

TRANSFERT D'OXYGÈNE DANS LES BIOREACTEURS

Enseignante référente : Nakry PEN (Nakry.Pen@univ-lorraine.fr)

Consignes de sécurité propres à ce TP :

- Le matériel (cuve en verre, agitateur en acier inoxydable et barboteur) est fragile : le nettoyage doit être réalisé avec précaution.
- Le bullage de l'air sortant du réacteur étant réalisé dans de l'eau de Javel, il faut veiller à ne pas renverser l'erlenmeyer et à porter des gants et des lunettes en cas de besoin de déplacer l'erlenmeyer.

Pré-requis :

- Module Cinétique et mise en œuvre de réacteurs, cours "Aération des réacteurs microbiologiques", ENSAIA, 1^{re} année IA, Isabelle CHEVALOT.
- Module Thermodynamique pour la sobriété énergétique, Cours "Equilibres liquide-vapeur de mélanges binaires", ENSAIA, 1^{re} année IA, Jérémy PETIT.

1. INTRODUCTION ET OBJECTIFS

Les procédés de culture de cellules animales, végétales et les procédés fermentaires (bactéries, levures, champignons) sont très utilisés aussi bien dans les industries alimentaires (production de levures), pharmaceutiques (production de protéines recombinantes, antibiotiques) ou environnementales (traitement des eaux usées). Dans la plupart de ces procédés, les conditions de culture sont aérobies, c'est-à-dire qu'un apport en oxygène est nécessaire pour assurer la maintenance, la croissance et la production. C'est souvent un des facteurs limitant de la bonne conduite d'un procédé à grande échelle, ce qui nécessite donc une attention particulière à la conception et la conduite de l'aération dans ces réacteurs.

L'objectif de ce TP est de quantifier le transfert d'oxygène dans un bioréacteur en fonction des conditions opératoires. Pour cela, il faudra :

- Mesurer la vitesse de consommation de l'oxygène d'une souche de levures ;
- Déterminer le coefficient volumique de transfert d'oxygène ($k_L a$) en fonction du débit de gaz et de la vitesse d'agitation.

2. CONCEPTS THEORIQUES

A. THEORIE DU K_{LA}

L'oxygène est présent dans un milieu de culture sous forme dissoute. Il est possible de dissoudre une quantité finie d'oxygène dans un liquide, c'est la concentration à la saturation ou solubilité, généralement notée O_2^* . L'apport d'oxygène étant réalisé par des bulles de gaz, cette concentration limite peut être obtenue par la loi de Henry (eq. 1) qui relie la pression partielle en oxygène dans la bulle de gaz à la fraction molaire d'oxygène dans le liquide (x_{O_2}).

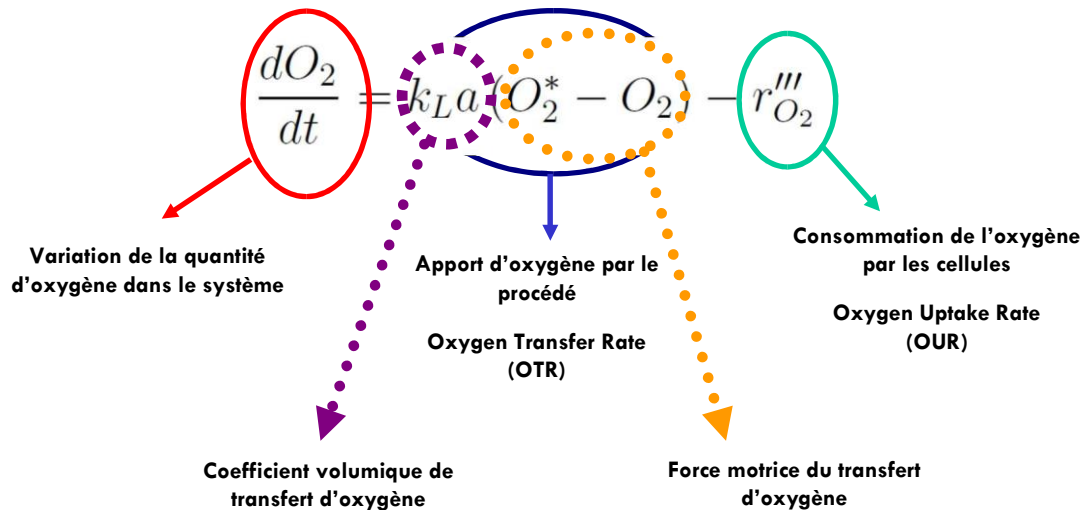
$$p_{O_2} = k_H \times x_{O_2} \quad (\text{eq. 1})$$

La constante de Henry k_H dépend de la température et vaut $5,07 \times 10^4$ atm à 30 °C. La pression partielle en oxygène (p_{O_2}) dépend de la proportion d'oxygène (y_{O_2}) dans le gaz injecté à une pression totale P_t (eq. 2). On peut montrer par ce calcul que la concentration à la saturation est très faible, ce qui implique que les stocks d'oxygène dans un milieu de culture peuvent être rapidement consommés, en particulier avec des biocatalyseurs très demandeurs, comme les levures ou les bactéries. Ceci confirme la nécessité d'attacher une attention particulière à l'aération.

$$p_{O_2} = P_t \times y_{O_2} \quad (\text{eq. 2})$$

B. BILAN EN OXYGENE

Le bilan en oxygène dans le bioréacteur est donné par la relation suivante :



L'oxygène est donc apporté par le procédé (OTR) ou bien consommé par les microorganismes (OUR).

3. MATERIEL ET METHODES

A. CALCUL THEORIQUE DU $k_L a$ PAR LES CORRELATIONS SEMI-EMPIRIQUES

Il n'est pas toujours possible de réaliser des mesures expérimentales de coefficient volumique de transfert d'oxygène, on utilisera alors les corrélations semi-empiriques fournies par la littérature. La forme générale des corrélations fournissant le $k_L a$ est la suivante :

$$k_L a = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^\alpha U_g^\beta$$

Annotations:

- U_g : Vitesse superficielle de gaz ($m \cdot s^{-1}$). U_g = débit volumique de gaz / aire de la section du réacteur.
- $\frac{P_g}{V}$: Puissance dissipée par unité de volume ($W \cdot m^{-3}$).

A est une constante qui ne dépend que des conditions opératoires et de la composition du milieu, α et β sont deux constantes qui dépendent du mobile d'agitation et du système d'aération choisi.

Pour une turbine Rushton, on peut utiliser l'équation de Van't Riet (eq. 3 et 4) :

Dans l'eau :

$$k_L a = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,4} U_g^{0,5} \quad (\text{eq. 3})$$

Dans un milieu aqueux en présence d'ions :

$$k_L a = A \left(\frac{P_g}{V} \right)^{0,7} U_g^{0,2} \quad (\text{eq. 4})$$

Avec :

- A est prise égale à $2,6 \times 10^{-2}$ et 2×10^{-3} pour une aération par fritté (cuve de 1,8 L) pour l'eau et le milieu aqueux en présence d'ions, respectivement.
- U_g est la vitesse superficielle du gaz ($m \cdot s^{-1}$).
- P_g est la puissance dissipée lorsque le système est en aération. Cette puissance peut être obtenue à partir de la puissance dissipée en l'absence d'aération (P_0) qui se calcule avec l'eq. 5.

$$Re \left(= \frac{\rho N D^2}{\mu} \right) > 10^4 \Rightarrow P_0 = N_p \rho N^3 D^5 \quad (\text{eq. 5})$$

Avec :

- N_p le nombre de puissance qui vaut 3 pour une turbine Rushton dans une cuve non-chicanée (réacteur de 1,8 L).
- N est la vitesse d'agitation (en $\text{tour}\cdot\text{s}^{-1}$) D est le diamètre de l'agitateur (m).
- ρ ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) et μ ($\text{Pa}\cdot\text{s}$) sont respectivement la masse volumique et la viscosité dynamique du milieu de culture qu'on supposera identiques à celles de l'eau.

Le calcul de la puissance en aération découle de la relation de Michel et Miller (eq. 6) :

$$P_g = P_0 \times 0,1 \times \left(\frac{Q}{N \times V} \right)^{-0,25} \times \left(\frac{N^2 \times D^4}{g \times w \times V^{0,67}} \right)^{-0,2} \quad (\text{eq. 6})$$

Avec :

- w (m) est la largeur des pales Rushton.
- V (m^3) est le volume fluide.
- Q ($\text{m}^3\cdot\text{s}^{-1}$) est le débit de gaz.

Attention : Si deux mobiles sont utilisés, il faut multiplier cette puissance dissipée par 2 même s'ils sont entraînés par le même axe d'agitation (ce qui est une approximation).

B. CALCUL EXPERIMENTAL DU K_La PAR LA METHODE DYNAMIQUE

Un bioréacteur Biolafitte d'un volume utile de 1,8 L est utilisé. Ses principales dimensions sont regroupées sur la Figure 1. Il est muni de deux turbines Rushton qui assurent l'agitation et la dispersion des bulles ainsi que d'un distributeur de gaz poreux assurant une aération sous forme de bulles. Une sonde à oxygène dynamique polarographique permet d'accéder à la concentration locale instantanée d'oxygène dissous. Son temps de réponse est court devant le coefficient de transfert d'oxygène ce qui permet de l'utiliser facilement pour la détermination expérimentale du coefficient de transfert d'oxygène. Attention, cette sonde fournit la concentration relative en oxygène, c'est-à-dire la proportion exprimée en pourcentage de la valeur à la saturation. Une double enveloppe d'eau reliée à un bain thermostaté permet la régulation de la température à 32 °C. Le microorganisme utilisé est la levure de panification *Saccharomyces cerevisiae*. La concentration à l'ensemencement est de 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$.

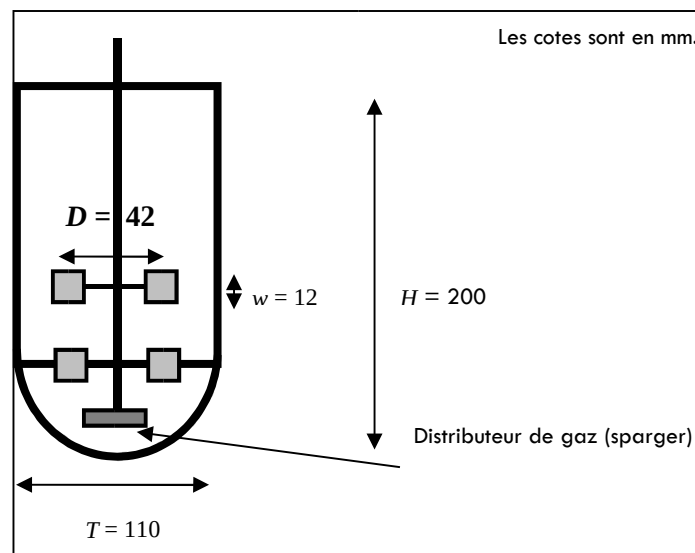


Figure 1. Réacteur de 1,8 L utilisé pour la méthode dynamique.

La méthode dynamique consiste à imposer un arrêt temporaire de l'aération dans un bioréacteur en présence de microorganismes pour provoquer une chute de la concentration en oxygène et à effectuer un

relevé temporel de la concentration en oxygène. C'est la plus utilisée car elle permet de mesurer le k_La pendant une fermentation. Elle se décompose donc en une phase de consommation seule (phase I) et une phase d'aération + consommation (phase II) comme le montre la Figure 2.

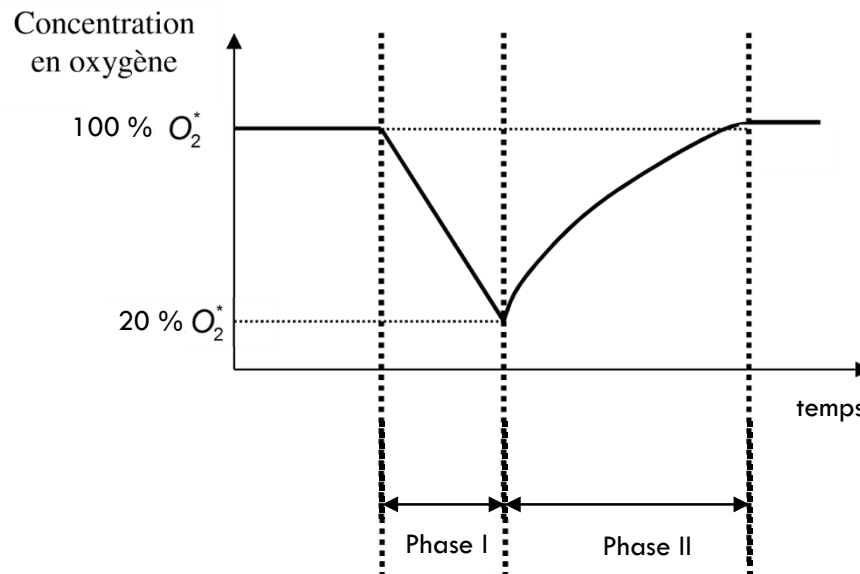


Figure 2. Evolution de la consommation de l'oxygène en fonction du temps lors de la méthode dynamique.

❖ Phase I

Partons de la saturation en oxygène et coupons l'aération. En l'absence d'aération, la quantité d'oxygène apportée par le procédé devient nulle ($OTR = 0$), donc le bilan en oxygène devient (eq. 7) :

$$\frac{dO_2}{dt} = -r_{O_2}''' \quad (\text{eq. 7})$$

On observe ainsi une décroissance de la concentration en oxygène. On restera à des concentrations supérieures à 20 % afin de maintenir les levures dans la phase de croissance. Des concentrations inférieures risqueraient d'activer le cycle fermentaire de la levure (production d'éthanol). L'interpolation linéaire des points expérimentaux fournit donc, dans cette première phase, la vitesse de consommation volumique r_{O_2}''' .

❖ Phase II

Lorsque l'aération est remise en marche, on observe une augmentation de la concentration en oxygène dans le milieu. Le bilan en oxygène devient :

$$\frac{dO_2}{dt} = k_La(O_2^* - O_2) - r_{O_2}''' \quad (\text{eq. 8})$$

Cette relation est réécrite sous la forme suivante :

$$O_2 = O_2^* - \frac{1}{k_La} \left(\frac{dO_2}{dt} + r_{O_2}''' \right) \quad (\text{eq. 9})$$

L'interpolation linéaire du tracé de $O_2 = f\left(\frac{dO_2}{dt} + r_{O_2}'''\right)$ fournit une droite de pente $-\frac{1}{k_La}$.

C. DEROULEMENT

Les mesures expérimentales sont à réaliser une heure après l'ensemencement de la levure avec les conditions opératoires regroupées dans le Tableau 1 ci-après. Le déroulement de la mesure est réalisé comme suit :

- Arrêter l'apport en oxygène et déclencher le chronomètre (t_0).
- Mesurer le taux d'oxygène dans le bioréacteur toutes les 10 s jusqu'à atteindre un taux de 20 %.
- Remettre immédiatement l'apport en oxygène.
- Mesurer le taux d'oxygène dans le bioréacteur toutes les 10 s jusqu'à atteindre une valeur stable et arrêter le chronomètre.

Tableau 1. Conditions expérimentales.

Temps	Débit d'oxygène (L·h ⁻¹)	Vitesse d'agitation (tr·min ⁻¹)
0 h (ensemencement par la levure)	250	700
1 h	250	700
1 h 30	250	700
Entre 1 h 30 et 2 h 30	100	700
	175	700
	250	600
	250	800

D. CALCUL EXPERIMENTAL DU k_{La} PAR D'AUTRES METHODES

- Méthode statique. Elle est très similaire à la méthode dynamique mais est utilisée sans microorganismes. La phase I est remplacée par une phase d'injection d'un gaz inerte, généralement de l'azote. La phase II est similaire à celle d'une méthode dynamique mais avec une consommation nulle.
- La méthode aux sulfites. Elle est basée sur la réaction d'oxydation des sulfites en sulfates en présence d'oxygène.
- La méthode à la glucose-oxydase. Elle est basée sur la réaction d'oxydation du glucose en acide gluconique en présence d'oxygène.
- La méthode par bilans gazeux. Cette méthode est complexe et nécessite plus d'appareillage. Elle permet néanmoins une mesure en ligne du coefficient de transfert d'oxygène et s'avère utile en cas de risque de modification de celui-ci au cours du procédé (augmentation de viscosité par exemple).

4. EXPLOITATION DES RESULTATS

Relever la quantité d'eau consommée lors du TP et remplir l'Excel du projet Val-EAU (onglet k_{La}).

En se basant sur la loi de Henry, déterminer la concentration massique en oxygène à la saturation (O_2^*) en g·L⁻¹.

Déterminer pour chacune des conditions opératoires le k_{La} :

- ❖ Par la méthode théorique en utilisant l'équation de Van't Riet.
- ❖ Par la méthode expérimentale :
 - En absence d'oxygène (phase 1) : Tracer $O_2(g \cdot L^{-1}) = f(t)$. Déduire le r_{O_2}''' .
 - En présence d'oxygène (phase 2) : Tracer $O_2(g \cdot L^{-1}) = f\left(\frac{dO_2}{dt} + r_{O_2}'''\right)$. Déduire le k_{La} .

On interprétera alors les résultats obtenus :

- Commenter la valeur de O_2^* .
- Comparer les valeurs expérimentales de k_{La} à celles prédites par la corrélation de Van't Riet.
- Interpréter la différence observée entre la valeur du k_{La} à 1 h et celle à 1 h 30.
- Interpréter l'effet des paramètres du procédé (vitesse d'agitation et débit d'oxygène) sur les variations du k_{La} .
- Discuter les tendances observées et la répétabilité des mesures.

Réaliser et envoyer par mail à l'enseignant encadrant (cf. mail en début d'énoncé) dans les 7 jours (weekend inclus, vacances et jours fériés inclus) suivant la date du TP. Le fichier Excel devra regrouper les résultats des différentes expériences et contenir les formules de calcul (paramétrisation des calculs, conversion automatique des unités), et être clair et synthétique.

5. NOMENCLATURE

Variables

U_g	Vitesse superficielle de gaz	($\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)
P_g	Puissance dissipée pour un système en aération	(W)
P_0	Puissance dissipée en l'absence d'aération	(W)
N	Vitesse d'agitation	($\text{tour}\cdot\text{s}^{-1}$)
D	Diamètre de l'agitateur	(m)
ρ	Masse volumique du milieu de culture	($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$)
μ	Viscosité dynamique du milieu de culture	($\text{Pa}\cdot\text{s}$)
r_{O_2}'''	Consommation de l'oxygène par les microorganismes	($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$)
k_{La}	Coefficient volumique de transfert d'oxygène	(s^{-1})
O_2^*	Concentration à la saturation de l'oxygène	($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

Nombre(s) adimensionnel(s)

Re	Reynolds	(-)
------	----------	-----

6. ANNEXE

