharopolyspora erytraea*, *Actinomadura roseorufa*, *Streptomyces rimosus*) que la longueur moyenne d'hyphe est constante au cours de l'expérimentation, allant de 15 à 25 μm (Warren *et al.*, 1995). De plus, la source de carbone et les conditions hydrodynamiques peuvent également modifier l'évolution morphologique des cellules. L'étude de Cho et de ses collaborateurs montre très nettement l'impact de ces paramètres sur des cultures de *Paecilomyces sinclairii*. La *Figure 27* illustre l'évolution morphologique de *P. sinclairii* en culture batch en bioréacteur sous deux aérations différentes.

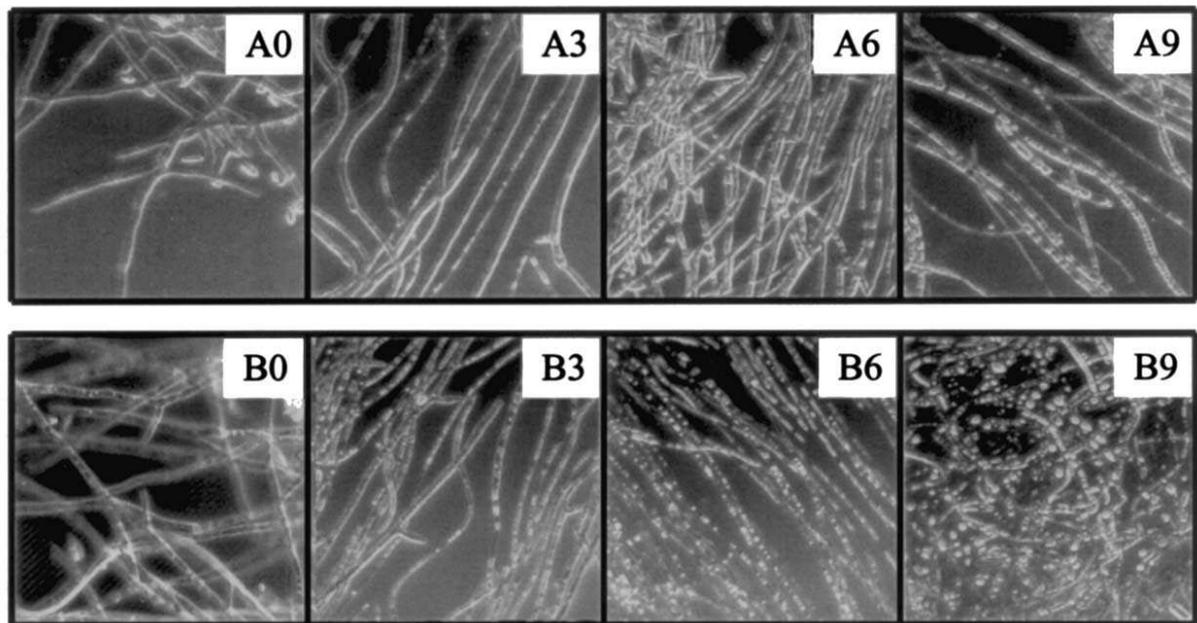


Figure 27 : Evolution morphologique de *P. sinclairii* en culture batch en bioréacteur¹ sous une aération de (A) 1.5 VVM et (B) 3.5 VVM (Cho *et al.*, 2002)

La condition d'aération A montre des hyphes avec une augmentation des branches au cours de la culture. La condition d'aération B montre des cellules avec une augmentation du nombre de vacuoles dans les cellules (Cho *et al.*, 2002). Cet exemple souligne l'impact de la conduite de culture sur certains microorganismes.

iii. Pellets

Les pellets sont un ensemble de cellules agencées en boulettes. Les conditions chimiques et physiques entre l'intérieur et l'extérieur d'un pellet sont totalement différentes. Dans cet environnement atypique, les cellules peuvent produire des métabolites qui seraient difficiles à obtenir par des cellules isolées. Ce phénomène a pu être mis en évidence lors de l'étude de Herran et de ses collaborateurs qui ont utilisé des ultrasons pour détruire la structure en pellet d'*Aspergillus terreus*. La conséquence observée a été une production de lovastatines considérablement réduite par rapport à une culture présentant une morphologie en pellet (Herrán *et al.*, 2008).

En ce qui concerne les interactions entre la forme de ces structures et les propriétés rhéologiques du moût, les conclusions rencontrées restent confuses. La présence de pellets ainsi que leur forme peuvent expliquer les modifications de viscosité du milieu, comme en témoigne l'étude de Sinha et ses collaborateurs sur une production d'exo-biopolymère par *Paecilomyces japonica*. Dans cette étude, la viscosité apparente maximale est observée dès l'obtention de la biomasse maximale au troisième jour de culture. Elle reste stable le quatrième jour, pour brusquement chuter le cinquième jour, et rester ensuite quasiment constante jusqu'au huitième jour, malgré d'importantes modifications morphologiques observées sur la *Figure 28*.

¹ Les nombres associés sur chaque photo correspondent au temps moyen de culture en nombre de jours.

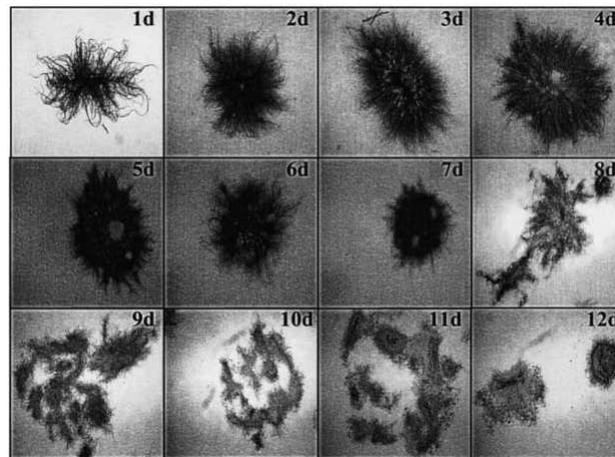


Figure 28 : Changement morphologique de *Paecilomyces japonica* au cours du temps (Sinha *et al.*, 2001)

L'apparition et la croissance de pellets ne permettent pas d'expliquer les multiples changements de viscosité. L'étude de Choi et de ses collaborateurs montre, sur une culture de *Streptomyces fradiae*, que la présence de pellets n'est pas le seul paramètre expliquant la modification de la viscosité du milieu. La forme de ces agrégats spécifiques est importante pour expliquer les changements de propriétés du milieu. La Figure 29 illustre la forme des pellets de deux cultures de *S. fradiae*. Dans cette étude, le changement de morphologie est induit par l'utilisation de différentes sources d'azote pour chaque culture (Choi *et al.*, 2000).

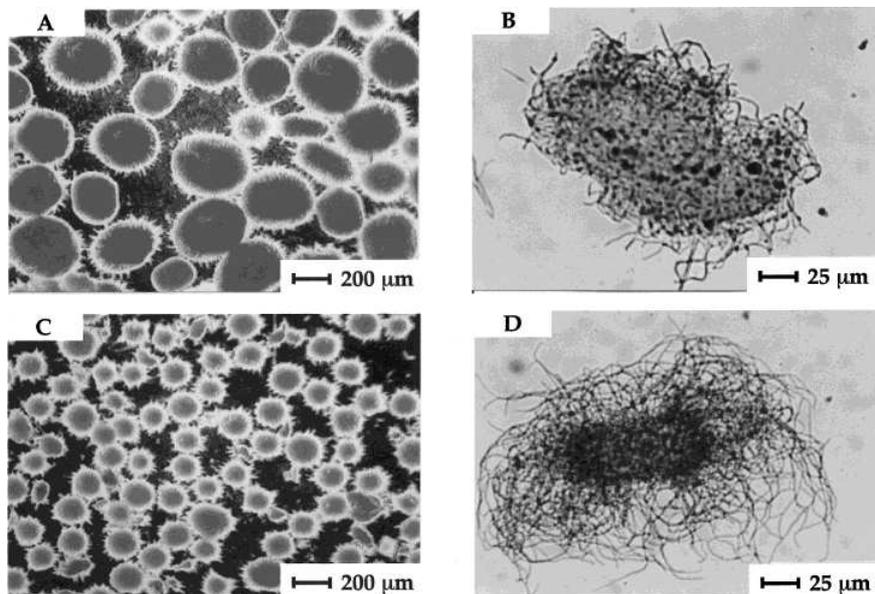


Figure 29 : Modifications morphologiques de *Streptomyces fradiae* induite par des sources d'azotes différents : (A, B) ion ammonium, (C, D) mélange acide glutamique et acide aspartique (Choi *et al.*, 2000)

Dans le cas illustré sur la *Figure 29*, à concentration égale, la forme présentée en (C, D) montre une viscosité plus élevée pouvant être expliquée par la présence de filaments plus denses en comparaison des pellets présentés en (A, B) (Choi *et al.*, 2000).

Pour certaines souches, les changements morphologiques sont également des indicateurs de l'environnement chimique (Ju *et al.*, 1991) ou de la production de métabolites. L'étude de Hwang et ses collaborateurs sur trois souches de basidiomycètes *Phellinus* (*Phellinus baumii*, *Phellinus gilvus*, *Phellinus linteus*) témoigne de cette spécificité. La *Figure 30* illustre les changements morphologiques de ces microorganismes.

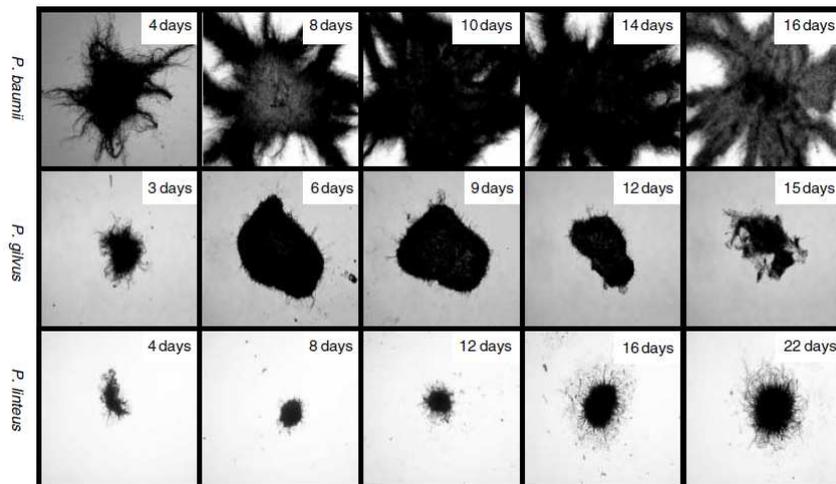


Figure 30 : Modification morphologique de trois basidiomycètes *Phellinus* au cours d'une production d'exopolysaccharide (Hwang *et al.*, 2004)

Au cours de la culture de *P. linteus*, la concentration en biomasse reste proche de celle de *P. gilvus*, avec une plus lente et plus faible productivité d'EPS. Dans le cas de *P. baumii*, malgré une croissance importante et une production rapide sur les six premiers jours, la productivité d'EPS reste seulement légèrement supérieure à *P. linteus* en fin de culture. Enfin, la culture de *P. gilvus* montre une dynamique de croissance proche de *P. linteus*, avec une productivité d'EPS nettement supérieure aux deux autres cultures (Hwang *et al.*, 2004). La morphologie des pellets de chaque culture représentée *Figure 30* permet ainsi de discriminer par une analyse physique l'activité biologique (Gehrig *et al.*, 1998; Hwang *et al.*, 2004).

Cependant, l'activité cellulaire ou la composition du milieu ne sont pas les seuls facteurs jouant sur les modifications morphologiques. Les conditions hydrodynamiques peuvent également perturber la morphologie des pellets (Jüsten *et al.*, 1998) ou les faire disparaître (Pamboukian and Facciotti, 2005). L'étude de Rodriguez Porcel le démontre et est illustrée par la *Figure 31*. On observe très nettement que si les conditions hydrodynamiques sont intenses, cela induira un cisaillement important subi par la cellule et les pellets observés sont alors plus petits et compacts (Rodríguez Porcel *et al.*, 2005). Cela correspond à une réponse adaptative du microorganisme à son milieu.

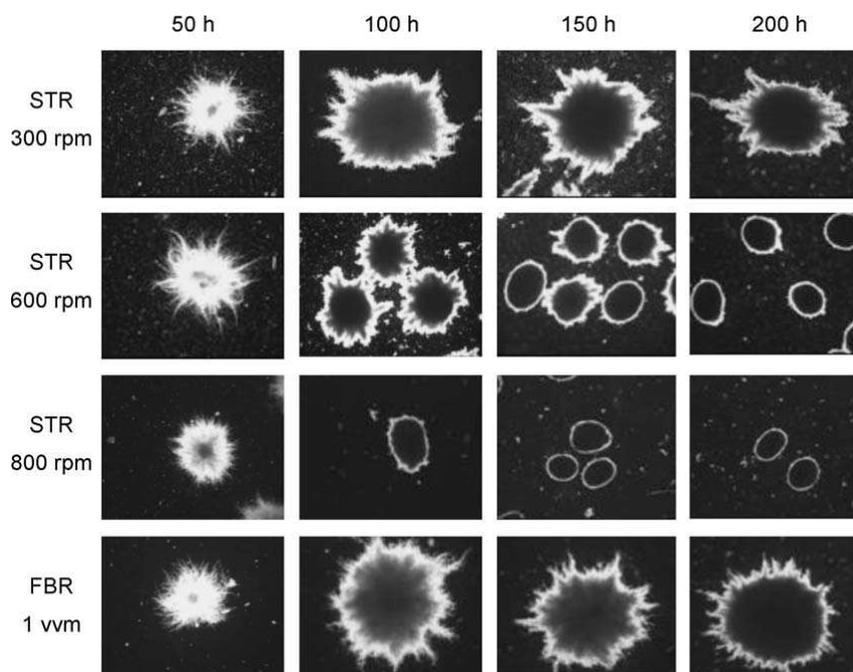


Figure 31 : Changements morphologiques de *Aspergillus terreus* pour différentes conditions hydrodynamiques dans des configurations STR¹ et FBR² (Rodríguez Porcel *et al.*, 2005)

De plus, ces changements de forme ont un impact significatif sur la production de métabolites d'intérêt, ainsi qu'il est possible de le voir dans l'étude de Casas Lopez et ses collaborateurs sur une production de lovastatine par *Aspergillus terreus* (Casas Lopez *et al.*, 2005).

2. Caractérisations *in-situ* et travaux originaux

Le prélèvement d'échantillon peut s'avérer un moyen d'étude non représentatif du phénomène étudié. Cette action peut provoquer une perturbation, voir une dénaturation de la dynamique à observer. La caractérisation de matrice en ligne est une méthodologie permettant d'obtenir des informations représentatives d'un phénomène dynamique. Elle permet de se rapprocher des conditions réelles, engendrant une minimisation de la dénaturation du sujet d'étude, dénaturation qui aurait été provoquée par un prélèvement d'échantillon. Cependant, elle demande une mise en place instrumentale plus spécifique, complexifiant l'approche expérimentale.

a. Matrices chimiques et alimentaires

Dans les études portant sur le comportement rhéologique lors de transformations de matrices alimentaires, on observe parfois l'utilisation de rhéofermenteurs. Ces appareils permettent d'obtenir en ligne des « réponses rhéologiques » spécifiques de l'obtention de la pâte à pain, afin de pouvoir étudier simultanément un spectre des paramètres physicochimiques intervenant sur ce type de matrices (Huang *et al.*, 2008; Huiyan *et al.*, 2010). La mesure des propriétés ultrasoniques est également utilisée dans le cas d'un suivi *in-situ* de l'évolution de la fermentation de pâte. Cependant,

¹ Stirred Tank Fermentation

² Fluidized Bed Fermentation

la méthodologie utilisée par Lee et ses collaborateurs est difficilement adaptable pour des échantillons de grand volume. En effet, l'instrumentation développée consiste à contenir dans un volume défini la pâte à analyser sur laquelle des ultrasons sont envoyés par transducteur piézoélectrique (Lee *et al.*, 2004).

On remarque que l'utilisation d'ultrasons, pour l'analyse de matrice, est une méthodologie utilisée plus spécifiquement pour réaliser de la vélocimétrie ultrasonore à effet Doppler (Antoine and Lebouche, 1998; Bachelet *et al.*, 2003; Ouriev *et al.*, 2000; Wiklund and Stading, 2008). L'approche peut être expérimentale, pour un objectif académique, comme l'étude d'Antoine et ses collaborateurs sur l'écoulement de suspensions non newtoniennes (Antoine and Lebouche, 1998) ou effectuée par modélisation en vue d'une application industrielle comme dans l'étude de Bachelet (Bachelet *et al.*, 2003). Il existe également des exemples d'applications industrielles utilisant cette méthodologie, comme le démontre, entre autre, les nombreuses études de Ouriev (Dogan *et al.*, 2002; Ouriev *et al.*, 2000; Ouriev *et al.*, 2004; Ouriev *et al.*, 2003; Ouriev and Windhab, 2002; Wiklund and Stading, 2008). Le développement de cette méthode a permis à Greenwood de développer un outil pouvant s'adapter à de multiples configurations industrielles (Greenwood and Bamberger, 2002).

Enfin, l'équipe de Salas-Bringas a mis en place une mesure de couple, adaptable sur une ligne de production de nourriture animale. Ce système est développé sur le même principe qu'un rhéomètre, et est adapté pour les matrices visqueuses, malgré une précision à ± 25 Pa s pour des viscosités dynamiques allant de 30 à 450 Pa s (Salas-Bringas *et al.*, 2007).

b. Matrices biologiques

Les matrices biologiques rassemblent les milieux issus du traitement d'effluents et les cultures pures de microorganismes.

Sur des matrices issues du traitement d'effluents, Akroyd et Nguyen ont mis en place un système d'évaluation en ligne de la viscosité par l'installation d'une boucle de recirculation sur la cuve initiale, comme illustré sur la *Figure 32*. L'instrument mesure le couple nécessaire à la rotation d'une géométrie cylindrique, le flux de liquide suivant un écoulement en ruban hélicoïdal autour de la géométrie (Akroyd and Nguyen, 2003).

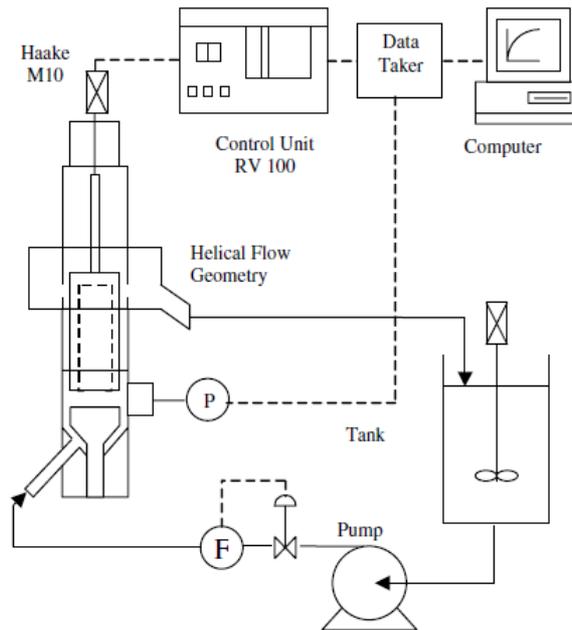


Figure 32 : Schéma expérimental de Akroyd pour son système de rhéométrie continue (Akroyd and Nguyen, 2003)

Seyssiecq et ses collaborateurs ont développé un système n'utilisant pas de boucle de recirculation pour effectuer la mesure mais une mesure de couple directement réalisée sur l'axe de l'arbre d'agitation (agitateur à double ruban hélicoïdal) comme illustré par la *Figure 33*. Les auteurs utilisent le concept de Metzner et Otto (Metzner and Otto, 1957) pour évaluer la viscosité apparente du milieu (Seyssiecq *et al.*, 2008).

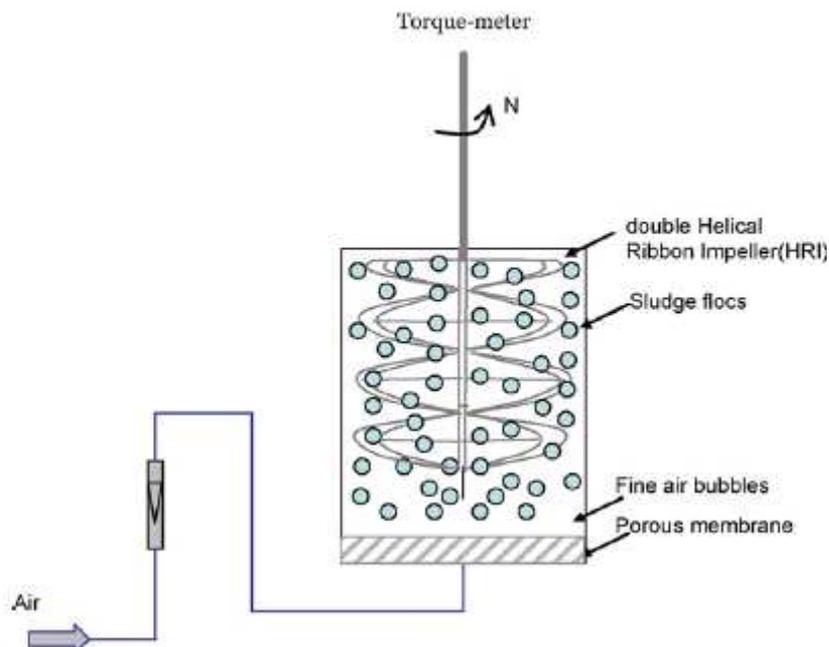


Figure 33 : Schéma expérimental du dispositif de Seyssiecq *et al.* permettant une rhéométrie en ligne (Seyssiecq *et al.*, 2008)

Ce système a permis à Barbot de mettre en évidence l'effet de la respiration sur la rhéologie des boues activées en étudiant de façon détaillée l'impact de l'utilisation d'azide de sodium (Barbot *et al.*, 2010).

La mise en place d'expérimentations mettant en jeu des cultures pures et permettant de caractériser en ligne le comportement rhéologique de moût a nécessité le développement d'installations spécifiques. Sur le même principe que Akroyd et Nguyen (Akroyd and Nguyen, 2003), Kemblowski a couplé à un bioréacteur de 60 l, une boucle de recirculation sur laquelle est disposé un rhéomètre constitué d'une cuve contenant une géométrie hélicoïdale, comme illustré sur la *Figure 34*.

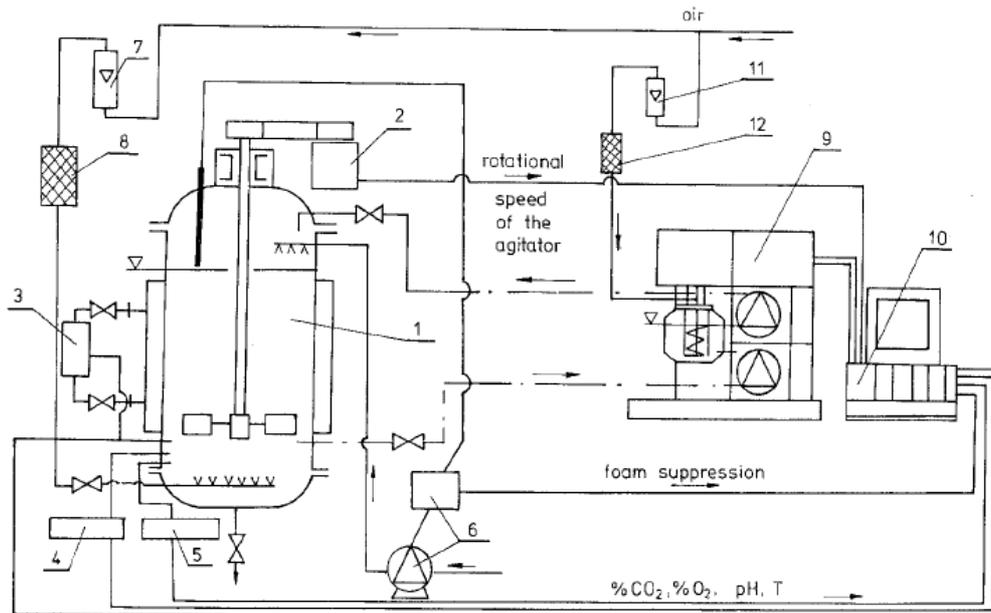


Figure 34 : Schéma du montage expérimental de Kemblowski (Kemblowski *et al.*, 1990)

La validation de cet outil a été effectuée dans un premier temps sur une culture de *Aspergillus niger* où le changement de morphologie a été identifié comme cause des modifications rhéologiques des données obtenues en ligne (Kemblowski *et al.*, 1990). Au cours de la culture, le microorganisme est passé progressivement d'une spore activée, à une structure en hyphe puis en clump (voir *I.A.1.c Modifications morphologique*). Grâce à cet outil, Olsvik a étudié le lien entre dioxygène dissous, concentration en biomasse, taux de croissance, morphologie et propriétés rhéologiques *in-situ* (Olsvik and Kristiansen, 1994; Olsvik *et al.*, 1993; Olsvik and Kristiansen, 1992a; Olsvik and Kristiansen, 1992b). Ce système a également été employé par Ajayi pour une culture de *Aureobasidium pullulans* où, contrairement aux précédentes cultures avec *A. niger*, le comportement rhéologique du moût est modifié par une production de polysaccharides extracellulaires. La présence d'exopolysaccharide conduit à un comportement non newtonien et thixotrope du milieu observé (Ajayi *et al.*, 1991). Cette stratégie d'étude a aussi été développée par Badino (Badino *et al.*, 1997) et investiguée sur une culture de *Aspergillus awamori* afin d'obtenir un modèle liant indice de consistance, concentration en biomasse, vitesse d'agitation et débit d'aération (Badino *et al.*, 1999).

CONCLUSION

L'étude des propriétés physiques des milieux de culture implique une approche interdisciplinaire où il est nécessaire d'identifier les grandeurs à mesurer directement disponibles. La prise en compte des forces en jeu est impérative de manière à pouvoir mieux comprendre les phénomènes observés, et plus spécifiquement les propriétés rhéologiques du milieu biologique. Cela implique d'être éclairé sur les différents phénomènes pouvant se dérouler à une échelle micrométrique (forces en jeu et interactions associées). L'analyse de ces phénomènes permet de mieux comprendre leurs répercussions sur les propriétés physiques de la suspension multiphasique considérée afin de pouvoir prédire son comportement par l'utilisation, voir l'adaptation de modèles adéquats.

Certains paramètres physiques, tels que la viscosité, ont été largement étudiés contrairement à d'autres comme la masse volumique. L'instrumentation et les stratégies d'études restent multiples, parfois accompagnées de conclusions contradictoires. Néanmoins, pour une grande majorité des auteurs, le comportement de suspensions biologiques est de type non newtonien rhéofluidifiant. Lorsque les modifications morphologiques sont faibles, la suspension peut être assimilée à une suspension de sphères, pour laquelle des modèles issus de la mécanique des fluides peuvent être utilisés et adaptés. Néanmoins, la contribution morphologique reste encore un paramètre difficile à intégrer si les modifications rencontrées ne sont pas importantes (transformation d'un hyphes en pellet).

L'observation la plus importante mise en évidence dans ce chapitre est probablement le fait que la caractérisation est généralement effectuée hors ligne, modifiant ainsi la mesure de la contribution de l'activité biologique sur les propriétés physiques des milieux biologiques. Globalement, les milieux biologiques étudiés peuvent être issus de matrices alimentaires ou de filières de traitement d'effluent. Dans ce cadre, l'isolement de la contribution des cellules dans le comportement physique global du milieu reste difficile à appréhender. L'approche par des cultures axéniques sur des milieux minéraux est alors idéale pour étudier le strict comportement physique cellulaire. Cependant, ces informations restent difficiles à obtenir sans le développement d'instruments adaptés. Certains auteurs ont commencé à investiguer par le développement d'outil *in situ*, mais peu d'études sont présentes dans la littérature sur l'évolution dynamique de ces milieux biologiques.

Chapitre II - Matériels et Méthodes

Table des matières du chapitre II

I. MATERIEL : L'OUTIL EXPERIMENTAL	79
A. PRESENTATION GENERALE	79
1. <i>Structure et fonctionnement général</i>	79
2. <i>Armoire électrique</i>	80
3. <i>Chaîne d'acquisition et de commande</i>	81
B. BIOREACTEUR ET ENVIRONNEMENT INSTRUMENTAL	85
1. <i>Bioréacteur</i>	85
2. <i>Pompes</i>	85
3. <i>Balances</i>	87
4. <i>Débitmètres massiques gaz</i>	87
5. <i>Analyseurs gaz</i>	88
6. <i>Sondes : température, pH, pO₂ et pression relative</i>	90
C. BOUCLE DE DERIVATION ET ENVIRONNEMENT	91
1. <i>Description</i>	91
2. <i>Instrumentation</i>	91
D. ALIMENTATION EN FLUIDES UTILITAIRES	94
1. <i>Circuit hydraulique</i>	94
2. <i>Circuit aéraulique</i>	95
3. <i>Circuit vapeur</i>	95
II. FLUIDES DE MAQUETTE FROIDE ET MILIEUX DE CULTURE.....	97
A. MILIEUX SYNTHETIQUES DE CARACTERISATION.....	97
1. <i>Milieux Newtoniens</i>	97
2. <i>Milieux non newtoniens</i>	97
B. CULTURE D'ESCHERICHIA COLI.....	98
1. <i>Généralités sur la bactérie E. coli</i>	98
2. <i>Milieux</i>	98
C. CULTURE D'YARROWIA LIPOLYTICA.....	102
1. <i>Généralités sur la levure Y. lipolytica</i>	102
2. <i>Milieux</i>	103
III. METHODES.....	107
A. CULTURES EN BIOREACTEUR.....	107
1. <i>Stratégie des expérimentations</i>	107
2. <i>Précultures et inocula</i>	108
3. <i>Dispositif de bioréaction</i>	110

B.	TECHNIQUES ANALYTIQUES HORS-LIGNE	116
1.	<i>Concentration en biomasse</i>	116
2.	<i>Analyses physiques</i>	117
3.	<i>Analyses chimiques</i>	127
IV.	TRAITEMENT DES DONNEES EXPERIMENTALES	131
A.	RHEOMETRIE EN LIGNE	131
1.	<i>Principe des séquences</i>	131
2.	<i>Etablissement de la courbe de frottement</i>	133
3.	<i>Détermination de la viscosité apparente en ligne</i>	138
4.	<i>Incertitudes des mesures et calculs.</i>	139
B.	ANALYSE STATISTIQUE DE POPULATIONS CELLULAIRES	144
1.	<i>Distribution de population</i>	144
2.	<i>Détermination du diamètre cellulaire</i>	147
C.	DONNEES MICROBIOLOGIQUES	149
1.	<i>Les calculs en ligne</i>	149
2.	<i>Calculs post-expérimentation</i>	162

I. MATERIEL : L'OUTIL EXPERIMENTAL

A. Présentation générale

Dans le cadre de ces travaux, un outil expérimental a été conçu et spécifiquement développé pour les besoins de l'étude. Il est constitué d'un bioréacteur de 20 l et d'une boucle de dérivation largement instrumentée, sur laquelle est montée une pompe mettant en circulation le moût. Le pilotage de cet outil et l'acquisition des données, aussi bien physiques que biologiques, sont réalisés par un logiciel spécifique développé pour répondre à nos objectifs. Ce logiciel sera présenté dans le *Chapitre III*.

L'outil expérimental peut être représenté par un schéma de principe (voir *Figure 35*). Il en ressort très clairement une première partie liée au bioréacteur (à gauche sur la *Figure 35*) et une seconde partie rattachée à la caractérisation physique symbolisée par la boucle de dérivation (à droite de la *Figure 35*).

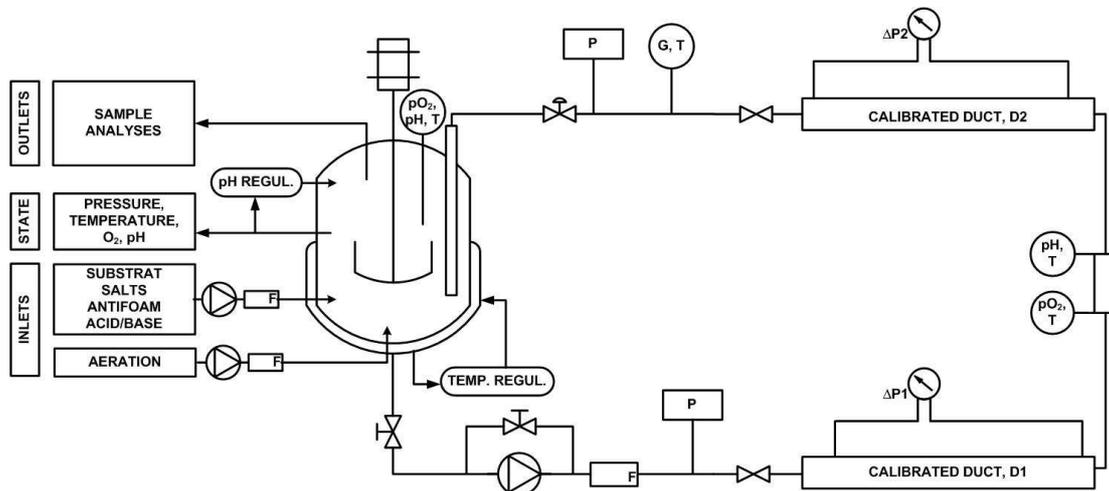


Figure 35 : Schéma de la plateforme de rhéologie en ligne

Or, cet ensemble n'est possible que si l'on intègre les besoins liés au montage d'un nouveau système expérimental : gestion de l'alimentation électrique, besoins liés aux fluides utilitaires (eau, air, vapeur), aux conditions de stérilité de l'installation, au pilotage de l'outil et à son interfaçage. Nous allons détailler ces postes dans la suite de ce paragraphe.

1. Structure et fonctionnement général

Afin de s'approcher au mieux des conditions optimales de culture, un logiciel de pilotage et d'acquisition a été développé spécifiquement pour nos applications. Appelé LoCoPREL, il a été écrit en C# WinForm sous Visual Studio 2008. Il permet, outre l'acquisition des données provenant des capteurs, de rassembler des informations provenant du reste de l'instrumentation utilisée. Ce logiciel est utilisé pour nous permettre de centraliser l'information. Cet outil est décrit au *Chapitre III*. Toutefois, nous préciserons dans la suite de ce chapitre, chaque fois que se sera le cas, le nom des

variables LoCoPREL associées aux grandeurs mesurées. Elles seront indiquées en caractères gras et entre parenthèses.

Le diagramme du procédé et de son instrumentation (PID) est décrit dans la *Figure 36* ; il met en évidence la complexité de l'outil expérimental et la richesse de son instrumentation (capteurs et actionneurs). Le bioréacteur, la boucle de dérivation et leurs environnements respectifs sont détaillés de façon exhaustive dans les paragraphes *I.B Bioréacteur et environnement* et *I.C Boucle de dérivation et environnement*.

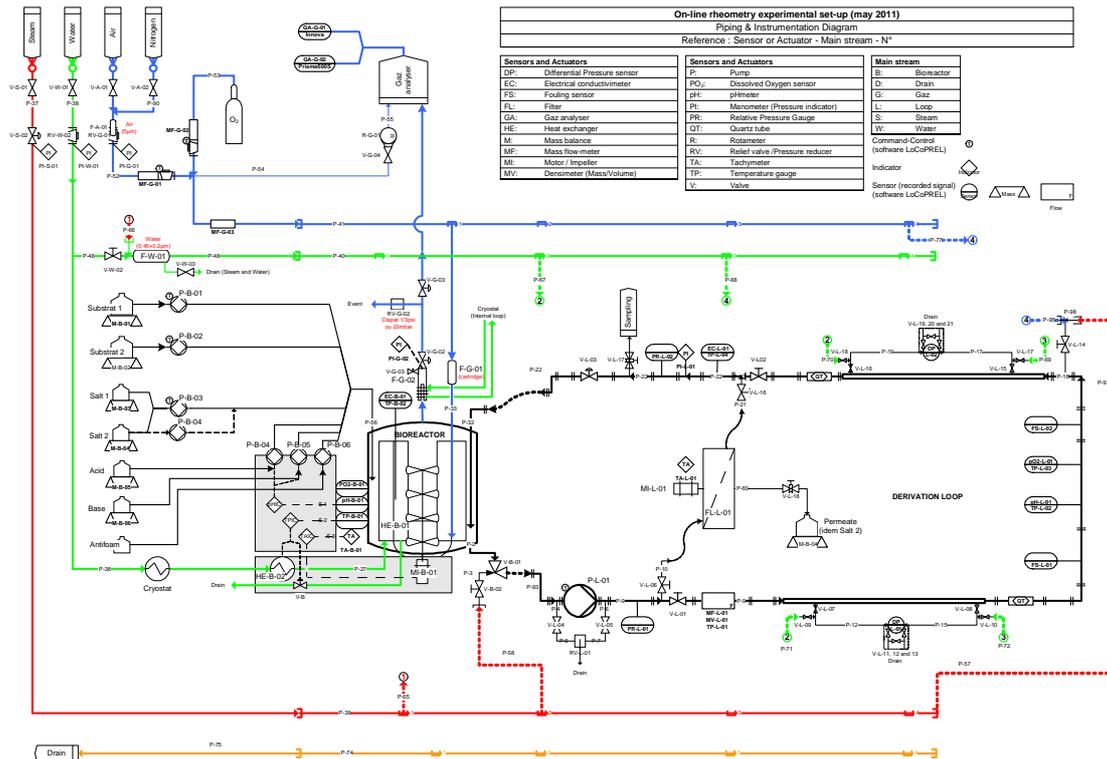


Figure 36 : PID de l'outil expérimental

2. Armoire électrique

La complexité de l'outil expérimental induit une structuration très précise de l'apport de puissance électrique, ainsi que de la gestion électrique des outils de contrôle/commande. L'armoire électrique¹ permet d'une part, l'alimentation et la récupération des signaux des capteurs et d'autre part, l'alimentation électrique et la commande des moteurs (pompes, module de filtration) Elle se compose de 5 étages qui assurent chacun une fonction spécifique (voir *Figure 37*) :

1. Distribution de puissance électrique : cette distribution est effectuée au moyen de deux sectionneurs. Cet étage permet de diviser l'arrivée du courant en deux : une première partie est dirigée vers l'alimentation des prises, le reste va alimenter le deuxième étage.

¹ Conception et réalisation par M. Pascal Debreyne, LGPTA - INRA UR638

2. Alimentation des variateurs de fréquence : cet étage se compose de sectionneurs, contacteurs, protections thermiques et d'interrupteurs. Il permet l'alimentation et la mise sous tension des moteurs et des pompes ainsi que leur commande via les variateurs (étage 3).
3. Implantation des variateurs de fréquence : trois variateurs de fréquence (1.5 kW, 2.2 kW et celui de la pompe de la boucle de dérivation) sont fixés sur une plaque servant de support. Ils permettent de commander la vitesse de rotation du module de filtration ou de contrôler le débit de la pompe de circulation.
4. Bornier de récupération : rassemble les connexions des capteurs pour la récupération des signaux dont l'alimentation est en 220 VAC sur l'armoire électrique.
5. Bornier d'alimentation et de récupération : rassemble les connexions des capteurs pour la récupération des signaux et leur alimentation électrique, plus spécifiquement ceux des instruments alimentés en basse tension et courant continu via un rack 2U.

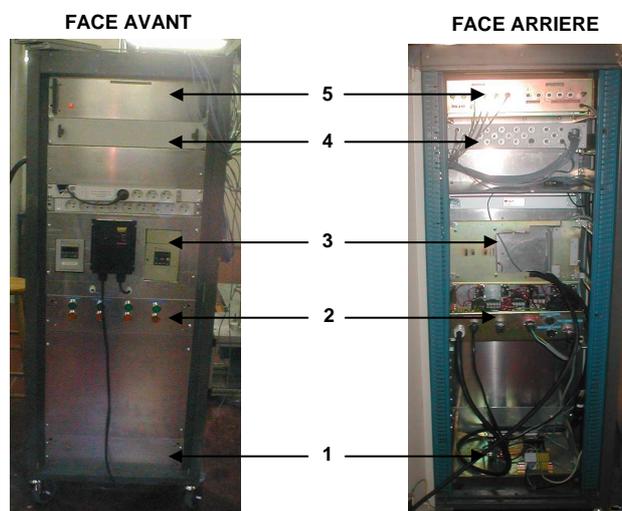


Figure 37 : Armoire électrique et localisation des différents étages

3. Chaîne d'acquisition et de commande

La chaîne de contrôle-commande se structure autour de quatre éléments principaux :

1. Module d'acquisition-commande (capteurs et pompes),
2. Démultiplicateur de ports USB (balances et débitmètres gaz),
3. Connexion au réseau local (analyseurs gaz),
4. Ordinateur portable et logiciel de pilotage.

Le lecteur trouvera, en annexe, le diagramme des connexions et d'interfaçage avec le référencement des voies pour chaque capteur et actionneur (*Annexe 2 : Diagramme de connexion de l'instrumentation*) ainsi que le paramétrage des ports de communication pour chaque instrument présent sur l'outil expérimental (*Annexe 3 : Paramétrage des ports de communication*).

La *Figure 38* schématise les communications entre les différents appareils mis en place. La gestion de l'ensemble de l'outil expérimental ne s'effectue pas uniquement avec le module Agilent®. Il nécessite d'intégrer d'autres instruments interfacés uniquement depuis l'ordinateur. Dans un souci d'homogénéité, les différents instruments communiquant avec l'ordinateur utilisent des liaisons séries. L'ordinateur n'ayant pas suffisamment de port de communication, des convertisseurs USB - RS232 sont utilisés pour palier ce manque. A l'exception du module Agilent®, les autres instruments sont rassemblés et connectés sur un démultiplicateur de port USB. Ainsi, seuls deux câbles USB relient tous les instruments à l'ordinateur : un pour le module Agilent® et l'autre pour le démultiplicateur de port USB.

Les analyseurs gaz sont des instruments collectifs, les données sont obtenues directement par lecture du fichier créé par l'analyseur (voir *I.B.5 Analyseurs gaz*). Ces fichiers sont implémentés au fur et à mesure des analyses effectuées. Les données sont récupérées par l'intermédiaire de répertoires partagés sous un réseau local. Une connexion au réseau local du laboratoire est alors nécessaire afin de permettre l'accès à ces données de manière interactive (voir *Figure 38*).

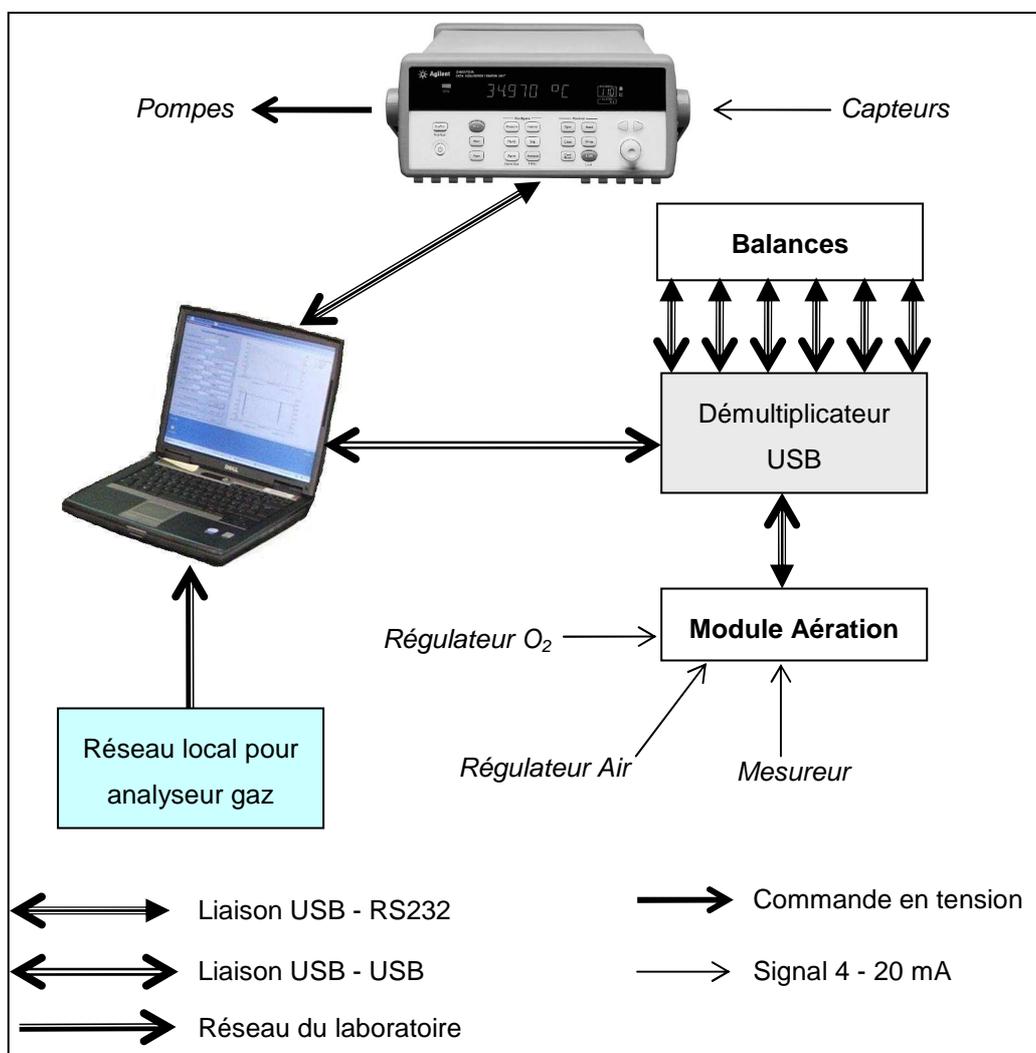


Figure 38 : Schéma récapitulatif des liaisons entre instruments

Le module d'acquisition retenu pour réaliser la chaîne d'acquisition se compose d'un commutateur (34970A, Agilent Technologies, Loveland Colorado USA) et de trois cartes (34901A et 2x 34907A, Agilent Technologies, Loveland Colorado USA). Le commutateur, aussi appelé module Agilent®, accueille les trois cartes dans des logements prévus à cet effet et référencés 100, 200 et 300 (voir *Figure 39*). L'adresse associée à chaque voie débute par le numéro du logement, suivi du numéro de la voie. Par exemple, la connexion n°12 du premier module possède le numéro de voie 112. Cette numérotation permet de récupérer la valeur du signal sur la carte appropriée. La première carte (34901A) permet la réception des signaux provenant des capteurs. Elle comprend 22 voies, dont 20 voies de mesure de tensions, et 2 voies protégées par des fusibles afin d'effectuer des mesures directes de courants. Les deuxième et la troisième cartes (34907A) associent deux ports d'entrée-sortie numériques à 8 bits, un compteur totaliseur pour des signaux TTL capable de compter jusqu'à une cadence de 100 kHz ainsi que deux sorties Convertisseur Numérique Analogique (CNA). Ces cartes permettent de piloter les pompes.

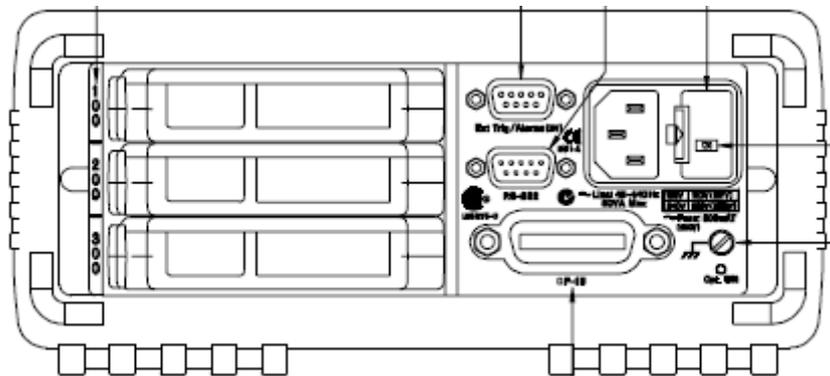


Figure 39 : Représentation de la face arrière du module Agilent® 34970A

Chaque capteur renvoie la valeur du signal physique sous forme d'un courant continu [4 - 20 mA] dans la plage définie de la grandeur physique (minima et maxima). La boucle de courant est un moyen de transmission permettant l'acquisition de signaux analogiques sur une grande distance sans perte ou modification du signal (bruit). L'ensemble de la connectique a été rassemblé sur deux borniers (Rack 2U). Le signal électrique est alors mesuré sous la forme d'une tension [0.4 - 2 V] aux bornes d'une résistance « shunt » (Ref : 487-5022, 100 Ω , $\pm 0.1\%$). La *Figure 40* ci-dessous représente ce descriptif.

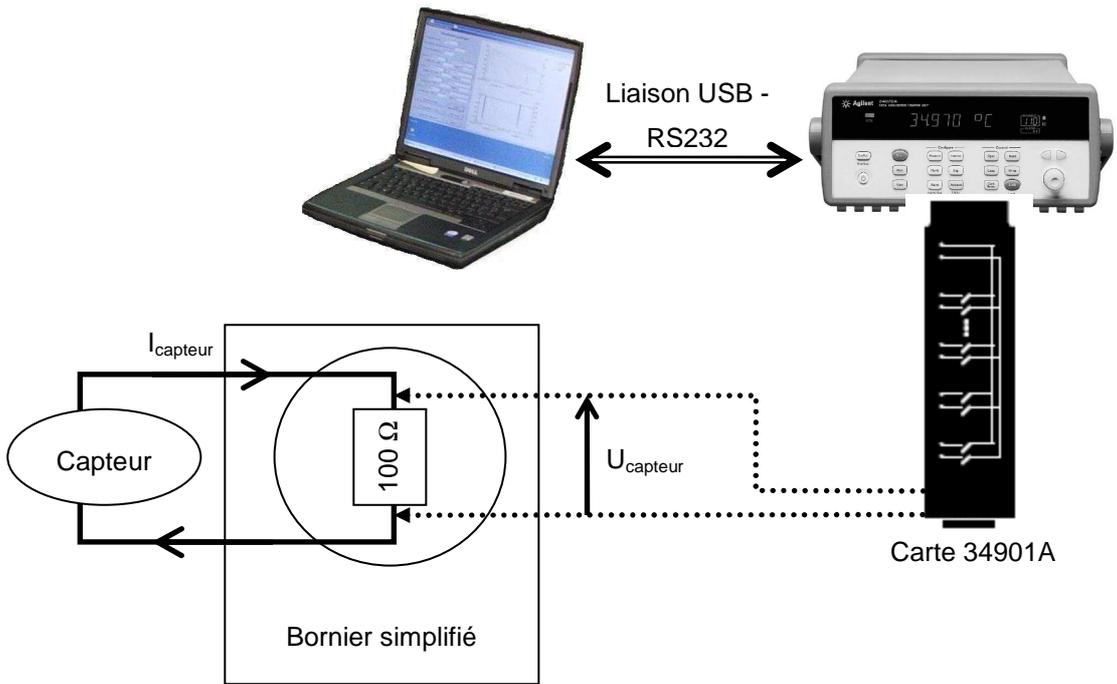


Figure 40 : Schéma de la chaîne d'acquisition associée au module Agilent® - De la boucle de courant du capteur à l'acquisition des données sur l'ordinateur

B. Bioréacteur et environnement instrumental

Le schéma de principe du bioréacteur et de son environnement est proposé sur la *Figure 35* ; Les différents éléments sont détaillés ci-dessous.

1. Bioréacteur

Le bioréacteur (Chemap-Fermenter, Chemap AG, CH-8601 Volketswil, Suisse) mis en œuvre a une contenance de 20 l, soit 11 à 12 l utiles. Il est constitué d'une cuve cylindrique transparente ($h_c = 0.48$ m, $d_c = 0.25$ m, $P_{max} = 2$ bars) équipée de quatre turbines Rushton ($d_a = 0.08$ m, quatre pales $h_p = l_p = 0.02$ m) et de quatre chicanes ($n_b = 4$, $h_b = 0.3$ mm, $l_b = 0.03$ m, fixées sur un anneau de 0.17 m de diamètre) liées à un échangeur de chaleur tubulaire (régulation de température). L'aération ($Q_{air, max} = 30 l_n \text{ min}^{-1}$) est assurée par une injection d'air située sous la première turbine. Une boucle de régulation permet de contrôler la température, le pH, l'agitation et l'oxygène dissous. Enfin un anti-mousse est également intégré et ajouté manuellement. L'entrée de la boucle de dérivation est située dans la partie basse du bioréacteur, et se trouve suffisamment éloignée, radialement, de l'entrée d'air pour ne pas aspirer de bulles provenant de la buse d'injection d'air.

Les adaptations au niveau du bas de cuve, ainsi que le retour au sein de celle-ci permettent une stérilisation en place de l'ensemble de l'installation. La cuve, la boucle de dérivation et les différents circuits fournissant les fluides utilitaires subissent une stérilisation effectuée par vapeur fluente pendant 7 à 9 h. Seule une légère surpression, permettant d'atteindre une température moyenne de 110°C dans l'installation, est appliquée pour des raisons de sécurité liées à la vétusté de la cuve en verre.

2. Pompes

Des pompes volumétriques péristaltiques sont utilisées pour gérer l'alimentation du bioréacteur suivant une stratégie que l'on aura définie. La liste des pompes utilisées se situe dans le *Tableau 2*.

N°Voie	Pompes d'alimentation	Solution	Gamme (min - max) [tr min ⁻¹]
304	Pompe substrat Masterflex® P-M-CD-11 Modèle : 77521-57	Substrat 1	1 - 100
204	Pompe substrat Masterflex® P-M-CD-12 Modèle : 77521-47	Substrat 2	6 - 600
305	Pompe sels principaux Watson-Marlow 400 SCI/ P-WM-400-6 Modèle : 403U/VM3	Sels 1	0 - 50
Manuel	Pompe sels complémentaires Watson-Marlow 400 SCI/ P-WM-400-6 Modèle : 403U/VM4	Sels 2	0 - 10
Manuel	Pompe ajout antimousse Masterflex® P-M-21 Modèle : 7544-60	Antimousse	Fixé à 60

Tableau 2 : Liste des pompes d'alimentation utilisées et de leurs spécifications

Les pompes Masterflex® sont associées à des têtes de pompe permettant de travailler sur différentes plages de débit. Ces têtes de pompe contiennent trois galets cylindriques en inox qui pincent le tuyau de manière à mettre le fluide en mouvement. Les caractéristiques des tuyaux associés aux têtes de pompe sont regroupées dans le *Tableau 3*.

Tête de pompe Masterflex®	Référence du tuyau	Diamètre intérieur [mm]	Rapport volume/tour [ml tr ⁻¹]
13	L/S 13	0.8	0.06
14	L/S 14	1.6	0.21
15	L/S 15	4.8	1.83
16	L/S 16	3.1	0.8
17	L/S 17	6.4	2.8
18	L/S 18	7.9	3.8
24	L/S 24	6.3	3
25	L/S 25	4.8	1.7
35	L/S 35	7.9	4.33
36	L/S 36	9.7	5.66

Tableau 3 : Relation entre tête de pompe - tuyau - capacité de pompage

Les pompes Watson-Marlow n'ont pas de tête de pompe interchangeable. Néanmoins, les tuyaux Masterflex® seront également utilisés. Cependant, la relation volume/tour ne correspondant pas aux références Masterflex®, il sera nécessaire d'ajuster les courbes d'étalonnage en fonction des débits réellement délivrés par la rotation de la tête de pompe. Dans tous les cas, il sera nécessaire de réaliser et d'utiliser des courbes d'étalonnage pour gérer correctement la culture.

3. Balances

La liste des balances utilisées durant les cultures et leurs spécifications sont répertoriées dans le *Tableau 4*.

Solution	Référence Sartorius®	Masse minimale [g]	Masse maximale [g]	Précision [g]
Substrat 1	QA Standard Modèles : QA7DCE-S S/N : 22011061	0.1	7500	± 0.1
Substrat 2	Sigmun 1 Modèle : SIWSDCP-1-16-H S/N :24901087	0.1	16000	± 0.1
Sels principaux	CP Gem ^{plus} Modèle : CPA5201 S/N : 24806235	0.1	5200	± 0.1
Sels complémentaires	CP Gem ^{plus} Modèle : CPA5201 S/N : 24806235	0.1	5200	± 0.1
pH - Régulation	CP Gem ^{plus} Modèle : CPA5201 S/N : 24806235	0.1	5200	± 0.1
pH - Régulation	CP Gem ^{plus} Modèle : CPA5201 S/N : 24806235	0.1	5200	± 0.1

Tableau 4 : Liste des balances utilisées et leurs spécifications

L'ensemble de ces balances est enregistré en ligne par le logiciel LoCoPREL (voir *Chapitre III*) via une liaison série type RS232.

4. Débitmètres massiques gaz

Un système de trois débitmètres massiques BROOKS® Instrument a été installé (voir *Tableau 5*). Deux d'entre eux sont des régulateurs/mesureurs, le troisième est uniquement un mesureur. Tous sont pilotés par un module de contrôle (Brooks Instruments Modèle : 0254AB2B11A, SN: T98328/01).

L'intérêt de ce système est de permettre un enrichissement de l'air du réseau en dioxygène pur. Un descriptif complet du montage se trouve dans le paragraphe *I.D.2 Circuit aéraulique*.

Nom	Gaz étalon	Gamme [l _n min ⁻¹]	Gaz mesuré	Type
Smart Mass Flow Modèle : 5850S/BC1AA1AC3BA0A1	Air	0 ¹ - 30	Air	Régulateur / Mesureur
Smart Mass ModèleFlow Modèle : 5850S/BC1AA1AC3BA0A1	Dioxygène	0 ¹ - 30	Dioxygène	Régulateur / Mesureur
Delta Smart II Mass Flow Modèle : SLA5860S1AAA0C2A1A1AAAA	Diazote	0 ¹ - 30	Mélange	Mesureur

Tableau 5 : Liste des débitmètres massiques

5. Analyseurs gaz

Durant nos expérimentations, deux analyseurs de gaz de fermentation ont été utilisés.

a. Spectromètre de masse

Le spectromètre de masse utilisé est le Prima 600S de la société VG Gas Analysis Systems. C'est un spectromètre à ionisation dure par impact électronique avec un analyseur quadripolaire. L'identification des composés est effectuée en fonction des masses m/z entrée dans la méthode d'analyse. Seules les espèces chargées positivement sont analysées par le spectromètre de masse. La méthode employée par l'appareil est l'identification des espèces N_2^+ ($m/z = 28$), O_2^+ ($m/z = 32$), Ar^+ ($m/z = 40$), CO_2^+ ($m/z = 44$) et CO^+ ($m/z = 28$) pour la quantification des espèces suivantes : N_2 , O_2 , Ar et CO_2 . L'algorithme de conversion des signaux détectés en pourcentage volumique reste confidentiel à la société VG Gas Analysis Systems. Afin d'éviter des contaminations entre les voies, des temps de purge ont été ajoutés pour conditionner au mieux la cellule de prélèvement. Le logiciel du spectromètre de masse est Gas Works V1.0 de la société Thermo Electron Corporations. A partir des signaux de chacune des espèces ionisées (choisies dans la méthode d'analyse comme étant représentatives de l'espèce), le logiciel utilise un algorithme interne permettant d'obtenir les fractions volumiques (molaires) de chaque espèce contenue dans le gaz analysé afin que la somme de ces proportions soit de 100 %.

Cet analyseur de gaz a l'avantage de ne pas imposer de limite maximum pour la quantification des composés dans nos conditions, principal atout pour la détermination des teneurs en CO_2 gazeux. Un débit minimum d'alimentation de 60 l h⁻¹ est néanmoins nécessaire.

¹ Mesure d'un très faible débit, mais non nul à cause du principe de mesure.

b. Analyseur INNOVA®

Le système INNOVA® 1313 Fermentation Monitor et 1309 Multipoint Sampler est un analyseur gaz (INNOVA AirTech Instruments) pouvant mesurer la concentration gazeuse en dioxyde de carbone, en dioxygène et en hydrocarbure total. Cet instrument est géré par le logiciel BZ6009 v1.12, provenant du même fournisseur. Ce système utilise deux principes de mesure suivant le composé analysé : la spectroscopie photo-acoustique et la spectroscopie magnéto-acoustique. Le schéma de principe de l'appareil est présenté *Figure 41*

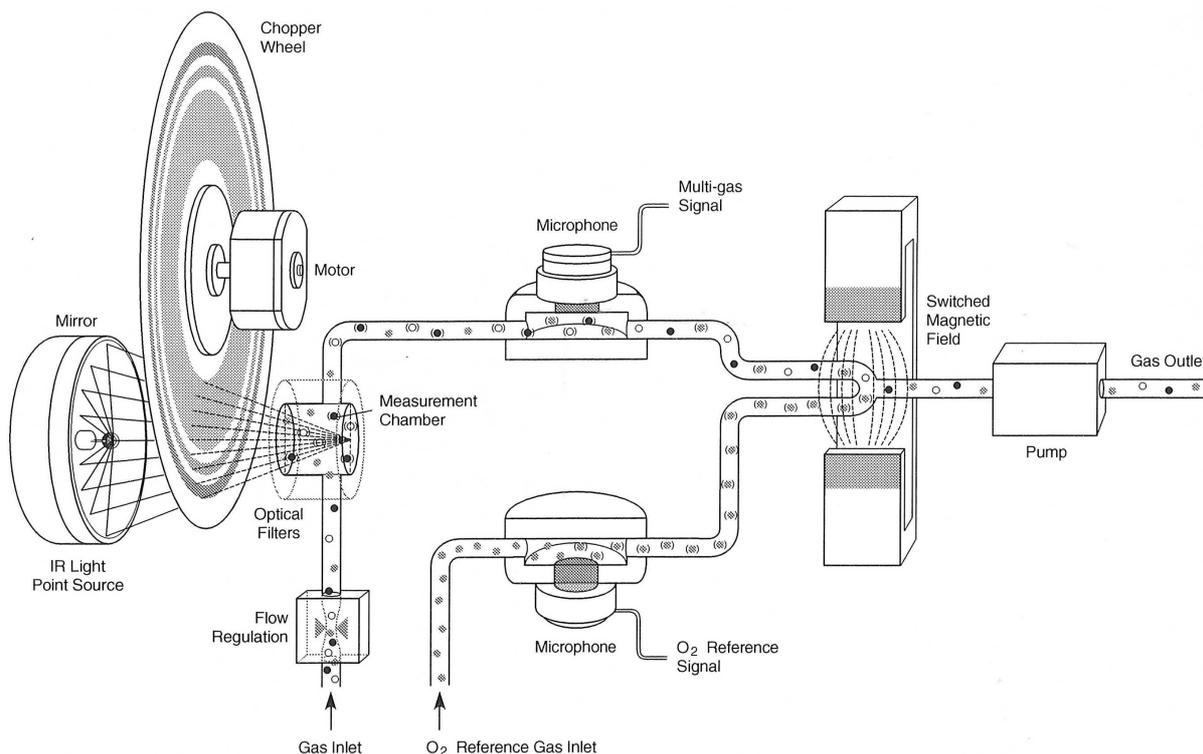


Figure 41 : Schéma de principe de l'analyseur gaz INNOVA®

Le premier système de mesure utilise la spectroscopie photo-acoustique. En spectroscopie photo-acoustique, un évènement optique est transformé en évènement acoustique. Un rayon lumineux émis dans le moyen infrarouge (la source) est dans un premier temps absorbé par le gaz échantillon contenu dans la chambre de mesure. La diminution de l'énergie due à la lumière absorbée produit un transfert de chaleur au sein de l'échantillon. Ce gradient thermique engendre alors des ondes de pression (signal acoustique). Cette onde de pression (expansion/contraction du gaz) ayant une fréquence propre en fonction du gaz, le signal peut alors être détecté par un microphone. Lorsque ce signal est tracé en fonction de la fréquence, on observe que le spectre fréquentiel est proportionnel au spectre d'absorption du gaz. Cette méthode permet la quantification des hydrocarbures gazeux pouvant absorber à 2950 cm^{-1} (groupement alcane $\text{CH}_2 / \text{CH}_3$), du dioxyde de carbone à 2350 cm^{-1} et une mesure intégrée de la vapeur d'eau à 1900 cm^{-1} pour corriger le biais dû à la présence d'humidité. Le second système utilise la spectroscopie magnéto-acoustique. La source utilisée est un champ magnétique alternatif. Appliqué à un gaz contenant du dioxygène, celui-ci va créer une onde de pression (expansion/contraction du gaz) qui sera proportionnelle à la présence de dioxygène. Cette

onde apparaît car l'oxygène est la seule espèce dans le mélange gazeux analysé ayant des propriétés paramagnétiques pouvant répondre au champ magnétique appliqué lors de la sollicitation. Cet analyseur gaz nécessite un débit minimum d'alimentation de 7.8 l h^{-1} . La linéarité de la réponse des composés analysés est assurée entre 0 et 0.21 (fraction molaire) pour le dioxygène et entre 0 et 0.05 (fraction molaire) pour le dioxyde de carbone.

6. Sondes : température, pH, pO_2 et pression relative

La température du bioréacteur (variable **Temp_Fermenteur** du logiciel LoCoPREL) est mesurée par une sonde interne au bioréacteur (Pt100, $-10 / +150^\circ\text{C}$, $\pm 0.1^\circ\text{C}$). Elle intervient également dans la régulation en température du bioréacteur.

La mesure du pH (variable **pH_Fermenteur**) est effectuée dans le bioréacteur par une sonde BROADLEY JAMES de longueur 54 cm et de précision ± 0.01 unité pH. A partir de la mesure de cette sonde, le module de pilotage du bioréacteur asservit une pompe tout-ou-rien de manière à réguler le pH du milieu à une valeur de consigne par l'utilisation d'un système de régulation PI (Proportionnel Intégral).

La mesure en dioxygène dissous (variable **pO2_Fermenteur**) s'effectue dans le bioréacteur par une sonde INGOLD (référence 322 756702 / 74111) de longueur 40 cm.

Un manomètre à aiguille est situé sur le condenseur, après le filtre de sortie du bioréacteur. Une vanne à membrane est située juste après ce manomètre de manière à régler manuellement la pression dans le bioréacteur. Ce manomètre peut monter jusqu'à 2 bar, avec des graduations de 0.2 bar. Ce capteur n'est pas intégré dans le système d'acquisition.

C. Boucle de dérivation et environnement

Les piquages sur ce bioréacteur étant tous positionnés sur la platine supérieure, une canule plongeante a été utilisée pour l'apport d'ammoniaque 28 % m/m (solution régulatrice de pH) du fait de sa volatilité.

1. Description

La boucle de dérivation (partie droite de la *Figure 35*) est une zone multi-instrumentée permettant la mise en circulation du moût, sa caractérisation (à l'aide de capteurs) et son prélèvement.

La boucle de dérivation ($V_{\text{boucle}} = 0.93 \pm 0.04$ l) se compose de conduites tubulaires (acier inoxydable 316L, diamètre nominal 12 mm) et d'une instrumentation diversifiée. Les pertes de charges linéiques sont mesurées sur deux conduites calibrées, D1 et D2. Chaque conduite ($L = 2.5$ m) est équipée d'un capteur de pression différentielle mesurant la perte de charge sur une longueur de 2 m, après une longueur de 0.3 m réservée à l'établissement du régime d'écoulement. Ces deux conduites sont rectilignes, cylindriques, de section circulaire et de diamètres respectifs 12 et 6 mm (inox 316L, épaisseur 1 mm).

La pompe de la plateforme de rhéologie en ligne permet la mise en circulation, dans la boucle de dérivation, du milieu contenu dans le bioréacteur. Il s'agit d'une pompe à engrenages (TUTHILL CORPORATION®, série D, Modèle DGS1.3) qui peut balayer une gamme de débit allant de 3.1 à 296.4 l h⁻¹ (capacité théorique sous pression nulle, $P_{\text{max}} = 8.6$ bar et $T_{\text{max}} : 60$ °C). La pompe est pilotable par l'intermédiaire d'un boîtier de contrôle (DART CONTROLS INC. série 250G). Cette interface permet la mise en route de la pompe, ainsi que la bascule sur les différents modes de contrôle (manuel ou pilotage à distance). La pompe peut être pilotée électriquement par une commande en tension comprise entre 0 et 10 V. Ce contrôle à distance est géré par le logiciel LoCoPREL via le module Agilent.

Les prélèvements s'effectuent à la fin de la boucle externe, avant le retour dans le bioréacteur. Un système de Té en inox avec une vanne à membrane permet une prise d'échantillon rapide en utilisant simplement la surpression dans la boucle externe

2. Instrumentation

La boucle de dérivation est instrumentée pour permettre des mesures de pressions relatives et différentielles, de débit massique, de température, de masse volumique, de pH, de dioxygène dissous et de conductivité électrique. Toutes ces mesures sont recueillies et gérées par le logiciel LoCoPREL (cf. Chapitre 3). Nous préciserons, dans la présentation qui suit, les noms des variables associées à ces grandeurs.

Le dioxygène dissous (variable **pO2_Inox**) et le pH (variable **pH_Inox**) sont mesurés à l'aide de deux sondes (respectivement OXYFERM FDA/120 référence PN 237 450, et EASYFERM PLUS VP 120 P/N 238633/00) intégrées sur un module inox placé à mi-chemin de la boucle de dérivation. La

précision de la sonde pH est de ± 0.01 unité pH. Elle permet de s'assurer que le milieu n'évolue pas drastiquement entre le bioréacteur et l'écoulement dans les diverses conduites.

Un transmetteur de pression relative (BOURDON HAENNI, modèle E913 n°6008) est situé en entrée de boucle (sortie pompe). Le transmetteur est monté sur un séparateur à manchette. Sa gamme de mesure va de 0 à 10 bar, avec une précision à 0.2 % en pleine échelle (variable **Prelative**).

Un manomètre à aiguille est situé en sortie de boucle avant le Té de prélèvement et la vanne de contre-pression. Ce manomètre peut supporter des mesures allant jusqu'à 6 bar (± 0.2 bar).

Un débitmètre à effet Coriolis (KROHNE, type MFS-7050-S06, SN: 02100306), a été installé dans le prolongement de la pompe de la boucle de dérivation et du transmetteur de pression relative. Il permet une mesure de débit correcte (variable **Debit_Massique**) pour les liquides (exactitude ± 0.1 %) et les gaz (exactitude ± 0.5 %), ainsi qu'une mesure de la masse volumique (variable **Masse_Volumique**) du fluide en ligne (incertitude de mesure de ± 2 kg m⁻³).

Les capteurs de pression différentielle (variables **Pdiff1** et **Pdiff2**) sont installés sur les conduites cylindriques D1 et D2 de l'installation. La transmission de pression s'effectue par colonne d'eau jusqu'aux chambres de mesure. Un système de vannes permet l'isolement, la communication en pression ou la mise à pression atmosphérique des chambres. Ces transmetteurs sont de marque HONEYWELL, modèle STD 120, SN : C2856562001001 et C2856562001002. Leur précision est de 0.003 % pour une pleine échelle à 10⁵ Pa.

La conductivité électrique (variable **Conductimetre**) est mesurée avant le retour dans le bioréacteur par un conductimètre à quatre électrodes (KEMOTRON, type 9147, n°36036) avec une précision de mesure de ± 3 % par décade. La constante de la cellule est égale à 0.3131.

Des capteurs de température (*Tableau 6.*) sont intégrés dans la plupart des capteurs installés. Ils sont au nombre de quatre, et permettent un suivi de la perte thermique le long de l'installation.

Nom	Type de sonde	Gamme	Précision	Nom LoCoPREL
Température (Débitmètre)	Interne débitmètre KROHNE ¹	0 - 100 °C	± 1 °C ² ± 0.1 °C ³	Temp_Debit
Température (pH Inox)	Pt 100	0 - 135 °C	± 0.1 °C ³	Temp_pH_Inox
Température (pO ₂ Inox)	NTC 22 kOhm	0 - 130 °C	± 0.5 °C ² ± 0.1 °C ³	Temp_pO2_Inox
Température (Conductimètre)	Pt 1000 Ω - IEC 751 - Class A	-20 - 150 °C	± 0.5 °C ² ± 0.1 °C ³	Temp_Conduc

Tableau 6 : Liste des capteurs de température présents sur l'outil expérimental

¹ Non renseigné

² Indication constructeur

³ Affichage du capteur

D. Alimentation en fluides utilitaires

1. Circuit hydraulique

Le circuit hydraulique ($P_{\max} = 3 \text{ bar}$) a deux objectifs : le premier est d'alimenter le circuit de chauffage du bioréacteur et le second de remplir les colonnes d'eau des capteurs de pression différentielle. Dans le premier cas, la stérilité de l'eau n'est pas requise. Elle nécessite néanmoins un refroidissement préalable avant son envoi dans le circuit de chauffage du bioréacteur. En effet, la température de l'eau du réseau peut monter au-delà de $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (périodes de fortes chaleurs). Or, certaines cultures (dont *Yarrowia lipolytica*) nécessitent des températures relativement basses proches de $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Pour éviter ce problème, l'eau du réseau est dans un premier temps refroidie en circulant dans le bain d'un cryostat utilisé pour le circuit de refroidissement du condenseur de gaz, fixé à une température de $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$. L'eau froide entre ensuite dans le circuit de régulation de température du bioréacteur. Elle y est alors soit chauffée par une résistance chauffante (circuit fermé) soit refroidie par ajout d'eau (circuit ouvert). Un drain permet d'évacuer cette eau de régulation thermique vers les égouts.

Dans le second cas, l'objectif est d'alimenter les colonnes d'eau des capteurs de pression différentielle, permettant ainsi la transmission de pression. Les deux prises de pression pour chacune des conduites circulaires (nommées A et B sur le schéma présenté en *Figure 42*) sont alimentées par un dispositif pouvant être stérilisé par de la vapeur fluante.

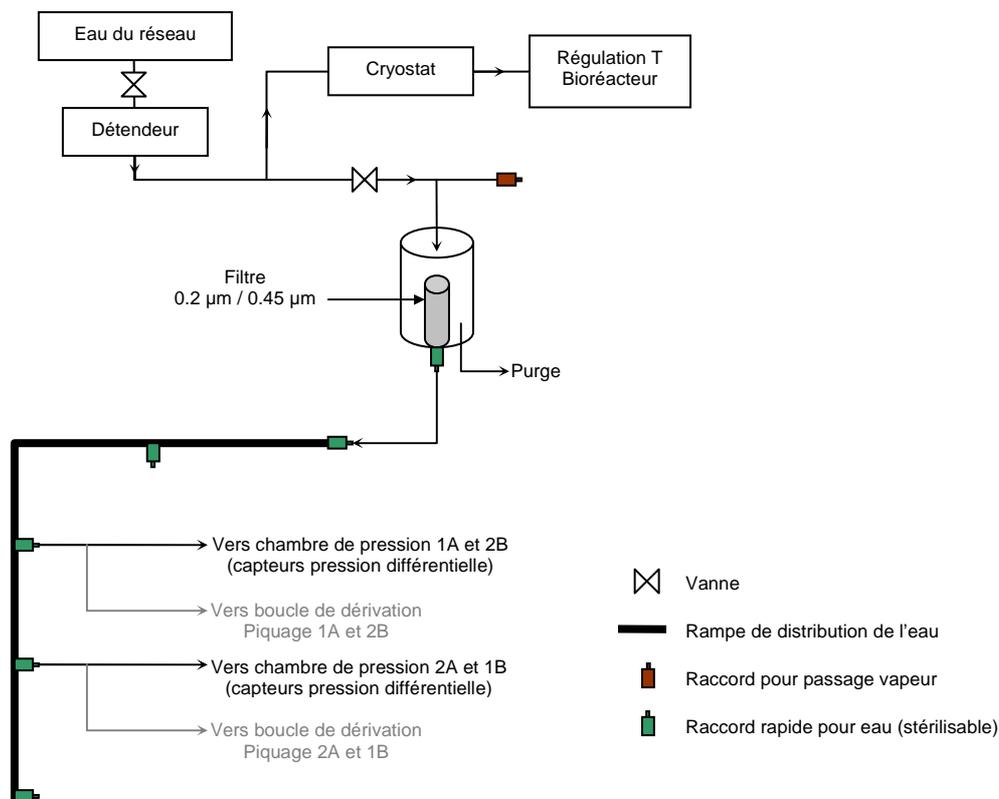


Figure 42 : Schéma du circuit hydraulique de l'outil expérimental

2. Circuit aéraulique

Le circuit aéraulique (Figure 43) permet l'obtention, à partir du réseau d'air comprimé du laboratoire ($P_{\max} = 7 \text{ bar}$), d'un gaz d'entrée exempt de particules. La composition et le débit d'entrée dans le bioréacteur sont contrôlés par le logiciel LoCoPREL via les débitmètres massiques gaz.

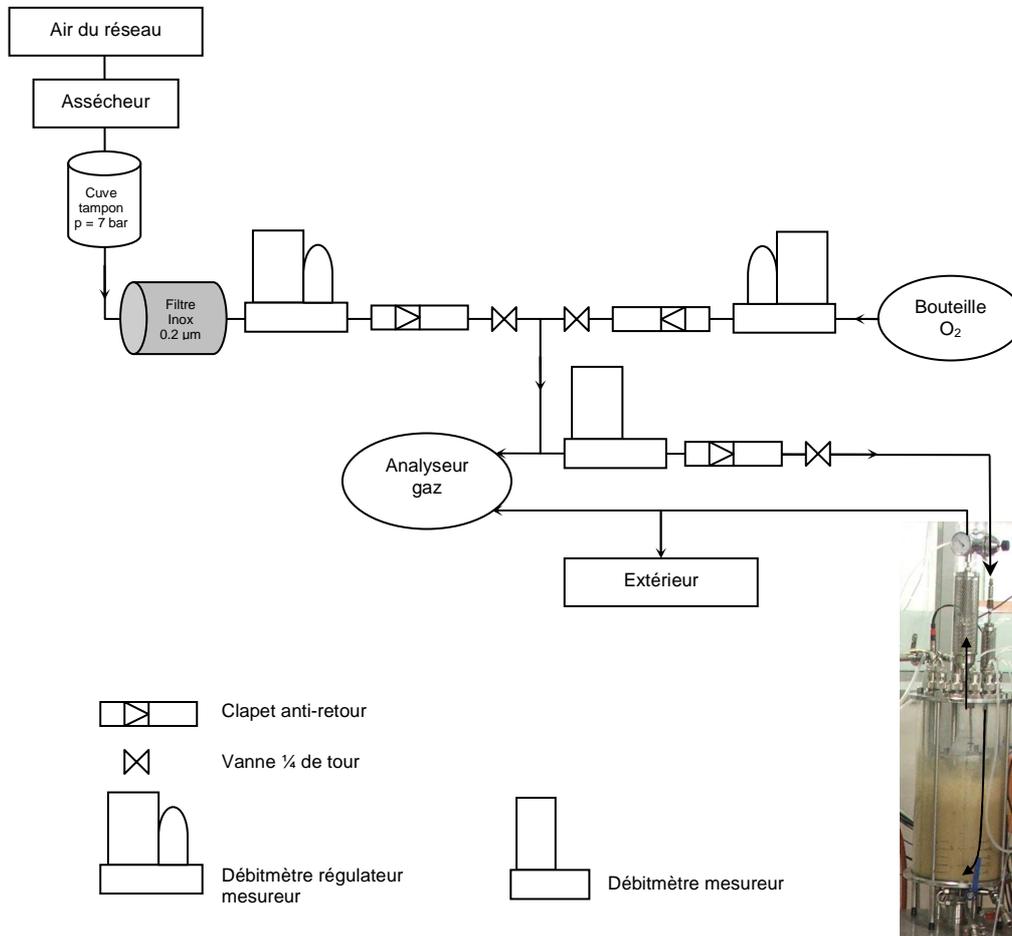


Figure 43 : Schéma du circuit aéraulique de l'outil expérimental

Le gaz entrant dans le bioréacteur est un mélange contrôlé de deux gaz : l'air comprimé du réseau et du dioxygène. L'air comprimé a subi un séchage puis un stockage dans une cuve de 100 l sous 7 bars de pression avant sa distribution, ce traitement faisant disparaître l'eau et le dioxyde de carbone initialement présents dans l'air du réseau. Afin de protéger le système, un filtre à particules est placé au point d'alimentation en air comprimé. Le dioxygène pur provient d'une bouteille, ce qui permet d'enrichir le gaz entrant en dioxygène. Le débitmètre régulateur est dégraissé afin d'éviter les risques d'explosion dus au système de mesure. Le contrôle de la composition en gaz s'effectue sur une fuite placée avant le débitmètre mesureur, lequel indique le débit réel de gaz allant dans le bioréacteur.

3. Circuit vapeur

La stérilisation de l'installation expérimentale, indispensable à la réalisation de cultures non polluées par la présence d'éventuelles souches parasites, est réalisée à l'aide du circuit vapeur ($P_{\max} = 3 \text{ bar}$). En effet, le bioréacteur utilisé, couplé à la boucle de dérivation, n'offre pas la possibilité d'une

stérilisation à l'autoclave. De plus, ce dernier ne supporterait pas les conditions de pression correspondant à une température de 121 °C à maintenir durant 20 minutes. Afin d'obtenir un niveau de stérilité suffisant, et pour des raisons de sécurité, l'installation est balayée pendant plusieurs heures par de la vapeur fluante. En moyenne, la durée de stérilisation de l'installation était de 8h à une température de 110°C, toutes les vannes étant partiellement ouvertes pour permettre une légère augmentation de pression et une circulation de la vapeur. L'apport en continu de vapeur s'effectue en différent lieu de l'outil expérimental, comme l'illustre la *Figure 44*.

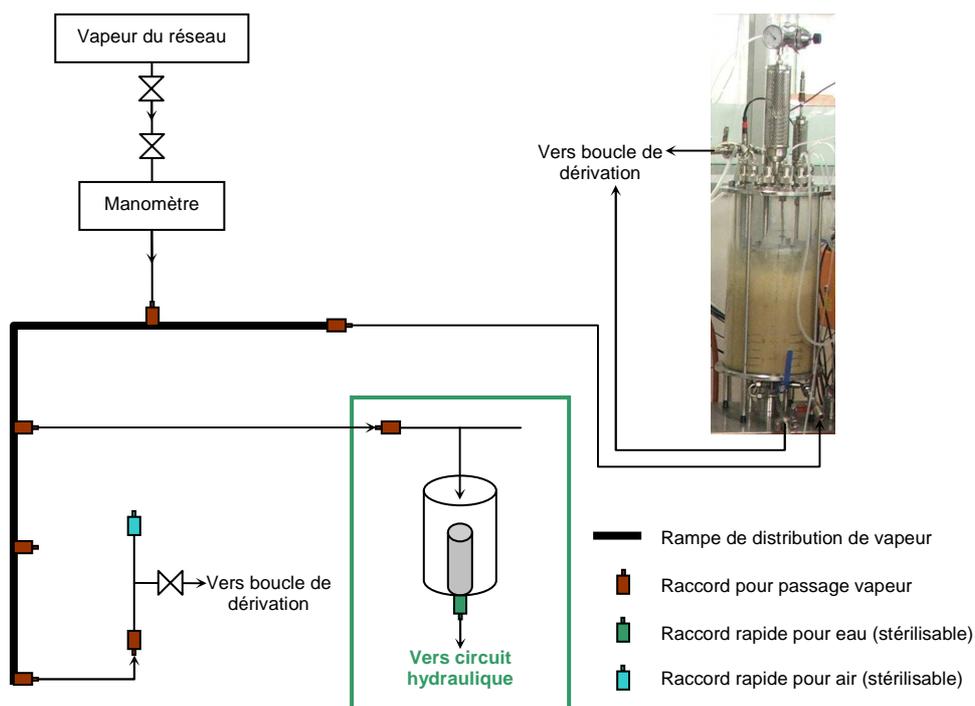


Figure 44 : Schéma du circuit vapeur de l'outil expérimental

II. FLUIDES DE MAQUETTE FROIDE ET MILIEUX DE CULTURE

Pour la présentation des cultures, nous décrivons la préparation la plus adaptée et validée lors des dernières expérimentations.

A. Milieux synthétiques de caractérisation

1. Milieux Newtoniens

Deux milieux sont utilisés pour investiguer une plage de vitesses de cisaillement la plus large possible sur la plateforme d'étude : l'eau osmosée et des sirops de glucose.

L'eau osmosée est employée comme premier fluide newtonien avec une viscosité dynamique de 10^{-3} Pa s. Elle est obtenue à partir d'une fontaine MILLIPORE RiOs 5 modèle ZR0S5005Y F8NM21365D sur une cartouche Progard® 2 Silver PROG000S2.

Des solutions concentrées de glucose permettent d'avoir différentes valeurs de viscosité dynamique. La viscosité dynamique la plus élevée a été de $(22.27 \pm 0.27) 10^{-3}$ Pa s. Ces solutions sont obtenues par dissolution de glucose monohydraté (société Roquette Frères, 62136 Lestrem, France) dans de l'eau osmosée.

2. Milieux non newtoniens

Les milieux non-newtoniens utilisés sont des solutions aqueuses de gomme de xanthane portant le nom industriel de Satiaxane™ CX910, lot numéro 20061675 et fabriqué par la société Cargill™. Ce produit est initialement utilisé comme additif alimentaire en tant qu'agent texturant (additif E415).

La masse de gomme de xanthane à dissoudre dans l'eau est préalablement mise en suspension dans trois fois sa masse en éthanol. Cela permet de faciliter la dispersion de la gomme dans de l'eau osmosée. Afin de récupérer l'ensemble du xanthane, des jets d'une pissette d'éthanol sont utilisés pour le transfert dans le volume d'eau. Cela évite la prise en masse dans le contenant de pesée si de l'eau avait été utilisée. La solution est mélangée pendant 1h30 sous agitation mécanique à hélice marine. Elle est ensuite transférée dans la cuve du bioréacteur, avec une régulation température à 40 °C, sous une agitation de 400 tr min⁻¹, sans aération, et un débit de circulation inférieur à 100 l h⁻¹ pendant 14 h (environ une nuit). Cette étape permet au polymère de se solvater progressivement afin d'obtenir une solution homogène. L'agitation est ensuite augmentée à 750 tr min⁻¹, avec un débit maximal de circulation, de manière à déloger les bulles bloquées dans l'installation pendant 4 h. Enfin, l'agitation est diminuée à 500 tr min⁻¹ et la régulation de température est réglée à 20 °C. Lorsque la température est stabilisée, les rampes de débit sont effectuées. La solution a alors une concentration de 0.4 % (m/m).

La caractérisation des fluides non-newtoniens a été effectuée sur le rhéomètre Bohlin C-VOR pour déterminer les indices de consistance et de structure. Ces indices ont été déterminés en ajustant une loi puissance type Ostwald-de Waele (cf. *Chapitre I Équation 17*), sur une plage de cisaillement de 0.1 à 100 s⁻¹. Les variations de ces paramètres avec la température ont également été analysées et modélisées par un polynôme du second degré. Des solutions de xanthane à 0.4 et 0.2 % (m/m) ont été caractérisées et les valeurs des paramètres à 20 °C sont reportées dans le *Tableau 7*.

Concentration % (m/m)	Indice de consistance K [Pa s ⁿ]	Indice d'écoulement n [/]
0.4	1.668	0.18
0.2	0.474	0.28

Tableau 7 : Caractéristiques rhéologiques des solutions de xanthane utilisées

B. Culture d'*Escherichia coli*

1. Généralités sur la bactérie *E. coli*

Escherichia coli est un microorganisme procaryote classé selon la taxonomie suivante : Bacteria ; Proteobacteria ; Gamma Proteobacteria ; Enterobacteriales ; Enterobacteriaceae ; *Escherichia*. Cette bactérie est un bacille gram négatif radiorésistant couramment étudié dans les laboratoires. Sa facilité de culture, couplée avec un grand nombre d'outils génétiques, en fait un modèle d'étude de choix pour les laboratoires de biologie moléculaire. Elle présente un métabolisme aéro-anaérobie.

Elle est naturellement présente majoritairement dans la microflore commensale intestinale de l'homme et des animaux homéothermes.

Cette bactérie présente une morphologie sous forme de petits bâtonnets plus ou moins allongés en fonction des conditions de culture.

Elle est utilisée dans l'industrie dans le cadre de cultures permettant la biosynthèse de molécules à forte valeur ajoutée notamment pour la production de protéines recombinantes.

Pour notre étude, nous mettrons en œuvre la souche sauvage *E. coli* K12.

2. Milieux

a. Milieu de conservation

Toutes les cultures d'*E. coli* sont initialementensemencées par un stock de cryotubes congelés et conservés à - 80 °C provenant d'une même culture antérieure. Le stock est réalisé à partir d'une culture en fin de phase exponentielle de croissance sur un milieu riche type LB liquide (voir *Tableau 8*). La suspension est mélangée à du glycérol pur pour obtenir un mélange contenant 20 à 40 % ($V_{\text{glycérol}}/V_{\text{final}}$) de glycérol (cryoprotecteur). Dans notre cas, notre stock contient du glycérol à hauteur de 33 % ($V_{\text{glycérol}}/V_{\text{final}}$). Un même stock a été utilisé durant toute notre étude afin de limiter les dérives génétiques dues à un trop grand nombre de repiquages.

b. Milieu de réveil

Une goutte provenant d'un tube stock préalablement préparé est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu riche LB gélosé (voir *Tableau 8*). La mise en culture est réalisée pendant 8 à 12 h à 37 °C. La boîte est retournée pendant la relance pour limiter l'assèchement de la gélose.

Une colonie est ensuite prélevée avec une anse stérile, puis placée dans un tube contenant 5 ml de milieu riche LB liquide. La culture est à nouveau placée pendant 8 h à 37 °C sur une table agitante à une vitesse de 200 tr min⁻¹.

Composé	Concentration [g l ⁻¹]	
	Milieu riche LB liquide	Milieu riche LB gélosé
Extrait de levure	5	5
Tryptone	10	10
NaCl _(s)	10	10
Glucose	5	5
Agar	0	20

Solution préparée dans de l'eau osmosée.
Stérilisation par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

Tableau 8 : Composition du milieu riche LB utilisé pour les boîtes de Pétri et la préculture I_R

c. Milieu minimum

La préparation du milieu minimum pour *E. coli* nécessite une attention particulière de manière à avoir un milieu non précipité. La préparation est largement inspirée du polycopié de travaux pratiques des étudiants de 5^{ième} année de l'INSA de Toulouse, issu des connaissances antérieures du laboratoire.

Pour cela, il est nécessaire de préparer indépendamment chaque composé contenu dans les *Tableau 9* et *Tableau 10*. Chacun est concentré 1000 fois (à l'exception de MgSO₄, 7H₂O_(s) concentré seulement 500 fois) par rapport à la concentration finale dans le milieu minimum. Chaque composé est préparé, séparément des autres, dans un flacon nettoyé à l'acide nitrique ~ 10 % (V/V), serti avec une goutte d'eau osmosée, puis stérilisé par autoclave pendant 20 min à 121 °C. Les solutions sont ensuite dissoutes, puis filtrées avec un filtre stérile d'une porosité de 0.22 µm, sous une hotte à flux laminaire.

Oligo-éléments - Milieu minimum	
Composé	Concentration [g l ⁻¹]
MnSO ₄ , H ₂ O _(s)	20
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O _(s)	4
CoCl ₂ , 6H ₂ O _(s)	8
CuCl ₂ , 2H ₂ O _(s)	2
ZnSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	4
H ₃ BO _{3(s)}	1

Solutions préparées dans de l'eau osmosée

Tableau 9 : Concentration de chaque oligo-élément concentré 1000 fois préparé séparément dans un flacon

Sels B - Milieu minimum	
Composé	Concentration [g l ⁻¹]
MgSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	500
CaCl ₂ , 2H ₂ O _(s)	40
FeSO ₄ , 7H ₂ O (ajusté à pH 2 avec HCl)	40
Thiamine	10
Solutions préparées dans de l'eau osmosée	

Tableau 10 : Composition des sels B concentrés 1000 fois (sauf MgSO₄, 7H₂O_(s) concentré 500 fois) préparés séparément dans un flacon

Les solutions sont conservées à température ambiante. Seule la solution concentrée de thiamine est conservée à l'abri de la lumière, à une température de 4 °C afin de limiter sa dégradation.

La préparation de 12.5 l de milieu minimum s'effectue en plusieurs étapes. Sous agitation avec un barreau magnétique, 750 ml d'acide citrique à environ 100 g l⁻¹ sont dissous dans de l'eau du réseau. 12.5 ml de chaque oligo-élément sont ajoutés dans l'ordre présenté dans le *Tableau 9*. 12.5 ml de chaque sels B¹ sont ensuite ajoutés dans l'ordre présenté dans le *Tableau 10*, afin d'éviter la précipitation des ions divalents (chélation par le diacide). La thiamine ne sera ajoutée au milieu qu'au moment de l'utilisation du milieu avec le même rapport que précédemment (1 ml pour 1 l de milieu).

Parallèlement, dans un bécher de 15 l sous agitation contenant environ 9.5 l d'eau du réseau, les sels A, prévus pour un volume final de 12.5 l sont ajoutés (voir *Tableau 11*). Après dissolution des sels A, chaque solution d'oligo-élément, suivie des sels B, est ajoutée. Le milieu est complété pour un volume final de 12.5 l avec l'eau du réseau.

Sels A - Milieu minimum	
Composé	Concentration [g l ⁻¹]
K ₂ HPO _{4(s)}	8
(NH ₄) ₂ HPO _{4(s)}	8
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O _(s)	5.046
NH ₄ Cl _(s)	0.13
(NH ₄) ₂ SO _{4(s)}	0.75
Solution préparée dans de l'eau du réseau	

Tableau 11 : Composition des sels A à la concentration finale du milieu minimum pour les précultures I, II, III et le fed-batch

Le milieu minimum est ensuite ajusté à un pH de 6.8 avant autoclavage avec une solution d'ammoniaque commerciale à 28 % (m/m). Il est ensuite stérilisé par autoclavage à 121 °C pendant 30 min.

¹ A l'exception de MgSO₄, 7H₂O où 25 ml est nécessaire.

d. Solutions d'alimentation

i. Solutions salines

La solution saline principale est asservie au volume de la solution de glucose concentrée. Elle est apportée dans un ratio de 9 / 100 en débit par rapport au débit de la solution de glucose concentrée. La solution est préparée dans environ 100 ml d'eau osmosée. Les composés sont ajoutés dans l'ordre présenté dans le *Tableau 12*, puis le volume est ajusté avec de l'eau osmosée.

Composé	Concentration [g l ⁻¹]
H ₃ PO _{4(l)}	31.957
KH ₂ PO _{4(s)}	75
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O _(s)	9
MgSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	47
CaCl ₂ , 2H ₂ O _(s)	3.7
MnSO ₄ , H ₂ O _(s)	0.21
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O _(s)	0.022
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.04
CuCl ₂ , 2H ₂ O _(s)	0.064
ZnSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	0.725
H ₃ BO _{3(s)}	0.021
Solution préparée dans de l'eau osmosée	

Tableau 12 : Solution saline principale d'alimentation du fed-batch

Le montage de l'alimentation en solution saline principale s'accompagne d'une alimentation avec une solution saline complémentaire (voir *Tableau 13*) qui se mélange, juste avant l'ajout dans le bioréacteur, avec la solution saline principale. Elle est asservie au débit de la solution de glucose concentré dans un ratio de 1 / 100. Cette stratégie d'alimentation est nécessaire lorsque l'expérimentation dure plus de 12 h car, au-delà, le mélange des deux solutions salines précipiterait.

Composé	Concentration [g l ⁻¹]
FeSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	37
Thiamine	8
Solution préparée dans de l'eau osmosée	

Tableau 13 : Solution saline complémentaire d'alimentation du fed-batch

ii. Source carbonée

Afin de pouvoir contrôler finement la croissance du microorganisme pour de faibles taux de croissance dès le début de l'inoculum, deux sources carbonées ont été mises en place. Il s'agit de deux sources de glucose à des concentrations différentes. Le premier apport est une alimentation à 50 g l⁻¹ en

glucose. Le second apport est une alimentation en glucose à 700 g l⁻¹. Chaque solution est stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 30 min. Après stérilisation, la quantité de sucre est déterminée afin d'obtenir une conduite de culture optimale. L'alimentation vers 50 g l⁻¹ est dosée avec l'analyseur YSI (voir III.B.3.a.i YSI - Glucose), puis en HPLC (voir III.B.3.a.ii HPLC - Glucose, acides organiques). La solution concentrée proche de 700 g l⁻¹ est caractérisée par une mesure de la masse volumique de la solution par méthode gravimétrique.

iii. Solutions de régulation pH

Pendant la croissance, la culture est régulée au pH de 6.8 avec une solution d'ammoniaque commerciale à 28 % (m/m). Le montage est préalablement stérilisé avec une goutte d'eau dans le montage par autoclavage à 121 °C pendant 20 min. Afin de limiter l'évaporation de l'ammoniac dans le ciel du bioréacteur, une canule d'alimentation plongeant dans le moût est installée. La solution d'ammoniaque est transvasée dans le montage sous une hotte à flux laminaire.

Après la croissance cellulaire, le pH du moût est régulé avec une solution d'acide sulfurique à 0.15 mol l⁻¹ préalablement stérilisée à 121 °C pendant 20 min.

iv. Solution d'antimousse

En cours de culture, le stress technologique ou nutritionnel fait apparaître de la mousse dans laquelle une certaine quantité de biomasse vient s'accumuler. La quantité de biomasse présente dans la phase liquide en sera alors modifiée. Pour éviter cela, une solution d'antimousse est ajoutée par une pompe à déclenchement manuel, de manière à répondre rapidement en fonction de l'évolution de la culture. L'antimousse utilisé est une solution de polypropylène glycol P2000 pur, stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

C. Culture d'*Yarrowia lipolytica*

1. Généralités sur la levure *Y. lipolytica*

Yarrowia lipolytica est un microorganisme eucaryote suivant la taxonomie suivante : Fungi ; Ascomycota ; Saccharomycetes ; Saccharomycetales ; Dipodascaceae; *Yarrowia*. *Y. lipolytica* est une levure atypique car elle se situe à la frontière entre les levures hémiascomycètes et les champignons filamenteux. Elle est la seule du genre *Yarrowia*. Elle présente un métabolisme aérobie strict.

Elle a été identifiée dans de multiples habitats. De manière générale, elle se retrouve dans des environnements riches en substrats hydrophobes. Elle peut se retrouver sur des aliments riches en lipides tels que les fromages, la margarine, l'huile d'olive, les plantes oléagineuses, l'huile de vidange mais aussi dans les gisements pétroliers.

Cette levure est dimorphique ; Elle peut aussi bien se trouver sous forme de cellules végétatives isolées, que sous forme d'hyphes selon les conditions de culture.

Cette levure a la possibilité de sécréter de nombreux métabolites en grandes quantités tels que le citrate, l'isocitrate, l' α -cetoglutarate. Elle est d'ailleurs utilisée au niveau industriel pour la production d'acide citrique.

Dans le cadre de nos travaux, nous utiliserons la souche sauvage *Y. lipolytica* W29.

2. Milieux

a. Milieu de conservation

Toutes les cultures de *Y. lipolytica* sont initialementensemencées par un stock de cryotubes congelés et conservés à -80 °C provenant d'une même culture antérieure, effectuée au cours des travaux de thèse de doctorat de Bérangère PORTELLI. Le stock est réalisé à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance sur un milieu riche type YPD (voir *Tableau 14*). Une suspension à 2 g l⁻¹ de biomasse est mélangée à une solution de glycérol à 30 g l⁻¹ (cryoprotecteur) dans les proportions 50 / 50 (V/V). Un même stock est utilisé afin de limiter les dérives génétiques dues à un trop grand nombre de repiquages.

b. Milieu de réveil

Une goutte, provenant d'un tube stock préalablement préparé, est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu riche LB gélosé (voir *Tableau 8*). La mise en culture est réalisée pendant 24 à 48 h à 30 °C. La boîte est retournée pendant la rel ance pour limiter l'assèchement de la gélose.

Une colonie est ensuite prélevée avec une anse stérile, puis placée dans un tube contenant 5 ml de milieu riche YPD (*Tableau 14*). La culture est à nouveau placée pendant 24 h à 30 °C sur une table agitante à une vitesse de 100 tr min⁻¹.

Composé	Concentration [g l ⁻¹]
Extrait de levure	10
Bactopeptone	10
NaCl(s)	9
Glucose	20
Solution préparée dans de l'eau osmosée	

Tableau 14 : Composition du milieu riche YPD

c. Milieu minimum

Le milieu utilisé est tiré du travail de DEA de Laetitia FAURE (Faure, 2003).

Dans un premier temps, il est nécessaire de préparer indépendamment chaque composé contenu dans le *Tableau 15*. Chaque composé est concentré 1000 fois par rapport à la concentration finale dans le milieu minimum et contenu dans un flacon nettoyé à l'acide nitrique ~ 10 % (V/V), serti avec une goutte d'eau osmosée, puis stérilisé par autoclave pendant 20 min à 121 °C. Les solutions sont ensuite dissoutes, puis filtrées avec un filtre stérile de porosité 0.22 µm, sous une hotte à flux laminaire.

Oligo-éléments - Milieu minimum	
Composé	Concentration [g l ⁻¹]
ZnSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	40
MnSO ₄ , H ₂ O _(s)	3.8
CoCl ₂ , 6H ₂ O _(s)	0.5
CuSO ₄ , 5H ₂ O _(s)	0.9
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O _(s)	0.06
CaCl ₂ , 2H ₂ O _(s)	23
H ₃ BO _{3(s)}	3
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₂ , 6H ₂ O _(s)	23
Ajusté à pH 1 avec HCl	
Solution préparée dans de l'eau osmosée	

Tableau 15 : Composition des oligo-éléments concentrés 1000 fois

Dans les trois quarts du volume final, le milieu minéral du *Tableau 16* est préparé dans de l'eau du réseau sous agitation. Les solutions d'oligo-éléments sont rajoutées dans les proportions de 1 ml pour 1 l de milieu minimum. Seule la solution de fer n'est pas ajoutée au milieu à ce stade pour éviter la précipitation du milieu. La solution est ajustée à un pH de 4.5, avec de l'acide orthophosphorique, puis stérilisée à l'autoclave. Une petite quantité de milieu minimum est prélevée afin de déterminer la quantité d'ammoniaque à rajouter aux précultures. La stérilisation se fait par autoclavage à 121 °C pendant 30 min. Après stérilisation, et juste avant inoculation dans le bioréacteur, le pH est ajusté et régulé à 5.5 avec une solution d'ammoniaque à 28 % (m/m). Les solutions de fer et de vitamines sont ajoutées à ce stade.

Milieu minéral - Milieu minimum	
Composé	Concentration [g l ⁻¹]
(NH ₄) ₂ SO _{4(s)}	3
K ₂ HPO _{4(s)}	3
NaH ₂ PO ₄ , 2H ₂ O _(s)	3.3916
MgSO ₄ , 7H ₂ O _(s)	0.4884
C ₅ H ₈ NNaO ₄ , 1H ₂ O _(s)	1.8074
(Glutamate de sodium)	
Solution préparée dans de l'eau du réseau	

Tableau 16 : Composition du milieu minéral à la concentration finale du milieu minimum pour les précultures II, III et le fed-batch

d. Solutions d'alimentation

i. Solution saline

La solution saline principale est asservie au volume de la solution de glucose proche de 700 g l⁻¹. Elle est apportée dans un ratio de 1 / 10 en débit par rapport au débit de la solution de glucose concentré. La solution est préparée dans environ 100 ml initial d'eau osmosée. Les composés sont ajoutés dans l'ordre présenté dans le *Tableau 17*, puis le volume est ajusté avec de l'eau osmosée.

Composé	Concentration [g l ⁻¹]
KCl _(s)	20
NaCl _(s)	20
MgSO _{4(s)}	13.186
ZnSO _{4, 7H₂O(s)}	7.7
MnSO _{4, H₂O(s)}	0.47
CoCl _{2, 6H₂O}	0.3
CuSO _{4, 5H₂O(s)}	0.6
Na ₂ MoO _{4, 2H₂O(s)}	0.094
CaCl _{2, 2H₂O(s)}	6.4
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) _{2, 6H₂O(s)}	5.6
H ₃ BO _{4(s)}	0.3
H ₃ PO _{4(l)}	146.7
Solution préparée dans de l'eau osmosée	

Tableau 17 : Composition de la solution saline d'alimentation du fed-batch

ii. Source carbonée

Afin de pouvoir contrôler finement la croissance du microorganisme pour de faibles taux de croissance dès le début de l'inoculum, deux sources carbonées ont été mises en place. Il s'agit de deux sources de glucose à des concentrations différentes. Le premier apport est une alimentation en glucose à 50 g l⁻¹ et le second apport est une alimentation du même substrat mais à 700 g l⁻¹. Chaque solution est stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 30 min. Après stérilisation, la quantité de sucre est déterminée afin d'obtenir une conduite de culture optimale. L'alimentation avec la solution à 50 g l⁻¹ est dosée avec l'analyseur YSI (voir *III.B.3.a.i YSI - Glucose*), puis en HPLC (voir *III.B.3.a.ii HPLC - Glucose, acides organiques*). La solution concentrée, proche de 700 g l⁻¹, est déterminée par une mesure de la masse volumique de la solution par méthode gravimétrique.

iii. Solution de régulation pH

Pendant la croissance, la culture est régulée au pH de 5.5 avec une solution d'ammoniaque commerciale à 28 % (m/m). Le montage est préalablement stérilisé avec une goutte d'eau osmosée dans le montage par autoclavage à 121 °C pendant 20 min. Afin de limiter l'évaporation de l'ammoniac dans le ciel du bioréacteur, une canule plongeante dans le mout est installée. La solution d'ammoniaque est transvasée dans le montage sous une hotte à flux laminaire.

Après la croissance cellulaire, le suivi du moût est régulé avec une solution d'acide sulfurique à 0.15 mol l⁻¹. La solution est stérilisée à 121 °C pendant 20 min.

iv. Solution de vitamines

Afin de répondre aux besoins nutritionnels de la levure, une solution contenant sept vitamines est préparée. Cette solution est concentrée 1000 fois par rapport à la concentration nécessaire dans le milieu.

Pour 100 ml de solution, la solution est préparée en dissolvant une pastille de NaOH dans 10 ml d'eau osmosée, on ajoute ensuite la d-biotine, puis on ajuste le pH à 6.5 avec HCl. On ajoute ensuite les six autres vitamines dans l'ordre présenté dans le *Tableau 18* en rinçant le contenant de pesée avec un jet de pissette d'eau osmosée. On ajuste le pH à 6.5 avec du NaOH ou HCl.

Composé	Concentration [g l ⁻¹]
d-biotine(s)	0.05
Panthoténate(s)	1
Acide nicotinique(s)	1
Myo inositol(s)	25
Thiamine hydrochloride _(s)	1
Pyridoxol hydrochloride _(s)	1
Acide p-aminobenzoïque _(s)	0.2
Solution préparée dans de l'eau osmosée, ajustée à pH 6.5	

Tableau 18 : Composition de la solution de vitamines concentrée 1000 fois

Dans un premier temps, un flacon serti avec une goutte d'eau osmosée est stérilisé à l'autoclave à 121 °C pendant 20 min. La solution est transvasée sous une hotte à flux laminaire par filtration à travers un filtre stérile (porosité de 0.22 µm). La solution est conservée à l'abri de la lumière à une température de 4 °C. La solution de vitamines est ajoutée initialement au milieu dans les proportions de 1 ml pour 1 l. Au cours de la culture, la solution de vitamines est ajoutée au milieu de culture à raison de 1 ml pour 10 g de biomasse produit.

v. Solution d'antimousse

En cours de culture, le stress technologique ou nutritionnel fait apparaître de la mousse sur laquelle une certaine quantité de biomasse vient s'accumuler. La quantité de biomasse présente dans la phase liquide en sera alors modifiée. Pour éviter cela, une solution d'antimousse est ajoutée par une pompe à déclenchement manuel, de manière à répondre rapidement en fonction de l'évolution de la culture. L'antimousse utilisé est une solution de polypropylène glycol P2000 pur, stérilisée par autoclavage à 121 °C pendant 20 min.

III. METHODES

A. Cultures en bioréacteur

1. Stratégie des expérimentations

Dans cette partie, nous aborderons la stratégie de culture employée avec l'utilisation du logiciel LoCoPREL. L'objectif est de produire des concentrations élevées en biomasse catalytique, tout en gérant l'activité biologique par un contrôle du taux de croissance. Pour cela, les cultures sont conduites à des taux de croissance compris entre 0.05 et 0.2 h⁻¹, de manière à appliquer des taux de croissance identiques avec les deux microorganismes utilisés.

Afin de définir les débits d'alimentation minimum à envoyer, des simulations ont été effectuées à partir d'une concentration initiale en biomasse $X = 0.1 \text{ g l}^{-1}$ pour un volume initial de 10 l de milieu minimum. En considérant un rendement apparent $R_{X/S}$ sur glucose¹ de 0.5 g g⁻¹ et un taux de croissance en débit d'expérimentation à 0.1 h⁻¹, il est alors possible de définir les débits d'alimentation du bioréacteur. Le *Tableau 19* ci-après décrit des exemples de débit pour différentes concentrations en substrat.

$R_{X/S} [\text{g}_x \text{g}^{-1}]$	0.5	$\mu [\text{h}^{-1}]$		0.1	$V_{\text{liquide}} [\text{l}]$	10	
$X [\text{g l}^{-1}]$	Débit d'alimentation du substrat $[\text{ml h}^{-1}]$						
0.1	20	10	4	2	0.8	0.4	0.29
1	200	100	40	20	8	4	2.86
10	2000	1000	400	200	80	40	28.57
$C_{\text{glucose}} [\text{g l}^{-1}]$	10	20	50	100	250	500	700

Tableau 19 : Estimation des débits minimum d'alimentation dans le bioréacteur

Le bioréacteur est alimenté par le haut de la platine. Il est important que le débit d'alimentation soit suffisamment important, de manière à ce que les gouttes de substrats tombent assez rapidement dans le milieu afin d'éviter une carence. Dans le cas d'une stratégie d'apport de l'alimentation de type fed-batch, il est nécessaire que le volume apporté par le substrat soit le plus concentré possible pour limiter l'augmentation de volume total du moût. Or, si le substrat de départ était concentré ($C_{\text{glucose}} = 700 \text{ g l}^{-1}$), le débit d'apport initial serait de 0.29 ml h⁻¹. Afin de réaliser une alimentation adaptée aux pompes employées, une solution de glucose diluée est utilisée à une concentration de 50 g l⁻¹, jusqu'à l'obtention d'une concentration en biomasse supérieur à 1 g l⁻¹ dans le bioréacteur (voir *Tableau 19*), de manière à ce que l'alimentation avec le substrat concentré à 700 g l⁻¹ soit à un débit minimum de l'ordre de 3 ml h⁻¹. Cette valeur de débit minimum peut alors être assurée techniquement par les pompes utilisées.

¹ Rendement moyen sur glucose en g g⁻¹ pour les deux microorganismes investigués.

Inversement, il est également nécessaire de déterminer les débits maximums afin de calibrer nos pompes sur une plage de travail adaptée. Dans le cas extrême de l'application d'un taux de croissance à 0.2 h^{-1} pour les mêmes conditions que précédemment à une concentration en biomasse de 100 g l^{-1} (sans se pencher sur les problèmes liés au volume du bioréacteur), le débit nécessaire serait alors de 571 ml h^{-1} . Concrètement, la pompe de substrat est calibrée de 1 à 600 ml h^{-1} , mais de manière à pouvoir gérer les prélèvements, nous ne dépasserons pas les 200 ml h^{-1} d'apport. A partir de ce débit, celui-ci sera placé en débit constant de manière à faire diminuer le taux de croissance pour que la culture ne soit pas limitée en transfert de dioxygène, jusqu'à l'obtention d'une concentration en biomasse supérieure à 100 g l^{-1} .

2. Précultures et inocula

Les premières cultures ont été effectuées sans le logiciel LoCoPREL puisque celui-ci a été développé au cours de ce travail. L'utilisation de LoCoPREL permettant de gérer une conduite de culture dès les faibles concentrations en biomasse, les stades de préculture diffèrent suivant que l'on utilise ou pas LoCoPREL. Ils vont être détaillés séparément dans ce paragraphe.

a. Sans LoCoPREL

Les précultures d'*E. coli* et *Y. lipolytica* sont issues de précédentes expérimentations en bioréacteur de 20 l, qui sont indépendantes de l'étude présentée dans ce travail.

Dans le cas d'*E. coli*, la stratégie expérimentale visait une production de biomasse catalytique, à partir de glucose, en étudiant l'apparition de métabolites par application de différents taux de croissance sur la culture. Le transfert de cette culture sur l'outil expérimental a permis d'effectuer la culture I (voir *Chapitre IV*).

Dans le cas d'*Y. lipolytica*, la stratégie expérimentale consistait à mettre en place une conduite de culture spécifique en vue de l'étude des flux de carbone au sein du microorganisme. Deux cultures ont été transférées sur l'outil expérimental. La première culture récupérée, nommée culture IV dans le *Chapitre IV*, a été alimentée progressivement d'un substrat osidique (glucose) à un substrat lipidique (acide oléique) de manière à suivre la stratégie définie pour un autre travail de recherche. La seconde culture, nommée culture V dans le *Chapitre IV*, a été alimentée en glucose. Cependant, cette alimentation carbonée a été couplée à une limitation nutritionnelle. Ces cultures ont été réalisées et suivies au cours des travaux de thèse de doctorat de Bérange PORTELLI.

Ces premières expérimentations (culture I, IV et V dans le *Chapitre IV* et *V*), sans le logiciel LoCoPREL, ont été effectuées en transférant une partie du moût du bioréacteur initial au bioréacteur de l'outil expérimental utilisé pour ce travail de thèse, sans nécessairement appliquer toute la rigueur microbiologique liée à la préservation de la stérilité du milieu. Néanmoins, la haute concentration cellulaire du moût a permis d'assurer le transfert de la culture sans développement de contaminants.

b. Avec LoCoPREL

Avec le logiciel LoCoPREL (voir *Chapitre III*), il est possible d'inoculer avec une préculture ayant suivi les stades classiques de préparation avec conservation de la chaîne de stérilité.

Dans le cas d'*E. coli*, les stades de préculture et de culture sont effectués à 37 °C. Pour les étapes I_R, I, II et III, la verrerie est déposée sur une table d'agitation à une vitesse de 200 tr min⁻¹ dans une chambre à 37 °C.

Une goutte d'un cryotube stock (congelé et conservé à -80 °C) est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu riche LB gélosé. Puis, une colonie isolée est prélevée avec une anse stérile pour inoculer un tube contenant du milieu riche LB liquide (étape I_R). Les étapes I, II et III contiennent du milieu minimum avec 5 g l⁻¹ de glucose. Une goutte de l'étape I_R, prélevée avec une anse stérile, sert à inoculer un tube contenant du milieu minimum (étape I). Le tube est ensuite intégralement versé dans un erlenmeyer bafflé de 500 ml contenant 45 ml de milieu minimum pour aboutir à un volume total de 50 ml (étape II). Ce volume est ensuite transféré dans un erlenmeyer bafflé de 5 l contenant 450 ml de milieu minimum pour obtenir un volume final de 500 ml (étape III). Ces étapes sont schématisées dans la Figure 45.

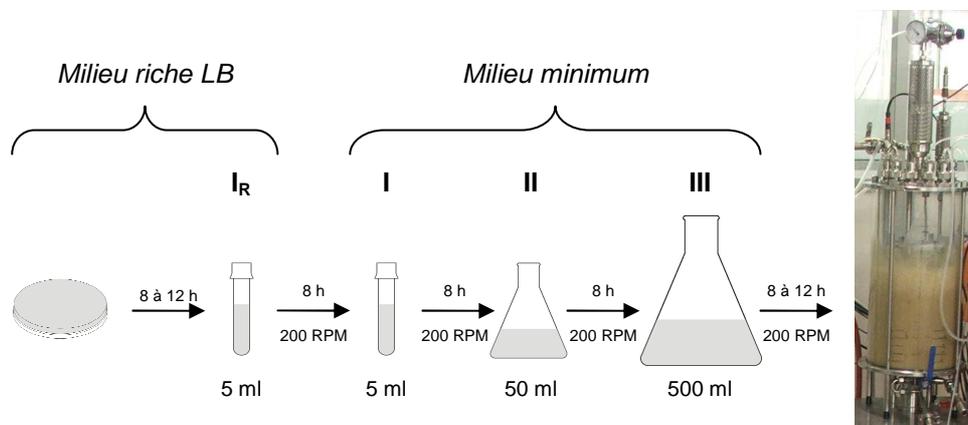


Figure 45 : Les stades de préculture d'*E. coli* jusqu'à inoculation dans le bioréacteur

Dans le cas d'*Y. lipolytica*, les stades de préculture sont effectués dans une chambre à 30 °C. La culture est ensuite régulée dans le bioréacteur à 28 °C. Pour les étapes de préculture II et III, la verrerie est déposée sur une table d'agitation à une vitesse de rotation de 100 tr min⁻¹ dans une chambre à 30 °C. L'étape de préculture I_R en tube est effectuée sur une table d'agitation à une vitesse de rotation de 200 tr min⁻¹.

Une goutte d'un cryotube stock (congelé et conservé à -80 °C) est étalée sur une boîte de Pétri contenant du milieu riche YPD gélosé. Puis, une colonie isolée est prélevée avec une anse stérile pour inoculer un tube contenant 5 ml milieu riche YPD liquide (étape I_R). Les étapes II et III contiennent du milieu minimum avec 10 g l⁻¹ de glucose. L'intégralité d'un tube de l'étape I_R sert à inoculer un erlenmeyer bafflé de 500 ml contenant 45 ml de milieu minimum pour aboutir à un volume total de 50 ml (étape II). Ce volume est ensuite transféré dans un erlenmeyer bafflé de 5 l contenant 450 ml de milieu minimum pour obtenir un volume final de 500 ml (étape III). Ce dernier erlenmeyer bafflé est ensuite utilisé pour inoculer le bioréacteur préalablement rempli de 10.5 l de milieu minimum. Ces étapes sont schématisées dans la Figure 46.

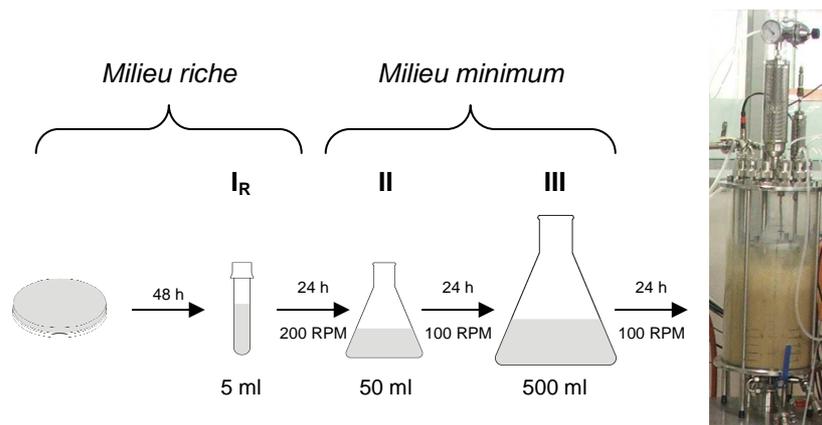


Figure 46 : Les stades de préculture d'*Y. lipolytica* jusqu'à inoculation dans le bioréacteur

3. Dispositif de bioréaction

Les cultures effectuées sur l'outil expérimental sont en mode discontinu alimenté (fed-batch). Le dispositif est utilisé dans sa configuration maximale d'utilisation :

- Contrôle par le logiciel LoCoPREL de 3 pompes d'alimentation (2 substrats + 1 sels d'alimentation), de la pompe de rhéologie en ligne, et de 2 pompes gérées manuellement (antimousse et sels complémentaires si besoin),
- Enregistrement en ligne jusqu'à 6 balances, du contrôle de l'aération par des débitmètres (régulateur et mesureur), de l'utilisation de l'ensemble des capteurs présents sur la boucle de dérivation et de la visualisation de différents calculs.

Le choix des plages de mesures de chaque capteur est configuré par l'opérateur avant le lancement de l'expérimentation. Pour les expérimentations biologiques, tous les capteurs ont été installés. Les variables mesurées en ligne par ces différents capteurs sont rassemblées dans le *Tableau 20*.

Nom LoCoPREL (variables mesurées)	[Unité]	Supervision
pO2_Fermenteur	[%]	Mesure
pH_Fermenteur	[U _{pH}]	Mesure et régulation
Temp_Fermenteur	[°C]	Mesure et régulation
Prelative	[bar]	Mesure
Debit_Massique	[kg h ⁻¹] ¹	Mesure
Masse_Volumique	[kg m ⁻³] ¹	Mesure
Temp_Debit	[°C] ¹	Mesure
Pdiff1	[mbar] ¹	Mesure
pH_Inox	[/]	Mesure
Temp_pH_Inox	[°C]	Mesure
pO2_Inox	[/]	Mesure
Temp_pO2_Inox	[°C]	Mesure
Pdiff2	[mbar] ¹	Mesure
Conductimetre	[mS cm ⁻¹]	Mesure
Temp_Conduc	[°C]	Mesure

Tableau 20 : Liste des mesures en ligne installées sur l'outil expérimental

Afin de s'approcher au mieux des conditions optimales de culture, le logiciel de pilotage et d'acquisition spécifiquement développé (nommé LoCoPREL) est utilisé. Codé en C# WinForm, il permet l'acquisition des données provenant des capteurs et la centralisation des informations provenant du reste de l'instrumentation utilisée. L'ensemble de ces variables récupérées est présenté dans le *Tableau 21*.

¹ L'unité du capteur dépend de la configuration effectuée par l'opérateur avant le lancement de l'expérimentation

Nom LoCoPREL (variables récupérées)	[Unité]	Origine
Debit_Gaz_Entree	[l h ⁻¹]	Module BROOKS
Masse_Substrat1	[g]	Balance
Masse_Substrat2	[g]	Balance
Masse_Sel1	[g]	Balance
Masse_Sel2	[g]	Balance
Masse_Acide1	[g]	Balance
Masse_Base1	[g]	Balance
Tension_PF	[V]	Module Agilent®
Tension_Substrat1	[V]	Module Agilent®
Tension_Substrat2	[V]	Module Agilent®
Tension_Sel1	[V]	Module Agilent®
Debit_Consigne_PF	[l h ⁻¹]	LoCoPREL
Debit_Substrat1	[ml h ⁻¹]	LoCoPREL
Debit_Substrat2	[ml h ⁻¹]	LoCoPREL
Debit_Sel1	[ml h ⁻¹]	LoCoPREL
Biomasse_PompeS1 (biomasse en consigne de la pompe substrat 1)	[g]	LoCoPREL
Biomasse_PompeS2 (biomasse en consigne de la pompe substrat 2)	[g]	LoCoPREL
Gaz_in_O2	[V]	Analyseur gaz
Gaz_in_CO2	[V]	Analyseur gaz
Gaz_in_N2	[V]	Analyseur gaz
Gaz_in_Ar	[V]	Analyseur gaz
Gaz_out_O2	[V]	Analyseur gaz
Gaz_out_CO2	[V]	Analyseur gaz
Gaz_out_N2	[V]	Analyseur gaz
Gaz_out_Ar	[V]	Analyseur gaz
Gaz_out_EtOH	[V]	Analyseur gaz

Tableau 21 : Liste des variables récupérées par le logiciel LoCoPREL

A partir de ces différentes informations, une série de calculs est effectuée afin d'obtenir un maximum d'indicateurs sur le déroulement de la culture. Les noms de ces variables calculées sont rassemblés dans le *Tableau 22* et le *Tableau 23*. Le détail des calculs est présenté dans la partie *IV.C Données microbiologiques*.

Nom LoCoPREL (variables calculées)	[Unité]	Descriptif
Volume_Liquide	[l]	Volume de liquide dans le bioréacteur
Volume_Ciel_Gazeux	[l]	Volume de gaz dans le bioréacteur
QR_r	[/]	Coefficient respiratoire obtenu à partir des vitesses
QR_Gaz	[/]	Coefficient respiratoire obtenu à partir des fractions volumiques molaires
Debit_Gaz_Sortie_N2	[l h ⁻¹]	Débit de gaz sortant du bioréacteur
Debit_Gaz_Sortie_Ar	[l h ⁻¹]	Débit de gaz sortant du bioréacteur
Cmol_Substrat1	[Cmol]	Quantité de carbone apportée par les substrats 1 ou 2
Cmol_Substrat2	[Cmol]	
Cmol_tot	[Cmol]	Quantité totale de carbone apportée
Conc_Cmol_Accumule	[Cmol l ⁻¹]	Carbone apporté, retranché du CO ₂
Conc_g_Biomasse_Accumule	[g l ⁻¹]	(par volume de liquide)
O2_Conso_tot	[mol]	Dioxygène total consommé
CO2_Produit_tot	[mol]	Dioxyde de carbone total produit

Tableau 22 : Liste des variables calculées (première partie)

Nom LoCoPREL (variables calculées)	[Unité]	Descriptif
RO2X_mol	[mol _{O2} Cmol _X ⁻¹]	Rendement global
RO2X_dt_mol	[mol _{O2} Cmol _X ⁻¹]	Rendement instantané
RO2X_g	[g _{O2} g _X ⁻¹]	Rendement global
RO2_dt_g	[g _{O2} g _X ⁻¹]	Rendement instantané
RCO2X_mol	[mol _{CO2} Cmol _X ⁻¹]	Rendement global
RCO2X_dt_mol	[mol _{CO2} Cmol _X ⁻¹]	Rendement instantané
RCO2X_g	[g _{CO2} g _X ⁻¹]	Rendement global
RCO2_dt_g	[g _{CO2} g _X ⁻¹]	Rendement instantané
μO2_Fermenteur	[h ⁻¹]	Taux de croissance
μO2_Inox	[h ⁻¹]	Taux de croissance
μsubstrat1	[h ⁻¹]	Taux de croissance fixé (substrat 1)
μsubstrat2	[h ⁻¹]	Taux de croissance fixé (substrat 2)
μBase	[h ⁻¹]	Taux de croissance
μO2	[h ⁻¹]	Taux de croissance (gaz)
μCO2	[h ⁻¹]	Taux de croissance (gaz)
Nmol_tot	[mol]	Azote total apporté
Nmol/Cmol	[mol _N mol _C ⁻¹]	Rapport élémentaire N / C
Rxs_mol	[x mol _C substrat mol _C ⁻¹]	Rendement global
Rxs_dt_mol	[x mol _C substrat mol _C ⁻¹]	Rendement instantané
Rxs_g	[g _X g _{substrat} ⁻¹]	Rendement global
Rxs_dt_g	[g _X g _{substrat} ⁻¹]	Rendement instantané
Redox_Substrat1	[/]	Redox apporté par le substrat 1
Redox_Substrat2	[/]	Redox apporté par le substrat 2
Redox_Accumule	[/]	/
Kla_estime	[h ⁻¹]	Estimation du k _l a de dioxygène
Kla_experimental	[h ⁻¹]	Mesure calculé du k _l a de dioxygène
Kla_exp_MoyLog	[h ⁻¹]	Mesure calculé du k _l a de dioxygène
rO2	[mol h ⁻¹]	Vitesse instantanée de O ₂
rO2_I	[mol l ⁻¹ h ⁻¹]	Vitesse instantanée normée de O ₂
rCO2	[mol h ⁻¹]	Vitesse instantanée de CO ₂
rCO2_I	[mol l ⁻¹ h ⁻¹]	Vitesse instantanée normée de CO ₂
qO2_mol	[mol _{O2} mol _X ⁻¹ h ⁻¹]	Vitesse spécifique de O ₂
qO2_g	[g _{O2} g _X ⁻¹ h ⁻¹]	Vitesse spécifique de O ₂
qCO2_mol	[mol _{CO2} mol _X ⁻¹ h ⁻¹]	Vitesse spécifique de CO ₂
qCO2_g	[g _{CO2} g _X ⁻¹ h ⁻¹]	Vitesse spécifique de CO ₂

Tableau 23 : Liste des variables calculées (seconde partie)

L'ensemble du dispositif expérimental lié à la conduite de la culture peut être schématisé par la Figure 47.

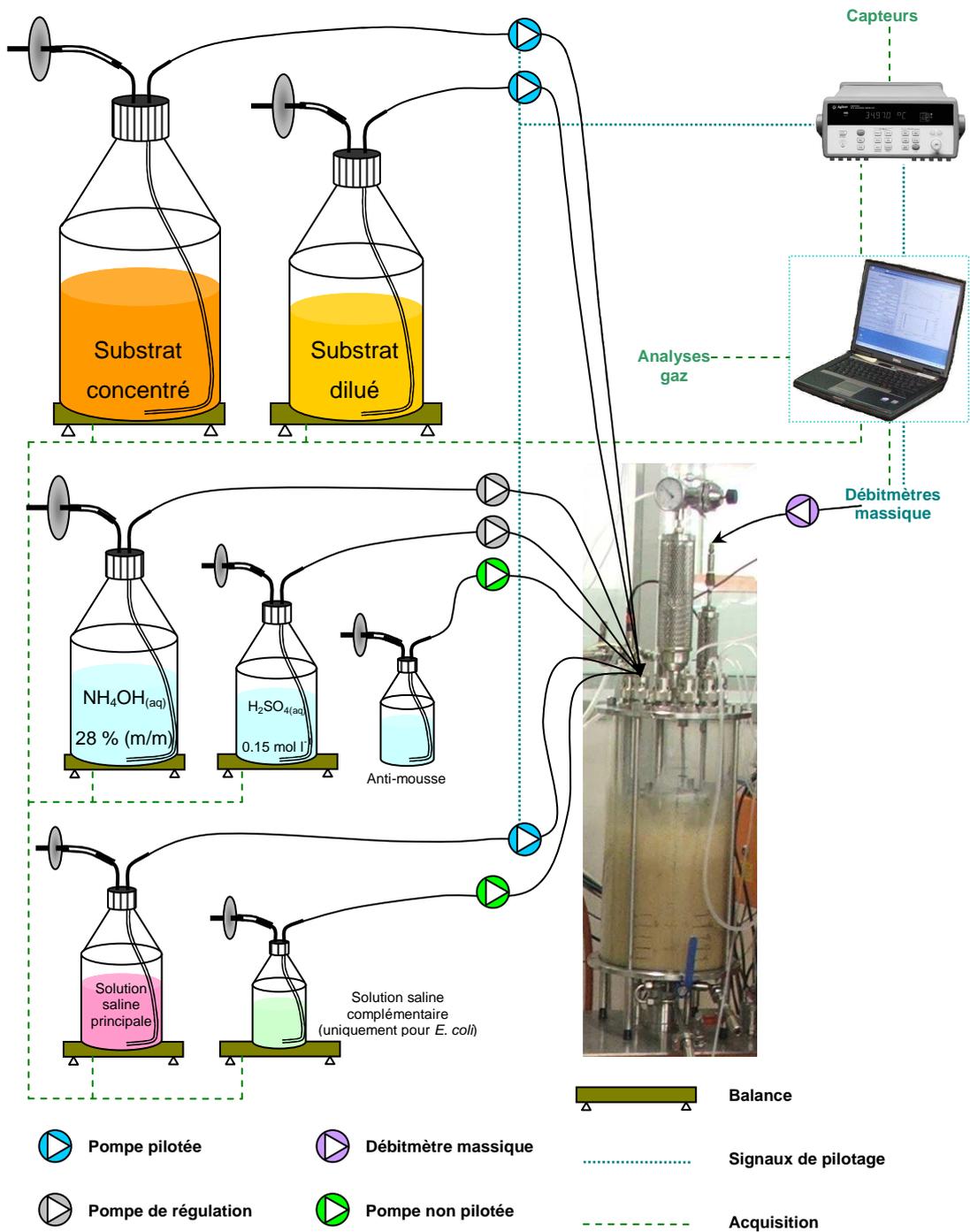


Figure 47 : Schéma général de la partie bioréacteur de l'outil expérimental

B. Techniques analytiques hors-ligne

1. Concentration en biomasse

a. Mesure d'absorbance

En cours de culture, une information sur la concentration en matière sèche est effectuée par une mesure de l'absorbance du milieu de culture sur une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm pour les levures et $\lambda = 620$ nm pour les bactéries. L'absorbance est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre biochrom® Libra SA Visible (Part number 80-5000-00, SN 88000). L'échantillon est placé dans une cuve « Special Optical Glass » de Hellma®, Allemagne (transmission > 80 % de 350 à 2000 nm), avec un trajet optique de 2 mm. Le blanc est effectué avec la même cuve, préalablement rincée et remplie d'eau osmosée. L'échantillon est dilué de manière à toujours obtenir une absorbance entre 0.2 et 0.6 UA afin de rester dans une zone linéaire.

b. Mesure gravimétrique

Pour les bactéries, la méthode de mesure gravimétrique par filtre est utilisable jusqu'à une concentration de l'ordre de 5 g l^{-1} . Au-delà de cette valeur, le filtre se colmatant trop rapidement, un biais apparaît sur la quantité de biomasse déposée. Pour des concentrations supérieures à 5 g l^{-1} , il est nécessaire d'effectuer une mesure de la concentration en biomasse par une méthodologie gravimétrique utilisant des eppendorfs.

i. Gravimétrie par filtres

Avant le lancement de l'expérimentation, des boîtes contenant des filtres (Sartolon Polyamid, Sartorius stedim biotech, Allemagne) dans des coupelles numérotées sont placées pendant 24 à 48 h dans une étuve à $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sous 200 mbar de pression absolue, avec du silicagel afin de les sécher. Avant de procéder à la pesée, les boîtes sont sorties, puis aussitôt placées à température ambiante pendant 1 h dans une étuve contenant du silicagel. Puis, les coupelles contenant les filtres sont pesées sur une balance de précision à 10^{-5} g. La manipulation des coupelles s'effectue avec une pince.

Sur le fritté d'un système büchner, un filtre de porosité adapté ($0.22 \text{ }\mu\text{m}$ pour les bactéries, $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ pour les levures) est disposé avec une pince. A partir de moût brut et préalablement vortexé (afin de resuspendre les cellules ayant décanté, sans intégrer une phase gaz), un volume précis de suspension cellulaire est prélevé avec une pipette jaugée, puis déposé progressivement sur le filtre sans toucher les bords du büchner.

Enfin, le filtre chargé de cellules est remis dans la coupelle initiale. Lorsque l'ensemble des boîtes seront remplies, elles seront mises à l'étuve à $60 \text{ }^\circ\text{C}$, sous 200 mbar de pression absolue, avec du silicagel afin de les sécher pendant un minimum de 48 h. Les coupelles seront à nouveau pesées afin de retrouver la concentration en matière sèche de la suspension cellulaire en lien avec le volume filtré.

ii. Gravimétrie par eppendorfs

Avant le lancement de l'expérimentation, des eppendorfs (Sorenson™ BioScience, Inc.) sont numérotés, percés 4 fois sur le bouchon avec une aiguille, disposés dans des boîtes, puis placés

pendant 24 à 48 h dans une étuve à 60 °C, sous 200 mbar de pression absolue, avec du silicagel afin de les sécher. Avant de procéder à la pesée, les boîtes sont sorties, puis aussitôt placées pendant 1 h dans une étuve à température ambiante avec du silicagel. Enfin, les eppendorfs sont manipulés avec une pince pour être pesés sur une balance de précision à 10^{-5} g.

Juste avant le lancement de l'expérimentation, une pipette multi avec un cône à déplacement de piston est calibrée sur de l'eau pour un volume de l'ordre de 1.4 ml. Lors de l'expérimentation, à l'aide d'une pipette multi avec un cône à déplacement de piston, un petit volume de suspension cellulaire est prélevé afin de conditionner le cône de prélèvement. Un volume de l'ordre de 10 ml est prélevé sans bulle apparente, puis un volume précis de 1.4 ml est déposé dans chaque eppendorf. Ceux-ci sont centrifugés à $13400 \text{ tr min}^{-1}$ pendant 3 min. Le surnageant est jeté, et l'eppendorf est remis dans la boîte. Lorsque l'ensemble des boîtes est rempli, celles-ci sont mises à l'étuve à 60 °C, sous 200 mbar de pression absolue, avec du silicagel afin de les sécher les eppendorfs pendant un minimum de 7 jours. Les eppendorfs seront à nouveau pesés afin de retrouver la concentration en matière sèche de la suspension cellulaire pour un volume de 1.4 ml.

On remarque que lors des phases d'expérimentation où l'activité cellulaire est réduite, le temps de centrifugation est augmenté jusqu'à 15 minutes pour avoir un surnageant le plus clair possible. De plus, il est nécessaire d'avoir une concentration de l'ordre de 5 g l^{-1} minimum afin d'avoir une pesée significative.

2. Analyses physiques

a. Caractérisation des cellules

i. Microscopie

La microscopie a pour finalité d'obtenir des prises de vue les plus nettes possibles, tout en ayant une résolution maximale. La résolution d'un microscope désigne sa capacité à séparer des détails très proches. Cependant, malgré la qualité du matériel utilisé, la résolution d'un microscope est inévitablement limitée par la diffraction de la lumière. Selon la théorie d'Abbe, la limite de résolution $d_{\text{résolution}}$ d'un microscope est la plus petite distance en dessous de laquelle deux points ne sont plus distingués. Cette grandeur est définie par l'Équation 71.

$$d_{\text{résolution}} = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin \theta}$$

Équation 71 : Limite de résolution du microscope optique

Dans l'Équation 71, λ est la longueur d'onde d'illumination, n est l'indice de réfraction en sortie de l'objectif et θ est le demi-angle du cône de lumière maximum ($n \cdot \sin \theta$ est aussi appelé ouverture numérique de l'objectif). De manière à augmenter le pouvoir résolutif du microscope, il est nécessaire soit d'augmenter l'indice de réfraction en sortie de l'objectif, soit de diminuer la longueur d'onde de l'éclairage.

Dans notre cas, les observations microscopiques sont effectuées entre lame et lamelle, sous huile ($n = 1.518$), de manière à augmenter la résolution du microscope. Le microscope utilisé est le

OLYMPUS BH2-RFCA (SN : 1J0769), avec les objectifs DPlanApo40UVPL (SN : 105592) et DApo100UVPL (SN : 106051). Avec ce dernier objectif, la résolution de l'observation atteint $0.15 \mu\text{m}$. Les échantillons utilisés pour la microscopie proviennent de la dilution effectuée pour la mesure de la concentration en biomasse par lecture de l'absorbance. Le grossissement utilisé est le X100 sous huile. L'acquisition de la prise de vue est effectuée avec la caméra Nikon DIGITAL SIGHT DS-Ri1. Les images sont numérisées au format TIFF par l'intermédiaire du logiciel NIS-Elements Basic Research 3.21.04 pour une dimension de 1280×1024 pixels. Enfin, pour chaque échantillon, un minimum de quatre prises de vue est enregistré.

ii. Granulométrie laser

Le granulomètre utilisé est le Mastersizer 2000 de la société Malvern Instruments. Il permet de mesurer la taille des microorganismes sur le principe de diffraction laser de particules dispersées. Cet appareil permet de mesurer une gamme de taille allant de 0.02 à $2000 \mu\text{m}$.

La mesure s'effectue à partir de la réponse de l'échantillon suite à la sollicitation par un faisceau laser, issu d'un tube gaz Hélium Néon. Le laser est collimaté pour obtenir un faisceau parallèle de 18 mm de diamètre et émet une lumière rouge de faible puissance. Les particules doivent être diluées et mises en circulation dans une cellule avant d'effectuer la mesure. Les particules éclairées par la lumière issue du laser dévient ainsi la lumière de son axe principal, permettant à l'appareil de remonter à une taille de particule (voir *Figure 48*).

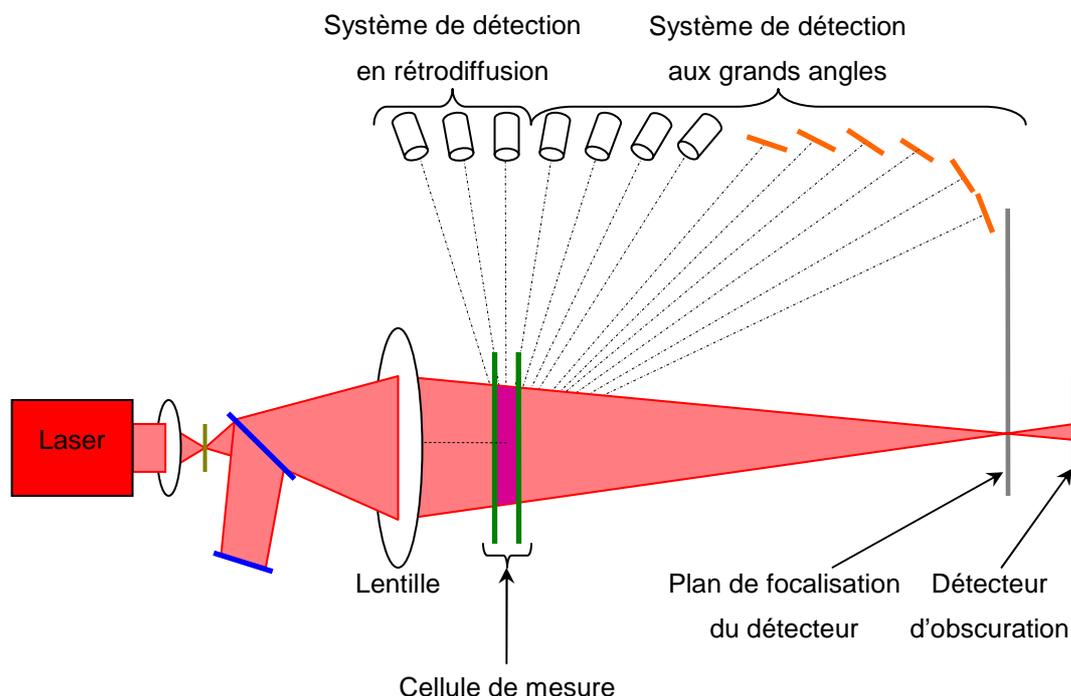


Figure 48 : Principe du banc optique du granulomètre laser Mastersizer 2000 (Malvern®)

La quantité de lumière déviée, ainsi que l'angle de déviation (mesuré de 0.01 à 130°), permettent de mesurer avec précision la taille des particules. Les intensités lumineuses reçues aux différents angles par des photodiodes en silicium sont numérisées, puis converties, à partir de la théorie de la diffraction et de la diffusion de Mie, en taille de particule. Cependant, cette solution analytique particulière des

équations de Maxwell reste correcte sous condition que les particules analysées soient des sphères. Or, dans des situations réelles, les suspensions microbiennes analysées peuvent très largement s'éloigner de cette hypothèse de sphéricité.

Le granulomètre permet de calculer des valeurs de diamètre sur l'hypothèse que la réponse mesurée est celle d'une particule sphérique. Sur la classification d'Allen, on parlera alors de diamètre en volume (Allen, 1997). Nous reviendrons sur la notion de diamètre dans la partie *IV.B.2.a Diamètre équivalent*.

iii. Morphogranulométrie

L'appareil Morphologi G3S (Malvern Inst. Automated Particle Characterization System, SN : MAL1033756) mesure les caractéristiques morphologiques (dimensions, formes) de particules. Les particules peuvent être obtenues à partir d'un fichier déjà existant ou du microscope de l'appareil. Dans le cas de l'utilisation du microscope, les particules analysées peuvent être préparées par voie sèche (dispersion des particules d'intérêt sur une plaque en verre transparente) ou par voie humide (observation microscopique classique entre lame et lamelle) pour une meilleure répétabilité des mesures. Les caractéristiques de la caméra sont rassemblées dans le *Tableau 24* ci-dessous.

Système caméra	Caractéristiques
Type de caméra	1/1.8" Global shutter progressive scan CCD
Type de connexion	IEEE 1394a (Firewire™)
Nombre de pixels	2592 x 1944 (5 MegaPixel)
Taille des pixels	2.7 µm x 2.7 µm
Taille du capteur	7.20 mm x 5.40 mm

Tableau 24 : Caractéristiques de la caméra du Morphologi® G3S

L'analyse d'image effectuée permet d'accéder à un grand nombre de mesures géométriques par particule, autorisant une analyse statistique basée sur le nombre de particules. Cette technique d'analyse est particulièrement adaptée pour détecter la présence de particules étrangères et pour conduire des analyses statistiques sur une ou plusieurs populations.

L'instrument Morphologi® G3S présente le net avantage d'effectuer des prises de vue standardisées et automatisées, ainsi qu'un traitement de l'image en ligne intégrant, dans une procédure définie, la binarisation de l'image et son seuillage. Les optiques utilisées permettent d'obtenir des analyses bornées par leur capacité optique. Leurs caractéristiques sont rassemblées en *Annexe 4 : Spécifications techniques du système optique du Morphologi G3S®*.

De multiples paramètres dimensionnels et morphologiques sont calculés pour chaque particule sur le principe de la *Figure 49*.

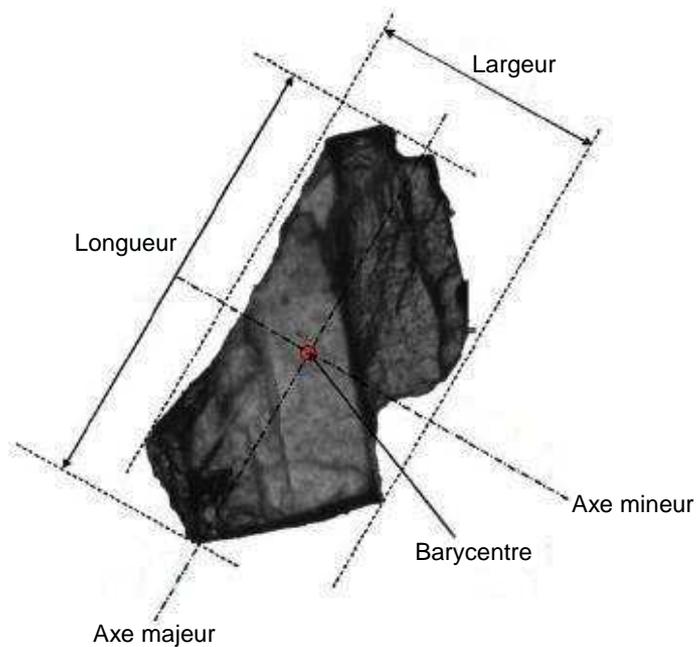


Figure 49 : Principe de la mesure de distance géométrique sur une particule

Suite à ces premières déterminations géométriques, de nouveaux paramètres sont mesurés et calculés. Des explications schématiques de ces paramètres sont développées en *Annexe 5 : Description des paramètres morphologiques*. La liste de ces paramètres est présentée dans le *Tableau 25*.

Nom	Abréviation	Mesure / Calcul
Longueur	Lon	Mesure
Largeur	Lar	Mesure
Périmètre réel	Per	Mesure
Aire réelle	Air	Mesure
Diamètre du cercle équivalent	Dce	Mesure
Circularité	Cir	$Cir = \frac{Pce}{Per}$
Circularité haute sensibilité	Chs	$Chs = Cir^2 = \left(\frac{Pce}{Per}\right)^2$
Rapport d'aspect	Asp	$Asp = \frac{Lar}{Lon}$
Elongation	Elo	$Elo = 1 - Asp = 1 - \left(\frac{Lar}{Lon}\right)$
Périmètre convexe	Pco	Mesure
Convexité	Con	$Con = \frac{Pco}{Per}$
Aire convexe	Aco	Mesure
Solidité	Sol	$Sol = \frac{Aco}{Air}$

Tableau 25 : Liste des paramètres morphologiques intégrée par le Morphologi® G3S

Ainsi, pour chaque analyse morphométrique, une série de paramètres nous permet de pouvoir décrire nos échantillons. Nos analyses se déroulent en voie humide, entre lame et lamelle. Les échantillons sont préalablement dilués dans de l'eau physiologique afin d'obtenir une absorbance entre 0.3 et 0.6, s'assurant que les cellules sont correctement séparées. Puis, afin de stopper l'évaporation de l'échantillon pendant l'analyse, un vernis est mis autour de la lamelle. Les objets à caractériser étant les microorganismes de nos cultures, deux protocoles distincts sont utilisés. Leurs caractéristiques sont rassemblées dans le *Tableau 26*.

Configuration	Bactérie (culture III)	Levure (culture VI)
Porte-échantillon	4 Slide Plate (75x25 mm) Compensation de planéité Lamelle présente sur l'échantillon Diascopique	
Illumination	Intensité de calibration : 80 Tolérance : 0.2	
Optique	50X (0.5 µm - 40 µm) Recouvrement : 40 % Focus manuel	
Seuil de contraste	190 à 255	0 à 170
Surface analysé	Forme rectangulaire 1 x 1 mm	Forme rectangulaire 2 x 2 mm
Analyse des particules	Version du logiciel : 3.00 Nombre minimum de pixel : 10	
Filtres	Aucun en cours d'analyse	

Tableau 26 : Configuration des protocoles de mesure du Morphologi G3S

Dans le *Tableau 26*, on observe que les seuils de contraste à appliquer entre l'analyse de bactérie et de levure sont totalement différents. En effet, lors de la mise au point de l'image, il sera nécessaire de focaliser les bactéries au niveau de leurs membranes, de manière à les voir plus claires que le fond ; ceci permettra de détecter les cellules. Les bactéries ayant des tailles caractéristiques proches des limites d'utilisation de l'appareil, cette focalisation est nécessaire sinon les cellules n'auront pas suffisamment de contraste pour être détectées. Au contraire, les levures ayant une taille plus importante, il est nécessaire de faire la mise au point de l'image afin de voir correctement l'intérieur des cellules. Dans ce cas, le contraste de gris est suffisamment important pour que les cellules soient correctement identifiées.

Lors de l'analyse de nos résultats, des filtres sont placés de manière à enlever les éléments parasites issus d'une mauvaise détection des objets. Cette étape n'est pas faite pendant l'acquisition des données afin d'avoir une mesure la plus représentative de l'échantillon en biaisant au minimum les résultats obtenus à cause du traitement. Les filtres appliqués pour l'analyse des bactéries et des levures sont rassemblés dans le *Tableau 27*.

Paramètres filtrés	Culture III	Culture VI
Aire mini (nombre de pixel)	20	
Convexité	= 1.000	
Elongation	= 0.000	
Aire maxi (nombre de pixel)	1250	20000

Tableau 27 : Paramètres de filtrage permettant de retirer les particules détectées par l'analyse d'image mais ne correspondant pas à des cellules

Les modifications géométriques sont suivies pour chaque analyse sur un minimum de 1000 cellules par prise de vue, et pouvant monter jusqu'à 25000 cellules après filtrage. Les analyses ont été répétées sur un même échantillon, de manière à procéder à une classification statistique (type dendrogramme). Ce traitement permet d'identifier des paramètres permettant de rassembler des échantillons proches. De plus, si les mêmes échantillons se trouvent à nouveau rassemblés, et que des groupes apparaissent distincts, cela indiquera qu'un paramètre a suivi une évolution et doit être étudié plus en détail.

Le morphomètre permet également de déterminer des diamètres équivalents par l'analyse de la distribution de taille de l'échantillon de cellules analysées. Dans ce cadre, le principe de l'appareil permet alors la détermination de diamètre en surface (cf. *Tableau 34*), et la détermination de $d_{3,2}$ (diamètre de Sauter) correspondant au diamètre équivalent le plus adapté suite à une obtention de résultat issu d'une analyse en 2D.

iv. Zetamétrie

La mesure du potentiel zeta des cellules s'effectue à partir du Zetasizer Nano-ZS de chez Malvern Instruments® (modèle : ZEN3600, SN : MAL1008061). Cet appareil procède à une mesure du potentiel zeta par effet Doppler.

Tout d'abord, un champ électrique alternatif est appliqué entre deux électrodes de manière à mettre en mouvement les particules chargées. Ce changement rapide de champ électrique permet de réduire la polarité des électrodes, améliorant la précision des mesures. La position de la mesure dans la cellule ne perturbe plus la valeur du potentiel zeta. Enfin, il est alors possible de négliger l'électro-osmose devant la mobilité électrophorétique des particules, permettant de déterminer le potentiel zeta. Un laser Helium-Néon est utilisé comme source lumineuse. Il est séparé en deux faisceaux, comme illustré en *Figure 50*.

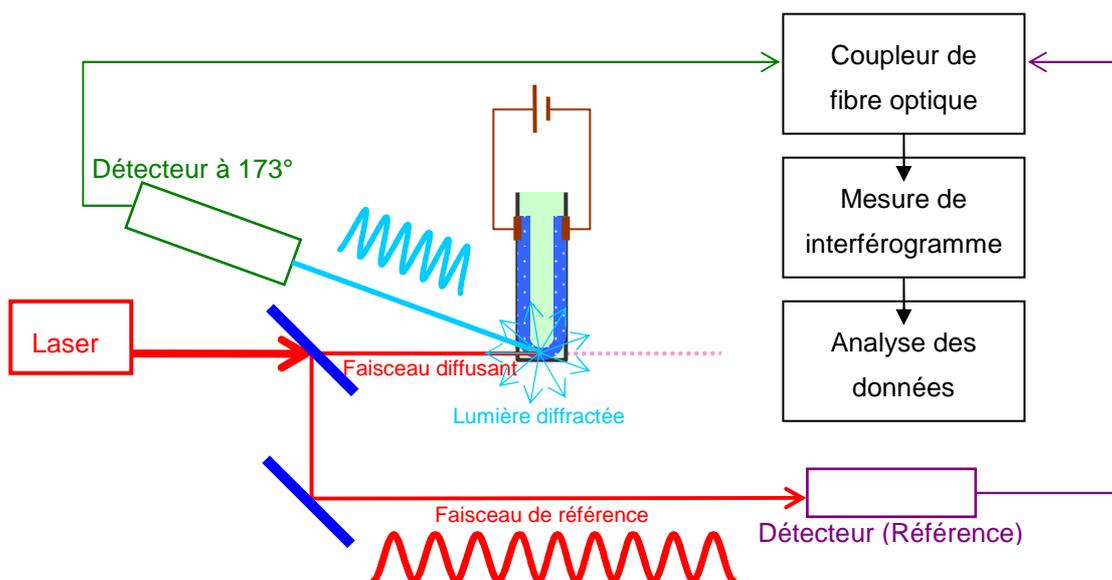


Figure 50 : Schéma de principe de la mesure du potentiel zeta par effet Doppler

La lumière diffractée par les particules en mouvement subit une variation de fréquence. La fréquence de la lumière étant très élevée ($f \approx 10^{14}$ Hz), la variation de fréquence ne peut être mesurée que par un système optique du type interféromètre. Le laser est divisé en deux sources identiques. Le premier faisceau passe au travers de l'échantillon ; c'est le faisceau diffusant. Le second ne traverse pas et sert de référence ; c'est le faisceau de référence. La lumière diffractée, issue des particules, provenant du faisceau diffusant, est combinée avec le faisceau de référence pour créer des variations d'intensité, formant ainsi un interférogramme. L'interférence de la lumière diffractée sur le faisceau de référence produit un interférogramme. Celui-ci montre un faisceau modulé de fréquence beaucoup plus faible produit par la différence de fréquence entre le faisceau de référence et le faisceau diffusé. Les interférences produisent des variations d'intensité avec une fréquence proportionnelle au déphasage. Ces fluctuations sont localisées sur un détecteur.

L'amplitude de la déviation Doppler est déterminée en comparant la fréquence « recombinaison » à la fréquence du faisceau de référence. La fréquence du faisceau de référence est modulée à partir du modulateur (cristal piézoélectrique supportant un miroir oscillant à une fréquence de 320 Hz). La mobilité des particules, sous l'effet d'un champ électrique, produit alors un décalage de fréquence. Le décalage de fréquence donne le signe et la valeur du potentiel zeta mesuré.

L'analyse des échantillons est effectuée post-expérimentation. Au moment d'un prélèvement, environ 1.4 ml de moût est placé dans un eppendorf, puis conservé à 4 °C jusqu'aux analyses de potentiel zeta.

Juste avant de commencer la série d'analyses, une solution de NaCl à 3 mmol l⁻¹ est préparée dans de l'eau MilliQ. Le pH de la solution est mesuré à 6.05. Cette solution est appelée solution standard car celle-ci sera utilisée pour la mesure des cellules de *E. coli* et *Y. lipolytica*, dont les pH de culture sont respectivement régulés à 6.8 et 5.5. Sa concentration est fixée à 3 mmol l⁻¹ afin que le courant pendant l'analyse n'échauffe pas trop l'échantillon. Le sel utilisé est le chlorure de sodium afin de se rapprocher de l'eau physiologique. A cette concentration, il est possible de préparer des solutions où le pH est fixé avec d'autres espèces et pour une force ionique équivalente, autorisant une analyse pour différents pH. Dans le cas de notre étude, nous nous restreindrons à la comparaison des analyses de cellules pour la solution standard à 3 mmol l⁻¹.

Chaque échantillon est lavé 3 fois. Pour cela, celui-ci est centrifugé à 13400 tr min⁻¹ pendant 3 min ; le surnageant est jeté, et le culot de cellule est resuspendu dans environ 1 ml de la solution standard, puis à nouveau centrifugé, etc. A la fin du troisième lavage, l'échantillon est resuspendu dans environ 1 ml de solution standard, et puis conservé 5 minutes minimum dans la glace avant sa dilution et son introduction dans la cellule de mesure.

v. Cendres

La quantification des cendres permet d'évaluer globalement la proportion inorganique contenue dans la biomasse. Ainsi, une importante dérive de la proportion de cendre permettra de détecter une modification de la composition élémentaire de la biomasse. Les échantillons utilisés pour la mesure

des cendres sont les filtres séchés, contenus à l'étuve à 60 °C sous 200 mbar de pression absolue, pour la détermination de la concentration en biomasse.

Dans un premier temps, des tubes à hémolyse vides sont placés sur un portoir métallique. Ils sont ensuite calcinés dans un four par l'application du programme de température contenu dans le *Tableau 28*.

Etape	Durée [h]	Température initiale [°C]	Température finale [°C]
Rampe	2	20	550
Plateau	12	550	550

Tableau 28 : Programmation de la température de calcination pour la détermination des cendres de la biomasse

A la fin de la calcination, les tubes sont placés pendant 1 h dans un dessiccateur à température ambiante avant d'effectuer leur pesée.

Les filtres contenant la biomasse sont ensuite placés dans les tubes à hémolyse et calcinés. Avant le démarrage de la calcination, 20 µl d'une solution de nitrate d'ammonium (NH₄NO₃) à 20 g l⁻¹ sont ajoutées pour améliorer la calcination de la matière organique. Les échantillons sont ensuite calcinés selon le programme de température du *Tableau 28*, puis placés 1 h dans un dessiccateur, avant d'être à nouveau pesés. Une nouvelle calcination est effectuée avec ajout de nitrate d'ammonium jusqu'à l'obtention d'une pesée stable à ± 0.05 mg et d'une erreur relative par rapport à la précédente inférieure à 0.1 %.

b. Caractérisation des fluides et des moules

i. Densimétrie

Le densimètre base sa mesure de masse volumique sur la mesure d'une oscillation mécanique induite sur un tube en « U ». Un aimant est fixé sur le tube en « U » vibrant à différentes fréquences dépendant de la masse volumique du fluide contenu dans ce même tube. La période d'oscillation t du système se modifie en fonction de la masse totale du système (tube en « U » + volume de fluide à l'intérieur du tube). Le volume intérieur du tube étant défini et constant pour une température donnée, la période d'oscillation du système est alors directement liée à la masse volumique du fluide contenu dans le tube. Il est possible d'exprimer la masse volumique de l'échantillon en fonction de la période d'oscillation du tube. L'expression analytique est présentée par l'*Équation 72*.

$$\rho_{\text{ech}} = \left(\frac{K_p}{4\pi^2 V_{\text{cell}}} \right) \times t^2 + \left(-\frac{m_U}{V_{\text{cell}}} \right)$$

Équation 72 : Relation entre la masse volumique et la période d'oscillation du tube en « U » de mesure

Dans l'Équation 72, K_p représente la constante de la cellule, m_{ech} et m_{cell} respectivement la masse de l'échantillon et la masse de la cellule (tube), ρ_{ech} est la masse volumique de l'échantillon et V_{cell} est le volume intérieur de la cellule de mesure.

La période d'oscillation est alors une fonction de la masse volumique d'un échantillon. Pour ainsi retrouver la valeur de ρ_{ech} , il est alors nécessaire de calibrer l'appareil à partir de deux échantillons connus. Cette manipulation permet alors de retrouver les coefficients du polynôme du second degré en t permettant la détermination de ρ_{ech} . Dans notre cas, nous calibrerons l'appareil avec de l'air et de l'eau osmosée à la température de la culture effectuée. La température de l'analyse est régulée par effet Peltier et contrôlée par un capteur situé entre les deux branches du tube en « U ». L'échantillon est introduit lentement par le bas du tube en utilisant une seringue. Les connections aux tubes sont en PEEK, polymère résistant et inerte pour une grande gamme de classes de produits chimiques. Le volume du tube est de l'ordre de 1 ml (valeur précise non indiquée dans la documentation et dépendante de la température d'analyse). Pour une mesure sûre, il est préférable de rincer la cellule par un volume d'échantillon de minimum 3 fois le volume de la cellule. Il est nécessaire de s'assurer que celle-ci ne contient pas de bulles d'air, ce qui modifierait, diminuerait et biaiserait la valeur de la mesure. Le densimètre donne des valeurs précises à 10^{-4} g ml⁻¹.

ii. Rhéométrie

La caractérisation rhéologique hors-ligne des milieux synthétiques est effectuée sur un rhéomètre Bohlin C-VOR 200. L'essentiel des mesures de caractérisation a été réalisé avec une géométrie de type cône plan de 60 mm de diamètre, 2° d'angle et un entrefer de 70 μ m. Les mesures ont été effectuées par paliers, de manière à obtenir pour chacun un régime stationnaire de cisaillement au sein du fluide pendant sa caractérisation. Un pré-cisaillement de 300 s⁻¹ est appliqué pendant 20 s, suivi de 10 s de repos. La plage de cisaillement utilisée est comprise entre 1 et 1000 s⁻¹, avec une répartition logarithmique des valeurs de palier.

La détermination de la viscosité des fluides newtoniens est obtenue par la moyenne des valeurs obtenues entre 10 et 100 s⁻¹, de manière à avoir une mesure de couple la plus significative possible.

Lors du suivi de cultures (suspensions de cellules), des mesures ont également été effectuées sur les prélèvements avec des géométries striées plans parallèles de 40 mm de diamètre et un entrefer de 300 μ m. L'utilisation de cette dernière géométrie permet de détecter un éventuel phénomène de glissement (lié à un gradient de concentration au voisinage des parois). Dans notre étude, aucun glissement n'a pu être observé pour une vitesse de cisaillement inférieure à 200 s⁻¹.

De manière générale, toutes les mesures ont été effectuées de manière à ce que le couple mesuré par le rhéomètre soit supérieur à 10⁻⁶ N m.

iii. Pression osmotique

- La pression osmotique de la phase liquide du moût est déterminée par un osmomètre automatique Roebbling type DR02 (Nr 9604002, Messtechnik, Berlin, Germany).
- Le principe de fonctionnement de l'appareil est basé sur la détermination du point de congélation des solutions aqueuses. La mesure de l'abaissement du point de congélation par rapport à l'eau

MilliQ donne une mesure directe de l'osmolarité du surnageant. Le point de congélation de l'eau pure est précisément à 0 °C. Dans le cas d'une solution de 1 osmole $\text{kg}_{\text{eau}}^{-1}$, le point de congélation de cette solution sera à -1.858 °C. Afin d'avoir une mesure des plus précises, l'appareil est calibré avant toute mesure, avec de l'eau MilliQ et une solution standard fournie avec l'appareil présentant une osmolarité de 300 $\text{mOsm kg}_{\text{eau}}^{-1}$. Les échantillons présentant une osmolarité supérieure à 300 $\text{mOsm kg}_{\text{eau}}^{-1}$ seront dilués dans de l'eau MilliQ de manière à avoir une mesure dans la gamme de l'appareil.

- Les analyses sont effectuées sur des surnageants. Environ 1.4 ml de moût contenu dans un eppendorf sont centrifugés pendant 3 min à 13400 tr min^{-1} . 100 μl précisément de surnageant sont prélevés et déposés au fond d'un nouvel eppendorf. Ce dernier est ensuite mis en place au niveau de la tête de mesure avant d'être abaissé dans le compartiment réfrigéré de l'appareil. Le résultat obtenu est exprimé en [$\text{mOsm kg}_{\text{eau}}^{-1}$].

3. Analyses chimiques

a. Caractérisation du surnageant

i. YSI - Glucose

Le glucose est dosé en cours de culture par un analyseur automatique YSI 2700 Select (Modèle 2700D, SN : 08C000029, YSI Inc., Yellow Springs, Ohio, USA). Cet appareil utilise une enzyme immobilisée sur une membrane, la glucose-oxydase, pour produire du peroxyde d'hydrogène à partir du glucose présent dans l'échantillon selon la relation

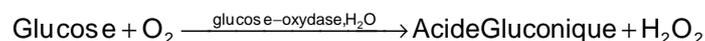


Figure 51 : Réaction de dosage du glucose par l'analyseur automatique YSI 2700 Select

L'oxydation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 sur une électrode de platine va libérer des électrons, créant ainsi un courant proportionnel à la concentration en glucose. Après étalonnage de l'appareil, la concentration en glucose est directement lue en [g l^{-1}], avec une précision de 5 % sur la concentration la plus élevée de la gamme étalon. La membrane garantit une réponse linéaire pour une plage de concentration en glucose allant de 0.05 à 9 g l^{-1} . Enfin, cet appareil présente l'avantage d'avoir une mesure rapide (60 s) et n'a besoin que d'un très faible volume d'échantillon (13 μl).

ii. HPLC - Glucose, acides organiques

La détermination du substrat résiduel et la quantification de possibles métabolites s'effectue en chromatographie liquide haute performance (CLHP).

L'appareillage utilisé est la chaîne CLHP chromeleon, composée d'une pompe quaternaire pouvant effectuer de manière automatique des rinçages à l'eau MilliQ. Un passeur d'échantillon contenant 3 tiroirs de 2 portoirs pouvant accueillir 6x54 échantillons réfrigérés à 4 °C permet de stocker les différents échantillons prêts à passer en analyse. Un injecteur automatique composé d'un bras mécanique et d'une seringue de 100 μl permet d'enchaîner les différents échantillons et étalons programmés dans la méthode. Différents rinçages préalables peuvent être programmés dans le

logiciel chromeleon. Pour une quantification fine, la boucle d'injection est à volume fixe, avec un volume injecté dans la colonne de 10 µl, permettant une plus grande répétabilité des volumes injectés. La séparation sur colonne H⁺ s'effectue selon le principe d'une chromatographie d'exclusion ionique (due aux particules et aux groupements SO₃⁻ de la phase stationnaire) et d'affinité (entre les analytes et les électrons π de la phase stationnaire). La séparation s'effectue en condition isocratique avec une phase mobile d'acide sulfurique à 5 mmol l⁻¹. Une colonne de garde permet d'augmenter la durée de vie de la colonne en minimisant les impacts des changements brusques de pression ou de composition de l'éluant. En effet, cela pourraient tasser la colonne, voir accentuer des phénomènes de collapses de la phase stationnaire ou d'encrassement, ce qui impliquerait une perte d'efficacité, de résolution et de séparation de la colonne. Les analytes sont détectés dans un premier temps par UV-Visible. En fonction de la molécule analysée, il est possible de fixer une longueur d'onde spécifique pour une meilleure détection ou de faire un spectre complet pour choisir la longueur d'onde au maximum d'absorbance de l'analyte. Les sucres et alcools sont détectés avec un détecteur réfractométrique, mis en série après la détection UV. Il mesure la variation de l'indice de réfraction de l'analyte par rapport à celui de la phase mobile. L'utilisation du gradient d'éluant ne permet pas l'utilisation de ce dernier détecteur. Enfin, la phase mobile est envoyée vers la poubelle à solvant située en dessous de la chaîne. Toutes les caractéristiques techniques de la colonne et de la chaîne sont rassemblées en *Annexe 6 : Caractéristiques de la chaîne CLHP Chromoléon*.

Cet appareil permet la quantification des espèces regroupées dans le *Tableau 29*. Les temps de rétention sont déterminés à partir d'une solution à 5 g l⁻¹ de chaque composé.

Espèces	Temps de rétention (à ± 0.03 min)	
	Détection UV	Détection réfractométrique
Oxaloacétate	9.40	9.77
Citrate	9.61	9.98
Isocitrate	9.64	10.01
Glucose	-	11.08
Pyruvate	11.43	11.78
Malate	11.46	11.84
Succinate	13.98	14.37
Lactate	15.19	15.56
Glycérol	-	16.25
Formate	16.44	16.84
Fumarate	Saturation vers 17 min	17.30
Acétate	17.90	18.31
Ethanol	-	25.71

Tableau 29 : Temps de rétention des analytes pouvant être présent dans le milieu de culture

iii. ICP-MS - Ions inorganiques

Afin de pouvoir estimer la force ionique au cours des cultures, l'ensemble des éléments inorganiques présents dans la préparation du milieu est quantifié par ICP-MS¹. L'appareil utilisé est le 7700 Series ICP-MS de chez Agilent Technologies.

Les échantillons sont préalablement préparés dans une solution d'acide nitrique à 1 % pour deux raisons. La première raison est pour éviter la formation d'hydroxyde pouvant faire précipiter certains composés. La seconde est pour éviter l'adsorption d'élément contre les éléments en quartz de l'appareillage (nébuliseur, chambre de nébulisation et les différentes connections jusqu'à la torche à plasma). Ensuite, les échantillons sont mis en place sur le passeur d'échantillon automatique avant leur introduction dans l'appareil.

Après prélèvement, l'échantillon est nébulisé dans une chambre refroidie à 2 °C de manière à obtenir un aérosol. Les gouttelettes les plus fines de l'échantillon sont redirigées par le gaz vecteur (Argon) vers la torche à plasma. Celle-ci a une température de 8600 K. Les gouttelettes les plus grosses sont condensées et pompées en direction de la poubelle. Les fines gouttelettes d'échantillons traversent la torche et sont progressivement asséchées, décomposées, atomisées et enfin ionisées positivement. La bobine de la torche à plasma oriente le flux d'ions en direction des cônes et des lentilles, augmentant la sensibilité de l'analyse. Le champ électrique des lentilles focalise le flux d'ions de manière à ne conserver que les ions positifs. Le flux traverse alors l'octopole. Celui-ci supprime une partie des espèces multichargées, ainsi que les oxydes présents. L'utilisation d'hélium dans la cellule contenant l'octopole permet d'enlever l'intégralité des espèces polyatomiques grâce à une discrimination des espèces en fonction de leur énergie cinétique au niveau de l'octopole. Des gaz, autres que l'hélium, peuvent être utilisés afin d'améliorer l'ionisation des analytes. L'objectif est de se retrouver avec une population d'espèces monochargées positivement. Les éléments ionisés d'intérêt sont ensuite sélectionnés par l'analyseur quadripolaire avant d'être détectés. Le détecteur permet la quantification d'espèces sur deux modes. Un mode analogique permet la quantification d'espèces concentrées dans l'échantillon. Un mode pulse autorise la quantification d'espèces à l'état de trace. Le temps d'intégration des espèces dépend de la qualité d'ionisation. Un tableau rassemblant les temps d'intégration du détecteur pour chaque espèce analysée est présenté en *Annexe 7: Temps d'intégration par éléments pour le détecteur de l'ICP-MS*.

b. Caractérisation de la biomasse

i. Analyse élémentaire

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas de modification majeure de la composition de la biomasse, des analyses ont été effectuées par le « Service Central d'Analyse » du CNRS. Après prélèvements, deux échantillons de 10 ml de moût sont centrifugés, dans des falcons de 15 ml, à 4 °C pendant 10 min à une vitesse de 4000 tr min⁻¹. Le surnageant est congelé, et les culots sont resuspendus dans de l'eau physiologique glacée. Cette étape de lavage est effectuée quatre fois. Après les étapes de lavage, le

¹ Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry

culot est congelé à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. A la fin de l'expérimentation, les échantillons sont lyophilisés avant d'être envoyés au « Service Central d'Analyse ».

Pour chaque échantillon envoyé, ce service quantifie la proportion massique des éléments carbone, hydrogène, oxygène et azote.

Les éléments C, H et N sont quantifiés à partir d'une mesure de perte de masse. Une masse précise de lyophilisat subit une combustion à $1050\text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un mélange gazeux (hélium + dioxygène). Le carbone se retrouve sous forme de CO_2 , l'hydrogène passe sous forme H_2O et l'azote se transforme en oxyde d'azote N_xO_y . Après réduction à $450\text{ }^{\circ}\text{C}$ de l'oxyde d'azote sur du cuivre pour obtenir de diazote N_2 , la séparation CO_2 , H_2O et N_2 est effectuée sur une colonne chromatographique. En sortie de colonne, les composés sont détectés avec un catharomètre.

L'élément O est quantifié à nouveau à partir d'une perte de masse. Une masse précise de lyophilisat subit une pyrolyse à $1120\text{ }^{\circ}\text{C}$ sur un charbon et sous flux de diazote. L'oxygène de l'échantillon passe alors sous forme de monoxyde de carbone CO. La quantification du monoxyde de carbone est obtenue par une détection infrarouge.

ii. Protéines

Les protéines sont dosées par colorimétrie à partir de la méthode de Biuret. Pour cela, des ions Cu^{2+} sont utilisés pour former un complexe avec les atomes d'azote des liaisons peptidiques. Le complexe Cu^{2+} -protéine est de couleur mauve et présente une absorbance maximale pour $\lambda = 545\text{ nm}$. L'objectif de ce dosage est de pouvoir déterminer la proportion de protéines dans le surnageant et dans la biomasse. Pour cela, une étape de lyse des cellules est alors nécessaire pour récupérer l'intégralité des protéines. Le protocole ci-dessous s'inspire des travaux de Stickland (Stickland, 1951).

Les étalons et les échantillons subissent les mêmes étapes de traitements chimiques et thermiques afin d'obtenir une gamme étalon représentative. Les étalons de protéine sont préparés à partir de BSA, sur une gamme allant de 0 à 5 g l^{-1} .

Un volume de 1 ml d'échantillon est disposé dans un tube en verre. $200\text{ }\mu\text{l}$ de soude (NaOH) à 200 g l^{-1} sont ajoutés à chaque tube avant de les fermer, puis de les vortexer. Les échantillons sont alors en condition basique. Les tubes sont ensuite plongés dans un bain marie à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ pendant 5 min afin de lyser les cellules afin de libérer le contenu protéique. Les échantillons sont ensuite sortis du bain marie et laissés le temps qu'ils reviennent à température ambiante. $30\text{ }\mu\text{l}$ de sulfate de cuivre penta-hydraté ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) à 25 g l^{-1} sont ajoutés à chaque tube. Puis, ils sont vortexés, et laissés 30 min afin que la réaction de complexation s'effectue. A la fin des 30 min, les tubes sont à nouveau vortexés, puis leur contenu est transvasé dans un eppendorf. Ceux-ci sont centrifugés pendant 3 min à 13400 tr min^{-1} pour séparer les débris cellulaires du surnageant contenant le complexe d'intérêt. La mesure d'absorbance s'effectue à partir de $200\text{ }\mu\text{l}$ de surnageant coloré, récupérés à la fin de la centrifugation, et disposés sur une plaque 96 puits. L'analyse s'effectue grâce à la lecture des absorbances par lecteur microplaque.

Il est nécessaire que le moût ne soit pas à une concentration en biomasse supérieure à 3.5 g l^{-1} . Dans le cas contraire, il est nécessaire de diluer préalablement l'échantillon dans l'eau osmosée. Des interférences peuvent apparaître si le milieu contient de l'ammoniaque.

IV. TRAITEMENT DES DONNEES EXPERIMENTALES

A. Rhéométrie en ligne

1. Principe des séquences

La réalisation de la viscosimétrie en ligne s'effectue par l'emploi d'une courbe de frottement permettant une estimation de la viscosité en ligne par l'emploi du concept de Metzner et Reed. Que ce soit pour l'établissement de la courbe de frottement ou pour l'estimation de la viscosité à partir de la courbe de frottement, il est nécessaire d'acquérir des données expérimentales représentatives du comportement réel au sein du bioréacteur et de l'outil expérimental. Pour cela, l'obtention des mesures est effectuée grâce à une programmation des débits appliqués par la pompe gérant le débit de circulation dans la boucle de dérivation.

Dans un premier temps, la gestion des séquences a été effectuée à partir d'un programme sommaire développé sous LabView®. Un descriptif de cette première interface homme-machine est présenté en *Annexe 8 : Interface homme-machine à partir du programme de gestion sous LabView®*. Les possibilités au niveau de la programmation des séquences de débits ont été complétées et améliorées au sein du logiciel LoCoPREL de manière à offrir une large gamme de stratégies d'analyse viscosimétrique en ligne. Quelques exemples d'allure de débit pouvant être obtenus sont représentés schématiquement dans la *Figure 52*.

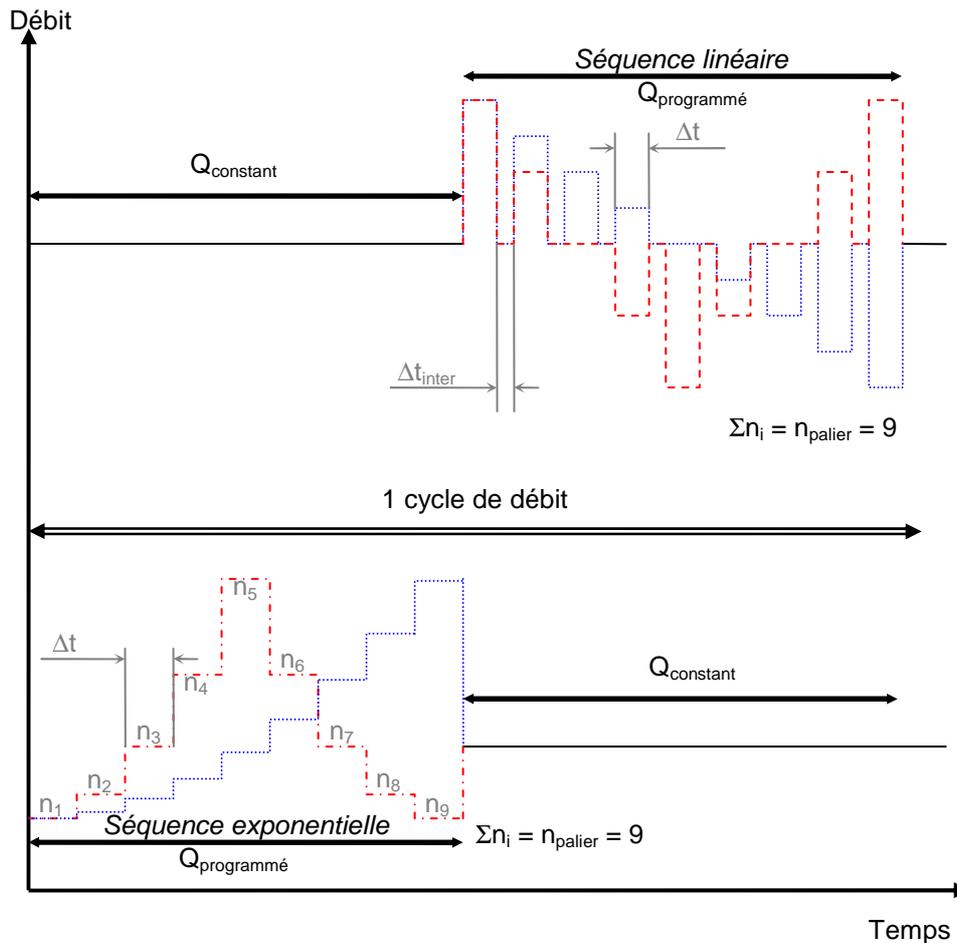


Figure 52 : Exemple de principe des séquences de débit de la pompe gérant la rhéologie en ligne sur l'outil expérimental

La Figure 52 montre différents cycles de débit. Ces cycles peuvent commencer par un débit constant, ou directement par une séquence de débit programmée. Les séquences programmées peuvent avoir une distribution de débit linéaire ou exponentielle, avec une allure en pyramide (pointillé bleu sur la Figure 52) ou en créneau (tiret rouge sur la Figure 52). La durée de la séquence dépend de la durée de chaque palier Δt , et de la durée entre créneaux Δt_{inter} (dans le cas d'allure en créneaux). Le temps entre chaque acquisition effectuée peut être diminué jusqu'à 1 s de manière à acquérir rapidement des données pour l'obtention de valeurs stabilisées pour chaque palier de débit appliqué.

Les caractéristiques d'une séquence, et plus généralement d'un cycle, doivent être choisies de manière à satisfaire des critères adaptés aux réponses hydrodynamiques et biologiques pouvant être rencontrées. La durée d'un palier doit prendre en compte les temps de réponse physiquement possibles à réaliser par l'environnement instrumental (temps de réponse des capteurs, fréquence d'acquisition maximale du système), le temps de séjour hydraulique (V_{boucle}/Q_{boucle}), le temps d'établissement du régime d'écoulement et les temps de réponse biologiques (V_{boucle}/r_{O_2} , $V_{boucle}/r_{substrat}$, ...).

Dans notre étude, nous choisirons les paramètres de programmation des séquences de débit de manière à minimiser le temps de séjour et la durée de chaque palier. L'objectif est une analyse en ligne des variables afin que la réponse biologique soit le moins possible perturbée par les conditions hydrodynamiques appliquées par l'outil expérimental. Pour cela, le débit de circulation dans la boucle de dérivation est maximum en dehors des séquences de débit de manière à éviter et/ou réduire une éventuelle bascule métabolique entre des conditions aérobies et anaérobies. De plus, cela permet de limiter les risques de carence en substrat subis par le microorganisme. Dans la même optique, la durée des paliers est fixée à 30 s, de manière à avoir suffisamment de points (à une fréquence d'échantillonnage de 1 Hz) pour obtenir une moyenne convenable du phénomène observé, tout en maintenant un régime d'écoulement suffisamment long pour avoir des conditions stabilisées. Le paramétrage des séquences par l'interface du logiciel LoCoPREL est présenté dans le *Chapitre III*. L'allure des séquences de débits idéales est discutée et comparée dans le *Chapitre IV*.

2. Etablissement de la courbe de frottement

L'établissement des courbes de frottement est effectué sur des données expérimentales obtenues par l'utilisation de milieux synthétiques liquides et homogènes.

a. Conditions opératoires

L'établissement de la courbe de frottement de chacune des conduites s'est effectué avec des données obtenues en fluide newtonien et pour une température réglée à 20 °C dans le bioréacteur. Etant proche de la température ambiante, cette température permet de minimiser la perte thermique lors de la circulation dans la boucle de dérivation pour de faibles débits.

b. Détermination du diamètre hydraulique

Pour chaque conduite, il a été nécessaire de déterminer le diamètre hydraulique précisément. Seules les données obtenues en régime laminaire sont utilisées de manière à appliquer la loi de Poiseuille.

i. Méthode de calcul

La détermination du diamètre hydraulique est obtenue à partir de la loi de Poiseuille (cf. *Chapitre I Équation 30*) aboutissant à l'*Équation 73*.

$$\frac{\Delta p}{\eta} = \frac{128 \cdot L}{\pi \cdot d_h^4} \cdot Q_v$$

Équation 73 : Loi de Poiseuille modifiée

Dans le cas d'un fluide newtonien, la relation est donc linéaire en fonction du débit volumique Q_v . L'estimation du coefficient directeur¹ s'effectue en utilisant une régression linéaire suivant la méthode des moindres carrés. Ce calcul est précis et représentatif des points expérimentaux si les distances

¹ Coefficient directeur = $\frac{128 \cdot L}{\pi \cdot d_h^4}$

entre deux points consécutifs sont constantes : le poids de chaque point sera le même dans le calcul du coefficient directeur.

Or, les variables d'intérêt, soit $f/2$ et Re_g , sont inversement proportionnelles et utilisées dans des représentations logarithmiques. Les points expérimentaux doivent donc décrire un modèle suivant une distribution exponentielle logarithmique afin d'avoir une distribution des points permettant une bonne détermination du modèle par la méthode des moindres carrés. Cependant, si nous effectuons une régression linéaire par cette même méthode, l'estimation du coefficient directeur sera biaisée car l'ensemble des points n'auront pas le même poids dans l'estimation de la pente : les points les plus éloignés du barycentre des données expérimentales auront un poids plus important dans le calcul. Dans le cas d'une distribution exponentielle des données (*i.e.* débit), on effectue une transformation logarithmique des données expérimentales pour se retrouver dans les conditions d'utilisation du modèle. Ainsi, la détermination du coefficient directeur est effectuée dans les mêmes conditions que celles d'utilisation du modèle, sur les variables $\log(Q_v)$ et $\log(\Delta p/\eta)$.

La mesure de pression doit être corrigée de l'offset du capteur de pression déterminé expérimentalement, soit en début et fin de mesure, soit en fin d'expérimentation, en identifiant l'ordonnée à l'origine.

ii. Analyse des données

La détermination du diamètre hydraulique a été effectuée par le calcul décrit précédemment, sur 15 séquences de débit pyramidales avec distribution exponentielle des points sur 16 paliers. Afin de déterminer les débits optimaux d'analyse pour l'obtention du diamètre hydraulique, les séquences sont analysées en enlevant progressivement 1 à 1 les paliers extrêmes des séquences pour n'obtenir que les données les plus pertinentes par l'obtention d'un coefficient de corrélation R supérieur à 0.99 pour D1 et supérieur à 0.9995 pour D2. La *Figure 53* illustre les valeurs de diamètre hydraulique obtenues pour la conduite D2, avec une répartition exponentielle des paliers.

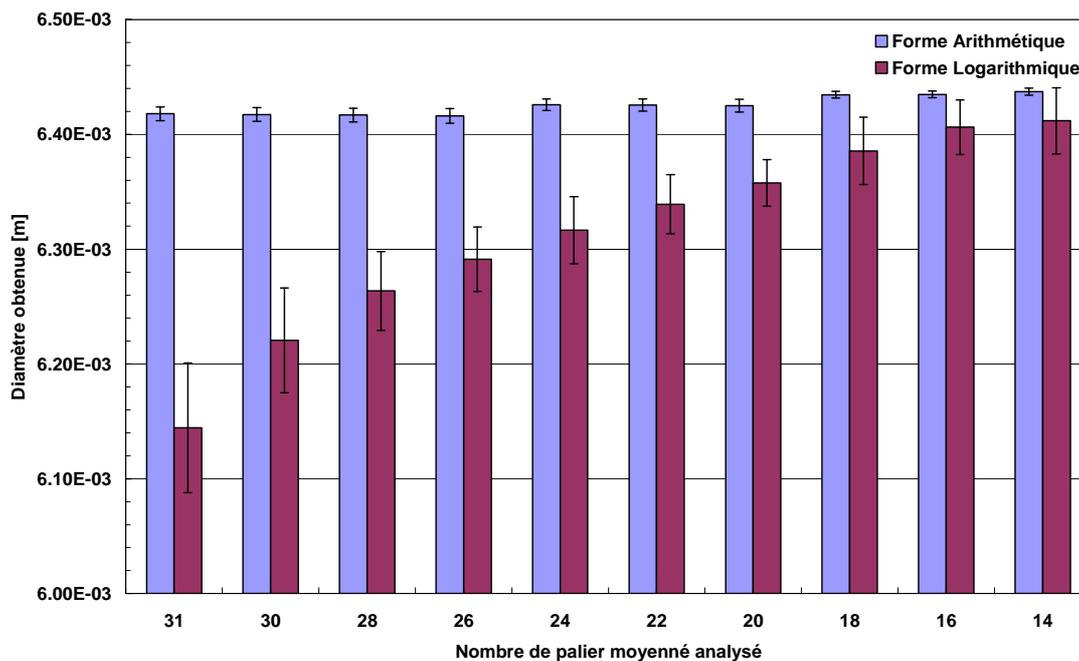


Figure 53 : Détermination du diamètre hydraulique par suppressions successives de paliers pour la conduite D2 - Comparaison des valeurs en fonction du calcul

La *Figure 53* montre que si la détermination du diamètre hydraulique n'est pas obtenue avec une transformation logarithmique, le résultat reste peu sensible au filtrage des données car ce traitement n'est pas adapté. La transformation logarithmique montre la nécessité de filtrer les données pour retirer les valeurs extrêmes induisant une valeur moyenne du diamètre hydraulique erronée (visible pour des nombres de paliers moyennés élevés). De plus, les écart-types des moyennes obtenues restent élevés quel que soit le filtrage. On note une légère diminution de la variabilité des mesures entre les valeurs brutes (nombre de paliers moyennés analysés égal à 31), visible par les barres d'erreur ($= \pm 1$ écart-type), et les valeurs à nombre de paliers moyennés analysés plus faible.

La plage de débit retenue (écoulement laminaire pour chaque conduite) est appliquée de manière identique pour les deux conduites. La conduite D1 est la plus restrictive avant l'obtention de la condition $R > 0.99$. La plage de débit retenue est comprise entre 40 et 200 l h⁻¹. La séquence de débit appliquée a une allure pyramidale avec une distribution exponentielle.

L'analyse des paliers s'est effectuée en décomposant les résultats en fonction de l'ensemble des données (palier à débit descendant, puis ascendant), ou en analysant séparément les paliers de débit descendant et ascendant. L'effet de la correction sous forme logarithmique a également été étudié. Ces résultats sont présentés dans la *Figure 54*.

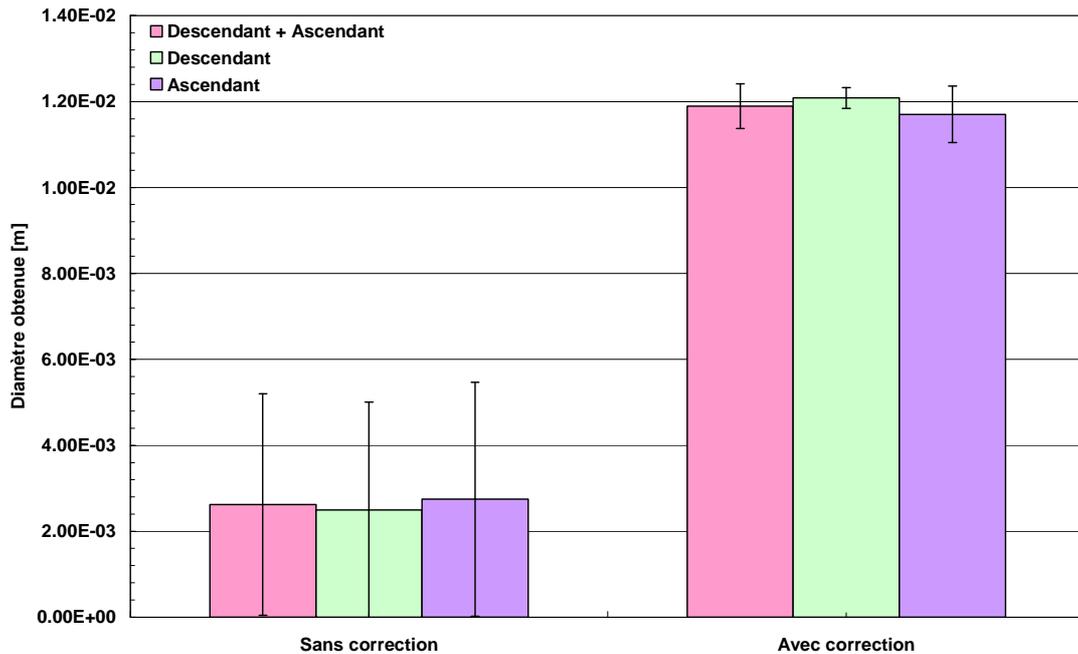


Figure 54 : Effet de la correction et comparaison des données contenues dans la séquence de débit pour la conduite D1

On observe que la correction des données après transformation logarithmique est obligatoire afin d'obtenir des résultats cohérents avec l'ordre de grandeur physique de la conduite (donnée constructeur : 12 mm pour D1, 6 mm pour D2). Pour les valeurs avec correction, on observe que la séquence de débit ne permet pas l'obtention de données identiques entre la partie à débit descendant et ascendant. Sans cette distinction, on obtient une valeur de diamètre hydraulique moyen. En procédant à cette distinction, on observe que la variabilité est due à la partie ascendante de la séquence de débit. La partie descendante de la séquence présente une valeur moyenne de diamètre hydraulique plus importante, et une variabilité plus faible des valeurs. C'est sur ce critère que nous retiendrons ce mode de traitement pour l'obtention du diamètre hydraulique utilisé pour la détermination des modèles.

Moyennant ces précautions de calcul, les diamètres hydrauliques des conduites D1 et D2 ont été respectivement estimés à 12.1 mm et 6.44 mm. Le coefficient de variation pour ces deux diamètres peut être estimé globalement à $\pm 1.6\%$.

c. Modélisation de la courbe de frottement

Les facteurs de frottement et les nombres de Reynolds issus des mesures expérimentales avec les fluides newtoniens sont présentés sur la *Figure 55* et *Figure 56*. Pour chacune des conduites, les trois régimes d'écoulement sont aisément identifiés et la courbe de frottement présente une allure classique pour des conduites cylindriques circulaires.

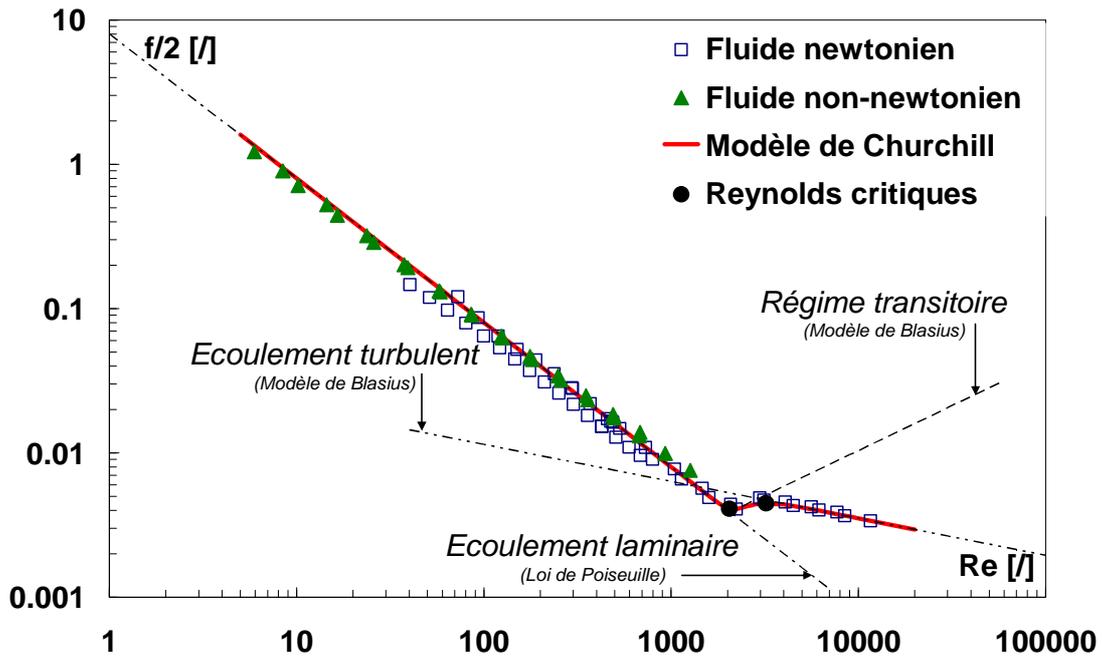


Figure 55 : Courbe de frottement de la conduite D1 : Modèles employés par régime d'écoulement, nombres de Reynolds critiques et modèle de Churchill

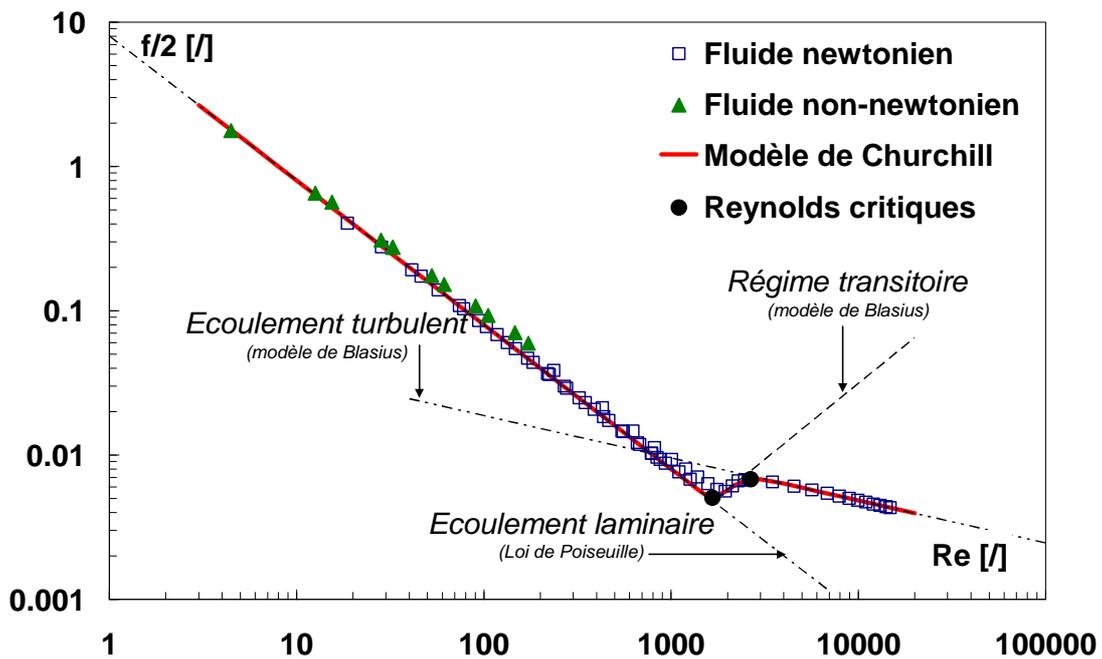


Figure 56 : Courbe de frottement de la conduite D2 : Modèles employés par régime d'écoulement, nombres de Reynolds critiques et modèle de Churchill

Dans nos conditions, les quatre paramètres a , b , c et d de l'Équation 52 et de l'Équation 53 (voir Chapitre I I.D.4 Théorie en conduite) sont identifiés spécifiquement pour les régimes laminaire, de transition et turbulent. Toutes les valeurs identifiées sont reportées dans le Tableau 30, avec les valeurs de diamètres hydrauliques et les nombres Reynolds critiques. Les diamètres de conduites

sont choisis sensiblement différents de manière à balayer des plages de vitesses de cisaillement plus importantes. Ces vitesses de cisaillement sont plus adaptées à l'évolution du comportement rhéologique lors de cultures cellulaires qui, débutant à très faible concentration (environ 0.1 g l^{-1}), se terminent à haute concentration cellulaire (environ 100 g l^{-1}). Les paramètres des différents modèles sont présentés dans le *Tableau 30*.

	d_h [mm]	σ_{dh} [mm]	Laminaire		Transitoire		Turbulent		
			ξ	Re_{c1}	a	b	Re_{c2}	c	d
D1	12.1	$2 \cdot 10^{-1}$	8	2049	$3.38 \cdot 10^{-5}$	0.622	3219	$3.72 \cdot 10^{-2}$	-0.256
D2	6.438	$3 \cdot 10^{-3}$	8	1661	$1.91 \cdot 10^{-6}$	1.05	2663	$7.28 \cdot 10^{-2}$	-0.294

Tableau 30 : Paramètres intégrés dans les courbes de frottement

Le diamètre hydraulique d_h est présenté avec une variabilité de plus ou moins un écart-type σ_{dh} . Cependant, la faible valeur de l'écart-type obtenu pour le diamètre hydraulique de D2 nous permet de nous interroger sur le sens physique réel de cette valeur.

Le modèle de Churchill qui sera utilisé sur chacune des conduites est défini par les coefficients du *Tableau 30*. Il sera dorénavant considéré comme la courbe de référence pour la mesure de rhéologie en ligne.

Dans un second temps, des expérimentations avec les fluides non newtoniens ont été réalisées. Le Reynolds généralisé est calculé par l'Équation 55, basée sur le concept de Metzner et Reed. On constate que les points obtenus se positionnent sur la courbe de frottement établie en fluide newtonien. Ainsi, l'unicité de la courbe de frottement confirme et valide l'approche choisie pour effectuer une mesure de rhéométrie en ligne sur les milieux de fermentation.

3. Détermination de la viscosité apparente en ligne

Le principe de la rhéométrie en ligne consiste à utiliser les courbes de frottement préalablement établies sur fluide synthétique. Après avoir ajusté le modèle de Churchill pour chaque conduite, l'expression analytique est utilisée pour déterminer, à partir du facteur de frottement lui-même calculé à l'aide de la perte de charge (cf. *Chapitre I Équation 48 : Facteur de frottement*), le nombre de Reynolds effectif en ligne sur la conduite concernée. Dans le cas où le débit est suffisamment faible pour se trouver dans la partie laminaire de la courbe de frottement, nous nous trouvons dans le cadre de l'application du principe de Metzner et Reed, permettant une estimation de la viscosité dynamique, que le fluide soit newtonien ou non-newtonien. L'obtention du nombre de Reynolds permet de déduire une estimation de la viscosité dynamique du milieu, ou d'une viscosité équivalente lorsque le fluide n'est pas newtonien (à partir de l'Équation 56).

Les courbes de frottement ne présentent pas une relation bi-univoque entre le facteur de frottement et le nombre de Reynolds généralisé lorsque l'on passe du régime laminaire au régime turbulent. Cela entraîne alors une incertitude sur la valeur de la viscosité estimée pour des valeurs de facteur de frottement expérimentales situées entre $3.90 \cdot 10^{-3}$ et $4.70 \cdot 10^{-3}$ pour la conduite D1, et $4.81 \cdot 10^{-3}$ et $7.16 \cdot 10^{-3}$ pour la conduite D2. Celles-ci correspondent respectivement aux valeurs de facteurs de

frottement pour les nombres de Reynolds généralisés critiques de chacune des courbes de frottement. Dans ce cas, l'estimation est effectuée dans le cas le plus critique, c'est-à-dire en recherchant le nombre de Reynolds à partir du régime turbulent de la courbe de frottement. Si une valeur répond à ce domaine, le régime d'écoulement dans la conduite considérée n'est pas laminaire ; il y a alors le risque d'une mauvaise estimation de la viscosité car il n'y a pas unicité de la courbe de frottement dans le cas d'un écoulement turbulent. Si aucune valeur ne peut être obtenue dans ce régime d'écoulement, le régime laminaire est balayé afin d'obtenir la valeur expérimentale du nombre de Reynolds généralisé. Ainsi, les valeurs obtenues dans le régime laminaire sont assurées d'être uniques quelle que soit la nature du fluide (newtonien ou non) car cette estimation répond au concept de Metzner et Reed. On a alors accès à un rhéogramme si plusieurs cisaillements (c'est-à-dire plusieurs débits dans les conduites calibrées) sont appliqués au fluide.

Les valeurs de viscosité estimées peuvent alors être tracées sur une courbe d'écoulement en évaluant expérimentalement la vitesse de cisaillement. Celle-ci est alors calculée en ligne à partir de la valeur de viscosité estimée selon l'Équation 74.

$$\dot{\gamma} = \frac{\tau_p}{\eta_{\text{expérimental}}}$$

Équation 74 : Vitesse de cisaillement sur l'outil expérimental

4. Incertitudes des mesures et calculs.

a. Définition de l'incertitude

Un rappel sur les calculs d'incertitudes est proposé en *Annexe 9 : Calcul d'incertitude*. Les informations sont issues du GUM (OIML-GUM, 2010).

Dans de nombreux cas, un mesurande Y n'est pas mesuré directement mais est déterminé à partir de N autres grandeurs X_1, X_2, \dots, X_N à travers la relation fonctionnelle f de l'Équation 75.

$$Y = f(X_1, X_2, \dots, X_N)$$

Équation 75 : Détermination du mesurande Y

L'estimation de l'espérance mathématique X_i est notée x_i . Une estimation du mesurande Y, notée y, est obtenue en utilisant les estimations d'entrées x_1, x_2, \dots, x_N pour les N grandeurs X_1, X_2, \dots, X_N . L'estimation de l'incertitude de sortie, résultat du mesurage, est donnée par l'Équation 76.

$$y = f(x_1, x_2, \dots, x_N)$$

Équation 76 : Estimation du mesurande y

Dans le cas de grandeurs non corrélées entre elles, l'expression de l'incertitude-type composée $u_c(y)$ suit l'Équation 77.

$$u_c^2(y) = \sum_{i=1}^N \left[\frac{\partial f}{\partial x_i} \right]^2 u^2(x_i)$$

Équation 77 : Incertitude-type composée sous forme de variance

La formule s'applique pour l'intégration :

- des différentes évaluations d'incertitude de Type A et B (voir *Annexe 9 : Calcul d'incertitude*) dans une incertitude-type unique $u(y)$,
- de l'ensemble des paramètres contenus dans une expression littérale.

Il y a corrélation (covariance non nulle) dans les grandeurs mises en œuvre quand un doute pèse sur deux estimations x_i et x_j des variables X_i et X_j qui entrent dans la composition du résultat y . Si l'on cherche à savoir si deux grandeurs d'entrée X_i et X_j sont ou non corrélées, il ne faut pas raisonner physiquement en pensant aux deux mesurandes correspondants. En revanche, il faut analyser comment le processus de mesure a pu introduire, ou n'a pas éliminé, un doute commun à ces deux variables aléatoires qui représentent les mesurandes.

Si Y est de la forme $Y = cX_1^{p_1} X_2^{p_2} \dots X_N^{p_N}$, et si les exposants p_i sont des nombres connus, positifs ou négatifs, d'incertitude négligeable, l'incertitude-type composée peut être exprimée sous la forme d'une variance composée relative selon l'Équation 78.

$$\left[\frac{u_c(y)}{y} \right]^2 = \sum_{i=1}^N \left[\frac{p_i u(x_i)}{x_i} \right]^2$$

Équation 78 : Incertitude-type composée relative sous forme de variance

L'incertitude-type composée relative devient de la forme de l'Équation 79.

$$\frac{u_c(y)}{|y|}$$

Équation 79 : Incertitude-type composée relative

L'incertitude-type relative de chaque estimation d'entrée est obtenu par l'Équation 80.

$$\frac{u(x_i)}{|x_i|} \text{ avec } \begin{cases} |y| \neq 0 \\ |x_i| \neq 0 \end{cases}$$

Équation 80 : Incertitude-type relative

b. Incertitudes sur la rhéométrie en ligne et hors-ligne

i. Sur la courbe de frottement

Afin d'avoir une information sur la pertinence des données obtenues, nous allons déterminer l'incertitude de mesure du dispositif expérimental. Pour cela, la loi de propagation des erreurs sera

appliquée sur le calcul du facteur de frottement et du nombre de Reynolds généralisé pour obtenir une incertitude-type composée relative sur les résultats obtenus. Nous présenterons dans cette partie les expressions finales à utiliser pour différents cas.

- **Régime laminaire ($Re < Re_{c1}$)**

En régime laminaire d'écoulement dans une conduite circulaire, le facteur de frottement et le nombre de Reynolds généralisé sont donnés par l'Équation 49 et l'Équation 50. Le développement du calcul est présenté en Annexe 10: *Evaluation de l'incertitude de mesure au cours de l'établissement de la courbe de frottement*.

Ainsi, l'expression de l'incertitude-type relative du facteur de frottement prend la forme de l'Équation 81.

$$\frac{u_c\left(\frac{f}{2_{\text{model}}}\right)}{\frac{f}{2_{\text{model}}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(\Delta p)}{\Delta p} \right]^2 + \left[5 \frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(L)}{L} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\rho)}{\rho} \right]^2 + \left[-2 \frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Équation 81 : Incertitude-type composée relative du facteur de frottement pour l'établissement du modèle

Concernant l'expression de l'incertitude-type relative du nombre de Reynolds généralisé, son calcul est exprimé par l'Équation 82.

$$\frac{u_c(Re_g)}{Re_g} = \left\{ \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Équation 82 : Incertitude-type composée relative du nombre de Reynolds généralisé pour l'établissement du modèle

- **Régime turbulent ($Re > Re_{c2}$)**

En régime turbulent, l'expression des incertitudes-type composées relatives du nombre de Reynolds et du facteur de frottement auront la même expression qu'en régime laminaire (Équation 81 et Équation 82). Cependant, même si les incertitudes-type de type B restent constantes (même appareillage utilisé pour les différents régimes d'écoulements), il est nécessaire de réajuster les incertitudes-type composées par les valeurs correctes des incertitudes-type de type A.

- **Incertainces sur $f/2$ et Reg**

Les valeurs des incertitudes-type composées pour le régime laminaire et le régime turbulent sont présentées dans le Tableau 31.

$\frac{u_c(y)}{y} \times 100$ [%]	Régime laminaire ($Re < Re_{c1}$)	Turbulent regime ($Re > Re_{c2}$)
f/2	2	2
Re_g	7	7

Tableau 31 : Incertitudes-type composées relatives sur les invariants de similitude utilisés pour l'établissement de la courbe de frottement de la conduite D2

Les résultats du *Tableau 31* montrent que le facteur de frottement présente une incertitude de mesure de 2 % et que le nombre de Reynolds généralisé atteint 7 %, quel que soit le régime d'écoulement. Malgré le changement de régime d'écoulement, la propagation des erreurs de mesure n'engendre pas une augmentation de l'incertitude-type composée relative lors du passage du régime laminaire au régime turbulent.

ii. Sur la viscosité en ligne et hors-ligne

A partir de l'expression de l'incertitude-type composée relative du facteur de frottement, il est possible de développer une expression permettant l'obtention de l'incertitude-type composée relative de l'estimation de la viscosité en ligne. Le développement de chaque expression est présenté en *Annexe 11 Evaluation de l'incertitude de mesure au cours de l'estimation de la viscosité en ligne*. Les relations aboutissant aux incertitudes de mesure sont présentées par l'Équation 83 pour le régime laminaire et par l'Équation 84 pour le régime turbulent.

$$\frac{u_c(\eta_{\text{en-ligne}})}{\eta_{\text{en-ligne}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(f/2_{\text{lam}})}{f/2_{\text{lam}}} \right]^2 + \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Équation 83 : Incertitude-type composée relative de la viscosité dynamique estimée en ligne en régime laminaire

$$\frac{u_c(\eta_{\text{en-ligne}})}{\eta_{\text{en-ligne}}} = \left\{ \left[\left(-\frac{1}{d} \right) \frac{u_c(f/2_{\text{turb}})}{f/2_{\text{turb}}} \right]^2 + \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Équation 84 : Incertitude-type composée relative de la viscosité dynamique estimée en ligne en régime turbulent

Il est également possible de déterminer l'incertitude-type composée relative appliquée sur l'obtention hors ligne de la viscosité apparente. Son expression est décrite par l'Équation 85 et le détail du calcul se retrouve en *Annexe 10: Evaluation de l'incertitude de mesure au cours de l'établissement de la courbe de frottement*.

$$\frac{u_c(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(\tau_p)}{\tau_p} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\dot{\gamma})}{\dot{\gamma}} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Équation 85 : Incertitude-type composée relative de la viscosité apparente estimée sur le rhéomètre Bohlin

B. Analyse statistique de populations cellulaires

Les analyses granulométriques issues du granulomètre laser et du morphogranulomètre permettent l'obtention de paramètres géométriques issus de l'analyse d'une population de cellules. Même si le morphogranulomètre permet l'acquisition d'un éventail plus large de critères morphologiques, une analyse statistique sur des critères communs aux deux analyses est possible. Dans un premier temps, un rappel sur les fonctions de distribution est effectué. Puis, la description de paramètres communs aux deux analyses est proposée, avant de définir les conditions d'acceptabilité pour définir une population cellulaire normale.

1. Distribution de population

a. Théorie

Prenons le cas de la description d'une variable monomodale. L'analyse du profil de distribution de données est effectuée pour déterminer les caractéristiques d'une population issue d'un échantillon analysé. A partir de l'analyse de l'échantillon, l'objectif est de définir la loi de probabilité (profil de distribution) permettant de décrire correctement la loi de distribution. Les profils de distributions peuvent être comparés en connaissant la fonction décrivant la loi de distribution, permettant l'obtention de leurs fonctions de répartitions¹ $\Phi(x)$ ². Ces fonctions de distribution peuvent être représentées comme des fonctions continues $l(x)$ ², par la modélisation de la population, ou des fonctions discrètes p_i , issues des mesures expérimentales. Ces fonctions sont reliées entre elle par la relation décrite par l'Équation 86.

$$\Phi(x) = \int_{x=0}^{\infty} l(x) \cdot dx = \sum_{i=0}^{\infty} p_i = 1$$

Équation 86 : Définition d'une fonction de distribution

Chaque fonction de distribution $l(x)$ peut être caractérisée par un ensemble de moments Γ_j et de moments centrés Γ_j' d'ordre j (Morice, 1972). Dans le cadre de nos travaux, nous nous intéresserons aux moments mathématiques définis dans le *Tableau 32* ci-dessous :

¹ Fonction de répartition = fonction de distribution cumulée

² Pour éviter les risques de confusion avec d'autres symboles de ce manuscrit, la fonction de répartition est notée $\Phi(x)$ plutôt que $F(x)$, et la fonction de distribution est notée $l(x)$ plutôt que $f(x)$.

Nom mathématique d'ordre j Symbole : Nom usuel	Expression
Moment d'ordre 1 $\Gamma_1 = \bar{x}$: <i>Moyenne</i>	$\Gamma_1 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \cdot x_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$
Moment centré d'ordre 2 Γ'_2 : <i>Variance</i>	$\Gamma'_2 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \cdot (x_i - \bar{x})^2}{\sum_{i=1}^k n_i}$
Moment centré d'ordre 3 Γ'_3 : Coefficient d'asymétrie	$\Gamma'_3 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \cdot (x_i - \bar{x})^3}{\sum_{i=1}^k n_i}$
Moment centré d'ordre 4 Γ'_4 : Coefficient d'aplatissement	$\Gamma'_4 = \frac{\sum_{i=1}^k n_i \cdot (x_i - \bar{x})^4}{\sum_{i=1}^k n_i}$

Tableau 32 : Exemples de moments mathématiques

A partir de la variance, il est possible de définir l'écart-type de population σ comme étant la racine carrée de la variance. Les différents moments seront par la suite mis en œuvre pour tester la normalité des fonctions de distribution discrètes obtenues à partir des analyses.

b. Distributions discrètes

Dans le cas d'une instrumentation adaptée, les résultats obtenus permettent de décrire une distribution d'une ou plusieurs populations par l'intermédiaire de l'enregistrement de signaux discrets au sein de classes. L'obtention de variables d'intérêt nécessitant un traitement de données de la distribution du signal impose une réflexion sur le genre de mesure effectué et le type de distribution discrète de population obtenus. Le *Tableau 33* rassemble des exemples de définitions de classes en fonction de l'analyse physique conduisant à une expression discrète de la distribution de la population.

Distribution	Signification de la fonction de distribution p_i	Expression
Effective	Fréquence effective de la classe i	$p_i = \frac{n_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$
Dimensionnelle	Fréquence dimensionnelle de la classe i	$p_i = \frac{n_i \cdot d_i}{\sum_{i=1}^k n_i \cdot d_i}$
Surfacique	Fréquence surfacique de la classe i	$p_i = \frac{n_i \cdot d_i^2}{\sum_{i=1}^k n_i \cdot d_i^2}$
Volumique	Fréquence volumique de la classe i	$p_i = \frac{n_i \cdot d_i^3}{\sum_{i=1}^k n_i \cdot d_i^3}$

Tableau 33 : Définition des classes pour l'expression discrète de populations

L'analyse de la distribution des classes p_i permet de remonter à une fonction $l(x)$ suite à une modélisation des signaux enregistrés, de manière à calculer les variables d'intérêt caractérisant la distribution.

c. Distribution continue : loi normale et log-normale

La description de la fonction de distribution discrète p_i nécessite souvent une hypothèse sur la forme même de la fonction de distribution continue. Dans le cadre de notre étude, nous utiliserons deux fonctions de distribution permettant l'application d'hypothèses sur la forme des distributions de populations rencontrées.

Dans le cadre d'une analyse, si la distribution discrète des signaux suit une courbe de Gauss, la distribution est dite normale. Les échantillons présentant une distribution de taille suivant une loi normale sont alors parfaitement décrits par deux paramètres : le moment d'ordre 1, appelé plus couramment la moyenne, et l'écart-type de la population σ . L'expression de la loi normale suit l'expression de l'Équation 87.

$$l(x) = \frac{1}{\sigma_x \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp \left[-\frac{(x - \bar{x})^2}{2 \cdot \sigma_x^2} \right]$$

Équation 87 : Expression de la loi normale

Si chaque terme $l(x)$ est discret, il est assimilé au p_i correspondant à la fréquence de la classe i définie dans le *Tableau 33*. De nombreux calculs statistiques s'appuient sur une hypothèse de distribution gaussienne. Cependant, la description de la distribution de la population par une fonction de distribution normale n'est pas toujours correcte. C'est souvent le cas des distributions de tailles de particules. Celles-ci sont généralement « biaisées » vers les plus grandes tailles. De tels échantillons sont alors mieux décrits par une loi de distribution log-normale, provenant de la transformation logarithmique de la variable x de l'Équation 87 telle que $z = \ln(x)$. A nouveau, la distribution en

représentation log-normale peut alors être totalement décrite par la moyenne de z et l'écart-type de la population σ_z .

$$f(z) = \frac{1}{\sigma_z \cdot \sqrt{2 \cdot \pi}} \cdot \exp\left[-\frac{(z - \bar{z})^2}{2 \cdot \sigma_z^2}\right]$$

Équation 88 : Expression de la loi log-normale

Dans l'Équation 88, la moyenne \bar{z} décrivant la loi log-normale est obtenue par l'expression issue de l'Équation 89.

$$\bar{z} = \ln(x_z) = \frac{\sum \ln(x) dp}{p} \Leftrightarrow x_z = \left(\prod x^{dp}\right)^{\frac{1}{p}}$$

Équation 89 : Obtention de la moyenne d'une loi log-normale

2. Détermination du diamètre cellulaire

a. Diamètre équivalent

Il existe de multiples façons de définir la taille d'une particule sous l'appellation « diamètre » lorsque cette particule n'est pas sphérique. Une liste des différentes définitions de la notion de diamètre peut être faite. Les définitions non employées dans notre travail sont listées en *Annexe 12: Liste des diamètres équivalents*. Ci-dessous, le *Tableau 34* rassemble uniquement les expressions rencontrées dans le cadre de nos travaux.

Symbole	Appellation	Définition
d_v	Diamètre en volume	Diamètre de la sphère qui a le même volume que la particule.
d_s	Diamètre en surface	Diamètre de la sphère qui a la même surface que la particule.
d_F^1	Diamètre de Féret	Valeur moyenne de la distance entre deux tangentes au contour projeté de la particule, tracées parallèlement à une direction donnée.
d_a	Diamètre de l'aire projeté stable	Diamètre du cercle qui a la même aire projetée que la particule dans une orientation stable.

Tableau 34 : Exemples de diamètres équivalents (Allen, 1997)

Le *Tableau 34* montre que la définition et la caractérisation d'un diamètre dépend réellement de son mode d'obtention. L'analyse des résultats est à effectuer en fonction des caractéristiques de chaque diamètre mis en œuvre.

¹ Diamètre statistique, souvent défini en valeur moyenne dans le cas d'une particule précise

b. Diamètre moyen

De manière générale, une suspension cellulaire ou particulaire est rarement constituée d'objets de taille unique. On représente la variation de taille d'une population d'objets sous la forme d'une distribution de diamètres de cellule. La plupart des techniques de caractérisation existantes donnent directement des distributions de population. Afin de pouvoir remonter à un diamètre, il est nécessaire de définir le type de distribution que renvoie l'appareil. La distribution de la population mesurée est découpée en classes dont la largeur dépend du système instrumental. La plupart des techniques de caractérisation existantes donnent directement l'une des distributions décrites dans le *Tableau 33*.

Selon la complexité de la forme de certaines cellules, et selon les propriétés que l'on cherche véritablement à mettre en évidence, il est nécessaire de définir le diamètre moyen pouvant être obtenu à partir, entre autre, de la liste du *Tableau 34*. Ce diamètre moyen est complété par un écart-type, décrivant la largeur de la distribution autour du diamètre moyen pour une population de cellules donnée.

De manière à généraliser les expressions, on définit les diamètres moyens à partir de l'*Équation 90* (Brittain, 2001) :

$$d_{p,q} = \left(\frac{\sum_{i=1}^k n_i \cdot d_i^p}{\sum_{i=1}^k n_i \cdot d_i^q} \right)^{\frac{1}{p-q}}$$

Équation 90 : Définition du diamètre moyen

Classiquement, dans le cas d'une distribution de populations en volume, on emploie le diamètre moyen volumique $d_{4,3}$. Dans le cas d'une distribution de la population en surface, on utilise le diamètre moyen surfacique $d_{3,2}$, appelé aussi diamètre de Sauter.

C. Données microbiologiques

Les calculs présentés dans cette partie sont effectués à deux reprises : une première fois en ligne, dans le logiciel LoCoPREL qui a été spécifiquement développé pour les besoins de l'étude. Ces calculs sont réalisés une seconde fois post-expérimentation, lorsque toutes les données correctives sont disponibles. En effet, un certain nombre de données, notamment la conversion du substrat en biomasse, n'est alors pas connu. Les calculs en ligne sont alors effectués sans prendre en compte ces corrections. Ces calculs sont donc effectués lorsque l'expérimentation et l'ensemble des analyses sont terminées avec, cette fois-ci, des calculs plus rigoureux. En effet, il est alors possible d'intégrer la bioconversion du substrat, un coefficient de correction volumique, un facteur de dilution et un calcul du volume théorique. Afin d'éviter une redondance, les calculs effectués en ligne par le logiciel sont décrits dans cette partie, le fonctionnement du logiciel à proprement parler est développé dans le *Chapitre III*. Les noms de variables dans le logiciel sont indiqués en **caractères gras** au fur et à mesure des explications.

1. Les calculs en ligne

a. Analyse des gaz

i. Bilan sur un composé A gazeux

L'équation de conservation de la matière peut s'écrire sous la forme de l'Équation 91.

$$\text{Accumulation} = (\text{entrée} - \text{sortie})_{\text{flux}} + [\text{production} - \text{consommation}]_{\text{réaction}}$$

Équation 91 : Principe du bilan matière

Soit $Q_{\text{entrée}}$ et Q_{sortie} les débits volumiques d'entrée et de sortie. Les entités A_i et r_A sont respectivement la fraction molaire et le flux. Pour alléger les expressions de ces bilans, on utilisera également la notation « A » mais en indice pour une quantité qui est relative à l'espèce A. La forme mathématique est développée à partir de l'Équation 92.

$$\frac{d(A_{\text{dissous}} \cdot V_{\text{liquide}})}{dt} + \frac{d(A_{\text{gazeux}} \cdot V_{\text{gaz}})}{dt} = (Q_{\text{Entrée}} \cdot x_{A_{\text{Entrée}}} - Q_{\text{Sortie}} \cdot x_{A_{\text{Sortie}}}) + r_A \cdot V_{\text{liquide}}$$

Équation 92 : Bilan de l'espèce A d'un élément présent en phase gazeuse et liquide

Il est possible de rassembler les termes de transfert issus de la phase liquide, on parlera du flux de transfert global de l'espèce A, présenté par l'Équation 93.

$$\Phi_A = \frac{d(A_{\text{dissous}} \cdot V_{\text{liquide}})}{dt} + r_A \cdot V_{\text{liquide}}$$

Équation 93 : Flux de transfert global de l'espèce A

Cependant, dans le cadre de notre étude, nous considérerons que le terme $\frac{d(A_{\text{dissous}} \cdot V_{\text{liquide}})}{dt}$ est négligeable, ceci afin de rendre possibles les calculs en ligne avec notre équipement. Pour faciliter les calculs, le terme prenant en compte l'espèce A_{gazeux} se développera sous la forme de l'Équation 94, le terme $\frac{dV_{\text{gaz}}}{dt}$ étant considéré comme étant négligeable.

$$\frac{dA_{\text{sortie}}^{\text{gazeux}}}{dt} = \frac{A_{\text{sortie}}^{t_2} - A_{\text{sortie}}^{t_1}}{t_2 - t_1}$$

Équation 94 : Différentiel au cours du temps de la concentration d'une espèce A gazeuse

ii. Diazote et Argon

Ces deux composés sont naturellement présents dans les gaz d'entrée et de sortie du bioréacteur. Ils ne sont pas consommés par le microorganisme, jouent un rôle de traceur inerte et sont à l'équilibre thermodynamique. Par ailleurs leur solubilité est faible dans la phase liquide. A partir de ces différentes constatations, il est possible de calculer le débit volumique de sortie d'après la mesure du débit volumique d'entrée et de la composition des gaz en entrée et en sortie du bioréacteur (Équation 95).

$$Q_{\text{sortie}} = \frac{Q_{\text{entrée}} \cdot x_{\text{N}_2}^{\text{entrée}, t_2} - \frac{dx_{\text{N}_2}^{\text{sortie}}}{dt} \cdot V_{\text{gaz}}}{x_{\text{N}_2}^{\text{sortie}, t_2}}$$

Équation 95 : Débit des gaz de sortie du bioréacteur

Dans l'Équation 95, x_{N_2} est la fraction volumique en diazote dans les gaz de sortie obtenue à partir de l'analyseur gaz. Cette dernière équation présente le calcul du débit des gaz de sortie à partir des données obtenues sur le diazote. Le calcul reste identique si les données utilisées sont issues de l'argon. Ces calculs sont retrouvés dans le logiciel LoCoPREL sous les noms **Debit_Gaz_Sortie_N2** et **Debit_Gaz_Sortie_Ar**. Dans le cadre des bilans effectués en ligne, le débit des gaz de sortie est effectué sur le diazote, car sa mesure par les analyseurs gaz est plus précise du fait de sa fraction volumique plus importante dans les gaz d'entrée par rapport à l'argon. De plus, ce double calcul permet de s'assurer de la cohérence des valeurs issues des gaz, afin de pouvoir détecter un éventuel dysfonctionnement au niveau de l'analyseur.

iii. Dioxygène et dioxyde de carbone

L'analyse en ligne de ces composés permet la détermination d'un certain nombre de variables décrites dans la suite de ce document. Rappelons que, dans le cadre de notre étude, nous considérons le transfert au sein de la phase liquide comme négligeable.

b. Volumes dans le bioréacteur

La détermination du volume de liquide est assurée par la méthode de la dérivée pour l'obtention du volume réel à chaque instant t_i . Dans le logiciel LoCoPREL, le volume est déterminé par l'Équation 96 et porte le nom **Volume_Liquide**. Il est issu de la mesure des différentes balances permettant une mesure de la perte de masse de chaque alimentation apportée dans le bioréacteur pendant un temps $\Delta t = t_i - t_{i-1}$.

$$V_{\text{liquide}}(t_i) = V_{\text{liquide}}(t_{i-1}) + (\Delta V_{\text{Substrat1}} + \Delta V_{\text{Substrat2}} + \Delta V_{\text{Eau1}} + \Delta V_{\text{Eau2}})_{\Delta t} + (\Delta V_{\text{Sel}} + \Delta V_{\text{pH1}} + \Delta V_{\text{pH2}} + \Delta V_{\text{Ech}} - \Delta V_{\text{Evap}})_{\Delta t}$$

Équation 96 : Volume de liquide dans le bioréacteur

Tous les volumes ΔV apportés pendant le temps Δt sont cumulés au volume de liquide calculé à la date t_{i-1} .

A partir du volume de liquide, le volume du ciel gazeux est déduit de l'Équation 97. Il est obtenu en considérant le volume total du bioréacteur $V_{\text{bioréacteur}}$ à 20 litres, complété par le volume des connexions $V_{\text{connexion}}$ du condenseur et des longueurs de tuyaux allant jusqu'à l'analyseur gaz. Il est nommé **Volume_Ciel_Gazeux** dans le logiciel LoCoPREL.

$$V_{\text{ciel}} = V_{\text{bioréacteur}} - V_{\text{liquide}} + V_{\text{connexion}}$$

Équation 97 : Volume du ciel gazeux dans le bioréacteur

i. Solutions carbonées

Les volumes apportés par un substrat en solution se décomposent en deux parties : le volume apporté par le substrat strict, et le volume d'eau apporté par la solution contenue avec le substrat (Solution = Substrat + Eau). Le logiciel LoCoPREL intègre la possibilité d'apporter deux substrats à utiliser successivement. Les volumes apportés sont dénommés ($V_{\text{Substrat1}} ; V_{\text{Eau1}}$) et ($V_{\text{Substrat2}} ; V_{\text{Eau2}}$).

La mesure en ligne de la masse de la solution par les balances permet l'obtention de $\Delta m_{\text{solution}}$, correspondant à la mesure de la variation de masse entre deux acquisitions. La masse de substrat apportée est déterminée par l'Équation 98.

$$\Delta m_{\text{substrat}} = \frac{\Delta m_{\text{solution}}}{\rho_{\text{solution}}} \times C_{\text{solution}}$$

Équation 98 : Masse de substrat apportée par une solution carbonée

Dans l'Équation 98, $\Delta m_{\text{substrat}}$ et $\Delta m_{\text{solution}}$ sont respectivement les masses, en [g], de substrat et de solutions apportées pendant une durée Δt , ρ_{solution} est la masse volumique de la solution en [g ml^{-1}] et C_{solution} est la concentration massique du substrat en [g ml^{-1}].

Afin de pouvoir effectuer des bilans en ligne, il est nécessaire de poser l'hypothèse que la masse volumique de la biomasse ρ_x est égale à 1000 g l^{-1} , et que le coefficient de correction volumique du

bioréacteur α est égal à 1. Ce dernier est sans dimension. Ce coefficient α est utilisé post-expérimentation lors des calculs de bilan pour corriger le volume de liquide calculé par le volume de liquide réellement mesuré après l'expérimentation. Le coefficient α permet d'intégrer les modifications du volume pendant la bioconversion du substrat en biomasse.

Sous ces hypothèses, le calcul de $\Delta V_{\text{substrat}}$ permet de traduire le phénomène de bioconversion du substrat en biomasse ($\text{substrat}_{(l)} = \text{biomasse}_{(s)} + \text{CO}_{2(g)}$) dans l'Équation 99.

$$\Delta V_{\text{substrat}} = \frac{\left(\frac{\Delta m_{\text{substrat}}}{M_{\text{substrat}}^C} - \Delta n_{\text{CO}_2} \right) \times M_{\text{substrat}}^C \times \alpha}{\rho_X}$$

Équation 99 : Volume de liquide apporté par le substrat dans le bioréacteur

Dans l'Équation 99, $\Delta m_{\text{substrat}}$ et M_{substrat}^C sont respectivement la masse de substrat en [g] et la masse molaire du substrat ramenée à un carbone (soit 30 g mol⁻¹ pour le glucose contre 180 g mol⁻¹ pour sa masse molaire « normale ») et Δn_{CO_2} est la quantité en [mol] de CO₂ produit pendant la durée Δt .

En ce qui concerne le volume d'eau apporté par la solution carbonée, il est déterminé par l'Équation 100.

$$\Delta V_{\text{eau}} = \frac{\Delta m_{\text{solution}} - \Delta m_{\text{substrat}}}{\rho_{\text{eau}}}$$

Équation 100 : Volume de liquide dans le bioréacteur apporté par l'eau contenue dans la solution carbonée

ii. Solutions d'éléments inorganiques

Le volume de liquide apporté par les solutions de régulation pH (ΔV_{pH1} , ΔV_{pH2}) et de sel d'alimentation (ΔV_{sel}) est déterminé par l'Équation 101.

$$\Delta V_i = \frac{\Delta m_{\text{solution}_i}}{\rho_i}$$

Équation 101 : Volume de liquide dans le bioréacteur ajouté par une solution apportant des composés inorganiques

Dans l'Équation 101, $\Delta m_{\text{solution}_i}$ représente la différence de masse en [g] pendant le temps Δt pour la solution i considérée, celle-ci ayant une masse volumique ρ_i en [g l⁻¹]

iii. Echantillons

Le calcul du volume de liquide dans le bioréacteur intègre les augmentations de volume $\Delta V_{\text{nutriment}}$ dues aux ajouts par un apport à la seringue de nutriments (ou vitamines), et les prélèvements effectués de moût pour les analyses $\Delta V_{\text{prélèvement}}$. Le terme ΔV_{Ech} est décrit par l'Équation 102.

$$\Delta V_{\text{Ech}} = \Delta V_{\text{nutriment}} - \Delta V_{\text{prélèvement}}$$

Équation 102 : Volume de liquide apporté ou soustrait par l'opérateur

iv. Evaporation

Les expérimentations peuvent durer parfois plus de 100 h sans interruption. Il est donc nécessaire d'intégrer un terme prenant en compte la perte de volume par évaporation d'eau. Pour cela, on utilise le débit d'aération $Q_{\text{Entrée}}$, en considérant que l'air en entrée est sec, et que les gaz sortant du bioréacteur sont saturés en vapeur d'eau (humidité relative = 100 %) à la température de consigne du condenseur considérée. Le volume d'eau évaporée est alors défini par l'Équation 103.

$$\Delta V_{\text{Evap}} = \frac{Q_{\text{Entrée}}}{V_{\text{mol}}} \times \left(\frac{p_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{Saturation}}}{p_{\text{Bioréacteur}}^{\text{Totale}}} \right)_T \times M_{\text{H}_2\text{O}} \times \frac{\Delta t}{\rho_{\text{Eau}}}$$

Équation 103 : Volume de liquide perdu par évaporation

Dans l'Équation 103, ΔV_{Evap} est le volume d'eau évaporée en [l] au cours de la durée Δt en [h], $Q_{\text{Entrée}}$ est le débit de gaz sec entrant dans le bioréacteur en [$\text{l}_n \text{ h}^{-1}$], V_{mol} désigne le volume molaire en [l mol^{-1}], $p_{\text{H}_2\text{O}}^{\text{saturation}}$ et $p_{\text{bioréacteur}}^{\text{total}}$ décrivent respectivement la pression de vapeur saturante en eau en [Pa] et la pression absolue en [Pa] à l'intérieur du bioréacteur considéré à la température du condenseur, $M_{\text{H}_2\text{O}}$ est la masse molaire de l'eau en [g mol^{-1}] et ρ_{eau} est la masse volumique de l'eau en [g l^{-1}].

c. Vitesses

Pour un composé i , à une concentration C_i , la vitesse instantanée de production ou consommation est obtenue par l'Équation 104.

$$r_i = \frac{dC_i}{dt}$$

Équation 104 : Vitesse instantanée de production/consommation d'un composé i

Dans le logiciel LoCoPREL, il est possible d'accéder aux vitesses instantanées pour le dioxygène r_{O_2} et le dioxyde de carbone r_{CO_2} . L'expression analytique contenue dans le logiciel est calculée suivant l'Équation 105 pour la consommation de dioxygène, et suivant l'Équation 106 pour la production de dioxyde de carbone.

$$r_{\text{O}_2} = \frac{Q_{\text{Entrée}} \cdot x_{\text{O}_2}^{\text{Entrée}} - Q_{\text{Sortie}} \cdot x_{\text{O}_2}^{\text{Sortie}} - \frac{dx_{\text{O}_2}^{\text{Sortie}}}{dt} \cdot V_{\text{Ciel}}}{V_{\text{mol}}}$$

Équation 105 : Vitesse instantanée de consommation de dioxygène [mol h^{-1}]

$$r_{\text{CO}_2} = \frac{Q_{\text{Sortie}} \cdot x_{\text{CO}_2}^{\text{Sortie}} - Q_{\text{Entrée}} \cdot x_{\text{CO}_2}^{\text{Entrée}} + \frac{dx_{\text{CO}_2}^{\text{Sortie}}}{dt} \cdot V_{\text{Ciel}}}{V_{\text{mol}}}$$

Équation 106 : Vitesse instantanée de production de dioxyde de carbone [mol h⁻¹]

On pose l'hypothèse que les espèces dissoutes sont minoritaires et peuvent être négligées dans le calcul. La prise en compte de ces espèces nécessitera une correction de ces calculs.

L'intégrale des vitesses instantanées permet d'accéder aux quantités totales consommées ou produites de dioxygène et de dioxyde de carbone que l'on appelle respectivement **O2_Conso_tot** et **CO2_Produit_tot**.

Les vitesses instantanées peuvent également être normalisées par le volume de liquide présent dans le bioréacteur selon l'Équation 107. Les variables sont respectivement nommées **rO2_I** et **rCO2_I** pour la vitesse instantanée de consommation de dioxygène et la production de dioxyde de carbone normalisées par le volume de liquide du bioréacteur.

$$r_i^{\text{liquide}} = \frac{r_i}{V_{\text{liquide}}}$$

Équation 107 : Vitesse de production instantanée de l'espèce i normalisée par le volume de liquide [mol l⁻¹ h⁻¹]

Les vitesses instantanées peuvent aussi être normalisées par la quantité de biomasse présente. On parlera alors de vitesse spécifique ayant pour expression l'Équation 108.

$$q_i = \frac{1}{X} \cdot r_i$$

Équation 108 : Vitesse spécifique d'un composé i

La vitesse spécifique peut être exprimée en [mol_Cmol_X⁻¹ h⁻¹]. Elle sera notée **qO2_mol** pour la consommation de dioxygène et **qCO2_mol** pour la production de dioxyde de carbone. Elle peut aussi être obtenue en [g g_{MS}⁻¹ h⁻¹]. La notation sera alors **qO2_g** pour la consommation de dioxygène et **qCO2_g** pour la production de dioxyde de carbone.

La vitesse spécifique de production de biomasse est appelée taux de croissance. Cette valeur peut être estimée en ligne par l'utilisation de différents signaux issus des capteurs. Dans le cas des sondes de dioxygène dissous (présentes en deux points de l'outil expérimental), l'estimation du taux de croissance a pour expression l'Équation 109.

$$\mu_{pO_2} = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \left(\frac{pO_2^* - pO_2^{\text{mesuré}_{t_2}}}{pO_2^* - pO_2^{\text{mesuré}_{t_1}}} \right)$$

Équation 109 : Taux de croissance estimé à partir des sondes à dioxygène dissous

La valeur obtenue a pour nom $\mu_{\text{O}_2_Fermenteur}$ ou $\mu_{\text{O}_2_Inox}$ suivant qu'elle a été calculée à partir des signaux issus de la sonde à dioxygène dissous positionnée dans le fermenteur ou de ceux de la sonde présente dans le module inox.

La valeur du taux de croissance peut également être estimée à partir des quantités réelles envoyées dans le bioréacteur et issues de l'enregistrement des balances. Il est alors possible d'obtenir $\mu_{\text{substrat1}}$, $\mu_{\text{substrat2}}$ et μ_{Base} à partir des valeurs des balances de substrat 1 et 2 envoyées, et de base consommée. La valeur est obtenue par l'Équation 110.

$$\mu_i = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \left(\frac{m_{\text{balance}_i}(t_2)}{m_{\text{balance}_i}(t_1)} \right) \text{ avec } t_2 > t_1$$

Équation 110 : Taux de croissance estimé à partir des substrats envoyés

L'estimation du taux de croissance μ_{O_2} et μ_{CO_2} est également faite à partir des vitesses calculées sur la consommation en dioxygène et la production de dioxyde de carbone. Ces estimations sont obtenues à partir de l'Équation 111 pour le gaz i.

$$\mu_i = \frac{1}{t_2 - t_1} \ln \left(\frac{r_i^{t_2}}{r_i^{t_1}} \right) \text{ avec } t_2 > t_1$$

Équation 111 : Taux de croissance estimé à partir des vitesses instantanées sur les gaz

d. Coefficient de transfert de dioxygène

Dans le logiciel LoCoPREL, plusieurs méthodes sont proposées pour déterminer le coefficient de transfert en dioxygène $k_L a$. Dans un premier temps, celui-ci est estimé à partir du dimensionnement théorique du bioréacteur. L'article de Riba permet ainsi d'avoir une relation empirique entre des caractères géométriques et le coefficient en transfert de dioxygène (Riba, 1998). Son expression est présentée dans l'Équation 112 et se nomme **Kla_Estime** dans le logiciel.

$$k_L a_{\text{estimé}} = 2 \cdot 10^{-3} \times \left(\frac{P_g}{V_{\text{liquide}}} \right)^{0.7} \times U_g^{0.2} \times 3600$$

Équation 112 : Coefficient de transfert de dioxygène estimé

Dans l'Équation 112, $k_L a_{\text{estimé}}$ est le coefficient en transfert de dioxygène en $[\text{h}^{-1}]$ et V_{liquide} est le volume de liquide précédemment calculé en [l]. P_g est la puissance mécanique en cuve agitée aérée en [W] ; elle est estimée à partir de la puissance consommée en cuve non aérée P et du nombre de Froude par l'Équation 113.

$$P_g = \left(0.27 + \frac{0.022}{Fr} \right) \times P$$

Équation 113 : Puissance mécanique en cuve agitée aérée

Dans l'équation précédente, P est la puissance mécanique en cuve agitée pour un nombre de Reynolds d'agitation $Re_{agitation} > 10^4$ avec vortex ; celui-ci est exprimé en [W], et se définit par l'Équation 114.

$$P = N_{P0} \times \rho_{\text{surnageant}} \times N^3 \times d^5$$

Équation 114 : Puissance mécanique en cuve agitée avec vortex pour $Re_{agitation} > 10^4$

L'Équation 114 est décrite par le nombre de puissance (sans dimension) en régime turbulent N_{P0} dont la valeur est fixe et égale à 0.47, $\rho_{\text{surnageant}}$ est la masse volumique de la solution agitée en [kg m^{-3}] (assimilé à celle de l'eau pour l'estimation de **Kla_estime**), N est la vitesse de rotation de l'agitation en [tr s^{-1}] et d est le diamètre du mobile d'agitation en [m], égal à 0.08 m pour notre bioréacteur. Le nombre de Froude s'exprime, dans le cas des cuves agitées, par l'Équation 115.

$$Fr = \frac{N^2 \times d}{g}$$

Équation 115 : Nombre de Froude

La relation ci-dessus utilise des termes communs à l'Équation 114, à l'exception de g qui est l'accélération de la pesanteur en [m s^{-2}].

Enfin, la vitesse superficielle de gaz U_g , exprimée en [m s^{-1}], est définie par l'Équation 116.

$$U_g = \frac{Q_v}{A}$$

Équation 116 : Vitesse superficielle de gaz

La vitesse superficielle de gaz U_g est dépendante du débit volumique de gaz entrant dans le bioréacteur en [$\text{m}^3 \text{s}^{-1}$], et de l'aire A de section droite de la cuve utilisée en [m^2]. Dans notre cas, cette aire est fixée à $5.73 \cdot 10^{-2} \text{ m}^2$.

Le coefficient de transfert de dioxygène peut également s'estimer en ligne à partir de la vitesse instantanée normée de consommation de dioxygène. Il est appelé **Kla_experimental** dans le logiciel LoCoPREL et s'exprime selon l'Équation 117.

$$k_l a_{\text{exp}} = \frac{r_{\text{O}_2}^{\text{liquide}}}{C_{\text{O}_2}^* - C_{\text{O}_2}^{\text{exp}}}$$

Équation 117 : Coefficient de transfert de dioxygène expérimental

$k_l a_{\text{exp}}$ est en [h^{-1}] si la vitesse instantanée de consommation de dioxygène $r_{\text{O}_2}^{\text{liquide}}$ est en [mol h^{-1}] et les concentrations $C_{\text{O}_2}^*$ et $C_{\text{O}_2}^{\text{exp}}$, exprimées en [mol l^{-1}], sont respectivement la concentration en dioxygène dissous à saturation et la concentration en dioxygène dissous à l'instant t.

Cependant, l'Équation 117 ne considère pas l'appauvrissement des bulles en dioxygène durant leur remontée dans le bioréacteur (dioxygène consommé progressivement par le microorganisme). Pour cela, le gradient de concentration est intégré au calcul du coefficient de transfert en dioxygène par l'utilisation d'une moyenne logarithmique utilisée dans la thèse de Mathias FYFERLING (Fyferling, 2007). L'expression du nouveau coefficient de transfert de dioxygène prend la forme de l'Équation 118 et se nomme **Kla_experimental_MoyLog** dans le logiciel LoCoPREL.

$$k_l a_{\text{exp/ln}} = \frac{r_{\text{O}_2}^{\text{liquide}}}{\left(C_{\text{O}_2}^{\text{entrée}} - C_{\text{O}_2}^{\text{entrée}} \cdot p_{\text{O}_2}^{\text{bioréacteur}} \right) - \left(C_{\text{O}_2}^{\text{sortie}} - C_{\text{O}_2}^{\text{sortie}} \cdot p_{\text{O}_2}^{\text{bioréacteur}} \right)} \ln \left(\frac{C_{\text{O}_2}^{\text{entrée}} - C_{\text{O}_2}^{\text{entrée}} \cdot p_{\text{O}_2}^{\text{bioréacteur}}}{C_{\text{O}_2}^{\text{sortie}} - C_{\text{O}_2}^{\text{sortie}} \cdot p_{\text{O}_2}^{\text{bioréacteur}}} \right)$$

Équation 118 : Coefficient de transfert de dioxygène expérimental corrigé

L'Équation 118 intègre, par rapport à l'Équation 117 le gradient de concentration en dioxygène dans la phase liquide entre le bas et le haut du bioréacteur. Pour cela, le pourcentage de saturation en dioxygène dissous $p_{\text{O}_2}^{\text{bioréacteur}}$ est pris en compte de manière à retrancher la quantité de dioxygène présente dans la phase liquide aux différents points du bioréacteur. Puis les concentrations en dioxygène dans la phase liquide au point d'injection de gaz et en sortie du bioréacteur, respectivement $C_{\text{O}_2}^{\text{entrée}}$ et $C_{\text{O}_2}^{\text{sortie}}$ en $[\text{mol l}^{-1}]$, sont calculées à partir de la loi de Henry et du modèle de Weisenberger et Schumpe (Weisenberger and Schumpe, 1996) permettant ainsi d'intégrer un correctif sur la variation de solubilité du dioxygène dans le cas de milieu salin.

e. Rendements apparents

Les rendements obtenus en ligne sont des rendements apparents car ils ne prennent pas en compte la maintenance du microorganisme. Ils peuvent être calculés sur les quantités totales mises en œuvre dans l'expérimentation ; on parlera alors de rendement apparent global. Ils peuvent également être calculés sur des intervalles de temps plus courts (les deux dernières acquisitions effectuées par le logiciel) ; on parlera alors de rendement apparent instantané. L'Équation 119 illustre le calcul des variables **Rxs_mol**, **Rxs_g**, **Rxs_dt_mol** et **Rxs_dt_g**. Le calcul est identique dans les deux cas, seules les unités utilisées et l'intervalle de temps considéré changent.

$$R_{x/s} = \frac{\Delta X}{\Delta S}$$

Équation 119 : Rendement apparent instantané biomasse - substrat

Le logiciel calcule trois rendements différents, en global et en instantané, dans différentes unités. L'ensemble des rendements contenus dans le logiciel est rassemblé dans le *Tableau 35*.

Type de rendement	Nom LoCoPREL	Unité
Global	RO2X_mol	[mol _{O2} mol ^C _X ⁻¹]
	RO2X_g	[g _{O2} g _X ⁻¹]
	RCO2X_mol	[mol _{CO2} mol ^C _X ⁻¹]
	RCO2X_g	[g _{CO2} g _X ⁻¹]
	Rxs_mol	[mol ^C _X mol _{substrat} ⁻¹]
	Rxs_g	[g _X g _{substrat} ⁻¹]
Instantané	RO2X_dt_mol	[mol _{O2} mol ^C _X ⁻¹]
	RO2X_dt_g	[g _{O2} g _X ⁻¹]
	RCO2X_dt_mol	[mol _{CO2} mol ^C _X ⁻¹]
	RCO2X_dt_g	[g _{CO2} g _X ⁻¹]
	Rxs_dt_mol	[mol ^C _X mol _{substrat} ⁻¹]
	Rxs_dt_g	[g _X g _{substrat} ⁻¹]

Tableau 35 : Synthèse des différents rendements calculés par le logiciel LoCoPREL

f. Coefficient respiratoire

A partir de l'analyse des gaz, il est possible d'estimer en ligne le coefficient respiratoire de deux façons différentes. La première possibilité consiste à utiliser les vitesses instantanées, son expression est présentée dans l'Équation 120. Il s'agit de la variable **QR_r** dans le logiciel LoCoPREL.

$$Q_R = \left| \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} \right|$$

Équation 120 : Coefficient respiratoire obtenu par les vitesses instantanées

La seconde forme utilise directement les pourcentages obtenus par les analyseurs gaz (Spectromètre de masse ou INNOVA®), et prend la forme de l'Équation 121. Il s'agira de la formule du terme **QR_Gaz** dans le logiciel LoCoPREL.

$$Q_R = \frac{\phi_{CO_2}^{out} - \phi_{CO_2}^{in}}{\phi_{O_2}^{in} - \phi_{O_2}^{out}}$$

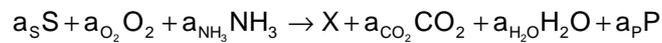
Équation 121 : Coefficient respiratoire obtenu à partir des données brutes des analyseurs gaz

g. Bilans

Malgré le bruit lié à l'ensemble des mesures, il est possible d'effectuer le bilan élémentaire du bioprocédé. Pour cela, un bilan sur le carbone est effectué, avant d'entreprendre un bilan généralisé en utilisant le degré de réduction des espèces en présence, de manière à ré-estimer le degré de réduction généralisé de la biomasse. Ce dernier est un indicateur de l'état physiologique de la cellule.

i. Théorie

Une réaction biologique peut être décrite de manière générale par l'Équation 122 où S est le substrat, X la biomasse et P les différents produits. Les termes a_i définissent les coefficients stœchiométriques de la bioréaction.



Équation 122 : Relation générale d'une bioréaction aérobie

Ainsi, il est possible de définir un bilan carbone par les vitesses instantanées (ou flux) en mole de carbone [mol^C] pour les m composés de la réaction biologique. Le bilan est bouclé sur la condition de l'Équation 123.

$$\sum_{j=1}^m r_j^{net} = 0 \Leftrightarrow -r_S + r_X + r_{CO_2} + r_P = 0$$

Équation 123 : Condition de vérification du bilan carbone

Le bilan élémentaire généralisé, plus souvent appelé bilan redox, intègre la vérification du bilan sur plusieurs éléments. Dans notre cas, le bilan redox est effectué sur le carbone, l'hydrogène, l'oxygène et l'azote. Le degré de réduction γ_j de chaque élément j est considéré. Il est alors intégré de manière à boucler le bilan pour chaque élément considéré selon la relation décrite par l'Équation 124 sous les conditions sur les degrés de réduction définies dans l'Équation 125.

$$\sum_{j=1}^m r_j^{net} \cdot \gamma_j = 0$$

Équation 124 : Condition de vérification du bilan élémentaire généralisé

$$\left. \begin{array}{l} \gamma_{NH_3} = \gamma_N + 3\gamma_H = 0 \\ \gamma_{CO_2} = \gamma_C + 2\gamma_O = 0 \\ \gamma_{H_2O} = 2\gamma_H + \gamma_O = 0 \\ \gamma_H = 1 \end{array} \right\} \begin{array}{l} \gamma_N = -3 \\ \gamma_C = 4 \\ \gamma_O = -2 \end{array}$$

Équation 125 : Degrés de réduction des éléments C, H, O, N

ii. Carbone apporté

Le logiciel LoCoPREL offre la possibilité de paramétrer deux substrats carbonés de manière à les intégrer aux calculs afin d'effectuer des bilans en ligne. Pour cela, la quantité de chaque substrat apporté est calculée par rapport aux masses initiales de leurs balances. Ces quantités sont désignées par **Cmol_Substrat1** et **Cmol_Substrat2** dans le logiciel LoCoPREL, pour les quantités apportées en moles de carbone, notées [Cmol] et respectivement issues du substrat n°1 et du substrat n°2. La quantité de carbone apportée par chaque substrat est issue de l'Équation 126.

$$n_{\text{substrat}}^{\text{C}} = \frac{\left(\frac{m_{\text{balance}}(t_0) - m_{\text{balance}}(t)}{\rho_{\text{solution}}} \cdot C_{\text{solution}} + m_{\text{substrat}}^{\text{inoc}} \right)}{M_{\text{substrat}}^{\text{C}}}$$

Équation 126 : Quantité de moles de carbone apportée pour un substrat défini

Dans l'Équation 126, le nombre de moles de carbone $n_{\text{substrat}}^{\text{C}}$, en $[\text{mol}^{\text{C}}]$, apporté par un substrat donné, est calculé à partir de m_{balance} correspondant à la masse en [g] du bidon de substrat à l'inoculum à l'instant t_0 et en cours d'expérimentation à l'instant t , ρ_{solution} et C_{solution} sont la masse volumique en $[\text{g l}^{-1}]$ et la concentration massique en $[\text{g l}^{-1}]$ de la solution de substrat, $m_{\text{substrat}}^{\text{inoc}}$ est la masse en [g] de substrat apportée par l'inoculum et $M_{\text{substrat}}^{\text{C}}$ est la masse molaire du substrat ramenée à un carbone (en $[\text{mol}^{\text{C}}]$).

La somme des quantités de carbone apportées dans le bioréacteur par les substrats paramétrés est nommée **Cmol_tot** dans le logiciel LoCoPREL. C'est à partir de cette quantité que sont calculés les différents bilans.

iii. Bilan carbone

Le bilan carbone effectué en ligne est calculé de proche en proche à chaque acquisition. Le logiciel permet d'obtenir la quantité de carbone accumulé dans le bioréacteur selon l'Équation 127. Cette variable est nommée **Cmol_Accumule** dans le logiciel LoCoPREL.

$$n_{\text{accumulé}}^{\text{C}}(t_i) = n_{\text{accumulé}}^{\text{C}}(t_{i-1}) + \Delta n_{\text{substrat1}} + \Delta n_{\text{substrat2}} - r_{\text{CO}_2} \cdot (t_i - t_{i-1})$$

Équation 127 : Calcul de la quantité de carbone accumulé dans le bioréacteur en [Cmol]

Les quantités de carbone accumulé dans le bioréacteur $n_{\text{accumulé}}^{\text{C}}$ au temps t_i et t_{i-1} (en [h]), et $\Delta n_{\text{substrat}}$ pour les substrats 1 et 2 sont exprimées en [Cmol]. La vitesse instantanée de production de dioxyde de carbone r_{CO_2} est en $[\text{mol h}^{-1}]$.

A partir de la quantité de carbone accumulée dans le bioréacteur, il est possible de déduire les concentrations au temps t_i , plus parlant pour un utilisateur du logiciel. LoCoPREL détermine la concentration molaire de carbone accumulé $C_{\text{accumulé}}^{\text{Cmol}}$, nommée **Conc_Cmol_Accumule** dans le logiciel. Une seconde concentration est calculée en considérant qu'aucun produit, autre que la biomasse, n'est obtenu dans le bioréacteur. Ainsi, à partir de la concentration en carbone accumulé, il est possible d'obtenir une concentration massique accumulée $C_{\text{accumulé}}^{\text{g}}$, nommé **Conc_g_Biomasse_Accumule** dans le logiciel, de manière à avoir une estimation de la concentration réelle en biomasse dans le bioréacteur. Les expressions de ces concentrations sont définies respectivement par l'Équation 128 et l'Équation 129.

$$C_{\text{accumulé}}^{\text{Cmol}} = \frac{n_{\text{accumulé}}^{\text{C}}}{V_{\text{liquide}}}$$

Équation 128 : Concentration du carbone accumulé dans le bioréacteur en [Cmol l⁻¹]

$$C_{\text{accumulé}}^g = C_{\text{accumulé}}^{\text{Cmol}} \cdot M_X^C$$

Équation 129 : Estimation de la concentration massique de la biomasse dans le bioréacteur en [g l⁻¹]

La concentration en carbone accumulé $C_{\text{accumulé}}^{\text{Cmol}}$, en [Cmol l⁻¹] est définie avec la quantité de carbone accumulée $n_{\text{accumulé}}^C$ en [Cmol] et le volume de liquide calculé en [l]. A partir de la masse molaire moyenne ramenée à un carbone de la biomasse M_X^C en [g Cmol⁻¹], et sur l'hypothèse d'une production de biomasse uniquement, il est possible d'estimer la concentration massique de biomasse dans le bioréacteur notée $C_{\text{accumulé}}^g$ en [g l⁻¹].

iv. Degré de réduction de la biomasse

Comme pour le bilan carbone, nous utilisons les quantités de carbone apporté en [Cmol] par chaque substrat. Elles sont ensuite employées en étant pondérées par le degré de réduction du carbone γ_C (sans dimension) des espèces entrantes. Ainsi, le pouvoir réducteur $n_{\text{substrat}}^\gamma$ en [Cmol] apporté par le carbone entrant dans le bioréacteur est défini par l'Équation 130 et se nomme **Redox_Substrat1** et **Redox_Substrat2** dans le logiciel LoCoPREL, respectivement pour le substrat 1 et le substrat 2.

$$n_{\text{substrat}}^\gamma = \gamma_C \cdot n_{\text{substrat}}^C$$

Équation 130 : Pouvoir réducteur apporté par un substrat

De manière à estimer en ligne le degré de réduction de la biomasse n_X^γ (sans dimension), appelé **Redox_Accumule** dans le logiciel LoCoPREL, celui-ci est défini par l'Équation 131.

$$n_X^\gamma = \frac{\gamma_C \cdot n_{\text{total}}^C + \gamma_O \cdot \int_{t_0}^t r_{O_2} \cdot dt}{n_{\text{accumulé}}^C}$$

Équation 131 : Estimation en ligne du degré de réduction de la biomasse

Le degré de réduction de la biomasse n_X^γ (sans dimension) dépend du degré de réduction du carbone γ_C apporté par la quantité totale de substrat n_{total}^C en [Cmol], du pouvoir oxydant de l'oxygène par son degré d'oxydation γ_O et de la quantité totale d'oxygène consommé représentée par l'intégral au cours du temps de la vitesse instantanée de consommation de dioxygène r_{O_2} en [mol h⁻¹], le tout ramené à la quantité de carbone accumulé dans le bioréacteur en [Cmol].

h. Limitation nutritionnelle

Dans le cadre de cultures produisant des métabolites spécifiques de manière intra ou extracellulaire, la gestion d'une limitation nutritionnelle nécessite souvent de gérer l'apport d'un élément limitant par rapport au substrat carboné. Dans le cadre du développement du logiciel LoCoPREL, seule une limitation nutritionnelle a été prévue. Il est nécessaire, afin d'augmenter les possibilités de conduite de culture, d'implémenter d'autres possibilités de limitation nutritionnelle.

Le logiciel LoCoPREL offre des indicateurs pour suivre une limitation nutritionnelle à l'azote. Pour cela, LoCoPREL offre deux informations. La première information est la quantité totale d'azote apporté **Nmol_tot**. Son expression est décrite par l'Équation 132.

$$N_{\text{total}} = \frac{m_{\text{balance}}(t_0) - m_{\text{balance}}(t)}{\rho_N} \times C_{\text{solution_N}}$$

Équation 132 : Quantité d'azote apporté dans le bioréacteur en [mol]

L'Équation 132 décrit la variable **Nmol_tot** de LoCoPREL sous le nom N_{total} , défini en [mol]. Dans son expression, $m_{\text{balance}}(t_0)$ et $m_{\text{balance}}(t)$ sont respectivement la masse de la balance de l'alimentation en azote au moment de l'inoculum et à l'instant t , toutes les deux en [g], ρ_N est la masse volumique de la solution azotée en $[\text{g l}^{-1}]$ et $C_{\text{solution_N}}$ est la concentration de la solution azotée en $[\text{mol l}^{-1}]$.

Pour suivre la limitation concernant cet élément, la connaissance de la quantité d'azote est insuffisante. Il est nécessaire de se pencher plus précisément sur le rapport élémentaire N/C, nommé **Nmol_Cmol** dans le logiciel LoCoPREL. L'Équation 133 explique l'expression de cette variable.

$$N/C = \frac{N_{\text{total}}}{C_{\text{accumulé}}}$$

Équation 133 : Rapport élémentaire Azote / Carbone

Dans l'Équation 133, N/C est un rapport sans dimension issu de la quantité totale d'azote N_{total} apportée dans le bioréacteur en [mol], ramenée à la quantité de carbone en [mol] accumulé dans le bioréacteur.

2. Calculs post-expérimentation

Outre les dosages de métabolites pouvant être produits, il est nécessaire de reprendre l'ensemble des calculs effectués en ligne afin de prendre en compte et corriger certaines hypothèses simplificatrices. Ces simplifications étaient nécessaires lors du calcul en ligne puisque l'ensemble des données nécessaires n'était pas disponible. Il s'agit, entre autres, de la bioconversion du substrat (transformé en biomasse dans notre cas) et du volume théorique de liquide, ce dernier étant recalculé en prenant en compte les volumes des échantillons prélevés. Cela nécessite de corriger le volume réel de liquide par le volume final réellement mesuré, puis de déterminer le coefficient de correction volumique α , préalablement présenté dans l'Équation 99.

De manière à s'affranchir de la variabilité des mesures expérimentales, les points expérimentaux sont lissés grâce à l'utilisation d'expressions polynômiales, de degré 3 ou 4, sur des fenêtres glissantes temporelles, par la méthode des moindres carrés. De manière à traduire au mieux la tendance des points expérimentaux, des points sont ajoutés de manière à ce que la courbe lissée traduise correctement les évolutions temporelles. Le lissage permet d'obtenir une continuité des valeurs expérimentales (appelées valeurs lissées) et de pouvoir avoir accès à la dérivée de la fonction polynômiales, et donc aux vitesses de réaction.

Les courbes lissées sont analysées par une méthode développée au laboratoire (Cailler, 1994) dérivée des méthodes décrites par van der Heijden et ses collaborateurs (Van Der Heijden *et al.*, 1994a; Van Der Heijden *et al.*, 1994b) pour la détection d'erreurs 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 entre elles.

**Chapitre III - Présentation du logiciel
LoCoPREL, interface informatique
de l'outil expérimental**

Table des matières du chapitre III

INTRODUCTION	169
I. DESCRIPTION GENERALE DE LOCOPREL	170
A. OBJECTIFS.....	170
B. CONTEXTE ET HISTORIQUE.....	171
C. ENVIRONNEMENT DE PROGRAMMATION.....	172
1. Langage C#.....	172
2. Eléments structurels d'un programme.....	172
D. SPECIFICITES DU CODE C# DEVELOPPE.....	173
1. Démarrage du logiciel.....	174
2. Préparation d'une expérimentation.....	176
3. Expérimentation biologique.....	177
E. ARCHITECTURE DE LOCOPREL.....	178
II. CONFIGURATION D'UNE EXPERIMENTATION	181
A. DEMARRAGE ET SAUVEGARDE.....	181
1. Utilisation pratique du logiciel.....	181
2. « Fichier Paramètre ».....	181
B. SYSTEME D'ACQUISITION DES CAPTEURS.....	181
C. INITIALISATION DE VARIABLES ET DES GAZ.....	183
D. BALANCES.....	185
1. Balances « Substrat ».....	186
2. Balances « Sel » et « Régulation pH n ² ».....	187
3. Balance « Régulation pH n ¹ ».....	188
E. POMPES.....	188
F. CROISSANCE MICROBIENNE.....	191
1. Production de biomasse.....	191
2. Configuration des apports.....	192
3. Information sur le microorganisme.....	193
G. JOURNAL EVENEMENTIEL ET FIN DES CONFIGURATIONS.....	194
H. SYNTHESE DE LOCOPREL SUR LA PREPARATION ET LA CONFIGURATION DU MATERIEL.....	195
III. CONDUITE DE CULTURES	196
A. MENU GENERAL.....	196
1. Généralités.....	196
2. Fichiers de stockage d'informations.....	197
B. INOCULUM.....	199
C. VISUALISATION DES VARIABLES.....	201

1.	<i>Variables alphanumériques</i>	201
2.	<i>Visualisation graphique</i>	202
D.	GESTION DU BIOPROCEDE	203
1.	<i>Fermenteur</i>	203
2.	<i>Apports nutritionnels</i>	204
3.	<i>Gaz</i>	206
4.	<i>Journal évènementiel</i>	207
E.	GESTION DE LA VISCOSIMETRIE	208
1.	<i>Courbe d'écoulement</i>	209
2.	<i>Configuration des profils de débit</i>	209
F.	PRELEVEMENTS ET CORRECTIFS AUTOMATISES	212
G.	SYNTHESE DE LOCoPREL AU COURS D'UNE EXPERIMENTATION BIOLOGIQUE	213
	CONCLUSION	214

INTRODUCTION

Dans le cadre de la mise en œuvre de microorganisme, les bioréacteurs n'offrent que de simples options quant aux possibilités de conduite des cultures. Ces options sont généralement des alimentations peu flexibles, limitées à des consignes constantes et à quelques régulations (pourcentage de dioxygène dissous, pH, température, pression et apport d'antimousse). Pour atteindre les hautes concentrations cellulaires, il est important de maîtriser l'apport en substrat, en particulier lorsque le microorganisme est sensible à la concentration résiduelle en substrats dans la phase liquide (cas de *S. cerevisiae*). Dans ce cas, le métabolisme du microorganisme s'oriente vers une autre voie, passant par exemple d'une production de biomasse à une production de métabolite spécifique. Ainsi, dans l'objectif de mieux contrôler l'activité du microorganisme, dans une large gamme de concentration en biomasse (et particulièrement pour les hautes concentrations cellulaires), les solutions commerciales disponibles ne sont pas suffisantes pour répondre aux impératifs liés à la gestion de l'activité biologique.

Pour éviter, entre autre, les limites de conduite de cultures consécutives à un environnement instrumental restreint, et dans l'objectif d'ajouter un grand nombre de capteurs pour affiner au maximum la conduite de cultures, le développement de l'outil expérimental a été réfléchi de manière à gérer précisément le métabolisme microbien. Cette gestion du métabolisme peut, par exemple, être effectuée par le contrôle des débits d'alimentation en substrat. Pour cela, les flux entrants sont maîtrisés, tout en gérant le débit de circulation dans la boucle de dérivation afin de permettre une investigation rhéologique du moût. Cette approche permet, *in fine*, d'étudier le métabolisme microbien, tout en enregistrant l'évolution des différentes variables permettant une caractérisation physique et physicochimique dynamique du moût.

Ainsi, il a été impératif de réfléchir sur différents plans. Pour que l'approche scientifique soit cohérente, il a fallu prendre du recul sur les outils disponibles et identifier le matériel manquant nécessaire au projet global, afin de compléter l'environnement instrumental et informatique existant. Les limites de communication, liées à l'emploi de liaisons série type RS232, ont dû être identifiées, de manière à déterminer les possibilités d'interaction entre instruments. Ceci est particulièrement nécessaire lors de calculs automatisés ou d'acquisitions à fréquence d'échantillonnage élevée. L'intégration du facteur humain a également été pris en considération, particulièrement en ce qui concerne la facilité d'utilisation de l'outil informatique, l'ergonomie de l'environnement, la transmission d'information entre opérateurs ou le gain de temps lié à la mise en place d'étapes automatisées. L'ensemble de ces étapes permet d'améliorer les conditions de préparation et de suivi de l'expérimentation par le ou les opérateurs. Enfin, une réflexion a été élaborée autour de l'agencement des compétences scientifiques nécessaires pour le sujet d'étude, principalement axée autour de la rhéologie et du génie microbiologique. Le logiciel LoCoPREL a été développé dans ce sens afin d'améliorer les potentialités de l'outil expérimental tout en offrant un large panel d'investigations possibles pour l'opérateur.

Ce troisième chapitre est composé de trois parties. Une première partie présente la démarche qui a abouti à la création du logiciel LoCoPREL. Une seconde partie décrit l'utilisation du logiciel et son paramétrage dans le cadre de la préparation d'une expérimentation. Enfin, une dernière partie présente les différentes fonctionnalités offertes à l'opérateur au cours d'une culture de microorganisme.

I. DESCRIPTION GENERALE DE LOCoPREL

La mise en place d'une nouvelle interface de gestion par ordinateur, répondant aux besoins de l'outil instrumental, a nécessité la recherche d'une technologie informatique adaptée. Cette technologie doit garantir l'ensemble des spécifications recherchées, par comparaison avec l'interface précédemment développée sous LabView®. Ce nouveau logiciel a été baptisé LoCoPREL (**Logiciel de Contrôle de la Plateforme de Rhéologie En Ligne**). Ce dernier, développé sous Microsoft Visual Studio 2008 sous C# en mode Winform, est opérationnel dans une première version partiellement corrigée (phase de débogage). Cependant, en l'état, il permet néanmoins de lancer des expérimentations biologiques à condition de respecter l'utilisation stricte du logiciel. Ce travail étant conséquent, toutes les éventualités pouvant provoquer des erreurs majeures (avec un risque d'avortement de l'expérimentation lié à l'interface informatique) n'ont pu être identifiées. Néanmoins, l'expérimentateur étant également le développeur, il a été possible de déboguer progressivement une partie du logiciel entre chaque expérimentation.

A. Objectifs

Le logiciel LoCoPREL est un outil informatique multifonctionnel (paramétrage, contrôle - commande et analyse en ligne) couplé à un outil expérimental complexe et singulier, comprenant un bioréacteur environnementé, une boucle de dérivation instrumentée, modulable, et un module de filtration dynamique (non utilisé dans cette étude). LoCoPREL vise prioritairement à conduire des cultures de microorganismes dans un bioréacteur, à en caractériser et analyser en ligne les diverses propriétés physico-chimiques, et à gérer l'activité microbiologique et les prélèvements/soutirages.

L'originalité du logiciel LoCoPREL réside dans l'ensemble des actions suivantes :

1. La configuration de l'outil expérimental avec le paramétrage de l'instrumentation spécifique, des solutions d'alimentation, du microorganisme et des conditions d'acquisition des données,
2. La conduite de culture en suivant une stratégie précise (contrôle/commande de l'environnement physico-chimique, des apports de substrat et nutriments) en mode continu, semi-continu (fed-batch) ou discontinu (batch).
3. La caractérisation et l'analyse en ligne des propriétés rhéologique et physico-chimique (viscosité, masse volumique, pH, température, conductivité électrique) de milieux de culture triphasiques (gaz, liquide, solide [biomasse catalytique et/ou particule en suspension]) en présence et sous contrôle de l'activité microbiologique.
4. L'estimation des bilans matières (intransit, extrant, accumulation), de plusieurs variables biologiques (taux de croissance, vitesse spécifique de production et de consommation, coefficient respiratoire, etc.) ou procédés (coefficient de transfert de dioxygène) en ligne.

Le logiciel a été initialement développé et validé pour conduire des cultures cellulaires axéniques en mode oxydatif (culture pure, production de biomasse) et en caractériser finement et *in situ* l'évolution du comportement rhéologique. Des approches macroscopiques hors ligne, en partie à l'échelle de la cellule, sont également conduites pour compléter les informations *in situ*. La principale difficulté réside dans la quantification des phénomènes physiques, par le développement et la mise en œuvre d'outils spécifiques *in situ*, sans compromettre la maîtrise de l'activité biologique, dans le respect du maintien de la stérilité.

B. Contexte et historique

Initialement, le système informatique disponible avec l'instrumentation comprend un système d'acquisition, avec la possibilité de changer manuellement la consigne en tension des pompes. Cette interface commerciale étant à la base limitée et non programmable, il a été nécessaire de réfléchir à un développement adapté à l'étude et répondant, dans un premier temps, aux conditions suivantes :

- Enregistrer les données des capteurs avec la possibilité de changer leur configuration (pleine échelle) pendant l'acquisition,
- Programmer des séquences de débit sur la pompe dans la boucle externe,
- Permettre d'appliquer des périodes d'acquisition différentes en fonction de la programmation de la pompe (débit constant ou séquencé),
- Visualiser et suivre les données au cours du temps.

Afin de répondre à un cahier des charges mêlant un ensemble de contraintes rhéologiques, microbiologiques, instrumentales et informatiques, un premier programme a été développé sous LabView® (cf. *Annexe 8 : Interface homme-machine à partir du programme de gestion sous LabView®*). Cette première interface était couplée à une application développée en « Visual Basic for Applications » sous Microsoft Excel® pour répondre aux objectifs initiaux de visualisation des données. Cependant, cette configuration a rapidement permis d'identifier des limitations sur les aspects purement informatiques. Celles-ci constituaient un réel frein à l'accroissement de la qualité des expérimentations biologiques et des possibilités de la plateforme. Les principaux points qu'il semblait particulièrement intéressant de mettre en place sont listés ci-dessous :

- Conserver le contrôle de l'instrumentation quelle que soit l'action effectuée avec le logiciel,
- Avoir une interface unique, ne limitant pas la quantité de données visualisables,
- Visualiser numériquement et graphiquement les variables issues des capteurs, des actionneurs ou des calculs,
- Intégrer une gestion des alimentations en substrat pour la conduite de culture (gestion des pompes, des balances, des gaz et des prélèvements),
- Permettre l'évaluation en ligne de grandeurs microbiologiques au cours de la conduite de culture à travers des calculs spécifiques,
- Permettre l'évaluation de la viscosité en ligne par l'intégration des courbes de frottement établies,
- Améliorer et faciliter le travail de groupe par le biais d'une interface fenêtrée intégrant un journal de bord pour la transmission des informations sur l'historique de l'expérience,

- Corriger en ligne les variables de température et les débits d'alimentation.

Parallèlement, notre cahier des charges doit intégrer les limites de communication de chaque appareil. L'ensemble de l'instrumentation a été préalablement décrit dans le *Chapitre II*.

C. Environnement de programmation

1. Langage C#

La syntaxe de C# est proche de celles des langages C, C++ ou Java. C# inclut tous les mécanismes classiques d'un langage objet : classes, implémentation, encapsulation, interfaces...

Ce langage a été choisi pour plusieurs raisons. La première est qu'il permet de créer des exécutables fenêtrés sous Windows. De plus, le C# est facile à prendre en main à partir de la connaissance d'un autre langage proche. D'autre part, les interfaces créées peuvent être dynamiques (menus, fenêtres multiples, graphiques évolutifs...) et peuvent faire afficher un plus grand nombre de données qu'avec les fichiers Excel au niveau des graphiques. Enfin, ce langage est évolutif et récent ; il permet, par la suite, de faire évoluer facilement un programme, et d'y ajouter de nouvelles fonctionnalités. Enfin, il permet de connecter l'exécutable à de nombreux autres outils et logiciels.

2. Éléments structurels d'un programme

Les programmes en C# s'exécutent sur le .NET Framework. Ce dernier est un composant intégral de Windows qui inclut un système d'exécution virtuel appelé Common Language Runtime (CLR) et un ensemble unifié de bibliothèques de classes. Les bibliothèques de classes sont un ensemble de classes regroupées car elles concernent toutes une même fonctionnalité. Par exemple, une bibliothèque de classe de traitement de chaîne de caractères regroupe un ensemble de classes en rapport avec le traitement de chaînes de caractères. Le CLR est l'implémentation commerciale de l'infrastructure du langage commun de Microsoft (CLI, Common Language Infrastructure), norme internationale constituant la base de toute création d'environnements d'exécution et de développement, assurant le fonctionnement homogène des langages et des bibliothèques.

Le code source écrit en C# est compilé dans un langage intermédiaire conforme à la spécification CLI. Le code de ce langage intermédiaire, ainsi que les ressources telles que les bitmaps et les chaînes, sont stockés sur le disque dans un fichier exécutable appelé assembly, dont l'extension est généralement .exe ou .dll. Un assembly contient un manifeste (fichier de description) qui fournit des spécifications sur les types, la version, la culture et les conditions de sécurité de l'assembly.

À l'exécution du programme C#, l'assembly est chargé dans le CLR, qui peut prendre différentes mesures sur la base des informations du manifeste. Ensuite, si les conditions de sécurité sont respectées, le CLR effectue une compilation juste-à-temps pour convertir le code du langage intermédiaire en instructions machine natives. Le CLR fournit également d'autres services en rapport avec les opérations automatiques de garbage collection (système permettant de détruire les objets inutilisés stockés en mémoire vive) et la gestion des exceptions et des ressources. Le code exécuté

par le CLR est quelquefois appelé « code managé », par contraste avec le « code non managé », compilé dans le langage machine natif ciblant un système spécifique. La *Figure 57* ci-dessous illustre les relations entre les temps de compilation et d'exécution des fichiers en code source C#, des bibliothèques de classes .NET Framework, des assemblys et du CLR.

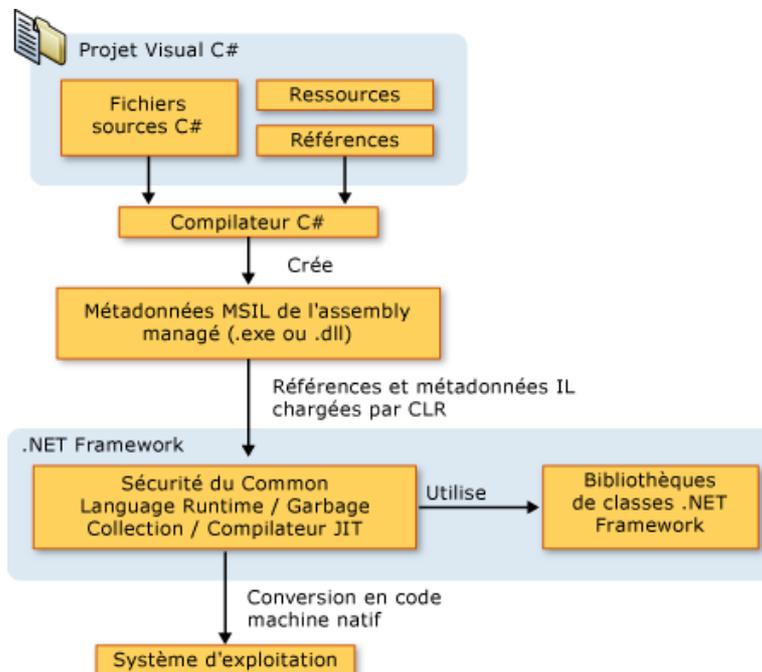


Figure 57 : Du projet visual C# au logiciel utilisé dans le système d'exploitation

L'interopérabilité des langages est une fonctionnalité clé du .NET Framework, l'interopérabilité permet ainsi de faire communiquer des applications créées dans deux langages différents (un programme en C# peut ainsi utiliser des bibliothèques de classe développées en VB.NET). Un même assembly peut contenir plusieurs modules écrits dans différents langages .NET, et les types peuvent se référencer l'un l'autre exactement comme s'ils avaient été écrits dans le même langage.

Outre les services d'exécution, le .NET Framework inclut également une bibliothèque étendue de plus de 4000 classes organisées en espaces de noms, qui fournissent une large gamme de fonctionnalités couvrant de nombreuses utilisations, de l'entrée/sortie de fichiers aux contrôles Windows Forms, en passant par la manipulation de chaînes et l'analyse XML. Une application C# standard utilise largement la bibliothèque de classes .NET Framework pour assurer les tâches de maintenance courantes les plus fastidieuses.

D. Spécificités du code C# développé

Le code du programme a été développé en intégrant un grand nombre de contraintes liées soit au cahier des charges du logiciel (voir *1.A Objectifs*), soit aux impératifs de communication du matériel utilisé. Cette partie a pour objectif de décrire les principales structures et spécificités nécessaires au bon fonctionnement du logiciel LoCoPREL dans sa globalité.

1. Démarrage du logiciel

Le démarrage du logiciel LoCoPREL offre quatre possibilités indépendantes en relation avec l'utilisation de l'outil instrumental. L'utilisateur peut démarrer une nouvelle expérimentation, impliquant le passage par l'ensemble des étapes de préparation et de configuration nécessaires avant le démarrage du logiciel pour une expérimentation biologique (voir *Figure 58*). Ainsi, dans le cas d'une erreur logicielle au cours d'une expérimentation biologique, celui-ci peut être redémarré directement en chargeant un fichier spécifique (fichier « Reload_ », une présentation plus détaillée des différents fichiers générés par LoCoPREL est faite dans la suite de ce chapitre). Cette manipulation permet d'éviter de passer l'ensemble des étapes de préparation et de configuration théoriquement nécessaires (flèche issue de « reprise du suivi » sur la *Figure 58*), et permet de poursuivre l'expérimentation en minimisant l'impact que pourrait causer ce problème sur le métabolisme microbien.

La fenêtre de démarrage permet également de modifier la liste des capteurs présents par défaut dans LoCoPREL. Ainsi, une liste de 14 capteurs, initialement présents au moment du développement du logiciel, est proposée lors de la configuration initiale des capteurs. Cependant, de manière à ne pas figer ou compliquer l'emploi du logiciel, LoCoPREL permet de modifier la liste des capteurs de manière à pouvoir l'implémenter. Les modifications sont alors intégrées et retrouvées dans les choix de capteurs disponibles.

Enfin, le démarrage du logiciel permet également de lancer un module de LoCoPREL qui permet de traiter les fichiers de mesures issu d'une précédente expérimentation. L'utilisateur choisit la séquence qu'il souhaite traiter, dans le fichier de données qu'il a préalablement chargé, de manière à calculer la viscosité estimée pour chacune des conduites calibrées. Chaque séquence analysée peut ensuite être visualisée, comparée avec une autre séquence, et/ou sauvegardée dans un nouveau fichier, différent des fichiers de données initiaux. Cependant, même si une partie du code existe au sein du logiciel, cette fonctionnalité n'a pas pu être terminée. Elle a donc été bloquée de manière à ne pas causer d'erreur logicielle issue de cette fonction inachevée. A terme, ce module permettra à la fois le traitement des données au cours d'une expérimentation biologique ainsi que post expérimentation.

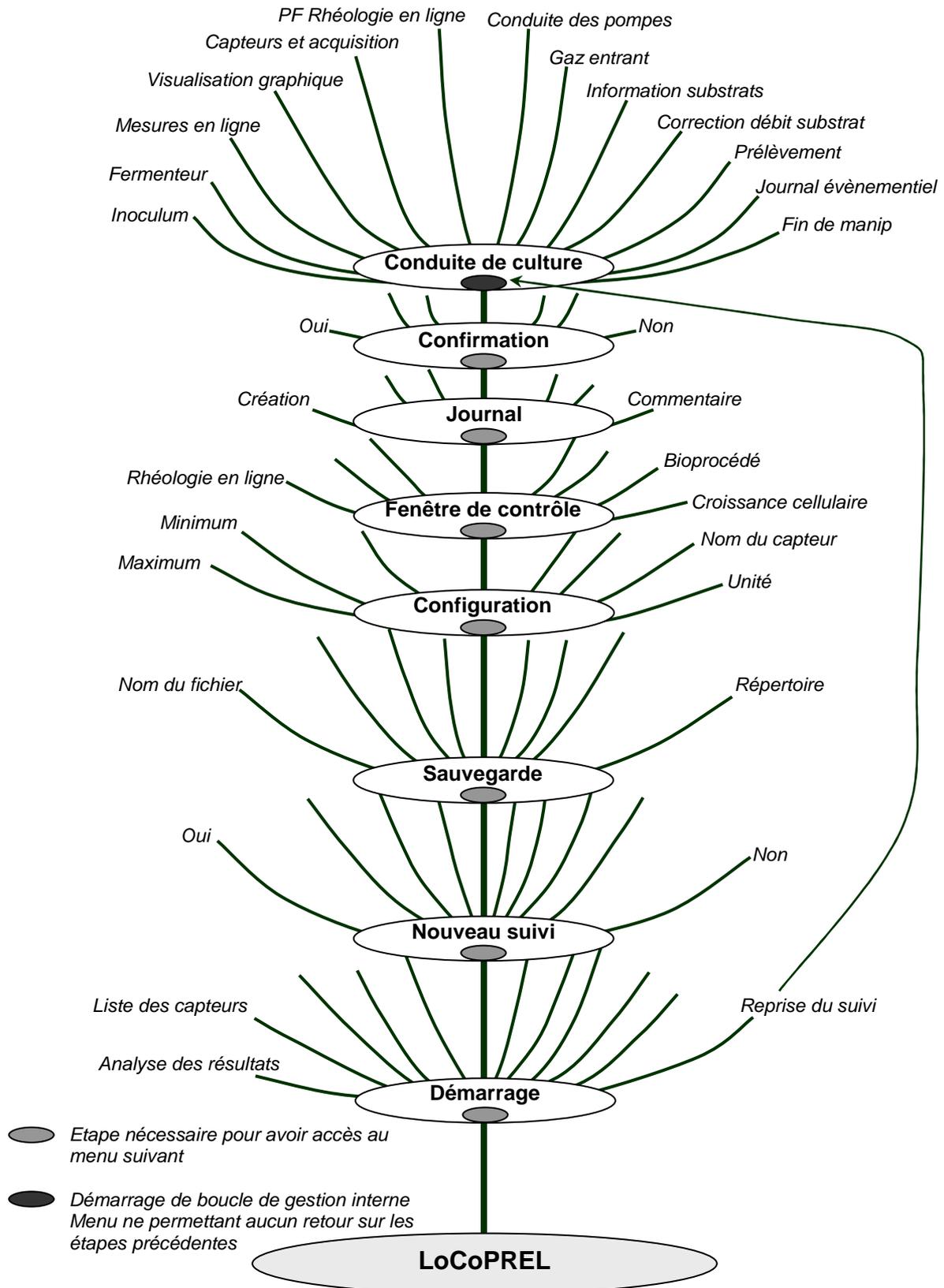


Figure 58 : Structure des étapes de LoCoPREL¹ aboutissant à la conduite d'une culture

¹ La structure du logiciel suit schématiquement la croissance d'une prêle, plante dont le nom du logiciel est inspiré.

2. Préparation d'une expérimentation

La préparation d'une expérimentation biologique nécessite un certain nombre d'étapes dont les menus majoritaires sont schématisés sur la *Figure 58*. Le détail de la configuration de l'ensemble de l'instrumentation sera effectué dans la partie *II Configuration d'une expérimentation*.

La configuration initiale des capteurs peut être effectuée en remplissant progressivement chaque champ associé au choix d'un capteur. Le nombre de capteurs pouvant être rapidement supérieur à une dizaine, le temps de remplissage des différents champs devient rapidement fastidieux, impliquant des risques d'erreur lors du remplissage du formulaire. Les configurations des capteurs changeant peu, il a été intégré la possibilité de charger une précédente configuration à partir d'un fichier de paramétrage commençant par « P_ » issu d'une précédente expérimentation (voir *II.B Système d'acquisition des capteurs, Figure 60*). Ainsi, l'utilisateur du logiciel n'a alors qu'à vérifier les différents champs qui ont été chargés, puis à compléter et/ou modifier les contenus par les informations correctes adaptées à son expérimentation.

L'exécution des différentes étapes de préparation permet de tester les différentes voies de communication entre le logiciel et l'instrument en cours de paramétrage. Une partie de ces tests peut être clairement identifiée par l'utilisateur du logiciel grâce à l'emploi de boutons commençant par « Test » apparaissant sur certaines fenêtres. Ce type de bouton permet, par exemple, de vérifier la réception correcte de la mesure d'une balance. Cependant, en cas de problème de communication (câble débranché, balance éteinte manuellement, mauvaise configuration de celle-ci, etc.), le logiciel serait bloqué jusqu'à réception d'une valeur, obligeant l'opérateur à redémarrer LoCoPREL à chaque test. Pour éviter cela, les erreurs liées à la communication entre l'instrument et le logiciel sont récupérées et gérées de manière à générer un message d'erreur ne bloquant pas les fonctionnalités du logiciel. Cette gestion d'erreur est effective pour la communication avec le module Agilent®, le module Brooks® (aération) et les différentes balances (cf. *Chapitre II*).

Même si un grand nombre de variables ont une valeur par défaut dans le logiciel (sans action préalable de l'opérateur), l'utilisateur reste néanmoins obligé de renseigner les périodes d'acquisition lors d'un débit de circulation constant ou séquencé. De plus, le débit de circulation au lancement de l'expérimentation biologique doit également être précisé de manière à ce que la pompe de la boucle de dérivation applique un débit correct dès le début de l'enregistrement des données.

Afin d'étendre les possibilités techniques de l'outil expérimental sur l'aspect conduite de culture, le logiciel intègre la possibilité d'un enrichissement de l'air entrant en dioxygène pur afin d'éviter les risques de limitation dans le bioréacteur. L'emploi possible de deux substrats carbonés différents au cours d'une expérimentation, ainsi que l'asservissement du débit d'alimentation en sels par rapport au débit d'alimentation en substrat est également prévu. Enfin, une estimation rapide de l'évolution de la quantité de biomasse dans le bioréacteur est possible lors de l'entrée des paramètres sur le microorganisme et les informations préliminaires sur l'inoculation dans le bioréacteur.

3. Expérimentation biologique

Lors du lancement de la partie expérimentation biologique du logiciel, plusieurs boucles de gestion interne démarrent et ne s'arrêteront qu'à la fin de l'expérimentation. Ces actions, peu visibles par l'utilisateur du logiciel, sont gérées au sein de flux d'exécution appelé « thread ». L'emploi de cette bibliothèque de classe est le point fort de cette partie du programme LoCoPREL, car elle permet d'exécuter plusieurs blocs de code en parallèle. De plus, un flux d'exécution (thread) peut être imbriqué dans un autre thread, permettant de compartimenter et hiérarchiser l'exécution du code. Cet aspect est particulièrement important du fait de l'emploi, comme élément central, d'un appareil multifonction (module Agilent®). L'ensemble des informations nécessaires au module passent par une liaison série unique et doivent permettre la récupération des signaux des capteurs et la gestion du pilotage des pompes (pompe de la boucle de dérivation, d'alimentation en substrats carbonés et en sels).

Pour permettre cela, le code principal s'articule autour de l'organisation des informations envoyées au module. Pour chaque instrument, une classe spécifique a été créée de manière à vérifier l'état de communication, permettre la modification de consigne, la récupération de données et la gestion d'erreurs de communication (notamment par la libération des ressources allouées à l'exécution de bibliothèques spécifiques à la gestion des ports de communication). Ensuite, le bloc de code principal, intégré dans un thread, exécute les étapes suivantes :

- Vérification et modification (si nécessaire) de la liste des capteurs choisis,
- Récupération des signaux des capteurs de la boucle de dérivation,
- Récupération successive de la masse sur les différentes balances utilisées,
- Récupération du débit d'aération envoyé dans le bioréacteur.

Un nouveau thread est créé à ce niveau pour enregistrer et ajouter les données obtenues dans des fichiers de sauvegarde.

Pendant la sauvegarde des données, les débits des pompes d'alimentation, lors d'une gestion par LoCoPREL, sont calculés, avec la condition d'un changement de consigne si la tension, à appliquer à la pompe considérée, subit une différence de 0.001 V par rapport à la consigne précédente (précision maximale de la consigne en tension délivrable par la carte 34907A du module Agilent®, voir *Chapitre I/1*). La consigne d'aération est également modifiée (si nécessaire) à la suite à ces actions.

Parallèlement, l'exécution du thread de sauvegarde des données brutes exécute également les calculs en ligne de manière à pouvoir générer les fichiers permettant la visualisation graphique des données. De manière à éviter des problèmes d'accès à ces mêmes fichiers liés à leur utilisation en lecture/écriture, l'ensemble des variables mesurées et calculées sont également envoyées, pour rafraîchissement, dans la fenêtre de visualisation numérique des données en ligne (voir *III.C.1 Variables alphanumériques*).

Un autre atout du logiciel LoCoPREL est l'emploi d'un fichier Paramètre (voir II.A.2 « Fichier Paramètre »). Ce fichier, interne à LoCoPREL, a la particularité de pouvoir être modifié et interrogé

sans problème d'accessibilité. Le contenu de ce fichier permet de faire le lien entre les différents threads et les différentes fenêtres apparaissant à l'utilisateur du logiciel. Ainsi, l'interrogation courante de certaines variables de ce fichier permet d'exécuter des parties de code de manière à avoir une réponse interactive (délai maximal de l'ordre de la seconde) du logiciel sur un ou des éléments spécifiques de l'outil expérimental. Malgré une exécution séquentielle du code C#, l'utilisation de LoCoPREL permet d'avoir en main différentes possibilités. Les informations obtenues peuvent être visualisées numériquement ou graphiquement (avec des possibilités de zoom sur les plages temporelles souhaitées).

L'aspect microbiologie peut être interprété grâce aux calculs en ligne effectués. La conduite de culture peut être modifiée manuellement ou corrigée automatiquement par le logiciel lors de la prise en compte des prélèvements réalisés. Les pompes d'alimentation en substrat présentent l'avantage de proposer différentes stratégies d'apports en fonction de l'étude souhaitée (voir *III.D.2 Apports nutritionnels*). De plus, le calcul de rapports élémentaires donne une information supplémentaire en cas de stratégie de culture impliquant une limitation nutritionnelle. Les prélèvements d'échantillons ne sont pas les seuls paramètres corrigés. Une estimation de l'évaporation pour le volume de liquide ou l'ajout d'un volume de gaz dû au tuyau de connexion jusqu'à l'analyseur gaz sont autant de paramètres correctifs intégrés dans le logiciel. D'autres correctifs en ligne nécessitent néanmoins un travail complémentaire tel que l'ajustement de la dérive de l'ensemble des sondes « température », le réajustement des débits de gaz entrant par un débitmètre étalon ou le correctif des débits réellement envoyés dans le bioréacteur.

La gestion de la rhéométrie s'effectue avec un paramétrage préalable de la séquence de débit souhaitée. L'ajustement des paramètres rhéométriques disponibles dans LoCoPREL suit le principe d'un protocole de mesure de rhéomètre (voir *III.E Gestion de la viscosimétrie*). Cependant, l'impératif de l'outil expérimental est, majoritairement, de limiter le temps de séjour du moût dans l'installation pour minimiser les risques de dénaturation liés aux stress technologiques et/ou nutritionnels.

Enfin, les cultures biologiques pouvant durer plusieurs jours sans interruption, une liste des principales actions réalisées sur le bioréacteur, et plus généralement sur l'outil expérimental, est générée automatiquement. Ce récapitulatif est intégré dans LoCoPREL au sein d'un journal évènementiel que l'opérateur peut implémenter de lui-même (voir *III.D.4 Journal évènementiel*). Ainsi, chaque changement de consigne sur le bioréacteur (température, pH, agitation, aération), modification de consigne de pompe d'alimentation, ajout de nutriment ou prélèvement effectué, est consigné de manière automatique dans ce même document afin d'avoir un journal centralisant le suivi de l'expérimentation.

E. Architecture de LoCoPREL

L'architecture de LoCoPREL est réalisée autour de deux blocs principaux permettant tout d'abord de configurer le logiciel, puis de démarrer une expérimentation, comme cela est schématisé dans la *Figure 59*.

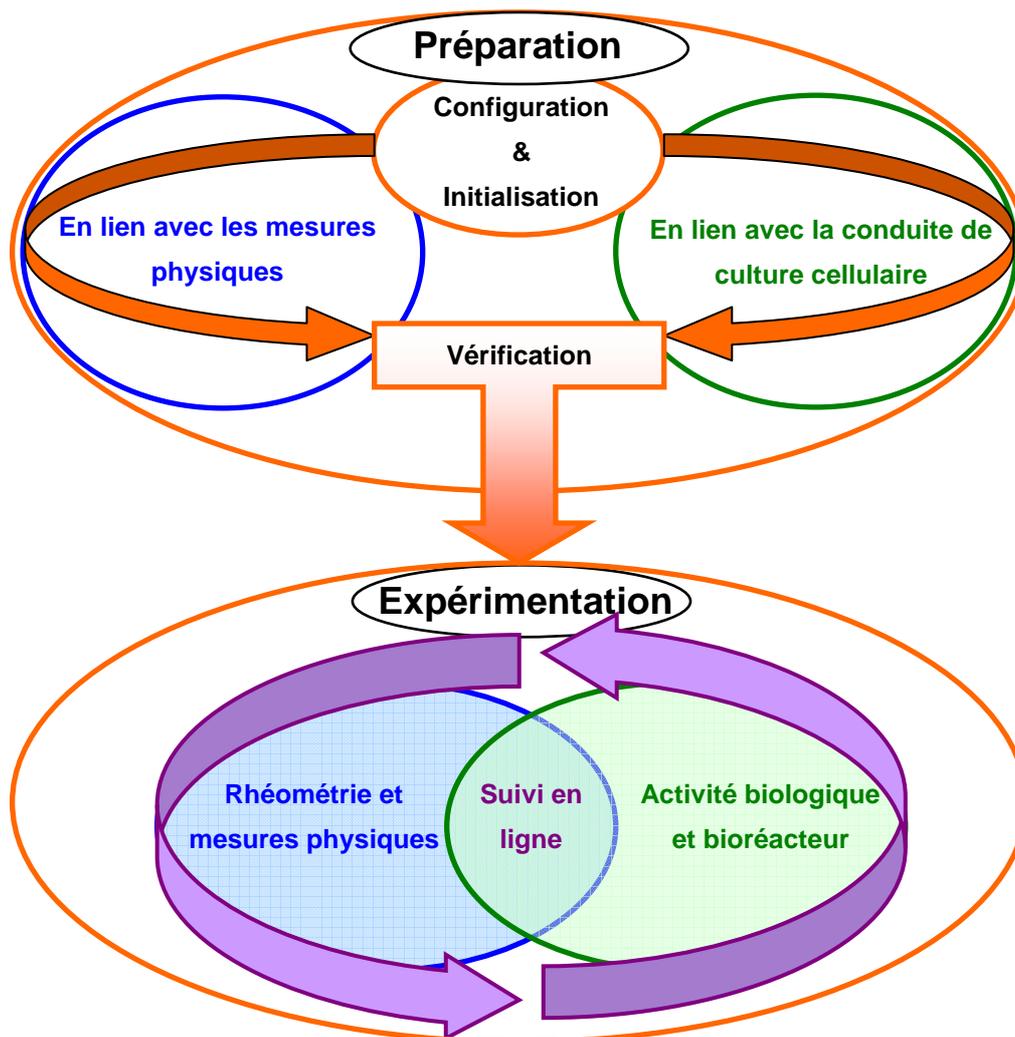


Figure 59 : Schéma général de la structuration de LoCoPREL

L'étape de configuration est relative à la préparation d'une expérimentation biologique. Elle permet de paramétrer et initialiser les capteurs (et certaines variables), de configurer les mesures physiques en ligne effectuées, ainsi que les alimentations en substrat nécessaire à la conduite d'une culture.

La seconde étape, liée au suivi d'une expérimentation, porte sur la gestion simultanée de la bio-réaction et des caractéristiques physico-chimiques en ligne. Ce pilotage repose sur la maîtrise de plusieurs boucles de régulation avec deux niveaux de contrôle. La description précise de ces boucles est effectuée dans la suite de ce chapitre. Au cours de l'expérimentation, il est alors possible de gérer les étapes de :

- Contrôle/Commande des apports nutritionnels (substrats, sels, vitamines, pH, acide, base, anti-mousse, aération) suivant la stratégie de culture afin de gérer l'activité microbologique,
- Contrôle/Commande des débits de circulation dans la boucle de dérivation (gestion des séquences de débit),
- Calcul en ligne, dont les bilans matières (instantanés et cumulés), ainsi que de plusieurs autres variables microbiologiques et physiques (cf. *Chapitre II C Données microbiologiques*),

- Visualisation alpha-numérique ou graphique de l'ensemble des variables acquises et calculées,
- Annotation de l'ensemble des événements sur le journal évènementiel de l'expérimentation.

Les étapes résultant du suivi et de la conduite de culture sont représentées en *Figure 58*.

Dans la suite de ce chapitre, nous nous attacherons à décrire plus en détail la configuration d'une expérimentation et les possibilités de LoCoPREL au cours de la conduite de culture.

II. CONFIGURATION D'UNE EXPERIMENTATION

A. Démarrage et sauvegarde

1. Utilisation pratique du logiciel

Au premier démarrage du logiciel, l'objectif est d'offrir la possibilité à l'utilisateur de :

- Commencer une nouvelle expérimentation,
- Modifier la liste des capteurs présents dans le logiciel,
- Analyser la viscosimétrie en ligne de précédentes expériences (actuellement non opérationnel),
- Relancer rapidement une expérimentation biologique suite à une erreur logicielle fatale (erreur qui interrompt le programme de façon irréversible).

Lors du lancement d'une nouvelle expérimentation, le logiciel demande le nom d'un fichier de sauvegarde (NomFichier). Ce nom est la partie constante des noms des autres fichiers générés par le logiciel (fichiers de paramétrage, d'étalonnage, de visualisation ou de sauvegarde). La localisation des fichiers doit également être indiquée de manière à rassembler l'ensemble des données dans le même répertoire. Après validation de l'utilisateur, le panneau de configuration initiale des capteurs s'ouvre.

2. « Fichier Paramètre »

L'initialisation du nom du fichier de sauvegarde ainsi que l'arborescence (localisation du fichier) sont les premières variables stockées dans le « Fichier Paramètres ». Ce fichier, invisible à l'utilisateur du logiciel, stocke tous les paramètres d'application devant être utilisés à plusieurs reprises par le programme. Dans le cas du logiciel LoCoPREL, les principaux types de variables contenues dans le « Fichier Paramètre » sont : string (chaîne de caractères), double (nombre avec virgule), float (nombre avec virgule), integer (nombre entier), bool (booléen), DateTime (date) et TimeSpan (durée). Ce fichier n'est pas sujet à des problèmes d'accessibilité (comme cela est le cas avec un fichier texte par exemple) ; il peut donc être interrogé et modifié en même temps par différentes instances du programme. Cependant, l'ensemble des paramètres présents dans ce fichier doit avoir été préalablement inclus et mis à une valeur par défaut pour pouvoir être employé dans la suite du code du logiciel.

B. Système d'acquisition des capteurs

Pour mieux comprendre la structure du panneau de configuration, il est nécessaire d'effectuer un rappel sur le fonctionnement du système d'acquisition utilisé. La communication entre l'ordinateur et le module Agilent® s'effectue via une liaison série type RS232 sur laquelle doivent transiter les informations concernant les trois cartes d'acquisition-commande. Il est donc nécessaire d'organiser les informations à envoyer au module afin que celui-ci ne reçoive pas plusieurs messages en même temps. Sachant que la gestion d'un message pour le module Agilent® est de l'ordre de la dizaine millisecondes, cela restera transparent pour l'utilisateur du logiciel.

Chaque capteur envoie la valeur du signal physique sous forme d'un courant continu situé entre 4 et 20 mA. Avec la connaissance des bornes minimum et maximum, et de la valeur du courant récupéré, la grandeur physique du signal est recalculée. La communication avec le module Agilent® permet de convertir les données physiques en tensions. Celles-ci sont obtenues par une mesure de la tension aux bornes des différentes résistances de shunt avant d'être convertie, par le module Agilent®, en chaîne de caractère obtenue par une communication en langage SCPI¹ transitant par la liaison série. Ces informations sont ensuite récupérées et organisées dans les fichiers de sauvegarde finaux. Ce type de communication entre un instrument et un ordinateur est généralisé à un grand nombre d'appareil, ce qui permet de faciliter l'établissement de la structure de communication entre instrument au sein du logiciel. Ainsi, le fichier portant le nom, précédemment enregistré (par exemple NomFichier), contiendra les valeurs en tension [V] issues des résistances de shunt de la boucle de courant des capteurs. La conversion en grandeur physique n'est possible qu'avec les données contenues dans le formulaire de configuration présenté par la *Figure 60*.

Voies	Capteurs	Unité	Minimum	Maximum
<input type="checkbox"/>				
<input checked="" type="checkbox"/>	Relative	Bar	0	10
<input type="checkbox"/>				
<input checked="" type="checkbox"/>	Debit_Massique	kg/h	0	400
<input checked="" type="checkbox"/>	Masse_Volumique	kg/m3	500	2000
<input checked="" type="checkbox"/>	Temp_Debit	°C	0	70
<input type="checkbox"/>				
<input checked="" type="checkbox"/>	pH_Fermenteur			
<input type="checkbox"/>				

Figure 60 : Fenêtre de configuration initiale des capteurs

Ce formulaire rassemble le numéro de la voie sur laquelle est branché le capteur, une liste déroulante des capteurs utilisables, l'unité de la grandeur physique, le minimum et maximum de la grandeur physique correspondant au minimum (4 mA \Leftrightarrow 0.4 V) et au maximum (20 mA \Leftrightarrow 2 V) délivrés en courant par le capteur. Ces données de paramétrage sont stockées dans un fichier commençant par « P_ », suivi du nom du fichier (exemple : P_NomFichier). Si un paramétrage proche a déjà été précédemment sauvegardé, il est possible de recharger les données contenues dans le fichier « P_ »,

¹ Standards Commands for Programmable Instruments

issu d'une précédente expérimentation. Le formulaire pré-rempli doit être complété et/ou modifié de manière adaptée à l'expérimentation qui doit être démarrée.

La sauvegarde de la configuration donne l'accès à la fenêtre gérant les autres aspects de l'outil expérimental (voir *Figure 61*).



Figure 61 : Fenêtre de contrôle de l'instrumentation de l'outil expérimental (hors capteurs)

C. Initialisation de variables et des gaz

A partir du bouton « Rhéologie en ligne » de la « Fenêtre de contrôle » (voir *Figure 61*), le logiciel permet d'accéder à l'initialisation de certains paramètres propres à l'outil expérimental. Au sein de la fenêtre « Rhéologie en ligne », il est possible d'initialiser les variables liées à l'acquisition de l'outil expérimental tels que la période d'échantillonnage à débit constant ou séquencé, ou le débit de circulation dans la boucle de dérivation au lancement de l'expérimentation biologique. Les autres fonctions de cette fenêtre sont visibles sur la *Figure 62*.

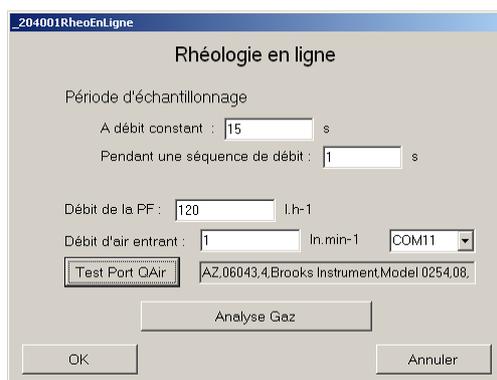


Figure 62 : Fenêtre d'initialisation de variable de la plateforme et des gaz

En plus de l'aspect initialisation de variables d'acquisition ou du débit de circulation dans la boucle externe, on définit à ce niveau le paramétrage lié aux gaz entrant ou sortant du bioréacteur. Cette fenêtre permet ainsi d'identifier une nouvelle liaison série type RS232 par le test du port nécessaire à la communication avec le module Brooks® gérant les débitmètres massiques. Le logiciel et l'outil expérimental offrent ainsi la possibilité d'enrichir l'air entrant en dioxygène pour permettre de prévenir

les risques de limitation en transfert de dioxygène dans le bioréacteur lorsque celui-ci est au maximum de sa vitesse d'agitation. Pour nos applications, nous n'avons pas utilisé cette option.

Afin de procéder au bilan matière en ligne, le logiciel va également interroger un analyseur gaz, préalablement défini. Le choix de l'analyseur déterminera le traitement du fichier de manière à récupérer les fractions molaires des espèces gazeuses d'intérêt. Pour cela, il est nécessaire de configurer le choix de cet analyseur en cliquant sur le bouton « Analyse Gaz ».

L'ouverture de la fenêtre de configuration de l'analyseur gaz (voir *Figure 63*) permet d'intégrer un volume de gaz supplémentaire permettant de corriger les calculs en ligne afin qu'ils soient les plus justes possible. Ce volume de gaz s'ajoute au volume du ciel gazeux présent au-dessus du volume de liquide dans le bioréacteur. Le volume supplémentaire à considérer provient généralement du condenseur et des connections (tuyaux) jusqu'à l'analyseur gaz.

Dans l'éventualité d'un problème matériel, les deux types d'analyseur gaz, utilisés dans l'équipe d'accueil, ont été intégrés dans le logiciel de manière à ne pas être bloqué pour le lancement d'une expérimentation sur l'outil expérimental. Il s'agit d'un spectromètre de masse « MS Prima 600s » et de l'analyseur commercial INNOVA® « INNOVA Sirichai » (cf. *Chapitre II*).

Pour l'utilisation du spectromètre de masse à partir du réseau interne, il est nécessaire d'aller chercher les fichiers dans lesquels sont implémentés des données d'analyses des gaz d'entrée et de sortie du bioréacteur (voir *Figure 63*).

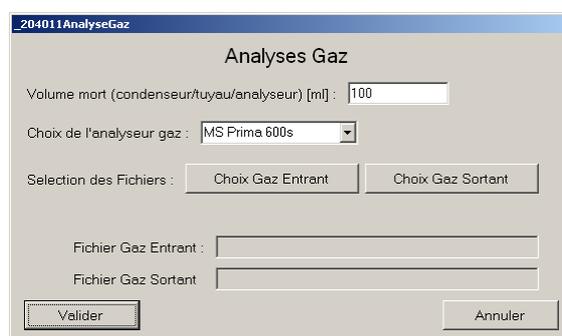


Figure 63 : Fenêtre de configuration de l'analyseur gaz (cas du spectromètre de masse)

L'organisation des données n'est pas identique entre les deux analyseurs. Dans le cas de l'analyseur INNOVA®, il est nécessaire de choisir le fichier dans lequel est stocké l'ensemble des données produits, puis de choisir les vannes sur lesquels sont connectés physiquement les gaz d'entrée et de sortie du bioréacteur pour une récupération correcte des valeurs (voir *Figure 64*).

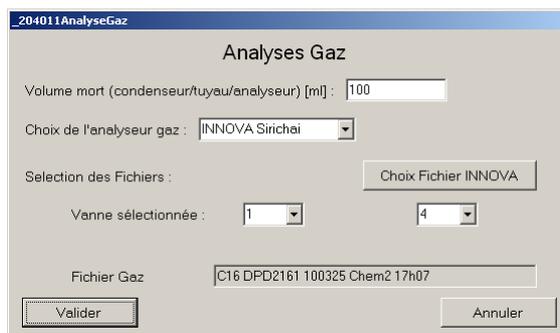


Figure 64 : Fenêtre de configuration de l'analyseur gaz (cas de l'INNOVA®)

D. Balances

A partir du bouton « Bioprocédé » de la fenêtre de contrôle de l'instrumentation (cf. *Figure 61*), la fenêtre représentée *Figure 65* apparaît. Elle donne accès à la gestion de l'alimentation des apports liquides dans le bioréacteur.

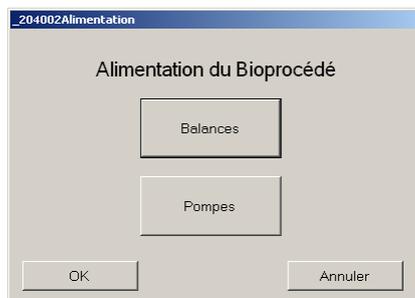


Figure 65 : Fenêtre de gestion des apports liquides du bioprocédé

En cliquant sur le bouton « Balances », le logiciel ouvre une fenêtre listant les intrants pouvant être configurés. Chaque intrant pouvant être utilisé doit être identifié par son port de communication (port COM d'une liaison série type RS232 spécifique). Puis, ses caractéristiques physiques doivent être saisies afin que celles-ci soient intégrées dans les calculs du logiciel, et plus spécifiquement sur les calculs de volumes de liquide et les bilans carbone en ligne. Dans le cas où l'identification du port de communication s'est effectuée sans problème, la masse de la balance s'affichera au retour dans la fenêtre récapitulative des balances, représentée en *Figure 66*.

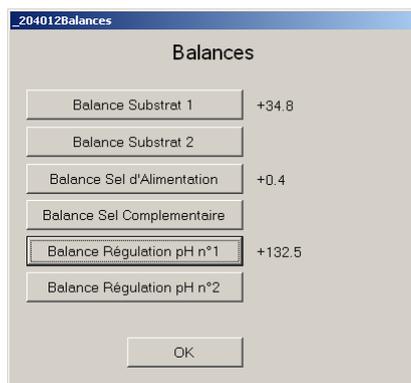


Figure 66 : Fenêtre récapitulative des balances disponibles à paramétrer

1. Balances « Substrat »

Le logiciel LoCoPREL offre la possibilité d'intégrer deux substrats ayant des caractéristiques physiques et chimiques différentes. Dans ce cas, les stratégies de conduite nécessitant une alimentation en co-substrat sont alors possibles. Ainsi, les potentialités d'utilisation de l'outil expérimental concernant l'aspect biologique, et plus spécifiquement sur les alimentations en substrat carboné sont alors plus étendues. Pour cela, les caractéristiques des solutions sont entrées dans les champs du formulaire représenté par la Figure 67.

Figure 67 : Fenêtre de paramétrage de la balance « Substrat 1 »

Pour un substrat donné, il faudra renseigner son nom, sa masse volumique, sa concentration massique et sa masse molaire (totale ou élémentaire). La précision de ces informations permettra de minimiser les erreurs au cours des calculs des bilans carbone en ligne. De plus, quelle que soit la solution considérée, il est impératif d'avoir la masse volumique mesurée de manière à savoir précisément les volumes ajoutés dans le bioréacteur à partir des pertes de masse du bidon d'alimentation.

L'identification du port de communication est importante, car ce paramètre est la jonction physique et informatique entre la balance et l'ordinateur. Si ce port n'est pas identifié correctement, les calculs

seront erronés. Afin de s'assurer que la connexion est correctement établie entre la balance et l'ordinateur, le formulaire, présenté en *Figure 67*, offre la possibilité de tester la communication en faisant un appel vers la balance connecté au port COM choisi. Si la valeur de la masse, apparaissant dans le champ « Masse Initiale », ne correspond pas à la valeur de la balance souhaitée, ou si un message d'erreur apparaît, le nom du port de communication devra être modifié (à partir de la liste déroulante « Port Com ») et/ou la connexion physique (câble) vérifiée. Lorsque l'ensemble des champs est rempli, l'utilisateur doit s'assurer que le formulaire est correctement rempli grâce aux calculs des concentrations molaires en utilisant le bouton « Calcul », avant de valider le formulaire par le bouton du même nom.

2. Balances « Sel » et « Régulation pH n°2 »

Deux alimentations en sels et une bouteille de régulation d'acide sont prévues au sein du logiciel LoCoPREL. Ces deux alimentations en sels ont été intégrées pour plusieurs raisons. Tout d'abord, en cas de mise en place d'une culture avec une alimentation en sels concentrées, certaines solutions précipitent rapidement ou ne sont pas stables au cours du temps (cas des cultures avec *E. coli* si l'on rassemble les sels principaux et complémentaires, voir *Chapitre II*). De plus, cette acquisition supplémentaire offrent la possibilité d'intégrer une alimentation permettant d'effectuer une limitation nutritionnelle différente ou complémentaire d'une limitation appliquée par la balance « Régulation pH n°1 » (voir *II.D.3 Balance « Régulation pH n°1 »*). Enfin, cette balance supplémentaire permettrait également d'alimenter en continu le bioréacteur avec une solution de vitamines plutôt qu'un ajout séquencé tous les 10 g l⁻¹ d'augmentation en concentration de biomasse (cas pour les cultures de *Y. lipolytica*).

A propos de la régulation avec une solution acide, son emploi a été utilisé lors de l'étude de la diminution de l'activité biologique. Dans ce cadre, le milieu ne nécessite plus un apport de base car le moût se basifie au cours du temps. De manière à maintenir constant le pH du milieu, une solution de régulation acide s'avère nécessaire.

La saisie du formulaire de ces trois alimentations est identique. Les informations à renseigner sont le nom, la masse volumique et le nom du port série. L'identification du port de communication est vérifiée à partir de la valeur de masse récupérée et affichée dans le champ « Masse Initiale ». Un exemple du formulaire pour ces trois alimentations est représenté en *Figure 68*.

Figure 68 : Fenêtre de paramétrage de la balance « Sel d'Alimentation »

L'importante différence entre la balance « Sel d'Alimentation » et « Sel Complémentaire » réside au niveau de l'attribution des pompes. Pour la balance « Sel d'Alimentation », une pompe pilotée depuis

le logiciel est prévue. Cela permet ainsi de pouvoir l'asservir avec une pompe d'alimentation en substrat. Dans le cas de la balance « Sel Complémentaire », aucun pilotage depuis le logiciel n'est associé car les possibilités du module Agilent® sont déjà maximisées. Cependant, son apport dans le bioréacteur est pris en compte dans les calculs. Concernant la balance « Régulation pH n°2 », le réservoir qu'elle pèse est utilisé uniquement au moment des phases de diminution de l'activité cellulaire par le système de régulation acide du pH du bioréacteur.

3. Balance « Régulation pH n°1 »

Le formulaire de la balance de régulation basique du pH s'appuie sur la *Figure 68* concernant les apports de sels ou d'acide dans le moût. Le formulaire de la solution de régulation basique et d'alimentation en azote est représenté par la *Figure 69*.

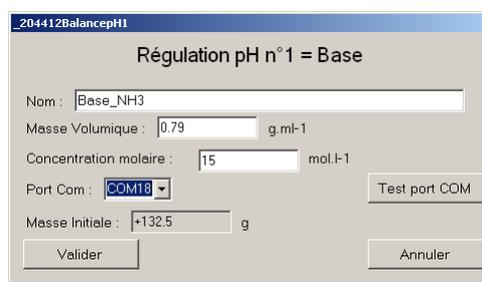


Figure 69 : Fenêtre de paramétrage de la balance « Régulation pH n°1 »

Par rapport aux formulaires précédents, on note un champ supplémentaire concernant la concentration molaire de la solution. Ce champ permet le calcul de rapports élémentaires entre cette alimentation et le carbone total dans le bioréacteur. Ceci offre la possibilité d'effectuer des cultures microbiennes avec une production de métabolites contrôlée par une limitation nutritionnelle, et ainsi, de contrôler le métabolisme par la gestion de la limitation nutritionnelle.

E. Pompes

Le bouton « Bioprocédé » de la fenêtre de contrôle de l'instrumentation (cf. *Figure 61*) donne accès à la gestion de l'alimentation des apports liquides dans le bioréacteur (cf. *Figure 65*). En cliquant sur le bouton « Pompes », le logiciel permet de paramétrer l'ensemble des pompes si l'identification du port communication avec le module Agilent® a été correctement effectuée. Dans le cas contraire, il n'est d'aucune utilité d'afficher les boutons des différentes pompes puisque aucune communication, sur la liaison série, ne pourra être effectuée par le module Agilent® pour piloter les pompes. La fenêtre récapitulative des pompes d'alimentation est représentée par la *Figure 70*.

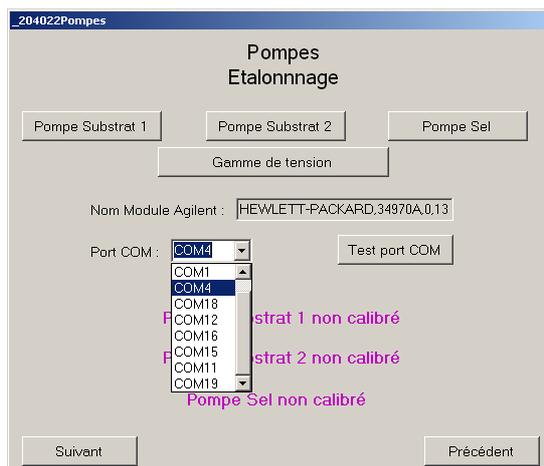


Figure 70 : Fenêtre récapitulative des pompes pouvant être étalonnées

Par défaut, le numéro de la voie de la pompe correspondant à la gestion du débit de circulation de la boucle de dérivation de l'outil expérimental est volontairement non accessible. Celui-ci est fixé à la voie 205 dès que le port de communication du module Agilent® est identifié.

Avant de lancer un étalonnage, il est nécessaire de savoir quelle est la gamme de tensions pour laquelle chaque pompe fonctionne. Pour cela, il est nécessaire de compléter ou vérifier le formulaire apparaissant en cliquant sur le bouton « Gamme de tension » comme représenté sur la *Figure 71*. Ce formulaire permet d'intégrer les plages de tension pour lesquelles les pompes d'alimentation fonctionnent réellement.

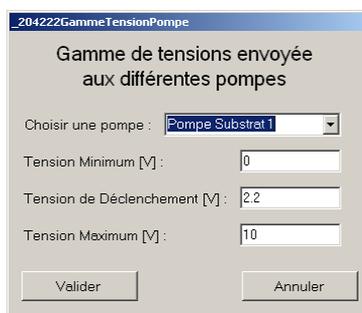


Figure 71 : Fenêtre de gestion des gammes de tensions des pompes

La tension minimum est la valeur minimale, indiquée par le constructeur, pouvant être appliquée à la pompe. Cette valeur ne correspond pas à la valeur de tension aboutissant au débit minimum de la pompe. Les tensions de déclenchement et maximum correspondent à la borne minimale et la borne maximale de l'étalonnage automatique. Le logiciel intègre des bornes de - 10 V à + 10 V sur les tensions extrêmes pouvant être appliquées sur les pompes. Ces tensions extrêmes correspondent aux tensions maximales pouvant être délivré par les cartes 34907A du module Agilent® (voir *Chapitre I*). De plus, même si l'utilisateur demande un débit ou une tension au-delà de ces limites, le logiciel bloque la requête aux valeurs de ± 10 V. Cette protection est conservée pendant l'étape d'étalonnage (manuelle ou automatique) et au cours de la culture cellulaire afin de minimiser les risques de dommage matériel. La tension de déclenchement correspond à la valeur minimale en tension pour que la pompe commence à fonctionner. En dessous de cette valeur, le débit est nul.

Trois pompes peuvent être étalonnées comme indiqué sur la *Figure 70*. Dans la fenêtre d'étalonnage, deux modes sont proposés : manuel ou automatique. Dans les deux cas, l'étalonnage s'effectue par perte de masse d'eau (dont la masse volumique est prise égale à 1 g cm^{-3}) sur une balance initialement identifiée. Quel que soit le mode d'étalonnage, il est nécessaire de renseigner les champs suivants :

1. Répétition par tension : Nombre de fois où le débit sera vérifié, puis moyenné pour la construction de la droite d'étalonnage,
2. Masse critique minimum [g] : Masse minimum d'eau perdue au niveau de la balance pour accepter la mesure de débit,
3. Temps critique maximum [min] : Temps maximum pour un point de mesure de débit ; le logiciel acceptera la mesure de débit, même si la masse critique minimale n'est pas atteinte ; cela évite des temps d'étalonnage trop longs dans le cas de calibration sur des petits débits,
4. Numéro de Voie sur Module : Numéro de la voie utilisée et raccordée de la pompe pour le contrôle par le module Agilent®.

D'autres options générales s'offrent à l'utilisateur. Il est possible de charger une calibration déjà effectuée (bouton « Chargement Calibration »), de modifier l'attribution du port de communication de la balance associée (bouton « Choix Balance »), d'effacer un étalonnage (bouton « Effacer »), d'en démarrer un nouveau (bouton « Calibration ») ou d'en arrêter un en cours (bouton « Arrêt »). Ces différentes possibilités sont représentées dans la fenêtre d'étalonnage de pompe ci-dessous en *Figure 72*.

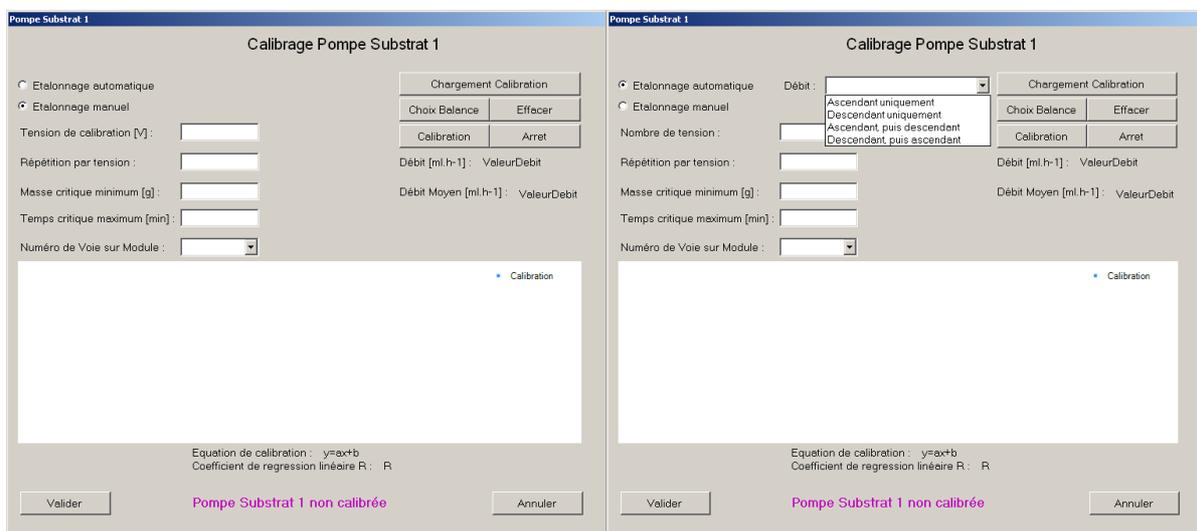


Figure 72 : Fenêtre d'étalonnage de pompe (en manuel à gauche, en automatique à droite)

Dans le cas d'un étalonnage manuel, il est nécessaire de remplir le champ « Tension de calibration [V] », ce champ correspond à la valeur de tension en volt choisie pour effectuer un point de calibration. Cette option permet d'effectuer rapidement des tests pour obtenir la gamme réelle de débit en fonction de la tête de pompe et du tuyau utilisé.

Dans le cas d'un étalonnage automatique, il est nécessaire de remplir le champ « Nombre de tensions » correspondant au nombre de points présents sur la droite d'étalonnage. Dans ce cas, il faut indiquer dans quel ordre ceux-ci doivent être effectués au cours de l'étalonnage :

- Ascendant uniquement : du plus petit au plus grand débit,
- Descendant uniquement : du plus grand au plus petit débit,
- Ascendant, puis descendant : combinaison des deux premières propositions,
- Descendant, puis ascendant : combinaison des deux premières propositions.

Au fur et à mesure de l'étalonnage, le graphique s'implémente avec le calcul de l'équation de droite et du coefficient de régression linéaire R. A la fin de l'étalonnage, le logiciel considèrera que la pompe est correctement calibrée si R est supérieur à 0.9995.

Les fichiers d'étalonnage des pompes sont des fichiers de type texte dans lesquels sont stockés tous les débits mesurés moyens, la moyenne des répétitions ainsi que chaque voltage appliqué à la pompe au moment de l'étalonnage. Le nom du fichier comporte le nom de la pompe, suivi du nom choisi au lancement du logiciel. Par exemple, pour la pompe « Substrat 1 », avec un nom de sauvegarde choisi « NomFichier », le nom du fichier de sauvegarde de l'étalonnage sera « Pompe Substrat 1_NomFichier ». La sauvegarde des calibrations des pompes d'alimentation sur des fichiers externes permet de pouvoir les recharger à loisir si le logiciel est relancé au cours de la préparation de l'expérimentation biologique.

F. Croissance microbienne

A partir du bouton « Croissance Cellulaire » de la « Fenêtre de contrôle » (voir *Figure 61*), le logiciel ouvre un panneau permettant l'accès à trois formulaires en lien avec la conduite de culture et les caractéristiques du microorganisme utilisé. Cette fenêtre est représentée par la *Figure 73*.

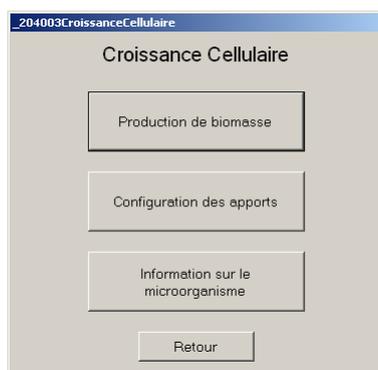


Figure 73 : Fenêtre d'accès pour la configuration des paramètres biologiques

1. Production de biomasse

A partir du bouton « Production de biomasse » de la fenêtre « Croissance Cellulaire » (voir *Figure 73*), le logiciel offre la possibilité de saisir des constantes propres au microorganisme (rendement biomasse / substrat, taux de croissance). Le formulaire à remplir est représenté en *Figure 74*. Ces valeurs seront rappelées et/ou utilisées lors de la conduite de culture lorsque l'expérimentation biologique aura débuté.

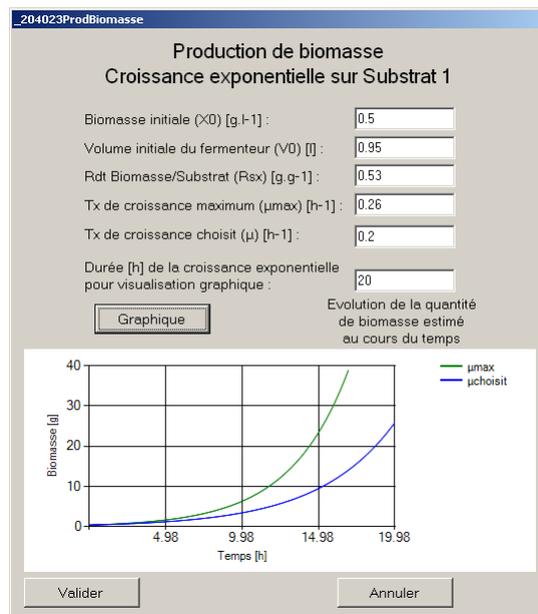


Figure 74 : Fenêtre de paramétrage pour une estimation et une production de biomasse

La prise en compte de paramètres tels que la biomasse initiale dans le bioréacteur, le volume initial de liquide et la durée de la croissance exponentielle permettent au logiciel de pouvoir montrer l'évolution au cours du temps de la quantité de biomasse produite via le bouton « Graphique ». Au cours des expérimentations, le rendement biomasse-substrat sera considéré constant de manière à appliquer un apport exponentiel de substrat adapté à l'application d'un taux de croissance fixe sur le microorganisme.

2. Configuration des apports

A partir du bouton « Configuration des apports » de la fenêtre « Croissance Cellulaire » (voir Figure 73), nous pouvons retrouver des informations concernant le substrat utilisé. Ces informations, nécessaires pour la conduite de culture, doivent avoir été saisies lors du paramétrage des balances. Ainsi, cette vérification permet de s'assurer de la configuration préalable des balances, comme représenté pour le substrat 1 dans la Figure 75.

Figure 75 : Fenêtre de vérification de la configuration des apports

La partie basse de la fenêtre (voir *Figure 75*) offre la possibilité de pouvoir asservir l'alimentation en sels par rapport à un débit de substrat, afin d'être au plus proche des besoins nutritionnels du microorganisme, en limitant les risques de stress osmotique. Enfin, un rappel des rendements configurés dans la fenêtre de paramétrage pour la production de biomasse (cf. *Figure 74*) est également effectué en fin de formulaire.

3. Information sur le microorganisme

Ce dernier formulaire est disponible à partir du bouton « Information sur le microorganisme » de la fenêtre « Croissance Cellulaire » (cf. *Figure 73*). A nouveau, ce formulaire, représenté par la *Figure 76*, permet un rappel du taux de croissance maximal et du rendement biomasse-substrat préalablement saisis et indiqués à nouveau dans les fenêtres précédentes (cf. *Figure 74* et *Figure 75*).

Figure 76 : Fenêtre de paramétrage d'information sur le microorganisme employé

Ce formulaire permet également d'enregistrer le nom du microorganisme qui sera utilisé, ainsi que sa composition élémentaire, sous l'hypothèse d'une composition élémentaire constante au cours de la durée de l'expérimentation. Ce dernier paramètre permet ainsi la conversion de grandeurs, issues des

bilans en ligne, impliquant des variables en [Cmol] pour aboutir à des variables en [g] (concentration en biomasse, vitesse spécifique, rendements).

G. Journal évènementiel et fin des configurations

Après avoir paramétré les aspects instrumentaux et biologiques, la validation de la fenêtre de contrôle (cf. *Figure 61*) déclenche l'initialisation du journal évènementiel (journal de bord) de l'expérimentation. Une représentation de la fenêtre d'initialisation du journal évènementiel est représentée en *Figure 77*.



The screenshot shows a software window titled "205JournalDepart". The main text reads "Début de l'expérience : Test_YM" and "Journal évènementiel". Below this, there are fields for "Date : 21/02/2011" and "Heure : 13:30:25". A "Commentaires :" label is followed by an empty text input field. At the bottom, there are two buttons: "Démarrage Acquisition" on the left and "Précédent" on the right.

Figure 77 : Fenêtre d'initialisation du journal évènementiel

Ce dernier formulaire permet d'entrer un commentaire qui correspondra au contenu de la première ligne du journal. Si le champ « Commentaires » reste vide, seules la date et l'heure seront enregistrées.

Après avoir cliqué sur le bouton « Démarrage Acquisition », une fenêtre de confirmation apparaît. La validation de la confirmation de cette fenêtre rendra impossible le retour vers une grande majorité des menus de configuration précédent, comme cela avait été représenté sur la *Figure 58*. Il est important de s'assurer que tous les champs précédents ont été correctement remplis avant le lancement de l'expérimentation biologique. Dans le cas contraire, le fonctionnement de l'instrumentation ou les calculs ne s'effectueront pas correctement.

Lorsque la confirmation est validée, la pompe de mise en circulation dans la plateforme démarre, accompagné de la régulation du débit d'aération et de l'acquisition. A partir de ce stade, l'acquisition ne s'arrêtera plus jusqu'à la fin de l'expérimentation.

H. Synthèse de LoCoPREL sur la préparation et la configuration du matériel

Afin de schématiser l'ensemble de la structure de préparation et de configuration du matériel, les étapes majeures sont rassemblées et présentées dans la *Figure 78* ci-dessous.

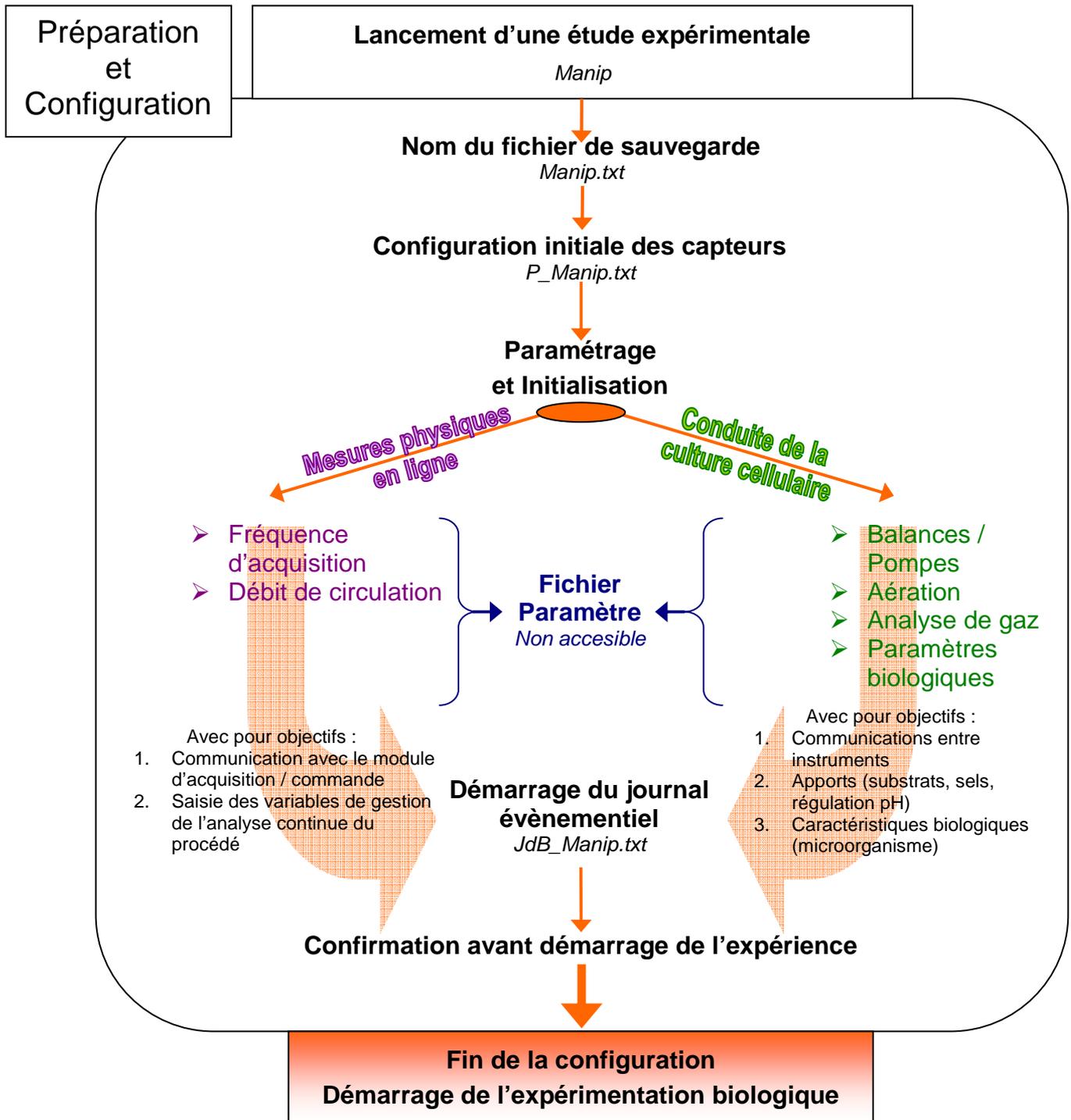


Figure 78 : Représentation schématique des étapes de préparation et de configuration du logiciel LoCoPREL

III. CONDUITE DE CULTURES

A. Menu général

1. Généralités

Après avoir validé l'ensemble des étapes de préparation et de configuration du matériel, la fenêtre du menu général apparaît comme l'élément central pour l'utilisation du logiciel LoCoPREL en cours d'expérimentation biologique.

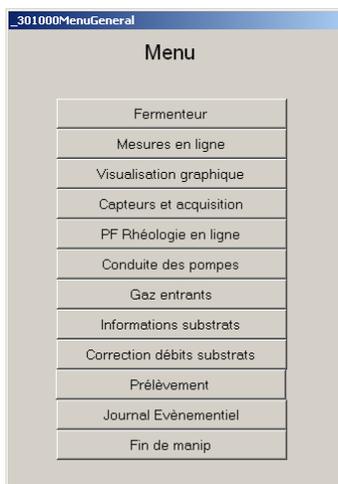


Figure 79 : Menu général du logiciel LoCoPREL (en cours d'expérimentation)

Cette fenêtre rend possible une vision globale des fonctionnalités développées et permet l'accès à celles-ci en cliquant sur les boutons correspondants :

- Fermenteur
- Mesures en ligne
- Visualisation graphique
- Capteurs et acquisition
- PF Rhéologie en ligne
- Conduite des pompes
- Gaz entrants
- Informations substrats
- Correction débits substrats
- Prélèvement
- Journal Evènementiel
- Fin de manip

En arrière-plan de cette fenêtre, toutes les actions du logiciel sont intégrées (acquisition de données, sauvegarde de fichiers, commande des pompes, visualisation des données, etc.). Le fenêtrage permet juste une structuration des actions à effectuer pour l'utilisateur. Ainsi, pendant que le code de la fenêtre « Menu général » s'exécute (même si celle-ci n'est plus active et visible), les fenêtres sur lesquelles interagit l'utilisateur modifient les variables contenues dans le « Fichier Paramètre » (cf. II.A.2 « Fichier Paramètre ») pour une réponse interactive du logiciel et de l'instrumentation. Cela permet ainsi de garder le contrôle de LoCoPREL pendant que celui-ci continue à communiquer avec les différents instruments. Pour l'utilisateur, les actions sont prises en compte de manière rapide (délais d'attente maximal de l'ordre de la seconde) permettant d'avoir un outil central interactif sur l'expérimentation.

2. Fichiers de stockage d'informations

A partir de l'apparition de la fenêtre du menu général (cf. *Figure 79*), le code associé à celle-ci interroge en permanence les variables contenues dans le « Fichier Paramètre » afin de permettre des actions interactives entre l'utilisateur et l'outil expérimental grâce au logiciel LoCoPREL. Une partie de ces fichiers a été évoquée dans la partie *II.H Synthèse de LoCoPREL sur la préparation et la configuration du matériel*. L'ensemble de ces fichiers est listé dans le *Tableau 36*.

Nom des fichiers	Descriptif
C_Nom_de_fichier.txt	Liste des capteurs utilisés
Nom_de_fichier.txt	Données électriques du module Agilent® (sauvegarde)
P_Nom_de_fichier.txt	Paramètres de conversion des données électriques en données physiques des capteurs
Phy_Nom_de_fichier.txt	Données des grandeurs physiques (capteurs + mesures + calculs)
JdB_Nom_de_fichier.txt	Journal de bord (actions, événements,...)
PhyResume_Nom_de_fichier.txt	Visualisation des variables issues des capteurs
PhyResumeMesures_Nom_de_fichier.txt	Visualisation des variables issues des mesures
PhyResumeCalculs_Nom_de_fichier.txt	Visualisation des variables issues des calculs
Pompe Substrat 1_Nom_de_fichier.txt	Gamme étalon de la pompe substrat 1
Pompe Substrat 2_Nom_de_fichier.txt	Gamme étalon de la pompe substrat 2
Pompe Sels1_Nom_de_fichier.txt	Gamme étalon de la pompe sels d'alimentation
Reload_Nom_de_fichier.txt	Redémarrage rapide en cas d'erreur logicielle

Tableau 36 : Liste des fichiers générés par l'utilisation du logiciel LoCoPREL

Nous allons les détailler dans les paragraphes suivants en supposant que le nom donné par l'utilisateur lors de la préparation et de la configuration du logiciel est : RMB_YM¹.

a. Fichiers de sauvegarde

i. *Nom_de_fichier.txt*

Ce fichier de sauvegarde contient les grandeurs électriques directement lues sur le bornier par la carte d'acquisition 34901A du module Agilent®. Les valeurs brutes sont donc conservées. Ainsi, si une configuration est erronée entre le paramétrage au sein du logiciel et le paramétrage réel des capteurs, il est alors possible de recalculer les valeurs correctes. En début de chaque ligne enregistrée dans ce fichier se trouve un rappel du mode de travail de la pompe de la boucle externe (voir *III.E.2 Configuration des profils de débit*), suivi du numéro de configuration contenu dans le fichier

¹ RMB_YM = Rhéologie de Milieu Biologique Yannick MANON

P_RMB_YM.txt. Ceci permet ainsi de retrouver la bonne correspondance entre les signaux électriques enregistrés et la configuration des capteurs.

ii. P_Nom_de_fichier.txt

Le fichier « P_ » (« P » pour Protocole capteur) apparaît dès la validation de la fenêtre de configuration initiale des capteurs (cf. *Figure 60*). Il contient le nom des capteurs, l'unité de mesure, et la valeur minimum et maximum de la mesure. Ainsi, la conversion en grandeurs physiques des signaux électriques lus par le module Agilent® est alors possible. Ce fichier enregistre une première configuration sous le nom de « Configuration n°1 ». Le numéro de la configuration est ensuite incrémenté dès lors que la fenêtre est à nouveau appelée puis validée. Ce rappel peut être effectué pendant l'étape de configuration/préparation du logiciel ou à partir du menu général quand une expérimentation biologique est en cours.

iii. Phy_Nom_de_fichier.txt

Afin d'éviter les erreurs de conversion entre données électriques (RMB_YM.txt) à partir des configurations contenues dans le fichier protocole capteur « P_ » (P_RMB_YM.txt), le calcul de conversion a été automatisé. L'objectif était d'avoir un fichier prêt à être traité. Les variables physiques étant désormais calculées, elles peuvent être également utilisées pour être visualisées au sein du logiciel. Ce nouveau fichier a le préfixe « Phy_ » pour rappeler que ce sont les variables physiques qui sont présentes dans ce fichier. De plus, comme pour le fichier contenant les données électriques (*III.A.2.a.i Nom_de_fichier.txt*), la première colonne contient le rappel du mode de travail de la pompe de la boucle externe ainsi que le numéro de configuration des capteurs.

b. Fichiers de visualisation

i. C_Nom_de_fichier.txt

Ce fichier contient le nom des capteurs qui ont été utilisés depuis le démarrage du logiciel. Cette liste est primordiale pour la fenêtre de visualisation graphique (cf. *Figure 84*). En effet, ce fichier permet de pouvoir visualiser, à partir des fichiers de suivis graphiques (voir *III.A.2.b.ii Suivis graphiques : les fichiers PhyResume*), les capteurs utilisés. Ainsi, dans le cas de changements de configuration et de capteurs, il est possible de pouvoir visualiser l'un d'entre eux, même si celui-ci n'est plus en acquisition au moment du chargement. Ce fichier a le préfixe « C_ » pour rappeler qu'il contient le nom des capteurs.

ii. Suivis graphiques : les fichiers PhyResume

Dans l'objectif d'avoir des graphiques mis à jour dès la fin de l'acquisition, une série de trois fichiers a été créée, comprenant l'ensemble des variables du fichier Phy_RMB_YM.txt. Cette compartimentation des données offre plusieurs avantages : ces fichiers étant interrogés uniquement pour la partie concernant la visualisation graphique, cela permet de gérer plus facilement les problèmes d'accessibilité de lecture. Chaque fichier contient les données d'une liste de variables (capteurs, mesures ou calculs). Ainsi, l'utilisateur peut rechercher plus rapidement sa variable, et le logiciel

recherche les valeurs de la liste choisie du fichier d'intérêt. Les fichiers étant moins volumineux, le temps de chargement des données pour la visualisation des graphiques est écourté. Cet aspect prend de l'importance en cas de longues expérimentations. Les noms des fichiers ont été choisis de façon à être facilement identifiés par l'utilisateur :

- **PhyResume_RMB_YM.txt** contient les variables physiques issues des capteurs en contact avec le milieu de culture,
- **PhyResumeMesures_RMB_YM.txt** contient les variables issues de l'instrumentation liée à la gestion du bioprocédé,
- **PhyResumeCalculs_RMB_YM.txt** contient les variables issues des calculs effectués en ligne et en lien avec la gestion du bioprocédé.

Le contenu de ces trois listes est expliqué plus en détail dans la partie *III.C.2 Visualisation graphique*.

c. Fichiers de secours

i. JdB_Nom_de_fichier.txt

Ce premier fichier de secours permet d'avoir un suivi des actions effectuées au cours de l'expérimentation. Il rassemble les informations sur les modifications de consigne de pompe, les prélèvements, les consignes du bioréacteur, les apports en nutriment à la seringue, les commentaires et les remarques entrées dans le logiciel par les différents opérateurs. Ce fichier est visualisable directement dans le logiciel via le « Journal Évènementiel » du menu général (voir *Figure 79*). Le fichier étant de type texte, il peut être ouvert par les logiciels classiques d'édition de texte. Ce fichier a été préfixé de « JdB_ », initiales de « Journal de Bord ».

ii. Reload_Nom_de_fichier.txt

Un outil informatique, aussi performant soit-il, peut connaître des erreurs de manipulation par l'utilisateur, ou des erreurs logicielles liés à son utilisation ou/et son instrumentation. Ainsi, si le logiciel (ou son environnement) génère une anomalie qui nécessite le redémarrage du logiciel ou de l'ordinateur, l'ensemble des paramètres ne doit pas nécessiter une nouvelle saisie. Cela représenterait un temps trop long alors que la culture microbienne n'est plus gérée. Afin d'accélérer la reprise de l'expérimentation, le logiciel enregistre, pour chaque acquisition, un fichier de secours commençant par « Reload_ ». Ce fichier contient une sauvegarde de certaines variables, initialement contenues dans le fichier paramètres (cf. *II.A.2 « Fichier Paramètre »*). Ainsi, le chargement de ce fichier permettra au logiciel de reprendre l'expérimentation au moment de la dernière acquisition de donnée.

B. Inoculum

Au moment du démarrage d'une expérimentation biologique, le menu général apparaît avec un bouton supplémentaire, comme représenté sur la *Figure 80*. Celui-ci se situe au dessus de la liste des boutons déjà présents et changera de nom en fonction des actions effectuées.

Initialement, le menu général a l'apparence de la *Figure 80* (à gauche). Le premier bouton de la fenêtre s'intitule « Masses Initiales ». Il apparaît seulement au lancement de l'acquisition, lorsque la

préparation et la configuration du matériel sont validées. A ce moment, l'ensemble des capteurs est en cours d'acquisition, mais aucune mesure ni calcul n'a encore démarré. Afin que les calculs démarrent, il est nécessaire d'enregistrer la masse initiale de l'ensemble des balances, ainsi que le contenu de l'inoculum en termes de concentration en biomasse, de substrat apporté et résiduel.

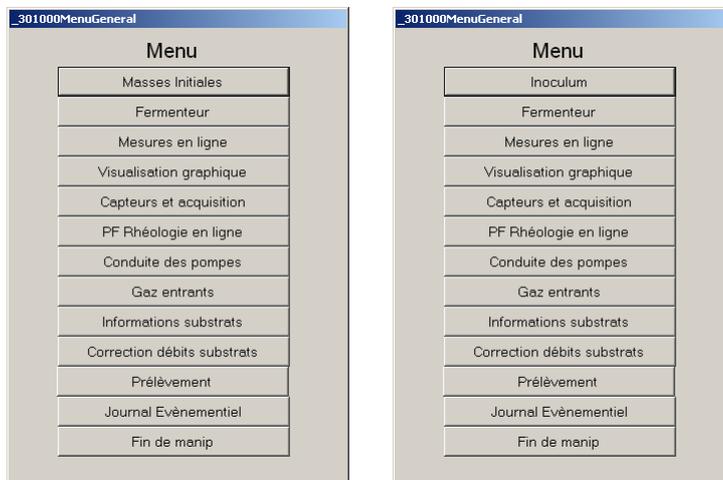


Figure 80 : Fenêtre du menu général du logiciel LoCoPREL (à gauche au moment du démarrage de l'expérimentation biologique / à droite juste avant d'inoculer le bioréacteur)

Dans un premier temps, il est nécessaire d'amorcer l'ensemble des pompes et des tuyaux avec les solutions d'intérêt (tuyau sans bulle, liquide amorcé jusqu'aux piquages). Lorsque ces actions sont effectuées, le bouton « Masses Initiales » peut être employé. La fenêtre *Figure 81* apparaît alors avec les noms des différentes solutions configurées.

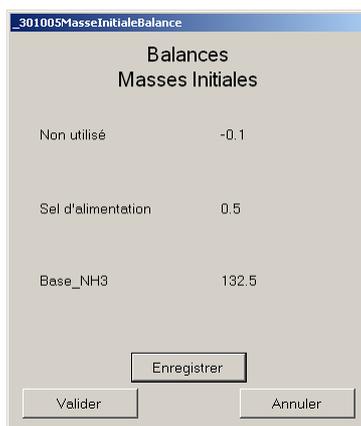


Figure 81 : Fenêtre d'enregistrement des masses initiales

A son ouverture, aucune masse n'est indiquée. En cliquant sur le bouton « Enregistrer », les masses des différentes balances paramétrées apparaissent. Dès que celles-ci sont stables et en correspondance avec les masses affichées sur la face avant de chacune d'entre elles, ces valeurs viennent alors implémenter le « Fichier Paramètre ». Ainsi, lorsque le bioréacteur sera inoculé, ces données permettront le démarrage des différents calculs en ligne liés à la gestion de la culture. Ces données sont stockées dans le « Fichier Paramètre ».

Après validation de la fenêtre, le menu général réapparaît. Le nom du premier bouton est modifié pour s'intituler « Inoculum » (cf. *Figure 80* à droite). Lorsque le bioréacteur est prêt à être inoculé, ce nouveau bouton permet l'apparition de la fenêtre représentée en *Figure 82*. Cette dernière permet d'entrer les paramètres de la préculture utilisée comme inoculum.

Inoculum	
CBiomasse obt.	0.8 [g.l-1]
Biomasse obtenue	8 [g]
Volume initial	10 [l]
Substrat1 initial	30 [g]
Substrat1 résiduel	14.90566037735 [g]
Substrat2_Perm initial	[g]
Substrat2_Perm résiduel	[g]

Figure 82 : Fenêtre des conditions initiales du bioréacteur après inoculation

Si deux substrats sont utilisés au cours de la culture, des champs apparaîtront pour chacun. Lorsque le bioréacteur est inoculé et le formulaire rempli, la validation de cette fenêtre déclenche l'enregistrement des données dans le « Fichier Paramètre » ainsi que le démarrage des calculs liés à la culture microbienne. La fenêtre du menu général apparaît tel que présenté sur la *Figure 79*.

C. Visualisation des variables

Un des points importants de ce programme est la possibilité de pouvoir acquérir des données, tout en pouvant visualiser celles-ci au sein du même environnement. Cela est maintenant possible à partir du menu général (cf. *Figure 79*).

1. Variables alphanumériques

A partir du bouton « Mesures en ligne », une fenêtre s'ouvre contenant l'intégralité des mesures et des calculs effectués en ligne (au nombre de 96). La *Figure 83* représente un exemple de cette fenêtre récapitulative des variables visualisables.

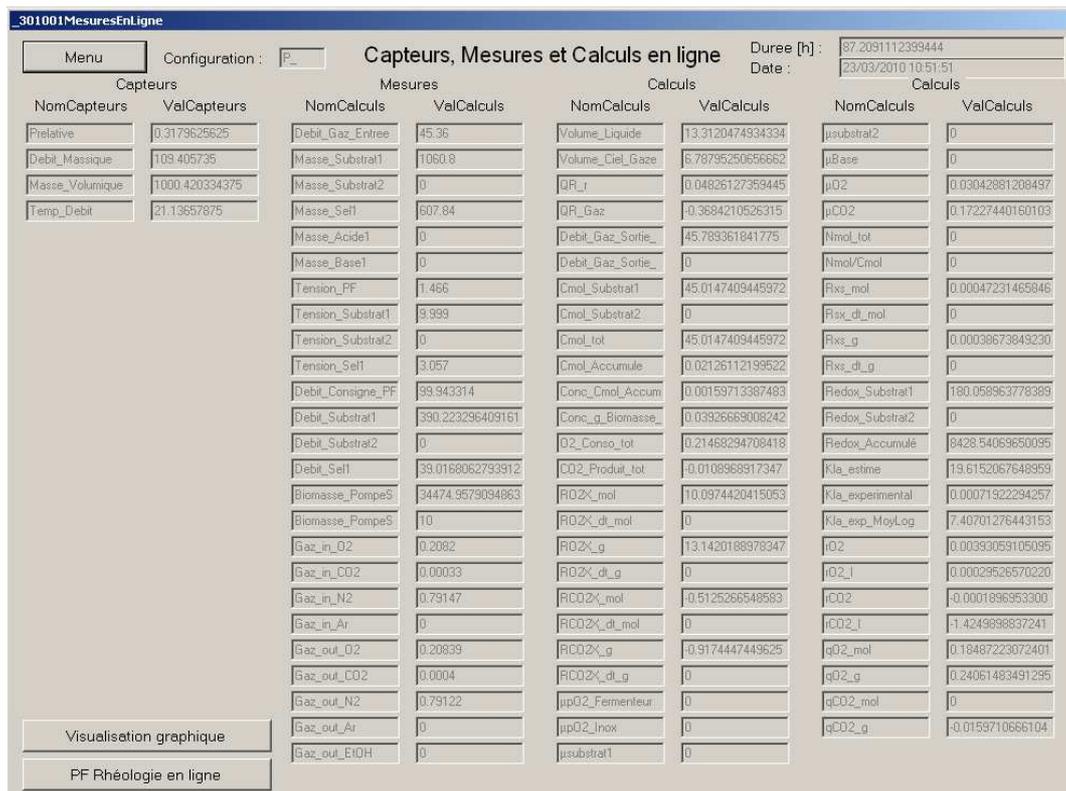


Figure 83 : Fenêtre de l'ensemble des valeurs obtenues en ligne

Les colonnes de cette fenêtre vont par paires (nom de la variable + valeur numérique). La fenêtre rassemble quatre paires de colonne. La première paire regroupe les valeurs issues des capteurs en contact avec le milieu de culture. La seconde paire de colonne regroupe les mesures « satellites » : débit d'aération, masse des balances, débit des pompes, consigne tension des pompes, biomasse consigne, composition des gaz d'entrée et de sortie. Les troisième et quatrième paires regroupent les calculs liés au bioprocédé : volumes, coefficient respiratoire, débits des gaz de sortie, quantités de substrat apporté, rendements, taux de croissance, coefficients de transfert d'oxygène, vitesses instantanées, spécifiques ... (cf. *Chapitre II C Données microbiologiques*).

Cette fenêtre permet également de savoir quel est le mode de travail de la pompe de la boucle externe au moment de la dernière acquisition (voir *III.E Gestion de la viscosimétrie*). Il est également possible de voir l'âge de la culture à partir du champ « Durée [h] » en haut à droite de la fenêtre, ainsi que la date et l'heure enregistrées par le logiciel lors de la dernière acquisition.

2. Visualisation graphique

A partir du bouton « Visualisation graphique » du menu général (cf. *Figure 79*), le logiciel ouvre la fenêtre permettant de suivre, au cours du temps, l'ensemble des variables enregistrées et calculées dans le logiciel. La fenêtre de visualisation graphique des données est représentée en *Figure 84*.

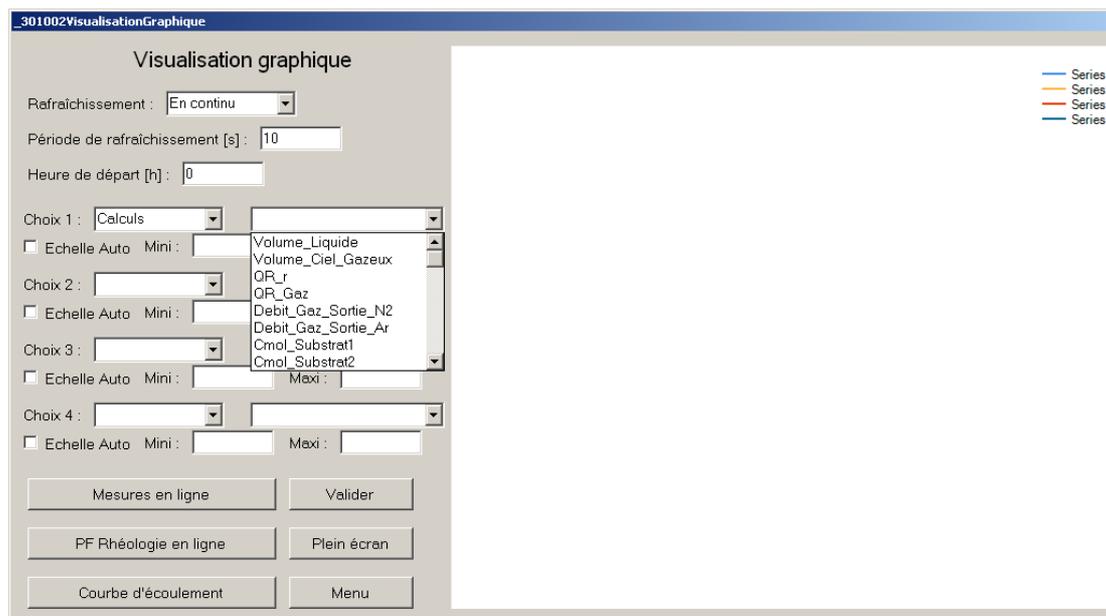


Figure 84 : Fenêtre de visualisation graphique des données

Celui-ci offre la possibilité de suivre quatre variables différentes réparties sur deux graphiques. Comme pour la fenêtre « Mesures en ligne » (cf. *Figure 83*), les variables sont rassemblées par groupe :

- Les capteurs : données issues des capteurs en contact avec le milieu de culture,
- Les mesures : données issus des appareils complétant les capteurs au niveau de la conduite de la culture (débit d'aération, masse des balances, débit des pompes, consigne en tension des pompes, biomasse consigne, composition des gaz d'entrée et de sortie),
- Les calculs : variables calculées en liens avec le bioprocédé (volumes, coefficient respiratoire, débit des gaz de sortie, substrat apporté, rendement, taux de croissance, coefficient de transfert d'oxygène, vitesse instantanée et spécifique).

Les graphiques peuvent être rafraîchis manuellement ou automatiquement en choisissant l'option appropriée de la fenêtre. Dans le cas d'un rafraîchissement continu, il est nécessaire de saisir la période de rafraîchissement des graphiques. Concernant les longues expérimentations, il est possible de changer l'origine du graphique en modifiant le champ « Heure de départ » afin d'avoir un temps de chargement des données moins important. Les échelles associées aux variables peuvent être ajustées de manière automatique ou choisies en indiquant le minimum et le maximum de la plage de valeur désirée. Il est également possible d'avoir un graphique de plus grande taille pour le suivi plus spécifique de deux graphiques en sélectionnant l'option « Plein écran ».

D. Gestion du bioprocédé

1. Fermenteur

A partir du bouton « Fermenteur » du menu général (voir *Figure 79*), il est possible de compléter le formulaire contenant les variables propres au bioréacteur, représenté en *Figure 85*, et d'intégrer les changements de consigne effectués au niveau du bâti de contrôle.

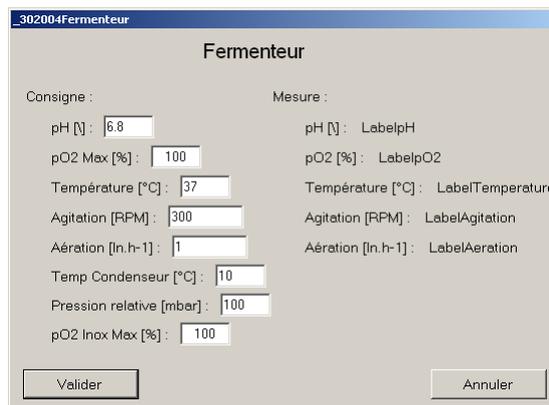


Figure 85 : Fenêtre des consignes appliquées au bioréacteur

Chaque modification est automatiquement ajoutée dans le journal événementiel, afin d'avoir un historique des actions effectuées sur le milieu de culture depuis le bâti du bioréacteur. Le remplissage de ce formulaire est important car certaines valeurs sont utilisées pour le calcul de variables en ligne (voir *Chapitre II IV.C Données microbiologiques*).

2. Apports nutritionnels

A partir du bouton « Conduite des pompes » du menu général (voir *Figure 79*), le logiciel ouvre une fenêtre présentant l'état de fonctionnement de chacune des pompes d'alimentation configurées. La *Figure 86* représente la fenêtre récapitulative de l'état de fonctionnement des pompes d'alimentation du bioréacteur.

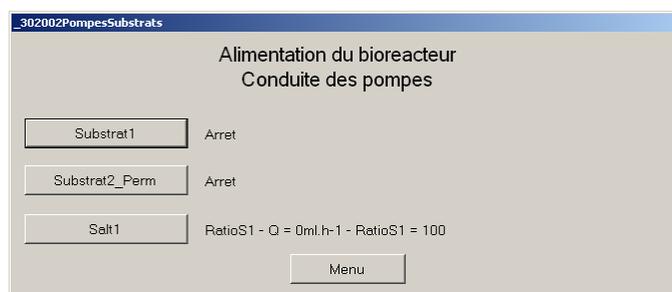


Figure 86 : Fenêtre récapitulative de l'état de fonctionnement des pompes d'alimentation

Sur la *Figure 86*, les boutons sur la gauche ouvrent l'accès aux modifications de conduite des pompes. Les indications à droite des boutons donnent l'état de fonctionnement de la pompe, le profil de débit ainsi que le débit théoriquement envoyé (déduit de la courbe de calibration et de la tension de consigne appliquée à la pompe). La modification des débits est possible à partir du choix de la pompe effectué à la fenêtre représentée en *Figure 86*. Les consignes de débits sont alors modifiables depuis la fenêtre de gestion des débits représentée en *Figure 87*.

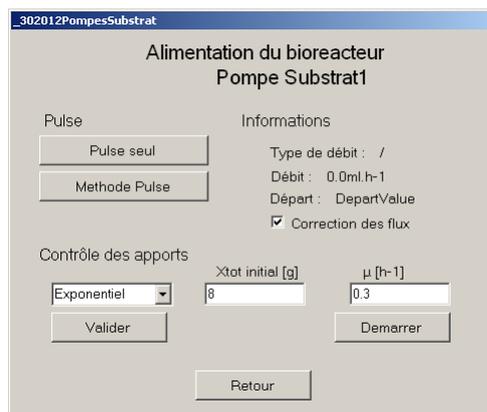


Figure 87 : Fenêtre de gestion des débits d'une pompe d'alimentation

Ces fenêtres permettent de gérer les débits d'apports pour différentes stratégies de conduite. La fenêtre de gestion de débit se décompose en trois zones nommées « Pulse », « Informations » et « Contrôle des apports ».

a. Pulse

La fenêtre offre la possibilité d'envoyer un pulse de substrat dont la quantité est choisie par l'opérateur (bouton « Pulse »). Cette action a pour objectif de mettre du substrat en excès à partir d'une concentration résiduelle nulle dans le milieu. La mesure du temps nécessaire à la consommation de la quantité ajoutée permet de déduire une vitesse moyenne de consommation et un taux de croissance moyen. La vitesse de croissance est obtenue si la quantité de substrat injecté n'inhibe pas la croissance elle-même. L'épuisement du substrat dans le milieu est détecté par une remontée de la mesure de la consommation en dioxygène dissous dans le milieu. L'obtention de ces grandeurs permet l'emploi de l'option « Méthode Pulse » de la fenêtre représentée en *Figure 87*. Cette option permet d'appliquer le flux de substrat préalablement consommé pour maintenir le taux de croissance le plus élevé du microorganisme dans les mêmes conditions.

b. Informations

La fenêtre de gestion des débits d'alimentation permet de visualiser l'état de fonctionnement de la pompe. Ainsi, il est possible d'obtenir la confirmation du paramétrage précédemment choisi. Cette zone de la fenêtre de gestion des débits rassemble les informations suivantes :

- Le type (profil) de débit : constant, linéaire, exponentiel ou asservi (spécifique de la pompe sel d'alimentation),
- La valeur du débit : Cette valeur est déduite de la tension de consigne envoyée à l'ouverture de la fenêtre et de la droite d'étalonnage utilisée par la pompe,
- La consigne de départ : Cette valeur correspond au paramétrage entré par l'utilisateur au moment du démarrage de la pompe ; son unité dépend du type (profil) de débit utilisé,
- La correction des flux : Paramètre corrigeant les flux du bioréacteur en fonction du ratio volume de liquide prélevé - volume de liquide calculé dans le bioréacteur ; si cette option est active, les débits seront corrigés quel que soit le type (profil) de débit choisi. Cette option

permet de minimiser l'impact des prélèvements effectués en maintenant la vitesse instantané d'apport de substrat entre avant et après le prélèvement.

c. Contrôle des apports

Le logiciel propose différents profils de débit permettant ainsi de moduler la conduite de culture en fonction des objectifs expérimentaux souhaités. LoCoPREL offre trois profils communs à toutes les pompes d'alimentation, ainsi qu'un quatrième profil spécifique à la pompe d'alimentation en sel. Chaque modification des apports est consignée automatiquement dans le journal événementiel.

i. Profil exponentiel

Le choix de ce profil permet d'utiliser les paramètres biologiques entrés dans le logiciel au moment de la préparation et de la configuration de l'expérimentation. Ainsi, le rendement biomasse - substrat étant intégré dans le logiciel, l'utilisateur n'a plus qu'à saisir la quantité totale de biomasse initiale dans le bioréacteur au moment de l'application du profil de débit, ainsi que le taux de croissance souhaité.

ii. Profil linéaire

Ce profil permet l'application d'une rampe de débit. L'utilisateur du logiciel entre le débit de départ et la pente à appliquer depuis ce débit. Le profil de débit suit alors une droite au cours du temps.

iii. Profil constant

Cette possibilité permet d'imposer un débit constant, sans évolution au cours du temps.

iv. Profil asservi

Ce profil est spécifique de la pompe d'alimentation en sels et permet un asservissement du débit volumique apporté en sels par le débit volumique apporté de substrat. Ainsi, l'application d'un coefficient de proportionnalité entre les débits volumiques permet d'asservir la pompe d'alimentation en sels sur le même profil de débit que l'alimentation en substrat. Seul le débit d'alimentation en sels est affecté. Ce type d'alimentation permet de maintenir la proportion de sels apportés dans la culture pour les mêmes quantités de carbone.

3. Gaz

A partir du bouton « Gaz entrants » du menu général (voir *Figure 79*), l'utilisateur a accès à la gestion des gaz entrant dans le bioréacteur par le contrôle des débitmètres. La fenêtre de gestion des gaz est représentée en *Figure 88*.

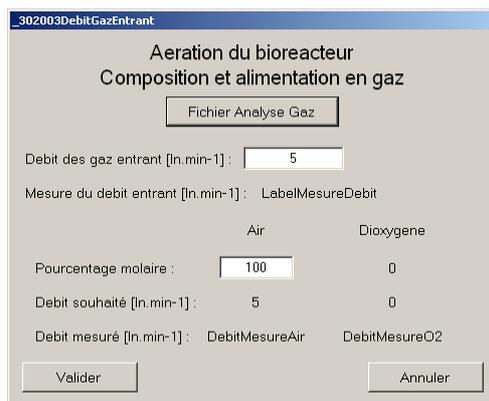


Figure 88 : Fenêtre de gestion des gaz du bioréacteur

Dans cette nouvelle fenêtre, le débit d'air entrant peut être modifié. Dans le cas d'un enrichissement en dioxygène, le logiciel permet de fixer le débit molaire total entrant (à partir du débit massique précédemment saisi) de manière à pouvoir modifier les proportions molaires d'air et de dioxygène. A partir de la proportion d'air entrant, le logiciel en déduit celle de dioxygène, et applique les débits massiques avec des consignes corrigées afin que les proportions molaires soient respectées. Chaque changement de consigne est sauvegardé dans le journal évènementiel.

En cours d'expérimentation, l'utilisateur devra également modifier les fichiers d'analyse de la composition gazeuse de sortie. En effet, les analyseurs gaz changent de fichier de sauvegarde toutes les 24h, imposant d'effectuer le changement de fichier manuellement au cours de l'expérimentation. Celui-ci se retrouvera dans la configuration présentée dans la partie *II.C Initialisation de variables*, au niveau des fenêtres représentées *Figure 63* et *Figure 64*.

4. Journal évènementiel

Le journal évènementiel est un document rassemblant l'ensemble des actions effectuées par le logiciel sur le milieu de culture. A partir du bouton « Journal Evènementiel » du menu général (*Figure 79*), la fenêtre de gestion du journal évènementiel apparaît, comme représenté en *Figure 89*.



Figure 89 : Fenêtre de gestion du journal évènementiel

Cette fenêtre offre la possibilité de visualiser les différents évènements consignés dans le journal manuellement ou automatiquement (voir *Figure 90*), ou d'ajouter un nouvel évènement manuellement (voir *Figure 91*).

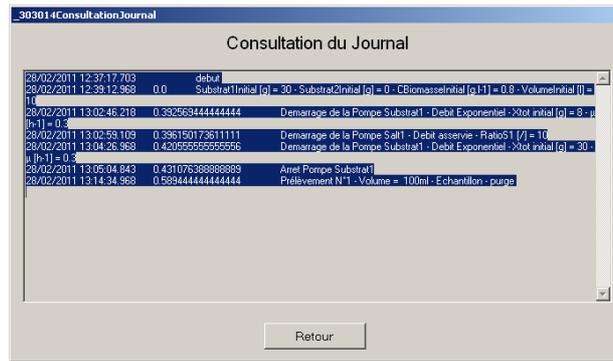


Figure 90 : Fenêtre de consultation du contenu du journal événementiel



Figure 91 : Fenêtre des types d'évènement à ajouter

Dans le cas d'un ajout d'évènement, l'opérateur peut se retrouver dans l'un des deux cas représentés en Figure 92.



Figure 92 : Fenêtre d'un ajout de nutriment (à gauche) et d'une information (à droite)

S'il s'agit d'un ajout de nutriment, l'utilisateur devra obligatoirement saisir un volume de nutriments afin qu'il soit intégré au calcul du volume de liquide du logiciel (voir Figure 92 à gauche). Dans le cas d'une remarque, seul le champ concernant le commentaire est disponible dans la fenêtre (Figure 92 à droite).

E. Gestion de la viscosimétrie

A partir du bouton « PF Rhéologie en ligne » du menu général (cf. Figure 79), le logiciel offre l'accès à la fenêtre récapitulative en lien avec l'analyse de la viscosité en ligne. Ce panneau de contrôle est représenté en Figure 93.

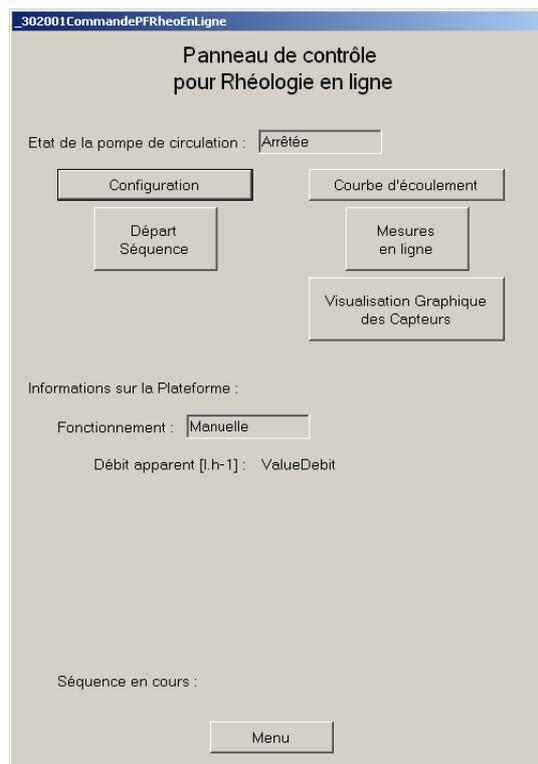


Figure 93 : Fenêtre de gestion de la viscosimétrie en ligne

Certaines options ont déjà été rencontrées dans le menu général (cf. *Figure 79*, bouton « Mesures en ligne » et « Visualisation Graphique »). Ce panneau de contrôle permet d'accéder à la programmation de la pompe contrôlant le débit de circulation dans la boucle de dérivation (bouton « Configuration »). Lorsque la configuration est effectuée, le profil programmé démarre à partir du bouton « Départ Séquence ». A chaque ouverture de cette fenêtre, les indicateurs présents dans la seconde partie de celle-ci se mettront à jour. Ceci permet ainsi de suivre l'avancement des profils exécutés par cette pompe spécifique à ce travail.

1. Courbe d'écoulement

Au sein du logiciel, il est prévu un traitement automatique des séquences de débit. Lors de la récupération des valeurs moyennes des paliers de débit effectués (correspondant à différents cisaillement), les courbes de frottement ($f/2 = f(Re_g)$) préalablement établies sur chacune des conduites permettent l'obtention d'une viscosité estimée. Ainsi, il est alors possible de visualiser les courbes d'écoulement ($\eta = f(\dot{\gamma})$) pour chaque séquence de débit effectuée.

2. Configuration des profils de débit

A partir du bouton « Configuration » de la fenêtre de gestion de la viscosimétrie en ligne (cf. *Figure 93*), il est possible d'accéder au contrôle et à la programmation des séquences de débit de la pompe gérant le débit de circulation dans la boucle de dérivation. Le débit de la pompe peut être imposé de manière manuelle, comme représenté en *Figure 94*.



Figure 94 : Fenêtre de gestion manuelle de la pompe de la boucle externe

Dans le cas contraire, le débit de la pompe doit être programmé. Pour cela, la séquence de débit doit être paramétrée. Ainsi, l'ensemble des champs nécessaires à la programmation du profil apparaît comme présenté sur la Figure 95.

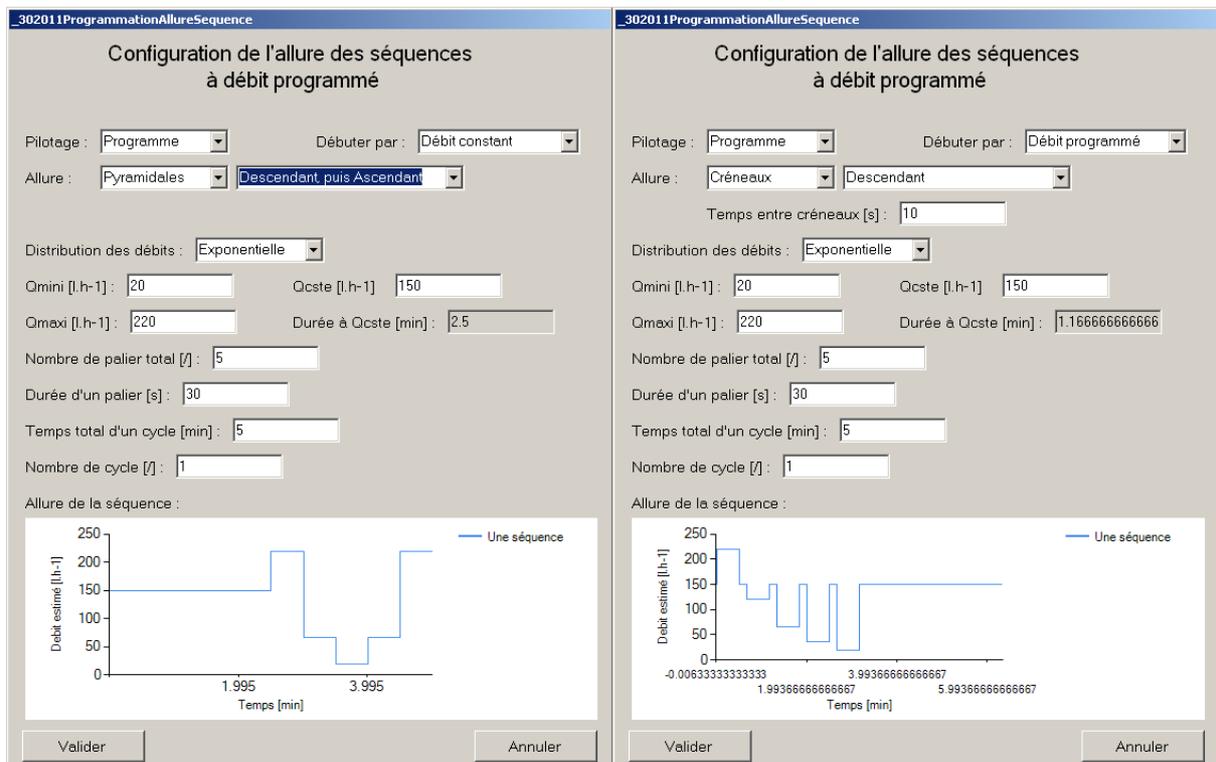


Figure 95 : Fenêtre de gestion de profils programmés de la pompe située sur la boucle externe

Le paramétrage de la séquence s'inspire des protocoles de mesure qu'il est possible de trouver sur un rhéomètre. Quelques explications sur ces protocoles de mesures sont décrites en *Annexe 13 : Protocoles de mesure en rhéométrie*.

La programmation du profil de débit de la pompe de dérivation débute par le choix de l'allure au démarrage de la séquence :

- Soit le profil débute par un débit constant et continue sur la séquence programmée (voir profil de gauche sur la *Figure 95*),
- Soit le profil commence directement par la séquence de débit (voir profil de droite sur la *Figure 95*).

L'allure du profil peut être de deux types :

- Pyramidal : le débit dans la boucle externe évolue par paliers d'un débit A à un débit B,
- Créneau : identique au pyramidal, avec un retour à un débit nominal entre chaque palier pendant une durée définie.

Concernant la séquence de débit, quatre possibilités sont proposées pour le profil :

- Ascendant : du débit le plus faible au débit le plus important,
- Descendant : du débit le plus important au débit le plus faible (voir *Figure 95* à droite),
- Ascendant, puis Descendant : le nombre de paliers total est partagé de manière à commencer par le débit le plus faible, avoir le débit le plus important au milieu de la durée totale de la séquence, et terminer par le débit le plus faible,
- Descendant, puis Ascendant : le nombre de paliers total est partagé de manière à commencer par le débit le plus important, avoir le débit le plus faible au milieu de la durée totale de la séquence, et terminer celle-ci par le débit le plus important (voir *Figure 95* à gauche).

La distribution des débits peut être de deux types :

- Linéaire : deux débits adjacents ont la même distance sur une échelle linéaire,
- Exponentielle : deux débits adjacents ont la même distance sur une échelle logarithmique.

Ensuite, il est nécessaire de saisir des valeurs chiffrées pour les différents paramètres afin de construire la séquence de débit :

- Qmini : débit minimum de la séquence,
- Qmaxi : débit maximum de la séquence,
- Qcste : débit de circulation dans l'outil expérimental en dehors des séquences de débit ; c'est aussi le débit nominal entre chaque palier pour un profil de type créneau,
- Le nombre de paliers de débit,
- La durée d'un palier, qui conditionnera, avec le nombre de palier, la durée totale de la séquence,
- Le temps total d'un cycle (durée de la séquence + durée entre séquences),
- Le nombre de cycles à effectuer.

Dans les fichiers NomFichier.txt et Phy_NomFichier.txt sont stockés l'état de fonctionnement (mode de travail) de la pompe de la boucle de dérivation ainsi que le numéro de la configuration utilisée (précisé dans le fichier P_NomFichier.txt). Ainsi, il est possible de savoir quelle est la programmation de la pompe en chaque point enregistré. La syntaxe du mode de travail de la pompe est la suivante :

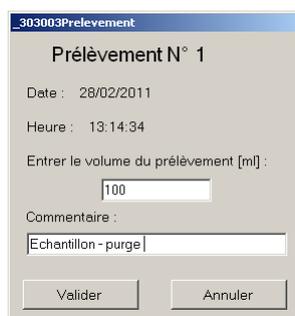
- « P_ » : la pompe est en commande manuelle ou à débit constant entre les séquences,
- « S_ » : la pompe est en commande programmée et fait actuellement un créneau avec un débit nominal,
- « SP » : la pompe est en commande programmée et fait actuellement une séquence de débit pyramidale,
- « SC » : la pompe est en commande programmée et fait actuellement une séquence de débit en créneaux.

A la suite de ces caractères, le numéro de configuration est accolé afin d'avoir une chaîne de caractères unique au sein de la première colonne.

La programmation d'un profil de débit permet de caractériser le milieu de culture pour divers cisaillement, afin de pouvoir construire *in fine* la courbe d'écoulement du moût pour des âges de culture précis.

F. Prélèvements et correctifs automatisés

Une fenêtre spécifique pour les prélèvements a été créée sur le même modèle que celui de la fenêtre de l'ajout d'un nutriment (cf. *Figure 92* à gauche). A partir du bouton « Prélèvement » du menu général (cf. *Figure 79*), le logiciel ouvre une fenêtre dans laquelle s'inscrivent la date, l'heure et le numéro de prélèvement qui seront, après validation, enregistrés dans le journal évènementiel.



The image shows a dialog box titled "Prélèvement N° 1" with a window title bar that reads "_303003Prelevement". The dialog contains the following information and input fields:

- Date : 28/02/2011
- Heure : 13:14:34
- Entrer le volume du prélèvement [ml] : 100
- Commentaire : Echantillon - purge

At the bottom of the dialog, there are two buttons: "Valider" and "Annuler".

Figure 96 : Fenêtre de prélèvement d'un échantillon

A chaque validation de cette fenêtre, le numéro du prélèvement s'incrémente. Le volume de prélèvement soutiré du bioréacteur est retranché au volume de liquide calculé. Dans le cas où l'option « correction des flux » est activée (*III.D.2.b Informations*), les débits envoyés seront diminués en fonction du ratio « Volume prélevé » / « Volume de liquide calculé avant prélèvement » afin de maintenir la vitesse instantanée de consommation de substrat constante dans le bioréacteur.

G. Synthèse de LoCoPREL au cours d'une expérimentation biologique

Afin de présenter une vision synthétique des étapes majeures du logiciel au cours d'une expérimentation biologique, les principaux événements et interactions entre les différentes fonctions du logiciel sont représentées dans la *Figure 97* ci-dessous.

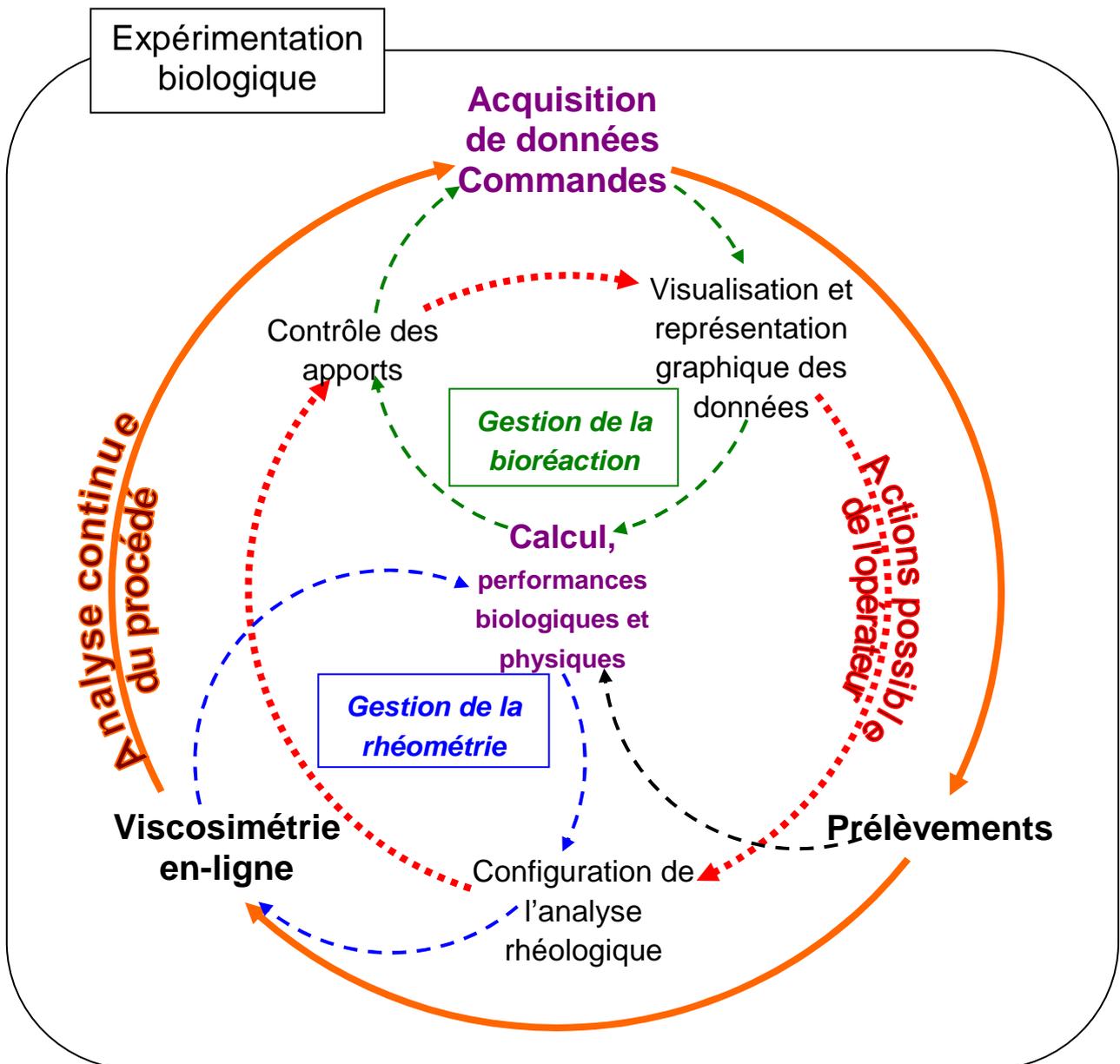


Figure 97 : Représentation schématique des interactions entre les différentes parties du logiciel LoCoPREL

CONCLUSION

LoCoPREL est l'aboutissement d'un travail de développement utilisant différentes technologies informatiques pour répondre à un cahier des charges multiple. L'amélioration de ce logiciel s'est faite par étapes, avec pour objectifs une amélioration des conditions de travail et une meilleure précision du suivi de chaque culture. Ce nouvel outil est à l'interface du génie microbiologique et de la rhéologie. La partie microbiologie intègre le pilotage de pompes d'alimentation en substrat, la prise en compte des prélèvements, des possibilités de correctifs de débit d'apport automatisé accompagnés de calculs en ligne adaptés au bioprocédé. L'enregistrement des signaux est adapté aux différentes contraintes rhéologiques appliquées en ligne (débit constant ou séquencé). L'acquisition mise en place permet d'enregistrer rapidement des données (période d'échantillonnage de 1 s) lors de changements de débit de circulation dans la boucle de dérivation au cours des séquences programmées (une modification de débit toutes les 30 s). Les données enregistrées peuvent être visualisées numériquement ou graphiquement. La préparation des expérimentations a été simplifiée avec la possibilité d'effectuer l'étalonnage des pompes d'alimentation de manière automatisée. La transmission des informations entre opérateurs a également été simplifiée par la mise en place d'un journal événementiel. Enfin, une partie des calculs en ligne a pu être vérifiée au cours des expérimentations.

Au sein de cet outil, l'intégration de compétences en rhéologie et en génie microbiologique augmente les potentialités d'utilisation de cet environnement au-delà du contexte de l'étude initiale. La prise en compte du savoir de différents secteurs scientifiques permet ainsi d'obtenir des informations en ligne qui ne pourraient pas être observables sans le déploiement d'une telle méthodologie. De plus, la gestion de l'activité microbiologique, par les alimentations en substrat, au cours de la caractérisation physique du moût, permet une analyse fine des dynamiques mesurables. De ce fait, les différentes caractéristiques de cet outil expérimental (bioréacteur, boucle de dérivation et LoCoPREL) en font un instrument d'investigation original et singulier.

Cependant, le développement de ce logiciel doit être amélioré. Même si une partie des options du logiciel fonctionne, de multiples éléments sont actuellement et volontairement bloqués. Parmi ces éléments non fonctionnels, nous pouvons évoquer l'utilisation des courbes de frottement pour l'estimation de la viscosité en ligne, l'établissement des courbes d'écoulement, l'alimentation du substrat par « Pulses » ou « Méthode Pulse », les correctifs sur les débits réels (de substrat ou de gaz entrant), sur l'ajustement de toutes les sondes températures, le pilotage du substrat par une limitation nutritionnelle... D'autres éléments du logiciel peuvent causer des erreurs. Celles qui ont été identifiées ont été gérées et ne risquent plus de perturber le fonctionnement du logiciel. Cependant, il est difficile de prévoir tous les cas d'erreur pour les gérer. Enfin, une partie des calculs reste en suspens, principalement lorsque les bilans doivent s'effectuer en ligne.

Le développement de l'outil expérimental dans sa globalité montre la faisabilité et la pertinence du développement d'une interface informatique avec un développement instrumental. Le code du logiciel

doit encore être amélioré de manière à mieux le structurer et permettre une optimisation des flux d'exécution mis ou à mettre en place (cas des indicateurs dans les fenêtres). De plus, sa flexibilité de développement autorise l'intégration de capteurs ou de mesures de plus en plus complexes, pouvant s'ajouter au développement existant comme des modules complémentaires. Cette flexibilité donne à cet outil une grande richesse de stratégie de recherche, les matrices investiguées pouvant être biotique ou abiotique, mono ou multiphasiques.

Chapitre IV - Analyse des cultures

Table des matières du chapitre IV

INTRODUCTION	221
I. PRESENTATION DES CULTURES	221
A. EXPERIMENTATIONS SUR PROCARYOTE	222
1. <i>Culture I</i>	222
2. <i>Culture II</i>	225
3. <i>Culture III</i>	227
B. EXPERIMENTATIONS SUR EUCARYOTE.....	229
1. <i>Culture IV</i>	229
2. <i>Culture V</i>	231
3. <i>Culture VI</i>	233
C. DONNEES EXPERIMENTALES ET EXPLOITATION	235
II. GRANDEURS PHYSIQUES EN LIGNE A DEBIT CONSTANT	240
A. DENSIMETRIE EN LIGNE.....	240
1. <i>Suivi de l'inoculation</i>	240
2. <i>Evolution en phase de croissance cellulaire</i>	241
B. CONDUCTIMETRIE EN LIGNE	247
1. <i>Suivi de l'inoculation</i>	247
2. <i>Evolution en phase de croissance</i>	249
C. PERTES DE CHARGE LINEIQUES	251
1. <i>Suivi de l'inoculation</i>	252
2. <i>Evolution en phase de croissance</i>	253
D. BILAN DES MESURES A DEBIT CONSTANT.....	261
III. GRANDEURS PHYSIQUES EN LIGNE LORS DE SEQUENCES	265
A. SCENARII DE CARACTERISATION PONCTUELLE IN SITU.....	266
1. <i>Test d'optimisation</i>	266
2. <i>Comparaisons d'allures de séquences</i>	270
B. ANALYSE DES MESURES PHYSIQUES.....	274
1. <i>Densimétrie en ligne</i>	275
2. <i>Conductimétrie en ligne</i>	281
3. <i>Pertes de charge linéiques</i>	285
C. BILAN DES MESURES A DEBIT SEQUENCE	289
CONCLUSION	291

INTRODUCTION

Les chapitre IV et V sont consacrés à la présentation et à l'analyse de l'ensemble des résultats. Dans le chapitre IV, nous exposons le détail des expérimentations effectuées et des mesures en ligne : le choix des microorganismes, les objectifs fixés à chaque culture, les mesures effectuées... Puis ces résultats seront analysés et confrontés aux mesures hors-ligne dans le chapitre V.

I. PRESENTATION DES CULTURES

Ce chapitre IV a donc pour objectif la description du déroulement de l'ensemble des expérimentations au cours de la croissance du microorganisme, ainsi qu'au cours d'une deuxième phase au cours de laquelle on a examiné la diminution de son activité biologique. On présentera donc ici la dynamique des variables mesurées dans le bioréacteur, ainsi que l'ensemble des flux entrants (substrats, sels, bases, gaz dans les versions les plus complètes). L'ensemble des cultures conduites ainsi que leurs principales caractéristiques sont présentés dans le *Tableau 37*. Dans ce tableau sont également mentionnés les objectifs propres à chaque culture. En effet, selon les cultures et le moment où elles ont été réalisées par rapport au développement de l'outil expérimental, l'objectif a été tantôt un développement de cet outil (objectif technologique), tantôt l'obtention d'éléments de réponse sur la conduite de la culture et ses caractérisations (objectif scientifique). Dans sa globalité, le but de cette partie est de démontrer l'amélioration continue de la maîtrise de la culture effectuée autorisant une analyse fine de l'évolution des mesures en ligne obtenues (cf. *Tableau 38*).

Dans le *Chapitre II*, nous avons présenté la composition des milieux, les conditions de pré-culture, de culture et les stratégies de culture associées. Les cultures et le bioprocédé ont été progressivement améliorés aussi bien sur les aspects implémentation de l'instrumentation, perfectionnement du logiciel de contrôle-commande-acquisition (cf. *Chapitre III*), que sur les aspects analyses biologiques et physico-chimiques. La concentration en biomasse est une des principales caractéristiques de chaque culture. Aussi, pour faciliter la lecture et la compréhension des résultats (*Chapitres IV et V*), nous incluons dans chaque figure un synoptique permettant d'identifier la culture, la souche et la plage de concentration couverte.

Microorganisme		<i>E. coli</i>			<i>Y. lipolytica</i>		
		I	II	III	IV	V	VI
Consignes	Température [°C]	37			28		
	pH [l]	6.8			5.5		
	Surpression [mbar]	100	0/300	50/300	20/100	0/100	300
	Agitation [tr min ⁻¹]	1500	200→700	200→1100	1200→1500	700→1500	400→1100
	Aération [l _n min ⁻¹]	20	0/6.5	1/11	12/20	10/20.5	5/13
Résultats	LoCoPREL	≈	+	++	≈	≈	++
	Objectif technique	+	++	++	+	++	++
	Objectif scientifique	≈	+	++	≈	+	++
	Biomasse [g l ⁻¹]	47*→108*	0.1→14	0.2→37	63*→104*	11→100	0.2→59
	μ _{moyen} [h ⁻¹]	0.075 (8)	0.077 (3)	0.093 (9)	0.023 (9)	0.082 (5)	0.160 (5)
	Perte d'activité biologique	≈	n.a.	++	≈	≈	n.a.

Tableau 37 : Tableau synoptique de l'ensemble des cultures réalisées et des résultats majeurs obtenus (≈ : essai exploratoire, + : essai concluant, ++ : confirmation/validation, *estimation par mesure d'absorbance)

$\frac{U_c(y)}{y} \times 100$ [%]	Régime laminaire (Re < Re _{c1})	Régime turbulent (Re > Re _{c2})
Milieu initial	-	7
<i>E. coli</i>	9	-
<i>Y. lipolytica</i>	8	-

Tableau 38 : Incertitude-type composée relative des facteurs de frottement expérimentaux au cours des expérimentations biologiques pour la conduite D2

A. Expérimentations sur procaryote

La culture d'*Escherichia coli* a été utilisée pour nos premiers essais, que ce soit sur la première utilisation de l'outil expérimental sur un milieu biologique avec le programme développé sous LabView® (cf. Annexe 8 : Interface homme-machine à partir du programme de gestion sous LabView®) ou lors de la première culture lancée avec le logiciel LoCoPREL (cf. Chapitre III).

1. Culture I

La première expérimentation réalisée sur l'outil expérimental, numérotée I, a pour premier objectif la vérification de la gestion informatique de l'acquisition des données et du lancement des rampes de séquences de débit permettant la rhéologie en ligne. Au cours de cette expérimentation, la culture a débuté avec un moût provenant d'une autre culture réalisée dans le laboratoire (voir Chapitre II III.A.2 Précultures et inocula) afin de se positionner d'emblée sur des conditions de culture à haute concentration cellulaire. Ceci a permis de valider la faisabilité de l'étude en plaçant directement l'outil

expérimental dans des conditions extrêmes de concentration permettant de tester le développement métrologique.

S'agissant d'une première expérimentation, l'environnement instrumental a impliqué un certain nombre de difficultés décrites dans le *Chapitre II*. La « stérilisation » s'est effectuée à l'éthanol absolu pendant environ 2 h, puis l'installation a été rincée une première fois rincée avec le milieu minimum (conditionnement), avant d'être remplie de milieu minimum dans des conditions de stérilité non complètement maîtrisées. Cependant, malgré l'environnement délicat lors du transfert du moût servant d'inoculum, celui-ci n'a pas développé de contaminants visibles avec les cellules d'*E. coli*. La conduite du bioréacteur s'est effectuée manuellement autant en terme d'apport carboné que de régulation du pH. La *Figure 98* et la *Figure 99* présentent respectivement, pour l'expérimentation I, l'évolution des variables et l'évolution des flux entrants dans le bioréacteur.

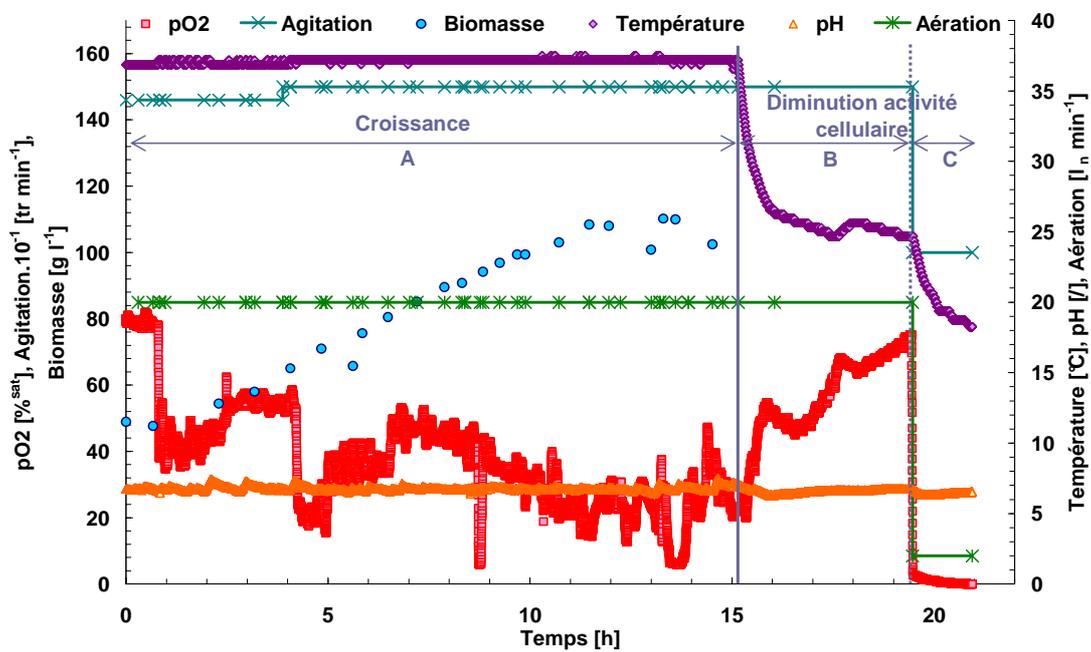


Figure 98 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture I, *E. coli*)

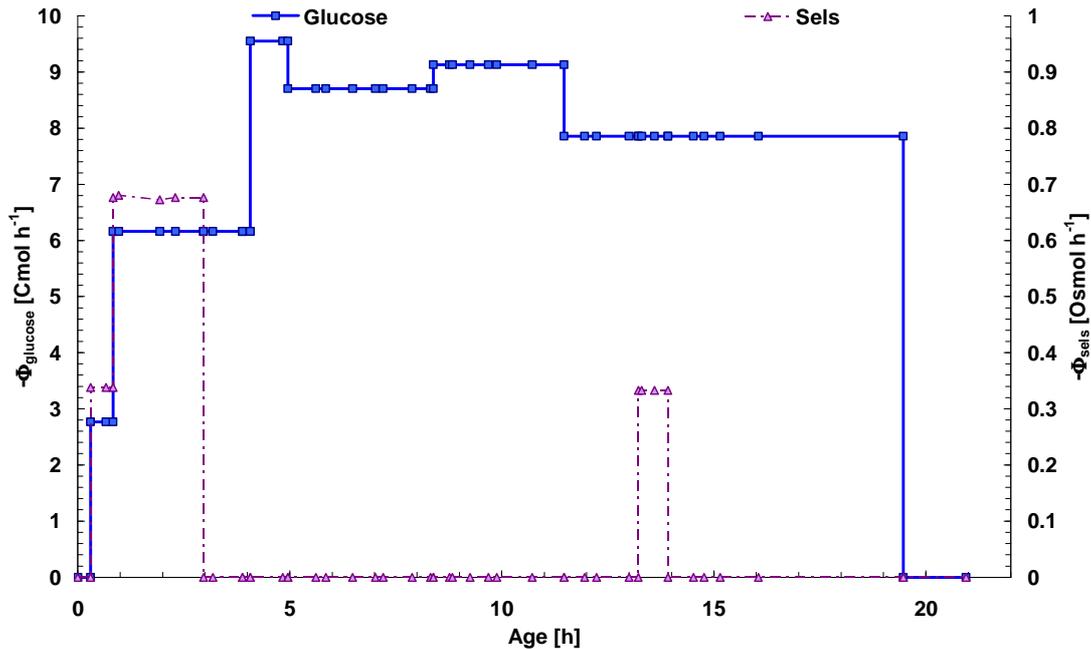


Figure 99 : Flux intrants en fonction du temps (culture I, *E. coli*, partie A : croissance)

Cette première expérimentation a connu plusieurs problèmes techniques. Au cours de l'expérimentation, un précipité s'est développé dans l'alimentation en sels, provoquant un risque de limitation nutritionnelle de la culture. De plus, la culture a développé, à de multiples reprises, de grandes quantités de mousse, indiquant que les microorganismes subissaient un stress. Ce stress a pu être causé par la grande fréquence de séquences de débit de type pyramidal imposées dans la boucle de dérivation, pouvant aller jusqu'à une séquence toutes les 20 min. L'intervalle entre les séquences a été augmenté pour les expérimentations suivantes afin de limiter ce stress. Par ailleurs, un grand nombre de soutirages a été effectué de manière anarchique, induisant la perte de la maîtrise du volume de liquide au sein du bioréacteur.

La plage de biomasse couverte par cette culture est représentée sur la Figure 100.

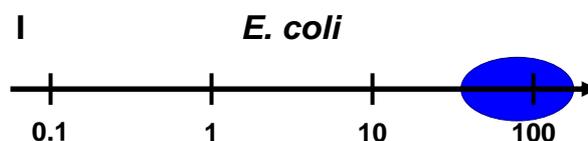


Figure 100 : Première culture d'*E. coli* (culture I, *E. coli*)

A la fin de la croissance, une seconde phase est investiguée avec, pour objectif, le test des conditions nécessaires à une étude de la perte de l'activité biologique. Ce premier essai a pour objectif de suivre la dynamique du moût en deux étapes (voir B et C de la Figure 98). La première étape (partie B sur la Figure 98) est de diminuer l'activité des cellules en abaissant la température de régulation du moût à 10 °C, tout en maintenant le flux de carbone dans le bioréacteur. La température du moût passe alors de 37 à 25°C. La seconde étape (partie C sur la Figure 98) consiste à diminuer fortement les conditions d'agitation (de 1500 à 1000 tr min⁻¹) et d'aération (de 20 à 2 l_n min⁻¹) en arrêtant

l'alimentation en carbone dans le bioréacteur. La diminution de l'activité biologique se poursuit par une chute de la température moyenne du moût. La production de chaleur liée au métabolisme des bactéries devient moins importante, permettant à la régulation de température d'évacuer plus facilement la chaleur du moût, qui permet à son tour un nouvel abaissement de la température du milieu de culture. L'apport en substrat a permis d'appliquer un palier intermédiaire entre la phase de croissance et l'arrêt brusque des conditions de ventilation et d'alimentation en substrat carboné.

2. Culture II

La seconde culture sur *E. coli* (culture II), a été la première effectuée avec le logiciel LoCoPREL. L'environnement informatique et instrumental a été grandement amélioré, la gestion des pompes a été simplifiée, que celles-ci soient les pompes d'alimentation ou la pompe de circulation dans la boucle de dérivation. L'installation a pu être stérilisée à la vapeur durant plusieurs heures, avec un contrôle, depuis le logiciel LoCoPREL, de la température en différentes localisations de l'outil expérimental.

Les tests de débogage du nouveau logiciel ne peuvent pas s'effectuer sans une utilisation dans des conditions réelles. Cette culture a donc subi de multiples arrêts du logiciel qui ont pu induire un stress sur le microorganisme. Ce stress a pu être causé par les modifications de conduite de culture gérées par logiciel et partiellement erronées. Cependant, l'opérateur a tout mis en œuvre pour limiter les conséquences sur la culture.

Parallèlement à ces aspects informatiques, la préparation des sels d'alimentation a été retravaillée de manière à alimenter le bioréacteur sans que ceux-ci précipitent. Le fer et la thiamine d'un côté, le calcium de l'autre, ont été séparés des autres composés contenus dans la solution saline d'alimentation afin d'éviter leur précipitation. Tous les sels d'alimentation ont été mis sous agitation pendant leur alimentation vers le bioréacteur. La solution saline principale contenant la majorité des sels a été gérée par le logiciel LoCoPREL, les deux autres apports (sels complémentaires) ont été gérés par une pompe externe à contrôle manuel.

Cette culture a pour objectif scientifique d'investiguer une gamme de concentration la plus large possible, en gérant le bioréacteur des très faibles concentrations en cellules jusqu'aux plus hautes. Les variables de cette culture II d'*E. coli* sont présentées dans la *Figure 101*, les flux du bioréacteur ont été représentés en *Figure 102*.

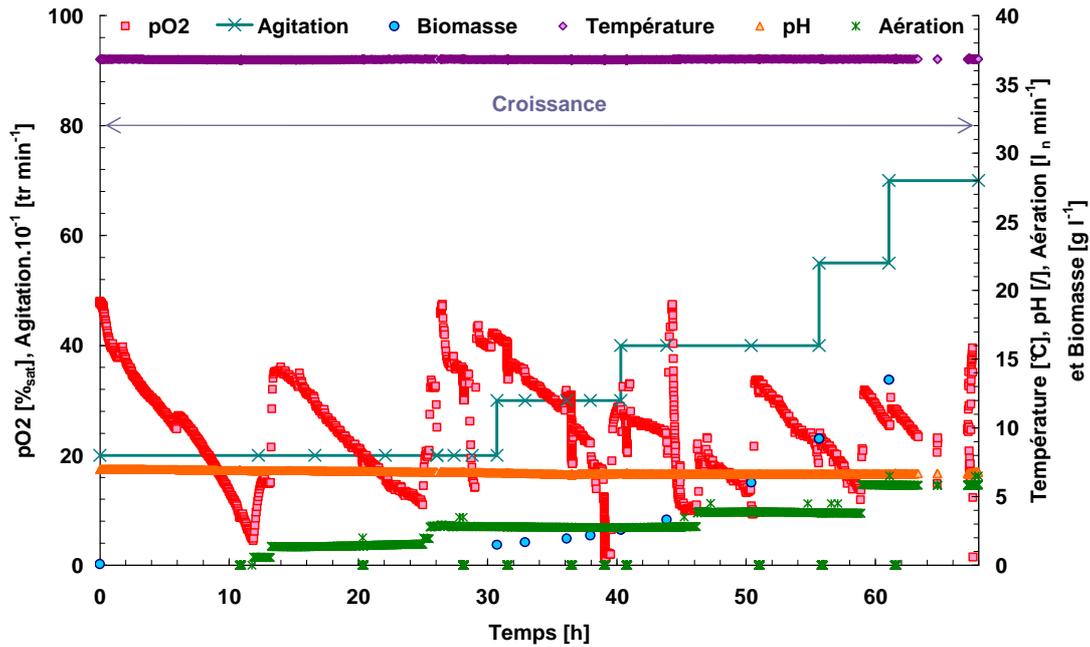


Figure 101 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture II, *E. coli*)

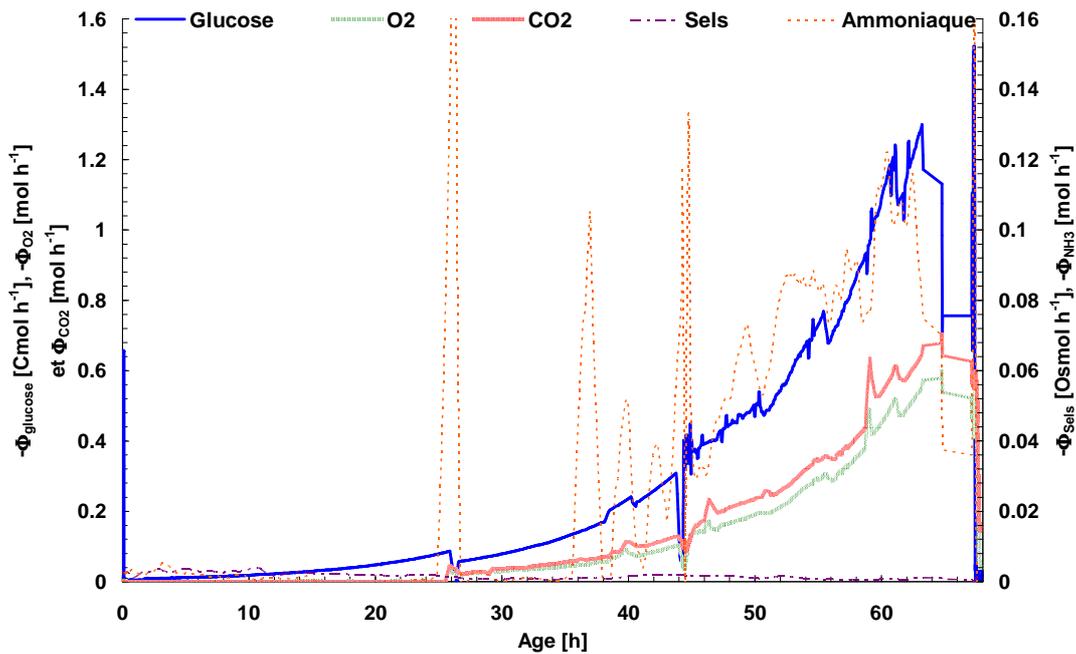


Figure 102 : Flux intrants et extrants en fonction du temps (culture II, *E. coli*)

Au cours de cette culture, des séquences de débit ont été effectuées dans la boucle de dérivation, mais leur fréquence a été diminuée avec des réalisations toutes les deux heures, temps minimum entre chaque prélèvement. Les séquences de débit effectuées suivent un profil en créneaux uniquement descendant. Le mode « créneau » permet de ré-oxygéner le moût entre chaque palier (cf. Chapitre II IV.A.1 Principe des séquences et Chapitre III III.E Gestion de la viscosimétrie).

Le maintien de la croissance a été effectué malgré un grand nombre de réajustements de débit sur le logiciel. Cela est visible par les multiples décrochements de la *Figure 102* sur le flux d'apport en glucose, qui impactent sur les flux de dioxygène consommé et de dioxyde de carbone produit.

Au cours de cette expérimentation, la pompe de mise en circulation de la boucle externe est tombée en panne, stoppant prématurément l'expérimentation pour une concentration voisine de 15 g l^{-1} . Ceci explique l'absence d'une phase de diminution de l'activité biologique.

Cette expérimentation est symbolisée par la *Figure 103*.

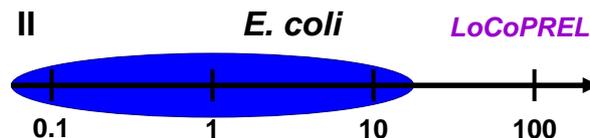


Figure 103 : Première culture d'*E. coli* avec utilisation de LoCoPREL (culture II, *E. coli*)

3. Culture III

Une troisième expérimentation mettant en œuvre *E. coli*, avec l'utilisation du logiciel LoCoPREL, a été effectuée avec une pompe de mise en circulation du moût dans la boucle externe réparée. L'objectif de cette culture III était l'obtention d'une concentration en biomasse finale équivalente à l'expérimentation I (concentration de l'ordre de 100 g l^{-1}), permettant de rassembler les phénomènes observés à faible et forte concentrations en cellules.

Un travail plus approfondi sur le logiciel a permis de diminuer le nombre de bogues en cours d'expérimentation. L'outil expérimental a été stérilisé à la vapeur pendant plusieurs heures, et l'ensemble des étapes de préculture a suivi le descriptif du Chapitre II. Les solutions salines d'alimentation ont été modifiées une dernière fois. Le calcium a été ajouté à la solution saline principale gérée par le logiciel LoCoPREL, le fer et la thiamine sont ajoutés par l'intermédiaire d'une solution saline complémentaire gérée par une pompe externe avec une commande manuelle.

Les variables de la culture III et les flux entrant et sortant du bioréacteur sont représentés respectivement sur la *Figure 104* et la *Figure 105*.

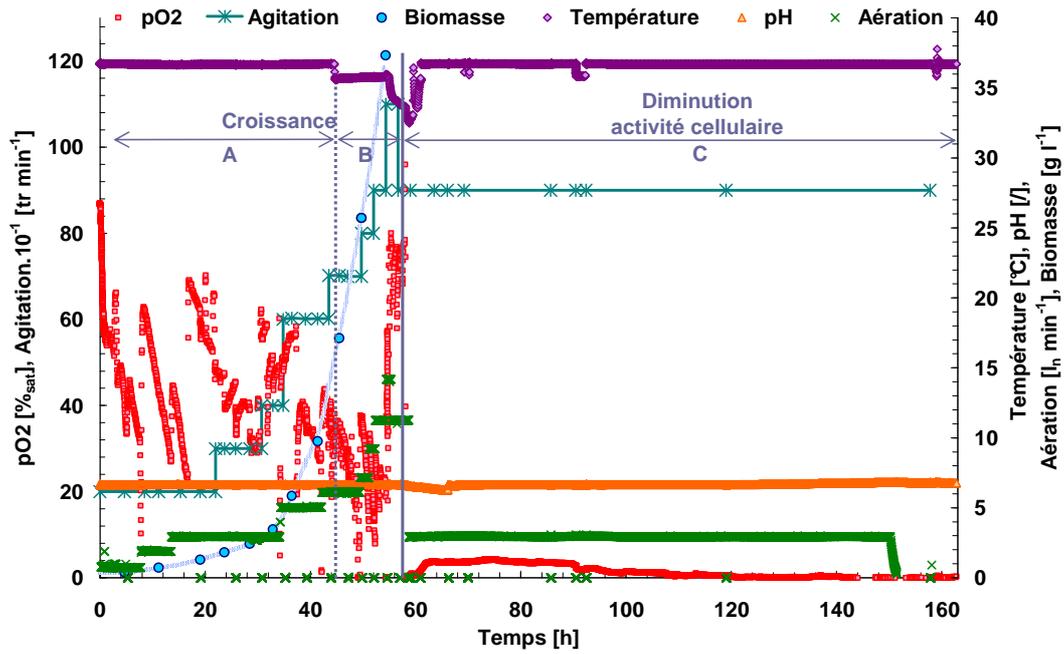


Figure 104 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture III, *E. coli*)

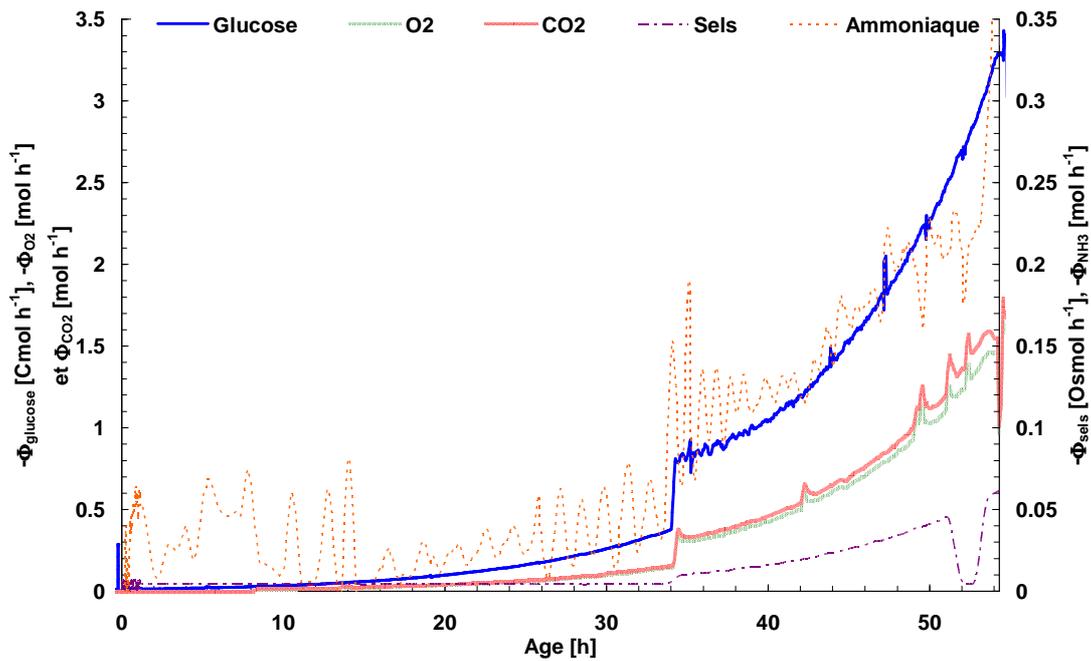


Figure 105 : Flux intrants et extrants en fonction du temps (culture III, *E. coli*)

Comme lors de la culture II, les séquences de débits sont effectuées toutes les deux heures minimum avec un profil en créneaux descendants permettant au moût d'être ré-oxygéné entre chaque palier. L'observation des flux apportés de la culture III par rapport à ceux de la culture II confirme que la culture III a été beaucoup moins perturbée au niveau de la gestion des débits d'alimentation. L'application d'un débit exponentiel devant maintenir un taux de croissance constant du microorganisme se voit de manière beaucoup plus nette sur les flux de carbone (limitation de la croissance par le substrat carboné), de sels et d'ammoniaque apportés, et par conséquent sur la

consommation de dioxygène et la production de dioxyde de carbone (partie A de la *Figure 104*). Cette expérimentation III est symbolisée sur la *Figure 106*.

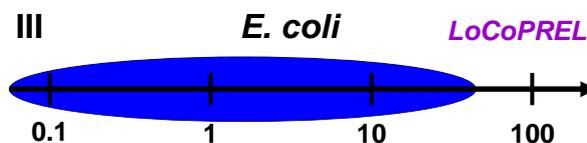


Figure 106 : Seconde culture d'*E. coli* avec utilisation de LoCoPREL (culture III, *E. coli*)

Cependant, cette dernière culture a été également avortée prématurément car la régulation de température a été à plusieurs reprises défectueuse, ne permettant plus une régulation à 37 °C (partie B de la *Figure 104*) nécessaire à une croissance optimale. Lorsque la confirmation de la perturbation de la croissance a été confirmée par la mesure d'absorbance (permettant un suivi de la concentration en cellule), le moût a alors été placé dans des conditions de diminution de l'activité biologique avec une aération au diazote pendant 45 min de manière à retirer rapidement toute présence de dioxygène pouvant maintenir une activité biologique. Cette étape s'est accompagnée d'un arrêt de l'ensemble des alimentations (substrats, sels). Le débit d'aération a ensuite été fixé à $3 \text{ l}_n \text{ min}^{-1}$ (pour des raisons techniques d'approvisionnement en diazote) jusqu'à la fin du suivi du moût afin de suivre la dynamique en ligne des variables physiques au cours du temps.

B. Expérimentations sur eucaryote

Les deux premières cultures d'*Y. lipolytica* (culture IV et V) ont été obtenues avec le système d'acquisition développé sous LabView®. La stérilisation de l'installation s'est effectuée par circulation d'éthanol dans l'installation pendant environ deux heures avant un premier rinçage avec le milieu minimum de la culture. L'installation est ensuite remplie du milieu minimum. La préparation et l'inoculation du bioréacteur ont été effectuées dans des conditions de stérilité non systématiquement maîtrisées. Nous avons toutefois obtenu une reprise de la croissance de la levure, sans développement de contaminants.

1. Culture IV

La quatrième expérimentation (culture IV) résulte d'une inoculation à haute concentration en cellules. L'objectif est de tester l'outil expérimental sur la faisabilité de la poursuite d'une culture de levure jusqu'à de hautes concentrations en cellules sans développement d'un contaminant.

Cette culture s'est effectuée en démarrant à une concentration dans le bioréacteur à 63 g l^{-1} jusqu'à une concentration supérieure à 100 g l^{-1} . Les paramètres de suivi du bioréacteur sont présentés en *Figure 107*, les flux entrants sont représentés en *Figure 108*.

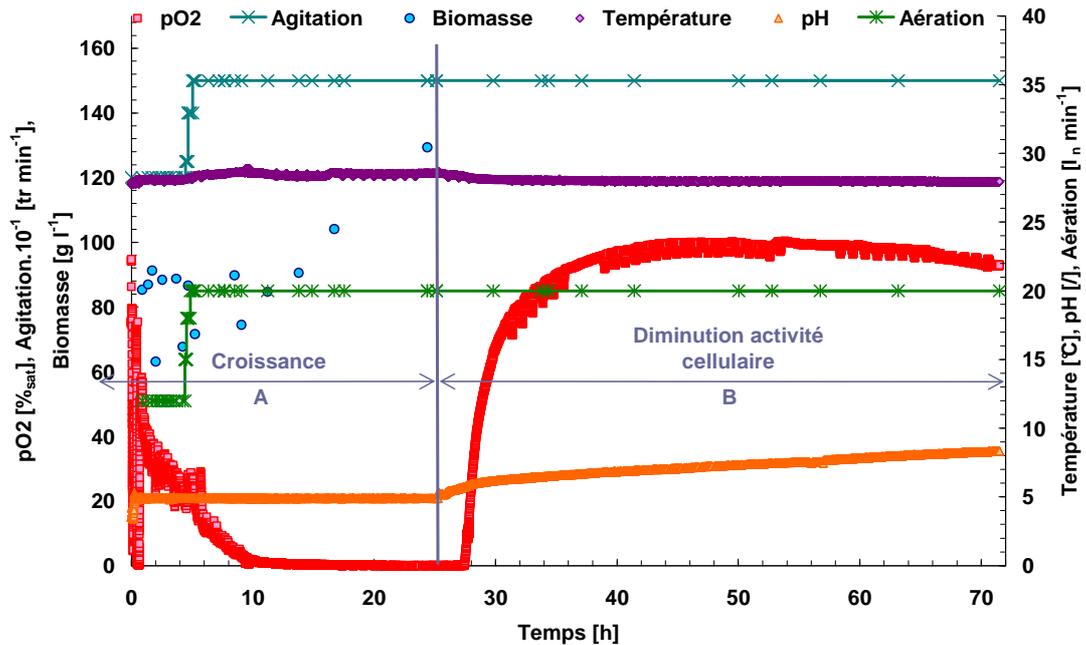


Figure 107 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture IV, *Y. lipolytica*)

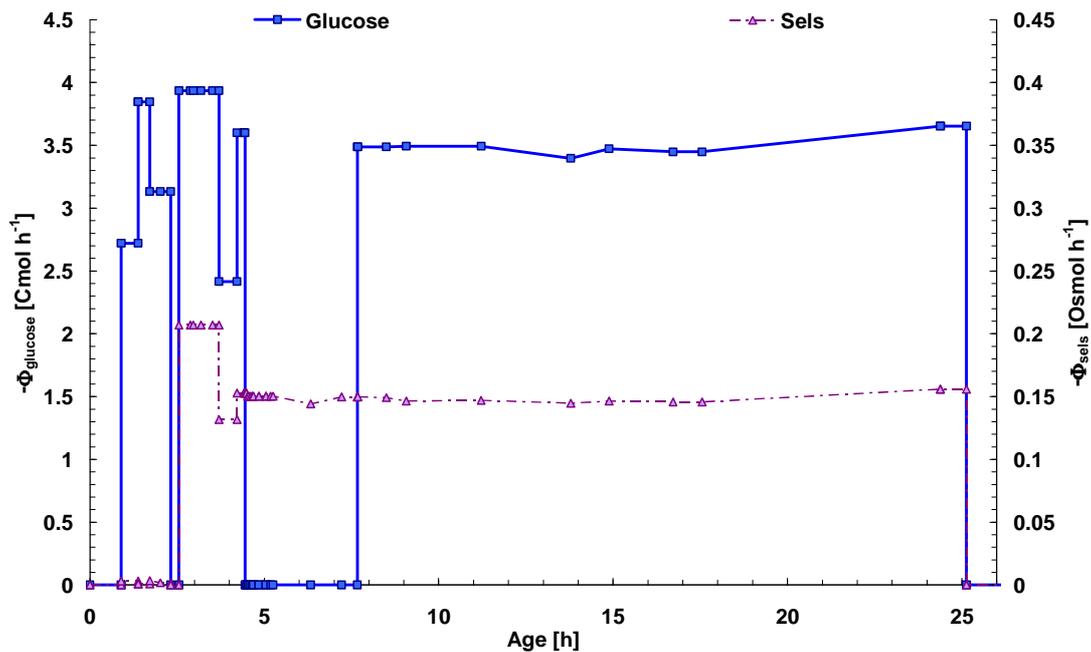


Figure 108 : Flux intrants en fonction du temps (culture IV, *Y. lipolytica*, partie A : croissance)

La culture s'est poursuivie sans développement de contaminant dans une gamme de hautes concentrations en cellules. Le flux de glucose a été modulé, puis arrêté après 5 à 7 h de culture car du glucose s'était accumulé dans le milieu jusqu'à une concentration résiduelle de l'ordre de 20 g l⁻¹. Malgré une limitation en transfert de dioxygène dans le bioréacteur, la levure a consommé et augmenté sa concentration en biomasse. Dès que la concentration en glucose s'est épuisée dans le milieu, un débit a à nouveau été fixé afin de poursuivre la croissance.

Cette expérimentation est symbolisée sur la *Figure 109*.

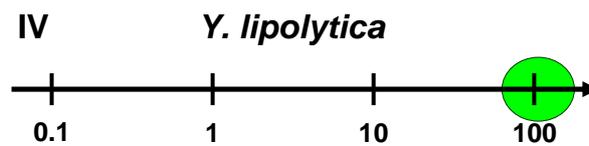


Figure 109 : Première culture d'*Y. lipolytica* (culture IV, *Y. lipolytica*)

L'expérimentation s'est poursuivie avec une phase de diminution de l'activité biologique effectuée par un arrêt des apports en substrats (carboné et salins) pour des conditions d'agitation et d'aération constantes respectivement à 1500 tr min^{-1} et de $20 \text{ l}_n \text{ min}^{-1}$ lorsque du glucose résiduel a, de nouveau, été détecté. Au dernier prélèvement avant l'étape de diminution de l'activité biologique, la concentration en glucose résiduel était de 5 g l^{-1} . Cette diminution d'activité s'est manifestée par une augmentation du pH du milieu (pas de régulation avec un acide au moment de cette expérimentation), suivie d'une augmentation de la concentration en dioxygène dissous avec un décalage temporel par rapport à l'augmentation du pH. L'augmentation de la concentration en dioxygène dissous s'effectue plus tard que celle du pH car le dioxygène transféré à la cellule (même si celui-ci est limitant pour le moût) est encore utilisé pour une consommation du glucose résiduel dans la phase liquide.

2. Culture V

La cinquième expérimentation est effectuée, comme la culture IV, à partir d'une culture antérieure à haute concentration en levures. L'objectif était d'investiguer une gamme de concentrations plus faibles pour arriver aux mêmes concentrations que la culture IV (concentration supérieure à 100 g l^{-1}) sans limitation en transfert de dioxygène dans le bioréacteur. Pour cela, le moût initial a été fortement dilué dans un milieu minimum adapté à *Y. lipolytica* pour une production de biomasse. A nouveau, le risque de contamination reste important au vu des conditions de manipulation. Néanmoins, malgré une forte dilution des cellules, leur croissance s'est poursuivie sans développement de contaminant, ce qui a été contrôlé à chaque prise d'échantillon par des observations microscopiques.

Les variables en ligne et les flux du bioréacteur de la culture V sont présentés respectivement en Figure 110 et Figure 111.

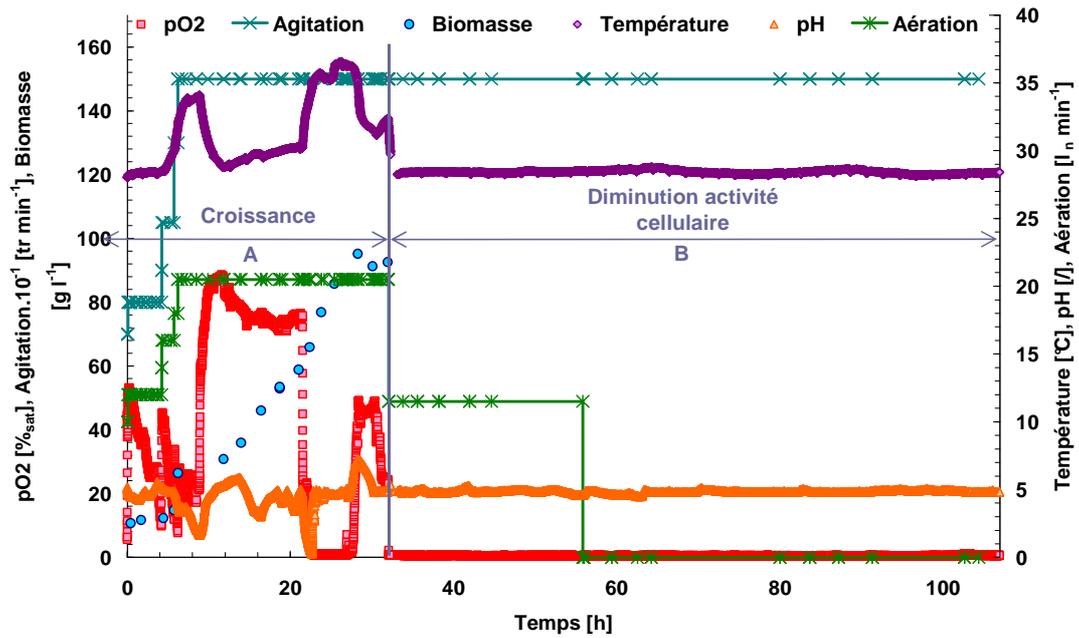


Figure 110 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture V, *Y. lipolytica*)

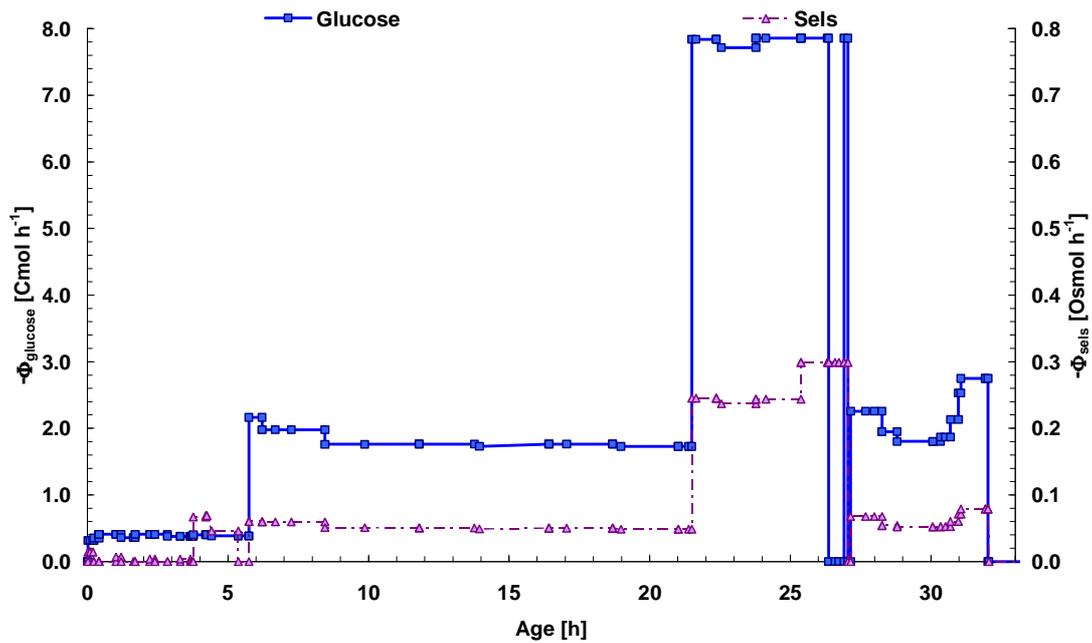


Figure 111 : Flux intrants en fonction du temps (culture V, *Y. lipolytica*, partie A : croissance)

Au cours de cette culture, deux problèmes de régulations du fermenteur sont apparus. La régulation pH, ainsi que le système d'apport de la solution correctrice du pH, se sont retrouvés mal réglés lors de la conduite de culture. L'apport en base dans le moût a été mal géré, impliquant de grandes fluctuations de pH dans le milieu de culture (voir Figure 110). De plus, à cause des fortes chaleurs au cours de l'expérimentation, la régulation de température n'a pas pu réguler la température du moût. La température de la culture est alors montée jusqu'à 34 et 36 °C au lieu de rester constante à 28 °C. Les fortes chaleurs au moment de l'expérimentation ont fait augmenter la température de l'eau du

réseau servant au circuit de refroidissement du bioréacteur. La température de l'eau du réseau, servant de liquide refroidissement, était proche, voir supérieure, à la température de régulation de la culture. Le refroidissement n'était donc pas possible. Pour ces raisons, les données issues de cette expérimentation doivent donc être analysées en intégrant ces problèmes. Néanmoins, la culture s'est poursuivie jusqu'à de fortes concentrations en atteignant le seuil des 100 g l^{-1} de biomasse. Cette expérimentation est symbolisée sur la *Figure 112*.

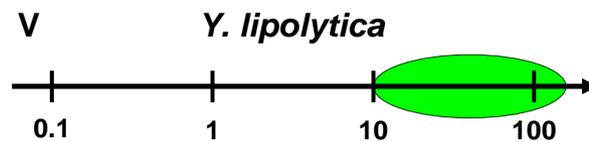


Figure 112 : Seconde culture d'*Y. lipolytica* (culture V, *Y. lipolytica*)

Lorsque la fin de la croissance est détectée par la mesure d'absorbance, les alimentations en substrat sont arrêtées, le moût est placé sous une aération de $11.5 \text{ l}_n \text{ min}^{-1}$ au diazote pendant environ 24 h avant de passer à une aération nulle (étape B de la *Figure 110*). Le passage de l'aération au diazote permet de stopper tout métabolisme aérobie, tout en conservant une phase gazeuse dans le moût. L'arrêt de l'aération avec le diazote permet d'étudier la contribution de la phase gaz sur un moût avec une activité biologique minimum.

3. Culture VI

La sixième et ultime expérimentation avec *Y. lipolytica* a été effectuée avec le logiciel LoCoPREL. L'installation a été stérilisée à la vapeur fluante pendant 8 à 10 h. Les stades de préculture et d'inoculation ont suivi les étapes décrites dans le *Chapitre II*. L'objectif de la culture était d'atteindre des concentrations en biomasse finales équivalentes à celles de la culture IV de manière à investiguer l'ensemble de la gamme de concentrations en biomasse.

Les variables de suivi de la culture sont représentées en *Figure 113*. Les flux entrants et sortants du bioréacteur sont décrits en *Figure 114*.

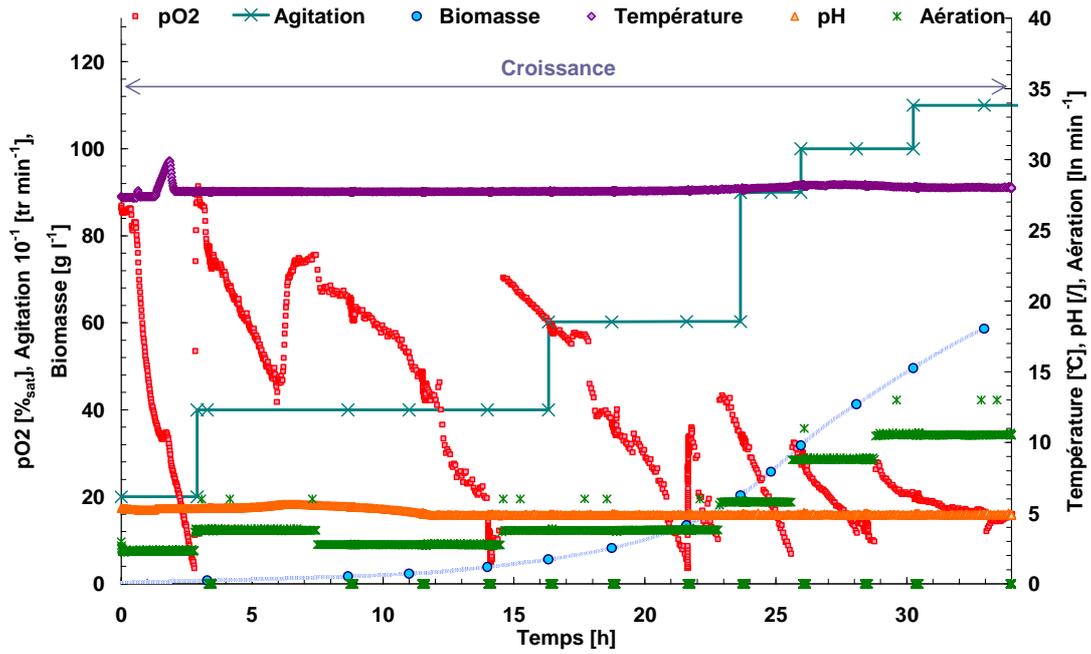


Figure 113 : Evolution des variables au sein du bioréacteur (culture VI, *Y. lipolytica*)

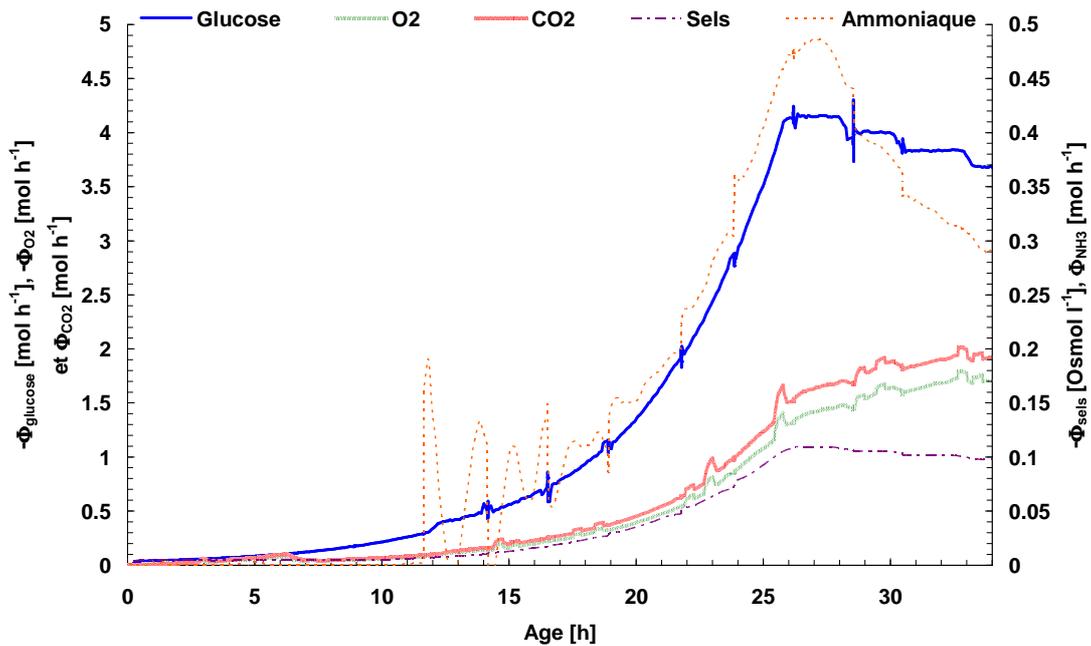


Figure 114 : Flux intrants et extrants en fonction du temps (culture VI, *Y. lipolytica*, partie A : croissance)

L'apport en glucose s'est effectué par un flux exponentiel devant permettre le maintien d'un taux de croissance constant. Ce débit exponentiel est maintenu jusqu'à atteindre un débit volumique maximal. Le flux a ensuite été maintenu constant afin de poursuivre la croissance avec une diminution des taux de croissance de manière à ne pas être limité par la capacité de transfert en dioxygène du bioréacteur. La culture a ensuite été précipitamment stoppée du fait d'un moussage trop important qui entraîna le colmatage du filtre de sortie gaz du bioréacteur, impossible à changer en cours

d'expérimentation à cause de la configuration du bioréacteur. Lorsque ce filtre fut bouché, le bioréacteur est aussitôt monté en pression (de l'ordre de 2 bars), forçant l'opérateur à utiliser la seule sortie possible disponible pour éviter l'explosion du bioréacteur : la vanne de prise d'échantillons. Le bioréacteur a été totalement purgé prématurément, avortant l'expérimentation avant son terme prévu pour des concentrations en biomasse de l'ordre de 100 g l^{-1} .

Cette expérimentation est symbolisée par la *Figure 115*.

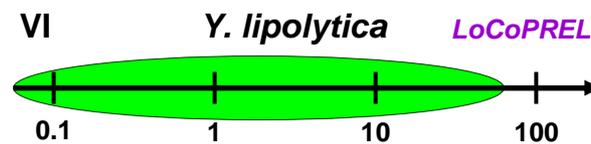


Figure 115 : Culture d'*Y. lipolytica* avec LoCoPREL (culture VI, *Y. lipolytica*)

C. Données expérimentales et exploitation

Les expérimentations conduites relèvent d'une approche à l'intersection entre les sciences pour l'ingénieur et le génie microbiologique. A cet égard de nombreuses exploitations et interprétations peuvent être envisagées et/ou réalisées. Dans le *Tableau 39*, nous nous efforçons de dresser de manière exhaustive et objective, les différentes analyses conduites et/ou potentielles en adéquation avec la maîtrise de chaque culture.

Microorganisme		<i>E. coli</i>			<i>Y. lipolytica</i>		
		I	II	III	IV	V	VI
Culture							
Variables et analyses au cours des expérimentations	Pertes de charge sur la conduite D1	∅	⊕	⊕	∅	⊕	⊕
	Pertes de charge sur la conduite D2	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Régulation Température	⊕	⊕	⊕	⊕	∅	⊕
	Régulation pH	+	⊕	⊕	⊕	∅	⊕
	Analyse des gaz	∅	⊕	⊕	∅	+	⊕
	Biomasse X [g l ⁻¹]	∅	⊕	⊕	∅	⊕	⊕
	Glucose résiduel [g l ⁻¹]	∅	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
Caractérisation physique, physicochimique et chimique hors ligne	Rhéométrie	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Microscopie optique	∅	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Granulométrie laser	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕
	Morphométrie	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕
	Zétamétrie	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕
	Teneur en cendres	∅	⊕	⊕	∅	∅	⊕
	Densimétrie	∅	⊕	⊕	∅	∅	⊕
	Pression osmotique	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕
	HPLC	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕
	ICP-MS	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕
	Composition élémentaire de X	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕
Teneur en protéines	∅	∅	⊕	∅	∅	⊕	
Résultats biotiques macrocinétiques	Volumes réels	∅	+	⊕	∅	∅	⊕
	Vitesses instantanées	∅	⊕	⊕	∅	∅	⊕
	Vitesse spécifiques	∅	+	⊕	∅	+	⊕
	Coefficient respiratoire	∅	⊕	⊕	∅	⊕	⊕
	Bilan carbone / généralisé global	∅	+	⊕	+	+	⊕
	Bilan carbone / généralisé instantané	∅	+	+	+	+	+
	Coefficient de transfert de dioxygène	∅	+	+	∅	+	+

Tableau 39 : Inventaire des analyses et exploitations potentielles ou effectuées en fonction des cultures (∅ : non-réalisée/non maîtrisée, + : réalisé/calculable et ⊕ : traitée/exploitée)

L'ensemble des approches effectuées pour chaque culture, pour un microorganisme fixé, bénéficie de l'expertise et des techniques analytiques développées au cours des précédentes cultures. Ainsi, les dernières cultures d'*E. coli* (culture III) et d'*Y. lipolytica* (culture VI) ont pu bénéficier d'une analyse plus poussée, tant sur la caractérisation chimique et physico-chimique, que sur l'analyse macrocinétique des résultats. L'approche physico-chimique par la batterie d'analyses hors ligne permet de découpler la caractérisation du milieu de culture en fonction de ses propriétés physiques (viscosité, masse volumique, pression osmotique, ...), des phases considérées (solide, liquide, gaz) ou de l'approche choisie par le traitement mathématiques des données.

De manière à pouvoir tracer les variables en ligne en fonction de la concentration en biomasse, les valeurs estimées ou mesurées par gravimétrie de l'ensemble des cultures sont lissées avant d'être interpolées. L'ensemble des concentrations en biomasse en fonction de l'âge des différentes expérimentations est représenté sur la *Figure 116* ci-dessous.

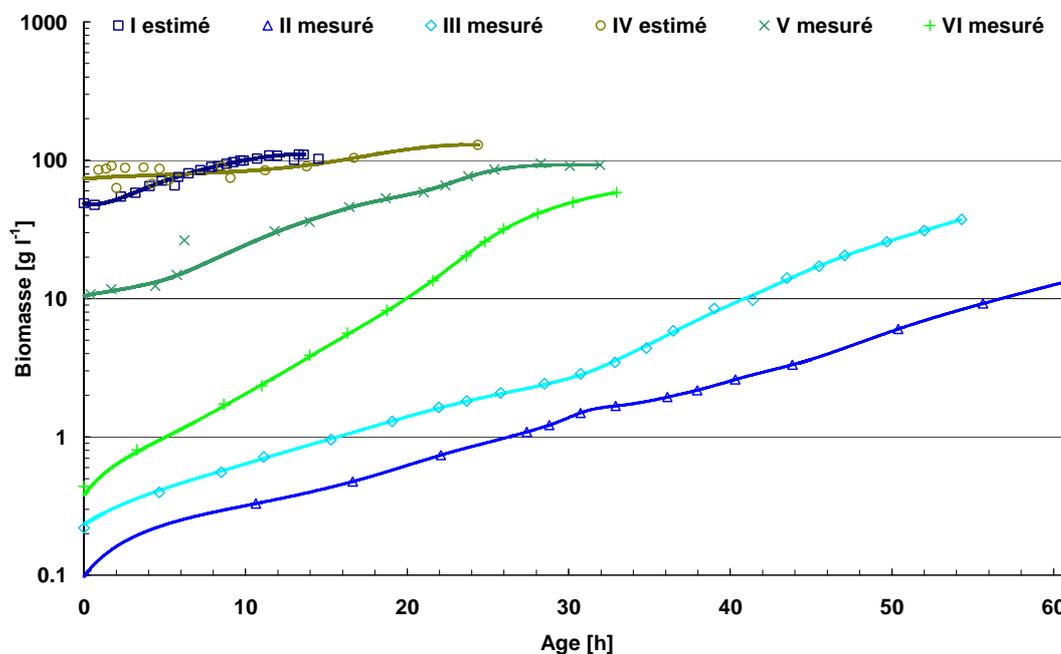


Figure 116 : Plages de concentrations investiguées en fonction du temps (cultures I, II, III, *E. coli* - IV, V, VI, *Y. lipolytica*)

Les variables liées à la bioréaction subissent dans un premier temps un lissage polynomial (polynôme de degré 3 ou 4) de manière à avoir accès aux vitesses de réaction. Les données sont ensuite réconciliées, afin de vérifier le bilan matière du bioprocédé et la cohérence des mesures effectuées entre elles (voir *Chapitre II IV.C Données microbiologiques*), permettant ainsi d'avoir accès aux vitesses de réaction. La vérification du bilan carbone est représentée pour les cultures III d'*E. coli* et VI d'*Y. lipolytica* sur la *Figure 117* et la *Figure 118*.

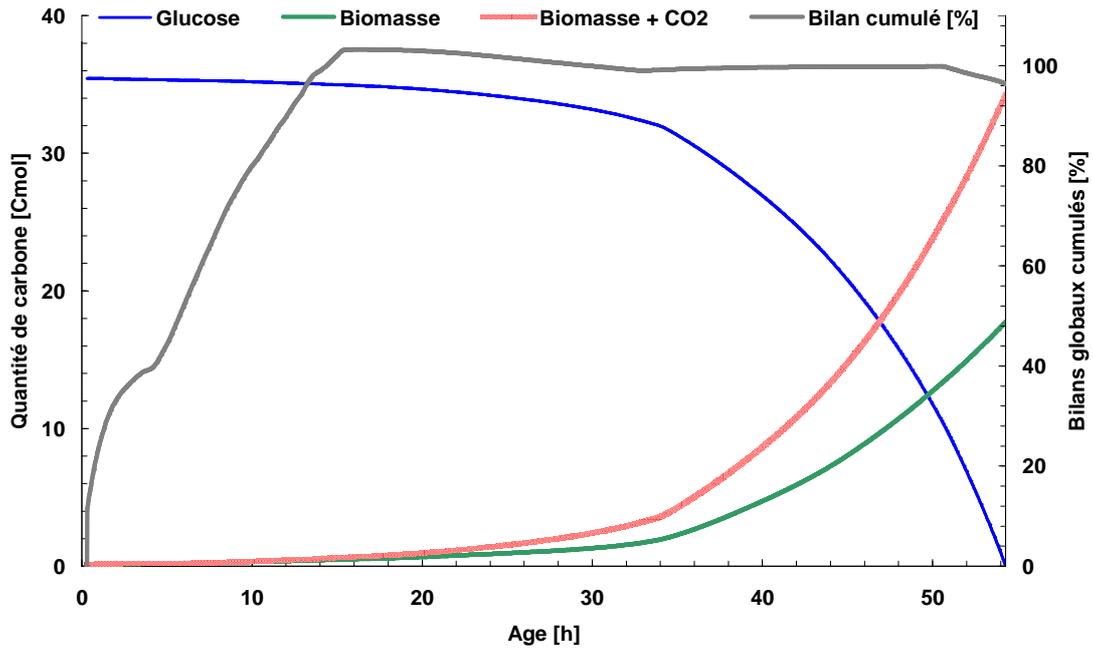


Figure 117 : Vérification du bilan carbone en fonction du temps (culture III, *E. coli*)

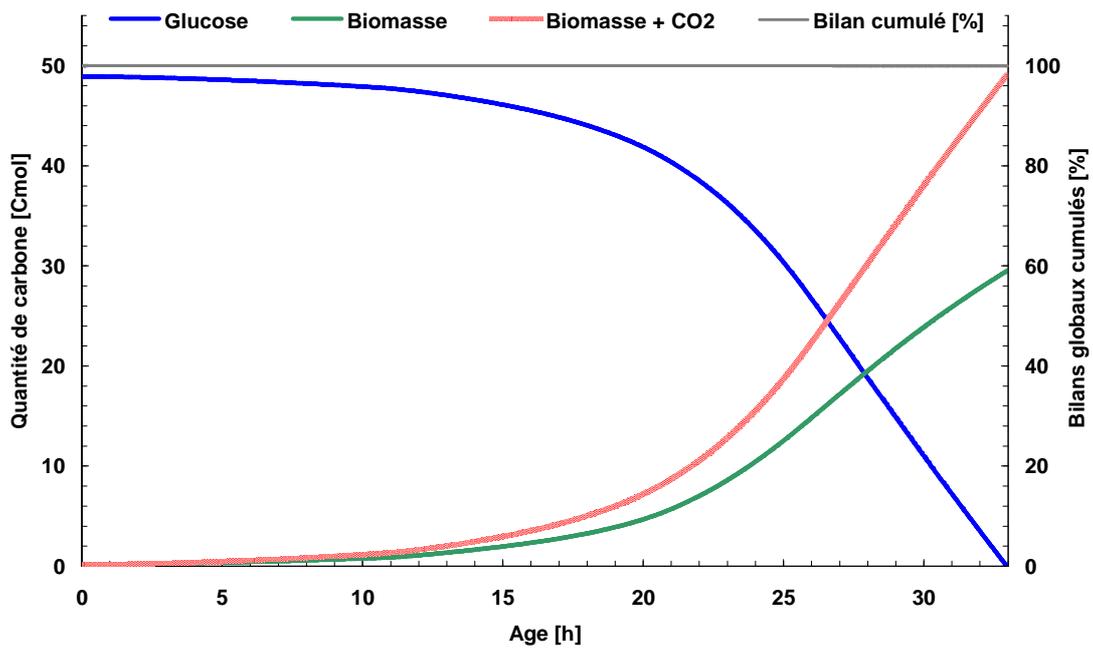


Figure 118 : Vérification du bilan carbone en fonction du temps (culture VI, *Y. lipolytica*)

Pour la culture III d'*E. coli*, on remarque que le bilan carbone ne boucle pas correctement sur les 20 premières heures (voir Figure 117). Le traitement des résultats pour cette culture nécessite un travail plus approfondi pour améliorer les bilans obtenus. Néanmoins, les débuts de culture restent toujours difficiles à boucler au vu de la précision des mesures au début des expérimentations. A la fin de la culture III, le bilan carbone global est vérifié à 96.35 %. Cependant, la vérification des bilans, y compris pour le début des cultures, peut être effectué correctement, comme cela est représenté sur la

Figure 118 où ceux-ci restent, dès le début de la culture centrés autour de 100 %. A la fin de la culture VI, le bilan carbone global est vérifié à 99.94 %.

L'ensemble des cultures a permis de pouvoir investiguer, sur plusieurs expérimentations, des plages de concentrations allant de 0.1 à plus de 100 g l⁻¹ pour la bactérie *E. coli* et la levure *Y. lipolytica*. Les taux de croissance moyens varient de 0.023 h⁻¹, pour la culture IV, à 0.160 h⁻¹, pour la culture VI. Ces vitesses de croissance ont été obtenues car les conduites ont été effectuées de manière à ce que ces deux microorganismes puissent avoir des taux de croissance équivalents. Dans un premier temps, nous allons considérer le taux de croissance comme l'indicateur de l'activité biologique. Ainsi, lors des phases d'arrêt de l'activité biologique, les premières cultures ont permis d'investiguer l'impact de certains facteurs physiques tels que la température et la consommation de substrat (pour la culture I avec *E. coli*), l'aération (pour la culture IV avec *Y. lipolytica*). Les dernières phases des deux dernières expérimentations avaient pour objectif un suivi de la diminution de l'activité biologique dans des conditions équivalentes pour *E. coli* et *Y. lipolytica* lors des cultures III et VI. Mais le colmatage du filtre de sortie des gaz du bioréacteur n'a pas permis l'obtention du suivi de cette étape pour la culture VI.

Dans le cadre de ces travaux de doctorat, nous détaillerons les cultures III et VI que nous prendrons en référence, et dont nous implémenterons ou modèrerons les observations en fonction des autres cultures. Dans ce travail, seule la partie production de biomasse de chaque culture sera détaillée et discutée.

II. GRANDEURS PHYSIQUES EN LIGNE A DEBIT CONSTANT

Cette partie se focalise sur les résultats obtenus pour le débit de circulation nominal dans la boucle de dérivation. Sous conditions (quasi) constantes, un suivi instantané des paramètres physiques mesurés sur la boucle de dérivation a été effectué. Pour toutes les cultures, ce débit volumique est maintenu constant et le plus élevé possible pour maintenir un temps de séjour faible du moût dans la boucle de dérivation visant à satisfaire les vitesses de consommation du dioxygène, du substrat carboné et des nutriments. Nous analyserons et discuterons successivement des mesures en ligne de masse volumique, de conductivité électrique et des pertes de charge linéiques pour les phases d'inoculation et de culture.

A. Densimétrie en ligne

1. Suivi de l'inoculation

Pendant la croissance aérobie des microorganismes, les conditions d'aération, d'agitation, d'alimentation (flux intrants) et de régulation (pH, température) doivent satisfaire les besoins nutritionnels en évitant toute limitation (transferts, nutriment) ou carence (substrat, dioxygène, vitamines...). Le coefficient de transfert de dioxygène ($k_L a$), mais également la fraction gaz générée par l'activité biologique, peuvent ainsi être suivis et analysés.

Dans un premier temps, il est possible d'observer, sur le suivi de masse volumique (voir Figure 119), un phénomène identique dans les cultures d'*E. coli* et de *Y. lipolytica* lors de l'inoculation.

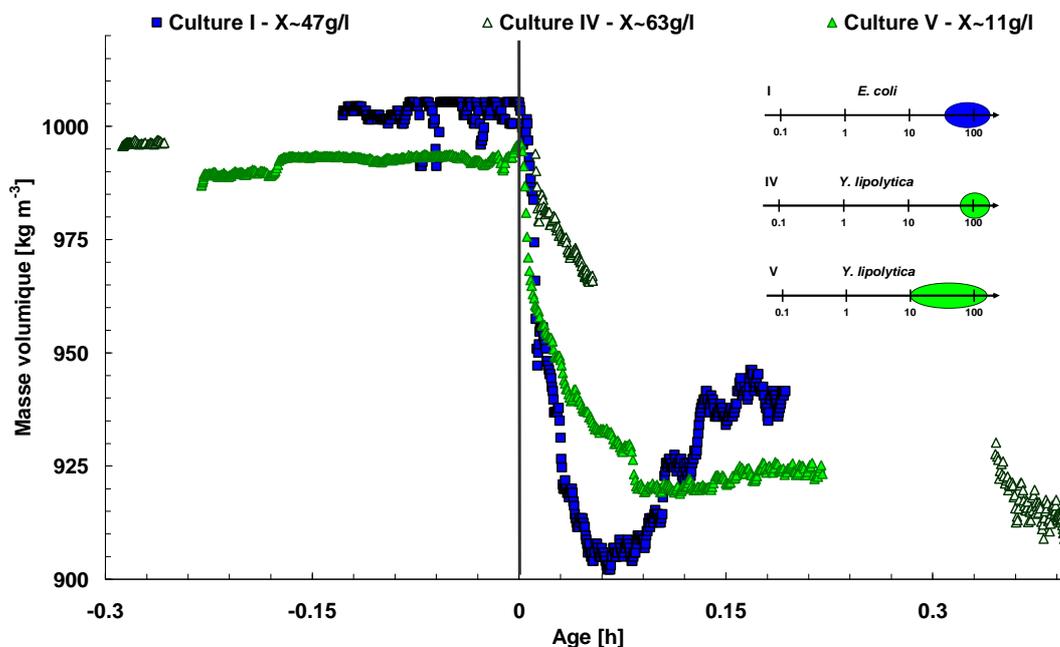


Figure 119 : Evolution de la masse volumique en ligne lors de l'inoculation du bioréacteur par des « précultures » à haute concentration en cellules (culture I, *E. coli* - culture IV, V, *Y. lipolytica*)

L'inoculation des « précultures à haute concentration en cellules » dans le bioréacteur s'effectue par un ajout de moût très concentré en plus du milieu minimum initialement présent dans le bioréacteur. Le milieu minimum est transféré dans le bioréacteur et mis à la température de la culture avant l'inoculation. Au cours du transfert, l'aération dans le bioréacteur est nulle et l'agitation est faible (200 tr min^{-1}) tant que le transfert de la préculture n'est pas terminé, celui-ci pouvant prendre quelques minutes. La vitesse de circulation dans la boucle de dérivation est au débit maximal ($\sim 250 \text{ l h}^{-1}$) de manière à appliquer, dès le début, les conditions de circulation dans la boucle de dérivation minimisant le temps de séjour des cellules dans la boucle externe.

A l'inoculation ($t = 0 \text{ h}$), on observe, pour les deux microorganismes, une chute de la masse volumique en ligne. Les microorganismes ont donc un impact significatif sur la masse volumique du moût, et interviennent sur l'entraînement et la génération d'une phase gaz. Nous verrons par la suite que cet impact est particulièrement visible et différent lorsque l'on observe l'évolution de la masse volumique sur toute la durée d'une culture pour différentes expérimentations.

L'entraînement de la phase gaz ne semble pas induit par les conditions d'agitation et d'aération, ni par la concentration en biomasse finale dans le bioréacteur. Par contre, aucune diminution de masse volumique en ligne n'est visible pour les cultures II, III et VI (non représentées). Pourtant, les inoculations de ces cultures ont été effectuées avec des précultures aboutissant à une concentration initiale dans le bioréacteur de l'ordre de 0.1 à 0.2 g l^{-1} (voir *Tableau 37*) pour une durée d'inoculation équivalente. Une concentration de cellule importante dans le bioréacteur semble être la cause de l'incorporation d'une phase gazeuse dans le moût mesurable dans la boucle de dérivation. La stabilisation des mesures effectuées est liée à la durée de l'inoculation et au temps de mélange du moût de précultures et du milieu minimum présent initialement dans le bioréacteur.

2. Evolution en phase de croissance cellulaire

L'évolution de la masse volumique en ligne pour les cultures III et VI est représentée sur la *Figure 120* avec l'évolution de la ventilation appliquée dans le bioréacteur. Les cultures III et VI sont représentées en fonction de la concentration en biomasse allant de quelques dixièmes à quelques dizaines de $[\text{g l}^{-1}]$.

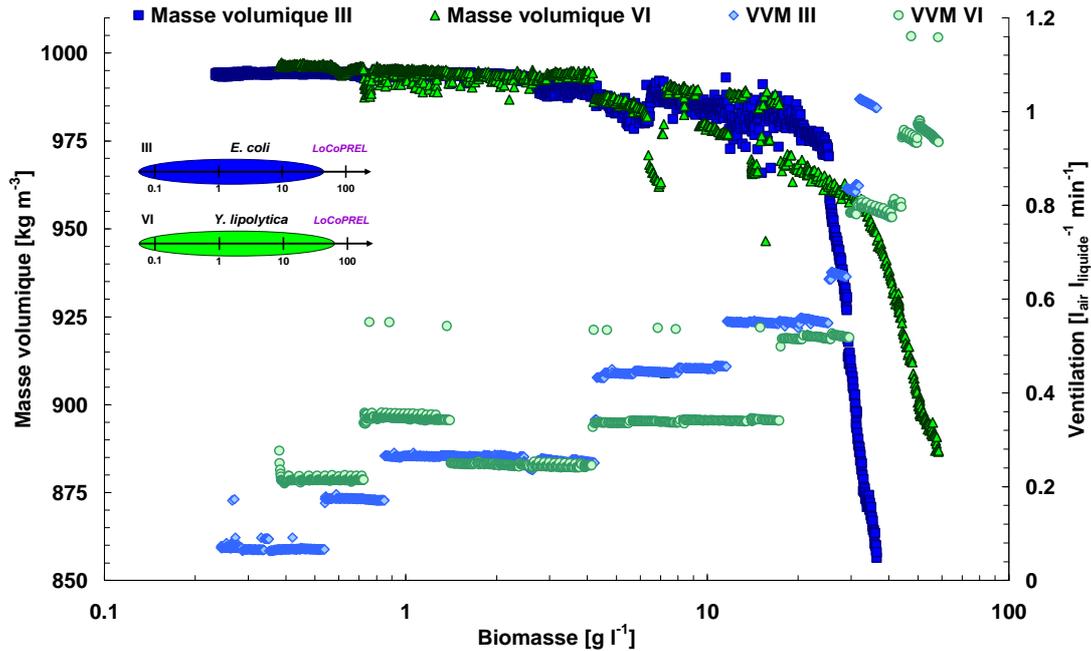


Figure 120 : Suivi de la masse volumique en ligne et de la ventilation en fonction de la concentration en biomasse lissée interpolée (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

Pour les concentrations inférieures ou de l'ordre de quelques $[g l^{-1}]$, la valeur de la masse volumique en ligne reste constante, proche de celle du milieu minimum. Pour les faibles concentrations en biomasse, des sursauts sur les valeurs de masse volumique. Même si les valeurs restent proches de la masse volumique du milieu minimum, le changement de ventilation explique les sursauts observés, et semble ajouter un bruit supplémentaire sur les mesures moyennes *in situ* à partir d'une concentration légèrement inférieure à $1 g l^{-1}$. Ceci s'explique par un entrainement croissant d'une phase gaz (même minime) dans la boucle de dérivation avec un accroissement soit de l'agitation, soit de l'aération.

A partir d'une concentration de $4 g l^{-1}$, les deux cultures montrent un premier décrochement où la tendance des valeurs mesurées semble commencer à diminuer, malgré un bruit important sur les mesures en ligne. Cette zone est clairement identifiable entre 4 et environ $20 g l^{-1}$ pour les deux cultures. Une quantification du bruit pour chaque mesure a été effectuée par une estimation du coefficient de variation en chaque point pour toute la plage de concentrations en biomasse considérée pour les cultures III et VI. Cependant, on n'observe pas d'évolution car sur l'ensemble des mesures répétées, le coefficient de variation estimé ne dépasse pas 0.5 %. Le bruit observé graphiquement est donc à considérer pour de larges gammes de concentrations, au-delà de la répétition ponctuelle de la mesure.

Enfin, une troisième zone peut être identifiée où l'on observe une rapide diminution de la masse volumique. Dans le cas de la culture III d'*E. coli*, la transition d'une évolution lente à rapide de la masse volumique en ligne en fonction de la concentration en biomasse est représentée par une rupture pour une concentration de $25 g l^{-1}$. Pour la culture VI d'*Y. lipolytica*, la rupture apparaît de manière moins tranchée pour une concentration de $33 g l^{-1}$. Pour les deux cultures, les changements de ventilation ne semblent pas impacter cette diminution soudaine et rapide en fonction de la

biomasse. Il est néanmoins normal que la ventilation suive la diminution de la masse volumique en ligne car les conditions d'agitation et d'aération du bioréacteur doivent répondre à la demande croissante en transfert de dioxygène par les microorganismes. On peut tout de même noter que le début de la troisième zone commence systématiquement, pour les deux cultures, lors d'une ventilation supérieure à $0.6 \text{ l l}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Afin de définir si le seuil est lié à une concentration en biomasse ou à un niveau de ventilation, il faudrait refaire chacune des expérimentations en appliquant, avant les concentrations seuils identifiées, une ventilation supérieure à $0.6 \text{ l l}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Si la ventilation est le paramètre expliquant la chute de masse volumique, la réponse sur la mesure en ligne de masse volumique sera immédiate. Dans le cas contraire, la chute se produira lorsque la concentration seuil dans le bioréacteur sera atteinte. Cependant, si le seuil en concentration devient alors plus faible, l'augmentation de la phase gazeuse dans le moût sera donc à considérer en fonction du couple concentration en biomasse et niveau de ventilation du bioréacteur. Cette dernière hypothèse semble la plus probable.

L'entraînement d'une phase gazeuse peut également s'effectuer en lien avec les conditions d'agitation dans le bioréacteur. La masse volumique en ligne et l'agitation appliquée sont présentées, en fonction de la concentration en biomasse, en *Figure 121*.

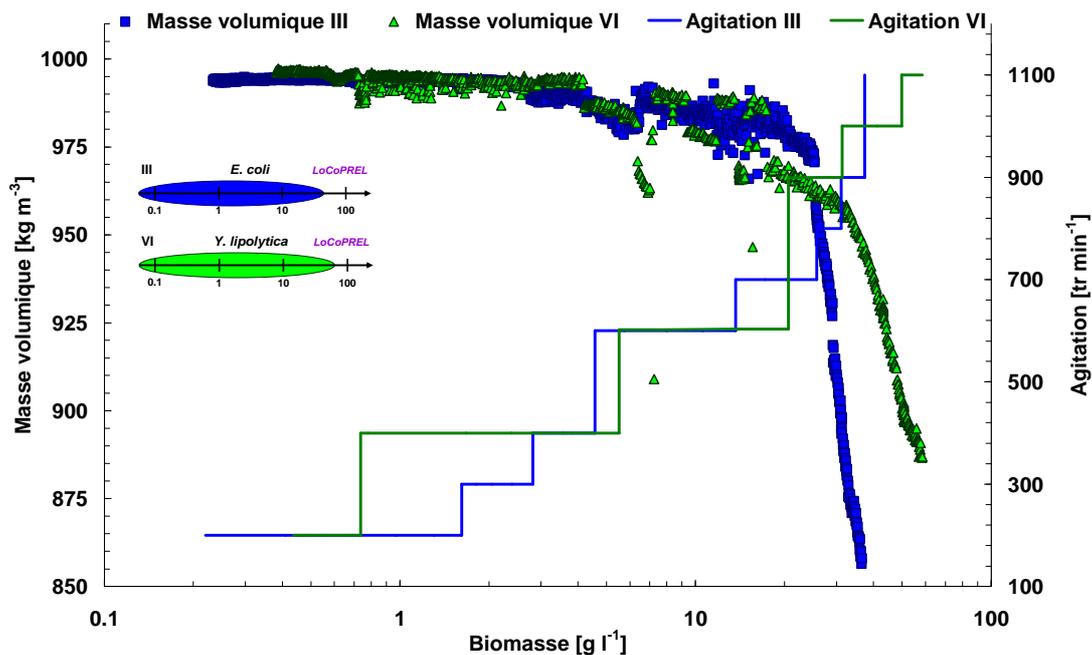


Figure 121 : Masse volumique en ligne et vitesse d'agitation du bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

A nouveau, les trois seuils de concentration peuvent être discutés en fonction des conditions d'agitation appliquées. Les sursauts observés, en plus de l'impact de la ventilation, sont également en partie expliqués par les différents changements de vitesse d'agitation dans le bioréacteur, perturbant la mesure effectuée par un ajout de bruit visible graphiquement mais difficilement quantifiable.

Afin d'étendre le comparatif aux autres cultures, les différences de masse volumique, par rapport à une masse volumique de référence (mesurée avant inoculation), pour les cultures I, III, IV, V et VI, sont représentées sur la *Figure 122*. On observe des comportements non attendus pour cette variable pour certaines expérimentations.

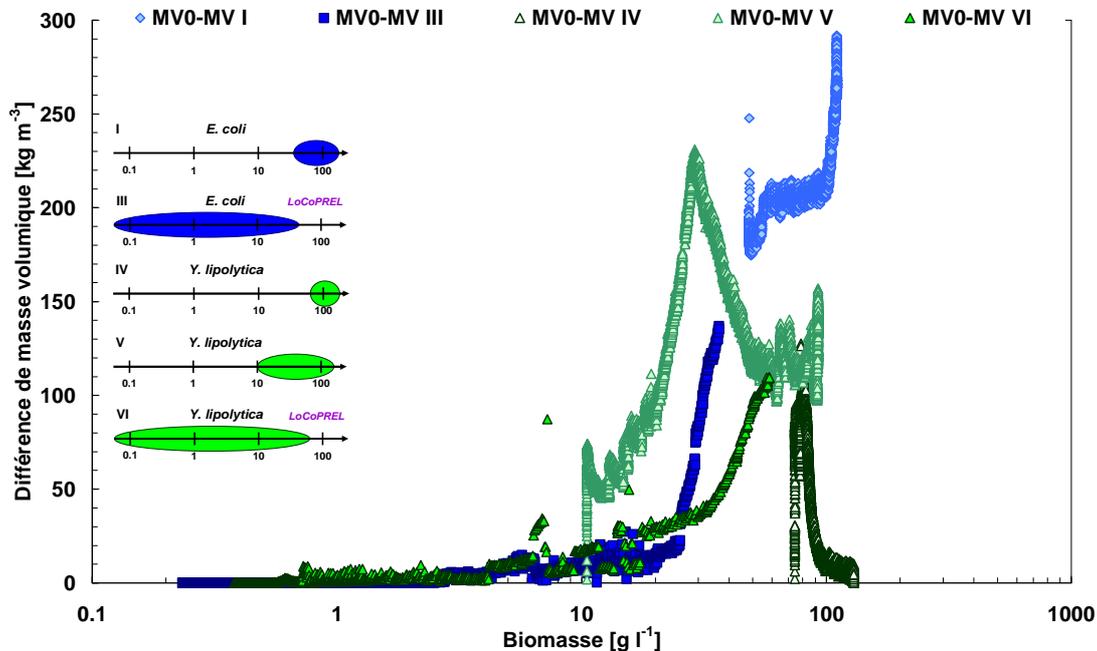


Figure 122 : Variation de la masse volumique en ligne en fonction de la concentration en biomasse (culture I, III, *E. coli* - culture IV, V, VI, *Y. lipolytica*)

La *Figure 122* permet de révéler deux tendances dépendantes du microorganisme considéré. Pour *E. coli* (culture I et III), les deux cultures tendent à être complémentaires l'une de l'autre. Pour les faibles concentrations en biomasse, la culture III traduit une allure avec une faible évolution à partir de 4 g l^{-1} , et jusqu'à une valeur seuil de concentration de 25 g l^{-1} où celle-ci évolue rapidement, tendant à rejoindre le début de la culture I. L'évolution de la culture I indiquerait un nouveau seuil de concentration où la masse volumique en ligne évolue peu, sur une plage de concentration estimée comprise entre 55 et 100 g l^{-1} . A partir de 100 g l^{-1} , l'incorporation de la phase gazeuse augmente à nouveau rapidement en fonction de la concentration en biomasse par rapport à la masse volumique de référence (moût avant inoculation).

Concernant les cultures d'*Y. lipolytica* (culture IV, V et VI), les évolutions de chaque culture apparaissent distinctes. La culture VI présente deux seuils pour 4 et 33 g l^{-1} . A partir de cette dernière concentration, l'incorporation de la phase gazeuse s'accroît rapidement avec l'augmentation de la concentration en biomasse. Cependant, pour les cultures IV et V, les allures et seuils de concentration semblent totalement différents de la culture VI. Pour les cultures IV et V, on observe une augmentation, puis une diminution de l'incorporation d'une phase gaz dans le moût. La culture IV présente une augmentation de la proportion d'une phase gazeuse jusqu'à une concentration estimée de 80 g l^{-1} , avant que celle-ci diminue jusqu'à la fin de l'expérimentation. La culture V montre une augmentation graduelle de l'incorporation d'une phase gazeuse avec une augmentation dès

l'inoculum à une concentration en biomasse de 10 g l^{-1} et jusqu'à un premier seuil à 20 g l^{-1} . L'incorporation de la phase gazeuse s'accroît jusqu'à une concentration en biomasse de 29 g l^{-1} , avant de décroître jusqu'à 50 g l^{-1} . A partir de cette concentration, la proportion de la phase gazeuse reste constante jusqu'à la fin de l'expérimentation vers 92 g l^{-1} .

La proportion croissante de microorganismes génère une phase gaz de plus en plus importante, mais elle peut également être à l'origine de l'aspiration de petites bulles au niveau du point d'entrée dans la boucle de dérivation (piquage excentré en pied de cuve). La présence des microorganismes en concentration de plus en plus élevée (augmentation de la viscosité apparente) ainsi que l'activité microbienne permettent de stabiliser les bulles présentes avant leur aspiration dans la boucle de dérivation. L'évolution distincte de la masse volumique des cultures d'*Y. lipolytica* montre clairement que la présence physique des cellules ne permet pas d'expliquer l'incorporation de la phase gaz dans le moût. Dans le cas des reprises de cultures (culture I, IV, V), l'historique des cellules semble avoir un impact non négligeable.

En effet, les cultures III et VI prises en référence dans le cadre de ces travaux montrent des tendances proches. La culture I d'*E. coli* était initialement une culture avec un objectif de production de biomasse catalytique, s'apparentant à la conduite de la culture III. Il apparaît logique que ces deux cultures soient complémentaires.

Or, la production de biomasse catalytique de la culture VI d'*Y. lipolytica* apparaît nettement différentes des deux autres cultures de *Y. lipolytica*. Initialement, les cultures utilisées comme précultures des cultures IV et V ont eu des conduites de culture plus éloignées que les conditions qui ont été appliquées lors de la culture VI. En effet, la préculture IV a eu initialement une alimentation avec un apport de deux substrats (glucose et acide oléique). La culture IV s'est poursuivie sur l'outil expérimental avec un apport carboné en glucose, mais avec une limitation en transfert de dioxygène qui a été appliquée pratiquement dès la reprise de la culture. La préculture V a été conduite avec une limitation nutritionnelle jusqu'à l'obtention d'une carence. La culture V a été obtenue en relançant la culture suite à une dilution dans un milieu minimum adéquat à la croissance, avant d'appliquer une conduite de culture adaptée, même si des problèmes de régulation en température et pH ont été rencontrés. Malgré la reprise de la culture, les générations de cellules issues de la croissance dans l'outil expérimental semblent avoir conservées des propriétés de surfaces différentes entre les différentes cultures, alors que la souche initiale provient du même stock. Ceci explique l'allure des différentes dynamiques de masse volumique en fonction de la concentration en biomasse.

Il paraît envisageable que les propriétés physico-chimiques de la membrane jouent un rôle sur l'incorporation d'une phase gazeuse dans le moût en fonction de l'augmentation de la concentration en biomasse. De plus, la proportion de la phase gazeuse semble suivre des dynamiques indépendantes pour chaque culture en fonction de la concentration en biomasse, ce qui laisse penser que les propriétés physiques des membranes ont évolué avec les conditions de cultures appliquées. La concentration seule en biomasse ne permet pas de répondre à l'incorporation de la phase gaz dans le milieu de culture.

Les différences de dynamique observées entre les cultures d'*E. coli* et *Y. lipolytica* peuvent avoir plusieurs explications. Ces deux microorganismes ont des tailles et des formes très distinctes. Nous

reviendrons sur cet aspect dans le *Chapitre V*. Si nous regardons les variables issues du bioréacteur, nous remarquons que les cultures I et III d'*E. coli*, V et VI d'*Y. lipolytica* n'ont pas été limitées en transfert de dioxygène, alors que la culture IV d'*Y. lipolytica* est limitée très rapidement après inoculation. Cette différence pourrait expliquer pourquoi l'amplitude de la dynamique observée pour la culture IV reste moins importante que pour les autres cultures représentées sur la *Figure 122*. L'augmentation de la concentration en biomasse favorise l'incorporation d'une phase gazeuse dans le moût, alors que cela n'est pas le cas si la culture est limitée en transfert de dioxygène. L'activité métabolique des cellules, en lien avec l'utilisation du dioxygène, expliquerait cette différence. Enfin, la composition chimique de la phase liquide est également un paramètre à prendre en considération car la coalescence des bulles dans cette phase est directement impactée par sa composition chimique. En cas de différences importantes de concentration en sels dans le surnageant, les propriétés de coalescence du milieu sont impactées, influant sur la quantité de bulles de petites tailles. Cet aspect sera discuté dans le *Chapitre V*.

B. Conductimétrie en ligne

La conductivité électrique constitue une propriété physique, en lien avec la concentration en espèces chargées (sels), pouvant être corrélée à l'activité microbologique, mais également au caractère multiphasique du moût.

1. Suivi de l'inoculation

L'évolution de la conductivité électrique peut être étudiée dès les faibles concentrations en biomasse. Ainsi, il est possible de suivre son évolution au cours de l'inoculation du bioréacteur de l'outil expérimental. La Figure 123 présente le suivi de la conductivité électrique en ligne pour les cultures I, III d'*E. coli*, V et VI d'*Y. lipolytica*.

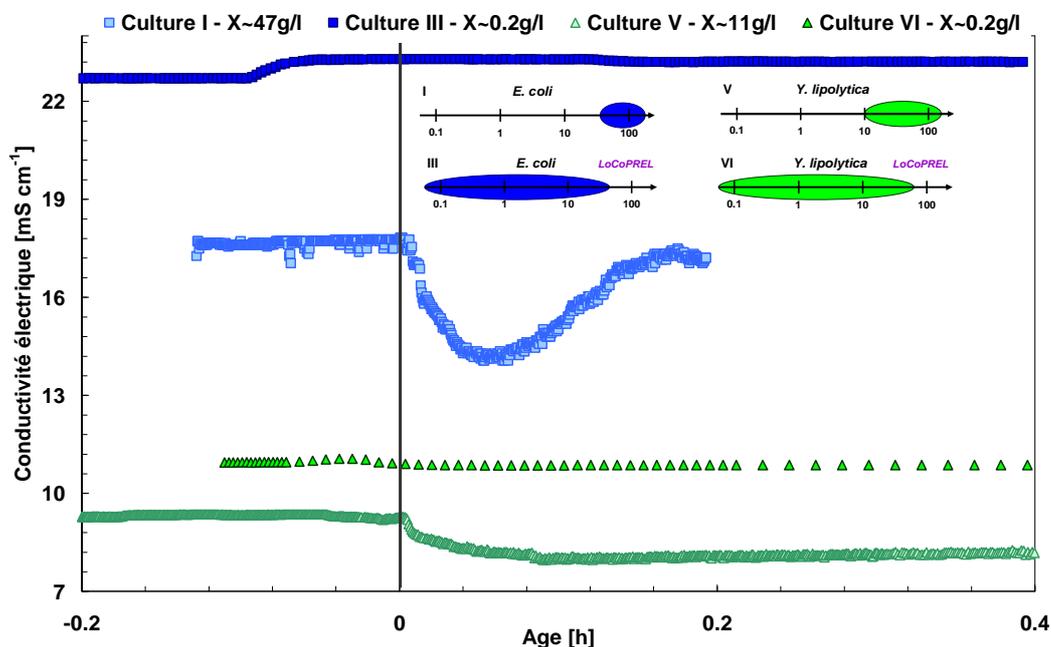


Figure 123 : Evolution de la conductivité électrique en ligne lors de l'inoculation en fonction du temps (culture I, III, *E. coli* - culture V, VI, *Y. lipolytica*)

On peut observer différentes évolutions. Dans le cas d'une inoculation du bioréacteur aboutissant à une concentration en biomasse faible (cas des cultures III et VI), on observe que la conductivité électrique n'évolue pas. Dans le cas de la culture III, la légère augmentation observée avant l'inoculation ($t = 0$ h) est liée à la mise en marche de la régulation pH. Dans le cas d'une inoculation du bioréacteur aboutissant à une concentration en biomasse élevée (cas des cultures I et V), on observe une diminution de la valeur mesurée *in situ*. Cette diminution indique que la préculture contenait moins d'espèces chargées dans sa phase liquide. Une autre possibilité, rejoignant l'idée du paragraphe précédent, serait l'impact de la masse volumique. L'augmentation de la phase gazeuse dans le milieu impliquerait une diminution de la mesure de la conductivité électrique du milieu. En effet, la présence de bulles dans le milieu joue un rôle d'isolant électrique, faisant ainsi diminuer la valeur mesurée de la conductivité électrique du milieu de culture. La représentation de la différence de conductivité

électrique par rapport à une conductivité électrique de référence (mesure effectuée avant inoculation) est représentée pour les cultures I, III d'*E. coli*, V et VI d'*Y. lipolytica* en Figure 124. Cette représentation permet une comparaison directe de la conductivité électrique initiale. Pour faciliter le comparatif, les cultures sont rassemblées deux à deux (I et V d'un côté, III et VI de l'autre).

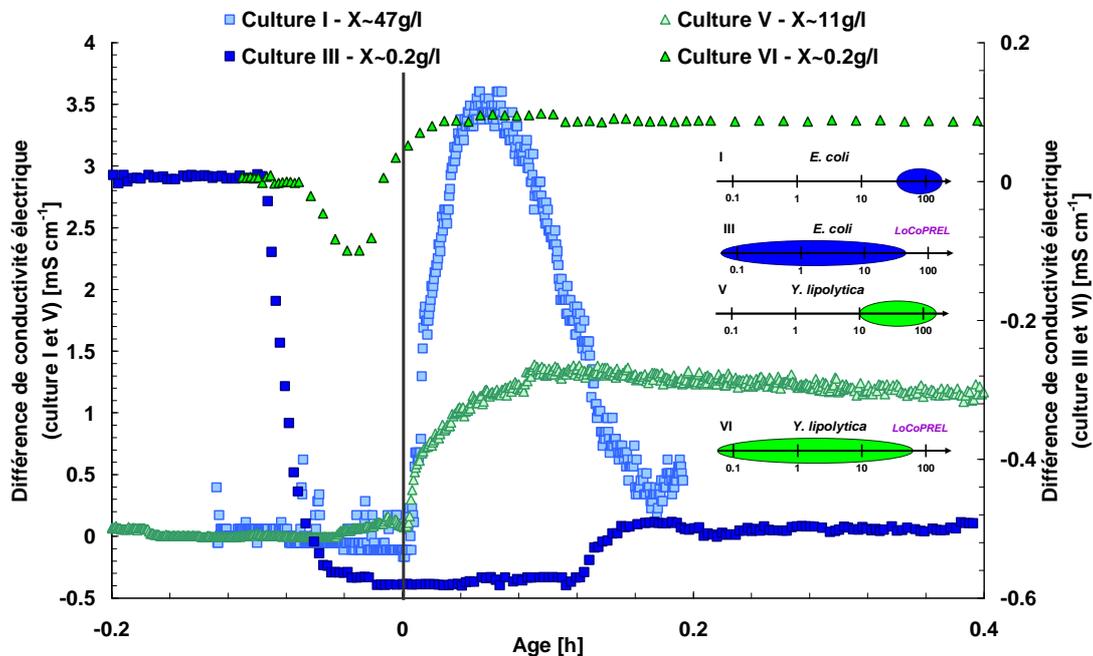


Figure 124 : Différence de conductivité électrique au cours de l'inoculation (culture I, III, *E. coli* - culture V, VI, *Y. lipolytica*)

Dans les deux cas considérés (culture I et V), les inoculations avec de hautes concentrations en cellules font augmenter la valeur moyenne de la différence de conductivité : la valeur absolue diminue par rapport à cette différence (remarque identique à la Figure 123). Pour les inoculations à faible concentration en cellules, la perturbation est beaucoup plus faible. Dans le cas de la culture III d'*E. coli*, la référence de conductivité électrique a été effectuée avant la mise à pH du milieu par la régulation du bioréacteur, indiquant une différence négative. Cependant, on observe, après inoculation, une augmentation de cette différence, indiquant une légère dilution des espèces chargées présentes, liée à l'ajout de l'inoculum dans le bioréacteur. Cet effet de dilution est également remarqué pour la culture VI d'*Y. lipolytica*.

Durant l'inoculation, la conductivité évolue en fonction de la concentration en biomasse dans l'inoculum. Si la concentration en biomasse est faible, les cellules auront peu consommé les sels à leur disposition, ce qui impliquera une légère dilution du milieu final dans l'outil expérimental en termes de concentration en espèces chargées. Si la concentration en biomasse est importante dans l'inoculum, la masse volumique finale du moût sera perturbée par l'incorporation d'une phase gaz, impliquant une diminution des mesures de conductivité électrique due à la présence de bulles jouant le rôle d'isolant électrique.

2. Evolution en phase de croissance

L'évolution de la conductivité électrique sur l'ensemble d'une culture permet de suivre, entre autres, la consommation des espèces ioniques présentes dans la phase liquide du milieu de culture, correspondant à la vitesse de consommation des sels. Cependant, la masse volumique du moût peut modifier les mesures de conductivité électrique *in situ* car la présence de bulles joue alors un rôle d'isolant. La *Figure 125* représente la conductivité électrique et la ventilation du moût en fonction de la concentration en biomasse.

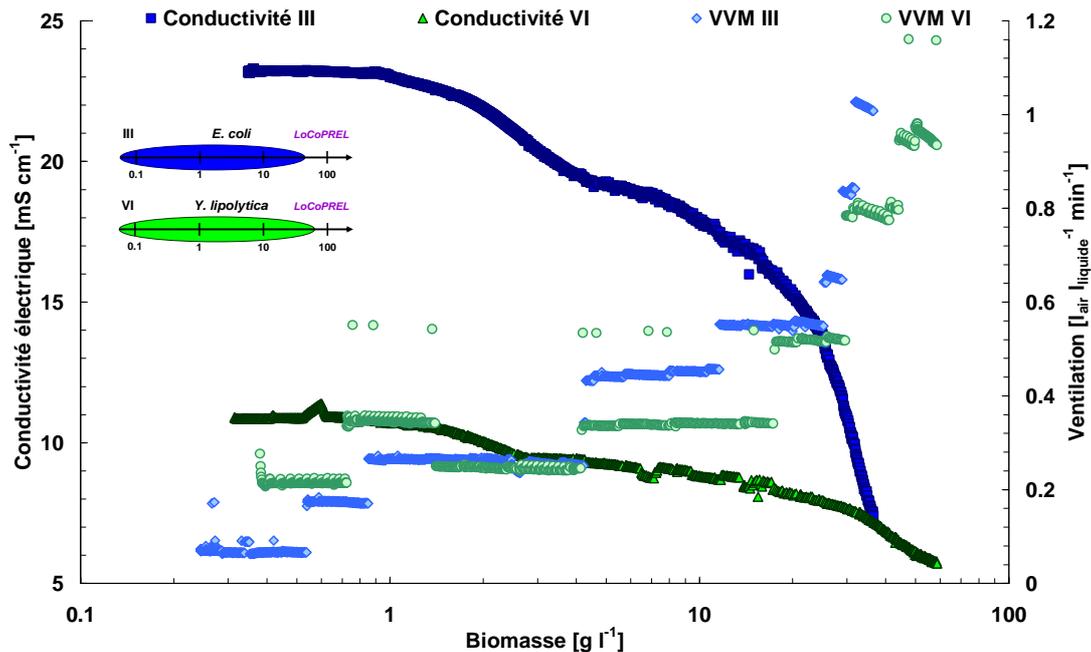


Figure 125 : Evolution de la conductivité électrique et de la ventilation en fonction de la concentration en biomasse (cultures III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

Pour les deux cultures, on observe une diminution de la conductivité électrique du moût qui s'effectue dès les très faibles concentrations en biomasse (inférieur à 1 g l^{-1}). Dans les deux cultures, on observe une cassure de la continuité des valeurs enregistrées (culture III : 4.1 g l^{-1} ; culture VI : 2.7 g l^{-1}). Cette discontinuité est induite par le passage de l'alimentation du substrat dilué au substrat concentré. Avant le passage du substrat concentré, le volume d'eau apporté est important, provoquant un début de dilution des sels présents, faisant diminuer la conductivité électrique. A ce stade, le débit d'alimentation en sels peut être considéré comme inexistant. Après le passage à une alimentation avec un substrat concentré, la dilution des espèces chargées présentes dans le moût est moindre, et l'alimentation en sels est progressivement augmentée, sans pour autant compenser la diminution de la conductivité électrique. Ceci indique que le flux d'apports salins reste insuffisant par rapport à la consommation des microorganismes. Le milieu s'appauvrit alors en nutriments chargés. On observe, sur la *Figure 125*, que les changements de la ventilation du bioréacteur ne perturbent pas la mesure de la conductivité électrique dans la boucle de dérivation.

Afin de pouvoir effectuer une comparaison entre les cultures en s'affranchissant de la phase gazeuse, la conductivité électrique est représentée sous la forme d'une différence de conductivité électrique équivalente définie par l'Équation 134 :

$$\Delta\sigma_{eq} = \frac{\sigma_0 - \sigma_{mesuré}}{\left(\frac{\rho_{mesuré}}{\rho_0}\right)}$$

Équation 134 : Différence de conductivité électrique équivalente à une suspension solide-liquide

Dans l'Équation 134, σ_0 et ρ_0 représentent respectivement la conductivité électrique et la masse volumique du milieu de culture avant inoculation, $\sigma_{mesuré}$ et $\rho_{mesuré}$ représentent les mesures en ligne au cours du temps de la conductivité électrique et de la masse volumique. La différence de conductivité électrique équivalente à une suspension solide-liquide, pour l'ensemble des cultures présentées dans ce travail, est présentée en Figure 126, en fonction de la concentration en biomasse avec une échelle linéaire.

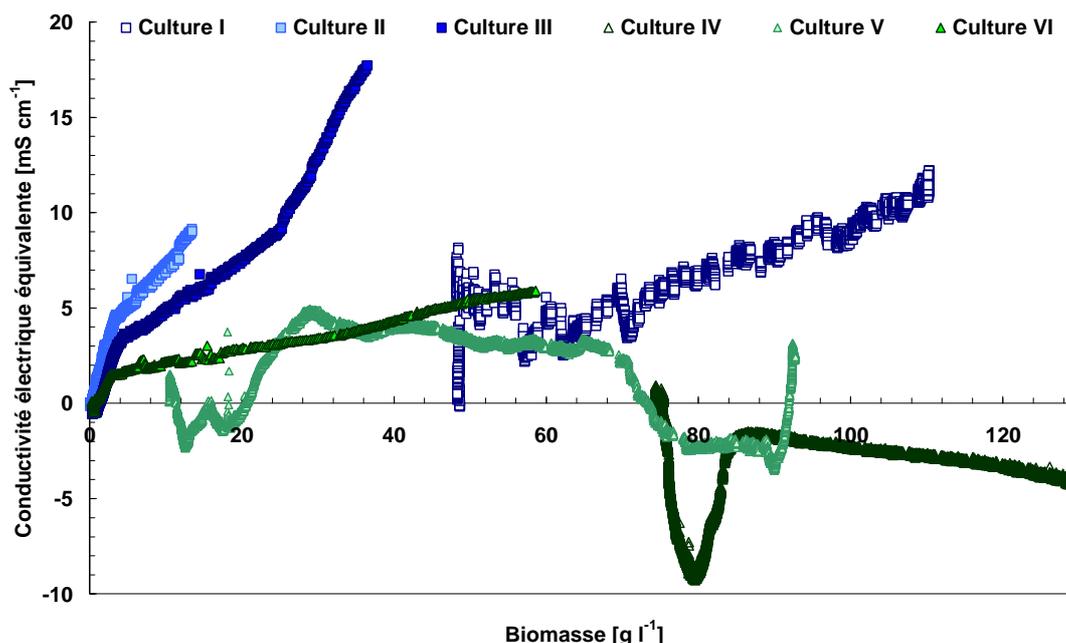


Figure 126 : Différence de conductivité électrique équivalente à une suspension solide-liquide en fonction de la concentration en biomasse (culture I, II, III, *E. coli* - culture IV, V, VI, *Y. lipolytica*)

Pour les deux cultures de référence (culture III et VI), l'augmentation de la différence de conductivité équivalente indique un appauvrissement du moût en espèces chargées du milieu. On note des tendances proches entre les deux microorganismes utilisés dans le cas des cultures totalement maîtrisées (culture II, III et VI). Il est possible d'observer des ruptures de pente pour les seuils préalablement identifiés.

Concernant les précultures à haute concentration cellulaire, la culture I d'*E. coli*, comme les trois cultures parfaitement maîtrisées, montre, sur l'ensemble de la gamme de concentrations, un appauvrissement en espèces chargées. Or, pour les reprises de culture avec *Y. lipolytica* (culture IV et V), la tendance n'est pas aussi claire.

Dans le cas de la culture IV, le milieu s'enrichit en espèces chargées jusqu'à une concentration de 80 g l^{-1} , avant que la différence de conductivité électrique commence à augmenter jusqu'à une valeur de concentration de 86.5 g l^{-1} (âge de la culture IV : 11.5 h). A ce moment, la culture est limitée par le transfert de dioxygène. On observe une diminution de la différence de conductivité équivalente, ne pouvant pas être attribuée à un impact de la phase gazeuse au vu de la correction des mesures. Des espèces chargées s'accumulent donc dans le milieu de culture. Le flux de sels apporté étant constant sur cette période, l'alimentation saline est donc trop importante par rapport aux besoins nutritionnels réels de la levure.

Concernant la culture V, la diminution des différences de conductivité électrique équivalente pour les faibles et fortes concentrations en biomasse traduit les perturbations de la culture liées à la mauvaise régulation pH et température du bioréacteur. Globalement, la proportion de sels semble moins importante dans le moût sur l'ensemble de la culture, rejoignant la tendance de la culture VI d'*Y. lipolytica* en conditions maîtrisées.

La mesure de la conductivité électrique (via une cellule à passage intégral) est également affectée par la présence d'une phase gaz. La masse volumique du moût, comme indicateur de la fraction gaz entraînée, est à prendre en considération. La masse volumique en ligne, pour ces mêmes expérimentations, diminue également avec l'augmentation de la concentration en biomasse. L'augmentation de la fraction volumique du gaz dans le mout peut alors masquer une accumulation possible d'espèces chargées, voire conduire à une allure inverse de ce qu'il se passe dans la phase liquide seule. La correction des mesures de conductivité par une mesure de différence de conductivité électrique équivalente permet de s'affranchir de la fraction gaz afin de suivre une conductivité électrique théorique à une suspension solide-liquide dépourvue de sa phase gazeuse. Des éléments de validation de ce correctif sont présentés dans le Chapitre V lors des mesures de suivi de pression osmotique et de force ionique sur les surnageants des cultures de référence (III et VI).

C. Pertes de charge linéiques

Afin d'étudier l'impact de la concentration en biocatalyseur sur le comportement rhéologique du milieu, des mesures de perte de charge en ligne sont effectuées. Ces grandeurs sont systématiquement normées par le débit volumique afin de s'affranchir d'une dérive éventuelle du débit massique et de la masse volumique durant la culture. Ainsi, sous condition d'un régime laminaire d'écoulement, l'évolution de la perte de charge en fonction du débit suit une relation linéaire proportionnelle à la viscosité dynamique du milieu (cf. *Chapitre I Équation 30 : Loi de Poiseuille*).

Comme mentionné dans le *Chapitre II*, les pertes de charge sont mesurées sur deux conduites cylindriques, D1 et D2 (longueur : 2 m) respectivement de 12 et 6 mm de diamètres intérieurs. La conduite D1 permet de balayer les faibles vitesses linéiques, et par conséquent les faibles vitesses de

cisaillement. La seconde conduite, D2, permet de couvrir des vitesses linéiques plus élevées et par conséquent des taux de cisaillement plus élevés.

1. Suivi de l'inoculation

Le suivi des pertes de charge normées est représenté ci-dessous en fonction du temps et pour différentes concentrations obtenues au départ des cultures effectuées au sein de l'outil expérimental. Afin de pouvoir répondre à un impact de la biomasse sur les mesures de perte de charge normée, les mesures sont suivies et comparées en fonction de l'évolution des signaux pré et post inoculation (t = .

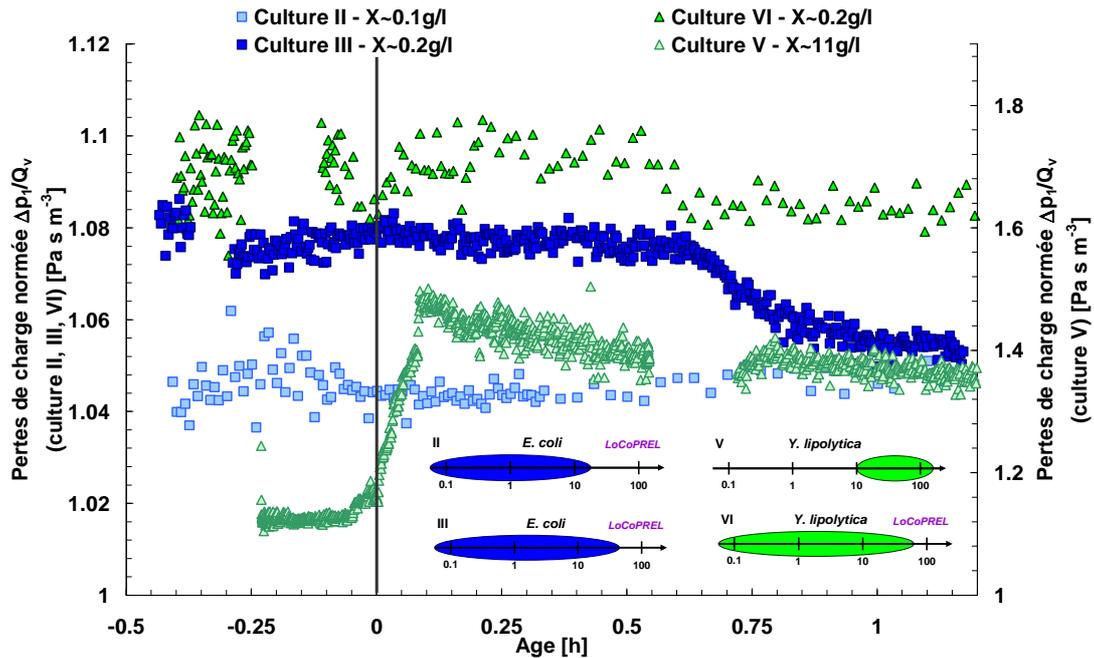


Figure 127 : Pertes de charge normées en fonction du temps pour la conduite D1 (culture II, III, *E. coli* - culture V, VI, *Y. lipolytica*)

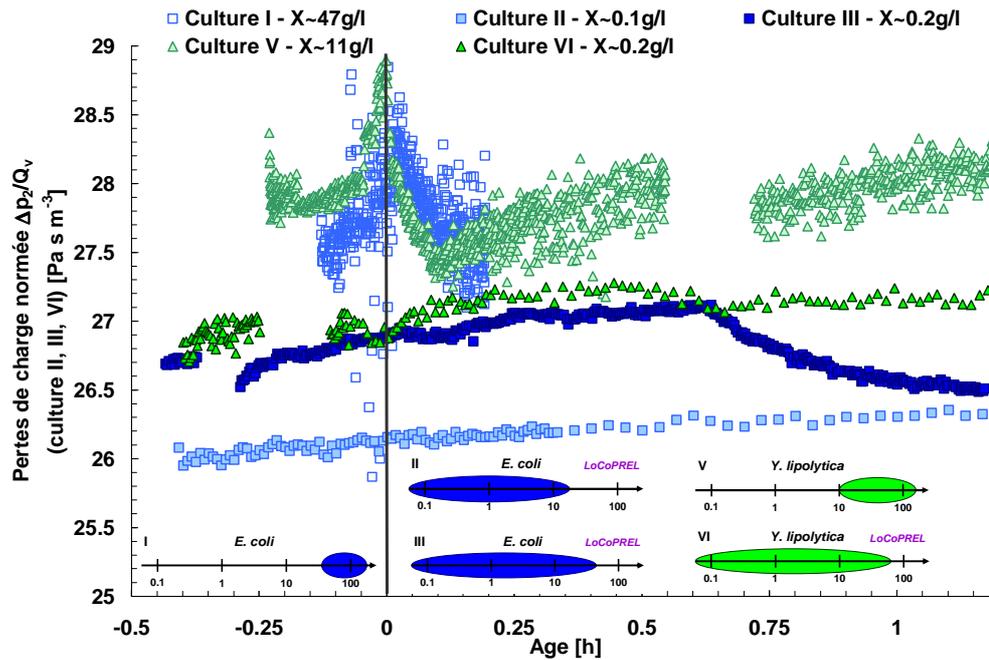


Figure 128 : Pertes de charge normées en fonction du temps pour la conduite D2 (culture I, II, III, *E. coli* - culture V, VI, *Y. lipolytica*)

Pour les deux conduites, on observe un impact important d'une inoculation à forte concentration en cellules sur la culture V, confirmé avec la culture I sur la conduite D2. Dans le cas de la conduite D2, on observe une diminution des pertes de charge normées $\Delta p_2/Q_v$ pour les cultures I et V. Or, sur la conduite D1, la culture V montre une augmentation de $\Delta p_1/Q_v$. L'impact des fortes concentrations est observé pour les valeurs de pertes de charge normées, mais il est difficile, avec ce seul suivi, d'interpréter l'allure des évolutions. Pour le cas des inoculations avec de faibles concentrations en cellule, nous n'observons pas d'évolution significative. La diminution de la perte de charge normée pour la culture III sur les deux conduites pour $t = 0.7$ h est liée à un ajout de thiamine (oubliée lors de la préparation du bioréacteur). On note que cet ajout nutritionnel a un impact sur les propriétés physiques enregistrées dès que l'activité biologique est relancée.

2. Evolution en phase de croissance

Les mesures de perte de charge sont analysées en observant l'impact de la ventilation du bioréacteur. Les mesures de masse volumique en ligne étant légèrement impactées, il est possible que les pertes de charge normées soient également perturbées. Pour s'en assurer, les pertes de charge normées, pour les conduites D1 et D2, et la ventilation du bioréacteur sont représentées en fonction de la concentration en biomasse, respectivement sur la *Figure 129* pour la conduite D1, et sur la *Figure 130* pour la conduite D2.

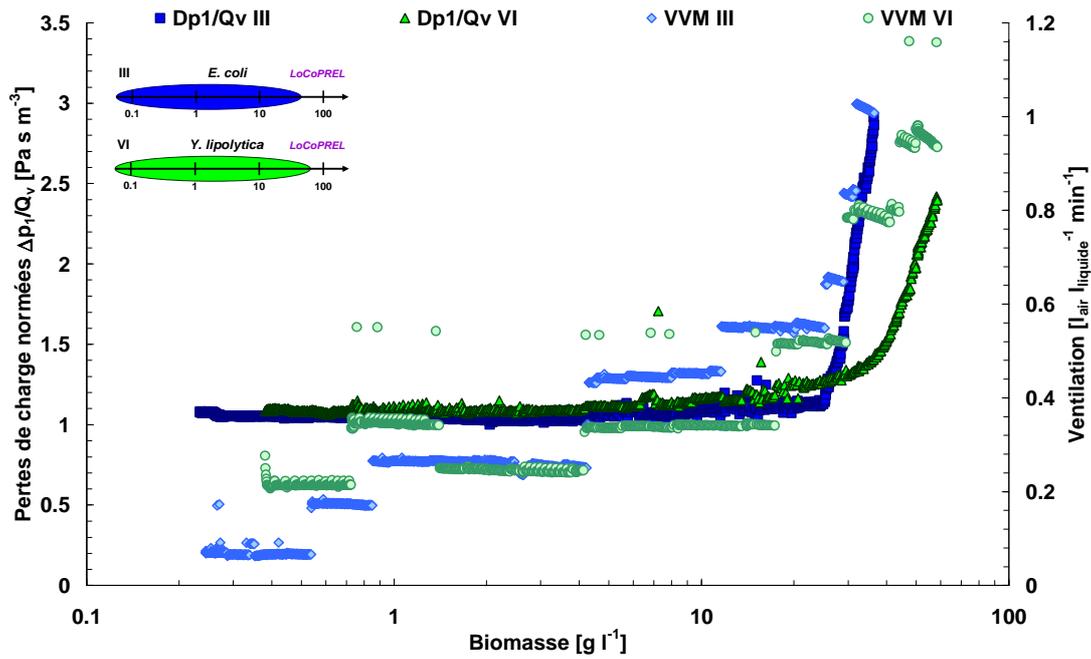


Figure 129 : Pertes de charge normées pour la conduite D1 et ventilation du bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

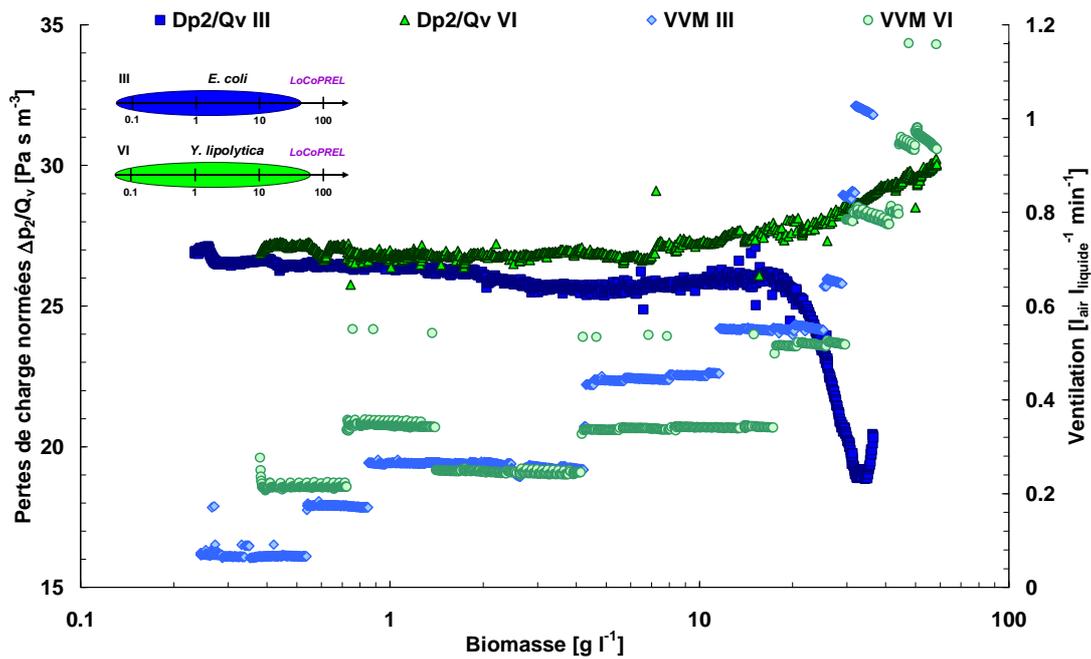


Figure 130 : Pertes de charge normées pour la conduite D2 et ventilation du bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

Pour chacune des conduites, on observe que les valeurs de pertes de charge normées semblent indépendantes des consignes de ventilation appliquées au bioréacteur de l'outil expérimental. Pour la conduite D1, on remarque un seuil franc de concentration à 25 g l^{-1} sur la culture III d'*E. coli* avant que la perte de charge soit réellement impactée. Concernant la culture VI d'*Y. lipolytica*, un seuil est aussi observé, mais moins clairement. Cependant, il est identifié pour une concentration en biomasse de

33 g l⁻¹. A propos de la conduite D2, des seuils de concentration peuvent également être identifiés à 19 g l⁻¹ pour la culture III d'*E. coli*, et 20 g l⁻¹ pour la culture VI d'*Y. lipolytica*.

La comparaison des cultures s'effectue par la représentation des valeurs de pertes de charge normées en fonction de la concentration en biomasse pour chacune des conduites utilisées. Une échelle logarithmique permet de suivre finement les faibles concentrations en biomasse (concentration inférieure à 10 g l⁻¹), alors qu'une échelle linéaire permettra de suivre les évolutions à hautes concentrations en cellules (concentration supérieure à 10 g l⁻¹).

La Figure 131 représente le suivi des pertes de charge normées sur la conduite D1 en fonction de la concentration en biomasse, pour l'ensemble des cultures étudiées (à l'exception de la culture I où le capteur de pression différentielle n'était pas encore mis en place). La Figure 132 représente les mêmes données que la Figure 131 mais avec l'utilisation d'une échelle linéaire de la concentration en biomasse.

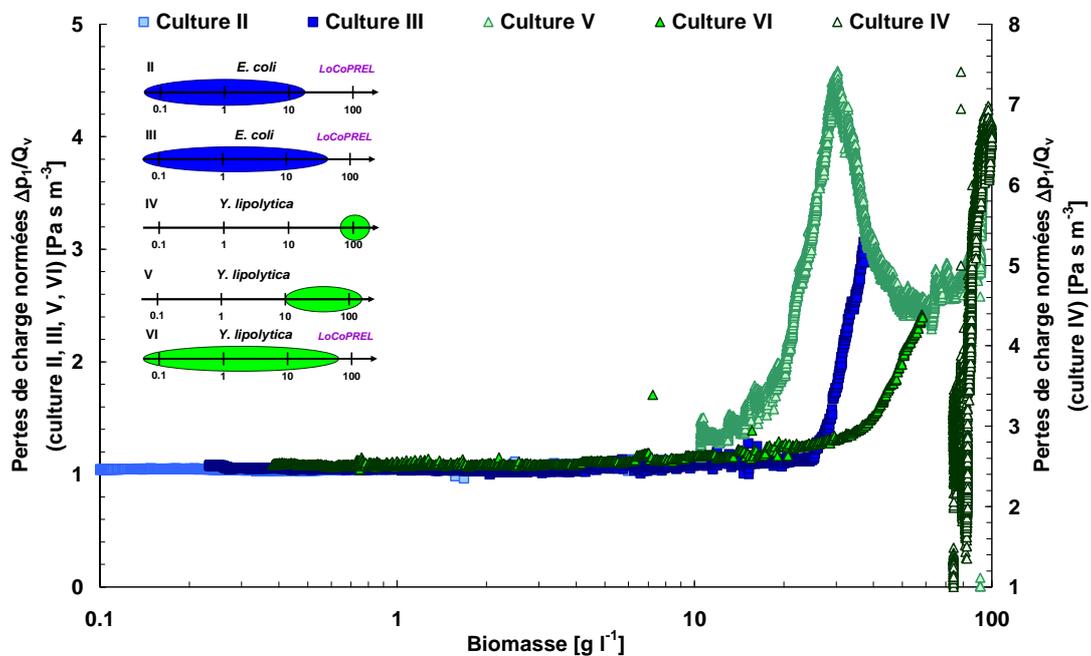


Figure 131 : Pertes de charge normées de la conduite D1 en fonction de la concentration en biomasse, échelle logarithmique (culture II, III, *E. coli* - culture IV, V, VI, *Y. lipolytica*)

Sur la Figure 131, on observe clairement que les pertes de charge normées de la conduite D1 n'évoluent pas avec la concentration en biomasse pour les faibles concentrations. L'évolution est significative à partir d'environ 10 g l⁻¹. Cependant, il semble que des seuils d'évolution de la perte de charge normée pour la conduite D1 diffèrent pour chaque culture, qu'elles soient ou non des cultures du même microorganisme.

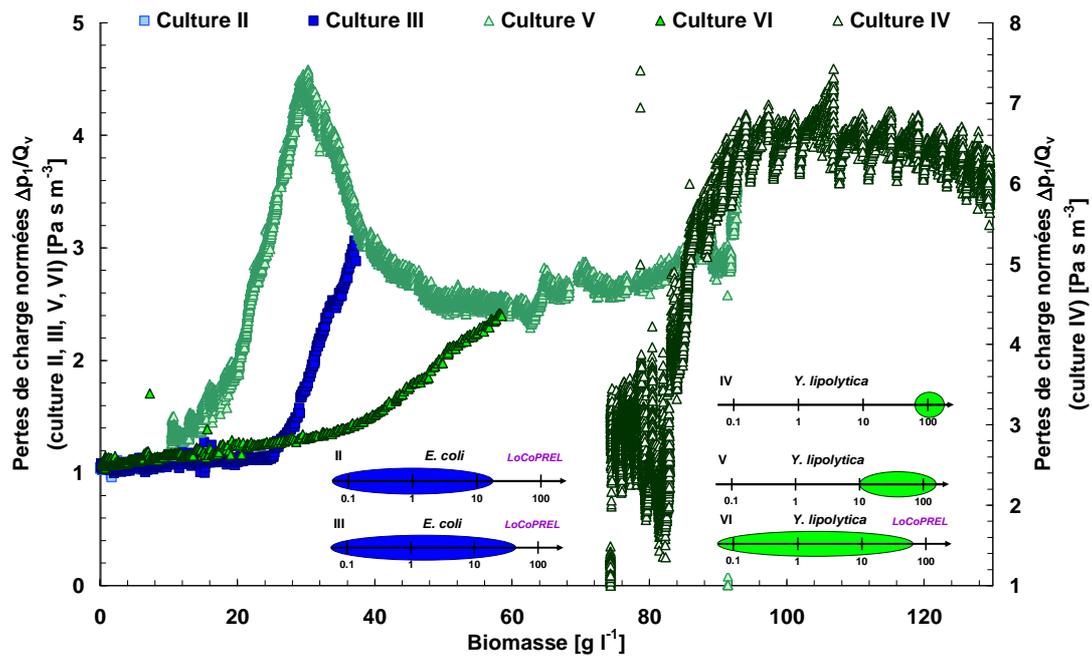


Figure 132 : Pertes de charge normées de la conduite D1 en fonction de la concentration en biomasse, échelle linéaire (culture II, III, *E. coli* - culture IV, V, VI, *Y. lipolytica*)

Le suivi de l'évolution est plus lisible sur une échelle linéaire pour des concentrations supérieures à 10 g l^{-1} . On observe que l'évolution des pertes de charge normée est distincte pour chaque culture. Les cultures III et VI ont toutes les deux un seuil identifié, par rapport aux faibles concentrations, où la perte de charge normée est impactée par la concentration en biomasse. La culture II n'a pas atteint une concentration en biomasse suffisamment élevée pour voir, et confirmer, le seuil identifié sur la culture III.

Concernant les cultures d'*Y. lipolytica*, l'évolution de la perte de charge semble démarrer systématiquement autour de 1 Pa s m^{-3} . Cependant, le début de l'augmentation des valeurs de pertes de charge normées démarre à 10 g l^{-1} pour la culture V, 33 g l^{-1} pour la culture VI et 80 g l^{-1} pour la culture IV. Cette variabilité des seuils s'explique probablement par la multitude de conditions environnementales appliquées à la levure. Même si toutes les cultures avaient pour objectif une reprise de la croissance pour une production de biomasse, on remarque que l'historique des cellules a une importance non négligeable sur les propriétés macroscopiques du moût. Cependant, même si certaines concentrations en biomasse sont estimées (cas des cultures I et IV), les seuils de concentration restent néanmoins très disparates malgré la prise en compte des biais possibles sur la concentration en biomasse. La présence physique des cellules dans le moût n'explique pas la disparité des seuils, ni les dynamiques observées.

Le suivi des pertes de charge normées, pour la conduite D2, est représenté sur la Figure 133 (échelle logarithmique de concentration en biomasse). La Figure 134 représente les mêmes données que la Figure 133 mais sur une échelle linéaire.

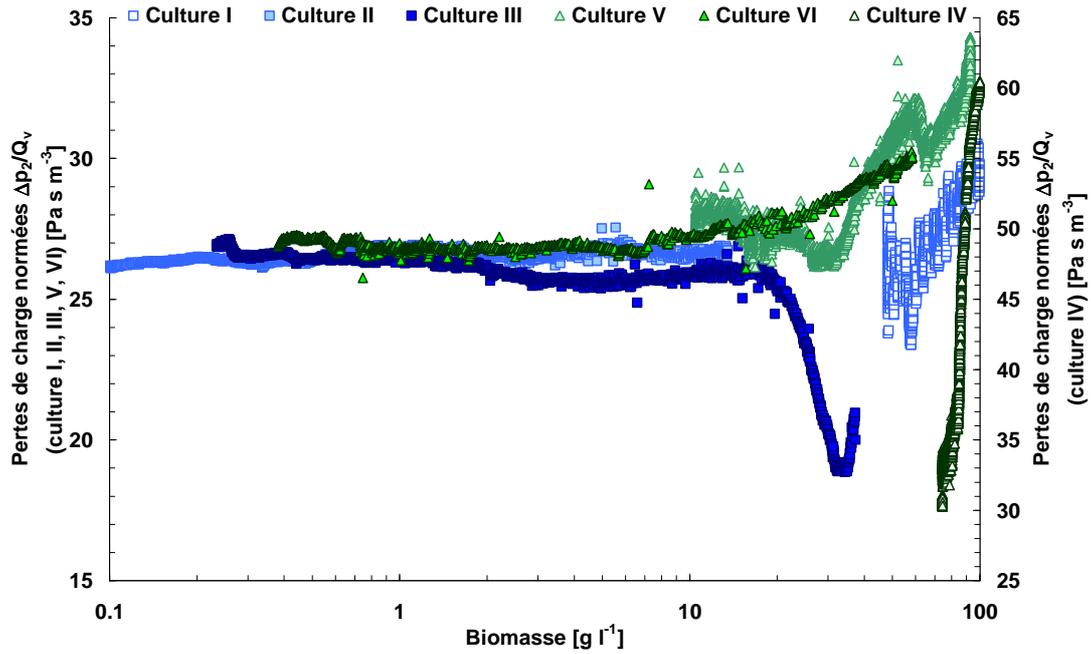


Figure 133 : Pertes de charge normées de la conduite D2 en fonction de la concentration en biomasse, échelle logarithmique (toutes les cultures)

A nouveau, comme pour la conduite D1, l'évolution des pertes de charge normées pour la conduite D2 reste centrée autour de 26 Pa s m^{-3} jusqu'à une concentration de l'ordre de 7 g l^{-1} . A partir de cette concentration, il est possible d'observer différents comportements en fonction de la culture de microorganisme, plus visibles sur la *Figure 134*.

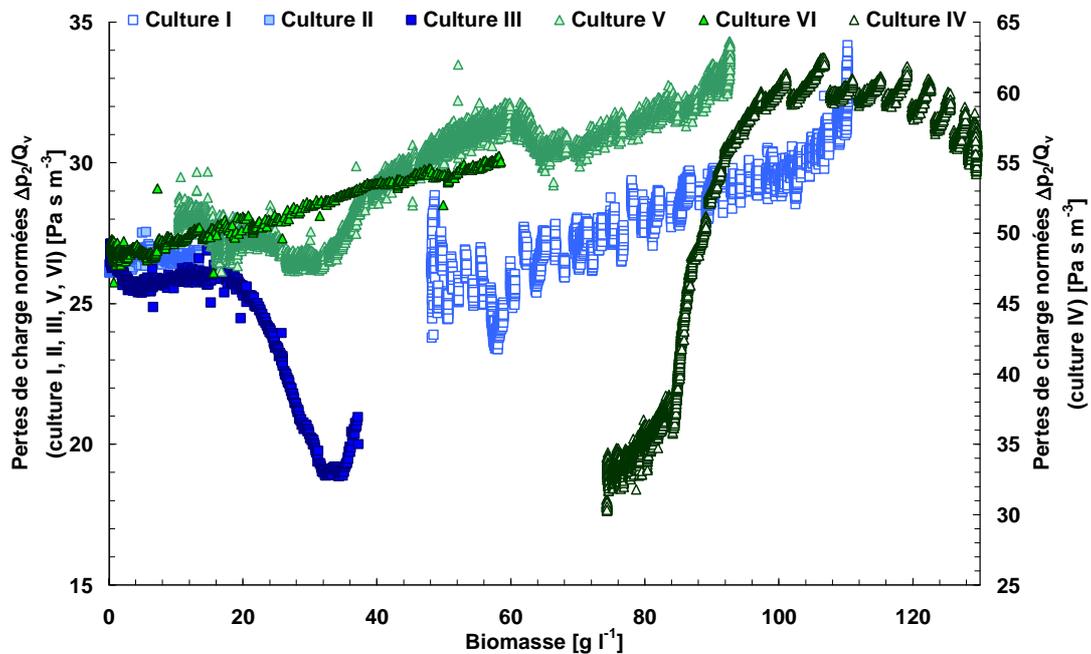


Figure 134 : Pertes de charge normées de la conduite D2 en fonction de la concentration en biomasse, échelle linéaire (toutes les cultures)

La *Figure 134* rassemble l'ensemble des suivis de perte de charge normée en fonction de la concentration en biomasse (en échelle linéaire) pour six cultures indépendantes (3 cultures avec *E. coli*, 3 cultures avec *Y. lipolytica*). Il est possible de distinguer deux comportements selon le microorganisme mis en culture.

Les cultures II et III d'*E. coli* montrent une évolution similaire et constante centrée autour de 26 Pa s m^{-3} pour les faibles concentrations en biomasse, jusqu'à une concentration de 18 g l^{-1} . A partir de ce seuil, les pertes de charge normées chutent jusqu'à une valeur minimale de 19 Pa s m^{-3} pour une concentration de 33.5 g l^{-1} . On observe ensuite un début d'augmentation des valeurs de pertes de charge normées. Parallèlement, les valeurs de la culture I, balayant une gamme de concentration plus élevée (même si la concentration en biomasse a été estimée), suggèrent une prolongation de la dynamique observée pour la culture III. La diminution de la perte de charge normée serait alors un phénomène transitoire sur une gamme de concentration en biomasse de 18 à 45 g l^{-1} . Au-delà de cette concentration, la perte de charge normée semble rester constante autour de 26 Pa s m^{-3} jusqu'à 60 g l^{-1} , avant d'augmenter proportionnellement en fonction de la concentration en biomasse jusqu'à une concentration de l'ordre de 100 g l^{-1} . Au dessus de cette concentration estimée, l'accroissement semble augmenter jusqu'à la concentration maximale de 110 g l^{-1} correspondant à la concentration finale de la culture I.

L'évolution des pertes de charge normées est également liée à la proportion de la phase gaz du moût, elle-même intégrée dans la perte de charge normée par le débit volumique. Néanmoins, l'augmentation de la proportion de bulles au cours de la culture, suivie par la mesure de la masse volumique en ligne, nous informe que l'activité cellulaire entre en jeu dans l'incorporation d'une phase gaz dans le moût. La ventilation et l'agitation n'ayant pas pu être écartées des causes possibles d'incorporation de la phase gaz (cf. *II.A Densimétrie en ligne*), il est nécessaire de les prendre en compte, tout comme l'activité cellulaire, symbolisée par la consommation de dioxygène et la production de dioxyde de carbone. Ces paramètres, liés au transfert de dioxygène dans le bioréacteur, sont en lien étroit avec, d'une part l'interaction possible de la membrane cellulaire de la biomasse et, d'autre part, l'environnement multiphasique du moût en circulation dans la boucle de dérivation. Ainsi, les trois phases du moût ont chacune un rôle important dans les pertes d'énergie par frottement visqueux pouvant être mesurées par une perte de charge.

Les cultures d'*Y. lipolytica* sont plus délicates à interpréter car elles semblent obéir à des dynamiques indépendantes. La culture VI de référence suit une fonction monotone croissante en fonction de la concentration à partir de 7 g l^{-1} pour une perte de charge normée de 26 Pa s m^{-3} jusqu'à 30 Pa s m^{-3} pour la concentration finale de culture de 59 g l^{-1} . La culture V, balayant une gamme de concentration de 10 à 100 g l^{-1} , montre également une tendance à l'augmentation à partir de la même valeur de départ de perte de charge normée. La dynamique paraît osciller autour de la tendance de la culture VI, ce qui semble cohérent et pourrait s'expliquer par les mauvaises conditions de régulation de la température et du pH du milieu. En revanche, la culture IV semble en marge des tendances des cultures V et VI. Le seuil initial de perte de charge normée sur D2 est plus élevé (23 %) pour la culture IV avec une perte de charge normée initiale à 32 Pa s m^{-3} par rapport à la culture VI. Une première

phase d'augmentation, proportionnelle à la concentration en biomasse de 74 à 84 g l⁻¹, apparait au début de la culture IV. Puis un accroissement très rapide survient, faisant augmenter la perte de charge normée sur D2 de 37 à 60 Pa s m⁻³ pour des concentrations estimées comprises entre 84 et 105 g l⁻¹. Cette différence d'évolution, malgré des tailles de cellule proches (voir *Chapitre V*), semble à nouveau liée à l'historique des cellules. En effet, la culture IV est la seule culture à avoir été alimentée avec une source carbonée lipidique (acide oléique) avant l'inoculation dans le bioréacteur de l'outil expérimental. De plus, c'est également la seule culture à avoir subi, pendant 65 % de son temps de culture, une limitation en transfert de dioxygène pendant sa croissance. Les propriétés physiques de la population de cellules de la culture IV semblent avoir acquis un caractère différent par rapport à des cellules obtenues en conditions totalement maîtrisées comme cela a été le cas pour la culture VI.

Cette disparité des dynamiques observé sur les pertes de charges normées sur D1 et D2 montre une richesse d'information difficile à analyser. Cependant, une des hypothèses pouvant expliquer cette multitude de comportements est liée à l'activité cellulaire. Si celle-ci est impliquée dans les interactions que les cellules ont avec les gaz environnants, en lien avec la consommation de dioxygène ou la production de dioxyde de carbone, leurs membranes doit alors être vue comme une partie de la cellule particulièrement impliquée dans les phénomènes de perte d'énergie par frottement visqueux causée par la mise en écoulement du moût. Ainsi, l'interaction de la membrane avec la phase gazeuse permettrait d'expliquer son impact sur les faibles valeurs de masse volumique en ligne mesurées pour des concentrations relativement élevées de biomasse (culture I, $\rho = 793 \text{ kg m}^{-3}$ pour $X^* = 55 \text{ g l}^{-1}$ - culture V, $\rho = 765 \text{ kg m}^{-3}$ pour $X = 29 \text{ g l}^{-1}$).

Une autre hypothèse considérerait une modification dynamique des propriétés rhéologiques du moût au cours des différentes cultures. Chaque culture tendrait à avoir sa propre évolution rhéologique, mais en suivant des tendances communes. Dans le cas de la culture V d'*Y. lipolytica*, pour une concentration de 30 g l⁻¹, la perte de charge normée pour D1 semble maximale, alors que celle sur D2 croit progressivement (avec l'apparition d'un léger seuil). Sachant que la vitesse de cisaillement sur la conduite D1 est plus faible que sur la conduite D2, il semble que l'augmentation de la viscosité du moût *in situ* est plus importante pour les faibles vitesses de cisaillement de D1 par rapport aux vitesses de cisaillement plus élevées appliquées avec D2. La proportion importante de la phase gazeuse a l'air d'expliquer cette différence entre les deux conduites, chacune d'entre elles faisant circuler un moût homogène.

Une tendance équivalente est également observée avec une culture d'*E. coli*. Lors de la culture III, on observe, sur la conduite D1, une augmentation de la perte de charge normée à partir d'une concentration de 25 g l⁻¹. A l'inverse, sur la conduite D2, la perte de charge normée chute à partir d'une concentration de 19 g l⁻¹ jusqu'à une concentration de 33.5 g l⁻¹. Ces tendances inversées confirment la diminution de la viscosité *in situ* du moût pour des cisaillements élevés, comme décrit précédemment pour la culture V, en considérant que les vitesses de cisaillement appliquées par D1 sont inférieures aux vitesses de cisaillement appliquées par D2. A nouveau, au cours de l'observation de ces tendances inversées de perte de charge normée entre les conduites, on remarque que la fraction gaz s'accroît considérablement pour les mêmes plages de concentration en biomasse,

passant de 973 kg m^{-3} à 25 g l^{-1} à 875 kg m^{-3} à 33 g l^{-1} . La contribution de la phase gazeuse, dans le comportement rhéologique *in situ* observé pour le moût, au cours de l'analyse à débit constant des mesures en ligne, semble se confirmer.

D. Bilan des mesures à débit constant

L'analyse en ligne de la masse volumique, de la conductivité électrique, et des pertes de charge normées pour les deux conduites a permis de révéler la présence de seuils de concentration en fonction du paramètre suivi. Pour l'ensemble des cultures, il est alors possible de dresser un récapitulatif des seuils identifiés où les dynamiques observées montrent une rupture dans leur évolution en fonction de la concentration en biomasse. Le *Tableau 40* rassemble les différents seuils observés pour les cultures d'*E. coli*.

Seuil	Culture	I	II	III
1	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$		∅	∅
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$		∅	26.11 ; 2
	$\rho ; X_\rho$		992 ; 6	990 ; 4
2	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$			1.15 ; 25
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$			26.06 ; 19
	$\rho ; X_\rho$			973 ; 25
3	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$			∅
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$	25.91 ; < 48		19.18 ; 33.5
	$\rho ; X_\rho$			875 ; 33
4	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$			
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$	25.80 ; 60		
	$\rho ; X_\rho$	793 ; 55		
5	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$			
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$	29.52 ; 100		
	$\rho ; X_\rho$	781 ; 100		

Tableau 40 : Seuils de concentration identifiés pour les cultures d'*E. coli* (∅ : aucun seuil observé - en grisé : aucune donnée)

Les trois cultures d'*E. coli* ont toutes eu pour objectif la production de biomasse, y compris au cours des phases de préculture à haute concentration cellulaire (culture I). Les seuils de concentrations et l'allure des dynamiques observées laissent à penser à une allure unique pour des concentrations allant de 0.1 à plus de 100 g l⁻¹. La *Figure 135* représente un schéma hypothétique d'une culture parfaitement maîtrisée avec *E. coli* en production de biomasse catalytique.

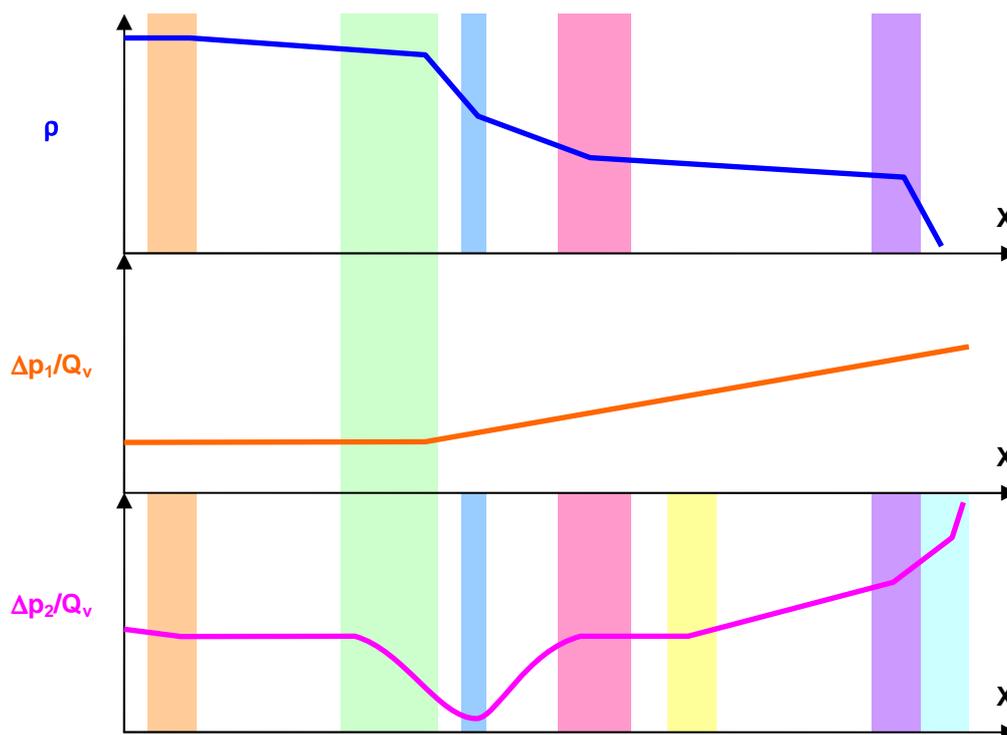


Figure 135 : Hypothèse de représentation schématique de la dynamique de la masse volumique et de pertes de charge normées en ligne pour une production de biomasse chez *E. coli*

La Figure 135 intègre l'ensemble des dynamiques observées pour les trois cultures d'*E. coli* mises en œuvre. Elle représente ainsi un comportement unique du suivi physique du moût dans le cas d'une culture bactérienne idéale d'*E. coli*.

Concernant les cultures levuriennes, le Tableau 41 présente les seuils pour les différentes cultures d'*Y. lipolytica*.

Seuil	Culture	IV	V	VI
1	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$		1.35 ; < 10	∅
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$			26.86 ; 7
	$\rho ; X_\rho$		943 ; < 12	994 ; 4
2	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$		1.89 ; 20	∅
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$		27.35 ; 21	∅
	$\rho ; X_\rho$		902 ; 20	∅
3	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$	2.70 ; < 74	4.45 ; 30	1.36 ; 33
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$	32.53 ; < 74	28.78 ; 38	∅
	$\rho ; X_\rho$		765 ; 29	955 ; 33
4	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$	2.75 ; 82	2.54 ; 50	∅
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$	37.87 ; 84	31.42 ; 60	∅
	$\rho ; X_\rho$	899 ; 80	878 ; 50	896 ; 51
5	$\Delta p_1/Q_v ; X_{D1}$	6.67 ; 105	2.90 ; 91	
	$\Delta p_2/Q_v ; X_{D2}$	60.70 ; 105	32.91 ; 92	
	$\rho ; X_\rho$	984 ; 95	∅	

Tableau 41 : Seuils de concentration identifiés pour les cultures d'*Y. lipolytica coli* (∅ : aucun seuil observé - en grisé : aucune donnée)

Comme pour les cultures d'*E. coli*, différents seuils ont pu être identifiés sur les cultures d'*Y. lipolytica*. Cependant, toutes les précultures n'ayant pas été conduites pour une obtention de biomasse catalytique (cas des cultures IV et V), les seuils de concentration se recourent difficilement entre les cultures.

La *Figure 136* représente un schéma hypothétique idéal d'une culture d'*Y. lipolytica* parfaitement maîtrisée dans un objectif de production de biomasse catalytique.

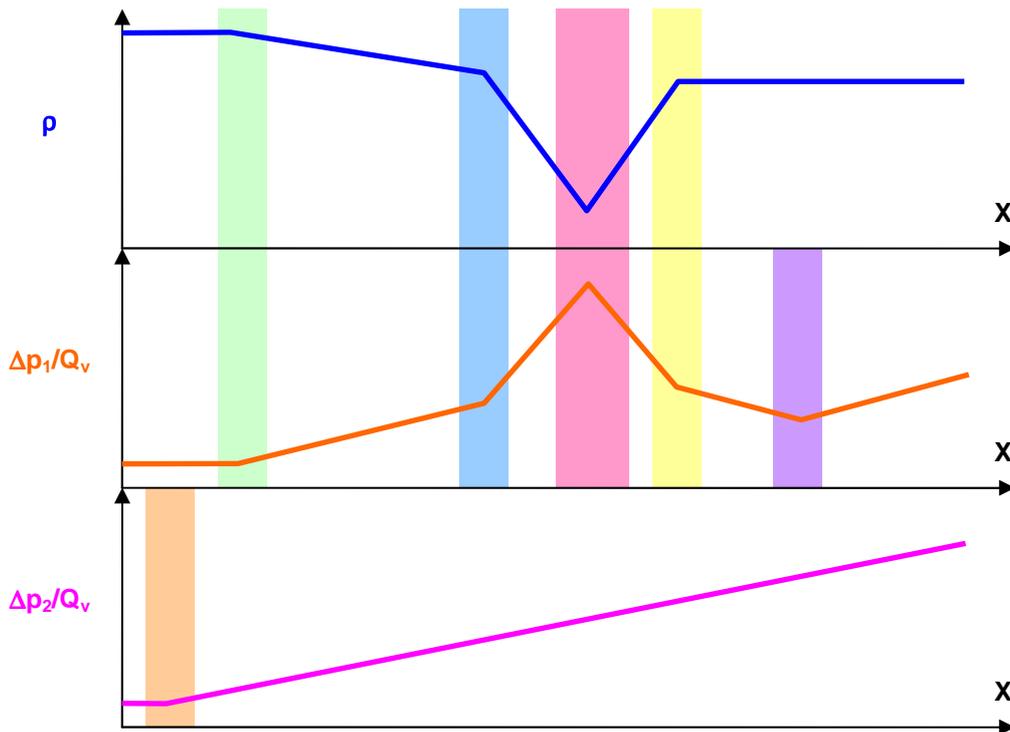


Figure 136 : Hypothèse de représentation schématique de la dynamique de la masse volumique et de pertes de charge normées en ligne pour une production de biomasse chez *Y. lipolytica*

La Figure 136 intègre l'ensemble des dynamiques observées pour les trois cultures d'*Y. lipolytica* mises en œuvre, en accordant une importance plus élevée à la culture V et VI. La figure ci-dessus représente alors une allure hypothétique idéale des paramètres physiques du moût dans le cas d'une culture levurienne d'*Y. lipolytica*.

Les pertes de charge résultent d'une dissipation d'énergie par frottement et sont liées au régime d'écoulement et au comportement rhéologique du milieu. Elles nous révèlent un comportement du moût où celui-ci semble à la fois être impacté par l'activité biologique et par la concentration en biomasse provoquant une modification de la viscosité du moût et du régime d'écoulement en conduite. Plus largement, il semble que le comportement rhéologique se modifie et évolue en passant progressivement d'un comportement newtonien, proche de celui de l'eau, à un comportement non newtonien, en lien avec la fraction gazeuse du moût. L'emploi de deux conduites permettant de suivre des pertes de charge normées informe sur le comportement global du moût pour deux vitesses de cisaillement distinctes.

III. GRANDEURS PHYSIQUES EN LIGNE LORS DE SEQUENCES

Les chapitres II et III ont mis en lumière l'originalité et la spécificité de notre démarche pour investiguer les propriétés physiques en ligne des moûts en étudiant une plage de débit permettant de couvrir une large gamme de vitesse de cisaillement. Dans la mesure où ces séquences de débit sont d'une durée limitée, l'information obtenue peut être assimilée à une information ponctuelle et permettre d'accéder à une caractérisation plus large. Cette démarche s'appuie d'une part, sur une analogie avec la rhéométrie hors-ligne, et d'autre part, sur la caractérisation d'une courbe d'écoulement au lieu d'une mesure ponctuelle pour un cisaillement donné.

Notre démarche se heurte cependant à plusieurs difficultés d'ordre expérimental et d'interprétation. Nous ne disposons d'aucun recul quant à la gestion des séquences de débits (allure des séquences, durée des paliers, nombre de paliers, durée totale). En effet, l'originalité de l'outil expérimental repose sur le fait qu'aucune référence bibliographique n'existe sur les paramètres de gestion de la boucle de dérivation. La première approche s'orientant sur une analyse bibliographique des vitesses spécifiques de consommation de dioxygène des souches mises en œuvre imposerait que ces mêmes vitesses de consommation soient obtenues pour des conditions de pression identiques. Or, ce paramètre est difficile à intégrer sur l'ensemble de l'outil expérimental. Celle-ci est constante dans le bioréacteur, augmente brusquement en sortie de la pompe de la boucle de dérivation (surpression dans la boucle), pour ensuite décroître progressivement le long du circuit (vitesse de consommation et temps de séjour) jusqu'au retour du moût dans le bioréacteur. L'impact de la pression hydrostatique sur le métabolisme microbien est alors important, faisant différer les vitesses spécifiques pour lesquelles des éléments de réponse de paramétrage des séquences auraient pu être obtenus. Une approche plus empirique a alors été effectuée de manière à minimiser l'impact des séquences sur les réponses physiques et physico-chimiques macroscopiques du moût. De plus, l'évaluation des moyennes et des variances pour chaque paramètre physique doit être conduite en tenant compte d'une part des mesures faites à débit nominal, et d'autre part des variations de pression au sein de la boucle de dérivation.

Le cheminement de ce travail conduira à décrire qualitativement différentes séquences testées, pour différentes cultures, afin d'en déduire un protocole optimal. De plus, la comparaison de différents profils de séquence permettra d'émettre certaines recommandations liées au couple stabilité/bruit sur les mesures, aux temps caractéristiques employés dans le paramétrage des séquences, ou à l'ordre des débits à appliquer (ascendant et/ou descendant). Enfin, l'analyse de l'évolution des mesures en ligne au cours des cultures permettra de discuter la précision du suivi *in situ*, et la pertinence des valeurs utilisées pour les calculs d'estimations de la viscosité en ligne.

A. Scenarii de caractérisation ponctuelle *in situ*

1. Test d'optimisation

La mise en place des profils de débit a été imaginée à partir de profils effectués au cours de la culture I d'*E. coli* (historiquement la première expérimentation réalisée). A ce stade de développement de l'outil expérimental, seuls les profils pyramidaux sont gérés par un pilotage informatique. Les profils en créneaux ont été effectués manuellement par une reprise ponctuelle du contrôle du débit de circulation de la pompe *via* le variateur de puissance.

La culture I a permis de tester, en version manuelle, les allures de séquences qui ont été par la suite intégrées au logiciel LoCoPREL afin de laisser le choix des profils de débit aux futurs opérateurs. Ces premiers tests ont été nécessaires pour définir la stratégie de programmation de séquences la plus adaptée.

La culture I est conduite en mode discontinu alimenté (fed-batch). C'est une culture axénique en mode oxydatif avec un pilotage des flux carbonés en l'absence de limitation en dioxygène. La boucle de dérivation est un circuit exogène d'un point de vue biologique (non nécessaire à la culture). Globalement, si la circulation dans la boucle de dérivation est rapide (temps de séjour de quelques secondes), le comportement macroscopique de la culture sera proche d'une culture en bioréacteur classique. La présence de la boucle de dérivation implique un risque de limitation en dioxygène, et une possibilité de bascule métabolique due à un stress pouvant induire une production de métabolites secondaires. Si le temps de séjour dans la boucle de dérivation devient important (par la diminution du débit de circulation), le microorganisme peut subir un stress causé par le manque de substrat carboné et/ou une limitation en dioxygène. Si ce stress est répété (par le nombre de séquences effectuées), la culture peut, à terme, s'éloigner de son comportement initial observé en bioréacteur classique.

Les cultures I, IV et V ont été effectuées avec le logiciel développé sous LabView®, qui permet une caractérisation *in situ* ponctuelle du moût avec des séquences en paliers. Ce premier logiciel ne permettait qu'un seul type de séquence de débit, à savoir une allure pyramidale. Les cultures II, III et VI ont été gérées par le logiciel LoCoPREL qui permet, entre autres, de pouvoir effectuer des séquences de débit en créneaux gérées depuis le logiciel.

Au cours de la culture I, les séquences pyramidales sont effectuées avec une gestion par le logiciel sous LabView® et des séquences en créneaux ont été effectuées manuellement afin de pouvoir comparer les deux types de séquences sur une même matrice. La *Figure 137* présente la masse volumique et la conductivité électrique en fonction du débit volumique dans la boucle de dérivation pour une concentration de 66 g l⁻¹. La *Figure 138* illustre les mêmes variables pour une concentration de 102 g l⁻¹. Pour ces deux figures, les résultats distinguent les phases de débit volumique pyramidales descendantes et ascendantes.

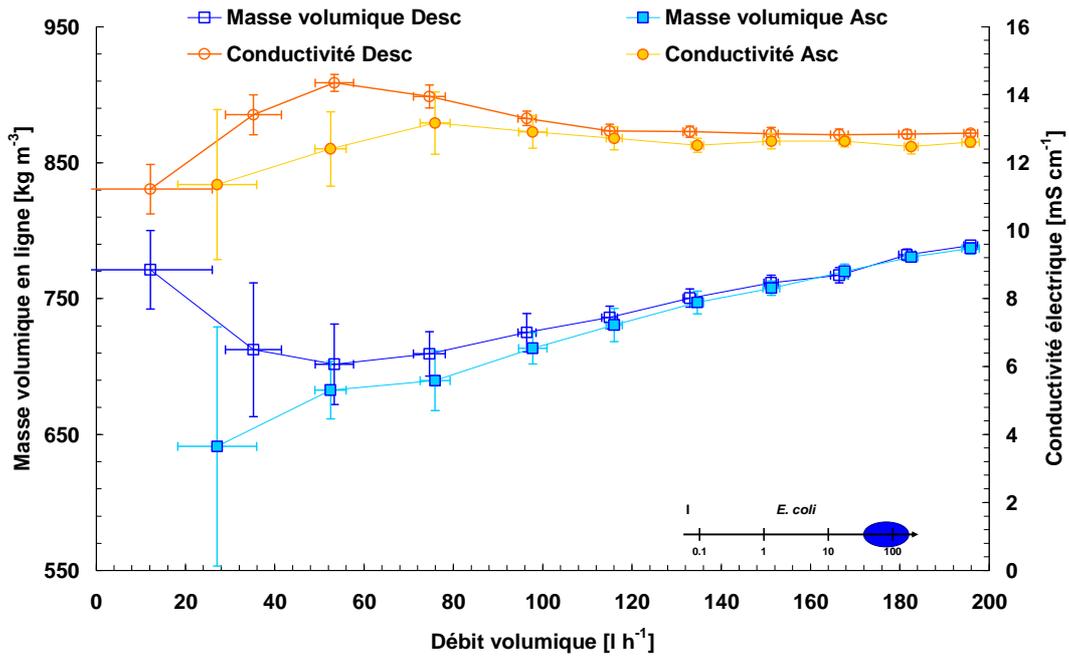


Figure 137 : Masse volumique et conductivité électrique en fonction du débit volumique, et leurs écart-types associés, pour une séquence pyramidale descendante et ascendante (culture I, *E. coli*, t = 5.6 h, X = 66 g l⁻¹)

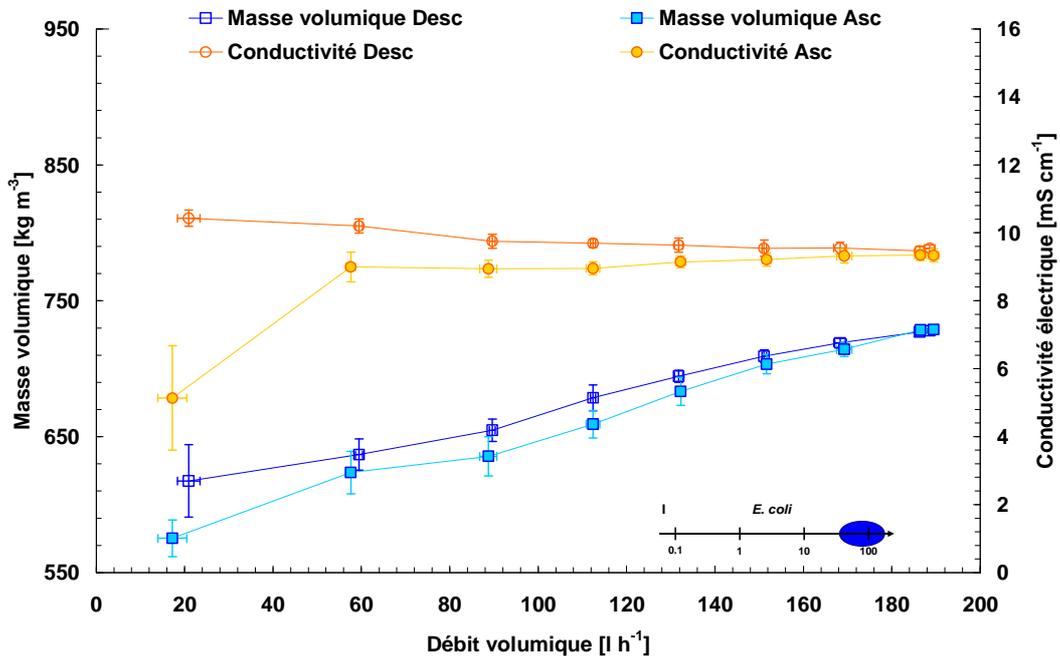


Figure 138 : Masse volumique et de la conductivité électrique en fonction du débit volumique, et leurs écart-types associés, au cours d'une séquence pyramidale descendante et ascendante (culture I, *E. coli*, t = 14.8 h, X = 102 g l⁻¹)

La comparaison de la Figure 137 et de la Figure 138 montre que la variabilité des mesures, pour une concentration en biomasse de 66 g l⁻¹ et 102 g l⁻¹, est différente, suggérant que la concentration de la

biomasse a un impact sur la variabilité des mesures. Cette différence permet de visualiser une hystérésis entre les valeurs obtenues en paliers pyramidaux descendants et ascendants. De manière générale, la diminution du débit de circulation dans la boucle de dérivation tend à dilater les bulles présentes dans la boucle de dérivation, faisant ainsi diminuer la valeur de la masse volumique enregistrée. Nous reviendrons sur cet aspect dans la suite de ce document. Néanmoins, on remarque que les valeurs enregistrées en palier pyramidal descendant sont systématiquement supérieures aux valeurs enregistrées en palier pyramidal ascendant. Cette remarque a été confirmée pour l'ensemble des cultures (culture I, IV et V). Ce systématisme indique que le moût a évolué par une augmentation de gaz provoquant une diminution de masse volumique. Cette évolution est la conséquence de la libération de gaz par la biomasse en métabolisme respiratoire.

L'observation de la conductivité électrique montre également un décalage entre les valeurs obtenues en paliers pyramidaux descendants et ascendants. Les valeurs obtenues au cours des débits descendants sont également systématiquement supérieures à celles obtenues en débits ascendants. Cette observation permet de confirmer la possibilité d'augmentation de la phase gazeuse dans le moût pouvant biaiser les valeurs mesurées comme cela semble être le cas avec la mesure de la conductivité électrique.

Dans ces conditions, afin de réaliser des mesures sur un milieu le plus proche possible du milieu biologique présent dans le bioréacteur, seules les mesures effectuées à débit descendant au cours des séquences seront conservées lors de l'analyse des résultats.

Lors de la diminution du débit de circulation au cours d'une séquence, le temps de séjour du moût dans la boucle de dérivation augmente. Le risque d'un stress lié à une limitation nutritionnelle (en carbone ou en dioxygène) augmente significativement. Pour éviter ce stress, un débit nominal est imposé entre les paliers de la séquence pour renouveler la biomasse contenue dans la boucle de dérivation. Ce type de séquence est dit « en créneau ». Afin d'étudier la faisabilité des séquences en créneaux, celles-ci ont été testées au cours de la culture I avec l'application de consignes manuelles sur la pompe de la boucle de dérivation. La masse volumique et la conductivité électrique enregistrées au cours de ces séquences tests sont comparées à une séquence pyramidale effectuée 20 min après une séquence test en créneau. Ces résultats sont présentés dans la *Figure 139*.

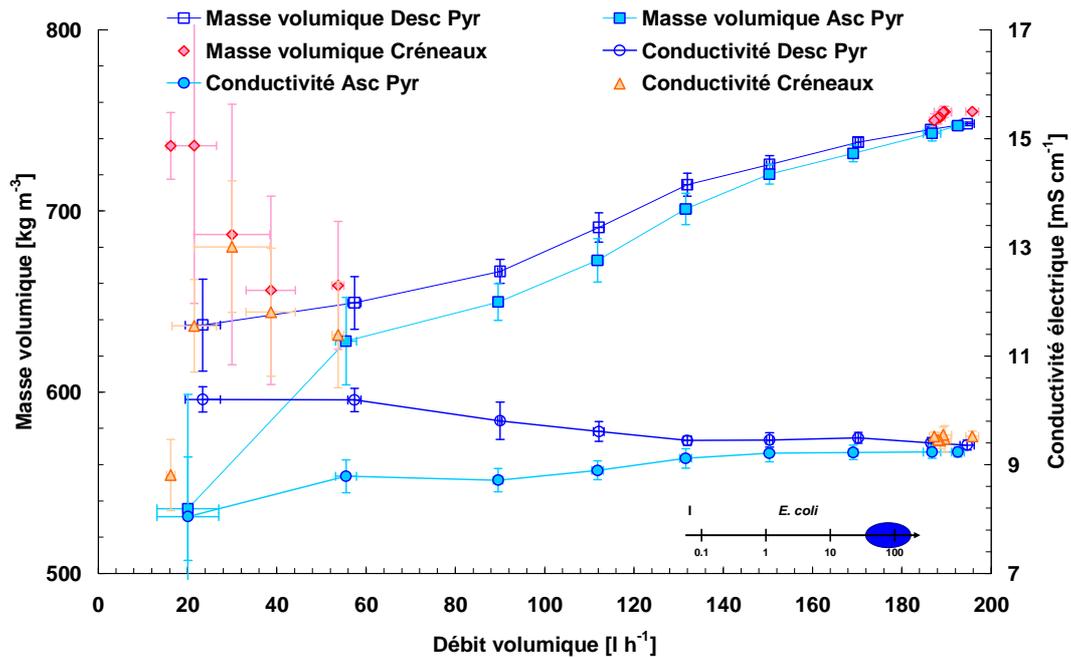


Figure 139 : Masse volumique et conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés, pour des séquences en créneau (rose/orange), pyramidal (bleu) descendant et ascendant (culture I, *E. coli*, t = 12.3 h, X = 108 g l⁻¹)

Comme décrits précédemment, les résultats obtenus en débit descendant sont systématiquement supérieurs par rapport aux résultats obtenus en débit ascendant. De manière générale, la variabilité des mesures augmente avec la diminution du débit volumique. Cela reste acceptable pour la séquence pyramidale, à l'exception du débit le plus faible de la séquence. C'est pour essayer de mieux investiguer les faibles débits volumiques qu'une séquence de débit avec une allure en créneaux est préconisée. Pour les débits volumiques importants, les résultats sont proches entre une séquence à allure pyramidale et une séquence en créneaux. Mais, lors du balayage des faibles débits, on remarque que la variabilité est bien plus importante pour une séquence en créneaux par rapport à une séquence pyramidale. La diminution rapide de pression au sein de l'installation dilate grandement la phase gazeuse présente, engendrant une forte perturbation des signaux enregistrés. Cependant, les perturbations appliquées aux cellules sont malgré tout largement diminuées puisque le temps de séjour des cellules dure légèrement plus d'un créneau de débit (environ 45 s), contre plusieurs minutes pour une séquence pyramidale. Ces perturbations sont traduites par une importante variabilité visible sur les mesures en ligne, tant sur la masse volumique que sur la conductivité électrique *in situ*. Ceci va représenter une difficulté supplémentaire pour l'obtention d'un écoulement laminaire dans la conduite calibrée. On peut envisager pouvoir diminuer le débit jusqu'à 3.1 l h⁻¹ correspondant à la valeur minimale de débit indiqué par le constructeur de la pompe (cf. *Chapitre II I.C Boucle de dérivation et environnement*). Cependant, dans le cas présenté sur la culture I, en dessous de 60 l h⁻¹, une mesure en ligne n'est plus fiable, que celle-ci soit effectuée avec une séquence pyramidale ou avec une séquence en créneaux.

2. Comparaisons d'allures de séquences

Au cours de nos cultures, deux allures de séquences de débits sont testées : allure pyramidale et en créneaux. Au cours de la séquence, la période d'échantillonnage est augmentée par rapport à celle imposée à débit constant de manière à obtenir rapidement des données physiques. Ainsi, le stress hydrodynamique, imposé par la diminution du débit, est limité par le temps de séjour réel dans la boucle de dérivation. Pour l'ensemble de nos cultures, la durée des paliers est fixée à 30 s pour une période d'échantillonnage de 1 s (durée minimale pouvant être appliquée par le système d'acquisition). Les consignes de débit entrées vont de 20 à 220 l h⁻¹ avec une corrélation tension de pilotage U [V] / débit appliqué Q [l h⁻¹] avec l'eau et déterminée en sortie de pompe de $Q = 64.679 U + 5.4171$.

La Figure 140 illustre la mesure du débit massique et de la conductivité électrique du milieu initial ; la Figure 141 présente la masse volumique et la pression relative enregistrées sur ces milieux exempts de biomasse. Ces deux figures sont issues des milieux utilisés pour les cultures III d'*E. coli* et VI d'*Y. lipolytica*.

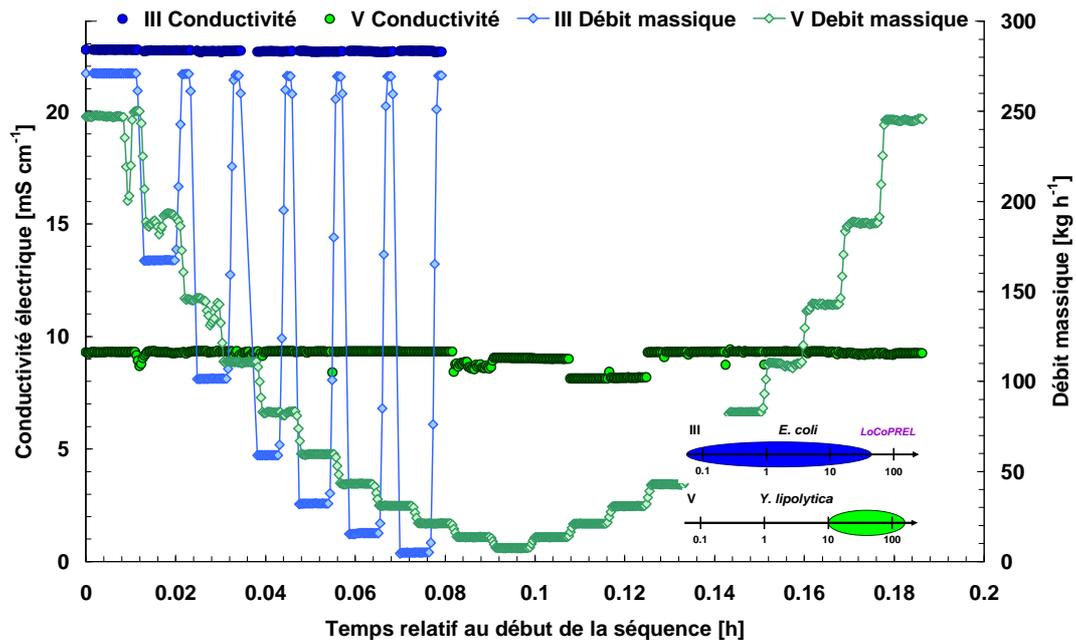


Figure 140 : Conductivité électrique et débit massique mesurés sur le milieu minimum avant inoculation au cours d'une séquence de débit (cultures III, *E. coli* - culture V, *Y. lipolytica*)

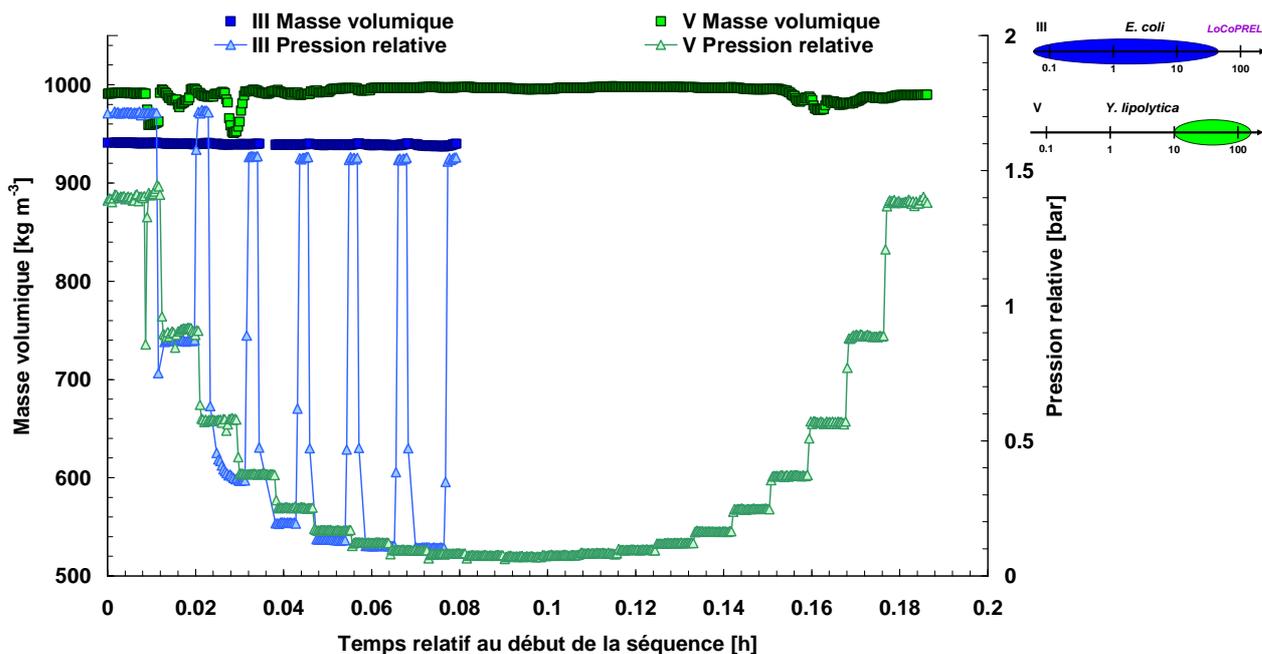


Figure 141 : Masse volumique et pression relative mesurées sur le milieu minimum avant inoculation au cours d'une séquence de débit (cultures III, *E. coli* - culture V, *Y. lipolytica*)

De manière générale, les mesures de débit massique et de pression relative sont parfaitement synchrones et rendent aisément identifiables chaque palier. La compressibilité de la phase gaz est primordiale pour l'interprétation de nos mesures au long des séquences. Les phénomènes de dépression de bulles circulant dans la boucle de dérivation impactent ponctuellement les données enregistrées, mais sont clairement identifiables (masse volumique, conductivité). Les phénomènes de dépression de bulles au sein de l'outil expérimental seront plus précisément abordés dans la partie *III.B.1 Densimétrie en ligne*.

La comparaison de la caractérisation *in situ* de ces deux milieux minimums montre des paliers de mesure stabilisés avec une faible variabilité. Malgré un temps de stabilisation plus long pour une séquence en créneaux (cas de la culture III d'*E. coli*), les mesures effectuées avec ces deux allures de séquences semblent identiques en termes d'informations pouvant être obtenues.

Lorsque le milieu contient de la biomasse, les allures se modifient drastiquement. Des exemples distincts de deux cultures sont présentés ci-dessous. Dans un premier cas, une séquence de débit en créneaux est illustrée pour la culture III d'*E. coli* en condition de diminution de l'activité biologique ($t = 119.0$ h, $X_{\text{inactif}} = 24.9$ g l⁻¹). Le deuxième cas présenté est une séquence pyramidale obtenue en condition de croissance de la biomasse pour la culture V d'*Y. lipolytica* ($t = 14.5$ h, $X = 36$ g l⁻¹). Ces deux séquences de débit, en présence de biomasse, avec différents scénarii d'investigation, permettent de traduire la difficulté rencontrée généralement au cours des cultures microbiennes.

La *Figure 142* illustre la conductivité électrique et le débit massique pour une séquence de débit pour la culture III à 119.0 h, et pour la culture V à 14.5 h.

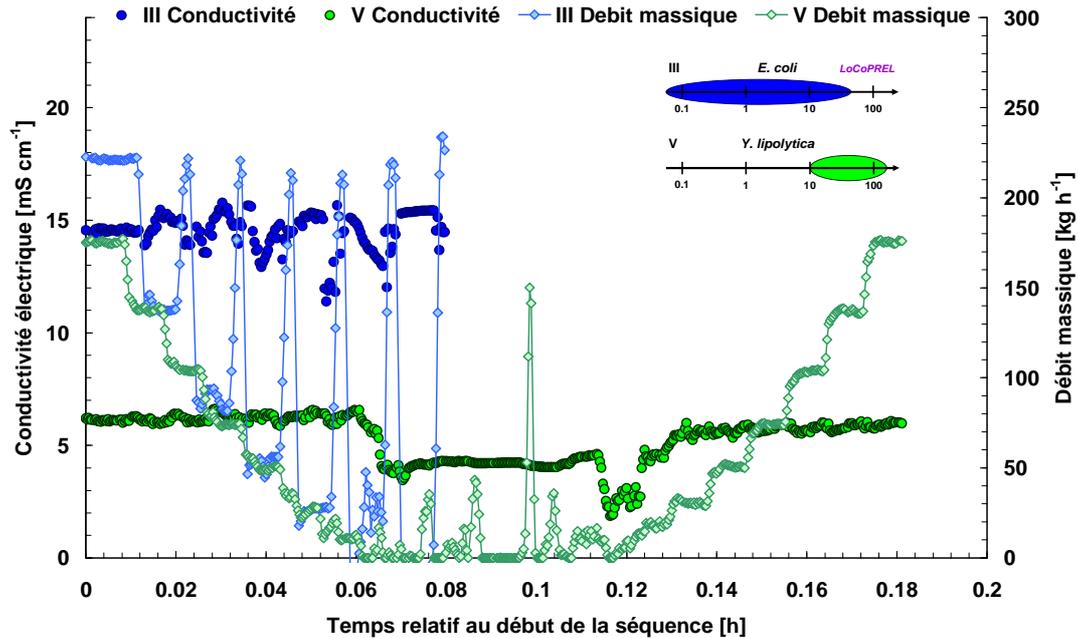


Figure 142 : Conductivité électrique et débit massique mesurés au cours d'une séquence de débit en présence de biomasse (cultures III, *E. coli*, $t = 119$ h, $X_{\text{inactif}} = 24.9$ g l⁻¹ - culture V, *Y. lipolytica*, $t = 14.5$ h, $X = 36$ g l⁻¹)

En comparant la *Figure 142* avec la *Figure 140*, on observe que la présence de la biomasse et/ou de bulles dans le milieu entraîne des modifications sur les mesures de la conductivité électrique. La phase gaz semble avoir un impact sur la qualité des mesures de conductivité électrique. Avant inoculation, cette mesure était stable et non impactée par les changements de débit de circulation. Dans le cas présenté par la *Figure 142*, on observe des fluctuations de la mesure pouvant être induites par la fraction gaz présente et circulant dans les conduites. Cela est clairement identifié sur les données présentées de la culture III. Concernant la culture V, on observe que le bruit observé sur les mesures de la conductivité électrique est moindre. Néanmoins, on note des chutes abruptes du niveau moyen enregistré. Cela est induit par la commande électrique de la pompe. En effet, de manière à comparer plus facilement les données des diverses séquences de débit, les paramètres sont maintenus constants pendant chaque expérimentation. Or, la relation entre la commande électrique et le débit volumique délivré se modifie en cours de l'expérimentation à cause des changements de propriétés physiques du moût. On peut donc se trouver dans une configuration où, malgré une tension correctement calculée et délivrée à la pompe de la boucle de dérivation, cette consigne ne permet pas d'assurer physiquement un débit. La pompe utilisée est une pompe volumétrique, dont le débit de fuite est croissant lorsque la viscosité du milieu mis en circulation diminue. Ceci est le cas lorsque le débit massique évolue, pour de débits faibles, lors de la mise en circulation de fluide peu visqueux ou ayant une fraction gaz élevée. Dans le cas d'une consigne pour l'application d'un faible débit, le risque de stagnation du moût dans la boucle de dérivation est alors important si la fraction gaz est importante. Cela engendrera un stress et une dénaturation de la portion de moût présente dans les canalisations de la boucle de dérivation (cas de la culture V, *Figure 142* et

Figure 143). Cependant, cela est moins important si cela se produit au cours de la phase de diminution de l'activité cellulaire (cas de la culture III, Figure 142 et Figure 143), La Figure 143 présente la masse volumique et la pression relative en sortie de la pompe de mise en circulation du moût, dans la boucle de dérivation, enregistrées sur les mêmes matrices que la Figure 142.

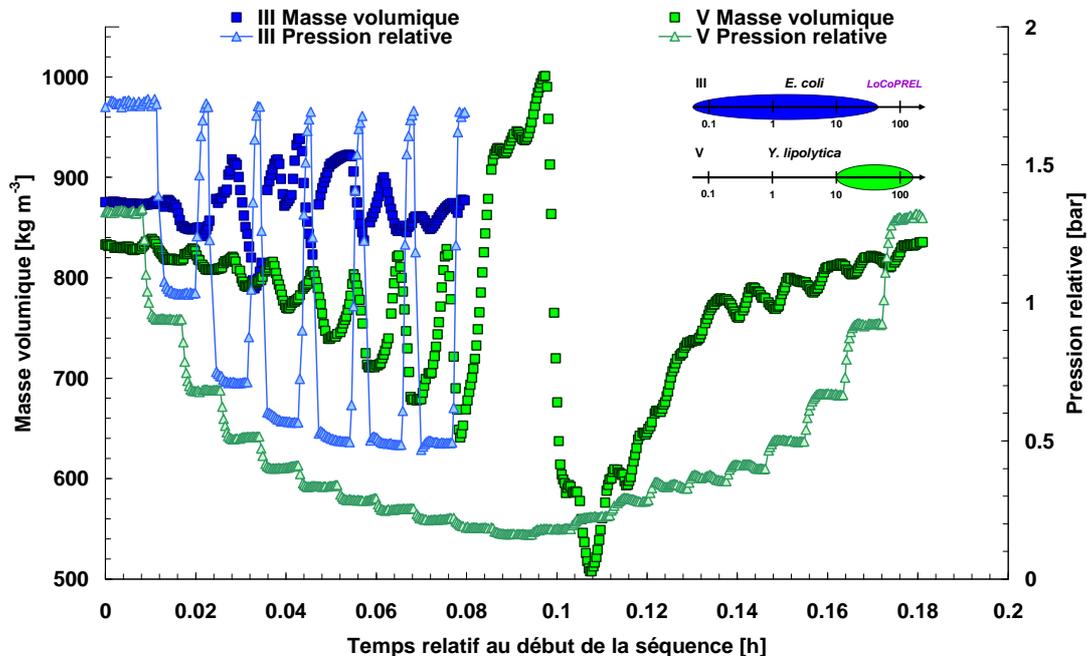


Figure 143 : Masse volumique et pression relative mesurées au cours d'une séquence de débit en présence de biomasse (cultures III, *E. coli*, $t = 119$ h, $X_{\text{inactif}} = 24.9$ g l⁻¹ - culture V, *Y. lipolytica*, $t = 14.5$ h, $X = 36$ g l⁻¹)

La fraction de gaz présente dans le moût se dilate à chaque diminution de la pression relative (engendrée par la diminution du débit de circulation). La difficulté d'obtention d'une mesure stable se voit parfaitement sur les données de masse volumique de la culture III. L'alternance de débits de circulation élevés et faibles perturbe la fraction gaz présente d'où un impact important sur les mesures de masse volumique en ligne. Cet aspect se confirme à nouveau sur la séquence pyramidale de la culture V. De plus, l'augmentation progressive de la pression relative sur la seconde partie de la séquence pyramidale induit également une augmentation des valeurs mesurées de masse volumique. La proportion de bulles dans l'installation varie en fonction de la pression hydrostatique appliquée, faisant varier la proportion de gaz dans le moût, modifiant rapidement au cours du temps les valeurs mesurées de la masse volumique *in situ*. La compressibilité de la phase gazeuse répondant à la loi des gaz parfaits, la production de gaz au sein de la boucle de dérivation par le microorganisme, et/ou le temps de séjour au sein de l'installation, sont autant d'hypothèses permettant d'apporter des éléments de réponse à cette dynamique. Ces aspects seront plus précisément développés dans la partie III.B.1 Densimétrie en ligne.

Concernant l'évolution de la pression relative, la partie descendante de la séquence pyramidale de la culture V a des plateaux de mesure plus stables que la partie ascendante. Cette amélioration de la

stabilité des mesures s'explique par les valeurs de masse volumique *in situ* plus faibles sur la partie ascendante ($0.09 \leq t_{\text{relatif}} < 0.18$ h) que sur la partie descendante ($0.00 \leq t_{\text{relatif}} < 0.09$ h). De plus, le moût subit un temps de séjour dans l'installation systématiquement supérieur, lors de l'exemple sur la culture V, sur la partie ascendante par rapport à la partie descendante de la séquence de débit. Cette augmentation du temps de séjour peut être une cause de stress supplémentaire subie par le microorganisme en termes de limitation ou de carence en dioxygène ou en substrat.

Au cours des cultures en condition de production de biomasse, il est impératif de choisir une allure en créneaux pour la caractérisation ponctuelle *in situ* du moût. Ceci permet de renouveler les cellules initialement présentes dans la boucle de dérivation de manière à leur éviter un stress nutritionnel. L'augmentation de la concentration de la biomasse, ou les profondes modifications des propriétés physiques du moût, sont des paramètres qui vont également dans le sens du choix d'une séquence à allure en créneaux de manière à minimiser la dénaturation de la biomasse.

Idéalement, il serait intéressant de pouvoir intégrer, grâce aux mesures en ligne, le calcul d'un débit volumique minimal réel de consigne. Ceci permettrait de corriger, par les mesures *in situ*, la corrélation débit volumique / tension de consigne utilisée pour le pilotage de la pompe, afin d'assurer un débit de circulation minimal dans la boucle de dérivation.

L'analyse des séquences montre que l'obtention d'une valeur moyenne représentative est complexe. La mise en place de l'outil expérimental a pour principal objectif l'obtention d'informations non dénaturées par un prélèvement et une caractérisation hors-ligne. Malgré le caractère *in situ*, l'outil expérimental doit être utilisé de manière éclairée afin de conserver un caractère non dénaturant.

Dans le cadre de notre étude, les caractérisations ponctuelles *in situ* suivent une allure pyramidale pour les cultures I, IV et V, et en créneaux pour les cultures II, III et VI. Chaque palier à débit constant a une durée de 30 s. Dans le cas d'une allure en créneaux, le retour au débit nominal dure 10 à 20 s. Il est préférable, pour éviter une dénaturation du moût, d'employer une allure en créneaux en balayant les débits de manière descendante uniquement.

Les séquences de débit impliquent de moyenniser la zone où les valeurs sont stabilisées pour chaque débit imposé. Pour cela, chaque transition de débit est retirée après l'analyse visuelle des valeurs de la pression relative (en sortie de pompe de recirculation) et du débit massique mesuré. L'objectif de ce traitement est d'identifier correctement les changements de consigne de la pompe, ainsi que de retirer les points non stabilisés ou en décalage temporel (à cause du temps d'intégration de la mesure par le capteur) pour effectuer la mesure, et obtenir une moyenne représentative du phénomène physique mesuré.

B. Analyse des mesures physiques

L'utilisation de l'outil expérimental permet d'effectuer, ponctuellement, une caractérisation physique du milieu de culture par l'application de scénarii de débit dans la boucle de dérivation. Ces scénarii sont préalablement paramétrés *via* les interfaces utilisées pour la caractérisation des milieux de culture présentés dans ce travail. Deux microorganismes sont étudiés à travers six cultures différentes, permettant de décrire l'évolution des paramètres physiques enregistrés en fonction du débit de

circulation dans la boucle de dérivation et de la concentration en biomasse au moment de la caractérisation ponctuelle.

1. Densimétrie en ligne

La mesure en ligne de la masse volumique du moût doit nous apporter une information essentielle par rapport à la phase gaz entraînée, au suivi l'activité biologique, et à la quantification de la grandeur elle-même afin de l'intégrer dans le calcul des invariants de similitude.

a. Cultures d'*E. coli*

La Figure 144 présente la masse volumique en ligne en fonction du débit volumique pour les cultures I et III d'*E. coli*, et permet de suivre l'évolution du moût d'une concentration en biomasse nulle à une concentration estimée de 104 g l⁻¹. Des séquences de débits pyramidales (SP) ont été effectuées pour la culture I, alors que des séquences de débit en créneaux (SC) ont été utilisées pour la culture III.

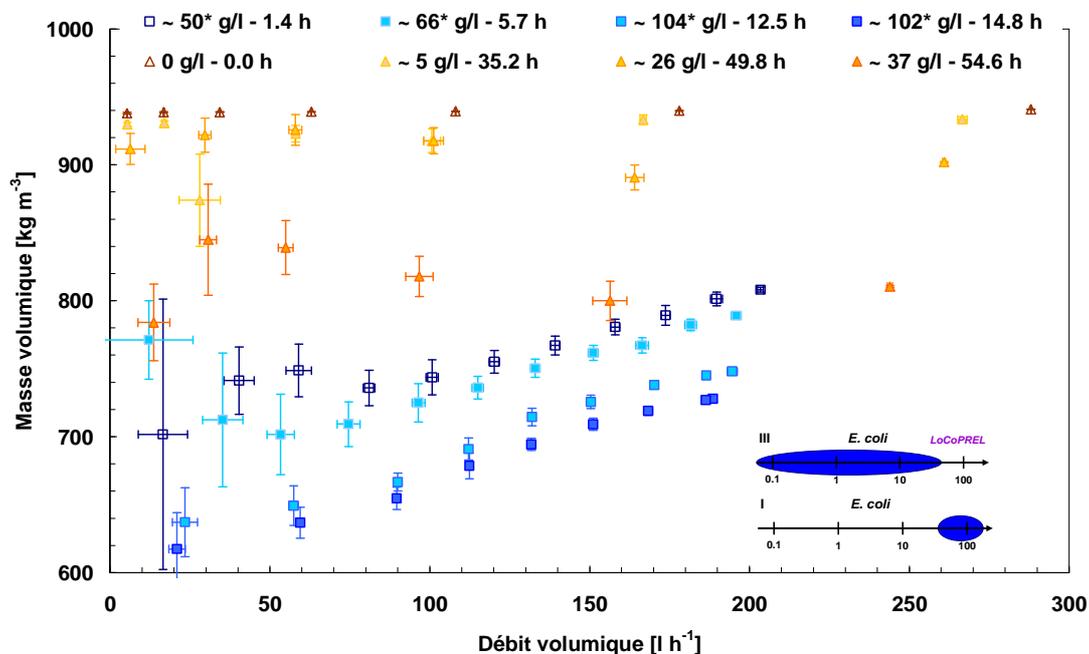


Figure 144 : Masse volumique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture I-SP, III-SC, *E. coli*), *biomasse estimée

De manière générale, pour les débits supérieurs à 100 l h⁻¹, on observe que l'augmentation de la biomasse fait diminuer progressivement la masse volumique du moût. A ce débit, la variabilité des mesures reste faible et il est possible d'observer une évolution significative entre les différentes concentrations en biomasse. Par ailleurs, la diminution du débit de circulation confirme que la biomasse a un impact sur la masse volumique. La présence des bactéries favorisera l'incorporation d'une phase gazeuse dans le moût, indépendamment des conditions physico-chimiques de la phase liquide. En dessous de 100 l h⁻¹, la variabilité augmente énormément en présence de biomasse dans le milieu. Malgré tout on observe une augmentation moyenne de la masse volumique enregistrée.

De plus, les allures en fonction des séquences de débit appliquées (séquence pyramidale ou en créneaux) ne permettent pas d'aboutir au suivi d'un phénomène unique de la masse volumique. Néanmoins, la concentration en biomasse paraît nettement liée à la diminution de la masse volumique, quelle que soit la culture d'*E. coli* et le débit volumique appliqués.

L'augmentation de la valeur moyenne des mesures pour les faibles débits s'explique par deux hypothèses en lien avec le débit de circulation dans la boucle de dérivation. La première hypothèse concerne la représentativité du moût aspiré en bas du bioréacteur. Lors de la diminution du débit de circulation, la force d'aspiration appliquée sur le moût présent dans le bioréacteur est modifiée. Cette force est moins élevée pour des débits de circulation plus faibles, impliquant l'aspiration d'un moût moins riche en bulles, les plus grosses bulles n'étant plus aspirées. Le moût aspiré contient alors une proportion de phase gaz diminuée par rapport aux conditions réelles dans le bioréacteur.

La deuxième hypothèse concerne l'impact de la phase gazeuse aspirée et circulant dans la boucle de dérivation. La diminution du débit implique une diminution de la pression hydrostatique dans le circuit. La phase gaz aspirée et circulant dans la boucle de dérivation augmente son volume pour répondre au changement de pression. La fraction volumique du gaz augmente, faisant diminuer la valeur de masse volumique en ligne mesurée.

Un couplage des deux hypothèses proposées permettrait une explication des dynamiques observées. Ces propositions sont à étayer avec l'ensemble des mesures disponibles.

b. Cultures d'*Y. lipolytica*

Afin de décrire au mieux le milieu levurien d'*Y. lipolytica*, la *Figure 145* illustre la masse volumique en ligne pour une concentration en biomasse faible à moyenne, et la *Figure 146* présente la masse volumique en ligne pour des concentrations moyennes à importantes.

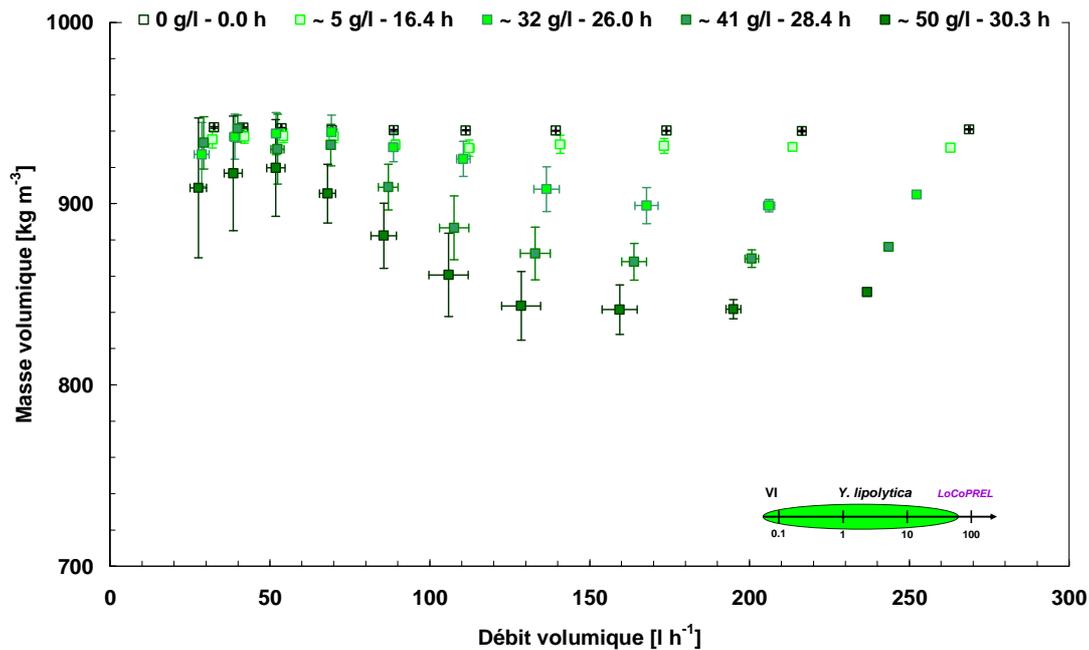


Figure 145 : Masse volumique en fonction du débit volumique, et écarts-types associés (culture VI-SC, *Y. lipolytica*)

La culture VI a été caractérisée par des séquences de débit en créneaux, pour des concentrations en biomasse allant de 0 à 50 g l^{-1} . Pour des débits de circulation dans l'outil expérimental supérieure à 100 l h^{-1} , comme pour les cultures avec *E. coli*, on observe une diminution progressive de la masse volumique mesurée en ligne. Dans ces conditions, il semble que, jusqu'à 50 g l^{-1} , la masse volumique du moût se comporte comme les cultures d'*E. coli*. Des paramètres tels que la forme des cellules ou la fraction volumique de la phase solide peuvent être avancés. Nous reviendrons sur ces possibilités dans le chapitre V. Pour des débits de circulation inférieurs à 100 l h^{-1} , on observe nettement, par rapport à la figure précédente, que la masse volumique en ligne augmente, malgré une augmentation de la variabilité. A nouveau, cette augmentation moyenne peut être expliquée par le phénomène d'enrichissement d'un moût tri-phasique initialement aspiré, par un moût uniquement diphasique dû au faible débit de circulation imposé dans la boucle de dérivation.

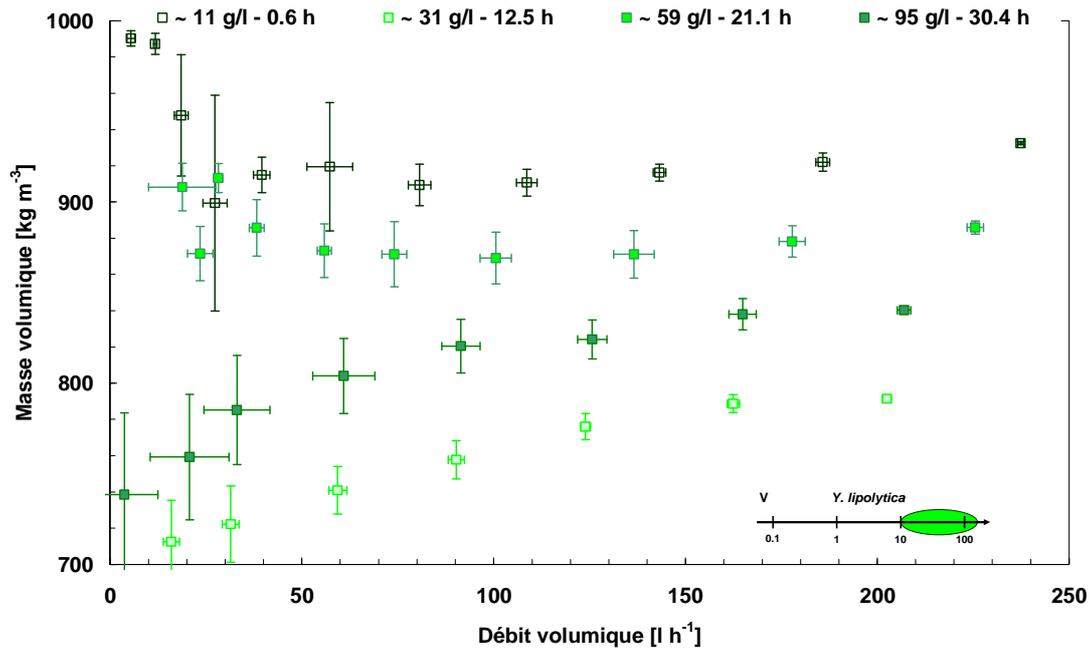


Figure 146 : Masse volumique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture V-SP, *Y. lipolytica*)

La culture V est caractérisée par des séquences de débit pyramidales avec une concentration en biomasse allant de 11 à 95 g l⁻¹. Contrairement à la culture VI, l'évolution de la masse volumique est différente. Pour une meilleure lisibilité, toutes les séquences effectuées n'ont pas été représentées sur la Figure 146. Seules les séquences des évolutions extrêmes sont représentées. Pour la culture V, la masse volumique en ligne est minimale à 31 g l⁻¹, alors que sur la culture VI, elle continue à diminuer jusqu'à 50 g l⁻¹. La culture V montre une remontée de la masse volumique pour 59 g l⁻¹, jusqu'à avoir des valeurs se situant entre les valeurs représentées pour 59 et 95 g l⁻¹. Ce changement de tendance peut avoir différentes origines. L'emploi de différentes allures de séquences (séquence pyramidale ou en créneaux) peut être mise en cause. La culture V a subi différents chocs au cours de sa conduite (élévation de la température, grande fluctuation du pH) pouvant ainsi expliquer un comportement en marge d'une culture parfaitement maîtrisée comme la culture VI. De plus, la forme des cellules entre les deux cultures peut également être avancée. Nous reviendrons sur ce point au chapitre V.

Les cultures V et VI ont eu des historiques totalement différents. Dans le cas de la culture V, les cellules ont subi préalablement une limitation nutritionnelle ayant provoquée une accumulation intracellulaire de molécules de réserve, et donc présentes au moment de l'inoculation dans le bioréacteur. Malgré l'utilisation d'un milieu complété des composés précédemment limitant afin de répondre à l'ensemble des besoins nutritionnels de la levure, la perturbation a pu être conservée sur les générations suivantes. Cette hypothèse pourrait alors aller dans le sens d'une modification de l'affinité de la membrane des cellules avec les bulles du milieu, permettant de faire diminuer la masse volumique du moût.

c. Impact de la fraction gaz

La mesure de la masse volumique en ligne nous informe que, au sein du bioprocédé, la fraction gaz est très importante et correspond à une partie intégrante du moût. L'hypothèse avancée sur la dilatation de la phase gaz, lors de la diminution de la pression appliquée par la pompe, peut se vérifier par une comparaison de l'évolution expérimentale de la masse volumique, et de la dilatation de la phase gaz par rapport à une masse volumique en ligne de référence. Dans ces conditions, le point de référence utilisé est le point de fonctionnement à débit volumique élevé, correspondant au débit de circulation à débit nominal. La masse volumique issue des séquences de débit pour les concentrations en biomasse les plus élevées des cultures précédemment présentées (culture I, III, V et VI) est présentée dans la *Figure 147*. Cette figure, présentée en fonction de la pression relative, illustre également l'évolution de la masse volumique théorique si celle-ci répondait strictement à une dilatation des gaz présent dans la boucle de dérivation.

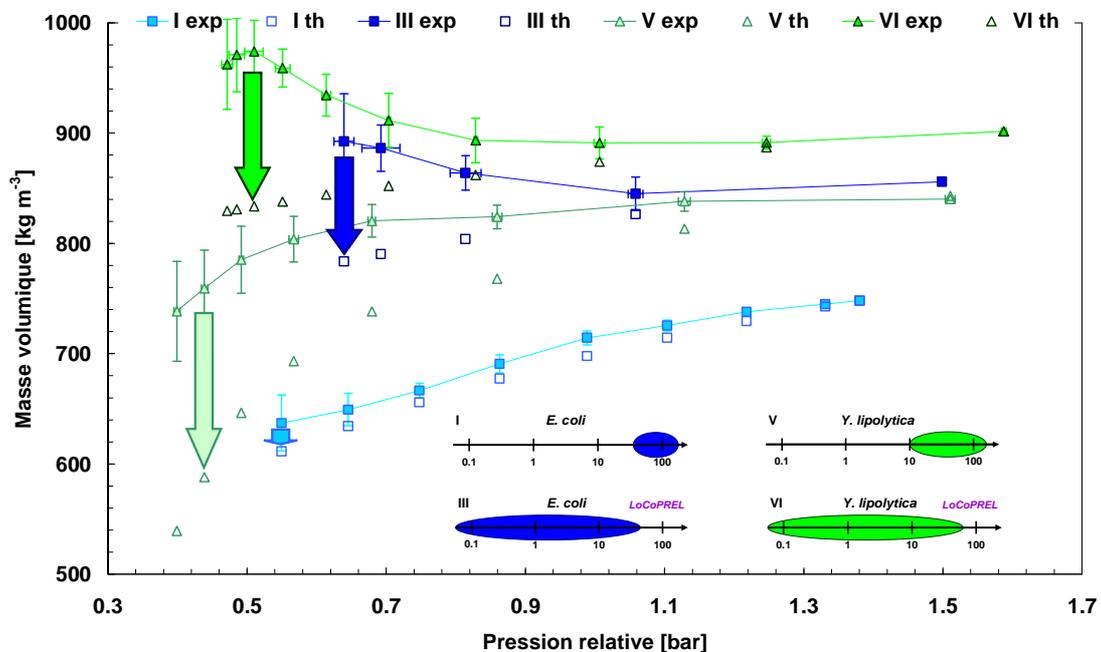


Figure 147 : Masse volumique mesurée et théorique¹ en fonction de la pression relative, et leurs écarts-types associés (culture I, III, *E. coli* - culture V, VI, *Y. lipolytica*)

Pour l'ensemble des cultures, la masse volumique mesurée est systématiquement supérieure à celle estimée si son évolution suivait strictement une dilatation de la phase gazeuse suite à une diminution de la pression hydrostatique. Ceci indique que l'hypothèse d'une aspiration sélective du moût lors de la diminution des débits de circulation se confirme. Cela est particulièrement visible pour les faibles débits, correspondant aux faibles pressions relatives sur la *Figure 147*.

Pour les débits plus élevés, les masses volumiques expérimentales et théoriques semblent en accord si l'on prend en considération la variabilité des mesures représentées par l'écart-type. Dans le cas où

¹ Pas d'estimation de la variabilité pour le calcul de la masse volumique théorique.

l'on considère uniquement ces points à débits élevés, il est alors possible de ré-estimer la masse volumique du moût dans le bioréacteur au niveau du point d'aspiration. Pour cela, il est nécessaire d'estimer, pour chaque séquence, la pression relative pour un débit de circulation nul. Cette pression relative, dénommée pression de référence, permet de considérer, à partir d'une mesure expérimentale, la surpression dans le bioréacteur et la hauteur de moût appliquant une force de pression sur le volume de moût au pied du bioréacteur. Puis, à partir de l'estimation d'un modèle linéaire entre la masse volumique expérimentale et la pression relative, l'utilisation de la pression de référence permet d'obtenir la masse volumique du moût dans le bioréacteur au niveau du point d'aspiration. Pour chacune des séquences présentées, la masse volumique dans le bioréacteur a été ré-estimée, puis tracée en fonction de la concentration en biomasse. La *Figure 148* présente les différentes estimations issues des séquences de débit présentées dans ce travail.

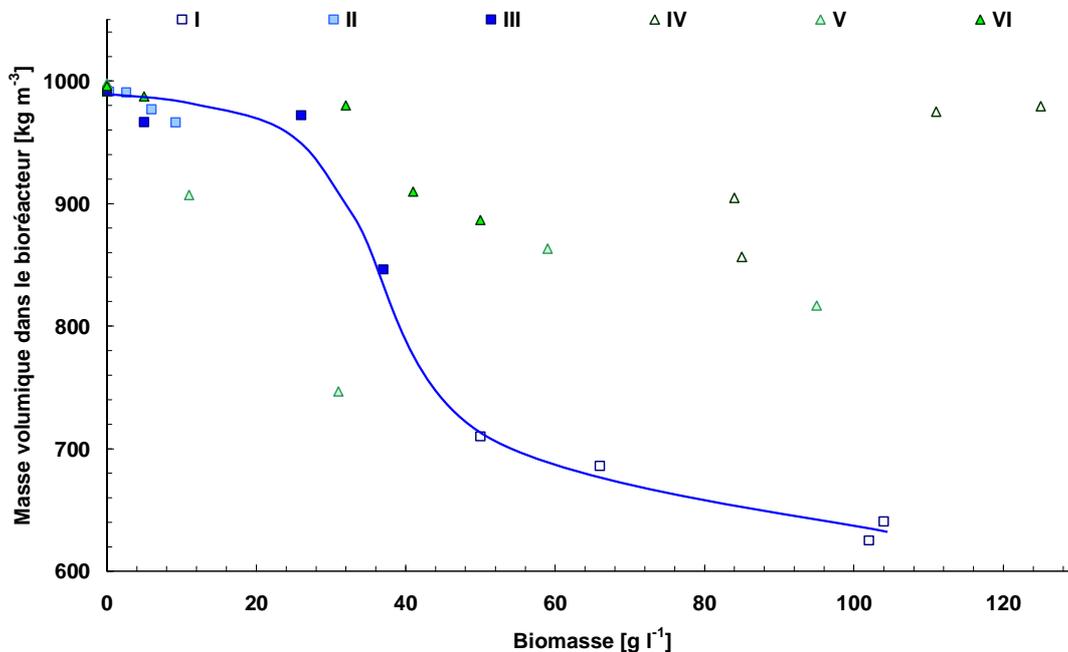


Figure 148 : Estimation de la masse volumique dans le bioréacteur en fonction de la concentration en biomasse

Il est possible de remarquer que les cultures I, II et III d'*E. coli* suivent une tendance unique. Celle-ci est représentée par le trait bleu continu sur la *Figure 148*. Pour les cultures IV, V et VI d'*Y. lipolytica*, il semble difficile d'observer une tendance unique. La diversité d'historique des cultures d'*Y. lipolytica* ne permet pas de conclure sur l'unicité du comportement de ces trois cultures entre elles en fonction de la concentration en biomasse. Chacune des cultures semble être indépendante des autres, ce qui permet d'expliquer la disparité des masses volumiques estimées dans le bioréacteur pour ces cultures.

2. Conductimétrie en ligne

Le suivi de la conductivité électrique du moût nous alerte sur certains phénomènes présents au cours des séquences de débit pouvant modifier l'interprétation finale des résultats de rhéologie en ligne. Les résultats présentés sont basés sur l'impact de la biomasse dans les dynamiques observées de la conductivité électrique en fonction du débit volumique. La hiérarchie des séquences entre elle, pour les débits de circulation élevés, suit l'ordre des mesures effectuées à débit constant.

d. Cultures d'*E. coli*

L'impact de la concentration en biomasse est présenté en *Figure 149* et en *Figure 150* pour deux cultures d'*E. coli* (culture III et I).

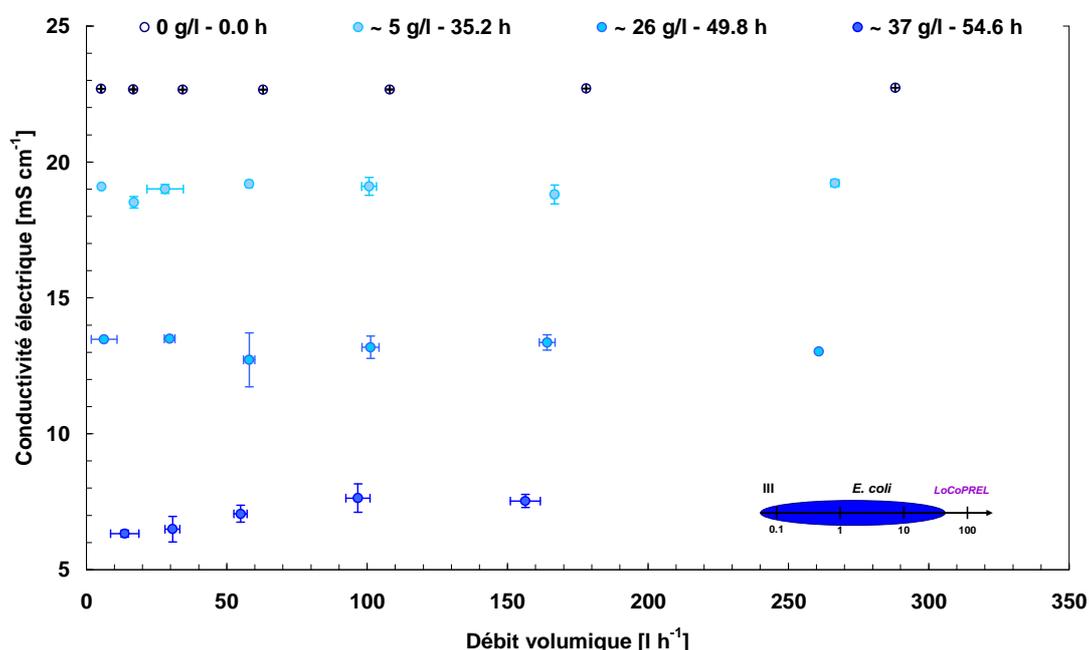


Figure 149 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture III-SC, *E. coli*)

Pour la culture III présentant une concentration en biomasse faible à moyenne, on observe que la conductivité électrique mesurée en ligne reste constante quel que soit le débit volumique balayé. Lors de cette culture, les séquences de débit ont une allure en créneaux (SC). A la concentration de 37 g l⁻¹, on observe une modification de la tendance de la conductivité électrique. Celle-ci reste constante pour des débits volumiques supérieurs à 100 l h⁻¹. Par contre, les valeurs mesurées semblent diminuer pour des débits volumiques inférieurs à 100 l h⁻¹. Ce comportement est à valider pour une culture d'*E. coli* plus concentrée.

La *Figure 150* présente la conductivité électrique en fonction du débit volumique de circulation dans la boucle de dérivation pour la culture I d'*E. coli*. Cette figure décrit les résultats obtenus pour une biomasse estimée allant de 50 à 104 g l⁻¹.

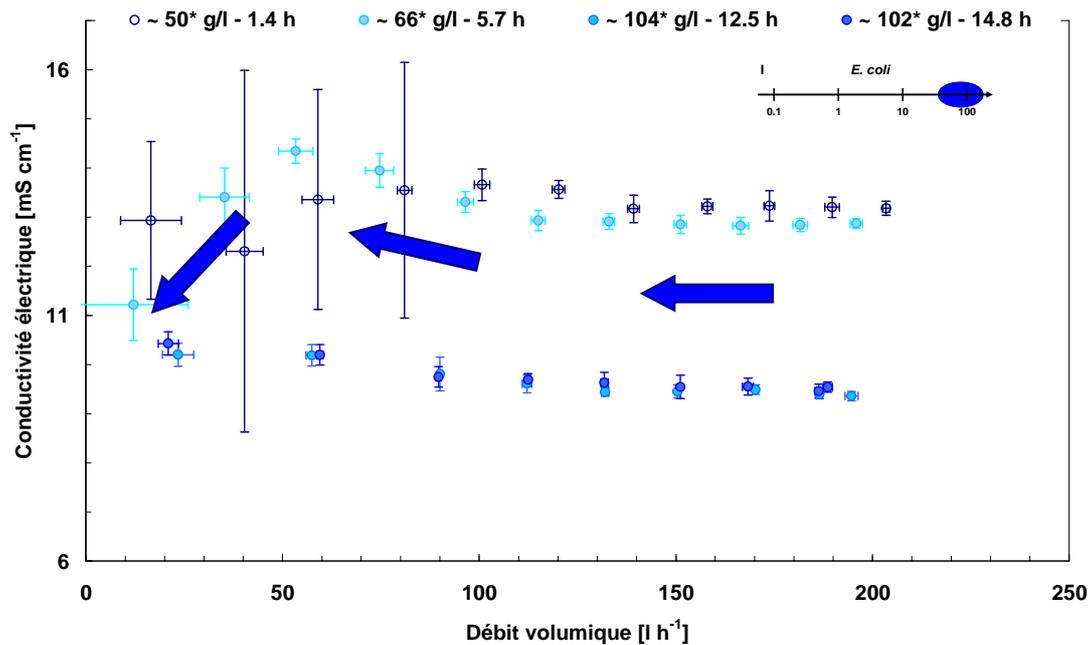


Figure 150 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique de circulation, et écart-types associés (culture I-SP, *E. coli*)

La Figure 150 montre distinctement deux phénomènes. Tout d'abord, comme identifié sur la Figure 149, la conductivité électrique ne semble pas subir de perturbation pour les débits volumiques supérieurs à 100 l h^{-1} . Néanmoins, nous pouvons voir sur la Figure 150 qu'il est possible d'observer une augmentation systématique de la valeur moyenne de la conductivité électrique lors de la diminution du débit volumique. Cela est clairement visible pour les concentrations estimées supérieures à 66 g l^{-1} . La caractérisation de la culture I s'effectue avec des séquences de débit pyramidales. La diminution progressive du débit volumique engendre une diminution progressive de la pression hydrostatique subie par les bactéries dans la boucle de circulation. La pression hydrostatique diminuant, les bactéries répondent de manière à ce que leur pression de turgescence reste stable afin de maintenir leur intégrité physique. Elles agissent alors sur l'eau présente dans leur milieu de manière à rééquilibrer la pression osmotique intra et extracellulaire (Wood, 1999), faisant augmenter la concentration d'espèces chargées dans la phase liquide, et donc la valeur de la conductivité électrique mesurée.

Lorsque le débit volumique devient inférieur à 100 l h^{-1} , on observe une augmentation de la variabilité des mesures, avec une chute de la valeur moyenne mesurée. La chute de la valeur moyenne est clairement visible pour 50 et 66 g l^{-1} , mais n'est plus observée pour les concentrations estimées de l'ordre de 100 g l^{-1} . La concentration de 37 g l^{-1} d'*E. coli* identifiée lors de la culture III semble être un seuil de concentration. En dessous de ce seuil, le moût semble peu ou pas perturbé par la présence de la biomasse. A partir d'environ 37 g l^{-1} de bactéries, pour les faibles débits volumiques, le moût subit une séparation de phase. Les bulles présentes dans le moût se séparent plus rapidement jusqu'à passer d'un milieu triphasique à un milieu diphasique avec une poche de gaz (ou une mousse) en haut de la conduite. Ce phénomène a pu être observé grâce au viseur quartz permettant de suivre visuellement l'évolution de l'écoulement. L'observation de l'allure de la conductivité électrique pour 50

et 66 g l^{-1} montre que le débit volumique de début de séparation de phase diminue avec l'augmentation de la concentration en biomasse dans le moût. On n'observe plus ce phénomène à partir de concentrations de l'ordre de 100 g l^{-1} . Le paramétrage des séquences de débit restant identique sur l'ensemble de l'expérimentation, l'augmentation de la concentration en biomasse implique un temps de séparation de phase de plus en plus élevé à cause de l'interaction entre la phase gazeuse et les bactéries. Cela implique que pour les concentrations de l'ordre de 100 g l^{-1} , la séparation de phase n'a pas eu le temps de se produire.

e. Cultures d'*Y. lipolytica*

Le suivi de la dynamique de la conductivité électrique pour les cultures d'*Y. lipolytica* est présenté dans deux figures distinctes. La *Figure 151* présente l'évolution de la conductivité électrique en fonction du débit dans la boucle de dérivation d'une culture d'*Y. lipolytica* parfaitement maîtrisée. La *Figure 152* présente le suivi de la conductivité électrique d'une reprise de croissance d'*Y. lipolytica* en fonction du débit volumique appliqué.

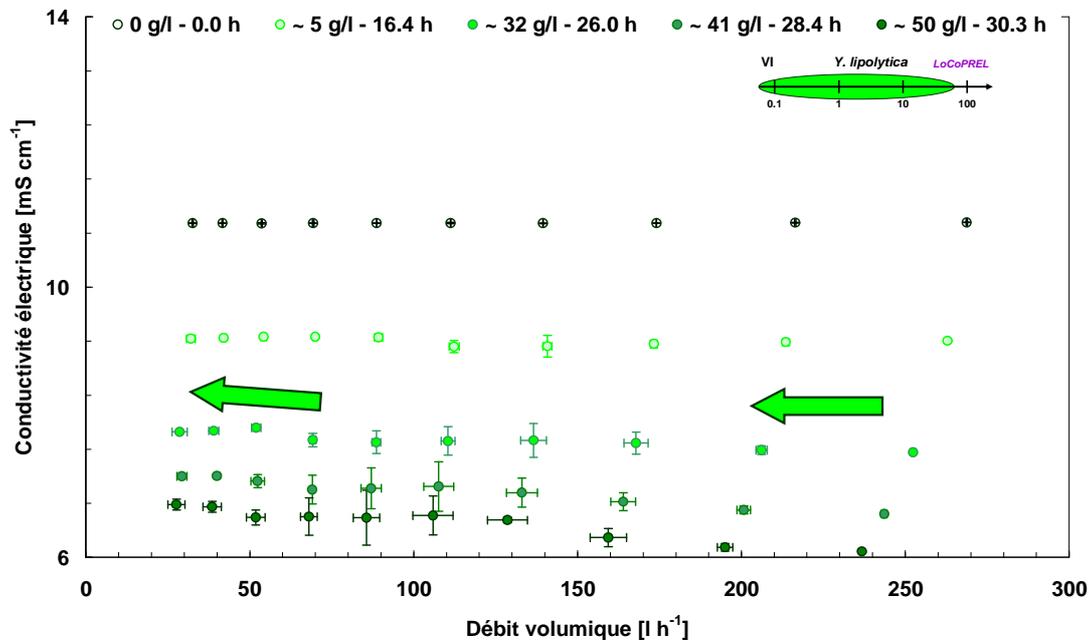


Figure 151 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture VI-SC, *Y. lipolytica*)

Concernant la culture VI d'*Y. lipolytica*, le suivi de la conductivité électrique du moût montre que celle-ci reste constante, avec une très légère augmentation pour les faibles débits volumiques pouvant être expliquée par le même phénomène que celui observé avec *E. coli* (hydratation de la cellule en réponse au changement de pression dans la conduite afin de réguler la pression de turgescence). On remarque qu'aucun changement n'apparaît pour une concentration de 50 g l^{-1} . La concentration seuil, identifiée préalablement vers 37 g l^{-1} avec *E. coli* sur la *Figure 149*, semble, si elle existe, bien supérieure.

La Figure 152 présente la conductivité électrique en fonction du débit volumique dans la boucle de dérivation pour la culture IV présentant des concentrations estimées en biomasse plus élevées que la culture VI.

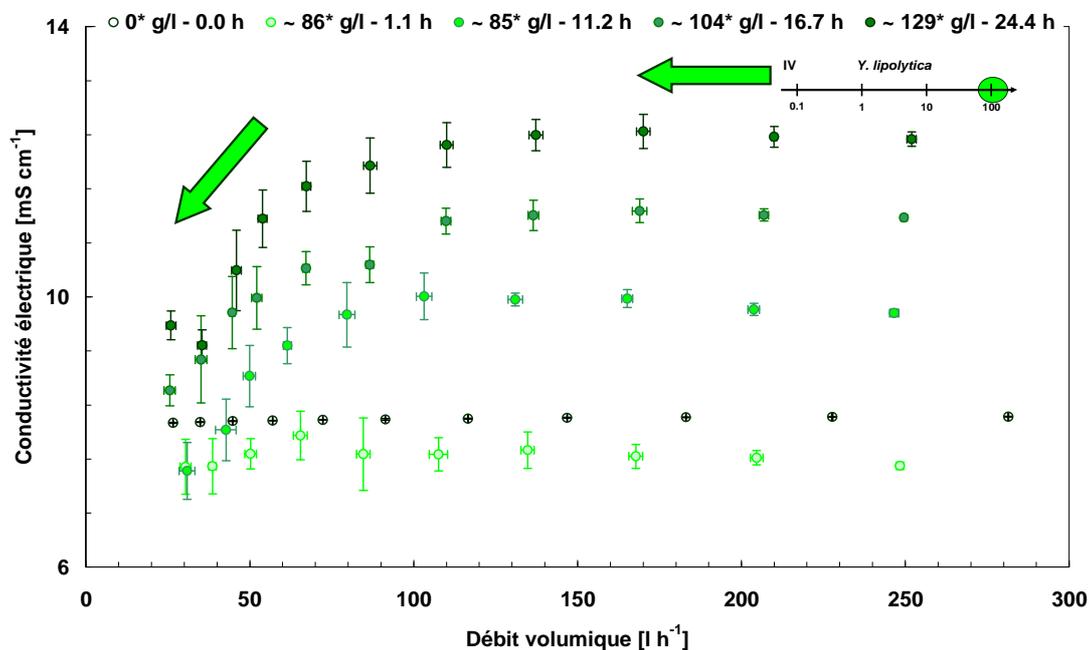


Figure 152 : Conductivité électrique en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture IV-SP, *Y. lipolytica*)

On observe une tendance identique à celle observée sur les cultures d'*E. coli*. La conductivité électrique présente un début de diminution de sa valeur moyenne pour une concentration estimée de 86 g l^{-1} , soit une concentration seuil plus de deux fois supérieure aux cultures d'*E. coli*. De manière similaire, on observe deux régions. La première correspond aux valeurs de conductivité électrique obtenues avec un débit volumique élevé. Au regard de la variabilité des points, ceux-ci semblent peu perturbés. Les valeurs obtenues pour des débits volumiques plus faibles montrent une augmentation de la variabilité des points ainsi qu'une diminution de la valeur moyenne de la conductivité électrique mesurée. La valeur maximale de la concentration estimée étant plus élevée que la concentration maximale estimée des cultures d'*E. coli*, il semblerait que le seuil où il ne se produit plus de séparation de phase soit également plus élevé pour les culture de *Y. lipolytica* et supérieur aux 129 g l^{-1} estimés.

Le phénomène de séparation de phase s'observe pour les deux microorganismes. Seuls les seuils de concentration où ils apparaissent, sont affectés et clairement distincts. La composition chimique du milieu, la taille, le volume, les propriétés de surface des cellules, l'activité biologique, ... sont autant de points pouvant être mis en avant pour expliquer une telle différence. Ces facteurs sont abordés dans le Chapitre V.

3. Pertes de charge linéiques

La mesure des pertes de charge linéiques lors des séquences doit nous permettre de construire les courbes d'écoulement caractérisant le comportement rhéologique du moût, la perte de charge et le débit volumique étant respectivement homothétiques à la contrainte pariétale et à la vitesse de cisaillement. L'utilisation de deux conduites en série, nous permet de balayer une large plage de vitesses de cisaillement. L'évolution des pertes de charge pour différents débits volumiques et concentrations en biomasse est présentée pour les deux souches.

f. Cultures d'*E. coli*

La Figure 153 présente l'évolution des pertes de charge de la conduite calibrée D1 pour la culture III d'*E. coli*. Les séquences de débit ont été effectuées avec une allure en créneaux.

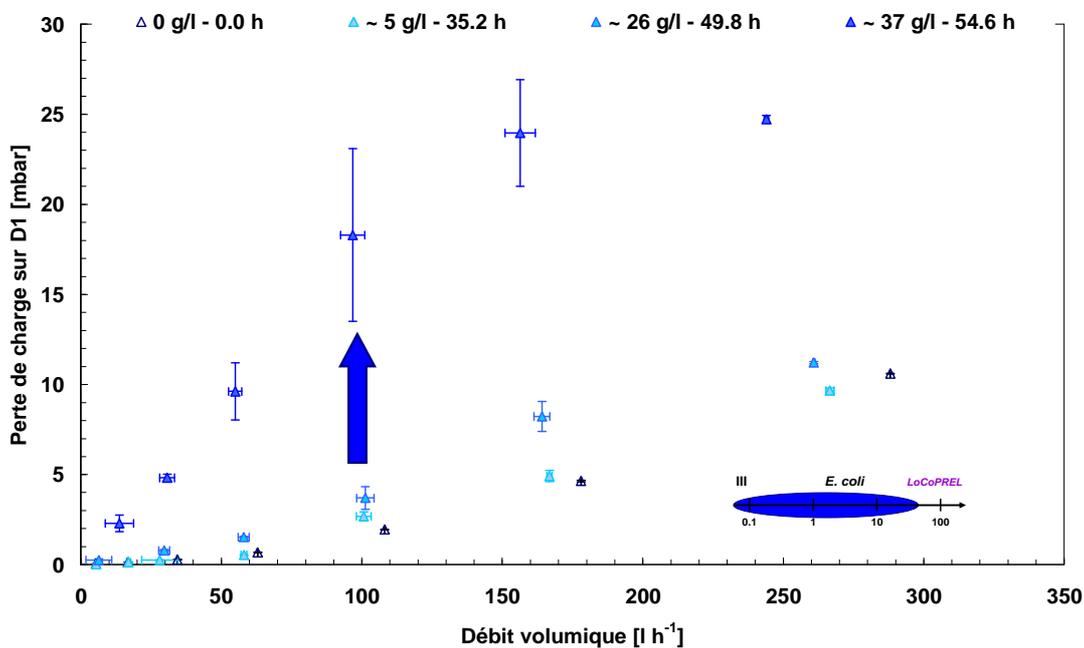


Figure 153 : Pertes de charge sur D1 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture III-SC, *E. coli*)

On observe que pour les faibles concentrations de l'ordre de 5 g l^{-1} , la tendance se distingue des données obtenues sur le milieu minimum ($0 \text{ g l}^{-1} - 0.0 \text{ h}$). L'accroissement de la concentration en biomasse augmente les valeurs moyennes des pertes de charge mesurées quel que soit le débit volumique de circulation dans la boucle de dérivation. Ceci laisse à penser que la viscosité du milieu suit l'augmentation de la concentration en cellule dans le milieu. Cela reste alors cohérent avec la littérature (Chen *et al.*, 1997; Curtis and Emery, 1993; Malinowski *et al.*, 1987; Toda *et al.*, 1998).

La Figure 154 présente l'évolution des pertes de charge de la conduite calibrée D2 pour la culture I et III d'*E. coli*.

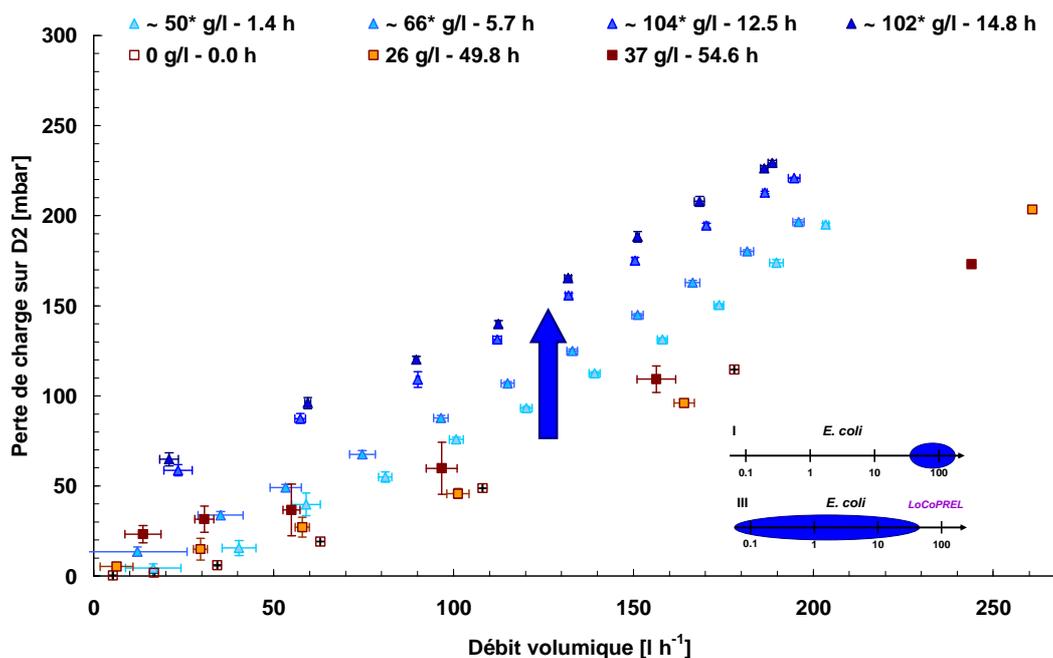


Figure 154 : Pertes de charge sur D2 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (triangle bleu : culture I-SP, *E. coli* - carré brun : culture III-SC, *E. coli*)

Comme précédemment, les séquences de débit montrent une nette évolution des pertes de charge avec l'augmentation de la concentration en biomasse. Quel que soit le débit volumique réel, les pertes de charge mesurées suivent le même ordre que la concentration en biomasse, malgré une augmentation de la variabilité des mesures pour de faibles débits.

g. Cultures d'*Y. lipolytica*

La Figure 155 présente les pertes de charge de la conduite calibrée D1 en fonction du débit volumique pour la culture VI d'*Y. lipolytica*. Pour cette culture, les séquences de débit ont une allure en créneaux.

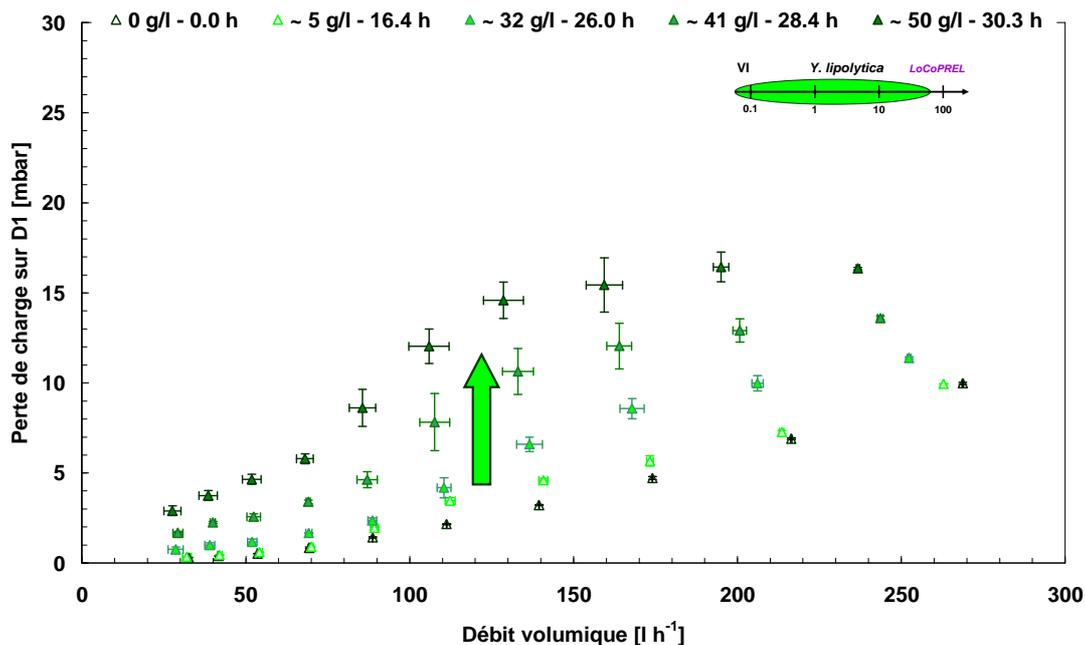


Figure 155 : Pertes de charge sur D1 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture VI-SC, *Y. lipolytica*)

Les pertes de charge, quel que soit le débit volumique appliqué, augmentent avec la concentration de la biomasse présente dans le moût. En comparant les valeurs de perte de charge des plus hautes concentrations pour les cultures III et VI, on observe que les pertes de charge mesurées sont moins élevées pour la culture de *Y. lipolytica*, malgré une concentration en biomasse plus élevée que la fin de la culture III d'*E. coli*.

L'impact de la concentration en biomasse (Curtis and Emery, 1993; Malinowski *et al.*, 1987; Toda *et al.*, 1998) dans l'évolution des pertes de charge est confirmé par la culture IV. L'augmentation de la viscosité du milieu se confirme par le suivi de la perte de charge. La *Figure 156* présente l'évolution des pertes de charge de la conduite calibrée D1 en fonction du débit volumique dans la boucle de dérivation pour la culture IV d'*Y. lipolytica*.

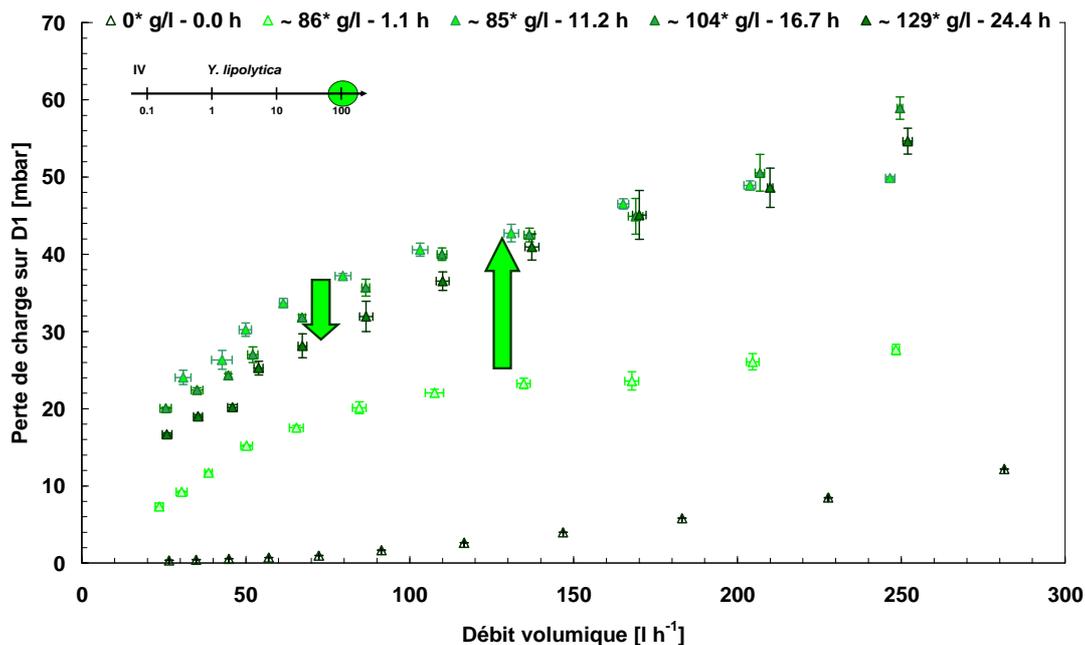


Figure 156 : Pertes de charge sur D1 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (culture IV-SP, *Y. lipolytica*)

Les valeurs moyennes de perte de charge présentent des allures similaires à celles observées dans la *Figure 155* pour des concentrations en biomasse plus faible. On remarque cependant un changement de tendance pour les débits volumiques inférieurs à 150 l h^{-1} . A partir d'une concentration estimée de 85 g l^{-1} , les pertes de charge diminuent malgré l'augmentation de biomasse. Il semble que le comportement physique du moût présente alors un seuil de concentration où les propriétés rhéologiques du milieu ne suivent plus une évolution en fonction de la concentration en biomasse.

La *Figure 157* présente les pertes de charge de la conduite calibrée D2 en fonction du débit volumique pour les cultures IV et VI d'*Y. lipolytica*.

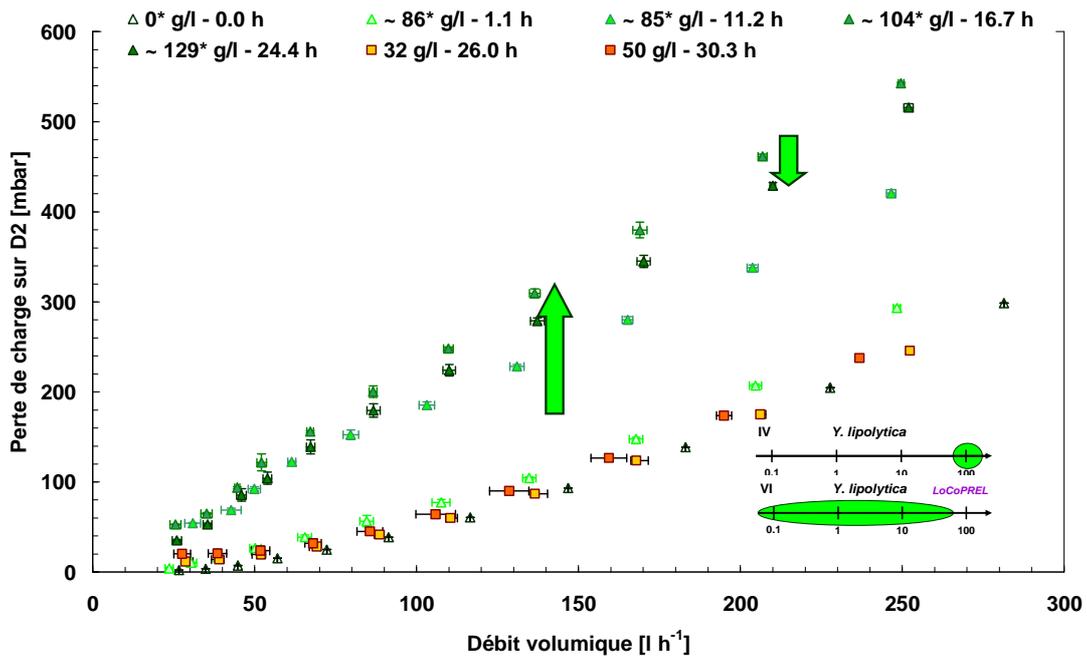


Figure 157 : Pertes de charge sur D2 en fonction du débit volumique, et écart-types associés (triangle vert : culture IV-SP, *Y. lipolytica* - carré brun : culture VI-SC, *Y. lipolytica*)

On observe à nouveau une évolution similaire des pertes de charge avec l'augmentation de la concentration dans le milieu, jusqu'à un maximum identifié à 104 g l⁻¹. Au-delà de cette concentration, comme sur la conduite D1, il y a une diminution des valeurs mesurées de perte de charge. Comme indiqué précédemment, cette évolution doit être confirmée, mais un seuil de concentration, où les propriétés rhéologiques se modifient, semble être validé. Cependant, à propos de la culture IV, l'hypothèse d'une évolution de la souche suite aux conditions subies lors de la précédente culture ne peut pas être totalement écartée car ce seuil n'a pas pu être confirmé par la culture VI (parfaitement maîtrisée) qui n'a pas atteint les mêmes concentrations.

La différence de propriétés physiques entre *E. coli* et *Y. lipolytica*, ainsi que l'environnement physico-chimique des milieux pour ces différentes cultures restent importants. L'impact de l'environnement sera plus précisément investigué lors du chapitre V par la confrontation à des analyses complémentaires.

C. Bilan des mesures à débit séquencé

Les mesures à effectuer au cours des séquences de débit doivent être analysées avec précaution car l'évolution des mesures permet certes de caractériser le moût, mais biaise également en partie la dynamique en fonction du débit volumique.

En effet, l'analyse des mesures de masse volumique en ligne indique la mise en place de deux phénomènes provoquant une réaction opposée sur les mesures. La première concerne l'aspiration sélective du moût dans le bioréacteur. La diminution du débit de circulation provoque une diminution de la force d'aspiration au point de prélèvement dans le bioréacteur, impliquant l'aspiration d'un moût

contenant moins de bulles, et donc une phase gaz moins importante dans le moût circulant dans la boucle de dérivation. Le second effet concerne la diminution de la pression dans la boucle de dérivation. La diminution du débit de circulation engendre l'abaissement de la pression dans le circuit, impliquant une dilatation de la phase gazeuse circulant dans le circuit.

A propos de la conductivité électrique, celle-ci nous permet d'identifier l'apparition d'un seuil de séparation de phase. Pour les cultures d'*E. coli*, ce seuil est identifié à 37 g l^{-1} , contre 86 g l^{-1} pour les cultures d'*Y. lipolytica*. De plus, les cultures d'*E. coli* ont également permis d'identifier un second seuil de concentration où le moût ne se déphase plus ou n'a plus le temps de se déphaser. Il est observé à partir d'une concentration de 100 g l^{-1} . Un équivalent de ce seuil de concentration n'a pas pu être observé pour les cultures d'*Y. lipolytica* présenté dans ce travail.

Enfin, le suivi des pertes de charge montre clairement, pour les conduites D1 et D2, un impact de la concentration en biomasse, traduisant une augmentation de la viscosité du milieu.

Globalement, l'allure des séquences de débit effectuées semble également avoir un impact sur les mesures obtenues. La mesure idéale n'existant pas, il est nécessaire de trouver, pour une caractérisation correcte du milieu, un compromis entre le déroulement d'une séquence pyramidale et en créneaux. Les séquences pyramidales impliquent un grand temps de séjour pour les cellules (et donc un stress nutritionnel) tandis que les séquences en créneaux entraînent des mesures moins stables et l'application d'un stress hydrostatique.

CONCLUSION

Le développement de l'outil expérimental a permis de développer une instrumentation cohérente et adaptée à l'étude souhaitée. Les expérimentations montrent, pour chaque culture, une amélioration de la gestion, du contrôle et de l'utilisation de ce nouvel outil d'investigation.

Le développement de l'environnement du bioprocédé a permis la mise en place de conditions de stérilité autorisant la réalisation de cultures axéniques parfaitement maîtrisées. Cet ensemble instrumental, complété par les résultats des six cultures réalisées, permet l'obtention d'informations par différentes approches. L'analyse peut porter sur le suivi des dynamiques physiques sous des conditions hydrodynamiques constantes ou volontairement perturbées (séquences de débits). L'approche peut également s'orienter sur le suivi de dynamiques biologiques, sur la comparaison possible entre les cultures de deux microorganismes distincts et pour différentes conditions d'activité biologique. Dans tous les cas, il est désormais possible d'affirmer que la métrologie mise en place pour l'analyse physique en ligne de milieux de culture peut être adaptée et validée par ces différentes expérimentations, et particulièrement par les cultures III et VI.

Les dynamiques observées à débit constant montrent, comme cela était attendu, un impact de la biomasse pour les fortes concentrations sur les différentes variables physiques. Plusieurs seuils de concentration ont pu être identifiés en fonction de la variable étudiée. Cependant, l'ensemble des cultures n'ayant pas été parfaitement maîtrisé pour une production de biomasse (culture IV et V), les seuils identifiés sont multiples et ne se recoupent pas forcément entre cultures d'un même microorganisme (exemple d'*Y. lipolytica*). L'analyse des séquences met en avant d'autres aspects spécifiques de l'outil expérimental à prendre en compte dans l'analyse des résultats. Outre l'impact de la biomasse sur l'augmentation des pertes de charge impliquant une augmentation de la viscosité du milieu, une attention particulière a été portée à l'analyse de la phase gazeuse. Un premier seuil de concentration permet d'identifier les débuts d'une séparation de phase entre les phases liquide-solide et la phase gaz. Les bornes ont été identifiées à 37 g l^{-1} pour *E. coli* et 86 g l^{-1} estimée pour *Y. lipolytica*. De plus, un second seuil de fin de séparation de phase semble exister. Il a pu être observé chez *E. coli* pour une concentration de 100 g l^{-1} , mais n'a pas pu être remarqué pour une culture d'*Y. lipolytica*.

Certaines améliorations pourraient être apportées de manière à faciliter l'utilisation de l'outil expérimental, améliorer la sécurité ou la qualité des informations obtenues. Par exemple, la mise en place d'une soupape de sécurité sur le bioréacteur limiterait le risque d'explosion en cas de colmatage du filtre de sortie des gaz (cause de l'arrêt prématuré de la culture VI).

L'instrumentation existante pourrait être complétée. La mise en place d'un capteur de pression relative en sortie de la boucle de dérivation permettrait l'établissement d'une nouvelle courbe de frottement. La mise en place de conduites calibrées de diamètre intermédiaire à D1 et D2, ou plus petite que D2, et de longueur plus faible, permettrait d'améliorer et d'accroître les informations obtenues à débit constant et séquencé. De plus, le suivi dynamique de la concentration en biomasse par un système de turbidimétrie en ligne ou mesure de la permittivité permettrait de corrélérer les mesures de concentration hors ligne afin de suivre en ligne l'évolution de la concentration en biomasse. Le

Le système instrumental pourrait également être complété par un couplemètre monté sur l'axe de l'agitateur permettant de suivre l'évolution rhéologique du moût par une mesure de couple (Metzner and Otto, 1957). Enfin, la détermination de la quantification de la séparation de phase, au sein des conduites, est primordiale à développer pour réajuster les courbes de frottement et les valeurs obtenues en ligne en fonction de la séparation de phase réelle.

L'ensemble des mesures en ligne doit être confronté avec les caractérisations hors ligne effectuées de manière à mieux comprendre les dynamiques observées *in situ*. Les phases solide (cellule) et liquide (surnageant) sont alors caractérisés hors ligne afin de mieux comprendre leur contribution sur les mesures effectuées en ligne. Les résultats issus de cette caractérisation complémentaire, et qui nous permettront d'affiner l'analyse sont présentés dans le *Chapitre V*.

**Chapitre V - Mesures en ligne et
hors ligne lors des phases de
croissance : comparaison,
analyse et discussion**

Table des matières du chapitre V

INTRODUCTION	297
I. CARACTERISATION HORS LIGNE COMPLEMENTAIRE.....	297
A. ANALYSES MORPHO-GRANULOMETRIQUES DE LA BIOMASSE	298
1. <i>Observation par microscopie optique</i>	298
2. <i>Granulométrie</i>	301
3. <i>Morphométrie</i>	305
a. Comparaison de diamètres équivalents	306
b. Changement morphologique chez <i>E. coli</i>	308
c. Changement morphologique chez <i>Y. lipolytica</i>	310
B. ANALYSES PHYSICO-CHIMIQUES SUR LA BIOMASSE ET LE SURNAGEANT	316
1. <i>Potentiel Zeta de la biomasse</i>	316
2. <i>Pression osmotique du surnageant</i>	317
3. <i>Force ionique</i>	318
C. ANALYSES CHIMIQUES	320
1. <i>Composition élémentaire</i>	320
2. <i>Protéines</i>	321
3. <i>Teneur en cendre</i>	322
CONCLUSION	323
II. MASSE VOLUMIQUE	325
A. SUIVI EN LIGNE ET HORS LIGNE	325
B. DISCUSSION SUR L'ANALYSE HORS LIGNE.....	327
C. COMPARATIF	330
III. EVOLUTION DES ESPECES CHARGEES.....	333
A. BILAN DES ANALYSES HORS LIGNE	333
B. SUIVI DE LA DYNAMIQUE IN SITU.....	333
IV. RHEOMETRIE.....	336
A. VISCOSIMETRIE EN LIGNE	336
B. VISCOSIMETRIE HORS LIGNE.....	341
C. RHEOMETRIE EN LIGNE ET HORS LIGNE : COMPARAISON	344
CONCLUSION.....	347

INTRODUCTION

Ce dernier chapitre se focalisera sur les analyses complémentaires permettant une caractérisation plus approfondie. Ces analyses ont pour objectif de compléter les informations obtenues *in situ*. L'ensemble des mesures en ligne a été présenté exclusivement dans le *Chapitre IV*. Plusieurs hypothèses ont été avancées sur différents aspects tels que l'impact de la biomasse en continu, l'existence d'un seuil de concentration, l'activité biologique, l'évolution de la phase gaz, etc.

Dans ce chapitre, on se propose donc d'approfondir ces résultats à partir des caractérisations de la morphologie de la biomasse, des propriétés physiques du moût par la densimétrie et la rhéologie, de l'évolution des propriétés physico-chimique de la biomasse et du surnageant, ainsi que de la composition chimique des cellules.

Nous présenterons les différentes analyses effectuées principalement sur les cultures III (*E. coli*) et VI (*Y. lipolytica*), de manière à enrichir et compléter notre discussion. Pour cela, nous présenterons l'ensemble des résultats obtenus hors ligne, avant d'effectuer un comparatif avec les grandeurs physiques *in situ*.

I. CARACTERISATION HORS LIGNE COMPLEMENTAIRE

L'analyse et l'interprétation des mesures en et hors ligne ne peuvent être conduites sans caractériser préalablement la biomasse catalytique du point de vue physique, physico-chimique et chimique au cours des cultures. Parallèlement, nous caractériserons le surnageant et le moût par quelques analyses hors-ligne. L'objectif est de mieux comprendre la dynamique des signaux enregistrés avec l'outil expérimental sur la boucle de dérivation. Ces analyses sont classées en trois groupes comme indiqué dans le *Tableau 42*.

Analyse	Mesure	Phase caractérisée
Physique	Microscopie optique	Biomasse
	Granulométrie laser	
	Morphogranulomètre	
Physico-chimique	Rhéométrie	Surnageant et moût
	Densimétrie	
	Potentiel Zeta	
Chimique	Pression osmotique	Surnageant
	Force ionique	
	Composition élémentaire	Biomasse
	Protéines	Biomasse et surnageant
	Cendres	Biomasse

Tableau 42 : Analyses physiques, physico-chimiques et chimiques hors ligne réalisées sur le moût, la biomasse et le surnageant

Les analyses physiques permettent d'obtenir des informations sur l'état physiologique de la cellule, la taille et la forme de la biomasse. Les analyses physicochimiques apportent des informations complémentaires sur le surnageant, assimilé à la phase liquide, et sur la membrane de la biomasse. Enfin, les analyses chimiques renseignent sur l'évolution de la composition élémentaire de la biomasse, le suivi de la consommation d'éléments inorganiques dans le milieu, et l'évolution de la proportion de protéine dans le surnageant par rapport à la matière sèche des cellules et à la quantité de protéine dans la biomasse.

A. Analyses morpho-granulométriques de la biomasse

Les analyses physiques de la biomasse apportent des informations sur l'état physiologique de la cellule, ses dimensions caractéristiques et sa morphologie. Elles permettent d'en extraire des dimensions caractéristiques, mais également de suivre leur évolution au cours de la culture. Dans un premier temps, la microscopie optique permet de décrire qualitativement la biomasse catalytique. Dans un second temps, la granulométrie laser caractérise la distribution du diamètre de sphère équivalente (ou diamètre en volume, d_v) associé à la population microbienne. Enfin, la morphométrie permet de déterminer les caractéristiques morphologiques (dimensions, formes) des microorganismes. Ces deux dernières analyses peuvent permettre une comparaison des valeurs obtenues entre elles.

1. Observation par microscopie optique

La microscopie optique permet d'accéder à une information qualitative sur l'état physiologique de la population microbienne (présence de contaminant, changements morphologiques majeurs, division cellulaire). Cette technique est couramment utilisée pour étudier des changements morphologique majeurs en fonction des conditions de culture (Cho *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2000; Lim *et al.*, 2002).

Lors des cultures I à VI, des observations sous microscope et des prises de vues sont effectuées pour déceler la présence de contaminants, contrôler la division cellulaire et suivre une possible évolution morphologique des populations par des critères purement qualitatifs.

Les *Figure 158* et *Figure 159* présentent respectivement des prises de vue au cours des cultures III (*E. coli*) et VI (*Y. lipolytica*).

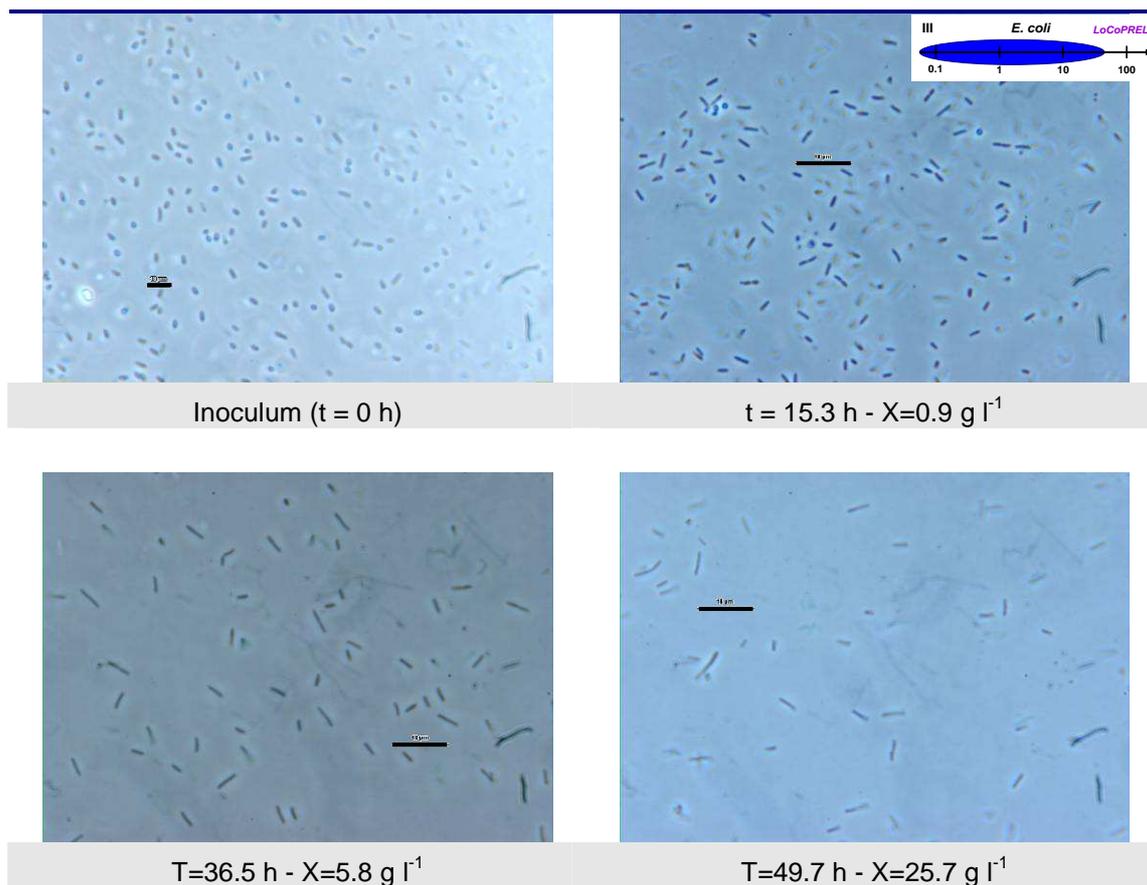


Figure 158 : Observation par microscopie optique (x50, sous huile) à t = 0, 15.3, 36.5 et 49.7 h, échelle = 10 μm (culture III, *E. coli*).

Pour chaque culture, nous noterons une évolution morphologique de la population lors de l'inoculation. Les cellules rencontrent, lors de cette étape, des conditions de culture (environnements physico-chimique et mécanique) différentes de celles de l'inoculum (préculture). Les cellules doivent notamment s'adapter à un environnement induisant un stress hydrodynamique singulier lié à la circulation dans la boucle de dérivation (débit nominal et séquence).

Pour les cultures d'*E. coli* (cultures I, II et III), malgré un allongement des cellules visible sur les prises de vue, les changements morphologiques semblent peu importants. Les bactéries *E. coli* se présentent sous la forme de bâtonnets d'une longueur de 1 à 3 μm environ.

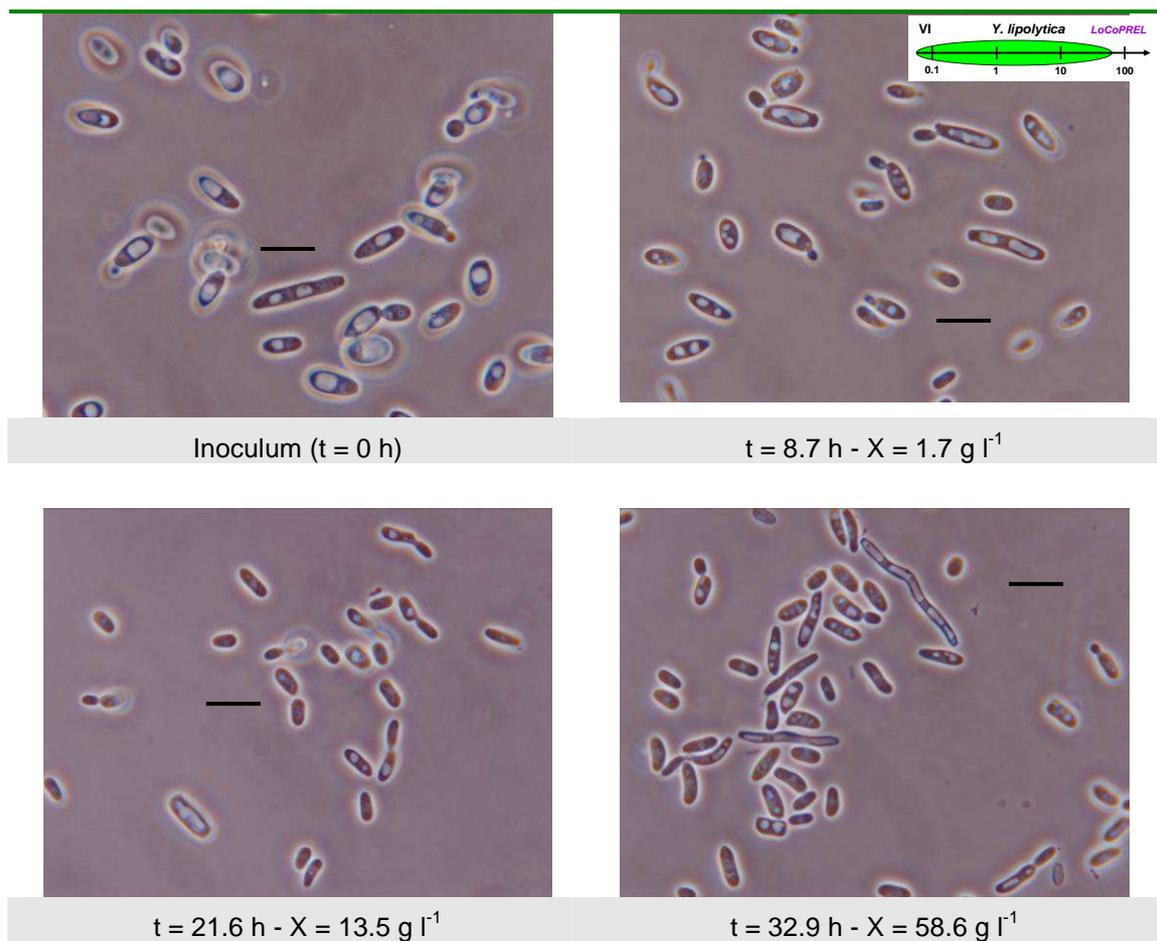


Figure 159 : Observation par microscopie optique (x50, sous huile) à t = 0, 8.7, 21.6 et 32.6 h, échelle = 10 μm (culture VI, *Y. lipolytica*)

Pour les cultures d'*Y. lipolytica* (cultures VI, V et VI), les prises de vue de l'inoculum et de fin de culture montrent des cellules plus longues dans ce dernier cas. De plus, les cellules de l'inoculum semblent plus larges. Ces changements morphologiques sont évalués qualitativement par microscopie optique sur un échantillon de petite taille de quelques dizaines de particules. Les levures *Y. lipolytica* exhibent une forme ovoïde avec une longueur allant de 4 à plus de 10 μm.

Pour une meilleure représentativité, la granulométrie laser et la morphogranulométrie nous permettront de confirmer ou non ces modifications apparues lors de l'observation au microscope. L'utilisation d'indicateurs morphologiques et statistiques est alors une aide précieuse pour une analyse de ces caractéristiques.

Pour l'ensemble des cultures, nous noterons que les modifications morphologiques restent peu importantes par rapport à des formations de type clump ou pellet précédemment observées dans la littérature sur des champignons filamenteux (Hwang *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2002; Pamboukian and Facciotti, 2005; Sinha *et al.*, 2001).

2. Granulométrie

La granulométrie laser nous permet d'accéder à deux informations. La première, plutôt qualitative, est le taux d'obscurité du faisceau par l'échantillon, celui-ci étant dilué dans un volume approximatif d'eau osmosée. La seconde information nous renseigne sur la distribution volumique des diamètres de sphère équivalente appelés aussi diamètres en volume.

Les mesures effectuées par granulométrie laser sur la culture III d'*E. coli* ont montré des résultats anormaux par rapport aux précédentes cultures. Pour cette analyse, la culture II est ainsi prise en référence.

La Figure 160 représente l'évolution du taux d'obscurité pondéré par le taux de dilution en fonction de la concentration en biomasse. Nous noterons la relation de proportionnalité entre l'obscurité pondérée du facteur de dilution et la concentration en biomasse. Cette relation confirme l'absence de dégradation de la biomasse durant les cultures qui aurait induit une évolution non linéaire. Cette relation, au même titre que la corrélation entre suivi de l'absorbance et évaluation de la concentration par gravimétrie, est « culture-dépendante ». Il est possible d'observer que les deux cultures représentées ne suivent pas la même relation de proportionnalité. Cependant, cette corrélation autorise au final une analyse semi-quantitative de la distribution de taille. La Figure 161 illustre l'évolution de la distribution volumique du diamètre équivalent pondérée du taux de dilution et du taux d'obscurité, en fonction du diamètre en volume d_v . L'exemple présenté avec la culture VI d'*Y. lipolytica* montre que, du fait de la division cellulaire et d'une possible évolution morphologique, le poids de la population initiale (concentration à 0.8 g l^{-1}) tend à diminuer au cours de la culture.

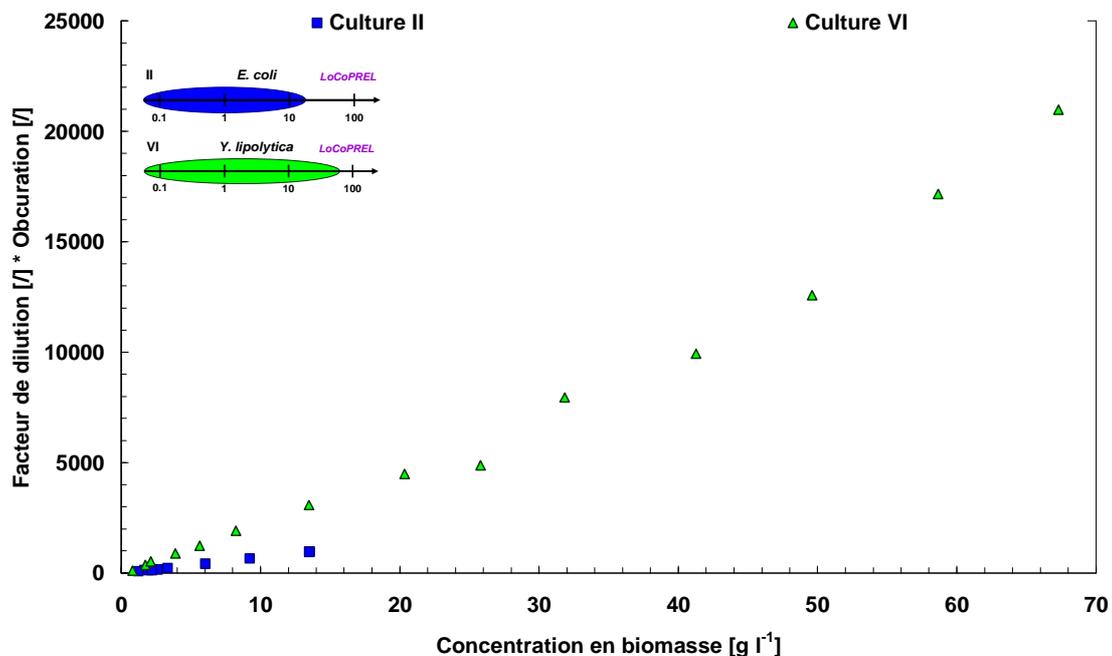


Figure 160 : Taux d'obscurité pondéré par le taux de dilution en fonction de la concentration en biomasse (culture II, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

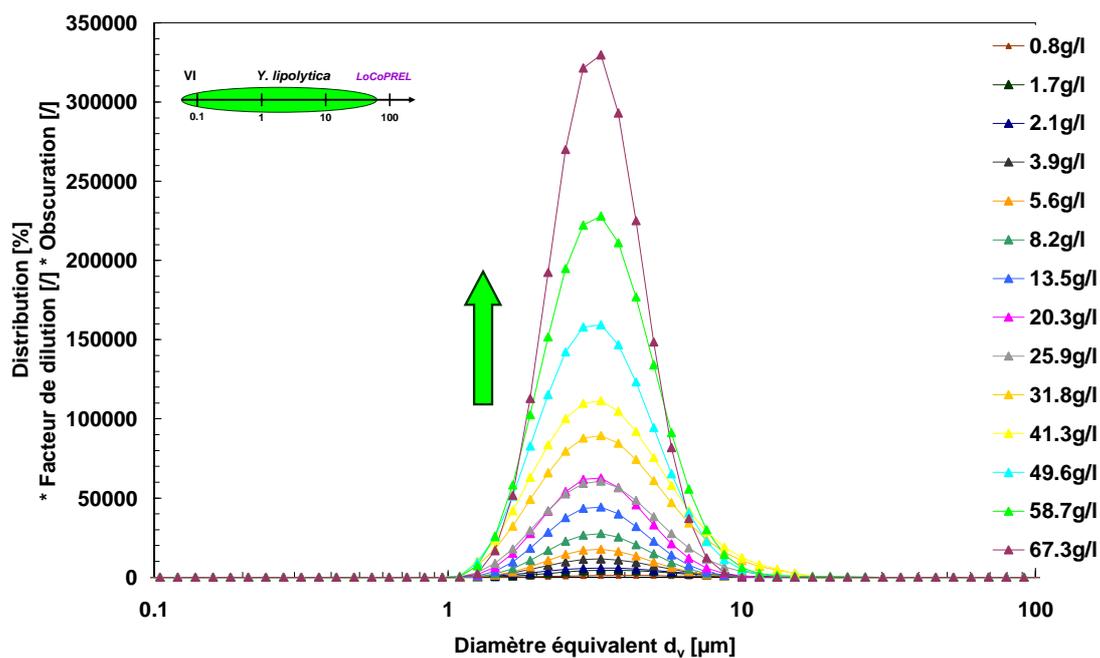


Figure 161 : Distribution volumique du diamètre équivalent pondéré par le taux de dilution et le taux d'obscurité en fonction du diamètre équivalent d_v (culture VI, *Y. lipolytica*)

Rappelons que chaque distribution de population peut être caractérisée par diverses grandeurs couplées aux fonctions de distribution et de distribution cumulée. Dans nos conditions, il est important de définir un diamètre moyen (et un écart type associé) pour une population donnée à un temps donné. En nous appuyant sur les fonctions de distribution volumique, nous retiendrons les critères suivants : les diamètres à 10, 50 et 90% de la population, désignés par $d_v(0.1)$, $d_v(0.5)$ et $d_v(0.9)$, et le $d_{4,3}$, appelé diamètre moyen volumique. Chaque critère sera défini avec un écart-type associé.

Les *Figure 162* et *Figure 163* illustrent l'évolution de ces critères sur les cultures II (*E. coli*) et VI (*Y. lipolytica*.) respectivement. Pour la culture II, on observe une population monomodale avec un $d_{4,3}$ de $1.48 \pm 0.25 \mu\text{m}$.

La culture VI présente une population monomodale avec un $d_{4,3}$ de $4.10 \pm 0.51 \mu\text{m}$, sans perturbation apparente de l'instrumentation.

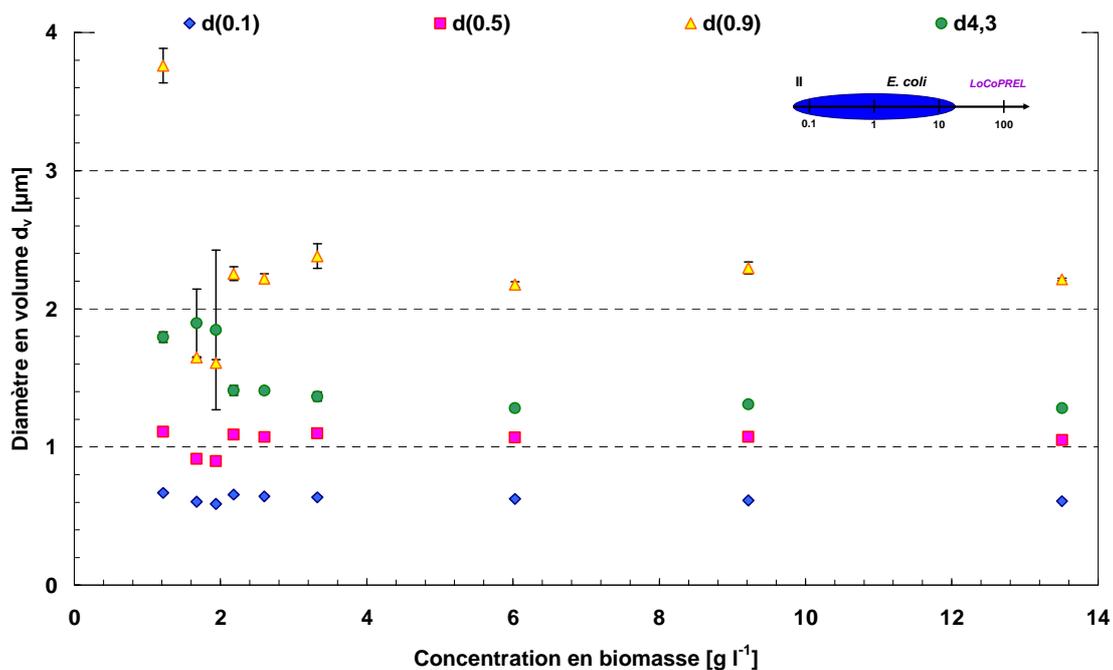


Figure 162 : Diamètre en volume, d_v pour 10, 50 et 90% de la population, $d_{4,3}$, et écart-types associés, en fonction de la concentration en biomasse (Culture II, *E. coli*).

Globalement, sur la durée de la culture II, on observe que la taille varie peu au cours de la culture. On note cependant une stabilisation de la taille plus prononcée, avec une variabilité des mesures plus faible, à partir de 2 g l^{-1} , ce qui correspond à un âge de culture de 36.1 h. A cet instant, l'alimentation avec le substrat concentré est démarrée, ce qui provoque une augmentation des débits en sels d'alimentation mais permet une meilleure alimentation des cellules en éléments inorganiques.

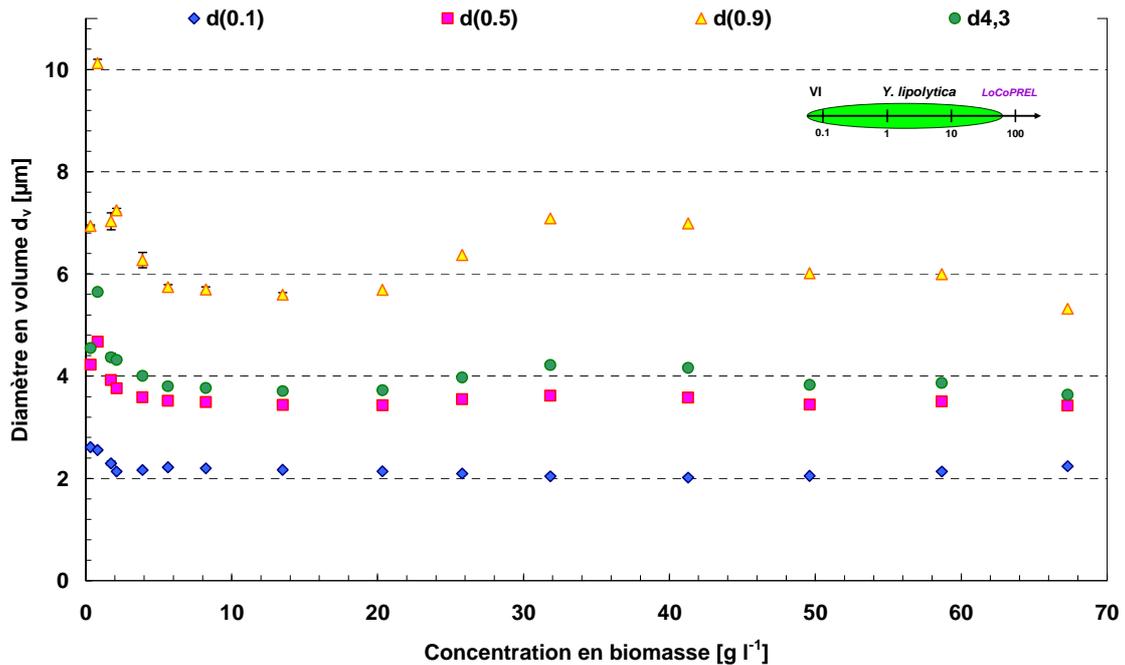


Figure 163 : Diamètre en volume, d_v , pour 10, 50 et 90% de la population, $d_{4,3}$, et écart-types associés, en fonction de la concentration en biomasse (Culture VI, *Y. lipolytica*).

Concernant la culture VI d'*Y. lipolytica*, l'évolution de taille est centrée avec un $d_{4,3}$ moyen de 4.10 μm . On remarque cependant une augmentation prononcée pour le $d_v(0.9)$ pour une concentration de 25.7 g l^{-1} (âge de 24.8 h). A cet instant, l'alimentation en substrat dilué est importante, diluant les éléments minéraux dans le milieu. Pour une concentration de 31.8 g l^{-1} (âge de 26.0 h), l'alimentation avec le substrat concentré démarre, augmentant ainsi le débit des sels d'alimentation. Dès que ceux-ci sont perçus par les cellules, le diamètre des particules diminue jusqu'à ce que le $d_v(0.9)$ passe en dessous de 6 μm comme cela était le cas avant la dilution des sels par l'utilisation d'un substrat dilué.

Malgré des hypothèses fortes en termes de forme de particules, le diamètre de sphère équivalente issu de l'estimation de d_v définit bien les dimensions approximatives avancées lors de la microscopie optique. L'analyse de l'obscurité en fonction de la concentration en biomasse montre, comme pour la mesure d'absorbance en cours de culture, que l'indice de réfraction de la biomasse semble rester constant au cours des cultures, et diffère bien entre les deux cultures de microorganisme. Cette mesure permet une analyse semi-quantitative des données obtenues en termes de concentration. Les dimensions moyennes de chaque microorganisme restent en adéquation avec la microscopie optique. Sous l'hypothèse que les microorganismes aient une forme sphérique, les mesures effectuées lors des différentes cultures permettent d'obtenir les mesures ci-dessous rassemblant les tailles caractéristiques moyennes sur l'ensemble de la durée des différentes cultures. Les données obtenues pour les cultures d'*E. coli* sont rassemblées dans le *Tableau 43*, alors que les données moyennes d'*Y. lipolytica* sont présentées dans le *Tableau 44*.

Culture	I	II	III
$d_v(0.1)$	0.712 ± 0.033	0.616 ± 0.039	∅
$d_v(0.5)$	1.061 ± 0.022	1.021 ± 0.097	∅
$d_v(0.9)$	1.64 ± 0.11	2.21 ± 0.62	∅
$d_{4,3} \pm S_{d4,3}$	1.127 ± 0.034	1.48 ± 0.25	∅

Tableau 43 : Diamètre en volume d_v , à 10 %, 50 % et 90% de la population et diamètre volumique moyen $d_{4,3}$ en [μm] pour les différentes cultures d'*E. coli*

On remarque que la culture I présente une dispersion des données moindre comparée à la culture II d'*E. coli*. Ceci peut s'expliquer par les concentrations de la culture I qui sont nettement plus élevées dès le départ. La population globale de la culture a simplement été doublée au sein de l'outil expérimental, alors que la culture II a nécessité bien plus qu'un simple doublement de génération. Dans le cas de la culture II, les cellules ont eu plus de temps pour s'adapter aux conditions hydrodynamiques de l'outil expérimental.

Culture	IV	V	VI
$d_v(0.1)$	2.48 ± 0.18	2.42 ± 0.15	2.16 ± 0.13
$d_v(0.5)$	4.32 ± 0.93	4.03 ± 0.27	3.65 ± 0.33
$d_v(0.9)$	9.2 ± 4.8	6.86 ± 0.78	6.6 ± 1.2
$d_{4,3} \pm S_{d4,3}$	5.1 ± 1.8	4.40 ± 0.35	4.10 ± 0.51

Tableau 44 : Diamètre en volume d_v , à 10 %, 50 % et 90 % de la population et diamètre volumique moyen $d_{4,3}$ en [μm] pour les différentes cultures d'*Y. lipolytica*

Dans le cas des cultures d'*Y. lipolytica*, les valeurs moyennes des cultures V et VI semblent proches et distinctes de la culture IV. A nouveau, la culture IV est en marge des deux autres, ce qui peut s'expliquer par son étape de « préculture » avec une alimentation par de l'acide oléique. Dans cette culture, la limitation en transfert de dioxygène a appliqué un stress continu aux cellules, les forçant à s'adapter à cet environnement. Un changement de taille par rapport aux cultures V et VI pourrait être un signe de l'adaptation de la cellule.

3. Morphométrie

La morphométrie permet d'augmenter le degré de précision par rapport à la granulométrie car elle permet l'obtention d'informations pour chacune des cellules identifiées. Cette analyse morphologique permet d'accéder à des données géométriques pour un nombre important de cellules, permettant ainsi de les suivre et d'observer des évolutions géométriques. Le morphogranulomètre (Morphologi G3S, cf. *Chapitre II III.B.2.a.iii* Morphogranulométrie) effectue une mesure surfacique, alors que la mesure du granulomètre laser effectue une mesure en volume. Ainsi, les déterminations du diamètre peuvent être comparées entre les appareils. En effet, le diamètre issu du morphogranulomètre est un diamètre en surface d_s , appelé aussi diamètre du cercle équivalent, alors que le diamètre issu du granulomètre

laser est un diamètre en volume d_v (cf. *Chapitre II III.B.2.a.ii Granulométrie laser*). Nous comparerons ces grandeurs pour la culture VI.

Le logiciel du morphogranulomètre permet également d'identifier les paramètres géométriques (cf. *Chapitre II Tableau 25 : Liste des paramètres morphologiques intégrée par le Morphologi® G3S*) ayant évolué de manière spécifique, par une analyse statistique de type classification hiérarchique. La visualisation des dendrogrammes pour l'ensemble des données permet de détecter, par regroupement d'échantillons, les analyses dont le comportement (la distance statistique intra-échantillons) se détache de l'ensemble des données (distance statistique inter-échantillon). L'arrangement des échantillons se traduit par un certain nombre de groupes rassemblant les échantillons répétés ou différents.

a. Comparaison de diamètres équivalents

Les analyses effectuées avec le morphogranulomètre nous permettent de pouvoir retrouver les tailles caractéristiques des microorganismes étudiés. Les fonctions de distribution de quatre concentrations en biomasse proches pour chacune des cultures de référence (III et VI) sont présentées ci-dessous en *Figure 164*.

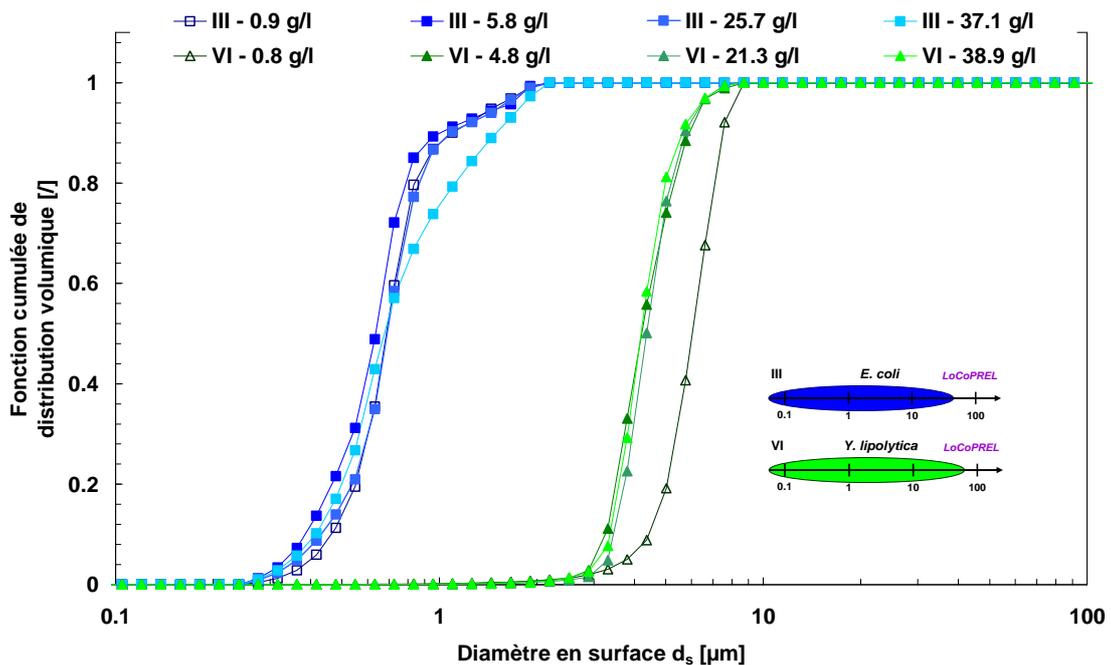


Figure 164 : Fonction de distribution volumique cumulée des diamètres en surface (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

Il est possible de remarquer que les fonctions de répartition de chaque microorganisme traduisent bien la différence de taille entre *E. coli* et *Y. lipolytica*. De plus, la fonction de répartition de la culture VI pour la concentration de 0.8 g l^{-1} , correspondant au premier prélèvement, montre une légère

augmentation moyenne de la taille des levures pour cet échantillon. Cette tendance ne s'observe pas sur la suite de la culture VI.

Les fonctions de répartition des diamètres équivalents en surface et en volume sont ensuite comparées pour les analyses effectuées sur les mêmes échantillons. Les résultats sont représentés en Figure 165 pour la culture VI d'*Y. lipolytica*.

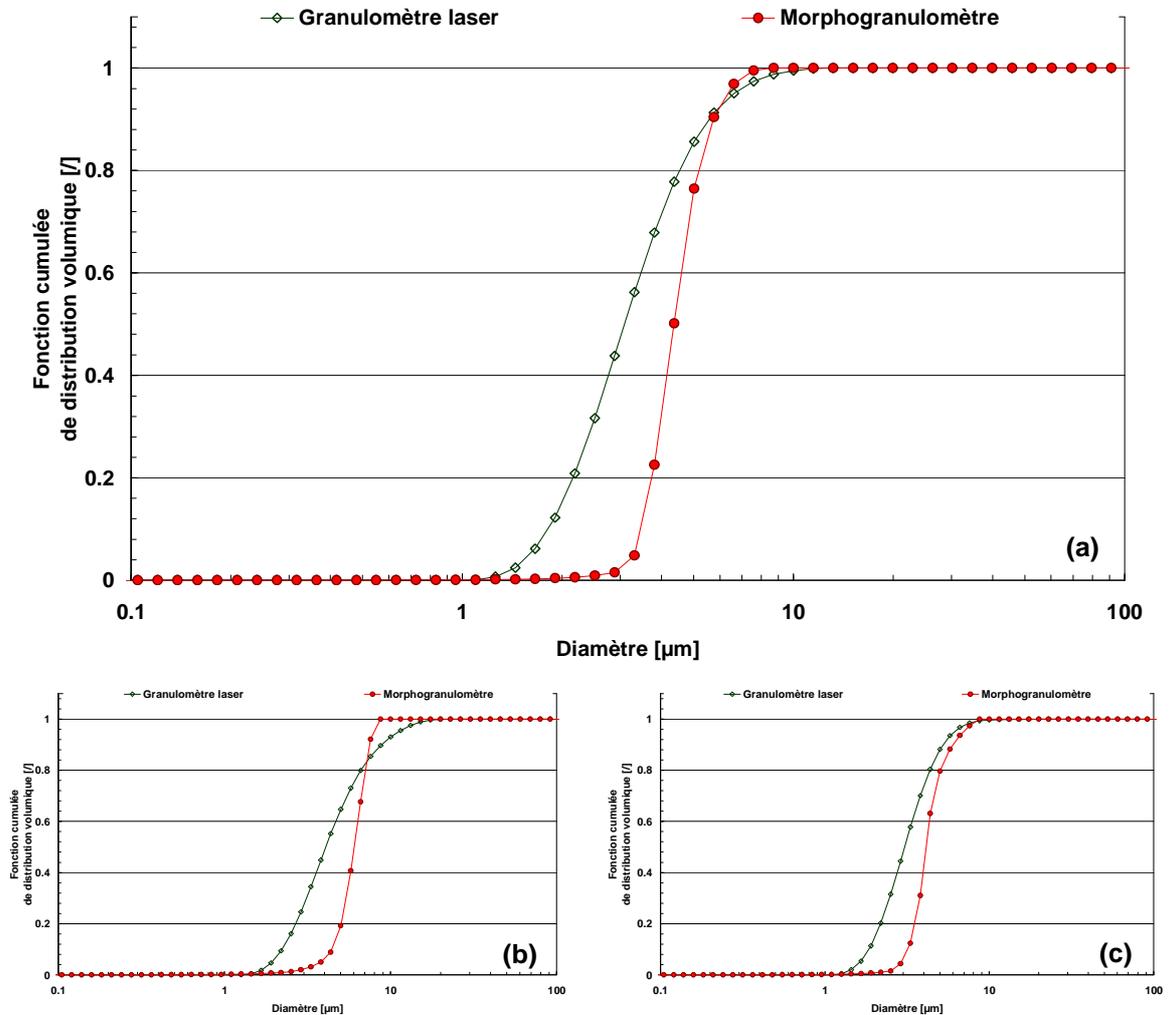


Figure 165 : Fonctions de répartition de la distribution volumique des diamètres équivalents d_v et d_s issus du granulomètre laser et le morphogranulomètre - (a) 25.8 g l⁻¹, t = 24.8 h / (b) 0.8 g l⁻¹, t = 3.3 h / (c) 58.7 g l⁻¹, t = 32.9 h

Les mesures obtenues avec le morphogranulomètre, correspondant à un diamètre en surface, sont systématiquement supérieures aux diamètres en volume issus du granulomètre laser. La mesure obtenue avec le morphogranulomètre étant issue de la surface projetée d'un objet, l'estimation du diamètre équivalent en surface sera maximisée lorsque la mesure est effectuée sur un objet s'écartant de la sphéricité. Sous l'effet de la gravité, l'objet s'orientera préférentiellement sur sa longueur, augmentant ainsi la surface projetée moyenne, et par conséquent, l'estimation du diamètre en surface par rapport au diamètre en volume.

La comparaison des diamètres moyens volumiques obtenus avec le morphogranulomètre et le granulomètre est présentée, dans la *Figure 166*, en fonction de la concentration en biomasse.

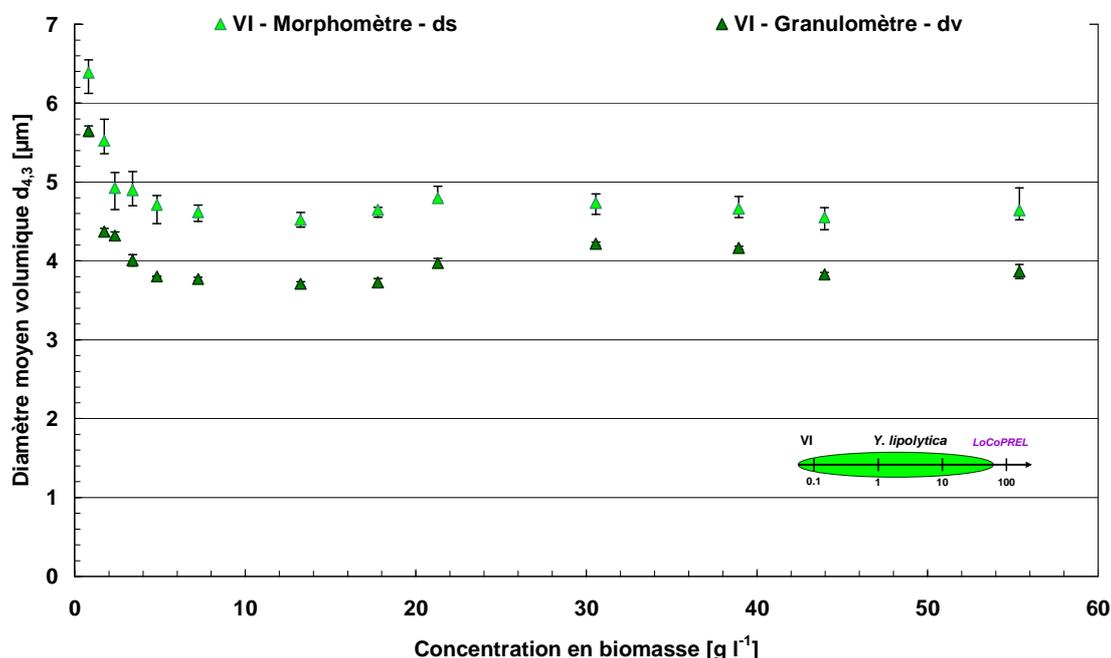


Figure 166 : Evolution du diamètre moyen volumique en fonction de la concentration en biomasse (culture VI, *Y. lipolytica*)

A nouveau, on remarque que l'estimation du diamètre moyen volumique en surface reste systématiquement supérieure au diamètre moyen volumique en volume avec un écart moyen entre les différentes analyses effectuées au cours de la culture VI, de $0.77 \pm 0.17 \mu\text{m}$. Cet écart s'explique par l'analyse de la surface projetée qui maximise la détermination du diamètre moyen pour les objets non sphériques. Le *Tableau 45* rassemble les valeurs moyennes de diamètre moyen volumique $d_{4,3}$ obtenues par le granulomètre (d_v) et le morphogranulomètre (d_s).

Diamètre équivalent	$d_{s\ 4,3}$	$d_{v\ 4,3}$
Culture III	0.808 ± 0.051	∅
Culture VI	4.89 ± 0.51	4.10 ± 0.51

Tableau 45 : Diamètre moyen volumique $d_{4,3}$ issu de diamètres en surface ou en volume (cultures III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

b. Changement morphologique chez *E. coli*

L'analyse morphologique avec *E. coli* est difficile à obtenir car le microscope optique utilisé est à la limite de sa résolution. La mise au point, effectuée à vue, reste sensible. Cependant, le logiciel de traitement d'image fourni avec l'appareil permet de récupérer correctement les objets analysés permettant ainsi de faire ressortir certaines évolutions morphologiques.

A partir des données obtenues sur les échantillons de la culture III, on impose au logiciel de traitement des données de trouver quatre groupes, correspondant aux quatre échantillons analysés et répétés. Sur la *Figure 167*, les échantillons répétés se distinguent entre eux par une lettre (A, B ou C). Sur les quatre échantillons analysés au morphogranulomètre pour la culture III, seuls quatre paramètres géométriques permettent de rassembler les échantillons similaires. Seuls les échantillons de début d'expérimentation ressortent de l'ensemble des données. La longueur, le volume de la sphère équivalente (SE Volume), le diamètre en surface (CE Diameter) et l'aire sont les paramètres géométriques permettant de discriminer les échantillons de début d'expérimentation (15.3 h - 0.9 g/l). La *Figure 167* montre un exemple de la classification hiérarchique ascendante obtenue avec la largeur comme variable géométrique analysée.

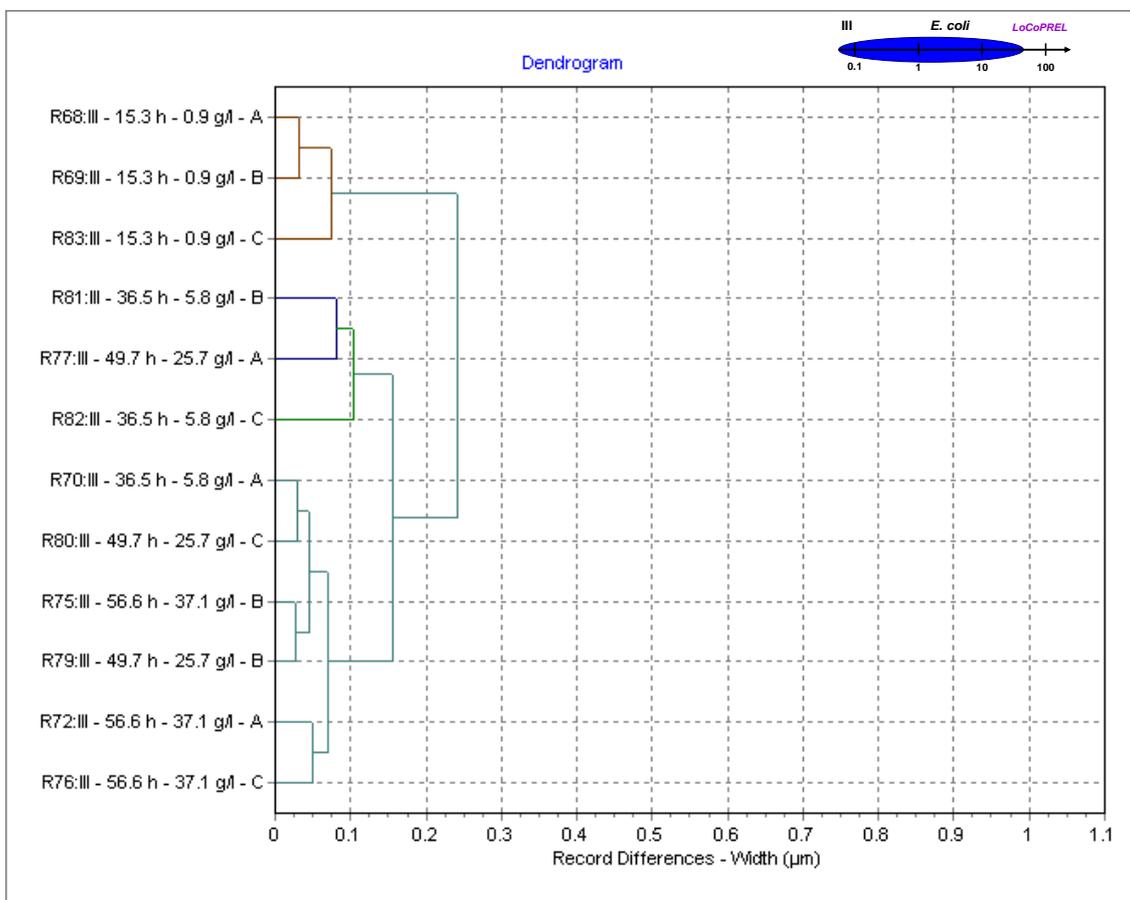


Figure 167 : Dendrogramme basé sur la largeur des cellules, issu de l'analyse de 107821 objets détectés (culture III, *E. coli*,)

Cette évolution se distingue mieux en traçant la fonction de répartition de la largeur des cellules, comme présenté dans la *Figure 168* ci-dessous.

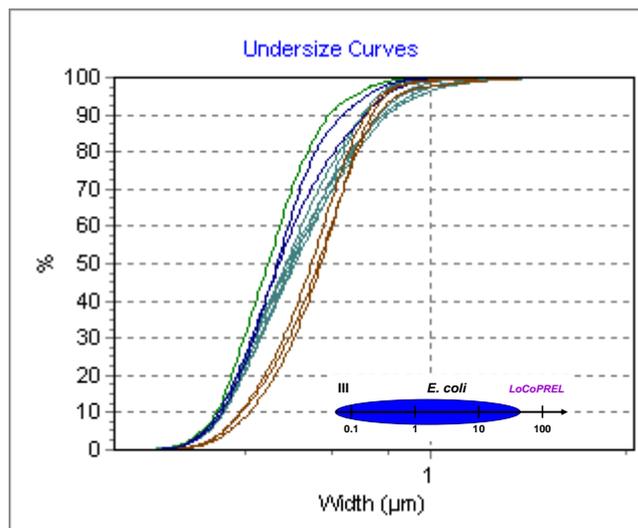


Figure 168 : Fonction de répartition de la largeur des cellules (culture III, *E. coli*) - en marron, les échantillons de début d'expérimentation

En début de culture, les cellules doivent s'adapter rapidement à l'environnement du bioréacteur et de la boucle de dérivation. Cette adaptation se traduit par une diminution de la largeur des cellules, comme présenté sur la *Figure 168*. Cette diminution de largeur traduit une réponse physiologique de la bactérie suite à son adaptation à l'environnement physicochimique (stress osmotique) et hydrodynamique imposé par l'outil expérimental. Les modifications morphologiques de bactéries, suite à un stress osmotique, sont des cas d'étude rencontrés dans la littérature comme en témoigne l'équipe de Pianetti avec *A. hydrophila* (Pianetti *et al.*, 2009). De plus, au-delà des modifications morphologiques géométriques, le stress osmotique peut également être la cause de modifications de la paroi cellulaire (Jydegaard-Axelsen *et al.*, 2005), pouvant ainsi expliquer également cette légère modification géométrique.

c. Changement morphologique chez *Y. lipolytica*

Une analyse géométrique a été également effectuée lors de la culture VI avec *Y. lipolytica*. Des échantillons de l'inoculum ont été conservés avant que la préculture ne soit inoculée dans le bioréacteur. La comparaison des cellules avant et après inoculation est présentée, sur la *Figure 169*, par le dendrogramme obtenu par l'analyse des données issues de la longueur. Une classification similaire peut être effectuée sur les paramètres analysés suivants : l'aire, le diamètre en surface (CE Diameter), la distance maximale, le périmètre, le volume de la sphère équivalente (SE Volume), la largeur, la circularité, la circularité haute sensibilité, la solidité et l'écart-type de l'intensité lumineuse des particules analysées.

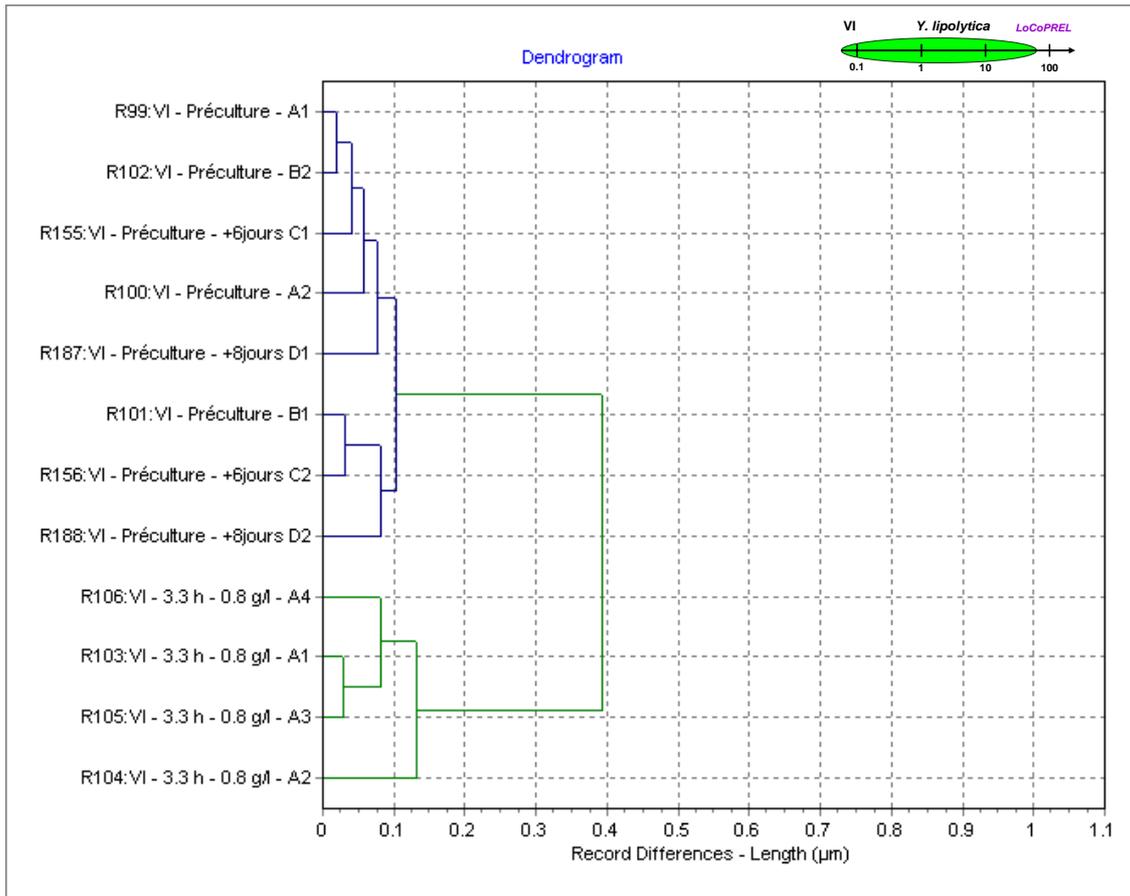


Figure 169 : Dendrogramme basé sur la longueur des cellules, issu de l'analyse de 66624 objets détectés (culture VI, *Y. lipolytica*)

La fonction de répartition de la longueur des cellules, représentée en *Figure 170*, permet de mieux identifier cette différence de distribution de longueur pour les échantillons pré et post-inoculation.

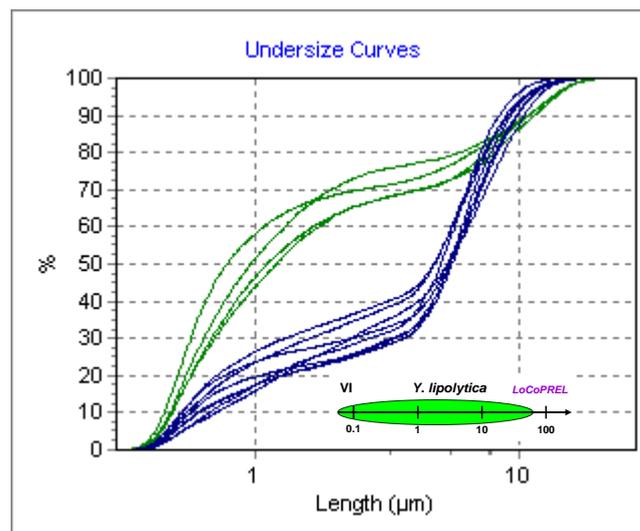


Figure 170 : Fonction de répartition de la longueur des cellules (culture VI, *Y. lipolytica*) - en bleu, les échantillons issus de la préculture

On observe que les cellules de l'inoculum (présentées en bleu dans la *Figure 170*) voient leur longueur diminuer après inoculation dans le bioréacteur. Malgré un milieu identique avant l'ajout des cellules pour le stade III de préculture (cf. *Chapitre II*), la phase liquide a évolué sous l'action de la croissance des cellules. Au moment de l'inoculation, la phase liquide du stade III de préculture et le milieu minimum du bioréacteur sont proches, mais suffisamment différents pour obtenir une réponse physiologique détectable et quantifiable. De plus, le premier prélèvement ayant été effectué 3.3 h après l'inoculation, les cellules ont pu commencer, voire s'adapter, à leur nouvel environnement de croissance. Dans le cas présenté, cette modification géométrique ne peut être expliquée que par deux hypothèses. La première est un stress osmotique des cellules entre le milieu de préculture et le milieu initial contenu dans le bioréacteur. La deuxième possibilité est un stress hydrodynamique lié à l'adaptation des cellules à des passages répétés au sein de la tête de pompe. Aucune séquence de débit n'ayant été effectuée avec les cellules, l'hypothèse d'une limitation en substrat ou en transfert en dioxygène n'est pas possible.

De manière à s'affranchir d'un doute lié à la préparation et la conservation des échantillons, les analyses sur la préculture III ont été répétées sur différentes lames (A, B, C, D), en différentes localisations (1, 2) de la lamelle, et pour différents temps de conservation (jusqu'à 8 jours après le début des analyses sur le morphogranulomètre). Cependant, ces facteurs ne sont pas discriminants, et ne permettent pas de regrouper les essais effectués le même jour.

Afin de détecter une possible évolution des cellules au cours de l'expérimentation, les échantillons de début et de fin sont analysés. Dans ce cas, seuls les dendrogrammes effectués sur le paramètre géométrique de solidité (cf. *Chapitre II III.B.2.a.iii Morphogranulométrie* et *Annexe 5 : Description des paramètres morphologiques*) permettent de discriminer ces deux groupes, comme cela est présenté dans la *Figure 171*.

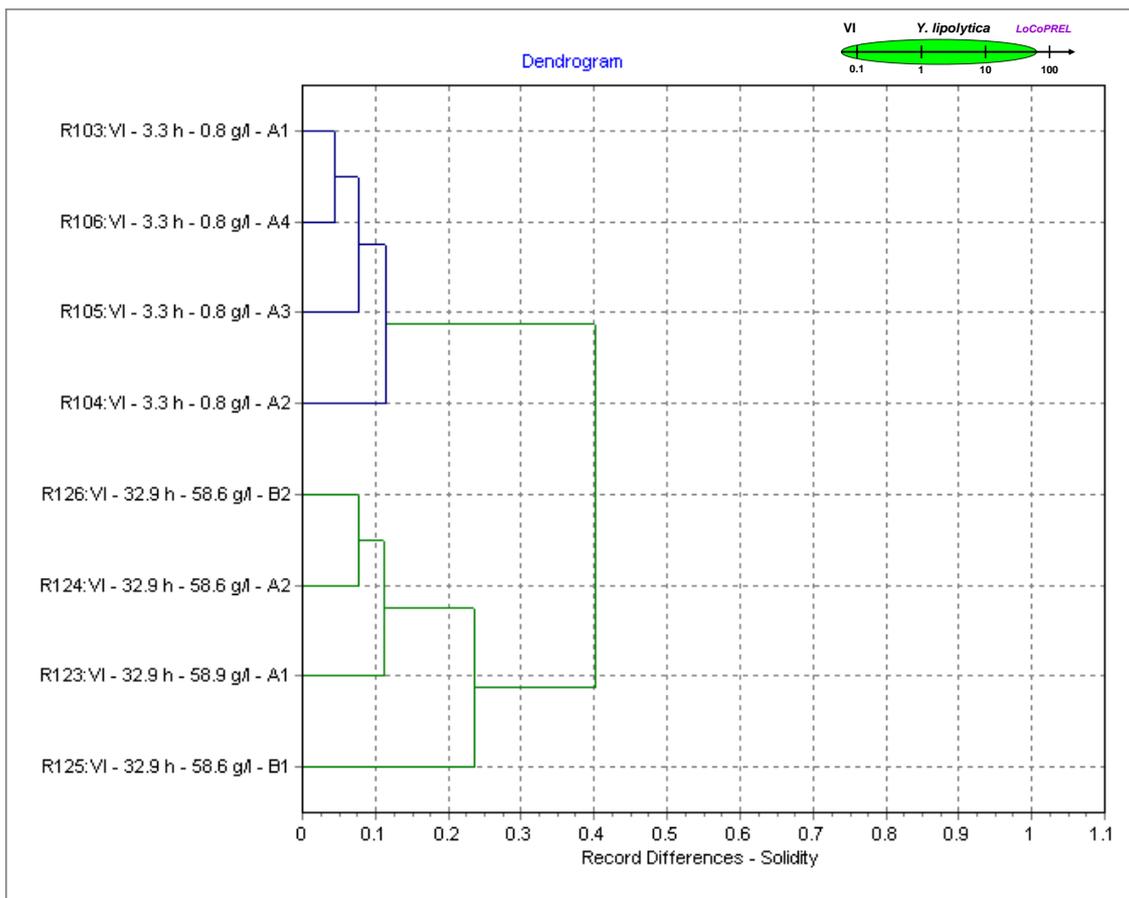


Figure 171 : Dendrogramme effectue sur le paramètre géométrique « solidité » de la culture VI (nombre total de particules : 40156)

Dans ce cas, si la solidité permet de discriminer les échantillons de début et de fin d'expérimentation, cela implique que la forme externe se modifie avec le temps d'expérimentation. A nouveau, la préparation de l'échantillon a été testée comme pouvant avoir un impact. Cependant, cela n'a pas été identifié dans le dendrogramme en termes de rassemblement des échantillons pour une même lame utilisée. La fonction de répartition de la solidité est présentée par la *Figure 172*.

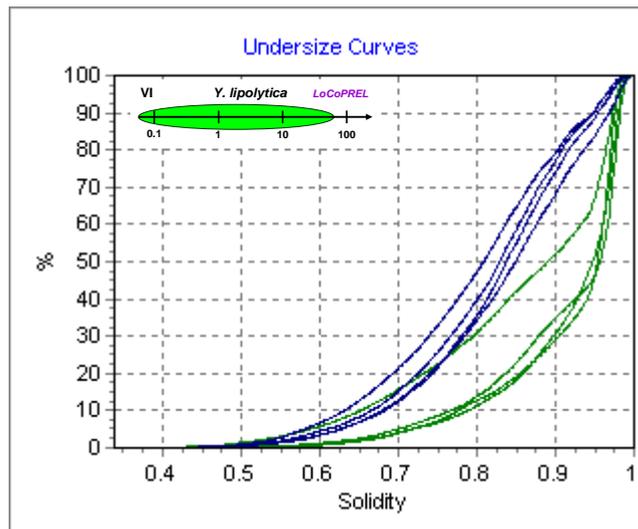
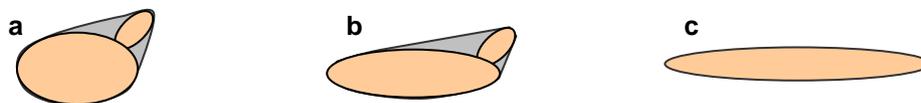


Figure 172 : Fonction de répartition de la solidité (culture VI, *Y. lipolytica*)

La Figure 172 montre que les cellules de fin d'expérimentation ont une solidité plus élevée par rapport à celles du début. Cela implique que l'aire convexe des cellules s'est accentuée au fur et à mesure de l'expérimentation pour tendre vers l'aire réelle des cellules. L'allongement des cellules a diminué l'impact du bourgeonnement des cellules sur la valeur de la solidité. De plus, la proportion de cellules allongées s'accroissant, la valeur de la solidité a également augmenté, comme cela est illustré sur la Figure 173.



Solidité (a) < Solidité (b) < Solidité (c)

Figure 173 : Augmentation de la solidité par modification de la forme des cellules

La levure *Y. lipolytica* a été étudiée sur ses aspects morphologie car elle présente naturellement un dimorphisme (Vanderwalt and Vonarx, 1980). Ce dimorphisme peut être généré par des conditions opératoires causant un stress (Kawasse *et al.*, 2003). La brusque modification osmotique du milieu suite à l'inoculation, ainsi que le stress hydrodynamique induit par la boucle de dérivation, sont autant de facteurs physicochimiques et physiques pouvant avoir un impact sur la morphologie du microorganisme. Dans l'étude de Kawasse, la formation d'hyphe de la levure *Y. lipolytica* est causée par l'application d'un stress thermique et oxydatif (Kawasse *et al.*, 2003). Les stress appliqués sur cette levure par l'outil expérimental peuvent être de type osmotique et / ou hydrodynamique. Même si ce dernier est minimisé par une gestion des apports les plus proches des besoins de la cellule, on note néanmoins une modification géométrique entre l'inoculum, le début et la fin de l'expérimentation. Par nature, la levure *Y. lipolytica* présente une polarité lors de sa multiplication asexuée par bourgeonnement, que celle-ci soit sous forme ovoïde ou sous forme d'hyphe (Herrero *et al.*, 1999).

Cette polarité indiquerait que l'évolution de la solidité schématisée sur la *Figure 173* se confirme, sans pour autant présenter un réel dimorphisme.

En conclusion, la caractérisation de taille des cellules effectuée avec le granulomètre et le morphogranulomètre présente des diamètres équivalents en volume et en surface proches, mais systématiquement différents. Sur la culture VI d'*Y. lipolytica*, on remarque que le diamètre en surface, issu du morphogranulomètre, est plus élevé que le diamètre en volume, provenant du granulomètre. Les paramètres géométriques pouvant traduire un changement morphologique drastique, tel que le rapport d'aspect (cf. *Chapitre II Tableau 25 : Liste des paramètres morphologiques intégrée par le Morphologi® G3S*) n'ont pas été détectés comme étant des paramètres évoluant significativement au cours de la culture. Les modifications morphologiques détectées sur l'évolution de la largeur des cellules d'*E. coli*, ou l'évolution de la longueur, entre autres, observé chez *Y. lipolytica*, montrent que la culture subit un léger stress, mais ne présente pas d'importante évolution morphologique pouvant modifier drastiquement les propriétés du milieu.

Il semble néanmoins que l'inoculation produise un stress osmotique forçant les cellules à s'adapter à la dilution du moût dans le nouveau milieu. Concernant l'évolution entre début et fin de culture, l'outil expérimental applique un stress continu sur les cellules, et l'identification d'une évolution morphologique malgré une culture effectuée dans des conditions d'alimentations en substrats maîtrisés, implique une réponse physiologique s'apparentant à un début de dimorphisme pour la levure *Y. lipolytica*. Néanmoins, cette réponse physiologique reste faible par rapport au potentiel d'évolution indiqué dans la littérature (Herrero *et al.*, 1999). Il est donc possible de considérer que l'impact de l'outil expérimental est faible, sans le considérer pour autant comme négligeable.

B. Analyses physico-chimiques sur la biomasse et le surnageant

Dans le *Chapitre IV*, nous avons vu qu'une proportion importante de gaz est comprise dans le moût lors de sa caractérisation *in situ*. De plus, le suivi de la conductivité électrique indique des allures opposées selon la culture considérée. Pour la majorité des cultures, les sels semblent progressivement consommés (culture I, II, III et VI), mais cette évolution n'est pas systématique comme cela a été remarqué pour les cultures IV et V (voir *Chapitre IV III.B.2 Conductimétrie en ligne*). Il est donc intéressant de mieux appréhender l'impact des espèces chargées sur le suivi de la conductivité électrique, et sa possible contribution dans l'incorporation d'une phase gaz dans le moût.

Une caractérisation hors ligne des phases est nécessaire afin de détecter la contribution de la phase solide représentée par la biomasse, et de la phase liquide, représentée par le surnageant du milieu de culture. La mesure du potentiel zeta des cellules nous informera d'une contribution de la biomasse à la mesure de la conductivité électrique. La mesure de la pression osmotique et de la force ionique nous informeront sur la dynamique globale d'évolution des espèces chargées en solution afin de savoir si leur contribution sont en adéquation avec les mesures effectuées en ligne.

1. Potentiel Zeta de la biomasse

La caractérisation des cellules s'est donc poursuivie par une estimation du potentiel zeta de la surface des cellules. Ce paramètre, s'il se modifie au cours de la culture, peut intervenir sur la dynamique observée sur les mesures de conductivité électrique. Les valeurs obtenues ne représentent pas une information absolue sur la valeur réelle en cours de culture car le milieu de culture et le pH diffèrent des conditions de l'analyse. Néanmoins, elle permet de détecter une possible évolution au cours de la culture. De manière à pouvoir comparer les valeurs entre les cultures, les cellules ont subi une préparation identique. Les résultats sont représentés dans la *Figure 174*.

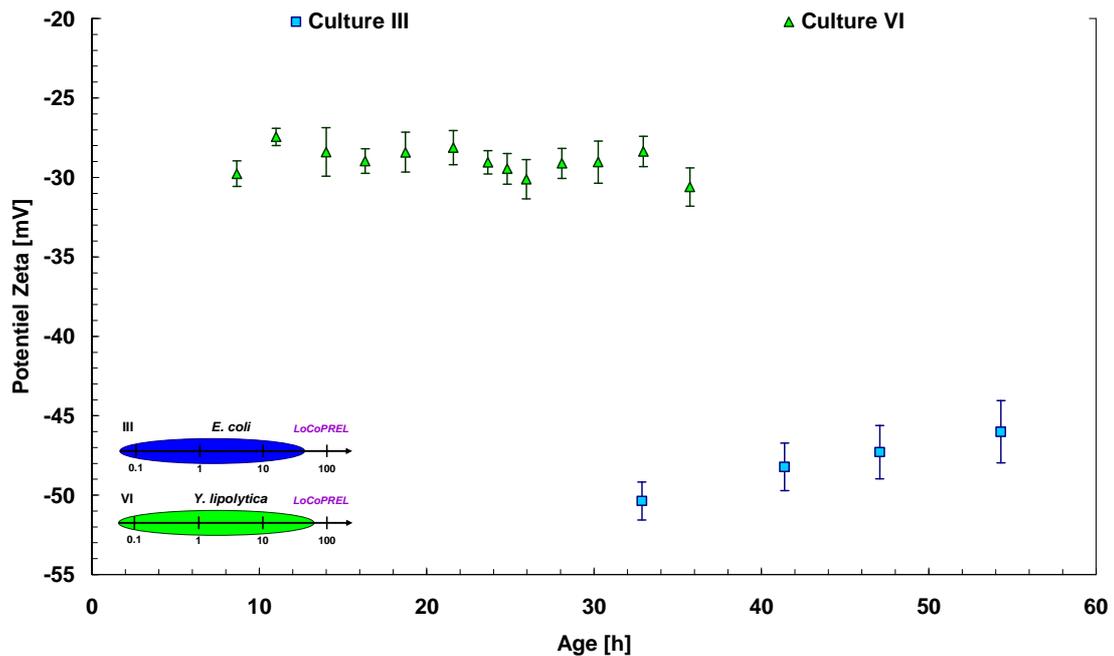


Figure 174 : Potentiel Zeta en fonction du temps (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

Malgré des écarts-types importants, on observe une distinction nette du potentiel zeta moyen entre *E. coli* avec -47.9 ± 1.8 mV et *Y. lipolytica* avec -28.98 ± 0.86 mV. De plus, le suivi temporel nous informe que le potentiel zeta ne semble pas ou peu modifié au cours du temps, malgré le peu de données pour la culture III. Le comparatif permet d'observer qu'*E. coli* présente une charge de surface plus prononcée qu'*Y. lipolytica*. Cette différence pourra être mise en avant pour expliquer des différences rhéologiques entre ces deux types de culture. Pour la suite de la discussion, nous retiendrons que le potentiel zeta de chacune des cultures reste globalement constant.

2. Pression osmotique du surnageant

La pression osmotique est la pression nécessaire pour empêcher la pénétration de l'eau dans un compartiment à travers une membrane rigide semi-perméable (perméable à l'eau mais pas aux ions). Ainsi, sa mesure dans la phase liquide permet de nous apporter une information supplémentaire concernant la quantité globale d'ions présents dans la phase liquide, en posant l'hypothèse que seules les espèces inorganiques contribuent à l'évolution de la pression osmotique mesurée. Lors des cultures, la phase liquide (surnageant) a été rapidement séparée de la phase solide pour chaque prélèvement de manière à analyser, post expérimentation biologique, les pressions osmotiques (Figure 175).

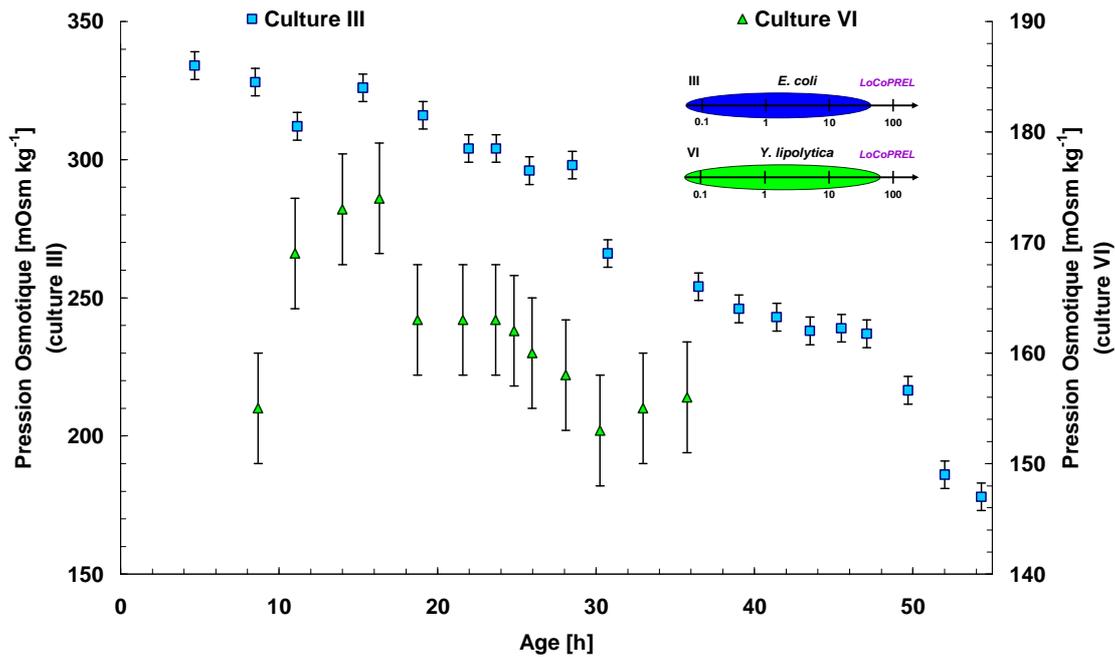


Figure 175 : Pression osmotique en fonction du temps (culture III, *E. coli* -culture VI, *Y. lipolytica*)

Pour les deux cultures, malgré une précision de $\pm 5 \text{ mOsm kg}^{-1}$ pour chaque échantillon analysé, nous observons une diminution globale de la pression osmotique du milieu. Cette baisse continue est plus prononcée pour la culture III d'*E. coli*. Cependant, même si la dynamique est plus faible pour la culture VI, la tendance observée semble de moindre amplitude, tout en étant similaire à celle de la culture III (le premier point de la série d'analyse à 8.6 h semblant aberrant).

Si l'on considère le modèle de Vant'Off, adapté pour les solutions diluées, la pression osmotique est proportionnelle à une concentration en soluté. Or, si la mesure de pression osmotique au cours du temps indique une diminution, il semble que le milieu s'appauvrit en espèces ioniques. De manière à confirmer cette dernière remarque, la pression osmotique sera complémentaire de la force ionique pour indiquer l'évolution de la teneur en sel dans le surnageant.

3. Force ionique

La force ionique du surnageant est déterminée en effectuant la quantification des différentes espèces chargées inorganiques présentes dans le surnageant à partir de dosages en ICP-MS. Ces espèces sont initialement présentes dans le milieu minimum, et apportées en continu par l'alimentation en sels. La quantification de chacune des espèces permet de calculer la force ionique du milieu selon l'Équation 135.

$$I = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n C_i \cdot z_i^2$$

Équation 135 : Expression de la force ionique

Le cumul des concentrations pondérées de leur charge permet de calculer un coefficient de variation moyen pour chaque point déterminé de 13 %. La représentation de la force ionique au cours du temps est présentée, pour les cultures III et VI, sur la *Figure 176*.

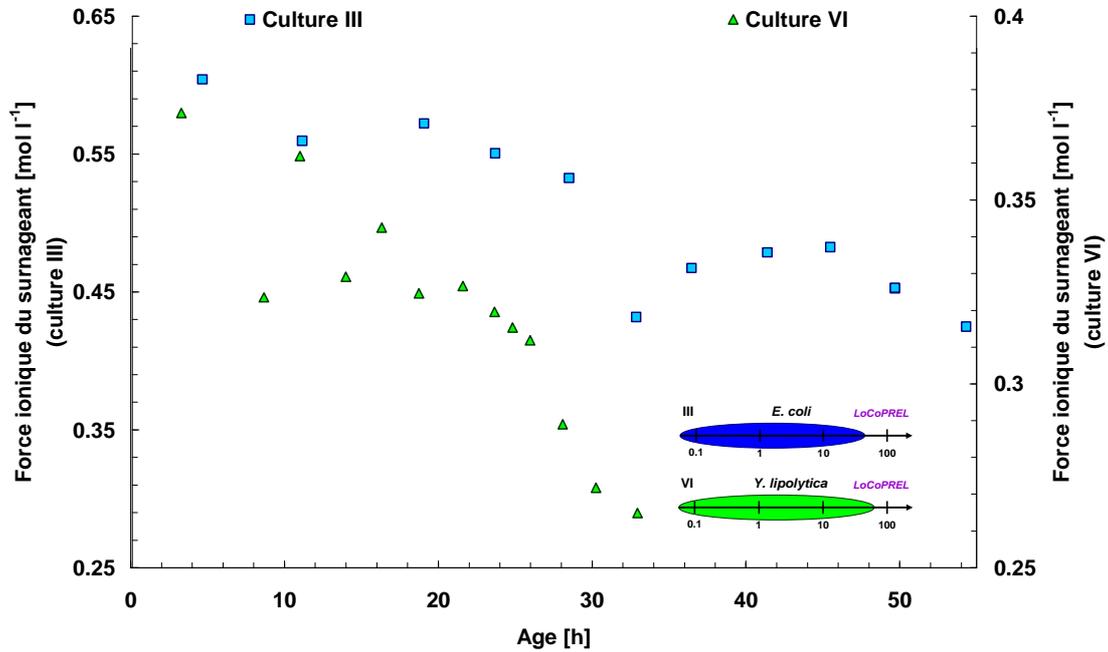


Figure 176 : Force ionique du surnageant en fonction du temps (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

A nouveau, comme pour la pression osmotique, on observe une diminution moyenne de la force ionique au cours du temps pour les cultures III et VI. Au contraire de la mesure de pression osmotique où les composés chargés ne sont pas les seuls à intervenir sur cette grandeur, la méthodologie employée pour la détermination de la force ionique ne contient pas ce biais possible. Seuls les composés inorganiques et chargés peuvent modifier cette grandeur. La similitude des dynamiques obtenues pour la pression osmotique et la force ionique confirme l'appauvrissement des milieux en éléments salins au cours des cultures.

C. Analyses chimiques

Plusieurs analyses chimiques (composition élémentaire, cendres et protéines) ont été réalisées. L'objectif est de caractériser la physiologie du microorganisme, mais également de conforter la pertinence des mesures physiques en ligne en démontrant que la biomasse reste homogène au cours de la culture. De manière à poursuivre l'analyse des résultats *in situ*, la caractérisation de la biomasse est approfondie sur des aspects plus spécifiques.

Une analyse élémentaire de la composition des cellules a été effectuée pour vérifier que celle-ci n'évolue pas vers une composition spécifique en lien avec une adaptation possible au sein de l'outil expérimental. Le suivi de la composition élémentaire Azote/Carbone permet également de détecter une possible évolution.

Pour conforter et compléter l'analyse élémentaire de la biomasse, les protéines totales sont dosées dans la biomasse et dans le surnageant. Les résultats sont présentés sous la forme d'une teneur protéique. Il est alors possible de détecter la présence d'une lyse cellulaire s'il y a une augmentation de ce ratio au cours de la culture.

Enfin, une mesure des cendres est effectuée de manière à suivre la composition de la cellule en éléments inorganiques. L'intérêt de cette dernière analyse est de vérifier la consommation de sel par le microorganisme, et de s'assurer que celle-ci est constante au cours de la culture. Cette vérification apportera des éléments de réponse sur le suivi de la conductivité électrique en ligne, en lien avec la mesure de la pression osmotique et de la force ionique du surnageant.

1. Composition élémentaire

La composition élémentaire consiste à déterminer les proportions de carbone, hydrogène, oxygène et azote présentes dans la biomasse. La *Figure 177* illustre la masse molaire de la biomasse [g Cmole^{-1}] et le rapport élémentaire N/C [l] durant les cultures III et VI.

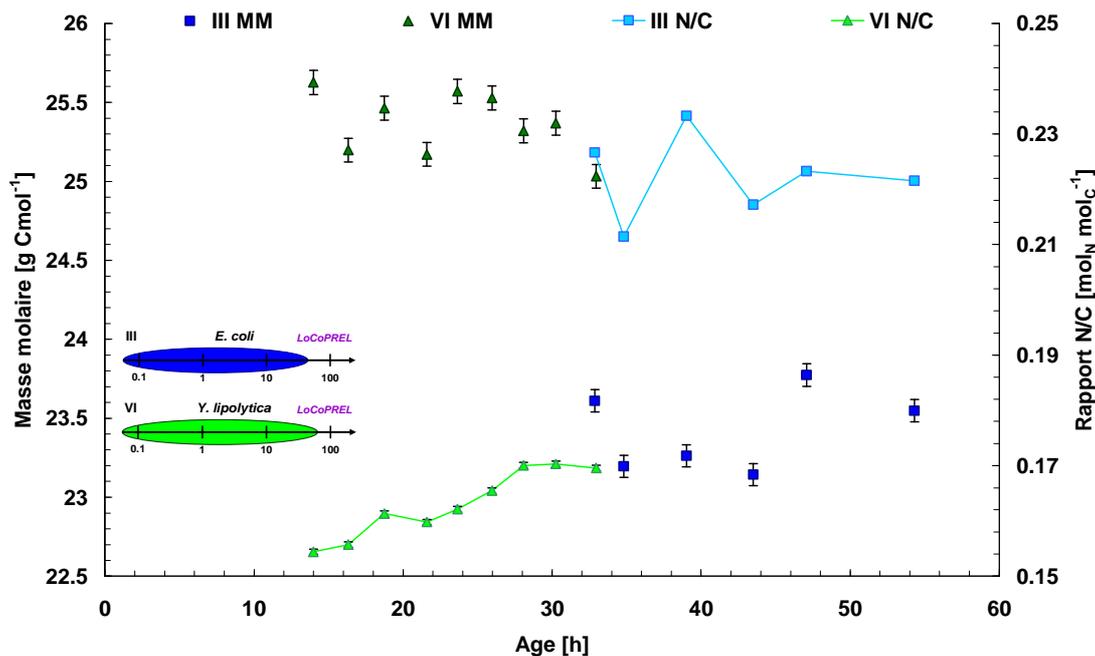


Figure 177 : Masse molaire de la biomasse en [Cmol] et rapport élémentaire intracellulaire N/C [/] en fonction du temps (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

La masse molaire de chaque culture présente une variabilité importante entre les points de mesure, malgré une précision garantie par le prestataire de 0.3 % pour chaque analyse effectuée. Ces mesures ne permettent pas de conclure à une évolution significative de la masse molaire. Sous l'hypothèse d'une constance de la composition cellulaire, les bactéries de la culture III (*E. coli*) ont une composition élémentaire moyenne de $\text{CH}_{1.817}\text{O}_{0.404}\text{N}_{0.222}$ correspondant à une masse molaire de $23.42 \text{ g Cmol}^{-1}$. Concernant les levures de la culture VI avec *Y. lipolytica*, on obtient une composition élémentaire moyenne de $\text{CH}_{1.848}\text{O}_{0.575}\text{N}_{0.163}$ correspondant à une masse molaire de $25.36 \text{ g Cmol}^{-1}$. Néanmoins, même si la variabilité inter-mesures est élevée sur la masse molaire, on observe que le rapport azote / carbone (N/C) dans la biomasse suit une tendance à l'augmentation pour la culture VI. La composition élémentaire de la biomasse semble bien suivre une évolution, même si la caractérisation et le suivi de ce changement restent difficiles à prouver. Rappelons que dans le cadre d'une analyse élémentaire de l'azote, celui-ci est dosé intégralement, sans distinction de l'azote organique (par exemple les protéines) et minéral.

Globalement, on retiendra de cette analyse que la précision des mesures et la variabilité des mesures obtenues ne permettent pas de mettre en évidence une dérive significative de ces grandeurs de la composition élémentaire des cellules des cultures III et VI.

2. Protéines

La Figure 178 rapporte, pour les cultures III et VI, l'évolution des rapports protéines du surnageant / concentration en matière sèche et protéines dans le surnageant / protéines dans la biomasse.

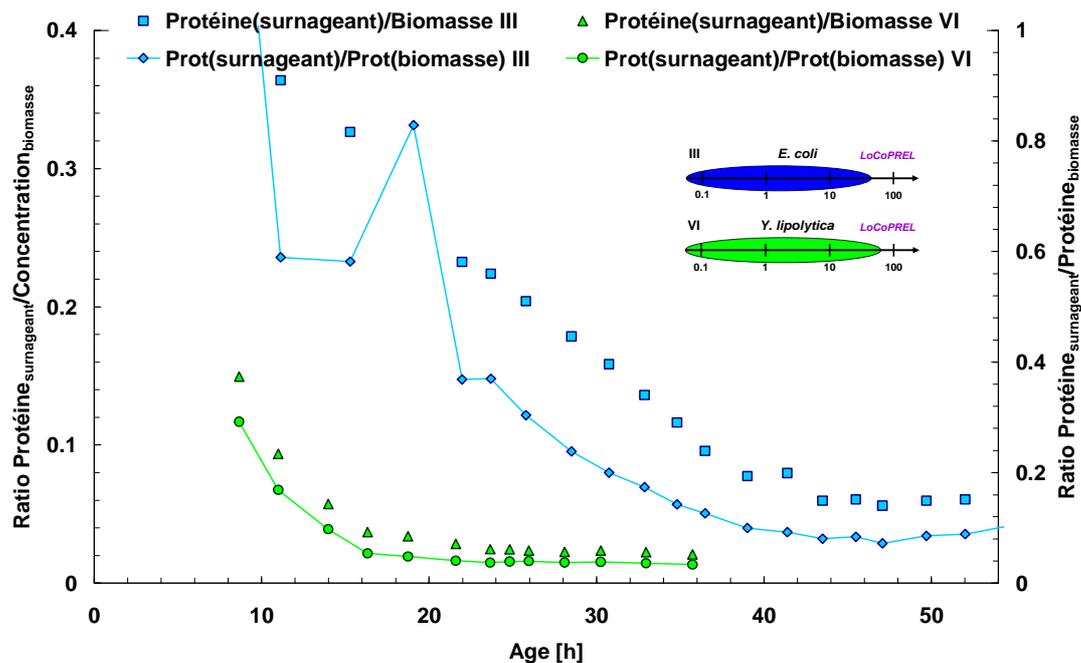


Figure 178 : Ratios des concentrations en protéines présentes dans le surnageant par rapport à la concentration en biomasse, et de la quantité de protéine dans le surnageant par rapport à la quantité de protéine dans la biomasse

Quelle que soit la culture, on observe une diminution des différents ratios suivis au cours du temps. La diminution de chacun des ratios indique que la proportion de protéines dans le surnageant diminue plus rapidement que la croissance des microorganismes. Ceci indique que les cellules ne sont pas perturbées au cours de leur croissance par la boucle de dérivation. Cela semble être vérifié pour les deux cultures. Cependant, pour la culture III, on note une stagnation des ratios à partir de 47 h, soit plusieurs heures avant l'étape de diminution de l'activité cellulaire. A partir de 45.5 h, la température a été régulée avec un degré en moins (36 °C) par rapport à la consigne initiale de 37 °C. A partir de ce t instant, et jusqu'à la fin de la croissance, on observe que les différents ratios semblent s'être stabilisés.

Globalement, ces différents ratios diminuent pour atteindre, à concentration en biomasse plus élevée, une valeur faible constante. On peut donc conclure que, au cours des cultures, il n'y a pas de lyse des cellules induite par le passage répété à travers la boucle de dérivation, tout au moins dans une proportion qui soit détectable par un dosage de protéine.

3. Teneur en cendre

En complément à l'analyse élémentaire, nous quantifions le taux de cendres (minéraux) contenues dans la biomasse comme le rapporte la *Figure 179*. Cette teneur nous permet d'une part de compléter les informations sur la composition élémentaire de la biomasse, la physiologie du microorganisme en cours de culture, et d'autre part d'obtenir des informations sur un stockage hypothétique de sels dans la biomasse par rapport à ceux présents dans le milieu initial (apportés par la solution saline d'alimentation).

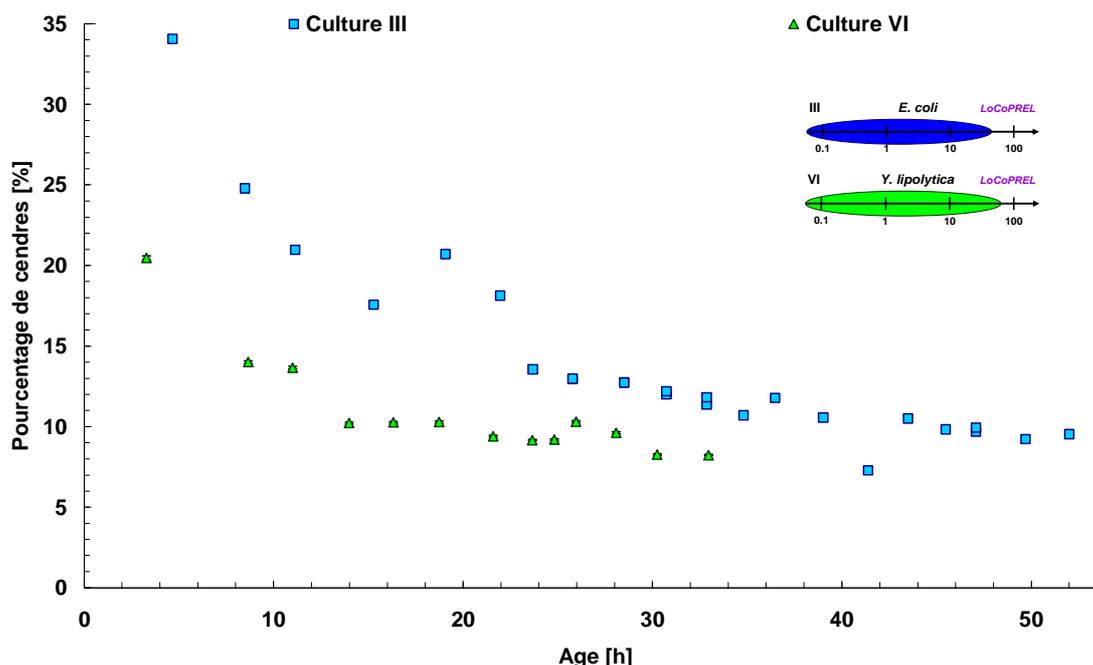


Figure 179 : Teneur de la biomasse en éléments inorganiques [g 100g⁻¹] en fonction du temps (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

L'incertitude associée à cette analyse est directement fonction de la concentration en biomasse présente, et révèle une erreur maximale de 0.3 % sur les pourcentages obtenus. Ainsi pour les faibles concentrations en biomasse, $X < 1\text{g l}^{-1}$, ces valeurs sont à considérer avec précaution. Pour les cultures III et VI, nous observons ainsi une diminution de la teneur en cendres en fonction de la concentration en biomasse. Cependant les taux de cendres considérés tendent à atteindre des valeurs de l'ordre de 8.5 à 10 g 100g⁻¹ pour *E.coli* et *Y. lipolytica*. La variabilité inter-mesures pour les débuts de culture implique un biais important par les faibles masses mesurées et ne permet pas de conclure sur une évolution de la teneur en cendres au cours des cultures. Par conséquent, nous considérons que les cendres sont maintenues constantes au cours des cultures III et VI.

Conclusion

L'ensemble des analyses effectuées a permis d'identifier des paramètres physiques ou physico-chimiques constants, pouvant être exclus des discussions sur la compréhension des dynamiques observées *in situ* pour les cultures III d'*E. coli* et VI d'*Y. lipolytica*.

Les analyses physiques permettant la détermination de taille des cellules ont permis d'identifier une légère évolution en fonction de la conduite, mais on conclura tout de même que celle-ci reste globalement constante. De même, le suivi de la morphologie a permis d'identifier des changements sur certains paramètres géométriques par comparaison de cellules dans des stades de culture bien distincts (préculture, début et fin d'expérimentation). Cependant, ces modifications restent mineures par rapport aux modifications morphologiques recensées dans la littérature (Herrero *et al.*, 1999; Pamboukian and Facciotti, 2005; Sinha *et al.*, 2001).

Les analyses physico-chimiques n'ont pas permis de détecter une évolution, au cours de la culture, du potentiel zeta des cellules. Par contre, la mesure de la pression osmotique et de la force ionique fournissent des résultats cohérents entre eux, et tendent, pour les cultures III et VI, à montrer un appauvrissement des milieux en espèces chargées.

Enfin, les analyses chimiques n'ont pas permis d'identifier une évolution significative de la biomasse en termes de proportion de cendres ou de composition élémentaire au cours des cultures. Cependant, le dosage des protéines intra et extra cellulaire a permis de vérifier que les cellules, parallèlement à leur croissance, ne semblent pas lyser, comme on aurait pu le craindre suite aux passages répétés dans la boucle de dérivation.

Ces différents résultats doivent maintenant être confrontés aux dynamiques *in situ* observées afin de mieux appréhender les phénomènes physiques mis en jeu au sein de l'outil expérimental.

II. MASSE VOLUMIQUE

A. Suivi en ligne et hors ligne

La description de l'évolution temporelle de la masse volumique enregistrée sur l'outil expérimental a été effectuée au *Chapitre IV*. Nous allons procéder à une analyse plus précise de la dynamique observée. L'une des hypothèses mises en avant pour expliquer l'allure de la masse volumique du moût est l'impact de la biomasse. Pour cela, la masse volumique enregistrée en ligne est comparée à l'analyse hors ligne de celle-ci. L'analyse hors-ligne permet de suivre le moût sans la phase gazeuse présente sur la boucle de dérivation. La masse volumique en ligne prend l'expression de l'*Équation 136*.

$$\rho_{\text{moût}}^{\text{en ligne}} = \rho_{\text{solide-liquide}} \cdot (\phi_{\text{solide}}^{\text{moût}} + \phi_{\text{liquide}}^{\text{moût}}) + \rho_{\text{gaz}} \cdot (\phi_{\text{gaz}}^{\text{moût}})$$

Équation 136 : Masse volumique du moût en ligne

Au sein de l'*Équation 136*, on considérera $\rho_{\text{solide-liquide}} = \rho_{\text{moût}}^{\text{hors-ligne}}$, $\phi_{\text{solide-liquide}} = \frac{V_{\text{solide-liquide}}}{V_{\text{total}}}$, et ρ_{gaz} sera assimilé à ρ_{air} . De plus, ϕ symbolisant la fraction volumique de cette matrice triphasique, l'*Équation 137* imposera la condition :

$$\phi_{\text{solide}}^{\text{moût}} + \phi_{\text{liquide}}^{\text{moût}} + \phi_{\text{gaz}}^{\text{moût}} = 1$$

Équation 137 : Somme des fractions volumiques des différentes phases du moût

Les différentes mesures de masse volumique sont représentées en fonction de la concentration en biomasse dans la *Figure 180*. La concentration en biomasse est obtenue à partir d'un lissage des valeurs de concentrations obtenues avec les mesures de concentration en matière sèche de la biomasse.

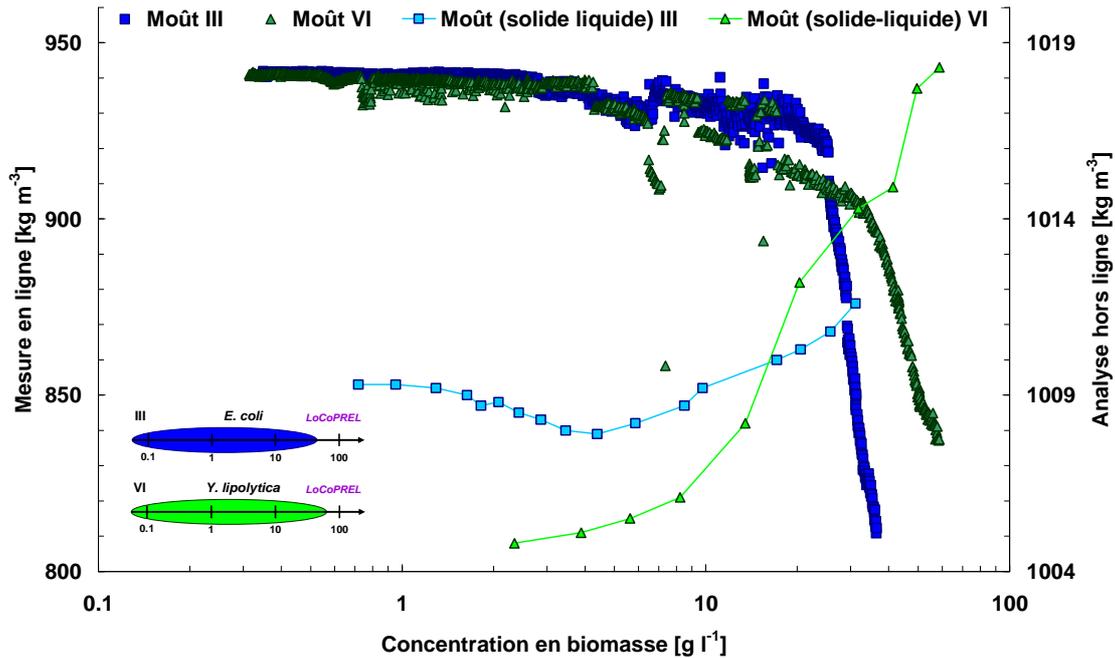


Figure 180 : Masse volumique en fonction de la concentration en biomasse pour les cultures III et VI

Tout d'abord, les mesures en ligne semblent montrer un seuil en concentration au-delà duquel la masse volumique en ligne diminue brusquement. Plus précisément, pour les deux cultures, on observe trois étapes. La première correspond à un moût non perturbé par la présence de cellules. Il sera pris en référence pour l'analyse de l'augmentation de la phase gazeuse. Une seconde étape montre une lente perturbation, accompagnée d'une augmentation de la variabilité des mesures en ligne et d'une petite diminution des valeurs moyennes enregistrées. Enfin, la dernière étape est marquée par une brusque diminution des valeurs de masse volumique enregistrées par l'outil expérimental. Au final, il semble que ce soit deux seuils, et non un seul, qui permette de décrire cette évolution. Les valeurs identifiées pour les cultures III et VI sont rassemblées dans le *Tableau 46*.

Expérimentation	Seuil 1 [g l ⁻¹]	Seuil 2 [g l ⁻¹]
III - <i>E. coli</i>	2.8	24.6
VI - <i>Y. lipolytica</i>	4.3	33

Tableau 46 : Seuils de biomasse identifiés sur l'analyse de la masse volumique en ligne

Parallèlement, les mesures hors ligne montrent deux tendances différentes en fonction du microorganisme utilisé. Dans le cas de la culture VI avec *Y. lipolytica*, on observe une augmentation continue de la masse volumique du moût exempt de sa phase gazeuse ($\rho_{\text{solide-liquide}}$). Pour la culture III d'*E. coli*, on observe une diminution, suivie d'une augmentation lors des analyses hors ligne de la masse volumique. La diminution s'explique par une réaction des cellules suite à l'appauvrissement du milieu en élément minéral. Au minimum observé, le bioréacteur commence à être alimenté avec un

substrat concentré, ainsi qu'un apport plus important en sel. La masse volumique des cellules se modifie de manière à s'adapter à leur environnement.

B. Discussion sur l'analyse hors ligne

L'analyse plus approfondie des valeurs de masse volumique obtenues nous impose de considérer les échantillons comme une suspension solide-liquide. En ce sens, l'expression de la fraction volumique de l'échantillon prend la forme de l'Équation 138.

$$\phi_{\text{solide}}^{\text{suspension}} + \phi_{\text{liquide}}^{\text{suspension}} = 1$$

Équation 138 : Somme des fractions volumiques du moût hors ligne

La suspension cellulaire se compose de différents éléments, schématisés dans la Figure 181.

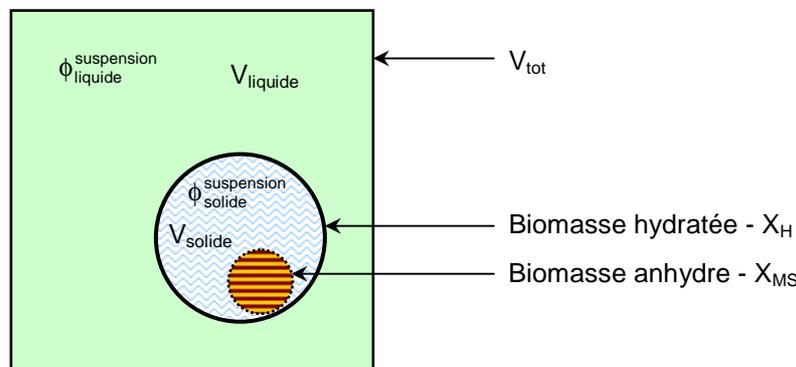


Figure 181 : Représentation schématique d'un échantillon de moût après prélèvement du bioréacteur

Dans un volume d'échantillon de suspension cellulaire nommé V_{tot} , deux phases sont à considérer. La première phase est la phase liquide. Elle est décrite par sa fraction volumique $\phi_{\text{liquide}}^{\text{suspension}}$ et sa masse volumique ρ_{liquide} . La seconde phase est la phase solide, symbolisée par la biomasse X . Elle est caractérisée par sa fraction volumique $\phi_{\text{solide}}^{\text{suspension}}$ et son volume V_{solide} . La phase solide est décomposée en deux espèces : la biomasse hydratée X_H (cercle en trait plein), caractérisée par sa masse volumique ρ_{X_H} . Elle intègre le pourcentage massique en eau de la cellule α , ainsi que la matière sèche de celle-ci. Si l'on considère uniquement la matière sèche de la biomasse (cercle en pointillé, intérieur rayé), on parlera de biomasse anhydre X_{MS} , caractérisée par sa masse volumique $\rho_{X_{MS}}$.

A partir de la masse volumique hors ligne et de la concentration en matière sèche de la biomasse, on obtient l'Équation 139. Le détail de ces calculs est reporté en Annexe 14 : Détermination de la masse volumique de la biomasse.

$$\rho_{\text{moût}}^{\text{hors-ligne}} = \left(\frac{\rho_{X_H} - \rho_{\text{liquide}}}{\rho_{X_{MS}} - \rho_{X_{MS}}} \right) \cdot X_{MS} + \rho_{\text{liquide}} = a_{\text{suspension}} \cdot X_{MS} + \rho_{\text{liquide}}$$

Équation 139 : Masse volumique hors ligne

Expérimentalement, à partir de la détermination du coefficient directeur $a_{\text{suspension}}$ et de l'ordonnée à l'origine ρ_{liquide} , il est possible de déterminer la masse volumique de la biomasse sèche X_{MS} par l'Équation 140, et de la biomasse humide X_{H} réellement présente dans le bioréacteur par l'Équation 141.

$$\rho_{X_{\text{MS}}} = \frac{\rho_{\text{liquide}}}{\frac{1}{1-\alpha} - a_{\text{suspension}}}$$

Équation 140 : Masse volumique de la biomasse anhydre

$$\rho_{X_{\text{H}}} = \frac{\rho_{\text{liquide}}}{1 - a_{\text{suspension}} \cdot (1 - \alpha)}$$

Équation 141 : Masse volumique de la biomasse hydratée

La représentation de la masse volumique hors ligne sur une échelle linéaire de concentration en biomasse nous permet de distinguer des gammes de concentration où une régression linéaire est possible. Les deux tableaux ci-dessous nous informent sur les résultats des régressions linéaires appliquées pour des plages de biomasse où la relation $\rho_{\text{moût}}^{\text{hors-ligne}} = f(X)$ est linéaire. Le Tableau 47 présente les résultats de la régression linéaire obtenus pour la culture III avec *E. coli*.

$a_{\text{suspension}}$ [l]	ρ_{liquide} [g l ⁻¹]	R [l]	n [l]	X [g l ⁻¹]
0	1009.30	/	2	0.72 ≤ X ≤ 0.95
-0.5329	1009.82	0.9859	8	0.95 ≤ X ≤ 3.46
0.2309	1006.85	0.9876	4	4.38 ≤ X ≤ 9.75
0.1094	1008.10	0.9959	5	9.75 ≤ X ≤ 31.1

Tableau 47 : Régression linéaire des données de masse volumique hors ligne (culture III, *E. coli*)

Le Tableau 47 montre que, malgré un nombre limité de prélèvements n, il est possible de traduire des plages de concentration en biomasse avec un coefficient de corrélation R acceptable. La régression linéaire nous permet d'avoir accès aux masses volumiques de la biomasse hydratée et anhydre. De plus, il est possible de déterminer des concentrations critiques physiques qu'il est possible d'atteindre¹. Sous l'hypothèse d'une morphologie sphérique des cellules avec un arrangement type cubique faces centrées (CFC), la fraction volumique solide serait fixée à $\phi_{\text{solide}} = 0.74$. Les concentrations critiques maximales X_{CFC} sont alors calculées pour la fraction volumique de 0.74. Les données obtenues pour la culture III d'*E. coli* sont rassemblées dans le Tableau 48 pour des teneurs en eau α extrêmes de 0.6 et 0.9.

¹ La détermination de la concentration critique ne prend pas en considération la possibilité physiologique des cellules cultivées.

Age [h] α [%]	ρ_{XMS} [g l ⁻¹]		ρ_{XH} [g l ⁻¹]		X_{CFC} [g l ⁻¹]	
	0.6	0.9	0.6	0.9	0.6	0.9
11.1 ≤ t ≤ 15.3	403.7	100.9	1009.3	1009.3	298.7	74.7
15.3 ≤ t ≤ 32.9	332.9	95.9	832.3	958.7	246.4	70.9
34.8 ≤ t ≤ 41.4	443.7	103.1	1109.3	1030.6	328.4	76.3
41.4 ≤ t ≤ 52.0	421.6	101.9	1054.2	1019.2	312.1	75.4

Tableau 48 : Masse volumique et concentration critique en microorganisme déduite (culture III, *E. coli*)

On observe qu'en fonction des phases de l'expérimentation, le microorganisme module sa masse volumique. Le passage d'un substrat dilué à un substrat concentré à 34.1 h reste un facteur modifiant significativement le microorganisme. En effet, la masse volumique des microorganismes passe d'une valeur légèrement en dessous de la masse volumique de la phase liquide à une valeur nettement supérieure à celle de l'eau. Evidemment, la teneur en eau des cellules n'étant pas connue, l'amplitude des modulations peut être amortie par une modification de cette teneur en cours de culture. Cependant, au regard des valeurs extrêmes de pourcentage d'eau intracellulaire de 60 et 90 %, l'évolution semble se confirmer. Toutefois, même si l'hypothèse d'un arrangement cubique faces centrées des cellules dans le bioréacteur n'est pas réaliste, il paraît peu probable que le pourcentage d'eau dans les cellules d'*E. coli* soit de 90 %, la concentration critique ayant été dépassée lors de la culture I.

Le *Tableau 49* présente les résultats de la régression linéaire obtenue pour la culture VI avec *Y. lipolytica*.

a [%]	$\rho_{liquide}$ [g l ⁻¹]	R [%]	n [%]	X [g l ⁻¹]
0.2226	1004.26	0.9994	4	2.35 ≤ X ≤ 8.23
0.5078	1001.72	0.9948	3	8.23 ≤ X ≤ 20.34
0.1647	1008.84	0.9779	5	20.34 ≤ X ≤ 58.65

Tableau 49 : Régression linéaire des données de masse volumique hors ligne (culture VI, *Y. lipolytica*)

A nouveau, on observe que les régressions linéaires effectuées sont tout à fait acceptables au vu des coefficients de corrélation associés qui sont supérieurs à 0.95. Malgré le faible nombre d'échantillons par régression, il est encore possible de traduire une tendance sur l'ensemble de la culture VI. Les résultats de masses volumiques et de concentration critique en biomasse sont estimés pour une teneur en eau α de 0.6 et 0.9. Ils sont rassemblés dans le *Tableau 50*.

Age [h] α [/]	ρ_{XMS} [g l ⁻¹]		ρ_{XH} [g l ⁻¹]		X_{CFC} [g l ⁻¹]	
	0.6	0.9	0.6	0.9	0.6	0.9
11.0 ≤ t ≤ 18.7	440.9	102.7	1102.4	1027.1	326.3	76.0
18.7 ≤ t ≤ 23.6	502.8	105.3	1257.0	1055.3	372.1	78.0
23.6 ≤ t ≤ 32.9	432.0	102.6	1080.0	1025.7	319.7	75.9

Tableau 50 : Masse volumique et concentration critique en microorganisme déduite (culture VI, *Y. lipolytica*)

La culture VI s'est effectuée avec une conduite permettant une croissance deux fois plus rapide des microorganismes par rapport à la culture III. L'échantillonnage n'ayant pas pu être effectué pour la mesure de la densité hors ligne avant 11.0 h, nous ne pouvons pas comparer les deux cultures pour savoir si la tendance à la diminution de la masse volumique hors ligne est également observée sur la culture VI avant l'alimentation par un substrat concentré. L'alimentation du bioréacteur avec un débit physiquement réalisé de substrat concentré et de sels s'effectue à partir de 12.1 h. Ces apports suivent un débit exponentiel jusqu'à 26.0 h. Ensuite, un débit constant est fixé de manière à gérer le volume de liquide dans le bioréacteur.

Si l'on considère une teneur en eau α des cellules constante au cours de l'expérimentation, il est alors possible d'observer plusieurs tendances. Au cours de l'alimentation par un débit exponentiel, on peut observer deux phases avec des masses volumiques de biomasse distinctes. Ces phases tendent à indiquer, à nouveau, la présence de deux seuils de concentration. Sur le même principe de l'évolution de la masse volumique sur l'outil expérimental, on observe une masse volumique hors ligne distincte et plus élevée sur l'âge de culture entre 18.7 et 23.6 h par rapport au début de l'expérimentation. Au-delà de 23.6 h, on observe une diminution de la masse volumique des cellules. La variabilité des mesures sur cette étape ne nous permet pas de savoir si cette nouvelle modification est induite par le passage, à 26.0 h d'expérimentation, à un débit constant en substrat et en sels. Si ce changement de masse volumique n'est pas induit par le changement de consigne des alimentations, le second seuil de concentration en biomasse correspond à une modification des propriétés de surface de la biomasse permettant au microorganisme un accroissement considérable d'incorporation de la phase gaz dans le moût.

C. Comparatif

Dans la littérature, la détermination de la masse volumique des cellules (ρ_{X_n}) est souvent effectuée par une centrifugation isopycnique des cellules sur une matrice permettant une migration des cellules en fonction de leur masse volumique. Cependant, même si l'analyse est effectuée rapidement, le risque de dénaturation des cellules reste élevé, malgré certaines précautions prises telles que le réajustement de l'osmolarité de la matrice utilisé. Dans l'étude de Baldwin et ses collaborateurs, une corrélation entre l'augmentation de l'osmolarité du milieu utilisé et l'augmentation de la masse volumique de cellules de *E. coli* (Baldwin *et al.*, 1995) est mise en évidence. Selon ces auteurs, l'augmentation de la masse volumique des cellules indiquerait une diminution de leur hydratation (ou teneur en eau α). Les résultats du précédent paragraphe montrent clairement que cela est le cas. Cependant, dans le cas de la culture III, l'évolution de l'osmolarité de la phase liquide reste

indépendante de la masse volumique de la biomasse hydratée. En effet, alors que la pression osmotique diminue continuellement sur l'ensemble de la culture III, on remarque que l'estimation de la masse volumique de la biomasse hydratée dépend de l'historique de la culture plutôt que de l'évolution de la pression osmotique. De plus, le changement de l'osmolarité du milieu s'effectuant progressivement, les cellules ne doivent pas subir de choc osmotique. Si cela est le cas, la masse volumique des cellules évoluerait en réponse à ce choc, comme cela est indiqué dans l'étude de Baldwin (Baldwin *et al.*, 1988). L'équipe de Kunitschek vient conforter l'existence d'une masse volumique dépendant de l'historique de l'expérimentation. En effet, dans leur étude, ils montrent que la masse volumique des cellules de *E. coli* reste constante autour d'une valeur de $1083.2 \pm 1.4 \text{ kg m}^{-3}$ quel que soit le taux de croissance des cellules (Kubitschek *et al.*, 1983). En croissance exponentielle, ils parviennent à une conclusion similaire sur la levure *Schizosaccharomyces pombe*, avec une valeur de masse volumique moyenne de $1094.50 \pm 0.37 \text{ kg m}^{-3}$ (Kubitschek and Ward, 1985). Ils notent que la valeur moyenne de la masse volumique de la levure *S. pombe* se modifie si celle-ci passe d'une phase exponentielle à une phase stationnaire. De plus, Martinez-salas et ses collaborateurs notent que la masse volumique instantanée de la cellule se modifie en suivant le cycle cellulaire, mais reste toujours centrée autour d'une valeur moyenne constante de $1109 \pm 6 \text{ kg m}^{-3}$ pour *E. coli* K12 (Martinez-salas *et al.*, 1981). Baldwin et Kubitschek ont observé ce phénomène sur la levure *S. cerevisiae* et ont corrélé le phénomène à la formation du bourgeon sur la levure mère (Baldwin and Kubitschek, 1984), comme présenté dans la *Figure 182*.

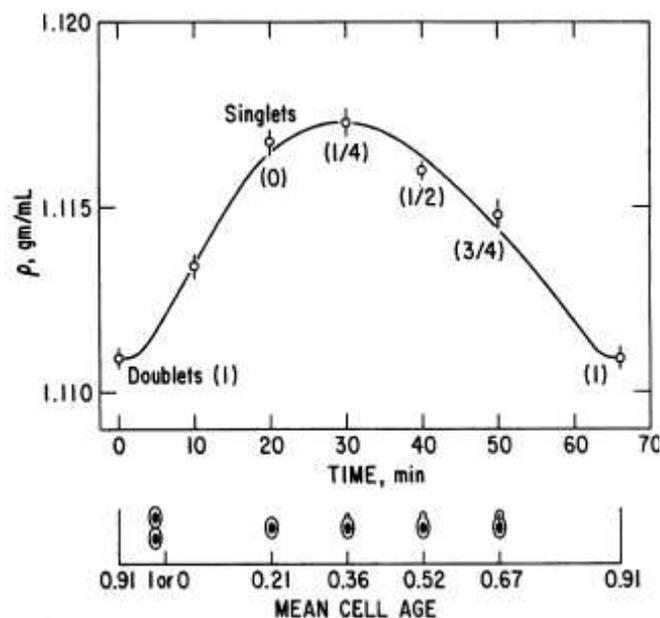


Figure 182 : Cycle de la masse volumique cellulaire de *S. cerevisiae* Y55 (Baldwin and Kubitschek, 1984)

Baldwin et Kubitschek montrent que la division cellulaire modifie la masse volumique de la cellule au cours de sa division, tout en conservant une masse volumique moyenne de $1112 \pm 10 \text{ kg m}^{-3}$ au cours d'une croissance exponentielle (Baldwin and Kubitschek, 1984). Les travaux plus récents de Bryan et

ses collaborateurs confirment la variation de la masse volumique des levures en fonction de leur bourgeonnement, avec une masse volumique moyenne de $1102.9 \pm 2.6 \text{ kg m}^{-3}$ (Bryan *et al.*, 2009).

Dans notre cas, la détermination de la masse volumique cellulaire semble constante, sur plusieurs plages horaires d'une même expérimentation. En fonction de l'historique subi par les cellules dans l'outil expérimental, celles-ci auront une masse volumique proche voir légèrement inférieure à celle de l'eau lors de l'alimentation avec le substrat carboné dilué. Cette alimentation diluera les éléments inorganiques dans le milieu, faisant également diminuer l'osmolarité du milieu. Cependant, les alimentations du milieu s'effectuant par des débits exponentiels, les masses volumiques des cellules sont alors maintenues constantes, comme indiqué dans les précédentes études (Baldwin and Kubitschek, 1984; Baldwin *et al.*, 1995; Kubitschek *et al.*, 1983; Kubitschek and Ward, 1985). Dans ces conditions, les changements sont plutôt attribués à des seuils de concentration où d'autres paramètres physiques (enregistrés par l'outil expérimental) interfèrent de manière plus prononcée sur le moût (pertes de charges, fraction gaz dans le moût).

III. EVOLUTION DES ESPECES CHARGEES

La confrontation des analyses hors ligne telles que les mesures de pression osmotique, de force ionique, du potentiel zeta et de teneur en cendres, avec la mesure de la conductivité électrique en ligne nous permet de suivre l'évolution des espèces chargées dans le moût.

En complément à la mesure de conductivité électrique qui est une réponse intégrée sur l'ensemble du moût (phase solide, liquide et gaz), les analyses hors ligne permettent une caractérisation plus fine de la suspension cellulaire sans la phase gaz. La phase solide (biomasse) est caractérisée par le potentiel zeta des cellules et sa teneur en élément inorganique, alors que la phase liquide (surnageant) l'est par sa pression osmotique et sa force ionique.

Nous savons également que le caractère multiphasique du moût, et plus particulièrement la présence d'une phase gaz (isolant électrique), est susceptible d'affecter la conductivité électrique. En intégrant les diverses informations, nous traduirons le comportement global des espèces chargées présentes et intervenant sur les changements des propriétés physiques du moût.

A. Bilan des analyses hors ligne

Les analyses hors ligne permettent d'identifier des paramètres constants pouvant être écartés dans notre discussion. Tout d'abord, le potentiel zeta des cellules semble constant sur la durée des cultures III et VI. Ces dernières sont prises en référence car les conduites de cultures y sont parfaitement maîtrisées. Les dynamiques des signaux de conductivité électrique sont alors régies par l'évolution d'autres paramètres qui sont à prendre en considération. Les teneurs en cendres des cellules semblent également constantes, écartant l'hypothèse d'une accumulation ou dilution des éléments inorganiques présents dans les cellules. Cet aspect est également confirmé par l'analyse de la composition élémentaire qui ne présente pas non plus d'évolution significative. En revanche, les mesures de pression osmotique et de force ionique présentent toutes deux des dynamiques analogues à la conductivité électrique *in situ*. La dynamique de la mesure de la conductivité électrique semble alors directement liée aux espèces ioniques présentes dans la phase liquide, en lien avec la vitesse de consommation et le flux intrant des sels.

B. Suivi de la dynamique *in situ*

Expérimentalement, nous avons accès à plusieurs informations relatives aux sels sous la forme de charges libres en solution car les analyses hors ligne n'ont pas détecté de modification de stockage au niveau de la biomasse. Il est alors possible de considérer les points suivants :

- L'apport total de sels (Osmol) lié à la concentration initiale du milieu salin et au flux de sels d'alimentation,
- La quantité de sels incorporée dans la biomasse,
- La pression osmotique et la force ionique permettant de traduire la concentration en sel du surnageant,
- La conductivité électrique en ligne du milieu dans sa globalité (biomasse + surnageant + gaz).

Dans le Chapitre IV (cf. III.B.2 *Conductimétrie en ligne*), nous avons montré des évolutions similaires mais singulières de la conductivité électrique en ligne pour les cultures III et VI. En représentant la

variation de conductivité en fonction de la biomasse, nous observons lors de l'alimentation avec le substrat dilué (apport en sels négligeable) une décroissance de la conductivité électrique. Cette diminution est directement proportionnelle à la concentration en biomasse traduisant la vitesse spécifique de consommation des sels lors de la culture à taux de croissance constant.

Lors de l'alimentation avec le substrat concentré (apport en sels), il apparait deux zones clairement identifiables. La première zone traduit une évolution proportionnelle de la biomasse et de la différence de conductivité avec une diminution du coefficient directeur du fait du flux de sels apporté. Le milieu s'appauvrit moins rapidement en espèces chargées. En revanche, la seconde zone, correspondant aux concentrations en biomasse les plus élevées, démontre une augmentation du coefficient directeur (zone entourée sur la *Figure 183* pour *E. coli*, et sur la *Figure 184* pour *Y. lipolytica*).

Nous savons que la conductivité électrique est une grandeur proportionnelle à la concentration en charge libre et inversement proportionnelle à la viscosité. De même, le caractère multiphasique du moût, et plus particulièrement la présence d'une phase gaz (mauvais conducteur électrique) est susceptible d'affecter la conductivité électrique du moût.

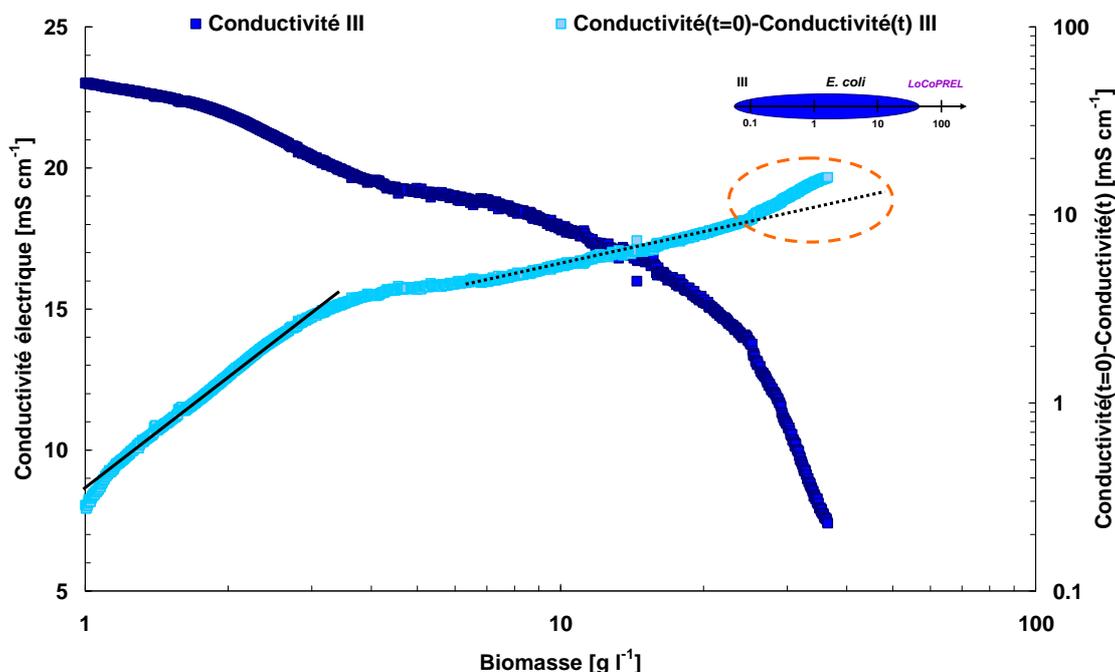


Figure 183 : Conductivité électrique et variation de conductivité électrique *in situ* en fonction de la concentration en biomasse (culture III, *E. coli*)

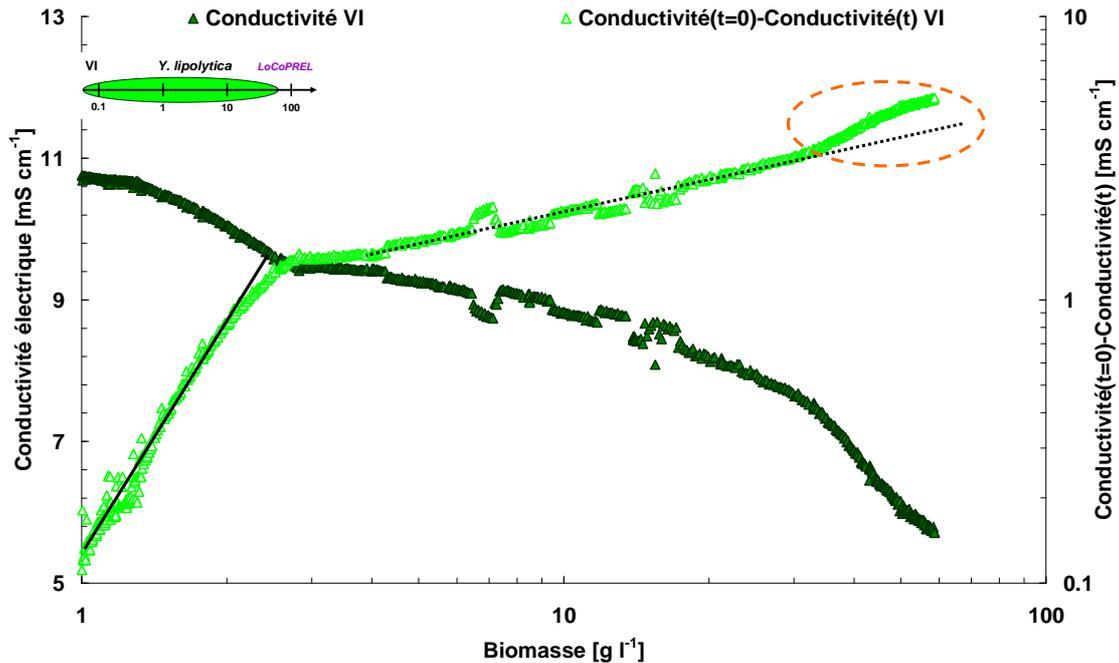


Figure 184 : Conductivité électrique et différence de conductivité électrique *in situ* en fonction de la concentration en biomasse (culture VI, *Y. lipolytica*)

Les mesures de pression osmotique et de la force ionique confirment qu'il y a, sur toute la durée des expérimentations, un appauvrissement en espèces chargées que l'on peut assimiler à des sels. Indépendamment de la vitesse de consommation de sels, il est possible d'émettre deux hypothèses afin d'expliquer cette rupture pour les fortes concentrations en biomasse. Soit cette rupture est en lien avec l'augmentation de la viscosité apparente du mout, soit c'est la résultante de l'augmentation de la fraction gaz. Or, dans le *Chapitre IV* (cf. *III.B.2 Conductimétrie en ligne*), les mesures de conductivité électrique ont été corrigées sous l'appellation de conductivité électrique équivalente. Cette grandeur traduit une conductivité électrique, corrigée de la diminution mesurée induite par la fraction gaz, en considérant que la fraction volumique de gaz présent fait diminuer de la même proportion la valeur de la mesure. Or, cette correction ne modifie pas l'allure (non présentée dans ce travail), et conserve le décrochement observé sur la *Figure 183* et *Figure 184*. L'hypothèse de l'impact de l'augmentation de la viscosité sur la conductivité électrique *in situ* semble se confirmer. Cependant, la viscosité dynamique du surnageant restant constante et proche de celle de l'eau, cette modification ne peut être qu'attribuée qu'à la concentration en biomasse et à son activité biologique.

Pour chacune des cultures, le décrochement est identifié à 25 g l^{-1} pour la culture III d'*E. coli*, et à 33 g l^{-1} pour la culture VI d'*Y. lipolytica*. Or, dans le *Chapitre IV*, nous avons pu identifier des seuils identiques de concentration en biomasse (cf. *Chapitre VI Tableau 40* et *Tableau 41*) lors du suivi de la variable de la masse volumique et de la perte de charge normée sur la conduite D1. Ceci indique que ces trois grandeurs sont synchronisées par une concentration en biomasse précise, sous condition que les cellules soient des cellules de biomasse catalytique. Sinon, dans le cas de la culture VI, les seuils de concentrations en biomasse identifiés pourraient se rapprocher de la culture IV ou V.

IV. RHEOMETRIE

Les résultats en lien avec la rhéométrie sont présentés en trois parties. A partir des données de viscosités estimées en ligne de la culture VI, les dynamiques des courbes d'écoulement sont discutées, principalement en lien avec les hypothèses identifiées préalablement. Une analyse de la conservation des moûts sur les propriétés rhéologiques est ensuite investiguée à partir de du recoupement avec des analyses hors ligne. Enfin, une confrontation des courbes d'écoulements obtenues avec l'outil expérimental et sur le rhéomètre est effectuée en vue d'une comparaison des phénomènes physiques mis en jeux.

A. Viscosimétrie en ligne

Comme nous l'avons montré dans le *Chapitre II*, les courbes de frottement des 2 conduites calibrées constituent des courbes « étalon » pour la détermination de la viscosité apparente en ligne et du cisaillement imposé. Pour chaque culture, nous traitons simultanément les mesures effectuées à débit nominal et lors des séquences.

La *Figure 185* représente l'évolution de viscosité apparente mesurée dans D1 et D2 en fonction de la concentration en biomasse pour les cultures III et VI. Pour la culture III, la vitesse de cisaillement est comprise entre 391 et 2081 s⁻¹ dans la conduite D1, et 2525 et 34954 s⁻¹ pour la conduite D2. Concernant la culture VI, la vitesse de cisaillement est comprise entre 364 et 1547 s⁻¹, et 8445 et 27174 s⁻¹ respectivement dans les conduites D1 et D2. Contrairement aux pertes de charge normées $\Delta p/Q_v$, la viscosité estimée nous permet de nous affranchir de la dérive éventuelle du débit volumique et des variations de masse volumique. Le suivi de la viscosité estimée, pour les cultures III et VI est présenté en *Figure 186*.

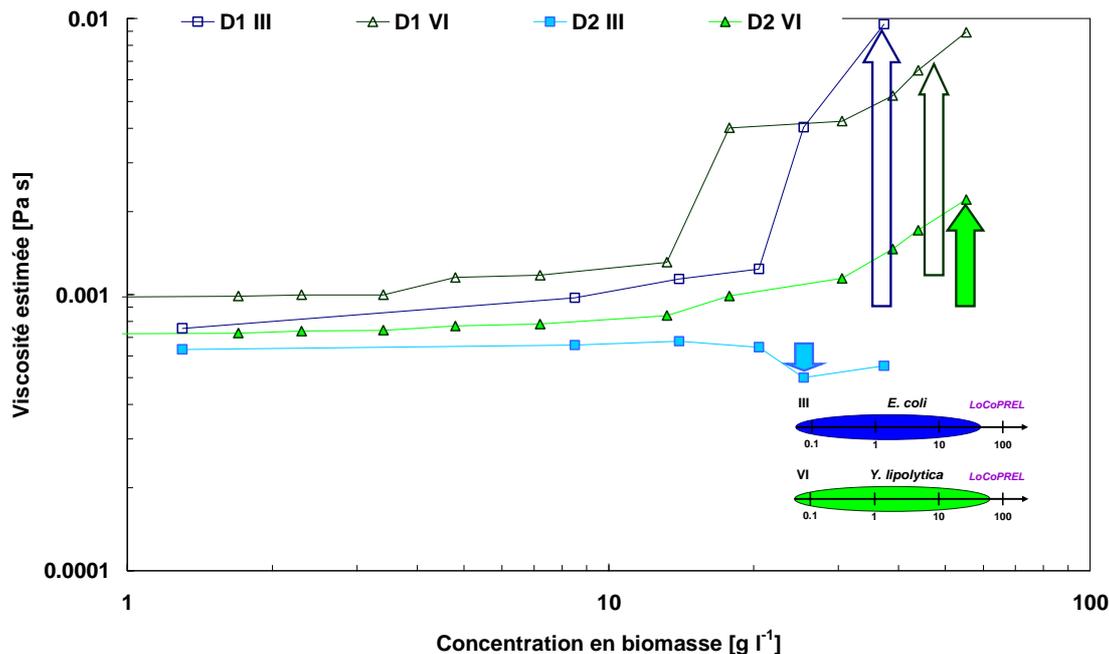


Figure 185 : Viscosité estimée sur l'outil expérimental pour les conduites D1 et D2 à débit nominal (culture III, *E. coli* - culture VI, *Y. lipolytica*)

Globalement, on remarque que, pour des conduites identiques, les cultures d'*Y. lipolytica* ont une viscosité estimée plus élevée que les cultures d'*E. coli*. Pour les faibles concentrations, ceci s'explique par la différence de la température de culture. Les cultures d'*E. coli* sont effectuées à 37 °C, alors que les cultures d'*Y. lipolytica* sont régulées à 28 °C. Cependant, pour les concentrations élevées, on remarque que la culture d'*E. coli*, pour une concentration de 37.3 g l⁻¹, présente une viscosité plus élevée que la culture d'*Y. lipolytica* pour la même concentration, malgré une température de culture plus haute. De plus, on remarque que, comme la perte de charge normée sur D2, la viscosité chute à une concentration de 25.4 g l⁻¹ en bactérie. Le cisaillement appliqué sur D2 étant plus important que sur D1 (32715 s⁻¹ pour D2 contre 419 s⁻¹ pour D1), il semble que le moût d'*E. coli* présente un comportement non newtonien plus prononcé que la culture d'*Y. lipolytica* pour les concentrations élevées en biomasse.

L'utilisation de l'outil expérimental nous permet d'atteindre une information sur la viscosité du milieu de culture de manière dynamique en minimisant sa dénaturation. L'utilisation de deux conduites calibrées sur l'outil expérimental présente l'avantage de pouvoir recouper des estimations de viscosité pour des plages de cisaillement équivalentes. La Figure 186 présente les viscosités estimées sur l'outil expérimental pour la culture VI, pour un milieu allant d'une concentration en biomasse nulle (milieu minimum) et jusqu'à une concentration de 55.3 g l⁻¹. Les résultats obtenus pour chacune des conduites sont distingués afin de pouvoir discuter des valeurs obtenues pour chaque conduite. Les données expérimentales sont représentées en Figure 186.

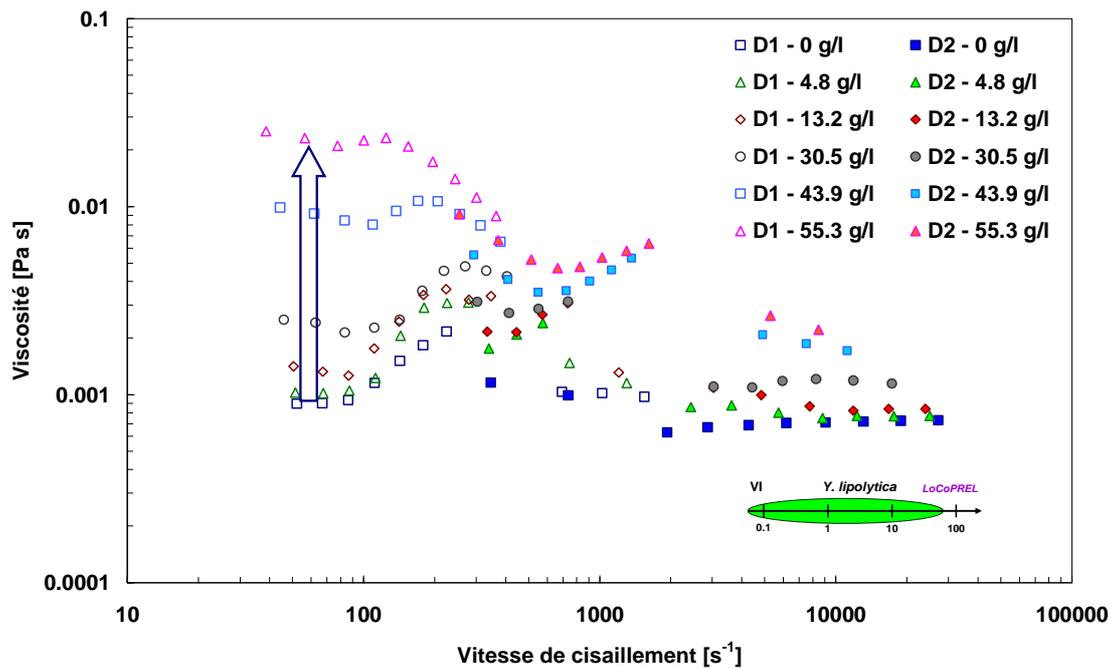


Figure 186 : Comparaison des viscosités déterminées sur l’outil expérimental pour les conduites D1 et D2 (culture VI, *Y. lipolytica*)

Quelle que soit la concentration, on observe une tendance générale à l’augmentation de la viscosité estimée. Si nous comparons les valeurs de viscosité obtenues avec *S. cerevisiae* dans l’étude de Mancini, on note un comportement newtonien pour une concentration de 50 g l⁻¹ de biomasse. De plus, la viscosité dynamique est légèrement inférieure à 3 10⁻³ Pa s pour une plage de cisaillement comprise entre 120s⁻¹ ≤ $\dot{\gamma}$ ≤ 240s⁻¹ (Mancini and Moresi, 2000). Or, les valeurs expérimentales montrent nettement un comportement non newtonien supérieur à 10 10⁻³ Pa s pour des cisaillements du même ordre de grandeur que l’étude de Mancini. Dans l’étude de Mancini, l’activité biologique n’est pas prise en compte puisque les suspensions étudiées sont issues de levures réhydratées. Or, cette différence majeure pourrait expliquer l’important écart entre les résultats de viscosités obtenus. La proximité de forme et de taille entre *S. cerevisiae* et *Y. lipolytica* impliquerait de retrouver des résultats similaires. Ceci n’étant pas le cas, la contribution de l’activité biologique dans la viscosité du moût estimée *in situ* semble indéniable.

L’impact de l’activité biologique sur les propriétés de la suspension cellulaire a pu être observé dans l’étude de Chen et ses collaborateurs. Leur étude porte sur le comportement rhéologique de cultures de l’algue *H. lacustris* dans des conditions de croissance mixotrophique ou hétérotrophique. Pour chaque condition de croissance, la viscosité dynamique de la suspension est significativement différente pour des concentrations en biomasse identiques (Chen *et al.*, 1997), ce qui confirme l’impact de l’activité biologique sur les propriétés physiques de la suspension. En comparaison avec la culture VI où les cellules ont une taille de l’ordre de 4 μm, la taille des algues est de 30 μm et 40 μm respectivement pour des conditions de culture hétérotrophe et mixotrophe. Pour une différence de taille d’un facteur 10, la viscosité dynamique des suspensions d’algues balaie une large gamme. Pour une vitesse de cisaillement de 73.6 s⁻¹, la viscosité dynamique de la suspension est de l’ordre de

$11 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ pour une concentration de l'ordre 37 g l^{-1} en condition hétérotrophique, et légèrement supérieur à $3 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$ en condition mixotrophique. Les valeurs obtenues dans les conditions mixotrophiques, malgré des tailles distinctes de cellule, se rapprochent des valeurs obtenues pour la concentration de 30.5 g l^{-1} avec *Y. lipolytica*. L'activité biologique peut alors redéfinir les propriétés de la suspension, indépendamment de la taille des cellules.

Sans distinction des conduites, on note la présence de deux plateaux de viscosité pour une vitesse de cisaillement de l'ordre de 70 et 700 s^{-1} . Outre l'observation d'une discontinuité de la courbe d'écoulement entre les deux jeux de données calculées issus des conduites calibrées, la dynamique des viscosités estimées est perturbée suite à différentes interférences inhérentes à l'outil expérimental. En effet, au cours du *Chapitre IV*, une séparation de phase solide-liquide et gaz avait été détectée lors de l'analyse des séquences à faible débit. A nouveau, on retrouve ce phénomène dans l'estimation de la viscosité à partir des données de l'outil expérimental. Ce phénomène de séparation de phase impacte directement la viscosité estimée par son action sur le diamètre hydraulique. En effet, la séparation de phase engendre l'apparition d'une surface libre au sein de la conduite, particulièrement pour la conduite D1 qui a le diamètre géométrique le plus important ($\sim 12 \text{ mm}$) des deux conduites. Si l'on considère l'apparition d'une surface libre due au déphasage de la phase gazeuse préalablement présente dans le moût, le diamètre hydraulique à considérer devient alors différent. En effet, dans les cultures III et VI, on observe une diminution de la masse volumique en ligne jusqu'à 15% par rapport au début de l'expérimentation pour les débits de circulation élevés. La masse volumique en ligne, suite à l'inoculation du bioréacteur, reste identique aux valeurs mesurées sur le milieu minimum. Afin de prévoir l'évolution de la viscosité estimée sur l'outil expérimental, la *Figure 187* présente l'évolution du diamètre hydraulique en fonction du pourcentage occupé par le moût solide-liquide exempt de la phase gaz.

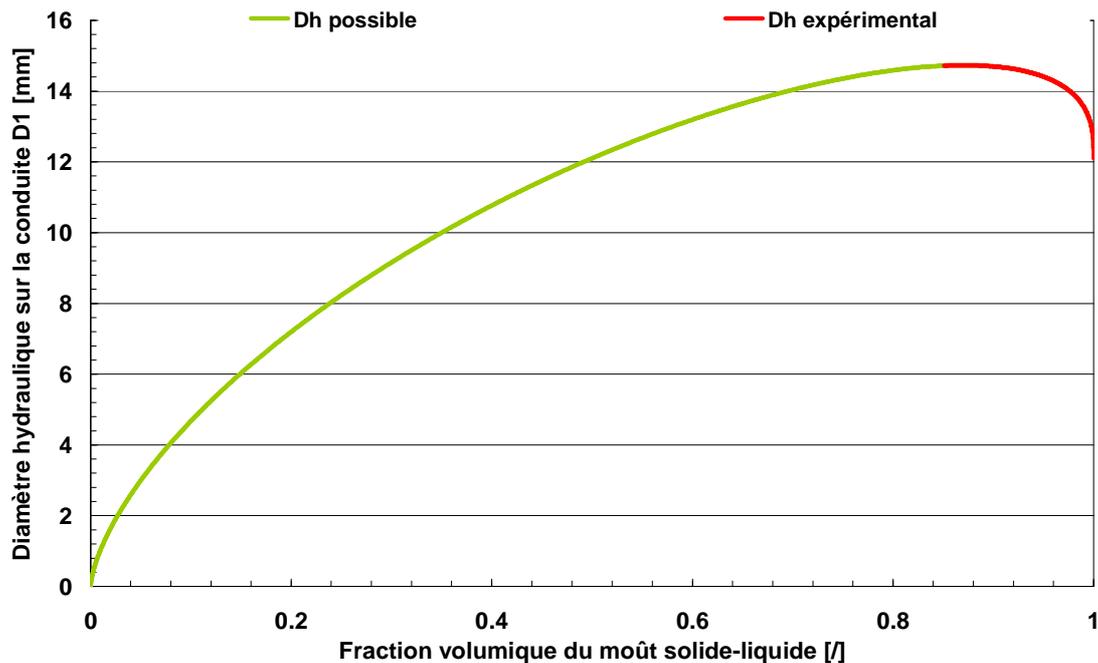


Figure 187 : Evolution du diamètre hydraulique sur la conduite D1 en fonction de la fraction volumique du moût en séparation de phase

Pour une proportion de gaz dans le moût jusqu'à 15 %, on observe que l'évolution du diamètre hydraulique, représenté en rouge sur la *Figure 187*, augmente jusqu'à plus de 21 % de sa valeur initiale de 12.1 mm. Cette augmentation engendre une estimation erronée des valeurs de viscosité en ligne. Au cours des calculs de viscosité estimée en ligne, il serait nécessaire d'intégrer cette modification afin de corriger les valeurs obtenues. Or, la séparation de phase s'effectuant progressivement, et n'ayant pas de moyen de quantifier dynamiquement la séparation de phase en cours de culture, il paraît difficile, avec les possibilités actuelles de l'outil expérimental, d'intégrer ce paramètre dans des corrections fiables. Cependant, au regard des valeurs de viscosité estimées pour les débits les plus faibles, l'intégration d'un diamètre hydraulique plus élevé permettrait d'amoinrir les paliers détectés à 70 et 700 s⁻¹. Cela diminuerait l'écart visible entre les deux conduites afin d'obtenir une diminution continue de la viscosité jusqu'à un plateau pour des vitesses de cisaillement élevées. Dans ces conditions, le seuil détecté pour des vitesses de cisaillement élevées semble être celui de la viscosité de la phase liquide, proche de la viscosité dynamique de l'eau.

B. Viscosimétrie hors ligne

Dans un second temps, nous nous focalisons sur l'analyse du comportement rhéologique des suspensions à partir des échantillons prélevés. Ces analyses sont conduites comme mentionnées dans le *Chapitre II* sur des échantillons exempt de phase gaz et conservés à 4°C de manière à éviter une lyse des cellules.

Les analyses rhéologiques des échantillons n'ont pu être effectuées directement après les prélèvements. Ainsi pour les cultures I, II, IV et V, ces analyses ont été effectuées au minimum 4 jours après le prélèvement dans le bioréacteur. Sur la culture VI d'*Y. lipolytica*, l'impact du temps de stockage des échantillons est étudié comme le rapportent la *Figure 188* et la *Figure 189*. Les temps de référence t_0 correspondent à des analyses effectuées 2 h maximum après prélèvement.

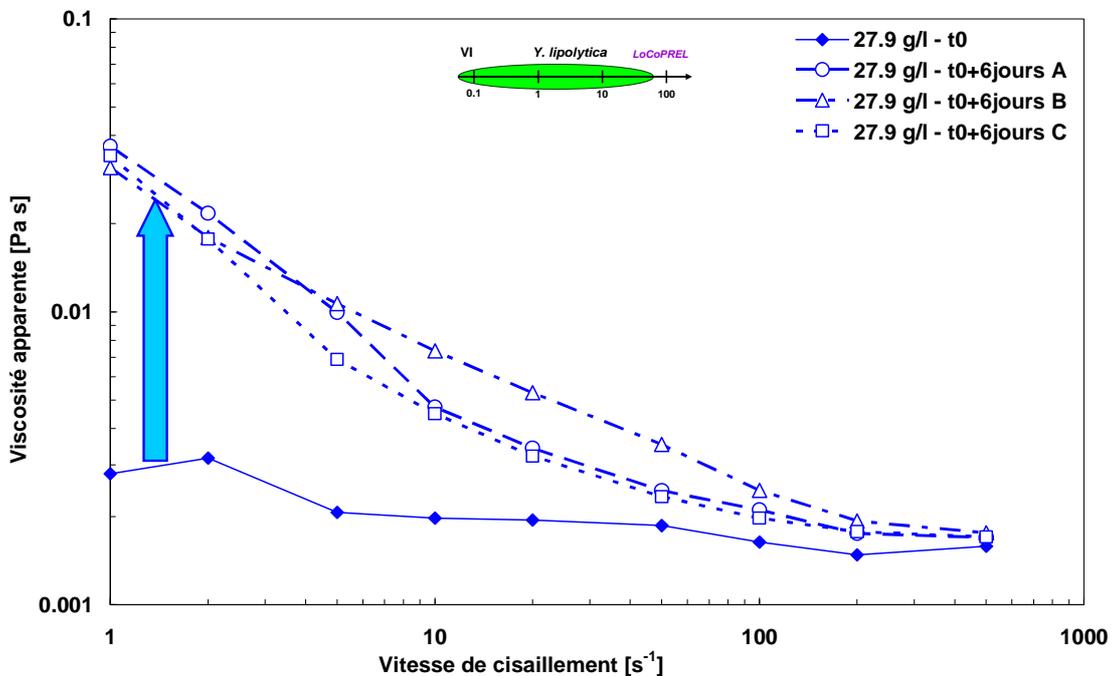


Figure 188 : Comparaison de rhéogrammes à une concentration en biomasse de 25.7 g l⁻¹ (culture VI - *Y. lipolytica*)

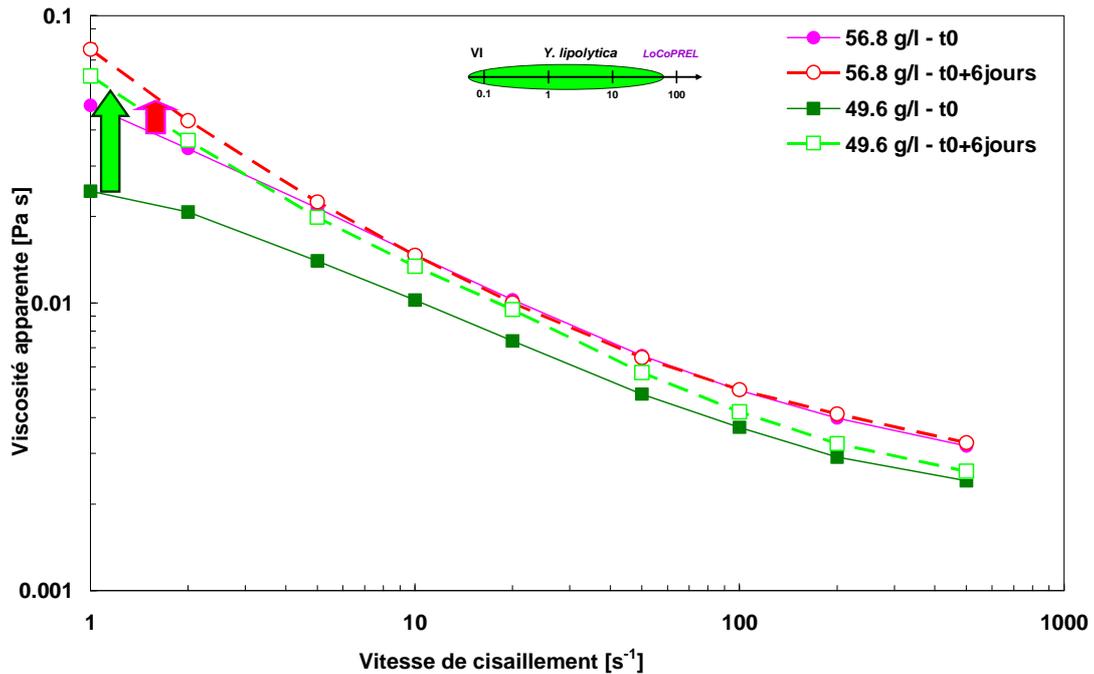


Figure 189 : Rhéogrammes des concentrations en biomasse de 49.6 g l⁻¹ et 58.6 g l⁻¹, à des temps de conservation t₀ et t₀ + 6 jours (culture VI, *Y. lipolytica*)

Quel que soit le cisaillement appliqué, les courbes d'écoulement des échantillons « frais » (t₀) ont une viscosité apparente plus faible ou au mieux égale à celle analysée quelques jours plus tard (t₀ + 6 jours). Nous constatons d'une part que la viscosité apparente suit une fonction monotone croissante en fonction de la concentration en biomasse quel que soit le temps de stockage. L'impact du temps de stockage semble moins prononcé avec l'augmentation de la concentration en biomasse. Le temps de conservation semble être un paramètre important sur la détermination de la viscosité apparente du moût en particulier pour les faibles concentrations. Nous précisons également que le rhéomètre est adapté aux mesures de faibles couples et donc à la détermination de faibles viscosités apparentes. Par ailleurs, au delà de 500 s⁻¹, des effets d'inertie apparaissent et n'autorisent pas de comparaison entre les mesures. En conséquence, nos discussions sur les mesures rhéologiques hors ligne s'appuieront exclusivement sur les analyses effectuées après un temps de stockage données.

Cette évolution du comportement rhéologique peut s'expliquer par une modification des cellules pendant leur période de conservation, malgré le maintien à une température basse (+ 4°C) pour limiter une évolution due à une activité cellulaire résiduelle. Nous avons préalablement montré dans le *Chapitre V I.A.3* que ce temps de stockage n'affectait pas la morphologie des microorganismes. Nous pouvons donc émettre une hypothèse sur une évolution des propriétés mécaniques des cellules (paroi/membrane) couplée à une activité cellulaire non nulle au cours du stockage. Pour conforter partiellement cette hypothèse, nous comparons à t₀ et t₀ + 6 jours les mesures de pressions osmotiques effectuées sur le surnageant des microorganismes. Les résultats issus de cette comparaison sont présentés en *Figure 190*.

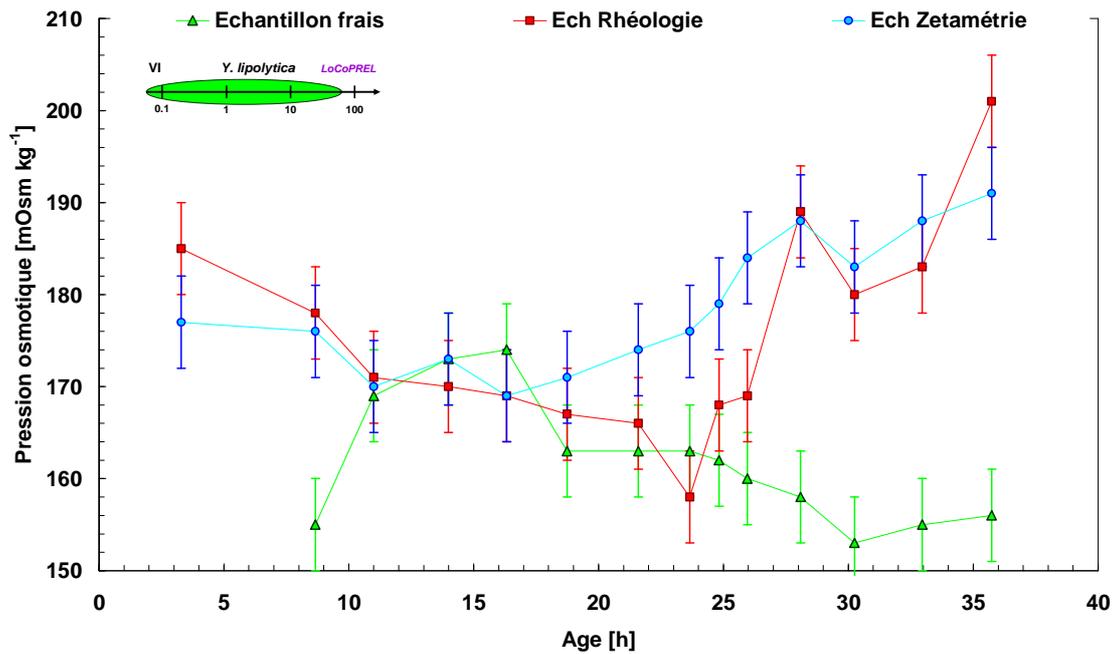


Figure 190 : Evolution des échantillons après prélèvement par la comparaison de la pression osmotique (culture VI, *Y. lipolytica*)

La diminution de pression osmotique durant la culture n'est pas maintenue après une durée de stockage des échantillons où celle-ci augmente significativement. Une mesure analogue effectuée sur les échantillons utilisés pour la détermination du potentiel zeta montre un comportement analogue. Ces deux tendances, sur différentes séries d'échantillons renseignent sur le fait que la perte d'activité biologique se traduit par une perméabilité des parois et membranes cellulaires, entraînant un passage d'ions ou molécules intracellulaires vers le surnageant.

C. Rhéométrie en ligne et hors ligne : comparaison

Dans une dernière phase, nous comparons et discutons les rhéogrammes établis à partir des mesures en ligne et hors ligne de la culture III.

La comparaison des viscosités obtenues sur l'outil expérimental et sur le rhéomètre nous confirme des hypothèses avancées précédemment. La *Figure 191* présente une confrontation des viscosités déterminées à partir de l'outil expérimental et d'un rhéomètre.

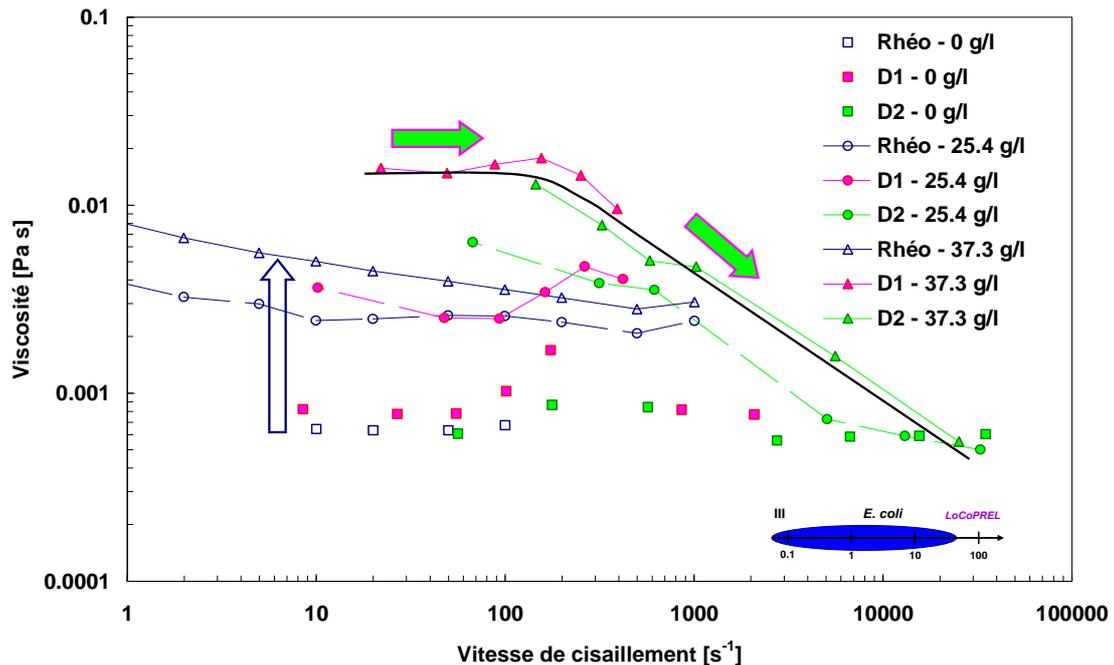


Figure 191 : Comparaison des viscosités déterminées sur un rhéomètre et sur l'outil expérimental (culture III, *E. coli*)

Sur la *Figure 191*, on observe que la viscosité du milieu minimum est estimée de manière identique avec l'outil expérimental et le rhéomètre. Cependant, lorsque la culture présente des concentrations en biomasse plus élevées, on remarque un décalage systématique des estimations entre ces deux instruments. Au vu des valeurs, l'estimation de la viscosité hors ligne semble systématiquement plus faible que la viscosité en ligne. Le travail ayant étudié une suspension bactérienne se rapprochant le plus d'une suspension d'*E. coli* est l'étude de Al-Asheh. Bien qu'il n'utilise pas la souche *E. coli*, nous pourrions comparer nos valeurs obtenus avec *P. aeruginosa*, cette bactérie étant gram négatif comme *E. coli*. *P. aeruginosa* est mis en culture dans un milieu riche à une température de 37 °C. Dans l'étude de Al-Asheh, les concentrations en biomasse varient de 0.83 à 5.5 g l⁻¹. Le comportement rhéologique de cette suspension est associé à un fluide non newtonien pouvant être associé à une loi en puissance ou un modèle de type Herschel-Bulkley. Dans l'étude, pour une vitesse de cisaillement fixée de 254 s⁻¹, la viscosité de la concentration la plus faible (0.83 g l⁻¹) est déjà supérieur à 10 10⁻³ Pa s (Al-Asheh *et al.*, 2002). Au cours de nos expérimentations, la viscosité

estimée en ligne n'évolue pas avec une concentration minimum de l'ordre de 20 g l^{-1} . Un tel décalage paraît surprenant, d'autant plus que la viscosité apparente obtenue hors ligne pour une vitesse de cisaillement proche est légèrement inférieure à $2 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$. Si nous comparons la suspension la plus concentrée de l'étude de Al-Asheh ($X = 5.5 \text{ g l}^{-1}$), celle-ci présente une viscosité apparente de $16.5 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$. A nouveau, cette valeur est totalement différente de nos valeurs expérimentales. De plus, la valeur de viscosité hors ligne pour une concentration de 5.5 g l^{-1} de *P. aeruginosa* se rapproche de la viscosité estimée en ligne pour la culture III d'*E. coli* pour une concentration de 37.3 g l^{-1} ($\eta \approx 15 \cdot 10^{-3} \text{ Pa s}$). Le facteur de taille entre ces deux bactéries ne semble pas expliquer une telle différence. La forme de celle-ci pourrait être une première piste. Ces deux bactéries étant gram négative, cet aspect ne peut pas être mis en cause. Par contre, les conditions de culture entre les deux microorganismes sont totalement différentes, impliquant une activité biologique nécessairement distincte. Une hypothèse serait que les propriétés de surface de chaque microorganisme impliqueraient des interactions entre cellules pour les très faibles concentrations. Ces propriétés de surface pourraient être attribuées au potentiel zeta de surface ou au caractère hydrophile/hydrophobe de la membrane. Cependant, malgré les mesures effectuées dans ce travail concernant le potentiel zeta, on remarque que, de manière générale, toutes les analyses hors ligne doivent être effectuées avec un temps de stockage d'échantillon minimum. Sinon, l'échantillon se dénaturera de lui-même plus ou moins rapidement en fonction de l'analyse. Cela a pu être observé lors de la caractérisation rhéologique hors ligne et sur les mesures de la pression osmotique.

Il faut garder à l'esprit que, au contraire d'un bioréacteur classique mécaniquement agité, l'outil expérimental développé applique des contraintes répétées sur les microorganismes. Ces contraintes de cisaillement sont notamment importantes au niveau de la pompe de mise en circulation dans la boucle de dérivation. Certes, le stress hydrodynamique lié à l'agitation et au mélange dans le bioréacteur ne cause pas autant de problème sur les microorganismes que sur les cellules animales (Barbouche, 2008). Cependant, 10 % du volume de la culture circule continuellement dans la boucle de dérivation à un débit moyen de 250 l h^{-1} . Ceci implique que chaque cellule passe dans la boucle de dérivation toutes les 2 minutes 40 secondes. Les expérimentations pouvant durer plusieurs dizaines d'heures, il serait risqué de ne pas considérer ce stress spécifique. Certes, son impact ne cause pas de perturbation majeure sur la croissance (identification d'un léger changement morphologique). Néanmoins, il est impératif de considérer ce facteur qui reste un paramètre nouveau à prendre en compte dans une culture microbienne, même si l'objectif du développement de l'outil expérimental restait la minimisation de ce genre d'impact.

Des précautions doivent être prises sur l'utilisation du diamètre hydraulique dans l'estimation de la viscosité *in situ*. En effet, celui-ci évolue s'il y a séparation de la phase gaz avec le reste du moût (pour les faibles débits de circulation dans la boucle de dérivation). Le plateau de viscosité observé pour les faibles vitesses de cisaillement sur les données en ligne ne serait alors qu'un biais lié à la séparation de phase du moût. Sans estimation du diamètre hydraulique « dynamique », il est impératif de préciser comment sont obtenues les valeurs de viscosité avec l'outil expérimental. Les courbes de frottement utilisées ayant été obtenues pour des diamètres hydrauliques identiques aux diamètres

géométriques des conduites, il est alors nécessaire de parler de viscosité estimée équivalente à un fluide homogène. Cette remarque permettra d'indiquer que le diamètre hydraulique est alors fixé sur l'ensemble des estimations de viscosité en ligne. Afin de se rapprocher au plus juste de la viscosité réelle en ligne, une valeur moyenne du diamètre hydraulique devra être calculée pour chaque palier de la séquence de débit, proportionnellement à la fraction gaz présente dans le moût ou à un système développé spécifique pour ce besoin.

CONCLUSION

L'ensemble des analyses hors ligne a permis de caractériser séparément les différentes phases du moût de manière à mieux comprendre la contribution de chacune dans les propriétés physiques mesurées *in situ*.

Les analyses morpho-granulométriques ont permis de vérifier l'état physiologique des cellules au cours des expérimentations, mais également de détecter une légère modification morphologique entre l'inoculation, le début et la fin de la culture. Cette modification morphologique reste difficile à intégrer dans la discussion des résultats. Les analyses physico-chimiques ont permis d'identifier des potentiels de surface des cellules constantes au cours des cultures, mais différents entre les deux microorganismes utilisés. Les mesures de pression osmotique et de force ionique ont été utilisées toutes deux conjointement pour évaluer l'appauvrissement du surnageant en espèces chargées. Enfin, les analyses chimiques sur la biomasse ont permis de vérifier qu'il n'y avait pas de lyse au cours de la croissance, par l'analyse de ratios protéiques dosés dans la biomasse ou dans le surnageant.

Puis, la comparaison des mesures *in situ* et *ex situ* de la masse volumique a permis d'identifier des changements de masse volumique cellulaire en fonction de la conduite de culture, ainsi que des concentrations limites en cellule atteignables dans le bioréacteur, sous certaines hypothèses de teneur en eau de la cellule.

Le suivi des espèces chargées par l'évolution de la conductivité a également mis en évidence un seuil de concentration en biomasse préalablement identifié au cours du chapitre IV avec les mesures de pertes de charge normées sur la conduite D1, et le suivi de la masse volumique. Cela indique que l'activité biologique prend une importance d'autant plus grande pour un seuil de concentration conjointement lié à la phase gaz et les pertes de charge *in situ*.

Enfin, les analyses rhéologiques montrent que le moût se dénature rapidement après son prélèvement. La comparaison des valeurs de pression osmotique issue des échantillons de moût frais, utilisées pour l'analyse rhéologique ou de mesure du potentiel zeta, prouve une évolution des propriétés après conservation. De plus, l'analyse du comportement rhéologique *in situ* et *ex situ* montre que les informations obtenues sont différentes, mettant en avant l'intérêt du développement de l'outil expérimental.

Conclusion et perspectives

Les enjeux sociétaux mondiaux actuels relèvent d'une prise de conscience, par les politiques, de l'impact de l'activité humaine sur son environnement. Une des alternatives écologiques proposées est le développement de procédés biotechnologiques permettant, entre autres, une utilisation de matières premières renouvelables plutôt que fossiles. Les ressources utilisables s'élargissent et offrent des alternatives aux procédés actuels, alternatives tendant à améliorer le bilan environnemental. Dans le cas des biotechnologies blanches (dites industrielles), le biocatalyseur est utilisé sous des impératifs de concentrations élevées pour une intensification des productions effectuées. Or, les performances des bioprocédés sont difficiles à maintenir dans ces conditions car un grand nombre de limitations peuvent intervenir (scale up, transfert). Dans ce cadre, les populations cellulaires subissent des conditions physico-chimiques différentes en fonction de leur localisation spatiale, ce qui peut perturber et modifier le comportement global et les performances du bioprocédé.

C'est dans l'objectif de mieux comprendre ces limitations, et les circonvenir, que les propriétés physiques du moût sont investiguées. Or, l'obtention d'informations représentatives des phénomènes se déroulant au sein du bioréacteur n'est pas aisée, car la structure tri-phasique du moût est éphémère (phase gaz, activité biologique). La caractérisation d'un milieu de culture de microorganismes nécessite donc la mise en place d'une métrologie spécifique, adaptée aux conditions de stérilité relative aux cultures axéniques, et permettant de gérer à la fois la conduite de culture et la caractérisation viscosimétrique.

L'étude a imposé la conception et la réalisation d'un outil expérimental, construit à partir d'un bioréacteur et pourvu d'une boucle de dérivation spécifiquement instrumentée. Puis, il a été nécessaire de caractériser les conduites calibrées par l'établissement des courbes de frottement. De manière à piloter ce nouvel outil, le logiciel LoCoPREL fut développé, permettant simultanément le contrôle de la culture cellulaire, la gestion de séquences de débit dans la boucle de dérivation et l'acquisition des données issues de l'instrumentation spécifique. Les mesures en ligne ont été réalisées à débit constant et selon des stratégies de séquences de débit spécifiques. Le moût a ainsi été suivi en ligne et hors ligne, et sa caractérisation a été complétée par un ensemble d'analyses complémentaires en lien avec les performances de la culture.

Dans un premier temps, l'objectif de ces travaux a consisté à mettre en place cet outil de caractérisation afin de permettre des investigations des caractéristiques physiques et du comportement rhéologique des milieux de culture en bioréacteur, et ce, *in situ* afin de minimiser l'impact des mesures sur le comportement tri-phasique du moût. Le développement s'est axé à la fois sur l'environnement hydraulique, aéraulique et instrumental afin d'intégrer, de manière cohérente, un ensemble de capteurs adaptés sur une boucle de dérivation montée sur un bioréacteur de 20 l.

Conclusion et perspectives

La boucle de dérivation possède deux conduites calibrées permettant la détermination d'une viscosité estimée via l'établissement de courbes de frottement et l'application du concept de Metzner et Reed.

Notre approche s'est appuyée sur des mesures physiques et physico-chimiques en ligne et hors ligne réalisées sur un bioréacteur instrumenté. Les mesures mises en place respectent les conditions imposées par les contraintes biologiques propres aux microorganismes et à la stratégie de culture choisie. Les cultures ont été effectuées à taux de croissance contrôlé par l'apport de substrat, avec *Escherichia coli* et *Yarrowia lipolytica* comme microorganismes modèles, et pour une gamme de concentration allant de 0.1 à 100 g l⁻¹.

L'ensemble instrumental a été géré, dans un premier temps, par un logiciel effectuant deux fonctionnalités de base et nécessaire à l'outil expérimental : l'acquisition des données et le pilotage de la pompe permettant l'analyse viscosimétrique *in situ*. Il a ensuite été nécessaire de développer une interface, beaucoup plus flexible et plus riche, intégrant un plus grand nombre de fonctionnalités. Le logiciel LoCoPREL, développé en C# WinForm, a permis de répondre à ce besoin technique nécessaire à notre étude. Cette interface informatique s'est alors substituée au premier programme, et offre maintenant une assez grande richesse de fonctionnalités : configuration d'une expérimentation biologique, acquisition des données, annotation d'évènements manuelle ou automatique, conduite de culture, correctifs automatiques des flux, rhéologie et calculs en ligne.

L'étude présentée dans ce document permet ainsi de prendre en référence les cultures les mieux maîtrisées pour chacun des microorganismes. En effet, la gestion des flux de substrat apportés permet de contrôler finement l'activité du microorganisme. La comparaison des données obtenues avec les autres cultures permet de compléter les informations acquises sur les propriétés du moût associé à un microorganisme. Dans toutes les cultures présentées dans cette étude, l'objectif a été une croissance des cellules afin d'atteindre une concentration finale la plus élevée en biomasse (0.1 à 100 g l⁻¹).

L'analyse des résultats s'est tout d'abord portée sur la compréhension des dynamiques observées *in situ*. Dans ce cadre, le pilotage par le logiciel LoCoPREL offre deux possibilités complémentaires : la caractérisation physique du milieu en continu avec un débit constant sur la boucle de dérivation, et des caractérisations ponctuelles plus fines avec un changement séquentiel du débit volumique de la pompe de mise en circulation du moût dans la boucle de dérivation.

Lorsque le débit volumique dans la boucle de dérivation est constant, on a pu observer de multiples seuils de concentration en fonction du paramètre physique suivi, principalement à propos de la masse volumique. Celle-ci a permis de mettre en évidence une proportion importante de la fraction gaz dans le moût, pouvant aller, dans le cas de culture d'*E. coli*, à une fraction volumique de l'ordre de 30 % pour les concentrations en biomasse avoisinant les 100 g l⁻¹. La conductivité électrique ne semble pas ou peu affectée par la phase gaz sous condition que le débit de circulation reste à son maximum. Elle permet ainsi de suivre la consommation d'espèces chargées (sels) dans le milieu, permettant de

Conclusion et perspectives

vérifier, de manière indirecte, la croissance cellulaire. Enfin, le suivi des pertes de charge sur les deux conduites permet de proposer l'hypothèse d'un comportement rhéofluidifiant, visible pour chaque culture, avec des réponses spécifiques en fonction du microorganisme étudié.

Quand le débit de circulation dans la boucle de dérivation est modifié ponctuellement, de manière séquentielle, il est possible de suivre les variables physiques selon un nouvel angle d'observation. Au cours des séquences de débit, la masse volumique *in situ* a permis de mettre en avant la représentativité des mesures en fonction des conditions de débit au sein de la boucle de dérivation. Dans le cas d'une diminution de débit volumique, la force d'aspiration du moût dans le bioréacteur est modifiée, impactant sur la proportion de phase gaz circulant dans la boucle de dérivation, mais également sur la dilatation de cette même phase gaz à cause de la diminution de la pression hydrostatique dans le circuit. La conductivité électrique permet de suivre à la fois l'impact de la baisse de la pression hydrostatique sur la réponse des cellules (régulation de la pression de turgescence), et le débit seuil pour lequel il y a séparation de phase au sein des conduites. Enfin, le suivi des pertes de charge montre nettement une augmentation de viscosité du milieu en lien direct avec l'augmentation de la concentration en biomasse.

L'ensemble des hypothèses et remarques de la partie analyse des dynamiques *in situ* ont été complétés par un ensemble d'analyses hors ligne de manière à vérifier les hypothèses progressivement avancées. Les tailles de chacun des microorganismes ont été mesurées par deux méthodes basées sur différents principes physiques aboutissant dans un cas, à la détermination d'un diamètre en volume et, dans le second cas, d'un diamètre en surface. Cette étude a permis de montrer une légère évolution morphologique pour chaque microorganisme en réponse à l'adaptation des cellules à l'environnement osmotique et hydrodynamique de l'outil expérimental. La consommation continue des espèces chargées pour les cultures de référence, suivie par la conductivité électrique, a été vérifiée par des mesures de pression osmotique et de la force ionique du surnageant, tout en vérifiant que le potentiel zeta et la teneur en cendre des cellules ont été maintenu constant au cours des expérimentations. L'analyse de la composition élémentaire de la biomasse n'a pas permis de détecter une possible dérive au cours des cultures. De plus, le suivi des ratios protéines/concentration en biomasse et protéines du surnageant/protéines dans la biomasse a pu vérifier qu'au cours des phases de croissance présumées, aucune lyse cellulaire détectable n'a été générée. La confrontation de la masse volumique *in situ* et *ex situ* fait apparaître des changements de la masse volumique cellulaire dépendant de la conduite de culture. Enfin, la caractérisation rhéologique *in situ* met en avant un comportement rhéofluidifiant du moût, différent de la caractérisation hors ligne, et faisant apparaître un seuil de concentration où la fraction gaz, la viscosité et la biomasse évolue de manière synchrone. De plus, il a pu être mis en évidence que les propriétés rhéologiques du moût évoluent rapidement, prouvant ainsi l'intérêt de la mise en place d'une métrologie de caractérisation *in situ* afin d'éviter les problèmes liés aux prélèvements.

Notre démarche combine des analyses dynamiques à différents niveaux d'observation (analyses macroscopiques, microscopiques et moléculaires) et une approche pluridisciplinaire couplant génie

Conclusion et perspectives

microbiologique, transfert, bioprocédé et physiologie quantitative pour un objectif de compréhension et de cohérence du système. Cependant, le contrôle et l'interaction de ces diverses contraintes (instrumental, informatique, rhéologique, microbiologique) restent difficiles à associer afin de répondre à l'ensemble des contraintes imposées par chacune d'entre elles. L'outil expérimental illustre parfaitement cette complexité.

A partir de cette première phase de développement aboutissant à un outil expérimental opérationnel, celui-ci peut dorénavant être amélioré et différentes propositions semblent particulièrement intéressantes : ainsi l'ajout d'un second capteur de pression relative en fin de circuit permettra d'ajouter une mesure hydrodynamique sur la boucle de dérivation, vue comme une singularité, venant ainsi compléter les deux mesures existantes en lien avec les conduites. Un deuxième type de caractérisation rhéologique pourrait également être mis en place à partir d'une mesure de couple sur l'axe du mobile d'agitation (préalablement caractérisé). Le circuit de la boucle de dérivation pourrait également être modifié par l'ajout de conduites calibrées de diamètre plus petit, moins longues et/ou de géométrie différente, permettant ainsi d'éviter la séparation de phase du moût, et d'augmenter le nombre de courbe de frottement autorisant une caractérisation et une estimation de la viscosité sur l'outil expérimental. De plus, la mise en place d'un système de détection de niveau au sein des conduites permettrait d'identifier, quantitativement, la proportion de séparation de phase lorsque celle-ci se produit. D'autres mesures physiques pourraient également s'articuler au sein du panel déjà proposé par l'outil expérimental tel que des mesures spectrophotométriques, électriques, ou thermiques, permettant de considérer le moût sous différentes approches. Enfin, des éléments de sécurité tel qu'une soupape de surpression peuvent être également rajouter afin d'éviter les risques en cas de colmatage du filtre de sortie, comme cela a été le cas lors de la dernière culture.

Au niveau de l'interface informatique représenté par LoCoPREL, un certain nombre de fonctionnalités en lien avec la conduite de culture restent encore à vérifier et/ou contrôler. Même si les fonctionnalités de base permettent d'effectuer un apport exponentiel du substrat, d'appliquer des consignes de débit constantes ou proportionnelles, la gestion de conduite spécifique à partir de pulse ou correspondant à une limitation nutritionnelle reste encore à développer. Les calculs en ligne permettant les bilans matières doivent encore être corrigés.

En ce qui concerne la viscosimétrie en ligne, l'intégration des courbes de frottement dans le logiciel reste une priorité car elles permettront, *in fine*, de suivre, pendant la culture, la viscosité estimée. Cette finalité de développement permettra de mettre en avant l'originalité de ce travail d'interfaçage couplant caractérisation physique et contrôle du bioprocédé simultanément. De plus, l'intégration de modèles de mécanique des fluides dans le logiciel permettra d'analyser les données, et d'estimer un grand nombre de paramètres spécifiques à la caractérisation rhéologique mise en place. Les scénarios de débit devront, dans l'idéal, alterner entre des allures pyramidales et en créneaux, car les réponses obtenues par ces deux stratégies d'investigations restent différentes en termes d'informations et d'impact au niveau du moût.

Enfin, la recherche d'erreurs sur LoCoPREL devra être poursuivie, des erreurs logicielles ou des ambiguïtés pouvant toujours être trouvées, liées à un grand nombre d'utilisateurs, aux très

Conclusion et perspectives

nombreuses connexions mises en place, à la multiplicité des instruments gérés, aux calculs effectués...

L'interface informatique mis en place offre également de multiples possibilités de conduite de culture grâce à la gestion, depuis le logiciel, de trois pompes d'alimentation. Le suivi des propriétés physiques d'un moût pour différents substrats peut être effectué. Même si le logiciel ne permet pas encore une conduite de culture idéale pour une limitation nutritionnelle, l'outil expérimental pourrait tout de même suivre une production de métabolites, à partir de la phase d'induction, et suivre son impact sur les changements de propriétés du milieu.

Les possibilités d'utilisation de ce nouvel outil d'investigation étant multiples, les investigations effectuées pourront très largement s'éloigner de son utilisation première du fait de sa grande potentialité. Bien sûr, des améliorations de l'outil expérimental sont toujours possibles, mais dans l'état actuel, il permet néanmoins de proposer une approche adaptée et cohérente pour une meilleure compréhension des caractéristiques physiques des milieux de culture bactériens et levuriens.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Aguilar L., Gaston C., Llopiz J.C., Jerez A. (2005).** Study of xanthan gum thermostability by thermal analysis and viscosimetry. *ICIDCA Sobre los Derivados de la Cana de Azucar* 39:52-57
- Ajayi O., Kembrowski Z., Kristiansen B., Larsen V.F. (1991).** On-line rheometer for the monitoring of polymer fermentations: operating conditions. *Biotechnology Letters*: 13 (8) 583-588 13:583-588
- Akroyd T.J. and Nguyen Q.D. (2003).** Continuous rheometry for industrial slurries. *Experimental Thermal And Fluid Science* 27:507-514
- Al-Asheh S., Abu-Jdayil B., Abunasser N., Barakat A. (2002).** Rheological characteristics of microbial suspensions of *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus cereus*. *International Journal Of Biological Macromolecules* 30:67-74
- Allen T. (1997).** Particle size measurement. Chapman & hall, 2-6 Boundary Row, London SE1 8HN, UK
- Amanullah A., Tuttiett B., Nienow A.W. (1998).** Agitator speed and dissolved oxygen effects in Xanthan fermentations. *Biotechnology And Bioengineering* 57:198-210
- Amin M.S., Park Y., Lue N., Dasari R.R., Badizadegan K., Feld M.S., Popescu G. (2007).** Microrheology of red blood cell membranes using dynamic scattering microscopy. *Optics Express* 15:17001-17009
- Angioloni A., Romani S., Pinnavaia G.G., Dalla Rosa M. (2006).** Characteristics of bread making doughs: influence of sourdough fermentation on the fundamental rheological properties. *European Food Research And Technology* 222:54-57
- Antoine Y. and Lebouche M. (1998).** Determination of the sliding velocities in a non-newtonian suspension using the Doppler ultrasound velocimetry. *Comptes Rendus De L Academie Des Sciences Serie Ii Fascicule B-Mecanique Physique Astronomie* 326:367-372
- Aranda-Selverio G., Penna A.L.B., Campos-Sas L.F., dos Santos O., Vasconcelos A.F.D., da Silva M.D.C., Lemos E.G.M., Campanharo J.C., Silveira J.L.M. (2010).** Rheological properties and effect of the salt addition on the exopolysaccharides viscosity produced by bacteria of *Rhizobium genus*. *Quimica Nova* 33:895-899
- Arnaud A., Rouquérol F., Chambaud G., Lissillour R. (2005).** *Chimie Physique*, Paris
- Arrhenius S. (1917).** The viscosity of solutions. *Biochemical Journal* 11:112-133
- Attia H., Kherouatou N., Dhouib A. (2001).** Dromedary milk lactic acid fermentation: microbiological and rheological characteristics. *Journal Of Industrial Microbiology & Biotechnology* 26:263-270
- Ayala-Hernández I., Hassan A., Goff H.D., Mira de Orduña R., Corredig M. (2008).** Production, isolation and characterization of exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis* subsp. cremoris JFR1 and their interaction with milk proteins: Effect of pH and media composition. *International Dairy Journal* 18:1109
- Bachelet C., Dantan P., Flaud P. (2003).** Indirect on-line determination of Newtonian fluid viscosity based on numerical flow simulations. *European Physical Journal-Applied Physics* 21:67-73
- Badino A.C., Facciotti M.C.R., Schmidell W. (1997).** Construction and operation of an impeller rheometer for on-line rheological characterization of non-Newtonian fermentation broths. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering* 14:359-365

Références bibliographiques

- Badino A.C., Facciotti M.C.R., Schmidell W. (1999).** Estimation of the rheology of glucoamylase fermentation broth from the biomass concentration and shear conditions. *Biotechnology Techniques* 13:723-726
- Bai W., Zhao K.S., Asami K. (2006).** Dielectric properties of E-coli cell as simulated by the three-shell spheroidal model. *Biophysical Chemistry* 122:136-142
- Baldwin W.W. and Kubitschek H.E. (1984).** Buoyant Density Variation During The Cell-Cycle Of *Saccharomyces-Cerevisiae*. *Journal Of Bacteriology* 158:701-704
- Baldwin W.W., Myer R., Powell N., Anderson E., Koch A.L. (1995).** Buoyant Density Of *Escherichia-Coli* Is Determined Solely By The Osmolarity Of The Culture-Medium. *Archives Of Microbiology* 164:155-157
- Baldwin W.W., Sheu M.J.T., Bankston P.W., Woldringh C.L. (1988).** Changes In Buoyant Density And Cell-Size Of *Escherichia-Coli* In Response To Osmotic Shocks. *Journal Of Bacteriology* 170:452-455
- Ball R.C. and Richmond P. (1980).** Dynamics of colloidal dispersions. *Physics And Chemistry Of Liquids* 9:99-116
- Balland M., Desprat N., Icard D., Fereol S., Asnacios A., Browaeys J., Henon S., Gallet F. (2006).** Power laws in microrheology experiments on living cells: Comparative analysis and modeling. *Physical Review E* 74
- Ballica R. and Ryu D.D.Y. (1993).** Effects of rheological properties and mass-transfer on plant-cell bioreactor performance - Production of tropane alkaloids. *Biotechnology And Bioengineering* 42:1181-1189
- Ballica R. and Ryu D.D.Y. (1994).** Tropane alkaloid production from *Datura stramonium*: an integrated approach to bioprocess optimization of plant cell cultivation. *Advances in plant biotechnology*.
- Ballica R., Ryu D.D.Y., Powell R.L., Owen D. (1992).** Rheological properties of plant-cell suspensions. *Biotechnology Progress* 8:413-420
- Barbot E., Seyssiecq I., Roche N., Marrot B. (2010).** Inhibition of activated sludge respiration by sodium azide addition: Effect on rheology and oxygen transfer. *Chemical Engineering Journal* 163:230-235
- Barbouche N. (2008).** Réponse biologique de cellules animales à des contraintes hydrodynamiques: simulation numérique, expérimentation et modélisation en bioréacteurs de laboratoire. Institut National Polytechnique de Lorraine.
- Barbut S. (2005).** Effects of chemical acidification and microbial fermentation on the rheological properties of meat products. *Meat Science* 71:397-401
- Barnes H.A., Hutton J.F., Walters K. (1989).** An introduction to Rheology, Elsevier ed.
- Batchelor G.K. (1977).** Effect of brownian-motion on bulk stress in a suspension of spherical-particles. *Journal Of Fluid Mechanics* 83:97-117
- Batchelor G.K. and Green J.T. (1972).** Determination of bulk stress in a suspension of spherical-particles to order C-2. *Journal Of Fluid Mechanics* 56:401-427
- Bausch A.R., Ziemann F., Boulbitch A.A., Jacobson K., Sackmann E. (1998).** Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry. *Biophysical Journal* 75:2038-2049

Références bibliographiques

- Bedeaux D. (1983).** The effective shear viscosity in 2-phase flow for arbitrary volume fractions. *Chemical Physics Letters* 94:324-326
- Beenakker C.W.J. (1984).** The effective viscosity of a concentrated suspension of spheres (and its relation to diffusion). *Physica A-Statistical Mechanics And Its Applications* 128:48-81
- Bhargava S., Wenger K.S., Rane K., Rising V., Marten M.R. (2005).** Effect of cycle time on fungal morphology, broth rheology, and recombinant enzyme productivity during pulsed addition of limiting carbon source. *Biotechnology And Bioengineering* 89:524-529
- Bimbenet J.-J., Duquenoy A., Trystram G. (2002).** Génie des procédés alimentaires - Des bases aux applications, p. 554, RiA Editions ed. Dunod, 2 10 004435 4.
- Borges C.D., Moreira A.D., Vendruscolo C.T., Ayub M.A.Z. (2008).** Influence of agitation and aeration in xanthan production by *Xanthomonas campestris* pv pruni strain 101. *Revista Argentina De Microbiologia* 40:81-85
- Borges C.D. and Vendruscolo C.T. (2007).** Xanthan synthesized by strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni: production, viscosity and chemical composition. *Bioscience Journal* 23:67-73
- Brady J.F. (1993).** The rheological behavior of concentrated colloidal dispersions. *Journal Of Chemical Physics* 99:567-581
- Brar S.K., Verma M., Tyagi R.D., Valero J.R., Surampalli R.Y. (2007).** *Bacillus thuringiensis* fermentation of hydrolyzed sludge - Rheology and formulation studies. *Chemosphere* 67:674-683
- Brinkman H.C. (1952).** The viscosity of concentrated suspensions and solutions. *Journal Of Chemical Physics* 20:571-571
- Brittain H.G. (2001).** Particule size distribution, Part I: representations of particles shape, size and distribution. *Pharmaceutical Technology* 25:38-45
- Bryan A.K., Goranov A., Amon A., Manalis S.R. (2009).** Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 107:999-1004
- Bueno S.M. and Garcia-Cruz C.H. (2001).** The influence of fermentation time and the presence of salts in the rheology of the fermentation broth of a polysaccharide-producing bacteria free of soil. *Journal Of Food Engineering* 50:41-46
- Cailler F. (1994).** Traitement de mesures expérimentales par la méthode des bilans. Diplôme d'études approfondies de microbiologie, option biotechnologies:35
- Capron I., Brigand G., Muller G. (1998).** Thermal denaturation and renaturation of a fermentation broth of xanthan: rheological consequences. *International Journal Of Biological Macromolecules* 23:215-225
- Casas J.A., Santos V.E., Garcia-Ochoa F. (2000).** Xanthan gum production under several operational conditions: molecular structure and rheological properties. *Enzyme And Microbial Technology* 26:282-291
- Casas Lopez J.L., Sanchez Perez J.A., Fernandez Sevilla J.M., Rodriguez Porcel E.M., Chisti Y. (2005).** Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. *Journal Of Biotechnology* 116:61-77

Références bibliographiques

- Castillo M., Lucey J.A., Payne F.A. (2006).** The effect of temperature and inoculum concentration on rheological and light scatter properties of milk coagulated by a combination of bacterial fermentation and chymosin. Cottage cheese-type gels. *International Dairy Journal* 16:131-146
- Chavez-Parga M.C., Gonzalez-Ortega O., Negrete-Rodriguez M.L.X., Medina-Torres L., Silva E.M.E. (2007).** Hydrodynamics, mass transfer and rheological studies of gibberellic acid production in an airlift bioreactor. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology* 23:615-623
- Chen F., Chen H., Gong X.D. (1997).** Mixotrophic and heterotrophic growth of *Haematococcus lacustris* and rheological behaviour of the cell suspensions. *Bioresource Technology* 62:19-24
- Cho Y.J., Hwang H.J., Kim S.W., Song C.H., Yun J.W. (2002).** Effect of carbon source and aeration rate on broth rheology and fungal morphology during red pigment production by *Paecilomyces sinclairii* in a batch bioreactor. *Journal Of Biotechnology* 95:13-23
- Choi D.B., Park E.Y., Okabe M. (2000).** Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. *Biotechnology Progress* 16:525-532
- Churchill S.W. (1977).** Friction-factor equation spans all fluid-flow regimes. *Chemical Engineering* 84:91-92
- Clarke C.I., Schober T.J., Arendt E.K. (2002).** Effect of single strain and traditional mixed strain starter cultures on rheological properties of wheat dough and on bread quality. *Cereal Chemistry* 79:640-647
- Clarke C.I., Schober T.J., Dockery P., O'Sullivan K., Arendt E.K. (2004).** Wheat sourdough fermentation: Effects of time and acidification on fundamental rheological properties. *Cereal Chemistry* 81:409-417
- Connelly R.K. and McIntier R.L. (2008).** Rheological properties of yeasted and nonyeasted wheat doughs developed under different mixing conditions. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 88:2309-2323
- Coussot P. and Ancy C. (1999).** Rhéophysique des pâtes et suspensions, EDP Sciences ed.
- Cruz M., Freitas F., Torres C.A.V., Reis M.A.M., Alves V.D. (2011).** Influence of temperature on the rheological behavior of a new fucose-containing bacterial exopolysaccharide. *International Journal Of Biological Macromolecules* 48:695-699
- Curtis W.R. and Emery A.H. (1993).** Plant-Cell Suspension-Culture Rheology. *Biotechnology And Bioengineering* 42:520-526
- Damin M.R., Minowa E., Alcantara M.R., Oliveira M.N. (2008).** Effect of cold storage on culture viability and some rheological properties of fermented milk prepared with yogurt and probiotic bacteria. *Journal Of Texture Studies* 39:40-55
- Dangaria J.H. and Butler P.J. (2007).** Macrorheology and adaptive microrheology of endothelial cells subjected to fluid shear stress. *American Journal Of Physiology-Cell Physiology* 293:C1568-C1575
- Dasari R.K. and Berson R.E. (2007).** The effect of particle size on hydrolysis reaction rates and rheological properties in cellulosic slurries. *Applied Biochemistry And Biotechnology* 137-140:289-299
- Dave R.I., Sharma P., McMahon D.J. (2003).** Melt and rheological properties of Mozzarella cheese as affected by starter culture and coagulating enzymes. *Lait* 83:61-77

Références bibliographiques

- Davey C.L., Markx G.H., Kell D.B. (1993).** On the dielectric method of monitoring cellular viability. *Pure And Applied Chemistry* 65:1921-1926
- Den Ouden F.W.C. and Van Vliet T. (2002).** Effect of concentration on the rheology and serum separation of tomato suspensions. *Journal Of Texture Studies* 33:91-104
- Deront M., Samb F.M., Adler N., Peringer P. (1998).** Biomass growth monitoring using pressure drop in a cocurrent biofilter. *Biotechnology And Bioengineering* 60:97-104
- Di Biasio A., Ambrosone L., Cametti C. (2010).** The dielectric behavior of nonspherical biological cell suspensions: An analytic approach. *Biophysical Journal* 99:163-174
- Di Biasio A. and Cametti C. (2007).** Effect of shape on the dielectric properties of biological cell suspensions. *Bioelectrochemistry* 71:149-156
- Di Biasio A. and Cametti C. (2011).** On the dielectric relaxation of biological cell suspensions: The effect of the membrane electrical conductivity. *Colloids And Surfaces B-Biointerfaces* 84:433-441
- Dogan N., McCarthy M.J., Powell R.L. (2002).** In-line measurement of rheological parameters and modeling of apparent wall slip in diced tomato suspensions using ultrasonics. *Journal Of Food Science* 67:2235-2240
- Drochon A. (2003).** Rheology of dilute suspensions of red blood cells: experimental and theoretical approaches. *European Physical Journal-Applied Physics* 22:155-162
- Druzian J.I. and Pagliarini A.P. (2007).** Xanthan gum production by fermentation from residue of apple juice. *Ciencia E Tecnologia De Alimentos* 27:26-31
- Einstein A. (1906).** A new determination of the molecular dimensions. *Annalen Der Physik* 19:289-306
- Faure L. (2003).** Optimisation de la production de lipases recombinantes chez *Yarrowia lipolytica*. Diplôme d'études approfondies Biologie - Santé - Biotechnologies:30
- Folkenberg D.M., Dejmek P., Skriver A., Guldager H.S., Ipsen R. (2006).** Sensory and rheological screening of exopolysaccharide producing strains of bacterial yoghurt cultures. *International Dairy Journal* 16:111-118
- Fujino T., Hirota K., Ohta K., Tahara T. (2008).** In-cell viscosity measurement using a fluorescence up-conversion microscope. *Chemistry Letters* 37:1240-1241
- Fyferling M. (2007).** Transfert d'oxygène en condition de culture microbienne intensive. Ph.D. INSA Toulouse, France, Toulouse.
- Gavrilescu M. and Roman R.V. (1994).** Oxygen mass transfer and gas holdup in a bubble column bioreactor with biosynthesis liquids. *Acta Biotechnologica* 14:27-36
- Gavrilescu M. and Tudose R.Z. (1998).** Hydrodynamics of non-newtonian liquids in external-loop airlift bioreactors - Part 1: Study of the gas holdup. *Bioprocess Engineering* 18:17-26
- Gehrig I., Bart H.J., Anke T., Germerdonk R. (1998).** Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. *Biotechnology And Bioengineering* 59:525-533
- Ghildyal N.P., Thakur M.S., Srikanta S., Jaleel S.A., Prapulla S.G., Prasad M.S., Devi P.N., Lonsane B.K. (1987).** Rheological studies on *Streptomyces fradiae* ScF-5 in submerged fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* 38:221-234

Références bibliographiques

- Gill N.K., Appleton M., Baganz F., Lye G.J. (2008).** Quantification of power consumption and oxygen transfer characteristics of a stirred miniature bioreactor for predictive fermentation scale-up. *Biotechnology And Bioengineering* 100:1144-1155
- Gogus N., Tari C., Oncu S., Unluturk S., Tokatli F. (2006).** Relationship between morphology, rheology and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* ATCC 20235 in submerged cultures. *Biochemical Engineering Journal* 32:171-178
- Goldsmith H.L. and Mason S.G. (1967).** The microrheology of dispersions in: Rheology theory and applications. Acad Press NY
- Gomes L.M.S., Santana M.H.A., Hokka C.O. (1997).** Specific productivity and rheological characterization of batch and fed-batch cephalosporin C production bioprocess. *Revista De Microbiologia* 28:101-108
- Gouveia E.R., Baptista-Neto A., Hokka C.O., Badino A.C. (2000).** Studies on the rheology and oxygen mass transfer in the clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering* 17:827-834
- Greenwood M.S. and Bamberger J.A. (2002).** Measurement of viscosity and shear wave velocity of a liquid or slurry for on-line process control. *Ultrasonics* 39:623-630
- Guizani N., Kasapis S., Al-Ruzeiki M. (2001).** Microbial, chemical and rheological properties of laban (cultured milk). *International Journal Of Food Science And Technology* 36:199-205
- Gupta K., Mishra P.K., Srivastava P. (2007).** A correlative evaluation of morphology and rheology of *Aspergillus terreus* during lovastatin fermentation. *Biotechnology And Bioprocess Engineering* 12:140-146
- Haque A., Richardson R.K., Morris E.R. (2001).** Effect of fermentation temperature on the rheology of set and stirred yogurt. *Food Hydrocolloids* 15:593-602
- Hasar H., Kinaci C., Unlu A., Togrul H., Ipek U. (2004).** Rheological properties of activated sludge in a SBR. *Biochemical Engineering Journal* 20:1-6
- Hassan A.N., Frank J.F., Schmidt K.A., Shalab S.I. (1996).** Rheological properties of yogurt made with encapsulated nonropy lactic cultures. *Journal Of Dairy Science* 79:2091-2097
- Hassan A.N., Ipsen R., Janzen T., Qvist K.B. (2003).** Microstructure and rheology of yogurt made with cultures differing only in their ability to produce exopolysaccharides. *Journal Of Dairy Science* 86:1632-1638
- Herrán N.S., López J.L.C., Pérez J.A.S., Martín M.M.B., Chisti Y. (2008).** Ultrasound affects fungal morphology and broth rheology of *Aspergillus terreus*. *Journal Of Biotechnology* 136:S489
- Herrero A.B., Lopez M.C., Fernandez-Lago L., Dominguez A. (1999).** *Candida albicans* and *Yarrowia lipolytica* as alternative models for analysing budding patterns and germ tube formation in dimorphic fungi. *Microbiology-Sgm* 145:2727-2737
- Huang B.Q., Qin P.Y., Xu Z.W., Zhu R.Y., Meng Y.H. (2011).** Effects of CaCl₂ on viscosity of culture broth, and on activities of enzymes around the 2-oxoglutarate branch, in *Bacillus subtilis* CGMCC 2108 producing poly-(gamma-glutamic acid). *Bioresource Technology* 102:3595-3598
- Huang S.Y. and Chan H.S. (2004).** Development of a miniature torque meter tailored to the measurement of power consumption in a laboratory-scale bioreactor. *Journal Of The Chinese Institute Of Chemical Engineers* 35:633-641

Références bibliographiques

- Huang W., Kim Y., Li X., Rayas-Duarte P. (2008).** Rheofermentometer parameters and bread specific volume of frozen sweet dough influenced by ingredients and dough mixing temperature. *Journal of Cereal Science* 48:639
- Huiyan Z., Feng W., Weining H., Jianxian Z., Rayas-Duarte P. (2010).** Rheofermentometer fermentation and breadmaking characteristics of dough containing xylo-oligosaccharide hydrolyzate from wheat bran. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 58 (3) 1878-1883
58:1878-1883
- Hwang H.J., Kim S.W., Xu C.P., Choi J.W., Yun J.W. (2004).** Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures. *Journal Of Applied Microbiology* 96:1296-1305
- Israelachvili J. (1991).** Intermolecular & Surface Forces, p. 450. *In A. press (ed.)*, 0 12 375181 0.
- Jeffery G.B. (1922).** The motion of ellipsoidal particles in a viscous fluid. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Containing Papers Of A Mathematical And Physical Character* 102:161-179
- Jin B., Lant P., Ge X. (2005).** Hydrodynamics and mass transfer coefficient in activated sludge aerated stirred column reactor: experimental analysis and modeling. *Biotechnology And Bioengineering* 91:406-417
- 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. *Biotechnology And Bioengineering* 38:1223-1232
- Jumah R.Y., Abu-Jdayil B., Shaker R.R. (2001).** Effect of type and level of starter culture on the rheological properties of set yogurt during gelation process. *International Journal Of Food Properties* 4:531-544
- Jüsten P., Paul G.C., Nienow A.W., Thomas C.R. (1998).** Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology And Bioengineering* 59:762-775
- Jydegaard-Axelsen A.M., Aaes-Jorgensen A., Koch A.G., Jensen J.S., Knochel S. (2005).** Changes in growth, rRNA content, and cell morphology of *Listeria monocytogenes* induced by CO₂ up- and downshift. *International Journal of Food Microbiology* 98:145-155
- Karsheva M., Hristov J., Penchev I., Lossev V. (1997).** Rheological behavior of fermentation broths in antibiotic industry. *Applied Biochemistry And Biotechnology* 68:187-206
- Kawasse F.M., Amaral P.F., Rocha-Leao M.H.M., Amaral A.L., Ferreira E.C., Coelho M.A.Z. (2003).** Morphological analysis of *Yarrowia lipolytica* under stress conditions through image processing. *Bioprocess And Biosystems Engineering* 25:371-375
- Kemblowski Z., Budzynski P., Owczarz P. (1990).** On-line measurements of the rheological properties of fermentation broth. *Rheologica Acta* 29:588-593
- Khongnakorn W., Wisniewski C., Pottier L., Vachoud L. (2007).** Physical properties of activated sludge in a submerged membrane bioreactor and relation with membrane fouling. *Separation And Purification Technology* 55:125-131
- Kieran P.M., MacLoughlin P.F., Malone D.M. (1997).** Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal Of Biotechnology* 59:39-52

Références bibliographiques

- Kim J.C., Lim J.S., Kim J.M., Kim C.Y., Kim S.W. (2005).** Relationship between morphology and viscosity of the main culture broth of *Cephalosporium acremonium* M25. Korea-Australia Rheology Journal 17:15-20
- Kim Y., Huang W., Du G., Pan Z., Chung O. (2008).** Effects of trehalose, transglutaminase, and gum on rheological, fermentation, and baking properties of frozen dough. Food Research International 41:903-908
- Krieger I.M. (1972).** Rheology of Monodisperse Latices. 3:111-136
- Kristo E., Biliaderis C.G., Tzanetakis N. (2003).** Modelling of the acidification process and rheological properties of milk fermented with a yogurt starter culture using response surface methodology. Food Chemistry 83:437-446
- Kubitschek H.E., Baldwin W.W., Graetzer R. (1983).** Buoyant Density Constancy During The Cell-Cycle Of *Escherichia-Coli*. Journal Of Bacteriology 155:1027-1032
- Kubitschek H.E. and Ward R.A. (1985).** Buoyant Density Constancy Of *Schizosaccharomyces-Pombe* Cells. Journal Of Bacteriology 162:902-904
- Laera G., Giordano C., Pollice A., Saturno D., Mininni G. (2007).** Membrane bioreactor sludge rheology at different solid retention times. Water Research 41:4197-4203
- Landon R.S., Law R.C.S., Webb C. (1993).** Fermentation broth rheology during dextran production by *Leuconostoc mesenteroides* B512(F) as a possible tool for control. Applied Microbiology And Biotechnology 40:251-257
- Lapasin R., Prici S., Bertocchi C., Navarini L., Cesaro A., de Philippis R. (1992a).** Rheology of culture broths and exopolysaccharide of *Cyanospira capsulata* at different stages of growth. Carbohydrate Polymers: 17 (1) 1-10 17:1-10
- Lapasin R., Prici S., Bertocchi C., Navarini L., Cesaro A., Dephilippis R. (1992b).** Polysaccharides from cyanobacteria.4. Rheology of culture broths and exopolysaccharide of *Cyanospira capsulata* at different stages of growth. Carbohydrate Polymers 17:1-10
- Leduy A., Marsan A.A., Coupal B. (1974).** A study of the rheological properties of a non-newtonian fermentation broth. Biotechnology And Bioengineering 16:61-76
- Lee S.Y., Pyrak-Nolte L.J., Campanella O. (2004).** Determination of ultrasonic-based rheological properties of dough during fermentation. Journal Of Texture Studies 35:33-51
- Lim J.S., Kim J.H., Kim C., Kim S.W. (2002).** Morphological and rheological properties of culture broth of *Cephalosporium acremonium* M25. Korea-Australia Rheology Journal 14:11-16
- Malinowski J.J., Lafforgue C., Goma G. (1987).** Rheological behaviour of high density continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Fermentation Technology 65:319
- Mancini M. and Moresi M. (2000).** Rheological behaviour of baker's yeast suspensions. Journal Of Food Engineering 44:225-231
- Marten M.R., Velkovska S., Khan S.A., Ollis D.F. (1996).** Rheological, mass transfer, and mixing characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. Biotechnology Progress 12:602-611
- Marten M.R., Velkovska S., Khan S.A., Ollis D.F. (1995).** Steady and dynamic shear characterization of cellulase-producing *Trichoderma reesei* suspensions. Applied Biochemistry And Biotechnology 51-2:319-328

Références bibliographiques

- Martinez-salas E., Martin J.A., Vicente M. (1981).** Relationship Of Escherichia-Coli Density To Growth-Rate And Cell Age. *Journal Of Bacteriology* 147:97-100
- Meeker S.P., Poon W.C.K., Pusey P.N. (1997).** Concentration dependence of the low-shear viscosity of suspensions of hard-sphere colloids. *Physical Review E* 55:5718-5722
- Meriem B., Nsabimana C., Bo J. (2010).** Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of kefir. *LWT - Food Science and Technology*: 43 (8) 1180-1184
- Mert B. (2008).** A new instrumental setup for determination of small amplitude viscoelastic properties of dough during fermentation. *European Food Research And Technology* 227:151-157
- Metzner A.B. and Otto R.E. (1957).** Agitation of non-newtonian fluids. *Aiche Journal* 3:3-10
- Metzner A.B. and Reed J.C. (1955).** Flow of non-newtonian fluids - correlation of the laminar, transition, and turbulent-flow regions. *Aiche Journal* 1:434-440
- Midoux N. (1993).** Mécanique et rhéologie des fluides en génie chimique, p. 513, Génie des procédés de l'école de Nancy, TEC & DOC - LAVOISIER, 1993 ed, 2 85206 928 8, Paris.
- Mishra P., Srivastava P., Kundu S. (2005).** A comparative evaluation of oxygen mass transfer and broth viscosity using Cephalosporin-C production as a case strategy. *World Journal Of Microbiology & Biotechnology* 21:525-530
- Mooney M. (1951).** The viscosity of a concentrated suspension of spherical particles. *Journal Of Colloid Science* 6:162-170
- Morice E. (1972).** Tests de normalité d'une distribution observée. *Revue de statistique appliquée* 20:5-35
- Nery T.B.R., Brandao L.V., Esperidiao M.C.A., Druzian J.I. (2008).** Biosynthesis of xanthan gum from the fermentation of milk whey: productivity and viscosity. *Quimica Nova* 31:1937-1941
- Niki R. and Motoshima H. (2006).** Influence of lactose on viscoelastic properties of acid-induced casein micelle gels: the secondary roll of lactose in yogurt production. *Milchwissenschaft*: 61 (4) 411-415
- Noik C., Monot F., Ballerini D., Lecourtier J. (1992).** Rheological characterization of xanthan-protein complexes obtained in various fermentation conditions. *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society* 203:363-COLL
- OIML-GUM (2010).** Evaluation of measurement data - Guide to the expression of uncertainty in measurement. Joint Committee on Guides in Metrology OIML G 1-100 Edition 2008 (E) Corrected version 2010
- Oliver G. and Brock C.J. (1997).** A rheological study of mechanical dough development and long fermentation processes for cream-cracker dough production. *Journal Of The Science Of Food And Agriculture* 74:294-300
- Olsvik E. and Kristiansen B. (1994).** Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnology Advances* 12:1-39
- Olsvik E., Tucker K.G., Thomas C.R., Kristiansen B. (1993).** Correlation of *Aspergillus niger* broth rheological properties with biomass concentration and the shape of mycelial aggregates. *Biotechnology And Bioengineering* 42:1046-1052

Références bibliographiques

- Olsvik E.S. and Kristiansen B. (1992a).** Influence of oxygen-tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnology And Bioengineering* 40:1293-1299
- Olsvik E.S. and Kristiansen B. (1992b).** Online rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnology And Bioengineering* 40:375-387
- Oncul S., Tari C., Unluturk S. (2007).** Effect of various process parameters on morphology, rheology, and polygalacturonase production by *Aspergillus sojae* in a batch bioreactor. *Biotechnology Progress* 23:836-845
- Opel C.F., Li J.C., Amanullah A. (2010).** Quantitative modeling of viable cell density, cell size, intracellular conductivity, and membrane capacitance in batch and fed-batch CHO processes using dielectric spectroscopy. *Biotechnology Progress* 26:1187-1199
- Ouriev B., Breitschuh B., Windhab E.J. (2000).** Rheological investigation of concentrated suspensions using a novel in-line Doppler ultrasound method. *Colloid Journal* 62:234-237
- Ouriev B., Windhab E., Braun P., Birkhofer B. (2004).** Industrial application of ultrasound based in-line rheometry: From stationary to pulsating pipe flow of chocolate suspension in precrystallization process. *Review Of Scientific Instruments* 75:3164-3168
- Ouriev B., Windhab E., Braun P., Zeng Y., Birkhofer B. (2003).** Industrial application of ultrasound based in-line rheometry: Visualization of steady shear pipe flow of chocolate suspension in pre-crystallization process. *Review Of Scientific Instruments* 74:5255-5259
- Ouriev B. and Windhab E.J. (2002).** Rheological study of concentrated suspensions in pressure-driven shear flow using a novel in-line ultrasound Doppler method. *Experiments In Fluids* 32:204-211
- Ozdemir U. and Kilic M. (2004).** Influence of fermentation conditions on rheological properties and serum separation of Ayran. *Journal Of Texture Studies* 35:415-428
- Pamboukian C.R.D. and Facciotti M.C.R. (2005).** Rheological and morphological characterization of *Streptomyces olindensis* growing in batch and fed-batch fermentations. *Brazilian Journal Of Chemical Engineering* 22:31-40
- Pappa E.C., Kandarakis I., Mallatou H. (2007).** Effect of different types of milks and cultures on the rheological characteristics of Teleme cheese. *Journal Of Food Engineering* 79:143-149
- Pena C., Peter C.P., Buchs J., Galindo E. (2007).** Evolution of the specific power consumption and oxygen transfer rate in alginate-producing cultures of *Azotobacter vinelandii* conducted in shake flasks. *Biochemical Engineering Journal* 36:73-80
- Penna A.L.B., Gurram S., Barbosa-Canovas G.V. (2006).** Effect of high hydrostatic pressure processing on rheological and textural properties of probiotic low-fat yogurt fermented by different starter cultures. *Journal Of Food Process Engineering* 29:447-461
- Petersen N., Stocks S., Gernaey K.V. (2008).** Multivariate models for prediction of rheological characteristics of filamentous fermentation broth from the size distribution. *Biotechnology And Bioengineering* 100:61-71
- Pevere A., d'Abzac P., van Hullebusch E., Lens P.N.L., Guibaud G. (2010).** Effect of substrate feeding on viscosity evolution of anaerobic granular sludges. *Water Science And Technology* 62:132-139

Références bibliographiques

- Pevere A., Guibaud G., van Hullebusch E., Lens P. (2007).** Identification of rheological parameters describing the physico-chemical properties of anaerobic sulphidogenic sludge suspensions. *Enzyme And Microbial Technology* 40:547-554
- Phan S.E., Russel W.B., Cheng Z.D., Zhu J.X., Chaikin P.M., Dunsmuir J.H., Ottewill R.H. (1996).** Phase transition, equation of state, and limiting shear viscosities of hard sphere dispersions. *Physical Review E* 54:6633-6645
- Pianetti A., Battistelli M., Citterio B., Parlani C., Falcieri E., Bruscolini F. (2009).** Morphological changes of *Aeromonas hydrophila* in response to osmotic stress. *Micron* 40:426-433
- Pintado M.E., da Silva J.A.L., Pintado A.I.E., Malcata F.X. (1998).** Rheological characterization under shear of a fraction of polymer produced via fermentation of whey-related media by *Rahnella aquatilis*. *Carbohydrate Polymers* 37:1-6
- Pollard D.J., Hunt G., Kirschner T.K., Salmon P.M. (2002).** Rheological characterization of a fungal fermentation for the production of pneumocandins. *Bioprocess And Biosystems Engineering* 24:373-383
- Pollice A., Giordano C., Laera G., Saturno D., Mininni G. (2006).** Rheology of sludge in a complete retention membrane bioreactor. *Environmental Technology* 27:723-732
- Porcel E.M.R., Lopez J.L.C., Perez J.A.S., Sevilla J.M.F., Sanchez J.L.G., Chisti Y. (2006).** *Aspergillus terreus* broth rheology, oxygen transfer, and lovastatin production in a gas-agitated slurry reactor. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 45:4837-4843
- Pu H., Ding G.L., Ma X.K., Hu H.T., Gao Y.F. (2009).** Effects of biofouling on air-side heat transfer and pressure drop for finned tube heat exchangers. *International Journal Of Refrigeration- Revue Internationale Du Froid* 32:1032-1040
- Queiroz M.C.R., Facciotti M.C.R., Schmidell W. (1997).** Rheological changes of *Aspergillus awamori* broth during amyloglucosidase production. *Biotechnology Letters* 19:167-170
- Quemada D. (2006).** Modélisation rhéologique structurelle - Dispersions concentrées et fluides complexes, p. 316, TEC & DOC ed. Lavoisier, 2 7430 0920 9 978 2 7430 0920 5, Paris.
- Rederstorff E., Fatimi A., Sinquin C., Ratiskol J., Merceron C., Vinatier C., Weiss P., Collic-Jouault S. (2011).** Sterilization of exopolysaccharides produced by deep-sea bacteria: Impact on their stability and degradation. *Marine Drugs* 9:224-241
- Riba J.-P. (1998).** Réacteurs enzymatiques et fermenteurs, p. 1-22, Techniques de l'ingénieur, vol. F3600.
- Richard A. and Margaritis A. (2003).** Rheology, oxygen transfer, and molecular weight characteristics of poly(glutamic acid) fermentation by *Bacillus subtilis*. *Biotechnology And Bioengineering* 82:299-305
- Riley G.L., Tucker K.G., Paul G.C., Thomas C.R. (2000).** Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnology And Bioengineering* 68:160-172
- Rodriguez-Monroy M., Trejo-Espino J.L., Jimenez-Aparicio A., Morante M.D.L., Villarreal M.L., Trejo-Tapia G. (2004).** Evaluation of morphological properties of *Solanum chrysotrichum* cell cultures in a shake flask and fermentor and rheological properties of broths. *Food Technology And Biotechnology* 42:153-158

Références bibliographiques

- Rodriguez F.A., Martinez-Toledo M.V., Gonzalez-Lopez J., Hontoria E., Poyatos J.M. (2010).** Performance of bench-scale membrane bioreactor under real work conditions using pure oxygen: viscosity and oxygen transfer analysis. *Bioprocess And Biosystems Engineering* 33:885-892
- Rodríguez Porcel E.M., Casas López J.L., Sánchez Pérez J.A., Fernández Sevilla J.M., Chisti Y. (2005).** Effects of pellet morphology on broth rheology in fermentations of *Aspergillus terreus*. *Biochemical Engineering Journal* 26:139-144
- Rogers S.S., van der Walle C., Waigh T.A. (2008).** Microrheology of bacterial biofilms in vitro: *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Langmuir* 24:13549-13555
- Rohm H. and Kovac A. (1995).** Effects of starter cultures on small deformation rheology of stirred yogurt. *Food Science And Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28:319-322
- Roukas T. (1999).** Rheological properties of pullulan fermentation broth in a stirred tank fermentor. *Food Biotechnology* 13:255-266
- Ryu H.W., Cho K.S., Chung D.J. (2010).** Relationships between biomass, pressure drop, and performance in a polyurethane biofilter. *Bioresource Technology* 101:1745-1751
- Salas-Bringas C., Jeksrud W.K., Schuller R.B. (2007).** A new on-line process rheometer for highly viscous food and animal feed materials. *Journal Of Food Engineering* 79:383-391
- Sampedro J.G. and Uribe S. (2004).** Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Molecular And Cellular Biochemistry* 256:319-327
- Sanchez A., Martinez A., Torres L., Galindo E. (1992).** Power-Consumption Of 3 Impeller Combinations In Mixing Xanthan Fermentation Broths. *Process Biochemistry* 27:351-365
- Schober T.J., Bean S.R., Boyle D.L. (2007).** Gluten-free sorghum bread improved by sourdough fermentation: Biochemical, rheological, and microstructural background. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry* 55:5137-5146
- Segre P.N., Meeker S.P., Pusey P.N., Poon W.C.K. (1995).** Viscosity And Structural Relaxation In Suspensions Of Hard-Sphere Colloids. *Physical Review Letters* 75:958-961
- Seyssiecq I., Marrot B., Djerroud D., Roche N. (2008).** In situ triphasic rheological characterisation of activated sludge, in an aerated bioreactor. *Chemical Engineering Journal* 142:40-47
- Shah R.K. and London A.L. (1978).** Laminar flow forced convection in ducts: a source book for compact heat exchanger analytical data. Academic Press, New York
- Shene C., Canquil N., Bravo S., Rubilar M. (2008).** Production of the exopolysacchzrides by *Streptococcus thermophilus*: Effect of growth conditions on fermentation kinetics and intrinsic viscosity. *International Journal of Food Microbiology* 124:279-284
- Sinha J., Bae J.T., Park J.P., Kim K.H., Song C.H., Yun J.W. (2001).** Changes in morphology of *Paecilomyces japonica* and their effect on broth rheology during production of exopolymers. *Applied Microbiology And Biotechnology* 56:88-92
- Skaf A., Nassar G., Lefebvre F., Nongaillard B. (2009).** A new acoustic technique to monitor bread dough during the fermentation phase. *Journal Of Food Engineering* 93:365-378
- Sodini I., Lucas A., Tissier J.P., Corrieu G. (2005).** Physical properties and microstructure of yoghurts supplemented with milk protein hydrolysates. *International Dairy Journal* 15:29-35

Références bibliographiques

- Stickland L.H. (1951).** The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *Journal Of General Microbiology* 5:698-703
- Survase S.A., Saudagar P.S., Bajaj I.B., Singhal R.S. (2007).** Scleroglucan: fermentative production, downstream processing and applications. *Food Technology and Biotechnology*: 45 (2) 107-118
- Taylor G.I. (1932).** The viscosity of a fluid containing small drops of another fluid. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series A-Containing Papers Of A Mathematical And Physical Character* 138:41-48
- Toda K., Furuse H., Amari T., Wei X.F. (1998).** Cell concentration dependence of dynamic viscoelasticity of *Escherichia coli* culture suspensions. *Journal Of Fermentation And Bioengineering* 85:410-415
- Torre L.L., Tamime A.Y., Muir D.D. (2003).** Rheology and sensory profiling of set-type fermented milks made with different commercial probiotic and yoghurt starter cultures. *International Journal Of Dairy Technology* 56:163-170
- Torres L.G., Nienow A.W., Sanchez A., Galindo E. (1993).** The characterization of a viscoelasticity parameter and other rheological properties of various xanthan gum fermentation broths and solutions. *Bioprocess Engineering* 9:231-237
- Tourbin M. (2006).** Caractérisation et comportement de suspensions concentrées de nanoparticules sous écoulement: Application aux processus d'aggrégation et de rupture. INP Toulouse, France, Toulouse, France.
- Trejo-Tapia G., Jimenez-Aparicio A., Villarreal L., Rodriguez-Monroy M. (2001).** Broth rheology and morphological analysis of *Solanum chrysotrichum* cultivated in a stirred tank. *Biotechnology Letters* 23:1943-1946
- Trepat X., Deng L.H., An S.S., Navajas D., Tschumperlin D.J., Gerthoffer W.T., Butler J.P., Fredberg J.J. (2007).** Universal physical responses to stretch in the living cell. *Nature* 447:592-595
- Tunick M.H., Rynne N., Guinee T.P., Van Hekken D.L., Kelly A.L., Beresford T.P., Malin E.L., Broadbent J.R., McMahon D.J. (2003).** Rheology of low-fat cheddar cheeses made with exopolysaccharide-producing cultures. *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society* 225:U78-U79
- Van Der Heijden R., Heijnen J.J., Hellinga C., Romein B., Luyben K. (1994a).** Linear constraint relations in biochemical reaction systems.1. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnology And Bioengineering* 43:3-10
- Van Der Heijden R., Romein B., Heijnen J.J., Hellinga C., Luyben K. (1994b).** Linear constraint relations in biochemical reaction systems.2. Diagnosis and estimation of gross errors. *Biotechnology And Bioengineering* 43:11-20
- Van Kaam R., Anne-Archard D., Alliet M., Lopez S., Albasi C. (2006).** Aeration mode, shear stress and sludge rheology in a submerged membrane bioreactor: some keys of energy saving. *Desalination* 199:482-484
- Van Megen W. and Underwood S.M. (1994).** Glass-transition in colloidal hard spheres - Measurement and mode-coupling-theory analysis of the coherent intermediate scattering function. *Physical Review E* 49:4206-4220
- Vanderwalt J.P. and Vonarx J.A. (1980).** The Yeast Genus *Yarrowia* Gen-Nov. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal Of Microbiology* 46:517-521

Références bibliographiques

- Vaz Rossell C.E., Yokoya F., Rodrigues N.S.S., Cipola L.E.M. (1976).** Rheological behaviour of culture medium for *Escherichia coli* fermentation for penicillinamidehydrolase production. *Revista Brasileira de Tecnologia* 7:391-395
- Veljkovic V.B., Lazic M.L., Skala D.U. (1988).** Studies on dextran fermentation broth rheology. *Enzyme And Microbial Technology* 10:686-688
- Verma M., Brar S.K., Tyagi R.D., Sahai V., Prevost D., Valero J.R., Surampalli R.Y. (2007).** Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme And Microbial Technology* 41:764-771
- Vlaev S.D., Mann R., Lossev V. (1995).** An analysis of the effect of rheology on local gas hold-up - The case of thylosin production. *Chemical Engineering Research & Design* 73:320-324
- Wang R.H. and Webb C. (1995).** Effect of cell concentration on the rheology of glucoamylase fermentation broth. *Biotechnology Techniques* 9:55-58
- Wang Z.Y., Lam Y.C., Joshi S.C., Chen X. (2010).** Determination of pressure drop for concentrated suspension in a capillary flow. *Polymer Composites* 31:792-798
- Warren S.J., Keshavarzmoore E., Shamlou P.A., Lilly M.D., Thomas C.R., Dixon K. (1995).** Rheologies And Morphologies Of 3 Actinomycetes In Submerged Culture. *Biotechnology And Bioengineering* 45:80-85
- Wehrle K. and Arendt E.K. (1998).** Rheological changes in wheat sourdough during controlled and spontaneous fermentation. *Cereal Chemistry* 75:882-886
- Weisenberger S. and Schumpe A. (1996).** Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *Aiche Journal* 42:298-300
- White D.E., Moggridge G.D., Wilson D.I. (2008).** Solid-liquid transitions in the rheology of a structured yeast extract paste, Marmite (TM). *Journal Of Food Engineering* 88:353-363
- Wiklund J. and Stading M. (2008).** Application of in-line ultrasound Doppler-based UVP-PD rheometry method to concentrated model and industrial suspensions. *Flow Measurement And Instrumentation* 19:171-179
- Wood J.M. (1999).** Osmosensing by bacteria: Signals and membrane-based sensors. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 63:230-262
- Wu Z., Wang Z.W., Zhou Z., Yu G.P., Gu G.W. (2007).** Sludge rheological and physiological characteristics in a pilot-scale submerged membrane bioreactor. *Desalination* 212:152-164
- Wu Z.Y. and Shi X.M. (2008).** Rheological properties of *Chlorella pyrenoidosa* culture grown heterotrophically in a fermentor. *Journal Of Applied Phycology* 20:279-282
- Yamada S., Wirtz D., Kuo S.C. (2000).** Mechanics of living cells measured by laser tracking microrheology. *Biophysical Journal* 78:1736-1747
- Yuan M.L., Lu Z.H., Cheng Y.Q., Li L.T. (2008).** Effect of spontaneous fermentation on the physical properties of corn starch and rheological characteristics of corn starch noodle. *Journal Of Food Engineering* 85:12-17
- Yun T., Yan X., Dong W. (2009).** Changes in morphology of *Rhizopus chinensis* in submerged fermentation and their effect on production of mycelium-bound lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*: 32 (3) 397-405

Références bibliographiques

- Yun U.J. and Park H.D. (2003).** Physical properties of an extracellular polysaccharide produced by *Bacillus* sp CP912. Letters In Applied Microbiology 36:282-287
- Zhang Z.G. and Chen H.Z. (2010).** Fermentation performance and structure characteristics of xanthan produced by *Xanthomonas campestris* with a glucose/xylose mixture. Applied Biochemistry And Biotechnology 160:1653-1663
- Zhao X.M., Hu Z.D., Nienow A.W., Kent C.A., Chatwin S. (1994).** Rheological characteristics, power-consumption, mass and heat-transfer during xanthan gum fermentation. Chinese Journal Of Chemical Engineering 2:198-210
- Zhong J.J., Seki T., Kinoshita S.I., Yoshida T. (1992).** Rheological characteristics of cell-suspension and cell-culture of *Perilla frutescens*. Biotechnology And Bioengineering 40:1256-1262
- Zhong J.J. and Yoshida T. (1994).** Rheological characteristics of suspended cultures of *Perilla frutescens* and their implications in bioreactor operation for anthocyanin production, Advances in plant biotechnology. Elsevier Science, Amsterdam Netherlands.
- Zhu H.Y., Wang F., Huang W.N., Zheng J.X., Rayas-Duarte P. (2010).** Rheofermento meter fermentation and breadmaking characteristics of dough containing xylo-oligosaccharide hydrolyzate from wheat bran. Journal Of Agricultural And Food Chemistry 58:1878-1883

Annexes

Table des annexes

ANNEXE 1 : SIMILITUDE	377
A. SIMILITUDE GEOMETRIQUE	377
B. SIMILITUDE PHYSIQUE	378
C. CONSEQUENCES	378
ANNEXE 2 : DIAGRAMME DE CONNEXION DE L'INSTRUMENTATION	380
ANNEXE 3 : PARAMETRAGE DES PORTS DE COMMUNICATION	381
ANNEXE 4 : SPECIFICATIONS TECHNIQUES DU SYSTEME OPTIQUE DU MORPHOLOGI G3S®	384
ANNEXE 5 : DESCRIPTION DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES	385
ANNEXE 6 : CARACTERISTIQUES DE LA CHAINE CLHP CHROMOLEON	387
ANNEXE 7 : TEMPS D'INTEGRATION PAR ELEMENTS POUR LE DETECTEUR DE L'ICP-MS.	389
ANNEXE 8 : INTERFACE HOMME-MACHINE A PARTIR DU PROGRAMME DE GESTION SOUS LABVIEW®	390
ANNEXE 9 : CALCUL D'INCERTITUDE	393
A. RAPPEL DE VOCABULAIRE	393
B. EVALUATION DES INCERTITUDES.....	393
C. METHODES D'EVALUATION DES INCERTITUDES	394
1. Type A.....	394
2. Type B.....	395
ANNEXE 10: EVALUATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE AU COURS DE L'ETABLISSEMENT DE LA COURBE DE FROTTEMENT	396
A. EN REGIME LAMINAIRE	396
1. Facteur de frottement.....	396
2. Nombre de Reynolds généralisé.....	397
B. EN REGIME TURBULENT	397
1. Facteur de frottement.....	397
2. Nombre de Reynolds généralisé.....	398
ANNEXE 11 EVALUATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE AU COURS DE L'ESTIMATION DE LA VISCOSITE EN LIGNE	399
REGIME LAMINAIRE	399
REGIME TURBULENT	399
ANNEXE 12: LISTE DES DIAMETRES EQUIVALENTS	401

ANNEXE 13 : PROTOCOLES DE MESURE EN RHEOMETRIE	402
ANNEXE 14 : DETERMINATION DE LA MASSE VOLUMIQUE DE LA BIOMASSE	403

ANNEXE 1 : SIMILITUDE

Cette approche s'est développée suite à un besoin de chiffrer des phénomènes, plutôt que de se baser sur l'empirisme. Les théories de la similitude sont utilisées aussi bien pour calculer des prototypes par extrapolation de maquettes, que pour calculer des coefficients de transferts entre phases.

Dans le cas de la comparaison de deux écoulements, on dit qu'il y a similitude complète s'il y a une similitude géométrique, cinématique et dynamique. Plus généralement, on parlera de similitudes géométriques et de similitudes physiques.

A. Similitude géométrique

Si deux figures sont semblables, elles possèdent des propriétés qui permettent de déduire l'une par rapport à l'autre. Le rapport entre la longueur quelconque d'une des figures, avec la longueur correspondante de l'autre figure, est une constante comme illustré sur la *Figure 192*. On appelle ce rapport « échelle d'agrandissement des longueurs » l_r .

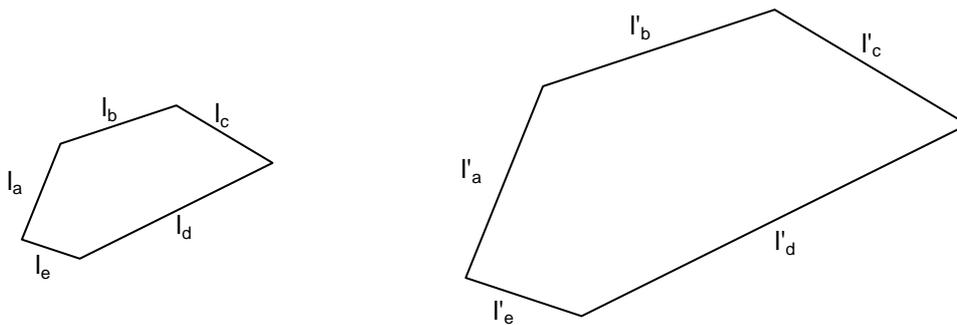


Figure 192 : Schéma d'une similitude géométrique

Ainsi, on obtient les égalités de l'Équation 142 pour l'échelle d'agrandissement des longueurs de la *Figure 192*.

$$\frac{l'_a}{l_a} = \frac{l'_b}{l_b} = \frac{l'_c}{l_c} = \frac{l'_d}{l_d} = \frac{l'_e}{l_e} = l_r$$

Équation 142 : Echelle d'agrandissement relatif aux longueurs

Sur le même principe, l'échelle d'agrandissement s'obtient sur le même principe pour une surface A ou un volume V , comme présenté à l'Équation 143.

$$\frac{A \cdot l}{V} = \frac{A' \cdot l'}{V'}$$

Équation 143 : Invariants de similitude relatifs à des longueurs

De manière générale, ces rapports s'appellent « invariants de similitude ».

B. Similitude physique

Cette notion de similitude, présentée pour les similitudes géométriques, peut s'étendre aux opérations physiques. Dans ce cadre, deux opérations sont semblables si les appareils sont géométriquement semblables et si les échelles d'agrandissement des grandeurs correspondantes sont constantes (invariants de similitude identiques pour chaque opération). Ainsi, si l'on regarde un écoulement entre une maquette et le prototype à l'échelle pilote, on peut poser le rapport de vitesse d'écoulement en deux points de l'installation (maquette ou pilote), comme schématisé en *Figure 193*.

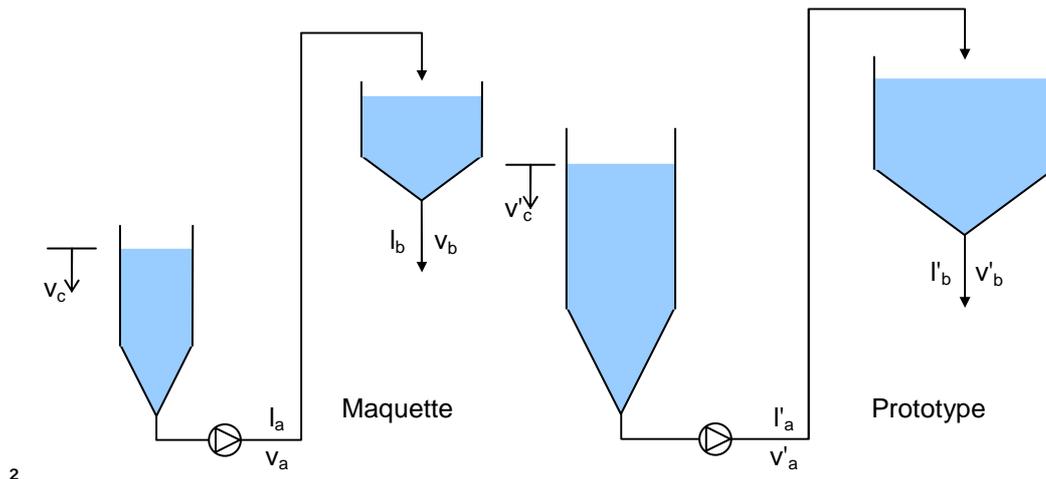


Figure 193 : Similitude physique relative aux vitesses

Ainsi, comme pour la similitude géométrique, on retrouve des rapports appelés invariants de similitude relatifs aux vitesses (*Équation 144*).

$$\frac{v_a}{v_b} = \frac{v'_a}{v'_b}$$

Équation 144 : Invariants de similitude relatifs aux vitesses

C. Conséquences

En généralisant cette approche avec différentes grandeurs telles que les masses volumiques, les forces, les énergies, etc., il est possible de retrouver les facteurs d'agrandissement d'une installation à une autre.

Par exemple, si l'on prend l'invariant de similitude de la longueur $l_+ = 20$ et de la vitesse $v_+ = 10$, on obtient l'invariant de similitude du temps $t_+ = 2$. Ainsi, 1 m pour une maquette correspondra à 20 m pour le pilote, et 1 s pour la maquette correspondra à 2 s pour le pilote. De la même manière, les lois de la physique nous permettent de calculer les échelles d'agrandissement :

- des surfaces $A_+ = l_+^2 = 400$;
- des volumes $V_+ = l_+^3 = 8000$;
- des accélérations $a_+ = l_+ \cdot t_+^{-2} = 5$;

Si nous poursuivons notre exemple en considérant l'invariant de similitude de la masse volumique $\rho_+ = 1$, nous considérons alors que nous utilisons le même fluide dans les deux installations. Nous obtenons pour échelles d'agrandissement :

- des masses $m_+ = V_+ \cdot \rho_+ = 8000$
- des forces $F_+ = m_+ \cdot a_+ = 40000$
- des pressions $p_+ = F_+ \cdot l_+^{-2} = 100$
- des énergies $Q_+ = F_+ \cdot l_+ = 2000$
- des puissances $P_+ = Q_+ \cdot t_+^{-1} = 1000$

Or, la similitude totale n'est pas possible en pratique. Par exemple, si nous reprenons les données ci-dessus, le changement d'échelle d'une installation impliquerait une échelle d'agrandissement :

- des viscosités dynamiques $\eta_+ = m_+ \cdot l_+^{-1} \cdot t_+^{-1} = 200$
- des tensions superficielles $\sigma_+ = F_+ \cdot l_+^{-1} = 2000$

Ces derniers cas ne sont évidemment pas possibles dans la réalité. Il en est de même pour l'évaluation des transferts de matière et de chaleur qui impliquent des constantes physiques (diffusivité, conductivité) qui ne peuvent de manière générale être cohérentes avec les autres données disponibles. Il est alors nécessaire de définir les bornes du problème à étudier permettant de définir les grandeurs intervenant dans le calcul des échelles d'agrandissement, mais définissant par convention comme celle intervenant dans le phénomène d'étude.

ANNEXE 3 : PARAMETRAGE DES PORTS DE COMMUNICATION

La communication entre les instruments de l'outil expérimental est détaillée dans les différents tableaux de cette annexe.

Matériel visé	Connexion Voie	Spécificité	Matériel concerné	Gamme
Portable D520 GBAREC146 Module acquisition AGILENT 34970A	Sous réseau local	login : XXX mot de passe : XXX	Logiciel LoCoPREL	/
	USB/RS-232 COM XX (9600/7/ Impaire/2/matériel)	Module multifonction	/	/
	Carte n°1 - Carte 34901A 101 à 120	Signal lu : 0.4 - 2 V	Capteurs & Bioréacteur	/
	Carte n°1 - Carte 34901A 121 à 122	Signal lu : 1A max	Non utilisé	/
	Carte n°2 - Carte 34907A 204	Signal envoyé : 0 - 10 V	Pompe Substrat 2	6 - 600 tr min ⁻¹
	Carte n°2 - Carte 34907A 205	Signal envoyé : 0 - 5 V	Pompe boucle de dérivation	0 - 300 l h ⁻¹
	Carte n°3 - Carte 34907A 304	Signal envoyé : 0 - 10 V	Pompe Substrat 1	1 - 100 tr min ⁻¹
Carte n°3 - Carte 34907A 305	Signal envoyé : 0 - 10 V	Pompe Sels d'alimentation	0 - 50 tr min ⁻¹	

Matériel	Connexion	Spécificité	Gamme	Utilisation
Balance Substrat 1	USB/ RS-232 COM XX (9600/7/ Impaire/2/matériel)	B-7-5-1 Sartorius QA7DCE-S (S/N: 22011061)	0 - 7000 g (± 0.1)	Calcul « biologique » dans LoCoPREL
Balance Substrat 2	USB/ RS-232 COM XX (19200/7/ Impaire/1/matériel)	Sigmun 1 - Sartorius SIWSDCP-1-16-H (S/N:24901087)	0 - 16000 g (± 0.1)	Calcul « biologique » dans LoCoPREL
Balance Sel ¹ 1	USB/ RS-232 COM XX (19200/7/ Impaire/1/matériel)	B-5-2-1 Sartorius CPA5201 (S/N: 24806235)	0 - 5200 g (± 0.1)	Calcul « biologique » dans LoCoPREL
Balance Sel ² 2	USB/ RS-232 COM XX (19200/7/ Impaire/1/matériel)	B-5-2-X Sartorius CPA5201 (S/N: 24806235)	0 - 5200 g (± 0.1)	Calcul hors- ligne
Balance pH (Régulation)	USB/ RS-232 COM XX (19200/7/ Impaire/1/matériel)	B-5-2-1 Sartorius CPA5201 (S/N: 24806235)	0 - 5200 g (± 0.1)	Calcul hors- ligne
Balance pH (Régulation)	USB/ RS-232 COM XX (19200/7/ Impaire/1/matériel)	B-5-2-5 Sartorius CPA5201 (S/N: 24806236)	0 - 5200 g (± 0.1)	Calcul hors- ligne

Matériel	Connexion	Spécificité	Gamme	Type
Débitmètre gaz	USB/ RS-232 COM XX (9600/8/ Aucune/1/aucun) Brooks Instruments 0254 - Model:0254AB2B1 1A (SN: 98328/01)	Mass Flow controler Brooks SLA5860S Régulateur (SN: T97833/003)	0 - 30 $l_n \text{ min}^{-1}$	Debitmètre régulateur contrôleur
		Mass Flow controler Brooks SLA5860S Regulateur (SN: T97833/001)	0 - 30 $l_n \text{ min}^{-1}$	Debitmètre régulateur contrôleur
		Mass Flow controler Brooks SLA5860S (SN: F00114/00002)	0 - 30 $l_n \text{ min}^{-1}$	Debitmètre contrôleur

¹ Sels principaux majoritaires

² Sels complémentaires aux sels 1 majoritaires

Annexes

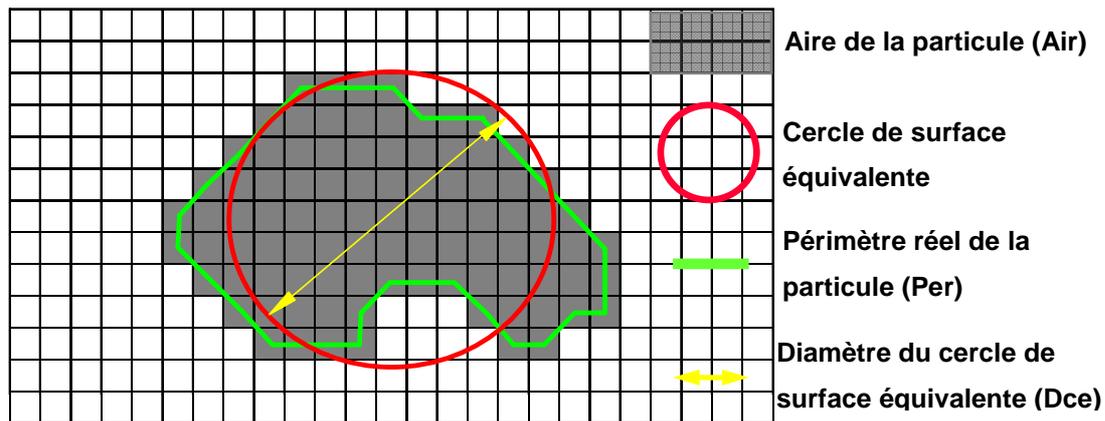
Matériel	Connexion	Spécificité	Débit minimum	Analyseur
Analyseur gaz	Sous réseau local	D\$ sur 'gbarec78 (Gbarec78)' (Y:) login : GBAREC78\mfcs mot de passe : Sartorius2.	6 l h ⁻¹	Innova
	Sous réseau local	Rapport sur 'CRI05294 (gbarec-spectro)' (W:) login: gbarec-spectro/user password: Prima600s!	60 l h ⁻¹	Prima 600s

ANNEXE 4 : SPECIFICATIONS TECHNIQUES DU SYSTEME OPTIQUE DU MORPHOLOGI G3S®

Système optique	Système optique Nikon® CFI 60 Brightfield / Darkfield					
Agrandissement (sur la caméra)	1X	2.5X	5X	10X	20X	50X
Grossissement approximatif	49X	123X	247X	494X	987X	2468X
Taille mini des particules [μm]	32	13	6.5	3.5	1.75	0.5
Taille maxi des particules [μm]	3000	1000	420	210	100	40
Ouverture numérique	0.040	0.075	0.15	0.30	0.40	0.55
Profondeur focale (total) [μm]	343.75	97.78	24.44	6.11	3.44	1.82
Distance de travail [mm]	3.2	8.80	18.00	15.00	13.00	9.80

ANNEXE 5 : DESCRIPTION DES PARAMETRES MORPHOLOGIQUES

Les paramètres morphologiques sont définis à partir des paramètres géométriques bruts suivants : la longueur (Lon), la largeur (Lar), le périmètre (Per), l'aire (Air). A partir de ces grandeurs géométriques, et de l'aire projetée de la particule (voir figure ci-dessous), il est possible de définir des descripteurs morphologiques.



A partir du cercle ou disque dont la surface est équivalente à l'aire de la particule, il est possible de définir le diamètre du cercle équivalent (Dce), et donc le périmètre du cercle équivalent Pce.

La circularité Cir est définie par : $Cir = \frac{Pce}{Per}$

La circularité haute sensibilité Chs découle de la circularité : $Chs = Cir^2 = \left(\frac{Pce}{Per}\right)^2$

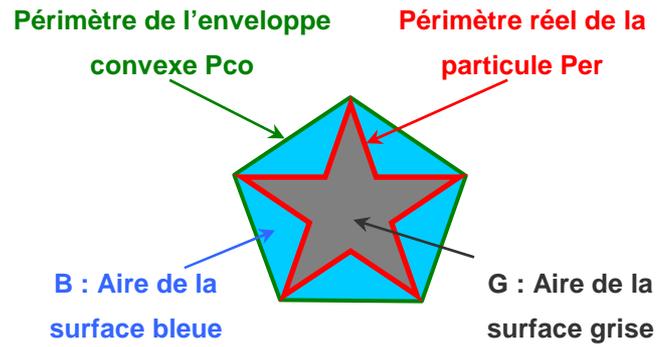
Cir et Chs sont toutes les deux sensibles à la forme générale et à la rugosité des bords.

Le rapport d'aspect Asp est défini par : $Asp = \frac{Lar}{Lon}$

L'élongation Elo est définie par : $Elo = 1 - \left(\frac{Lar}{Lon}\right) = 1 - Asp$

L'élongation est un paramètre sensible à la symétrie (centrale ou axiale) de la particule. Une particule symétrique aura une élongation de 0.

Pour définir la convexité Con, il est nécessaire d'introduire le périmètre de l'enveloppe convexe Pco, correspondant au périmètre d'un élastique tendu autour de la particule comme représenté sur le schéma ci-dessous :



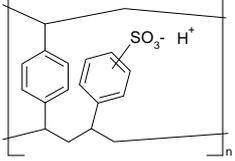
La convexité est définie par : $Con = \frac{Pco}{Per}$

Sur le schéma ci-dessus, la solidité Sol est définie par : $Sol = \frac{G}{B + G}$

Les derniers paramètres définis par le logiciel sont liés aux niveaux de gris des particules. L'intensité moyenne Imo correspond à la moyenne des niveaux de gris des pixels contenus dans chaque particule. L'écart-type de l'intensité Isd correspond à l'écart-type des niveaux de gris des pixels dans chaque particule.

ANNEXE 6 : CARACTERISTIQUES DE LA CHAÎNE CLHP CHROMOLEON

La colonne utilisée sur la chaîne HPLC chromoléon est la colonne HPLC Organic Acid Analysis Column, Aminex[®] HPX-87H Ion Exclusion Column, 300 mm x 7.8 mm, de référence dans le catalogue Dionex 125-0140. Les conditions d'utilisation de cette colonne sont rassemblées dans le tableau ci-dessous

Paramètre	Spécification
Forme ionique de la résine	H ⁺
Composition de la phase stationnaire	Copolymère de divinyl- benzène-styrène sulfonaté 
Taille de particule	9 µm
Pression maximum	1500 psi
Débit maximum	1 ml min ⁻¹
Température maximum	65 °C
Phase mobile typique	5 mmol l ⁻¹ de H ₂ SO ₄
Gamme de pH	1 à 3

Les caractéristiques des différents éléments de la chaîne HPLC chromoléon sont rassemblées dans le tableau ci-dessous.

Élément de la chaîne	Spécification												
	Ultimate 3000 Pump, Dionex												
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"></td> <td style="text-align: center;">Fuse</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Device</td> <td style="text-align: center;">LPG-3400A</td> <td style="text-align: center;">2ATT</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S/N</td> <td style="text-align: center;">8000441</td> <td style="text-align: center;">2ATT</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">P/N</td> <td style="text-align: center;">5035.0015</td> <td style="text-align: center;">136</td> </tr> </table>			Fuse	Device	LPG-3400A	2ATT	S/N	8000441	2ATT	P/N	5035.0015	136
			Fuse										
	Device	LPG-3400A	2ATT										
	S/N	8000441	2ATT										
	P/N	5035.0015	136										
	Seringue :												
	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">MSU 014-00A</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Volume 100 µl</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Scale 60 mm</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">ID 04</td> </tr> </table>	MSU 014-00A	Volume 100 µl	Scale 60 mm	ID 04								
	MSU 014-00A												
	Volume 100 µl												
	Scale 60 mm												
	ID 04												
	CTC Analytics - SNo. 141479												
	Rev. B.H - HCT-PAL												
	Rack et portoir 6 x 54 Echantillon réfrigéré à 4 °C												
BIORAD - Catalog (Dionex) 125-0128													
Colonne BIORAD													
Ultimate 3000 Photodiode Array Detector, Dionex													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"></td> <td style="text-align: center;">Fuse</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Device</td> <td style="text-align: center;">PDA-3000</td> <td style="text-align: center;">4AF</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S/N</td> <td style="text-align: center;">6020439</td> <td style="text-align: center;">4AF</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">P/N</td> <td style="text-align: center;">5080.0020</td> <td style="text-align: center;">162</td> </tr> </table>			Fuse	Device	PDA-3000	4AF	S/N	6020439	4AF	P/N	5080.0020	162	
		Fuse											
Device	PDA-3000	4AF											
S/N	6020439	4AF											
P/N	5080.0020	162											
Fabricant	Rheodyne												
Serial Number	67074												
Model Number	EV700-100-S2												
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td colspan="2"></td> <td style="text-align: center;">Fuse</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Device</td> <td style="text-align: center;">RI-101</td> <td style="text-align: center;">3.15AT</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S/N</td> <td style="text-align: center;">113856</td> <td style="text-align: center;">3.15AT</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">P/N</td> <td style="text-align: center;">5060.0030</td> <td style="text-align: center;">150</td> </tr> </table>			Fuse	Device	RI-101	3.15AT	S/N	113856	3.15AT	P/N	5060.0030	150	
		Fuse											
Device	RI-101	3.15AT											
S/N	113856	3.15AT											
P/N	5060.0030	150											
Support Eluant, Dionex													
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="text-align: center;">Device</td> <td style="text-align: center;">SR-3000</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">S/N</td> <td style="text-align: center;">8000764</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">P/N</td> <td style="text-align: center;">5035.9200</td> </tr> </table>	Device	SR-3000	S/N	8000764	P/N	5035.9200							
Device	SR-3000												
S/N	8000764												
P/N	5035.9200												
Matériaux : métal ou PEEK													
ID maximum : 0.013 inch													
Longueur maximum : 10 inch													

ANNEXE 7 : TEMPS D'INTEGRATION PAR ELEMENTS POUR LE DETECTEUR DE L'ICP-MS

Les temps d'intégration du détecteur pour chaque espèce quantifiée sont rassemblés dans le tableau ci-dessous en fonction du mode de tune (gaz présent au niveau de la cellule de réaction de l'octopole) effectué au cours de l'analyse.

Répétition	4	Etape 1	Etape 2	Etape 3
Fichier Tune		nogas.u	he.u	he-he.u
Temps de stabilisation [s]		5	10	10
Masse	Elément	Temps d'intégration par point et par masse [s]		
10	B	0.1	-	-
11	B	0.1	-	-
23	Na	0.01	-	-
24	Mg	0.01	-	-
25	Mg	0.1	-	-
26	Mg	0.01	-	-
31	P	0.01	-	2.0
32	S	0.01	-	2.0
33	S	0.01	-	2.0
34	S	0.01	-	2.0
35	Cl	0.5	-	-
37	Cl	0.5	-	-
39	K	0.01	0.01	-
42	Ca	0.01	-	-
43	Ca	0.01	-	-
44	Ca	0.01	-	-
55	Mn	-	0.3	-
56	Fe	-	0.3	-
57	Fe	-	0.3	-
59	Co	-	0.3	-
63	Cu	-	0.3	-
65	Cu	-	0.3	-
66	Zn	-	0.3	-
67	Zn	-	0.3	-
68	Zn	-	0.3	-
95	Mo	0.3	-	-
97	Mo	0.3	-	-
113	In	0.1	0.3	2.0

ANNEXE 8 : INTERFACE HOMME-MACHINE A PARTIR DU PROGRAMME DE GESTION SOUS LABVIEW®

De manière à éviter une gestion manuelle du débit de circulation dans la boucle de dérivation, un premier programme a été rapidement développé sous LabView® de manière à pouvoir établir les courbes de frottement et commencer les expérimentations biologiques. Ce programme permettait différentes actions, qu'il est possible de retrouver dans le logiciel LoCoPREL.

Avant le lancement de chaque fichier d'acquisition, l'opérateur avait la possibilité d'écrire un commentaire dans l'en-tête du fichier de sauvegarde par l'intermédiaire de l'encadré de la *Figure 194*.

Figure 194 : Insertion d'un commentaire avant l'initialisation du fichier de sauvegarde

Après validation, le nom du fichier de sauvegarde était demandé avant que les fonctions du programme soient activées.

La seconde étape consistait à entrer le nom des capteurs, la gamme de leur échelle et l'unité dans le panneau représenté par la *Figure 195*.

N° Voie	Nom	Mini	Maxi	Unité	a	b
101		0	0		0	0
102		0	0		0	0
103		0	0		0	0
104		0	0		0	0
105		0	0		0	0
106		0	0		0	0
107		0	0		0	0
108		0	0		0	0
109		0	0		0	0
110		0	0		0	0
111		0	0		0	0
112		0	0		0	0
113		0	0		0	0
114		0	0		0	0
115		0	0		0	0
116		0	0		0	0
117		0	0		0	0
118		0	0		0	0
119		0	0		0	0
120		0	0		0	0
121		0	0		0	0
122		0	0		0	0

Figure 195 : Panneau de paramétrage des capteurs

Ce panneau permet d'enregistrer, dans un fichier annexe (**P_Nom_du_fichier.txt**), le paramétrage des capteurs utilisés afin de pouvoir convertir les grandeurs électriques enregistrées en grandeurs physiques.

La gestion de l'acquisition et des séquences de débit s'effectue par le panneau représenté par la *Figure 196*. On retrouve principalement deux encadrés permettant la gestion de l'acquisition en dehors (Mode 1 - Qcste) et au cours d'une séquence de débit (Mode 2 - Séquences). De manière à prendre en compte chaque modification effectuée sur l'acquisition, les débits de circulation ou le paramétrage des capteurs, une validation sur le bouton approprié doit être effectuée.

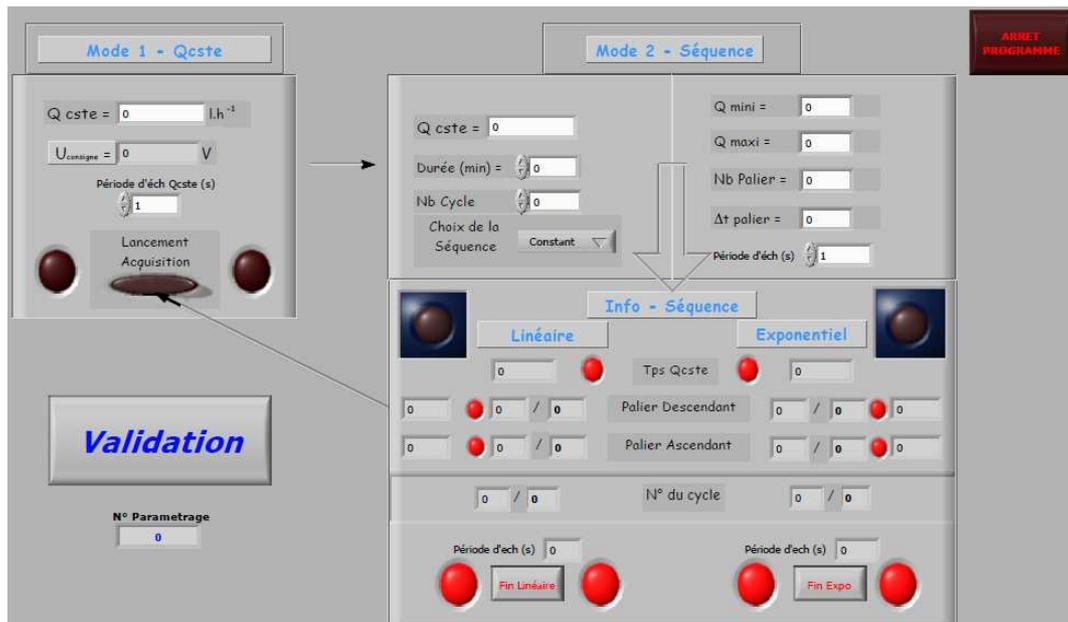


Figure 196 : Acquisition de données et séquences de débit

Des voyants en différents points du panneau permettent à l'opérateur de savoir où en est l'exécution du programme.

Le « Mode 1 - Qcste » permet de modifier le débit de circulation dans la boucle de dérivation et l'intervalle de temps entre chaque acquisition, ainsi que le lancement ou l'arrêt de l'acquisition lorsqu'on est dans le mode 1.

Le « Mode 2 - Séquence » permet de programmer la pompe pour effectuer des séquences de débits à allure pyramidale. L'avantage est que l'exécution des séquences s'effectue par une gestion informatisée issue d'un paramétrage préalablement effectué par l'opérateur. Ainsi, ce programme a permis de réaliser des séquences de débits en commençant ou en terminant par une certaine durée à un débit nominal fixé, avant de réellement modifier les débits pour l'application des séquences. Ainsi, la séquence de débits est appliquée en suivant un débit minimal, maximal, un intervalle de temps par palier et un nombre de paliers. Ces paramètres sont fixés avant le lancement du cycle de séquences. Un cycle de séquences est composé d'un intervalle de temps à un débit constant et d'une séquence de débits, pouvant être répétées plusieurs fois. Cette étape pose néanmoins un problème en termes de contrôle. En effet, lorsque le mode 2 est activé, l'opérateur ne peut plus interagir avec le

programme. Le paramétrage des capteurs, l'intervalle entre chaque acquisition, les débits appliqués ou le paramétrage des séquences est alors figé jusqu'à la fin de l'ensemble des cycles.

Un dernier panneau existe de manière à s'assurer que les capteurs sont réellement actifs. Celui-ci est représenté par la *Figure 197*.



Figure 197 : Récapitulatif des capteurs utilisés

Dans ce dernier panneau, lorsqu'un capteur est en acquisition, un voyant s'allume avec le nom enregistré par le programme ainsi que la voie sur laquelle il est connecté.

Le programme LabView® ne permettait pas de visualiser les variables enregistrées au cours de l'acquisition. De manière à avoir accès à l'information, une macro développée en VBA sous Microsoft Excel était lancée en continue, parallèlement au programme LabView®, de manière à suivre les valeurs numériques des grandeurs physiques.

ANNEXE 9 : CALCUL D'INCERTITUDE

A. Rappel de vocabulaire

Mesurage : action de mesurer

Incertitude de mesure : paramètre associé au résultat d'un mesurage, qui caractérise la dispersion des valeurs qui pourraient raisonnablement être attribuées au mesurande.

Y : mesurande

X_i : une des N grandeurs d'entrée permettant d'obtenir la valeur du mesurande à travers une relation fonctionnelle.

y : estimation du mesurande Y

x_i : estimation d'une des N grandeur d'entrée X_i

$u(x_i)$: incertitude-type.

$U(x_i)$: incertitude élargie.

$\frac{U(x_i)}{x_i}$: incertitude relative.

Remarque : les notations u et U viennent de l'anglais « uncertainty ».

Concernant la visualisation graphique :

- Ecart-type : permet de visualiser la dispersion des résultats obtenus par des mesures répétées.
- Intervalle de confiance : permet de visualiser la précision des mesures (sous conditions et hypothèses statistiques).

Répétabilité : étroitesse de l'accord entre les résultats des mesurages successifs du même mesurande, mesurages effectués dans les mêmes conditions de mesure. Ces conditions sont appelées conditions de répétabilité, elles comprennent :

- même mode opératoire,
- même observateur,
- même instrument de mesure utilisé dans les mêmes conditions,
- répétition durant une courte période de temps.

B. Evaluation des incertitudes

L'instrument de mesure, construit et certifié initialement par un étalon, aura toujours, malgré la meilleure des précisions, une incertitude liée à l'acte de mesurer. Cet acte entraîne deux types d'erreurs :

➔ Incertitude de type A :

Cas où l'opérateur fait toute une série de mesures. Le traitement des erreurs est statistique : moyenne, écart-type, ... Cette analyse statistique se fait lorsqu'on a peu d'indication sur les sources d'erreurs.

➔ Incertitude de type B :

Cas où il est impossible, voire difficile de faire un calcul statistique (cas de la mesure unique). L'opérateur doit chercher à évaluer les sources d'erreurs. Le constructeur de l'instrument de

mesure fournit des données telles que la casse de l'appareil, le calibre, la résolution. Il est nécessaire d'avoir alors une connaissance générale sur l'expérience.

→ Incertitudes composées (ou incertitude-type) :

Dans un certain nombre de cas complexes, il est nécessaire de combiner les méthodes d'évaluation de type A et de type B. Ceci permet d'obtenir une meilleure évaluation de l'incertitude réelle :

$$u_c(x_i) = \sqrt{u_A^2(x_i) + u_B^2(x_i)}$$

C. Méthodes d'évaluation des incertitudes

1. Type A

Nous sommes dans le cas de plusieurs mesures indépendantes répétées (conditions de répétabilité). La valeur x_i , mesure de la grandeur X_i , est alors prise comme la moyenne arithmétique des mesures :

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

Dans ce cas, l'incertitude se calcule à l'aide de l'écart-type, ayant $n-1$ degrés de liberté, encore appelé écart-type de l'échantillon ou écart-type expérimental :

$$s(x_i) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Si la distribution des mesures suit une loi gaussienne, alors les observations montrent que σ_{n-1} est un bon estimateur de l'incertitude pour un très grand nombre de mesures. Cependant, il est rare que la puissance du test, permettant la vérification de la normalité des mesures, soit élevée, du fait du faible nombre de mesures possibles (rarement proche de la dizaine de milliers).

A partir des mêmes valeurs expérimentales, il est possible de déterminer un autre estimateur de la variabilité autour de la moyenne, et issu de l'écart-type expérimental. Cet estimateur est nommé écart-type expérimental de la moyenne et se définit par l'expression ci-dessous :

$$s(\bar{x}) = \frac{s(x_i)}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n \cdot (n-1)}}$$

Dans la pratique, l'écart-type expérimental de la moyenne est appelé incertitude de répétabilité.

2. Type B

Si un laboratoire de mesure disposait de ressources et d'un temps illimités, il pourrait effectuer une recherche statistique exhaustive de toutes les causes imaginables d'incertitude, en utilisant par exemple des instruments de différents types et de différents fabricants, avec différentes méthodes de mesure, différents modes opératoires et différentes approximations dans les modèles théoriques du mesurage.

Les incertitudes associées à toutes ces causes pourraient être alors évaluées par l'analyse statistique de séries d'observations et l'incertitude due à chaque cause pourrait être caractérisée par un écart-type évalué statistiquement. Finalement, toutes les composantes de l'incertitude seraient obtenues par des évaluations de Type A.

Comme une telle étude n'est pas envisageable économiquement et temporellement, de nombreuses composantes de l'incertitude doivent être évaluées par tous les autres moyens disponibles.

L'ensemble des informations recherchées peut comprendre :

- Des résultats de mesures antérieures,
- La connaissance générale ou empirique du comportement des instruments utilisés,
- Les spécifications du fabricant,
- Les certificats d'étalonnage,
- L'incertitude attribuée à des valeurs de référence provenant d'ouvrage, manuels et autres normes.

Pour arriver à exprimer l'incertitude de Type B sous forme d'un écart-type, il faut recourir à des lois de probabilité dont les plus employées sont la loi normale (ou gaussienne) et la loi rectangulaire (ou uniforme).

ANNEXE 10: EVALUATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE AU COURS DE L'ETABLISSEMENT DE LA COURBE DE FROTTEMENT

Pour chaque capteur, on détermine une incertitude-type composée intégrant des incertitudes-type de Type A et des incertitudes-type de Type B.

Le tableau ci-dessous présente l'ensemble des variables nécessaires aux calculs d'incertitude avec le type de chaque incertitude pour chacune :

Capteurs	Evaluation des incertitudes-type
Débitmètre massique Q_m [kg.h ⁻¹]	Composée
Masse volumique ρ [kg.m ⁻³]	Composée
Perte de charges Δp [mBar]	Composée
Diamètre hydraulique D_h [m]	Composée
Longueur de la conduite L [m]	Type B
Viscosité [Pa.s]	Composée

A. En régime Laminaire

En régime laminaire d'écoulement dans une conduite circulaire, le facteur de frottement et le nombre de Reynolds généralisé sont donnés par :

$$f/2_{\text{laminaire}} = \frac{8}{Re_g} \text{ et } Re_g = \frac{\rho \cdot v \cdot d_h}{\mu_{\text{app}}}$$

Dans cette section, le facteur de frottement calculé correspondra au facteur de frottement estimé en régime laminaire :

$$f/2 = f/2_{\text{laminaire}}$$

1. Facteur de frottement

Les relations précédentes nous permettent de conduire le calcul suivant :

$$\begin{aligned} f/2 &= \frac{\tau_p}{\rho \cdot v^2} = \frac{\Delta p \cdot d_h}{4L} \cdot \frac{1}{\rho \cdot v^2} = (900 \cdot \pi)^2 \cdot \frac{\Delta p \cdot d_h^5 \cdot \rho}{4L \cdot Q_m^2} \\ \Rightarrow \frac{d(f/2)}{f/2} &= \frac{d\Delta p}{\Delta p} + \frac{dd_h}{d_h} - \frac{dL}{L} - \frac{d\rho}{\rho} - \frac{2dv}{v} \\ v &= \frac{1}{900\pi} \cdot \frac{Q_m}{d_h^2 \cdot \rho} \Rightarrow \frac{dv}{v} = \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{2dd_h}{d_h} - \frac{d\rho}{\rho} \\ \frac{d(f/2)}{f/2} &= \frac{d\Delta p}{\Delta p} + \frac{dd_h}{d_h} - \frac{dL}{L} - \frac{d\rho}{\rho} - 2 \left(\frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{2dd_h}{d_h} - \frac{d\rho}{\rho} \right) \\ \frac{d(f/2)}{f/2} &= \frac{d\Delta p}{\Delta p} + \frac{5dd_h}{d_h} - \frac{dL}{L} + \frac{d\rho}{\rho} - \frac{2dQ_m}{Q_m} \end{aligned}$$

L'incertitude-type composée relative du facteur de frottement déterminée pour la construction de la courbe de frottement est alors donnée par :

$$\frac{u_c(\frac{f}{2_{\text{model}}})}{\frac{f}{2_{\text{model}}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(\Delta p)}{\Delta p} \right]^2 + \left[5 \frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(L)}{L} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\rho)}{\rho} \right]^2 + \left[-2 \frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

2. Nombre de Reynolds généralisé

$$Re_g = \frac{\rho \cdot v \cdot d_h}{\eta_{\text{Bohlin}}}$$

$$v = \frac{1}{900\pi} \cdot \frac{Q_m}{d_h^2 \cdot \rho} \Rightarrow \frac{dv}{v} = \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{2dd_h}{d_h} - \frac{d\rho}{\rho}$$

$$\eta_{\text{Bohlin}} = \frac{\tau_p}{\dot{\gamma}} \Rightarrow \frac{d\eta_{\text{Bohlin}}}{\eta_{\text{Bohlin}}} = \frac{d\tau_p}{\tau_p} - \frac{d\dot{\gamma}}{\dot{\gamma}} \Rightarrow \frac{u_c(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(\tau_p)}{\tau_p} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\dot{\gamma})}{\dot{\gamma}} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

La documentation du rhéomètre Bohlin nous indique les valeurs suivantes pour une géométrie cône/plan type CP2960mm, correspondant à une incertitude-type de type B :

$$\frac{u_B(\tau_p)}{\tau_p} = 0.08\% \text{ et } \frac{u_B(\dot{\gamma})}{\dot{\gamma}} = 0.21\%$$

$$\frac{u_c(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} = \left\{ \left[\frac{u_A(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} \right]^2 + \left[\frac{u_B(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

$$\frac{dRe_g}{Re_g} = \frac{d\rho}{\rho} + \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{2dd_h}{d_h} - \frac{d\rho}{\rho} + \frac{dd_h}{d_h} - \frac{d\eta_{\text{Bohlin}}}{\eta_{\text{Bohlin}}}$$

$$\frac{dRe_g}{Re_g} = \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{dd_h}{d_h} - \frac{d\eta_{\text{Bohlin}}}{\eta_{\text{Bohlin}}}$$

$$\frac{u_c(Re_g)}{Re_g} = \left\{ \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

B. En régime turbulent

En régime turbulent, la relation entre le facteur de frottement et le nombre de Reynolds suit une loi de Blasius du type :

$$\frac{f}{2_{\text{turbulent}}} = c \cdot Re_g^d$$

Dans cette section, le facteur de frottement calculé correspondra au facteur de frottement estimé en régime turbulent :

$$\frac{f}{2} = \frac{f}{2_{\text{turbulent}}}$$

1. Facteur de frottement

L'expression de la propagation des incertitudes de mesure du facteur de frottement en régime turbulent restera de la même forme qu'en régime laminaire :

Annexes

$$\frac{d(f/2)}{f/2} = \frac{d\Delta p}{\Delta p} + \frac{5dd_h}{d_h} - \frac{dL}{L} + \frac{d\rho}{\rho} - \frac{2dQ_m}{Q_m}$$

L'incertitude-type composée relative du facteur de frottement reste de la même forme :

$$\frac{u_c(f/2_{\text{model}})}{f/2_{\text{model}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(\Delta p)}{\Delta p} \right]^2 + \left[5 \frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(L)}{L} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\rho)}{\rho} \right]^2 + \left[-2 \frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Il est nécessaire de porter attention au fait que les incertitudes-type de type B restent constantes (même appareillage utilisé), mais qu'il est nécessaire de déterminer à nouveau les incertitudes-type de type A pour ce nouveau régime d'écoulement.

2. Nombre de Reynolds généralisé

Sur le même modèle que le facteur de frottement, l'expression différentielle de la propagation des incertitudes de mesure du nombre de Reynolds généralisé restera de la même forme qu'en régime laminaire :

$$\frac{dRe_g}{Re_g} = \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{dd_h}{d_h} - \frac{d\eta_{\text{Bohlin}}}{\eta_{\text{Bohlin}}}$$

L'incertitude-type composée relative au nombre de Reynolds reste de la même forme :

$$\frac{u_c(Re_g)}{Re_g} = \left\{ \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(\eta_{\text{Bohlin}})}{\eta_{\text{Bohlin}}} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Comme dans le cas du facteur de frottement, on notera que les incertitudes-type de type B restent constantes (même appareillage utilisé), mais qu'il est nécessaire de déterminer à nouveau les incertitudes-type de type A pour ce nouveau régime d'écoulement.

ANNEXE 11 EVALUATION DE L'INCERTITUDE DE MESURE AU COURS DE L'ESTIMATION DE LA VISCOSITE EN LIGNE

Régime laminaire

L'estimation de la viscosité en ligne en régime laminaire dans une conduite cylindrique est effectuée à partir des relations suivantes :

$$\begin{aligned} f/2 &= f/2_{\text{laminaire}} = f/2_{\text{en ligne}} \\ \mu_{\text{en ligne}} &= \left(\frac{f/2_{\text{en ligne}}}{8} \right) \times \frac{\rho \cdot v \cdot d_h}{\rho} \end{aligned}$$

L'estimation de l'incertitude sur la viscosité en ligne, résultat des mesurages des différents capteurs de la plateforme, est donnée par :

$$d\mu_{\text{en ligne}} = \left(\frac{\partial \mu_{\text{en ligne}}}{\partial (f/2_{\text{en ligne}})} \right)_{\rho, v, d_h} d(f/2) + \left(\frac{\partial \mu_{\text{en ligne}}}{\partial \rho} \right)_{f/2, v, d_h} d\rho + \left(\frac{\partial \mu_{\text{en ligne}}}{\partial v} \right)_{f/2, \rho, d_h} d\bar{v} + \left(\frac{\partial \mu_{\text{en ligne}}}{\partial d_h} \right)_{f/2, \rho, v} dd_h$$

$$\frac{d\mu_{\text{en ligne}}}{\mu_{\text{en ligne}}} = \frac{d(f/2_{\text{en ligne}})}{f/2_{\text{en ligne}}} + \frac{d\rho}{\rho} + \frac{dv}{v} + \frac{dd_h}{d_h}$$

$$\text{Avec } v = \frac{1}{900\pi} \cdot \frac{Q_m}{d_h^2 \cdot \rho} \Rightarrow \frac{dv}{v} = \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{2dd_h}{d_h} - \frac{d\rho}{\rho}$$

$$\frac{d\mu_{\text{en ligne}}}{\mu_{\text{en ligne}}} = \frac{d(f/2_{\text{en ligne}})}{f/2_{\text{en ligne}}} + \frac{d\rho}{\rho} + \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{2dd_h}{d_h} - \frac{d\rho}{\rho} + \frac{dd_h}{d_h}$$

$$\frac{d\mu_{\text{en ligne}}}{\mu_{\text{en ligne}}} = \frac{d(f/2_{\text{en ligne}})}{f/2_{\text{en ligne}}} + \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{dd_h}{d_h}$$

L'incertitude-type composée relative à la viscosité en ligne déterminée en conduite cylindrique et en régime laminaire est donnée par :

$$\frac{u_c(\mu_{\text{en ligne}})}{\mu_{\text{en ligne}}} = \left\{ \left[\frac{u_c(f/2_{\text{en ligne}})}{f/2_{\text{en ligne}}} \right]^2 + \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(d_h)}{d_h} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

Régime turbulent

L'estimation de la viscosité en ligne en régime turbulent dans une conduite cylindrique est réalisée à partir des relations :

$$\begin{aligned} f/2_{\text{turbulent}} &= c \cdot \text{Re}_g^d \\ \Rightarrow \left(\frac{f/2_{\text{turbulent}}}{c} \right)^{\frac{1}{d}} &= \frac{1}{900\pi} \cdot \frac{Q_m}{\mu_{\text{en ligne}} \cdot d_h} \\ \mu_{\text{en ligne}} &= \left(\frac{f/2_{\text{turbulent}}}{c} \right)^{\frac{1}{d}} \cdot \frac{1}{900\pi} \cdot \frac{Q_m}{d_h} \end{aligned}$$

Annexes

L'estimation de l'incertitude de la viscosité en ligne, résultat des mesurages des différents capteurs de la plateforme, est donnée par :

$$\frac{d\mu_{\text{en ligne}}}{\mu_{\text{en ligne}}} = \left(-\frac{1}{d}\right) \cdot \frac{d\left(\frac{f}{2_{\text{turbulent}}}\right)}{\frac{f}{2_{\text{turbulent}}}} + \frac{dQ_m}{Q_m} - \frac{dD_h}{D_h}$$

L'incertitude-type composée relative à la viscosité en ligne en conduite cylindrique en régime turbulent est donnée par :

$$\frac{u_c(\mu_{\text{en ligne}})}{\mu_{\text{en ligne}}} = \left\{ \left[\left(-\frac{1}{d}\right) \frac{u_c\left(\frac{f}{2_{\text{turbulent}}}\right)}{\frac{f}{2_{\text{turbulent}}}} \right]^2 + \left[\frac{u_c(Q_m)}{Q_m} \right]^2 + \left[-\frac{u_c(D_h)}{D_h} \right]^2 \right\}^{\frac{1}{2}}$$

ANNEXE 12: LISTE DES DIAMETRES EQUIVALENTS

Cette liste rassemble les tailles ayant l'appellation « diamètre » et pouvant être rencontrées en dehors de nos travaux (Allen, 1997; Tourbin, 2006).

Symbole	Appellation	Définition
d_{sv}	Diamètre en surface-volume	Diamètre de la sphère qui a le même rapport surface - volume que la particule
d_d	Diamètre de glisse	Diamètre de la sphère qui a la même résistance au déplacement dans un fluide de même viscosité dynamique pour une même vitesse
d_f	Diamètre de chute libre	Diamètre de sphère qui a la même densité et la même vitesse de chute libre que la particule dans un fluide de même masse volumique et de même viscosité
d_{St}	Diamètre de Stokes	Diamètre de chute libre dans un écoulement laminaire
d_p	Diamètre de l'aire projetée aléatoire	Diamètre du cercle qui a la même aire projetée que la particule dans une orientation aléatoire
d_c	Diamètre lié au périmètre	Diamètre du cercle qui a le même périmètre que la projection du contour de la particule
d_M^1	Diamètre de Martin	Longueur de la corde, parallèle à une direction donnée, qui partage l'image de la particule en deux aires égales
d_R	Diamètre déroulé	Longueur de la corde passant par le centre de gravité du contour de la particule
d_t	Diamètre de tamisage	Côté de la plus petite maille carrée au travers de laquelle la particule peut passer
d_d	Diamètre de diffraction	Diamètre du cercle équivalent qui engendre la même déviation du faisceau que la particule en raison de la nature ondulatoire du rayonnement

ANNEXE 13 : PROTOCOLES DE MESURE EN RHEOMETRIE

Le contrôle du gradient de vitesse s'effectuera par l'application d'une vitesse de rotation ω sur un mobile donné. La conversion vitesse de rotation en vitesse de cisaillement sera alors dépendante de la géométrie du mobile.

Dans le cas d'une expérimentation longue, ou de fluides très peu visqueux, une géométrie de type cylindres coaxiaux pourra être utilisée afin de contrôler le cisaillement sur l'ensemble de l'échantillon tout en diminuant les risques d'évaporation. Ce dispositif est plus long à utiliser que les géométries cône-plan ou plans parallèles (mise en place et nettoyage de la géométrie). En outre, le moment d'inertie du mobile est assez élevé et il est donc peu adapté aux mesures en instationnaire (oscillations par exemple).

Quelle que soit la géométrie, le contrôle du gradient de vitesse ou de la contrainte de cisaillement s'effectuera par l'application, respectivement, d'une vitesse de rotation ω ou d'un couple C au mobile. Les mesures pourront alors se dérouler par paliers, avec l'application d'une vitesse de cisaillement précise pendant un temps donné avant le changement de la consigne. Cela permet au gradient de vitesse d'atteindre une certaine stabilité au sein de l'échantillon avant de passer à la vitesse suivante, comme l'illustre la figure ci-dessous.

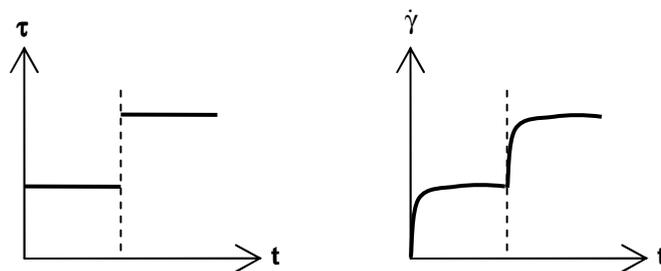


Schéma d'un protocole de mesures par paliers

Dans ce cas, la mesure est faite lorsque l'écoulement est établi.

Une autre méthode de mesure consiste à appliquer une rampe de gradient de vitesse permettant ainsi de balayer la totalité d'une gamme de cisaillement. Lorsque peu d'informations sont disponibles sur l'échantillon, cette méthode permet ainsi une approche exploratoire rapide, illustrée par la figure suivante.

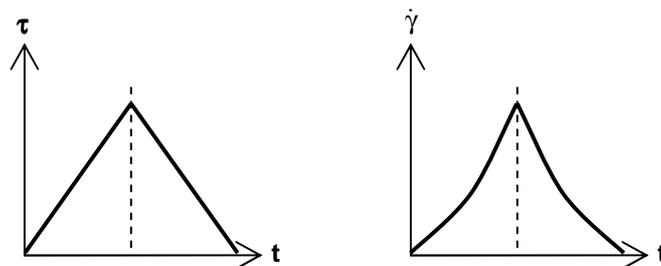


Schéma d'un protocole de mesure par rampe

ANNEXE 14 : DETERMINATION DE LA MASSE VOLUMIQUE DE LA BIOMASSE

Rappel

$$\text{Humidité relative : } x = \frac{m_{\text{eau}}}{m_{X_H}}$$

$$\text{Humidité absolue : } n = \frac{m_{\text{eau}}}{m_{X_{MS}}}$$

La biomasse hydratée X_H est constituée d'une fraction d'eau, appelée teneur en eau, et d'une fraction sèche X_{MS} .

$$m_{X_H} = m_{X_{MS}} + m_{\text{eau}}$$

La teneur en eau est symbolisée par α et suit l'expression ci-dessous :

$$\alpha = \frac{m_{\text{eau}}}{m_{\text{eau}} + m_{X_{MS}}}$$

$$\Leftrightarrow m_{\text{eau}} = \frac{\alpha}{1-\alpha} \cdot m_{X_{MS}} \Leftrightarrow \rho_{\text{eau}} = \frac{\alpha}{1-\alpha} \cdot \rho_{X_{MS}}$$

$$\Leftrightarrow \rho_{X_H} = \left(\frac{1}{1-\alpha} \right) \cdot \rho_{X_{MS}}$$

Les cellules sont caractérisées par la biomasse hydratée X_H , et la biomasse anhydre issue de la détermination en matière sèche de la cellule X_{MS} . En ce sens, il est possible de poser les relations suivantes :

$$\left. \begin{array}{l} m_{X_{MS}} = X \cdot V_{\text{tot}} \\ m_{X_{MS}} = \rho_{X_{MS}} \cdot V_{\text{solide}} \end{array} \right\} \rightarrow X = \rho_{X_{MS}} \cdot \frac{V_{\text{solide}}}{V_{\text{tot}}} = \rho_{X_{MS}} \cdot \phi_{\text{solide}} \rightarrow \phi_{\text{solide}} = \frac{X}{\rho_{X_{MS}}}$$

$$m_{X_H} = m_{X_{MS}} + m_{\text{eau}}$$

$$m_{X_H} = \rho_{X_H} \cdot V_{\text{solide}}$$

L'expression de la masse volumique déterminée hors ligne prend la forme de l'expression suivante :

Annexes

$$\begin{aligned}
 & \rho_{\text{moût}}^{\text{hors-ligne}} \\
 &= \rho_{\text{solide-liquide}} \\
 &= \rho_{\text{liquide}} \cdot \phi_{\text{liquide}} + \rho_{X_H} \cdot \phi_{\text{solide}} \\
 &= \rho_{\text{liquide}} \cdot (1 - \phi_{\text{solide}}) + \left(\frac{1}{1 - \alpha} \right) \cdot \rho_{X_{MS}} \cdot \phi_{\text{solide}} \\
 &= \rho_{\text{liquide}} + \phi_{\text{solide}} \cdot \left[\left(\frac{1}{1 - \alpha} \right) \cdot \rho_{X_{MS}} - \rho_{\text{liquide}} \right] \\
 &= \rho_{\text{liquide}} + \frac{X}{\rho_{X_{MS}}} \cdot \left[\left(\frac{1}{1 - \alpha} \right) \cdot \rho_{X_{MS}} - \rho_{\text{liquide}} \right] \\
 &= \rho_{\text{liquide}} + X \cdot \left(\frac{\rho_{X_H}}{\rho_{X_{MS}}} - \frac{\rho_{\text{liquide}}}{\rho_{X_{MS}}} \right) \\
 &= \rho_{\text{liquide}} + X \cdot a_{\text{suspension}}
 \end{aligned}$$

A partir d'une régression linéaire de la fonction $\rho_{\text{moût}}^{\text{hors-ligne}} = f(X)$, il est possible de déterminer $a_{\text{suspension}}$.
 Nous pouvons alors avoir accès à ρ_{X_H} et $\rho_{X_{MS}}$ à partir des expressions suivantes :

$$a_{\text{suspension}} = \frac{\rho_{X_H}}{\rho_{X_{MS}}} - \frac{\rho_{\text{liquide}}}{\rho_{X_{MS}}} = \frac{1}{1 - \alpha} - \frac{\rho_{\text{liquide}}}{\rho_{X_{MS}}}$$

$$\rho_{X_H} = \frac{\rho_{\text{liquide}}}{1 - a_{\text{suspension}} \cdot (1 - \alpha)}$$

$$\rho_{X_{MS}} = \frac{\rho_{\text{liquide}}}{\frac{1}{1 - \alpha} - a_{\text{suspension}}}$$