

Titre: Influence de la mise à l'échelle sur les performances de séparation
Title: d'une colonne d'adsorption

Auteur: Nathalie Viens
Author:

Date: 2000

Type: Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

Référence: Viens, N. (2000). Influence de la mise à l'échelle sur les performances de séparation d'une colonne d'adsorption [Mémoire de maîtrise, École Polytechnique de Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/8662/>
Citation:

Document en libre accès dans PolyPublie

Open Access document in PolyPublie

URL de PolyPublie: <https://publications.polymtl.ca/8662/>
PolyPublie URL:

Directeurs de recherche: Robert Legros, & Michel Perrier
Advisors:

Programme: Non spécifié
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**INFLUENCE DE LA MISE À L'ÉCHELLE SUR LES PERFORMANCES DE
SÉPARATION D'UNE COLONNE D'ADSORPTION**

NATHALIE VIENS

DÉPARTEMENT DE GÉNIE CHIMIQUE
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

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

JANVIER 2000



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.

0-612-53606-8

Canada

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Ce mémoire intitulé :

**INFLUENCE DE LA MISE À L'ÉCHELLE SUR LES PERFORMANCES DE
SÉPARATION D'UNE COLONNE D'ADSORPTION**

présenté par : VIENS Nathalie

en vue de l'obtention du diplôme de : Maîtrise ès sciences appliquées
a été dûment accepté par le jury d'examen constitué de :

M. JOLICOEUR, Mario, Ph.D., président

M. LEGROS, Robert, Ph.D., membre et directeur de recherche

M. PERRIER, Michel, Ph.D., membre et codirecteur de recherche

M. KLVANA, Danilo, Ph.D, membre

DÉDICACE

À Ray, où que tu sois.

À Diane & Roger, pour tout.

Merci

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier :

- ☞ Robert Legros, pour avoir su m'éclairer
- ☞ Michel Perrier, pour son aide
- ☞ Hafida Aomari, pour son sourire et son aide sans précédent
- ☞ Le jury, pour avoir pris le temps de me lire et de m'écouter
- ☞ L'équipe de purification, pour leur accueil et leur amitié
- ☞ L'Institut de recherche en biotechnologie pour l'opportunité
- ☞ L'École Polytechnique, pour m'avoir permis de me dépasser
- ☞ Alexandre César, pour son aide et son soutien
- ☞ Francis Viens, pour sa présence
- ☞ Mes parents, pour leur aide
- ☞ Sébastien Lafrenière, pour son dessin
- ☞ Marc-André Gladu, pour l'imprimante!

RÉSUMÉ

L'adsorption avec un lit en expansion est une étape chromatographique qui est introduite comme technique utilisée pour la récupération primaire de protéines à partir de bouillons de culture. Cette technologie combine les étapes de clarification, de concentration et de purification initiale en une seule étape. Le lit en expansion agit comme un lit fixe au point de vue de l'efficacité d'adsorption, mais son hydrodynamique est semblable à un lit fluidisé. En fait un lit en expansion est un lit fluidisé idéal. Par contre, un lit en expansion en opération présente moins de turbulence dans le gel que le lit fluidisé puisqu'il est opéré à des vitesses d'écoulement légèrement supérieures à la vitesse minimale de fluidisation. De plus, il y a une gradation de particules de gel dans un lit en expansion qui demeure lorsque le lit est en opération.

Le but premier de cette recherche est de caractériser l'hydrodynamique d'un lit en expansion ainsi que les facteurs affectant son efficacité de séparation. La relation entre les paramètres hydrodynamiques et l'efficacité de séparation est étudiée. De plus, les effets de la mise à l'échelle sont observés et caractérisés en comparant deux types de colonne : une colonne de 1 cm de diamètre, SynchroTM et une de 5 cm de diamètre, Pharmacia. L'avantage d'opérer à petite échelle est une minimisation des coûts d'opération et une réduction du temps d'opération. Des tests d'expansion, de traçage d'acétone (distribution de temps de séjour) ainsi que de saturation de la colonne (point de rupture) sont réalisés afin de caractériser le comportement du lit. Les LUB (longueur de lit inutilisé), la capacité du gel et le nombre de Bodenstein sont obtenus et présentés dans ce travail.

Les paramètres hydrodynamiques tels la viscosité et la vitesse d'écoulement, ont une importance cruciale lors de l'opération du lit puisqu'ils sont ceux affectant le plus l'écoulement. Pour la colonne de 1 cm, on trouve des nombres de Bodenstein qui varient

entre 43 et 73 alors que pour la colonne de 5 cm, les nombres de Bodenstein se retrouvent dans l'intervalle de 83 à 227, où 227 est la valeur maximale obtenue pour une vitesse d'écoulement de 0.56 mm/s. Il est également important de rappeler qu'un simple calcul des facteurs d'expansion n'est pas suffisant afin de caractériser l'écoulement puisque tous les facteurs calculés se retrouvent dans le même intervalle, soit de 3.21 à 3.96 pour les colonnes de 1 et 5 cm et il descend à 2.21 lorsqu'une concentration de 15 % de glycérol est présente.

Une étude sur la capacité dynamique a également été réalisée, mais malheureusement, aucune tendance n'a pu être déterminée.

Lors de l'opération à petite échelle, la séparation est toujours moins effective que celle à grande échelle; par contre, lorsque la colonne est opérée à des vitesses inférieures, la situation dans la petite colonne se rapproche de celle observée dans la colonne à grande échelle.

Afin d'acquérir une compréhension accrue des phénomènes gouvernant l'opération du lit en expansion, un modèle mathématique doit être développé. Ce modèle liera le transfert de matière et l'hydrodynamique liquide-solide de façon à prédire les performances du type de colonne de séparation utilisée lors des expériences présentées dans ce travail en fonction des conditions d'opérations. Un tel modèle sera développé dans le cadre de futur travaux.

Mots clés : adsorption avec un lit en expansion • hydrodynamique • effet de la viscosité • dispersion axiale

ABSTRACT

Expanded bed adsorption bed is one of chromatographic steps which has been introduced as a technique in the primary recovery of proteins starting from unclarified broths. This technology combines a clarification, concentration and initial purification step in a single step. Expanded bed acts like a packed bed regarding adsorption, but its hydrodynamics are akin to that of a fluidized bed. In fact, it is an ideal fluidised bed. Though, when operated, an expanded bed presents less axial turbulence and particles mixing since it is operated at velocities slightly higher than the minimum fluidisation velocity. Moreover, a classification of gel particle is observed in the expanded bed.

The main purpose of this research is to characterise the hydrodynamics of an expanded bed column and the factors which affect its separation performance. The relationships between hydrodynamics parameters and separation efficiency were studied, as well as the effects of scale-down by comparing two scales of expanded bed columns of 1 cm (SynchroTM) and 5 cm (Pharmacia) in diameter. The advantage of small-scale systems is that they minimise operational costs and time.

Expansion tests, acetone tracer tests (residence time distribution) as well as breakthrough point experiments are performed in order to characterised the bed. The LUB (length of unused bed), the gel capacity and the Bodenstein number are obtained from those experiences and are presented in this work. For the conditions studied, it is determined that the hydrodynamics variables such as flow velocity and viscosity affect the flow pattern inside the bed.

For the one cm column, Bodenstein number between 43 and 73 are obtained while in the five cm column, they are found between 83 and 227. The highest Bo number found for the five cm column is obtained when a flow velocity of 0.56 mm/s is used. A simple

calculation of the Richardson-Zaki exponent is not sufficient to characterise the hydrodynamic flow inside the column since for all experiments, the calculated exponents were found in the same interval; the exponents varied from 3.21 to 3.96 for both the one and five cm column and was found to drop at 2.21 when a glycerol concentration of 15 % v/v is present.

A capacity study is done but unfortunately, no trend in the result was observed.

When working at small scale, the separation is always less effective than at large scale, nevertheless, when varying the viscosity and operating at lower velocity, the situation in the small scale approach the one observed in the large scale.

In order to have a better understanding of the phenomenon governing the expanded bed operation, a mathematical model should be developed. This model will link the mass transfer and the liquid-solid hydrodynamics in order to predict the efficiency of the column used in this study with respect to the operating parameter. Such model will be developed in future work.

Keywords : expanded bed adsorption • hydrodynamic pattern • viscosity effect • axial dispersion

TABLE DES MATIÈRES

DÉDICACE	IV
REMERCIEMENTS	V
RÉSUMÉ	VI
ABSTRACT	VIII
LISTE DES TABLEAUX	XII
LISTE DES FIGURES	XIV
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	XVI
LISTE DES ANNEXES	XVIII
CHAPITRE : 1 INTRODUCTION	1
CHAPITRE : 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE	3
2.1 Le principe du lit en expansion	4
2.2 L'adsorption	10
2.3 Les différents types de colonne	12
2.4 Les paramètres importants au fonctionnement du lit	15
2.5 L'opération de la colonne	18
2.6 L'hydrodynamique	22
2.7 Les caractéristiques d'expansion	27
2.7.1 Caractéristiques de l'expansion du lit	28
2.7.2 Temps de procédé et productivité	30
2.7.3 Transport de particules	30
2.8 La dispersion axiale de l'écoulement du liquide	31
2.8.1 Augmentation de l'agitation axiale des solides et des liquides dans le lit	32

2.9 La mise à l'échelle	34
2.9.1 Détermination du degré d'expansion du lit	35
2.9.2 Nettoyage de la colonne	35
2.10 Le monitoring et le contrôle	36
CHAPITRE : 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES	37
3.1 Matériels	37
3.2 Méthodes	41
3.2.1 Mesure des caractéristiques du lit en expansion	41
3.2.2 Mesure des caractéristiques de dispersion du liquide	42
3.2.3 Mesure du taux d'adsorption de protéines	43
3.2.4 Méthode statistique	44
CHAPITRE : 4 CONCEPTS THÉORIQUES	47
4.1 Distribution du temps de résidence pour les réacteurs non idéaux	47
4.1.1 Détermination de la distribution de temps de séjour	47
4.1.2 Caractéristiques de la fonction E(t)	48
4.1.3 Analyse d'un réacteur non-idéal	50
4.2 Transfert de matière	54
CHAPITRE : 5 ANALYSE DES RÉSULTATS	63
5.1 Analyse statistique de l'efficacité de séparation : détermination des effets dominants	63
5.1.1 Paramètres hydrodynamiques	66
5.2 Relations entre les paramètres hydrodynamiques et l'efficacité de séparation	79
5.3 Effet de la mise à l'échelle	84
CHAPITRE : 6 CONCLUSION	95
RÉFÉRENCES	97

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 3-1 Caractéristiques du gel	41
Tableau 3-2 Méthode statistique	45
Tableau 3-3 Valeur des variables	45
Tableau 3-4 Protocole expérimental	46
Tableau 5-1 Analyse des résultats obtenus avec la méthode statistique	63
Tableau 5-2 Facteur d'expansion et vitesse terminale empirique	68
Tableau 5-3 Effet du distributeur du bas – nombre de Bodenstein	70
Tableau 5-4 Effet de la hauteur de lit – nombre de Bodenstein	72
Tableau 5-5 Effet de la viscosité – nombre de Bodenstein	74
Tableau 5-6 LUB et capacité	82
Tableau 5-7 LUB et capacité	84
Tableau 5-8 Colonne de 5 cm – facteur d'expansion et vitesse terminale	85
Tableau 5-9 Colonne de 5 cm – nombre de Bodenstein	88
Tableau A-1 Influence du système	101
Tableau A-2 Comparaison entre l'eau et la solution utilisée	102
Tableau A-3 Calcul du degré d'expansion - Effet de la viscosité	102
Tableau A-4 Calcul du degré d'expansion – Différents débits	102
Tableau A-5 Détermination du débit nécessaire pour un ratio de 3	102
Tableau A-6 Nombre de plateaux pour différentes viscosités	103
Tableau A-7 Nombre de plateaux théoriques pour 3 concentrations de glycérol	103
Tableau A-8 Degré d'expansion et N/m pour différents angles de déviation	106
Tableau A-9 Nombre de plateaux par mètre pour les 3 types de distributeurs	110
Tableau A-10 Vitesse expérimentale pour différents distributeurs	111
Tableau A-11 Indice n pour différents distributeurs	111
Tableau A-12 Nombre de plateaux théoriques pour différentes hauteurs de gel	113
Tableau A-13 Vitesse expérimentale pour différentes hauteurs de gel	113

Tableau A-14 Nombre de plateaux théoriques pour différentes hauteurs de gel	114
Tableau A-15 LUB	115
Tableau A-16 Capacité	117
Tableau A-17 Nombre de Bodenstein distributeur de 45 degrés	117
Tableau A-18 Nombre de Bodenstein distributeur de 90 degrés	118
Tableau A-19 Nombre de Bodenstein distributeur de 150 degrés	118
Tableau A-20 Nombre de Bodenstein différentes hauteurs de gel	118
Tableau A-21 Nombre de Bodenstein différentes concentrations de glycérol	119
Tableau A-22 Nombre de Bodenstein colonne de 5 cm	119

LISTE DES FIGURES

Figure 2-1 Le procédé standard versus le procédé avec lit en expansion (Snow 1994)	4
Figure 2-2 Colonne de Streamline 50	13
Figure 2-3 Colonne d'expansion modifiée (Bertrand et al. 1998)	14
Figure 2-4 Colonne proposée par UpFront (Chromatography 1997).....	15
Figure 2-5 Les patterns qui peuvent être observés dans une colonne en expansion (Pharmacia-Biotech 1996).....	21
Figure 3-1 a) Colonne SynChro b) Colonne Pharmacia 50.....	37
Figure 3-2 Schéma du distributeur.....	39
Figure 3-3 Système Biopilot.....	40
Figure 4-1 Mesure du temps de résidence (Fogler 1992)	48
Figure 4-2 Temps de résidence pour un lit fixe avec zones mortes et chemins préférentiels (Fogler 1992).....	49
Figure 4-3 Dispersion d'un traceur à l'intérieur d'un tube (Fogler 1992)	52
Figure 4-4 Système fermé (Fogler 1992)	54
Figure 4-5 Courbe idéale d'adsorption (Treybal 1980)	55
Figure 4-6 Courbe de rupture idéale (Treybal 1980)	58
Figure 4-7 Courbe idéale de rupture(Treybal 1980)	59
Figure 5-1 Distribution de la taille des particules	65
Figure 5-2 Effet de la viscosité sur l'adsorption.....	75
Figure 5-3 Effet de la viscosité sur le degré d'expansion	76
Figure 5-4 Effet de la viscosité sur la porosité	77
Figure 5-5 Courbe de saturation idéale et réelle	81
Figure 5-6 Comparaison entre la petite et grande échelle – facteur d'expansion	87
Figure 5-7 Comparaison entre les colonnes de 1 et 5 cm - nombre de Bodenstein	91
Figure 5-8 Comparaison entre les colonnes de 1 et 5 cm - Degré d'expansion	94
Figure A-1 Effet du débit volumique sur la pression à l'intérieur de la colonne	106

Figure A-2 Déviation de la colonne	107
Figure A-3 Effet de la verticalité de la colonne	108
Figure C-1 Courbe de rupture typique.....	128

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

A	aire d'échange (section de la colonne) (cm ²)
Ar	nombre d'Archimède
Bo	nombre de Bodenstein (UL/D _{axl})
C _i	concentration de traceur (mg/ml)
C _o	concentration initiale de traceur (à l'entrée de la colonne) (mg/ml)
C(t)	concentration de traceur à la sortie de la colonne (mg/ml)
d _p	diamètre de particule (μm)
d, d _c	diamètre de la colonne (cm)
D	diamètre de la colonne (cm)
D _{axl}	coefficient de dispersion axiale
D _{eff}	coefficient de dispersion axiale effective
D _m	coefficient de diffusion moléculaire
E	coefficient axial de diffusion eddy
E(t)	distribution temps de résidence
F, G _s	débit volumique (m ³ /s)
f	capacité d'adsorption
H _s	hauteur de la section de test (cm)
L, H	hauteur du lit (cm)
l	longueur caractéristique de la colonne (cm)
k _f	coefficient de transfert de matière
M _a	masse moléculaire de la solution (g/mol)
n	facteur d'expansion
N	nombre de plateaux théoriques (t ² /σ ²)
Pe _{eff} , Per	nombre de Peclet effectif (UL/D _{eff})
Pe _f	nombre de Peclet fluide (μd _p /D _{axl} ε)
Pe _p	nombre de Peclet particule
Re	nombre de Reynolds (d _p Uρ/μ)
Re _{mf}	nombre de Reynolds pour un minimum de fluidisation
Sc	nombre de Schmidt (μ/ρD _m)
V _e	volume auquel le point de rupture apparaît (ml)
V _{gel}	volume de gel dans la colonne (ml)
U, U _o	vitesse d'écoulement (mm/s)
U _{mf}	vitesse minimale de fluidisation (mm/s)
U _t	vitesse terminale ((ρ _p - ρ _l)d _p ² g/μ _t) (mm/s)
T	température (K)
t	temps (s)
̄t, t _m	temps de résidence moyen (s)
V _l	volume de liquide (ml)
V _{gel}	volume de gel (ml)

w_a	quantité totale de solution accumulée durant la rupture ($w_e - w_b$) (ml)
w_b	volume au point de rupture (ml)
w_e	volume à saturation (ml)
w_s	volume où les deux côtés de la courbe sont identiques (ml)
W_b	masse de particule dans une section du lit (g)
Y_o	concentration initiale de lysozyme (mg/ml)
Y	concentration de lysozyme (mg/ml)
Z, H_o	hauteur de lit fixe (cm)
Z_a	zone d'adsorption (cm)
μ_l	viscosité du liquide (cps)
ϵ	porosité
σ^2	variance
θ_a	temps nécessaire à la zone d'adsorption pour se déplacer d'une longueur égale à sa propre hauteur (s)
θ_b	temps nécessaire pour que la zone d'adsorption s'établisse puis sorte du lit (s)
θ_r	temps nécessaire à la formation de la zone d'adsorption (s)
θ_s	temps auquel les zones ombragées sont équivalentes (s)
θ_b	temps auquel le point de rupture apparaît (s)
ρ_p, ρ_s	densité des particules (kg/m ³)
ρ_l	densité du liquide (kg/m ³)
ϕ, ϕ_s	fraction solide
ϕ_r	fraction fluide
DTS	distribution de temps de séjour
LUB	longueur de lit inutilisé (length on unused bed)
SP	matrice d'échange d'ion sulphopropyl (sulphopropyl ion exchange ligand)

LISTE DES ANNEXES

ANNEXE A – Les expériences	101
a. Validité des comparaisons - influence de la colonne et des solutions tampons	101
b. Effet de la pression et de la verticalité	104
c. Effet du système de distribution	107
d. Effet de la quantité de gel	112
e. LUB	114
f. Capacité	116
g. Nombre de Bodenstein	117
ANNEXE B – Spécifications de la colonne	120
ANNEXE C – Courbe typique de rupture	123
ANNEXE D – Résultats du Mastersizer pour la taille des particules	125

CHAPITRE 1 INTRODUCTION

La séparation par chromatographie avec un lit en expansion est une technique utilisée dans l'industrie pharmaceutique. Elle se base sur des molécules de soluté chargées et des entités inversement chargées liées de façon covalente à une matrice chromatographique. La séparation par chromatographie est normalement réalisée dans une colonne à lit fixe. Dans un lit fixe, on retrouve des problèmes d'opération tel le colmatage de la colonne et la nécessité d'ajouter des étapes de clarification; une alternative est donc recherchée. La séparation avec le lit en expansion est l'alternative proposée il y a quelques années. Cette technique est en réalité une matrice chromatographique fluidisée où la solution est introduite par le bas de la colonne. La séparation avec le lit en expansion fait partie de l'étape de purification. En fait, dans l'industrie pharmaceutique, plusieurs produits d'intérêt sont des protéines et des fractions d'anti-corps. Ils sont produits par des bactéries; après fermentation, un bouillon de culture est recueilli. La première étape de la purification est de concentrer le produit et de le purifier. La séparation avec un lit en expansion constitue cette première étape de purification.

Le but de la recherche est d'étudier les caractéristiques d'une colonne chromatographique à lit en expansion. Les facteurs affectant l'efficacité de la séparation ainsi que la séparation elle-même sont étudiés. En fait, les objectifs principaux du projet sont :

- ◆ D'étudier l'effet du scale-down, c'est-à-dire de diminuer le diamètre de la colonne afin de mieux comprendre les forces et les phénomènes gouvernant le système.
- ◆ De caractériser la colonne utilisée.
- ◆ D'étudier les effets de plusieurs variables sur l'hydrodynamique.
- ◆ De déterminer le nombre d'étages théoriques, le nombre de Bodenstein, les degrés d'expansion ainsi que la capacité de la colonne.

Le scale-down de l'adsorption avec un lit en expansion est intéressant puisqu'il permet d'étudier les facteurs influençant l'opération de la colonne à moindre coût en peu de temps. La compréhension des phénomènes gouvernant ce système de séparation est primordial. En fait, le système doit être défini afin de pouvoir le contrôler, l'automatiser et rentabiliser l'opération. De plus, la mise à l'échelle doit être comprise et maîtrisée afin de réaliser la recherche et le développement à petite échelle pour ensuite opérer à grande échelle dans les conditions optimales déterminées à petite échelle.

Dans ce travail, un premier pas est fait dans cette direction. La relation entre les paramètres hydrodynamiques et l'efficacité de séparation est étudiée. De plus, les effets de la mise à l'échelle sont observés et caractérisés en comparant deux types de colonne : une colonne de 1 cm de diamètre, Synchro™ et une de 5 cm de diamètre, Pharmacia. Les LUB (longueur de lit inutilisé), la capacité du gel et le nombre de Bodenstein sont présentés.

CHAPITRE 2 REVUE DE LA LITTÉRATURE

Dans l'industrie biotechnologique pharmaceutique, plusieurs produits d'intérêts sont des protéines. Ces protéines sont synthétisées dans une variété de systèmes biologiques ; pour la plupart des applications thérapeutiques, la pureté du produit doit être très élevée. Lors de la purification primaire d'une substance, trois étapes sont nécessaires : une centrifugation et une microfiltration afin de clarifier la solution ainsi qu'une purification avec une chromatographie dans un lit fixe pour concentrer et purifier le composé (Chase et Draeger 1992; Chase 1994).

L'adsorption requiert un gel adsorbant, un composé à adsorber et une solution d'où le composé est adsorbé. De plus, l'adsorption doit être réversible afin de pouvoir récupérer le composé d'intérêt lors de l'élution (Hjorth 1997).

La plupart des purifications de protéines impliquent des particules suspendues dans un liquide qui contient également des cellules et des débris cellulaires générés lors de l'extraction du produit intracellulaire. Les cellules et les débris cellulaires contenus dans le bouillon de culture peuvent rester bloqués dans les interstices du gel dans le lit fixe. Ceci occasionne une augmentation de la perte de charge à l'intérieur de la colonne ainsi qu'une agglomération de cellules et des débris pouvant se former au niveau du distributeur inférieur. Jusqu'à maintenant, la façon de remédier à ce problème est d'ajouter deux étapes qui précèdent l'extraction dans la colonne à lit fixe : la centrifugation et la filtration (Fig. 2.1). En plus d'augmenter le prix de l'opération, l'autre désavantage de cette solution est la perte considérable de produit. Une alternative développée récemment pour contrer le coût élevé de production est l'adsorption dans un lit en expansion. Cette technique est avantageuse puisqu'elle permet l'élimination des deux étapes précédant l'extraction. L'adsorption dans un lit en expansion est une

technique récente (Chase et Draeger 1990; Gailliot et al. 1990). Les premiers articles sur le sujet ont paru, il y moins de 10 ans.

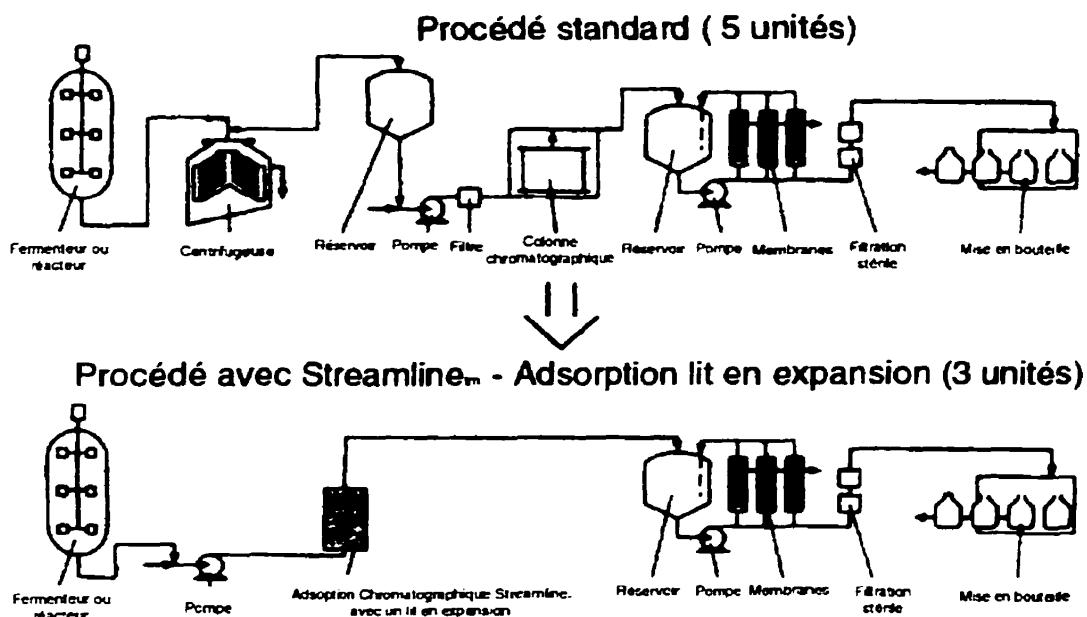


Figure 2-1 Le procédé standard versus le procédé avec lit en expansion (Snow 1994)

2.1 Le principe du lit en expansion

Le lit en expansion s'inspire du principe de fluidisation. Lorsque le liquide est introduit par le bas de la colonne, les particules de gel à l'intérieur du lit se distancient, c'est-à-dire qu'elles subissent une expansion vers le haut de la colonne. L'adaptateur, qui est la partie supérieure mobile de la colonne, (pour détails voir Fig. 3-2) ne doit pas empêcher le mouvement des particules de gel, donc, il doit être placé à une hauteur suffisamment élevée. Idéalement, chaque particule de gel garde une position discrète dans le lit en expansion, avec un minimum de mouvements. Ceci est dû à la distribution des billes de gel dans le lit. Les particules de gel sont réparties dans la colonne selon une distribution de tailles. (Fig. 2.2)

La densité de chaque bille est quasi-identique, mais leur diamètre diffère. Cette distribution assure la stabilité au lit et l'absence de mélange turbulent à l'intérieur de la colonne. Les billes les plus petites sont emportées plus facilement par le courant et se retrouvent dans la partie supérieure de la colonne. Les billes plus larges ne sont pas emportées aussi facilement et restent dans la partie inférieure de la colonne. Les billes de gel prennent une certaine disposition dans la colonne de façon quasi instantanée.

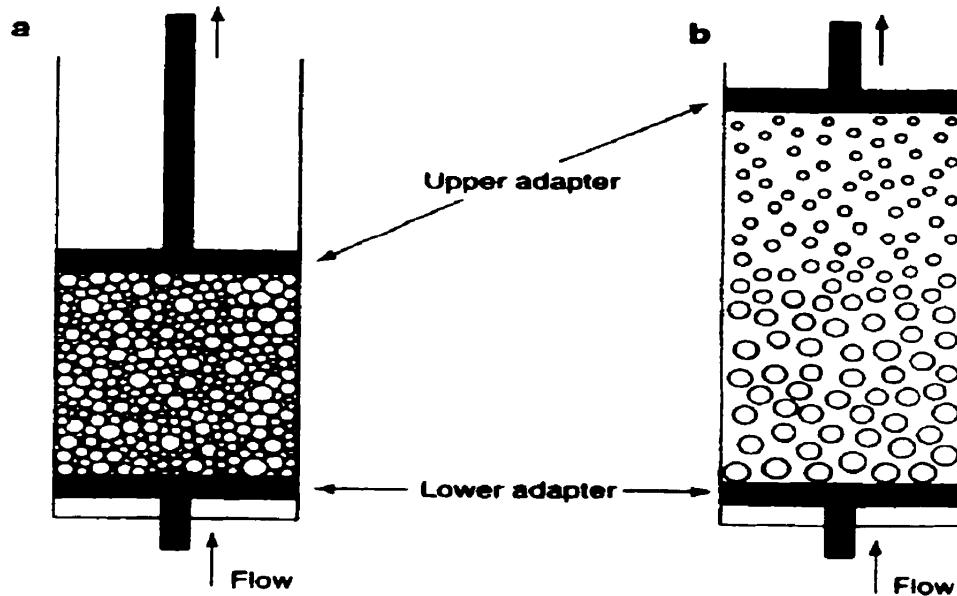


Figure 2-2 Comparaison entre (a) lit fixe et (b) lit en expansion (Chang et Chase 1994)

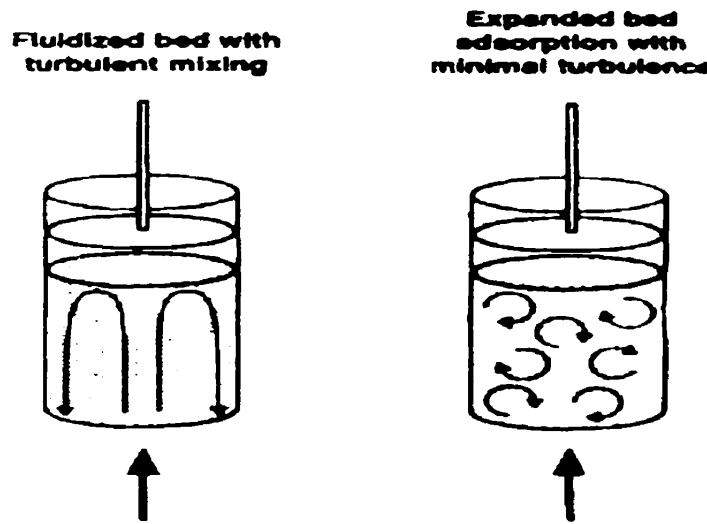


Figure 2-3 Comparaison entre un lit fluidisé conventionnel et un lit en expansion (Snow 1994)

Un lit en expansion est en fait un lit fluidisé. Il est par contre important de faire correctement la différence entre l'opération d'un lit fluidisé et d'un lit en expansion. (Fig. 2.3) Mis à part le fait que les deux suivent les mêmes principes, il existe plusieurs facteurs importants spécifiques à l'opération d'un lit en expansion dans une colonne d'adsorption. Puisqu'on désire des bonnes performances de séparation, il est important de minimiser le mouvement des particules. Ainsi, il est possible d'obtenir des nombres de plateaux théoriques élevés. Dans le lit en expansion, on désire une gradation des particules de gel dans la colonne, l'écoulement de liquide à l'intérieur est de type piston et il n'y a pas ou peu de turbulence dans le lit. Le coefficient de dispersion axiale est faible et le nombre de plateaux théoriques est grand (Anspach 1999). Les particules dans le lit font un mouvement discret autour de la même position. Le lit atteint l'expansion complète lorsque la force de gravité sur chaque particule est égale à la force de suspension procurée par le courant de liquide ce qui est le principe même de la fluidisation (Snow 1994). On pourrait donc définir un lit en expansion comme étant un lit fluidisé idéal. Un équilibre doit être établi entre la vitesse d'entraînement de la particule de gel et la vitesse de sédimentation du gel, c'est-à-dire entre la force de traînée et le poids apparent de la particule (Fig. 2-4).

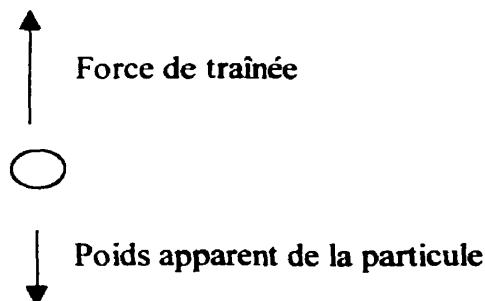


Figure 2-4 Bilan d'équilibre sur une particule

Idéalement, un lit en expansion est opéré à une vitesse légèrement supérieure à la vitesse minimum de fluidisation. La technique du lit en expansion offre l'avantage par rapport au

lit fixe, de ne pas se colmater et d'être moins affecté par les cultures contenant un haut taux de solides ou une viscosité élevée. Par contre, un des désavantages de l'expansion est le manque de compréhension du procédé de fluidisation avec les résines utilisées (telles Streamline™ et Bioran™) et les lysats de bactéries (lysozymes, BSA, fraction d'anti-corps) présent dans le fluide fluidiseur (Thelen et al. 1997).

Le lit fluidisé, tel qu'il est opéré dans le domaine des réacteurs chimiques ou pour la combustion, se définit de la façon suivante : passage de fluide à travers le lit de particules à vitesse relativement élevée, ce qui occasionne un mélange grossier des particules du lit ; donc une turbulence élevée dans le lit. Pour une colonne d'adsorption opérée dans ces conditions, la turbulence fait en sorte de diminuer l'efficacité de séparation. Le lit fluidisé possède alors un coefficient de dispersion axiale élevé et un nombre de plateaux théoriques bas (Anspach 1999). Par contre, pour le lit en expansion, il possède pratiquement la même efficacité qu'un lit fixe avec en plus, la possibilité de faire passer des bouillons de cultures sans causer de blocage dans le gel ((Chang et Chase 1994); (Thömmes et al. 1997)). La principale différence entre l'adsorption dans un lit fixe et un lit fluidisé est la mobilité des particules d'adsorbant dans le lit fluidisé. Si cette mobilité est maintenue à un minimum, le lit en expansion devient pratiquement équivalent au lit fixe en terme de nombre de plateaux théoriques par hauteur de lit.

La productivité de la colonne en expansion est plus grande à des vitesses élevées que celle des lits fixes malgré leur efficacité légèrement inférieure (Finette et al. 1998). En d'autres termes, le lit fixe possède une efficacité de séparation supérieur mais lors de l'opération de la colonne à des vitesses élevées, l'augmentation de la pression et le nécessité d'opérer à contre-courant font en sorte que la productivité est plus grande dans la colonne avec le lit en expansion. Le lit en expansion est formé d'une ségrégation de particules, les plus grosses dans le fond, les plus petites sur le dessus. Pour obtenir un lit en expansion avec un faible degré de mélange, un profil piston, «plug-flow», est

désirable. Cela est obtenu en générant une perte de charge à l'entrée du liquide dans la colonne afin de bien uniformiser le profil de vitesse du liquide sur la section d'écoulement (Hjorth 1997).

2.2 L'adsorption

Il existe plusieurs méthodes de purification de protéines. On retrouve la précipitation du produit à l'aide de solvants tels des bases, des acides, des produits organiques et non-organiques. Ensuite, on peut utiliser l'interaction hydrophobique, la chromatographie en phase inversée, l'affinité immobilisée sur métal, des ligands en affinité biologique, la chromatographie en mode mixte (hydroxyapatite, ligands teinture et des boronates de phénol) et la chromatographie par échange d'ions (Gagnon 1998).

Cette dernière technique, la chromatographie par échange d'ions, est l'une des plus utilisées dans l'industrie. Elle se base sur des molécules de soluté chargées et des entités inversement chargées liés de façon covalente à une matrice chromatographique. La popularité de cette technique est due à son application variée, son haut pouvoir de résolution, sa grande capacité ainsi que sa simplicité d'opération. Un bon échangeur d'ions doit posséder un mécanisme d'interaction très simple entre l'échangeur d'ions et le soluté.

Trois facteurs peuvent être contrôlés dans la colonne de chromatographie : la sélectivité, l'efficacité et la capacité. La sélectivité est définie par les facteurs suivants : la nature des groupes ioniques de la matrice, le pH ainsi que la force ionique. La capacité, quant à elle, peut se définir de deux façons ; soit la capacité ionique totale, soit la capacité dynamique. Le nombre de particules chargées par gramme d'échangeur d'ions sec ou par ml de gel en expansion est ce qu'on appelle la capacité ionique totale. La quantité réelle de protéines qui peuvent être liées à l'échangeur d'ions, sous des conditions expérimentales définies, dépend de la vitesse d'écoulement à laquelle le gel doit être opéré. La quantité liée est alors caractérisée comme la capacité dynamique de l'échangeur d'ions. Cette capacité dépend des facteurs suivants : les propriétés de la protéine, les propriétés de l'échangeur d'ions et les conditions opératoires. Les

conditions opératoires qui affectent la capacité sont le pH, la force ionique du tampon, la nature de l'ion échangé, la vitesse d'écoulement, les propriétés de la phase liquide et la température.

Le taux d'échange d'ions dépend de cinq étapes individuelles (Treybal 1980) :

- 1) La diffusion des ions de la solution à la surface du gel dans le film stagnant.
- 2) La diffusion interne des ions à travers la particule solide jusqu'au site d'échange.
- 3) L'échange d'ions (adsorption, réaction et désorption).
- 4) La diffusion vers l'extérieur des ions et l'expulsion de la particule solide.
- 5) La diffusion des particules émises dans la phase liquide.

Les prochains points présentent les principaux avantages de l'utilisation de la chromatographie avec échange d'ions :

- ◆ Haute résolution.
- ◆ Dans la solution contenant le produit purifié, peu d'ADN, de virus et d'endotoxine sont présents.
- ◆ Capacité de subir des traitements chimiques agressifs.
- ◆ Peut accommoder une grande variété de produits.

Par contre, comme toute technique, elle comporte des désavantages (Pharmacia-Biotech 1991) :

- ◆ Nécessité de diluer la solution afin que celle-ci reste dans la gamme de conductivité supportée par le gel.
- ◆ Contamination facile du gel, c'est-à-dire occupation des sites de réactions par des entités autres que le produit d'intérêt.

Le gel cationique possède des groupes chargés positivement qui sont liés de façon covalente. Les groupes chargés captent le produit qui est chargé négativement. Donc, le conditionnement du gel doit se faire avec une solution qui lui permet de garder ces charges, pour cette raison, il est parfois nécessaire de diluer la solution. Une fois que le produit est adsorbé, on veut le désorber, pour ce faire, on utilise une solution possédant les mêmes charges que le produit donc on crée une compétition entre les deux. De cette façons, le produit est désorbé du gel, souvent à l'aide d'une solution saline, ce qui rend la conductivité élevée.

2.3 Les différents types de colonne

Plusieurs compagnies commercialisent des colonnes d'adsorption. La compagnie Pharmacia est une des pionnières dans les colonnes désignées spécialement pour les lits en expansion. Pharmacia a commercialisé plusieurs colonnes de séparation. Celles-ci possèdent différents diamètres. Elles possèdent un distributeur muni d'un filtre à la base ainsi qu'un adaptateur mobile dans la partie supérieure. L'adaptateur supérieur est également muni d'un filtre pour empêcher le gel de s'échapper. La colonne elle-même est faite de verre.



Figure 2-5 Colonne de Streamline 50

Une des variantes de la colonne de Pharmacia est l'ajout d'un cylindre magnétique dans le bas de celle-ci (Fig. 2-6). Cette technique permet un mélange en bas de la colonne afin d'éviter l'agglomération de particules ou, du moins, en réduire les chances. Afin d'utiliser cette barre magnétique, une deuxième entrée de liquide est faite sur la paroi latérale (Bertrand et al. 1998).

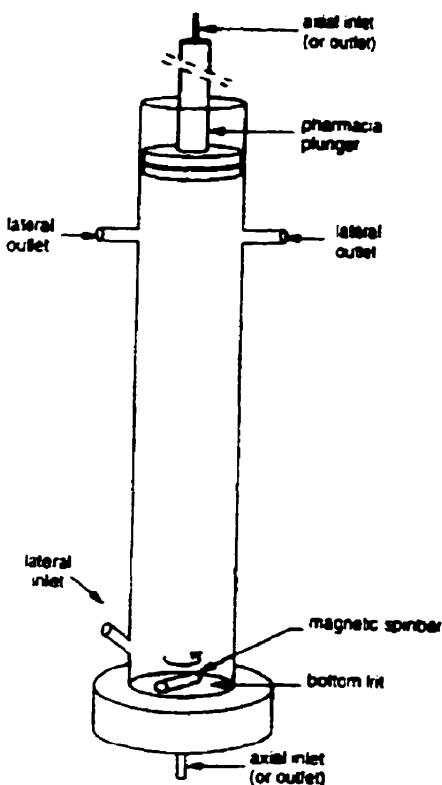


Figure 2-6 Colonne d'expansion modifiée (Bertrand et al. 1998)

Une colonne similaire est présentée par Lihme et al. (1998). Cette colonne possède une seule entrée sur la paroi inférieure. Elle possède une sortie également sur la paroi inférieure où la solution d'élution sort. Pour ce qui est de la partie supérieure, la solution sort par l'adaptateur mobile. La colonne possède également une barre magnétique qui assure le mélange de la solution et diminue les risques d'agglomération. Lihme et al. (1998) et Zafirakos et al. (1998), présentent aussi une version améliorée de cette colonne qui ne possède pas de filtre ni de plaque de distribution dans la partie inférieure, mais toujours la barre magnétique. Il n'y a pas d'adaptateur dans la partie supérieure, mais plutôt une sortie flottante qui peut agir comme mesure de niveau. Cette colonne présente l'avantage d'être peu coûteuse à construire en plus d'être plus facile à automatiser. Par contre, l'élution doit se faire en mode expansion, ce qui donne un plus grand volume. Cependant, l'élution en mode expansion est de plus en plus utilisée dans l'industrie pour

des questions de facilité d'opération, de nettoyage de colonne ainsi que de validation.

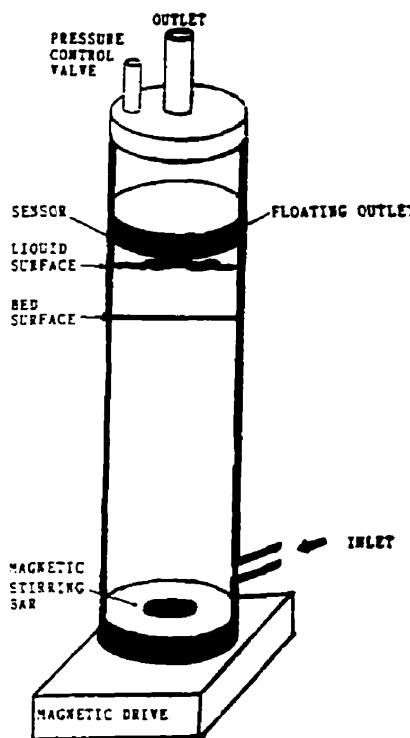


Figure 2-7 Colonne proposée par UpFront (Chromatography 1997)

2.4 Les paramètres importants au fonctionnement du lit

La stabilité du lit est primordiale au bon fonctionnement de la séparation ainsi qu'à son efficacité. Si le lit n'est pas stable, il se comportera comme un lit fluidisé conventionnel, c'est-à-dire avec un mélange des particules. Le succès de l'adsorption avec un lit en expansion est directement lié au contrôle de la fluidisation idéale de l'adsorbant ; et, un lit stable avec agitation minimum est crucial pour atteindre la performance du lit fixe (Thömmes et al. 1995). Il existe plusieurs paramètres importants pour la stabilité du lit tels qu'énumérés par Thömmes (1997).

Trois paramètres influencent grandement la stabilité du lit et sont responsables de son efficacité :

1. L'alignement de la colonne.
2. Les pertes de charge - elles doivent être constantes, car des fluctuations entraînent des chemins préférentiels dans le lit.
3. Le distributeur ou système de distribution.

L'alignement de la colonne est crucial au bon fonctionnement. En fait, Bruce et Chase (1998) ont rapporté une baisse de 7.8% d'adsorption pour une déviation de seulement 0.15 degré sur une colonne de 1 cm. Par contre, aucune baisse est observée sur la colonne de 5 cm pour une même déviation. Donc, les effets sont moindres sur les colonnes de diamètre plus grand. Le système de distribution est important à la stabilité du lit dans la mesure où il favorise un écoulement piston et minimise le mélange axial à l'intérieur de la colonne. Par contre, De Luca et al. (1994) ont démontré que le design du distributeur n'est pas crucial si la hauteur de gel est suffisamment élevée, car, avec cette hauteur, l'effet des jets de liquide engendrés par le distributeur est dissipé. La même conclusion est stipulée par Galaev (1998) à l'effet que la stabilité du lit dépend de la hauteur de gel dans la colonne. Si la hauteur est au moins le double du diamètre de la colonne lorsque celle-ci n'est pas en opération, la partie inférieure agit comme distributeur tandis que la partie supérieure permet un lit stable.

Les paramètres influençant la performance du lit sont les suivants (Thömmes 1997) :

- ◆ Les conditions d'équilibre entre la protéine à adsorber et le gel
- ◆ La dispersion dans la phase liquide
- ◆ Le transport de matière dans la phase liquide
- ◆ Le transport de matière dans la phase solide
- ◆ La dispersion de la phase solide

Les conditions d'équilibre entre les protéines et le gel adsorbant pour un lit en expansion sont influencées par la concentration de protéines. La conductivité, le pH et la présence de débris et de particules (qui réduisent la capacité d'adsorber du gel en s'attachant aux surfaces) affectent l'adsorption. Chase et Draeger (1992) soulignent le fait qu'il y a une baisse de la capacité maximum d'adsorption en présence de cellules. Le système le plus touché est celui à échange d'ions où l'on remarque une baisse drastique de 49 % de la capacité alors que le système par affinité subit une baisse de 17 % seulement. Quant à Lan et al. (1998), ils observent que la présence de cellules stabilise le gel et favorise l'adsorption de protéines tout en réduisant le mélange et en augmentant le nombre de plateaux.

Lors de l'adsorption, les paramètres critiques peuvent être divisés en deux catégories : physiques et chimiques. Les paramètres chimiques sont liés à la capacité et à la sélectivité du procédé de séparation : le pH, la force ionique et le type de solution tampon. Quant aux paramètres physiques, ils sont reliés à l'hydrodynamique et à la stabilité d'une fluidisation homogène dans le lit. Certains paramètres sont liés à la culture elle-même : la concentration de cellule, la quantité de biomasse et la viscosité. Les autres paramètres sont liés aux conditions d'opération : la température, le débit volumique et la hauteur du lit.

2.5 L'opération de la colonne

Mc Cormick (1993) définit les étapes d'opération pour la colonne d'adsorption comme suit :

- ◆ La solution tampon est envoyée dans le lit par le dessous de la colonne, ce qui entraîne l'expansion du lit par fluidisation des particules de gel.
- ◆ On remplace la solution tampon par la solution à traiter lorsque le lit est stable.
- ◆ L'expansion augmente quelque peu avec la solution, car elle a une densité et une viscosité plus grande.
- ◆ Un cycle de lavage suit le passage de la solution ; elle a pour but d'entraîner vers le haut les débris qui sont restés dans le lit.
- ◆ Le lit est rabaissé et un éluent est passé dans la colonne par le haut, si en mode fixe ou par le bas si en mode expansion.
- ◆ Le composé voulu est concentré pendant l'élution.

Lors de l'élution, la colonne peut fonctionner en mode expansion ou encore en mode fixe (sédimenté). S'il y a seulement une petite partie de la capacité du gel qui a été utilisée, il est préférable de faire l'élution avec le gel sédimenté. Par contre, si une grande partie du gel est utilisée, il est préférable de faire l'élution avec le gel en expansion. La vitesse de la solution tampon pendant l'élution affecte la concentration du produit. Une faible vitesse donne un plus petit volume d'élution (Pharmacia-Biotech 1996). L'élution en mode expansion est parfois désavantageuse. S'il y a présence de cellules ou débris dans la colonne après le lavage, ils vont sortir en même temps que la protéine d'intérêt et, par le fait même, rendre moins pure la solution (Anspach 1999).

L'étape de lavage a une double fonction : elle enlève les débris qui sont retenus entre les particules du gel en plus d'enlever les protéines qui ont formé de faibles liens avec le gel (Chase et Chang 1994). Peu importe le lavage et l'élution, dans un échangeur anionique, il reste toujours des particules. Par contre, Anspach (1999) et Ramberg (1998), ont déterminé que la solution nettoyante la plus performante pour éliminer les acides aminés

(c'est-à-dire les protéines), les lipides ainsi que les composés comprenant du phosphore est une solution de 1.0 M d'hydroxyde de sodium (NaOH). De plus, lorsqu'il y a présence de NaCl dans la solution, la procédure de nettoyage en place (clean-in-place) est plus efficace et peut enlever les molécules d'ADN (Anspach 1999). La procédure de nettoyage en place (CIP) est l'opération de nettoyer le gel utilisé lors de la séparation en ne changeant rien au montage opératoire, ni en retirant le gel de son environnement.

Les sources les plus critiques de variation durant l'opération d'une colonne d'adsorption en expansion sont : une variation dans la concentration du produit, une variation dans la concentration de protéines contaminantes, une variation de la quantité de biomasse, une variation de la viscosité et de la conductivité et, enfin, des changements de personnel, d'équipement, de matières premières et de tampon (Anspach 1999).

Les paramètres d'opération sont définis comme suit :

- ◆ Les propriétés du produit à adsorber.
- ◆ Les propriétés de l'adsorbant.
- ◆ Les propriétés de la solution (densité, viscosité, concentration de cellules ou débris, etc.).
- ◆ La vitesse de l'écoulement.
- ◆ La géométrie de la colonne.

Le lit est affecté par la biomasse et la viscosité de la solution. Lorsque la quantité de biomasse sèche est élevée, il y a une accumulation de particules de gel sur l'adaptateur du haut puisque les particules de gel sont emportées par le courant fluidiseur. Lors des expériences de Frej et al. (1994), ceci a causé un effondrement du lit au-delà d'une viscosité de 500 mPa.s. Au delà de la viscosité mentionnée, les pertes de charge à travers le lit est importante et l'écoulement du fluide est hardu, ce qui fait que l'expansion du lit est difficile et dans un cas d'effondrement, voir impossible. Ces derniers (Frej et al. 1994) proposent quelques conseils d'opération afin de faciliter l'opération de la colonne et de réduire les chances d'un effondrement du lit :

- ◆ Le distributeur doit fournir un débit uniforme sur toute la surface de la colonne.
- ◆ Les particules du gel adsorbant doivent avoir une haute densité et avoir une distribution gaussienne de densité et de taille.
- ◆ Les ligands doivent être en mesure de tolérer des procédures de lavage sévère.
- ◆ Lors de l'usage de solution avec une forte viscosité, le lit va avoir une grande expansion et l'adsorbant va commencer à s'accumuler dans le haut de la colonne ; cela va entraîner un blocage avec les cellules et les débris cellulaires et le lit va s'effondrer. Si la direction de l'écoulement est inversée quelques instants, on peut empêcher le problème; par contre, la stabilité du lit est perturbée.

Il peut être bon de placer, entre la pompe et la colonne, un appareil qui minimise les pulsations de la pompe; de cette façon, la colonne est moins affectée par les pulsations (Thelen et Ramirez 1998). Les cellules ne sont pas endommagées en passant à travers le lit en expansion ou en passant à travers une pompe piston (Ameskamp et al. 1997). Par contre, la contrainte de cisaillement (shear stress) doit être maintenu au minimum afin de réduire le risque de dégradation moléculaire des protéines d'intérêt.

Dans la colonne, il y a une faible agitation et le design du distributeur doit être fait de façon très attentionné pour s'assurer qu'il n'y a pas formation d'un vortex. Le système de distribution doit créer une perte de charge suffisante pour obtenir un écoulement piston; de plus, il doit diriger l'écoulement dans le sens vertical seulement. Le distributeur ne doit pas avoir de zone morte où les débris pourraient s'accumuler.

Un distributeur avec des petits pores (0.8 mm) distribue le jet de liquide à l'entrée de la colonne. Dues à la petitesse des pores, certaines limitations sont engendrées. Si le liquide contient des impuretés ou des bulles d'air, la distribution uniforme de l'écoulement peut être affectée puisque les pores du distributeur peuvent être bloqués (Zafirakos et Lihme 1999).

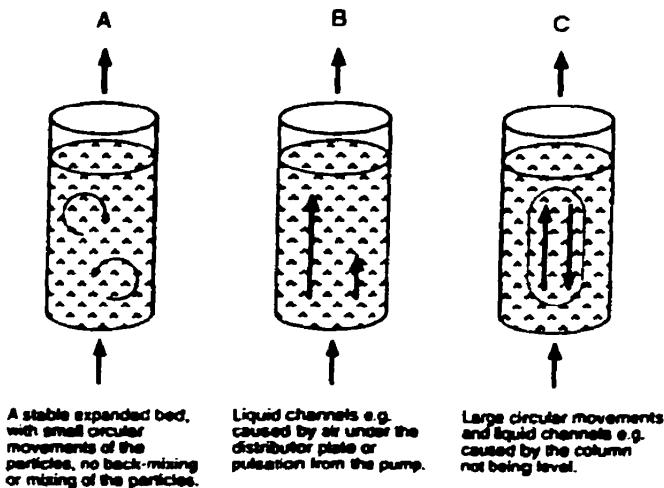


Figure 2-8 Les patrons qui peuvent être observés dans une colonne en expansion (Pharmacia-Biotech 1996)

La figure 2-8 présente les différents patrons d'écoulement qui peuvent être observés dans un lit en expansion. L'image de gauche (A) représente l'écoulement idéal, où les particules de gel tournent discrètement sur elles-mêmes avec un minimum de dispersion axiale. L'image centrale (B) représente un écoulement avec des chemins préférentiels tandis que l'image de droite (C) représente l'écoulement dans une colonne qui n'est pas alignée verticalement; on observe, encore une fois, l'apparition de chemins préférentiels qui résultent en un mixing grossier du lit.

Lors de l'opération du lit, il est important d'avoir une bonne idée du taux selon lequel le transfert de matière entre les phases s'effectue, d'autant plus que ce paramètre a une importance cruciale sur la quantité d'adsorbant qui peut être utilisée efficacement sous ces conditions (Chase et Draeger 1992).

2.6 L'hydrodynamique

Les particules lors de l'expansion ont un parcours particulier qui peut être relativement bien décrit par un modèle de diffusion. La source majeure de diffusion provient des effets hydrodynamiques (Thelen et Ramirez 1998).

L'expansion du lit peut être décrite par la corrélation de Richardson-Zaki qui régit l'expansion du lit fluidisé homogène (Thömmes 1997).

$$U_t = U_t \varepsilon^n \quad (1)$$

Où U_t est la vitesse terminale des particules qui peut être calculée par l'équation de Stokes.

$$U_t = \frac{(\rho_p - \rho_l) dp^2 g}{18 \mu_l} \quad \text{pour } Re < 0.1 \quad \text{où } Re = \frac{dp U \rho}{\mu} \quad (2)$$

Lorsque certains paramètres d'opération peuvent être contrôlés et leur influence dominée, la performance du procédé peut être améliorée ((Thömmes 1997) (Chase et Chang 1994)). Plusieurs instabilités hydrodynamiques et des courants de solides sont retrouvés dans le lit en opération et causent un mélange axial et une ségrégation des particules. Le maintien de l'écoulement piston maximise le nombre théorique d'étages dans la colonne, ce qui assure une performance accrue à la chromatographie.

Les propriétés des particules dans le gel doivent être différentes de celles utilisées dans le liquide afin d'assurer le bon fonctionnement de l'extraction. La variation de la taille des particules et leur distribution dans le lit peuvent être déterminées à l'aide de

photographies d'échantillon de gel ((Menzel et al. 1998) (Al-Dibouni et Garside 1979)). Trois zones différentes ont été observées : une zone de faible porosité où l'on retrouve une classification des particules, une zone intermédiaire où un mélange intensif se produit et finalement une zone de porosité élevée où il y a encore une classification et même une agitation à la base de la colonne. Lorsque le ratio d_R (ratio de la plus grosse particule à la plus petite) est plus grand que 2.2, la classification domine le comportement du lit.

Al-boudini et Garside (1979), présentent une équation qui donne la variation de la taille des particules en fonction de la hauteur (dd/dh) du lit.

$$\frac{dd}{dh} = \frac{m(d)}{A \rho_s \left[1 - \left(\frac{U}{U_s} \right)^{1/\alpha} \right]} \quad (3)$$

La fonction $m(d)$ représente la distribution différentielle de masse, alors que A représente l'aire de la section d'écoulement.

Thömmes (1997) présente plusieurs corrélations et nombres adimensionnels qui caractérisent l'hydrodynamique de la colonne. Ces nombres et corrélations sont ceux généralement utilisés dans le domaine de la fluidisation.

Ces nombres sont :

Le nombre d'Archimède ou Galilée

$$Ar = \frac{\rho_p g (\rho_p - \rho_f) d_p^3}{\mu^2} \quad (4)$$

La relation entre le nombre de Reynolds terminal Re_t et Ar.

$$Re_t = \left[\frac{23}{Ar} + \frac{0.6}{Ar^{0.5}} \right]^{-1} \frac{1}{1 + 2.35 \frac{d_p}{d_c}} \quad \text{où } d_c \text{ est le diamètre de la colonne} \quad (5)$$

Re au point de fluidisation minimale Re_{mf} est donné par plusieurs corrélations dont celle de Riba et al. (1978).

$$Re_{mf} = 1.54 * 10^{-2} Ar^{0.66} Mv^{0.7} \quad (6)$$

Où $Mv = \left(\frac{\rho_p - \rho_l}{\rho_l} \right)$

La dispersion dans la phase liquide est décrite par le nombre de Bodenstein, qui caractérise le degré de mélange axial dans le lit alors que le nombre de plateaux théorique, N, est une indication de l'efficacité de séparation.

$$Bo = \frac{U \bullet L}{D_{axl}} \quad (7)$$

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad (8)$$

Le nombre de plateaux est influencé par l'hydrodynamique du lit en général, c'est-à-dire la dispersion axiale de la phase mobile dans les interstices du gel et la résistance au transfert de matière autour des particules du gel (Wnukowski 1998).

D'autres nombres adimensionnels qui caractérisent le mélange des particules sont le nombre de Péclet pour les particules qui caractérise le mélange à l'intérieur de la phase

liquide, Pe_p et le nombre de Péclét qui caractérise la dispersion, Pe_{eff} est un nombre adimensionnel qui est similaire au nombre de Bo.

$$Pe_p = \frac{U_e d_p}{D_{axl}} \quad (9)$$

$$Pe_{eff} = \frac{uL}{Deff} \quad (10)$$

Le coefficient de dispersion effective peut être calculé par la corrélation proposée par De Ligny (1970).

$$Deff = 0.7d_c + \frac{2.5d_p}{1 + \frac{7.7d_c}{d_p u}} u \quad (11)$$

La corrélation de Van der Meer et al. (1984) (12), ainsi que celle de Kang et al. (1990) (13), donnent une estimation de l'agitation des solides dans le lit.

$$D_{axl} = 0.04 \cdot U^{1.8} \quad (12)$$

$$D_{axl} = 2.97 \cdot 10^{-3} \cdot (U + U_{mf})^{0.802} \quad (13)$$

La détermination de D_{axl} est nécessaire pour la détermination du rôle de la dispersion de solide dans le lit et son influence sur l'adsorption en lit fluidisé.

Cette équation (14) permet de calculer le coefficient de diffusion Ei en mesurant la variation de la distribution de la taille des particules en fonction de la hauteur.

$$E_i \frac{dc_i}{dh} = c_i \left[\frac{U_o - U_{oi}}{\varepsilon_h} \right] \quad (14)$$

où E_i = coefficient axial de diffusion d'eddy
 c_i = la concentration de particules
 U_o = la vitesse superficielle
 ε = la porosité du lit

Cette équation (14) peut être adaptée pour calculer E_i en fonction de la variation de la distribution de la taille des particules à différentes hauteurs dans un lit fluidisé, ensuite, la variation de la distribution de la taille des particules peut être obtenue des valeurs connues des coefficients axial de diffusion d'eddy. La valeur maximale du coefficient de diffusion d'eddy est retrouvé à une porosité d'environ 0.7 lors d'études réalisées par Al-Dibouni et Garside (1979), confirmant ainsi la présence d'un mélange axial élevé à cette porosité, pour des particules ayant une diamètre variant entre 0.55 et 3.07 mm à des vitesses correspondant à un nombre de Reynolds variant de 52.6 à 1180. La porosité à une hauteur h peut être calculée par le gradient de pression à cette hauteur, dp/dh . Afin d'étudier la variation de la distribution des particules en fonction de la hauteur dans le lit, une colonne est divisée en différentes parties; de cette façon, il est possible d'analyser chaque section. Durant chaque expérience le gradient de pression à travers la colonne peut être mesuré afin de déterminer la porosité locale. L'équation (15) représente le gradient de pression, la porosité est obtenue avec l'équation (16) et pour terminer une équation simplifiée (17) pour une coefficient d'eddy constant.

$$\frac{dp}{dh} = (1 - \varepsilon_h) (\rho_s - \rho_f) g \quad (15)$$

$$\varepsilon_h = 1 - \frac{W_h}{\rho_s} Ah \quad (16)$$

$$\int_0^h \left[\frac{(U_0 - U_{0i})}{\varepsilon_h} \right] dh = E_i \ln \left[\frac{c_i(h)}{c_i(0)} \right] \quad (17)$$

Les résultats sur la dispersion de la phase liquide indiquent que lorsque les matières poreuses sont utilisées pour l'adsorption dans un lit fluidisé, un faible degré d'agitation axiale est observé si le lit est stabilisé en réduisant la mobilité locale des particules fluidisées.

2.7 Les caractéristiques d'expansion

Deux aspects de l'opération du lit en expansion sont observés par De Luca et al. (1994) : le comportement de l'expansion en régime permanent en fonction du design du distributeur et la réponse en régime transitoire lors d'un changement de type échelon dans la vitesse du liquide ou dans ses propriétés. Ces effets sont importants puisque l'expansion du lit influence l'efficacité de séparation. L'expansion est une variable qui permet de définir le régime d'écoulement à l'intérieur du lit en permettant le calcul des facteurs d'expansion. Le régime transitoire est observé afin d'améliorer la compréhension des effets du changement des conditions opératoires sur le comportement du lit. Ces effets sont importants lors de l'élaboration des protocoles opérationnels puisque le débit est amené à changer lors de l'utilisation de la colonne en production et il est crucial de prédire le comportement du lit afin de le contrôler.

L'effet du distributeur est complexe à décrire et à définir. Il provoque des jets qui, en pénétrant dans le lit de particules, peuvent causer des chemins préférentiels qui engendrent une mauvaise expansion. La présence de jets dans le lit à une haute vitesse

mène à une expansion réduite. Par contre, avec une hauteur de lit suffisamment élevée, soit deux fois le diamètre interne de la colonne, le design du distributeur ne prend plus autant d'importance.

La densité de cellules et la quantité de biomasse affectent la viscosité – ce qui a pour effet de réduire le débit maximum d'opération en créant une surexpansion du gel. En augmentant la température, la viscosité diminue. La vitesse et le débit sont augmentés et, par le fait même, le temps d'opération est réduit et la stabilité du produit est conservée.

Il est important de connaître les caractéristiques d'expansion du lit. L'expansion du lit est guidée principalement par le diamètre des billes (particules de gel), la différence de densité entre les particules, leur distribution et l'alimentation, la vitesse d'écoulement et la viscosité de l'alimentation (Chang et Chase 1994).

2.7.1 Caractéristiques de l'expansion du lit

Une augmentation de la viscosité du lit diminue la plage de vitesse de liquide qui peut être utilisée dans le lit. La vitesse terminale des particules est inversement proportionnelle à la viscosité du liquide. Thelen et Ramirez (1997), proposent un modèle de fluidisation à deux phases : le modèle de fluidisation solide – liquide. Ce modèle permet de prédire le profil de fraction solide dans le lit.

Le temps de résidence dans la colonne est estimé avec l'équation suivante :

$$\bar{t} = \frac{V_l}{F} = \frac{A \cdot \varepsilon \cdot L}{F} \quad (18)$$

\bar{t} : temps de résidence moyen

L : la hauteur du lit en expansion

V_l : volume de liquide

F : débit volumique

A : aire d'échange (section de la colonne)

ε : la fraction de vide

Si lors des expériences, le temps de résidence est petit, cela indique que l'expansion du gel est moindre et qu'il y a formation de chemins préférentiels. Pour décrire le temps de résidence moyen, il y a deux modèles mathématiques : le modèle de dispersion ainsi que le modèle des réservoirs en série. Afin d'éviter que l'adsorption ne soit limitée par le mélange du liquide, on devrait avoir un nombre de Bo plus grand que 40 ou un nombre de réacteurs en série plus grand que 20 (Pharmacia-Biotech 1996). Puisqu'un nombre de Bodenstein supérieur à 40 indique que les effets de parois sont négligeables et que la dispersion axiale est moyenne.

Afin de déterminer le coefficient de transfert de matière, k_f , la corrélation suivante est utilisée :

$$k_f = \frac{D_m}{d} \left[2 + \left(1.5 \bullet (1 - \varepsilon) Re_p \right)^{1/2} Sc^{1/3} \right] \quad (19)$$

$$Re_p = \frac{\rho u d_p}{\mu}$$

où

$$Sc = \frac{\eta}{\rho D_m}$$

Les corrélations de Young et al. et de Min et Howell caractérisent la diffusion moléculaire pour la solution (bulk).

$$D_m = 8.34 \times 10^{-15} \frac{T}{\mu(Ma)^{1/3}} \quad (20)$$

Où Ma représente la masse moléculaire de la solution à adsorber.

2.7.2 Temps de procédé et productivité

Chang et Chase (1996), ont trouvé que le temps de production est une fonction décroissante de la vitesse du liquide. Même si la capacité dynamique diminue, le cycle de purification diminue avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement. Ils ont également trouvé que la productivité, ou capacité du gel, à différentes conditions - pour des concentrations de glycérol variant de 0 à 32 % v/v glycérol et en opérant soit à degré d'expansion constant (degré d'expansion de 2 à 3) soit à une vitesse constante de 300 cm/h - reste dans un intervalle rapproché, c'est-à-dire de 0.162 à 0.354 mg de lysozymes par ml d'adsorbant*min.

2.7.3 Transport de particules

En augmentant la vitesse d'écoulement dans le lit, on observe généralement que sa capacité dynamique diminue ; par contre, le temps de contact solution-gel demeure quasi-constant à cause de l'expansion du lit.

Thelen et Ramirez (1997), ont développé un modèle mathématique qui décrit le changement de hauteur du gel dans la colonne en opération après un changement d'échelon de vitesse d'écoulement de la solution. En d'autres termes, ils ont étudié le comportement transitoire de la colonne en opération.

Lors d'un échelon positif (augmentation) sur la vitesse de fluidisation, il est normal de croire qu'il y a aura une montée rapide de la surface du lit et, éventuellement, un équilibre sera atteint. En pratique, ce n'est pas tout à fait ce qui est observé. La surface de lit monte de façon linéaire pendant un certain de temps. Par la suite, apparaît une période où le taux d'expansion diminue de façon asymptotique.

Lors d'un échelon négatif (diminution) sur la vitesse de fluidisation, une région de contraction à un taux constant est remarquée ; par la suite, la vitesse de sédimentation commence à diminuer jusqu'au moment où le lit atteint son niveau d'équilibre.

De Luca et al. (1994), ont observé le même comportement.

2.8 La dispersion axiale de l'écoulement du liquide

En général, un modèle de dispersion axiale permet de décrire ou de prendre en compte les déviations possibles de l'écoulement piston, peu importe si le lit est fixe ou fluidisé.

Trois facteurs sont responsables de la dispersion axiale à l'intérieur de la colonne. Le mélange à l'échelle microscopique est d'abord causé par des obstructions mécaniques (recirculation, eddies) ou encore par la diffusion (dispersion convective). Il provient également de la présence de chemins préférentiels dans le lit d'adsorbant ou de la présence d'un mauvais système de distribution à l'entrée de la colonne. Cela a pour effet d'augmenter l'intervalle des temps de résidence. Enfin, l'effet vient de la colonne elle-même, c'est-à-dire, des longs volumes de tube, des détecteurs, etc.

Thömmes et al. (1995), observent une diminution de l'agitation lorsque le ratio hauteur du lit au diamètre de la colonne augmente, et lorsque la vitesse linéaire du courant d'alimentation augmente. Par contre, Chang et Chase (1996), remarquent une

augmentation dans la dispersion axiale lorsque la vitesse, la viscosité du liquide ou la porosité du lit augmentent. Une augmentation du nombre de Bo implique une diminution de l'agitation axiale dans le lit (Mullick et al. 1998).

Les deux paramètres majeurs qui influencent le mélange de la phase liquide sont le ratio H/d et la vitesse d'écoulement. Le ratio H/d représente la quantité de matrice utilisée pour un diamètre donné, lorsque celui-ci est élevé, l'effet de la turbulence à l'entrée de la colonne est réduit. Cet effet provient du distributeur et des courants préférentiels.

L'effet des parois qui résulte des gradients de vitesse causent une ségrégation des particules dues aux vitesses plus faibles aux parois. En effet, l'agitation n'est pas réduite par les effets de paroi (Thömmes et al. 1995). Il est suggéré que l'effet des parois ne soit pas significatif lorsque le ratio du diamètre de la colonne au diamètre des billes de gel dans la colonne est supérieur à quinze (Chang et Chase 1995). Donc, pour une colonne de 1 cm, la valeur du ratio varie entre 10 et 20 pour des particules de gel typiques (d_p entre 100 et 200 μm), ce qui veut dire que les effets des parois devraient être considérés puisqu'ils ont un impact sur la stabilité du lit (Chang et Chase 1995). L'effet des parois peut être négligé lorsque le ratio hauteur/diamètre de la colonne (H/d) est supérieur à 100 selon Thömmes et al. (1995).

2.8.1 Augmentation de l'agitation axiale des solides et des liquides dans le lit

L'agitation dans la phase liquide est plus grande dans les lits avec une importante porosité. Également, plus la viscosité du liquide est grande, plus il y a mélange des phases liquide et solide dans le lit. Lors de l'opération d'un lit en expansion avec une solution visqueuse, il est observé que l'adsorption est plus affectée par le mélange axial de la phase liquide et solide que par l'augmentation de la résistance du transfert de matière (Chang et Chase 1996). Lorsque la colonne est opérée à une hauteur de lit

constante, la porosité du lit augmente avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement. La dispersion axiale peut être négligée si le nombre de Peclet effectif est supérieur à 40 (Thömmes et al. 1995). La dispersion dans la phase solide est caractérisée par le mouvement de chaque particule. Ce mouvement est aléatoire et peut être représenté schématiquement comme de la diffusion de particules. Il y a une contribution importante du mouvement convectif des particules sur le mélange de la phase solide qui est dû au mélange axial, c'est-à-dire que les particules montent au centre de la colonne et descendent le long des parois. Le coefficient de dispersion de la phase solide est dépendant de la porosité du lit. La valeur de porosité à laquelle est obtenue la valeur maximale de dispersion est de 0.7 selon Thömmes (1997).

2.9 La mise à l'échelle

Dans l'industrie, il est pratique courante de faire la recherche et le développement à petite échelle. De cette façon, il y a une économie de temps et d'argent. Par contre, en usine, il est primordial de travailler à plus grande échelle afin d'optimiser l'opération et la production et de la rentabiliser. Pour cette raison, il est important de pouvoir faire la mise à l'échelle des techniques développées à petite échelle.

Hjorth (1997) décrit quatre étapes à réaliser pour réussir un bon changement d'échelle :

1. *Petite échelle dans un lit fixe* : étudier les effets des caractéristiques du produit sur la purification ; à cette étape, les conditions optimales pour l'adsorption et l'élution sont déterminées.
2. *Petite échelle dans un lit en expansion* : étudier l'influence des cellules et des débris sur le procédé d'adsorption et déterminer la quantité de biomasse que l'on peut appliquer au lit.
3. *Échelle pilote en mode d'expansion* : vérification des résultats obtenus ; à cette étape, il est important de conserver la même hauteur de lit et la même vitesse d'écoulement et d'augmenter la surface transversale de la colonne en proportion avec le volume à traiter.
4. *Échelle Production* : l'établissement du procédé.

L'utilisation d'un traceur, distribution des temps de séjour (DTS), est un bon outil de validation pour caractériser l'hydrodynamique dans les lits en expansion. La clé pour réussir un scale-up de l'opération d'adsorption dans un lit en expansion est de garder les paramètres hydrodynamiques constants (Lindgren et al. 1993).

Les paramètres suivants sont augmentés avec le scale-up en fonction du diamètre de la colonne : le débit volumétrique, le volume d'adsorbant et le volume de solution tampon (Snow 1994).

Aucun changement du diamètre des billes de gel ni de la hauteur du lit en expansion n'est effectué pendant le scale-up. Par contre, la surface d'échange du lit ainsi que le débit volumétrique envoyé à la colonne doivent être changés proportionnellement au volume d'alimentation à traiter (Chase et Chang 1994).

La méthode utilisée par Frej et al. (1997) pour tester la possibilité de scale-up est la détermination du degré de l'expansion du lit, la détermination de la capacité des protéines à passer dans le gel ainsi que la détermination de la dispersion axiale. Il est également important de vérifier si la colonne est bien nettoyée, donc une analyse après l'extraction doit être faite.

2.9.1 Détermination du degré d'expansion du lit

Le degré d'expansion du lit est mesuré par le ratio de la hauteur du lit en expansion sur la hauteur du lit sédimenté.

2.9.2 Nettoyage de la colonne

Frej et al. (1997), ont trouvé qu'après une expérience avec les cellules de *E. coli*, il y avait quatre endroits autour de l'adaptateur retrouvé en bas de colonne où on retrouvait des cellules mortes. Donc, il est important d'inclure des périodes d'écoulement à contre-courant lors du nettoyage afin d'assurer l'enlèvement de tous les débris.

2.10 Le monitoring et le contrôle

Thelen et Ramirez (1998), ont présenté des stratégies de modélisation qui peuvent être utilisées pour contrôler le lit en expansion. La commercialisation de la technique du lit en expansion est difficile puisqu'il n'existe pas de façon, présentement, de bien contrôler la stabilité du lit. Une technique basée sur les ultrasons a été développée. Cette technique a été utilisée pour mesurer la hauteur du gel dans la colonne en tout temps ; le capteur détecte les bulles d'air et est capable de déterminer si le lit colmate. Grâce à ce système de mesure, il est possible de caractériser le comportement de la colonne, c'est-à-dire la hauteur du gel en fonction du changement de vitesse d'écoulement et de viscosité. Un modèle est alors développé. Par la suite, un simple contrôleur PI (proportionnel intégral) peut être utilisé afin d'appliquer un contrôle sur la hauteur de lit [(Thelen et al. 1997; Thelen et Ramirez 1998)]. Bruce et al.(1998), ont également développé une façon de faire du monitoring du comportement du gel dans la colonne lors de l'opération de la colonne. Cette technique consiste à introduire une seringue à l'intérieur du lit à différents endroits par différents trous placés dans la colonne et à retirer un échantillon de la solution. Cela permet de déterminer l'état du procédé et, de cette façon, d'optimiser le cycle d'opération du système, c'est-à-dire l'injection du bouillon de culture (matière à adsorber), la phase de lavage ainsi que l'élution. De plus, cette technique permet d'avoir une idée de l'hydrodynamique à l'intérieur de la colonne.

CHAPITRE 3 MATÉRIELS ET MÉTHODES

3.1 Matériels

Le système opératoire utilisé se compose de trois sections : la colonne, le système automatisé d'opération et d'acquisition de données et l'ordinateur qui gère les données.

Deux colonnes sont utilisées : une colonne SynChroTM de 1 cm de diamètre et 49 cm de hauteur et une colonne de Pharmacia, STREAMLINE 50 de 5 cm de diamètre et 100 cm de hauteur.

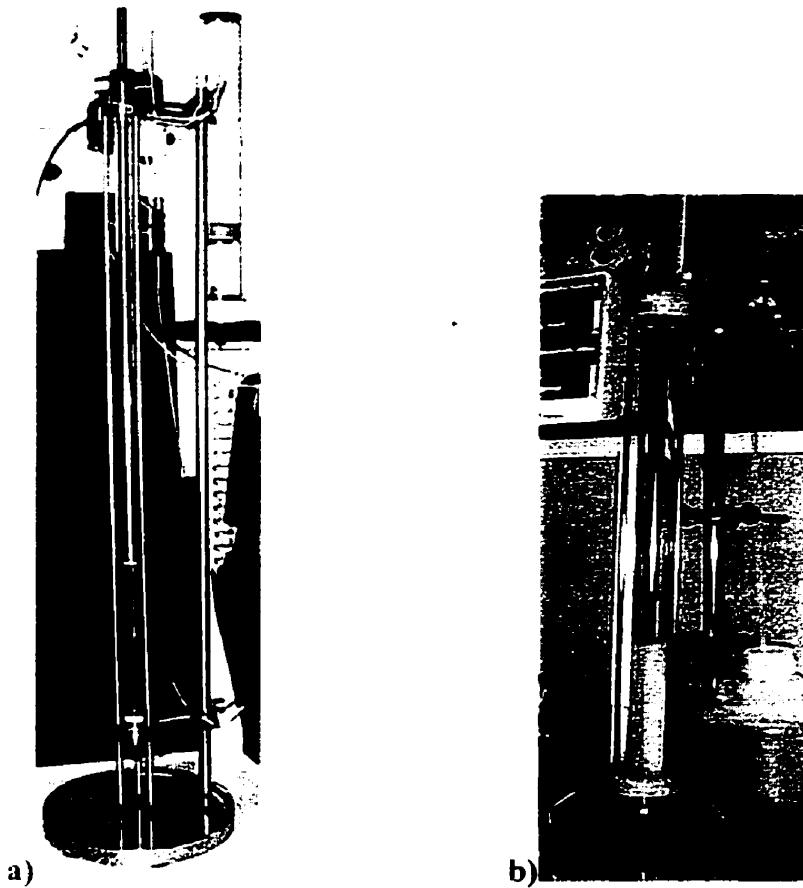
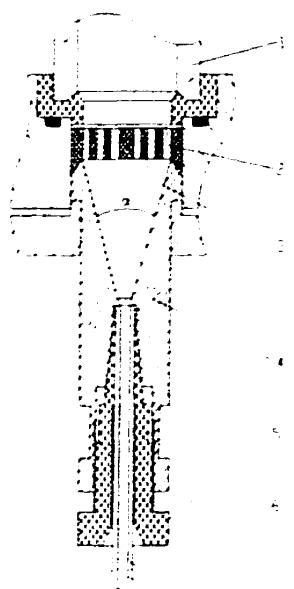


Figure 3-1 a) Colonne SynChro b) Colonne Pharmacia 50

L'adaptateur est fait d'acier inoxydable ainsi que les deux distributeurs. Le distributeur inférieur peut être assemblé de six façons différentes puisqu'il y a trois types de distributeurs avec des angles différents. De plus, il est possible d'ajouter ou non un distributeur. Les angles d'ouverture pour le distributeur sont 150° , 90° et 45° . Sur la figure 3-2, la pièce 4 représente le distributeur. L'angle d'ouverture indiqué sur le dessin représente celui de 45 degrés, si par contre, l'angle d'ouverture de 150 degrés était présent, la profondeur du cône serait moins importante et l'ouverture plus grande. Chaque distributeur possède un filtre en titane ayant des pores de $80 \mu\text{m}$ de diamètre. Les bagues d'étanchéité sont faits en polypropylène. Le filtre supérieur a un diamètre de 0.4 cm tandis que celui inférieur a un diamètre de 1 cm. Le filtre inférieur couvre toute la section de la colonne, tandis que le filtre supérieur est placé à l'intérieur de l'adaptateur mobile de la colonne. Celui-ci fait moins de 1 cm de diamètre, de plus, la section d'écoulement de l'adaptateur est de 1 mm de diamètre (voir Annexe B pour détails). Pour un distributeur possédant un diamètre de 1cm et 36 trous de diamètre égal à 0.5 mm, le ratio de l'aire vide versus l'aire totale est de 9 %.



- 1 – colonne
- 2 – filtre avec pores
- 3 – distributeur
- 4 – soutien pour le filtre
- 5 – verrou pour le capillaire
- 6 – capillaire

Figure 3-2 Schéma du distributeur

Le système de mesure et d'acquisition de données est le BioPilot (Fig. 3-3). C'est un système de chromatographie extrêmement versatile. Il est fabriqué par la compagnie Pharmacia Biotech, Suède. Il se compose de deux unités : une boîte de contrôle et une unité de séparation. Ce système automatisé est composé de trois paires de pompes péristaltiques P-6000 (a moteur fonctionne à l'intérieur d'un espace confiné et actionne deux pistons. Les pistons bougent en synchronisation dans le cylindre, lorsqu'un piston pousse le fluide à l'extérieur de la pompe, l'autre aspire le fluide à l'intérieur de la pompe.), d'un moniteur UV –1 fonctionnant à 280 nm, d'un pHmètre et d'un conductivimètre . Le système compte dix valves d'entrées et dix valves de sorties. La conductivité, l'absorbance en UV et le pH sont enregistrés en continu, ainsi que plusieurs autres données utiles telles la pression, les débits.

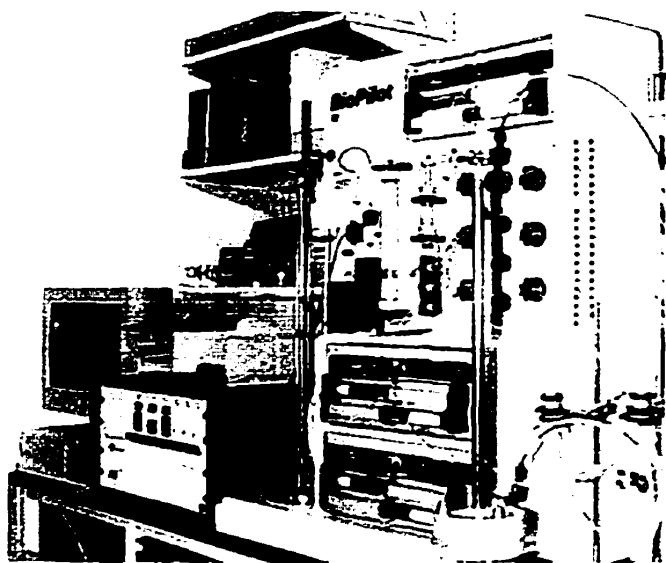


Figure 3-3 Système Biopilot

Le logiciel de contrôle est connu sous l'appellation UNICORNTM. C'est un système de contrôle complet pour la chromatographie ainsi que pour la manipulation de liquide via les vannes et les pompes. Il peut contrôler jusqu'à quatre systèmes BioPilot à la fois. Il fonctionne avec des ordinateurs qui sont IBM compatible et il a besoin du système OS-2 pour opérer.

Un gel d'échange cationique STREAMLINE SP de Pharmacia est utilisé pour les expériences. Ses caractéristiques sont données au tableau 3-1.

Tableau 3-1 Caractéristiques du gel

<i>Caractéristiques</i>	<i>Streamline SP</i>
Type d'échangeur d'ions	Échangeur cationique
Capacité totale ionique (mmol/ml gel)	0.17 – 0.24
Intervalle de diamètre des particules (μm)	100 - 300
Diamètre moyen des particules (μm)	200
Densité moyenne des particules (g/ml)	1.2
Degré d'expansion (H/H_0) à 300 cm/h	2 - 3
Stabilité pH	
À long terme	4 – 13
À court terme	3 – 14
Capacité de liaison (mg/ml gel)	
Lysozyme (MW 14 500)	> 60
Entreposage	0.2 M acétate de sodium dans 20 % éthanol

3.2 Méthodes

La majorité des essais permettant de caractériser l'opération d'une colonne d'adsorption à lit en expansion a été réalisée avec une colonne de 1 cm de diamètre. Quelques essais ont été effectués avec la colonne de 5 cm afin de validité de certaines tendances observées avec la colonne de 1 cm.

3.2.1 Mesure des caractéristiques du lit en expansion

Les caractéristiques du lit en expansion sont mesurées à la température de la pièce avec la colonne Synchro 10 et la colonne Streamline 50. L'expansion du lit est mesurée lors de l'augmentation du débit volumique tel que décrit par Chang et Chase (1995). Le lit est considéré stable après qu'une période de 20 minutes se soit écoulée puisque les particules

de gel ont atteint leur position dans le lit et la hauteur du lit est expansion ne change plus et que les billes du gel semblent avoir un mouvement minimal. Les exposants de Richardson – Zaki sont calculés à partir des résultats obtenus.

3.2.2 Mesure des caractéristiques de dispersion du liquide

Une méthode de traçage a été utilisée pour mesurer la distribution des temps de séjour (DTS) du liquide dans la colonne. Une solution diluée d'acétone est utilisée comme traceur à l'entrée du lit et l'absorption en UV est mesurée à la sortie de la colonne. Ce test doit être exécuté dans les mêmes conditions que lors de l'opération du lit (même tampon et même vitesse d'écoulement). Lors de l'évaluation de la courbe obtenue avec le traceur, il faut garder en tête que la mesure ne sera pas seulement fonction de la dispersion dans la colonne mais, également de la perméabilité de la matrice.

Des mesures de DTS permettant de déterminer la dispersion axiale du liquide dans le lit en expansion en fonction de la viscosité ont été effectuées. Pour ce faire, un traceur d'acétone 1.0% (v/v) est injecté dans diverses solutions contenant différentes concentrations de glycérol (0%, 10% et 15% v/v glycérol, dans une solution tampon de 100 mM acétate de sodium, pH 5.0). Deux pompes péristaltiques P-6000 de Pharmacia sont utilisées pour contrôler le débit de solution envoyé à travers le système. Lorsqu'un lit stable est atteint, l'absorbance en UV du courant de sortie est mesurée grâce au système Unicorn. Dès l'obtention d'une ligne de base stable, la solution contenant le traceur est injectée dans le lit. Cette solution continue à être injectée jusqu'à l'obtention d'une courbe. Quand le signal UV a atteint sa valeur maximale, l'injection du traceur se termine et c'est la solution de base qui est envoyée dans la colonne. Le signal UV redescend à la ligne de base. Pendant ces expériences, l'adaptateur supérieur est placé juste au-dessus de la surface du gel afin de minimiser le volume mort du système. Ce type de mesures a été effectuées sur les deux colonnes (1 et 5 cm).

Les résultats de cette méthode servent aux calculs du nombre de Bodenstein, Bo , et du nombre de plateaux théoriques, N .

$$Bo = \frac{U \bullet L}{D_{axl}} \quad (21)$$

$$N = \frac{t^2}{\sigma^2} \quad t = \text{temps de résidence moyen} \quad (22)$$

$\sigma = \text{déviation standard}$

3.2.3 Mesure du taux d'adsorption de protéines

Les lysozymes sont des protéines globulaires (Wright et al. 1998). Le choix de cette protéine a été motivé par les facteurs suivant : elle est peu coûteuse, elle se caractérise bien, c'est-à-dire qu'elle est bien définie et est facilement quantifiable, elle est utilisée de façon régulière pour modéliser l'adsorption de protéines et finalement, elle s'adsorbe et se désorbe facilement avec l'échange d'ions et ce, dans les mêmes conditions de pH. Son coefficient d'extinction à 280 nm est 2.64 mL/mg.cm (Chang et Chase 1996). Les lysozymes utilisées dans le cadre de cette recherche proviennent de la compagnie Sigma (numéro de catalogue L-6876)

Ce test consiste à calculer C/Co (concentration de lysozymes à la sortie de la colonne/concentration de lysozymes à l'entrée de la colonne) afin d'obtenir la capacité maximale d'adsorption du gel présent dans la colonne. Ainsi, à mesure que C/Co s'approche de 1, le lit adsorbe de moins en moins les lysozymes.

Dans ces expériences, des analyses du taux d'adsorption des lysozymes par le gel STREAMLINE SP sont faites à la température de la pièce en variant différentes conditions opératoires. L'effet de quatre facteurs est observé : le débit volumique, la

concentration de lysozyme, la concentration de glycérol ainsi que la hauteur du gel dans la colonne. Les expériences sont réalisées selon un plan statistique (Clément 1998) qui est défini à la section 3.2.4.

Lors des expériences, la concentration des lysozymes présente dans la solution sortante du lit est déterminée avec l'utilisation d'une mesure d'absorbance UV à 280 nm. Treybal (1980) propose une méthode qui permet de quantifier la capacité du gel pour chaque expérience. Le LUB (length of unused bed – longueur de lit inutilisé) est déterminé avec ces courbes par une technique également proposée par Treybald (1980).

Une solution tampon de 1.0 M d'hydroxyde de sodium, pH 5.0 est utilisée afin de nettoyer la colonne après l'injection de lysozymes. L'élution est opérée en mode d'expansion avec une solution de 1.0 M NaCl dans 100 mM acétate de sodium, pH 5.0.

3.2.4 Méthode statistique

Il est avantageux d'utiliser une méthode statistique de planification d'expériences afin de comparer les résultats (tableau 3-2); de cette façon, le nombre d'expériences à réaliser est réduit. Cette méthode permet d'évaluer l'influence des différents paramètres sur l'opération et d'évaluer l'effet combiné de deux paramètres à la fois. Tous les effets combinant plus de deux paramètres sont négligés, car selon l'auteur de la méthode factorielle, ils sont pratiquement inexistant ou du moins négligeables. La méthode factorielle suivante est utilisée :

Tableau 3-2 Méthode statistique

Expérience	X1	X2	X3	X4
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

Les variables étudiées sont définies dans le tableau 3-3.

Tableau 3-3 Valeur des variables

Variable	Définition	+	-
X1	Vitesse d'écoulement mm/s	0.56	0.42
X2	Concentration de lysozyme mg/ml	6.0	2.0
X3	Concentration de glycérol % v/v	15	0
X4	Hauteur cm	11.9	6.8

Le protocole (Tableau 3-4) suivant est utilisé lors de l'expérimentation :

Tableau 3-4 Protocole expérimental

Expérience	X1 mm/s	X2 mg/ml	X3 % v/v	X4 cm
1	0.42	2	0	6.8
2	0.56	2	0	6.8
3	0.42	6	0	6.8
4	0.56	6	0	6.8
5	0.42	2	15	6.8
6	0.56	2	15	6.8
7	0.42	6	15	6.8
8	0.56	6	15	6.8
9	0.42	2	0	11.9
10	0.56	2	0	11.9
11	0.42	6	0	11.9
12	0.56	6	0	11.9
13	0.42	2	15	11.9
14	0.56	2	15	11.9
15	0.42	6	15	11.9
16	0.56	6	15	11.9

CHAPITRE 4 CONCEPTS THÉORIQUES

4.1 Distribution du temps de résidence pour les réacteurs non idéaux

Cette section théorique est tirée largement des chapitres 13 & 14 de Fogler (1992).

La mesure du temps de résidence à l'intérieur de la colonne est défini comme le temps que prend une particule de liquide pour passer à travers la longueur de la colonne. Cette donnée est une caractéristique du mélange qui survient dans la colonne.

Lorsque la colonne est remplie de gel, la solution ne s'écoule pas nécessairement de façon uniforme. Il y a des sections du lit qui offrent peu de résistance au transfert ce qui a pour conséquence de créer un chemin préférentiel où la majorité du liquide s'écoule. Les molécules de solution qui voyagent par ce chemin ne demeurent pas le même laps de temps à l'intérieur de la colonne que celles qui empruntent les régions où la résistance à l'écoulement est plus élevée.

Le système de séparation où les particules passent exactement le même temps de résidence dans la colonne est considéré comme idéal. Dans la réalité, ce type de système n'existe pas; les particules passent des laps de temps différents dans le lit. Donc, la mesure obtenue du temps de résidence est en réalité celle d'une distribution.

4.1.1 Détermination de la distribution de temps de séjour

Le temps de résidence est déterminé en injectant un agent chimique inerte dans la colonne au temps « t » égale 0 et la concentration de ce traceur est mesurée à la sortie de la colonne en fonction du temps. Deux méthodes d'injection sont fréquemment utilisées, l'injection sous forme d'échelon et celle sous forme d'impulsion. Dans le cas présent,

l'injection retenue est celle sous forme d'échelon. Cette technique est préférée car elle s'opère plus facilement lors des expériences. Par contre, la difficulté à maintenir la concentration de traceur à l'entrée ainsi que l'obligation de dériver les données afin d'obtenir la courbe de DTS sont deux inconvénients majeurs à cette technique. La différentiation des données peut également engendrer des erreurs non-négligeables. La différence entre les deux types d'injection apparaît dans la Fig. 4.1

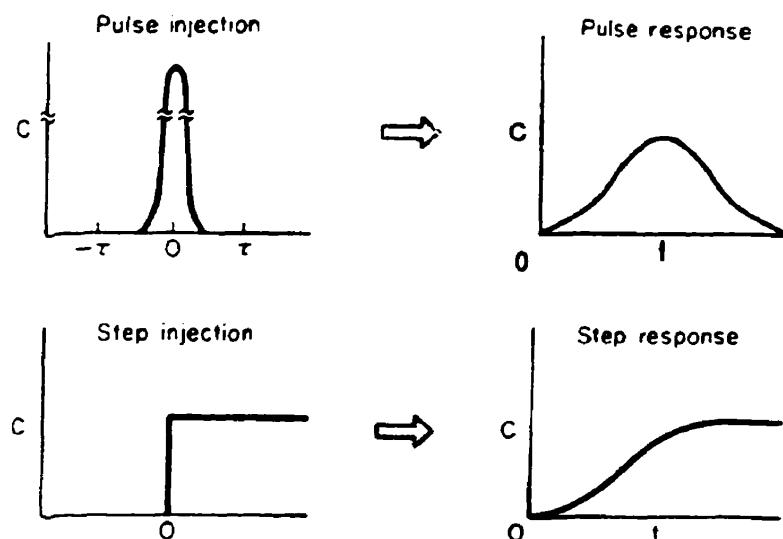


Figure 4-1 Mesure du temps de résidence (Fogler 1992)

4.1.2 Caractéristiques de la fonction $E(t)$

La fonction $E(t)$ qui est en soi la distribution du temps de résidence est défini par l'équation suivante :

$$E(t) = \frac{d}{dt} \left[\frac{C(t)}{C_0} \right]_{step} \quad (23)$$

Où $C(t)$ représente la concentration de traceur à la sortie de la colonne

C_0 est une constante qui représente la concentration de traceur à l'entrée de la colonne

Cette distribution est utilisée régulièrement puisqu'elle permet l'analyse de la colonne en quantifiant la durée de temps que passent les molécules de traceur à l'intérieur de la colonne. La somme de cette fonction avec le temps et ce pour des valeurs de temps plus petites qu'un temps choisi, représente la fraction du courant de sortie qui a résidé une période de temps plus courte que cette valeur de temps donnée. Cette fonction est exprimée sous la forme suivante (voir Fig. 4.2) :

$$\int_0^t E(t) dt = F(t) \quad (24)$$

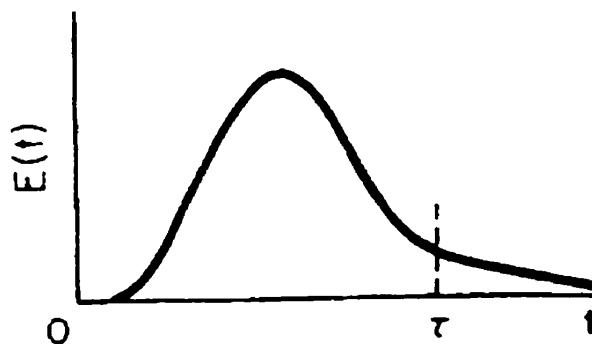


Figure 4-2 Temps de résidence pour un lit fixe avec zones mortes et chemins préférentiels (Fogler 1992)

D'autre part, l'intégrale de la fonction $E(t)$ lorsqu'elle est multipliée par le temps donne le temps de résidence moyen du traceur dans le système étudié. Le temps de séjour moyen est également appelé le premier moment de la fonction.

$$tm = \int_0^{\infty} t E(t) dt \quad (25)$$

La comparaison des courbes de DTS est souvent faite en comparant les moments au lieu de comparer la courbe de distribution en entier. Pour ce faire, trois moments sont utilisés. Le premier moment est appelé le temps de résidence moyen. Le deuxième moment, soit la variance ou le carré de la déviation standard, est défini par l'équation qui suit :

$$\sigma^2 = \int_0^{\infty} (t - tm)^2 E(t) dt \quad (26)$$

L'ordre de grandeur de cette valeur est une indication de l'étalement de la distribution. Plus la valeur du moment est grande, plus la distribution est étendue. Le troisième moment est le moins utilisé des trois; il mesure le biais de la distribution par rapport à la moyenne.

4.1.3 Analyse d'un réacteur non-ideal

Lors de l'analyse d'un système non – idéal, certains moyens doivent être pris afin de considérer la déviation du système. Plusieurs modèles peuvent être utilisés pour prédire le comportement de l'écoulement. L'équation doit tenir compte du type d'écoulement. Elle est basée sur une combinaison ou une modification du modèle idéal. Avec cette technique, le modèle peut être classifié comme un modèle de un paramètre (réacteur en série ou dispersion) ou encore un modèle de deux paramètres (réacteur avec un volume mort ou avec une dérivation).

Le choix de ce modèle dépend en grande partie du jugement de l'ingénieur qui effectue l'analyse. Un compromis entre la simplicité mathématique et le réalisme physique doit être fait.

Lors de l'étude d'un réacteur tubulaire, où dans le cas concerné, une colonne de séparation, le profil de vitesse est à priori considéré plat et le mélange axial nul. Ces deux hypothèses sont erronées pour la plupart des réacteurs. Une approche consiste à modéliser le système par une série de réacteurs mélangés tandis que l'autre façon propose de modifier le comportement idéal en lui imposant une dispersion axiale.

Le système de modélisation par une série de réacteurs mélangés consiste à déterminer le nombre de réacteurs idéals en série qui donne approximativement la même distribution de temps de séjour que le réacteur non-idéal. On considère qu'une quantité de traceur est injectée sous forme d'impulsion dans le premier réacteur parfaitement mélangé, ensuite, un bilan de matière est réalisé sur le réacteur. La même chose est fait pour tout les réacteurs, ce qui donne une équation générale pour « n » nombre de réacteurs.

La technique de modélisation qui consiste à modifier le comportement idéal en lui imposant une dispersion axiale est choisie afin de modéliser le système d'adsorption de la colonne. À prime abord, cette méthode donne l'impression de considérer seulement le mélange axial lors de son application. Il est démontré que cette approche compense non seulement pour les problèmes de mélanges axiaux, mais également pour ceux causés par le mélange radial ainsi que les autres profils de vitesses non-plats. Les fluctuations dans la concentration proviennent des différentes vitesses d'écoulement et chemins d'écoulement. Elles sont également engendrées par la diffusion moléculaire et turbulente.

Afin d'illustrer les effets de la dispersion sur la concentration dans un réacteur tubulaire, l'exemple suivant est présenté : l'injection d'un traceur sous forme d'impulsion parfaite. La figure 5.2 schématise la dispersion du traceur à l'intérieur du tube.

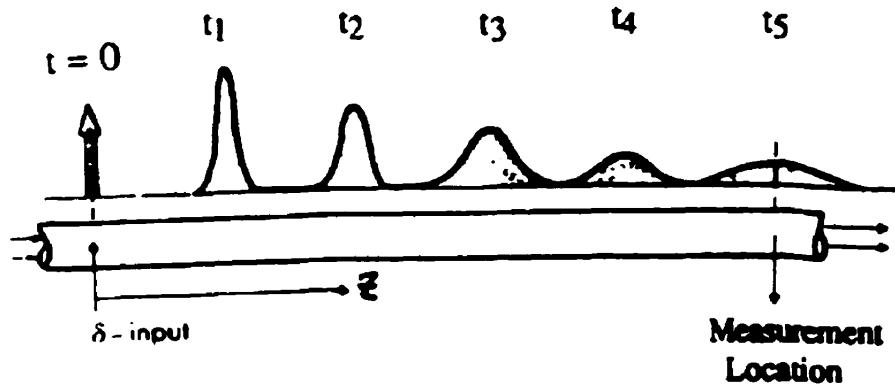


Figure 4-3 Dispersion d'un traceur à l'intérieur d'un tube (Fogler 1992)

En combinant un bilan molaire obtenu avec le débit d'écoulement du traceur avec un bilan de matière du traceur, l'équation qui suit est obtenue, et ce en divisant le tout par l'aire de la section de la colonne.

$$D_{eff} \frac{\partial^2 Ct}{\partial z^2} - \frac{\partial(U Ct)}{\partial z} = \frac{\partial Ct}{\partial t} \quad (27)$$

Lorsque cette équation est transformée sous forme adimensionnelle, le nombre de Peclet peut être retrouvé dans l'équation. Le nombre de Peclet est défini comme le rapport entre la vitesse de transport par convection sur la vitesse de transport par diffusion ou dispersion. Le nombre de Peclet prend le nom de nombre de Bodenstein lorsqu'il est question de dispersion.

$$Pe = \frac{U\ell}{D_{eff}} \quad (28)$$

où ℓ = la longueur caractéristique de la colonne
 U = la vitesse superficielle dans le tube – pour un lit fixe, la vitesse utilisée est normalement la vitesse interstitielle moyenne (vitesse superficielle divisée par la porosité)
 D_{eff} = le coefficient de dispersion effective

Ce nombre de Peclet est également nommé le nombre de Peclet pour le réacteur (Pe_r) puisqu'il utilise la longueur de la colonne ou du réacteur. Le nombre de Peclet peut être défini comme Pe_f , soit le nombre de Peclet pour le fluide.

$$Pe_f = \frac{Ud_p}{\varepsilon D_{axl}} \quad (29)$$

La différence majeure entre celui-ci et le précédent est la valeur de L (longueur caractéristique) ; dans un cas, c'est la longueur du réacteur tandis que dans l'autre, il est question du diamètre des particules. Ce dernier est utilisé lors de l'opération d'un lit fixe. Par contre, il est facile de passer de Pe_f à Pe_r , simplement en multipliant le premier par L/d_p . Pour un lit fixe, les valeurs typiques des ces nombres sont environ 1000 pour Pe_r et de 10 pour Pe_f .

Avant de débuter l'analyse, les conditions frontières du système doivent être connues. Deux choix sont possibles, soit le système possède des conditions frontières fermées, soit il possède des conditions frontières ouvertes. Un système fermé implique qu'aucune dispersion ou variation radiale dans la concentration ne se fait en amont ou en aval de la colonne ou réacteur. Contrairement, un système ouvert est un système où la dispersion ou la variation radiale est observée en amont ainsi qu'en aval de la colonne.

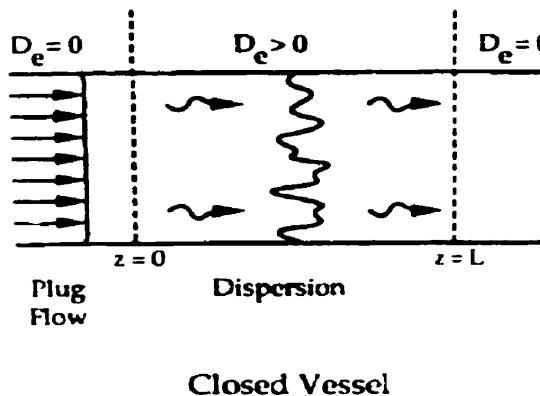


Figure 4-4 Système fermé (Fogler 1992)

Le cas retrouvé dans la présente étude est celui d'un système fermé, Fig. 4.4. Donc, en amont du système de séparation, un écoulement parfaitement piston est obtenu et il en est de même pour l'aval du système.

Avec les conditions frontières énoncées par Dackwerts, l'équation reliant la variance, le temps de résidence et le nombre de Peclet est définie.

$$\frac{\sigma^2}{t_m^2} = \frac{2}{Pe_r} - \frac{2}{Pe_r^2} \left(1 - e^{-Pe_r} \right) \quad (30)$$

4.2 Transfert de matière

Cette section théorique est tirée du chapitre 11 du livre *Mass transfer operation* (Treybal 1980).

La courbe idéale d'adsorption de la figure suivante est analysée.

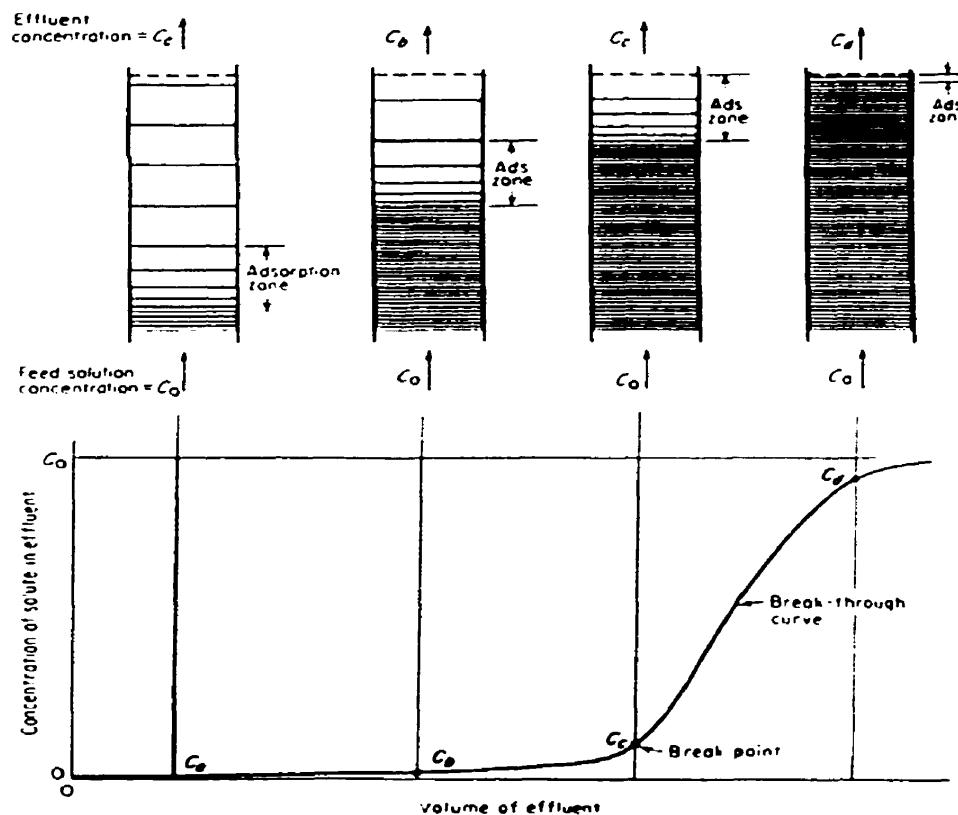


Figure 4-5 Courbe idéale d'adsorption (Treybal 1980)

Elle est obtenue en passant un courant de solution liquide à travers un lit d'adsorbant. La partie inférieure du lit entre en contact avec la solution riche en protéines. Au début, l'adsorption est rapide et efficace; tout ce qui n'est pas adsorbé par la première couche de gel est adsorbé par les couches subséquentes. L'effluent à la sortie de la colonne est pratiquement sans protéine. Au fur et à mesure que la solution riche est injectée dans la colonne, le gel se sature et la zone d'adsorption diminue. La zone d'adsorption se déplace, comme une vague, à un taux relativement plus lent que la vitesse d'écoulement de la solution à travers le lit. Lorsque le lit est saturé à plus de la moitié de sa capacité, une quantité mesurable de protéines est retrouvée dans l'effluent. Lorsque la concentration de protéines dans le courant de sortie est appréciable, le lit a atteint son

point de rupture. À partir de ce point, la concentration de sortie augmente rapidement. Lorsque la courbe d'adsorption monte rapidement, cela implique une adsorption rapide. Normalement, le point de rupture dans le temps diminue avec une diminution de la hauteur de lit ainsi qu'avec une augmentation de la taille des particules, de la vitesse d'écoulement de la solution et de la quantité initiale de protéines dans la solution (Treybal 1980).

Le courant d'entrée est injecté avec un débit surfacique G_s (masse/(aire)(temps)) et avec une concentration initiale de protéines C_0 (masse de protéine/masse totale de la solution). La courbe d'adsorption est raide, la concentration de protéines dans le courant de sortie augmente rapidement de zéro à une concentration égale au courant d'entrée. Une valeur arbitraire, C_b (définie sur la figure 4.5), est choisie comme le point de rupture tandis que le point où le lit est considéré saturé est choisi arbitrairement comme le point C_d , soit une valeur qui s'approche grandement de C_0 .

La figure 4.5 présente la courbe idéale d'adsorption. Cette situation représente les conditions idéales d'opération. La solution entre par le bas de la colonne d'adsorption et le produit d'intérêt est adsorbé sur le gel dans la colonne jusqu'à saturation de celle-ci (Treybal 1980).

Le temps nécessaire à la zone d'adsorption pour se déplacer d'une longueur égale à sa propre hauteur dans la colonne est défini par la variable θ_a . θ_b représente le temps nécessaire pour que la zone d'adsorption s'établisse puis sorte du lit.

$$\theta_a = \frac{w_a}{G_s} \quad \theta_b = \frac{w_E}{G_s} \quad (30)$$

La hauteur totale du lit correspond à Z , le temps nécessaire pour la formation de la zone est représenté par θ_f , alors la zone d'adsorption est Za .

$$Za = Z \frac{\theta_a}{\theta_e - \theta_f} \quad (31)$$

La quantité de protéines enlevées de la solution entre le point de rupture et celui de saturation représente la zone ombrée sur la figure 4.6. La zone U est trouvée grâce à l'équation suivante qui représente en fait la quantité massique de protéines divisée par l'aire de la section de la colonne.

$$U_{zone} = \int_{w_B}^{w_E} (Y_o - Y) dw \quad (32)$$

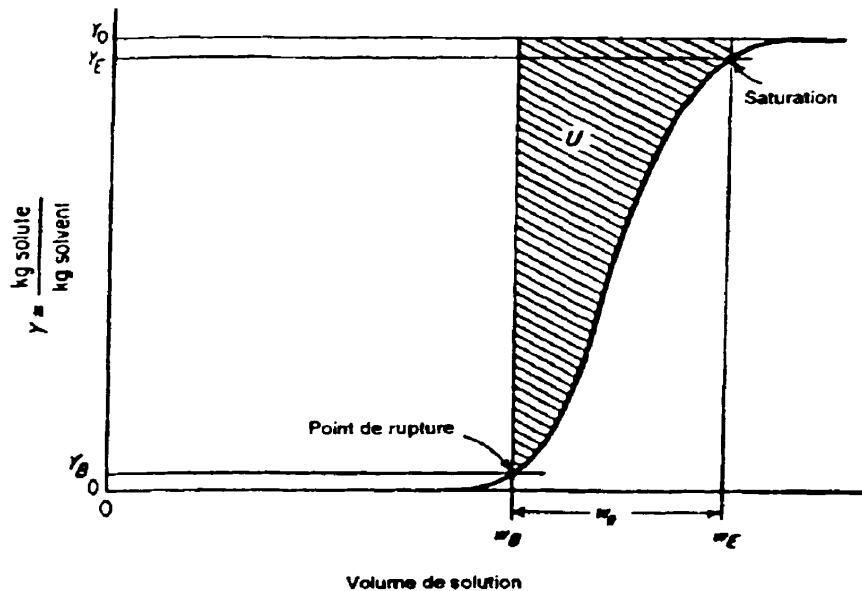


Figure 4-6 Courbe de rupture idéale (Treybal 1980)

Lorsque la zone d'adsorption est saturée, elle contient $C_o V_a$, quantité massique de protéines/aire. En conséquence, au point de rupture, lorsque la zone est toujours dans la colonne, la capacité d'adsorption de cette zone est définie par la variable f .

$$f = \frac{U_{zone}}{Y_o w_a} = \frac{\int_{w_0}^{w_1} (Y_o - Y) dw}{Y_o w_a} \quad (33)$$

Si la zone d'adsorption est complètement saturée, le temps de formation de la zone au haut de la colonne, θ_F , est pratiquement identique au temps θ_A nécessaire à la zone pour se déplacer d'une longueur égale à sa hauteur ; cette situation est observée lorsque $f=0$. Si par contre $f=1$, la zone d'adsorption contient peu ou pas de protéines; alors, le temps de formation de la zone est très court. Ces conditions limites sont représentées par l'équation 34.

$$\theta_F = (1-f)\theta_A \quad (34)$$

Après quelques transformations mathématiques, le degré de saturation de la colonne est obtenu.

$$\text{Degré de saturation} = \frac{w_E - w_A f}{w_E} \quad (35)$$

Une autre variable est utilisée afin de caractériser l'efficacité du lit, la longueur de lit inutilisé ou LUB (Eqn.36). Si le taux de transfert de matière est infiniment rapide, une ligne verticale pourrait être observée sur la figure suivante. Le temps θ_s est obtenu lorsque les deux zones ombragées sont égales (Fig. 4.7). Au point de rupture, la longueur du lit est la somme des LUB et une longueur saturée de protéines en équilibre avec le courant d'entrée.

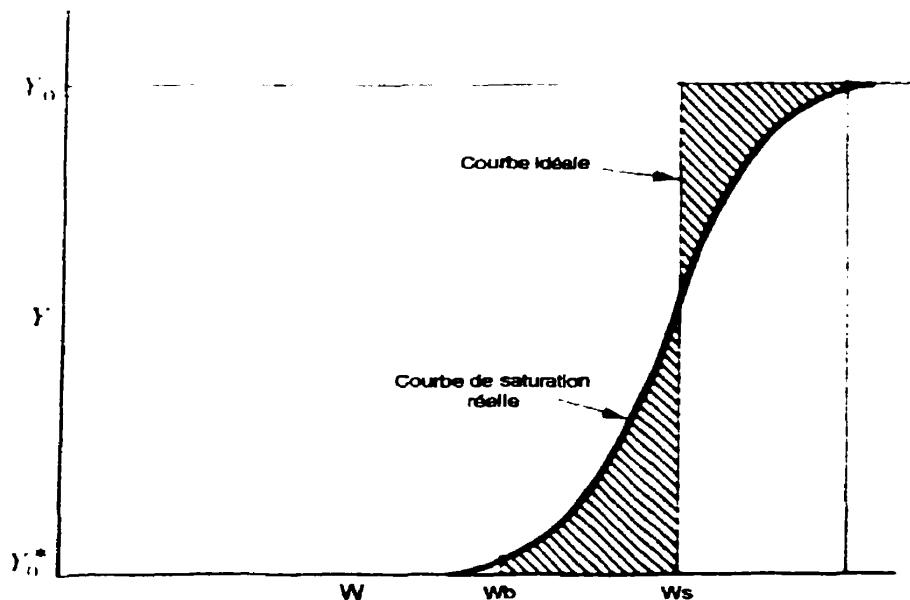


Figure 4-7 Courbe idéale de rupture(Treybal 1980)

$$LUB = Z - Z_s = V(\theta_s - \theta_b) = \frac{Z}{\theta_s}(\theta_s - \theta_b) \quad (36)$$

La capacité maximale du gel est définie par l'équation suivante :

$$Capacité = \frac{Y_o * we}{Vgel} \quad (37)$$

Les variables sont définies par la Fig. 4-6. La zone ombragée, U, correspond à la quantité de soluté retirée de la solution dans la zone d'adsorption à partir du point de rupture jusqu'à l'épuisement du lit.

Une augmentation du rapport H/D (longueur sur diamètre de la colonne) provoque une augmentation de l'efficacité de l'adsorption selon Thömmes et al. (1995). L'augmentation de la vitesse d'écoulement améliore la performance du procédé, à conditions que le temps nécessaire à la diffusion de la protéine dans les pores soit suffisant, c'est-à-dire que l'étape ne doit pas être limitante.

Lorsque la vitesse est augmentée avec une quantité constante d'adsorbant dans le lit fluidisé, le ratio H/d est changé dû à l'augmentation de l'expansion. Augmenter la vitesse résulte en l'augmentation de la porosité du lit (ϵ = volume de liquide libre entre les particules fluidisées ou la porosité). D'un point de vue hydrodynamique, un ratio H/d élevé augmente la performance d'adsorption dans les lits fluidisés.

En présence d'une adsorption à une vitesse de 0.83 mm/s avec une solution très visqueuse, l'expansion du lit peut être de 4 à 6 fois la hauteur originale du lit. L'avantage de fonctionner à cette vitesse est la rapidité de la purification ; par contre, cela amène une réduction de la performance de l'adsorption.

Une adsorption faite de façon à conserver une expansion constante, soit 2 à 3 fois la hauteur du lit sédimenté, en modifiant la vitesse du liquide, présente l'avantage d'augmenter la performance du lit. L'écoulement dans le lit est de type piston, selon les nombres de Bodenstein de l'ordre de 40, retrouvés à l'intérieur du gel et on y retrouve peu de mélange dans la phase liquide du lit favorisant ainsi la performance de l'adsorption. Le temps de résidence dans le lit est augmenté et sa performance également (Chang et Chase 1996).

L'adsorption à expansion constante est meilleure pour des mélanges visqueux selon les expériences réalisées par Chang et Chase (1996) car la capacité dynamique des liaisons est augmentée. Dans la purification en industries, la présence d'un haut taux de solides engendre une viscosité élevée dans les bouillons de culture, le protocole opératoire d'opération à une expansion constante proposé par Chang et Chase est donc de mise.

La quantité de produit par volume d'adsorbant (g/l) est liée à la capacité dynamique de liaison et au pourcentage de récupération des protéines voulues. La capacité dynamique de liaison, qui est la quantité réelle de protéines qui pourra être liée à l'échangeur d'ions sous des conditions expérimentales définies (normalement, un point de rupture de 10%), est une fonction de la vitesse d'écoulement au travers du lit en expansion et du taux d'adsorption de la protéine cible. Elle diminue lorsque la vitesse augmente ainsi qu'en présence d'une augmentation de la viscosité.

Thömmes (1997) a conclu qu'aucun paramètre n'a pu être identifié afin d'implanter un contrôle de l'opération du lit en expansion. Il a toutefois identifié celui qui est le plus déterminant. Il s'agit du transfert de matière du côté des particules. Le transfert de matière côté particules est décrit selon le modèle de diffusion. Le transport des protéines se produit dans le fluide qui entoure la surface de l'adsorbant. Il a déterminé qu'avec le gel Streamline SP, la capacité dynamique d'adsorption est bonne jusqu'à une certaine

vitesse d'écoulement. Par la suite, plus on augmente la vitesse d'écoulement, plus on diminue la capacité dynamique d'adsorption. Du au fait qu'au delà d'un certaine vitesse d'écoulement, la capacité dynamique est réduite lors de l'augmentation du temps de résidence du fluide, celui-ci n'est pas un bon paramètre pour définir l'effet de la diffusion dans les pores pour le lit en expansion.

CHAPITRE 5 ANALYSE DES RÉSULTATS

5.1 Analyse statistique de l'efficacité de séparation : détermination des effets dominants

Afin de déterminer les paramètres affectant l'efficacité du lit en expansion, plusieurs expériences sont réalisées tel que mentionnées dans la section 3. La méthode statistique choisie fait varier les paramètres entre deux valeurs, tel qu'expliqué aux tableaux 3-2 et 3-3. Un plan factoriel complet de quatre facteurs et deux modalités est utilisé dans le but d'évaluer l'effet de variables définies sur la variable mesurée, le LUB. Suite à l'analyse du modèle statistique, il est démontré que la concentration de glycérol, c'est-à-dire la viscosité, est le facteur influençant le plus l'efficacité de séparation de l'adsorption du lit en expansion.

Tableau 5-1 Analyse des résultats obtenus avec la méthode statistique

Variables	Rang
X1 – vitesse d'écoulement - mm/s	2
X2 – concentration de lysozyme- mg/ml	4
X3 – concentration de glycérol - % v/v	1
X4 – hauteur de lit sédimenté (H0) – cm	3

En fait, au fur et à mesure que la concentration de glycérol est augmentée, la longueur de lit inutilisé (LUB) augmente aussi. Le pire cas observé est obtenu avec une concentration de glycérol de 15 % v/v , une vitesse d'écoulement de 0.42 mm/s, une hauteur de lit de 6.8 cm et une concentration de lysozymes de 2 mg/ml. Lorsque ces conditions sont présentes, près de la moitié du lit est inutilisée, 44 %. Les LUB donnent une indication de la résistance au transfert de matière, plus la valeur du LUB est élevée, plus la séparation est difficile, donc, l'efficacité de séparation de la purification est réduite. La

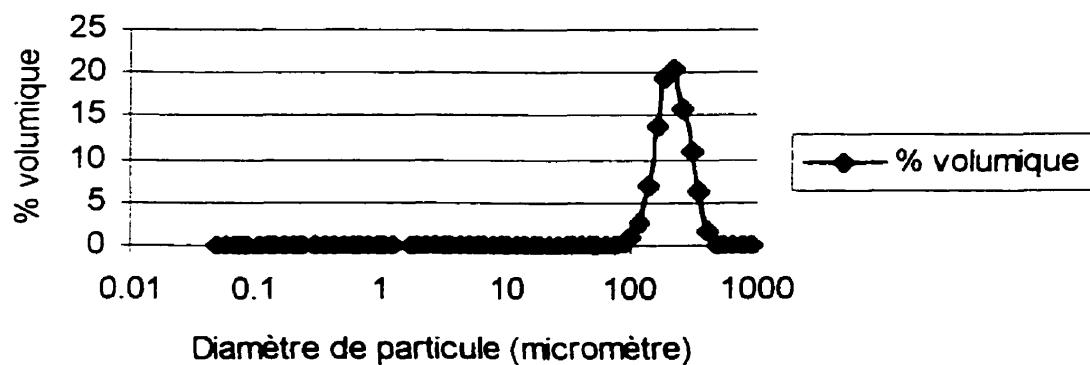
seconde variable en importance qui ressort de l'étude statistique est la vitesse d'écoulement.

Il est important de noter que ces expériences ont été réalisées dans une solution pure, c'est-à-dire sans la présence de cellules et de débris cellulaires. Les effets de la viscosité en présence d'un mélange hétérogène sont différents. Dans la littérature, deux lignes de pensée existent : une stipule que la présence de cellules améliore l'efficacité de la séparation alors que l'autre dit que la présence de cellules nuit à la séparation ((Chase et Draeger 1992) (Lan et al. 1998)). Des expériences supplémentaires doivent être entreprises afin de vérifier les effets de la présence de cellules mais ne sont pas réalisées dans le cadre de cette recherche.

Cette analyse met l'emphasis sur l'ampleur de l'effet de l'hydrodynamique sur le procédé d'adsorption. Chang et Chase (1996) ont également conclu que deux paramètres (vitesse d'écoulement et viscosité de la solution d'entrée) exercent une influence significative sur la capacité dynamique d'un lit en expansion. Par contre, ils ont trouvé que l'ajout du glycérol dans la solution tampon n'altère pas la constante d'équilibre de dissociation ni la capacité maximale d'adsorption donc il s'agit d'un effet purement hydrodynamique (Chang et Chase 1996). À la lumière de ces faits, la suite logique des démarches est d'observer les profils d'écoulement à l'intérieur de la colonne.

Le gel joue un rôle essentiel dans la fluidisation, d'où l'importance de sa classification. Après étude, le gel est classifié selon la charte des poudres de Geldart. La distribution des diamètres de particules est observée sur la figure 5.1.

Distribution de la taille des particules



Distribution de la taille des particules

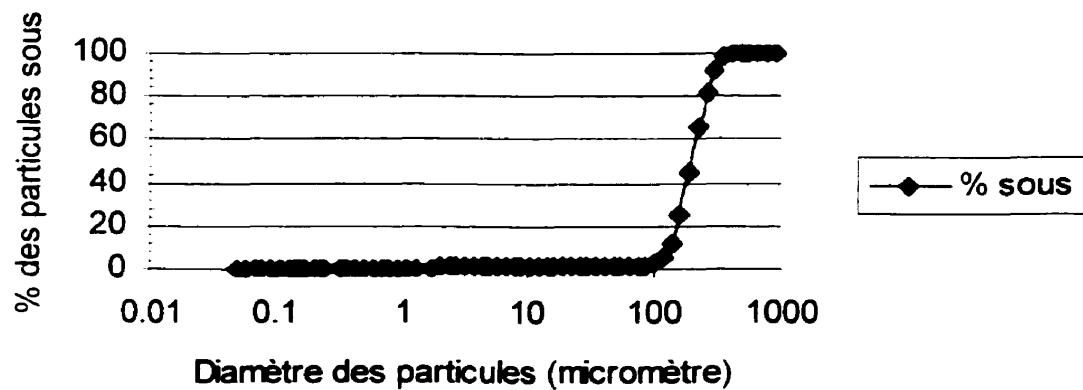


Figure 5-1 Distribution de la taille des particules

Le gel employé lors de l'expérimentation se retrouve dans le groupe A, mais très près de la frontière avec le groupe C. La définition de cette frontière est vague; par conséquence, le gel peut également être considéré comme appartenant au groupe C. Le groupe A présente les conditions idéales pour la fluidisation, soit un comportement homogène. Ces particules engendrent une expansion du lit élevée et un mélange des particules solides. Quant à lui, le groupe C est composé de particules cohésives qui se fluidisent difficilement. Les particules de gel classifiées dans le groupe C ne peuvent atteindre la séparation requise pour être totalement supportées par la force de traînée ainsi que par la poussée du liquide. Par conséquent, une fluidisation réelle n'est pas obtenue (Rhodes 1998).

5.1.1 Paramètres hydrodynamiques

L'écoulement dans la colonne devrait avoir un profil piston afin de favoriser l'obtention d'une expansion stable et d'accroître l'efficacité du procédé d'adsorption en permettant un nombre élevé de plateaux théoriques. La variation de l'expansion du lit soumis à diverses vitesses en régime permanent suit de façon générale la corrélation de Richardson-Zaki (Richardson et Zaki 1997). Rappelons que la corrélation de Richardson – Zaki est définie comme suit :

$$U = U_1 \varepsilon^n \quad (38)$$

Où n est appelé le facteur d'expansion et dépend du nombre de Reynolds. Cette corrélation a comme condition limite, la vitesse terminale U_t lorsque $\varepsilon = 1$. Ainsi à partir des résultats expérimentaux de ε versus U , il est possible de trouver une vitesse terminale empirique.

Richardson et Zaki (1997) ont statué que pour une suspension uniforme de particules, la résistance rencontrée par une particule pour une vitesse donnée est causée par l'augmentation du gradient de vitesse et non par un changement de viscosité. Cela dépend également des particules environnantes, car elles affectent le profil d'écoulement; par le fait même, elles occasionnent des gradients de vitesses importants.

Dû au fait que l'échelle de la colonne est petite, plusieurs facteurs, telle la verticalité, affectent l'écoulement à l'intérieur de la colonne. Les valeurs du facteur d'expansion et des vitesses expérimentales empiriques obtenues pour la colonne de 1 cm sont présentées dans le tableau 5.2.

Tableau 5-2 Facteur d'expansion et vitesse terminale empirique

		Second distributeur présent		Second distributeur absent	
Angle de distribution (Degré)		n	Vitesse terminale (mm/s)	n	Vitesse terminale (mm/s)
H : 10.2 à 14.6 cm % glycérol : 0	45	3.84	2.30	3.62	2.10
	90	3.37	2.00	3.31	2.30
	150	3.52	2.10	6.06	5.30
Hauteur de gel (cm)		n	Vitesse terminale (mm/s)	n	Vitesse terminale (mm/s)
Angle : 45 ° % glycérol : 0	7.7	3.22	2.04	N/D	N/D
	11.9	3.87	2.65	N/D	N/D
	14.6	3.21	2.00	N/D	N/D
Viscosité en % de glycérol		n	Vitesse terminale (mm/s)	n	Vitesse terminale (mm/s)
H : 6.8 cm Angle : 45 °	0	3.26	2.00	N/D	N/D
	10	2.60	1.20	N/D	N/D
	15	2.14	0.90	N/D	N/D

Les expériences pour différentes hauteurs de gel et viscosité sont réalisées avec le distributeur de 45 degrés et le second distributeur présent. Les expériences où la concentration de glycérol est variée sont faites avec une hauteur de gel de 6.8 cm tandis que celles où l'angle de distribution est varié sont obtenues avec une hauteur de gel variant entre 10.2 et 14.6 cm.

L'exposant "n" est une fonction du régime d'écoulement. La valeur du facteur d'expansion (n) utilisé normalement, dans la littérature, pour le régime laminaire ($Re_p < 0.4$) est de 4.8 ((Chase et Draeger 1992),(Thörmes et al. 1995)). Le régime d'écoulement est considéré laminaire lorsque $Re_p < 0.4$ ce qui est le cas pour les

conditions utilisées dans cette études (Chang et Chase 1996). Les indices « n » trouvés lors des expériences sont inférieurs à ce qui est observé dans des colonnes de plus grand diamètre. Chase et Draeger (1992) observe ≈ 4.8 pour une colonne de 5 cm de même que Thömmes et al. (1995). De plus, les vitesses terminales prédictes par l'équation de Richardson – Zaki à $\epsilon = 1$, sont, elles aussi inférieures aux valeurs théoriques obtenues avec l'équation de Stokes (Thömmes 1997) .

Le facteur d'expansion est une fonction du ratio d/D , diamètre des billes sur le diamètre de la colonne, ainsi que de la porosité. En présence d'effets visqueux et de forces d'inertie significatives, le ratio de vitesse est aussi gouverné par le nombre de Reynolds. Lorsqu'il y a fluidisation, un gradient de vitesse est engendré dans le liquide dû aux effets de parois. Le ratio U/U_t est fonction de la porosité et du ratio d/D (Richardson et Zaki 1997).

Chang et Chase (1996) ont déterminé que le facteur d'expansion augmente lorsque la viscosité du liquide fluidisant le gel est élevée. Les mêmes observations ne sont pas faites ici. Lors de l'opération de la colonne à petite échelle, une augmentation de la concentration de glycérol, c'est-à-dire la viscosité, diminue le coefficient.

Le nombre de Bodenstein est défini comme étant le ratio entre le taux de transport par convection sur le taux de transport par diffusion ou dispersion. Ce ratio donne une bonne indication du type d'écoulement à l'intérieur du lit. Un grand nombre de Bodenstein signifie un écoulement de type piston, contrairement à un petit nombre de Bodenstein qui lui, indique un écoulement parfaitement mélangé. Un nombre de Bo aux environs de 500 indique une faible quantité de dispersion, un avoisinant 400 indique une dispersion intermédiaire tandis qu'un nombre de Bodenstein autour de 5 démontre une quantité de dispersion importante (Fogler 1992). Nous avons vu au chapitre 4 que, pour le type

d'expériences de traçage réalisées, le calcul du nombre de Bodenstein est fait à partir de l'équation suivante :

$$\frac{\sigma_t^2}{\bar{t}^2} = \frac{2}{Bo} - \frac{2}{Bo^2} [1 - e^{-Bo}] \quad (39)$$

Où Bo est défini par l'équation 40 (Thömmes et al. 1995) :

$$Bo = \frac{U \cdot L}{D_{ad}} \quad (40)$$

Une particularité intéressante de la petite colonne, Synchro de 1 cm, est l'habileté de varier l'angle du distributeur inférieur : trois angles de distribution : 45, 90 and 150 degrés, peuvent être utilisés. Ils ont également la possibilité d'être joints à une deuxième plaque distributrice, qui est optionnelle. La connaissance des effets de ces paramètres sur l'écoulement est primordiale, pour cette étude, puisqu'ils offrent la possibilité de changer la colonne selon les besoins de l'expérience et les possibilités de la mise à l'échelle.

Tableau 5-3 Effet du distributeur du bas – nombre de Bodenstein

Angle de distribution	Second distributeur présent			Second distributeur absent		
	Bo 0.42 mm/s	Bo 0.56 mm/s	Bo 0.83 mm/s	Bo 0.42 mm/s	Bo 0.56 mm/s	Bo 0.83 mm/s
45	47 ± 1	55 ± 6	71 ± 12	69 ± 11	73 ± 5	67 ± 9
90	51 ± 5	53 ± 7	62 ± 4	45 ± 5	65 ± 13	75 ± 2
150	43 ± 2	56 ± 1	73 ± 3	32 ± 3	37 ± 3	38 ± 4

La présence du deuxième distributeur semble avoir un effet sur l'écoulement liquide dans la colonne. Le distributeur de 45 degrés présente un écoulement uniformément distribué

sans la seconde plaque distributrice. L'ajout du deuxième distributeur semble causer des courants de reflux qui altèrent l'écoulement piston de la solution à travers le lit de gel. Le second distributeur dirige de nouveau le courant, ce qui engendre des fluctuations dans l'uniformité de l'écoulement. L'équilibre qui est atteint à la sortie du premier distributeur est perdu, car la section d'écoulement n'est plus uniforme. Cette uniformité est requise pour obtenir un profil de vitesse plat; les fluctuations affectent ce profil en engendrant des remous et de la dispersion à l'intérieur de la colonne. Pour le distributeur de 90 degrés, l'analyse des résultats permet de conclure que la présence du second distributeur n'affecte pas l'écoulement. Pour ce qui est du distributeur possédant l'angle d'injection de 150 degrés, de meilleurs résultats sont obtenus en présence du second distributeur.

L'impact de la hauteur de gel sur l'efficacité (LUB) est relevé par l'analyse statistique. Son importance est mineure comparativement à la viscosité et à la vitesse d'écoulement. Néanmoins, une étude est réalisée afin d'évaluer les effets de cette variable sur le profil d'écoulement. La quantité de gel présent dans la colonne peut affecter l'écoulement de la solution. En fait, la quantité de gel doit être suffisante afin de pouvoir adsorber la quantité requise de protéines; par contre, une quantité trop élevée de gel diminue l'efficacité de celui-ci. Il est aussi essentiel de tenir compte des limitations de la colonne, la hauteur du lit en expansion ne pouvant être plus élevée que la hauteur de la colonne elle-même.

Tableau 5-4 Effet de la hauteur de lit – nombre de Bodenstein

Hauteur de lit (cm)	Bo	Bo	Bo
	0.42 mm/s	0.56 mm/s	0.83 mm/s
7.7	36 ± 11	34 ± 14	45 ± 5
11.9	45 ± 10	48 ± 7	58 ± 3
14.6	59 ± 7	68 ± 11	81 ± 4

Les nombres de Bodenstein présentés dans le tableau 5.4 révèlent la différence entre les trois hauteurs de gel. Pour une même hauteur de gel, le nombre de Bodenstein varie avec une augmentation de la vitesse de la solution. Par ailleurs, les données, pour un même débit, démontrent des dissemblances. En effet, augmenter la hauteur de lit provoque une augmentation du nombre de Bodenstein, d'où une diminution de la dispersion à l'intérieur de la colonne. Plus le ratio H/d (hauteur du lit sur diamètre de la colonne) est grand, plus les fluctuations pouvant résulter du système de distribution sont négligeables.

Selon l'étude statistique effectuée, la concentration de glycérol, ou la viscosité en fait, est le facteur en importance en ce qui a trait à la productivité du procédé de séparation. Tel que présenté dans le tableau 5.2, la viscosité affecte l'expansion. Les vitesses terminales sont quelque peu différentes des valeurs théoriques respectives de 3.20 mm/s et 1.64 mm/s en absence de glycérol et en présence de 15% de glycérol. La porosité du gel en expansion pour la solution contenant 10 % de glycérol varie entre 0.67 et 0.82, alors que pour la solution de 15 %, la porosité passe de 0.69 à 0.85 pour la gamme de vitesse d'écoulement utilisée.

Chang et Chase (1996) ont démontré qu'un ratio d'expansion de deux (2) résulte en une efficacité de séparation optimale. Ils ont trouvé que la capacité dynamique de liaison est optimum lorsque le ratio est près de 2, ce qui représente une porosité de 0.7. Ceci est contraire à Thömmes et al. (1995), qui affirment que la dispersion est maximale à une porosité de 0.7. Thömmes (1997) présente, dans sa revue sur la dispersion dans la phase

solide, les différences observées entre les conclusions stipulées par différents chercheurs. Al Dibouni et Garside (1979) ont réalisé des études sur le mélange des particules dans des lits fluidisés et ils ont découvert qu'à une porosité de 0.7, on retrouve un maximum de dispersion, par contre, tel que mentionné à la section 2, ces études sont réalisées avec de particules de grosses tailles (dp entre 0.55 et 3.07 mm). Kang et al. (1990) et Yutani et al. (1982) ont trouvé des résultats similaires avec des billes ayant un diamètre variant entre 1 et 6 millimètre. Les particules de gel utilisées ne sont pas comparables avec les particules utilisées dans cette étude (dp entre 100 et 300 μm).

Van de Meer et al (1984) ont proposé une corrélation (Eqn. 12) qui prédit que le coefficient de dispersion augmente avec une augmentation de la vitesse et ce pour des particules ayant un diamètre variant entre 500 et 720 μm . Thömmes a comparé la validité des corrélations proposées par Van de Meer et al (1984) et Kang et al (1990) et celle de Van de Meer et al. (1984) décrit mieux le comportement de la dispersion de la phase solide. Suite à l'analyse de tous ces énoncés, il est possible de conclure que des études plus poussées, entre autre concernant le coefficient de dispersion axiale, sont nécessaires afin de définir le rôle de la dispersion solide dans l'adsorption dans un lit fluidisé.

Avec les concentrations de glycérol utilisées lors de l'expérimentation, la porosité atteinte dans le lit est plus élevée que celle où le glycérol est absent; donc, les conditions optimales ne sont pas respectées. L'efficacité de la séparation diminue puisque le ratio du lit en expansion sur le lit fixe s'éloigne de l'optimum 2 (Chang et Chase 1996).

La présence de mélange causé par les effets de parois est examinée de plus près avec le calcul du nombre Bodenstein.

Les nombres de Bodenstein pour différentes concentrations de glycérol sont répertoriés dans le tableau 5.5. Suite à l'observation des Bo, on remarque que les valeurs restent dans le même intervalle peu importe la concentration de glycérol ajoutée à la solution.

Tableau 5-5 Effet de la viscosité – nombre de Bodenstein

% of Glycérol	Bo	Bo
	0.42 mm/s	0.56 mm/s
0	34 ± 14	45 ± 5
5	N/D	41 ± 2
10	43 ± 3	35 ± 14
15	35 ± 15	48 ± 8

Chang et Chase (1996) ont trouvé que lorsqu'un lit est opéré à un degré constant d'expansion en présence de solutions visqueuses, l'efficacité d'adsorption est améliorée car la capacité dynamique de liaison l'est aussi. Ils clament que les effets de la viscosité sur le lit en expansion sont plus significatifs lorsque le lit est opéré à haute vitesse. La porosité calculée à travers la longueur entière du lit varie entre 0.67 et 0.85. Considérant que la porosité optimale est de 0.7, il est possible de constater que cette porosité n'est pas obtenue lors des expériences précédentes où la concentration de glycérol est variée. En d'autres termes, le lit n'est pas opéré à une expansion qui représente le double du lit fixe. Le point de rupture apparaît plus rapidement dans le temps lorsque la viscosité est augmentée pour une même vitesse. Cette observation peut s'expliquer par une augmentation de la résistance au transfert de matière entre les lysozymes et les sites d'adsorption ou encore par un mélange axial substantiel (Chang et Chase 1996).

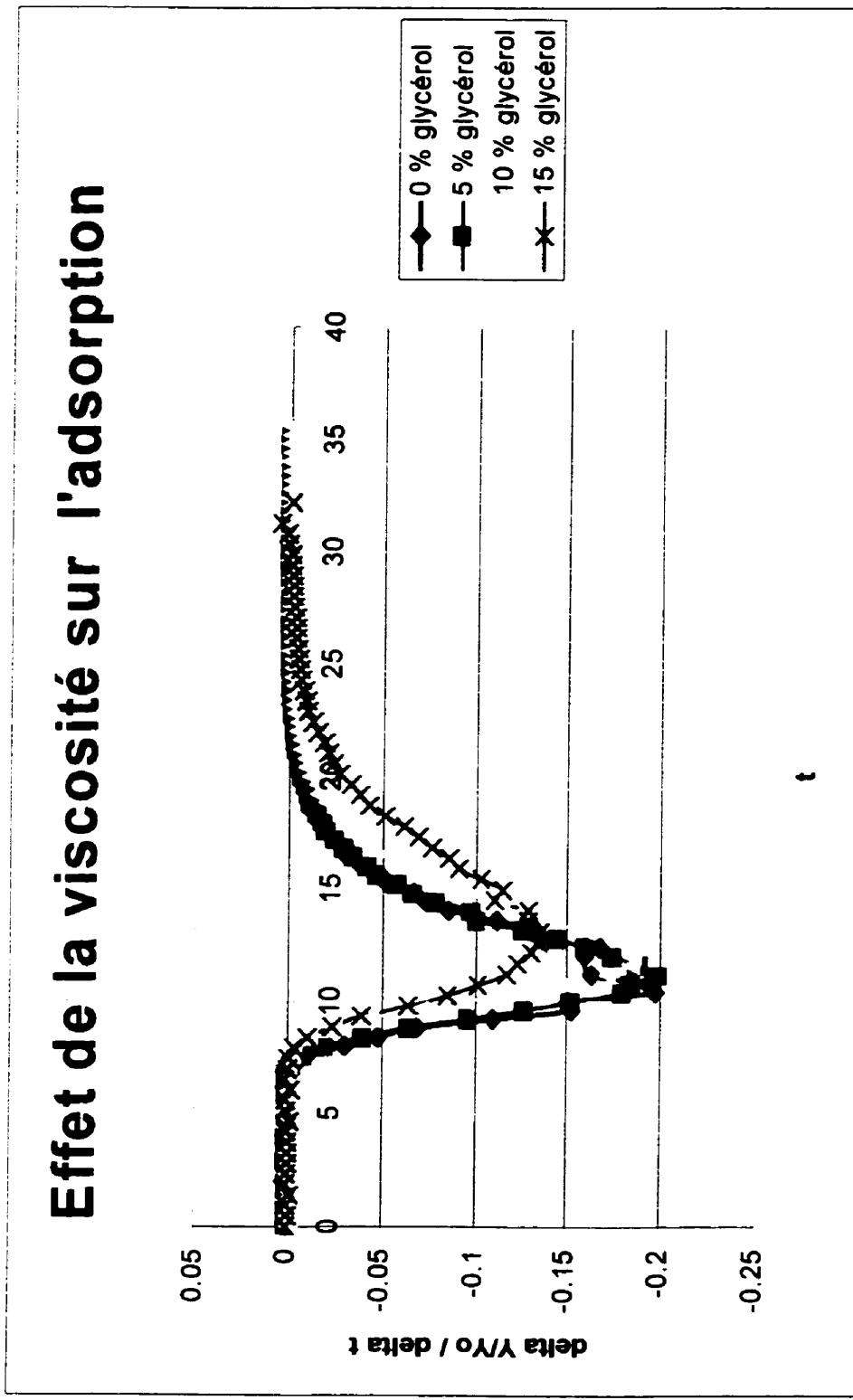


Figure 5-2 Effet de la viscosité sur l'adsorption

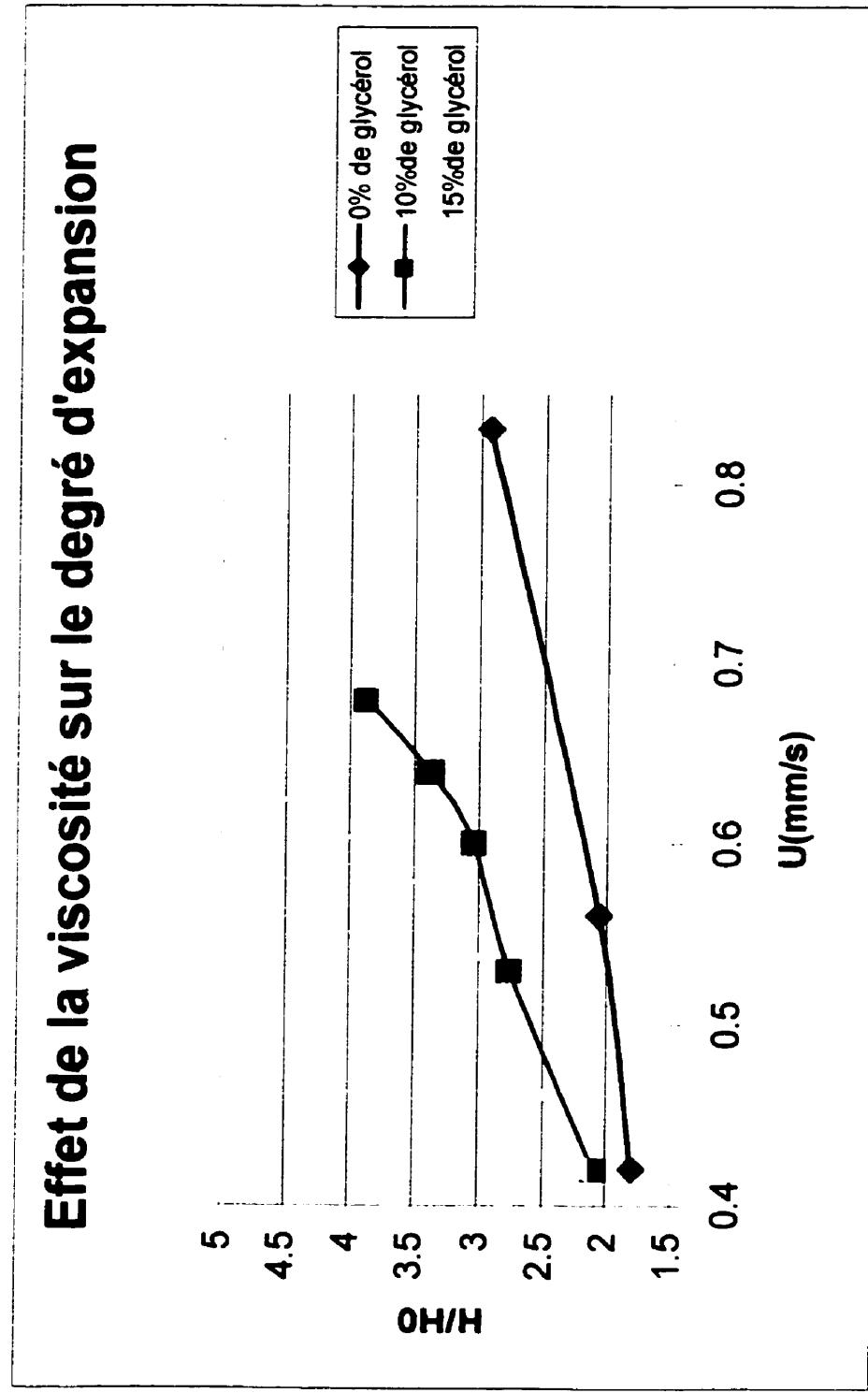


Figure 5-3 Effet de la viscosité sur le degré d'expansion

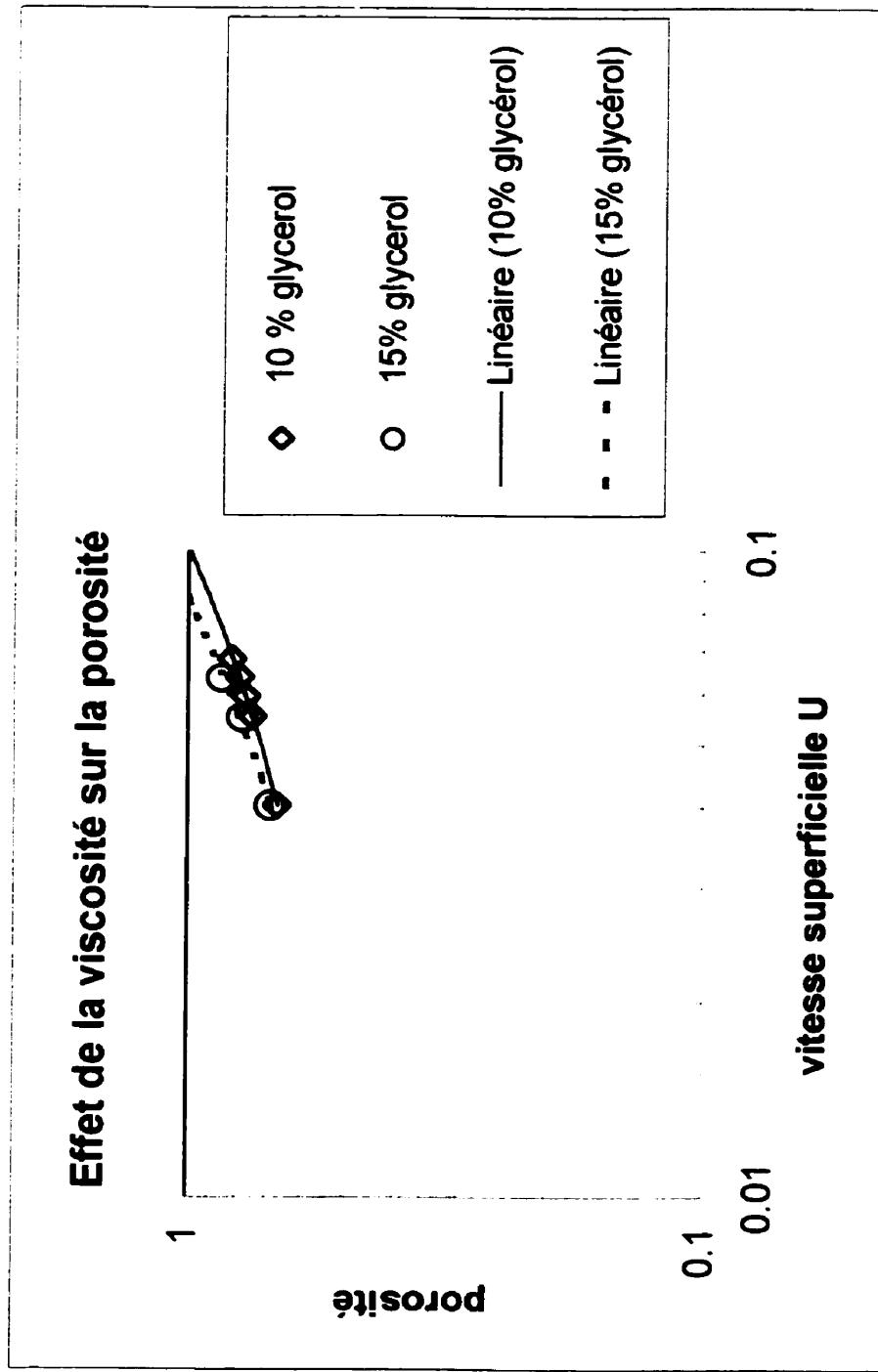


Figure 5-4 Effet de la viscosité sur la porosité

Certaines distinctions peuvent être observées entre les expériences sur la figure 5-2. La courbe la moins évasée est obtenue en l'absence de glycérol tandis que la plus évasée provient des expériences où la solution d'entrée contient 15% de glycérol. Même si les nuances entre les expériences ne sont pas explicites lors de l'observation du nombre de Bodenstein, elles apparaissent dans le graphique. Une diminution de la raideur de la pente résulte d'une élévation de la concentration de glycérol. En augmentant la viscosité, le profil d'écoulement devient de moins en moins plat et le gradient de vitesse près des parois devient important. Ce type de profil d'écoulement résulte en une dispersion axiale importante. Au fur et à mesure que la viscosité s'élève, le front uniforme de concentration de protéines est perdu et le point de rupture dans certaines régions arrive plus rapidement (c'est-à-dire le gel se sature plus rapidement). Par ailleurs, la figure 5-3 montre les effets de la viscosité sur le degré d'expansion. Lorsqu'aucun glycérol n'est ajouté au courant d'entrée, le degré d'expansion réagit de façon quasi-linéaire avec une vitesse croissante. Le ratio demeure en tout temps sous la valeur 3, tandis que le ratio augmente jusqu'à une valeur de 5 pour une solution contenant 15% de glycérol. L'équation (41) décrit la relation entre le degré d'expansion, la porosité et le ratio des vitesses. En augmentant la viscosité, la vitesse terminale U_t diminue, ce qui fait tendre le ratio des vitesses plus rapidement vers la valeur 1 et par le fait même, fait diminuer rapidement le dénominateur de l'équation $(1 - (U/U_t)^{1/n})$, le tout a pour effet d'augmenter le degré d'expansion rapidement. Ce phénomène est observé sur la courbe 5.3, soulignant le fait que la viscosité engendre des fluctuations dans le lit et cause une expansion supérieure au degré idéal de 2, proposé par Chang et Chase (1996). La courbe 5.4 indique la variation de porosité avec l'augmentation de la vitesse d'écoulement. On peut voir que la porosité pour le lit opéré avec une solution de 15% v/v de glycérol augmente plus rapidement que celle de 10% v/v.

$$\frac{H}{H_0} = \frac{1 - \varepsilon_o}{1 - \left(\frac{U}{U_t} \right)^{\frac{1}{n}}} \quad (41)$$

En présence d'une forte viscosité, la porosité du lit devient importante et cela crée un étalement axial du front de protéines qui passe à travers le gel (Chang et Chase 1996). Donc, lors de l'adsorption, la courbe de rupture est plus évasée, ce qui se traduit par une efficacité de séparation moindre.

5.2 Relations entre les paramètres hydrodynamiques et l'efficacité de séparation

Afin d'être en mesure d'approfondir la compréhension des relations entre les paramètres hydrodynamiques et l'efficacité de séparation, le nombre de Bodenstein aussi bien que le facteur d'expansion doivent être évalués et comparés au LUB et à la capacité dynamique du gel.

En se rapportant à la figure 5.5, si le taux de transfert de matière est extrêmement rapide, la courbe de saturation obtenue serait une ligne verticale au volume w_s . Cette ligne représente le point dans le temps où les zones ombragées de chaque côté de la ligne sont équivalentes. Le LUB est égal à la longueur du lit moins la longueur du lit saturé en protéines (ou ayant atteint sa capacité dynamique) qui est en équilibre avec le courant d'entrée. Le LUB, tel que mentionné dans la section 4, est calculé à partir de l'équation suivante (Treybal 1980) :

$$LUB = \frac{Z}{w_s} (w_s - w_b) \quad (42)$$

La longueur de lit inutilisé donne une bonne indication de l'efficacité du transfert de matière. Un autre facteur à considérer est la capacité du gel. Les deux facteurs devraient être en concordance; une augmentation du LUB devrait être en accord avec une diminution de la capacité dynamique.

La capacité est définie comme suit :

$$\text{Capacité} = \frac{Y_o * w_e}{V_{gel}} \quad (43)$$

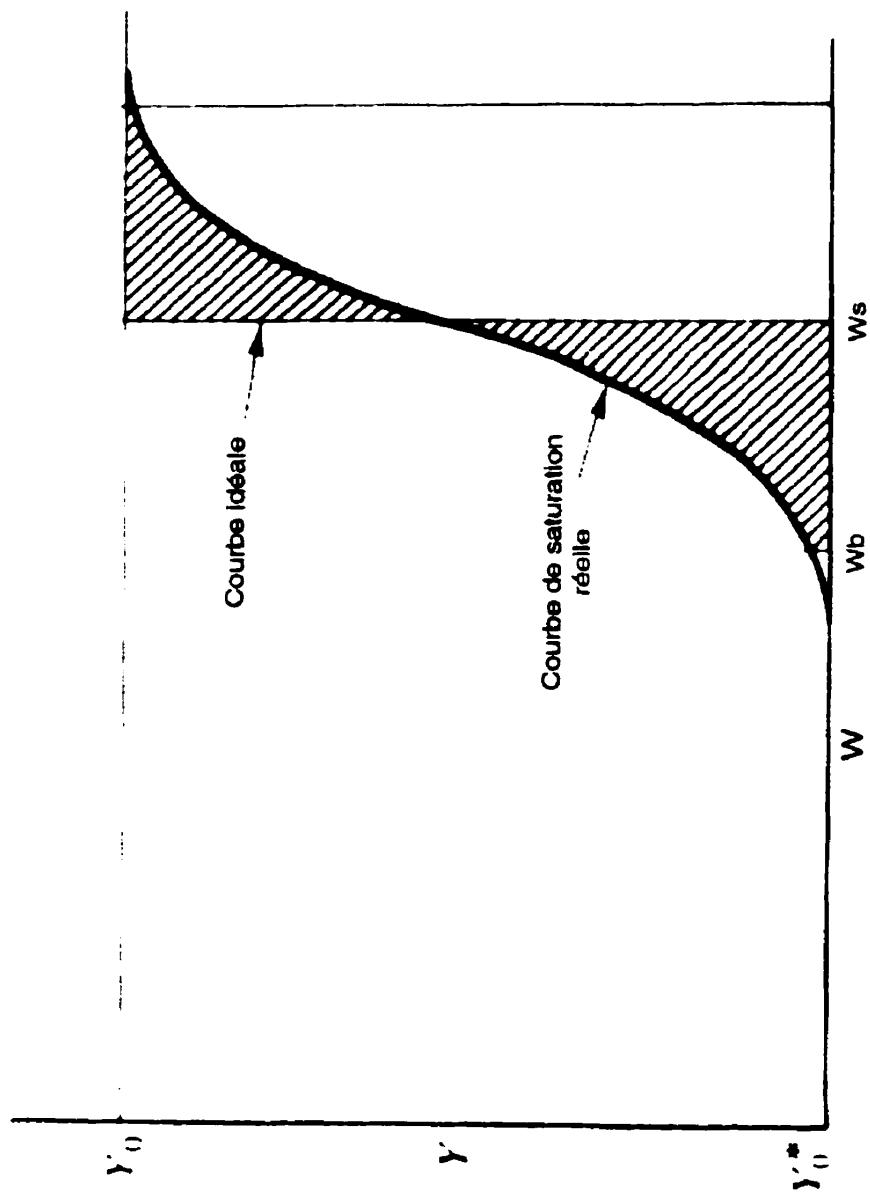


Figure 5-5 Courbe de saturation idéale et réelle

La figure 4-6 définit les variables employées dans l'équation 43. La zone ombragée, sur la figure, correspond à la quantité de protéines retirée de la solution dans la zone d'adsorption du point de rupture jusqu'à l'épuisement du lit.

Les longueurs de lit inutilisé ainsi que les capacités dynamiques trouvées pour la colonne de 1cm sont présentées au tableau 5.6.

Tableau 5-6 LUB et capacité

Essai	X1	X2	X3	X4	LUB	Capacité
	mm/s	mg/ml	% v/v	Cm	cm	mg/ml
Fixe	0.42	2	0	6.8	1.69	66
Fixe	0.56	2	0	6.8	1.96	68
1	0.42	2	0	6.8	1.42	97
2	0.56	2	0	6.8	2.31	79
3	0.42	6	0	6.8	2.27	64
4	0.56	6	0	6.8	1.88	49
5	0.42	2	15	6.8	2.71	134
6	0.56	2	15	6.8	3.02	55
7	0.42	6	15	6.8	2.63	72
8	0.56	6	15	6.8	1.91	37
9	0.42	2	0	11.7	1.03	84
10	0.56	2	0	11.7	1.65	85
11	0.42	6	0	11.7	1.39	96
12	0.56	6	0	11.7	2.17	46
13	0.42	2	15	11.7	1.48	100
14	0.56	2	15	11.7	2.66	83
15	0.42	6	15	11.7	2.14	96
16	0.56	6	15	11.7	3.12	89

La capacité maximale du gel selon le manufacturier Pharmacia est d'environ 75 mg de lysozymes par ml de gel. Il existe une différence majeure entre les expériences de Pharmacia et celles réalisées dans le cadre de cette recherche : le diamètre de la colonne utilisée. Pharmacia a réalisé ces expériences avec une colonne de 5 cm de diamètre, une vitesse d'écoulement de 0.83 mm/s avec une solution de 2 mg/ml. Les résultats présentés

dans ce travail ont été obtenus avec la colonne de Synchro, diamètre de 1 cm. Malheureusement, l'analyse des résultats de la capacité dynamique ne permet pas de dégager de tendance. Des essais supplémentaires, en mettant plus d'emphase sur la mesure de la capacité dynamique d'adsorption du gel, sont nécessaires avant de tirer des conclusions.

À titre de comparaison, Chang et Chase (1996) ont réalisé des expériences sur une colonne de 5 cm avec différentes concentrations de glycérol (de 0 à 32%) et ils obtiennent des capacités dynamiques variant entre 23.6 mg/ml et 59.0 g/ml pour un lit de 10 cm de haut.

Le but de cette étude statistique est de déterminer l'influence de quatre facteurs sur l'efficacité de séparation d'une colonne d'adsorption à lit fluidisé. Tel que mentionné au début de cette section, la viscosité est le facteur important, soulignant ainsi l'importance de l'hydrodynamique. Pour ce qui est de la capacité, il est déterminé d'après une analyse statistique, que la vitesse d'écoulement et la concentration de lysozymes affectent grandement sa valeur. Cette conclusion est incertaine à ce stade-ci à cause du nombre limité d'expériences. Un fait ressort de l'analyse, lorsque la vitesse d'écoulement est augmentée, la capacité dynamique de liaison est réduite. Thömmes et al. (1995) ont également observé une diminution de la capacité lorsque la vitesse d'écoulement est élevée au dessus de 0.5 à 0.67 mm/s.

Le tableau 5.7 est divisé en deux sections : la première partie représente les expériences réalisées avec 6.8 cm de gel alors que la deuxième partie représente celles faites avec 11.7 cm de gel.

Tableau 5-7 LUB et capacité

Hauteur de lit	LUB (cm)	Capacité (mg/ml)
6.8 cm	1.42	97
	1.88	49
	1.91	37
	2.27	64
	2.31	79
	2.63	72
	2.71	134
11.9 cm	3.02	55
	1.03	84
	1.39	96
	1.48	100
	1.65	85
	2.14	96
	2.17	46
	2.66	83
	3.12	89

La capacité présentée dans le tableau est obtenue pour une rupture de 10%. Les calculs ont été refaits pour une rupture de 20, 30 et 50 % (valeurs introduites en Annexe tableau 8.16) et le même type de résultats est obtenu. Encore une fois à cause de l'incertitude sur le calcul de la capacité dynamique aucune corrélation ne peut être trouvée entre le LUB et la capacité dynamique.

5.3 Effet de la mise à l'échelle

Une série d'expérience est faites sur la colonne de 5 cm afin de comprendre les phénomènes associés au scale-up. Contrairement à la colonne de 1 cm, celle de 5 cm est beaucoup moins affectée par les effets de parois, comme Thömmes et al. (1995) avaient déjà suggéré que lorsque le ratio hauteur de colonne sur son diamètre est supérieur à 100, les effets de parois sont négligeables. La colonne de 5 cm est plus proche de ce ratio que la colonne de 1 cm. En opérant une colonne à grande échelle, la verticalité de celle-ci devient un facteur de moindre importance. En fait, Bruce et Chase (1998) ont déterminé

qu'une déviation de seulement 0.15 degré diminue le nombre de Bodenstein pour la colonne de 1 cm à 36 % de sa valeur optimale, alors que ce même nombre ne diminue qu'à 60 % de sa valeur optimale pour la colonne de 5 cm. Cette valeur est tout de même importante mais moins critique que celle obtenue par Bruce et Chase (1998). En laboratoire, lors de la reproduction de ces expériences, des résultats moins dramatiques ont été obtenus avec la colonne SynChro de 1 cm; pour une déviation de 0.5 degré, le nombre de Bodenstein a diminué à 50 % de sa valeur optimale. La différence entre les résultats peut venir de l'utilisation de différentes colonnes. Ils ont utilisé une colonne Soham Scientific avec un distributeur de verre concassé. La colonne utilisée lors de la présente étude possède un système de distribution très différent : il est fait d'acier inoxydable et possède des plaques perforées de PTFE. La colonne conçue par SynChro possède donc l'avantage d'être moins perturbée par les déviations.

Tableau 5-8 Colonne de 5 cm – facteur d'expansion et vitesse terminale

Diamètre de colonne	Facteur d'expansion	Vitesse terminale (mm/s)
1 cm – 45 degré	3.84	2.30
1 cm – 90 degré	3.37	2.00
1 cm – 150 degré	3.52	2.10
5 cm	3.96	2.50

Tel que présentés au tableau 5.8, les facteurs d'expansion mesurés pour la colonne de 5 cm démontrent que le régime laminaire est atteint à l'intérieur du gel. Il semble donc que les effets de parois deviennent négligeables et les turbulences à l'intérieur de la colonne diminuent. La vitesse théorique de Stokes obtenue est de 3.92 mm/s, ce qui est comparable à la valeur expérimentale trouvée.

Une comparaison de résultats de la petite et grande échelle démontre des comportement pratiquement identiques. En fait, la pente des droites tracées sur la figure 6.5 sont semblables. Par conséquent, il est possible de conclure que des études de traçage sont

nécessaires afin d'évaluer correctement les différences entre les deux échelles puisqu'une observation des facteurs d'expansion n'est pas suffisante.

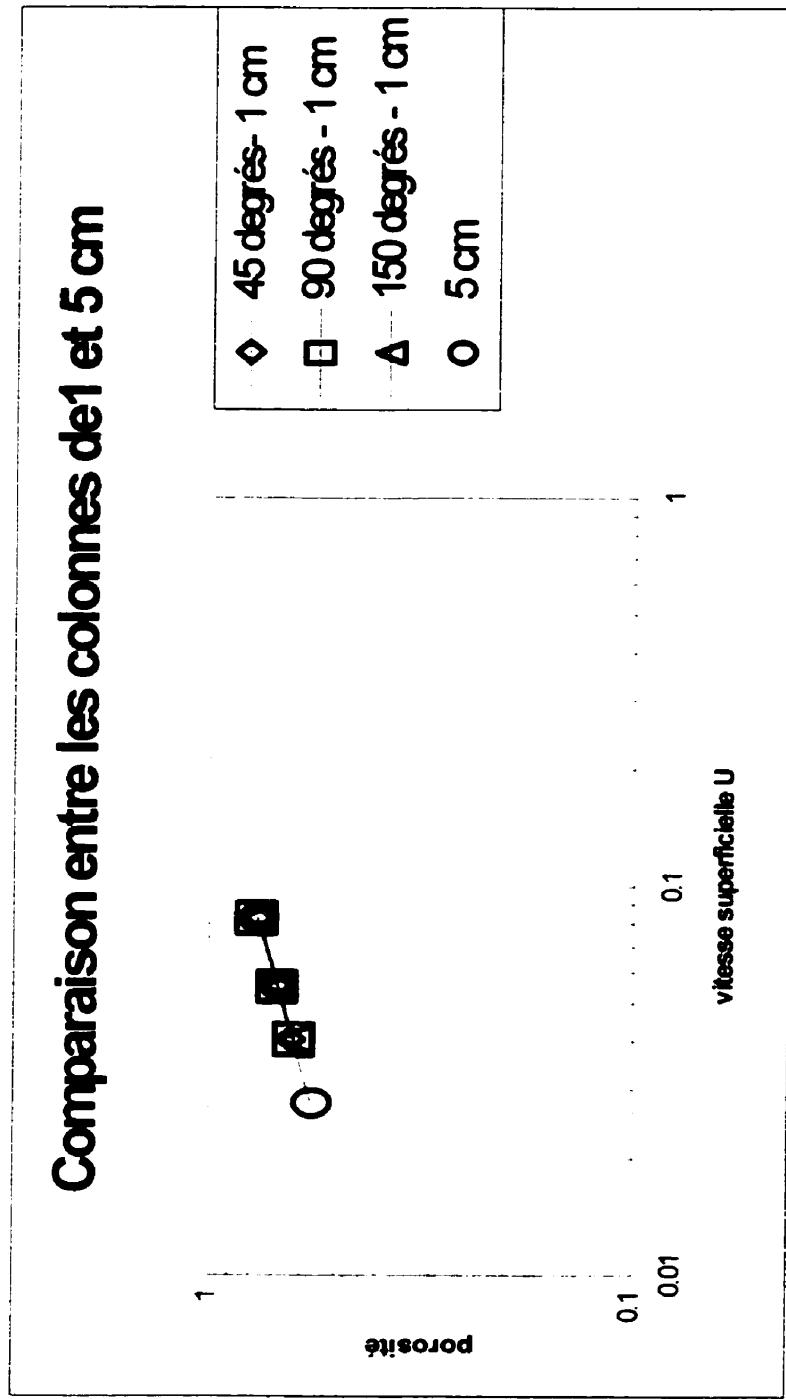


Figure 5-6 Comparaison entre la petite et grande échelle – facteur d’expansion

Afin de qualifier le profil d'écoulement à l'intérieur de la colonne, le nombre de Bodenstein est calculé à partir d'essais de traçage avec acétone, utilisant la méthode décrite à la section 3.2.2. Les valeurs sont présentées dans le tableau 5.9.

Tableau 5-9 Colonne de 5 cm – nombre de Bodenstein

Diamètre de la colonne	Bo 0.42 mm/s	Bo 0.56 mm/s	Bo 0.83 mm/s
1 cm – 45 degrés	47 ± 1	55 ± 6	71 ± 12
1 cm – 90 degrés	51 ± 5	53 ± 7	62 ± 4
1 cm – 150 degrés	43 ± 2	56 ± 1	73 ± 3
5 cm	83 ± 19	227 ± 31	158 ± 30

Il est important de noter que les expériences ont été faites dans une seule manipulation en réalisant trois injections consécutives dans le cas de la colonne de 5 cm et cinq injections pour la colonne de 1 cm.

Les nombres de Bodenstein pour la colonne de 5 cm sont supérieurs à ceux trouvés pour la colonne de 1 cm. Ce résultat n'est point surprenant puisque la colonne de 5 cm est moins sujette aux effet de parois. Ce qui résulte en un profil d'écoulement plus plat et que, par le fait même, l'efficacité de séparation est améliorée à cause d'une diminution de la dispersion axiale. Les nombres de Bodenstein déterminés se retrouvent dans l'intervalle de dispersion intermédiaire à élevée selon la classification proposée par Fogler. Ils sont tout de même plus près de la classe intermédiaire. Afin de pouvoir classifier l'écoulement dans la zone où il y a peu ou pas de dispersion, le nombre de Bodenstein doit avoir une valeur supérieure à 500. Dans le meilleur des cas, le nombre de Bodenstein obtenu est égale à la moitié de cette valeur. Thömmes et al. (1995) ont trouvé qu'en augmentant le ratio H/d , le nombre de Bodenstein augmente donc, le mélange axial diminue.

Ce phénomène s'explique avec la logique suivante; le lit en expansion agit comme une série de plateaux théoriques de séparation. Plus le nombre d'étape d'adsorption augmente plus le profil d'écoulement approche celui d'un écoulement piston idéal. En plus, les turbulences engendrées par le distributeur d'entrée sont réduites à plus grande échelle. Les mêmes observations sont faites ici. Par contre, Thömmes et al. (1995) ont également trouvé que le nombre Bo augmente avec une augmentation de la vitesse. Cette caractéristiques est observée dans toutes les expériences de 1 cm, mais non dans celles de 5 cm. Thömmes et al. (1995) ont réalisé leurs expériences avec une colonne de 5 cm similaire à celle utilisée pour l'obtention des résultats de la présente étude, mais non le même gel. Ils ont utilisé le gel Bioran SP de Schott Glaswerke, qui est un gel anionique. Ce gel possède une densité uniforme de 2200 kg/m^3 et une distribution de diamètres de particules qui varie entre 100 et 250 μm . Cette variable peut jouer un rôle dans l'écart entre ces résultats et ceux présentés ici. Par contre, la différence la plus importante entre les deux séries d'expériences est la vitesse d'écoulement de la solution dans la colonne. Ils ont réalisé leurs expériences en variant la vitesse de 0.52 mm/s à 1.35 mm/s, alors que les expériences réalisées dans le cadre de cette recherche sont obtenues en variant la vitesse d'écoulement entre 0.42 et 0.83 mm/s (Thömmes et al. 1995). Une augmentation de la vitesse se traduit par une augmentation de la porosité. La porosité à l'intérieur du gel pour la petite et la grosse colonne était pratiquement identique dans cette étude. La principale différence entre les deux échelles provient de l'effet de parois; ils sont significatifs dans la petite colonne et moins importants dans la grosse colonne.

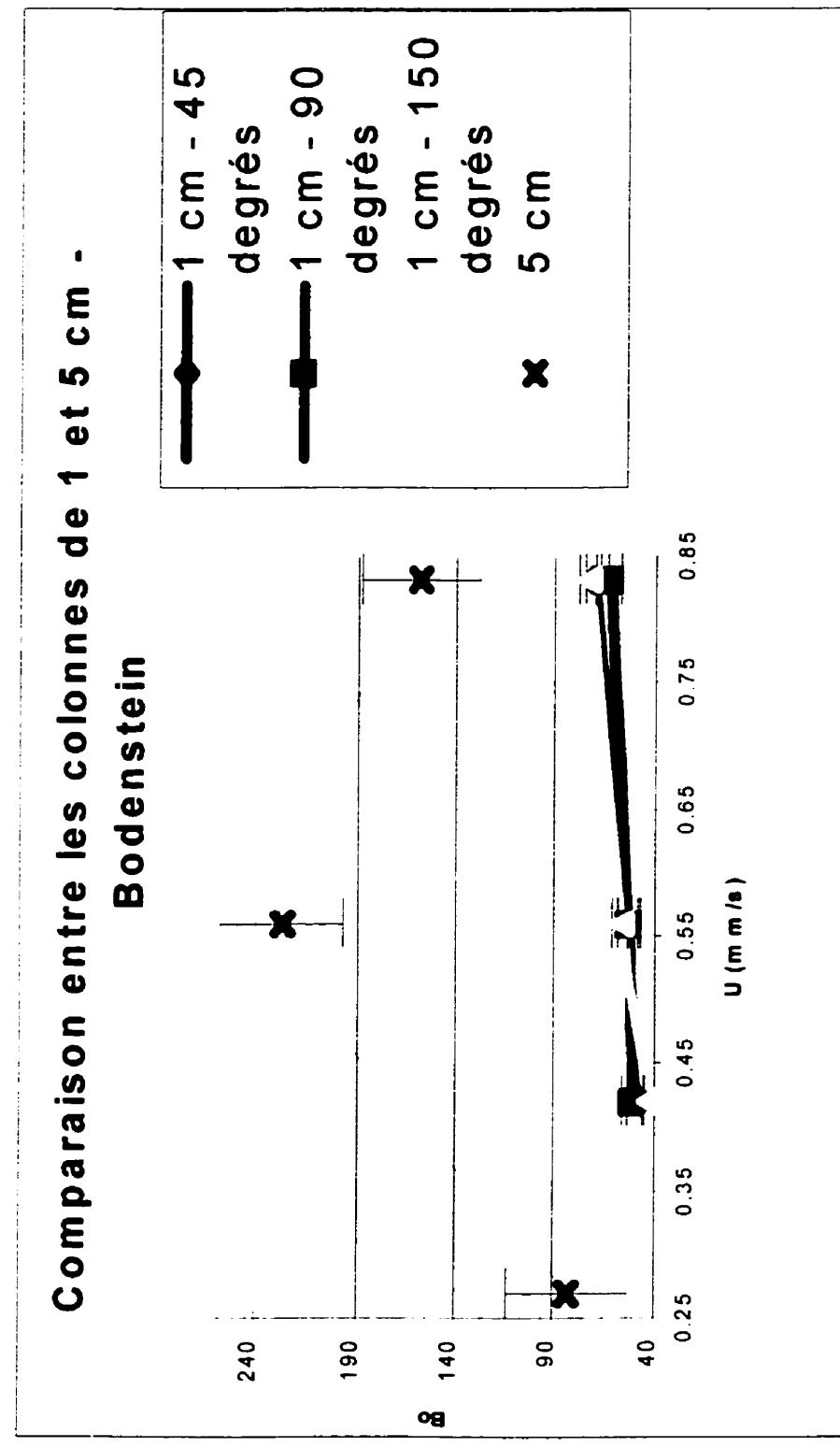


Figure 5-7 Comparaison entre les colonnes de 1 et 5 cm - nombre de Bodenstein

La figure 5.7 met en évidence la variation du nombre de Bodenstein avec la vitesse, pour la colonne de 5 cm. La colonne de 5 cm présente sans aucun doute les plus hauts nombres de Bodenstein. Des relations linéaires sont obtenues pour la colonne de 1 cm tandis que la colonne de 5 cm présente un optimum à 0.56 mm/s. Cette caractéristique est particulière puisqu'elle n'est pas observée dans la littérature. Plus de recherches doivent être entreprises concernant de cette caractéristique; entre autres, des points intermédiaires doivent être trouvés afin de s'assurer que l'optimum à 0.56 mm/s est bien valide. De plus, il serait intéressant d'augmenter les vitesses d'écoulement de façon à corroborer les résultats de Thömmes et al. (1995). Bien qu'intéressantes et importantes, ces expériences supplémentaires n'ont pu être réalisées dans le cadre de cette maîtrise dû à la non-disponibilité de l'équipement utilisé pour ces expériences. Par contre, il est bon de souligner cette avenue possible de recherche pour le futur.

La figure 5.8 révèle l'écart entre les degrés d'expansion pour les deux types de colonne pour différentes vitesses d'entrée de la solution. La colonne de 5 cm possède la plus petite pente, ce qui signifie qu'elle est la moins affectée par une variation de vitesse en ce qui a trait à l'expansion puisque le ratio demeure plus facilement près de la valeur 2.

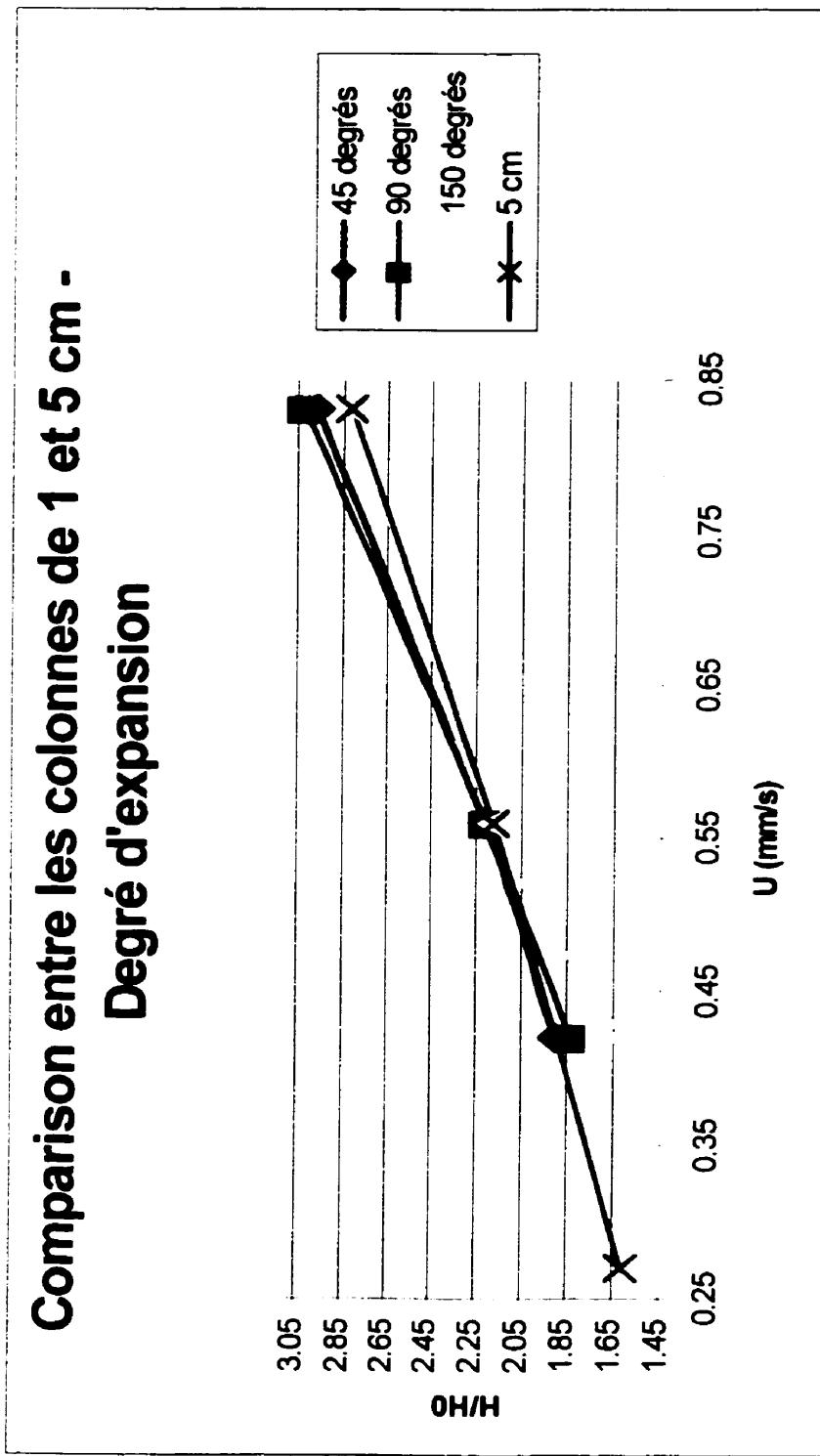


Figure 5-8 Comparaison entre les colonnes de 1 et 5 cm - Degré d'expansion

Des limitations sont encourues lors de l'opération de la colonne de 1 cm. Il est impossible d'opérer la colonne à petite échelle à des vitesses plus élevées que 0.56 mm/s en présence d'une solution contenant 15 % v/v de glycérol. Lors des essais l'incapacité d'obtenir un lit stable a été confirmée par le test de traçage avec acétone (DTS). Avec une colonne de 5 cm, Chang et Chase (1996) ont réussi avec succès le test de traçage à une vitesse de 0.83 mm/s et avec une concentration de glycérol aussi élevée que 32 % v/v (H/H_0 près de 6). En outre, lors de l'opération de la colonne à petite échelle, il est primordial de considérer les limitations de l'expansion aussi bien que celles engendrées par la viscosité de la solution puisque ces deux facteurs affectent grandement le profil d'écoulement.

L'importance de l'hydrodynamique sur le procédé d'adsorption a été démontrée dans cette section. La concentration de glycérol et la vitesse d'écoulement affectent le plus l'efficacité de séparation. Deux effets peuvent être associés à une augmentation de la viscosité. D'abord l'épaisseur de la couche limite côté liquide augmente avec une diminution du nombre de Reynolds (avec μ croissant), ce qui augmente la résistance au transfert de matière. De plus, les gradients de vitesse augmentent, ce qui diminue l'uniformité du profil de vitesse et cause une augmentation de la dispersion axiale. Ces deux effets sont donc associés à une diminution de l'efficacité de séparation.

La hauteur de gel joue un rôle qui n'est pas à négliger si l'on veut opérer un système de séparation avec succès. Ces facteurs sont surtout importants lors de l'opération à petite échelle. La viscosité affecte la séparation en variant le nombre de Bodenstein et en diminuant le facteur d'expansion ($n = 3.26$ lorsqu'aucun glycérol n'est présent et il est égal à 2.14 lorsqu'une concentration de 15 % v/v de glycérol est présente). À petite échelle, les gradients de vitesse autour des particules sont élevés et les effets de parois deviennent considérables, ce qui cause de la dispersion. Afin de travailler dans des conditions similaires à celle de la grande échelle, il devient donc essentiel de réduire les

vitesses d'opération à petite échelle. Dans le but d'acquérir une compréhension accrue des phénomènes gouvernant l'opération du lit en expansion, un modèle doit être développé. Ce modèle devrait lier le transfert de matière et l'hydrodynamique liquide-solide de façon à prédire les performances de ce type de colonne de séparation en fonction des conditions d'opérations. Un tel modèle sera développé dans le cadre de futur travaux.

CHAPITRE 6 CONCLUSION

Cette étude n'est qu'un premier pas dans la compréhension des phénomènes mis en jeu lors du scale-up d'une colonne d'adsorption avec un lit en expansion. L'effet de plusieurs facteurs sur l'opération d'un tel système a été évalué. Les paramètres hydrodynamiques tels la viscosité et la vitesse d'écoulement, ont une importance cruciale lors de l'opération du lit puisqu'ils sont ceux affectant le plus l'écoulement.

Pour la colonne de 1 cm de diamètre, on trouve des nombres de Bodenstein qui varient entre 43 et 73 alors que pour la colonne de 5 cm, les nombres de Bodenstein se retrouvent dans l'intervalle de 83 à 227, où 227 est la valeur maximale obtenue pour une vitesse d'écoulement de 0.56 mm/s. Il est également important de rappeler qu'un simple calcul des facteurs d'expansion n'est pas suffisant afin de caractériser l'écoulement puisque tous les facteurs calculés se retrouvent dans le même intervalle, soit de 3.21 à 3.96 pour les colonnes de 1 et 5 cm et il descend à 2.14 lorsqu'une concentration de 15 % de glycérol est présente.

Les LUB calculés dans cette étude ont permis de conclure l'effet de la viscosité sur l'opération du système de séparation. Une étude sur la capacité dynamique a également été réalisée, mais malheureusement, aucune tendance n'a pu être déterminée.

À petite échelle, il est observé que le facteur d'expansion diminue avec une augmentation de la viscosité. De plus, la quantité de gel dans la colonne ne semble pas affecter l'écoulement par contre, il est important de considérer les limitations physiques de la colonne, c'est-à-dire la hauteur, ainsi que la quantité de protéines à adsorber lors du calcul de la quantité de gel à utiliser pour l'opération de séparation.

Les résultats présentés dans ce travail sont en accord avec ceux de Chang et Chase (1996) si on tient compte qu'une porosité de 0.7 présente les conditions optimales de séparation. Thömmes et al. (1995) affirment le contraire, c'est-à-dire que l'on retrouve une dispersion maximale à ce point. Des travaux futurs devront être entrepris afin de clarifier cette divergence.

Les résultats des expériences de traçage d'acétone réalisées avec la colonne de 5 cm démontrent un comportement intéressant, en fait on retrouve un optimum pour le nombre de Bo à 0.56 mm/s. Cette caractéristique est particulière puisqu'elle n'est pas observée dans la littérature. Une avenue possible de recherche pour le futur est de reprendre les expériences en ajoutant des points intermédiaires afin de s'assurer que l'optimum à 0.56 mm/s est bien valide. De plus, il serait intéressant d'augmenter les vitesses d'écoulement de façon à corroborer les résultats de Thömmes et al. (1995).

Ce mémoire est une première approche à la compréhension des phénomènes gouvernant le scale-up d'un lit en expansion. L'adsorption dans un lit en expansion est une voie de recherche intéressante et en mouvement. Le développement d'un modèle mathématique qui prend en considération plusieurs facteurs est une voie de recherche très prometteuse puisqu'elle permettra de contrôler l'opération et de prédire l'effet de paramètres à petite et grosse échelle. De cette façon, la recherche et le développement pourront se faire à petite échelle.

RÉFÉRENCES

- AL-DIBOUDINI, M. R. et GARSIDE, J. (1979). "Particle mixing and classification in liquid fluidised beds." Trans IChemE **57**: 94-103.
- AMESKAMP, N., LÜTKEMEYER, D., TEBBE, H., WITTLER, J., et LEHMANN, J. (1997). "Purification of murine IgG1 from spent culture medium by expanded bed adsorption chromatography." Science Tools from Pharmacia Biotech. **2**(1).
- ANSPACH, B. (1999). Expanded bed presentation. Montréal, Canada.
- BERTRAND, O., COCHET, S. et CARTRON, J.-P. (1998). "Expanded bed chromatography for one-step purification of mannose binding lectin from tulip bulbs using mannose immobilized on DEAE Streamline." Journal of chromatography **822**: 19-28.
- BRUCE, L. J. et CHASE, H.A. (1998). The effect of column alignment on separation efficiency in scale down expanded bed adsorption. The second international conference on expanded bed adsorption, Napa Valley.
- BRUCE, L. J., CLEMMITT, R.H., NASH, D.C, et CHASE, H.A. (1998). On-line monitoring within an expanded bed adsorption column. The second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.
- CHANG, Y. K., MCCREATH, G.E. et CHASE, H.A. (1995). "Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates." Biotechnology and bioengineering **48**: 355-366.
- CHANG, Y. K., et CHASE, H.A (1996). "Development of operating conditions for proteins purification using expanded bed techniques : the effect of the degree of bed expansion on adsorption performance." Biotechnology and bioengineering **49**: 512-526.
- CHANG, Y. K. et CHASE, H.A., Ed. (1994). Expanded bed adsorption for the direct extraction of proteins. Separation for biotechnology 3. London, Elsevier applied science.
- CHASE, H. A. et DRAEGER, N. (1992). "Affinity purification of proteins using expanded beds." Jurnal of chromatography **597**: 129-145.
- CHASE, H. A. (1994). "Purification of proteins by adsorption chromatography in expanded beds." TIBTECH - reviews: 296-302.

CHASE, H.A. et DRAEGER, N.M. (1990). Modelling of protein adsorption in liquid fluidized beds. Separations to Biotechnology 2. D. L. Pyle. London, Elsevier applied Science: 325-334.

Chromatography, U. f. (1997). Expanded bed columns Pilot equipment. Upfront.

CLÉMENT, B. (1998). Planification et analyse statistique d'expériences industrielles. École Polytechnique de Montréal.

DE LUCA, L., HELLENBROICH, D., TICHENER-HOOKER, N.J., et CHASE, H.A. (1994). A study of the expansion characteristics and transient behaviour of expanded beds of adsorbent particles suitable for bioseparations. Bioseparation. Netherlands, Kluwer Academic Publishers. **4**: 311-318.

FINETTE, G. M. S., MAO, Q.-M., et HEARN, M. T. W. (1998). "Examination of protein adsorption in fluidized bed and packed bed columns at different temperatures using frontal chromatographic methods." Biotechnology and Bioengineering **58**(1): 35-46.

FOGLER, H. S. (1992). Elements of chemical reaction engineering 2 edition. New Jersey, Prentice Hall PTR.

FREJ, A.-K. B., HJORTH, R. et HAMMARSTRÖM, Å. (1994). "Pilot scale recovery of recombinant annexin V from unclarified *E. coli* Homogenate using expanded bed adsorption." Biotechnology and Bioengineering **44**: 922-929.

FREJ, A.-K. B., JOHANSSON, H.J., JOHANSSON, S., et LEIJON, P. (1997). "Expanded bed adsorption at production scale : Scale-up verification, process example and sanitization of column and adsorbent." Bioprocess Engineering **16**: 57-63.

GAGNON, P. (1998). Bulletproof industrial protein purification - CEE, Validated Biosystems.

GAILLIOT, F. P., GLEASON,C., WILSON,J.J., et ZWARICK,J. (1990). "Fluidized bed adsorption for whole broth extraction." Biotechnology Prog. **6**: 370-375.

GALAEV, I. Y. (1998). "New methods of protein purification, expanded bed chromatography." Biochemistry (Moscow) **63**(No 6): 619-624.

HJORTH, R. (1997). Expanded-bed adsorption in industrial bioprocessing : recent developments. Tibtech. **15**: 230 - 235.

LAN, J. C., HAMILTON G et LYDDIAT A. (1998). Physical and biochemical characterisation of a simple intermediate between fluidised and expanded bed contactors. Second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.

LIHME, A., et OLANDER, M.A. (1998). Mixed mode ligands - sophisticated 'ion exchangers' for efficient capture of proteins from crude raw materials. Second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.

LINDGREN, A., JOHANSSON, S. et NYSTRÖM, L-E (1993). "Scale-up of expanded bed adsorption." Bioprocess engineering 27: 27-30.

MCCORMICK, D. K. (1993). "Expanded bed adsorption." Bio/Technology 11: 1059.

MENZEL, O., SCHAFENBERG, R. et HESSE, D. (1998). "Characterization of porous media by digital image processing" Chem. Eng. Technology 21: 248-252.

MULLICK, A., GRIFFITH, C.M. et FLICKINGER, M.C. (1998). "Expanded and packed bed albumin adsorption on fluoride modified zirconia." Biotechnology and bioengineering 60(3): 333-341.

Pharmacia-Biotech (1991). Ion exchange chromatography.

Pharmacia-Biotech (1996). Expanded bed adsorption - principles and methods.

RAMBERG, M. et ASPLUND, M. (1998). Development of cleaning in place protocol and repetitive use of streamline Q XL. Second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.

RAMIREZ, W. F. et THELEN, T. V. (1997). "Bed-height dynamics of expanded beds." Chemical engineering science 52(19): 3333-3344.

RHODES, M. (1998). Introduction to particle technology. West Sussex, John Wiley and Sons Ltd.

RICHARDSON, J. F. et ZAKI, W. N. (1997). "Sedimentation and fluidisation : part 1." Chemical engineering research and design 75: S82 - S100.

SNOW, U. (1994). "Adsorbent reduces primary unit operations for bioprocess recovery." Genetic engineering news 14(13).

THELEN, T., MAIRAL, A. P., THORSEN, C. S., et RAMIREZ, W. F. (1997). "Application of ultrasonic backscattering for level measurement and process monitoring of expanded bed adsorption columns." Biotechnol. Prog. **13**: 681-687.

THELEN, T. V. et RAMIREZ, W. F. (1998). Monitoring, modeling and control strategies as applied to bed-expansion of EBA processes. Second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.

THÖMMES, J., WEIHER, M., KARAU, A., et KULA, M.-R. (1995). "Hydrodynamics and performance in fluidized bed adsorption." Biotechnology and Bioengineering **48**: 367-374.

THÖMMES, J. (1997). "Fluidized bed adsorption as a primary recovery step in protein purification." Advances in biochemical engineering biotechnology **58**: 185-230.

TREYBAL, R. E. (1980). Mass-Transfert operations, third edition. U.S.A., McGraw - Hill Book company.

WNUKOWSKI, P. (1998). The impact of hydrodynamics on the column performance of the EBA column. Second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.

WRIGHT, P. R., MUZZIO, F. et GLASSER, B.J. (1998). "Batch Uptake of lysozymes : Effet of solution viscosity and mass transfer on adsorption." Biotechnology progress **14**(6): 913-922.

ZAFIRAKOS, E., et LIHME, A. (1998). UpFront expanded bed columns - performance and scale-up. The second international conference on the expanded bed adsorption, Napa Valley.

ZAFIRAKOS, E. et LIHME, A. (1999). EBA columns with a distribution system based on local stirring.

ANNEXE A – LES EXPÉRIENCES

a. Validité des comparaisons - influence de la colonne et des solutions tampons

Afin de s'assurer que les effets comparés sont bien reliés aux facteurs variés, un standard du système doit être fait. Un test d'acétone est effectué sans la colonne à trois différents débits. Le nombre de plateaux théoriques est calculé. Avec les incertitudes, le nombre de plateaux obtenus reste dans la même intervalle. Donc, peu importe le débit utilisé sans la colonne, le système réagit de façon identique.

Lors des expériences de RTD, le solvant utilisé est l'eau alors que celui utilisé pour l'obtention des courbes de capacité est une solution de sodium acétate. Afin de comparer les résultats de ces deux types d'expériences, il est primordial de démontrer que ces deux solutions se comportent de façon similaire durant l'expérimentation. La colonne est soumise à plusieurs expansions avec les deux solutions. La comparaison des ratios d'expansion calculés démontre que le gel se comporte de façon similaire avec les deux solutions à l'exception d'un facteur. En effet, l'expansion du lit diffère selon qu'elle est obtenue avec de l'eau ou du sodium acétate, injecté à 300 cm/h. Par contre, pendant l'injection de la solution de lysozymes à l'intérieur de la colonne, le débit n'est jamais supérieur à 200 cm/h ; ce faisant, les résultats de toutes les expériences sont comparables.

L'influence du système est observée avec cette série d'expériences. Elles sont réalisées sans la colonne.

Tableau A-1 Influence du système

	1.9 ml/min	2.6 ml/min	3.9 ml/min
Moyenne	11.24 \pm 1.88 plateaux	12.13 \pm 1.66 plateaux	12.70 \pm 1.66 plateaux

La prochaine série d'expériences permet de s'assurer de la validation des comparaisons entre les expériences où l'eau est utilisée et les expériences où la solution de sodium d'acétate est utilisée.

Tableau A-2 Comparaison entre l'eau et la solution utilisée

Solution	H0	H1/H0	H2/H0	H3/H0
Moyenne Eau	6.8 cm	1.80 \pm 0.01	2.09	2.86 \pm 0.01
Moyenne Sodium Acétate	6.8 cm	1.80 \pm 0.02	2.06 \pm 0.04	2.93

Les prochains tableaux indiquent l'influence et l'importance de la viscosité.

Tableau A-3 Calcul du degré d'expansion - Effet de la viscosité

Solution	H0	H1/H0	H2/H0	H3/H0
Moyenne Sodium Acétate 15%	6.8 cm	2.24 \pm 0.06	3.23 \pm 0.11	-----
Moyenne Sodium Acétate 10%	6.8 cm	2.09 \pm 0.02	2.75 \pm 0.03	-----

Tableau A-4 Calcul du degré d'expansion – Différents débits

Solution	H/H0	H/H0	H/H0	H/H0	H/H0
15% v/v	1.9 ml/min	2.6 ml/min	2.8 ml/min	3.0 ml/min	3.2 ml/min
	2.24	3.23	Pas fait	4.85	-----
10% v/v	2.10	2.76	3.04	3.38	3.88

Pour avoir une expansion de trois fois la hauteur du lit, soit 20.4 cm, le débit nécessaire est déterminé.

Tableau A-5 Détermination du débit nécessaire pour un ratio de 3

Solution	Débit	Hauteur	MOYENNE
15% v/v	2.40 ml/min	20.4 cm	20.5 \pm 0.02 cm
		20.4 cm	
		20.7 cm	
10% v/v	2.78 ml/min	20.4 cm	20.4 cm \pm 0.01 cm
		20.3 cm	
		20.4 cm	

Des tests de traceur d'acétone avec les solutions de sodium acétate et du glycérol sont réalisés. Les tests sont expérimentés avec des concentrations de 15 % et 10 % v/v de glycérol à deux débits différents : 2.6 ml/min et 3.9 ml/min. Les expériences démontrent qu'il est impossible d'obtenir un lit stable avec 3.9 ml/min.

Tableau A-6 Nombre de plateaux pour différentes viscosités

Solution	Débit	1	2	3	4	5	moyenne
10 % v/v glycérol	2.6 ml/min	491.6	473.2	478.1	463.4	Nil	476.6 ± 20.3 N/m
	3.9 ml/min	608.1	479.7	461.8	404.3	Nil	impossible
15 % v/v glycérol	2.6 ml/min	357.0	317.4	333.3	308.2	375.9	338.4 ± 64.0 N/m
	3.9 ml/min	629.1	586.5	519.5	253.2	Nil	impossible

Le lit semble plus stable à 10 % v/v glycérol qu'à 15 % v/v glycérol. Un plus grand nombre de plateaux par mètre est obtenu à 2.6 ml/min pour la solution de 10%. Le nombre de plateaux théoriques par mètre tend à diminuer en augmentant la concentration de glycérol dans la solution tampon. Donc, une augmentation de viscosité diminue l'efficacité du gel. On effectue les tests avec 5 % de glycérol afin de s'assurer de la validité de cet argument.

Tableau A-7 Nombre de plateaux théoriques pour 3 concentrations de glycérol

Solution	Débit	1	2	3	4	5	Moyenne
5% v/v glycérol	2.6 ml/min	423.0	412.0	384.5	413.6	Nil	408.3 ± 28.7 N/m
	10 % v/v glycérol	2.6 ml/min	491.6	473.2	478.1	463.4	Nil
15 % v/v glycérol	2.6 ml/min	357.0	317.4	333.3	308.2	375.9	338.4 ± 64.0 N/m

L'efficacité du lit augmente avec la concentration de glycérol jusqu'à une valeur milieu pour ensuite descendre. Ceci est sûrement dû à la porosité du lit. La porosité optimale est de 0.7; en augmentant la viscosité de la solution, l'expansion du lit augmente et, par le fait même, la porosité du lit. Si la valeur de la porosité monte plus haut que la valeur optimale, cela diminue l'efficacité.

b. Effet de la pression et de la verticalité

Conditions d'opération

- Gel utilisé : STREAMLINE SP
- Distributeur avec un angle de **45 degrés**
- Second distributeur présent
- Solution utilisée : eau

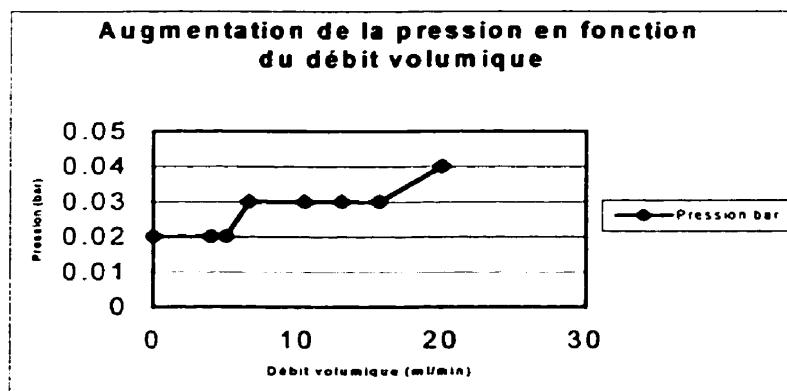


Figure A-1 Effet du débit volumique sur la pression à l'intérieur de la colonne

Lors de l'opération de la colonne avec le gel à l'intérieur et avec l'eau comme solution, une augmentation de la pression est observée. En effet, la pression passe de 0.02 bar à 0.1 bar en l'espace de quelques minutes (moins de 10 minutes). Ceci est dû à l'agglomération de particules fines sur le filtre supérieur. Donc, il est nécessaire d'enlever ce filtre le temps d'enlever les particules du gel. Pour ce faire, le lit en expansion roule

pendant plusieurs heures afin d'éliminer toutes particules. Après un certain laps de temps, la majorité des particules fines en suspension, présentes au début de l'expérience, ont disparu.

Un des paramètres les plus importants à petite échelle est sans contredit la verticalité de la colonne. Afin de vérifier l'effet de la verticalité, la colonne fut déviée selon cinq angles différents. Le nombre de plateaux théoriques par mètre ainsi que l'expansion furent mesurés. La colonne est déviée par la base de la colonne selon le dessin suivant.

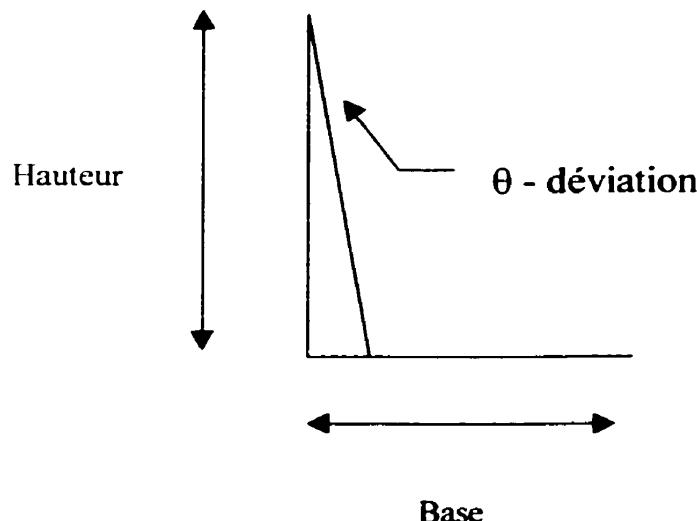


Figure A-2 Déviation de la colonne

Les effets de la verticalité sur la colonne sont répertoriés dans le graphique qui suit.

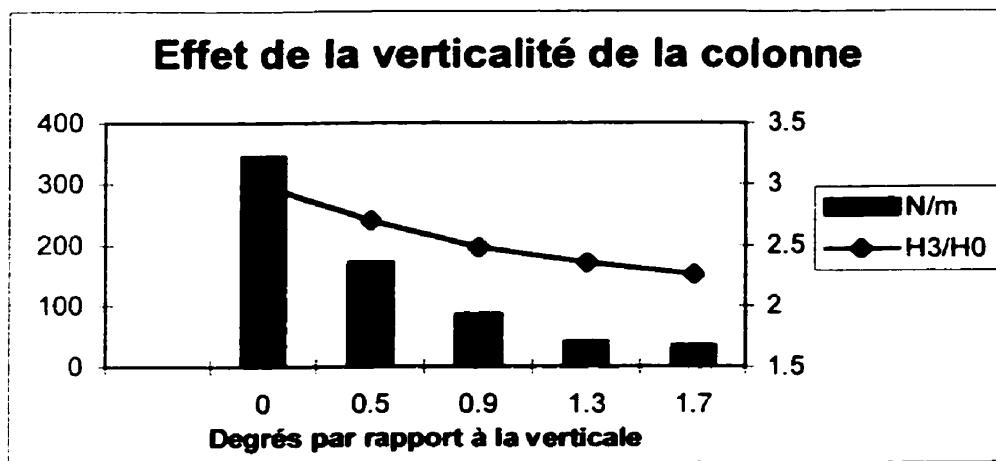


Figure A-3 Effet de la verticalité de la colonne

Tableau A-8 Degré d'expansion et N/m pour différents angles de déviation

Test	Angle de déviation (degré)	Degré d'expansion	N/m	Incertitude (N/m)
1	0	2.99	344	± 9
2	0.5	2.70	171	± 4
3	0.9	2.48	85	± 6
4	1.3	2.36	41	± 1
5	1.7	2.25	34	± 3

Comme le démontrent les chiffres, il est primordial de s'assurer que la colonne soit parfaitement alignée lors des expériences, car l'effet de la verticalité est non négligeable. Cette constatation est évidente pour une colonne de 1 centimètre de diamètre. Les mêmes manipulations réalisées sur une colonne de diamètre supérieur, soit cinq centimètres, démontrent que l'effet n'est pas aussi marqué. Néanmoins, il est tout de même présent. Bruce et Chase (1998) démontrent qu'une colonne de un centimètre possédant une déviation de 0.15 degré obtient une efficacité de 36 % de sa valeur optimum tandis qu'une colonne de cinq centimètres de diamètre n'est affectée qu'à 60 % de sa valeur optimum.

c. Effet du système de distribution

Le système de distribution de la colonne est particulier. Il possède plusieurs façons d'être assemblé ; de plus, on a la possibilité de changer certaines pièces à l'intérieur. La répercussion de ces changements sur les résultats doit être connue afin d'assurer la validité des conclusions tirées.

Conditions d'opération

- Gel utilisé : STREAMLINE SP
- Second distributeur présent
- Solution utilisée : eau

Les degrés d'expansion de la colonne avec le distributeur de 45 degrés sont les suivants :

$$\begin{array}{ll}
 H_0 : 10.7 \text{ cm} & H_0 : 13.2 \text{ cm} \\
 H_1/H_0 = 1.90 & H_1/H_0 = 1.90 \\
 H_2/H_0 = 2.20 & H_2/H_0 = 2.21 \\
 H_3/H_0 = 2.96 & H_3/H_0 = 2.97
 \end{array}$$

Les degrés d'expansion de la colonne avec le distributeur de 90 degrés sont les suivants :

$$\begin{array}{ll}
 H_0 : 10.7 \text{ cm} & H_0 : 13.2 \text{ cm} \\
 H_1/H_0 = 1.95 & H_1/H_0 = 1.92 \\
 H_2/H_0 = 2.31 & H_2/H_0 = 2.23 \\
 H_3/H_0 = 3.12 & H_3/H_0 = 3.16
 \end{array}$$

Les degrés d'expansion de la colonne avec le distributeur de 150 degrés sont les suivants :

$$\begin{array}{ll}
 H_0 : 10.7 \text{ cm} & H_0 : 13.2 \text{ cm} \\
 H_1/H_0 = 1.83 & H_1/H_0 = 1.84 \\
 H_2/H_0 = 2.12 & H_2/H_0 = 2.17 \\
 H_3/H_0 = 2.78 & H_3/H_0 = 2.95
 \end{array}$$

La prochaine série d'expériences vérifie l'effet du second distributeur sur l'expansion et le nombre de plateaux théoriques par mètre.

Conditions d'opération

- Gel utilisé : STREAMLINE SP
- **Second distributeur absent**
- Solution utilisée : eau

Le degré d'expansion de la colonne avec le distributeur de 45 degrés pour chaque débit volumique est déterminé

$$H_0 : 14.6 \text{ cm}$$

$$H_1/H_0 = 1.87$$

$$H_2/H_0 = 2.23$$

$$H_3/H_0 = 2.99$$

L'expérience sans le second distributeur est réalisée de nouveau mais cette fois-ci avec un angle de 150 degrés afin de vérifier si les mêmes conclusions sont obtenues, c'est-à-dire celles obtenues lors de l'expérience faite avec le distributeur de 45 degrés.

Le degré d'expansion de la colonne avec le distributeur de 150 degrés pour chaque débit volumique est déterminé

$$H_0 : 13.1 \text{ cm (14.3 cm pour 1.9 ml/min)}$$

$$H_1/H_0 = 1.86$$

$$H_2/H_0 = 2.17$$

$$H_3/H_0 = 2.65$$

L'expérience sans le second distributeur est refaite, mais cette fois-ci, avec un angle de 90 degrés afin de départager les résultats différents obtenus avec le distributeur de 45 degrés

et celui de 150 degrés. Le degré d'expansion de la colonne avec le distributeur de 90 degrés pour chaque débit volumique est déterminé

$$H_0 : 13.1 \text{ cm}$$

$$H_1/H_0 = 1.70$$

$$H_2/H_0 = 1.80$$

$$H_3/H_0 = 2.64$$

Les trois distributeurs ensemble sont comparés l'un à l'autre

Tableau A-9 Nombre de plateaux par mètre pour les 3 types de distributeurs

Débit volumique	1.9 ml/min	2.6 ml/min	3.9 ml/min
Second distributeur	Valeur (N/m)	Valeur (N/m)	Valeur (N/m)
Présent			
Angle 150 degrés	224 ± 17 (7.5%)	302 ± 11 (4%)	356 ± 33 (9%)
Absent			
Angle 150 degrés	137 ± 19 (14%)	174 ± 14 (8%)	207 ± 11.5 (5.5%)
Présent			
Angle 90 degrés	260 ± 14 (5%)	286 ± 17 (6%)	387 ± 23 (6%)
Absent			
Angle 90 degrés	254 ± 31 (12%)	332 ± 40 (12%)	385 ± 37 (10%)
Présent			
Angle 45 degrés	254 ± 19 (7.5%)	280 ± 15.5 (5.5%)	393 ± 19 (5%)
Absent			
Angle 45 degrés	351 ± 26 (7%)	365 ± 13 (3.5%)	451 ± 9 (2%)

Les régressions linaires faites à partir des données et permettent de calculer la vitesse expérimentale des particules du gel dans la colonne ainsi que l'indice de Richardson – Zaki. Ces données sont comparées avec les données théoriques dans le tableau A.10.

Tableau A-10 Vitesse expérimentale pour différents distributeurs

Angle de distribution	Second distributeur	Vitesse expérimentale	Vitesse théorique
45	Présent	0.0023 m/s	0.00392 m/s
45	Absent	0.0021 m/s	0.00392 m/s
90	Présent	0.0020 m/s	0.00392 m/s
90	Absent	0.0023 m/s	0.00392 m/s
150	Présent	0.0021 m/s	0.00392 m/s
150	Absent	0.0053 m/s	0.00392 m/s

La vitesse terminale augmente en l'absence du second distributeur pour les angles de distribution de 90 et 150 degrés ; par contre, elle diminue pour l'angle de 45 degrés. Ce qui laisse croire que le jet est mieux dirigé sans le second distributeur pour deux des trois angles.

Tableau A-11 Indice n pour différents distributeurs

Angle de distribution	Second distributeur	n
45	Présent	3.84
45	Absent	3.62
90	Présent	3.37
90	Absent	3.31
150	Présent	3.52
150	Absent	6.06

Effectivement, il apparaît avantageux de fonctionner sans le second distributeur avec l'angle de 150 degrés et avec le distributeur pour l'angle de 45 degrés. L'exposant de Richardson-Zaki est une indication du type d'écoulement. Quand l'indice se rapproche de 4.8 pour un écoulement laminaire ($Rep < 0.4$) (Chang 1996), le profil de vitesse est plat, c'est-à-dire que l'écoulement est qualifié de type piston. Un écoulement piston est synonyme d'une meilleure séparation. Les exposants présentés dans le tableau A.11 se retrouvent à un intervalle raisonnable de la valeur typique (4.8). Il est possible de

conclure que le système se trouve dans le régime laminaire et que l'écoulement est du type piston. Par contre, les résultats obtenus pour le nombre de plateaux par mètre affichent des conclusions différentes de celles obtenues avec les indices. Le nombre de plateaux par mètre tend à démontrer que le second distributeur n'est pas nécessaire au bon fonctionnement du distributeur de 45 degrés alors qu'il l'est à celui du distributeur de 150 degrés. Des conclusions inverses sont obtenues à la suite de l'étude des indices « n ». On peut expliquer cette différence par le fait que le nombre de plateaux est plus sensible que « n » au type de distributeur ainsi qu'à une fluidisation homogène.

d. Effet de la quantité de gel

Conditions d'opération

- Gel utilisé : STREAMLINE SP
- Second distributeur présent
- Solution utilisée : eau

Les degrés d'expansion de la colonne avec le distributeur de 45 degrés sont les suivants :

H_0 : 7.7 cm	H_0 : 11.9 cm	H_0 : 14.6 cm
H_2/H_0 : 1.84	H_2/H_0 : 1.90	H_2/H_0 : 1.85
H_2/H_0 : 2.22	H_2/H_0 : 2.18	H_2/H_0 : 2.25
H_3/H_0 : 2.97	H_3/H_0 : 2.82	H_3/H_0 : 3.01

Suite à l'analyse des résultats, aucune différence marquée entre le degré d'expansion à différente hauteur du gel n'est observée. Le tableau suivant expose les différents nombres de plateaux théoriques pour chaque hauteur initiale dans la colonne.

Tableau A-12 Nombre de plateaux théoriques pour différentes hauteurs de gel

H_0	N/m (pour 1.9 mL/min)	N/m (pour 2.6 mL/min)	N/m (pour 3.9 mL/min)
7.7 cm	375 \pm 61 (\pm 16%)	395 \pm 47 (\pm 12%)	410 \pm 53 (\pm 13%)
11.9 cm	283 \pm 39 (\pm 14%)	380 \pm 67 (\pm 18%)	328 \pm 30 (\pm 9%)
14.6 cm	284 \pm 35 (\pm 12%)	327 \pm 40 (\pm 12%)	352 \pm 36 (\pm 10%)

La quantité de gel peut influencer l'écoulement à l'intérieur du gel. La compréhension de l'effet que provoque cette variable est cruciale. La capacité d'adsorption est directement liée à cette variable. Si la hauteur du gel n'est pas suffisamment importante, le produit d'intérêt ne peut être complètement retiré de la solution. De plus, la vérification de l'effet de sa variation sur l'hydrodynamique doit être analysée puisque le but premier de cette étude est de quantifier l'hydrodynamique de l'écoulement et de quantifier l'effet des facteurs l'influencant.

En se servant des régressions linéaires obtenues à partir des données ci-haut, il est possible de calculer les vitesses terminales expérimentales ; elles sont comparées avec la vitesse terminale théorique.

Tableau A-13 Vitesse expérimentale pour différentes hauteurs de gel

Hauteur du gel	Vitesse expérimentale	Vitesse théorique
7.7 cm	0.00204 m/s	0.00392 m/s
11.9 cm	0.00265 m/s	0.00392 m/s
14.6 cm	0.00200 m/s	0.00392 m/s

La vitesse expérimentale est identique à 7.7 cm et 14.6 cm. Elle atteint un maximum à 11.9 cm. Cela s'explique par le fait que la hauteur du gel passe par un optimal pour ensuite redescendre. L'indice «n» suit également le même profil.

Tableau A-14 Facteur d'expansion pour différentes hauteurs de gel

Hauteur du gel	n
7.7 cm	3.22
11.9 cm	3.87
14.6 cm	3.21

Il y a une valeur optimale autour de 11.9 cm de gel. Le gel doit être présent en quantité suffisante afin d'avoir une expansion et une séparation efficaces, mais en plaçant trop de gel, l'efficacité diminue et l'expansion n'est plus optimale.

Le facteur d'expansion (tableau 8.14) calculé pour chacune des trois hauteurs de gel se retrouve dans le même intervalle avec les incertitudes. Au point de vue hydrodynamique, la similitude est présente, alors qu'un problème survient au point de vue pratique, pour l'adsorbance du produit. Une quantité insuffisante de gel ne permet pas de retirer tout le produit voulu.

e. LUB

Seize expériences sont faites avec la colonne de 1 cm. L'adaptateur choisi est celui de 45 degrés et le second distributeur est présent. Avec les données d'absorbance, le «LUB» est calculé, c'est-à-dire le *length of unused bed* ou la longueur de lit inutilisée. Les quatre variables étudiées sont respectivement la vitesse d'écoulement, la concentration de lysozymes, la concentration volumique de glycérol et la hauteur du gel dans la colonne.

Les résultats suivants sont obtenus :

Tableau A-15 LUB

Run	X1 Cm/h	X2 Mg/ml	X3 % v/v	X4 cm	LUB
Packed	150	2	0	6.8	1.69
Packed	150	2	0	6.8	1.96
1	150	2	0	6.8	1.42
2	200	2	0	6.8	2.31
3	150	6	0	6.8	2.27
4	200	6	0	6.8	1.88
5	150	2	15	6.8	2.71
6	200	2	15	6.8	3.02
7	150	6	15	6.8	2.63
8	200	6	15	6.8	1.91
9	150	2	0	11.7	1.03
10	200	2	0	11.7	1.65
11	150	6	0	11.7	1.39
12	200	6	0	11.7	2.17
13	150	2	15	11.7	1.48
14	200	2	15	11.7	2.66
15	150	6	15	11.7	2.14
16	200	6	15	11.7	3.12

En séparant l'évaluation des paramètres, on peut conclure que :

→ Avec une hauteur de lit de 6.8 cm,

- ⇒ Toutes les expériences donnent une valeur de LUB inférieure sans glycérol.
- ⇒ Avec une concentration de 2 mg/ml, la longueur de lit inutilisée est plus faible avec une vitesse d'écoulement de 150 cm/h, tandis que le contraire est observé avec une concentration de 6 mg/ml.
- ⇒ Le pire cas analysé est celui où le fluide s'écoule à une vitesse de 200 cm/h avec une concentration de 2 mg/ml de lysozymes et 15 % de glycérol ; dans ces conditions, pratiquement la moitié du lit est inutilisée (44%).

⇒ La situation qui se rapproche le plus du comportement idéal avec une concentration de glycérol de 0% est l'expérience #1 ($X_1=150$, $X_2=2$, $X_3=0$, $X_4=6.8$) : seulement 21% de lit est inutilisé. Par contre avec une concentration de 15% dans l'expérience #8 ($X_1=200$, $X_2=6$, $X_3=15$, $X_4=6.8$), on retrouve 28 % de lit inutilisé.

→ Avec une hauteur de lit de 11.7 cm,

- ⇒ Toutes les expériences donnent une valeur de LUB inférieure sans glycérol avec une vitesse d'écoulement de 150 cm/h.
- ⇒ Il est préférable de travailler avec 2 mg/ml qu'avec 6 mg/ml de lysozymes.
- ⇒ Le pire cas analysé est celui où le fluide s'écoule à une vitesse de 200 cm/h avec une concentration de 6 mg/ml de lysozymes et 15 % de glycérol ; dans ces conditions, 27% du lit est inutilisé.
- ⇒ La situation qui se rapproche le plus du comportement idéal avec une concentration de glycérol de 0% est l'expérience #9 ($X_1=150$, $X_2=2$, $X_3=15$, $X_4=11.7$) : seulement 9% de lit est inutilisé. Dans l'expérience #13 ($X_1=150$, $X_2=2$, $X_3=15$, $X_4=11.7$) avec une concentration de 15% on retrouve 13% de lit inutilisé.

Les expériences avec une hauteur de lit de 11.7 cm sont nettement plus performantes que celles avec une hauteur de lit plus faible, soit 6.8 cm. Le pire cas analysé avec 11.7 cm de gel se rapproche du meilleur résultat obtenu avec 6.8 cm de gel. Donc, lorsqu'il n'y a pas assez de gel dans la colonne, il y a plus de turbulence, donc de chemins préférentiels, et la séparation n'est pas aussi efficace qu'elle se devrait. La même conclusion a été obtenue précédemment avec les résultats du calcul du nombre de plateaux théoriques par mètre.

f. Capacité

La capacité maximale du lit est calculée avec les données des courbes de ruptures. Le résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant.

Tableau A-16 Capacité

Essai	Capacité mg/ml			
	10%	20%	30%	50%
1	97.45	101.72	105.99	116.67
2	78.50	83.37	89.21	102.85
3	63.93	68.20	73.54	83.15
4	48.54	54.38	60.22	71.91
5	134.46	137.30	139.44	146.27
6	55.13	60.97	66.82	83.37
7	72.47	81.01	89.55	101.29
8	36.85	39.78	48.54	54.38
9	84.11	86.95	89.80	95.08
10	84.88	86.82	90.16	93.50
11	96.26	98.70	101.13	104.79
12	46.07	49.41	52.75	57.75
13	99.96	103.21	105.65	112.15
14	83.21	87.10	89.33	94.33
15	96.26	101.13	104.79	112.72
16	88.62	92.79	97.80	107.81
Fixe	66.14	72.19	78.60	91.76
fixe	68.28	71.84	77.53	91.76

g. Nombre de Bodenstein

Distributeur de 45 degrés

Tableau A-17 Nombre de Bodenstein distributeur de 45 degrés

Débit	Second distributeur	#1	#2	#3	#4	#5	Moyenne
1.9	Oui	nil	47.6	46.8	46.5	45.8	46.675
1.9	Non	64	69.4	63.7	77.5	68.5	68.62
2.6	Oui	57	53.2	52.9	51.25	58.7	54.61
2.6	Non	76	71	70.7	75.8	72.6	73.22
3.9	Oui	61	75.7	74.2	nil	72	70.725
3.9	Non	68.8	61.8	63.5	66.3	72.7	66.62

Distributeur de 90 degrés

Tableau A-18 Nombre de Bodenstein distributeur de 90 degrés

Débit	Second distributeur	#1	#2	#3	#4	#5	Moyenne
1.9	Oui	52.9	53.9	49.8	48.7	49.3	50.92
1.9	Non	42.4	45.8	46.1	47.8	42.6	44.94
2.6	Oui	53.7	54.3	55.7	55.7	46.9	53.26
2.6	Non	64.7	75.7	nil	59.7	58.7	64.7
3.9	Oui	64.3	61.1	62.2	63.1	59.5	62.04
3.9	Non	73.7	76	75.2	nil	73.7	74.65

Distributeur de 150 degrés

Tableau A-19 Nombre de Bodenstein distributeur de 150 degrés

Débit	Second distributeur	#1	#2	#3	#4	#5	Moyenne
1.9	Oui	43.6	44.6	42.25	41.6	42.4	42.89
1.9	Non	34.5	30.35	31.8	32.05	31.35	32.01
2.6	Oui	56.85	55.1	55.4	55.5	56.35	55.84
2.6	Non	38.15	35.2	36.7	38.2	38.45	37.34
3.9	Oui	71.44	73.6	72.7	70.2	74.6	72.508
3.9	Non	40.7	40.9	38.4	31.7	40	38.34

Hauteur de gel

Tableau A-20 Nombre de Bodenstein différentes hauteurs de gel

Hauteur	Débit	#1	#2	#3	#4	#5	Moyenne
7.7 cm	1.9	36.5	26.6	35.7	36.3	42.4	35.5
7.7 cm	2.6	28.6	26.5	41.85	40.2	nil	34.2875
7.7 cm	3.9	45.6	44	46.5	48.3	41.1	45.1
11.9 cm	1.9	45.8	48.4	36.5	46.1	49.5	45.26
11.9 cm	2.6	50.1	42	47.3	51	nil	47.6
11.9 cm	3.9	56.4	57.4	57.2	56.4	60.6	57.6
14.6 cm	1.9	63	60.5	55.4	55	60.5	58.88
14.6 cm	2.6	58.8	69	68.8	72.7	72.5	68.36
14.6 cm	3.9	77.4	83	80.5	80.5	81.3	80.54

Concentration de glycérol

Tableau A-21 Nombre de Bodenstein différentes concentrations de glycérol

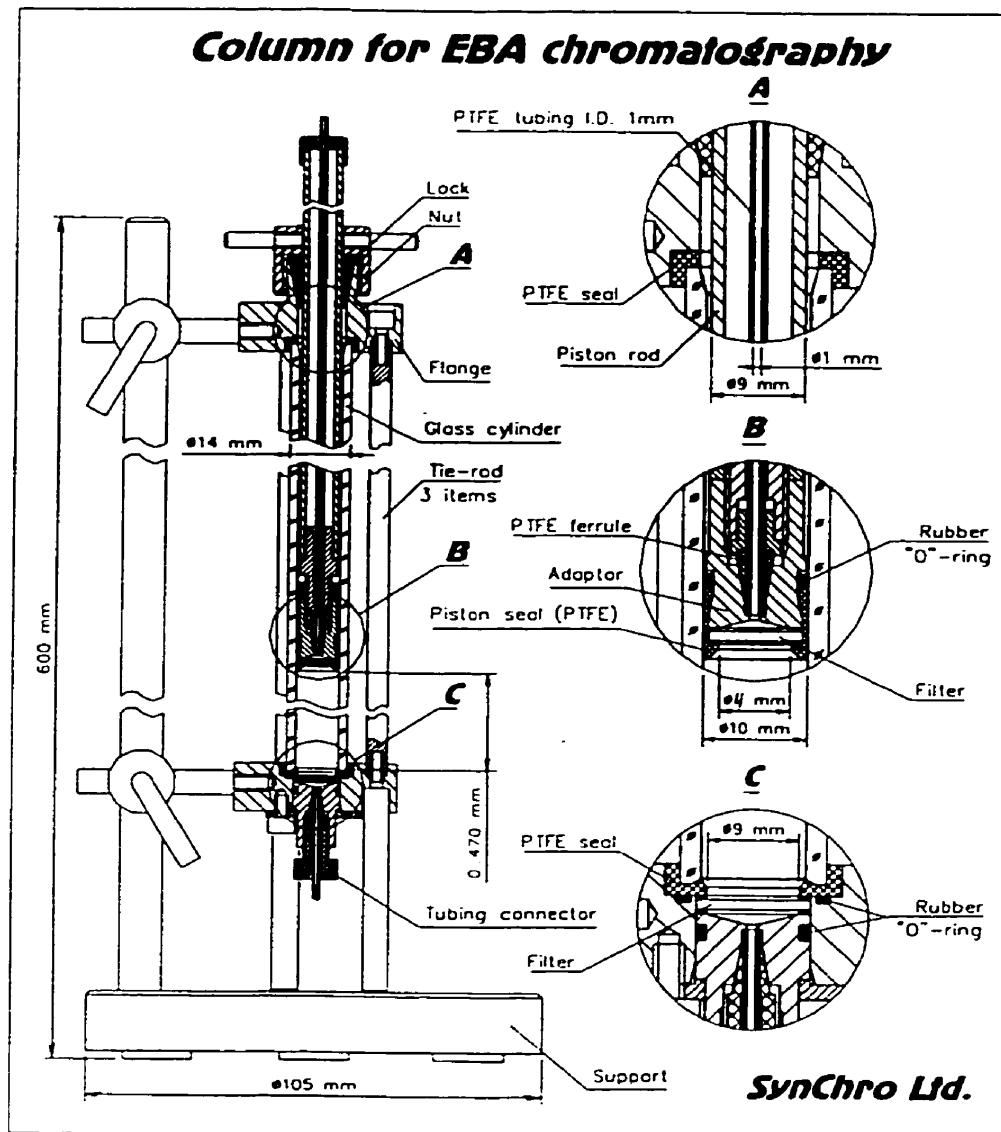
% glycérol	Débit	#1	#2	#3	#4	#5	Moyenne
5	2.6	39.2	40.95	41.7	41.9	nil	40.9375
10	2.6	43.2	41.05	44.8	43.9	nil	43.2375
10	3.9	50	47.1	43.2	31.05	nil	42.8375
15	2.6	32.65	46.4	27	31.2	35.5	34.55
15	3.9	55.1	45.5	44.4	47.2	nil	48.05

Colonne de 5 cm

Tableau A-22 Nombre de Bodenstein colonne de 5 cm

Débit	#1	#2	#3	Moyenne
100 cm/h	69.8	97	83	83.27
200 cm/h	248	228	203.9	226.63
300 cm/h	180	157	137	158

ANNEXE B – SPÉCIFICATIONS DE LA COLONNE



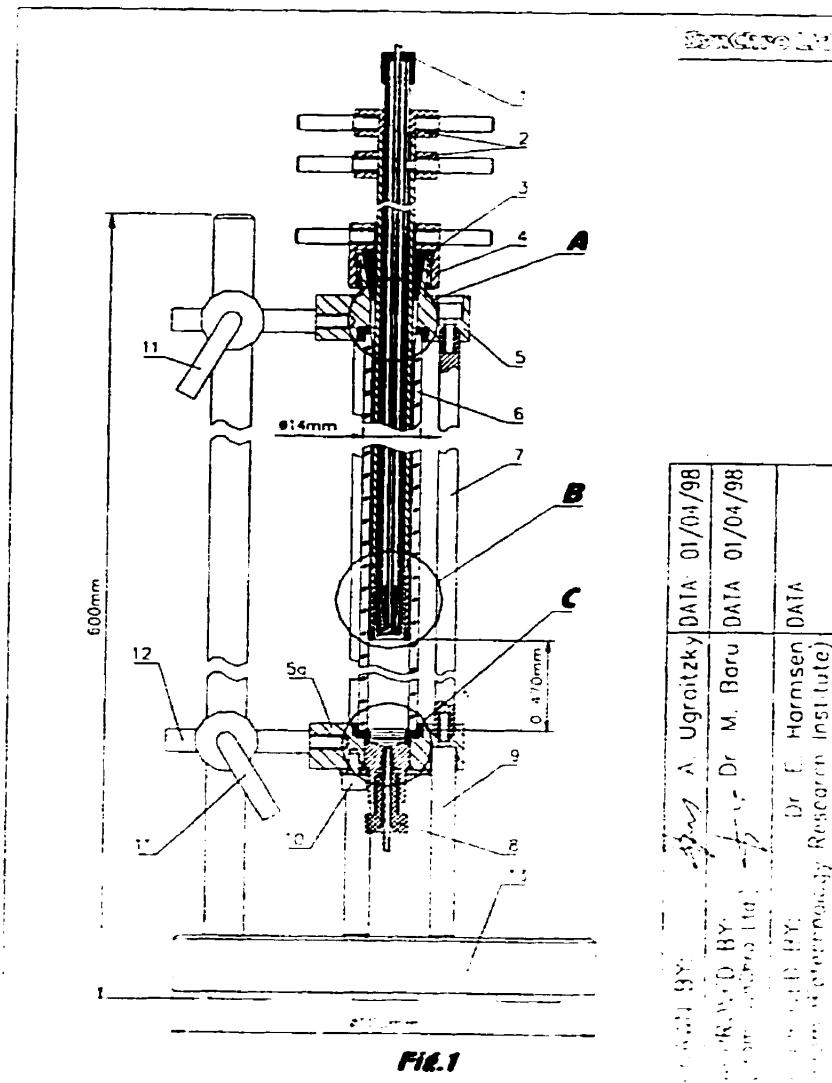


FIG. 1

ANNEXE C – COURBE TYPIQUE DE RUPTURE

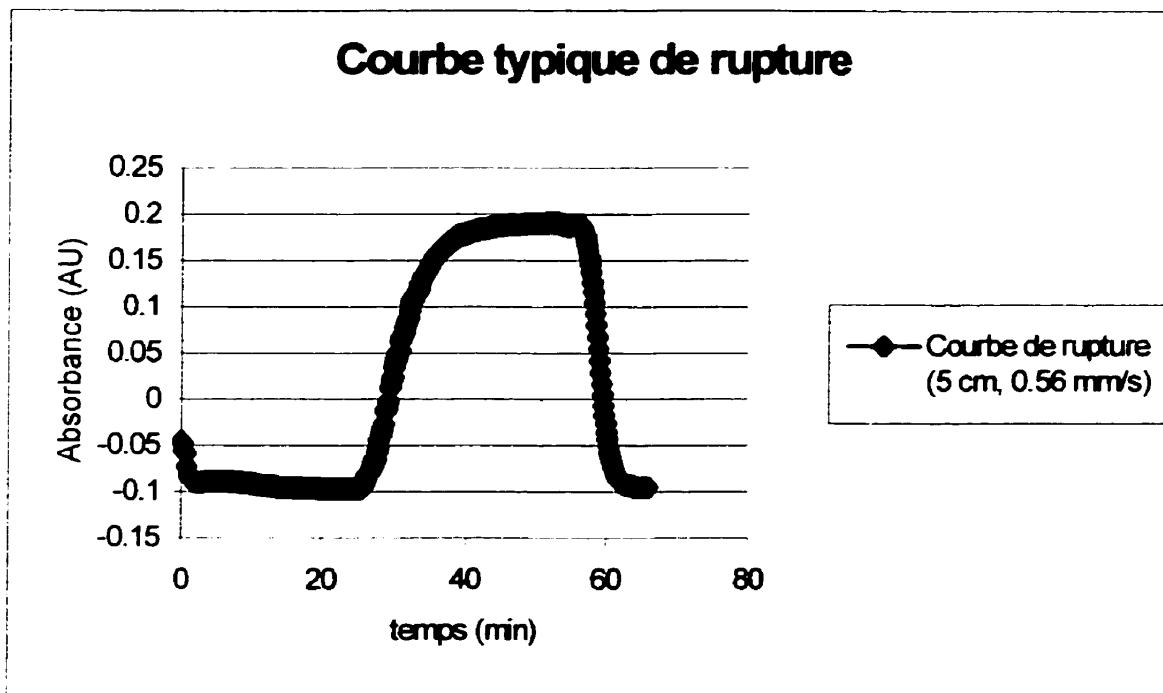


Figure C-1 Courbe de rupture typique

**ANNEXE D – RÉSULTATS DU MASTERSIZER POUR LA TAILLE
DES PARTICULES**

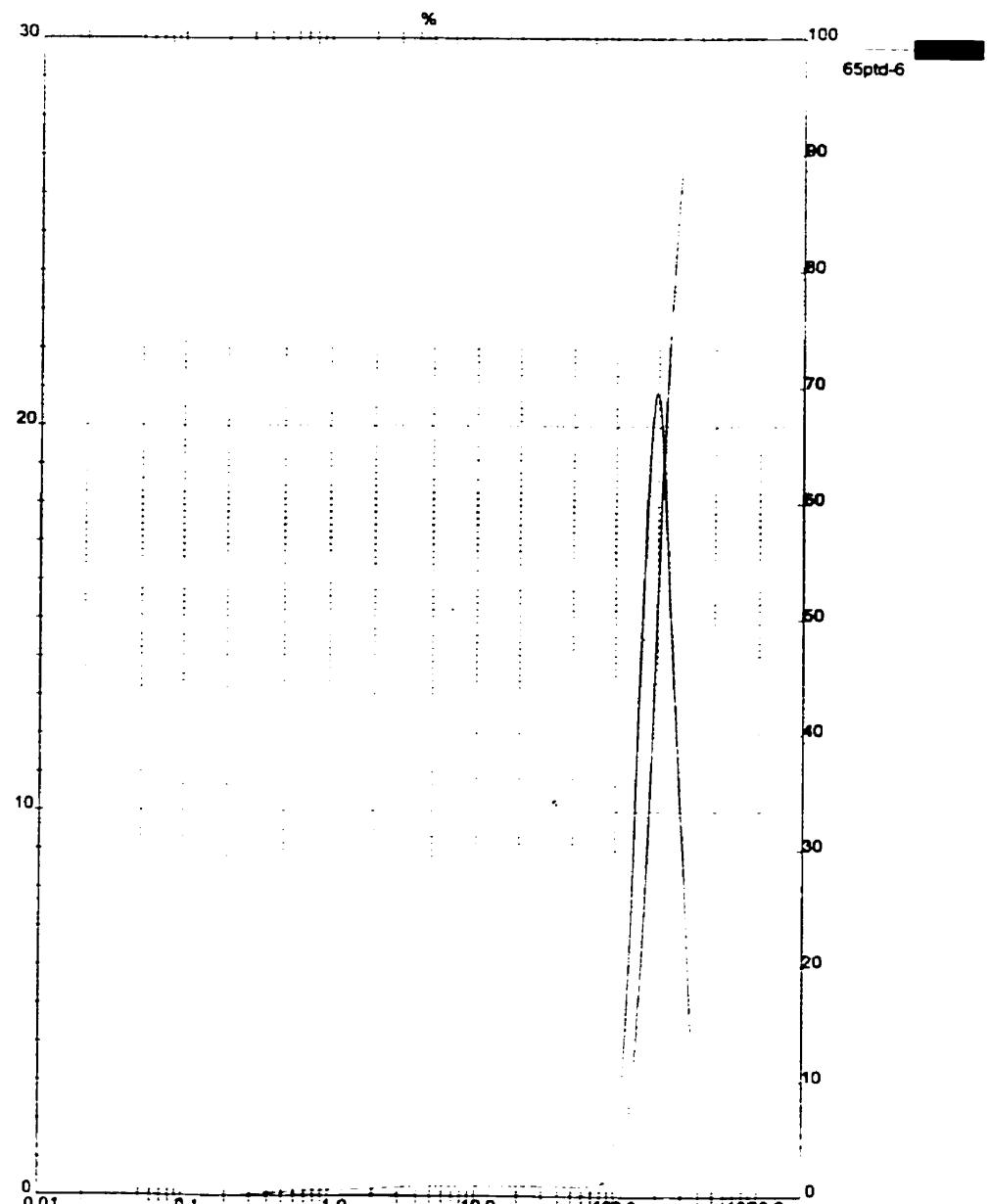

MASTERSIZER
Result: Analysis Report

Sample Details			
Sample ID: 65ptd	Run Number: 6	Measured: 3 Dec 1999 13:58	
Sample File: ROBERT	Record Number: 1	Analysed: 3 Dec 1999 13:58	
Sample Path: D:\PEOPLE\BROCAR\ROSSI\		Result Source: Analysed	
Sample Notes: 65% kaolin suspension without additives			

System Details			
Range Lens: 300RF mm	Beam Length: 2.40 mm	Sampler None	Obscuration: 18.4 %
Presentation: 3DHD	[Particle R.I. = (1.5295, 0.1000), Dependant R.I. = 1.3300]		
Analysis Model: Polydisperse			
Modifications: None			Residual: 0.657 %

Result Statistics			
Distribution Type: Volume	Concentration = 0.2327 %Vol	Density = 1.000 g / cub. cm	Specific S.A. = 0.1127 sq. m/g
Mean Diameters:	D (v. 0.1) = 136.07 μ m	D (v. 0.9) = 197.80 μ m	D (v. 0.9) = 290.79 μ m
D [3, 2] = 265.06 μ m	D [3, 2] = 53.22 μ m	Span = 7.822E-01	Uniformity = 2.463E-01

Size Low (μ m)	In %	Size High (μ m)	Under%	Size Low (μ m)	In %	Size High (μ m)	Under%
0.05	0.00	0.05	0.00	6.63	0.00	7.72	0.90
0.06	0.00	0.07	0.00	7.72	0.00	9.00	0.90
0.07	0.00	0.08	0.00	9.00	0.00	10.48	0.90
0.08	0.00	0.09	0.00	10.48	0.00	12.21	0.90
0.09	0.00	0.11	0.00	12.21	0.00	14.22	0.90
0.11	0.00	0.13	0.00	14.22	0.00	16.57	0.90
0.13	0.00	0.15	0.00	16.57	0.00	19.31	0.90
0.15	0.00	0.17	0.00	19.31	0.00	22.49	0.90
0.17	0.00	0.20	0.00	22.49	0.00	26.20	0.90
0.20	0.00	0.23	0.00	26.20	0.00	30.53	0.90
0.23	0.01	0.27	0.02	30.53	0.00	35.56	0.90
0.27	0.04	0.31	0.06	35.56	0.00	41.43	0.90
0.31	0.08	0.36	0.14	41.43	0.00	48.27	0.90
0.36	0.09	0.42	0.23	48.27	0.01	56.23	0.91
0.42	0.09	0.49	0.31	56.23	0.04	65.51	0.95
0.49	0.08	0.58	0.39	65.51	0.12	76.32	1.07
0.58	0.05	0.67	0.44	76.32	0.35	88.91	1.42
0.67	0.03	0.78	0.47	88.91	0.97	103.58	2.39
0.78	0.02	0.91	0.49	103.58	2.69	120.67	5.08
0.91	0.02	1.06	0.51	120.67	6.90	140.58	11.97
1.06	0.02	1.24	0.54	140.58	13.70	163.77	25.67
1.24	0.03	1.44	0.57	163.77	19.35	190.80	45.02
1.44	0.04	1.68	0.61	190.80	20.49	222.28	65.51
1.68	0.05	1.95	0.66	222.28	15.74	258.95	81.25
1.95	0.05	2.28	0.71	258.95	11.00	301.68	92.25
2.28	0.05	2.65	0.76	301.68	6.25	351.46	98.50
2.65	0.04	3.09	0.80	351.46	1.50	409.45	100.00
3.09	0.04	3.60	0.84	409.45	0.00	477.01	100.00
3.60	0.03	4.19	0.86	477.01	0.00	555.71	100.00
4.19	0.02	4.88	0.88	555.71	0.00	647.41	100.00
4.88	0.01	5.69	0.89	647.41	0.00	754.23	100.00
5.69	0.01	6.63	0.90	754.23	0.00	878.67	100.00



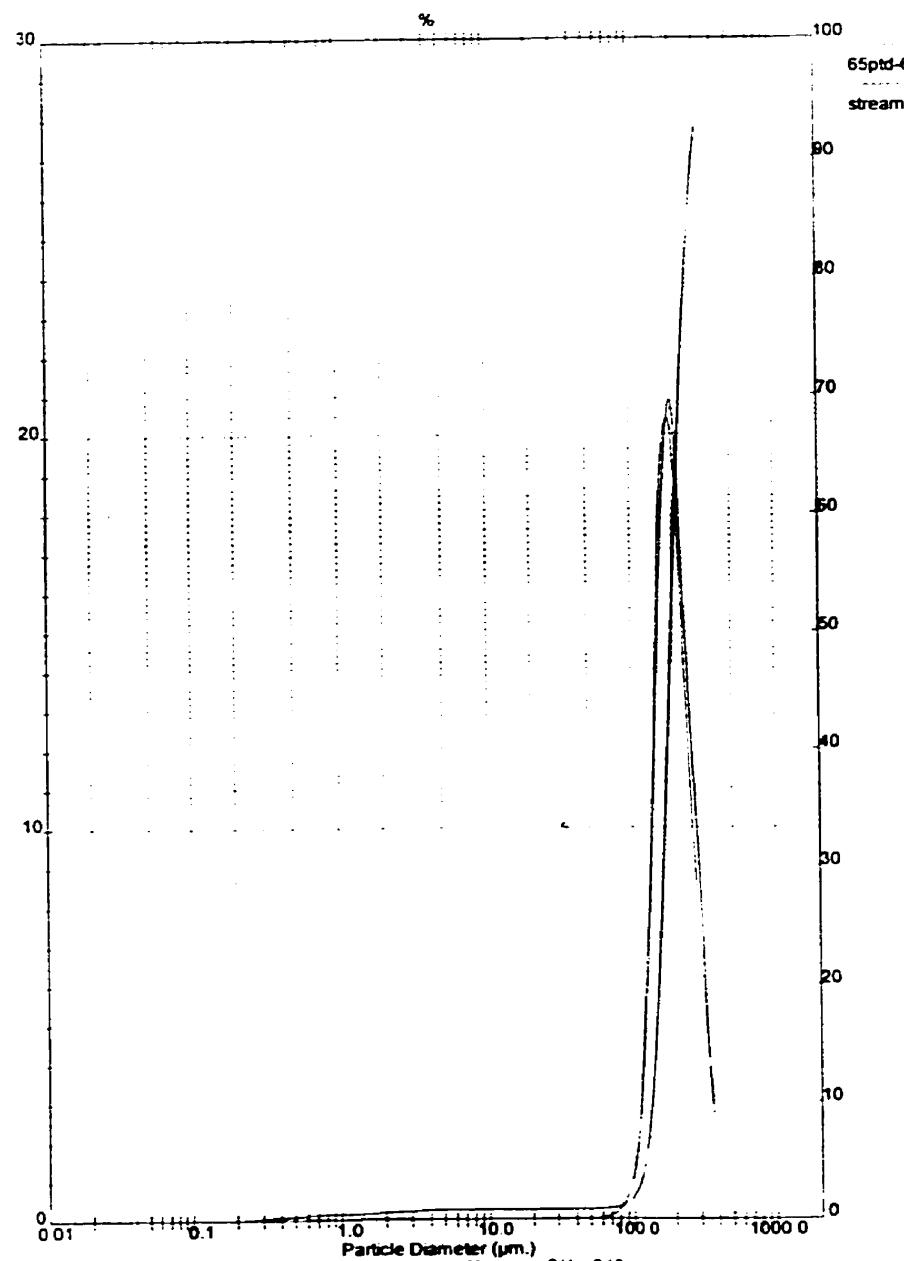
Malvern Instruments Ltd
Malvern, UK
Tel: +(44) (0)1684-892456 Fax: +(44) (0)1684-892789

Mastersizer S Ver 2.1B
Serial Number 33544-187

p 2
03 Dec 99 13:59


MASTER SIZER
Result: Analysis Report

Sample Details				System Details							
Sample ID: stream		Run Number: 7		Measured: 3 Dec 1999 14:10		Analysed: 3 Dec 1999 14:10					
Sample File: (Result Not Saved)		Result Source: Analysed									
Sample Path: D:\PEOPLE\BROCAR\ROSS\											
Sample Notes:											
Rangef Lens: 300RF mm				Beam Length: 2.40 mm							
Presentation: 30HD				Sensit: None							
Analysis Model: Polydisperse				Obcclusion: 15.5 %							
Modifications: None				Residu: 0.445 %							
Result Statistics											
Distribution Type: Volume	Concentration = 0.2021 %Vol	Density = 1.000 g / cub. cm	Specific S.A. = 0.1036 sq. m/g	D [v, 0.1] = 134.11 μ m	D (v, 0.5) = 193.33 μ m	D (v, 0.9) = 295.16 μ m					
Mean Diameter:	D [v, 0.1] = 134.11 μ m	D (v, 0.5) = 193.33 μ m	Uniformity = 2.688E-01	D [3, 2] = 57.93 μ m	Span = 6.382E-01						
Size Low (μ m)	In %	Size High (μ m)	Under %	Size Low (μ m)	In %	Size High (μ m)	Under %				
0.05	0.00	0.05	0.00	6.63	0.00	7.72	0.00				
0.06	0.00	0.07	0.00	7.72	0.00	8.00	0.00				
0.07	0.00	0.08	0.00	8.00	0.00	10.48	0.00				
0.08	0.00	0.09	0.00	10.48	0.00	12.21	0.00				
0.09	0.00	0.11	0.00	12.21	0.00	14.22	0.00				
0.11	0.00	0.13	0.00	14.22	0.00	16.57	0.00				
0.13	0.00	0.15	0.00	16.57	0.00	19.31	0.00				
0.15	0.00	0.17	0.00	19.31	0.00	22.49	0.00				
0.17	0.00	0.20	0.00	22.49	0.00	25.20	0.00				
0.20	0.00	0.23	0.00	25.20	0.00	30.53	0.00				
0.23	0.01	0.27	0.01	30.53	0.00	35.56	0.00				
0.27	0.03	0.31	0.04	35.56	0.00	41.43	0.00				
0.31	0.07	0.36	0.11	41.43	0.00	48.27	0.00				
0.36	0.08	0.42	0.19	48.27	0.01	56.23	0.81				
0.42	0.09	0.49	0.27	56.23	0.03	65.51	0.85				
0.49	0.08	0.58	0.35	65.51	0.11	76.32	0.95				
0.58	0.05	0.67	0.40	76.32	0.31	88.91	1.26				
0.67	0.03	0.78	0.43	88.91	0.93	103.58	2.19				
0.78	0.02	0.91	0.45	103.58	2.82	120.67	5.01				
0.91	0.02	1.06	0.46	120.67	7.76	140.58	12.77				
1.06	0.02	1.24	0.48	140.58	15.40	163.77	28.16				
1.24	0.03	1.44	0.51	163.77	20.07	190.80	48.23				
1.44	0.04	1.68	0.56	190.80	19.38	222.28	67.61				
1.68	0.04	1.95	0.60	222.28	14.10	258.95	81.72				
1.95	0.05	2.26	0.65	258.95	9.18	301.68	90.90				
2.28	0.05	2.65	0.70	301.68	5.30	351.46	96.20				
2.65	0.04	3.09	0.74	351.46	2.71	409.45	98.90				
3.09	0.03	3.60	0.76	409.45	1.10	477.01	100.00				
3.60	0.02	4.19	0.78	477.01	0.00	555.71	100.00				
4.19	0.01	4.88	0.79	555.71	0.00	647.41	100.00				
4.88	0.01	5.69	0.80	647.41	0.00	754.23	100.00				
5.69	0.00	6.63	0.80	754.23	0.00	878.67	100.00				



Malvern Instruments Ltd
Malvern, UK
Tel: +(44) (0)1684 892456 Fax: +(44) (0)1684 892789

Mastercam S Ver. 2.18
Serial Number 33544-187

03 Dec 99 14 11