

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

OPTIMISATION, CARACTÉRISATION ET VALIDATION D'UN BIORÉACTEUR
DE 5 L POUR LA CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES EN SUSPENSION À
HAUTE DENSITÉ

DAVID FORTIER

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

MÉMOIRE PRÉSENTÉ EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLÔME DE
MAÎTRISE ÈS SCIENCES APPLIQUÉES
(GÉNIE CHIMIQUE)

DÉCEMBRE 2002



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-81516-1

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

OPTIMISATION, CARACTÉRISATION ET VALIDATION D'UN BIORÉACTEUR
DE 5 L POUR LA CULTURE DE CELLULES VÉGÉTALES EN SUSPENSION À
HAUTE DENSITÉ

présenté par : DAVID FORTIER

en vue de l'obtention du diplôme de Maîtrise ès sciences appliquées

a été soumis au jury d'examen constitué de :

M. MARIO JOLICOEUR, Ph.D., président

M. MICHEL PERRIER, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. JEAN ARCHAMBAULT, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. AMINE KAMEN, Ph.D., membre

REMERCIEMENTS

Je voudrais commencer par remercier mon superviseur en milieu pratique, M. Joël Sirois, pour m'avoir initié au domaine de la biotechnologie végétale, il y a maintenant trois ans. Il m'a fait découvrir un domaine en pleine effervescence, rempli de défis technologiques à résoudre. Ses réflexions, commentaires et directives ont constamment motivé ma recherche de l'excellence.

Je suis extrêmement reconnaissant envers mon directeur de recherche, M. Michel Perrier, et mon co-directeur de recherche, M. Jean Archambault, d'avoir eu confiance en moi pour la réussite de ce projet. Mes trop rares discussions avec M. Perrier ont toujours apporté un réconfort dans les moments angoissants. Merci beaucoup à M. Jean Archambault pour son enthousiasme communicatif, ses nombreux conseils et son questionnement dans la compréhension des phénomènes. Un merci particulier à M. Pierre Carreau de l'École Polytechnique pour avoir contribué à ce projet et apporté des réflexions toujours pertinentes.

Je voudrais remercier mes compagnons de laboratoire qui ont œuvré indirectement sur mon projet : M. Alain Veilleux pour son support et son aide dans le cadre de mes études, M. Sergio Joao pour son travail au laboratoire et ses nombreux résultats sur le mélange et M. Matthieu Fortier pour son aide lors des cultures en bioréacteur et la conception de trappes à mousse.

Je ne pourrais passer sous silence l'apport des membres de Phytobiotech inc. sur ce projet. Je n'ai qu'à penser à Dany Aubry, Martin Gaudette, Steve Fiset et Martin Descôteaux pour leur patience suite à mes nombreuses questions et leur expertise dans la culture de cellules végétales, Luc Lavoie, Serge Brouillette et François Stabile pour les analyses et le groupe de Cultures de cellules, Robert Williams, Sophie Roy et Meghan Graham pour les cellules, leur enthousiasme et leur collaboration à la réussite de ce projet.

Je voudrais remercier le Fonds Québécois de la Recherches sur la Nature et les Technologies (anciennement FCAR) et Phytobiotech inc. pour leur support financier. Leur aide a été un souci de moins et a contribué à ma motivation à réussir ce projet.

En terminant, je voudrais remercier mes proches d'avoir cru en moi tout au long de mes études : ma compagne, Caroline, qui a toujours été d'un réconfort dans les moments les plus difficiles et qui a subi, malgré elle, la longue étape de la rédaction et mon absence pendant les cultures de cellules, mes parents, qui n'ont jamais cessé de m'encourager et de s'intéresser à ce domaine qui est inconnu pour eux et finalement, mes amis Frédéric, David, Pascal, Sébastien et mes nombreux amis de génie sans lesquels je n'aurais jamais été l'homme de valeur que je suis.

RÉSUMÉ

L'objectif principal de ce projet est d'optimiser le design du bioréacteur de 5 L développé par Jolicoeur (1990) afin de permettre un transfert d'oxygène suffisant pour la culture de cellules végétales à haute densité cellulaire en cuvée alimentée. Le projet vise le développement d'une technologie d'aération permettant d'atteindre un coefficient de transfert volumétrique d'oxygène (k_La) de 25 h^{-1} dans l'eau avec un débit maximal de 0.05 vvm (volume de gaz par volume de bioréacteur par minute) et une vitesse d'agitation de 60 rpm (rotation par minute).

Dans un premier temps, un diffuseur en acier poreux a été choisi comme aérateur. Une étude photographique a montré que les bulles sont de dimensions inférieures (62 à 73 % selon le débit de gaz) à celles formées par un aérateur à orifice simple. Une plaque dont la porosité est de $0.4 \mu\text{m}$ a été retenue comme aérateur car elle présente des k_La supérieurs (7 à 20 %) à la plaque de $1.3 \mu\text{m}$. Le dimensionnement du bioréacteur a été étudié en utilisant trois cuves de 5 L avec des rapports Hauteur/Diamètre (H/D) différents. Une augmentation du k_La de 85 % se produit lorsque le rapport H/D augmente de 1.3 à 3.6. Un rapport H/D de 1.9 a été choisi pour la conception du bioréacteur. Il s'agit de la hauteur maximale physiquement réalisable pour un bioréacteur de 150 L selon une mise à l'échelle géométrique.

Le dimensionnement de l'hélice à ruban hélicoïdal simple a été optimisé en fonction des rapports géométriques pas/diamètre (P/d) de l'hélice et largeur du ruban/diamètre de l'hélice (W/d). L'hélice ayant un rapport P/d de 1.45 et un rapport W/d de 0.2 a montré le meilleur k_La (10.1 h^{-1}) et le temps de mélange le plus bas (18 s). La détermination du cisaillement a par la suite été estimée par simulations à l'École Polytechnique de Montréal dans des bioréacteurs de 3 L. L'équipe de Phytobiotech a déjà déterminé expérimentalement que dans ses bioréacteurs, la croissance est normale à 90 rpm mais qu'elle est totalement inhibée à 120 rpm pour une grande variété d'espèces. Des simulations ont montré que le taux de cisaillement

généralisé par une agitation de 90 rpm est de 60 s^{-1} . Des simulations ont ensuite été faites avec un bioréacteur de 5 L pour déterminer l'influence de l'entrefer et de la vitesse d'agitation sur le cisaillement développé par le ruban hélicoïdal géométriquement similaire à ceux utilisés dans les bioréacteurs de 3 L. Les résultats ont montré qu'un entrefer de 10 mm et une vitesse d'agitation de 90 rpm génère un cisaillement maximal de 38 s^{-1} , qui est inférieur au cisaillement critique. L'ajout de 3 chicanes de surface de 2 cm de profondeur a ensuite permis d'augmenter le $k_L a$ à 12.2 h^{-1} et de diminuer le temps de mélange à 12 s pour un débit gazeux de 0,05 vvm et une vitesse d'agitation de 60 rpm.

L'augmentation de la vitesse d'agitation à 90 rpm et du débit d'aération à 0.1 vvm montrent un $k_L a$ atteint de 20 h^{-1} , ce qui représente une augmentation de 571 % du $k_L a$ initialement développé par l'ancien aérateur seul. L'utilisation d'un rapport géométrique H/D de 3.6 aurait théoriquement permis d'atteindre un $k_L a$ de 27 h^{-1} sans la contrainte physique de l'espace de travail. Ceci représente une augmentation de 670 %.

La comparaison entre le nouveau bioréacteur et l'ancien bioréacteur montre une amélioration de 70 % du $k_L a$ sous les mêmes débits gazeux. Le $k_L a$ du nouveau bioréacteur est cependant moins sensible à l'augmentation de la vitesse d'agitation. Une augmentation de la vitesse d'agitation de 60 à 90 rpm augmente le $k_L a$ du nouveau bioréacteur de 15 % contrairement à 60 % pour l'ancien bioréacteur.

Aucune différence significative de la croissance n'a été observée lors de la culture en parallèle de cellules d'*Eschscholtzia californica* dans les deux bioréacteurs. Par contre, les débits totaux et d'oxygène nécessaires pour un contrôle de l'oxygène dissous (90 % de la saturation avec l'air) de l'ancien bioréacteur a dépassé les limites du projet (0.05 vvm). Les forts débits employés ($> 0.05 \text{ vvm}$) ont causé une formation excessive de mousse qui a causé l'arrêt prématuré de la culture. Une analyse des $k_L a$ en culture montre que le $k_L a$ du nouveau bioréacteur est deux fois plus élevé que le

k_La de l'ancien bioréacteur en milieu visqueux pour une même concentration en masse de cellules.

L'étude de la rétention gazeuse et de l'évolution du diamètre des bulles a permis de caractériser les principaux phénomènes concernant le transfert gazeux. Le développement d'un modèle a permis de prédire le transfert gazeux pour l'échelle de 5 L avec une erreur inférieure à 20 %. L'utilisation du modèle montre qu'une mise à l'échelle géométrique du nouveau bioréacteur est possible sans perte de rendement pour un débit gazeux de 0.05 vvm. Il est primordial de conserver le même régime de bullage pour maximiser le transfert gazeux. Le modèle développé à l'échelle de 5 L est utilisé pour prédire le k_La développé pour des échelles supérieures. L'utilisation du modèle montre que la valeur maximale de k_La pouvant être atteinte diminue lorsque l'échelle augmente. La diminution est attribuée à un diamètre moyen des bulles prédit plus élevé. Selon le modèle, l'effet de l'augmentation du temps de résidence des bulles causé par une hauteur de liquide plus élevée est masqué par la diminution de l'aire interfaciale, du coefficient de transfert de masse k_L et de l'augmentation de la vitesse ascensionnelle des bulles causés par une augmentation du diamètre moyen des bulles dans le bioréacteur. Cependant, le manque d'information sur certains paramètres tel que le taux de coalescence des bulles pour des hauteurs supérieures de liquide et le facteur d'écoulement nécessite une étude plus approfondie à différentes échelles afin de valider le modèle et d'entamer la construction de nouveaux bioréacteurs de plus grande capacité.

ABSTRACT

The objective of this project was the optimization of the 5 L helical ribbon bioreactor design previously developed by Jolicoeur (1990) to increase oxygen transfer for high-density culture of plant cells. This work required the development of a new aeration technology to volumetric mass transfer coefficients (k_La) of at least 25 h^{-1} in water with a maximum gas flow rate of 0.05 vvm and an agitation speed of 60 rpm.

During the first phase of this project, stainless steel porous diffusers were chosen as the best way to obtain the required mass transfer rate, and their properties optimized. A photographic study of the gas release into the water showed smaller bubbles (62 to 73 %) than for static orifice. The porosity of the diffuser chosen was $0.4 \mu\text{m}$ because it showed k_La (7-20 % increase) greater than the $1.3 \mu\text{m}$ diffuser under the same operating conditions.

The second phase of this investigation involved the physical dimensions of the 5 L bioreactor tube itself. Three different columns with Height/Diameter (H/D) ratios of between 1 and 3.6 were studied. Increasing the H/D ratio for 1.3 to 3.6 increased the k_La by 85 %. However, a H/D ratio of 1.9 was chosen for the 5 L bioreactor since it was the maximum possible height for the geometrical scale-up of a 150 L bioreactor. Simple helical ribbons were optimized with respect to the geometrical ratios of pitch/impeller diameter (P/d) and the width/impeller diameter (W/d). Impellers with P/d of 1.45 and W/d of 0.2 showed the highest k_La (10.1 h^{-1}) and the lowest mixing time (18 s). Simulations carried out at École Polytechnique de Montréal using a similar 3 L bioreactor were performed to determine maximum shear stress. Previous research at Phytobiotech showed normal growth at 90 rpm but inhibition of growth at higher rpm (120). Simulations showed that the maximum shear rate was 60 s^{-1} . Finally, simulations in the 5 L bioreactor were conducted to determine the influence of both the gap and the agitation speed on the impeller configuration previously chosen. Results showed that an agitation speed of 90 rpm developed

shear rates (38 s^{-1}) that is lower than the maximum shear rate as long as a gap of 10 mm was present. Furthermore, addition of three baffles at the surface of the culture increased the k_La to 12.2 h^{-1} and decreased mixing time to 12 s.

Increase of the agitation speed to 90 rpm and the gas flow rate to 0.1 vvm yielded a k_La of 20 h^{-1} without cell damage, representing an increase of 571 % over the original k_La obtained by the old aeration system. Maximum k_La of 27 h^{-1} was estimated with a H/D of 3.6 (without constraint of the physical space), representing an increase of 670 %.

Finally the old and the new bioreactor configurations were compared. The new bioreactor showed an increase of 70 % in the k_La for the same gas flow rate. The new bioreactor also developed higher k_La with lower agitation speed ($< 90 \text{ rpm}$). No difference was observed in the growth of *Eschscholtzia californica* in two parallel cultures. However, the old bioreactor required higher total and oxygen gas flow rates (over the limit of this project) to maintain dissolved oxygen level at 90 % air saturation. The higher gas flow rate caused excessive foam formation which resulted in early cessation of the culture in the old bioreactor. Study of k_La under actual culture conditions with similar numbers of plant cells showed a k_La two-fold greater in the new bioreactor configuration compared with the original.

The void fraction and the evolution of the bubble diameter were also studied to characterize the coalescence rate. A model was developed to predict the gas transfer in the 5 L bioreactor with a error lower than 20%. These results indicated that scale-up of the new bioreactor configuration is clearly possible. The same bubbling regime was essential to maintain high k_La . The model developed at the 5 L scale was used to predict the k_La at increasing scale. The model predicts that the maximum k_La will decrease with the scale-up of the bioreactor. This decrease was caused by higher average bubble diameter due to coalescence. The effectiveness of higher residence time of the bubbles with higher fluid levels, however, was cancelled by the decrease

of the interfacial area, the mass transfer coefficient k_L and the higher bubble rising velocity caused by higher average bubble diameter. Information on the actual coalescence rate at higher liquid level and the flow rates will be required before using this model to start construction of new bioreactor of greater volume.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	iv
RÉSUMÉ	vi
ABSTRACT	ix
TABLE DES MATIÈRES	xii
LISTE DES TABLEAUX	xv
LISTE DES FIGURES	xvi
LISTE DES SYMBOLES.....	xix
LISTE DES ANNEXES.....	xxii
1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Problématique.....	1
1.2 Objectifs.....	3
2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
2.1 L'industrie pharmaceutique du 21 ^e siècle	4
2.2 La culture de cellules végétales en suspension	6
2.2.1 Culture en suspension	6
2.2.2 Comportement rhéologique.....	7
2.2.3 Sensibilité au cisaillement	8
2.2.4 Demande gazeuse.....	10
2.3 Système de culture en bioréacteur.....	11
2.3.1 Gazéosiphon	11
2.3.2 Caisson rotatif.....	12
2.3.3 Bioréacteurs agités mécaniquement.....	13
2.4 Technologie d'aération.....	14
2.4.1 L'aérateur de surface.....	15
2.4.2 Orifices statiques.....	16
2.4.3 Membrane	17
2.4.4 Diffuseur poreux	20

2.5	Transfert gazeux	25
2.5.1	Formation des bulles	25
2.5.2	Régions et régimes d'écoulement de bulles	29
2.5.3	Coalescence et bris des bulles	31
2.5.4	Rétention gazeuse.....	32
2.5.5	Coefficient de transfert gazeux	35
2.6	Paramètres de transfert gazeux en bioréacteur	39
2.6.1	Rapport géométrique du bioréacteur.....	39
2.6.2	Débit gazeux	40
2.6.3	Agitation	41
2.6.4	Viscosité.....	42
2.6.5	Milieu	43
2.7	Mise à l'échelle.....	45
2.7.1	Rapport géométrique.....	46
2.7.2	Agitation	47
2.7.3	Aération	48
3.0	MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE.....	50
3.1	Transfert gazeux	50
3.1.1	Montages expérimentaux.....	50
3.1.2	Mesure de la rétention gazeuse	53
3.1.3	Mesure du diamètre des bulles	54
3.1.4	Calcul de l'aire interfaciale.....	55
3.1.5	Mesure du $k_L a$	57
3.2	Mélange	58
3.2.1	Mesure des temps de mélange	58
3.2.2	Description des suspensions modèles.....	59
3.3	Cisaillement	60
3.4	Cultures de cellules végétales en suspension	61
3.4.1	Lignée cellulaire	61
3.4.2	Analytique	61

4.0	ÉTUDES DES PARAMÈTRES DE CONCEPTION.....	63
4.1	Technologie d'aération.....	63
4.1.1	Choix de la technologie.....	63
4.1.2	Porosité du diffuseur	64
4.1.3	Rapport géométrique du bioréacteur.....	66
4.1.4	Rapports géométriques de l'hélice	69
4.1.5	Cisaillement	73
4.1.6	Présence de chicanes	79
4.1.7	Débit d'aération	86
4.1.8	Vitesse d'agitation	88
4.1.9	Comparaison des différents effets.....	90
4.1.10	Viscosité de la suspension.....	93
4.2	Modélisation de l'aération.....	94
4.2.1	Rétention gazeuse.....	94
4.2.2	Diamètre des bulles.....	96
4.2.3	Nombre de pores	99
4.2.4	Taux de coalescence	102
4.2.5	Modèle	105
5.0	CONCEPTION DU BIORÉACTEUR DE 5 L	114
5.1	Dimensionnement	114
5.2	Caractérisation	117
5.3	Validation en culture.....	119
6.0	MISE À L'ÉCHELLE DU BIORÉACTEUR.....	128
7.0	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS.....	131
7.1	Optimisation du bioréacteur	131
7.2	Caractérisation et validation en culture.....	132
7.3	Mise à l'échelle.....	133
	BIBLIOGRAPHIE	134
	ANNEXES.....	156

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 2.1 : $k_L a$ obtenus selon l'aérateur	23
Tableau 2.2 : Modèles empiriques pour la formation des bulles	28
Tableau 2.3 : Limites des régimes de formation des bulles pour un orifice	29
Tableau 2.4 : Limites des régimes de formation des bulles pour un orifice	30
Tableau 2.5 : Critères de mise à l'échelle	46
Tableau 2.6 : Effets des critères de mise à l'échelle	47
Tableau 3.1 : Dimensions des réservoirs	50
Tableau 3.2 : Relations utilisées pour le calcul du diamètre des bulles	56
Tableau 4.1 : Vitesse d'agitation en fonction du rapport H/D	66
Tableau 4.2 : Modalité du plan expérimental pour la simulation sur le bioréacteur virtuel de 5 L	75
Tableau 4.3 : Principaux résultats de simulation du bioréacteur virtuel de 5 litres	75
Tableau 4.4 : Configuration de la nouvelle hélice hélicoïdale	83
Tableau 5.1 : Dimension du bioréacteur, de l'agitateur et des chicanes	115

LISTE DES FIGURES

Figure 3.1. Dimensions d'un réservoir	51
Figure 3.2. Montage expérimental	52
Figure 3.3. Dimension d'une bulle	55
Figure 4.1. Diamètre des bulles mesurées à l'orifice selon de diamètre de l'orifice dans l'eau	64
Figure 4.2. $k_L a$ dans l'eau en fonction de la porosité du diffuseur	65
Figure 4.3. $k_L a$ dans l'eau en fonction du rapport géométrique des réservoirs	67
Figure 4.4. Temps de mélange en fonction du rapport géométrique des réservoirs....	68
Figure 4.5. $k_L a$ en fonction des rapports géométriques de l'hélice W/d et P/d pour une suspension de résine (400g/L)	70
Figure 4.6. Temps de mélange en fonction des rapports géométriques de l'hélice W/d et P/d pour une suspension d'agar (400 g M.H./L)	71
Figure 4.7. $k_L a$ selon le type d'hélice utilisée dans l'eau	71
Figure 4.8. Temps de mélange dans l'eau selon le type d'hélice utilisée.....	72
Figure 4.9. Résultats des simulations pour le bioréacteurs de 3 L.....	74
Figure 4.10. Surface de cisaillement en fonction de la vitesse d'agitation (rpm) et de l'entrefer (mm).....	76
Figure 4.11. $k_L a$ dans l'eau et la résine (400 g/L) en fonction de l'entrefer	77
Figure 4.12. $k_L a$ dans l'eau et l'agar (400 g M.H./L) en fonction de l'entrefer.....	78
Figure 4.13. Temps de mélange avec le ruban simple et le ruban double (entrefer de 10 mm)	78
Figure 4.14. $k_L a$ mesuré dans l'eau selon le type d'hélice	80
Figure 4.15. Temps de mélange mesurés dans l'agar (400 g M.H./L) selon le type d'hélice	81
Figure 4.16. $k_L a$ mesuré selon le type d'hélice	82
Figure 4.17. $k_L a$ mesuré dans l'eau en fonction de la profondeur des chicanes	83
Figure 4.18. Temps de mélange mesurés en fonction de la profondeur des chicanes	84

Figure 4.19. $k_L a$ mesuré dans l'eau en fonction de la distance par rapport aux chicanes	85
Figure 4.20. Temps de mélange mesurés en fonction de la distance par rapport aux chicanes	85
Figure 4.21. $k_L a$ mesuré dans l'eau en fonction du débit	86
Figure 4.22. Temps de mélange mesurés en fonction du débit d'aération	87
Figure 4.23. $k_L a$ mesuré dans l'eau en fonction de la vitesse d'agitation	88
Figure 4.24. Temps de mélange mesurés en fonction de la vitesse d'agitation	89
Figure 4.25. $k_L a$ et amélioration des différentes configurations du système	91
Figure 4.26. Temps de mélange dans l'agar (400 g M.H./L) et amélioration des différentes configurations du système	92
Figure 4.27. $k_L a$ mesuré dans une suspension de résine XAD-16 en fonction de la concentration	93
Figure 4.28. Rétention gazeuse mesurée en fonction du débit d'air	95
Figure 4.29. Rétention gazeuse mesurée en fonction de la vitesse d'agitation	95
Figure 4.30. Diamètre des bulles mesuré dans l'eau dans le haut de la colonne selon de débit volumétrique	97
Figure 4.31. Diamètre des bulles mesuré dans l'eau selon le débit volumique	98
Figure 4.32. Diamètre des bulles mesurées selon la vitesse d'agitation	98
Figure 4.33. Diamètre des bulles formées selon différents modèles en fonction du débit par orifice sous aucune agitation	100
Figure 4.34. Nombre de pores actifs selon la vitesse superficielle au diffuseur.....	101
Figure 4.35. Diamètre moyen des bulles mesuré en fonction de la hauteur de liquide dans l'eau	103
Figure 4.36. Taux de coalescence dans l'eau en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur	104
Figure 4.37. Facteur d'écoulement en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur.....	107
Figure 4.38. Évolution du k_L en fonction du diamètre de la bulle	109
Figure 4.39. Algorithme pour le calcul du diamètre moyen utilisé dans le modèle ...	111
Figure 4.40. $k_L a$ en fonction du débit.....	112

Figure 4.41. Erreur entre les k_La mesurés et les modèles du facteur d'écoulement .	113
Figure 5.1. Montage du bioréacteur.....	116
Figure 5.2 k_La dans l'eau en fonction du débit d'air.....	117
Figure 5.3. k_La dans l'eau en fonction de la vitesse d'agitation.....	118
Figure 5.4. Masse sèche et masse humide des cultures en bioréacteur	120
Figure 5.5. Croissance cellulaire dans chacune des cultures en bioréacteur	120
Figure 5.6. Taux de croissance et temps de division en masse humide des cultures en bioréacteur .	121
Figure 5.7. Taux de croissance et temps de division en masse sèche des cultures en bioréacteur .	121
Figure 5.8. Taux de croissance et temps de division cellulaire en cultures en bioréacteur.	122
Figure 5.9. Débits totaux et d'oxygène durant les cultures.....	123
Figure 5.10. Nombre de cellules en fonction du débit total nécessaire pour le maintien de la concentration d'oxygène dissous à 90 % de la saturation avec l'air....	124
Figure 5.11. Rapport des k_La en culture.....	126
Figure 6.1. Évolution du k_La dans l'eau lors de la mise à l'échelle du bioréacteur développé	128
Figure 6.2. Évolution des kLa lors de la mise à l'échelle du bioréacteur de 150 L	129

LISTE DES SYMBOLES

a	Aire interfaciale spécifique (m^{-1})
$C_{\text{O}_2 \text{ gaz}}$	Concentration d'oxygène dans la phase gazeuse (mmol L^{-1})
$C_{\text{O}_2 \text{ liquide}}$	Concentration d'oxygène dissous dans la phase liquide (mmol L^{-1})
d	Diamètre de l'hélice (mm)
d_b	Diamètre d'une bulle (mm)
d_o	Diamètre de l'orifice (mm)
d_{bmo}	Diamètre des bulles mesuré à l'orifice (mm)
D	Diamètre du réservoir (mm)
D_{O_2}	Coefficient de diffusion de l'oxygène dans l'eau à 25°C ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
D_{CO_2}	Coefficient de diffusion du gaz carbonique dans l'eau à 25°C ($\text{m}^2 \text{s}^{-1}$)
g	Accélération gravitationnelle (9.8 m s^{-2})
h	Hauteur d'une bulle (mm)
H	Hauteur de liquide (mm)
k_L	Coefficient de transfert de masse gaz-liquide (m s^{-1})
$k_L a$	Coefficient de transfert volumique (h^{-1})
l	Largeur d'une bulle (mm)
m	Indice de consistance de la loi de puissance ($\text{Pa s}^{(n+1)}$)
$M.H.$	Masse humide (g L^{-1})
$M.S.$	Masse sèche (g L^{-1})
n	Indice du comportement en écoulement de la loi de puissance
n_{bm}	Nombre de bulles mesurées

n_{pores}	Nombre de pores actifs
$n_{\text{bulle/pores}}$	Nombre de bulles formées par pores actifs
N	Vitesse d'agitation (rpm)
OUR	Taux d'assimilation d'oxygène global d'une culture (mmol h^{-1})
P	Pas de l'hélice (mm)
q_{O_2}	Taux de respiration spécifique (mmol h^{-1})
Q	Débit volumétrique d'air au travers de la plaque poreuse (L min^{-1})
Q_{go}	Débit de gaz à l'orifice ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$)
Re	Nombre de Reynolds ($\rho v d / \mu$)
Rq	Quotient respiratoire ($\text{mmol CO}_2 \text{ mmol O}_2^{-1}$)
t_e	Temps de réponse de la sonde (s)
t_m	Temps de mélange (s)
t_{res}	Temps de résidence des bulles dans la phase liquide (s)
T_{coa}	Taux de coalescence
va_b	Vitesse ascensionnelle des bulles (m s^{-1})
$V_{\text{aéré}}$	Volume de liquide pendant l'aération (L)
V_g	Volume de gaz dans le réservoir (L)
V_L	Volume de liquide dans le réservoir (L)
v_{sg}	Vitesse superficielle du gaz dans le réservoir (m s^{-1})
v_{gd}	Vitesse superficielle du gaz au diffuseur (m s^{-1})
W	Largeur de la pale (mm)
x_c	Concentration cellulaires (millions de cellules ml^{-1})
x_d	Biomasse sèche (g L^{-1})

X_w	Biomasse humide (g L^{-1})
ε	Rétention gazeuse
μ_L	Viscosité de la phase liquide (Pa s)
ρ_L	Masse volumique de la phase liquide (kg m^{-3})
σ	Tension de surface de la phase liquide (N m^{-1})
η	Viscosité (Pa s)
γ	Taux de cisaillement (s^{-1})

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A : COMPOSTION DU MILIEU B5	157
ANNEXE B : COURBE DE CALIBRATION POUR LA MESURE DU DIAMÈTRE DES BULLES	159
ANNEXE C : DISTRIBUTION EN NOMBRE DES BULLES	162
ANNEXE D : DIMENSIONS ET RAPPORT GÉOMÉTRIQUE DU RUBAN HÉLICOÏDAL DU BIORÉACTEUR DE 3 L ET MISE À L'ÉCHELLE GÉOMÉTRIQUE	165
ANNEXE E : PHOTOGRAPHIE DES HÉLICES UTILISÉES.....	167
ANNEXE F : CARTES DE CISAILLEMENT DES SIMULATIONS DU BIORÉACTEUR DE 3 L	169
ANNEXE G : CARTES DE CISAILLEMENT DES SIMULATIONS DU BIORÉACTEUR DE 5 L	172
ANNEXE H : PHOTOGRAPHIE D'UNE POPULATION DE BULLES.....	177

1. INTRODUCTION

Les plantes ont depuis longtemps été utilisées pour leurs propriétés médicinales. Elles montrent un potentiel évident pour la découverte de produits pharmaceutiques. De nos jours, les plantes produisent plus de 20 000 composés, incluant les pharmaceutiques, les pigments et les autres éléments de chimie fine, ce qui est plus de 4 fois de ce qui est obtenu avec les bactéries. (Zhong et coll., 1995). Beaucoup de composés d'origine végétale d'intérêts commerciaux sont généralement complexes, non-protéiniques et sont habituellement générés par le métabolisme secondaire des cellules végétales (Shuler et coll., 1992). Ils ne peuvent pas être synthétisés par les bactéries et leur synthèse chimique n'est généralement pas une alternative rentable.

Traditionnellement, les plantes entières sont cultivées et les molécules d'intérêts sont ensuite extraites de la biomasse naturelle. Cette technique d'approvisionnement rend souvent le procédé économiquement non-viable, notamment à cause des faibles quantités de phytochimiques (molécules possédant une activité chimique et produites par les plantes) que contiennent les plantes à l'état naturel. Le meilleur exemple est la production du Taxol™. Le Taxol™ provient de l'if (espèce *Taxus*) et est utilisé dans le traitement d'un certain nombre de cancer (Shuler et coll., 1992). Pour obtenir 1 kg de taxol, 30 tonnes de biomasse naturelle doivent être recueillies. Les longs temps de croissance de ces arbres, jumelés à une demande croissante de Taxol™, nécessitent d'autres moyens d'approvisionnements plus rapides et plus efficaces. La culture en suspension de cellules végétales est la seule alternative permettant de subvenir à la demande croissante de ce phytochimique.

1.1 Problématique

Les métabolites secondaires sont généralement produits en faibles quantités par les plantes. Par conséquent, il est difficile de les obtenir en grandes quantités par la culture

de cellules végétales (Zhong et coll., 1995). La formation de métabolites secondaires par les cellules de plante est dépendante de l'expression des gènes qui contrôlent la production. Ces gènes sont influencés par les conditions physiologiques de la cellule et son environnement (Leckie et coll., 1990). La stimulation du mécanisme de défense des plantes suite à une attaque biologique d'un organisme pathogène (élicitation) permet d'augmenter les rendements de phytomolécules produites (Aubry, 1994).

La commercialisation des technologies développées pour la culture de cellules végétales à l'échelle de laboratoire est limitée par des difficultés d'ordres biologiques et technologiques (Kieran et coll., 1997). Hsiao (1999) a estimé un prix requis de vente de 1000\$ à 5000\$/kg pour des phytomolécules (molécules provenant de cellules végétales) afin qu'un procédé à base de cellules végétales soit rentable. Coelho (2000) rapporte trois moyens d'augmenter la productivité du procédé : 1) réduire le temps de culture en augmentant le taux de croissance; 2) augmenter la concentration cellulaire pour la production; 3) forcer le métabolisme des cellules à produire plus.

L'augmentation des taux de croissances est la première étape vers une meilleure production. Les travaux de Sirois (1997); (2000) et Coelho (2000) ont permis d'améliorer les taux de croissance et la concentration cellulaire. L'augmentation du nombre de cellules provoque cependant une augmentation de la consommation en oxygène ainsi qu'une augmentation de la viscosité qui réduit le transfert gazeux dans le bioréacteur. Le transfert d'oxygène est actuellement l'élément limitant la croissance cellulaire dans les bioréacteurs. Cette limitation empêche également la mise à l'échelle du procédé pour la culture de cellules végétales à haute densité.

La sensibilité des cellules végétales au cisaillement, la production de mousse par les polysaccharides et les protéines extra-cellulaires et la nécessité d'avoir une concentration contrôlée de CO₂ dissous (Fiset, 2000) font de l'augmentation de la vitesse d'agitation et du débit d'air des stratégies inefficaces pour assurer l'apport d'oxygène aux cellules. Le design d'un système d'aération efficace est primordial pour

transférer de l'oxygène aux cellules à haute densité à faible cisaillement et à de faibles débits gazeux.

1.2 Objectifs

L'objectif principal de ce projet est d'optimiser le design du bioréacteur à ruban hélicoïdal 5 L originalement développé par Jolicoeur (1990) afin de permettre un transfert d'oxygène suffisant pour la culture de cellules végétales à haute densité cellulaire en cuvée alimentée. Le projet vise le développement d'une technologie d'aération efficace permettant d'atteindre un coefficient de transfert d'oxygène (k_La) de 25 h^{-1} dans l'eau à un débit maximal de 0.05 vvm et une vitesse d'agitation de 60 rpm. Les rapports géométriques du bioréacteur et du ruban hélicoïdal ainsi que la présence de chicanes de surface seront également étudiés afin de maximiser le transfert gazeux et minimiser le cisaillement et le temps de mélange. La validation du nouveau bioréacteur en culture sera effectuée avec l'espèce *Eschscholtzia californica*. Une compréhension des phénomènes de transfert gazeux impliqués est aussi nécessaire afin de prédire les k_La aux différentes échelles. Le but ultime de ce projet est d'adapter la configuration du bioréacteur à une échelle de 150 L.

2. REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

2.1 L'industrie pharmaceutique du 21^e siècle

L'industrie pharmaceutique connaît des changements considérables depuis 5 à 10 ans. Les travaux portant sur la découverte du génome humain fourniront un nombre important de nouvelles cibles pour la découverte de nouvelles drogues (de 400 à ce jour, à plus de 10 000). En parallèle, l'amélioration du criblage moléculaire (High Throughput Screening systems) a permis de réduire le temps nécessaire à la découverte de nouveaux principes actifs.

Par conséquent, la recherche et la découverte de Nouvelles Entités Chimiques (NEC) avec une activité biologique sécuritaire, spécifique et efficace sont des préoccupations bien actuelles. Les molécules complexes non protéiniques provenant des micro-organismes, des plantes et des insectes sont perçues comme la source la plus abondante de NEC. En fait, 44 % des nouvelles drogues approuvées entre 1983 et 1994 étaient d'origine naturelle (Cragg et al., 1997).

Le succès dans l'industrie pharmaceutique des produits naturels provenant des plantes (phytochimiques) ne fait pas de doute. Le quart de toutes les prescriptions pharmaceutiques contiennent des composées d'origine naturelle. Actuellement, il existe plus de 120 drogues dérivées de plantes utilisées dans le monde entier. Verpoote rapporte qu'en 1995, 40 000 phytochimiques avaient été testés pour la découverte de nouvelles drogues (Verpoote, 1998). Le taux de succès approximatif pour la découverte de nouveaux principes actifs serait donc de 1 NEC découvert par 300 phytochimiques testés. Ce taux est largement supérieur aux molécules obtenus par synthèse chimique (1 NCE par 10 000 entités testées). Cet estimé montre l'énorme potentiel des phytochimiques pour la découverte de NEC, spécialement lorsque l'on considère que moins de 8 % des 300 000 espèces du domaine végétal ont été étudiés, souvent partiellement, pour leur potentiel thérapeutique.

En réalité, le potentiel des phytochimiques est déjà reconnu par l'industrie pharmaceutique. Cependant, l'accès à ces phytochimiques est problématique :

- Les rendements (< 0.01-5 % de la biomasse sèche) et les taux de production sont faibles;
- La plupart des banques de molécules naturelles pour la découverte de nouvelles drogues sont composées d'extraits contenant des centaines de molécules, complexes, avec des effets synergiques et antagonistes, ce qui signifie que l'utilisation d'extraits pour le criblage moléculaire (HTSS) n'est pas possible;
- L'extraction, la séparation et la purification des extraits de produits naturels sont des opérations complexes;
- La complexité des phytochimiques empêche la synthèse chimique facile de ces molécules ou leur clonage dans des micro-organismes.

Ces problèmes expliquent l'absence d'investissements massifs de l'industrie pharmaceutique pour la recherche de nouveaux phytochimiques actifs. La culture de cellules de plante *in vitro* présente plusieurs avantages pour la biosynthèse de phytochimiques d'intérêt pharmaceutique. Par contre, cette biotechnologie a échoué dans sa tentative de produire un accès illimité et reproductible de phytochimiques particuliers, séparés et purifiés.

La culture conventionnelle de cellules de plante présente plusieurs inconvénients :

- Les taux de croissance des cellules de plante sont faibles (temps de division > 24 à 72 h);
- Le métabolisme secondaire est difficile à induire;
- Les taux de production sont faibles (< 100 mg/L en 7 à 14 jours);
- Les taux de production diminuent avec la mise à l'échelle.

Par contre, durant les dernières 15 années, le Dr. Archambault et ses associés ont développé de nouvelles approches de culture de cellules de plante qui rendent l'utilisation de cette biotechnologie viable. Cette technologie permet d'atteindre une production de 3 000 mg/L de métabolites en 5 à 10 jours de culture en bioréacteur (résultats non publiés).

L'optimisation du bioréacteur utilisé pour la culture de cellules végétales est la première étape d'un projet de mise à l'échelle de ces technologies et ce, dans le but d'assurer un approvisionnement suffisant pour la recherche de nouveaux principes actifs.

2.2 La culture de cellules végétales en suspension

2.2.1 Culture en suspension

L'approche la plus directe pour augmenter la productivité volumétrique de métabolites secondaires est d'augmenter la densité cellulaire durant la production (Su et coll., 1990; Kim et coll., 1991). La culture de cellules de plante immobilisées comporte plusieurs difficultés, notamment au niveau du transfert de masse. La culture de cellules de plante en suspension est la seule solution pour la croissance à haute densité cellulaire.

Les cellules de plante croissent lentement. Les temps de doublement varient de 20 à 200 h (Sahai et Knuth, 1985). Elles ont habituellement un diamètre de 20 à 40 μm et une longueur de 100 à 200 μm (Sahai et Knuth, 1985; Ballica et Ryu, 1992). Leur croissance en suspension s'effectue en agrégats de plus de 200 cellules (Jolicoeur, 1990) de dimensions variant entre 40 et 2000 μm (Tanaka, 1982). Ces agrégats ont tendance à sédimenter. Leur dimension n'est pas stable et change tout au long de la culture. Ballica et Dewey (1993) et Sirois (2000) suggèrent que l'élongation soit reliée à

la disponibilité des nutriments. La distribution de la taille des agrégats peut aussi être une réponse de la culture à un facteur de l'environnement, notamment du degré d'agitation (Kieran et coll., 1998; Tanaka, 2000). Par conséquent, la gravité spécifique des agrégats de cellules varie avec l'âge de la culture et est généralement supérieure lors de la phase de croissance que lors de la phase stationnaire (Tanaka, 1982; Ballica et Ryu, 1992).

2.2.2 Comportement rhéologique

Les propriétés rhéologiques des suspensions de cellules végétales dépendent de la présence d'agrégats, de la concentration en biomasse et de la sécrétion de polysaccharides et de protéines extracellulaires (Zhong et coll., 1992). Des études de Tanaka (1982) et de Curtis et Emery (1993) sur plusieurs espèces montrent que la viscosité de la culture augmente lorsque la taille des agrégats diminue. Par contre, une étude de Zhong et coll. (1992) sur *Perilla frutescens* montre qu'il n'existe pas de relation directe entre la grosseur des amas cellulaires (entre 75 et 500 μm) et la viscosité de la culture. Une revue de Kieran et coll. (1997) rapporte plutôt que la viscosité apparente est fortement dépendante de la concentration en biomasse humide. L'étude de Curtis et Emery (1993) montre également que le milieu de culture ne devenait pas plus visqueux avec la sécrétion de polysaccharides par les cellules.

Curtis et Emery (1993) ont par ailleurs développé une relation générale pour exprimer la viscosité d'une suspension de cellules végétales en fonction de la fraction volumique de cellule :

$$\eta = \eta_{\text{solvant}} \cdot (1 + 2.5 \cdot \phi^2 + 10.05 \cdot \phi^2 + 247 \cdot \phi^3 + 2150 \cdot \phi^5) \quad (2.1)$$

où η est la viscosité apparente de la suspension et ϕ la fraction volumique de cellule. La viscosité apparente de la suspension cellulaire est pratiquement constante en dessous de 5 g M.S./L (Zhong et coll., 1992). Sous cette concentration, la plupart des

suspensions cellulaires montrent un comportement newtonien (Curtis et Emery, 1993; Zhong et coll., 1995). Les effets de la concentration de biomasse humide sur la viscosité sont visibles à partir de 12,8 g M.S./L (Zhong et coll., 1992). L'augmentation du volume par une élongation des cellules, mais non des amas cellulaires, confère un comportement non newtonien rhéofluidisant à la suspension (Curtis et Emery, 1993; Ballica et Ryu; 1993; Ballica et Dewey; 1993). La viscosité des suspensions de cellules de plante obéit à une loi de puissance de type :

$$\eta = m \cdot \gamma^{n-1} \quad (2.2)$$

où m est l'indice de consistance de la loi de puissance ($\text{Pa s}^{(n+1)}$), n est l'indice du comportement en écoulement de la loi de puissance, η est la viscosité (Pa s) et γ est le taux de cisaillement (s^{-1}). Plusieurs facteurs cellulaires comme la paroi et les propriétés de la membrane, la morphologie de la culture et la formation d'agrégats peuvent contribuer à la réponse viscoélastique de la suspension cellulaire (Ballica et Ryu; 1992). Les paramètres rhéologiques tel l'indice de consistance m et l'indice de puissance n sont fortement dépendants du micro-organisme cultivé, de l'âge de la culture (Gavrilescu et Roman, 1994) et de la différence de taille entre les agrégats (Tanaka, 1982). Jolicoeur et coll. (1992) montrent une augmentation de m de 0,2 à 0,9 et une diminution de n de 0,8 à 0,1 lors de la culture de cellules de *Catharanthus roseus*.

2.2.3 Sensibilité au cisaillement

Les cellules de plante sont sensibles au cisaillement causé par le stress hydrodynamique de l'agitation mécanique et de l'aération de la culture (Tanaka et coll., 1983; Sahai et Knuth, 1995). Le cisaillement au-dessus d'un certain seuil critique réduit la viabilité cellulaire, la masse cellulaire et la production de métabolites secondaires (Zhong et coll., 1995). La sensibilité au cisaillement des cellules végétales a été attribuée à la grosseur des cellules (10 à 200 μm) (Shibasaki et coll., 1992; Scragg, 1995; Joshi et coll., 1996), à la présence d'une paroi cellulosique rigide (Merchuk,

1991; Ballica et Ryu, 1992; Zhong et coll., 1995; Scragg, 1995; Joshi et coll., 1996), à la présence de larges vacuoles (Su et Humphrey, 1990; Zhong et coll., 1995; Scragg, 1995) et au degré d'agrégation (Joshi et coll., 1996). Le degré de sensibilité des différentes souches étudiées peut également être dû à la différence des conditions expérimentales telle que l'historique de la cellule, le nombre de passages dans la zone de cisaillement, l'âge de la culture et son statut nutritionnel (Joshi et coll., 1996).

La réponse d'un système biologique à un environnement hydrodynamique dépend de la durée et de l'intensité du stress ainsi que des propriétés physiologiques des cellules (Kieran et coll., 1997). La tolérance au cisaillement n'est pas une caractéristique fixe de la lignée cellulaire mais peut être développée durant la culture sous des conditions de cisaillements (Merchuk, 1991). Par contre, le changement dans la composition de la membrane cellulaire peut affecter les cinétiques de croissance et la perméabilité des nutriments dans la cellule (Merchuk, 1991).

Des études de Joshi et coll. (1996) et de Kieran et coll. (1997) sur des suspensions de cellules de *Morinda citrifolia* ont montré une sensibilité au cisaillement entre 25 et 350 N/m². Pareilleux (1987) parle d'une limite d'adhésion de 200 N/m² au-delà de laquelle la cohésion des cellules entre elles n'est plus assurée. La sensibilité de la cellule végétale au cisaillement n'a pas vraiment été étudiée (Joshi et coll., 1996). Ballica et Ryu (1992) rapportent des taux de cisaillement maximal de l'ordre de 20-200 s⁻¹ pour des suspensions de cellules de plante en bioréacteurs agités sans baisse de la viabilité.

Tanaka (2000) a étudié la sensibilité au cisaillement de *Cudrania tricuspidata* en flacons agités. Il a remarqué qu'une augmentation de la vitesse d'agitation conduit à une diminution en nombre des agrégats de plus 991 µm et une augmentation en nombre des agrégats plus petits. Namdev et Dunlop (1995) suggèrent aussi que le cisaillement contrôle le bris des agrégats. Les mécanismes de dommage aux cellules demeurent cependant inconnus (Joshi et coll., 1996; Dey et coll., 1997).

2.2.4 Demande gazeuse

L'effet des concentrations d'oxygène dissous et de CO₂ dissous sur la croissance a été étudié (Fiset, 2000). Celles-ci ont une influence profonde sur la croissance et sur la concentration totale de métabolites produits (Zhao et coll., 2001; Fiset, 2000). Ballica et Ryu (1993) de même que Ballica et Dewey (1993) montrent que le taux d'aération doit être optimisé pour une croissance et une production maximale de métabolites :

$$\frac{dC_{O_2 \text{ liquide}}}{dt} = k_L a (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}}) - q_o x_c \quad (2.3)$$

où $C_{O_2 \text{ liquide}}$ est la concentration d'oxygène dans le liquide (mmol L⁻¹), $C_{O_2 \text{ gaz}}$ est la concentration d'oxygène dans la phase gazeuse (mmol L⁻¹), q_o est la respiration cellulaire (mmol cellules⁻¹ h⁻¹) et x_c est la concentration cellulaire (cellules L⁻¹). La concentration d'oxygène et de dioxyde de carbone dissous sont dépendantes du $k_L a$. Il existe une valeur minimale de $k_L a$ sous laquelle la croissance est inhibée (Kieran et coll., 1997).

Le même bilan peut s'effectuer avec le gaz carbonique. La relation entre les coefficients de transfert volumique est montrée par les équations (2.4) et (2.5) (Guell et Giralt, 1994) :

$$k_L a_{O_2} = k_L a_{CO_2} \left(\frac{D_{O_2}}{D_{CO_2}} \right)^{0.5} \quad (2.4)$$

$$k_L a_{CO_2} \cong 0.78 \cdot k_L a_{O_2} \quad (2.5)$$

L'oxygène n'est pas très soluble dans les solutions aqueuses. Dans l'eau pure à 25°C, la solubilité de l'oxygène est de 7,8 mg/L. Dans les milieux de culture, elle est

habituellement inférieure, soit 6,0 – 6,5 mg/L selon la composition de la phase liquide (Schneider et coll., 1995). L'enrichissement de l'air en oxygène est une stratégie qui permet de réduire le débit de gaz nécessaire à la culture (Jolicoeur, 1990; Schlatmann et coll., 1993; Sucker et coll., 1994; Hsiao et coll., 1999). La concentration critique d'oxygène dissous (valeur en dessous de laquelle l'arrêt de la croissance a été observée) est de 15 à 20% de la saturation en air (Kieran et coll., 1997). Shibasaki et coll. (1992) remarquent que lorsque la concentration en oxygène atteint 40 %, la croissance est augmentée. Des travaux de Fiset (2000) avec *Eschscholtzia californica* portant sur l'effet de l'environnement gazeux sur la croissance de cellules de plante en suspension montrent une croissance maximale à une concentration d'oxygène dissous de 120 % de la saturation en air. Il observe un rendement maximal des principaux nutriments consommés (NO_3 , NH_4 et glucose) à cette valeur.

Fiset (2000) montre également que l'effet de la concentration de dioxyde de carbone dissous est davantage liée à son contrôle qu'à son niveau. Il observe que les cultures effectuées à des niveaux de CO_2 dissous différents mais contrôlés montrent des taux de croissance supérieurs aux taux de croissance effectués sans contrôle. Il recommande une concentration de CO_2 dissous de 4 %.

2.3 Système de culture en bioréacteur

2.3.1 Gazéosiphon

Les caractéristiques principales des cellules de plante (ex : sensibilité au cisaillement, forte viscosité à haute densité et croissance sur les parois initiée par la flottation des cellules causée par les polysaccharides) sont des problèmes pour la culture en bioréacteur (Su et Humphrey, 1989). Le principal avantage du gazéosiphon est sa simplicité (Haque et coll., 1986; Merchuk et coll., 1994). La simplicité mécanique est particulièrement importante lorsque la stérilité doit être maintenue pendant une longue

période. Le cisaillement développé dans la culture en suspension de cellules végétales avec un gazéosiphon est faible (Hegarty et coll., 1986; Kim et coll., 1991; Merchuk et coll., 1994). Wagner et coll. (1977) rapportent la croissance de *Catharanthus roseus* jusqu'à 28 g M.S./L pour ce type de bioréacteur.

Le principal désavantage des gazéosiphons est que l'agitation est couplée à l'aération (Merchuk et coll., 1994). L'aération ne peut être altérée sans avoir un effet sur le niveau d'agitation. De plus, les gazéosiphons ne sont pas efficaces pour de hautes densités cellulaires (>200 g M.H./L ou >10 M.S./L) (Petiard, 1987). Wagner et coll. (1977) ont observé des zones mortes en fin de culture causées par le manque d'agitation. Une augmentation du taux d'aération dans le but d'augmenter l'efficacité de mélange peut conduire à un dégazage du CO₂ en plus de produire un taux élevé de production de mousse. La circulation périodique des cellules d'une section hautement aérée à une section faiblement aérée peut également affecter le métabolisme des cellules (Pollard et coll., 1996).

2.3.2 Caisson rotatif

Le principal avantage du bioréacteur à caisson rotatif est le faible taux de cisaillement développé par la vitesse d'agitation nécessaire au mélange de la suspension (Shibasaki et coll., 1992). Il permet également d'éviter l'attachement des cellules de plante à la paroi du bioréacteur (Shibasaki et coll., 1992). Shibasaki et coll. (1992) ont proposé un nouveau système d'aération utilisant un filtre poreux de 0,2 µm afin de favoriser le transfert gazeux. À des conditions identiques d'opération, les croissances observées dans le bioréacteur à caisson rotatif ont été supérieures à celles observées dans un gazéosiphon (Shibasaki et coll., 1992). Dans une étude comparative, Tanaka et coll. (1983) mentionnent que le bioréacteur à caisson rotatif est supérieur au bioréacteur agité au moyen d'une hélice « *flat-blade turbine* » à quatre pâles pour sa capacité à fournir de l'oxygène à haute viscosité et à faible cisaillement.

Le principal désavantage du bioréacteur à caisson rotatif est la complexité des pièces mécaniques nécessaires à sa construction et à son opération. L'efficacité de mélange est également contrôlée par le rapport volume de culture/volume du bioréacteur. Shibasaki et coll. (1992) suggèrent un rapport de 2:7. Ce rapport pose un problème majeur pour une mise à l'échelle du bioréacteur.

2.3.3 Bioréacteurs agités mécaniquement

Ces bioréacteurs sont efficaces pour mélanger des suspensions de solides (Arjunwadkar et coll., 1998). L'agitation est nécessaire afin de garder la matière solide en suspension et assurer un environnement homogène pour un apport adéquat des nutriments (van't Riet et Tramper, 1991). Le cisaillement et le temps de mélange des bioréacteurs agités sont principalement fonction du type d'hélice utilisé. Le transfert de masse est alors contrôlé par la puissance dissipée par l'agitateur.

Les hélices de type « Ruhston » et marine ne sont pas efficaces pour mélanger des fluides visqueux. Elles nécessitent de hautes vitesses d'agitation et développent un fort cisaillement local. Kim et coll. (1991) ont utilisé une modification du « cell-lift impeller » pour la culture de cellules végétales en mode perfusion. Le « cell-lift impeller » favorise le mélange à faible cisaillement et procure un bon transfert de masse. La culture de *Thalictrum rugosum* avec cette hélice sans grillage a permis d'atteindre 26 g M.S./L. en mode perfusion. Par contre, l'étude ne mentionne pas le taux d'aération ni le $k_L a$ développé par ce système.

D'autres types de systèmes pour la culture de cellules végétales ont été développés. Fukui et Tanaka (1995) ont utilisé un film de fluorocarbène comme paroi pour la culture de *Lithospermum erythrorhizon* sur un agitateur giroscopique. Le film est perméable à l'oxygène. Le transfert d'oxygène est fonction de l'épaisseur du film. La nécessité d'avoir une épaisseur de film de l'ordre du micron est problématique pour une mise à l'échelle de la technologie. Hsiao et coll. (1999) utilisent un film de polypropylène qui

n'est pas perméable à l'oxygène pour la culture de *Hyoscyamus muticus* dans un bioréacteur de 40 L. L'utilisation d'une paroi flexible permet la stérilisation d'un bioréacteur de grand volume dans un autoclave de petite dimension. Lors de la culture, la paroi repose sur un support fixe. L'air est apporté par un bulleur dans le fond du bioréacteur. Hsiao et coll. (1999) n'utilisent cependant pas d'agitateur mécanique, ce qui facilite énormément l'utilisation de cette technologie.

Les travaux de Jolicoeur (1990) sur la conception d'un bioréacteur ont montré l'efficacité de l'agitateur à double ruban hélicoïdal pour la culture de cellules végétales. Une culture de *Catharanthus roseus* a atteint une masse de 450 g M.H./L (25 g M.S./L) en utilisant l'aération de surface uniquement. Ce double ruban hélicoïdal nécessite de faibles vitesses d'agitation (< à 60 rpm) pour la mise en suspension des cellules dans le bioréacteur, ce qui génère de faibles taux de cisaillement. En utilisant une aération à l'aide d'un bulleur à la base de ce bioréacteur, Sirois (1997) et Coelho (2000) ont atteint une concentration de plus de $20 \cdot 10^9$ cellules/L pour une biomasse humide de plus de 300 g M.H./L. avec *Eschscholtzia californica*. Des travaux de Sifi (1999) dans un bioréacteur de 3 L sur la croissance de *Eschscholtzia californica* avec un ruban hélicoïdal double et un ruban simple montrent des taux de croissance supérieurs pour le ruban simple. Sifi (1999) n'a pas remarqué de différence pour le transfert gazeux entre les deux types de rubans et explique plutôt ces résultats par une diminution du cisaillement. En conclusion, seul le ruban hélicoïdal a permis la culture à haute densité de cellules végétales.

2.4 Technologie d'aération

La plupart des bioréacteurs utilisés pour la culture de cellules de plante sont dérivés de ceux utilisés pour la culture de bactéries (Zhong et coll., 1995). La formation de mousse, le dégazage de dioxyde de carbone, la haute viscosité des cultures et la sensibilité au cisaillement des cellules végétales nécessitent la conception de systèmes

d'aération différents pour ce genre de culture en suspension. Le meilleur système gazeux génère une dispersion efficace des bulles, une haute rétention gazeuse et montre un k_La maximal (Birch et Ahmed, 1996).

2.4.1 L'aérateur de surface

L'aération de surface consiste à transférer de l'oxygène par la surface du liquide. L'oxygène pénètre le liquide par le transfert de masse au travers de la surface non brisée à l'interface gaz-liquide (Ju et Armiger, 1990) et par l'entraînement mécanique des bulles dans le vortex créé à la surface (Chapman et coll., 1990).

Kamen et coll. (1993) rapportent un k_La de 1.4 h^{-1} pour un BDRH (bioréacteur à double ruban hélicoïdal) de 3 L avec chicane et une agitation de 75 rpm. Le coefficient de transfert augmente à $1,8 \text{ h}^{-1}$ pour le BRH de 11 L avec les mêmes conditions. Jolicoeur et coll. (1992) rapportent un k_La de 19 h^{-1} à une agitation de 120 rpm pour un BDRH de 11 L avec chicanes. Le taux d'aération de surface augmente rapidement en augmentant l'agitation (Chapman et coll., 1990; Mano et coll., 1990; Jolicoeur et coll., 1992). Jolicoeur et coll. (1992) soulignent l'importance de la présence des chicanes de surface pour ce type d'aération. Aunins (1989) suggère le positionnement de l'hélice près de la surface pour augmenter l'efficacité de transfert. Jolicoeur et coll. (1992) proposent aussi d'augmenter la pression partielle d'oxygène dans la tête du bioréacteur afin d'accroître le transfert d'oxygène. Pour sa part, Hu et coll. (1986) soulignent que l'aération de surface ne cause pas de production de mousse.

L'importance de l'aération de surface diminue rapidement lorsque des bulles sont entraînées dans le liquide (Chapman et coll., 1990). Jolicoeur (1990) remarque que l'aération de surface représente 20 % de l'oxygénation totale pour une vitesse d'agitation d'environ 120 rpm. Chapman et coll. (1990) rapportent que certains auteurs ont trouvé que le k_La de surface (sans entraînement de bulles) représente 60 % du taux de transfert total. Son étude montre plutôt que la contribution de l'aération de

surface n'est jamais supérieure à 20 % du transfert total et est généralement inférieure à 5 %.

La mise à l'échelle de l'aération de surface est problématique. L'aération de surface est limitée par le rapport surface/volume de culture (Mano et coll., 1990; Sucker et coll., 1994). Des études de Fuchs et coll. (1978) de même que Chapman et coll. (1990) concluent que la contribution de l'aération de surface sur le coefficient de transfert total diminue lorsque l'échelle du bioréacteur augmente.

2.4.2 Orifices statiques

Ce type d'aérateur comprend les orifices simples (Motarjemi et Jameson, 1978), les plaques perforées (Thorat et coll., 1978; Grevskott et coll., 1996) et les diffuseurs annulaires (Khare et Niranjana, 1995; Pollard et coll., 1996). De tous les systèmes d'aération, l'orifice simple est le plus facile à concevoir et à caractériser (Rooney et Huibregtse, 1993). Les trous varient généralement de 0,343 mm (plus petit trou mécaniquement possible selon Weber et coll. (1990)) à 2 mm de diamètre.

Le volume des bulles produites par les aérateurs simples est élevé. Le diamètre des bulles varie en fonction du diamètre de l'orifice et est généralement entre 1 mm et 7 mm (Heijnen et van't Riet, 1984; Pollard et coll., 1996). Les k_La obtenus sont faibles, généralement inférieure à 2 h^{-1} pour un débit de 0.04 vvm. Gavrilescu et Roman (1994) ont étudié la diminution du k_La selon l'âge d'une culture pour un orifice simple de 3mm. Ils obtiennent initialement un k_La variant entre 14 et 30 h^{-1} pour un débit de 9.5 L/min (0.8 vvm). Ces résultats concordent avec les travaux de Kastanek et coll. (1980) sur les plaques perforées. Ce dernier a trouvé un k_La de 14 h^{-1} avec une plaque perforée (trous de 1,6 mm de diamètre) avec une aération de 5,3 L/min (0,5 vvm). Andou et coll. (1996) proposent une relation entre le k_La (s^{-1}) et la rétention gazeuse (ε).

$$k_La = 1.24 \cdot 10^{-1} \varepsilon^{0.23} \quad (2.6)$$

Fraser (1983) et Modaressi (1997) proposent un aérateur rotatif de 6 orifices de 1 mm de diamètre installé dans le fond d'une colonne à bulle. Leurs études sur un gazéosiphon montrent la production de bulles de diamètre plus petites. Le diamètre de Sauter des bulles passe de 5 mm à moins de 1 mm lorsque la vitesse du diffuseur augmente de 0 à 350 rpm. La rotation du diffuseur augmente significativement la rétention gazeuse. Ce type de diffuseur n'a cependant jamais été utilisé en culture de cellules.

Fregapane (1999) utilise l'injection d'air et de liquide sous pression afin de générer de fines bulles dans le fond d'un bioréacteur de 100 L pour la culture d'une espèce bactérienne. Il rapporte des $k_L a$ de 70 h^{-1} à 170 h^{-1} pour des débits variant entre 4,5 à 17,5 L/min (3.7 à 15 vvm sans agitation). Ce système développe cependant un fort cisaillement localisé à l'entrée d'air et de liquide. L'introduction de liquide ne convient pas à l'opération en mode cuvée avec des ajouts inférieurs à 100 ml par jour. Les débits d'aération élevés nécessaires à son application rendent cette technologie difficilement applicable à la culture de cellules végétales.

2.4.3 Membrane

L'aération par membrane comprend l'aération avec ou sans bulles. L'aération par membrane permet un meilleur contrôle du système car elle permet de découpler l'aération du mélange (Cote et coll., 1988). L'aération sans bulle est obtenue en utilisant un tube fait d'un matériau microporeux perméable à l'oxygène (Cote et coll., 1988). Les matériaux couramment utilisés sont le téflon (Mano et coll., 1990), le caoutchouc de silicone (Cote et coll., 1988; Su et Humphrey, 1989; Winston et coll., 1992; Abdullah et coll., 2000), le fluorocarbène (Cote et coll., 1988; Fukui et Tanaka, 1995) et le polypropylène (Su et Humphrey, 1989; Moorhouse et coll., 1996). L'aération sans bulle est produite en plaçant un mince film d'un polymère synthétique entre le gaz

et le liquide, généralement en utilisant un tube qui parcourt la paroi intérieure du bioréacteur. Le transfert d'oxygène s'effectue par diffusion au travers du film sans créer de bulle (Mano et coll., 1990). L'étape déterminante du transfert d'oxygène est le film aqueux entourant le tube (Mano et coll., 1990). Le transfert d'oxygène est donc largement influencé par les conditions hydrodynamiques du bioréacteur (Schneider et coll., 1995).

Mano et coll. (1990) rapportent des k_La de $0,72 \text{ h}^{-1}$ à $3,08 \text{ h}^{-1}$ pour un système utilisant un tube de teflon dans un bioréacteur de 6 L agité pour la culture de cellules de mammifères. Fukui et Tanaka (1995) rapportent une croissance de *Lithospermum erythrorhizon* jusqu'à 11 g M.S./L avec un film de fluorocarbène. Su et Humphrey (1991) rapporte une croissance de *Anchusa officinalis* jusqu'à 26 g M.S./L avec un système en polypropylène en mode perfusion. Par contre, il n'est nullement mention du k_La développé par chacun de ces systèmes.

L'aération sans bulle permet d'éviter la formation de mousse (Winston et coll., 1992; Abdullah et coll., 2000), le dégazage des composants volatils (Cote et coll., 1988), la flottation des cellules (Su et Humphrey, 1991; Winston et coll., 1992; Lu et coll., 1995) et le cisaillement causé par les bulles (Su et Humphrey, 1991; Winston et coll., 1992). Contrairement aux systèmes avec des bulles, la surface de transfert n'est pas affectée par l'augmentation de viscosité des cultures lors de la croissance (Su et Humphrey, 1991; Winston et coll., 1992). Su et Humphrey (1989) ont d'ailleurs observé que le k_La n'est pas affecté par la viscosité lorsque celle-ci est inférieure à 20 cp. Schneider (1995) recommande l'utilisation du teflon en raison de son inertie chimique et de sa surface hydrophobe qui prévient la croissance sur la surface du tube. L'oxygène est également très soluble dans le teflon. Le transfert ne s'effectue donc pas seulement par les pores.

Le principal désavantage de l'utilisation de cette technologie est l'accumulation de cellules entre les tubes. Abdullah et coll. (2000) ont remarqué que seulement 31 % des cellules de *Morinda elliptica* demeuraient dans la suspension à la fin de la culture.

L'utilisation de tubulure à l'intérieur du bioréacteur n'est pas simple et utilise de l'espace réservé pour la suspension cellulaire. Un support métallique est nécessaire afin de retenir le système de tubes (Schneider et coll., 1995) et peut ainsi créer des zones mortes. La pression de gaz doit être maintenue de façon à être sous le point de bullage. Au-delà de cette pression, Cote et coll. (1988) ont remarqué une réduction du transfert de masse par la formation de bulles demeurant attachées à la paroi du tube. Winston (1992) définit également une longueur limite concernant la longueur du tube. Au-delà de cette limite, le transfert d'oxygène n'augmente plus.

L'aération avec bulle s'effectue avec une membrane trouée. Durant son opération, le diffuseur membranaire se déforme sous l'action de la pression causant une ouverture des orifices (Weber et coll., 1990). La membrane s'autorégule, la grosseur des trous augmente lorsque la pression augmente (Poulsen et Iversen, 1998). Un plus grand nombre de trou produit de plus petites bulles (Weber et coll., 1990). Rice et coll. (1987) suggèrent un espacement entre chaque trou de façon à éviter la coalescence. Weber et coll. (1990) rapportent une diminution des bulles produites de 3,8 à 2,6 mm pour le diffuseur membranaire comparé au diffuseur rigide. Rice et coll. (1981) de même que Poulsen et coll. (1998) suggèrent que la formation de petites bulles est favorisée par le mouvement oscillatoire des trous de la membrane.

Deckwer et coll. (1982) rapportent de meilleurs k_La pour le diffuseur membranaire troué par rapport à la plaque perforée pour des vitesses superficielles du gaz allant jusqu'à 5 cm/s dans une solution de 0,7 % de CMC. Poulsen et coll. (1998) rapportent une valeur de k_La de 54 h⁻¹ pour un débit de 5 L/min (0,16 vvm) dans une colonne à bulle. Ils rapportent des résultats 2 fois meilleurs que pour une plaque perforée pour le même montage. Ce type d'aérateur a seulement été utilisé par Eriksen et coll. (1998) de même que Poulsen et coll. (1999) pour la culture de *Rhodomonas sp.* jusqu'à une concentration de 10×10^9 cellules/L. Il n'est cependant aucunement question du taux d'aération, ni du coefficient de transfert volumique développé par le système. Un changement de la méthode de stérilisation, passant de l'autoclave (Eriksen et coll.,

1998) à l'ozone (Poulsen et Iversen, 1999) laisse supposer une détérioration de la membrane sous des cycles de chaleur répétitifs. À la connaissance des auteurs, ils sont les seuls à utiliser ce système d'aération.

L'aérateur par membrane trouée présente l'avantage de prévenir le retour du liquide (Weber et coll., 1990; Poulsen et Iversen, 1998). Les orifices élastiques se referment lorsque l'alimentation d'air est arrêtée. D'ailleurs, ce type d'aérateur ne s'encrasse pas (Rice et coll., 1981; Deckwer et coll., 1982 ; Poulsen et Iversen, 1998). L'oscillation dans la grosseur des pores prévient une accumulation de la biomasse. Elle permet également de générer un régime homogène de bulles et peut supporter un plus grand débit gazeux (Herbard et coll., 1996). Le principal désavantage du diffuseur flexible est sa perte de charge. Herbard et coll. (1996) rapportent une perte de charge dix fois supérieure à celle produite par la plaque perforée et le diffuseur poreux. L'aération par bullage cause un haut niveau de mousse et peut produire un stress aux cellules (Moorhouse et coll., 1996).

2.4.4 Diffuseur poreux

Les aérateurs poreux comprennent les diffuseurs en silice (Deckwer et coll., 1982; Ashley et coll., 1991; Andou et coll., 1996; de Ory et coll., 1999), en acier inoxydable (Buchholz et coll., 1978; Deckwer et coll., 1980; Abdullah et coll., 2000), en céramique (Kim et coll., 1991; Kim et Boyle, 1993; Scott et coll., 1996; Liu et coll., 1999) et en polyéthylène (Prakash et Briens, 1990). Ils ont une structure poreuse variant de 0.3 à 150 microns.

Des travaux de Scott et coll. (1996), Wagner et coll. (1998) et Liu et coll. (1999) montrent que les valeurs de $k_L a$ augmentent en diminuant la grosseur des pores au diffuseur pour le même débit gazeux. Il semble cependant exister une limite. Une étude de Marrucci et coll. (1967) sur la coalescence des bulles avec la présence d'un électrolyte montre qu'il n'y a pas de différence significative entre la plaque poreuse de

20 μm et une plaque de 8 μm . Bin et coll. (1995) indiquent que pour générer des bulles inférieures à 2 mm de diamètre, les pores doivent avoir un diamètre inférieur à 40 μm . Il est cependant difficile de valider cette limite. La seule étude disponible sur l'influence de la porosité a été effectuée par Ashley et coll. (1991) sur des aérateurs poreux de 40 μm et de 140 μm . Ils n'ont pas remarqué de différence significative entre le diamètre des bulles formées (3,8 à 4,2 mm et 3,8 à 4,5 mm) dans la plage de débits testés (9.4 à 18.8 L/min).

Schlatmann et coll. (1993) rapportent un k_La de 12 h^{-1} avec un diffuseur poreux en acier avec une aération de $600 \text{ cm}^3/\text{min}$ (0,3 vvm) combiné à une agitation par une turbine à une concentration de 20 % de biomasse humide de *Catharanthus roseus*. Les travaux de Wang et Zhong (1996) montrent un k_La de 17 h^{-1} avec une aération de 0.2 vvm par un aérateur poreux combiné à un agitateur de type « cell-lift » à 150 rpm dans un bioréacteur de 5 L. Pour de plus faibles débits, Leckie (1990) rapporte un k_La de 4 h^{-1} à $300 \text{ cm}^3/\text{min}$ (0,04 vvm) avec une agitation de 50 rpm avec une hélice de type « Rushton » dans un bioréacteur de 8,5 L. Dernièrement, les travaux de Coelho (2000) sur le positionnement d'un diffuseur poreux de 2 μm en acier sur le BDRH développé par Jolicoeur (1990) montrent un taux de transfert allant jusqu'à $8,0 \text{ h}^{-1}$ avec une agitation de 60 rpm et un débit d'aération de $200 \text{ cm}^3/\text{min}$ (0,04 vvm). Les observations de Coelho (2000) rapportent des bulles d'environ 1 mm de diamètre pour la plage de débits spécifiés dans ce projet (0 à 0.05 vvm).

Le principal désavantage des aérateurs poreux est l'encrassement du diffuseur par la précipitation de dépôts de fer et de carbonates ainsi que par la croissance biologique sur le diffuseur (Boyle et Redmon, 1983; Kim et Boyle, 1993). Selon Boyle et Redmon (1983), les principales causes de l'encrassement sont la distribution inégale de l'air au travers du diffuseur, le faible débit d'air, les hautes densités cellulaires et les caractéristiques des résidus cellulaires. L'encrassement conduit à une augmentation de la coalescence des bulles à la surface du bulleur.

Le Tableau 2.1 résume les différents k_La obtenus selon l'aérateur, le système utilisé et les variables d'opération : le débit gazeux et la vitesse d'agitation. Il est imprudent de comparer les valeurs de k_La d'un système à un autre. Les dimensions du bioréacteur influencent le k_La . Prakash (1990) rapporte un k_La de 216 h^{-1} (à un débit de 1.2 vvm) avec un bulleur en acier poreux (pores de $17,5 \mu\text{m}$) tandis que Sotelo (1994) rapporte un k_La de 18 h^{-1} (sous un débit de 0.6 vvm) avec un aérateur poreux (pores de $30 \mu\text{m}$) pour des colonnes à bulles de 10 L. Cependant, les rapports géométriques hauteur/diamètre des colonnes à bulles sont respectivement de 10 et de 25. Seules les études comparatives sont valables pour juger de l'efficacité d'une technologie d'aération. Des observations de Rice et coll. (1981), de Herbard et coll. (1996) et d'Andou et coll. (1996) montrent une production de plus petites bulles par le diffuseur poreux comparativement à la plaque perforée pour le même débit de gaz. Heijnen (1984) rapporte que pour les systèmes non coalescents, le diffuseur poreux montre des k_La six fois supérieurs à ceux d'orifices simples.

Tableau 2.1 : $k_L a$ obtenus selon le mode d'injection du gaz dans le liquide

Aérateur	d_o (μm)	H/D	Volume L	Phase liquide	N rpm	Débit gazeux ml/min	$k_L a$ h^{-1}	Auteur	Notes
Surface	n/d	1.4	10	eau	n/d	4000	21	Funchs et coll., (1971)	Vitesse d'agitation non-disponible
Surface	n/d	1.9	51000	eau	n/d	20.4 E6	3.6	Funchs et coll., (1971)	Vitesse d'agitation non-disponible
Surface	n/d	1.0	11	eau	60	n/d	1.0	Jolicoeur et coll., (1992)	Agitateur à double ruban hélicoïdal (BRH)
Surface	n/d	1.3	3	eau	n/d	25	0.9	Kamen et coll., (1993)	BRH + chicanes de surface
Orifice "jet"	Ouverture 0.4 mm	3.3	70	eau?	n/d	3000	37	Fregapane et coll., (1999)	Recirculation de liquide
8 Orifices simples	n/d	0.9	2.5	eau	60 (flat-blades)	2500	17	Tanaka (1982)	Diffuseur annulaire
73 Orifices simples	1000	19.3	41.5	CMC 1%	n/d	9250	6.3	Deckwer et coll., (1982)	
10 Orifices simples	2000	n/d	8.5	eau	50 (2 rushitons)	300	1.5	Leckie et coll., (1990)	
20 Orifices simples	2000	5.3	16.3	14.7% solide	n/d	35750	126	Smith et Skidmore (1990)	Gazéosiphon
16 Orifices simples	500	5.6	1.2	Milieu de culture	n/d	2000	30	Ballica et Ryu (1993)	Gazéosiphon
Orifice simple	3000	9.5	27	eau	n/d	9425	36	Gavrilescu et Roman (1994)	Données en début de culture
7 Orifices simples	1000	5.5	105	eau	n/d	39600	40	Wu et Hsiun (1996)	Gazéosiphon
Orifice simple	2000	5	0.4	eau	n/d	9400	72	Gavrilescu et Tudose (1996)	
Orifice simple	4000	3.2	17	Solution mousse	n/d	119000	252	Andou et coll., (1996)	Briseur de mousse mécanique, présence de 4 chicanes
4 Orifices simples	2000	316	250	Levures	n/d	94700	36	Pollard et coll., (1996)	Gazéosiphon
Plaque perforée	1600	2.0	42	eau	n/d	21200	13.6	Kastanek et coll., (1980)	
Plaque perforée	2000	3.2	17	Solution mousse	n/d	119000	240	Andou et coll., (1996)	Briseur de mousse mécanique, présence de 4 chicanes
Plaque perforée	1000	40	55	eau	n/d	9500	16	Al-Masry et Waheed (1999)	Gazéosiphon

Tableau 2.1 : $k_L a$ obtenus selon le mode d'injection du gaz dans le liquide (suite)

Aérateur	d_o (μm)	H/D	Volume L	Phase liquide	N rpm	Débit gazeux cm^3/min	$k_L a$ h^{-1}	Auteur	Notes
Membrane trouée	300	19.3	41.5	CMC 1%	n/d	9250	0.22	Deckwer et coll. (1982)	
Tube membranaire	Teflon	1	6	eau	50 (marine)	50	0.01	Mano et coll. (1990)	
Membrane trouée	n/d	10.7	23	CMC 1%	n/d	18500	0.80	Muller et coll. (1992)	
Membrane trouée*	1000.0	13.3	32	eau	n/d	21300	0.67	Poulsen et Iversen (1998)	*Membrane couvrant la base de la colonne
Membrane poreuse	0.2	n/d	80	eau	n/d	15000	0.19	Parameshwaran et coll. (1999)	Aucune précision sur le diffuseur
Acier poreux	17.5	28	60.2	CMC 1%	n/d	18500	0.31	Buchholz et coll. (1978)	
Acier fritté	200	19.3	41.5	CMC 1%	n/d	9250	0.22	Deckwer et coll. (1982)	
Polyéthylène poreux	35	4.8	5	eau	n/d	9000	1.8	Prakash et Briens (1990)	
Verre poreux	3	n/d	8.5	eau	50 (2 rushions)	300	0.04	Leckie et coll. (1990)	En bioréacteur
Acier fritté	n/d	n/d	1.8	C.roseus (1:5)	250 (2 rushions)	600	0.33	Schlattmann et coll. (1993)	En colonne à bulle
Acier fritté	n/d	n/d	1.8	C.roseus (1:5)	n/d	600	0.33	Schlattmann et coll. (1993)	
Verre poreux	30	37.5	1.9	eau	n/d	200	0.11	Sotelo et coll. (1994)	
Plaque poreuse	n/d	5	0.4	eau	n/d	9400	23.5	Gavriescu et Tudose (1996)	Pas de précision sur le diffuseur
Acier poreux	2	1.3	3	eau	60	33	0.01	Sirois (exp.)	Aération de surface de 150 cm^3/min en plus
Céramique poreuse	1.5	24	1.2	eau	n/d	3800	3.2	Liu et coll. (1999)	
Céramique poreuse	2.6	24	1.2	eau	n/d	3800	3.2	Liu et coll. (1999)	
Verre fritté	45	24	1.2	eau	n/d	3800	3.2	Liu et coll. (1999)	
Acier poreux	2	1.3	3	eau	60	50	0.02	Sifi (1999)	Bioréacteur présentement utilisé
Acier poreux	2	1.0	5	eau	60	100	0.02	Coelho (2000)	Bioréacteur présentement utilisé
Acier poreux (2 diffuseurs)	2	1.0	5	eau	60	100	0.02	Coelho (2000)	

2.5 Transfert gazeux

Le transfert gazeux dépend principalement de l'hydrodynamisme dans le film liquide à la surface des bulles, de la surface de transfert, de la concentration d'oxygène dans la phase gazeuse et du temps de résidence dans la phase liquide (Rooney et Huibregtse, 1993). Certaines caractéristiques de l'aération tel que la rétention gazeuse, la vitesse des bulles et le coefficient de transfert volumique ($k_L a$) sont gouvernées par la grosseur des bulles dans le réservoir. Une bonne connaissance du comportement des bulles est nécessaire afin de comprendre et de prédire le transfert gazeux dans le bioréacteur. Si les bulles sont trop grosses, elles montent à la surface rapidement et le temps requis pour le transfert d'oxygène est insuffisant. Si les bulles sont trop petites, elles perdent leur oxygène rapidement et il n'y aura pas d'effet bénéfique sur le transfert gazeux (Motarjemi et Jameson, 1978). Les phénomènes qui déterminent la grosseur des bulles dans le bioréacteur sont complexes et impliquent notamment la grosseur de la bulle à l'orifice et le taux de coalescence (Heijnen et van't Riet, 1984).

2.5.1 Formation des bulles

Plusieurs groupes de recherche ont étudié la formation des bulles (Marmur et Rubin, 1976; Clift et coll., 1978; Tsuge et coll., 1981; Tan et Harris, 1986; Parthasarathy et coll., 1991; Wilkinson et coll., 1994). Les bulles croissent dans l'orifice selon une forme quasi sphérique. Au moment où le diamètre de la bulle atteint le diamètre de l'orifice, celle-ci commence à s'élever au dessus de l'orifice en augmentant de volume. La bulle quitte l'aérateur lorsque son cou se brise. Ce phénomène survient lorsque la distance entre le centre de la bulle et l'orifice correspond au diamètre de la bulle.

La formation des bulles est un phénomène très complexe. Le volume des bulles dépend du diamètre de l'orifice, du débit de gaz, du volume de la chambre du gaz sous l'orifice ainsi que de la densité, de la viscosité et de la tension de surface de la phase liquide.

Iguchi et coll. (1998) montrent que la densité du gaz n'affecte pas significativement la formation des bulles produites par un diffuseur poreux. Tsuge et coll. (1981) ont observé une faible différence de 2 % entre le volume des bulles formées par l'air et le CO₂. Bien qu'il soit très difficile de modifier les propriétés de la phase liquide lors de la culture de cellules végétales, Tsuge et coll. (1981) montrent que le volume des bulles diminue avec une augmentation de la densité du liquide. Une étude de Machon et coll. (1997) sur la grosseur des bulles dans l'alcool et dans des solutions d'électrolytes montre que la grosseur des bulles ne peut pas être directement reliée à la tension de surface.

Dans le cas de culture de cellules végétales en suspension, il est très difficile de modifier la phase liquide afin d'influencer la formation des bulles. Par conséquent, la formation des bulles devient entièrement dépendante du design du diffuseur (grosseur et localisation des orifices), du volume de la chambre du gaz ainsi que de la vitesse superficielle du gaz au travers des orifices (Heijnen et van't Riet, 1984; Medic et coll., 1989; Weber et coll., 1990; Chabra, 1993). Davidson et coll. (1956) remarquent qu'une augmentation de la chambre de gaz sous l'orifice augmente le volume de la bulle lors de sa formation. Une étude de Miyahara et coll. (1983) montre également que la grosseur d'une bulle formée à un orifice simple est fortement influencée par le volume de la chambre. Cet effet diminue lorsque le nombre de trous augmente, et disparaît lorsqu'il y a plus de 15 trous. La plupart des auteurs s'entendent également pour dire que le volume des bulles augmente avec une augmentation à la fois de la vitesse superficielle du gaz et du diamètre des orifices. Certains facteurs n'ont aucune influence sur la formation des bulles tel que la pression d'injection du gaz (Deckwer et coll., 1980), le matériau de l'aérateur (Koide et coll., 1968), l'inclinaison de l'orifice (Clift et coll., 1978) et le temps de formation de la bulle (Blanchard et Syzdek, 1977).

Machon et coll. (1997) rapportent qu'il est impossible de prédire la grosseur des bulles à partir de considérations purement théoriques. Les mécanismes de formation et de fusion des bulles ne sont pas complètement compris actuellement (Iguchi et coll.,

1998). Plusieurs chercheurs proposent et utilisent des corrélations empiriques permettant de prédire le diamètre des bulles formées par un aérateur. Le Tableau 2.2 présente des modèles empiriques pour la prédiction du diamètre des bulles lors de leur formation indépendants de la géométrie du système. La précision de chacune de ces corrélations dépend fortement de la précision avec laquelle la grosseur des bulles a pu être mesurée. Les corrélations proposées ne sont généralement que pour des orifices simples. Il n'existe pas de relations pour les aérateurs poreux dû à la complexité des interactions impliquées entre les bulles lors de leur formation à la surface de la plaque (Kim et Boyle, 1993; Miyahara et Tanaka, 1997).

Le design d'un aérateur efficace implique la formation de bulles à chaque orifice. Kastanek (1980) rapporte que la formation des bulles se produit à chaque orifice si le nombre de Weber de l'orifice ($We_o = v_{go} d_o \rho / \sigma$) est supérieur à 3. Guy (1984) propose plutôt une valeur de 2. Davidson et coll. (1956) rapportent qu'il existe une fréquence maximale de production de bulles par orifice. Cette fréquence se calcule selon :

$$f_{\max} = 0.909 \frac{Q_o^{0.133}}{\left(d_o/2\right)^{0.434}} \quad (2.7)$$

où $f_{\max}$ est la fréquence maximale de bulles produites par l'orifice, Q_o est le débit par orifice et d_o est le diamètre de l'orifice. Au-delà de cette fréquence, Marmur et coll. (1976) concluent que le volume des bulles augmente avec le débit gazeux.

Tableau 2.2 : Modèles empiriques pour la formation des bulles

Corrélation	Auteurs	Années
$d_b = 3.15 \frac{d_o^{0.05} \cdot Q_{go}^{0.32} \cdot \mu_L^{0.1}}{g^{0.21} \cdot \rho_L^{0.1}}$	Tilton et coll.	1982
$d_b = \left(\frac{6 \cdot C \cdot \left(Q_{go}^2 / g \right)^{3/5}}{\pi} \right)^{1/3}$	Chabra	1993
$d_b = (d_o)^{1/3} \cdot \left(\frac{6\sigma}{\rho_L \cdot g} \right)^{1/3}$	Wilkinson et coll.	1994
$d_b = 0.18 \cdot (d_o)^{0.5} \cdot Re_o^{1/3}$	Bhavaragu et coll.	1978
$d_b = 389 \cdot \left((d_o)^{0.5} \cdot Q_{go} \right)^{0.289}$	Iguchi et coll.	1998

d_b : diamètre des bulles (m); d_o : diamètre de l'orifice (m); Q_{go} : débit de gaz par orifice ($m^3 s^{-1}$); μ_L : viscosité de la phase liquide (Pa s); g : accélération gravitationnelle ($9.8 m/s^2$); ρ_L : masse volumique de la phase liquide ($kg m^{-3}$); C : constante selon le régime d'écoulement; σ : tension de surface ($N m^{-2}$); Re_o : Nombre de Reynolds de l'orifice.

2.5.2 Régions et régimes d'écoulement de bulles

Il existe trois régions d'écoulement dans un réservoir contenant des bulles (Guy, 1984) :

- La région I près des orifices où le diamètre des bulles est déterminé par le processus de formation des bulles aux orifices;
- La région II où le diamètre des bulles est déterminé par le taux de coalescence et le bris des bulles;
- La région III lorsque les bulles s'échappent de la phase liquide.

Le diamètre des bulles à leur formation influence directement le taux de transfert gazeux dans le bioréacteur. Tavakoli et coll. (1995) observent que 95 % du transfert gazeux se produit à 20 % de la hauteur totale (région I et II) à la sortie du diffuseur. L'étude des phénomènes régissant cette région est donc primordiale dans l'optimisation du $k_L a$. Plusieurs auteurs (Davidson et Amick, 1956; Heijnen et van't Riet, 1984; Camarasa et coll., 1999) s'entendent pour définir trois régimes de formation des bulles à l'orifice : la formation de bulles séparées, le bullage à la chaîne et le jet. Chaque régime est principalement délimité par la vitesse superficielle du gaz au travers de l'orifice. Haque et coll. (1986) caractérisent la formation de bulles au travers d'un orifice en fonction du nombre de Reynolds de l'orifice (Tableau 2.3).

Tableau 2.3 : Limites des régimes de formation des bulles pour un orifice

Régime de formation des bulles	Re_{orifice}
Séparées	< 2 000
À la chaîne	2 000 – 10 000
Jet	> 10 000

La limite entre les trois régimes dépend de la conception du réacteur (rapport Hauteur/Diamètre) et du diffuseur, des paramètres d'opération et des propriétés physico-chimiques des phases liquide et gazeuse (Thorat et coll., 1978; Deckwer et coll., 1980; Gavrilescu et coll., 1996; Camarasa et coll., 1999).

Par contre, les travaux de Camarasa et coll. (1999) sur un diffuseur poreux montrent que la formation des bulles est toujours à la chaîne pour une plaque poreuse contenant plusieurs pores. Iguchi et coll. (1998) définissent trois régimes de bullage pour un diffuseur poreux en fonction de la vitesse superficielle du gaz au diffuseur (v_{sgd}). Le régime faible montre la formation de bulles distinctes tandis que le régime élevé montre une coalescence totale des bulles au diffuseur. Le régime moyen en est un de transition. Il remarque que la vitesse critique entre les régimes de bulles semble dépendante du diamètre des pores du diffuseur et qu'en dessous de 100 μm , la valeur des limites de la transition est relativement constante selon le diamètre des pores (Tableau 2.4)

Tableau 2.4 : Limites des régimes de formation des bulles pour un orifice

Régime de formation des bulles pour un diffuseur poreux	v_{sgd} (m/s)
Faible	< 0.2
Moyen	0.2 - 0.4
Élevé	> 0.4

Il est important d'opérer dans le régime faible afin de minimiser la coalescence des bulles au diffuseur. La performance du système diminue au fur et à mesure que la coalescence se produit (Evans et coll., 1999).

2.5.3 Coalescence et bris des bulles

Dans un réservoir agité, il existe un équilibre entre la coalescence et le bris des bulles conduisant à une grosseur à l'équilibre des bulles (Parthasarathy et coll., 1991). La coalescence résulte de la collision ou de la proximité de deux bulles. Le film qui les sépare s'amincit jusqu'à se briser pour former une bulle de dimension supérieure (Chabra, 1993; Tse et coll., 1998). Le temps nécessaire au phénomène de la coalescence se calcule en millième de seconde (Tse et coll., 1998).

Des études sur des orifices statiques montrent que la coalescence est fortement dépendante de la distance entre les orifices (Leibson et coll., 1956; Medic et coll., 1989; Chabra, 1993; Banerjee, 1993). Une étude de Marrucci et coll. (1967) sur un diffuseur poreux montre que le phénomène de coalescence se produit près du distributeur et détermine la grosseur des bulles dans le reste de la colonne. Koide (1968) remarque que la coalescence de ces petites bulles se produit dans la région immédiatement au-dessus du diffuseur. Les chances de contact entre les bulles sont si fréquentes et l'interface liquide-gaz si petite que la probabilité de coalescence est élevée. McCann et Prince (1969) notent que le point de coalescence, la distance de l'orifice, diminue lorsque le débit augmente. Iguchi et coll. (1998) stipulent également qu'une faible distance entre les pores conduit inévitablement à un certain degré de coalescence.

Le taux de coalescence dépend de la nature du liquide, de sa tension de surface, de sa viscosité et de la vitesse superficielle du gaz (Davidson et Amick, 1956; Heijnen et van't Riet, 1984). À de faibles vitesses superficielles, les bulles générées par le diffuseur montent en ligne droite, particulièrement dans la partie inférieure de la colonne (Gavrilescu et coll., 1996). Iguchi et coll. (1998) stipulent qu'une bulle monte en ligne droite vers la surface lorsque son nombre de Re est plus petit que 300. Lorsque la vitesse superficielle du gaz augmente, la grosseur des bulles au diffuseur augmente. Ceci conduit à une augmentation de l'oscillation de la trajectoire de la bulle et une probabilité plus élevée d'entrer en contact avec une autre bulle (van Krevelen et Hoftijer, 1950; Gavrilescu et coll., 1996). La présence d'un électrolyte n'a pas

d'influence sur la coalescence sauf de favoriser la formation de plus petites bulles (Tse et coll., 1998). Tavakoli et coll. (1995) remarquent que la présence de solides accélère différemment la coalescence selon la nature du liquide. De plus, la nature du gaz utilisé n'a pas d'effet remarquable sur le comportement des bulles (Koide et coll., 1968).

Le bris des bulles se produit lorsque la bulle est soumise à un mouvement turbulent du fluide. Lorsque le gradient de vitesse est trop élevé, la tension de surface devient insuffisante pour maintenir la bulle intacte (Clift et coll., 1978). Il n'y a pas de bris des bulles pour un Re_{orifice} supérieur à 20 000. Cette observation suggère que le bris des bulles n'est pas relié à la turbulence du gaz à l'orifice mais plutôt à la turbulence du liquide (Haque et coll., 1986; Evans et coll., 1999). Des études suggèrent que pour des liquides à haute viscosité, l'absence de bris des bulles est due au fait qu'il n'y ait plus de turbulence dans le liquide (Haque et coll., 1986).

La coalescence est un phénomène néfaste pour le transfert gazeux. La formation de bulles plus grosses réduit l'aire interfaciale par unité de volume (Arjunwadkar et coll., 1998) et réduit la rétention gazeuse (Leary et coll., 1969). Chabra (1993) a développé un modèle afin de prédire la coalescence. Ce modèle est valide uniquement pour un système de deux bulles dans des conditions très spécifiques. Dans le cas d'un réservoir agité, aucune corrélation ne peut être associée au phénomène de coalescence. Quant au bris des bulles, la prédiction théorique de la grosseur des bulles formées dans les zones de cisaillement près de la rotation de l'hélice est extrêmement difficile. Ceci est dû à la complexité des mouvements du fluide (Parthasarathy et coll., 1991). Par contre, Clift et coll. (1978) indiquent qu'il est possible de prédire le diamètre des bulles près de l'agitateur avec la théorie de la turbulence isentropique de Kolmogoroff.

2.5.4 Rétention gazeuse

La rétention gazeuse dans un réacteur agité est une mesure du volume de gaz contenu dans le liquide en régime permanent. Elle se définit comme le volume de gaz dispersé

par rapport au volume total du mélange gaz-liquide (Roustan et coll., 1977). Elle est principalement fonction des géométries de la cuve et de l'hélice, de la vitesse d'agitation, des propriétés du fluide et du design du diffuseur (Rewatkar et coll., 1993; Merchuk et coll., 1998). Selon Heijnen et van't Riet (1984), la rétention gazeuse peut varier de 20 à 200 % selon le type de diffuseur. Des travaux de Camarasa et coll. (1999) montrent une augmentation de la rétention gazeuse avec la plaque poreuse (Fraser et coll., 1983) par rapport à l'orifice simple. La plaque poreuse permet de générer de petites bulles qui peuvent constituer de 70 à 80 % de la rétention totale (Khare et Niranjana, 1995). La formation de petites bulles augmente l'aire interfaciale pour le même débit de gaz (Haque et coll., 1986) tout en ayant une vitesse ascensionnelle plus lente (Rewatkar et coll., 1993). Une augmentation du débit de gaz conduit inévitablement à de plus hautes rétentions gazeuses (Khare et Niranjana, 1995; Pollard et coll., 1996). Les propriétés du gaz n'ont qu'un faible effet (moins de 20 %) sur la rétention gazeuse (Heijnen et van't Riet, 1984).

La rétention gazeuse est aussi une mesure indirecte de la vitesse ascensionnelle des bulles. Moins les bulles montent rapidement à la surface, meilleure est la rétention gazeuse et le transfert gaz-liquide. Gezork et coll. (2000) remarquent que la vitesse ascensionnelle augmente avec une augmentation du diamètre des bulles. Jamialahmadi et coll. (1994) de même que Camarasa coll. (1999) ont observé que la vitesse ascensionnelle des petites bulles est généralement constante à 0.25 – 0.30 m/s. Afin de prédire la vitesse ascensionnelle des bulles, Roustan et coll. (1977) suggèrent d'utiliser la relation de Mendelson (équation 2.8) valide pour des bulles de diamètre variant de 2 à 5 mm :

$$va_b = \left(\frac{2\sigma}{\rho_L \cdot d_b} + \frac{g \cdot d_b}{2} \right)^{0.5} \quad (2.8)$$

où va_b est la vitesse ascensionnelle des bulles ($m \cdot s^{-1}$) et d_b le diamètre des bulles (m). Jamialahmadi et coll. (1994) ont étudié la vitesse ascensionnelle des bulles dans

différents liquides et développé une équation valide pour toutes les dimensions de bulles selon des fondements théoriques (équations 2.9, 2.10, 2.11). Leurs travaux expérimentaux confirment leurs prédictions théoriques.

$$Va_b = \frac{U^{sp} \cdot U^w}{\sqrt{(U^{sp})^2 + (U^w)^2}} \quad (2.9)$$

$$U^{sp} = \frac{1}{18} \cdot \frac{\rho_g - \rho_L}{\mu_L} g d_b^2 \left[\frac{3\mu_L + 3\mu_g}{2\mu_L + 3\mu_g} \right] \quad (2.10)$$

$$U^w = \sqrt{\frac{2\sigma}{\rho_L \cdot d_b} + \frac{g \cdot d_b}{2}} \quad (2.11)$$

Le transfert gazeux de l'oxygène de la bulle à la phase liquide lors d'un long temps de résidence entraîne la diminution du volume de la bulle (Nassar et coll., 2000). Bredwell et Worden (1998) prédisent que le diamètre d'une microbulle d'oxygène pur passera de 25 à 0 μm en moins de 10 secondes. Motarjemi et Jameson (1978) ont pour leur part observé une diminution du diamètre d'une bulle d'air de 738 μm à 701 μm sur une distance de 29,5 cm.

Peu de relations existent afin de prédire la rétention gazeuse dans des bioréacteurs en fonction du type d'hélice, du type de diffuseur et de la concentration en biomasse. Les travaux portant sur des colonnes à bulles (Roustan et coll., 1977; Heijnen et van't Riet, 1984; Poulsen et Iversen, 1998) proposent une relation linéaire entre la vitesse du gaz et la rétention gazeuse qui ne s'applique pas aux réservoirs agités. Récemment, Greaves et Barigou (1990) ont proposé une relation du type :

$$\varepsilon = 4.07 \cdot N^{-0.62} \cdot Q^{0.64} \cdot \left(\frac{d}{D} \right)^{1.39} \quad (2.12)$$

où ε est la rétention gazeuse, N la vitesse d'agitation (s^{-1}), Q le débit volumique de gaz ($m^3 s^{-1}$), d le diamètre de l'hélice (m) et D le diamètre du réservoir (m). Cette étude a été effectuée avec des hélices à 6 pales inclinées de différentes dimensions. Aucune corrélation n'est disponible dans la littérature concernant l'agitateur à ruban hélicoïdal en combinaison avec un diffuseur poreux. Gavrilesco (1996) suggère de ne pas utiliser la rétention gazeuse pour modéliser le transfert gazeux car ce n'est pas une variable indépendante.

2.5.5 Coefficient de transfert gazeux

Le coefficient de transfert de masse volumétrique ($k_L a$) est le produit du coefficient de transfert de masse « k_L » et de l'aire interfaciale par unité de volume « a » entre la phase gazeuse et la phase liquide. Les principaux facteurs affectant k_L sont l'hydrodynamique (Linek et coll., 1970) et les propriétés de la phase liquide (de Ory et coll., 1999; Coelho, 2000). Bakker et van der Hakker (1994) indiquent que l'intensité de la turbulence détermine le processus de renouvellement du film stagnant autour de la bulle. Ils rapportent également qu'une augmentation de la turbulence favorise une augmentation de k_L . Une diminution de la viscosité et de la tension de surface provoque également une augmentation de k_L (Heijnen et van't Riet, 1984). L'aire interfaciale dépend principalement de la grosseur des bulles présentes dans le bioréacteur (Liu et coll., 1999). Pour une même rétention gazeuse, les plus petites bulles offrent une surface de transfert beaucoup plus grande. Comme l'aire est inversement proportionnelle au carré du rayon des bulles, des bulles 10 fois plus petites ont un potentiel de transfert 100 fois plus élevé.

Motarjemi et Jameson (1978) suggèrent un diamètre optimal des bulles pour le transfert gazeux de 2 mm. En dessous de cette valeur, la surface de la bulle deviendrait rigide au lieu d'être mobile. Le changement d'hydrodynamisme dans le film liquide entourant la bulle conduit à une chute linéaire du coefficient de transfert de masse k_L .

en fonction du diamètre de la bulle. Par contre, l'effet sur le coefficient de transfert de masse volumique est contre-balancé par l'augmentation de la surface de transfert causée par de plus petites bulles. Plusieurs auteurs ont noté une augmentation du $k_L a$ en réduisant le diamètre des bulles pour un même débit gazeux (Leckie et coll., 1990; Khare et Niranjana, 1995; Burns et coll., 1997; de Ory et coll., 1999). Pour les systèmes biologiques, Michaels et coll. (1996) rapportent que l'utilisation de petites bulles réduit la probabilité de coalescence ainsi que la probabilité d'entraîner les cellules lors de leurs ascensions. Plusieurs auteurs (Motarjemi et Jameson, 1978; Bredwell et Worden, 1998; Eriksen et coll., 1998) suggèrent d'utiliser de l'oxygène ou du gaz carbonique pur au lieu d'une combinaison avec de l'air pour le transfert dans la phase liquide. La pressurisation n'a pas d'effet sur le $k_L a$ omis de favoriser une meilleure solubilité du gaz (Coelho, 2000).

La prédiction de k_L dans un réservoir agité demeure laborieuse. van't Riet (1979) rapporte des valeurs de 1 à 6×10^{-4} m/s pour le coefficient de transfert de masse. Bin (1995) propose une valeur de 3 à 4×10^{-4} m/s pour une bulle supérieure à 2 mm dans l'eau tandis que Linek et coll. (1970) suggèrent d'utiliser une valeur de 6×10^{-4} m/s. Heijnen (1984) suggère d'utiliser la relation de Higbie pour des bulles de diamètre supérieure à 2 mm :

$$k_L = 1.13 \left(\frac{v a_b \cdot D_{O_2}}{d_b} \right)^{0.5} \quad (2.13)$$

Pour des bulles de diamètres inférieurs, les données recueillies par Heijnen et van't Riet (1984) suggèrent une régression linéaire jusqu'à un diamètre de 0.8 mm où le coefficient de transfert de masse semble se stabiliser à 1×10^{-4} m/s.

L'aire interfaciale est très difficile à prédire. Mehta (1971) stipule que les propriétés du système ont un effet prononcé sur l'aire interfaciale et que le $k_L a$ ne peut être prédit. Même si la prédiction du volume des bulles lors de leur formation est possible, l'absence de modèles pour prédire le taux de coalescence rend la prédiction de l'aire

interfaciale pratiquement impossible. Par contre, l'aire interfaciale se calcule facilement lorsqu'on connaît la rétention gazeuse et le diamètre moyen des bulles (Buchholz et coll., 1978; Deckwer et coll., 1980; Guy, 1984; Poulsen et Iversen, 1998).

$$a = \frac{A_g}{V_L} = \frac{A_g}{V_g} \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} = \frac{\sum 4\pi \left(\frac{d_{b,i}}{2} \right)^2}{\sum \frac{4}{3} \pi \left(\frac{d_{b,i}}{2} \right)^3} \frac{\varepsilon}{1 - \varepsilon} \quad (2.14)$$

$$a = \frac{6 \cdot \varepsilon}{d_b \cdot (1 - \varepsilon)} \quad (2.15)$$

où a est l'aire interfaciale, A_g l'aire total de la phase gazeuse (m^2) et V_L est le volume de liquide (m^3). Par conséquent, la prédiction du $k_L a$ demeure principalement fonction du système utilisé. Medic (1989), Poulsen (1998) et Barboza (2000) suggèrent d'utiliser une corrélation du type :

$$k_L a = k_1 \cdot v_{sg}^a \quad (2.16)$$

valide pour les colonnes à bulles où v_{sg} est la vitesse superficielle du gaz ($cm \ s^{-1}$). Poulsen et coll. (1998) suggèrent des valeurs de 0.32 pour k_1 et de 0.7 pour leurs données pour un $k_L a$ en s^{-1} . Barboza et coll. (2000) proposent plutôt des valeurs de 81 et de 98 pour k_1 et des valeurs de 1.33 et de 0.86 pour a pour obtenir un $k_L a$ (h^{-1}) dépendant de la plage de vitesse superficielle v_{sg} . Medic (1989) propose la relation suivante afin de tenir compte de la hauteur du liquide :

$$k_L a = 1.36 \cdot v_{sg}^{0.83} \cdot H^{-0.33} \quad (2.17)$$

où H est la hauteur de liquide (m). Tavakoli et coll. (1995) ont étudié le transfert gazeux avec des fluides visqueux et suggèrent deux relations avec des colonnes à bulles.

$$k_L a \left(s^{-1} \right) = 0.014 \cdot v_{sg}^{0.66} \cdot \mu_L^{-0.5} \quad (2.18)$$

$$k_L a \left(s^{-1} \right) = 0.11 \cdot v_{sg}^{0.66} \cdot \mu_L^{-0.46} \cdot d_p^{0.39} \cdot 10^{0.481} \quad (\text{En lit fluidisé}) \quad (2.19)$$

où d_p est le diamètre des particules (m). Peu d'auteurs ont développé des relations afin de prédire le $k_L a$ dans des réservoirs agités. La plupart ces auteurs (Robinson et Wilke, 1973; Fuchs et coll., 1978; Figueiredo et Calderbank, 1979) utilisent des corrélations du type :

$$k_L a = k_1 \cdot v_{sg}^b \cdot N^c \quad (2.20)$$

Cette équation n'est utilisable que pour un type et une géométrie particulière d'agitateur. Toutes les relations utilisant la puissance fournie par l'arbre d'agitation ne peuvent être utilisées dans les bioréacteur requérant un joint d'étanchéité stérile (Aubry, 1995) car la puissance est dissipée principalement à celui-ci. Poulsen et coll. (1998) suggèrent une relation impliquant la rétention gazeuse. Celle-ci est difficilement utilisable étant donné la difficulté de mesurer la rétention gazeuse dans les systèmes biologiques.

La comparaison des diverses relations met en évidence la grande diversité des corrélations entourant la prédiction du $k_L a$. Cette diversité suggère que le $k_L a$ est principalement fonction du design du système et que les relations sont difficilement transférables d'un système à l'autre.

2.6 Paramètres de transfert gazeux en bioréacteur

2.6.1 Rapport géométrique du bioréacteur

La hauteur de liquide dans le bioréacteur influence le k_La (Haque et coll., 1986; Gavrilescu et Tudose, 1996; Wu et Hsiun, 1996). Arjunwadkar (1998) suggère d'utiliser un rapport Hauteur/Diamètre du réservoir (H/D) plus grand que 1 afin d'augmenter le temps de résidence de la phase gazeuse. Des mesures prises par Motarjemi et Jameson (1978) sur le transfert d'oxygène ont montré qu'une bulle d'oxygène de 1 mm de diamètre a besoin de 4 m pour transférer 90 % de son oxygène. Des rapports H/D supérieur à un favorisent le temps de résidence des bulles, et par conséquent, le temps d'échange. Par contre, Buchholz et coll. (1978) soulignent que pour le même volume, un trop faible diamètre de réservoir augmente le taux de coalescence et réduit l'aire interfaciale. Gavrilescu et Tudose (1996) rapportent que l'effet du rapport H/D est significatif pour un orifice statique mais diminue avec l'utilisation d'une plaque poreuse. Ceci est possiblement dû à la coalescence des petites bulles.

Peu d'études ont été publiées sur l'influence du rapport géométrique H/D sur le transfert gazeux. Motarjemi et Jameson (1978) ont étudié l'influence du rapport H/D sur la rétention gazeuse. Ils prétendent qu'une augmentation du rapport H/D à partir de 1 diminue la rétention gazeuse de 15 à 20 % lorsque le rapport atteint 5. Par contre, le point de comparaison qu'utilise Motarjemi et Jameson (1978) n'est cependant pas valide. La vitesse superficielle du gaz ne peut pas servir de comparaison en raison du changement d'aire axiale du réservoir lorsque le rapport H/D augmente. Par conséquent, en analysant les résultats, la rétention gazeuse montre une augmentation avec l'augmentation du rapport H/D pour un même débit gazeux.

2.6.2 Débit gazeux

L'augmentation du débit gazeux augmente le transfert gazeux. Marrucci et coll. (1967) remarquent qu'une augmentation du débit de gaz produit un nombre plus grand de bulles par unité de volume liquide. Une augmentation du taux de coalescence se produit habituellement car la probabilité de collisions entre les bulles est plus élevée. Un plus grand débit génère un plus grand mouvement de convection dans la phase liquide qui augmente aussi la force des impacts. Plusieurs auteurs (Koide et coll., 1968; Medic et coll., 1989; Pollard et coll., 1996; Liu et coll., 1999) remarquent également une augmentation du diamètre des bulles lors de leur formation à l'orifice. Ceci est causée par l'augmentation de la vitesse superficielle du gaz au travers des orifices. Cette augmentation demeure négligeable tant et aussi longtemps que le régime de bullage ne change pas et que la fréquence de formation demeure sous la fréquence maximale de formation (Davidson et Amick, 1956).

Les travaux portant sur le $k_L a$ mentionnent une augmentation du transfert gazeux avec le débit (Stejskal et Potucek, 1985; Smith et Skidmore, 1990; Sotelo et coll., 1994; Gavrilescu et Tudose, 1996; Andou et coll., 1996; Parameshwaran et coll., 1999; Liu et coll., 1999). Guell et Girart (1994) de même que Andou et coll. (1996) remarquent également une meilleure rétention gazeuse avec une augmentation du débit.

L'utilisation d'un débit de gaz minimal demeure nécessaire dans les cultures de cellules végétales en suspension afin de limiter le dégazage du CO_2 dissous (Hegarty et coll., 1986; Jolicoeur, 1990; Aubry, 1994) et la flottation des cellules (Wongsamuth et Doran, 1994). En vertu de leurs propriétés de surface, les cellules ont tendance à se concentrer à l'interface liquide-gaz et à se séparer du milieu par flottation (Wongsamuth et Doran, 1994). La réduction du débit de bullage limite la flottation des cellules. La formation de mousse (Wongsamuth et Doran, 1994; Andou et coll., 1996) est également un problème causé par la production de protéines extracellulaires et de polysaccharides (Kieran et coll., 1997). L'entraînement des cellules dans la mousse cause donc une baisse de productivité (Wongsamuth et Doran, 1994; Al-Masry et

Waheed, 1999). Les cellules accumulées en phase de mortalité dans la partie supérieure du bioréacteur peuvent aussi sécréter des sous-produits qui peuvent inhiber la croissance comme les protéases (Abdullah et coll., 2000). Un faible débit peut cependant conduire au colmatage de l'aérateur (Ashley et coll., 1991).

2.6.3 Agitation

L'agitation est nécessaire afin d'assurer un environnement homogène et de garder les cellules en suspension. Arjunwadkar et coll. (1998) montrent qu'il est possible de modifier le transfert gazeux en variant la position et la vitesse de l'agitateur. Peu d'études sont disponibles pour des systèmes biologiques. Rewatkar et coll. (1993) rapportent de meilleures rétentions gazeuses avec une hélice à pâles inclinées comparée à la turbine radiale à pale droite. Lu et coll. (1999) rapportent qu'à la même vitesse d'agitation, l'hélice avec le plus de pâles disperse toujours mieux le gaz et produit des k_La plus élevés. Figueiredo et Calderbank (1979) recommandent d'utiliser une multitude d'hélices (entre 2 et 5) afin d'augmenter le k_La . La vitesse d'agitation influence grandement le transfert gazeux (Sucker et coll., 1994). Des vitesses d'agitation plus élevées permettent d'augmenter la turbulence, de disperser les bulles dans une plus grande partie du bioréacteur (Heijnen et van't Riet, 1984; Chapman et coll., 1990) et d'augmenter le cisaillement afin de briser les bulles (Bredwell et Worden, 1998). La vitesse maximale d'agitation est principalement fonction du cisaillement développé par l'hélice. Selon la théorie de Kolmogoroff, la similitude entre le volume des bulles et les amas cellulaires indique que la vitesse d'agitation maximale permise n'est pas suffisante pour briser les bulles sans abîmer les cellules. Il n'existe pas d'étude sur la vitesse minimale de mise en suspension pour des particules solides avec le ruban hélicoïdal.

La présence d'une hélice peut augmenter ou diminuer le transfert gazeux (Stejskal et Potucek, 1985; Fujie et coll., 1997; Arjunwadkar et coll., 1998). Le patron d'écoulement détermine le temps de circulation des bulles dans le réacteur (Pollard et coll., 1996; Wu

et Hsiun, 1996; Arjunwadkar et coll., 1998). Les travaux de Rooney et Huibregtse (1993) montrent une augmentation du k_La de 74 % simplement en modifiant les patrons d'écoulement. Les travaux de Coelho (2000) sur le transfert gazeux d'un bioréacteur avec un double ruban hélicoïdal montre des valeurs supérieures de k_La pour un pompage ascendant au ruban lorsque le système d'aération est situé dans l'axe du bioréacteur. L'ascension des bulles est ralentie par la rencontre du fluide et demeure plus longtemps dans le fluide. Jolicoeur (1990) de même que Chapman et coll. (1990) mentionnent qu'il faut porter une attention particulière à ce que l'aération ne nuise pas à l'hydrodynamique dans le bioréacteur.

2.6.4 Viscosité

Le transfert gazeux diminue lorsque la viscosité de la phase liquide augmente. Le k_La (Buchholz et coll., 1978; Gavrilescu et Tudose, 1996; Coelho, 2000) et la rétention gazeuse (Heijnen et van't Riet, 1984; Gavrilescu et Roman, 1994; Arjunwadkar et coll., 1998) diminuent généralement avec une augmentation de la viscosité du fluide. Roustan et coll. (1977) ont cependant remarqué que la viscosité de la phase liquide est sans influence sensible sur la rétention gazeuse en dessous de 20 cps.

Tavakoli et coll. (1995) rapportent que la diminution du k_La est associée à la diminution très forte de l'aire interfaciale spécifique (a) plutôt qu'à celle du coefficient de transfert de matière (k_L). Leibson et coll. (1956) de même que Chabra et coll. (1993) rapportent que le volume des bulles formées dans les liquides fortement visqueux est plus élevé que dans des systèmes de plus faibles viscosités. L'augmentation de la viscosité augmente également le taux de coalescence (Buchholz et coll., 1978; Weber et coll., 1990; Tavakoli et coll., 1995) et réduit le bris des bulles (Philip et coll., 1990; Tavakoli et coll., 1995). Par contre, la vitesse ascensionnelle des bulles diminue lorsque la viscosité augmente (Heijnen et van't Riet, 1984; Gavrilescu et Roman, 1994).

La présence de cellules peut affecter le taux de transfert d'oxygène de trois façons : 1) l'accumulation de cellules à l'interface gaz-liquide, 2) la présence de cellules comme particules solides et 3) la modification de la nature du milieu par les cellules (Ju et Sundararajan, 1995). Ju et Sundararajan (1995) rapportent que plusieurs études ont montré que les cellules, comme particules solides, peuvent changer l'hydrodynamique à l'interface gaz-liquide des bulles. Smith et coll. (1990) indiquent qu'à de faibles concentrations de solide, les petites particules présentes dans le film le brisent et réduisent la résistance au transfert de masse (k_L). La longueur de diffusion effective pour le transfert de masse est réduite par la pénétration de fines particules solides au travers du film liquide. Une étude de Kim et Kim (1990) rapporte un $k_L a$ optimal pour une addition de 15 % v/v de fines particules. Toute augmentation subséquente de la concentration en particules solides (Smith et Skidmore, 1990; Guell et Giralt, 1994), en concentration cellulaire (Ballica et Ryu, 1993; Ballica et Dewey, 1993) ou en agar (Jolicoeur, 1990; Wang et Zhong, 1996) réduit davantage le transfert gazeux. Les observations de Kim et Kim (1990), Guell et Giralt (1994) de même que Tavakoli et coll. (1995) montrent que la baisse du $k_L a$ est attribuable à l'augmentation du taux de coalescence. Plusieurs auteurs (Smith et Skidmore, 1990; Tavakoli et coll., 1995; Burns et Zhang, 2001) rapportent aussi que la diminution de la taille des particules diminue le transfert gazeux. Coelho (2000) rapporte une baisse de 40 % du $k_L a$ en culture comparé au $k_L a$ effectué dans l'eau aux mêmes conditions d'opérations (0.05 vvm et 60 rpm).

2.6.5 Milieu

L'ajout d'un soluté dans l'eau réduit le taux de coalescence par la force répulsive des ions qui s'accumulent à l'interface liquide-gaz (Marrucci et Nicodemo, 1967). L'efficacité des électrolytes à empêcher la coalescence augmente selon la charge de l'ion (Koide et coll., 1968; Mehta et Sharma, 1971). Prince et Blanch (1990) rapportent que des concentrations élevées de sels produisent une augmentation de la tension de surface du film à l'interface liquide-gaz. Thorat et coll. (1978) ont observé que les bulles

généérées aux orifices sont plus petites dans le cas d'une solution d'électrolyte par rapport à l'eau. Poulsen et Iversen (1998) n'ont pas observé de diminution du diamètre des bulles aux orifices mais ont noté une diminution du diamètre moyen des bulles dans le réservoir. La plupart des travaux mentionnent une diminution du diamètre des bulles sans mentionner si c'est lors de leur formation ou lors de leur ascension (Robinson et Wilke, 1973; Haque et coll., 1986; Machon et coll., 1997; Tse et coll., 1998).

L'augmentation de la concentration d'ions conduit à une augmentation de la rétention gazeuse (Thorat et coll., 1978; Merchuk et coll., 1998; Arjunwadkar et coll., 1998). Poulsen et Iversen (1998) rapportent une augmentation de 10 à 25 % de la rétention gazeuse par rapport à l'eau distillé. van't Riet (1979) rapporte que l'aire interfaciale peut être augmenté de 10 fois avec l'addition d'ions. L'addition d'ions réduit le taux de coalescence par une diminution de la grosseur des bulles et une augmentation du $k_L a$. Ceci se produit à une concentration d'ions maximale à partir de laquelle il n'y a plus d'augmentation du $k_L a$. La présence d'ions n'a que peu d'effet sur la solubilité de l'oxygène. Dans le milieu de culture B₅ (annexe A), elle est estimée à 95% de sa solubilité dans l'eau, soit 7,8 mg/L à 25°C (Su et Humphrey, 1989).

Des surfactants peuvent être ajoutés afin de réduire le degré de coalescence (Bredwell et Worden, 1998; Burns et Zhang, 2001). Ce sont des agents de surface actifs qui réduisent la tension superficielle de la phase liquide. Ils sont caractérisés par une terminaison hydrophile et une terminaison hydrophobe, qui se concentrent à l'interface des deux phases (Burns et Zhang, 2001). Bredwell et Worden (1995) suggèrent d'utiliser des surfactants non ioniques afin de ne pas dénaturer les enzymes. La présence de surfactants réduit le transfert gazeux malgré la réduction du taux de coalescence. Bredwell et Worden (1998) rapportent que les surfactants à l'interface liquide-gaz créent une résistance supplémentaire au transfert de masse (diminution du facteur k_L). Ils agissent comme une barrière physique au passage des molécules gazeuses à l'interface et peut influencer l'épaisseur du film liquide autour de la bulle.

Les agents anti-mousses sont parfois employés pour réduire la mousse. Les problèmes causés par les agents anti-mousses sont la réduction du coefficient de transfert d'oxygène, les réactions d'inhibition et de toxicité aux cellules et la récupération plus difficiles des produits (Takesono et coll., 1993). L'ajout d'agents anti-moussant peut déstabiliser les bulles de la mousse en agissant comme pont hydrophobique entre deux films de surface et en déplaçant les protéines stabilisantes (Al-Masry et Waheed, 1999). De la même manière que les surfactants (Al-Masry et Waheed, 1999), la présence d'agents anti-mousses réduit le transfert gazeux (Haque et coll., 1986; Ballica et Dewey, 1993). Abdullah et coll. (2000) montrent une diminution du k_La de 80 % suite à l'ajout d'un agent anti-mousse (Silicon antifoam, Sigma). Wongsamuth (1994) n'a pas remarqué d'effet sur la croissance avec de l'*Antifoam C* et du *Polypropylène glycol 1025*.

2.7 Mise à l'échelle

Les faibles taux de croissance, la sensibilité au cisaillement, l'adhésion aux surfaces, l'agrégation des cellules (Kim et coll., 1991) et le maintien du k_La (Reisman, 1993) tout au long de la culture sont les principales difficultés de la mise à l'échelle de la culture de cellules végétales en suspension. Reisman (1993) rapporte que le changement d'un environnement de culture causé par le changement d'échelle peut provoquer une réponse des cellules impossible à prédire. Les critères de mise à l'échelle utilisés pour les cultures biologiques sont présentés au Tableau 2.5 (Mavituna, 1996).

Tableau 2.5 : Critères de mise à l'échelle

Critères	Raisons
$k_L a$ constant	Assurer le transfert d'oxygène aux cellules
Vitesse du bout de l'agitateur constante Puissance de pompage de l'agitateur constante	Maintenir un cisaillement acceptable
Temps de mélange égaux Maintien de la puissance par unité de volume	Assurer la disponibilité de l'oxygène et des nutriments
Rapports géométriques constants	Maintenir les phénomènes constants

2.7.1 Rapport géométrique

Une des règles couramment utilisées pour la mise à l'échelle est la similarité géométrique (Reisman, 1993; Mavituna, 1996). La similarité des rapports géométriques facilite le maintien la constance des nombres adimensionnels lorsque ceux-ci sont utilisés comme critères de mise à l'échelle (Mavituna, 1996). Les nombres adimensionnels sont des rapports de temps sur les phénomènes impliqués. En gardant les nombres adimensionnels constants, le rapport des phénomènes impliqués dans le procédé demeure constant (Mavituna, 1996). Lorsqu'il est impossible de garder tous les nombres adimensionnels constants, il est nécessaire de choisir ceux qui ont un impact majeur, de les conserver et de négliger les autres.

Par contre, le maintien des rapports géométriques ne peut à lui seul garantir le succès de la mise à l'échelle. L'utilisation seule des similarités géométriques pour la mise à l'échelle peut devenir un piège lorsque la phénoménologie n'est pas comprise.

Le Tableau 2.6 présente les effets des principaux critères de mise à l'échelle selon Mavituna (1996) pour une mise à l'échelle d'un bioréacteur de 10 à 10 000 L avec une géométrie préservée. Le tableau montre les effets sur les critères de mise à l'échelle lorsqu'un critère est choisi pour la mise à l'échelle.

Tableau 2.6 : Effets des critères de mise à l'échelle

Critères	P	P/V	N	ND	Re
P/V constant	10^3	1	0.22	2.15	21.5
N constant	10^5	10^2	1	10	10^2
$V_{\text{bout de pale}}$ constant	10^2	0.1	0.1	1	10
Re constant	0.1	10^{-4}	10^{-2}	0.1	1

2.7.2 Agitation

Une agitation efficace est primordiale afin de mettre les cellules en suspension, d'assurer le transport des nutriments à toutes les cellules (Reisman, 1993) et d'éviter les zones mortes (Sie et Krishna, 1998). Sie et Khrisna (1998) suggèrent de maintenir le rapport géométrique $d_{\text{hélice}}/D_{\text{réservoir}}$ au lieu de la vitesse d'agitation afin de favoriser la mise à l'échelle du mélange.

Merchuk (1991) rapporte que les résultats théoriques montrent qu'en général, la mise à l'échelle dans un réservoir géométriquement similaire ne devrait pas être néfaste pour les cellules si la puissance spécifique (P/V) est maintenue constante. Par contre, le tableau 2.6 montre qu'il y a une différence significative entre le nombre de Re et le cisaillement générée (vitesse de bout de pale) pour la même puissance spécifique. Le dommage aux cellules serait causé par les « eddys » microscopiques du liquide présentés par la théorie de Kolmogoroff (Merchuk, 1991). Par conséquent, la puissance

spécifique (P/V) n'est pas un bon critère pour la mise à l'échelle de cellules végétales. Le nombre de Reynolds n'est pas plus utile. Il représente une mesure du mélange turbulent macroscopique, i.e. un taux égal de turbulence mais un écoulement inégal. Le cisaillement associé par la vitesse en bout de pâle est un critère plus important pour la mise à l'échelle de cellules végétales en suspension.

2.7.3 Aération

Le succès de la mise à l'échelle dépend de l'oxygénation suffisante de toutes les cellules dans le bioréacteur lorsque le débit d'aération est faible. Le taux de transfert d'oxygène (*Oxygen Transfert Rate : OTR*) doit suffire à la demande en oxygène des cellules (*Oxygen Uptake Rate : OUR*) selon :

$$\frac{dC_{O_2 \text{ liquide}}}{dt} = OTR - OUR \quad (2.20)$$

$$OUR = q_{O_2} X_c \quad (2.21)$$

$$OTR = k_L a (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}}) \quad (2.22)$$

Le $k_L a$ est le critère à préserver pour la mise à l'échelle des systèmes d'aération (Reisman, 1993). L'enrichissement de l'oxygène dans l'air est aussi une méthode efficace afin d'augmenter l'apport d'oxygène. Figueiredo et Calderbank (Kamen et coll., 1993) soulignent que la plupart des échecs de mise à l'échelle de bioréacteurs résultent de mauvais estimés de $k_L a$. Les corrélations empiriques développées pour un aérateur à petite échelle divergent souvent de la réalité à plus grandes échelles. Tilton et Russell (1982) soulignent que les mouvements du fluide sont rarement identiques à plus grande échelle. Même en augmentant la capacité de l'aérateur avec l'échelle, l'augmentation du débit conduit habituellement à une plus grande production de bulles

et inévitablement à une diminution du k_La marquée par un taux plus élevé de coalescence.

En résumé, la croissance de cellules végétales en suspension nécessite un apport en nutriments et en oxygène suffisant tout au long de la culture. L'augmentation de la viscosité de la suspension sous de haute densité nécessite le design d'un agitateur efficace pour maintenir les cellules en suspension. Seul le bioréacteur agité mécaniquement à l'aide du ruban hélicoïdal (Jolicoeur, 1990) montre son efficacité de mélange pour les suspensions cellules végétales.

De plus, cette viscosité réduit le transfert gazeux en augmentant le taux de coalescence des bulles produites par l'aérateur. Le dégazage du CO_2 et la production de mousse font de l'augmentation du débit gazeux une solution inefficace pour maintenir le k_La tout au long de la culture. La compréhension des mécanismes de formation de bulles montre que la production de bulles de dimension inférieure à 2 mm est nécessaire afin de maximiser le k_La . La revue des différents systèmes d'aérations montrent que seul la membrane perforée et les aérateurs poreux peuvent respecter cette condition.

3.0 MÉTHODOLOGIE EXPÉRIMENTALE

3.1 Transfert gazeux

3.1.1 Montages expérimentaux

Trois réservoirs de 5 L ont été développée comme modèle à froid. Les dimensions de chacun des réservoirs sont présentées au Tableau 3.1. Un schéma et une photographie du montage sont présentés aux Figures 3.1 et 3.2. Les réservoirs 1 et 3 étaient en acrylique tandis que le réservoir 2 était en verre.

Tableau 3.1 : Dimensions des réservoirs

	H	D	H/D
	mm	mm	
Réservoir 1	217	172	1.3
Réservoir 2	283	150	1.9
Réservoir 3	437	121	3.6

Les hélices à ruban hélicoïdal étaient construites au laboratoire à l'aide de tiges de fer, de la colle, du plastique et de pipette. Elles étaient entraînées par un moteur (Stir-Pak Laboratory mixer, Cole Palmer Instruments ca) contrôlé. L'air alimentait le réservoir par un débitmètre contrôleur massique (Brooks Mass Flow Controlers 5850, Polycontrôle inc.). La dispersion de l'air en bulles était assurée par une plaque poreuse (Pall inc.). La mesure de l'oxygène dissous s'effectuait par une sonde polarographique (Inglod). Un système d'acquisition de données par ordinateur (Bioexpert inc., Québec, Canada) effectuait l'acquisition de données et le contrôle du débit gazeux.

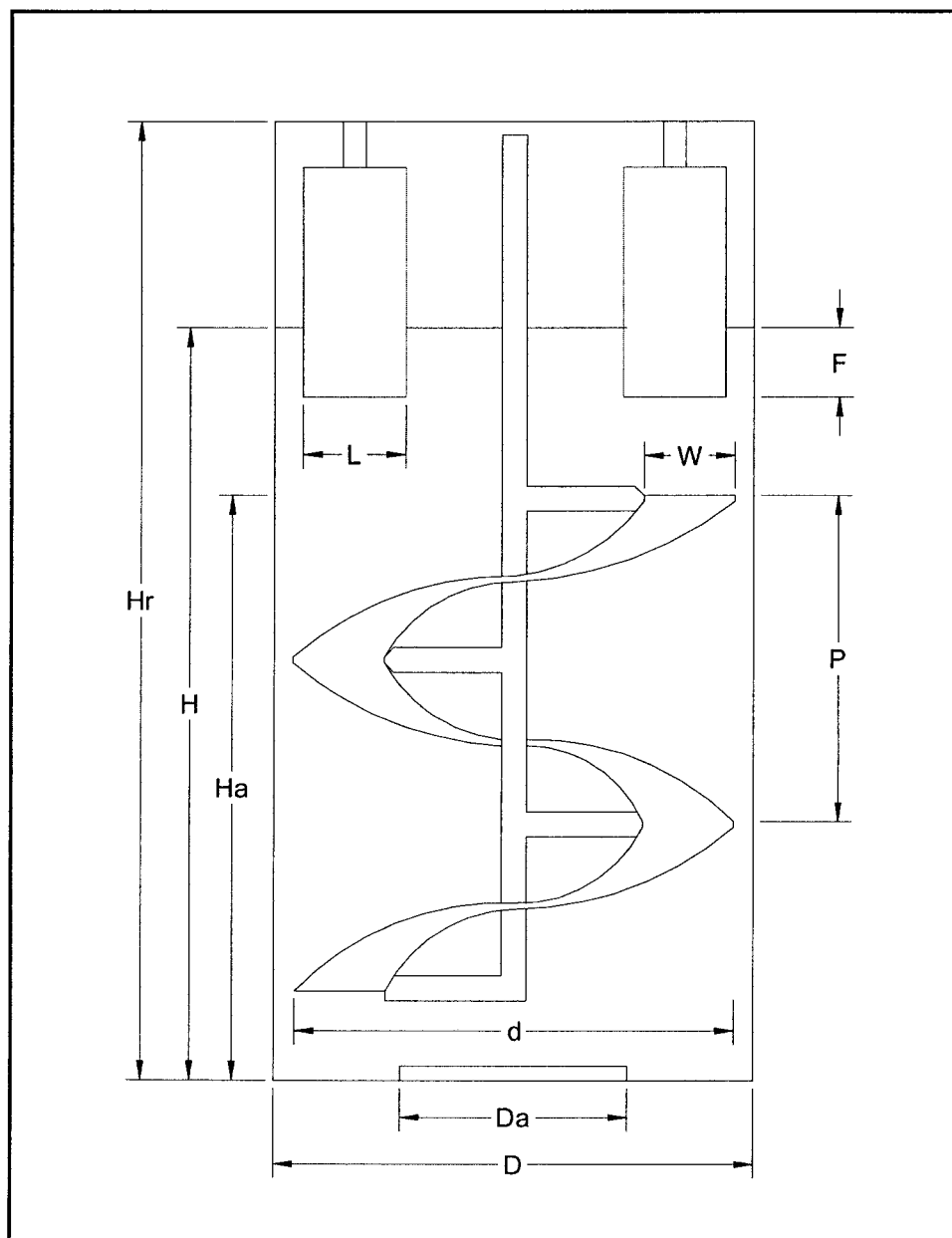


Figure 3.1 Dimensions d'un réservoir



Figure 3.2. Montage expérimental

Récemment, Herbard et coll. (1996) ont montré que les performances du transfert de masse d'un diffuseur poreux sont affectées par les procédures de mises en route. Pour de meilleurs résultats, l'introduction d'air dans le réservoir doit débiter avant l'introduction du liquide. Une étude de Prakash et Briens (1990) montre que le

coefficient de transfert de masse lors d'un démarrage où l'air est introduit avant le liquide est plus élevé de 15% que la situation inverse. Lorsque le liquide est introduit en premier, plusieurs pores sont bouchés par l'eau. Seulement une fraction de ces pores redevient libre lorsque l'air est introduit. La conséquence directe d'un nombre plus faible de pores actifs est une augmentation de la vitesse superficielle du gaz dans l'orifice et la production de bulles de diamètres supérieures. Par conséquent, tous les essais ont été effectués en introduisant le gaz avant le liquide.

3.1.2 Mesure de la rétention gazeuse

La rétention gazeuse a été mesurée par la méthode d'expansion du volume (Gavrilescu et Roman, 1994). L'équation 3.1 a été utilisée afin de calculer la rétention gazeuse.

$$\varepsilon = \frac{V_g}{V_L} = \frac{V_{aéré} - V_L}{V_L} \quad (3.1)$$

Un système similaire à celui utilisé par Fiset (2000) a été fabriqué et installé sur le modèle à froid de 5 L ($H/D = 1,9$). L'air était introduite par l'aérateur poreux pendant 5 minutes avant chaque lecture afin d'atteindre le régime permanent. Suite à la lecture ($V_{aéré}$), le débit d'air était arrêté. La lecture du volume de liquide V_L était effectuée après 5 minutes suite à l'arrêt afin de laisser le temps aux bulles de sortir du liquide. L'effet de la paroi n'a pas été pris en compte tel que proposé par Uno et Kintner (1956) pour le critère suivant :

$$\frac{d_b}{D} < 0.1 \quad (3.2)$$

Ce critère est respecté tout au long de l'étude.

3.1.3 Mesure du diamètre des bulles

La méthode photographique a été utilisée pour mesurer le diamètre des bulles. Cette méthode est la plus utilisée par les différents chercheurs (Mehta et Sharma, 1971; Buchholz et coll., 1978; Deckwer et coll., 1980; Tsuge et coll., 1981; Fraser et coll., 1983; Guy, 1984; Iguchi et coll., 1998; Gomez et coll., 2000). Elle a l'avantage d'être simple contrairement à la méthode par atténuation de lumière (Guy, 1984) et la méthode par électro-résistivité (Kim et Kim, 1990; Iguchi et coll., 1995). Le problème majeure de la méthode photographique est d'éliminer l'effet de la paroi et d'identifier les bulles qui sont dans le plan de mise au point (Guy, 1984). Deckwer et coll. (1980) rapportent que l'erreur de mesure sur les bulles près de la paroi est inférieure à 30%.

Les photographies ont été prises avec un appareil Nikon (boitier Nikon F90X, lentille Nikon AF 50 mm). Une règle a été placée dans la colonne dans le plan de mise au point afin de permettre une meilleure mesure des bulles. Le coefficient de corrélation de 99 % présenté à l'annexe B montre que l'effet de la courbure n'est pas significatif sur une distance de 60 mm à partir de l'axe central. L'appareil est demeuré fixe pendant toutes les photographies. Des photographies monochromes ont été produites afin de faire ressortir les contrastes et de faciliter l'analyse.

Pour chaque photographie, la largeur et la hauteur (Figure 3.3) de 200 bulles ont été mesurées afin d'obtenir une mesure statistiquement valable tel que recommandé par Camarasa et coll. (1999).

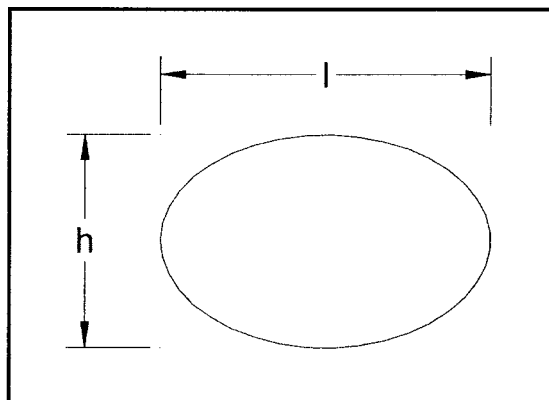


Figure 3.3. Dimension d'une bulle

Le diamètre équivalent d'une bulle sphérique de même volume a ensuite été calculé à partir de l'équation utilisée par Herbard et coll. (1996) :

$$d_b = (l^2 \cdot h)^{1/3} \quad (3.3)$$

3.1.4 Calcul de l'aire interfaciale

L'aire interfaciale a été calculée à partir de la rétention gazeuse (ε) et du diamètre des bulles (d_b) tel que suggéré par Figueiredo et coll. (1979) de même que par Arjunwadkar et coll. (1998) :

$$a = \frac{6 \cdot \varepsilon}{d_b \cdot (1 - \varepsilon)} \quad (3.4)$$

Un certain nombre de méthodes sont disponible pour estimer le diamètre de bulles. Le Tableau 3.2 montre les relations les plus couramment utilisées.

Tableau 3.2 : Relations les plus courantes pour l'estimation du diamètre des bulles

	Méthode de calcul
Diamètre moyen ($d_{b \text{ moy}}$)	$d_{b \text{ moyen}} = \frac{\sum d_{b,i}}{n}$
Diamètre de Sauter ($d_{b \text{ Sauter}}$)	$d_{b \text{ Sauter}} = \frac{\sum d_{b,i}^3}{\sum d_{b,i}^2}$

La distribution du diamètre des bulles n'est pas très uniforme comme le montre l'annexe C. Le nombre élevé de petites bulles tend à baisser le diamètre moyen des bulles même si le volume de gaz de ces bulles n'est pas très représentatif du volume total. Par conséquent, il est plus juste d'utiliser un diamètre équivalent basé sur l'aire totale telle que calculée à l'aide des équations 3.5 et 3.6.

$$A_{\text{Totale}} = \sum 4\pi \left(\frac{d_{b,i}}{2} \right)^2 = n \cdot \left(4\pi \left(\frac{d_{b \text{ équivalent}}}{2} \right)^2 \right) \quad (3.5)$$

$$d_{b \text{ équivalent}} = \left(\frac{A_{\text{Totale}}}{n \cdot \pi} \right)^{0.5} \quad (3.6)$$

Pour chaque condition expérimentale, l'aire de 200 bulles a été calculée et le diamètre équivalent a été utilisé pour le calcul de l'aire interfaciale de la population de bulles.

3.1.5 Mesure du $k_L a$

Les méthodes de mesure du $k_L a$ comprennent les méthodes chimiques et les méthodes dynamique (Yang et coll., 1988; Chang et coll., 1989; Gauthier et coll., 1991). Les méthodes chimiques utilisent un oxydant, habituellement du sulphite en présence d'un catalyseur cuivreux, qui réagit avec l'oxygène. La mesure du coefficient de transfert volumique s'obtient en effectuant un bilan de masse sur l'oxygène et en titrant le produit de la réaction chimique dans le temps. La difficulté de cette méthode est de déterminer avec précision la constante de cinétique (Kamen et coll., 1993; Tribe et coll., 1995) de même que le coût des produits. Les méthodes dynamiques comprennent la méthode par bilan gazeux et la méthode d'échelon dans la concentration d'oxygène du gaz d'entrée. La méthode par bilan sur l'oxygène demande plusieurs mesures tel que le débit gazeux, la fraction molaire d'oxygène dans le gaz d'entrée et dans le gaz de sortie et la concentration d'oxygène dissous (Badino et coll., 2000). Des problèmes de fiabilité du moniteur à oxygène ont rendu la mesure de la fraction d'oxygène dans le gaz de sortie impossible. La méthode de changement dans la concentration d'oxygène a donc été utilisée pour tous les essais du projet. La méthode consiste à enregistrer la concentration d'oxygène dissous dans le temps suite à un changement de la concentration du gaz d'entrée (Linek et coll., 1989). Le bilan sur l'oxygène est montré à l'équation (3.7).

$$\frac{dC_{O_2 \text{ liquide}}}{dt} = k_L a (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}}) \quad (3.7)$$

La résolution de l'équation différentielle donne une équation linéaire (équation 3.8).

$$-\ln (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}}) = k_L a \cdot t + k_3 \quad (3.8)$$

Le graphique de $-\ln (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}})$ en fonction du temps t donne une droite de pente égale à $k_L a$. De l'azote était d'abord introduit à un débit et à une agitation

constante. Lorsque la concentration d'oxygène dissous était nulle, de l'air était introduit au même débit et à la même agitation. L'essai était arrêté lorsque la concentration d'oxygène atteignait sa valeur d'équilibre avec l'air. Seules les valeurs entre 20 et 80% de la concentration de saturation en oxygène en équilibre avec l'air ont été retenues afin de supprimer les effets de bouts. Les coefficients de régressions linéaires obtenus ont toujours été supérieurs à 99%. Trois essais ont été effectués pour chaque condition d'opération. Le temps de réponse de la sonde a été négligé. Plusieurs auteurs (van't Riet, 1979; Kamen et coll., 1993; Tribe et coll., 1995; Montes et coll., 1999) rapportent que l'erreur sur le coefficient de transfert d'oxygène causé par la négligence du temps de réponse de la sonde est plus petit que 6% lorsque :

$$k_L a < \frac{1}{t_e} \quad (3.9)$$

Le temps de réponse de la sonde était de 30 s pour la sonde utilisée dans les réservoirs modèles et de 10 s pour le bioréacteur final de 5 L. Ceci implique que le temps de réponse de la sonde peut être négligé pour des mesures de $k_L a$ allant jusqu'à 120 h⁻¹ et 360 h⁻¹, ce qui est largement au dessus des $k_L a$ obtenus dans ce projet.

3.2 Mélange

3.2.1 Mesure des temps de mélange

Les temps de mélange effectués dans les prototypes de 5 L ont été mesurés par colorimétrie. Des solutions de 1 N de HCl et de 1 N de KOH furent utilisées. Le rouge de phénol a servi d'indicateur. Il présente une couleur jaune en milieu acide et une couleur pourpre en milieu basique. Le point de virage était trouvé par essai et erreur. Par la suite, 5 gouttes de la solution de HCl ou de NaOH étaient ajoutées à l'aide d'une micro-pipette en verre. Le temps de mélange était défini comme étant le temps nécessaire à

la disparition totale de la couleur d'origine suite à l'ajout de la première goutte d'acide ou de base. Chaque essai fut répété de 6 à 15 fois.

3.2.2 Description des suspensions modèles

L'eau a été utilisée pour représenter le comportement du bioréacteur sans cellule. Le milieu visqueux produit par les cultures de cellules végétales a été représenté par une suspension d'agar granuleux et une suspension de résine XAD-16 (Sigma).

L'agar granuleux était préparé en gélifiant une solution aqueuse à 5.8 % d'agar (Sigma) par un cycle à 121°C à l'autoclave et en laissant refroidir à la température de la pièce. Le gel était ensuite broyé à l'aide d'un mélangeur (Osterizer, Sunbeam) en présence d'eau jusqu'à l'homogénéisation de la suspension de fines particules. La suspension était ensuite filtrée et la masse humide d'agar servait de base à l'élaboration des suspensions modèles. Une concentration d'agar de 400 g M.H./L a été utilisée. Cette concentration correspond à un rapport volume d'agar/volume de suspension (SCV : *sedimented cells volume*) variant entre 86 et 88 %. Selon les travaux de Jolicoeur (1990), cette concentration correspond à une viscosité d'environ 0.5 Pa s. Avant chaque essai, le SCV de 400 g M.H/L de l'agar granulé était mesuré. Pour chaque suspension dont le SCV ne se trouvant pas dans l'écart de 85-90 %, l'agar était rejeté (ou regranuler selon le cas).

La préparation des suspensions de résines était produite en humidifiant la résine. La masse humide de résine servait de base à l'élaboration des suspensions. Une concentration de 400 g M.H/L de résine a été choisie pour représenter le milieu visqueux, ce qui correspond à la masse atteinte dans les bioréacteurs à une haute densité cellulaire.

La suspension d'agar n'a pas été retenue pour les mesures de transfert gazeux. La suspension d'agar colmatait la membrane de la sonde à oxygène dissous et rendait la

reproduction de la mesure impossible à réaliser. La détérioration partielle de l'agar dans le temps s'est aussi avérée problématique. La résine XAD-16 a été choisie pour caractériser le transfert gazeux en milieu visqueux car elle possède une masse volumique semblable à celle des cellules végétales. Elle n'a cependant pas pu être utilisée pour la mesure des temps de mélange. L'adsorption à la surface de la résine du rouge de phénol rendait le changement de couleur difficile à percevoir et faussait les résultats. L'agar a donc été utilisé pour mesurer les temps de mélange en milieu visqueux. On a cependant été constaté que l'agar subit une dénaturation sur une période de plus de 24 heures en raison des fortes variations de pH. Les temps de mélange ont été mesurés dans une période inférieure à 24 heures.

3.3 Cisaillement

La mesure du cisaillement en culture est extrêmement ardue car il est impossible de mesurer le torque de l'hélice en présence du joint mécanique d'étanchéité (Sucker et coll., 1994). L'estimation du cisaillement a été réalisée par simulations effectuées par l'équipe de recherche du Dr. François Bertrand de l'École Polytechnique de Montréal de l'Unité de Recherche sur les Procédés d'Écoulement Industriels (URPEI). Son groupe a mis au point un logiciel pour prédire les écoulements par la méthode des éléments finis.

Chaque série de simulations prenait environ une semaine à converger pour un point donné en viscosité. Les simulations possèdent cependant leurs limites. La modélisation d'un mélange air-liquide est extrêmement difficile et ne peut être réalisée à l'aide du logiciel. La géométrie de la cuve doit également être symétrique par rapport au point central. Tout élément asymétrique prolonge la durée des simulations.

3.4 Cultures de cellules végétales en suspension

3.4.1 Lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée lors de ce projet est de l'espèce *Eschscholtzia californica*. Elle a été développée par le Dr. Robert Williams de la compagnie Phytobiotech inc. Elle est cultivée dans du milieu B5 (Annexe A) auquel ont été ajoutés 0.2 mg L^{-1} d'acide 2-4 dichlorophenoxyacétique, 0.1 mg L^{-1} de kinétine, 30 g L^{-1} de glucose et 5 mM d'ammonium citrate. Une solution de KOH 1N permettait d'ajuster le pH à 5.5 avant la stérilisation (25 minutes, 121°C , 1 bar).

Les suspensions cellulaires sont maintenues sur un agitateur orbitale (100 rpm) dans des flacons de 500 ml. Un volume de 240 ml de suspension était cultivé en présence de lumière à une température de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Les sous-cultures sont effectuées périodiquement lorsque le volume de cellules sédimentées (SCV) se situait entre 50 et 75%.

3.4.2 Analytique

Les concentrations en ions et en glucose sont déterminées par chromatographie en phase liquide. Les cations et les anions sont analysés à l'aide d'un HPLC avec un détecteur électrochimique (Dionex) opéré en mode conductivité. La phase mobile est une solution aqueuse d'acide méthanosulfonique 20 mM alimentée à 0.9 ml min^{-1} pour les anions et une solution aqueuse de bicarbonate ($35 \text{ mM Na}_2\text{CO}_3$ et 1.0 mM NaHCO_3) alimentée à 1.0 ml min^{-1} pour les cations. Une pompe (Dionex) sert à l'alimentation des solutions. La commande de la pompe et de l'injecteur automatique (AS3500, Spectra System) ainsi que l'acquisition de données est accomplie par le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex).

Les glucides sont analysés à l'aide d'un HPLC muni d'un détecteur à indice de réfraction (7515-A, ERC Inc). La phase mobile est de l'eau déionisée alimentée à 0.25 ml min^{-1} par une pompe (modèle 501, Waters). La séparation (saccharose, glucose, fructose) est effectuée à l'aide d'une colonne analytique (Aminex HPX87C, Biorad) maintenue à $80 \pm 3^\circ\text{C}$ par un élément chauffant (7980, Mantech). L'acquisition de données est accomplie par le logiciel PeakNet 5.2 (Dionex).

4.0 ÉTUDES DES PARAMÈTRES DE CONCEPTION

4.1 Technologie d'aération

4.1.1 Choix de la technologie

Deux technologies ont été étudiées pour la conception du système d'aération : la plaque perforée et le diffuseur poreux. L'aération de surface ne permet pas d'atteindre un $k_L a$ élevé et les membranes trouées ne sont pas stérilisables. La proximité des pores de l'acier poreux provoque un certain degré de coalescence à la surface du diffuseur. Ce problème peut être résolu en construisant un aérateur dont les orifices sont fixés à une distance évitant qu'une bulle n'entre en contact avec une autre lors de leur formation. Il n'existe pas d'étude caractérisant le comportement et la formation des bulles pour une plaque perforée avec des orifices inférieurs à 1 mm. Une étude a donc été entreprise pour déterminer le diamètre des bulles formées à l'orifice sous différents débits gazeux par orifices. Différentes plaques comprenant un seul orifice furent fabriquées et testées. La Figure 4.1 résume les résultats de cette étude.

Ces résultats montrent que le volume des bulles formées est supérieur aux bulles produites par un aérateur poreux. La présence d'un grand nombre (> 100) d'orifices de 350 μm auraient certainement réduit la dimension des bulles mesurées par la diminution de la vitesse superficielle du gaz au travers des orifices pour un même débit. Par contre, les résultats pour les plus faibles débits ne montrent pas de diminution significative du diamètre des bulles mesurées. La fabrication d'une plaque de plusieurs orifices de cette dimension pose des problèmes mécaniques. L'option de la plaque perforée a donc été abandonnée et les efforts ont été concentrés sur la conception d'un aérateur poreux en acier inoxydable.

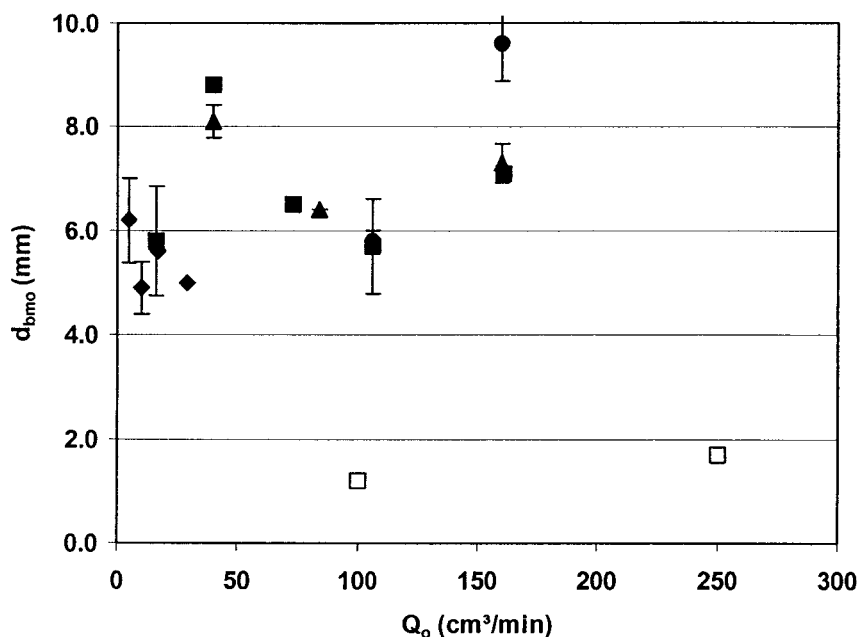


Figure 4.1. Diamètre des bulles mesurées à l'orifice selon de diamètre de l'orifice dans l'eau: (♦) d_o : 350 μm ; (■) d_o : 500 μm ; (▲) d_o : 750 μm ; (●) d_o : 1000 μm ; (□) plaque poreuse d_o : 0.4 μm .

4.1.2 Porosité du diffuseur

Le diamètre des orifices d'un diffuseur poreux est défini par sa porosité. Deux plaques de porosité différente (0.4 et 1.3 μm) furent testées pour déterminer l'influence de la porosité sur le transfert gazeux. Les résultats de la section précédente montre qu'en général, de plus petits orifices forment des bulles plus petites pour un même débit. Des plaques de porosité supérieure n'ont pas été étudiées. Les essais ont été effectués dans le premier réservoir de 5 L ($H/D=1.3$) avec une hélice à ruban hélicoïdal aux rapports géométriques similaires à celle utilisée dans les réservoirs de 3 L (Annexe D). La vitesse d'agitation a été fixée à 34 rpm afin de maintenir le nombre de Re constant. La même surface de bullage a été utilisée pour les deux plaques. La Figure 4.2 présente les résultats.

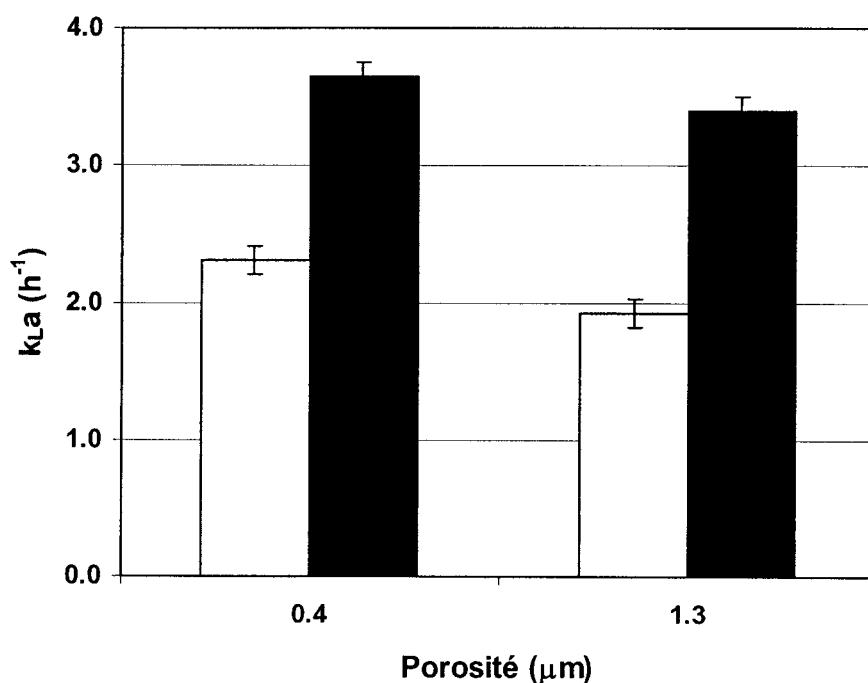


Figure 4.2. $k_{L,a}$ dans l'eau en fonction de la porosité du diffuseur: (□) 0.06 vvm; (■) 0.02 vvm.

La plaque de porosité 0.4 μm montre une augmentation du $k_{L,a}$ de 20 % pour le débit de 30 cm³/min et de 7 % pour le débit de 100 cm³/min par rapport à la plaque de 1.3 μm. Cette augmentation se situe au-delà des erreurs sur la mesure (5 % et 3 % respectivement). La formation de bulles plus petites a aussi été observée avec la plaque de porosité 0.4 μm. Suite à ces résultats, la plaque de 0.4 μm a été retenue pour la suite des essais. Cette étude ne tient pas compte des problèmes d'encrassement que l'utilisation d'une plaque de faible porosité pourrait causer.

4.1.3 Rapport géométrique du bioréacteur

Le rapport géométrique du bioréacteur influence directement la hauteur de liquide et la surface du diffuseur. De plus, Coelho (2000) a montré qu'il était néfaste pour le k_La de buller sous les pâles d'un agitateur à ruban hélicoïdal. Une augmentation de la coalescence due au ruban et une vitesse ascensionnelle supérieure des bulles conduisent à un transfert gazeux inférieur. Par conséquent, un rapport géométrique élevé réduit la surface disponible pour un bullage efficace mais augmente le temps de résidence de la phase gazeuse. La probabilité de coalescence des bulles sera aussi plus élevée pour un réservoir de plus faible diamètre. Un faible rapport géométrique permet cependant de réduire la vitesse superficielle au diffuseur par une augmentation de l'aire transversale et de produire de plus petites bulles.

Des essais ont été réalisés dans trois cuves de 5 L de différents diamètres. Des hélices géométriquement semblables au bioréacteur de 3 L ont été utilisées (voir annexe D). La vitesse d'agitation a été déterminée pour chaque configuration de manière à garder le nombre de Reynolds constant ($0.052 \rho_L/\mu_L$). Le Tableau 4.1 présente les vitesses d'agitation utilisées.

Tableau 4.1 : Vitesse d'agitation en fonction du rapport H/D

H/D	Agitation (rpm)
1.3	34
1.9	45
3.6	70

La surface maximale de bullage fut utilisée pour chaque réservoir. Le diamètre de la surface de bullage fut déterminé en utilisant le diamètre inter-pâle (annexe D). Les résultats sont montrés à la Figure 4.3.

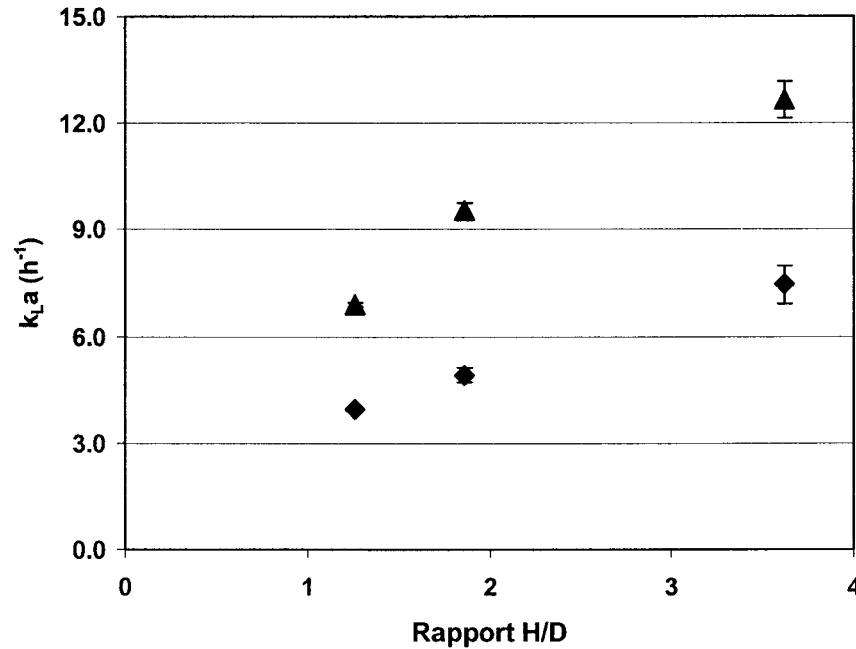


Figure 4.3. k_{La} dans l'eau en fonction du rapport géométrique des réservoirs: (◆) 0.02 vvm; (▲) 0.05 vvm. Sans chicanes de surface.

Pour les deux débits testés, l'augmentation du rapport géométrique conduit à une augmentation du k_{La} . À ces faibles débits, on observe que la formation des bulles ne se produit pas sur toute la surface de l'aérateur. Il y a tout lieu de croire que la vitesse superficielle du gaz par orifice est similaire pour les différentes géométries employées et que le principal facteur pouvant expliquer ces résultats est le temps de résidence des bulles dans la phase liquide. L'augmentation de la hauteur de liquide serait donc plus importants que l'augmentation du taux de coalescence causé par une diminution du diamètre du réservoir. Il existe un rapport optimal (> 3.6) qui n'a pu être déterminé lors de cette étude. Une diminution du diamètre augmentera inévitablement la probabilité d'une bulle d'en rencontrer une autre et de coalescer. Les performances devraient alors décroître. Selon ces résultats, le rapport H/D optimal se situerait entre 3 et 4.5 en tenant compte de l'erreur sur la mesure.

Les résultats montrent aussi que la valeur optimale du rapport H/D semble diminuer lorsque le débit d'aération est augmenté. Cette tendance suggère que le taux de coalescence supérieur à des débits plus élevés réduit la hauteur nécessaire pour atteindre un transfert maximum.

Le temps de mélange a été mesuré selon les différents rapports géométriques étudiés. Les résultats sont présentés à la Figure 4.4.

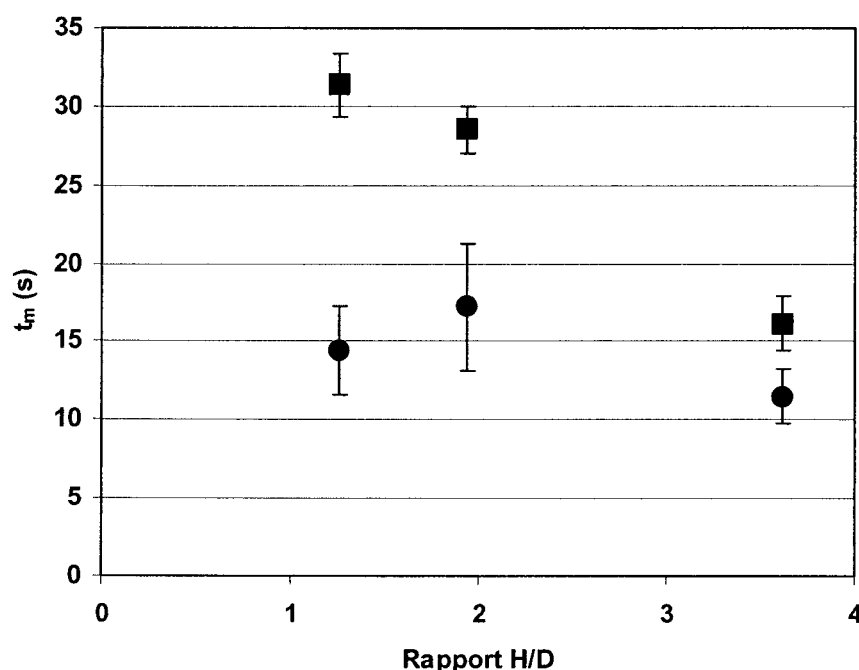


Figure 4.4. Temps de mélange en fonction du rapport géométrique des réservoirs: (●) eau; (■) agar (450 g M.H./L). ($Q=250 \text{ cm}^3/\text{min}$)

Il n'y a pas de différence significative pour les résultats obtenus avec l'eau ($13 \pm 10 \%$). Le ruban hélicoïdal présente l'avantage d'être plus efficace en milieu visqueux. La faible viscosité de l'eau suggère que le mélange s'effectue principalement par la génération de chaos dans l'écoulement du fluide plutôt que par la génération d'un patron d'écoulement défini. En milieu visqueux, les résultats dans l'agar montre que le temps de mélange diminue avec l'augmentation du rapport géométrique.

Dans les locaux actuels, le rapport H/D maximum physiquement réalisable pour un bioréacteur de 150 L est de 1.9. Cette valeur a donc été choisie pour la conception du bioréacteur de 5 L afin d'éviter des complications lors de la mise à l'échelle.

4.1.4 Rapports géométriques de l'hélice

La conception de l'hélice à ruban hélicoïdal pour les suspensions cellulaires nécessite un compromis entre l'efficacité de mélange, le transfert d'oxygène et le cisaillement maximal supporté par les cellules. Ces paramètres dépendent principalement de l'hydrodynamique du système. Les étapes de conception et l'optimisation de l'hélice sont donc très importantes. Cinq paramètres peuvent être ajustés pour la conception du nouveau ruban hélicoïdal : la vitesse d'agitation, l'entrefer, le pas de l'hélice, la largeur de la pale et la hauteur d'agitation.

La hauteur d'agitation doit être maximale afin de minimiser les zones mortes. Ensuite, l'effet de l'entrefer et de la vitesse d'agitation a été étudié à l'aide de simulations (section 4.1.5) alors que l'effet du pas de l'hélice et de la largeur de la pale a été déterminé par expérimentation.

Des rapports géométriques adimensionnels ont été utilisés pour la conception de l'hélice. Ces rapports sont le pas/diamètre de l'hélice (P/d) et le rapport largeur de la pale/diamètre de l'hélice (W/d). Ces rapports sont illustrés à la Figure 3.1. Même si le diamètre de l'hélice est constant pour tous les tests (140 mm), l'utilisation de rapports géométriques adimensionnels facilite la mise à l'échelle. Jolicoeur (1990) a démontré qu'un pompage du fluide ascendant à la paroi favorisait le transfert gazeux. Ce sens d'agitation a donc été choisi et la vitesse a été fixée à 60 rpm. L'aération est maintenue à 0.05 vvm pendant tous les tests. La Figure 4.5 présente les $k_L a$ alors que la Figure 4.6 présente les temps de mélange obtenus pour cinq types d'hélice étudiés.

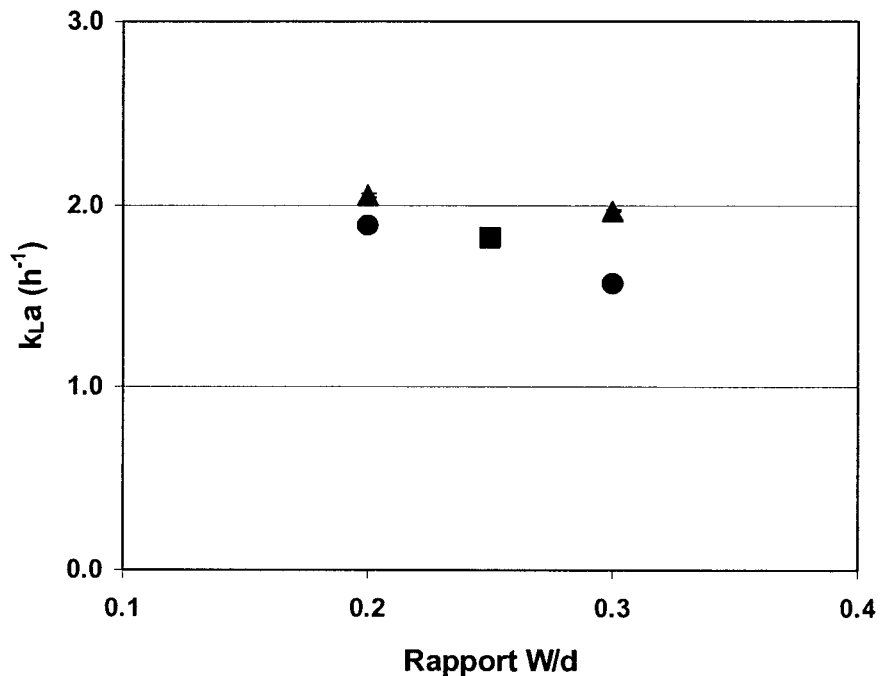


Figure 4.5. k_{La} en fonction des rapports géométriques de l'hélice W/d et P/d pour une suspension de résine (400g/L) : (●) $P/d = 0.63$; (■) $P/d = 1.04$; (▲) $P/d = 1.45$.

Les résultats de la Figure 4.5 sont très similaires et permettent difficilement de choisir une meilleure configuration d'hélice. Par contre, deux hélices présentent des temps de mélange inférieurs (Figure 4.6). Il s'agit des l'hélices ($P/d=1.45$ et $W/d=0.20$), ($P/d=0.63$ et $W/d=0.30$). Ces hélices (Figures E.1.A et E.1.B de l'annexe E) ont donc été retenues pour une seconde série d'essais.

Un nouveau type d'hélice a été élaboré pour la seconde série d'essais. Il s'agit d'une hélice hélicoïdale enroulée autour d'un tube concentrique (Figure E.1.C de l'annexe E) qui devrait favoriser le pompage du fluide en plus de ralentir l'ascension des bulles. Les essais ont été effectués dans l'eau afin d'amplifier les différences entre les k_{La} générés par les hélices. La Figure 4.7 présente les k_{La} obtenus.

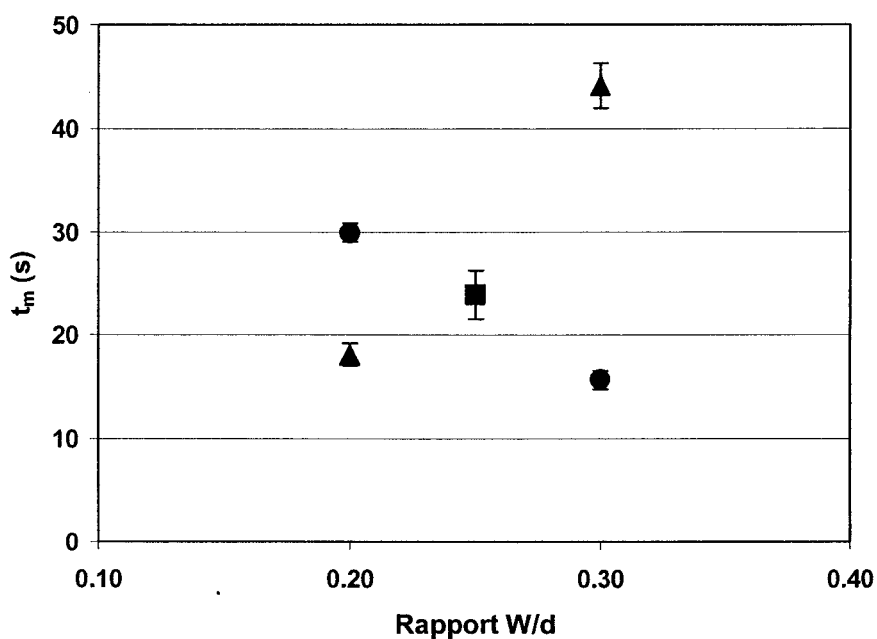


Figure 4.6. Temps de mélange en fonction des rapports géométriques de l'hélice W/d et P/d pour une suspension d'agar (450 g M.H./L) : (●) P/d = 0.63; (■) P/d = 1.04; (▲) P/d = 1.45.

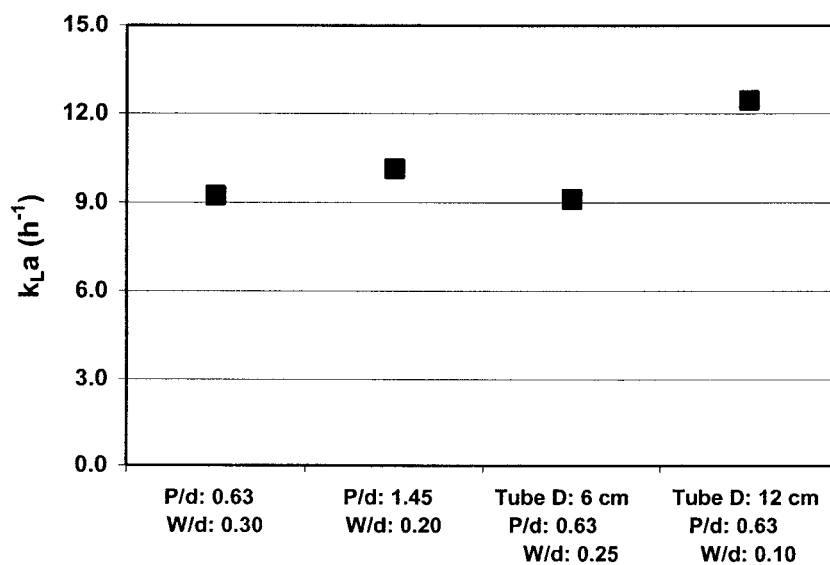


Figure 4.7. k_{La} selon le type d'hélice utilisée dans l'eau ($Q=0.05$ vvm, $N=60$ rpm)

L'hélice avec le tube concentrique de 12 cm de diamètre et une pale de 1 cm de largeur favorise le transfert gazeux en ralentissant la vitesse ascensionnelle des bulles alors que l'hélice avec le tube concentrique de 6 cm de diamètre n'est pas aussi efficace. Il a été observé que la majorité des bulles sont entraînées à l'extérieure du tube concentrique, sous les pâles dû à une vitesse descendante du fluide trop élevée dans le tube concentrique de 6 cm. Cette hélice a donc été éliminée des essais. La Figure 4.8 présente les temps de mélange obtenu pour les hélices retenues. Il n'y a pas de différences significatives entre les hélices utilisées. À ce stade de la conception, les trois hélices ont été retenues.

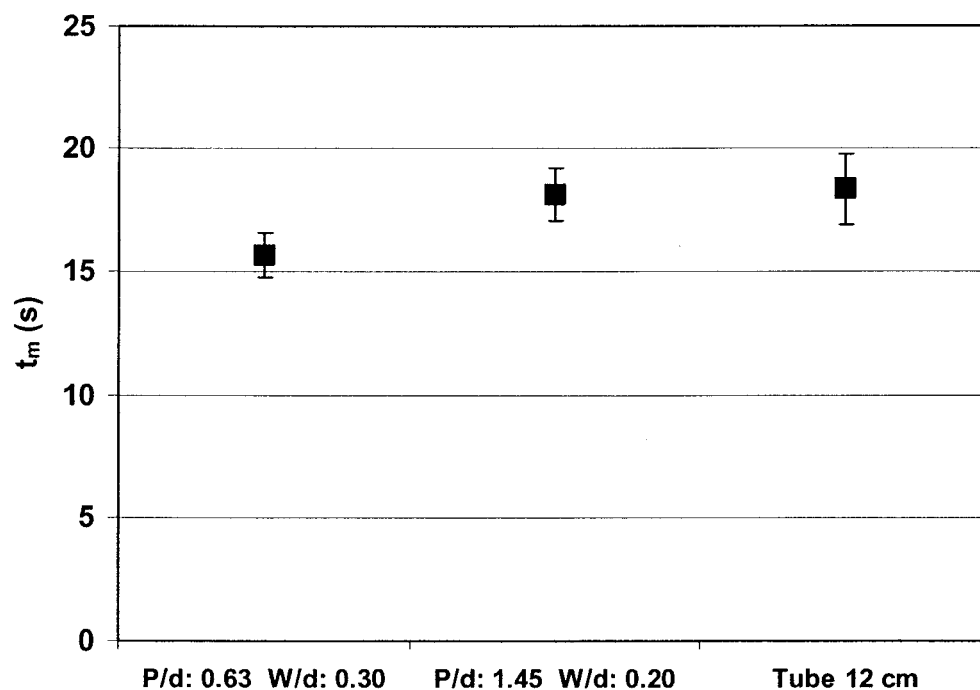


Figure 4.8. Temps de mélange dans l'eau selon le type d'hélice utilisée ($Q=0.05$ vvm, $N=60$ rpm).

4.1.5 Cisaillement

L'entrefer et la vitesse d'agitation affectent principalement le cisaillement imposé aux cellules. Il existe peu de données sur le cisaillement critique au-delà duquel la viabilité cellulaire diminue. Le groupe de recherche a déjà déterminé que la croissance de cellules d'*Eschscholtzia californica* n'est pas significativement affectée dans un bioréacteur de 3 L à 90 rpm alors qu'elle est complètement inhibée à 120 rpm (résultats non publiés). Des simulations ont été entreprises à l'École Polytechnique de Montréal avec le groupe de recherche du Dr. François Bertrand afin de caractériser le cisaillement dans les bioréacteurs de 3 L (entrefer de 10 mm). Les cartes de cisaillement obtenues à 60 rpm et 90 rpm sont présentées à l'annexe F. La Figure 4.9 résume les résultats obtenus par simulation pour le taux de cisaillement et la contrainte de cisaillement locale maximale.

La réponse d'un système biologique à un environnement hydrodynamique dépend de la durée et de l'intensité du stress. Le taux de cisaillement représente une mesure de l'intensité du stress sur les cellules tandis que la contrainte de cisaillement représente une mesure de la durée du stress. Le taux de cisaillement effectif subi par les cellules a été choisi comme critère de conception des nouvelles hélices. Une mortalité complète en quelques heures d'une suspension cellulaire en bioréacteur de 3 L à une vitesse d'agitation de 120 rpm suggère que ce ne soit pas la durée du stress imposé aux cellules qui est en cause mais plutôt l'intensité. Les résultats suggèrent que lorsque les cellules circulent dans une zone dépassant un cisaillement critique, elles cessent de croître ou meurent.

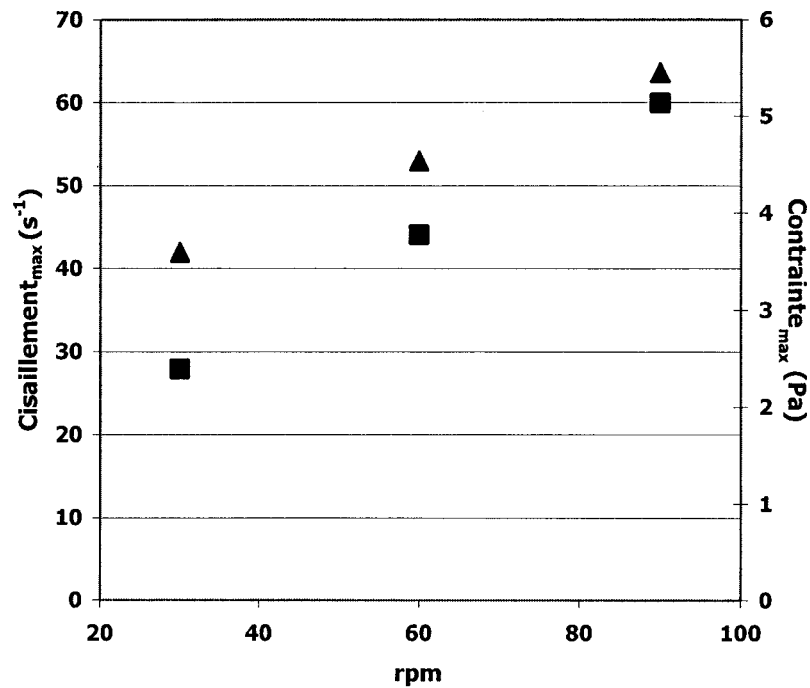


Figure 4.9. Résultats des simulations pour le bioréacteurs de 3 L : (■) Cisaillement; (▲) Contrainte. Résultats pour les indices m et n de 0.5.

Le cisaillement estimé par simulation à 90 rpm (environ 60 s^{-1}) a donc été choisi comme cisaillement maximum admissible pour la conception de l'hélice du nouveau bioréacteur. Les résultats des simulations montrent aussi que le milieu de culture est purement turbulent au départ ($Re \approx 2 \times 10^4$) puis tend vers un régime d'écoulement transitoire à mesure que la viscosité de la culture augmente (laminaire : $Re < 10$; transitoire : $10 < Re < 10^3$; turbulent : $10^3 - 10^4 < Re$). En régime transitoire, il n'existe aucune corrélation fiable pour prédire la puissance dissipée ou le cisaillement effectif moyen, contrairement aux régimes laminaire et turbulent.

Les effets de la conception de l'hélice à ruban hélicoïdal sur le cisaillement ont donc été estimés par simulation dans un bioréacteur virtuel de 5 L avec un rapport H/D de 1.9. Cinq essais ont été choisis afin de caractériser le taux de cisaillement effectif en fonction de la vitesse d'agitation et de l'entrefer. La largeur du ruban (35 mm), le pas

(145 mm) et la hauteur d'agitation (255 mm) ont été maintenus constants pour les simulations. Les modalités du plan expérimental sont résumées au Tableau 4.2.

Tableau 4.2 : Modalités du plan expérimental
pour la simulation du bioréacteur virtuel de 5 L

Paramètres	Unité	Symbole	Essai #1	Essai #2	Essai #3	Essai #4	Essai #5
Diamètre de l'hélice	mm	d	140	145	145	135	135
RPM	min ⁻¹	va	60	45	75	45	75

Les principaux résultats sont présentés au Tableau 4.3. Les figures correspondantes sont présentées à l'annexe G.

Tableau 4.3 : Principaux résultats de simulation du bioréacteur virtuel de 5 litres

Essai #	Agitation rpm	Entrefer mm	Contrainte _{max} Pa	Cisaillement _{max} s ⁻¹	Reynolds
1	60	5	4.1	34	39
2	45	2.5	5.4	60	27
3	75	2.5	7.0	100	59
4	45	8	3.0	21	24
5	75	7.5	10.7	33	n/d

Le cisaillement est donc fortement lié à l'entrefer et à la vitesse d'agitation. Seul l'essai avec un entrefer de 2.5 mm et une agitation de 75 rpm génère un cisaillement maximum (100 s⁻¹) supérieur au critère de conception (60 s⁻¹) sélectionné. Un modèle mathématique combinant les effets de l'entrefer et de la vitesse d'agitation a été développé en minimisant le carré de l'erreur entre les prédictions du modèle et les

points expérimentaux. La Figure 4.10 présente une surface de cisaillement générée par le modèle.

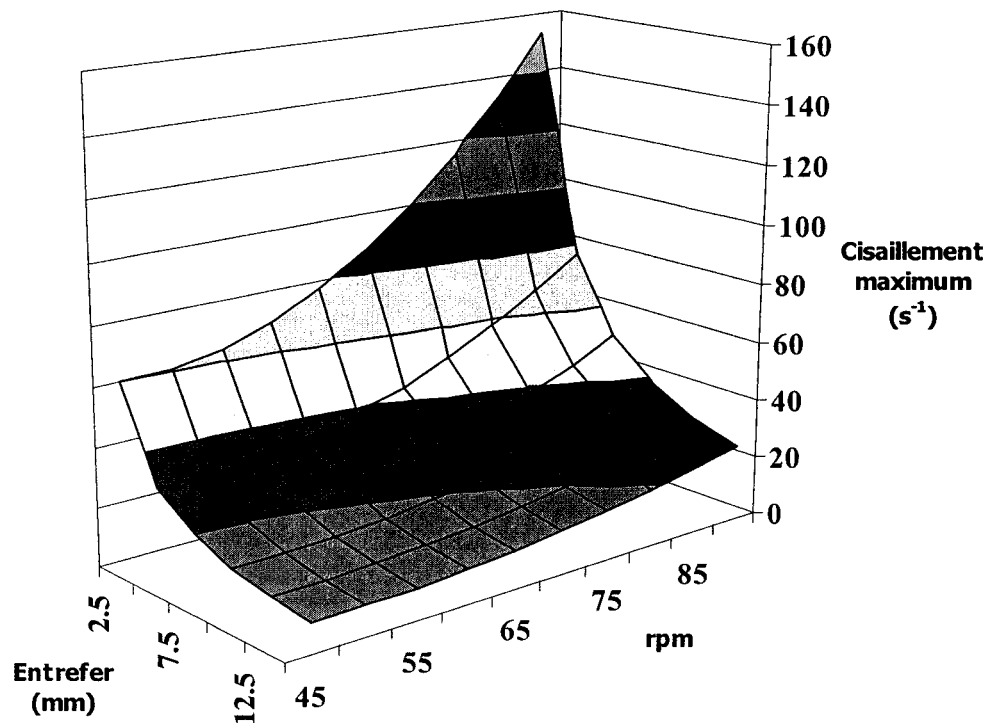


Figure 4.10. Surface de cisaillement en fonction de la vitesse d'agitation (rpm) et de l'entrefer (mm)

Selon ces résultats, un entrefer d'au moins 7.5 mm permet de respecter le critère de conception pour toute vitesse d'agitation inférieure à 95 RPM. Pour des considérations pratiques, un entrefer de 10 mm a été choisi. Le changement d'entrefer a été testé sur l'hélice ($P/d = 1.45$, $W/d = 0.20$) afin de déterminer son influence sur le $k_L a$. L'entrefer n'a que peu d'influence sur le $k_L a$ pour l'agitateur à ruban hélicoïdal comme le montre la Figure 4.11. L'augmentation de l'entrefer à 10 mm montre une augmentation du temps de mélange (Figure 4.12) pour une vitesse d'agitation de 60 rpm.

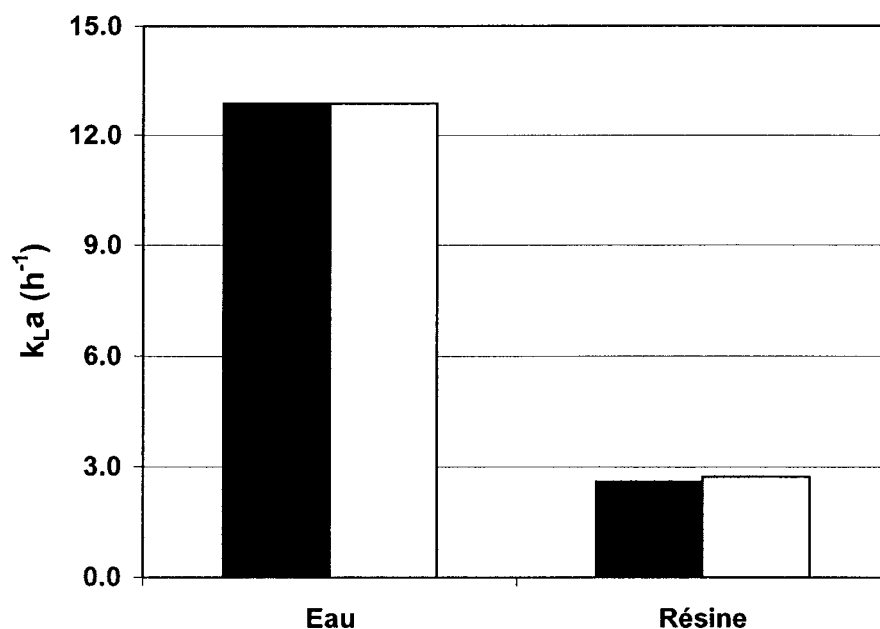


Figure 4.11. k_{La} dans l'eau et la résine (400 g/L) en fonction de l'entrefer : (■) entrefer : 5 mm; (□) entrefer : 10 mm. Essai en présence de trois chicane de surface (2 cm de profondeur). $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

Des essais ont ensuite été réalisés avec une hélice à ruban hélicoïdal simple et double. La présence d'un second ruban hélicoïdal n'améliore pas significativement les temps de mélange (Figure 4.13), autant avec l'eau qu'avec une suspension d'agar rhéo-fluidifiant. Ces résultats indiquent donc qu'un seul ruban est aussi efficace qu'un ruban double. Le ruban simple a été retenu car il permet de diminuer le cisaillement imposé aux cellules.

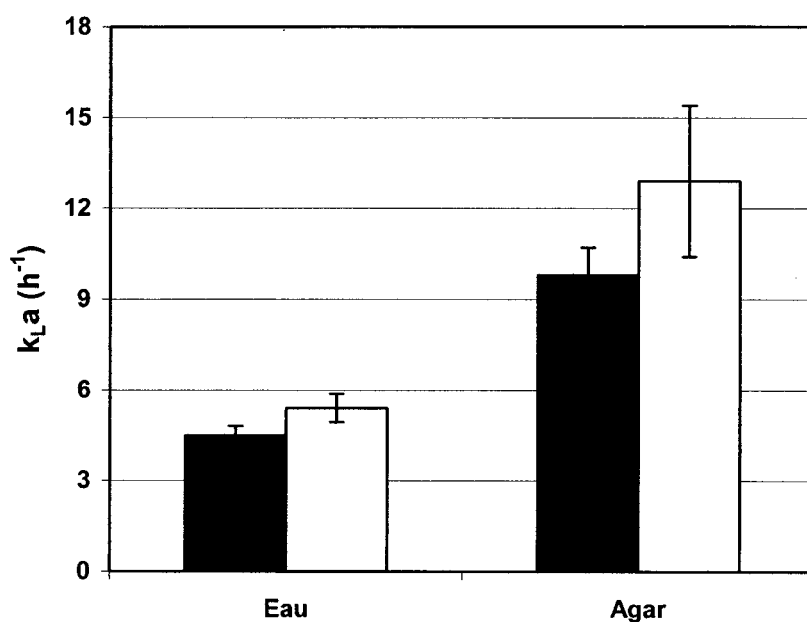


Figure 4.12. $k_L a$ dans l'eau et l'agar (400 g M.H./L) en fonction de l'entrefer : (■) entrefer : 5 mm; (□) entrefer : 10 mm. Essai en présence de chicane (2 cm de profondeur), $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

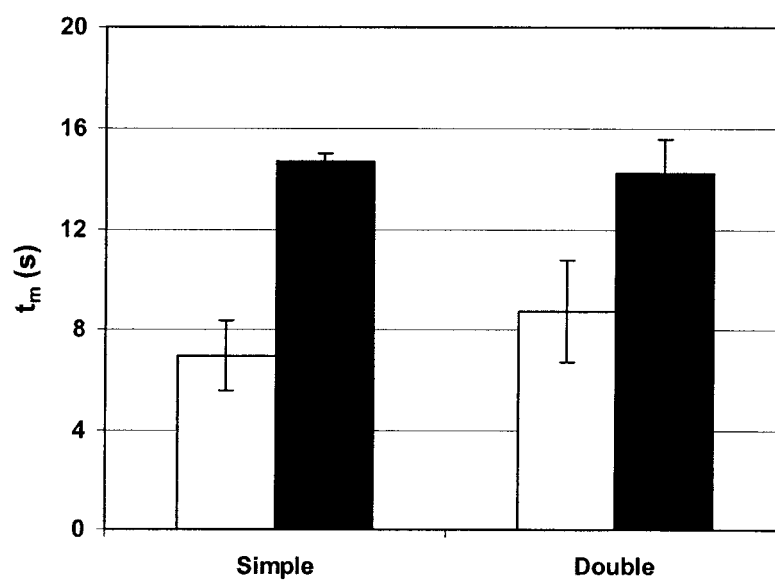


Figure 4.13. Temps de mélange avec le ruban simple et le ruban double (entrefer de 10 mm) : (□) Eau; (■) Agar (400 g M.H./L). $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

Par ailleurs, peu d'études ont été publiées sur le cisaillement développé par les bulles. Une publication de Michaels et coll. (1996) sur les cellules animales montre que l'interaction entre les bulles et les cellules dans la phase liquide n'est pas un mécanisme dominant lors de la mortalité des cellules. Les résultats suggèrent que l'énergie dissipée associée à la coalescence et au bris des bulles n'est pas suffisante pour causer du dommage aux cellules. Plusieurs auteurs (Kamen et coll., 1993; Merchuk et coll., 1994; Michaels et coll., 1996) s'entendent pour affirmer que la principale cause du dommage aux cellules causé par les bulles survient lors de leur désengagement de la phase liquide. Cherry et Hulle (1992) ont estimé que le taux de dissipation de l'énergie associé à la rupture du film liquide correspond à l'équivalent d'une longueur de « eddy » de 2 μm et d'une contrainte de cisaillement de 95 N/m^2 . Cette valeur se situe dans l'intervalle critique (25 et 350 N/m^2) trouvé par Joshi et coll. (1996) et Kieran et coll. (1997) pour *Morinda citrifolia*. L'absence de dommage mécanique aux cellules de *Catharanthus roseus* observé par Hegarty et coll. (1986) montre que de hauts taux d'aération ne causent pas de dommages physiques aux cellules végétales. De plus, Wongsamuth et Doran (1994) ont analysé la viabilité des cellules d'*Atropa belladonna* entraînées dans la mousse. La viabilité de ces cellules demeure élevée, ce qui suggère que les mécanismes tel que le bris des bulles et les phénomènes interfaciaux n'affectent pas les cellules végétales.

4.1.6 Présence de chicanes

Le design proposé par Jolicoeur (1990) comprenait trois chicanes de surface. Ces chicanes augmentent le k_La pour l'aération de surface et favorisent un meilleur temps de mélange. Depuis l'introduction de l'aération par bullage (Aubry, 1994) au bioréacteur à ruban hélicoïdal de l'équipe de recherche, l'aération de surface devint négligeable et les chicanes ont été enlevées. Les chicanes favorisaient alors l'accumulation de la biomasse dans la tête du bioréacteur.

Des essais ont été entrepris afin de caractériser l'influence des chicanes de surface sur le transfert gazeux et le mélange dans le bioréacteur. L'utilisation d'un ruban hélicoïdal empêche l'installation de chicanes en profondeur le long de la paroi du bioréacteur. Le nombre de chicanes de surface a été fixé à 3 car cette disposition permet leur utilisation maximale (Jolicoeur, 1990). Le transfert d'oxygène ne semble pas être dépendant de l'angle d'inclinaison radiale pour la plage de 10 à 30° (Jolicoeur, 1990). Elles ont été installées à 0° radialement. Jolicoeur (1990) n'a pas observé de différence significative entre des chicanes rectilignes et des chicanes avec une courbe. Les chicanes rectilignes ont été retenues pour la facilité de conception.

L'effet de trois chicanes de surface sur les performances des trois hélices retenues a été étudié. Les chicanes ont 4.5 cm de largeur et sont fixées à 2 cm de profondeur. Les Figure 4.14 et 4.15 présentent les résultats pour le k_La et pour le temps de mélange.

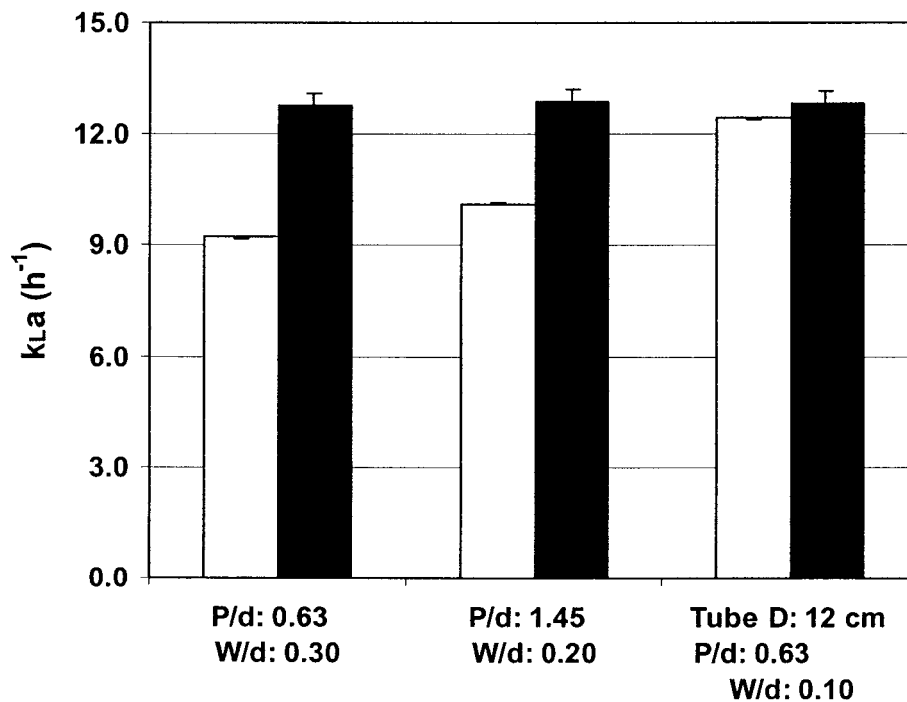


Figure 4.14. k_La mesuré dans l'eau selon le type d'hélice: (□) sans chicane; (■) avec chicanes. $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

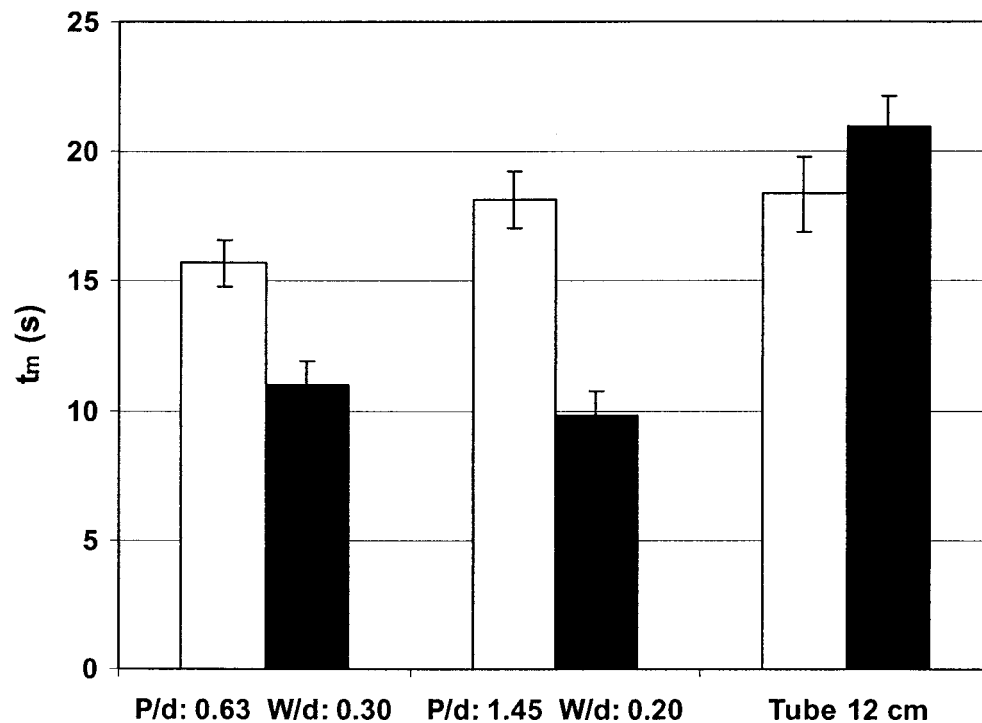


Figure 4.15. Temps de mélange mesurés dans l'agar (400 g M.H./L) selon le type d'hélice: ($\square$) sans chicane; ($\blacksquare$) avec chicanes. $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

Des observations visuelles montrent que l'utilisation de chicanes brise le vortex de liquide. Les résultats montrent que la présence de chicanes favorise le transfert avec les rubans hélicoïdaux mais ne produit pas d'effet significatif avec le tube concentrique de 12 cm. En effet, les $k_L a$ obtenus avec les rubans hélicoïdaux montrent une augmentation de 27 % et 38 %. De plus, la présence de chicanes diminue les temps de mélange des hélices hélicoïdales de 33 % et 50 %. Dans le cas de l'hélice à tube, le temps de mélange est augmenté de 10 %. Ces essais ont aussi été effectués avec de la résine (400 g/L) afin de simuler l'effet des chicanes de surface sur les coefficients de transfert d'une suspension. La Figure 4.16 présente les résultats obtenus.

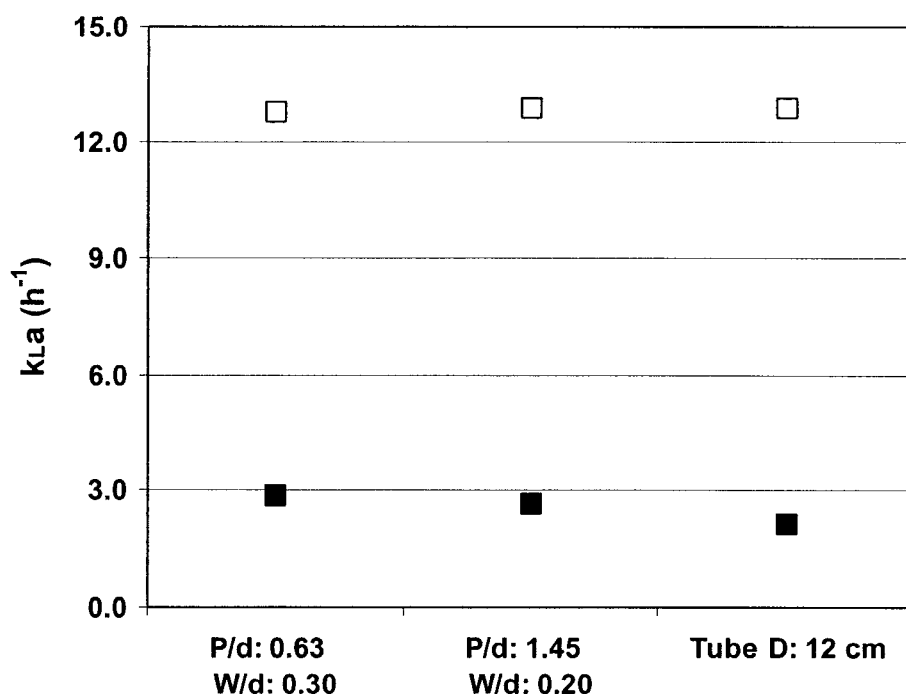


Figure 4.16. k_{La} mesuré selon le type d'hélice : (□) eau; (■) résine (400 g/L). $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

On observe que les k_{La} obtenus avec la suspension et des hélices simples sont au moins égaux sinon supérieurs à ceux de l'hélice à tube en milieu visqueux. Cette dernière présente aussi un désavantage important : elle ne peut être utilisée pour une opération à volume variable du bioréacteur. En effet, si le volume est inférieur au volume nominal d'opération, le liquide ne peut pas passer par-dessus le tube pour redescendre dans le centre. Il n'y a alors pratiquement plus de mélange. De plus, sa construction est plus complexe. L'utilisation de l'hélice hélicoïdale à tube concentrique a donc été abandonnée. L'hélice avec la configuration ($P/d=1.45$ et $W/d=0.20$) a été choisie pour la suite de l'étude. Elle possède une largeur de pale plus petite et permet ainsi d'utiliser une plus grande surface d'aération sans buller sous les pâles du ruban. Le Tableau 4.4 présente les caractéristiques de l'hélice retenue.

Tableau 4.4 : Configuration de la nouvelle hélice hélicoïdale

Diamètre (mm)	Entrefer (mm)	Largeur de pale (mm)	Pas (mm)
130	10	25	190

L'effet de la profondeur des chicanes a aussi été étudiée en gardant la distance entre l'agitateur et les chicanes constante à 1 cm. Une distance inférieure causerait une augmentation du cisaillement comme le montre les résultats de la section 4.1.5. Les résultats pour le $k_L a$ et le temps de mélange sont présentés aux Figure 4.17 et 4.18.

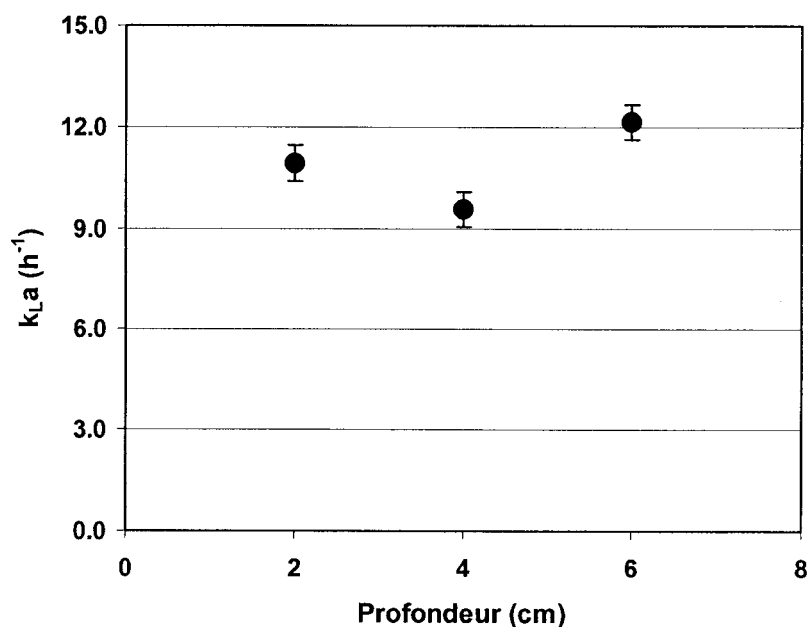


Figure 4.17. $k_L a$ mesuré dans l'eau en fonction de la profondeur des chicanes : (●) Eau. $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

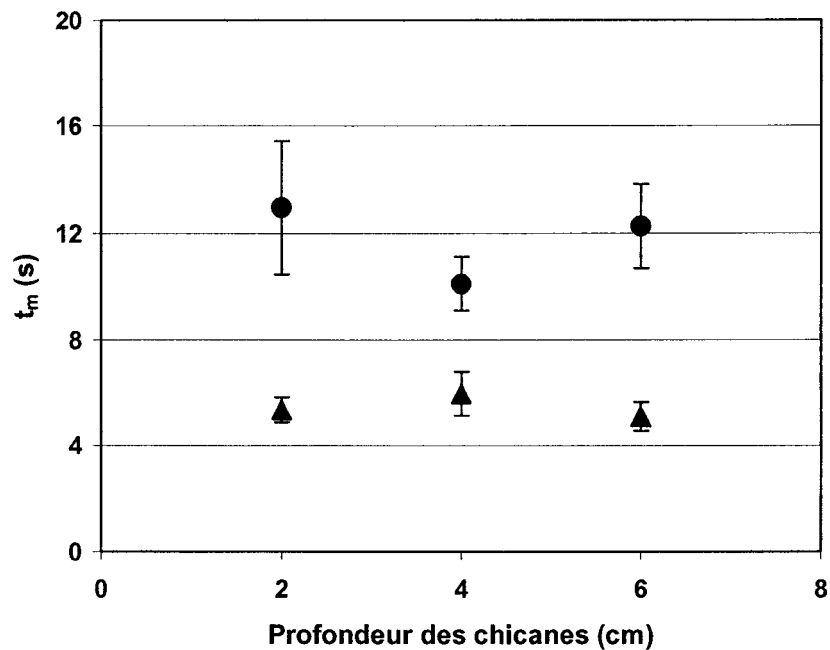


Figure 4.18. Temps de mélange mesurés en fonction de la profondeur des chicanes : (▲) eau; (●) agar (400 g M.H./L). $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

Ces résultats montrent qu'une immersion de 4 cm des chicanes diminue le coefficient de transfert. Cependant, aucune hypothèse ne peut expliquer cette tendance. En tenant compte de l'erreur expérimentale, la profondeur des chicanes n'a pas d'effet significatif sur la qualité du mélange à 60 rpm. Cette conclusion est valide à différentes viscosités du liquide comme le démontrent les résultats obtenus avec de l'eau et une suspension d'agar. Une profondeur des chicanes de 2 cm a été retenue pour la suite de l'étude car elle permet une hauteur d'agitation maximale.

La zone de cisaillement entre les chicanes et l'agitateur peut également être réduite en augmentant la distance entre ceux-ci. La hauteur d'agitation a donc été étudiée. Comme la profondeur des chicanes n'a pas d'effet sur le mélange, la profondeur des chicanes a été maintenue constante à 2 cm et la hauteur d'agitation a été changée. Les résultats sont présentés aux Figures 4.19 et 4.20.

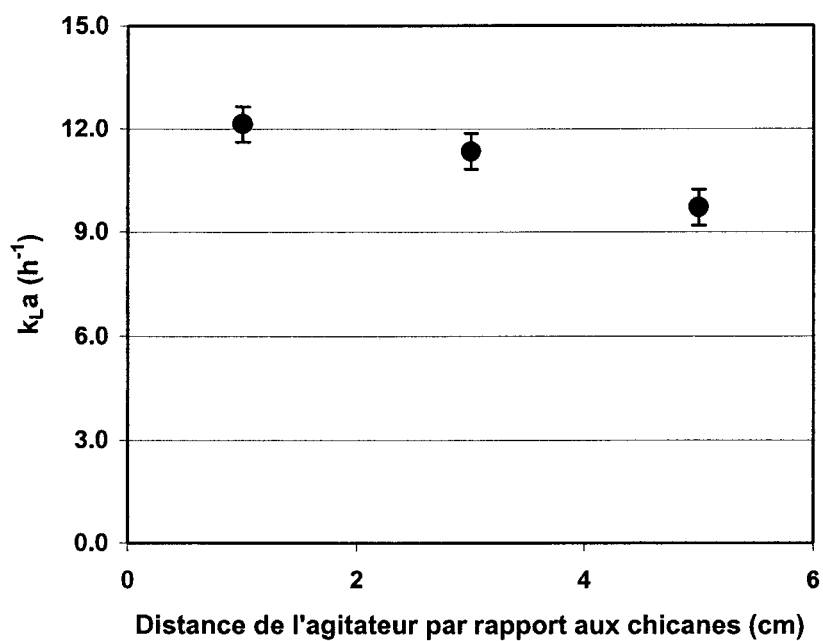


Figure 4.19. k_{La} mesuré dans l'eau en fonction de la distance par rapport aux chicanes : (●) Eau. $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

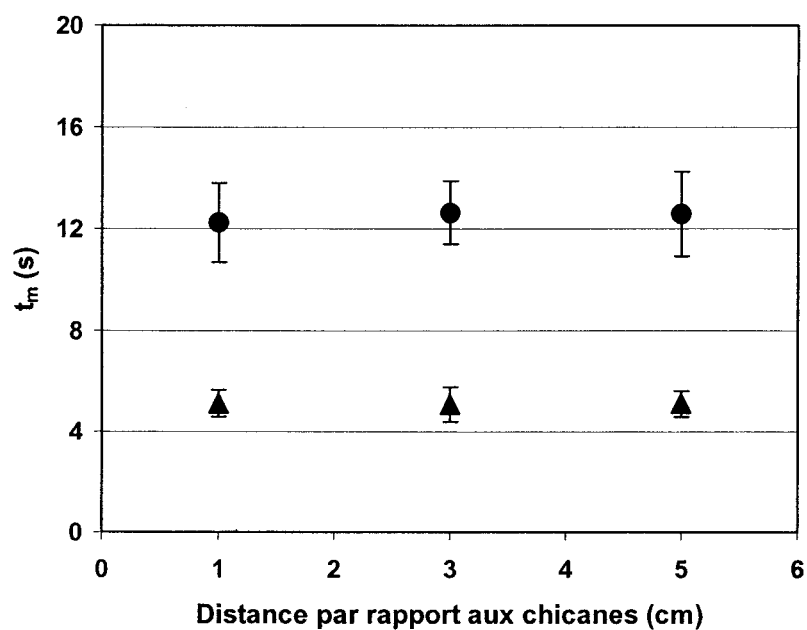


Figure 4.20. Temps de mélange mesurés en fonction de la distance par rapport aux chicanes : (▲) eau; (●) agar (450 g M.H./L). $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

Les résultats montrent que le k_{La} est favorisé lorsque la distance entre l'agitateur et les chicanes est diminuée. Pour le mélange, aucun effet significatif ne ressort des tests effectués dans l'eau et la suspension d'agar. Une distance de 1 cm entre l'agitateur et les chicanes a donc été choisie.

4.1.7 Débit d'aération

L'effet du débit d'aération sur les performances du système a été évalué. Le débit gazeux a été augmenté jusqu'à 0.15 vvm. Les résultats pour le k_{La} sont présentés à la Figure 4.21 tandis que les résultats pour le temps de mélange sont présentés à la Figure 4.22.

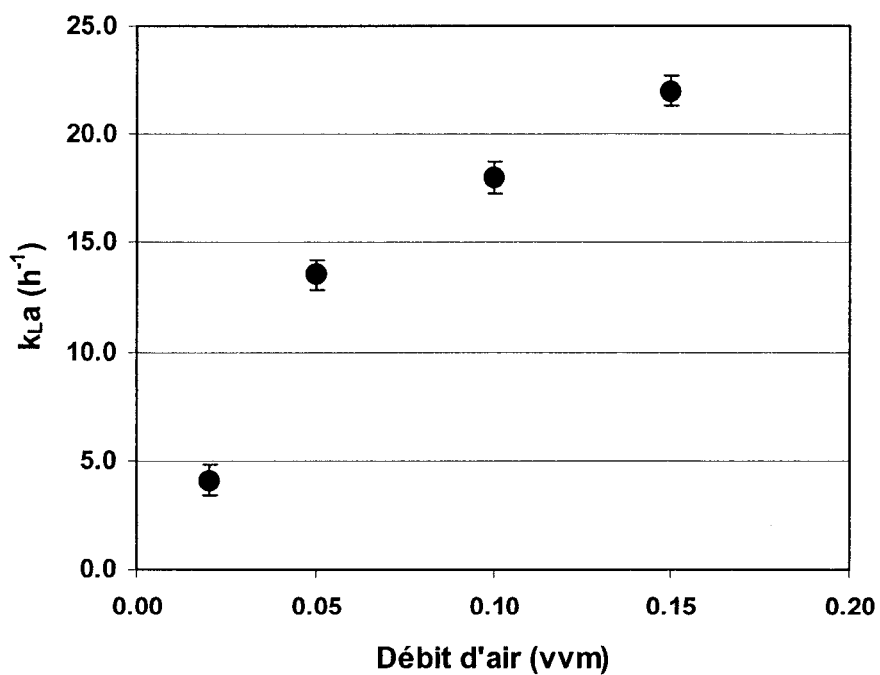


Figure 4.21. k_{La} mesuré dans l'eau en fonction du débit : (●) Eau. $N = 60$ rpm. Configuration finale.

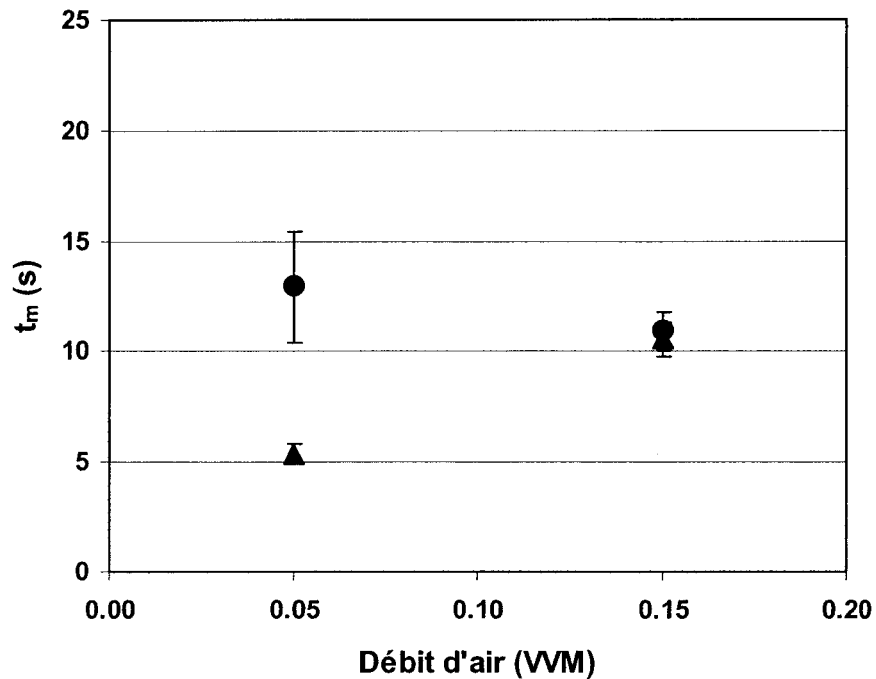


Figure 4.22. Temps de mélange mesurés en fonction du débit d'aération : (▲) eau; (●) agar (450 g M.H./L). $N = 60$ rpm. Configuration finale.

Ces résultats montrent que le $k_L a$ augmente significativement avec le débit d'aération. Il n'y a pas chute de performance du système dans la plage de débit testée. La formation de bulles ne se produit pas sur toute la surface du diffuseur. La distribution uniforme des bulles à la surface ne peut être atteinte lorsque le débit d'air par unité de surface du diffuseur est trop faible. L'augmentation des performances du système d'aération avec le débit d'air devrait se poursuivre jusqu'à l'apparition de bulles sur toute la surface du diffuseur. Elle devrait même augmenter tant et aussi longtemps que le régime de bullage demeure le même. Par contre, l'aération semble nuire au mélange dans l'eau. Cet effet devient négligeable lorsque la viscosité augmente comme le montrent les résultats obtenus avec une suspension d'agar.

4.1.8 Vitesse d'agitation

L'effet de la vitesse d'agitation sur les performances du système a été testé. Les résultats pour le k_La sont présentés à la Figure 4.23 tandis que les résultats pour le temps de mélange sont présentés à la Figure 4.24.

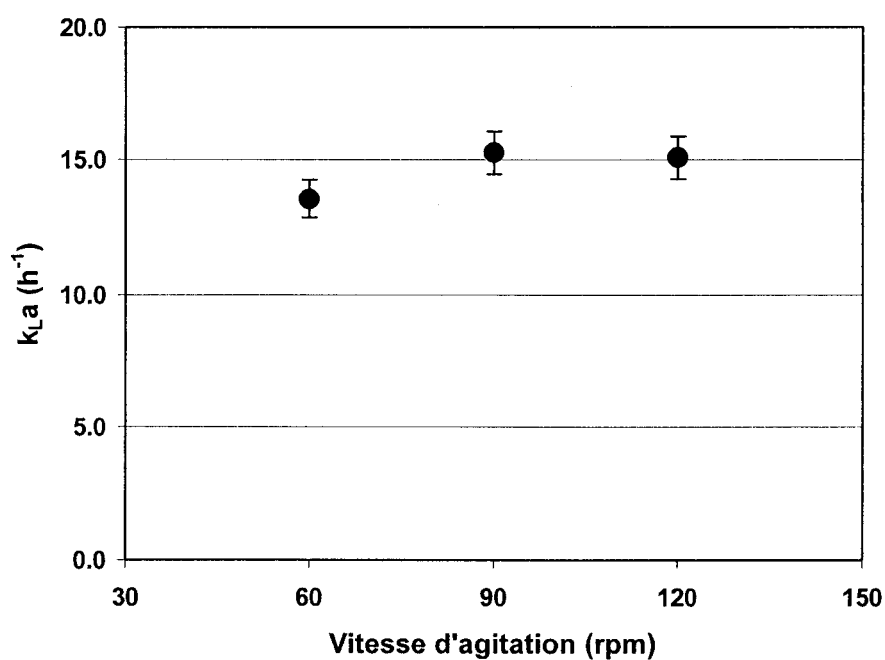


Figure 4.23. k_La mesuré dans l'eau en fonction de la vitesse d'agitation : (●) Eau. $Q = 0.05 \text{ vvm}$. Configuration finale.

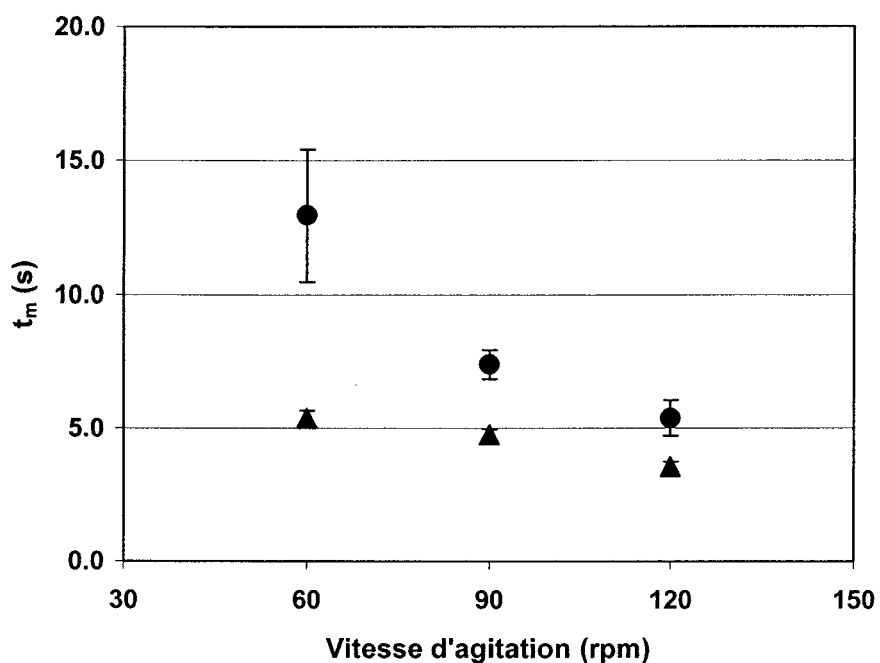


Figure 4.24. Temps de mélange mesurés en fonction de la vitesse d'agitation : (▲) eau; (●) agar (450 g M.H./L). $Q = 0.05$ vvm.

Ces résultats montrent que le $k_L a$ augmente d'environ 5% pour une élévation de la vitesse d'agitation de 30 rpm. Une augmentation de la vitesse d'agitation ne représente donc pas une manière efficace d'augmenter le transfert gazeux pour le système conçu. Les résultats montrent qu'une augmentation de la vitesse d'agitation de 60 à 120 rpm améliore le mélange dans l'eau en diminuant le temps de mélange de 5.4 à 3.5 secondes. Ce phénomène est encore plus significatif dans une suspension d'agar où le temps de mélange est passé de 13.0 à 5.4 secondes.

4.1.9 Comparaison des différents effets

La Figure 4.25 présente l'effet de chaque amélioration technologique sur l'évolution du k_La . Ces résultats montrent que le gain le plus important (38 %) a été obtenu en ajoutant trois chicanes de surface. Le changement du système d'aération procure une augmentation de 16 %. Il permet aussi d'assurer une meilleure homogénéité des bulles formées à plus grands débits. Il est également permis de croire que le fait de générer des bulles de façon dispersée sur la plaque réduit la coalescence au diffuseur. Même s'il est difficilement mesurable, cet avantage devrait être considérable en milieu visqueux. Les changements proposés montrent une augmentation totale du k_La de 371 % par rapport à l'ancien système d'aération utilisé. Il est possible d'augmenter d'avantage les performances du diffuseur en augmentant le débit gazeux à 0.10 vvm et l'agitation à 90 rpm. Pour certains types de cultures de cellules végétales, il se peut que la production de mousse et la ventilation du CO_2 dissout ne soit pas problématique. À la lumière des résultats de la section 4.1.5, l'augmentation de la vitesse d'agitation à 90 rpm n'est pas problématique. L'augmentation totale du k_La par le système proposé atteint donc 571 % par rapport à l'ancien système d'aération utilisé.

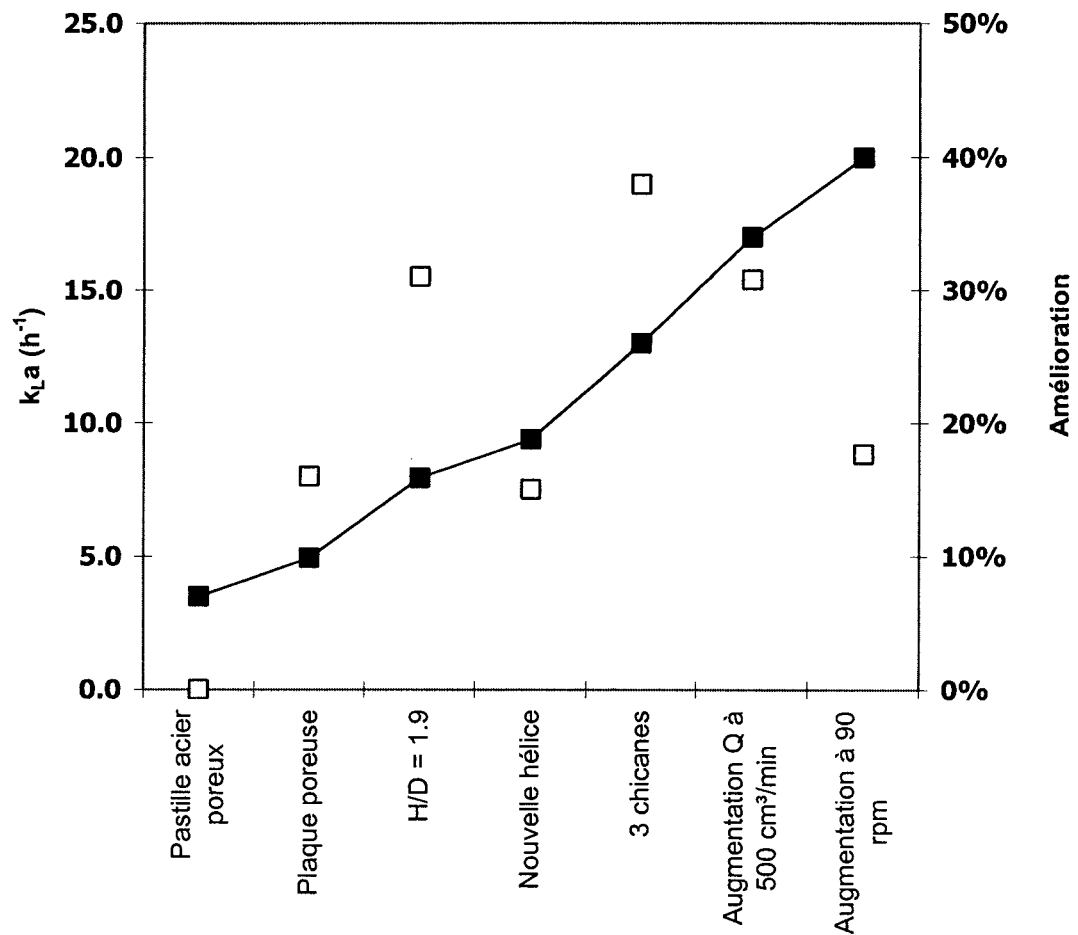


Figure 4.25. $k_L a$ et amélioration des différentes configurations du système : (■) $k_L a$; (□) amélioration (%).

De plus, le rapport H/D choisi n'est pas optimal. En effet, des limitations physiques ont restreint la hauteur du bioréacteur de 150 L qui représente la finalité de ce projet. Le coefficient de transfert a ainsi été réduit de 34%. Sans cette réduction, le $k_L a$ aurait été d'environ $27 h^{-1}$, ce qui représente une augmentation totale de 670 % par rapport à l'ancien système d'aération et qui dépasse les attentes initiales de $25 h^{-1}$. On peut donc conclure que la technologie développée permettra d'éviter les limitations de transfert d'oxygène dans le futur bioréacteur.

En ce qui concerne le temps de mélange, la Figure 4.26 présente les résultats des différentes améliorations du système.

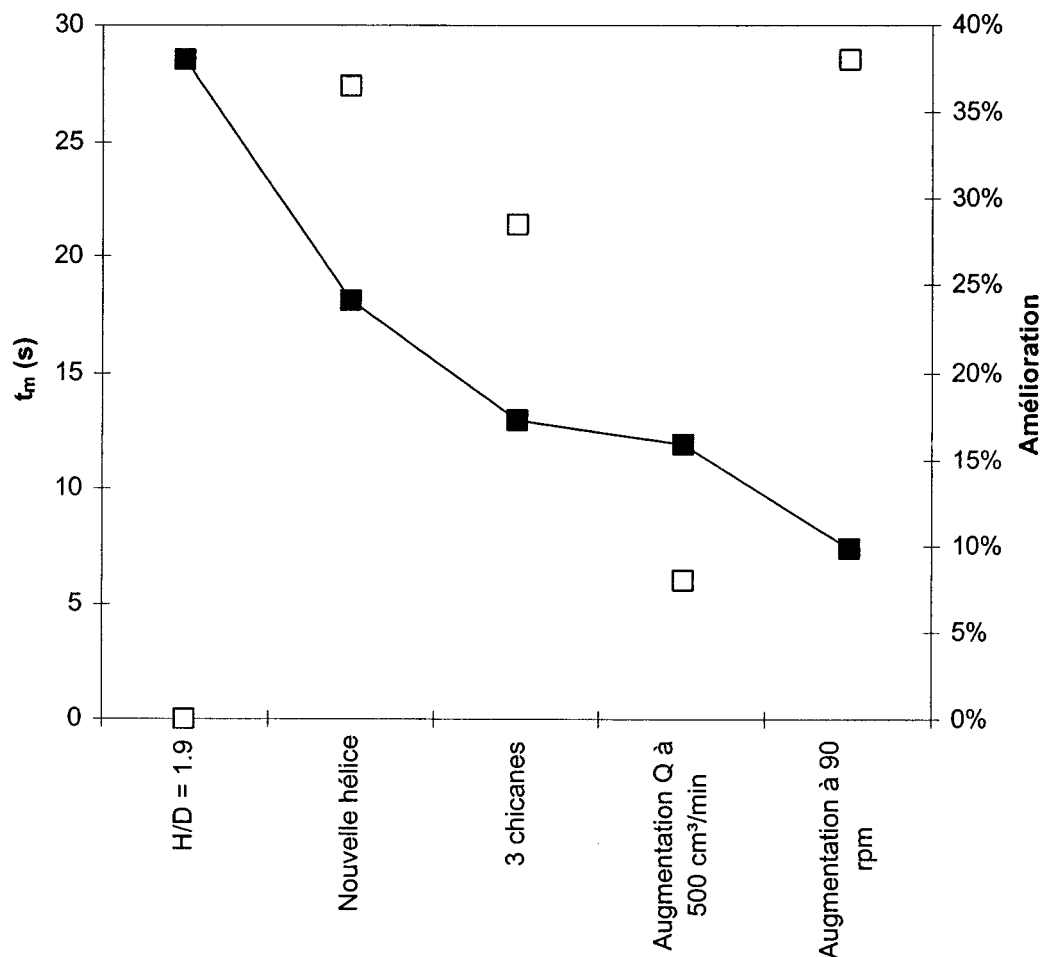


Figure 4.26. Temps de mélange dans l'agar (450 g M.H./L) et amélioration des différentes configurations du système : (●) Temps de mélange; (□) Amélioration (%).

Ces résultats montrent que la diminution la plus importante (37 %) provient du nouveau design du ruban hélicoïdal. L'augmentation de la vitesse d'agitation à 90 rpm montre une diminution supplémentaire du temps de mélange de 38 %. Dans l'ensemble, l'optimisation de la configuration du bioréacteur de 5 L a permis de

diminuer le temps de mélange de 29 à 8 secondes, ce qui représente une diminution de plus de 110 % du temps de mélange développé par l'ancien bioréacteur.

4.1.10 Viscosité de la suspension

La diminution du k_{La} lors de l'augmentation de la viscosité est largement documentée dans la littérature. Des essais ont donc été effectués afin de caractériser cette diminution dans des suspensions représentant les conditions d'opération des cultures de cellules végétales où la concentration de cellules et de résines maximale observée dans les cultures est de 350 g/L. La Figure 4.27 présente les résultats.

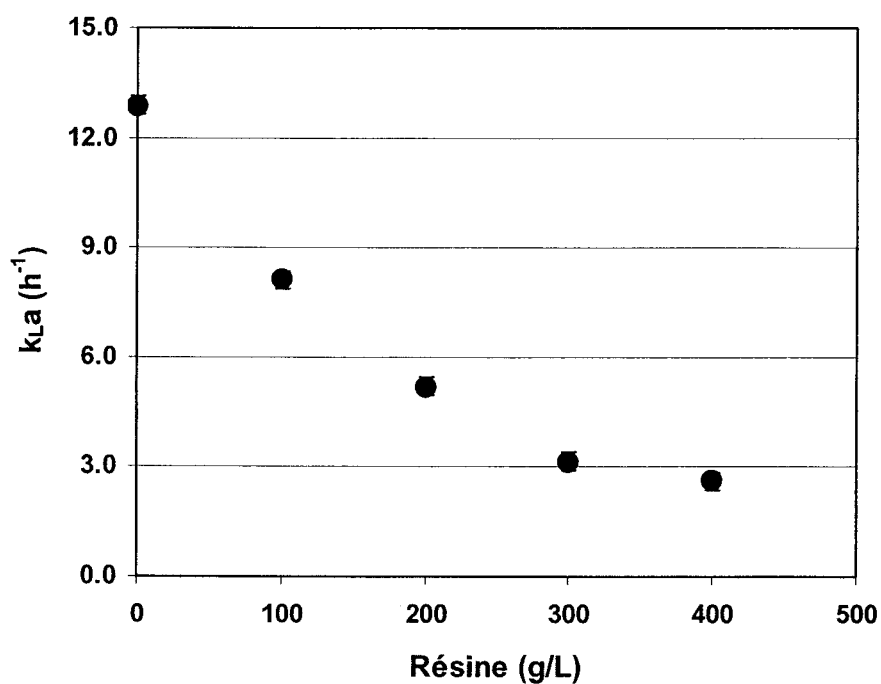


Figure 4.27. k_{La} mesuré dans une suspension de résine XAD-16 en fonction de la concentration. Eau. $Q = 0.05$ vvm, $N = 60$ rpm.

Ces résultats montrent qu'une diminution rapide du k_La se produit lorsque la viscosité de la suspension augmente. Le coefficient de transfert en culture est donc significativement plus bas que celui obtenu dans l'eau. Ceci explique les limitations observées dans de précédentes cultures (Sirois, 1997; Coehlo, 2000) et la nécessité d'accroître le transfert gazeux.

4.2 Modélisation de l'aération

La prédiction du k_La selon des considérations entièrement théoriques est impossible. Par contre, certaines relations empiriques peuvent être obtenues en étudiant le comportement des bulles formées par l'aérateur. Le développement d'un modèle afin de prédire le k_La selon le comportement des bulles permet d'avoir une relation dépendant uniquement de l'aérateur. Le modèle prédictif du k_La est obtenu en deux étapes, soit un développement théorique et l'élaboration de relations empiriques. Les relations résultantes permettent de relier le k_La à différents paramètres, au volume de liquide, au rapport H/D et au débit gazeux. Cette relation sera utile pour prédire le transfert gazeux pour des bioréacteurs géométriquement différents mais utilisant la même technologie d'aération.

4.2.1 Rétention gazeuse

La rétention gazeuse se définit comme le volume de gaz dispersé par rapport au volume total du mélange gaz-liquide. Elle a été mesurée avec la version finale retenue à la section 4.1. Les Figures 4.28 et 4.29 présentent les résultats.

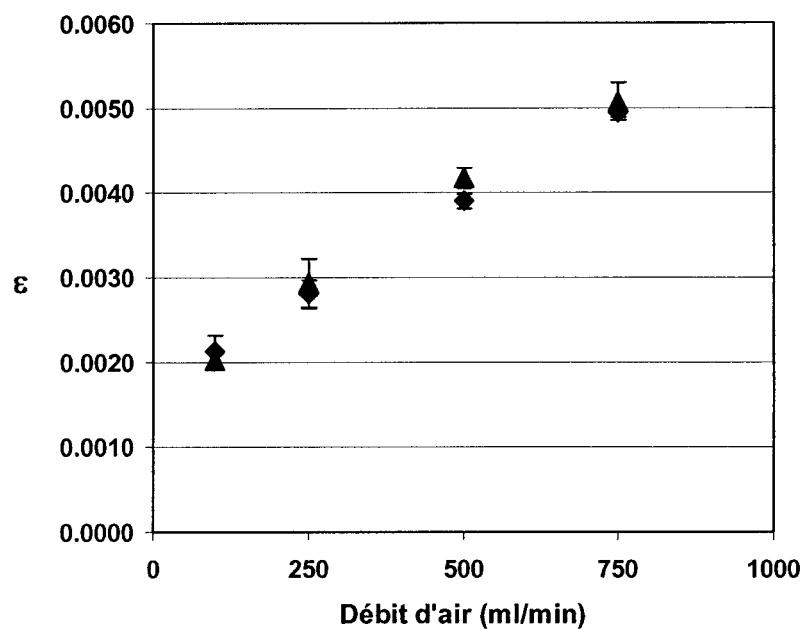


Figure 4.28. Rétention gazeuse mesurée en fonction du débit d'air : (♦) eau; (▲) résine (400 g/L). Configuration finale, $N = 60$ rpm. Configuration finale.

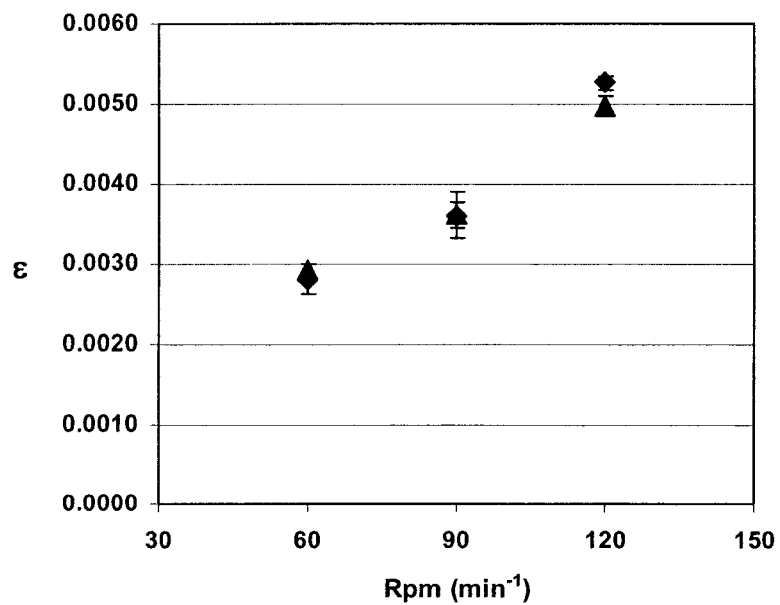


Figure 4.29. Rétention gazeuse mesurée en fonction de la vitesse d'agitation : (♦) eau; (▲) résine (400 g/L). Configuration finale, $Q = 0.05$ vvm (250 ml/min). Configuration finale.

Il est évident qu'une augmentation du débit favorise un plus grand volume de gaz dans la phase liquide. L'augmentation de la rétention gazeuse avec la vitesse d'agitation peut être causée par l'augmentation de l'efficacité de pompage du ruban hélicoïdal. Ces résultats montrent aussi qu'il n'y a pas de différence entre le milieu visqueux et l'eau pour la rétention gazeuse. L'efficacité de pompage du ruban hélicoïdal en milieu visqueux ralentit la vitesse ascensionnelle des bulles et devrait fournir une meilleure rétention gazeuse. Une rétention gazeuse identique peut s'expliquer par une augmentation de la coalescence. L'effet de l'augmentation du pompage est ainsi annulé par l'augmentation de la vitesse ascensionnelle des bulles plus volumineuses.

La coalescence causée par la présence de particules est largement documentée (Su et Lei, 1993; Guell et Giralt, 1994; Tavakoli et coll., 1995). Cette coalescence a un effet direct sur le k_La en réduisant la surface de transfert. Les résultats précédents montrent une diminution du k_La en milieu visqueux (Figure 4.27). Il n'est cependant pas possible d'attribuer la diminution du k_La que par la diminution de l'aire interfaciale. La présence d'un nombre important de particules dans l'interface gaz-liquide réduit le coefficient de transfert de masse k_L tel que suggéré par Ju et coll. (1995). Il est impossible de caractériser les phénomènes tel que la présence de particules dans cette interface, la coalescence ainsi que la vitesse ascensionnelle des bulles à cause de l'opacité de la suspension visqueuse.

4.2.2 Diamètre des bulles

Des photographies ont été prises dans l'eau à la base du réservoir et près de la surface. L'annexe H montre un exemple de photographie. La Figure 4.30 présente les diamètres obtenus dans le haut de la colonne en fonction du débit selon les différentes méthodes de calcul.

Ces résultats suivent une tendance identique, soit l'augmentation du diamètre en fonction du débit. Il existe peu de différence entre le diamètre moyen et le diamètre équivalent basé sur l'aire totale. Par contre, le diamètre de Sauter montre une tendance beaucoup plus élevée (environ 35 %). Le diamètre équivalent basé sur l'aire totale a donc été retenu pour les calculs subséquents.

La Figure 4.31 présente l'influence du débit d'air sur le diamètre des bulles mesurées tandis que la Figure 4.32 illustre l'influence de la vitesse d'agitation sur le diamètre des bulles mesurées.

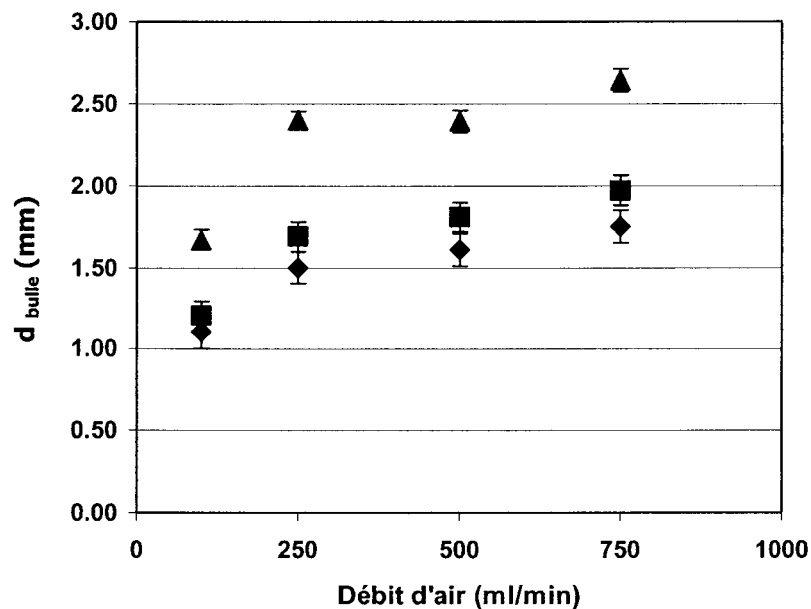


Figure 4.30. Diamètre des bulles mesuré dans l'eau dans le haut de la colonne selon de débit volumétrique : (◆) diamètre moyen; (■) diamètre équivalent; (▲) diamètre de Sauter. $N = 60$ rpm. Configuration finale.

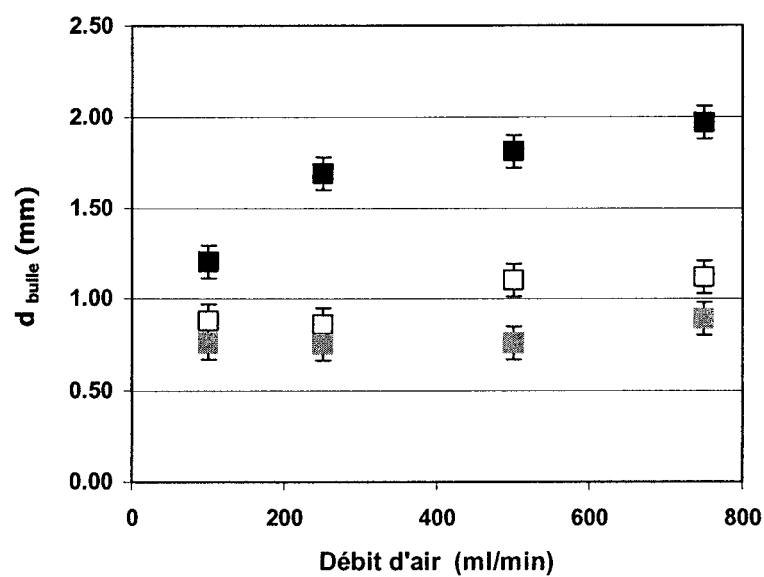


Figure 4.31. Diamètre des bulles mesuré dans l'eau selon le débit volumique : (□) À la plaque poreuse, sans agitation; (■) À la plaque poreuse, avec agitation de 60 rpm; (■) Dans le haut, avec agitation de 60 rpm.

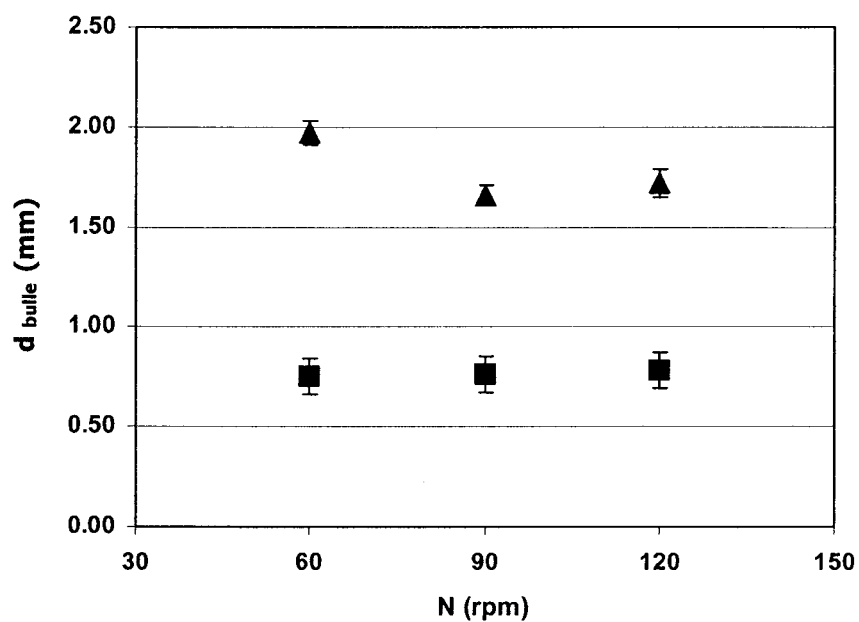


Figure 4.32. Diamètre des bulles mesurées selon la vitesse d'agitation : (■) Aux orifices de la plaque poreuse; (▲) Dans le haut. Configuration finale, eau, $Q = 0.05$ vvm.

Ces résultats montrent que l'agitation diminue le volume des bulles mesuré lors de leur formation. Les mouvements du fluide à l'orifice favorisent la rupture prématurée du cou de la bulle. Les bulles décollent plus rapidement et sont plus petites. Il est par contre difficile de déterminer si l'augmentation du volume des bulles sans agitation à la base de la colonne selon le débit d'air est le résultat d'une vitesse superficielle du gaz au travers des orifices plus élevée ou d'un certain degré de coalescence. Une augmentation de la surface active de bullage observée à des débits plus élevés semble confirmer qu'un certain degré de coalescence apparaît lorsque le débit est augmenté. L'augmentation du diamètre des bulles dans le haut de la colonne montre que le taux de coalescence augmente avec le débit d'air. À de hauts débits, plus de bulles sont formées et les probabilités de collisions sont plus élevées.

Les résultats de la Figure 4.32 indiquent que la vitesse d'agitation a peu d'effet sur le diamètre des bulles mesurées à l'orifice. Par contre, l'augmentation de la vitesse d'agitation diminue le diamètre des bulles dans le haut de la colonne. L'augmentation de la vitesse d'agitation semble favoriser une meilleure dispersion des bulles dans le réservoir et réduire ainsi la probabilité de collision.

4.2.3 Nombre de pores

Le calcul du nombre de pores actifs, soient ceux permettant le passage de l'air, servira à caractériser la plaque poreuse. Cette caractérisation est nécessaire afin d'estimer le nombre de bulles qui peuvent être produites par la plaque. En posant l'hypothèse que tous les pores actifs sont d'une même dimension, la somme des débits dans chaque orifice est égal au débit total selon :

$$Q_{Tot} = n_{pores} \cdot Q_{go} \quad (4.1)$$

et

$$n_{pores} = \frac{Q_{Tot}}{Q_{go}} \quad (4.2)$$

où n_{pores} est le nombre de pores actifs, Q_{go} le débit par pore ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$) et Q_{Tot} est le débit total au travers de la plaque poreuse ($\text{m}^3 \text{s}^{-1}$). Le débit par orifice (Q_{go}) peut s'obtenir à l'aide d'un modèle de formation de bulles. La Figure 4.33 illustre les modèles montrés au Tableau 2.2 de la section 2.5. pour un orifice de $0.4 \mu\text{m}$.

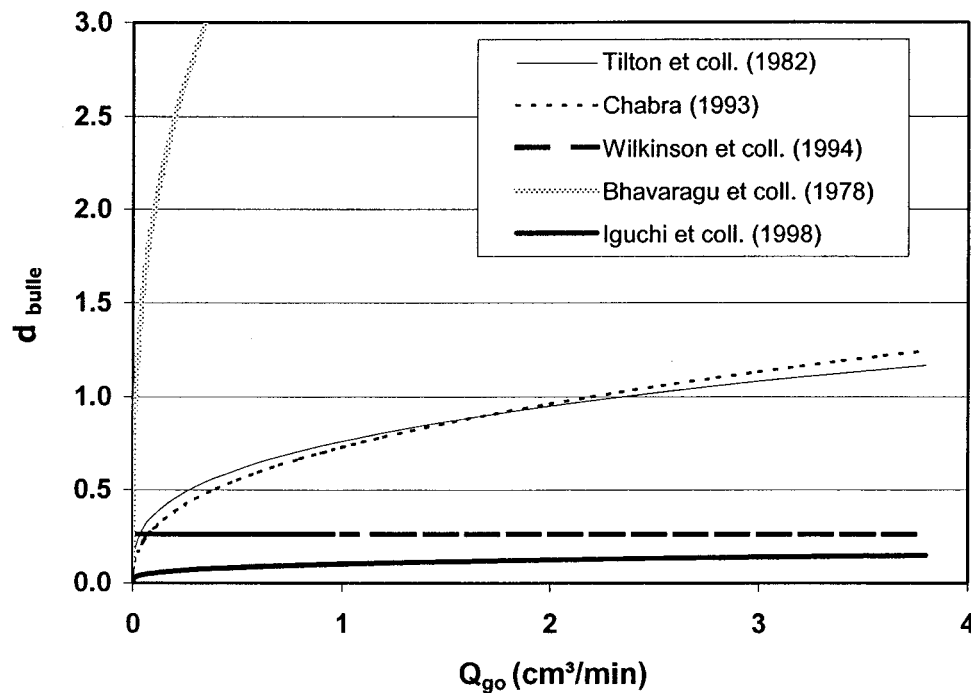


Figure 4.33. Diamètre des bulles formées selon différents modèles en fonction du débit par orifice sous aucune agitation. $d_o = 0.4 \mu\text{m}$.

La comparaison entre ces estimés obtenues par les différents modèles et les diamètres des bulles mesurées permet d'affirmer que dans les conditions expérimentales de ce projet, les corrélations développées par Tilton et coll. (1982) ainsi que Chabra et coll. (1993) montrent des résultats comparables. La relation utilisée par Tilton et coll. (1982) est retenue (Équation 4.3) car elle présente l'avantage de contenir l'effet des propriétés du fluide.

$$Q_{go} = 0.317 \cdot \left(\frac{d_{bm} \cdot g^{0.21} \cdot \rho_L^{0.1}}{d_o^{0.05} \cdot \mu_L^{0.1}} \right)^{3.125} \quad (4.3)$$

En remplaçant le diamètre des bulles (d_b) par le diamètre des bulles mesurées à l'orifice (d_{bmo}), le débit par orifice Q_{go} devient le seul inconnu. Il est possible de déterminer le nombre de pores actifs de la plaque poreuse. La figure 4.34 présente le nombre de pores actifs estimé depuis 4.2 et 4.3 pour la plaque de $0.4 \mu\text{m}$.

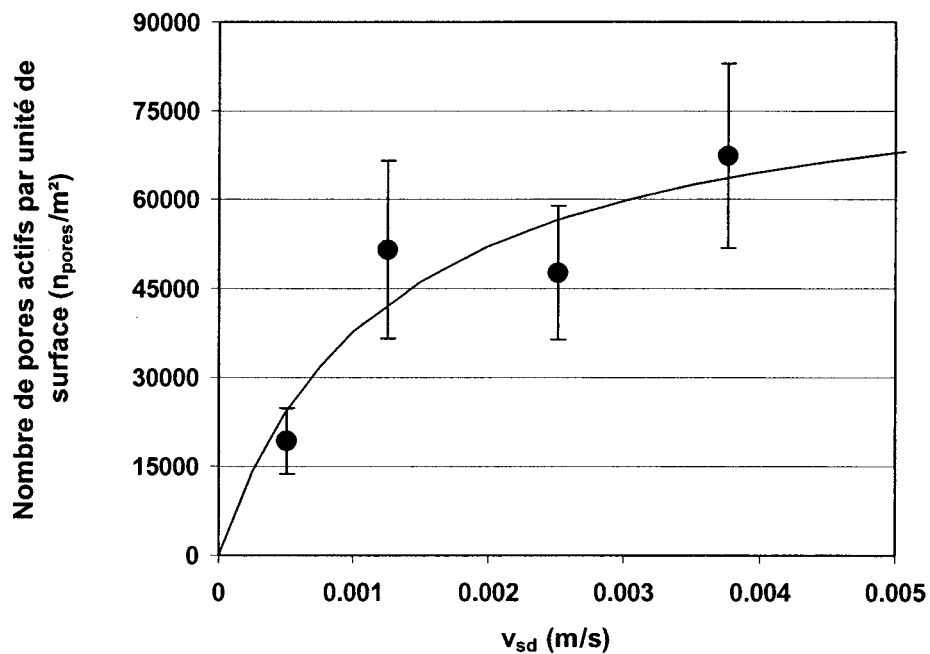


Figure 4.34. Nombre de pores actifs selon la vitesse superficielle au diffuseur. (●) Points calculés; (—) Modèle développé.

La figure montre qu'un modèle de premier ordre peut prédire le nombre de pores actifs dans la marge d'erreur des points calculés. La vitesse superficielle au diffuseur (v_{sd}), i.e le débit d'air par unité de surface de la plaque poreuse, a été choisie comme variable

caractéristique de l'aération car elle permet d'obtenir une relation indépendante de la géométrie du système. Le modèle a été réalisé en minimisant le carré de la différence entre le modèle et les points calculés. Il est défini par :

$$n_{pa} = \frac{85\,000 \cdot v_{sd}}{0.001266 + v_{sd}} \quad (4.4)$$

où n_{pa} est le nombre de pores actifs et v_{sd} la vitesse superficielle au diffuseur (m s^{-1}). Il existe un nombre maximal de pores actifs sur la plaque poreuse. Selon le modèle, le nombre maximal de pores actifs par unité de surface serait d'environ 85 000 pores- m^{-2} . Avec cet estimé, le rapport de la surface totale des pores par rapport à la surface totale de la plaque poreuse est de $3.2 \cdot 10^{-2} \%$. Cette relation n'est valide que pour la porosité et le type de plaque utilisé. La connaissance du nombre de pores actifs permettra d'estimer le diamètre des bulles formées à l'orifice à l'aide de la relation de Tilton et coll. (1982) et sera utile pour prédire le $k_L a$ lors de la mise à l'échelle.

4.2.4 Taux de coalescence

La connaissance de l'évolution du diamètre des bulles lors de leur ascension est utile afin de prédire les caractéristiques de la phase gazeuse tel que l'aire interfaciale et la vitesse ascensionnelle des bulles. Il n'existe pas de modèle connu afin de caractériser la coalescence des bulles dans un réacteur agités. Luo et Svendsen (1996) suggèrent d'utiliser un bilan sur une population de bulles afin de décrire les phénomènes de coalescence et le bris des bulles. Le taux de coalescence a donc été déterminé en comparant l'évolution du diamètre équivalent des bulles au bas de la colonne et lors du désengagement à la surface. La Figure 4.35 présente les résultats pour chaque débit d'opération.

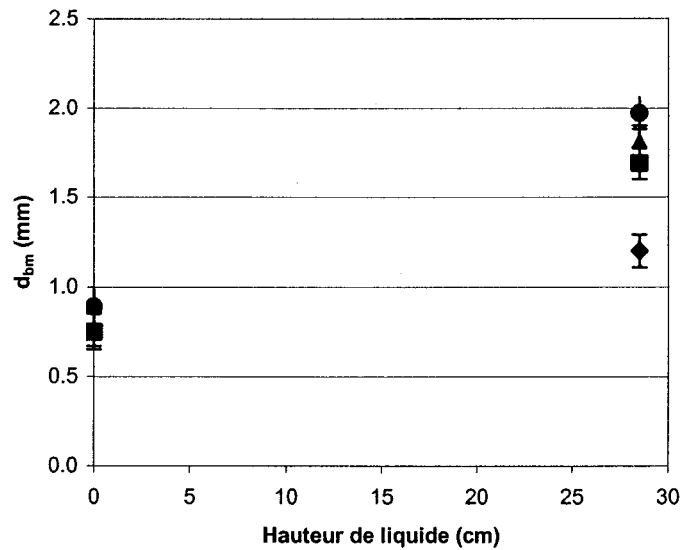


Figure 4.35. Diamètre moyen des bulles mesuré en fonction de la hauteur de liquide dans l'eau: (◆) Q : 0.02 vvm; (■) Q : 0.05 vvm; (▲) Q : 0.10 vvm; (●) Q : 0.15 vvm. N = 60 rpm, Configuration finale.

En posant l'hypothèse que le taux de coalescence est linéaire, il est possible de tracer une droite dont l'ordonnée à l'origine est le diamètre initial des bulles lors de leur formation et dont la pente est le taux de coalescence (4.5).

$$d_{b \text{ haut}} = T_{\text{coalescence}} \cdot H + d_{bo} \quad (4.5)$$

où $d_{b \text{ haut}}$ (m) et d_{bo} (m) est le diamètre de la bulle dans le haut du réservoir et à l'orifice (m), $T_{\text{coalescence}}$ est le taux de coalescence et H est la hauteur de liquide (m). Comme le taux de coalescence est une conséquence directe du débit d'air, il est possible de tracer le taux de coalescence en fonction de celui-ci. La Figure 4.36 présente l'évolution du taux de coalescence en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur.

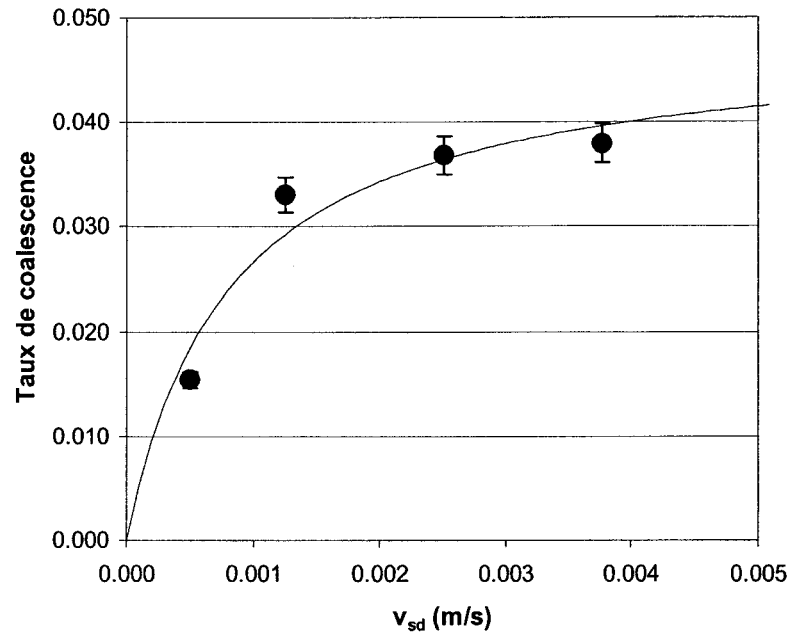


Figure 4.36. Taux de coalescence dans l'eau en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur. (●) Points calculés; (—) Modèle.

Cette figure montre qu'un modèle de premier ordre peut prédire le taux de coalescence. La vitesse superficielle au diffuseur (v_{sd}) a aussi été choisie comme variable caractéristique de l'aération car elle permet d'obtenir une relation indépendante de la géométrie du système. Le modèle a été réalisé en minimisant le carré de la différence entre le modèle et les points calculés. Il est défini par :

$$T_{coa} = \frac{0.0493 \cdot v_{sd}}{0.000888 + v_{sd}} \quad (4.6)$$

Cette relation sera aussi utile pour prédire le $k_L a$ lors de la mise à l'échelle.

4.2.5 Modèle

La prédiction du $k_L a$ depuis des considérations purement théoriques est impossible à réaliser dans un réservoir agité. Par contre, des relations empiriques peuvent être développées afin de décrire les principaux phénomènes tels que la formation des bulles, le taux de coalescence et la vitesse ascensionnelle des bulles, ce qui permettra de prédire le $k_L a$. Le coefficient de transfert gazeux est composé des deux termes suivants :

$$k_L a = k_L \cdot a \quad (4.7)$$

L'aire interfaciale peut être remplacée par la relation développée par Poulsen et Iversen (1998) tel que :

$$k_L a = k_L \cdot \left(\frac{6\varepsilon}{d_{bmoy} \cdot (1 - \varepsilon)} \right) \quad (4.8)$$

La simplification de l'équation est possible pour $\varepsilon \ll 1$. La rétention gazeuse est la mesure du rapport du volume de gaz (V_g) sur le volume de liquide (V_L). L'expression précédente peut alors s'écrire :

$$k_L a = k_L \cdot \left(\frac{6}{d_{bmoy}} \cdot \frac{V_g}{V_L} \right) \quad (4.9)$$

Le volume de gaz est celui contenu dans chaque bulle présente dans la phase liquide :

$$k_L a = k_L \cdot \left(\frac{6}{d_{bmoy}} \cdot \frac{\sum V_b}{V_L} \right) \quad (4.10)$$

Par conséquent, le volume de gaz peut aussi être remplacé par le produit du nombre de bulle à un instant donné dans la phase liquide et du volume moyen d'une bulle (4.11)

$$k_L a = k_L \cdot \left(\frac{6}{d_{bmoy}} \cdot \frac{n \cdot V_{b \text{ moyen}}}{V_L} \right) \quad (4.11)$$

Le nombre de bulle peut être exprimé par le produit du nombre de pores actifs et du nombre de bulles formées par pores actifs tel que :

$$n = n_{pores} \cdot n_{bulle \text{ / pores}} \quad (4.12)$$

Il est possible de calculer le nombre de bulles présentes dans la phase liquide. Le volume de gaz passant au travers d'un orifice pendant le temps que prend une bulle à parcourir la hauteur de liquide permet d'obtenir le volume émanant d'un orifice pendant le temps que prend une bulle à atteindre la surface. Le rapport de ce volume sur le volume d'une bulle permet ainsi d'obtenir le nombre de bulles formées par l'orifice. L'équation (4.13) montre cette relation.

$$n = n_{pores} \cdot \left(\frac{Q_o \cdot t_{res}}{V_{b \text{ moyen}}} \right) \quad (4.13)$$

Le temps de résidence des bulles dans la phase liquide est relié à la vitesse ascensionnelle des bulles et de la hauteur de liquide. Il n'existe pas de relation pour prédire la vitesse ascensionnelle des bulles dans un réacteur agité. Une modification de la relation (2.9) a été utilisée pour prédire la vitesse ascensionnelle des bulles.

$$Va_b = \frac{U^{sp} \cdot U^w}{\sqrt{(U^{sp})^2 + (U^w)^2}} \cdot F_{ecoulement} \quad (2.9a)$$

$$U^{sp} = \frac{1}{18} \cdot \frac{\rho_g - \rho_L}{\mu_L} g d_b^2 \left[\frac{3\mu_L + 3\mu_g}{2\mu_L + 3\mu_g} \right] \quad (2.10)$$

$$U^w = \sqrt{\frac{2\sigma}{\rho_L \cdot d_b} + \frac{g \cdot d_b}{2}} \quad (2.11)$$

L'introduction d'un facteur d'écoulement ($F_{\text{écoulement}}$) a été nécessaire car l'effet de pompage du ruban hélicoïdal ralentit la vitesse ascensionnelle des bulles. Ce facteur a été estimé par itération de manière à ce que la rétention gazeuse découlant de la nouvelle vitesse ascensionnelle tende vers la rétention gazeuse mesurée à la section 4.2.1. La Figure 4.37 présente les résultats des calculs en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur (v_{sd}).

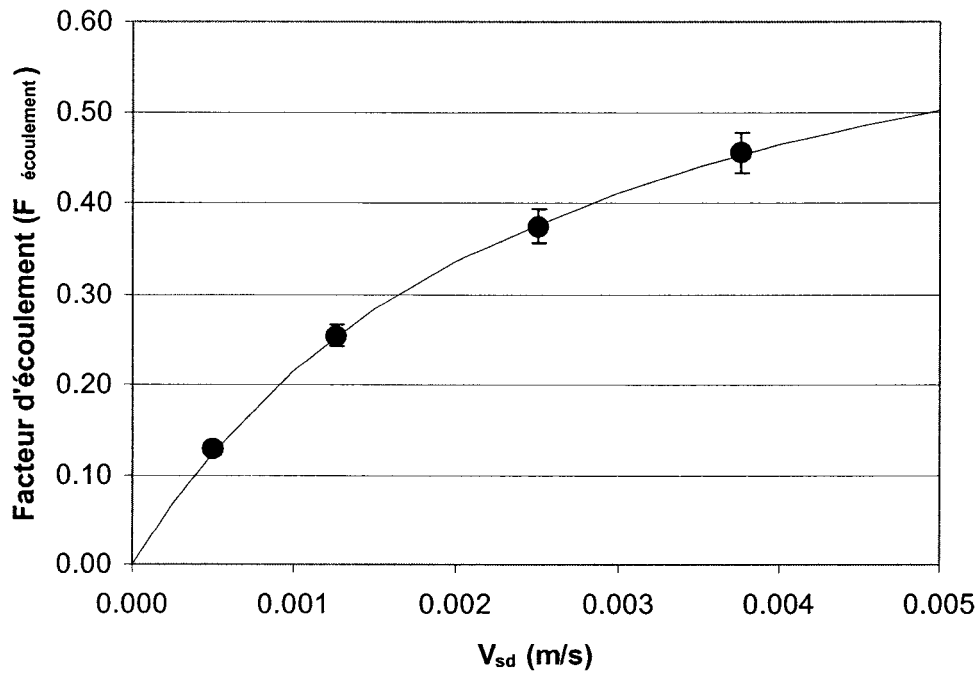


Figure 4.37. Facteur d'écoulement en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur. (●) Points calculés; (—) Modèle de premier ordre.

La figure montre qu'un modèle de premier ordre peut prédire le facteur d'écoulement en fonction de la vitesse superficielle au diffuseur. Le modèle a été réalisé en minimisant le carré de la différence entre le modèle et les points calculés. Il est défini par :

$$F_{\text{écoulement}} = \frac{0.75 \cdot v_{sd}}{0.0025 + v_{sd}} \quad (4.14)$$

Le facteur d'écoulement augmente avec une augmentation de la vitesse superficielle i.e. l'importance de l'effet de la circulation du fluide sur la vitesse ascensionnelle des bulles diminue lorsque le nombre de bulles dans la phase liquide augmente. Les plus petites bulles ne restent pas indéfiniment dans la phase liquide. Par conséquent, ce modèle peut diverger. Une droite ($R^2 = 0.96$) générée par l'équation suivante permet de prédire le facteur d'écoulement :

$$F_{\text{écoulement}} = 98.08 \cdot v_{sd} + 0.106 \quad (4.15)$$

Il a été visuellement observé que même les plus petites bulles ne restent pas indéfiniment dans la phase liquide. Avec l'utilisation de ce modèle, la vitesse ascensionnelle de la bulle n'est jamais nulle. Ceci correspond au phénomène physique observé. De plus, en augmentant le débit d'aération indéfiniment, l'ascension des bulles finira par vaincre la force de pompage du ruban hélicoïdal et entraîner le fluide.

Le temps de résidence des bulles peut alors s'exprimer par :

$$t_{\text{res}} = \frac{H}{va_b} \quad (4.16)$$

En utilisant l'équation (4.1), il est possible d'écrire l'expression finale du modèle:

$$k_L a = k_L \cdot \left(\frac{6}{d_{bmoy}} \cdot \frac{Q_{Tot}}{V_L} \cdot \frac{H}{va_b} \right) \quad (4.17)$$

Les valeurs de k_L sont tirées de la littérature. Le coefficient de transfert de masse k_L dépend principalement du diamètre de la bulle. Les données recueillies par Motarjemi et Jameson (1978) ainsi que Heijnen et coll. (1984) ont permis de reproduire le comportement de k_L . La Figure 4.38 présente l'évolution de k_L en fonction du diamètre de la bulle.

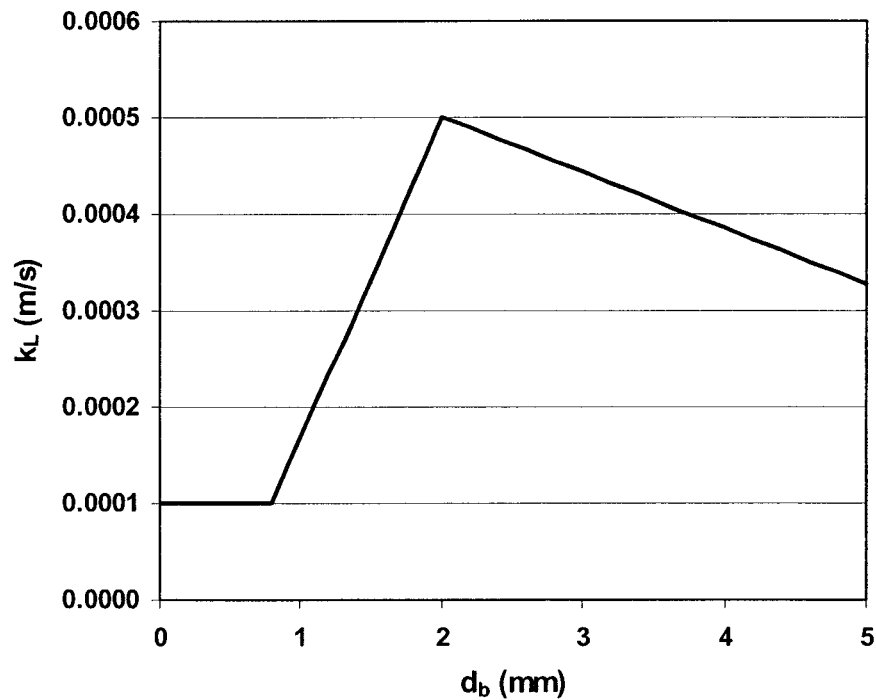


Figure 4.38. Évolution du k_L en fonction du diamètre de la bulle. (—) Modèle.

La valeur du coefficient de transfert de masse k_L (m/s) peut alors être prédite pour chaque bulle comme le montre les équations (4.18), (4.19) et (4.20)

$$d_b < 0.8 \text{ mm}, k_L = 0.0001 \quad (4.18)$$

$$0.8 \text{ mm} < d_b < 2.0 \text{ mm}, k_L = 0.000333 \cdot d_b - 0.000167 \quad (4.19)$$

$$d_b > 2.0 \text{ mm}, k_L = -0.000058 \cdot d_b + 0.000617 \quad (4.20)$$

Le diamètre des bulles choisi a une grande importance dans la modélisation du $k_L a$. En plus d'intervenir dans le calcul du coefficient de transfert de masse k_L , il est utilisé pour déterminer l'aire interfaciale et la vitesse ascensionnelle des bulles. Le diamètre moyen des bulles entre l'orifice et le point de désengagement dans le haut de la colonne a été retenu. L'utilisation du diamètre moyen permet de développer un modèle indépendant de la géométrie du système. La Figure 4.39 présente l'algorithme permettant de trouver le diamètre des bulles aux orifices de la plaque poreuse et de trouver le diamètre moyen des bulles dans le haut de la colonne par l'utilisation du taux de coalescence.

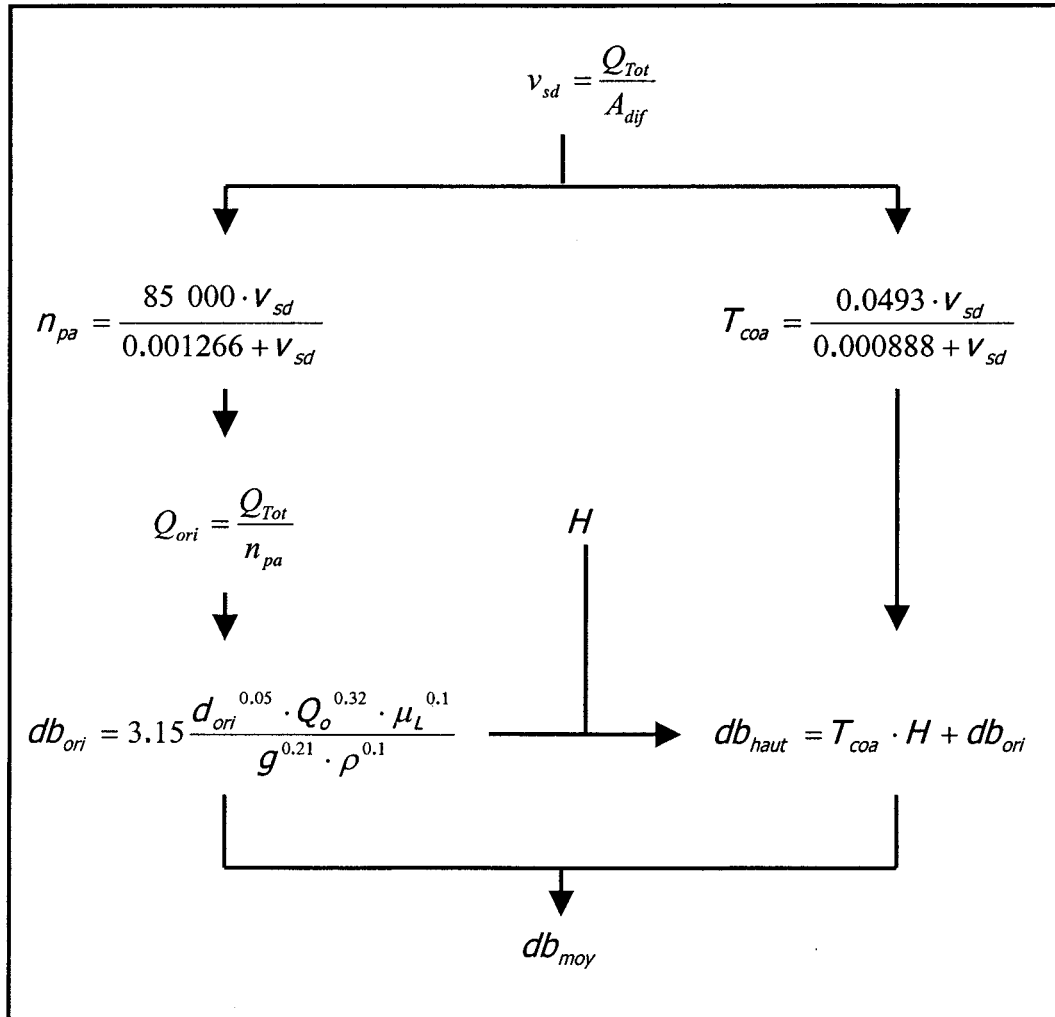


Figure 4.39. Algorithme pour le calcul du diamètre moyen utilisé dans le modèle

Par conséquent, il est possible de prédire le $k_L a$ (Équation 4.17). Il est seulement nécessaire de connaître les dimensions du réservoir (diamètre du réservoir, rapport H/D), les dimensions de la plaque poreuse (diamètre, porosité), les constantes physiques (viscosité et masse volumique de la phase liquide) et le débit d'opération (Q). La Figure 4.40 montre l'évolution du modèle en fonction du débit d'aération.

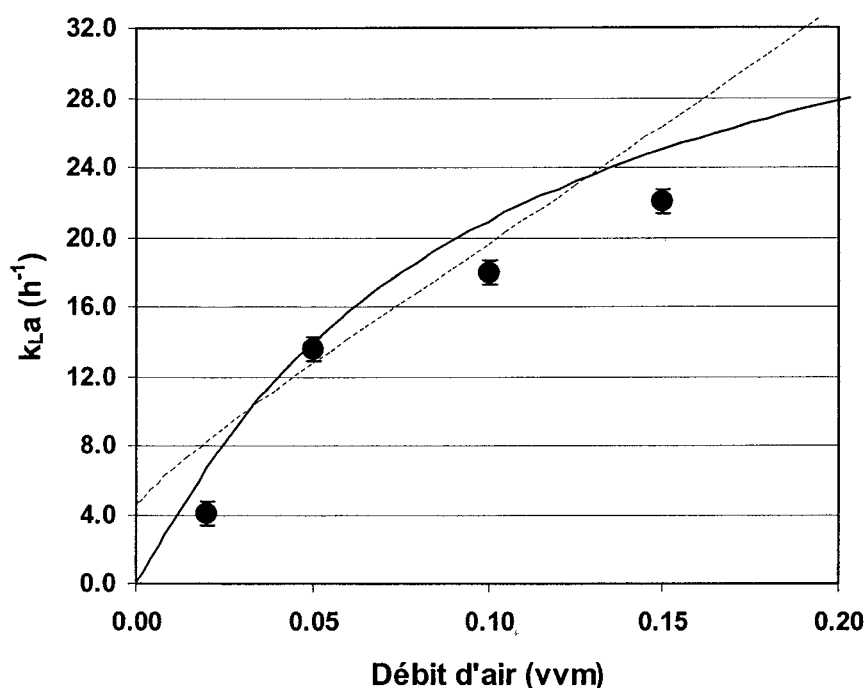


Figure 4.40. k_{La} en fonction du débit. (●) k_{La} mesurés; (- - -) Modèle avec le facteur d'écoulement du premier ordre; (—) Modèle avec le facteur d'écoulement linéaire.

La comparaison entre les facteurs d'écoulement utilisés pour le modèle montre que la relation linéaire tend à prédire un plafonnement du k_{La} . Cette tendance est en accord avec les travaux de Heijnen et coll. (1984). Le plafonnement du k_{La} à d'hautes taux d'aération a couramment été observé (Buchholz et coll., 1978; Deckwer et coll., 1982; Heijnen et van't Riet, 1984). La Figure 4.41 montre la différence entre les prédictions des k_{La} selon le modèle du facteur d'écoulement utilisé et les k_{La} mesurés.

L'utilisation du facteur d'écoulement linéaire montre une meilleure prédiction du k_{La} à faible débit. De plus, lorsque le débit augmente, la différence entre les deux modèles n'est pas significative. L'allure de la courbe suggère que le modèle utilisant le facteur d'écoulement linéaire permettra une meilleure prédiction du k_{La} . En réalité, une augmentation du débit entraînera une augmentation de la coalescence. L'aire interfaciale atteindra une valeur limite au-delà de laquelle il n'y aura plus d'augmentation du k_{La} . Selon le modèle retenu (avec le facteur d'écoulement linéaire),

la valeur maximale du $k_L a$ pour l'aérateur conçu serait de 32 h^{-1} pour un débit d'air de $1500 \text{ cm}^3/\text{min}$ (0.3 vvm). Au-delà de ce débit, le diamètre des bulles est supérieur à 2 mm et la valeur de k_L diminue. Ce comportement, jumelée à une vitesse ascensionnelle des bulles plus élevée, entraîne une baisse du $k_L a$.

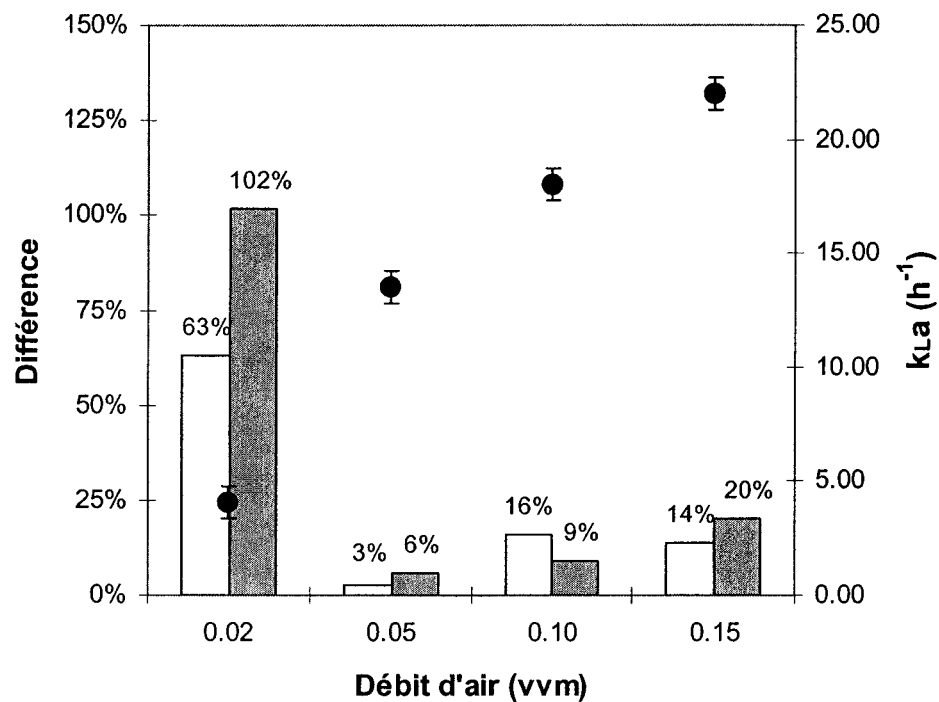


Figure 4.41. Erreur entre les $k_L a$ mesurés et les modèles du facteur d'écoulement. (●) $k_L a$ mesurés; (□) Différence du modèle linéaire. (▨) Différence du modèle de premier ordre.

5.0 CONCEPTION DU BIORÉACTEUR DE 5 L

5.1 Dimensionnement

La construction d'un bioréacteur en acier inoxydable 316 basée sur les dimensions du modèle à froid a été réalisée. Les principales dimensions sont présentées au Tableau 5.1. Un schéma du montage est également présenté à la Figure 5.1.

Un nouveau joint stérile d'étanchéité compacte a été développé. Un joint de connexion à l'intérieur du bioréacteur permet de changer l'hélice sans démonter le joint stérile d'étanchéité. Six ports ont été construits à la base du bioréacteur. Les ports de 15° sont de différentes longueurs permettant une plus grande versatilité. Le port d'échantillonnage a été installé dans la base du bioréacteur permettant de prendre des échantillons uniformes et de vidanger complètement le bioréacteur. De plus, un port de 50° a été construit afin d'utiliser un système de sédimentation sur plan incliné (Fortier, 2000). Les chicanes ont été construites en Teflon. La faible tension de surface de ce polymère minimisera l'adhérence de la biomasse. Finalement, des filets NPT ont été usinés sur le couvercle du bioréacteur permettant d'utiliser une multitude de connexions selon les besoins.

Tous les matériaux utilisés lors de la construction peuvent supporter un cycle de stérilisation à l'autoclave (121°C, 15-16 psig pendant 50 min).

Tableau 5.1 : Dimension du bioréacteur, de l'agitateur et des chicanes

Dimension du bioréacteur	mm
Diamètre interne (D)	152
Diamètre externe	165
Hauteur de la base en acier	181
Hauteur du socle en verre	229
Hauteur externe totale	422
Diamètre de l'aérateur	64
Dimension de l'hélice	
Diamètre de l'hélice (d)	133
Rapport d/D	0.88
Pas de l'hélice (P)	203
Rapport P/d	1.52
Largeur de pôle (W)	29
Rapport W/d	0.22
Nombre de tours	1.2
Dimension des chicanes	
Largeur	44
Hauteur	121
Épaisseur maximale	13

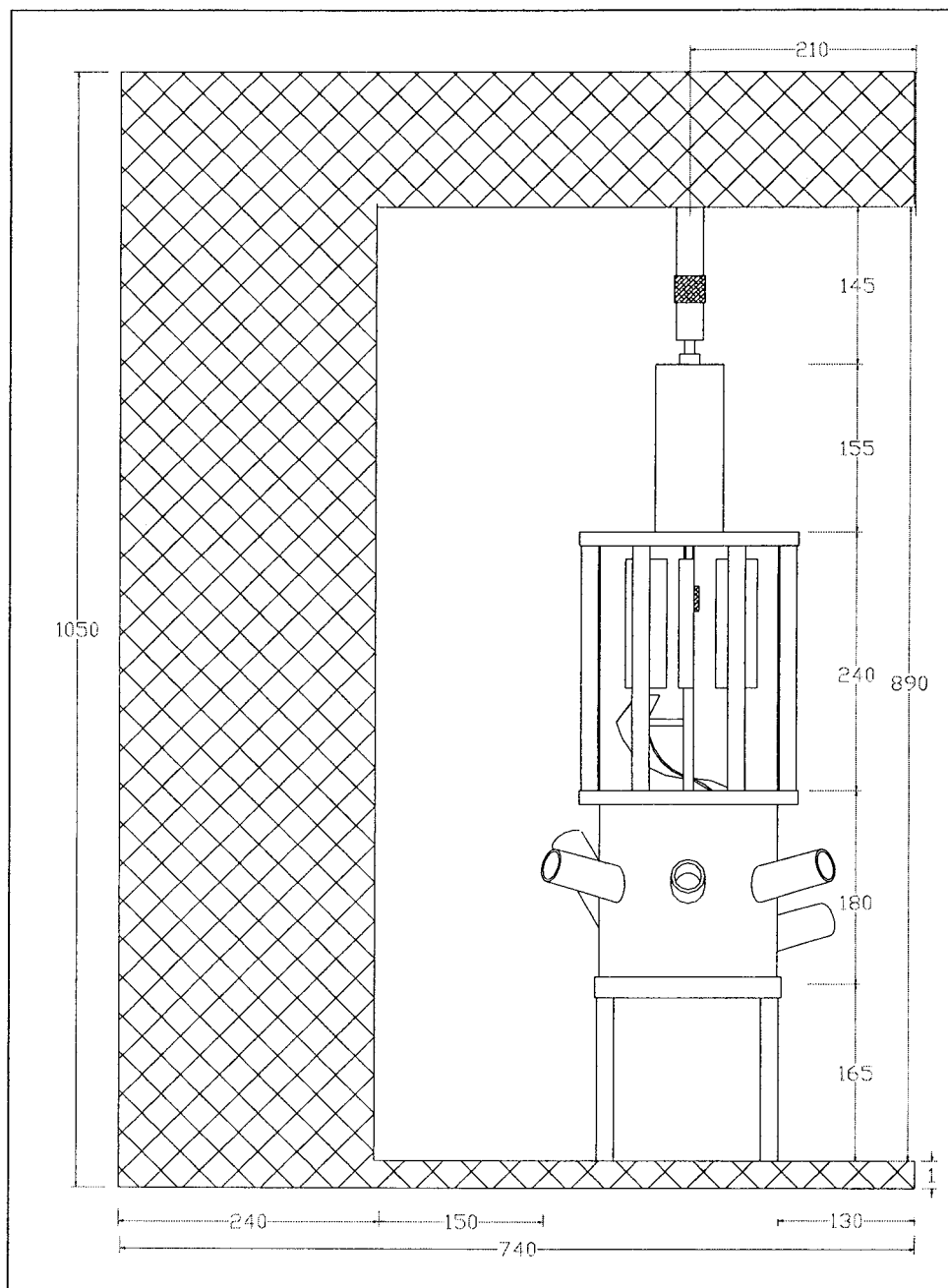


Figure 5.1. Montage du bioréacteur (unités en mm)

5.2 Caractérisation

La Figure 5.2 présente le $k_L a$ en fonction du débit d'air. Les résultats sont comparés au modèle à froid et au bioréacteur conçu et développé par Jolicoeur (1990) équipé d'un bulleur d'acier poreux (2 μm) de 1.5 cm de diamètre.

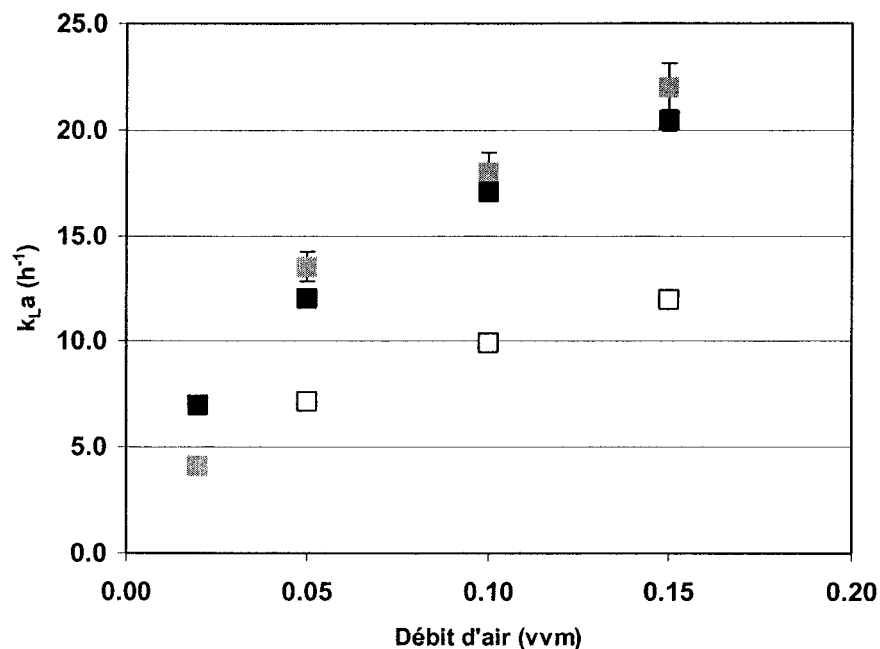


Figure 5.2 $k_L a$ dans l'eau en fonction du débit d'air : ($\square$) Bioréacteur de 5 L (Jolicoeur, 1990); ($\boxtimes$) Modèle à froid du nouveau bioréacteur de 5 L; ($\blacksquare$) Nouveau bioréacteur de 5 L. $N = 60$ rpm.

Ces résultats montrent que le $k_L a$ du bioréacteur est toujours supérieur de 70 % au bioréacteur développé par Jolicoeur (1990). L'absence de différence entre le modèle à froid (bioréacteur construit en laboratoire pour les essais) et le bioréacteur de 5 L développé par Jolicoeur (1990) équipé d'un bulleur poreux de 0.2 μm pour un débit de 0.02 VVM est dû à l'absence d'un bullage uniforme sur toute la surface du modèle à

froid pour ce débit. L'augmentation de la surface de bullage dans le nouveau prototype de bioréacteur permet d'augmenter la production de petites bulles lorsque le débit augmente au lieu d'augmenter directement le taux de coalescence. L'augmentation du taux de coalescence survient à des débits plus élevés contrairement au bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) où la coalescence à la surface du bulleur a été observée. La différence entre le modèle à froid et le nouveau bioréacteur est principalement associé à la plaque poreuse. La plaque poreuse influence directement la formation des bulles. Il suffit d'une faible différence au niveau du diamètre de quelques orifices pour créer un chemin préférentiel. La formation des bulles à des endroits plus distancés peut aussi influencer la coalescence et par conséquent le $k_L a$. L'augmentation des performances du bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) en fonction de la vitesse d'agitation est cependant supérieure au nouveau bioréacteur tel que montré à la Figure 5.3.

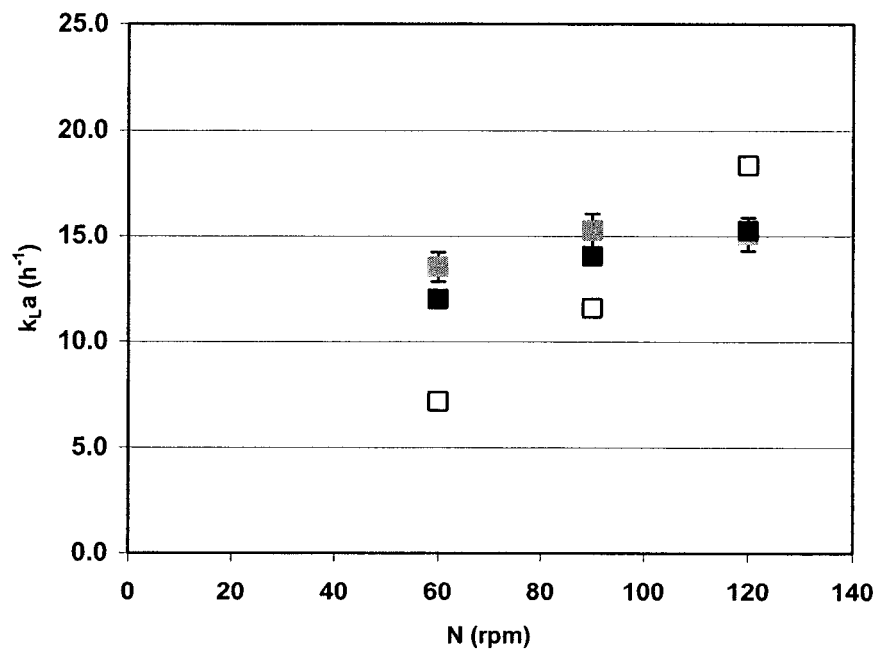


Figure 5.3. $k_L a$ dans l'eau en fonction de la vitesse d'agitation : (□) Bioréacteur développé par Jolicoeur (1990); (⊠) Modèle à froid du nouveau bioréacteur de 5 L; (■) Nouveau bioréacteur de 5 L. $Q = 0.05$ vvm.

Ces résultats montrent une augmentation d'environ 15 % du k_La pour une augmentation de 30 rpm avec le nouveau bioréacteur. Cette augmentation passe à 60% avec le bioréacteur développé par Jolicoeur (1990). L'effet de pompage du double ruban hélicoïdal du bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) augmente l'efficacité du transfert gazeux lorsque la vitesse d'agitation augmente au delà de 100 rpm. Par contre, le simple ruban hélicoïdal permet de générer un meilleur k_La à de faibles vitesses d'agitation et, par conséquent, de plus faibles taux de cisaillement.

5.3 Validation en culture

La culture de cellules d'*Eschscholtzia californica* a été faite en parallèle dans le bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) et dans le nouveau bioréacteur. L'homogénéisation des inocula a été faite avant l'inoculation. La concentration en oxygène dissous a été maintenue à 90 % de la saturation en air pendant toute la durée des cultures. Aucune des cultures n'a subi de limitations en nutriments. La vitesse d'agitation a été maintenue constante à 60 rpm pour toute la durée des cultures. Les résultats en masse sèche, humide et en nombre de cellules sont présentés à Figure 5.4, et 5.5. Les taux de croissances correspondant sont aussi présentés aux Figures 5.6, 5.9 et 5.8.

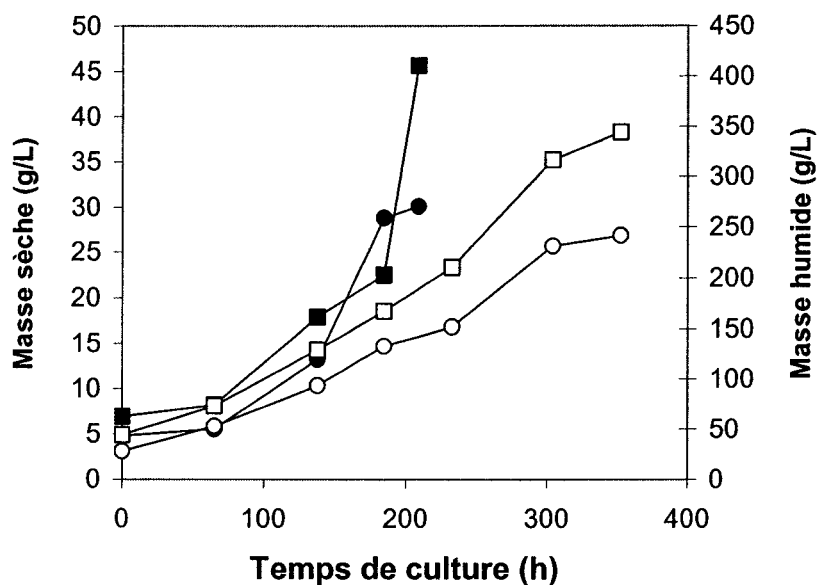


Figure 5.4. Croissance des cultures en bioréacteur : (●) Biomasse sèche du bioréacteur développé par Jolicoeur; (○) Biomasse sèche du nouveau bioréacteur; (■) Biomasse humide du bioréacteur développé par Jolicoeur; (□) Biomasse humide du nouveau bioréacteur.

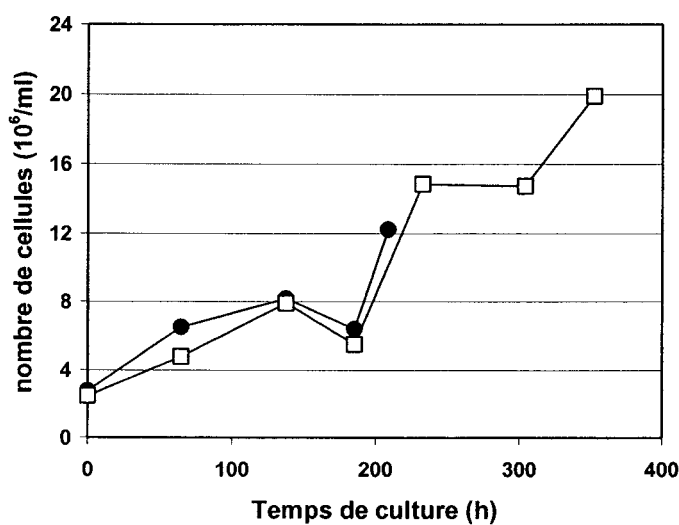


Figure 5.5. Croissance cellulaire dans chacune des cultures en bioréacteur : (■) Bioréacteur développé par Jolicoeur; (□) Nouveau bioréacteur

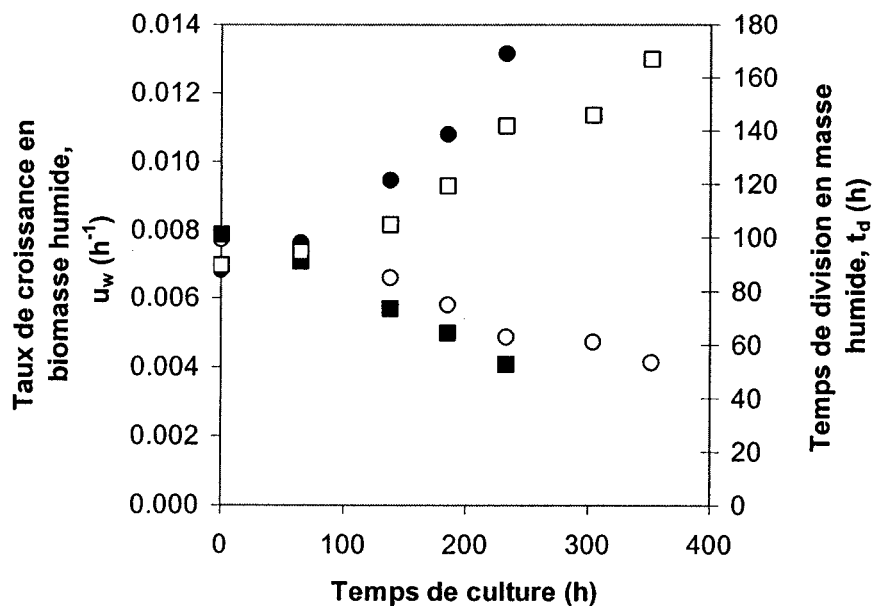


Figure 5.6. Taux de croissance et temps de division en masse humide des cultures en bioréacteur : (●) μ_w , bioréacteur développé par Jolicoeur; (○) μ_w , nouveau bioréacteur; (■) t_d , bioréacteur développé par Jolicoeur; (□) t_d , nouveau bioréacteur.

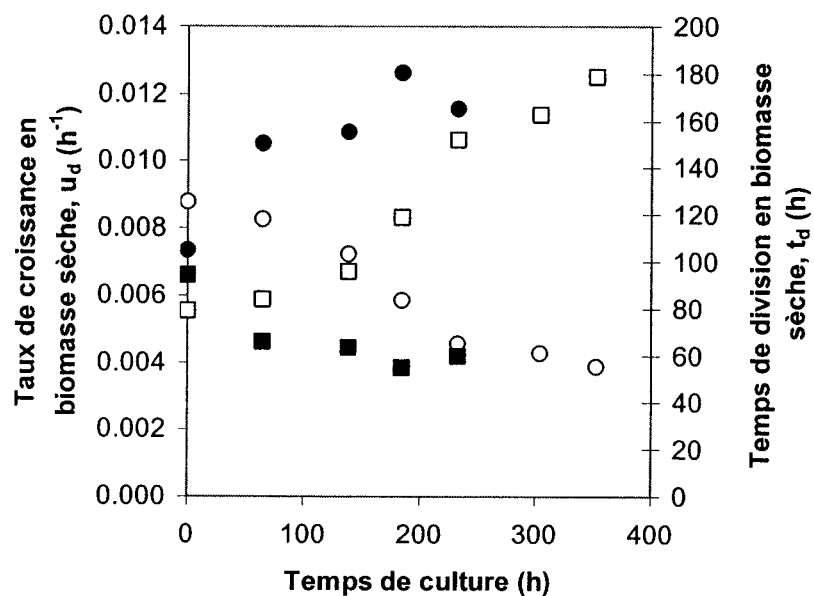


Figure 5.7. Taux de croissance et temps de division en masse sèche des cultures en bioréacteur : (●) μ_d , bioréacteur développé par Jolicoeur; (○) μ_d , nouveau bioréacteur; (■) t_d , bioréacteur développé par Jolicoeur; (□) t_d , nouveau bioréacteur.

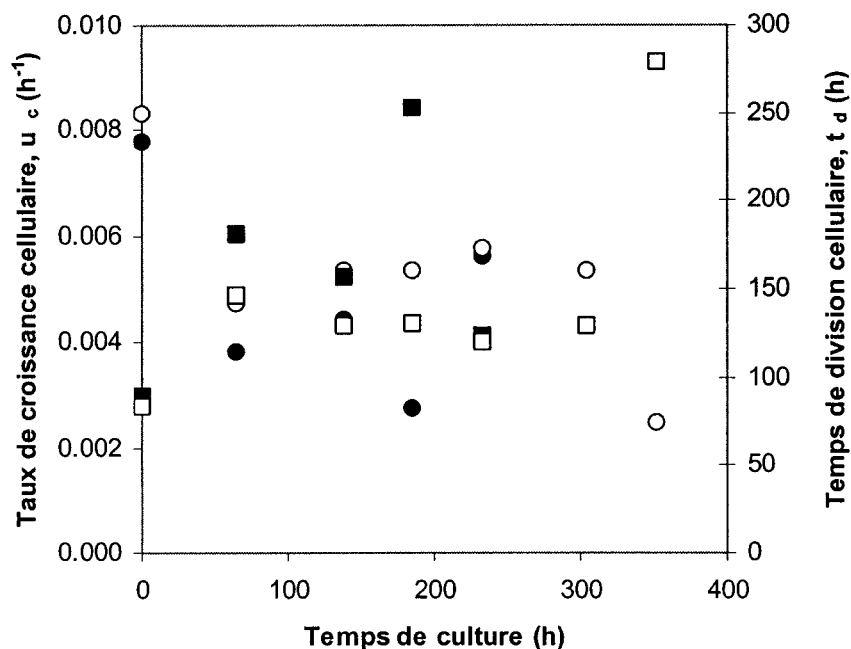


Figure 5.8. Taux de croissance et temps de division cellulaire en cultures en bioréacteur : (●) μ_c , bioréacteur développé par Jolicoeur; (○) μ_c , nouveau bioréacteur; (■) t_d , bioréacteur développé par Jolicoeur; (□) t_d , nouveau bioréacteur.

Les résultats montrent que la croissance est pratiquement identique pour les deux bioréacteurs. Les débits totaux et d'oxygène sont présentés à la Figure 5.9 pour le bioréacteur développé par Jolicoeur et le nouveau bioréacteur.

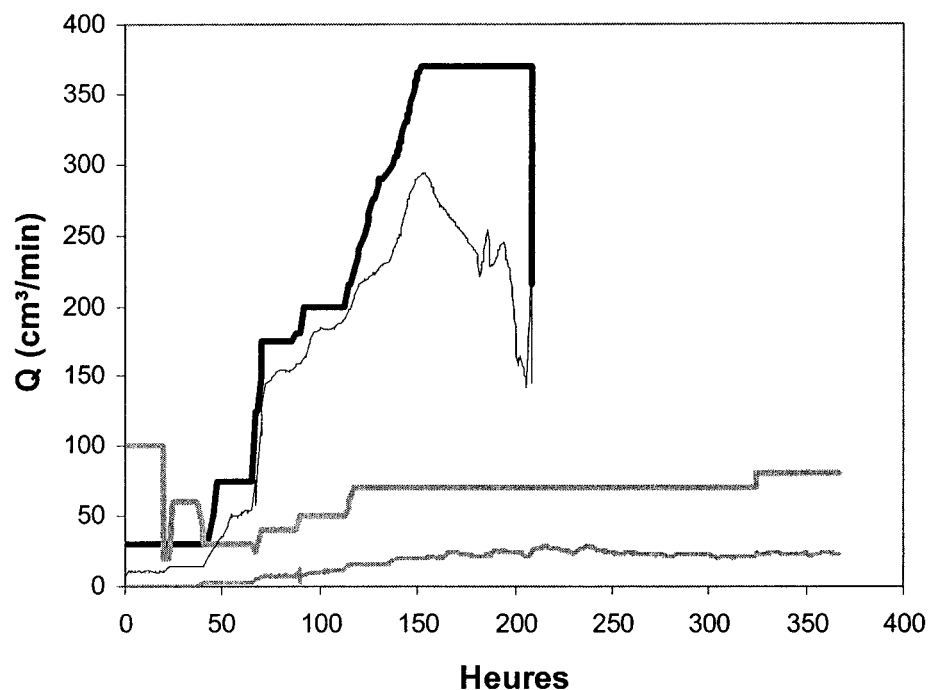


Figure 5.9. Débits totaux et d'oxygène durant les cultures: (—) Q total, bioréacteur développé par Jolicoeur; (---) Q total, nouveau bioréacteur; (—) Q oxygène, bioréacteur développé par Jolicoeur; (---) Q oxygène, nouveau bioréacteur.

Ces résultats montrent que les débits nécessaires pour maintenir une concentration en oxygène dissous de 90 % de la saturation en air sont toujours supérieurs dans le bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) par rapport au nouveau bioréacteur. Le plus faible k_La de l'ancien système ne suffit pas à transférer de la phase gazeuse suffisamment d'oxygène aux cellules à de faibles débits. Une augmentation du débit total est nécessaire afin d'augmenter le k_La . Les débits utilisés dans le bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) dépassent même le débit maximal initialement fixé pour ce projet (0.05 vvm, 250 cm³/min). Les forts débits employés dans le bioréacteur développé par Jolicoeur ont causé plusieurs problèmes : production élevée de mousse, accumulation de cellules dans la partie supérieure du bioréacteur, encrassement du condenseur malgré l'utilisation d'une trappe à mousse, encrassement des filtres de sortie, encrassement du moniteur à CO₂. La culture a dû être arrêtée prématurément à

cause de l'encrassement des filtres de sortie. Cet encrassement a causé une pressurisation du bioréacteur et une fuite du fluide liquide d'environ 600 ml entre le cylindre de verre et le joint de caoutchouc. Ces problèmes n'ont pas été rencontrés lors de l'utilisation du nouveau bioréacteur.

La Figure 5.10 montre la concentration cellulaire en fonction du débit total nécessaire pour le maintien de la concentration d'oxygène dissous à 90 % de la saturation avec l'air. Le nouveau bioréacteur permet un nombre supérieur de cellules atteintes avec de plus faibles débits.

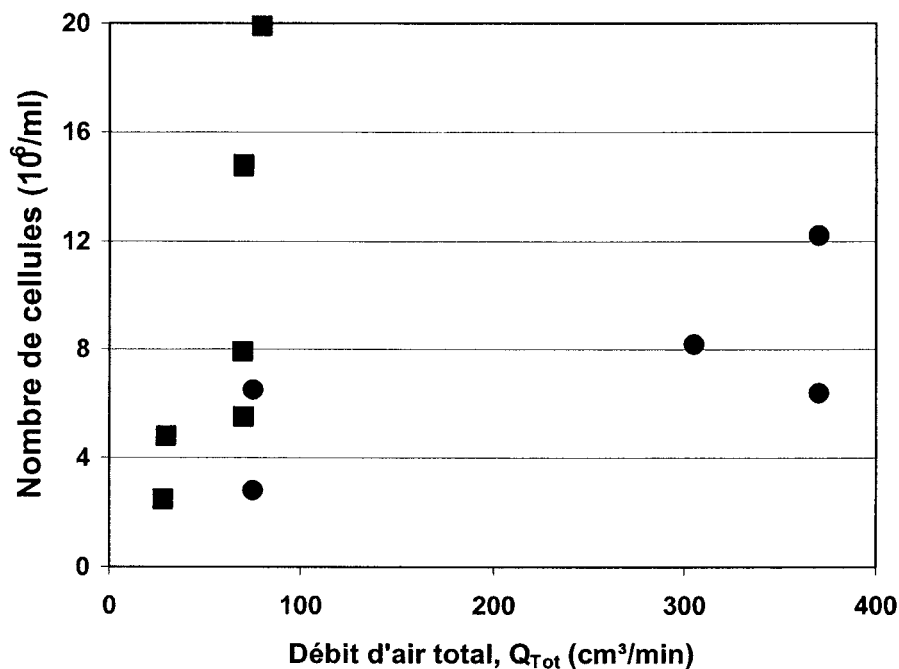


Figure 5.10. Nombre de cellules en fonction du débit total nécessaire pour le maintien de la concentration d'oxygène dissous à 90 % de la saturation avec l'air : (■) Nouveau bioréacteur; (●) Bioréacteur développé par Jolicoeur.

La caractérisation du k_La en culture est laborieuse. Elle nécessite la connaissance de la respiration cellulaire. Celle-ci est très difficile à déterminer car elle dépend des

conditions nutritionnelles et environnementales. Par contre, il est possible d'étudier le comportement du transfert gazeux d'un bioréacteur par rapport à l'autre. En effet, le quotient respiratoire (R_q) s'écrit :

$$R_q = \frac{CPR}{OUR} \quad (5.1)$$

$$CPR = CTR - \Delta DCO_2 \quad (5.2)$$

$$OUR = k_L a (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}}) \quad (5.3)$$

En analysant le système pour un court intervalle de temps, l'équation 5.2 se réduit à :

$$CPR = CTR \quad (5.4)$$

Par conséquent, il est possible d'écrire que pour un système en contrôle de l'oxygène dissout :

$$k_L a = \frac{CTR}{R_q (C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}})} \quad (5.5)$$

La croissance cellulaire est pratiquement identique pour les deux cultures (Figure 5.5). En posant l'hypothèse que le quotient respiratoire est sensiblement identique dans les deux cultures (équation 5.6), il est possible de calculer le rapport du $k_L a$ dans le nouveau bioréacteur par rapport au $k_L a$ du bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) aux mêmes conditions de culture (équation 5.7).

$$R_{q_{NB}} \approx R_{q_{AB}} \quad (5.6)$$

$$\frac{k_L a_{NB}}{k_L a_{AB}} = \frac{\left[\frac{CTR}{(C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}})} \right]_{NB}}{\left[\frac{CTR}{(C_{O_2 \text{ gaz}} - C_{O_2 \text{ liquide}})} \right]_{AB}} \quad (5.7)$$

Le respect des hypothèses émises est primordial pour une comparaison du transfert gazeux des bioréacteurs. Le calcul doit être fait à un temps fixe, la concentration d'oxygène dissous doit être stable dans le temps et la concentration en biomasse doit être sensiblement la même. La Figure 5.11 présente le rapport du transfert gazeux lorsque ces conditions sont satisfaites.

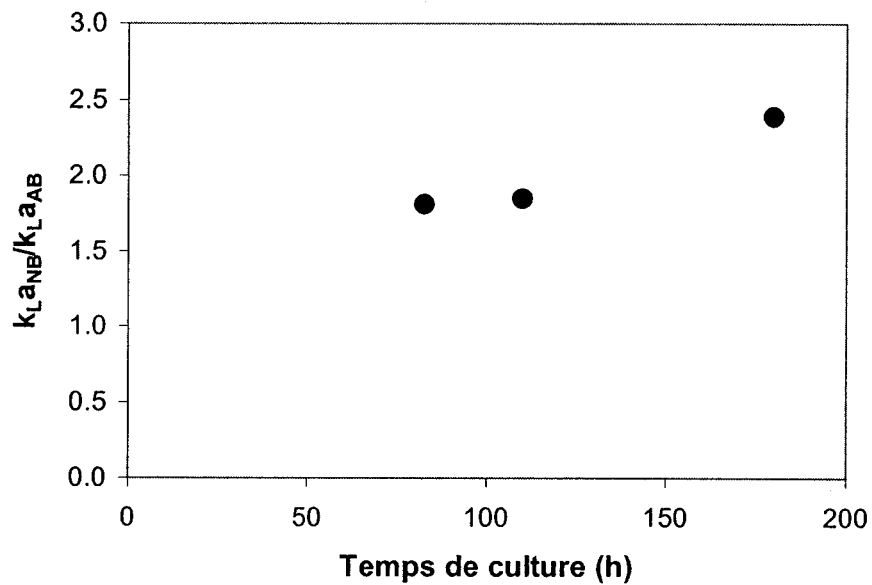


Figure 5.11. Rapport des $k_L a$ en culture.

Ces résultats montrent que le transfert gazeux du nouveau bioréacteur est deux fois plus efficace que le bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) en culture.

L'augmentation du transfert gazeux en milieu visqueux est donc plus élevée qu'avec l'eau. La Figure 5.1 montraient une augmentation de 70 % du k_La avec le nouveau bioréacteur par rapport à celui de Jolicoeur. Celle-ci passe à environ 100 % en milieu visqueux avec des cellules végétales en suspension.

6.0 MISE À L'ÉCHELLE DU BIORÉACTEUR

La mise à l'échelle du bioréacteur doit s'effectuer en gardant les rapports géométriques constants. Les plages de vitesses superficielles au diffuseur utilisée dans ce projet permettent un faible bullage en chaîne (Iguchi et coll., 1998). Les résultats de ce projet ne sont toutefois valides que pour ce régime d'écoulement. Tout changement dans le régime de bullage peut faire varier les présents résultats et rendre l'utilisation du modèle développé hasardeuse.

Le modèle développé à la section 4.2 permet la prédiction du k_La pour des échelles supérieures. La Figure 6.1 présente l'évolution du k_La pour les plus grands bioréacteurs prévus dans le cadre de ce projet de recherche. Le bioréacteur de 50 L de Phytobiotech possède un rapport H/D de 1.2. Pour le bioréacteur de 150 L, le H/D sera fixé à 1.9.

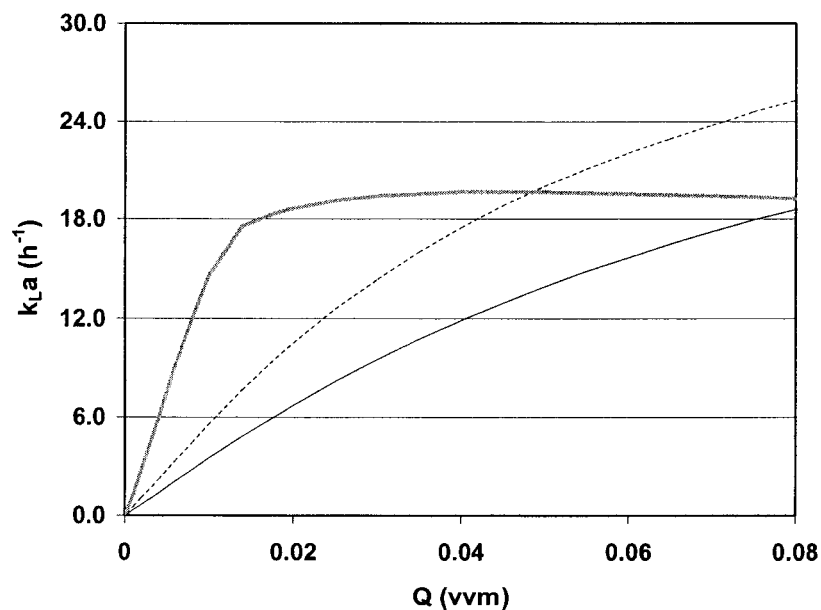


Figure 6.1. Prédiction du k_La dans l'eau lors de la mise à l'échelle du bioréacteur développé : (—) Bioréacteur de 5 L (H/D = 1.9); (---) Bioréacteur de 40 L (H/D = 1.2); (-.-) Bioréacteur de 150 L (H/D = 1.9).

Le modèle montre un plafonnement du k_La dans le bioréacteur de 150 L dans la plage de débit à l'étude. La tendance de la courbe du modèle pour le 150 L est générale pour le modèle. L'augmentation de la hauteur de liquide lors de l'augmentation de volume permet un temps d'échange plus long et explique le meilleur transfert à faibles débits pour des bioréacteurs plus volumineux. Par contre, toute augmentation du débit d'air augmente le taux de coalescence significativement pour les bioréacteurs plus volumineux. Le plafonnement du k_La pour le bioréacteur de 150 L est la combinaison de plusieurs phénomènes : le diamètre moyen des bulles supérieur à 2 mm qui entraîne une diminution du coefficient de transfert de masse k_L , une vitesse ascensionnelle des bulles supérieure qui diminue le temps de résidence des bulles dans la phase gazeuse et l'aire interfaciale supérieure générée par la production d'un plus grand nombre de bulles. La Figure 6.2 montre l'évolution du modèle pour le bioréacteur de 150 L pour deux rapports H/D : le rapport retenu (1.9) et le rapport optimal pour le 5 L si la contrainte physique du H/D n'avait pas été présente (3.6).

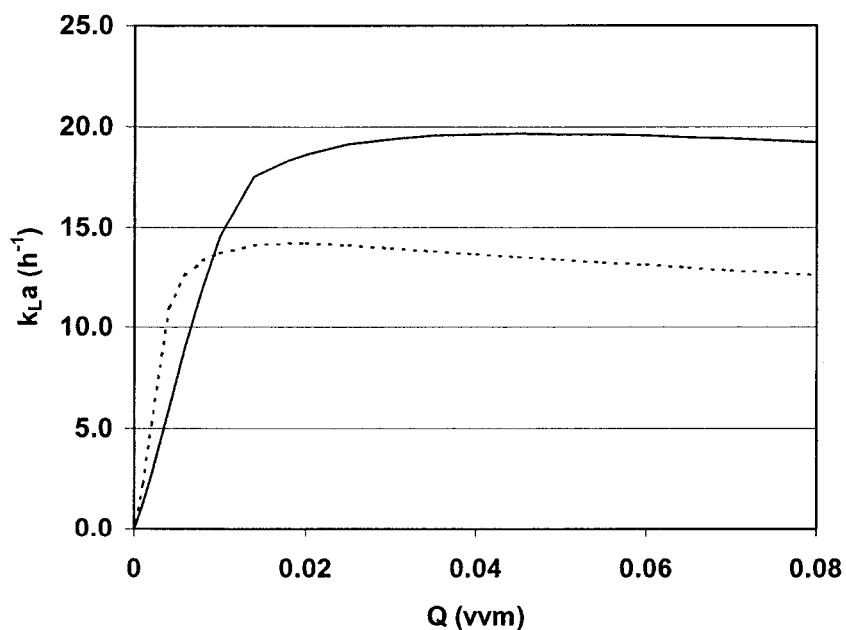


Figure 6.2. Évolution des k_La lors de la mise à l'échelle du bioréacteur de 150 L : (—) Bioréacteur de 150 L (H/D = 1.9); (---) Bioréacteur de 150 L (H/D = 3.6).

Le modèle montre que l'augmentation du rapport H/D conduit à une diminution du k_La maximal pouvant être atteinte lors de la mise à l'échelle. Par contre, le coefficient de transfert volumique maximal est atteint plus rapidement. Selon le modèle, une itération sur le rapport H/D permet d'atteindre un k_La maximal de 25 h^{-1} pour un débit de 0.05 vvm à une valeur de H/D de 1 pour le bioréacteur de 150 L. Toutefois, le manque d'information sur certains paramètres du modèle nécessiterait une étude plus approfondie avant d'entamer la construction de nouveaux bioréacteurs. Le taux de coalescence et le facteur d'écoulement sont les deux paramètres les plus susceptibles de montrer des comportements différents lors de l'augmentation d'échelle.

Le taux de coalescence permet de calculer directement le diamètre moyen des bulles dans le bioréacteur, ce qui en fait un paramètre extrêmement important. Sa linéarité a été fixée sur les observations de la grosseurs des bulles (seulement deux points) sur une hauteur de liquide de 28 cm. Il aurait été intéressant de voir le comportement des bulles pour des hauteurs plus élevées de fluides. Il existe probablement une taille maximale des bulles pouvant être atteinte. Au-delà de cette dimension, la vitesse des bulles est tellement élevée qu'elles sont immédiatement désengagées à la surface du fluide. Il est important de mentionner que la linéarité du taux de coalescence ne tient pas compte de ce phénomène possible. Quant au facteur d'écoulement, il peut également diverger de la présente étude pour des bioréacteurs de dimensions différentes. Une mise à l'échelle en préservant la vitesse en bout de pale ne génère pas nécessairement la même vitesse de fluide dans l'écoulement axial. Il est aussi possible qu'à partir d'une certaine hauteur, les bulles divergent de l'axe et se dirige sous les pâles du ruban. Le modèle ne tient pas compte de ces phénomènes possibles.

7.0 CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

L'objectif principal de ce projet était d'optimiser le design du bioréacteur de 5 L développé par Jolicoeur (1990) afin de permettre un transfert d'oxygène suffisant pour la culture de cellules végétales à haute densité cellulaire en cuvée alimentée. En premier lieu, le développement d'une technologie d'aération efficace a été effectué. Par la suite, les rapports géométriques du bioréacteur, du ruban hélicoïdal et des chicanes ont été optimisés dans le but d'atteindre un coefficient de transfert volumétrique d'oxygène (k_La) de 25 h^{-1} dans l'eau avec un débit maximal de 0.05 vvm et une vitesse d'agitation de 60 rpm. La validation en culture avec l'espèce *Eschscholtzia californica* a été faite dans le nouveau bioréacteur afin de démontrer son efficacité à haute densité cellulaire. La compréhension des phénomènes de transfert gazeux était nécessaire afin de prédire les k_La développés lors de la mise à l'échelle. Le but ultime dans lequel s'inscrit ce projet est de mettre le bioréacteur à une échelle de 150 L.

7.1 Optimisation du bioréacteur

L'étude de la formation des bulles sur des orifices simples et une plaque poreuse a permis de choisir cette dernière comme aérateur. Par la suite, l'étude du rapport H/D du bioréacteur a permis de déterminer la configuration optimale pour le transfert gazeux. Le pas de l'hélice et la largeur de la pâle ont été étudiés afin de déterminer la géométrie du ruban hélicoïdal qui permet le meilleur transfert gazeux et les temps de mélange les plus bas. Des simulations ont été entreprises à l'École Polytechnique pour caractériser l'effet de l'entrefer et de la vitesse d'agitation sur le taux de cisaillement. Le design de chicanes de surface a aussi été étudié.

La plaque poreuse a été choisie comme aérateur. La porosité de $0.4 \mu\text{m}$ permet la formation de bulles plus petites que de petits orifices simples ($350 \mu\text{m}$). Un rapport géométrique H/D de 1.9 a été choisi pour le dimensionnement du bioréacteur. Bien que les résultats montrent qu'un rapport H/D supérieur favorise de meilleurs k_La , l'espace

de travail ne permet pas l'utilisation d'un rapport plus élevé que 1.9 pour la mise à l'échelle géométrique à un bioréacteur de 150 L. Une hélice avec les rapports géométriques Pas/diamètre de l'agitateur de 1.45 et Largeur de la pâle/diamètre de l'agitateur de 0.20 a montré les meilleurs coefficients de transferts gazeux et les temps de mélange les plus bas. Par la suite, des simulations sur des bioréacteurs de 3 L ont montré que le taux de cisaillement maximal critique est de 60 s^{-1} . Les simulations sur le prototype de 5 L ont montré qu'un entrefer de 10 mm permet une vitesse d'agitation de 90 rpm sans atteindre le taux de cisaillement critique. La combinaison de l'ajout de chicanes de surface de 2 cm de profondeurs et d'une hauteur d'agitation à 1 cm des chicanes a permis d'augmenter le k_La à 12.1 h^{-1} et de réduire le temps de mélange à 12.2 s. L'augmentation de la vitesse d'agitation à 90 rpm et du débit d'aération à 0.1 vvm permet d'atteindre un k_La atteint de 20 h^{-1} sans causer de dommage aux cellules, ce qui représente une augmentation de 570 % du k_La initialement développée par l'ancien aérateur utilisé dans le bioréacteur de Jolicoeur (1990). Sans la contrainte physique de l'espace de travail, l'étude du rapport H/D montre que l'utilisation d'un rapport géométrique H/D de 3.6 aurait permis d'atteindre un k_La de 27 h^{-1} , ce qui représente une augmentation de 670 %. Une étude pourrait être entreprise pour vérifier le k_La d'un bioréacteur possédant un H/D de 3.6 à l'échelle de 5 L. Il serait ainsi possible de vérifier si les dimensions optimales de l'hélice et des chicanes le sont pour des rapports H/D supérieurs.

7.2 Caractérisation et validation en culture

La caractérisation du nouveau bioréacteur montre une amélioration de 70 % du k_La par rapport à l'ancien bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) aux mêmes débits. Par contre, le nouveau bioréacteur est moins sensible à l'augmentation de la vitesse d'agitation. Une augmentation de la vitesse d'agitation de 30 rpm augmente le k_La du nouveau bioréacteur de 15 % contrairement à 60 % pour l'ancien bioréacteur. Le nouveau bioréacteur permet cependant de meilleurs k_La à de faibles vitesses d'agitation ($< 90 \text{ rpm}$). Aucune différence significative de la croissance de cellules d'*Eschscholtzia*

californica n'a été observée lors de cultures réalisées en parallèle dans les deux bioréacteurs. Par contre, les débits totaux et d'oxygène nécessaires pour un contrôle de l'oxygène dissout à 90 % de la saturation avec l'air du bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) a dépassé les limites du projet (0.05 vvm). Les forts débits employés ont causé la formation excessive de mousse qui a causé l'arrêt prématuré de la culture. Une analyse des k_La en culture montre que le k_La du nouveau bioréacteur est deux fois plus élevé que le k_La du bioréacteur développé par Jolicoeur (1990) en milieu visqueux pour une concentration cellulaire similaire. Puisque le transfert gazeux est amélioré, il serait intéressant d'observer le comportement du nouveau bioréacteur en mode perfusion. La diminution de la production de mousse par l'évacuation des protéines et le maintien de l'environnement nutritionnel permettrait probablement de dépasser régulièrement les $20 \cdot 10^6$ cellules/ml.

7.3 Mise à l'échelle

Le modèle développé montre qu'une mise à l'échelle géométrique du bioréacteur optimisée est possible. Le développement d'un modèle à l'échelle de 5 L permet de prédire le k_La pour des échelles supérieures. Des modèles empiriques ont été nécessaires pour caractériser le taux de coalescence et le facteur d'écoulement. L'utilisation du modèle montre que le k_La maximal diminue lorsque l'échelle augmente. La diminution est attribuée à un diamètre moyen des bulles plus élevé déterminé à partir du taux de coalescence. L'effet de l'augmentation du temps de résidence des bulles causé par une hauteur de liquide plus élevée est masqué par la diminution de l'aire interfaciale, du coefficient de transfert de masse k_L , et de l'augmentation de la vitesse ascensionnelle des bulles causés par une augmentation du diamètre moyen des bulles. Le manque d'information sur certains paramètres tel que le taux de coalescence pour des hauteurs supérieures de liquide et le facteur d'écoulement nécessitent une étude plus approfondie à différentes échelles avant de généraliser le modèle et d'entamer la construction de nouveaux bioréacteurs.

BIBLIOGRAPHIE

ABDULLAH, M.A., ARIFF, A.B., MARZIAH, M., ALI, A.M. et LAJIS, N.H. (2000). Strategies to overcome foaming and wall-growth during the cultivation of *Morinda elliptica* cell suspension culture in a stirred-tank bioreactor. Plant Cell Tissue and Organ Culture, **60**, 205-212.

AL-MASRY, J.Y. et WAHEED, A. (1999). Effects of antifoam and scale-up on operation of bioreactors. Chemical Engineering and Processing, **38**, 197-202.

ANDOU, S., YAMAGIWA, K. et OHKAWA, A. (1996). Effect of gas sparger type on operational characteristics of a bubble column under mechanical foam control, Journal of Chemical Technology and Biotechnology, **66**, 65-71.

ARJUNWADKAR, S J., SARVANAN, K., KULKARNI, P.R. et PANDIT, A.B. (1998). Gas-liquid mass transfer in dual impeller bioreactor. Biochemical Engineering Journal, **1**, 99-106.

ASHLEY, K.I., HALL, K.J. et MAMINIC, D.S. (1991). Factors influencing oxygen transfer in fine pore diffused aeration. Water Research, **25**, 1479-1486.

AUBRY, D. (1994). Développement et commande d'un bioprocédé de production de sanguinarine par le culture de cellules végétales. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

AUNINS, J.G., WOODSON, B.A. Jr, HALE, T.K. et WAND, D.I.C. (1989). Effects of paddle impeller geometry on power input and mass transfer in small-scale animal cell culture vessels. Biotechnology and Bioengineering, **34**, 1127-1132.

BADINO Jr., A.C., FACCIOTTI, M.C.R. et SCHMIDELL, W. (2000). Improving k_La determination in fungal fermentation, taking into account electrode response time. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 75, 469-474.

BAKKER, A. et van der AKKER, H.E.A. (1994). A computational model for the gas-liquid flow in stirred reactors. Trans. IChemE., 72, 594-606.

BALLICA, R. et DEWEY, D.Y. (1993). Effects of rheological properties and mass transfer on plant cell bioreactor performance : Production on tropane alkaloids. Biotechnology and Bioengineering, 42, 1181-1189.

BALLICA R. et Ryu, D.D.Y. (1992). Rheological properties of plant cell suspensions. Biotechnology Progress, 8, 413-420.

BALLICA R. et 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.

BANERJEE, U.C. (1993). Effect of stirrer speed, aeration rate and cell mass concentration on volumetric oxygen transfer coefficients (k_La) in the cultivation of *Curvularia lunata* in a batch reactor. Biotechnology Techniques, 7, 733-738.

BARBORA, M., ZAJAT, M. et HOKKA, C.O. (2000). General relationship for volumetric oxygen transfer coefficient (k_La) prediction in tower bioreactors utilizing immobilized cells. Bioprocess Engineering, 22, 181-184.

BHAVARAGU, S.M., MASHELKAR, R.A. et BLANCH, H.W. (1978). The Design of Gas Sparged Devices for Viscous Liquid Systems. AIChE. Journal, 24, 454-466.

BIN, A.K. (1995). Application of a Single-Bubble Model in Estimation of Ozone-Transfer Efficiency in Water. Ozone - Science and Engineering, 17, 469-484.

BIRCH, D. et AHMED, N. (1996). Gas sparging in vessels agitated by mixed flow impellers. Powder Technology, 88, 33-38.

BLANCHARD, D.C. et SYZDEK, L.D. (1977). Production of air bubbles of a specified size. Chemical Engineering Science, 1109-1112.

BOYLE, W.C. et REDMON, D.T. (1983). Biological fouling of fine bubble diffusers : State of art. ASCE Jour. Of Env. Eng., 109, 991-105.

BREDWELL, M.D., TELGENHOFF, M.D. et WORDEN, R.M. (1995). Formation and Coalescence Properties of Microbubbles. Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A - Enzyme Engineering and Biotechnology, 501-510.

BREDWELL, M.D. et WORDEN, R.M. (1998). Mass-transfer properties of microbubbles. 1. Experimental studies. Biotechnology Progress, 14, 31-38.

BREDWELL, M.D. et WORDEN, R.M. (1998). Mass-transfer properties of microbubbles. 2. Analysis using a dynamic model. Biotechnology Progress, 14, 39-46.

BUCHHOLZ, H., BUCHLOLZ, R., LÜCKE, J. et SCHÜGERL, K. (1978). Bubble swarm behavior and gas absorption in non-newtonian fluids in sparged columns. Chemical Engineering Science, 1061-1070.

BURNS, S.E., YIACOUMI, S. et TSOURIS, C. (1997). Microbubble generation for environmental and industrial separations. Separation and purification technology, 11, 221-232.

BURNS, S.E. et ZHANG, M. (2001). Effects of System Parameters on the Physical Characteristics of Bubbles Produced through Air Sparging. Environmental Science and Technology - Columbus, 35, 204-208.

CAMARASA, E., VIAL, C., PONCIN, S., WILD, G., MIDOUX, N. et BOUILLARD, J. (1999). Influence of coalescence behaviour of the liquid and of gas sparging on hydrodynamics and bubble characteristics in a bubble column. Chemical Engineering and Processing, 38, 329-344.

CHABRA, R.P. (1993). Bubbles, Drops, and Particles in Non-newtonian fluids, CRC Press.

CHANG, H.N., HALARD, B. et MOO-YOUNG, M. (1989). Measurement of K_La by a gassing-in method with oxygen-enriched air. Biotechnology and Bioengineering, 34, 1147-1157.

CHAPMAN, C.M., NIENOW, A.W. et MIDDLETON, J.C. (1980). Surface aeration in a small, agitated sparged vessel. Biotechnology and Bioengineering, 22, 981-999.

CLIFT, R., GRACE, J.R. et WEBER, M.E. (1978). Bubbles, Drops, and Particles, Academic Press.

COTE, P., BERSILON, J., HUYARD, A. et FAUP, G. (1988). Bubble-free aeration using membranes: process analysis. Journal Water Poll. Control. Fed., 60, 1986-1992.

CURTIS, W.R. et EMERY, A.H. (1993). Plant cell suspension culture rheology. Biotechnology and Bioengineering, 42, 520-526.

DAVIDSON, L. et AMICK Jr., E.H. (1956). Formation of Gas Bubbles at Horizontal Orifices. AIChE, 2, 337-342.

de ORY, I., ROMERO, L.E. et CANTERO, D. (1999). Laboratory scale equipment for the determination of k_La in bio-reactors. Bioprocess Engineering, 20, 73-76.

DECKWER, W.D., LOUISI, Y., ZAIDI, A. et RALEK, M. (1980). Hydrodynamic properties of the Fischer-Tropsch slurry process. Ind. Engineering Chemical Process Des. Dev., 19, 699-708.

DECKWER, W.D., NGUYEN-TIEN. K., SCHUMPE, A. et SERPEMENT, Y. (1982). Oxygen mass transfer into CMC solutions in a bubble column. Biotechnology and Bioengineering, 24, 461-481.

DEY, D., BOULTON-STONE, J.M., EMERY, A.N. et BLAKE, J.R. (1997). Experimental comparisons with a numerical model of surfactant effects on the burst of a single bubble. Chemical Engineering Science - Paper Edition, 52, 2769-1784.

ERIKSEN, N.T., POULSEN, B.R. et LONSMANN IVERSEN, J.J. (1998). Dual sparging laboratory-scale photobioreactor for continuous production of microalgae. Journal of Applied Phycology, 10, 377-382.

EVANS, G.M., RIGBY, G.D., HONEYANDS, T.A et HE, Q.L. (1999). Gas dispersion through porous nozzles into down flowing liquids. Chemical Engineering Science - Paper Edition, 54, 4861-4867.

FIGUEIREDO, M. et CALDERBANK, P.H. (1979). The scale-up of aerated mixing vessels for specified oxygen dissolution rates. Chemical Engineering Science, 34, 1333-1338.

FISSET S. (2000). Étude de l'effet des gaz dissous sur la croissance de cellules végétales en bioréacteur. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

FRASER, R.D. et HILL, G.A. (1993). Hydrodynamic Characteristics of a spinning Sparger, External Loop Airlift Bioreactor. Canadian Journal of Chemical Engineering, 71, 419-428.

FREGAPANE, G., RUBIO-FERNANDEZ, H., NIETO, J. et SALVADOR, M.D. (1999). Wine vinegar production using a noncommercial 100-litre bubble column reactor equipped with a novel type of dynamic sparger. Biotechnology and Bioengineering, 63, 141-146.

From discovery to production - Scaleup's one of the most important and least talked about aspects of mixing. Chemical Processing - Chicago, 62, 45-50. (1999).

FUCHS, R., RYU, D.Y. et HUMPHREY, A.E. (1978). Effect of Surface Aeration on Scale-Up Procedures for fermentation Processes. Ind. Engineering Chemical Process Design Dev., 10, 192.

FUJIE, K., KASAKURA, T., TSUCHIYA, K. et TOMITA, Y. (1997). Effects of Air Diffuser Arrangement on Hydrodynamics and Oxygen Transfer in Activated Sludge Aeration Tanks. Environmental Technology, 18, 663-668.

FUKUI, H. et TANAKA, M. (1995). An envelope-shaped film culture vessel for plant cell suspension cultures and metabolite production without agitation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 41, 17-22.

GAUTHIER, L., THIBAUT, J. et LEDUY, A. (1991). Measuring kla with randomly pulsed dynamic method. Biotechnology and Bioengineering, 37, 889-893

GAVRILESCU, M. et ROMAN, R.V. (1994). Oxygen Mass Transfer and Gas Holdup in a Bubble Column Bioreactor with Biosynthesis Liquids. Acta Biotechnology, 14, 27-34.

GAVRILESCU, M. et TUDOSE, R.Z. (1996). Bubble Column Reactors of Small Dimensions I. Gas holdup in gas/liquid Dispersions. Hung. J. Ind. Chem., 24, 25-34.

GAVRILESCU, M. et TUDOSE, R.Z. (1996). Bubble column reactors of small dimensions II. Mass transfer in gas/liquid dispersions. Hungarian Journal of Industrial Chemistry, 24, 81-86.

GEZORK, K.M., BUJALSKI, W., COOKE, M. et NIENOW, A.W. (2000). The Transition from Homogenous to heterogenous flow in a gassed, stirred vessel. Chemical Engineering Research and Design, 78, 363-370.

GOMEZ, C.O., ESCUDERO, R. et FINCH, J.A. (2000). Determining Equivalent Pore Diameter for Rigid Porous Spargers. Canadian Journal of Chemical Engineering, 78, 785-792.

GUELL, C. et GIRALT, J. (1994). Determination of K_La Values Using CO₂ Mass Balance Technique in a Coal Desulfurization Bioreactor. I and EC Research, 33, 950-956.

GREVSKOTT, S., SANNAES, B.H., DUDUKOVIC, M.P., HJARBO, K.W. & SVENDSEN, H.F. (1996). Liquid circulation, bubble size distributions, and solids movement in two- and three-phase bubble columns. Chemical Engineering Science, 51, 1703-1713.

GUY, C. (1984). Étude du comportement hydrodynamique d'une colonne à bulles, Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

HAQUE, M.W., NIGAM, K.D.P. et JOSHI, J.B. (1986). Optimum gas sparger design for bubble columns with a low height to diameter ratio. Chemical Engineering Journal, 33, 63-69.

HEGARTY, P.K., SMART, N.J., SCRAGG, A.H. et FOWLER, M.W. (1986). The aeration of *Catharanthus roseus* L. G. Don suspension cultures in airlift bioreactors: The inhibitory effect at high aeration rates on culture growth. Journal of Experimental Botany, 37, 1911-1920.

HEIJEN, J.J. et van't RIET, K. (1984). Mass transfer, mixing and heat transfer phenomena in low viscosity bubble column reactors. Chemical Engineering Journal, 28, B21-B42.

HERBARD, G., BASTOUL, D. et ROUSTAN, M. (1996). Influence of the gas sparger on the hydrodynamic behaviour of bubble columns. Trans I Chem. E., 74(A), 406-414.

HSIAO, T.Y., BACANI, F.T., CARVALHO, E.B. et Curtis, W.R. (1999). Development of a Low Capital Investment Reactor System: Application for Plant Cell Suspension Culture. Biotechnology Progress, 15, 114-122.

HU, W.S., MEIER, J. et WANG, D.C.I. (1986). Use of surface aerator to improve oxygen transfer in cell culture. Biotechnology and bioengineering, 28, 122-125.

IGUSHI, M., KAWABATA, H., NAKAJIMA, K. et MORITA, Z. (1995). Measurement of Bubble Characteristics in a Molten Iron Bath at 1600 (degree)C Using an Electroresistivity Probe. Metallurgical and Materials Transactions - Series B, 26, 67-74.

IGUSHI, M. et CHIHARA, T. (1998). Water Model Study of the Frequency of Bubble Formation under Reduced and Elevated Pressures. Metallurgical and Materials Transactions - Series B, 29, 755-762.

IGUCHI, M., KAJI, M. et MORITA, Z-I. (1998). Effects of Pore Diameter, Bath Surface Pressure, and Nozzle Diameter on the Bubble Formation from a Porous Nozzle. Metallurgical and Materials Transactions - Series B, 29, 1209-1218.

JAMIALAHMADI, M., BRANCH, C. et MÜLLER-STEINHAGEN, H. (1994). Terminal Bubble Rise Velocity in Liquids. Trans. IchemE, 72, Part A, 119-122.

JOLICOEUR, M. (1990). Conception d'un bioréacteur pour la culture de cellules de plantes en suspension. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

JOLICOEUR, M., CHAVARIE, C., CARREAU, P.J. et ARCHAMBAULT, J. (1992). Development of a Helical-Ribbon Impeller Bioreactor for High-Density Plant Cell Suspension Culture. Biotechnology and Bioengineering, 39, 511-521.

JOSHI, J.B., ELIAS, C.B. et PATOLE, M.S. (1996). Role of hydrodynamic shear in the cultivation of animal, plant and microbial cells. Chemical Engineering Journal and Biochemical Engineering Journal, 62, 121-141.

JU, L.-W. et ARMIGER, W.B. (1990). Enhancing oxygen transfer in surface-aerated bioreactors by stable foams, American Chemical Society and AIChE, 262-265.

JU, L.K. et SUNDARAJAN, A. (1995). The effects of cells on oxygen transfer in bioreactors. Bioprocess Engineering, 13, 271-281.

KAMEN, A.A., GARNIER, A., ANDRÉ, G., ARCHAMBAULT, J. et CHAVARIE, C. (1993). Determination of mass transfer parameters in surface aerated bioreactors with bubble entrainment, Mass Transfer Parameters in Surface Aerated Bioreactors.

KASTANEK, F., ZAHRADNIK, J., RYLEK, M. et KRATSCHUIL, J. (1980). Scaling-up bubble reactors basis of laboratory data. Chemical Engineering Science, 35, 456-462.

KHARE, A.S. et NIRANJAN, K. (1995). Impeller-agitated aerobic reactor : the influence of tiny bubbles on gas hold-up and mass transfer in highly viscous liquids. Chemical Engineering Science, 50, 1091-1105.

KIERAN, P.M., MacLOUGHLIN, P.F. et MALONE D.M. (1997). Plant cell suspension cultures : some engineering considerations. Journal of Biotechnology, 59, 39-52.

KIM, J.O. et KIM S.D. (1990). Gas-Liquid Mass Transfer in a Three Phase Fluidized Bed with Floating Bubble Breakers. Canadian Journal of Chemical Engineering, 68, 368-375.

KIM, D.I., CHO, G.H., PEDERSEN, H. et CHIN C.K. (1991). A hybrid bioreactor for high density cultivation of plant cell suspensions, Applied Microb. Biotechnology, 34, 726-729.

KIM, Y.-K. et BOYLE, W.C. (1993). Mechanisms of Fouling in Fine-Pore Diffuser Aeration. Journal of Environmental Engineering - American Society of Civil Engineers, 119, 1119-1138.

KOIDE, K., KATO, S., TANAKA, Y. et KUBOTA, H. (1968). Bubbles generated from porous plate. Journal of chemical Engineering Of Japan, 1, 51-56.

L'ÉCUYER-COELHO, H. (2000). Développement d'un procédé pour la culture de cellules végétales à haute concentration. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

LEARY, R.D., ERNEST, L.A. et KATZ, W.J. (1969). Full scale oxygen transfer studies of seven diffuser systems. Journal of Water Pollution Control Fed., 41, 459-473.

LECKIE, F., SCRAGG, A.H. et CLIFFE, K.C. (1990). An investigation into the role of initial k_La on the growth and alkaloid accumulation by cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, 37, 364-370.

LEIBSON, I., HOLCOMB, E.G., CACOSO, A.G. et JAMIC, J.J. (1956). Rate of flow and mechanics of bubble formation from submerged orifices. AIChE Journal, 2, 296-306.

LINEK, V., MARRHOFEROVA, J. et MOSNEVORA, J. (1970). The Influence of diffusivity on liquid mass transfer in solutions of electrolytes. Chemical Engineering Science, 25, 1033-1045.

LINEK, V., BENES, P. et VACEK, V. (1989). Dynamic pressure method for K_La measurement in large-scale bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 33, 1406-1412.

LIU, F.-J., CHOU, K.-S. et HUANG, C.-T. (1999). Oxygen Transfer in a Bubble Column with Porous Ceramic Gas Distributor. Journal of Environmental Science and Health - Part A - Toxic Hazardous Substances, 34, 1859-1873.

LU, G.Z., THOMPSON, B.G., SURESH, M.R. et GRAY, M.R. (1995). Cultivation of Hybridoma Cells in an Inclined Bioreactor. Biotechnology and Bioengineering, 45, 176-186.

LU, W.-M., WU, H.-Z. et CHOU, C.-Y. (1999). Effect of Impeller Blade Number on K_La in Mechanically Agitated Vessels. Korean Journal of Chemical Engineering, 16, 703-708.

LUO, H. et SVENDSEN, H.F. (1996). Theoretical Model for Drop and Bubble Breakup in Turbulent Dispersions. AIChE Journal - American Institute of Chemical Engineers, 42, 1225-1233.

MACHON, V., PACEK, A.W. et NIENOW, A.W. (1997). Bubble sizes in electrolyte and alcohol solutions in a turbulent stirred vessel. Chemical Engineering Research & Design, Part A: Transactions of the Institute of Chemical Engineers, 75, 339-348.

MANO, T., KIMURA, T., IIJIMA, S., TAKAHASHI, K. et KOBAYASHI T. (1990). Comparison of oxygen supply methods for cultures of shear-stress sensitive organism including animal cell culture. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 47, 259-271.

MARKX, G.H. et PETHIG, R. (1995). Dielectrophoretic Separation of Cells : Continuous Separation. Biotechnology and Bioengineering, 45, 337-343.

MARMUR, A. et RUBIN, A (1976). A theoretical model for bubble formation at an orifice submerged in a inviscid liquid. Chemical Eng. Science, 31, 453-463.

MARRUCCI, G. et NICODEMO, L. (1967). Coalescence of gas bubbles in aqueous solutions of inorganics electrolytes. Chemical Engineering Science, 22, 1257-1297.

MAVITUNA, F. (1996). Strategies for Bioreactor Scale-up. NATO ASI Series E Applied Sciences - Advanced Study Institute, 305, 125-142.

McCANN, D.J. et PRINCE, R.G.H. (1969). Bubble formation and weeping at a submerged orifice. Chemical Eng. Science, 24, 801-814.

MEDIC, L., CEHOVIN, A., KOLOINI, T. et PAVKO, A. (1989). Volumetric gas-liquid mass transfert coefficients in a rectangular bubble column with a rubber aeration pad. Chemical Engineering Journal, 41, B-51-B-54.

MEHTA, V.D. et SHARMA, M.M. (1971). Mass transfer in mechanically agitated gas-liquid contactors. Chemical Engineering Science, 26, 461-479.

MERCHUK, J.C. (1991). Shear effects on suspended cells. Advances in Biotechnology Engineering, 44, 65-95.

MERCHUK, J.C, BEN-ZVI YONA, S. et NIRANJAN, K. (1994). Why use bubble-column bioreactors?. Trends in Biotechnology, 12, 501-511.

MERCHUK, J.C., CONTRERAS, A., GARCIA, F. et MOLINA, E. (1998). Studies of mixing in a concentric tube airlift bioreactor with different spargers. Chemical Engineering Science - Paper Edition, 53, 709-720.

MICHAELS, J.D., MALLIK, A.K. et PAPOUTSAKIS, E.T. (1996). Sparging and Agitation-Induced Injury of Cultured Animal Cells: Do Cell-to-Bubble Interactions in the Bulk Liquid Injure Cells? Biotechnology and Bioengineering, 51, 399-409.

MIYAHARA, T., MATSUBA, Y. et TAKAHASHI, T. (1983). The size of Bubbles Generated from Perforated Plates. Int. Chem. Eng., 23, 517-523.

MIYAHARA, T. et TANAKA, A. (1997). Size of Bubbles Generated from Porous Plates. Journal of Chemical Engineering of Japan, 30, 353-355.

MODARESSI, H., MILNE, B. et HILL, G.A. (1997). Hydrodynamic Behavior of a Liquid-Lift, External-Loop Bioreactor Using a Spinning Sparger. Ind. Eng. Chem. Research, 36, 4681-4687.

MONTES, F.J., CATALAN, J. et GALAN, M.A. (1999). Prediction of k_La in yeast broths. Process Biochemistry, 34, 549-546.

MOORHOUSE, S.D., WILSON, G., HENNERTY, M.J., SELBY, C. et MACANSAOIR, S. (1996). A plant cell bioreactor with medium-perfusion for control of somatic embryogenesis in liquid cell suspensions. Plant Growth Regulation, 20, 53-56.

MOTARJEMI, M. et JAMESON, G.J. (1978). Mass transfer from very small bubbles – the optimum bubble size for aeration. Chemical Engineering Science, 33, 1415-1423.

MULLER, F.L. et DAVIDSON, J.F. (1992). On the contribution of small bubbles to mass transfer in bubble columns containing highly viscous liquids. Chemical Engineering Science, 47, 3525-3532.

NAMDEV, P.K. et DUNLOP, E.H. (1995). Shear Sensitivity of Plant Cells in Suspensions : Present and Future, Applied Biochemistry and Biotechnology. 54, 109-131.

NASSAR, R., LUEBBERT, A., SSCHMIDT, J. et ZHAO, Q. (2000). A Mathematical Model for Mass Transfer between Bubble and Liquid. Hungarian Journal of Industrial Chemistry, 28, 139-142.

PARAMESHWARAN, K., VISVANATHAN, C. et AIM, R.B. (1999). Membrane as Solid/Liquid Separator and Air Diffuser in Bioreactor. Journal of Environmental Engineering, 125, 825-834.

PARTHASARATHY, R., JAMESON, G.I. et AHMED, N.M. (1991). Bubble break-up in stirred vessels predicting the Sauter mean diameter. Trans. IChemE., 69(A), 295-301.

PAREILLEUX, A. (1987). Technologie et stratégies de mise en œuvre des cultures en masse de cellules végétales. Ann. Pharm. Fr., 45, 155-162.

PETIARD, V. (1987). La culture végétale in vitro: originalité et utilisations. Ann. Pharm. Fr., 45, 111-119.

PHILIP, J., PROCTER, J.M., NIRANJAN, K. et DAVIDSON, J.F. (1990). Gas hold-up and liquid circulation in internal loop reactors containing highly viscous Newtonian and non-newtonian liquids. Chem. Eng. Science, 45, 651-662.

POLLARD, D.J., SHAMLOU, P.A., LILLY, M.D. et Ison, A. P. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* fermentations in a pilot scale airlift bioreactor: Comparison of air sparger configurations. Bioprocess Engineering, 15, 279-288.

POULSEN, B.R. et IVERSEN, J.J.L. (1998). Characterization of gas transfer and mixing in a bubble column equipped with a rubber membrane diffuser. Biotechnology and Bioengineering, 58, 633-641.

POULSEN, B.R. et IVERSEN, J.J. (1999). Membrane sparger in bubble column, airlift, and combined membrane-ring sparger bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 64, 452-458.

PRAKASH, A. et BRIENS, C.L. (1990). Porous gas distributor in bubble columns. Effect of liquid presence on distributor pressure drop. Effect of start-up procedure on distributor performance. Canadian Journal of Chemical Eng., 68, 204-210.

PRINCE, M.J. et BLANCH, H.W. (1990). Transition electrolyte concentrations for bubble coalescence. AIChE Journal, 36, 1425-1429.

REISMAN, H.B. (1993). Problems in Scale-Up of Biotechnology Production Processes. Critical Reviews in Biotechnology, 13, 195-254.

REWATKAR, V.B., DESHPANDE, A.J., PANDIT, A.B. et JOSHI, J.B. (1993). Gas hold-up behavior of mechanically agitated gas-liquid reactors using pitched blade downflow turbines. Canadian Journal of Chemical Engineering, 71, 226-237.

RICE, R.G., TUPPERAINEN, J.M.I. et HEDGE, R.M. (1981). Dispersion and hold-up in bubble columns-comparaison of rigid and flexible spargers. Canadian Journal Chemical Engineering, 59, 677-687.

RICE, R.G. et LITTLEFIELD, M.A. (1987). Dispersion coefficients for ideal cubbly flow in truly vertical bubble columns. Chemical Engineering Science, 42, 2045-2053.

ROBINSON, C.W. et WILKIE, C.R. (1973). Oxygen absorbtion in stirred tanks: a correlation for ionic strength effects. Biotechnology and Bioengineering, 15, 755-782.

ROONEY, T. et HUIBREGTSE, G.L. (1983). Increased oxygen transfer efficiency with coarse bubble diffusers. Journal of Water Pollution Control Fed., 52, 2315-2326.

ROUSTAN, M., GBAHOUE, L. et ROQUES, H. (1977). Étude de la retention gazeuse dans les Colonnes à Bulles en ascension libre. Chem. Eng. Journal, 13, 1-5.

SAHAI, O. et KNUTH, M. (1985). Commercializing Plant Tissue Culture Processes : Economics, Problems and Prospects. Biotechnology Progress, 1, 1-9.

SCHLATMANN, J.E., NUUTILA, A.M., van GULIK, W.M., ten HOOPEN, H.J.G., VERPOOTE, R. et HEIJNEN, J.J. (1993). Scaleup of ajmalicine production by plant cell cultures of *Catharanthus roseus*. Biotechnology and Bioengineering, 41, 253-262.

SCHNEIDER M., REYMOND, F., MARISON, I.W. et STOCKAR, U.V. (1995). Bubble-free oxygenation by means of hydrophobic porous membranes. Enzyme and Microbial Technology, 17, 839-847.

SCOTT, J.A., HOWELL, J.A., ARNOTT, T.C., SMITH, K.L. et BRUSKA, M. (1996). Enhanced system k_La and permeate flux with a ceramic membrane bioreactor. Biotechnology Techniques, 10, 287-290.

SCRAGG, A. (1995). The problems associated with high biomass levels in plant cell suspension. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 43, 163-170.

SHULLER, L.M. et KARGI F. (1992). Bioprocess Engineering, Basic Concepts. Prentice Hall International Series, New Jersey.

SHIBASAKI, N., HIROSE, K., YONEMOTO, T. et TADAKI, T. (1992). Suspension Culture of *Nicotiana tabacum* cells in a Rotary-Drum bioreactor. Journal of Chem. Technology and Biotechnology, 53, 359-363.

SIE, S.T. et KRISHNA, R. (1998). Process development and scale up: 1. Process development strategy and methodology. Reviews in Chemical Engineering, 14, 47-88.

SIFI, I. (1999). Mise au point et caractérisation d'un bioréacteur pour la culture de cellules végétales. Projet de fin d'étude, Université du Québec à Trois-Rivières, Canada.

SIROIS J. (1997). Optimisation de la croissance de cellules d'Eschscholtzia californica en bioréacteur. Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SIROIS J. (2000). Modélisation et optimisation en continu d'un procédé de culture de cellules végétales. Thèse de doctorat, École Polytechnique de Montréal, Canada.

SMITH, B.C. et SKIDMORE, S.R. (1990). Mass tranfer phenomena in an airlift reactor: Effets of solids loading and temperature. Biotechnology and Bioengineering, 35, 483-491.

SOTELO, J.L., BENITEZ, F.J., BELTRAN-HEREDIA, J. et RODRIGUEZ, C. (1994). Gas holdup and mass transfer coefficients in bubble columns. 1. Porous glass-plate diffusers. International Chemical Engineering, 34, 82-90.

STEJSKAL, J. et POTUCEK, F. (1985). Oxygen Transfer in Liquids. Biotechnology and Bioengineering, 27, 503-508.

SU, W-W. et HUMPHREY, A.E. (1989). Studies on the different oxygenation methods for enhancing oxygen transfer in high cell density plant tissue cultures. AIChE Annual Meeting, San Francisco.

SU, W.W. et HUMPHREY, A.E. (1990). Production of Rosmarinic acid in high perfusion cultures of *Anchusa officinalis* using a high sugar medium. Biotechnology Letters, 12, no.11, 733-798.

SU, W.W. et HUMPHREY, A.E. (1991). Production of Rosmarinic acid from perfusion culture of *Anchusa officinalis* in a membrane-aerated bioreactor. Biotechnology Letters, 13, 889-892.

SU, W.W. et LEI, F. (1993). Perfusion Strategy for Rosmarinic Acid Production by *Anchusa officinalis*. Biotechnology and Bioengineering, 42, 884-890.

SUCKER H.G., JORDAN, M., EPPENBERGER, H.M. et WIDMER, F. (1994). Bubble bed reactor: A reactor design to minimize the damage of bubble aeration on animal cells. Biotechnology and Bioengineering, 44, 1246-1254.

TAKESONO, S., ONODERA, M., YAMAGIWA, K. et OHKAWA, A. (1993). Design and operation of rotating-disk foam-breakers fitted to tower fermenters. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 57, 237-246.

TAN, R.B.H. et HARRIS, I.J. (1986). A model for non-spherical bubble growth at a single orifice. Chemical Eng. Science, 41, 3175-3182.

TANAKA H. (1982). Oxygen transfer in broths of plant cells at high density. Biotechnology and Bioengineering, 24, 425-442.

TANAKA, H., NISHIKIMA, F. et SUMA, M. (1983). Rotating drum fermentor for plant cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering, 25, 2359-2370.

TANAKA, H. (2000). Technological problems in cultivation of plant cells at high density. Biotechnology and Bioengineering, 67, 775-790.

TAVAKOLI, T., SYAIFUL, S., BASCOUL, A. et DELMAS, H. (1995). Évolution axiale du coefficient de transfert de matière en colonne à bulles et en lit fluidisé triphasique. Canadian Journal of Chemical Engineering, 73, 55-65.

THORAT, B.N., SHEVADE, A.V., BHILEGAONKAR, K.N., AGLAWE, R.H., VEERA, U.P., THAKRE, S.S., PANDIT, A. B., SAWANT, S. B. et JOSHI, J. B. (1998). Effect of Sparger Design and Height to Diameter Ratio on Fractional Gas Hold-up in Bubble Columns. Chemical Engineering Research and Design, 76, 823-834.

TILTON, J.N. et RUSSELL, T.W.F. (1982). Designing gas-sparged vessels for mass transfer. Chemical Engineering, 61-68.

TRAMBOUZE, P. (1990). Reactor scaleup methodology. Chemical Engineering Progress, 86, 23-31.

TRIBE, L.A., BRIENS, C.L. et MARGARITIS, A. (1995). Determination of the volumetric mass transfert coefficient (k_{la}) using the dynamic "gas out-gas in" method: analysis of

errors caused by dissolved oxygen probes. Biotechnology and Bioengineering, 46, 388-392.

TSE, K., MARTIN, T., McFARLANE, C.M. et NIENOW, A.W. (1998). Visualisation of bubble coalescence in a coalescence cell, a stirred tank and a bubble column. Chemical Engineering Science, 53, 112-118.

TSUGE, H., TANAKA, Y. et HIBINO, S.I. (1981). Effects of the physical properties of gas on the volume of bubble formed from a submerged single orifice. Can. Journal of Chemical Eng., 59, 569-572.

van KREVELEN, D.W. et HOFTIJER, P.J. (1950) Studies of gas-bubble formation. Chemical Engineering Progress, 46, 29-35.

van't RIET, K. (1979). Review of Measuring Methods and Results in Non viscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev., 18, 357-364.

van't RIET, K. et TRAMPER, J. (1991). Chapitre 8: Shear. Basic Bioreactor Design, 136-180.

WAGNER, F. et VOGELMANN, H. (1977). Cultivation of plant tissue cultures in bioreactors and formation of secondary metabolites. Plant tissue culture and its biotechnological application, BURY, W., REINHART, E. et ZENK, V.H., Springer-Verlag, New York, 245-252.

WAGNER, M.R. et POPEL, H.J. (1998). Oxygen transfer and aeration efficiency - Influence of diffuser submergence, diffuser density and blower type. Water Science and Technology, 38, 1-6.

WANG, S.-J. et ZHONG, J.-J. (1996). A Novel Centrifugal Impeller Bioreactor. II. Oxygen Transfer and Power Consumption. Biotechnology and Bioengineering, 51, 520-527.

WEBER, M.E., LOISELLE, E. et CHARRIER, J.M. (1990). Performance of a tubular elastic sparger. Canadian Journal Chemical Engineering, 68, 742-747.

WINSTON, W., CARAM, H.S. et HUMPHREY, A.E. (1992). Optimal design of the tubular microporous membrane aerator for shear-sensitive cell cultures. Biotechnology Progress, 8, 19-24.

WILKINSON P.M. et van DIERENDONCK L.L. (1994). A theoretical model for the influence of gas properties and pressure on single-bubble formation at an orifice. Chemical Engineering Science, 49, 1429-1438.

WONGSAMUTH, R. et DORAN, P.M. (1994). Foaming and Cell Flotation in Suspended Plant Cell Culture and the Effect of Chemical Antifoams. Biotechnology and Bioengineering, 44, 481-488.

WU, W.T. et HSIUN, D.Y. (1996). Oxygen transfer in an airlift reactor with multiple net draft tubes. Bioprocess Engineering, 15, 59-62.

YANG, X.M., ZHUO-XIONG, M. et SHOU-ZHI, Y. (1988). An improved method for determination of the volumetric oxygen transfer coefficient in fermentation process. Biotechnology and Bioengineering, 31, 1006-1009.

ZHAO, J., ZHU, W.-H. et HU, Q. (2001). Enhanced catharanthine production in *catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. Enzyme and Microbial Technology, 28, 673-680.

ZHONG, J.J., TATSUJI, S., KINOSHITA, S.I. et TOSHIOMI, Y. (1992). Rheological Characteristics of Cell Suspension and Cell Culture of *Perilla frutescens*. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1256-1262.

ZHONG J.-J., YU, J.-T. et YOSHIDA, T. (1995). Recent advances in plant cell cultures in bioreactors. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 11, 461-467.

ANNEXES

ANNEXE A : COMPOSTION DU MILIEU B5

Tableau A.1: Composition du milieu B₅

Macronutriments	mg·L⁻¹	mM
KNO ₃	2500	25
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	150	1.0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	250	1.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	1.0
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	150	1.1
Micronutriments	mg·L⁻¹	μM
KI	0.75	4.5
H ₃ BO ₃	3.0	50
MnSO ₄ · H ₂ O	10	60
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2.0	7.0
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.25	1.0
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0.025	0.1
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	0.025	0.1
EDTA – ferrique	43.0	100
Vitamines	mg·L⁻¹	
Moy-inositol	100	
Acide nicotinique	1	
Pyridoxine · HCl	1	
Thiamine · HCl	10	
Hormones	mg·L⁻¹	
Kinétine	0.1	
Acide 2-4 dichlorophénoxyacétique	0.2	
pH	5.5	
Glucose	30000	

**ANNEXE B : COURBE DE CALIBRATION POUR LA MESURE DU
DIAMÈTRE DES BULLES**

La figure B.1. présente la courbe de calibration utilisée pour convertir les mesures des dimensions des bulles sur les photographies afin d'obtenir une mesure des dimensions à l'échelle des bulles. La courbe présente un coefficient de corrélation de 99 %.

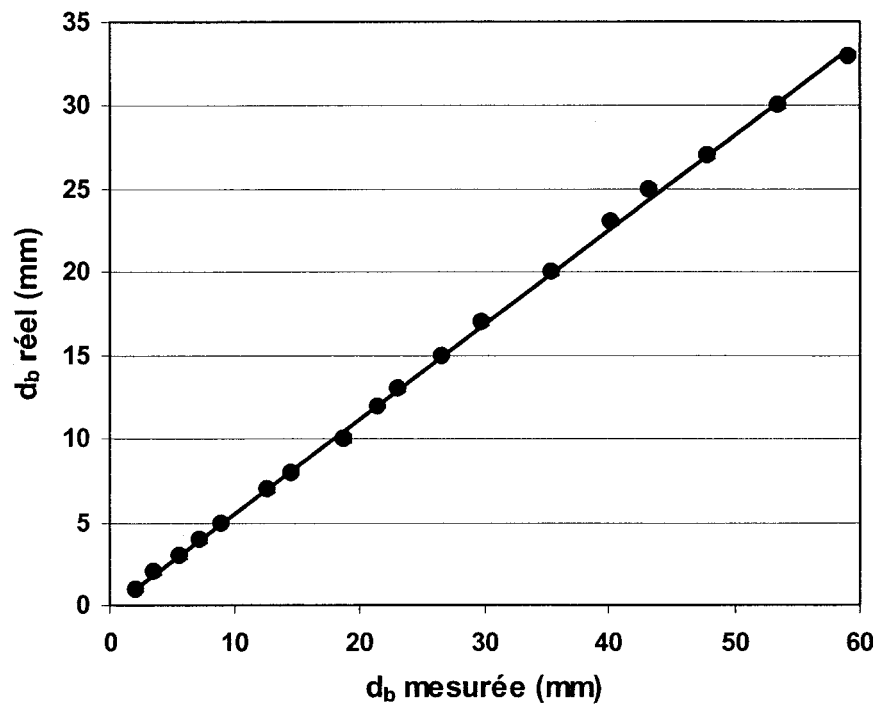


Figure B.1 : Courbe de calibration pour la mesure du diamètre des bulles.

ANNEXE C : DISTRIBUTION EN NOMBRE DES BULLES

La figure C.1 présente la distribution en nombre de 200 bulles mesurées dans le haut de la colonne ($H/D=1.9$) pour une vitesse d'agitation de 60 rpm et un débit de 100 cm^3/min .

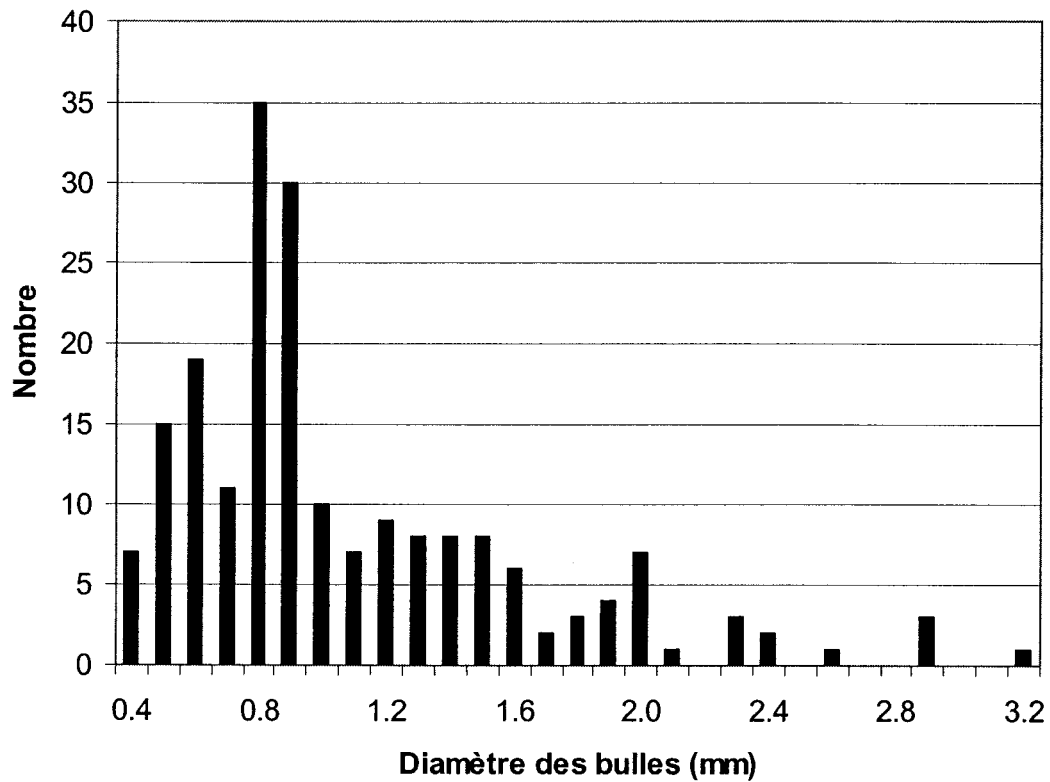


Figure C.1. Distribution en nombre de 200 bulles mesurées. $N = 60$ rpm, $Q = 100$ cm^3/min .

Il est aussi possible de calculer le volume de chaque bulle. La figure C.2 présente le volume total pour chaque diamètre de bulle mesuré.

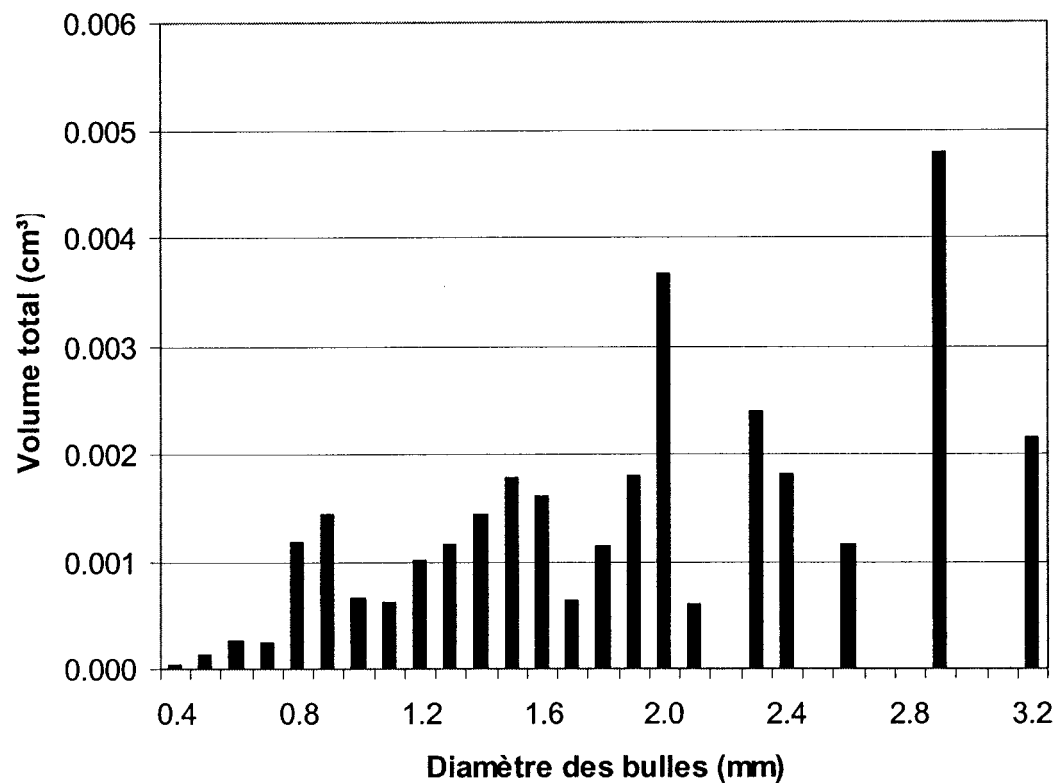


Figure C.2. Distribution en volume de 200 bulles mesurées. $N = 60$ rpm, $Q = 100$ cm³/min.

Les résultats montrent que bien que les bulles de petites dimensions soient en plus grand nombre, la fraction du volume de gaz occupé par ces bulles n'est pas significative. Par conséquent, la majeure partie du gaz se retrouve sous formes de bulles de dimensions supérieures.

**ANNEXE D : DIMENSIONS ET RAPPORT GÉOMÉTRIQUE DU RUBAN
HÉLICOÏDAL DU BIORÉACTEUR DE 3 L ET MISE À L'ÉCHELLE
GÉOMÉTRIQUE**

Dimension	Unité	Bio. 3 L	Rés. #1	Rés. #2	Rés. #3
Diamètre du réservoir (D)	mm	130	171	150	121
Hauteur de liquide (H)	mm	156	217	283	437
Rapport (H/D)		1.2	1.3	1.9	3.6
Volume de liquide	L	2.0	5.0	5.0	5.0
Hauteur d'agitation (H_a)	mm	81	112	146	226
Rapport (H_a/H)		0.52	0.52	0.52	0.52
Diamètre de l'hélice (d)	mm	116	154	134	108
Rapport d/D		0.90	0.90	0.90	0.90
Largeur de pale (W)	mm	24	32	28	22
Rapport W/d		0.21	0.21	0.21	0.21
Pas (P)	mm	76	100	88	70
Rapport P/d		0.65	0.65	0.65	0.65
Nombre tours		1.1	1.1	1.7	3.2
D interpale	mm	68	90	79	64

ANNEXE E : PHOTOGRAPHIE DES HÉLICES UTILISÉES

La Figure E.1 présente les photographies des hélices retenues suite à la première série d'essais de la section 4.1.4.

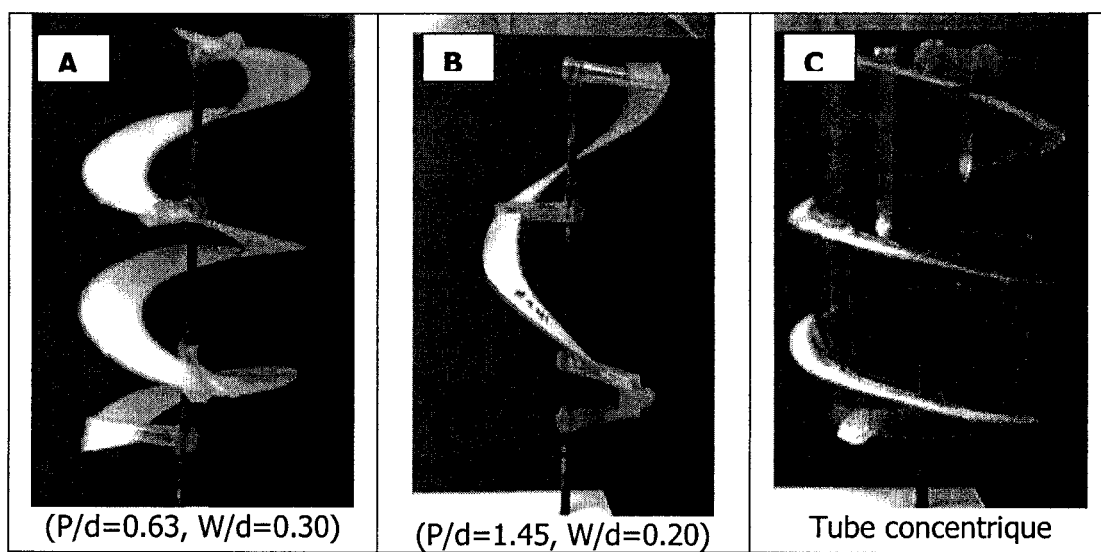


Figure E.1. Photographie des hélices retenues

**ANNEXE F : CARTES DE CISAILLEMENT DES SIMULATIONS DU
BIORÉACTEUR DE 3 L**

Les cartes de cisaillements ont été obtenues par le groupe du Dr. François Bertrand de l'École Polytechnique de Montréal.

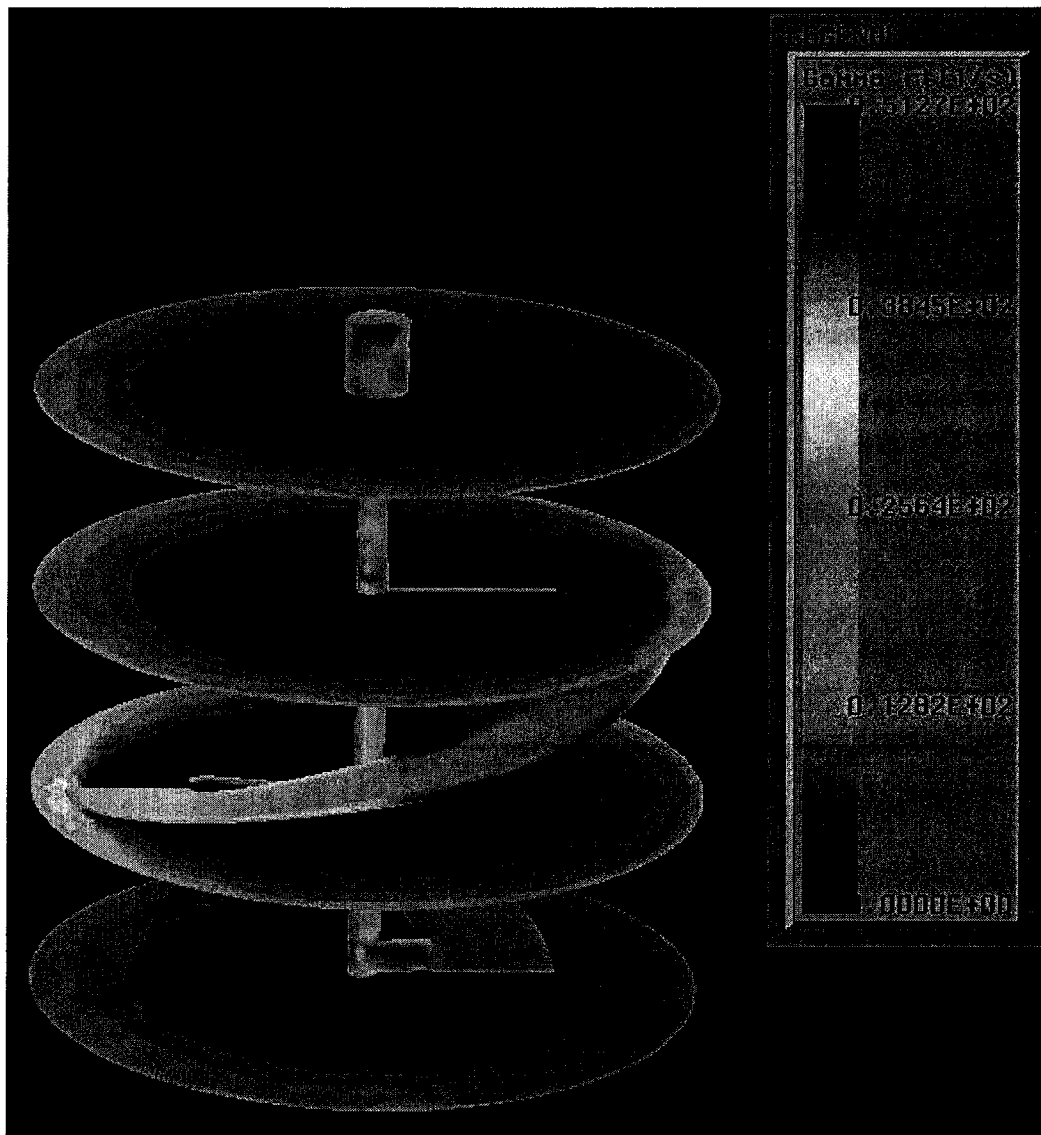


Figure F.1. Carte de cisaillement du bioréacteur de 3 L à 60 rpm

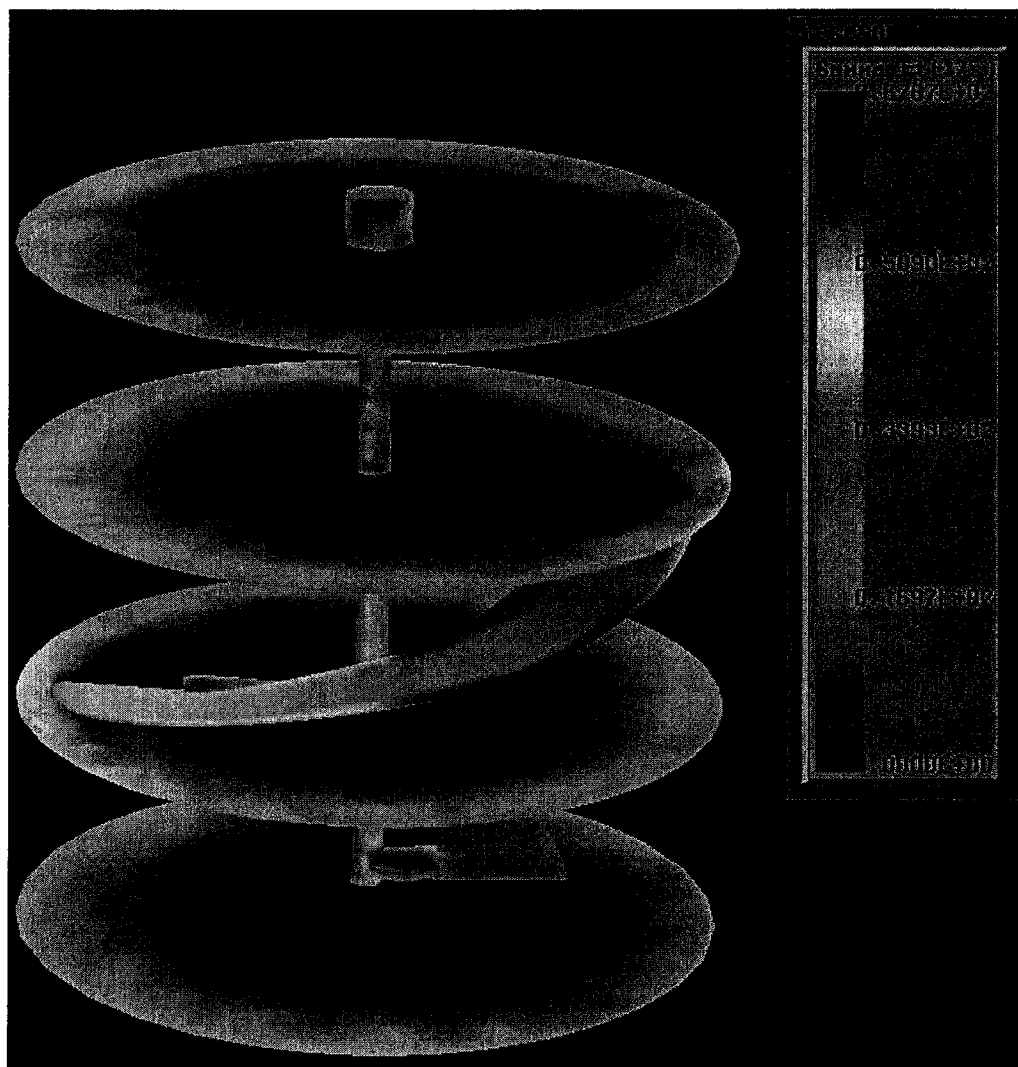


Figure F.2. Carte de cisaillement du bioréacteur de 3 L à 90 rpm.

**ANNEXE G : CARTES DE CISAILLEMENT DES SIMULATIONS DU
BIORÉACTEUR DE 5 L**

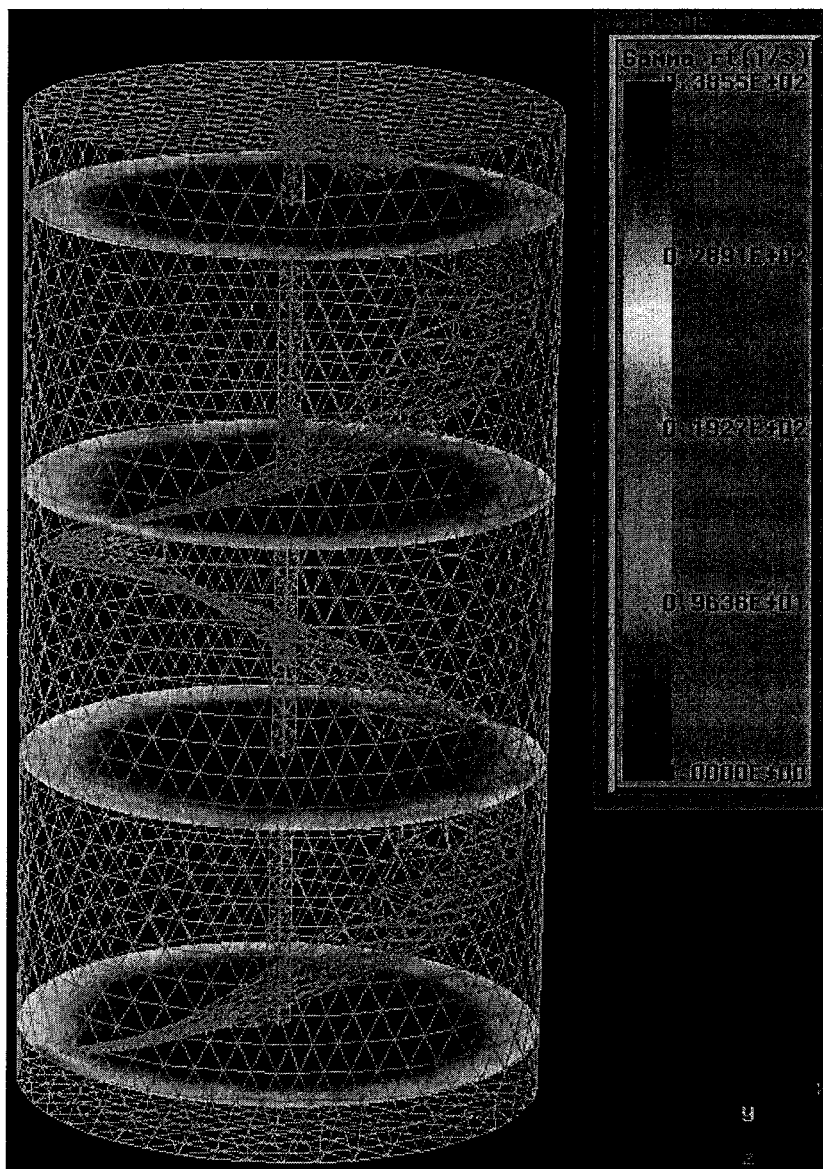


Figure G.1: Carte de cisaillement dans un bioréacteur de 5 L à 60 rpm avec un entrefer de 5 mm

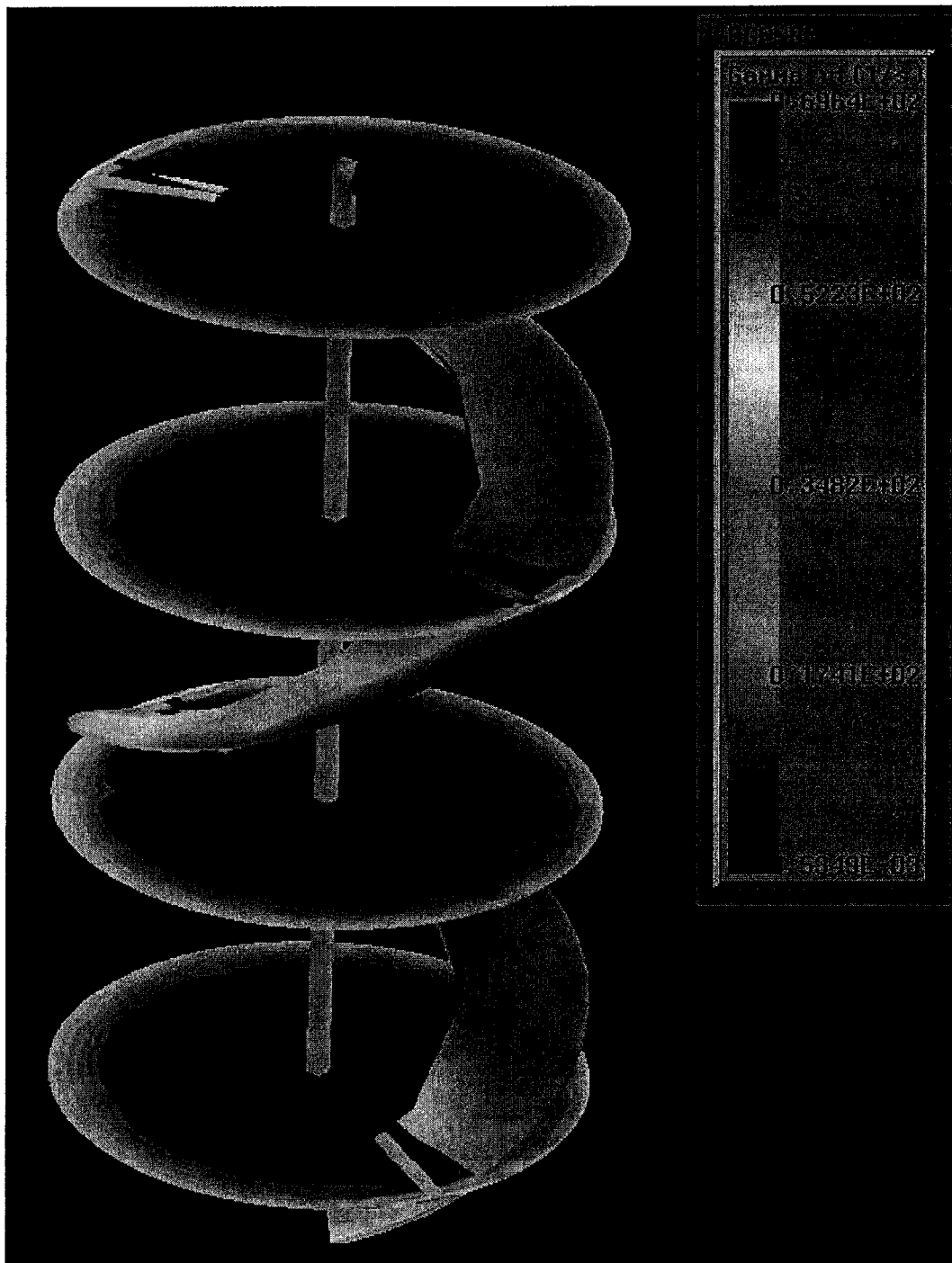


Figure G.2. Carte de cisaillement dans un bioréacteur de 5 L à 45 rpm avec un entrefer de 2.5 mm

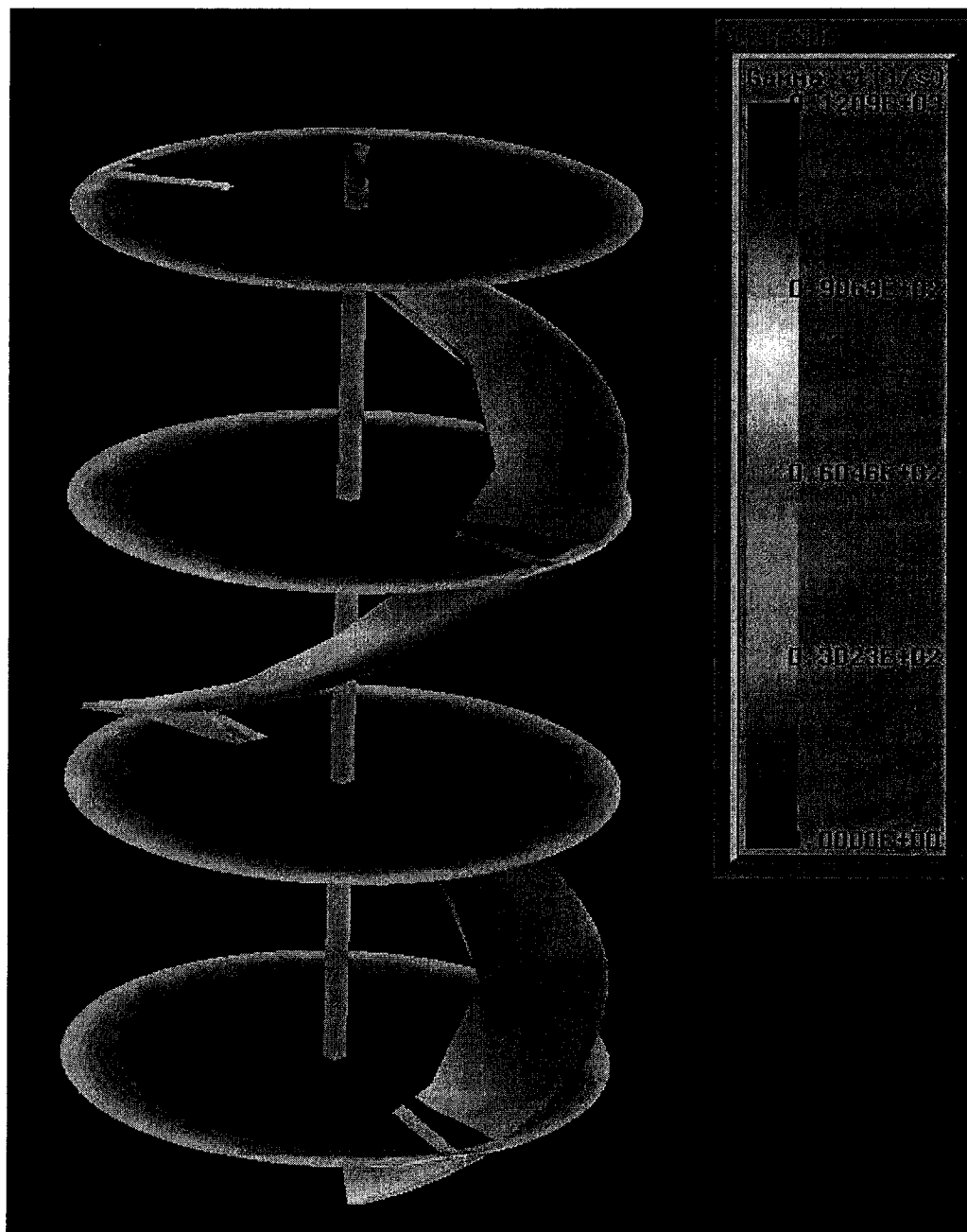


Figure G.3. Carte de cisaillement dans un bioréacteur de 5 L à 75 rpm avec un entrefer de 2.5 mm

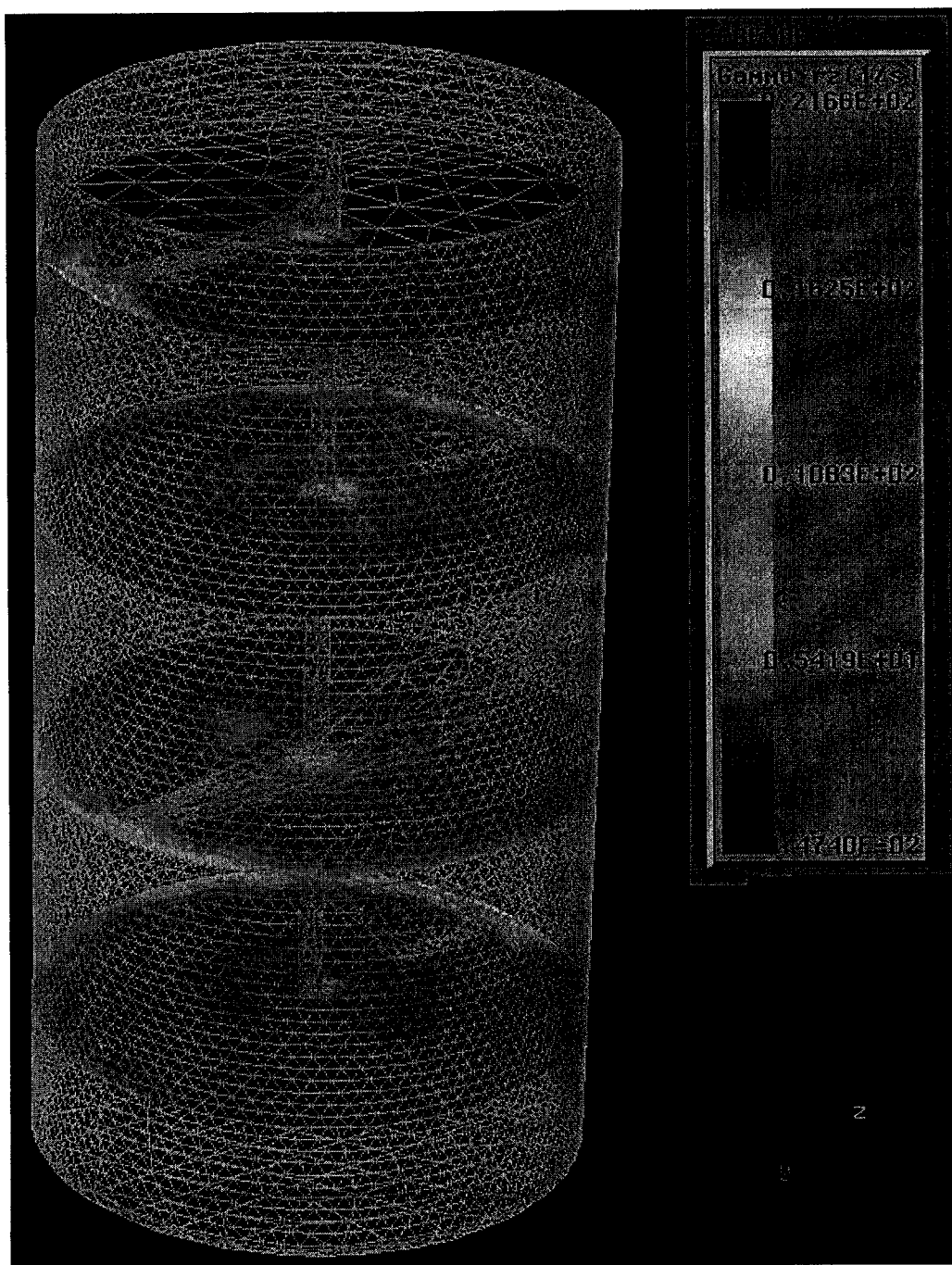


Figure G.4. Carte de cisaillement dans un bioréacteur de 5 L à 45 rpm avec un entrefer de 7.5 mm.

ANNEXE H : PHOTOGRAPHIE D'UNE POPULATION DE BULLES

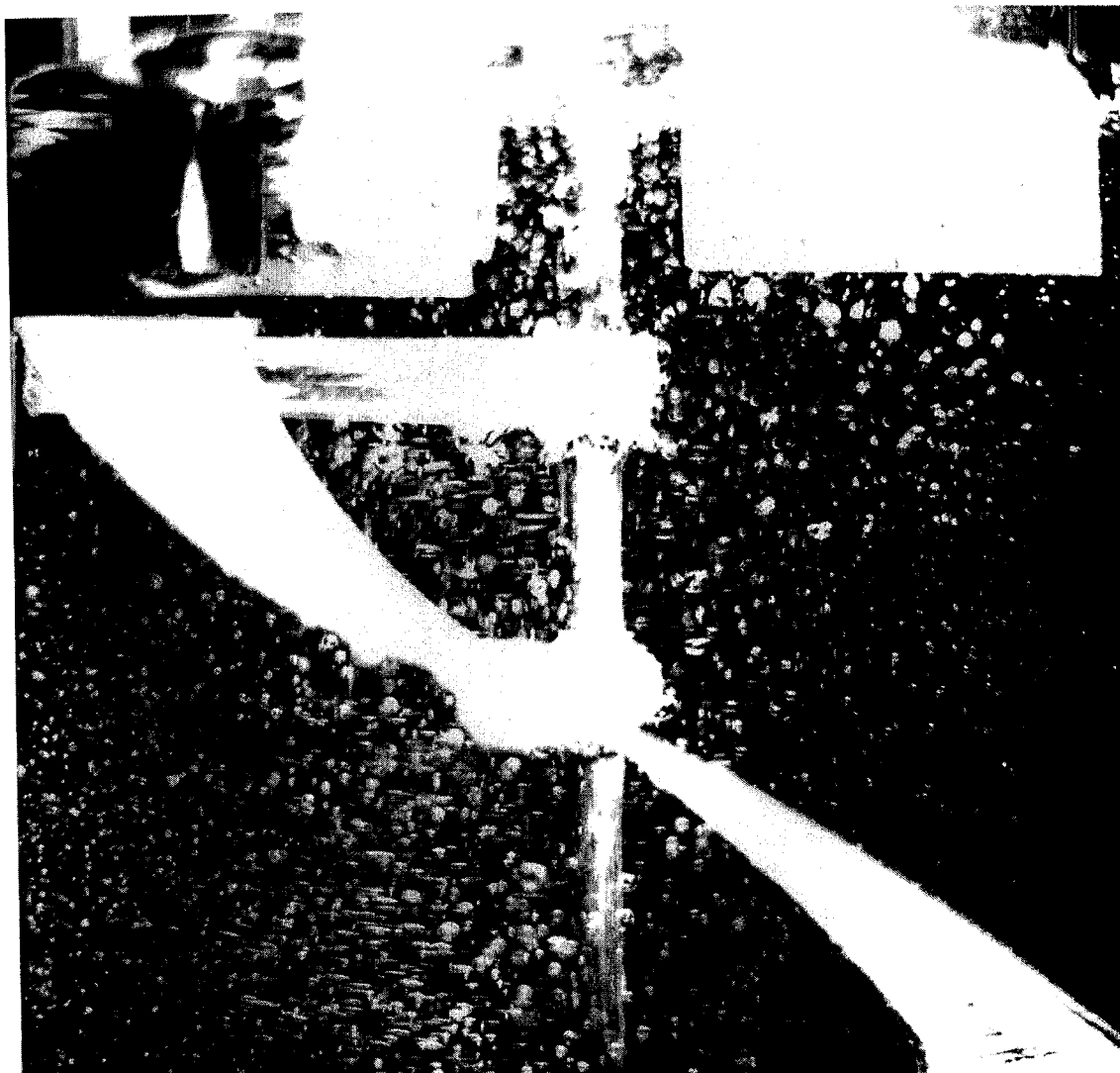


Figure H.1. Photographie d'une population de bulles. $Q = 0.02$ vvm, $N = 60$ rpm, $H/D = 1.9$.