

UNIVERSITÉ DE LIÈGE

Faculté des Sciences Appliquées

Laboratoire de Génie Chimique

**INFLUENCE DE L'HYDRODYNAMIQUE
SUR LA MORPHOLOGIE D'UNE BACTÉRIE FILAMENTEUSE
DANS UN FERMENTEUR À CUVE AGITÉE
MÉCANIQUEMENT**

Sylvie GROSLAMBERT

Thèse présentée en vue de
l'obtention du grade de
Docteur en Sciences Appliquées

2001

à mon père

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Génie Chimique de l'Université de Liège. Il constitue un travail multidisciplinaire qui s'inscrit dans les divers domaines d'expertise de ce laboratoire.

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur Michel Crine pour la confiance qu'il m'a accordée en m'offrant la possibilité d'effectuer un doctorat au sein de son service, pour les conseils et encouragements qu'il m'a prodigués, ainsi que pour sa patience.

Je remercie le Professeur Guy L'Homme de l'honneur qu'il me fait en acceptant de présider ce jury de thèse.

Ma plus profonde gratitude va également à Madame le Docteur Silvia Blacher. Sa grande compétence en analyse d'images a permis le développement de l'algorithme d'analyse d'images sans lequel ce travail n'aurait pu aboutir.

Je remercie également le Professeur Jean-Marie Frère, ainsi que les chercheurs et les techniciens du Centre d'Ingénierie des Protéines de l'Université de Liège pour l'accueil chaleureux qu'ils m'ont réservé dans leur laboratoire et pour l'aide qu'ils m'ont prodiguée pour tout ce qui concerne le domaine de la microbiologie. J'associe le Docteur Benoît Granier à ces remerciements pour m'avoir fait profiter de sa grande expérience des procédés de fermentation et de ses précieux conseils.

Je voudrais remercier également le Professeur Jean-Paul Pirard pour l'intérêt qu'il a apporté à ce travail et pour le temps qu'il a consacré à la relecture de ce manuscrit.

Je remercie le Docteur René Pirard pour son aide dans le domaine de la rhéologie.

Je remercie également le Docteur Pierre Marchot pour son aide et ses conseils judicieux lors de la modélisation de l'hydrodynamique.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans les compétences techniques et le savoir-faire de Messieurs Marc De Bruyn, Jean-Paul Deschamps et Frédéric Fyon. Je les en remercie.

Je remercie du fond du cœur Monsieur Thierry Salmon pour son amitié et le soutien de tous les instants qu'il m'a apporté au long de la réalisation de ce doctorat. Que tous les autres membres du laboratoire de Génie Chimique trouvent ici l'expression de ma gratitude pour leurs encouragements et leur disponibilité.

Mes sincères remerciements vont également à Mesdames et Messieurs les membres de jury pour le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à la lecture et à l'évaluation de ce travail, et plus particulièrement aux membres extérieurs à l'Université de Liège, qui ont accepté de se déplacer jusqu'à Liège pour assister à la présentation de cette thèse.

Enfin, je voudrais remercier ma mère et les membres de ma famille pour leur soutien, leur compréhension et leurs encouragements tout au long de ce travail, ainsi que tous ceux et celles qui, de près ou de loin, m'ont apporté leur amitié et leur assistance.

PLAN DU TRAVAIL

Résumé

Chapitre I : Fermentation & stress hydrodynamique

Annexe I : Milieux de culture

Chapitre II : Rhéologie

Annexe II : Programme d'ajustement paramétrique

Chapitre III : Hydrodynamique d'un fermenteur à cuve agitée mécaniquement

Annexe III.1 : Programme de modélisation du fermenteur

Annexe III.2 : Modèles compartimentés

Chapitre IV : Morphologie

Annexe IV.1 : Notions d'analyse d'images

Annexe IV.2 : Routine d'analyse d'images pour Visilog 5.0

Annexe IV.3 : Grandeurs caractéristiques de l'hydrodynamique

**Annexe IV.4 : Influence des conditions hydrodynamiques sur la morphologie
(compléments)**

Conclusions et perspectives

RÉSUMÉ

Depuis que l'homme a découvert les applications potentielles de la culture des micro-organismes, il a cherché à mettre en place les conditions optimales à leur développement ou leur mise en œuvre. Pour croître, se multiplier et produire, un micro-organisme a notamment besoin de nourriture, fournie par le milieu nutritif qui doit être mise à sa disposition de façon optimale (ni trop ni trop peu, afin d'éviter inhibition ou famine). Un autre besoin est un environnement adapté à son métabolisme, tant du point de vue de la température que du pH, par exemple. Enfin, pour ceux qui ont un métabolisme aérobie, de l'oxygène doit être disponible en quantité suffisante. L'obtention de ces conditions nécessite la conception de dispositifs capables d'assurer des transferts de matière et de chaleur telles que ce soient les caractéristiques intrinsèques de la population microbienne qui déterminent les cinétiques du procédé. Le processus de mélange permet de réduire les gradients au sein du fermenteur et d'optimiser ces transferts. Cependant, les contraintes mécaniques générées par l'agitation peuvent avoir des conséquences négatives sur le développement de certains micro-organismes plus ou moins fragiles, plus particulièrement les micro-organismes filamenteux et les cellules animales et végétales.

La vitesse de réaction observée pour un organisme particulier dépend à la fois de la nature de l'environnement physico-chimique et de l'hydrodynamique dans le voisinage immédiat de l'organisme. En général, on peut s'attendre à ce que les deux varient dans l'espace et dans le temps. L'intensité de ces variations dépend des conditions de mélange qui, pour une configuration de fermenteur et des conditions de culture données, dépendent fortement des propriétés rhéologiques de la culture. Ces dernières sont à leur tour fonction de la morphologie du micro-organisme, dépendance d'autant plus marquée dans le cas d'une souche filamenteuse qui peut pousser sous forme de pelotes ou de filaments. La morphologie développée sera elle-même fonction des conditions physico-chimiques de culture, ainsi que de l'hydrodynamique du fermenteur. Un milieu visqueux non-newtonien (tel que rencontré dans le cas des cultures de micro-organismes filamenteux) induit généralement des hétérogénéités (par exemple des zones stagnantes) qui résultent en de faibles performances par diminution du rendement ou de la productivité. L'état de mélange optimum pour un fermenteur est dès lors une homogénéité parfaite. On peut constater que le problème est complexe et que les différents paramètres interagissent les uns avec les autres. C'est pourquoi une amélioration des performances des fermentations doit reposer sur une analyse de l'ensemble des phénomènes évoqués ci-dessus, utilisant les outils du génie chimique.

L'organigramme de la Figure 1 présente les relations complexes reliant la rhéologie, la morphologie et les conditions opératoires rencontrées lors d'une fermentation.

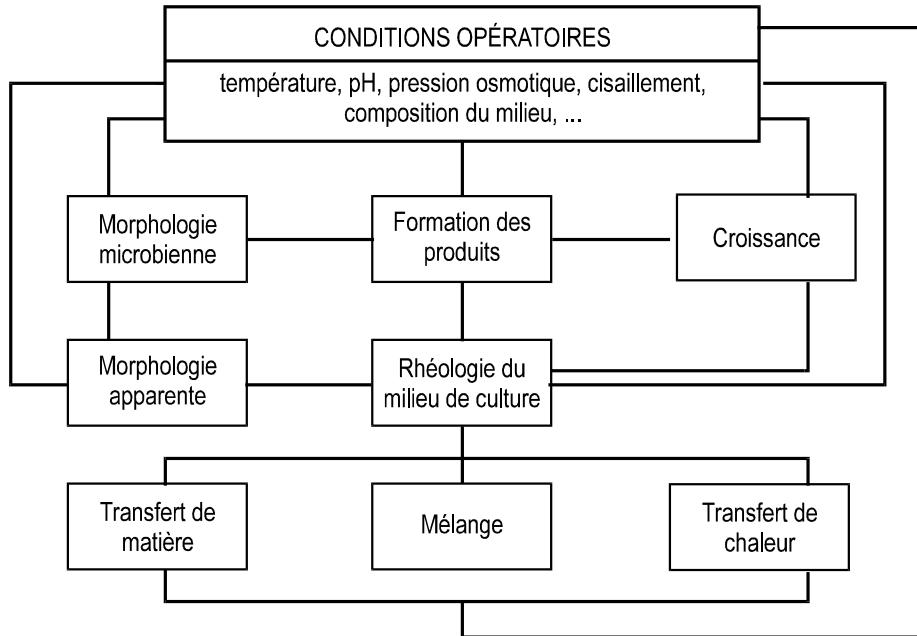


Figure 1 : Relations entre la rhéologie, la morphologie et les conditions opératoires

Le but de ce travail est d'étudier l'influence de l'hydrodynamique d'un fermenteur de laboratoire à cuve agitée mécaniquement sur la croissance et la morphologie d'une bactérie filamentuse. Les micro-organismes filamentueux sont réputés pour être particulièrement sensibles au stress hydrodynamique, qui est le terme générique utilisé pour décrire les dommages causés par l'agitation. De plus, ces micro-organismes sont largement utilisés dans des applications industrielles, puisque 80% des antibiotiques sont produits par ce type d'organismes, ainsi que des produits tels que l'acide citrique. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier les réponses d'une bactérie filamentuse à divers niveaux de stress. Les variables utilisées pour modifier les conditions hydrodynamiques lors de cultures sont de deux types : la nature du mobile d'agitation et sa vitesse de rotation. Notre choix s'est porté sur des mobiles à écoulement radial – les turbines Rushton – et à écoulement axial-mixte – les Intermig.

Ce travail est divisé en quatre parties qui reflètent le caractère multidisciplinaire de l'étude : fermentation, rhéologie, hydrodynamique et morphologie. Chacune de ces parties comporte une étude bibliographique, une description des techniques et du matériel utilisés, ainsi que les résultats expérimentaux et leur exploitation.

Le chapitre I de ce travail décrit les **fermentations** elles-mêmes. Il comporte tout d'abord une phase de sélection de la souche sensible au stress hydrodynamique. La mise au point d'un milieu nutritif simplifié (mais performant) par la méthodologie des plans statistiques d'expériences constitue la deuxième étape préliminaire aux fermentations proprement dites. La souche et le milieu sont utilisés pour des cultures dans différentes conditions hydrodynamiques, modifiées par le changement du type de mobile d'agitation et de sa vitesse de rotation. Les deux types de mobiles d'agitation ayant des diamètres différents (56 mm pour les turbines Rushton et 102 mm pour les Intermig), la grandeur de référence choisie pour pouvoir comparer les fermentations est la vitesse périphérique des pales. La mesure de la biomasse produite permet d'évaluer les conséquences des modifications des conditions hydrodynamiques du fermenteur sur la croissance de cette bactérie filamenteuse. L'influence de la concentration en oxygène dissous et de la quantité d'inoculum introduite dans le fermenteur sont également estimées. Des échantillons prélevés lors de la fermentation (à un moment correspondant au minimum de la concentration en oxygène dissous) sont conservés pour l'étude de la morphologie.

Le chapitre II est consacré à l'étude de la **rhéologie** de la culture mycéienne, qui est un paramètre essentiel pour la description et la compréhension des phénomènes hydrodynamiques qui prennent place dans une cuve agitée. La rhéologie du milieu de fermentation est mesurée et modélisée. Cette connaissance permet la mise au point d'un milieu artificiel reproduisant les caractéristiques rhéologiques de la fermentation qui nous occupe afin de pouvoir mener à bien l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur sans les contraintes que représentent la manipulation d'un milieu opaque et contenant des micro-organismes.

Le chapitre III est consacré à l'étude de l'**hydrodynamique** du fermenteur à cuve agitée mécaniquement. Le phénomène de macro-mélange dans le milieu artificiel est quantifié par la technique des essais de traceur et par le calcul du temps de mélange. Les résultats sont modélisés par un système multi-compartimenté avec ajustement sur les essais de traceurs des paramètres décrivant les écoulements. Ces paramètres sont eux-mêmes reliés aux conditions d'agitation. Le temps de mélange est exprimé en fonction à la fois des conditions d'agitation et des paramètres du modèle. Une autre grandeur importante pour la caractérisation de l'hydrodynamique est la puissance dissipée lors de l'opération de mélange. Elle est mesurée dans le milieu artificiel avec et sans aération. Le nombre de puissance en régime turbulent est calculé pour chacun des mobiles.

Dans **le chapitre IV**, l'outil qui permet de décrire quantitativement la **morphologie** de la bactérie filamenteuse est présenté : il s'agit de l'analyse d'images. Il permet de mesurer divers paramètres

morphologiques sur les échantillons prélevés lors des fermentations. Les micro-organismes se présentent essentiellement sous forme de pelotes et agrégats filamentueux et sont caractérisés par l'aire des objets, leur périmètre, les diamètres de Féret maximum et minimum, le nombre de trous et la circularité. Notre objectif est de pouvoir relier ces grandeurs morphologiques aux conditions d'agitations imposées lors des cultures et aux résultats obtenus lors de l'étude de l'hydrodynamique, indépendamment du type de mobile utilisé. Ceci doit permettre de mettre en relief les grandeurs caractéristiques de l'hydrodynamique qui sont responsables des modifications de la morphologie.

Nous terminerons bien entendu par les **conclusions** de ce travail et quelques **perspectives** d'application de la méthodologie mise au point dans ce travail.

Chapitre I

FERMENTATION & STRESS HYDRODYNAMIQUE

1. INTRODUCTION.....	1
2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
2.1. LES MICRO-ORGANISMES FILAMENTEUX	2
2.2. LA CULTURE AÉROBIE DES MICRO-ORGANISMES (FILAMENTEUX)	4
2.3. L'OXYGÉNATION.....	5
2.4. LE STRESS HYDRODYNAMIQUE.....	6
2.5. LES EFFETS DU STRESS HYDRODYNAMIQUE SUR LES MICRO-ORGANISMES FILAMENTEUX	8
2.5.1. Les effets du stress hydrodynamique sur la croissance.....	8
2.5.2. Les effets du stress hydrodynamique sur la morphologie	10
2.5.2.1. Le cas des filaments.....	10
2.5.2.2. Le cas des pelotes	11
2.6. LES CAUSES DE DÉTÉRIORATION DES MICRO-ORGANISMES.....	12
2.6.1. Le cisaillement	12
2.6.1.1. La vitesse de cisaillement maximale et la vitesse périphérique des pales	13
2.6.1.2. La vitesse de cisaillement moyenne.....	14
2.6.1.3. Le facteur de cisaillement intégré (ISF).....	14
2.6.2. La puissance dissipée	15
2.6.2.1. La puissance spécifique moyenne.....	15
2.6.2.2. La puissance spécifique maximale.....	16
2.6.2.3. L'importance de la géométrie des mobiles	16
2.6.3. La fréquence de passage dans la zone du mobile.....	17
2.6.4. La combinaison de la puissance spécifique moyenne et de la circulation.....	17
2.6.5. Les micro-tourbillons et les tensions turbulentes de Kolmogoroff	17
2.6.6. Les chocs	19
2.6.7. L'aération	19
2.6.8. La viscosité	19
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	21
3.1. LES MÉTHODES DE DOSAGE	21
3.1.1. Le poids sec	21
3.1.2. L'amidon	21
3.2. LE FERMENTEUR.....	23
3.2.1. Le dispositif d'agitation.....	24
3.2.2. La géométrie de la cuve	24
3.2.3. Les périphériques	25
3.2.4. La stérilisation.....	27
4. MISE AU POINT DES FERMENTATIONS	29
4.1. LA SÉLECTION DE LA SOUCHE.....	29
4.1.1. Les souches testées	29
4.1.2. Les conditions du test.....	29
4.1.3. L'inoculum et milieu de culture pour la sélection de la souche.....	30
4.1.4. La biomasse obtenue dans les différentes conditions.....	30
4.1.5. L'analyse des résultats.....	31
4.2. LA STANDARDISATION DES INOCULUMS	32
4.3. LA MISE AU POINT D'UN MILIEU DE CULTURE.....	33
4.3.1. Les plans d'expériences.....	33
4.3.1.1. Introduction	33
4.3.1.2. La taille du plan d'expériences	36
4.3.1.3. La phase de sélection des variables	37
4.3.1.4. L'évaluation des effets principaux <i>MI</i>	39
4.3.1.5. L'estimation des interactions.....	39
4.3.1.6. La signification des résultats.....	40

4.3.1.7.	L'estimation de l'erreur expérimentale	40
4.3.1.8.	La phase d'optimisation	41
4.3.2.	Le choix des composants du milieu de culture	42
4.3.3.	La mise en œuvre d'un premier plan de discrimination des variables	43
4.3.3.1.	Les résultats après 24 heures	45
4.3.3.2.	Les résultats après 46.5 heures	46
4.3.3.3.	L'interprétation des résultats du premier plan de discrimination des variables	47
4.3.4.	Le second plan de discrimination des variables	48
4.3.4.1.	Les résultats après 24 heures	49
4.3.4.2.	Les résultats après 47 heures	51
4.3.4.3.	L'interprétation des résultats	52
4.3.5.	L'optimisation du milieu de culture	53
4.3.5.1.	L'analyse des résultats après 22 heures de culture	55
4.3.5.2.	L'analyse des résultats après 47 heures de culture	55
4.3.5.3.	La composition du milieu optimisé	55
4.4.	LES CONCLUSIONS SUR LA MISE AU POINT PRÉLIMINAIRE AUX FERMENTATIONS	56
5.	FERMENTATIONS	57
5.1.	LA PRÉPARATION DE L'INOCULUM	57
5.2.	LES CONDITIONS DE FERMENTATION	57
5.3.	LE SUIVI DES FERMENTATIONS	59
5.4.	LES RÉSULTATS DES FERMENTATIONS : LE POIDS SEC	60
5.4.1.	La reproductibilité	60
5.4.2.	L'influence de la concentration en oxygène dissous	61
5.4.3.	L'influence du taux d'inoculation	63
5.4.4.	L'influence de la vitesse d'agitation	64
5.4.5.	L'influence du type de mobile	64
6.	CONCLUSIONS SUR LES FERMENTATIONS ET LE STRESS HYDRODYNAMIQUE	67
7.	BIBLIOGRAPHIE	68
8.	SYMBOLES	73

Chapitre I

FERMENTATION & STRESS HYDRODYNAMIQUE

1 Introduction

L'opération de mélange est une étape particulièrement importante dans la conception d'un bioréacteur. Par le biais de l'agitation, elle gouverne les transferts de matière, de chaleur et de quantité de mouvement. En contre-partie, la turbulence engendrée risque d'entraîner la destruction des micro-organismes.

Dans ce chapitre, nous présenterons les micro-organismes filamentueux, ainsi que les conséquences que peuvent avoir sur eux les conditions de fermentation, notamment les inconvénients liés aux contraintes physiques générées par l'agitation et qui sont regroupés sous le terme générique de *stress hydrodynamique*. Nous étudierons tout d'abord ce que la littérature renferme sur le sujet, que ce soit au niveau des causes de dommages ou des conséquences sur les micro-organismes filamentueux.

Nous présenterons ensuite la base expérimentale de ce travail : la collecte de données sur l'influence du stress hydrodynamique sur une bactérie filamentueuse. Nous avons tout d'abord sélectionné une souche sensible aux effets de l'agitation. L'inoculum de la souche choisie a été standardisé afin de ne pas introduire d'élément non contrôlé (tel qu'une dégénérescence de la souche, ou une concentration différence de l'inoculum) et de favoriser au maximum la reproductibilité des expériences. Nous avons ensuite mis au point et optimisé un milieu de culture simple en ayant recours aux plans statistiques d'expériences. Des cultures ont été menées dans un fermenteur de laboratoire de cinq litres utiles et à agitation mécanique, qui a été équipé successivement de deux types de mobiles d'agitation entraînant des schémas d'écoulement de nature différente. Les fermentations se sont déroulées à plusieurs vitesses de rotation, en prenant comme grandeur de référence la vitesse périphérique des pales du mobile d'agitation.

Nous présenterons ensuite les résultats de ces expériences en termes de biomasse produite. Les conséquences du stress hydrodynamique sur la morphologie des bactéries filamentueuses seront exposées au Chapitre IV : *Analyse d'images*.

2 Étude bibliographique

2.1 Les micro-organismes filamenteux

Les fermentations aérobies d'organismes filamenteux couvrent une large gamme de procédés industriels importants (Cooke *et al.*, 1988) : de nombreuses variétés de *Streptomyces* (bactéries) ou de *Penicillium* (moisissures) sont utilisées pour la production d'antibiotiques, *Aspergillus niger* produit de l'acide citrique, d'autres micro-organismes servent pour les productions d'enzymes ou d'acides organiques (Mitard and Riba, 1988).

Les micro-organismes filamenteux sont caractérisés par un grand rapport longueur sur largeur (contrairement aux bacilles en forme de bâtonnets ou aux coques et levures sphériques). Ils se présentent sous forme de *filaments* ramifiés ou non, qui croissent sous forme dispersée (Figure 1a) ou en *pelotes* (Figure 1b et c). Les pelotes les moins compactes (Figure 1b) sont nommées *agrégats* ou *enchevêtements*. Ces agrégats ne peuvent être défaits facilement, même sous l'action de vigoureux traitements physiques et chimiques (Justen *et al.*, 1996), et conservent leur structure lors de la dilution : il ne s'agit pas d'un artefact dû à un recouvrement de filaments du fait d'une trop forte concentration dans le champ du microscope (Tucker and Thomas, 1993). Ils ne se désagrègent pas, à moins du bris des *hyphes* (qui sont les filaments composés de cellules placées bout à bout, constitutifs du mycélium – c'est-à-dire l'appareil végétatif – des micro-organismes filamenteux). Chacune de ces formes a ses propres caractéristiques en terme de cinétiques de croissance, de consommation d'oxygène ou de rhéologie (Mitard and Riba, 1988; Caussette *et al.*, 1997).

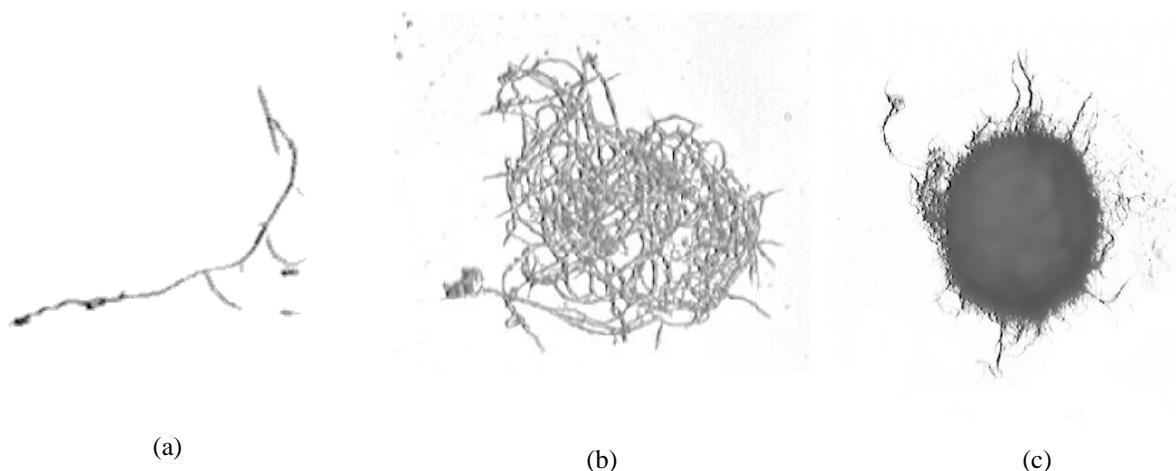


Figure 1 : Différentes morphologies d'*Actinomadura* R39 : (a) filament ramifié, (b) agrégat, (c) pelote

La morphologie a des conséquences non négligeables sur la conception et la conduite des procédés de fermentation en influençant la viscosité et donc le mélange des milieux de fermentation. Les suspensions de micro-organismes filamenteux sont généralement visqueuses et non-newtoniennes, et la croissance sous forme d'hyphes augmente considérablement la viscosité (Berovic *et al.*, 1993). Ce problème sera abordé au *Chapitre II : Rhéologie*.

Le type de morphologie privilégié lors de la croissance dépend d'un grand nombre de variables : la nature de la souche, le type d'inoculum (spores ou cellules en croissance) et sa concentration, les conditions de préculture ou de culture, ainsi que l'âge des micro-organismes. Par exemple, la taille des hyphes et la fréquence de branchement de *Penicillium chrysogenum* diminuent avec l'âge (Schugerl *et al.*, 1988). On notera que certaines productions sont liées à une morphologie spécifique, notamment pour certains métabolites fongiques (Cui *et al.*, 1997; Paul and Thomas, 1997).

Le lien entre la productivité et la morphologie sous l'action de différents agitateurs est encore assez mal compris (Justen *et al.*, 1996), et on n'a pu établir de corrélation entre la vitesse de croissance et la morphologie (Olsvik and Kristiansen, 1992; Smith *et al.*, 1990). Ceci peut notamment être expliqué par le fait que les méthodes utilisées pour faire varier la vitesse de croissance - en modifiant les conditions de culture - diffèrent d'un auteur à l'autre (Metz *et al.*, 1979) et que ce sont sans doute celles-ci qui influencent la morphologie **et** la croissance simultanément.

La concentration en oxygène dissous influence également la morphologie en modifiant les propriétés du mycélium (Olsvik and Kristiansen, 1992; van Suijdam and Metz, 1981; Metz *et al.*, 1979). La réponse des cellules à la pression partielle d'oxygène est un phénomène complexe dans la mesure où différentes voies métaboliques sont induites ou réprimées selon le niveau d'oxygène dissous (Olsvik and Kristiansen, 1992). Ceci affecte notamment la composition de la paroi cellulaire, et donc la flexibilité des hyphes, ainsi que les interactions entre les hyphes dans le milieu.

Inversement, la croissance sous forme de pelotes modifie la disponibilité de l'oxygène pour les cellules situées en leur centre et on peut observer plusieurs zones dans les pelotes de taille importante ($>400 \mu\text{m}$) : une couronne de cellules actives, une couche intermédiaire de cellules mortes et une zone centrale sans cellules (suite à la lyse des cellules asphyxiées). La taille critique du diamètre de la pelote est déterminée par le taux de transfert d'oxygène, pour lequel la diffusion

moléculaire est le mécanisme prépondérant. Ceci est la conséquence du fait que la convection et l'écoulement turbulent au sein des pelotes sont négligeables en fermentation submergée (Cui *et al.*, 1998). Ce phénomène peut entraîner une forte réduction de productivité et il existe donc une taille optimale, qui peut être obtenue en suivant une stratégie définie au niveau des précultures (Schügerl *et al.*, 1988).

2.2 ***La culture aérobie des micro-organismes (filamenteux)***

Les fermenteurs à agitation mécanique sont populaires du fait de leur flexibilité et de leur efficacité en termes de mélange, de dispersion des bulles d'air et des agrégats (Gusek *et al.*, 1991).

Lors de la culture en fermenteur à agitation mécanique, le processus d'agitation servant à assurer le mélange du milieu poursuit plusieurs buts :

- assurer l'homogénéité du milieu : les gradients de concentration sont néfastes du point de vue du manque en nutriments (on parle de *stress physiologique*, Markl *et al.*, 1991) autant que l'accumulation de métabolites inhibiteurs dans le voisinage des cellules (Merchuk, 1991);
- éviter les zones stagnantes du fermenteur (qui en diminuent le volume utile, Peters *et al.*, 1989). Idéalement, les constantes de temps de l'écoulement (donc sa vitesse) doivent être inférieures à celles des réponses biologiques des micro-organismes qui sont de l'ordre de 2 à 3 secondes (van't Riet and Tramper, 1991);
- maintenir les micro-organismes en suspension;
- assurer de bons transferts de matière des nutriments et des métabolites (Toma *et al.*, 1991);
- dispenser la phase gazeuse lors des procédés aérobies et assurer un bon transfert gaz-liquide (en jouant sur les deux facettes du k_{LA} : le coefficient de transfert et l'aire interfaciale);
- assurer un bon transfert de chaleur, en maintenant une vitesse adéquate des fluides au voisinage des surfaces d'échange.

Mais une agitation intense inhibe la croissance microbienne et le métabolisme, notamment la production de métabolites secondaires (Toma *et al.*, 1991; Shamlou *et al.*, 1994; Reuss, 1988; Smith *et al.*, 1990). Malheureusement, lorsque des études sont menées sur le sujet, cela se passe généralement dans des conditions hydrodynamiques mal définies et les liens de causes à effets sont parfois difficiles à établir (Reuss, 1988).

Le seul fait non controversé concernant l'influence des différentes forces mécaniques sur l'activité d'un matériel biologique (micro-organismes, tissus, organelles, enzymes) est que cela constitue l'un

des problèmes les plus complexes en biotechnologie pour l'ingénieur du fait des nombreuses interactions et rétroactions que ces phénomènes englobent. Un schéma général est proposé à la Figure 2. La complexité de ce problème affecte la conception et le développement des bioréacteurs et les opérations unitaires de récupération des produits tout autant que l'évaluation des conditions les plus appropriées pour conduire le procédé (Reuss, 1988).

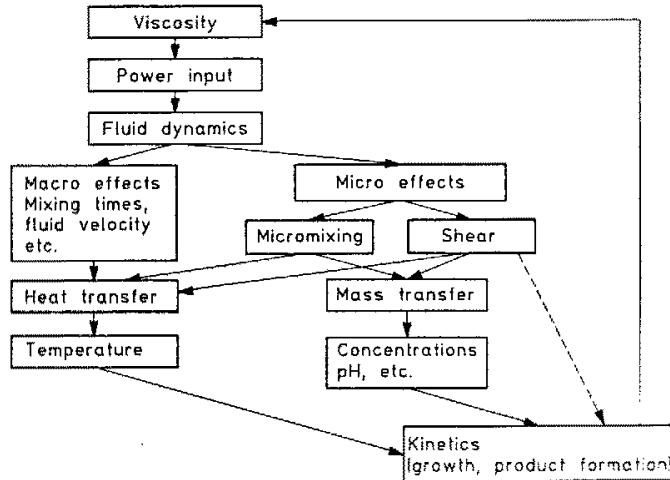


Figure 2 : Interactions entre la dynamique des fluides et la cinétique dans un bioréacteur (Merchuk, 1991)

2.3 L'oxygénéation

L'opération de transfert de matière la plus cruciale pour les fermentations aérobies est la dissolution de l'oxygène nécessaire à la respiration des micro-organismes (Smith *et al.*, 1990). La faible solubilité de l'oxygène couplée à une forte consommation rend la tâche de l'approvisionnement en oxygène (l'aération) complexe. Alors que les forces de cisaillement peuvent détruire les tissus microbiens fragiles, ce n'est que par cette action de cisaillement et une forte turbulence que les milieux de fermentation peuvent être aérés efficacement (Gusek *et al.*, 1991).

Les interactions entre le métabolisme et la concentration en oxygène dissous sont complexes et les rapports dans la littérature sur le contrôle du métabolisme par l'aération et l'agitation sous toujours ambigus (Toma *et al.*, 1991). La concentration critique d'oxygène (c'est-à-dire la concentration minimale en oxygène dissous nécessaire au bon fonctionnement des micro-organismes) dépend des intensités d'aération et d'agitation du fermenteur, ainsi que de la source de carbone pour un micro-organisme donné. Par exemple la concentration en oxygène dissous critique pour *Penicillium chrysogenum* est de 30% de la saturation pour la production de métabolites secondaires (Smith *et al.*, 1990). Par ailleurs, il a été démontré que les concentrations limitantes en substrat pour la

croissance microbienne dépendent de l'intensité d'agitation (mais sans explication sur les mécanismes de dépendance) (Toma *et al.*, 1991).

Afin de séparer les effets de la vitesse d'agitation de ceux dus à une carence en oxygène, on préconise d'utiliser un mélange enrichi air-oxygène pour assurer une concentration en oxygène dissous non limitante pour le procédé plutôt que la variation la vitesse d'agitation (qui est le mode d'action le plus fréquemment proposé par les fabricants de fermenteurs pour réguler la tension en oxygène dissous) (Peters *et al.*, 1989; Nienow, 1999). Malheureusement, la plupart des études menées sur le sujet ne découpent pas ces effets de l'aération et de l'agitation, ce qui rend difficile l'analyse des résultats (van Suijdam and Metz, 1981).

2.4 Le stress hydrodynamique

Le stress hydrodynamique dans un fermenteur à cuve agitée mécaniquement résulte des actions conjuguées des mobiles d'agitation (rotation, cisaillement), de la présence d'interface gaz-liquide (bulles), des variations de pression (derrière les pales des mobiles, aux abords des bulles), des collisions avec les mobiles ou les parois, etc. (van't Riet and Tramper, 1991). L'écoulement turbulent peut être divisé en une première zone de haute énergie située près du mobile qui occupe une faible partie du volume total du réacteur, et en une seconde zone beaucoup plus calme lorsqu'on s'éloigne du mobile vers les parois de la cuve (Shamlou *et al.*, 1994).

Si l'on observe l'écoulement autour de la pale d'une turbine Rushton (mobile à disque et à pales droites, voir Figure 10, §3.2.1), on voit qu'il existe une zone stagnante sur la face avant et un courant fortement accéléré est produit à l'extrémité (Figure 3) (Bronnenmeier and Markl, 1982). Ceci entraîne des tensions dans cette région qui peuvent être jusqu'à 100 fois supérieures à celle que l'on trouve dans le reste de la cuve (Shamlou *et al.*, 1994). À l'arrière de la pale, il existe une zone de basse pression avec des tourbillons qui s'en éloignent (deux pour une turbine Rushton, mais un seul pour une hélice ou un Intermig, représenté à la Figure 11, §3.2.1, par exemple).

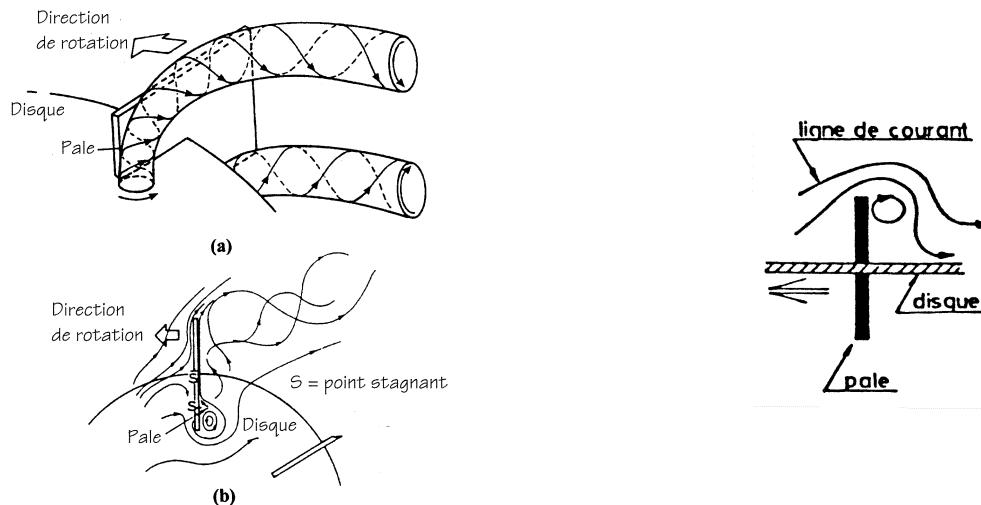


Figure 3 : Écoulement autour de la pale d'une turbine Rushton (Bronnenmeier and Markl, 1982)

Dans ce courant, on peut rencontrer deux mécanismes de destruction : les changements de pression rapides autour de la pale accompagnés de l'accélération des micro-organismes qui sont ainsi soumis à des brusques variations de vitesse, et les tensions de cisaillement intenses à l'extrémité de la turbine.

Les forces dynamiques turbulentes qui en résultent et qui agissent sur les faces opposées d'une particule (par exemple une pelote) peuvent être des tensions de cisaillement ou des tensions normales, selon la direction des fluctuations de vitesse (Figure 4).

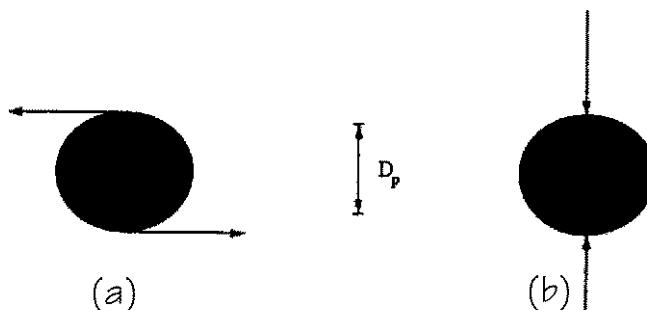


Figure 4 : Effets des fluctuations de tension agissant sur une particule sphérique dans un champ d'écoulement turbulent :

- (a) tensions de cisaillement dues aux fluctuations de vitesses tangentiales à la surface de la particule;
- (b) tensions normales dues aux fluctuations de vitesse normales à la surface de la particule (Shamloo *et al.*, 1994)

2.5 *Les effets du stress hydrodynamique sur les micro-organismes filamentueux*

La sensibilité des organismes au stress hydrodynamique dépend de la stabilité des parois cellulaires et de la morphologie (Markl *et al.*, 1991). Par exemple, les hyphes peuvent mesurer plusieurs milliers de µm de long, ce qui les expose à des forces de cisaillement plus intenses que les simples cellules (Gusek *et al.*, 1991; Merchuk, 1991) (en supposant que ces contraintes sont responsables des dégâts, nous y reviendrons plus tard). La réponse au stress dépend également du pH, de la température et de la pression osmotique du milieu (Merchuk, 1991).

Les conséquences du stress hydrodynamique sur les micro-organismes sont diverses. Il influence notamment :

- la morphologie des moûts et des micro-organismes filamentueux, des cultures de cellules végétales ou animales (Reuss, 1988; Toma *et al.*, 1991) ainsi que le volume cellulaire des bactéries (Merchuk, 1991);
- l'adhésion des organismes à des particules ou des surfaces (Reuss, 1988);
- la formation et la stabilité de flocs et de précipités (Reuss, 1988);
- le transfert de substances entre espèces lors de cultures mixtes (Reuss, 1988);
- l'endommagement des membranes et la modification de leur perméabilité (Toma *et al.*, 1991; Merchuk, 1991);
- le relargage de métabolites ou de fragments d'ARN (Reuss, 1988; Markl *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1990);
- l'éclatement ou la destruction des cellules (Markl *et al.*, 1991; Bronnenmeier and Markl, 1982);
- le ralentissement de la croissance et le retard du métabolisme (Bronnenmeier and Markl, 1982) ainsi que le nombre d'extrémités en croissance pour les filaments (Merchuk, 1991).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux effets sur la croissance et la morphologie.

2.5.1 Les effets du stress hydrodynamique sur la croissance

Les Figure 5 et Figure 6 montrent que l'écoulement dans un fermenteur affecte la croissance et la production des micro-organismes (Markl *et al.*, 1991; Gusek *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1990). On a observé l'existence d'un optimum du point de vue du cisaillement ou de la vitesse périphérique des pales lors de la culture de cellules végétales (Zhong *et al.*, 1994) et cet optimum existe également pour les micro-organismes en général (Justen *et al.*, 1996). Il s'explique par le fait qu'une

augmentation de la vitesse de rotation améliore initialement les performances, apparemment par l'augmentation de l'apport en oxygène et des autres transferts en général (matière, chaleur) (Merchuk, 1991). Au-delà de cet optimum, toute augmentation supplémentaire de la vitesse de rotation diminue rapidement les performances.

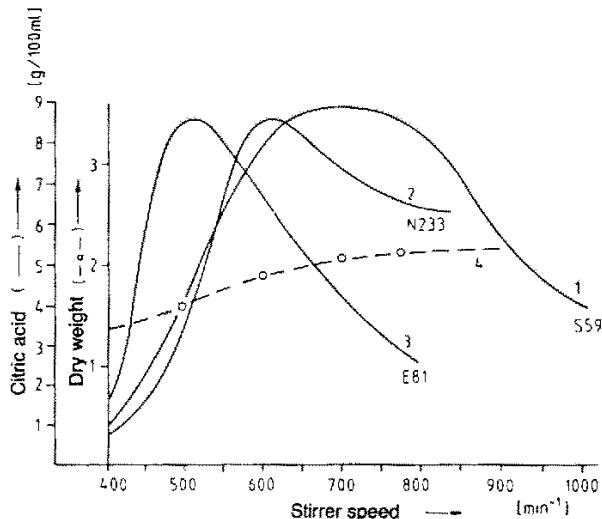


Figure 5 : Production d'acide citrique par *Aspergillus niger* et biomasse en fonction de la vitesse de rotation pour différentes souches (Markl *et al.*, 1991)

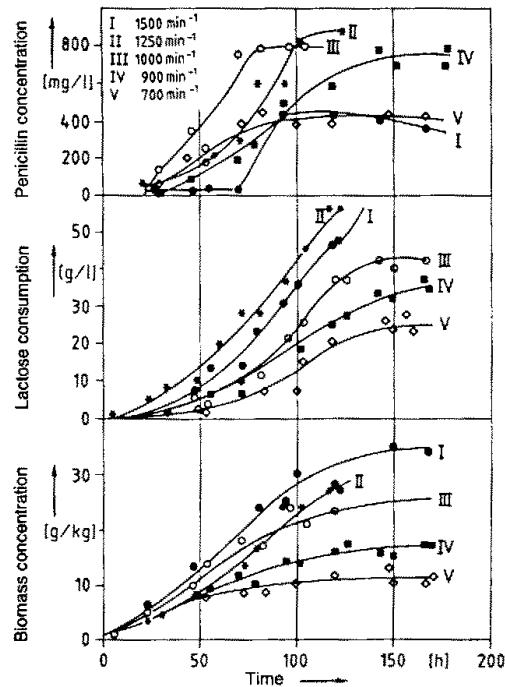


Figure 6 : Concentration en pénicilline, consommation de lactose et concentration en biomasse en fonction du temps avec *Penicillium chrysogenum* (Markl *et al.*, 1991)

Bien entendu, la question de savoir si une tension de cisaillement importante est bénéfique ou non dépend des buts du procédé. En terme de production de métabolites ou de micro-organismes, c'est sûrement un désavantage, sauf si la production de métabolites secondaires peut être améliorée aux dépends de la croissance cellulaire (Toma *et al.*, 1991). Par contre, dans les procédés biologiques d'épuration, la situation est très différente : une augmentation de consommation de substrats sans croissance est souhaitable. Notre travail portera sur la première de ces situations.

La valeur de l'optimum dépend de la résistance des souches et de leurs besoins nutritionnels (Merchuk, 1991). Les valeurs critiques de la vitesse d'agitation (exprimée en rpm : rotations par

minute) pour quelques micro-organismes valent par exemple (Bronnenmeier and Markl, 1982; Toma *et al.*, 1991) :

- *Chlamydomonas reinhardtii* souche clonée : ≥ 300 rpm ($d=50$ mm, $D=98$ mm, $V=1.74$ l) ($P \geq 0.28$ W/l), souche sauvage : > 2400 rpm ($P > 41$ W/l)
- *Spirulina platensis* : > 900 rpm ($P=3.89$ W/l)
- *Brevibacterium flavum* : 900 rpm
- *Trichoderma reesei* : < 150 rpm
- *Saccharomyces cerevisiae* : < 800 rpm ($V=5$ litres).

2.5.2 Les effets du stress hydrodynamique sur la morphologie

Un des premiers témoignages concernant les effets de l'agitation sur la morphologie des micro-organismes filamentueux a été donné en 1958 par Camposano (Merchuk, 1991). Il a observé les modifications de la morphologie d'*Aspergillus niger* et des chemins métaboliques utilisés lorsqu'on augmente l'agitation.

Les premières investigations concernaient essentiellement la forme dispersée des filaments (typiquement moins de 20 % de la biomasse dans une fermentation de production de pénicilline sur base de la mesure de l'aire projetée; Tucker *et al.*, 1992). Peu de travaux ont été faits sur les agrégats et les pelotes, tout simplement parce que jusqu'à récemment il n'existe pas de méthode pour les mesurer. L'analyse d'images est maintenant disponible à cet effet (Tucker *et al.*, 1992) et la totalité de la biomasse peut être prise en considération.

2.5.2.1 Le cas des filaments

La longueur des hyphes serait déterminée par un équilibre dynamique entre les forces "constructives" provenant de la force de tension des parois cellulaires et les forces "disruptives" due à l'agitation du fluide (Shamlou *et al.*, 1994).

Lorsqu'on applique des conditions d'agitation intense, les filaments libres sont plus courts et plus larges, avec une fréquence de branchement plus importante. Ce phénomène a été observé pour plusieurs organismes (Gusek *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1990; Yang and Wang, 1992). Selon van Suijdam and Metz (1981), la diminution de la longueur des filaments est une conséquence directe de la rupture des hyphes et n'est pas due à l'accélération du processus de vieillissement qui conduit à

l'autolyse. En ce qui concerne la ramification, son augmentation améliorerait la résistance mécanique des hyphes (Mitard and Riba, 1988).

Mais on a également observé (van Suijdam and Metz, 1981) que si la concentration en oxygène dissous est augmentée par l'injection d'oxygène à la place d'air dans une culture de *Penicillium chrysogenum*, les hyphes sont plus épaisses, plus courtes, fortement branchées et plus effilées à leurs extrémités. On a également observé une influence de la tension d'oxygène sur la viscosité de solutions d'*Aspergillus niger*. Cette dernière diminue alors que la concentration en biomasse est plus importante, mais sans modification de la morphologie : la différence viendrait du fait que les parois des cellules sont plus minces. Il n'est cependant pas conseillé d'utiliser cette caractéristique pour diminuer la viscosité du milieu : ce serait énergétiquement trop coûteux pour un trop faible résultat (Yang and Wang, 1992).

Toutes ces observations montrent bien la complexité des phénomènes rencontrés.

2.5.2.2 Le cas des pelotes

Tagushi (cité par Reuss, 1988 ; Markl *et al.*, 1991; Mitard and Riba, 1988 et Merchuk, 1991) décrit deux types de dégâts liés à l'agitation de pelotes de moisissures (Figure 7): la rupture directe des pelotes et les dommages dus à l'abrasion ou l'attrition de leur surface (selon que le frottement est généré par un matériau étranger ou qu'il s'agit de frottement réciproque).

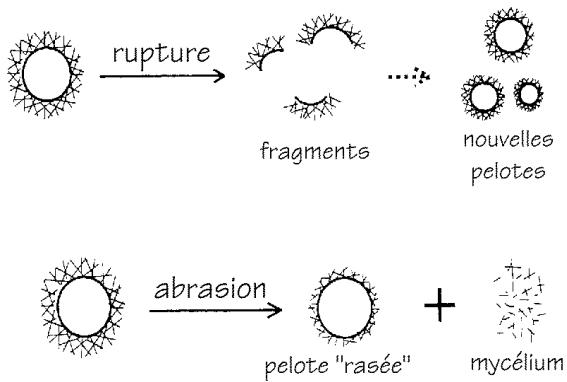


Figure 7 : Description schématique des dommages subis par les pelotes en cuve agitée (Cui *et al.*, 1997)

En général, les interactions entre les forces mécaniques et les pelotes résultent plus en l'épluchage des hyphes qui dépassent qu'en une rupture (Cui *et al.*, 1997). Par ce mécanisme, l'extension de la taille de la chevelure des pelotes est limitée. Les morceaux d'hyphes arrachés aux pelotes

contribuent au mycélium libre et redémarrent leur croissance. Selon les conditions de culture, la taille des pelotes varie et elles seront plus ou moins compactes (modification de leur porosité), avec une chevelure plus ou moins longue (on les décrit comme *lisses* ou *chevelues*) (Cui *et al.*, 1998).

2.6 ***Les causes de détérioration des micro-organismes***

De nombreux facteurs sont susceptibles d'être la cause des dommages mécaniques dans les bioprocédés en général (Oh *et al.*, 1989).

On notera que si l'on s'intéresse d'assez près aux conséquences de la turbulence sur les micro-organismes, très peu de recherches ont été effectuées concernant l'altération du champ de turbulence par la présence de ces particules solides (Caulet *et al.*, 1996). Lorsque la concentration en particules devient élevée, ce sont les interactions entre les particules qui affectent l'écoulement. Toutefois nous n'entrerons pas ici dans ces considérations encore très mal connues et ne nous intéresserons qu'aux effets de l'écoulement sur les micro-organismes.

2.6.1 **Le cisaillement**

On a tendance à utiliser le terme *sensibilité aux tensions de cisaillement* ou *turbohypobiosis* pour couvrir l'ensemble des conséquences néfastes de l'agitation (Toma *et al.*, 1991). Toutefois, cette approche handicape la compréhension du problème dans la mesure où elle implique *a priori* l'acceptation que ce sont les forces de cisaillement qui jouent un rôle prépondérant, alors qu'on ne connaît que peu de choses sur la validité de cette assertion (Reuss, 1988; Shamlou *et al.*, 1994).

Pour rappel (voir pour plus de détails le *Chapitre II : Rhéologie*), la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ est directement proportionnelle à la force par unité de surface (ou tension) nécessaire pour maintenir les différences de vitesse. On l'appelle la tension de cisaillement τ et la constante de proportionnalité est la viscosité dynamique μ :

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (\text{Pa}) \quad (1)$$

Strictement, cette équation ne s'applique qu'à l'écoulement laminaire. Dans le cas d'un écoulement turbulent, on ne peut pas convertir la vitesse de cisaillement en tension de cisaillement en la multipliant pas la viscosité : on doit définir une *viscosité turbulente*. La différence entre les viscosités laminaire et turbulente dépend des propriétés du liquide et des conditions opératoires (notamment des schémas d'écoulement) (Merchuk, 1991).

Un argument "en faveur" de la responsabilité du cisaillement concernant les dommages causés aux micro-organismes est qu'une agglomération des cellules permet une protection contre le stress hydrodynamique. Or cette agrégation protège contre le cisaillement et non pas contre les fluctuations de pression (Markl *et al.*, 1991). Les tensions de cisaillement à l'extrémité de la turbine seront les plus dommageables pour les micro-organismes les plus fragiles (tels que les hyphes) alors que ceux qui ont une forme plus compacte seront plus agressés par les changements de pression autour des pales et les accélérations (Bronnenmeier and Markl, 1982). On a tenté de diminuer les tensions de cisaillement associées aux turbines Rushton en recouvrant les pales des mobiles avec du tube Tygon bien ajusté. Les pales modifiées, dépourvues d'arêtes et d'extrémités aiguës qui exacerbent le cisaillement des cellules, ont significativement amélioré le rendement en biomasse et la production de protéase par *Thermomonospora fusca* (Gusek *et al.*, 1991).

Pour découvrir si la localisation de la fragmentation des hyphes est en fait dans le tourbillon derrière les pales ou dans une quelconque autre région de l'agitateur, des recherches plus fondamentales sont nécessaires, par exemple en utilisant des micromanipulations pour étudier les propriétés mécaniques des filaments libres et des agrégats. Connaissant l'hydrodynamique dans la région de l'agitateur, certaines forces (tension et compression) appliquées aux hyphes pourraient être prédites, et donc appliquées directement aux micro-organismes par des micromanipulations, pour découvrir dans quelles conditions, et donc où, les hyphes sont abîmées (Justen *et al.*, 1996).

La valeur de la vitesse de cisaillement variant selon la position dans le fermenteur, il existe plusieurs façons de la caractériser :

2.6.1.1 La vitesse de cisaillement maximale et la vitesse périphérique des pales

La vitesse de cisaillement maximale est proportionnelle à la vitesse périphérique des mobiles v_p (équation (2) du Tableau 1) (van't Riet and Tramper, 1991), qui est la variable la plus utilisée pour caractériser l'influence du stress mécanique (Reuss, 1988). Par exemple, ce facteur de proportionnalité vaut 40 pour un mobile à pales droites (van't Riet and Tramper, 1991).

Toutefois, dans certaines configurations, on peut avoir de très grandes vitesses de cisaillement dans des zones où l'espacement entre le mobile en rotation et un composant stationnaire de la cuve est très petit. C'est le cas entre des agitateurs de large diamètre et la paroi de la cuve (ou les baffles) (van't Riet and Tramper, 1991). La vitesse de cisaillement tangentielle maximale $\dot{\gamma}_{tan,max}$ peut être

estimée à partir de l'expression du profil d'écoulement entre deux cylindres concentriques (équation (3) du Tableau 1).

2.6.1.2 La vitesse de cisaillement moyenne

Dans une cuve non bafflée en régime turbulent, la vitesse de cisaillement moyen peut être calculée par l'équation empirique (4) du Tableau 1 (Merchuk, 1991; van't Riet and Tramper, 1991).

Les données provenant de la culture de cellules animales dans plusieurs fermenteurs ont pu être toutes corrélées sur une même courbe d'allure "échelon" (Figure 8) par cette vitesse de cisaillement moyenne. On a détecté ainsi l'existence d'une valeur critique de la vitesse de cisaillement moyen au-delà de laquelle les cellules ne poussent plus.

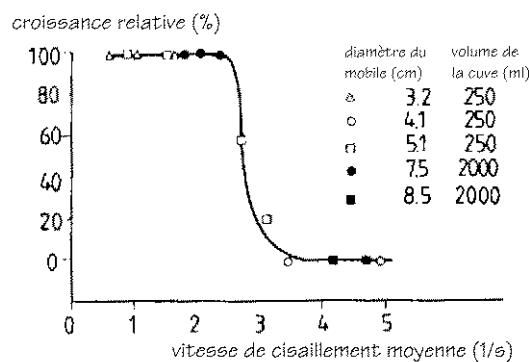


Figure 8 : Croissance relative de cellules animales sur microporteurs en fonction de la vitesse de cisaillement moyenne (van't Riet and Tramper, 1991)

2.6.1.3 Le facteur de cisaillement intégré (ISF)

Un autre critère pour évaluer le cisaillement dans une cuve est le *facteur de cisaillement intégré* ou *ISF (Integrated Shear Factor)* (Merchuk, 1991; van't Riet and Tramper, 1991). Il est défini par l'équation (5) du Tableau 1. Il représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile. Bien qu'ayant été défini empiriquement et non sur des bases théoriques, ce facteur a pu être relié à la croissance de cellules mammifères sur microporteurs pour plusieurs cuves et mobiles (la relation a grosso modo une allure d'échelon, voir Figure 8 pour l'allure de la courbe).

Tableau 1 : Grandeurs caractérisant le cisaillement

$$v_p = \pi N d \quad (\text{m/s}) \quad (2)$$

$$\dot{\gamma}_{\tan,\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2} \quad (3) \quad (\text{s}^{-1})$$

$$\dot{\gamma}_m = \frac{113.1 N d^{1.8} (D^{0.2} - d^{0.2}) \left(\frac{d_f}{d} \right)^{1.8}}{D^2 - d^2} \text{ avec } \left(\frac{d_f}{d} \right) = \frac{0.625 Re}{625 + Re} \text{ où } Re = \frac{\rho N d^2}{\mu} \quad (4) \quad (\text{s}^{-1})$$

$$ISF = \frac{2 \pi N d}{(D - d)} \quad (5) \quad (-)$$

Globalement, les vitesses de cisaillement moyennes et maximales, ainsi que le facteur de stress intégré sont proportionnels à la vitesse de rotation de l'agitateur et il est difficile d'établir une discrimination entre eux (van't Riet and Tramper, 1991).

2.6.2 La puissance dissipée

Puisque le champ d'énergie dans un fermenteur n'est pas uniforme (existence d'une zone de haute énergie située près du mobile, voir à ce sujet le §2.4 et le *Chapitre III : Hydrodynamique*), il peut exister de grandes différences entre les valeurs moyennes et maximales de la puissance dissipée.

2.6.2.1 La puissance spécifique moyenne

À partir de l'analogie avec les tailles des bulles et des gouttes (où les tailles sont gouvernées par l'équilibre entre les forces de cisaillement turbulentes et la tension superficielle) et de corrélations vérifiées expérimentalement pour l'abrasion des pelotes (Cui *et al.*, 1997), on peut justifier de considérer la puissance spécifique moyenne comme l'une des causes responsables des modifications de la morphologie des micro-organismes filamentueux (Reuss, 1988).

La puissance spécifique moyenne ε_T est définie par :

$$\varepsilon_T = \frac{P}{\rho V} \quad (\text{W/kg}) \quad (6)$$

La puissance dissipée dans le fermenteur est elle-même proportionnelle à la vitesse d'agitation et au diamètre du mobile :

$$P = Np \rho N^3 d^5 \quad (\text{W}) \quad (7)$$

où Np (-) est le nombre de puissance (qui est constant en régime turbulent). Ce sujet sera développé en détail au *Chapitre III : Hydrodynamique* (§2.6).

Via l'abrasion, on a donc un lien entre la fraction de filaments libres et la puissance spécifique moyenne. La porosité des pelotes est inversement proportionnelle à la puissance spécifique moyenne et le poids sec en biomasse par volume humide de pelote augmente également avec cette variable (Cui *et al.*, 1997).

Bien que certains auteurs (Smith *et al.*, 1990) prétendent que tous les modèles quantitatifs reliant la morphologie des hyphes à la puissance spécifique moyenne ont dû être rejetés, d'autres auteurs (Cui *et al.*, 1997, Cui *et al.*, 1998) ont réussi à corrélérer la longueur de la chevelure des pelotes et la taille des pelotes à ε_T par une loi en puissance (dont l'exposant vaut -0.16 à -0.4 selon les souches).

2.6.2.2 La puissance spécifique maximale

Il est vraisemblable que la fragmentation de l'hyphe principale prend place dans la région proche de l'agitateur, où l'on a montré qu'avait lieu la plus grande dissipation d'énergie (Stoots and Calabrese, 1995; Cutter, 1966; van Suijdam et Metz, 1981). Ce volume critique dans la région de l'agitateur est égal à $V\Phi$ (Justen *et al.*, 1996) avec

$$\Phi = \left(\frac{d}{D} \right)^2 \left(\frac{L}{d} \right)^{2/3} n_b^{0.6} (\sin \alpha)^{1.15} \quad (-) \quad (8)$$

où L est la hauteur de la pale pour un mobile radial et la hauteur projetée pour un mobile axial, n_b est le nombre de pales et α leur angle. L'exposant dans la corrélation pour Φ a été trouvé empiriquement. Une corrélation entre $P/(V\Phi)$ et la morphologie a pu être établie (Justen *et al.*, 1996).

2.6.2.3 L'importance de la géométrie des mobiles

Il est bien connu que différentes vitesses avec une turbine Rushton mènent à différentes morphologies mais il a été également montré qu'un simple changement du type d'agitateur, utilisé à la même puissance volumique, peut altérer la morphologie mycélienne (Metz *et al.*, 1981; Nielsen, 1993).

Pour une même puissance dissipée, les dégâts dépendent de la géométrie de l'agitateur, tant pour les filaments libres que pour les agrégats (Justen *et al.*, 1996). Les agitateurs à pales droites et les turbines Rushton ne produisent pas de dommages significatifs pour autant que leur rapport d/D soit suffisamment grand et donc leur vitesse assez faible (pour une puissance donnée). Les agitateurs à pales inclinées avec de faibles rapports d/D et d'assez relativement faibles nombres de puissance (et

donc de grandes vitesses pour cette puissance fixée) causent le plus de dégâts. Entre ces deux extrêmes, les dégâts augmentent toujours avec la diminution du rapport d/D .

2.6.3 La fréquence de passage dans la zone du mobile

Puisque au voisinage du mobile d'agitation, les vitesses de cisaillement peuvent être 50 à 100 fois plus grandes que celles régnant dans le reste de la cuve (Merchuk, 1991), on aura également un lien entre la fréquence de passage dans la zone la plus "meurtrière" proche du mobile et la probabilité de dommage aux cellules (van Suijdam and Metz, 1981; Justen *et al.*, 1996). Par exemple, la rupture des pelotes d'*Aspergillus niger* a été reliée à un phénomène de fatigue qui survient lors des expositions répétées à la zone de stress intense située près de l'agitateur (van Suijdam and Metz, 1981).

De la même façon, les travaux de Smith *et al.* (1990) montrent que si ni la vitesse périphérique ni la puissance spécifique moyenne n'ont de validité générale pour la mesure des dommages infligés aux hyphes de *Penicillium chrysogenum*, leurs résultats sont par contre raisonnablement bien corrélés à la vitesse de circulation (Nd^3/V), ou à des grandeurs similaires.

2.6.4 La combinaison de la puissance spécifique moyenne et de la circulation

Afin de combiner les effets de la puissance spécifique moyenne et du temps d'exposition des micro-organismes à ces contraintes dans la zone du mobile, Reuss (1988) a proposé de diviser la puissance par le flux de circulation V/θ_c où le temps de circulation θ_c représente le temps nécessaire au fluide pour effectuer deux passages successifs au même endroit (voir *Chapitre III : Hydrodynamique*). Il a ainsi corrélé la vitesse de croissance maximale de *Rhizopus nigricans* et la constante cinétique de rupture de *Tetrahymena pyriformis* au produit $[(P/V)*\theta_c]$ (Ws/m³).

Mais Smith *et al.* (1990) ont argumenté contre l'utilisation de ce produit $(P/V)*\theta_c$. Ils ont adapté un modèle de van Suijdam et Metz (1981) et ont proposé une dépendance de la fréquence de rupture avec le terme $(P/d^3)*(1/\theta_c)$ (W/m³s). Cette adaptation fut plus fructueuse et montra une corrélation simple entre la production ou la morphologie et le terme $(P/d^3)*(1/\theta_c)$ à différentes échelles (jusqu'à 1000 litres (Makagiansar *et al.* (1993)).

2.6.5 Les micro-tourbillons et les tensions turbulentes de Kolmogoroff

Si les auteurs cités aux paragraphes précédents s'accordent pour attribuer la fracture des hyphes dans les cuves agitées mécaniquement aux tensions qui agissent sur les extrémités opposées des

filaments, une autre approche suggère que les mécanismes les plus plausibles de rupture des particules soient ceux basés sur les interactions entre les particules et les tourbillons (Cui *et al.*, 1997; Shamlou *et al.*, 1994; Cherry and Kwon, 1990; van Suijdam and Metz, 1981; Caulet *et al.*, 1996). On considère alors que les tensions proviennent des fluctuations de pression dynamique des tourbillons.

On peut s'attendre à ce que la taille des tourbillons qui sont responsables de la rupture soit du même ordre de grandeur que celle des particules. Les tourbillons beaucoup plus petits que la particule n'ont pas assez d'énergie pour les casser, et ceux qui sont beaucoup plus grands ne sont pas capables de générer les fluctuations de pression dynamique nécessaires à la rupture (van Suijdam and Metz, 1981). L'échelle de Kolmogoroff λ_K est la grandeur qui est utilisée pour prédire les dommages infligés aux microporteurs (utilisé pour la culture de cellules animales) par Cherry and Kwon, 1990. Cette échelle représente la taille des plus petits tourbillons, à laquelle a lieu la transition entre les régimes turbulents et visqueux (ou laminaires) (Caulet *et al.*, 1996).

L'échelle de Kolmogoroff est définie par (Oh *et al.*, 1989) :

$$\lambda_K = \left(\frac{V^3}{\varepsilon_T} \right)^{0.25} \quad (\text{m}) \quad (9)$$

Toutefois, on sait que le taux de dissipation d'énergie spécifique ε_T est maximum près du mobile, et on recommande pour la rupture des gouttes de liquide de faire l'hypothèse qu'essentiellement toute l'énergie est dissipée dans la moitié du volume occupé par le mobile (on peut également utiliser la relation (8) pour déterminer le volume de cette zone critique).

En supposant une faible viscosité dans la région du mobile à cause du caractère non-newtonien des suspensions mycéliennes, l'échelle de Kolmogoroff dans le voisinage du mobile est de l'ordre de 10 à 500 µm (van Suijdam and Metz, 1981; Shamlou *et al.*, 1994; Dunlop and Ye, 1990), alors que les hyphes mesurent typiquement de 50 à 500 µm.

On a pu représenter les données obtenues sur la croissance des cellules en fonction de l'échelle de longueur de Kolmogoroff (Merchuk, 1991). On obtient une courbe dont l'allure en échelon suggère l'existence d'une valeur critique en dessous de laquelle la croissance est nulle (par exemple la taille des microporteurs pour culture de cellules animales, voir Figure 8 pour l'allure de la courbe). Ceci explique pourquoi la corrélation n'est pas significative entre le nombre de Reynolds et les

dommages causés par le stress : le nombre de Reynolds est une mesure grossière de la turbulence à l'échelle macroscopique, c'est-à-dire concernant les tourbillons dont la taille est de l'ordre de grandeur du mobile, alors que les dégâts sont causés par les tourbillons à l'échelle microscopique (cette remarque étant vraie pour n'importe quelle grandeur globale).

2.6.6 Les chocs

On ne trouve pas de données expérimentales concernant l'impact entre les mobiles et les micro-organismes, mais on trouve néanmoins quelques données sur les impacts entre les mobiles et des billes de verre, le nombre d'impacts par unité de temps étant grossièrement proportionnel à ε_T^4 (Cui *et al.*, 1997). Toutefois, l'importance de ces impacts est minimisée lorsque les particules ont une densité proche de celle du fluide : elles suivent alors les lignes de courants (van't Riet and Tramper, 1991).

2.6.7 L'aération

Les cellules subissent plus de dommages par les actions combinées de l'injection d'air et de l'agitation mécanique que par l'une d'entre elles seule (Yang and Wang, 1992). Au cisaillement engendré par le mobile s'ajoute le phénomène de division/coalescence des bulles ainsi que les chocs avec elles (surtout dans la zone entourant le mobile en rotation où ces phénomènes sont les plus violents). La vitesse de décès spécifique d'une algue fragile a pu être corrélée linéairement avec l'aire interfaciale. D'autre part, on a observé l'absence de dommages aux cellules en cuve agitée sans injection d'air et le contraire avec aération (Oh *et al.*, 1989). La présence d'air peut tout autant être due à l'injection directe qu'à l'incorporation depuis la surface à haute vitesse d'agitation (surtout s'il existe un vortex).

On notera à ce sujet que pour la culture des cellules animales ou végétales, beaucoup plus fragiles que les bactéries ou moisissures, on évite la présence de bulles dans le milieu. L'aération est assurée par la diffusion de l'oxygène à travers un tube poreux ou par alimentation en milieu préalablement saturé en oxygène.

2.6.8 La viscosité

Il n'y a pas de consensus dans littérature concernant l'effet de la viscosité du milieu de fermentation sur le stress hydrodynamique d'une culture. Certains prétendent qu'une augmentation de la viscosité diminue la vitesse critique d'agitation (c'est-à-dire celle à partir de laquelle une augmentation est

dommageable pour les micro-organismes), alors que selon d'autres auteurs une augmentation de la viscosité permet une "protection" des cellules (Markl *et al.*, 1991).

3 Matériel et méthodes

3.1 Les méthodes de dosage

3.1.1 Le poids sec

Une quantité précise de milieu de culture (généralement 5 ou 10 ml de culture) est centrifugée pendant 10 minutes à 5000 rpm. Le surnageant puis le culot sont ensuite filtrés sur un filtre 0.45 µm en acétate de cellulose préalablement taré. Le filtre est pesé (sur une balance de précision pesant au dixième de milligramme) après séchage pendant 24 heures dans une étuve à 80°C. La différence de poids donne le poids sec de micro-organismes dans le volume prélevé.

L'erreur commise lors de la mesure peut provenir de la précision du pipetage et du pesage, mais elle découle surtout de problèmes liés à la méthode (le filtre colle parfois à la boîte de Pétri dans lequel il est posé dans l'étuve).

En utilisant les informations obtenues lors de quelques expériences où nous avons deux réPLICATIONS du poids sec mesuré sur une prise de 10 ml, l'écart standard s_e vaut 0.2 g/l (la méthode de calcul est exposée dans la partie *Plans d'expériences*). Ce qui signifie que la précision de la mesure de la biomasse par le poids sec dans des limites de confiance à 95% est de l'ordre de 0.5 g/l (Le numéro correspond à celui de la fermentation, voir le Tableau 21 pour les conditions expérimentales)

$$s_e^2 : \quad n^{\circ}3 = 0.064 \quad (s_e=0.25)$$

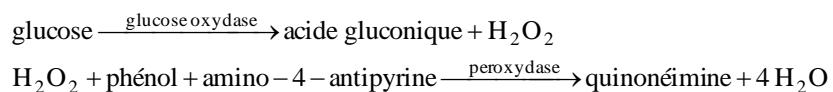
$$n^{\circ}5 = 0.021 \quad (s_e=0.14)$$

$$n^{\circ}7 = 0.029 \quad (s_e = 0.17)$$

$$\Rightarrow s_e^2 (\text{global}) = 0.038 \Rightarrow s_e = 0.19 \text{ g/l}$$

3.1.2 L'amidon

L'amidon est dosé en utilisant la méthode de l'équivalent glucose (Granier, 1990). Il est tout d'abord hydrolysé en D-glucose au moyen de l'amyloglucosidase. Le glucose libéré est alors dosé par voie enzymatique selon les réactions suivantes (kit de dosage du glucose Sopachem) :



La lecture de l'absorbance à 500 nm donne une relation linéaire par rapport à la concentration en glucose.

Le mode opératoire est le suivant : 5 µl d'échantillon de surnageant sont ajoutés à 100 µl de solution d'amyloglucosidase (1 g/l dans un tampon NaAc 25mM, pH 5, Sigma-Aldrich) et mis à incuber à 53°C (l'enzyme supporte au maximum 55°C). On ajoute alors 500 µl de réactif (mélange de glucose oxydase, de phénol, de peroxydase et d'amino-4-antipyrine dans un tampon phosphate pH 7.4) et le tout est mis à incuber 15 minutes à 37°C. L'absorbance à 500 nm (mesurée par un spectrophotomètre UV-Visible Unicam 8625) est convertie en concentration en amidon (g/l) à partir d'une courbe d'étalonnage :

$$\text{Amidon (g/l)} = \text{absorbance (500 nm)} * 3.7$$

3.2 Le fermenteur

Le fermenteur utilisé pour l'ensemble des expériences est une cuve à agitation mécanique : un Biostat ED de la firme B.Braun (Melsungen, Allemagne) (les numéros entre parenthèses se réfèrent à la Figure 9). Il se compose essentiellement d'une unité de base compacte (6) comprenant divers périphériques (câblage électrique, circuits secondaires de régulation de température et de stérilisation, etc.), d'une cuve (1) et d'une unité digitale de mesure et contrôle (DCU) (7).

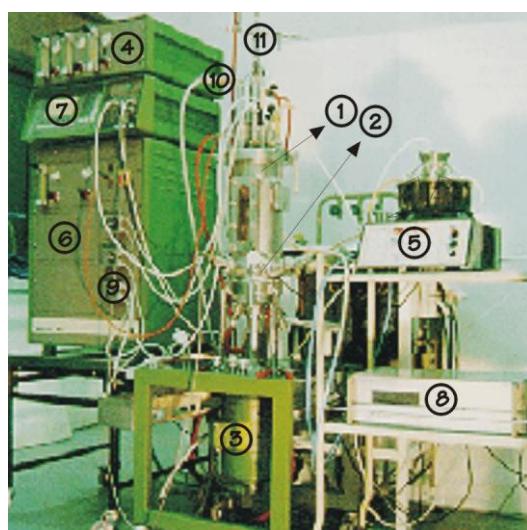


Figure 9 : Fermenteur B. Braun et périphériques

3.2.1 Le dispositif d'agitation

Nous disposons de deux types de mobiles d'agitation de géométrie et de taille très différentes. Ils sont des versions non-standard des turbines Rushton (Figure 10) et des Intermig (Figure 11), et ont été fournis par B. Braun avec le fermenteur. Les écoulements qu'ils provoquent dans le fermenteur sont de nature différente : radial pour les turbines Rushton et axial-radial pour les Intermig. Une description détaillée et les dimensions sont fournies dans le *Chapitre III : Hydrodynamique*. Trois mobiles identiques sont fixés sur l'arbre d'agitation (Figure 12). Le diamètre des turbines Rushton est de 56 mm et celui des Intermig est de 102 mm.

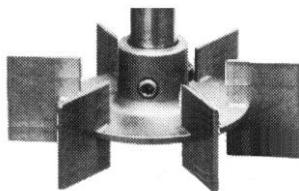


Figure 10 : Turbine Rushton

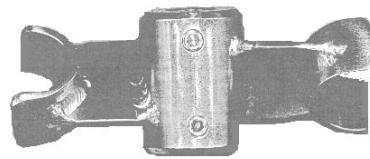


Figure 11 : Intermig

3.2.2 La géométrie de la cuve

La cuve du fermenteur (Figure 9 : (1)) a une capacité de 5 litres utiles (7.4 litres au total) en acier inoxydable, avec une double enveloppe pour la régulation de température et la stérilisation, une fenêtre permettant un contrôle visuel, cinq entrées latérales standard de 25 mm et une de 19 mm (pour la sonde de température). Ces cinq bossages sont situés à une hauteur de 80 mm (distance entre le bas du bossage et le fond de la cuve) et ils sont inclinés de 15° par rapport à l'horizontale. Ils permettent l'introduction de sondes et d'une vanne stérilisable de prise d'échantillon (2). Le couvercle est percé de trous pour l'entrée (10) et la sortie de l'air (11) (via des filtres), l'ajout de l'inoculum et de l'acide, base et antimousse, un capteur de pression, une vanne de sécurité (en cas de surpression, réglée sur 0.3 MPa) et une sonde de détection de mousse. L'air est injecté par un disperseur (sparger) en forme de fer à cheval percé de trous et situé sous le mobile inférieur (Figure 12). La sortie de l'air passe par un condenseur avant d'être filtré. Une vanne de vidange (stérilisable) est située au fond de la cuve. La cuve a un diamètre de 147 mm, avec un rapport hauteur/diamètre de 2, et elle comporte quatre baffles de 7 mm de large fixés à 3 mm de la paroi (pour éviter d'avoir des "recoins" stagnants et difficiles à nettoyer).

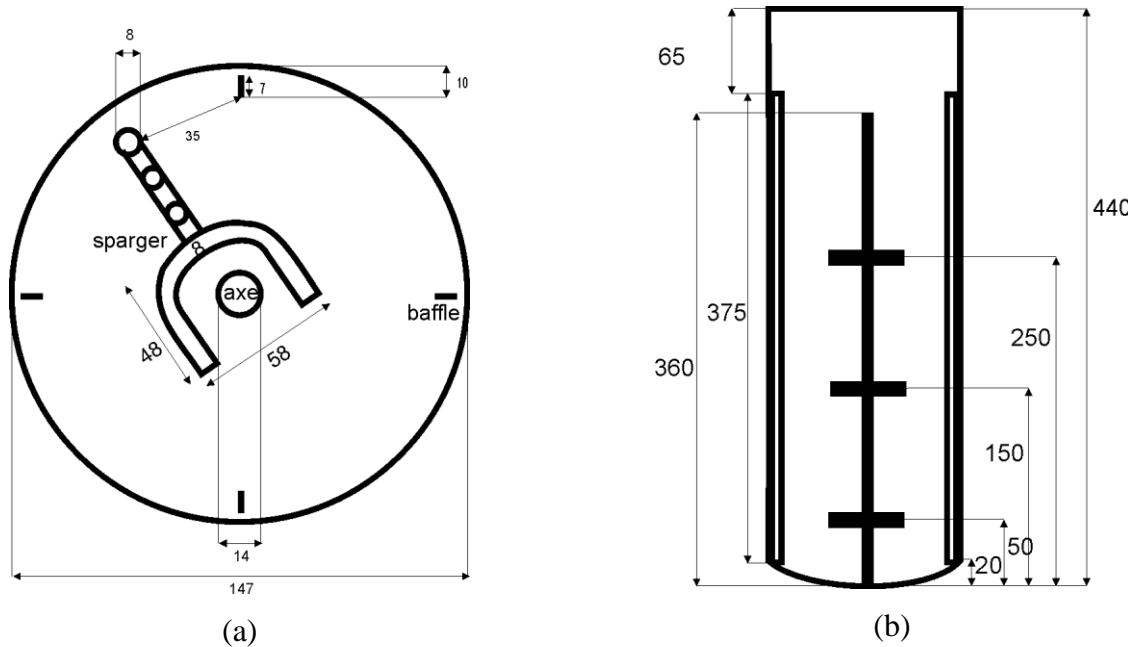


Figure 12 : Vue du haut (a) et de profil (b) du fermenteur (avec les turbines Rushton), cotes en mm

Le profil du diffuseur utilisé avec les Intermig est un peu différent afin de ne pas toucher les mobiles en rotation, et sa zone d'injection d'air est plus grande de façon à se situer sous les extrémités des palettes externes des Intermig.

Quel que soit le type de mobile, nous les avons disposés selon le schéma de droite de la Figure 12. Dans le cas des Intermig, chaque mobile est orienté perpendiculairement à son voisin (les mobiles "1" et "3" sont donc parallèles).

3.2.3 Les périphériques

Les numéros entre parenthèses se réfèrent à la Figure 9.

- **Les capteurs** : outre le capteur de pression situé sur le couvercle, nous mesurons le pH (sonde combinée de 120 mm Ingold), la température (Pt100), l'oxygène dissous (sonde ampérométrique Ingold) et la turbidité (voir le turbidimètre). Toutes ces sondes sont installées dans les bossages 25 mm et sont stérilisées en même temps que le milieu de culture.
- **Étalonnage des sondes :**

- * la sonde pH est étalonnée avant introduction dans le fermenteur en utilisant des tampons standardisés;
 - * la sonde pO₂ a son zéro fixé lors de la stérilisation et le 100% de saturation est ajusté après la stérilisation et dans les conditions de température et de pression de la fermentation (28°C et 25 kPa de surpression);
 - * les valeurs de gain du turbidimètre sont fixées préalablement (en fonction des données provenant d'autres essais) et le zéro est ajusté après stérilisation. Après la fermentation, l'ensemble de la courbe est réajusté linéairement sur les poids secs mesurés. Cette méthode permet d'obtenir une "interpolation" en ligne des points intermédiaires entre deux prises d'échantillons. De plus, lors de la fermentation, on a une vue qualitative de l'évolution de la culture (latence-croissance-maintenance-décès).
- **Le moteur** (3) est un moteur à courant continu avec variateur de vitesse, d'une puissance de 0.75 kW et couvrant une gamme de 50 à 1500 rpm. Le moteur est placé sous le fermenteur et il est couplé à l'arbre d'agitation directement par un joint mécanique
 - **Une station de mélange de gaz** (4) permet de réguler le gaz injecté dans le fermenteur en débit et/ou en composition par mélange d'air et d'oxygène ou d'azote et d'oxygène. Le contrôle est effectué par des débitmètres massiques. Cette station peut être utilisée de façon autonome, ou pour la régulation de l'oxygène dissous (en modifiant le débit total ou sur la proportion des gaz).
 - **Un échantillonneur automatique MX3** (5) (New Brunswick Scientific) permet de prélever des échantillons à des moments précis en l'absence d'opérateur. Les échantillons de 25 ml sont prélevés stérilement dans une boucle de circulation continue et stockés à 4 °C.
 - **La régulation de température** se fait par circulation d'eau dans la double-enveloppe. Un système électrique chauffe l'eau pour la régulation mais aussi pour la stérilisation. La mesure est faite par une sonde de type Pt100.
 - **Un turbidimètre** (8) (Mettler FC402) permet de mesurer en ligne la turbidité du milieu de fermentation (par dispersion arrière de la lumière). La sonde est placée dans l'un des bossages de 25 mm de diamètre.
 - **Un analyseur de CO₂** à infrarouge (Binos 100, Rosemount) mesure en continu la teneur en CO₂ des gaz de sortie.
 - **L'acquisition des données** est faite par deux ordinateurs. Le premier est relié au DCU et permet l'enregistrement de toutes les données liées au fermenteur (valeurs mesurées par les différents capteurs, signaux de régulation, etc.). Cette acquisition se fait par le programme

Autopax développé par ICOE. Le second ordinateur stocke les données provenant du turbidimètre et de l'analyseur de CO₂, via le logiciel Labview (National Instruments).

Le **DCU** (7) (Digital Control Unit) permet l'affichage des valeurs mesurées par les capteurs et la programmation des différentes boucles de régulation (avec réglage des consignes et des paramètres de régulateurs PID) :

- la température;
- l'oxygène dissous : la régulation peut se faire soit en modifiant la vitesse de rotation de l'agitateur, soit en modulant le débit ou la composition du gaz injecté dans le fermenteur;
- le pH : la régulation se fait par l'ajout d'acide (H₂SO₄, 4N) ou de base (NaOH, 4N) par des pompes situées sur l'unité centrale (9);
- la présence de mousse (sonde capacitive sur le couvercle). La régulation se fait par ajout d'antimousse également par une pompe (9). Les trois tuyaux des pompes acide, base et antimousse sont réunis sur une grosse aiguille qui est vissée dans un bouchon sur le couvercle;
- la pression (par un capteur à pont de Wheatstone sur le couvercle). La régulation se fait par un débitmètre massique équipé d'une vanne électromagnétique situé sur le circuit de sortie;

Un bouton de coupure de sécurité peut être actionné en cas de problème ou d'alarme, mettant l'ensemble du système à l'arrêt avec les différentes parties en position de sécurité (arrêt du chauffage, de l'agitation, de l'aération et des autres régulations, et fermeture de la vanne de sortie d'air). Une simple pression sur le bouton remet le système en marche avec toutes les valeurs de consignes telles qu'elles étaient avant la coupure.

3.2.4 La stérilisation

Étant donné que nous nous intéressons à la culture d'une souche bien définie, il est impératif d'assurer la stérilité des différentes parties du procédé afin d'éviter toute contamination.

Le milieu de culture est préparé dans le fermenteur en ajoutant les composants à cinq litres d'eau désionisée. Le système d'agitation du fermenteur est utilisé pour l'homogénéisation. La composition du milieu a fait l'objet d'une étude particulière et sera abordée au § 4.3. Le contenu du fermenteur est stérilisé *in situ* 20 minutes à 121°C avec une agitation de 300 rpm. L'apport thermique se fait par la circulation dans la double enveloppe d'eau chaude surpressée, qui est chauffée par un petit boîtier

électrique (qui sert également à la régulation de température). Le filtre d'entrée d'air est stérilisé par la vapeur s'échappant du milieu. Lorsque le délai est écoulé, le fermenteur est refroidi et de l'air est injecté afin de maintenir une surpression de 25 kPa dans la cuve.

Un dispositif externe permet l'envoi de vapeur vive à 0.2 MPa dans le filtre de sortie (le dispositif prévu par la firme utilisait également la vapeur s'échappant du milieu de culture, mais cela colmatait le filtre). Nous avons installé un système de "T" qui permet la stérilisation indépendante de ce filtre et de la jonction au fermenteur. Ce même apport de vapeur externe, produite par un générateur de vapeur New Brunswick Scientific, sert à stériliser les vannes de vidange et d'échantillonnage.

Les bouteilles contenant l'acide, la base et l'antimousse, ainsi que les tuyaux et l'aiguille qui servira à les connecter au fermenteur, sont stérilisées dans un autoclave externe. Un manchon en acier inoxydable garni d'un bourrage d'ouate garantit la stérilité de l'aiguille. Après stérilisation du fermenteur, l'aiguille est vissée dans un bouchon du couvercle, en traversant un septum (rempli d'alcool pour garantir l'innocuité de l'opération). Un Erlenmeyer de 1 litre et équipé d'un tuyau de verre prolongé par un tuyau en silicium et d'une aiguille et traversant une bourre d'ouate est également stérilisé à part, et recevra la préculture sous une hotte à flux laminaire. Ce dispositif est ensuite connecté à un autre port du couvercle après stérilisation et l'inoculum est injecté dans le milieu à l'aide d'une pompe péristaltique.

4 Mise au point des fermentations

4.1 La sélection de la souche

4.1.1 Les souches testées

De par notre collaboration avec le Centre d'Ingénierie des Protéines (CIP) du professeur Jean-Marie Frère (Université de Liège), nous avions la possibilité de travailler avec diverses souches bactériennes filamenteuses. Nous avons effectué un test de sensibilité afin de déterminer laquelle était la plus "réceptive" au stress hydrodynamique.

Le CIP étudie différentes souches de la collection d'Actynomycétales constituée par le professeur Welsch (1963) pour comprendre leurs mécanismes de résistance aux antibiotiques à noyaux β -lactames et les différents modes d'actions selon leurs systèmes enzymatiques respectifs.

Nous avons testé la sensibilité des souches suivantes: *Actinomadura R39*, *Streptomyces coelicolor*, *S. lividans* TK24 et *S. albus G*. Elles sont toutes de type Gram +.

4.1.2 Les conditions du test

Le test de sensibilité a été effectué en Erlenmeyers de 100 ml et sur une table agitante thermostatisée à 28°C. Nous avons testé deux types d'Erlenmeyers : avec et sans ressort en acier inoxydable dans le fond. La présence de ressort permet une meilleure aération du milieu (en cassant les bulles) ainsi qu'un meilleur mélange (en empêchant la création d'un vortex, remplissant le rôle de baffles dans une cuve agitée mécaniquement). Mais les ressorts provoquent également un stress hydrodynamique, que ce soit par l'augmentation de la turbulence qu'ils occasionnent ou par leur présence sur le passage des micro-organismes qu'ils brisent mécaniquement.

Deux séries d'expériences ont été menées, à deux vitesses de rotation différentes: 120 et 200 rpm. Tout comme pour les ressorts, l'influence de la vitesse de rotation est double : une augmentation de la vitesse améliore de la capacité d'aération, mais entraîne aussi une augmentation de la turbulence et donc du stress hydrodynamique.

4.1.3 L'inoculum et milieu de culture pour la sélection de la souche

Pour chacune des souches choisies, la culture a été préparée à partir d'une pente de gélose reprise par 5 ml de milieu, ajoutés à 20 ml de milieu frais dans un Erlenmeyer de 100 ml. Le milieu de culture utilisé était le milieu TAU avec le glucose comme source carbonée. Sa composition est reprise à l'*Annexe I*.

Chaque souche a servi à inoculer deux Erlenmeyer. Le nombre des Erlenmeyers s'élevait ainsi à 16 : 4 souches*2 types d'Erlenmeyer*2 réplicates. La totalité des fioles pouvait donc prendre place sur une seule table agitante, ce qui permettait d'éviter des fluctuations dues à des variables opératoires incontrôlées.

Une prise de 5 ml d'échantillon a été réalisée après 46 heures de culture. Le dosage de la biomasse s'est fait par poids sec. En raison de la faible quantité de culture disponible, un seul poids sec a été mesuré par Erlenmeyer.

4.1.4 La biomasse obtenue dans les différentes conditions

Les Tableau 2 et Tableau 3 reprennent les poids secs obtenus pour les différents Erlenmeyers après 46 heures de culture. s_e représente l'écart-type calculé d'après les deux poids secs mesurés.

Tableau 2 : Agitation à 120 rpm: poids secs (g/l) après 46 heures de culture

Souche	Erlen. avec ressorts (1)	Erlen. avec ressorts (2)	Moyenne (ressorts) [s_e]	Erlen. sans ressorts (1)	Erlen. sans ressorts (2)	Moyenne (sans) [s_e]
<i>A. R39</i>	0.813	0.757	0.785 [0.04]	0.709	0.567	0.6 [0.1]
<i>S. coelicolor</i>	4.096	5.219	4.7 [0.8]	1.941	2.227	2.1 [0.2]
<i>S. TK24</i>	5.028	4.382	4.7 [0.5]	2.201	2.273	2.24 [0.02]
<i>S. albus G</i>	6.144	4.992	5.6 [0.8]	2.756	(contaminé)	2.76 [-]

Tableau 3 : Agitation à 200 rpm: poids secs (g/l) après 46 heures de culture

Souche	Erlen avec ressorts (1)	Erlen avec ressorts (2)	Moyenne (ressorts) [s_e]	Erlen. sans ressorts (1)	Erlen. sans ressorts (2)	Moyenne (sans) [s_e]
<i>A. R39</i>	1.546	1.348	1.45 [0.14]	2.314	2.300	2.31 [0.01]
<i>S. coelicolor</i>	4.104	4.554	5.3 [0.3]	3.272	3.826	3.5 [0.4]
<i>S. TK24</i>	4.716	4.526	4.6 [0.1]	3.306	3.400	3.35 [0.07]
<i>S. albus G</i>	2.254	3.316	2.8 [0.75]	3.020	3.396	3.2 [0.3]

4.1.5 L'analyse des résultats

Il faut noter que le milieu de culture a été choisi sans tenir compte des préférences ou caractéristiques des souches testées (dans la mesure où il n'était pas particulièrement adapté à l'une ou l'autre souche). Afin de pouvoir comparer entre eux les résultats tenir compte du fait que le milieu choisi pouvait être mieux adapté à la croissance d'une des souches par rapport aux autres, nous avons calculé pour chaque souche le rapport entre la biomasse obtenue sans ressort et avec ressort pour chaque vitesse de rotation (Tableau 4).

Un rapport inférieur à 1 signifie une influence positive de la présence des ressorts (vraisemblablement due à une amélioration de l'aération) puisque la souche croît moins bien lorsqu'ils sont absents. Par contre, un rapport supérieur à 1 montre une plus grande sensibilité au stress hydrodynamique entraîné par les ressorts qu'à l'amélioration du pouvoir d'aération.

Une faible vitesse de rotation (120 rpm dans notre cas) peut entraîner un manque d'oxygène qui se répercute sur la croissance, manque qui peut être compensé par la présence de ressorts. Une souche plus sensible au manque d'oxygène qu'à la turbulence pourra donc voir sa croissance (à faible vitesse de rotation) favorisée par la présence de ressorts (rapport des poids secs < 1)

Par contre, à une vitesse de rotation plus importante (200 rpm) où la limitation en oxygène ne devrait plus poser de problème, une souche sensible au stress hydrodynamique verra sa croissance favorisée par l'absence de ressort (rapport des poids secs > 1).

Tableau 4 : Rapport entre les poids secs obtenus sans et avec ressort dans les Erlenmeyers (-)

Souche	Vitesse d'agitation	
	120 rpm	200 rpm
A. R39	0.815	1.593
S. coelicolor	0.446	0.820
S. TK24	0.476	0.725
S. albus G	0.496	1.152

À 120 rpm, les trois souches de *Streptomyces* sont plus sensibles au manque d'oxygène qu'au stress hydrodynamique (le rapport des poids secs vaut $0.4 \text{ à } 0.5 < 1$), alors qu'*Actinomadura* marque beaucoup moins de différence (rapport des poids secs = $0.8 < 1$ mais plus proche de 1 que dans le cas des souches de *Streptomyces*).

Par contre, à 200 rpm (où l'oxygénéation est moins limitée), *Actinomadura* marque une nette préférence pour la situation sans ressorts (rapport des poids secs = 1.6 >1), alors que les *Streptomyces* affichent des valeurs beaucoup plus proches de 1.

C'est donc *Actinomadura* R39 qui a été retenue pour servir de témoin lors de notre étude de l'influence du stress hydrodynamique sur les bactéries filamenteuses.

Actinomadura R39 est une bactérie filamentuse qui a été identifiée dans des échantillons prélevés par le professeur Welsch (1963) en 1958 dans le parc National Albert du Congo (secteur Ruwenzori). Son appartenance au genre *Actinomadura* provient du fait que la structure du peptidoglycane (de sa paroi) est différente de celle des *Streptomyces*. La souche fait partie depuis cette époque de la collection du CIP. Elle se conserve sur gélose inclinée Asparagine-Glycérol (composition : voir *Annexe I*) en chambre froide.

4.2 ***La standardisation des inoculums***

Le manque de reproductibilité des cultures de micro-organismes filamenteux étant un problème bien connu (Reuss, 1988), il était important de gérer cette difficulté afin de ne pas introduire de variable opératoire non contrôlée lors de nos cultures et de pouvoir les comparer. Des expériences précédentes avec *Streptomyces albus G* nous avaient montré que de trop nombreux repiquages successifs sur pente de gélose d'une souche filamentuse pouvait conduire à sa dégénérescence et modifier ses caractéristiques de croissance (et de production). La standardisation était une condition essentielle pour mener à bien notre travail. Sans cela, il eut été difficile de savoir si une différence entre deux cultures provenait de la modification des conditions d'agitation ou n'était qu'une variation aléatoire due à des différences de préculture. C'est pourquoi nous avons préparé une préculture mère, qui nous a servi à ensemencer toutes nos cultures.

La préculture mère a été préparée à partir d'une pente d'*Actinomadura* R39 datée du 6/9/1993 (souche sauvage) fournie par le CIP. Cette pente a été remise en culture dans 250 ml de milieu TBE (composition : voir *Annexe I*) dans un Erlenmeyer de 1 litre équipé de ressorts pour favoriser l'aération. Après environ 90 heures de culture sur table agitée et thermostatisée à 28 °C, la culture ainsi obtenue a été centrifugée dix minutes à 3000 rpm. Les culots ont été repris dans environ 50 ml d'un mélange LB/glycérol à 50% de chaque constituant (composition : voir *Annexe I*). Le glycérol sert à préserver l'intégrité des bactéries lors du stockage à basse température. Ce mélange a été

réparti dans des Eppendorfs de 1.5 ml à raison de 1 ml par récipient. Les starters ainsi préparés ont été stockés à -70 °C.

Il va sans dire que toutes les opérations décrites dans ce paragraphe se sont déroulées stérilement, tant pour l'environnement que pour le matériel. Si la conservation prolongée de cette préculture mère provoquait néanmoins une perte de sa viabilité (et une diminution de la concentration de l'inoculum), nous aurons au moins l'assurance que les cellules de départ sont dans le même état physiologique et morphologique.

Toutes les cultures ultérieures ont eu pour inoculum une préculture préparée par l'addition du contenu d'un de ces Eppendorfs dans un Erlenmeyer de 1 litre avec ressorts contenant 250 ml de milieu TSB stérilisé (composition : voir *Annexe I*), mis à incuber 24 heures à 28°C sur une table agitante.

4.3 *La mise au point d'un milieu de culture*

La souche choisie avait déjà fait l'objet d'une étude (Granier, 1990) et un milieu complexe avait été mis au point. Toutefois, deux différences fondamentales existaient par rapport à notre travail : tout d'abord, il s'agissait de la souche transformée pour la (sur)production de DD-carboxypeptidase, et ensuite le milieu avait été optimisé pour cette production, sans tenir compte de la complexité de préparation, du prix, ou de la croissance (au contraire, on cherchait à minimiser cette dernière en faveur de la production).

Il nous semblait dès lors indispensable de refaire ce type d'étude et de mettre au point un milieu plus simple à préparer, moins coûteux (pour pouvoir faire par la suite des études à plus grande échelle), et surtout adapté à la souche sauvage et favorisant sa croissance.

L'optimisation de ce milieu a été réalisée en utilisant la méthode des plans statistiques d'expériences.

4.3.1 Les plans d'expériences

4.3.1.1 Introduction

Afin d'étudier l'influence de plusieurs facteurs sur une réponse, une méthode habituelle consiste à étudier l'influence de la variation d'un seul facteur à la fois, tout en maintenant les autres à une valeur constante, et puis ensuite de sélectionner un autre facteur pour une nouvelle série d'expériences. Toutefois, cette méthode est assez lente à mettre en œuvre (et d'autant plus laborieuse

que le nombre de variables à analyser est important), et elle est inadéquate pour détecter des interactions entre plusieurs facteurs (une interaction étant une mesure de l'effet sur la réponse dû au changement de niveau d'un facteur, et qui dépend du niveau d'un ou plusieurs autres facteurs). Une alternative consiste à réaliser un plan factoriel qui examine toutes les combinaisons possibles des variables indépendantes à leurs différents niveaux.

Ce type de recherche n'est applicable que lorsque le nombre des variables et de leurs niveaux sont réduits (Erpicum, 1990). En effet, si l'examen de trois variables à deux niveaux ne nécessite que huit expériences (2^3) pour couvrir le plan factoriel, l'optimisation à trois niveaux de cinq nutriments demanderait 243 (soit 3^5) expériences ! Il est dès lors conseillé d'avoir recours à des plans partiels définis par les statisticiens. Ces plans, appelés "plans factoriels incomplets" sont des portions équilibrées de plans factoriels (Plackett and Burman, 1946; Box and Behnken, 1960).

Les bénéfices de cette technique sont les suivants (Murphy, 1977) :

- ce type de plan donne plus d'informations qu'une approche non planifiée;
- elle constitue une approche organisée tant pour la collecte que pour l'analyse de l'information. Souvent les conclusions à l'issue d'un plan d'expériences sont évidentes sans analyse statistique extensive. Par contre, une approche qui décide au hasard des conditions expérimentales peut mener à des résultats difficiles à analyser;
- elle permet une évaluation de la fiabilité de l'information par rapport aux variations expérimentales et analytiques;
- elle permet de détecter les interactions entre les variables expérimentales, amenant à des prédictions de la réponse plus fiables dans des zones du plan non directement couvertes par l'expérimentation.

Afin de préparer un plan ayant une signification statistique, on doit avoir une estimation de la reproductibilité du phénomène étudié. La variabilité est exprimée en terme d'estimation de l'écart standard s_e (qui est une évaluation de l'écart type). Il est supposé constant dans la gamme de réponse couverte par le plan. Les variables expérimentales (ou indépendantes) sont contrôlées par l'opérateur. Le niveau d'une variable est sa valeur durant un essai.

Quand la réponse et les variables sont continues, il est pratique de considérer la relation variable/réponse en termes de fonction mathématique, ou modèle. En l'absence d'information a

priori sur la fonctionnalité de la dépendance entre réponse et variables expérimentales, on utilise les modèles linéaires (vis-à-vis des paramètres). Ceux-ci fournissent en effet le moyen le plus simple pour quantifier la dépendance entre deux variables. Les modèles (polynômes) du premier et second ordre sont les plus couramment utilisés.

Le modèle du premier ordre (par rapport à chaque variable X_i) est le plus simple. Il est utile pour prédire une réponse Y dans une gamme limitée des variables X_i . Il peut être utilisé pour la sélection des variables, où l'intérêt est centré sur celles ayant le plus grand effet sur la réponse Y . Le modèle le plus simple si la courbure est faible (pour n variables indépendantes) est celui du premier ordre par rapport à chaque variable X_i (les indices du double produit sont tels qu'on n'a jamais de terme X^2_i , le second indice j variant de $i+1$ à n) :

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (10)$$

- Si b_i est proche de zéro, on dit que la variable X_i n'a pas d'effet significatif sur la réponse, dans les limites de confiances (LC) choisies.
- Le terme $X_i X_j$ (où $i \neq j$) représente les interactions entre les variables X_i et X_j .
- Si $b_{ij} \approx 0$: le modèle est du 1^{er} ordre strictement additif.

Dans le cas d'un modèle du premier ordre, seuls deux niveaux sont nécessaires pour estimer les paramètres. Ces niveaux seront désignés par *bas* et *haut*, ou "−" et "+". La variation de la réponse Y entre ces niveaux est appelée *effet principal* de la variable X_i .

Le modèle du second ordre (comprenant cette fois le terme en X^2_i) est quant à lui utilisé lorsque la réponse par rapport à des variables est une courbe. Il est obtenu en ajoutant un terme quadratique ou de courbure (j varie cette fois de 1 à n).

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^n \sum_{j=1}^n b_{ij} X_i X_j \quad (11)$$

Ce type de modèle donne une excellente description de la réponse dans la gamme de l'expérience, et peut être utilisé en interpolation ou pour trouver un optimum, s'il en existe un. Il est cependant très peu fiable pour des prédictions en dehors de la gamme d'expérimentation. Dans le cas d'un modèle du second ordre, un troisième niveau est requis pour estimer le paramètre de courbure b_{ii} . Ce troisième niveau, généralement choisi à mi-chemin entre les deux niveaux extrêmes, est appelé

point central, et est codé *milieu* ou "0". L'effet de courbure est défini comme étant la différence entre la réponse expérimentale du point central et la valeur attendue pour ce point à partir d'un modèle du 1^{er} ordre ajusté entre les deux points extrêmes.

Le nombre de paramètres à ajuster pouvant devenir rapidement assez grand avec le nombre de variables indépendantes n , un modèle plus simple est généralement préféré au début d'une recherche. Au fur et à mesure que des variables sont éliminées par l'expérience, le modèle peut être graduellement étendu à un modèle du second ordre partiel ou complet, ou remplacé par un modèle théorique (cinétique de Monod,...). Ce type de modèle peut nécessiter plus de trois niveaux des variables pour l'ajustement des paramètres.

4.3.1.2 La taille du plan d'expériences

Lorsqu'il y a plus d'une variable, chaque essai est défini comme une combinaison des niveaux des variables. Si l'on veut estimer les effets et interactions de n variables à p niveaux, on a besoin de p^n expériences, que l'on décrit comme un plan factoriel. Un inconvénient majeur du plan factoriel à p^n expériences est le nombre important d'essais pour un n croissant (même pour $p=2$). Pour circonvenir ce problème et si la variance de l'erreur expérimentale n'est pas trop grande (c'est-à-dire qu'on n'a pas besoin de beaucoup d'observations pour obtenir la précision nécessaire), des fractions convenables du plan (ou sous-ensembles) peuvent être utilisées. Il sera toutefois nécessaire de sacrifier une partie ou toutes les estimations des interactions. Ces plans partiels sont utiles à l'étape de sélection des variables. Ils conviennent pour estimer les effets principaux et la courbure globale, et, dans certains cas, des groupes d'interactions.

La précision sur l'estimation des effets principaux, des interactions et de la courbure dépend du nombre de données utilisées pour l'estimation, ainsi que de l'erreur sur la réponse s_e . L'expérimentateur doit donc, dans le cas d'un plan partiel, préciser le nombre total d'essais N pour atteindre la précision désirée. Pour ce faire, on détermine la variation minimale de la réponse ayant un intérêt pratique, désignée Δ . L'expérience doit permettre de déclarer cet effet statistiquement significatif avec un grand degré de certitude (si cet effet existe). La relation entre N et le rapport Δ/s_e a été développée par les statisticiens (Murphy, 1977) :

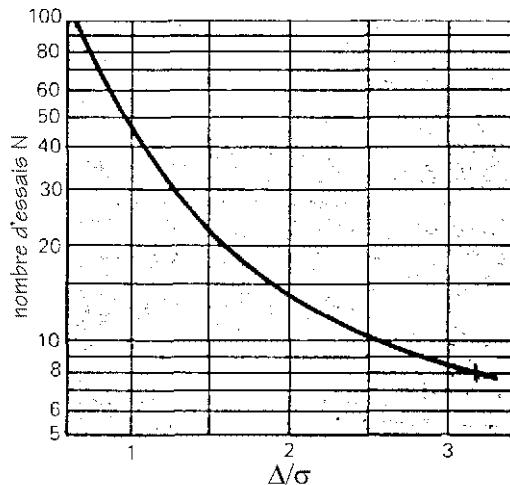


Figure 13 : Relation entre le nombre d'expériences et la précision relative (Murphy, 1977)

Si on veut détecter un effet égal à 2 fois l'erreur ($\Delta/s_e = 2$), il faudra environ 14 essais. Pour $\Delta/s_e = 1$, il en faut 50. Si ce nombre d'essais est beaucoup plus grand que celui du plan d'expériences choisi sur base d'un modèle mathématique, il est nécessaire de refaire le plan entier une ou plusieurs fois. Le but premier de cette répétition est de fournir une précision suffisante pour les estimations. Un but secondaire peut être aussi d'obtenir une estimation plus précise de s_e , qui pourra être utilisée pour établir la taille des plans suivants.

4.3.1.3 La phase de sélection des variables

L'attention se porte principalement sur la détermination des variables les plus importantes. Les buts secondaires seront une détection grossière des effets de second ordre (courbure, interactions), et l'obtention d'une meilleure estimation de s_e pour les phases ultérieures.

On utilise un modèle d'ordre 1 du type :

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_n X_n + (\text{courbure globale}) + (\text{interactions})$$

Les interactions individuelles et les effets de courbure ne sont pas directement estimés, mais leur présence peut être mesurée indirectement.

Un exemple de plan partiel est proposé au Tableau 5 (Plackett and Burman, 1946). Il s'agit d'un plan comprenant huit essais.

Chaque plan consiste en une matrice de – et +, qui correspondent aux niveaux bas et haut de chaque variable. Chaque rang du tableau définit les niveaux des variables pour un essai expérimental donné.

Chaque plan peut prendre en compte jusqu'à ($N-I$) variables en N essais, mais la pratique est de laisser 2 à 5 colonnes non assignées pour évaluer les groupes d'interactions. Les variables peuvent être assignées aux colonnes de n'importe quelle manière. Les colonnes non attribuées, appelées *variables fictives* (ou *factices*), ne sont pas utilisées pour définir les conditions expérimentales, mais entreront en jeu lors de l'analyse des résultats.

Dans le cas du plan présenté au Tableau 5, la première expérience (notée Essai 1) sera faite en mettant en œuvre les variables X1, X2, X3 et X4 à leur niveau bas, et les variables X5, X6, et X7 à leur niveau haut (s'il s'agit d'une expérience à 7 variables opératoires).

Tableau 5 : Exemple de plan partiel

Essai	X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7
1	-	-	-	-	+	+	+
2	+	-	-	+	+	-	-
3	-	+	-	+	-	+	-
4	+	+	-	-	-	-	+
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	-	+	-
7	-	+	+	-	+	-	-
8	+	+	+	+	+	+	+
Estimation des effets principaux de la variable i et des interactions (notées i-j)* entre les variables Xi et Xj	1	2	3	4	5	6	7
	4-5	3-5	2-5	1-5	2-3	1-3	1-2
	3-6	4-6	1-6	2-6	1-4	2-4	3-4
	2-7	1-7	4-7	3-7	6-7	5-7	5-6

(* par exemple 4-5 représente l'effet de l'interaction des variables X4 et X5)

Cette table ne représente qu'une petite fraction du nombre total de combinaisons variables/niveaux que l'on peut faire. Il est possible que certains de ces essais soient impraticables pour des raisons de faisabilité ou de sécurité. De plus, certains essais absents pourraient présenter un certain intérêt. Pour s'adapter aux conditions expérimentales, ces plans peuvent être modifiés en changeant la polarité d'une ou plusieurs colonnes (c'est-à-dire interchanger les + et les -). De cette façon, on peut obtenir un ensemble d'essais mieux appropriés à la situation. Après préparation théorique du plan, l'ordre des essais doit être rendu aléatoire pour éviter les erreurs systématiques. Pour estimer la

courbure et l'erreur expérimentale, deux ou plusieurs points centraux sont ajoutés aux points du plan. Les points centraux doivent être uniformément répartis parmi les points expérimentaux.

4.3.1.4 L'évaluation des effets principaux *MI*

Les plans à 2 niveaux évoqués précédemment ont en commun les caractéristiques suivantes : la moitié des essais pour chaque variable est à bas niveau (et l'autre moitié à haut niveau) et chaque variable est "équilibrée" par rapport aux autres dans la mesure où à la fois les essais à bas et haut niveaux de chaque variable sont répartis au sein des bas et hauts niveaux des autres variables (Murphy, 1977).

L'effet principal *MI* ("main interaction") est calculé à partir de la différence entre les moyennes des essais à bas et haut niveaux :

$$\text{Effet principal de } X_i = \frac{\sum (\text{réponses à haut } X_i) - \sum (\text{réponses à bas } X_i)}{(N / 2)} \quad (12)$$

(l'effet principal MI_i de la variable X_i correspond en fait au b_i des équations (10) et(11))

Ainsi, tous les résultats sont utilisés pour estimer l'effet de chaque variable, et ceci indépendamment des effets des autres variables.

Par exemple, en se référant au plan d'expériences comprenant 8 essais proposé au Tableau 5, l'effet principal de la variable X1 sera obtenu en additionnant les résultats des essais 2,4,6 et 8 et en leur soustrayant les résultats des essais 1, 3, 5 et 7, le tout étant divisé par 4.

4.3.1.5 L'estimation des interactions

Sauf si certaines colonnes du plan sont inutilisées, le plan doit être augmenté pour inclure des colonnes pour les interactions. Une colonne de ce type est formée à partir des colonnes des deux variables qui sont concernées, en multipliant les entrées de leurs colonnes respectives selon la "règle des signes" appliquée en multiplication ($+ * + = +$, $- * - = +$, $+ * - = -$). L'interaction est alors calculée comme étant la moyenne de la différence de réponse entre une moitié du plan (niveau haut) et l'autre moitié (niveau bas), suivant la même procédure que pour les effets principaux.

Par exemple pour un plan 2^2 on a la disposition suivante (Murphy, 1977):

Tableau 6 : Estimation des interactions entre les variables

Essai	X ₁	X ₂	X ₁ X ₂	Réponse
1	-	-	+	Y ₁
2	+	-	-	Y ₂
3	-	+	-	Y ₃
4	+	+	+	Y ₄

Dans le cas du plan d'expériences comprenant 8 essais proposé au Tableau 5, si on n'étudie que 6 variables, la colonne de la variable X7 n'est pas utilisée lors de la mise en œuvre expérimentale. Par contre, cette variable fictive peut être utilisée pour estimer les interactions des variables X1 et X2, puisque les valeurs des niveaux de X7 correspondent à X1*X2. L'interaction de X1 et X2 est calculée en additionnant les résultats des essais 1, 4, 5, et 8 et en leur soustrayant les résultats des essais 2, 3, 6 et 7, le tout étant divisé par 4.

4.3.1.6 La signification des résultats

La limite de confiance (au-delà duquel une variable est considérée comme ayant un effet non nul) est donnée par (Murphy, 1977):

$$LC = \pm \frac{t s_e}{\sqrt{\frac{N}{4}}} \quad (13)$$

où LC = limite de confiance (par exemple à 95%)

s_e = estimation de l'erreur

t = variable de Student pour la limite de confiance choisie (par exemple 95%) et les v degrés de libertés de s_e (avec $v = \sum (r_i - 1)$)

N = nombre d'essais du plan

Si l'effet principal d'une variable est supérieur à cette limite de confiance, on peut dire qu'il est statistiquement non nul au niveau de confiance choisi.

4.3.1.7 L'estimation de l'erreur expérimentale

On peut obtenir une première estimation de l'erreur expérimentale s_e au moyen des réplications (qui sont les points centraux PC) (Murphy, 1977).

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}{(r - 1)}} \quad (14)$$

où Y_i = valeur de Y pour l'essai i

\bar{Y} = moyenne des PC

r = nombre de réplicates

Si on possède une estimation supplémentaire sur l'erreur (provenant par exemple d'essais précédents ou de données sur l'erreur commise lors de la mesure de Y), on peut calculer une erreur s_e contenant ces données sous forme d'une somme pondérée par les degrés de liberté de chaque erreur individuelle $s_{e,i}$: (pour k estimations de l'erreur)

$$s_e^2 = \frac{\sum_{i=1}^k (r_i - 1)s_{e,i}^2}{\sum_{i=1}^k (r_i - 1)} \quad (15)$$

4.3.1.8 La phase d'optimisation

Après élimination des variables n'ayant pas d'effet significatif sur le paramètre étudié, on peut optimiser la valeur des variables retenues. Pour ce faire, on peut utiliser les techniques d'optimisation de surface générées par les effets linéaires, interactifs et quadratiques des variables étudiées. Des plans ont été élaborés pour l'étude de plusieurs variables indépendantes (ex. : Box and Behnken, 1960). Il s'agit de plans à 3 niveaux (-, 0, +), très utiles pour estimer les coefficients d'un polynôme du second degré. Un modèle quadratique complet est requis pour prédire avec précision le point optimum (11). Le point optimum est obtenu par la résolution des équations qui annulent les dérivées partielles $\frac{\partial Y}{\partial X_i} = 0$.

L'étude du Hessien (matrice des dérivées secondes) permet de dire si le point obtenu est un maximum (toutes les valeurs propres sont < 0), un minimum (toutes les valeurs propres sont > 0), ou un point singulier (toute autre combinaison). Le point de selle (ou col) est un point singulier où une seule valeur est positive et toutes les autres négatives.

La table suivante présente un exemple de plan (Box and Behnken, 1960) pour trois facteurs à optimiser. Dans ces tables, le symbole (± 1 , ± 1 , ..., ± 1) signifie que toutes les combinaisons de niveaux hauts et bas doivent être faites. Le nombre de points total est ainsi de $12+3=15$.

Tableau 7 : Exemple de plan d'expériences à trois niveaux pour trois facteurs à optimiser(Box and Behnken, 1960)

$$\left[\begin{array}{ccc} \pm 1 & \pm 1 & 0 \\ \pm 1 & 0 & \pm 1 \\ 0 & \pm 1 & \pm 1 \\ 0 & 0 & 0 \end{array} \right] \quad \left. \right\}^{12} \quad \overline{3} \quad N = 15$$

Le logiciel *SAS* (Statistical Analysis System, SAS Institut Inc., Cary N.C.), fournit l'analyse complète des résultats : le type d'optimum atteint, la valeur prédictive pour la réponse, et celles des variables pour l'obtenir. On utilise pour ce faire la procédure *RSREG* qui ajuste les paramètres d'une surface de réponse quadratique complète par la méthode des moindres carrés et détermine alors les valeurs critiques qui optimisent la réponse, si cette surface a la forme appropriée.

4.3.2 Le choix des composants du milieu de culture

Pour rappel, un milieu de culture optimum doit rassembler tous les éléments nécessaires et doit fournir un apport énergétique suffisant à la croissance et à la maintenance du micro-organisme (Granier, 1990). Il doit aussi contenir des vitamines, des sels minéraux, des éléments en trace, etc. Selon Granier, le glucose et le glycérol sont deux sources de carbone facilement assimilables par la bactérie. De plus, *Actinomadura R39* sécrète une α -amylase capable d'hydrolyser l'amidon en glucose. Par contre, une trop forte concentration de glucose libre provoque l'inhibition de la croissance et de la production de DD-carboxypeptidase. Dans le cas où c'est la cinétique d'hydrolyse de l'amidon en glucose qui règle l'approvisionnement en substrat carboné, on n'observe jamais de glucose libre dans le milieu de culture. Dans ces conditions, une meilleure croissance et une productivité spécifique double ont pu être observées.

Le milieu complexe TAU mis au point par Granier (1990) (voir *Annexe I*) a servi de milieu témoin, ainsi que de composition de base pour certains éléments. Une étude de la production d'enzyme en milieu synthétique avait conduit à l'idée que le milieu TAU ne présentait aucune carence (Granier, 1990).

La **base** du milieu de fermentation était la suivante:

- urée 2 g/l
- K₂HPO₄ 2 g/l

- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g/l
- TE 1 ml/l
- TRIS 100 mM (ajusté à pH=8)

où TE sont des éléments en trace:

- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l
- $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ 1 g/l
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l
- $CaCl_2$ 1 g/l

et TRIS un tampon zwitterionique. Le maintien du pH dans des cultures en Erlenmeyers où la régulation n'est pas possible par ajout de solutions externes peut se faire au moyen d'un tel tampon.

Le milieu TAU comportait en plus de cette base:

- amidon 10 g/l
- peptone 7213 5 g/l
- extrait de levure 10 g/l

La variable dépendante de notre problème était la biomasse produite après environ 24 et 48 heures de culture et estimée par le poids sec (g/l). Les variables indépendantes étaient les composants du milieu de culture (en dehors de la base commune) correspondant aux sources de carbone et d'azote complexes (autres que l'urée).

Les sources de carbone testées étaient l'amidon (notée C1) (pour vérifier son effet) et le glucose (D-glucose monohydrate) (notée C2). Les sources d'azote qui ont été choisies étaient la peptone caséine plus (notée P1) (Organotechnie), la peptone de soja A3 (P2) (Organotechnie), l'extrait de levure (P3) (Organotechnie), l'extrait de viande (P4) (Organotechnie) et le soluble de maïs (P4) (Roquette Frères).

4.3.3 La mise en œuvre d'un premier plan de discrimination des variables

Au total, l'effet de sept variables (deux sources de carbone et cinq d'azote) a été étudié. Dans un premier temps, nous avons choisi le plan à huit expériences présenté au Tableau 5 du §4.3.1.3. Les interactions ont été examinées ultérieurement. En se référant à la Figure 13 au §4.3.1.2, on peut s'attendre à un rapport Δ/s_e de l'ordre de 3.1 (c'est-à-dire que l'on pourra détecter une influence trois fois supérieure à l'erreur expérimentale, ce qui est suffisant pour cette étude).

Les valeurs des niveaux hauts "+" et bas "-" et points centraux "0" sont présentées au Tableau 8 :

Tableau 8 : Valeur des niveaux du plan d'expériences

	Valeur des niveaux		
	-	0	+
sources de carbone	5 g/l	10 g/l	15 g/l
sources de protéines	0 g/l	5 g/l	10 g/l

Le choix des niveaux a été orienté par le fait qu'à aucun moment, la somme des sources de carbone ou de protéines de la composition d'un Erlenmeyer ne devait être nulle.

Le milieu était tamponné par du TRIS 100 mM avec le pH ajusté à 8.

Afin d'obtenir des données sur la reproductibilité, chaque essai était représenté par deux Erlenmeyers de 300 ml munis de ressorts et contenant 100 ml de milieu de culture.

Nous avons ajouté quatre points centraux (PC) et deux Erlenmeyers contenant du milieu TAU comme points de comparaison. Ce qui nous donnait au total $(8*2)+4+2=22$ Erlenmeyers. La totalité des fioles a été placée sur la même table agitée rotative (entre 150 et 200 rpm, pas d'indicateur de vitesse) dans une enceinte thermostatisée à 28°C.

En terme de composition, le plan était le suivant: base + (concentrations en g/l) (selon les niveaux hauts et bas tels que présentés au Tableau 5 et détaillés au Tableau 9):

Tableau 9 : Composition (g/l) du premier plan d'expériences à deux niveaux

Erlen n°	amidon C1	glucose C2	caséine P1	soja P2	levure P3	viande P4	maïs P5
1	5	5	0	0	10	10	10
2	15	5	0	10	10	0	0
3	5	15	0	10	0	10	0
4	15	15	0	0	0	0	10
5	5	5	10	10	0	0	10
6	15	5	10	0	0	10	0
7	5	15	10	0	10	0	0
8	15	15	10	10	10	10	10
PC	10	10	5	5	5	5	5

Les numéros des Erlenmeyers correspondent aux essais constituant le plan d'expériences.

Une préculture a été initialisée par ajout du contenu d'un Eppendorf de la préculture mère dans 250 ml de milieu TSB (voir *Annexe I*) dans un Erlenmeyer de 1 litre avec ressort, mis en incubation

durant vingt-quatre heures à 28 °C sur la table agitante rotative. Chaque Erlenmeyer du plan a été inoculé avec 5 ml de cette préculture.

Après 24 et 46.5 heures de culture, des prises d'échantillons ont été faites et le poids sec a été mesuré sur 10 ml.

4.3.3.1 Les résultats après 24 heures

Tableau 10 : Poids sec après 24 heures (g/l)

Essai	Poids sec (g/l)	Moyenne (g/l)	Écart type s _e
TAU	2.29 3.23	2.76	0.66
1	3.38 2.33	2.86	0.74
2	6.30 5.98	6.14	0.23
3	3.99 3.62	3.81	0.26
4	4.18 4.58	4.38	0.28
5	3.5 4.03	3.77	0.37
6	6.03 6.42	6.23	0.28
7	2.47 2.61	2.54	0.10
8	8.82 8.34	8.58	0.34
PC1	5.28	4.78	0.42
PC2	4.54		
PC3	4.33		
PC4	4.95		

Le Tableau 11 montre le calcul des effets principaux *MI* des différentes variables après 24 heures :

Tableau 11 : Effets principaux après 24 h

	C1	C2	P1	P2	P3	P4	P5
Σ+	25.30	19.30	21.10	22.30	20.10	21.50	19.70
Σ-	13.00	19.00	17.20	16.00	18.20	16.80	18.60
(Σ+)-(Σ-)	12.30	0.30	3.90	6.30	1.90	4.70	1.10
MI	3.08	0.07	0.98	1.58	0.48	1.18	0.28

Nous pouvons calculer l'estimation de l'erreur combinée en tenant compte de l'information obtenue par les réplications des essais et des points centraux :

- Le nombre de degrés de liberté s'élève à $8+3=11$
- La valeur de la variable t pour un niveau de confiance de 95% vaut alors 2.201

$$s_e^2 = 0.15$$

$$s_e = 0.39$$

$$\text{LC(95\%)} = 0.61$$

On constate que **C1** (amidon), **P2** (peptone de soja), **P4** (extrait de viande) et **P1** (peptone de caséine) (par ordre décroissant d'importance) ont un effet positif significatif sur la croissance mesurée après 24 heures de culture (voir Figure 14).

4.3.3.2 Les résultats après 46.5 heures

Tableau 12 : Poids sec après 46.5 heures (g/l)

Essai	Poids sec	Moyenne	Écart type s_e
TAU	3.05 3.12	3.085	0.05
1	3.74 2.91	3.33	0.59
2	7.13 *	7.13	
3	4.70 3.85	4.28	0.6
4	4.52 5.09	4.81	0.4
5	5.21 5.27	5.24	0.04
6	5.71 5.62	5.67	0.06
7	2.14 2.98	2.56	0.59
8	9.36 11.19	10.28	1.29
PC1	6.25	5.58	0.80
PC2	5.12		
PC3	4.69		
PC4	6.25		

* un problème expérimental n'a pas permis d'obtenir une mesure pour ce point

Le Tableau 13 montre le calcul des effets principaux (*MI*) des différentes variables après 46.5 heures:

Tableau 13 : Effets principaux après 46.5 h

	C1	C2	P1	P2	P3	P4	P5
$\Sigma+$	27.88	21.92	23.74	26.92	23.29	23.54	23.65
$\Sigma-$	15.40	21.36	19.54	16.36	19.99	19.74	19.63
$(\Sigma+)-(\Sigma-)$	12.48	0.56	4.21	10.57	3.31	3.81	4.02
MI	3.12	0.14	1.05	2.64	0.83	0.95	1.00

Nous pouvons calculer l'estimation de l'erreur combinée en tenant compte de l'information obtenue par les réplications des essais et des points centraux :

- Le nombre de degrés de liberté s'élève à $7+3=10$
- La valeur de la variable *t* pour un niveau de confiance de 95% vaut alors 2.228

$$s_e^2 = 0.48$$

$$s_e = 0.69$$

$$\text{LC(95\%)} = 1.09$$

On constate que **C1** (amidon) et **P2** (peptone de soja) (par ordre décroissant d'importance) ont un effet positif significatif sur la croissance mesurée après 46.5 heures de culture (voir Figure 14).

4.3.3.3 L'interprétation des résultats du premier plan de discrimination des variables

La Figure 14 illustre les résultats obtenus :

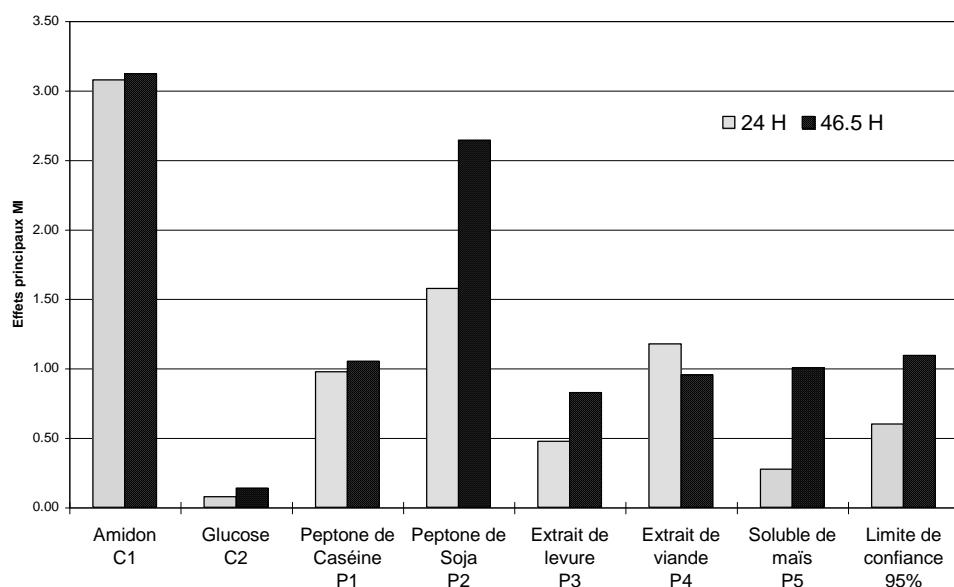


Figure 14 : Résultats du premier plan de discrimination des variables

On constate que ce sont essentiellement l'**amidon** et la **peptone de soja** qui ont un effet positif sur la croissance d'*Actinomadura R39*, ainsi que l'extrait de viande et la peptone de caséine au début de la croissance (lors des 24 premières heures de culture).

Le milieu TAU donne de nettement moins bons résultats : il avait été optimisé pour la production de DD-carboxypeptidase et non pour la croissance de la bactérie elle-même. Il faut noter que les études qui avaient abouti à la mise au point du milieu de culture TAU (Granier, 1990) portaient sur des fermentations en Erlenmeyers (avec ressorts) de durée relativement longue (de l'ordre de 120 heures), avec un maximum de la biomasse vers 60 à 90 heures de culture (selon les milieux testés). Dans le meilleur des cas, on obtenait 5 g/l après 60 heures de culture.

Il nous a donc paru judicieux de faire un plan complémentaire en faisant intervenir l'urée (qui selon les travaux de Granier (1990) pourrait avoir une influence néfaste sur la croissance, alors qu'elle a un effet positif sur la production).

4.3.4 Le second plan de discrimination des variables

Le second plan statistique d'expériences a fait intervenir comme variables indépendantes les concentrations en urée, en peptone de soja et en extrait de viande (les deux sources de protéines les plus performantes). L'utilisation d'un plan à huit essais nous laissait de la marge pour introduire ces trois variables et étudier certaines interactions grâce aux colonnes laissées libres (variables fictives).

La base du milieu de fermentation était la suivante:

- amidon 10 g/l
- K₂HPO₄ 2 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0.6 g/l
- TE 1 ml/l
- TRIS 100 mM (ajusté à pH=8)

Les valeurs des niveaux hauts et bas pour les trois composants testés étaient respectivement de 15 g/l et 5 g/l.

Tableau 14 : Niveaux et concentrations (g/l) du second plan de discrimination

Erlen n°	urée	peptone soja	extrait viande	urée	peptone soja	extrait viande
1	-	-	-	5	5	5
2	+	-	-	15	5	5
3	-	+	-	5	15	5
4	+	+	-	15	15	5
5	-	-	+	5	5	15
6	+	-	+	15	5	15
7	-	+	+	5	15	15
8	+	+	+	15	15	15
PC	0	0	0	10	10	10

On notera que dans le cas présent (à 3 variables indépendantes), le plan statistique partiel rejoint en fait le plan factoriel complet à 2^3 essais. Le nombre total d'Erlenmeyers s'élève à (8 essais*2 erlen)+4 points centraux = 20 Erlenmeyers, qui ont été placés sur la même table agitante dans une enceinte thermostatisée à 28 °C.

4.3.4.1 Les résultats après 24 heures

Tableau 15 : Poids sec après 24 heures (g/l)

Essai	Poids sec (g/l)	Moyenne (g/l)	Écart type s_e
1	2.39	2.32	0.10
	2.25		
2	0.83	0.83	0.01
	0.82		
3	2.41	2.60	0.25
	2.76		
4	0.79	1.25	0.64
	1.70		
5	2.78	2.73	0.08
	2.66		
6	1.13	1.09	0.06
	1.04		
7	3.56	3.55	0.01
	3.54		
8	0.89	1.10	0.29
	1.30		
PC1	1.43	1.40	0.12
PC2	1.31		
PC3	1.27		
PC4	1.54		

Le Tableau 16 montre le calcul des effets principaux (*MI*) des différentes variables après 24 heures. Les interactions entre la peptone de soja et l'extrait de viande sont notées S-V, entre l'urée et l'extrait de viande U-V et entre l'urée et la peptone de soja U-S :

Tableau 16 : Effets principaux et interactions après 24 heures

	urée	soja	viande	S-V	U-V	U-S
$\Sigma+$	4.25	8.48	8.45	7.79	7.09	7.38
$\Sigma-$	11.18	6.95	6.98	7.64	8.34	8.05
$(\Sigma+)-(\Sigma-)$	-6.93	1.53	1.48	0.15	-1.26	-0.67
MI	-1.73	0.38	0.37	0.04	-0.31	-0.17

Calcul de l'estimation de l'erreur combinée calculée en tenant compte de l'information obtenue par les réplications des essais et des points centraux:

- Le nombre de degrés de liberté s'élève à $8+3=11$
- La valeur de la variable t pour un niveau de confiance de 95% vaut alors 2.201

$$s_e^2 = 0.06$$

$$s_e = 0.24$$

$$\text{LC (95\%)} = \mathbf{0.37}$$

On constate que l'urée a un effet significatif important (négatif) sur la croissance mesurée après 24 heures de culture, et que la peptone de soja un effet positif significatif (voir Figure 15). Les interactions des différents composants ne sont pas significatives (non représentées).

4.3.4.2 Les résultats après 47 heures

Tableau 17 : Poids sec après 47 heures (g/l)

Essai	Poids sec (g/l)	Moyenne (g/l)	Écart type s_e
1	2.05 1.84	1.95	0.15
2	0.84 1.07	0.96	0.16
3	2.40 2.65	2.53	0.18
4	0.83 1.97	1.40	0.81
5	2.42 2.38	2.40	0.03
6	1.23 1.35	1.29	0.08
7	4.78 3.66	4.22	0.79
8	0.89 1.50	1.20	0.43
PC1	1.29	1.33	0.09
PC2	1.32		
PC3	1.26		
PC4	1.46		

Le Tableau 18 montre le calcul des effets principaux (MI) des différentes variables après 47 heures. Les interactions entre la peptone de soja et l'extrait de viande sont notées S-V, entre l'urée et l'extrait de viande U-V et entre l'urée et la peptone de soja U-S :

Tableau 18 : Effets principaux et interactions après 47 heures

	Urée	Soja	Viande	X4	S-V	U-V	U-S
$\Sigma+$	4.84	9.34	9.11	7.08	8.32	6.96	6.94
$\Sigma-$	11.09	6.59	6.83	8.86	7.62	8.98	8.99
$(\Sigma+)-(\Sigma-)$	-6.25	2.75	2.28	-1.78	0.70	-2.02	-2.05
MI	-1.56	0.69	0.57	-0.45	0.18	-0.51	-0.51

Calcul de l'estimation de l'erreur combinée calculée en tenant compte de l'information obtenue par les réplicates des essais et des points centraux:

- Le nombre de degrés de liberté s'élève à $8+3=11$
- La valeur de la variable t pour un niveau de confiance de 95% vaut alors 2.201

$$s_e^2 = 0.14$$

$$s_e = 0.38$$

$$\text{LC (95\%)} = 0.59$$

On constate que l'**urée** a un effet significatif (négatif) important sur la croissance mesurée après 47 heures de culture, et que la peptone de soja un effet positif significatif (voir Figure 15). Les interactions des différents composants ne sont pas significatives (non représentées).

4.3.4.3 L'interprétation des résultats

Les résultats sont assez difficiles à interpréter, dans la mesure où l'urée a un effet fortement négatif. Dans la conception du plan, nous n'avions malheureusement pas mis le niveau bas de l'urée à zéro, ce qui aurait permis de mieux estimer les effets des autres composants. Lors du premier plan, la concentration (fixe) en urée n'était que de 2 g/l, ce qui réduisait son effet inhibiteur et permettait aux autres composants de s'exprimer.

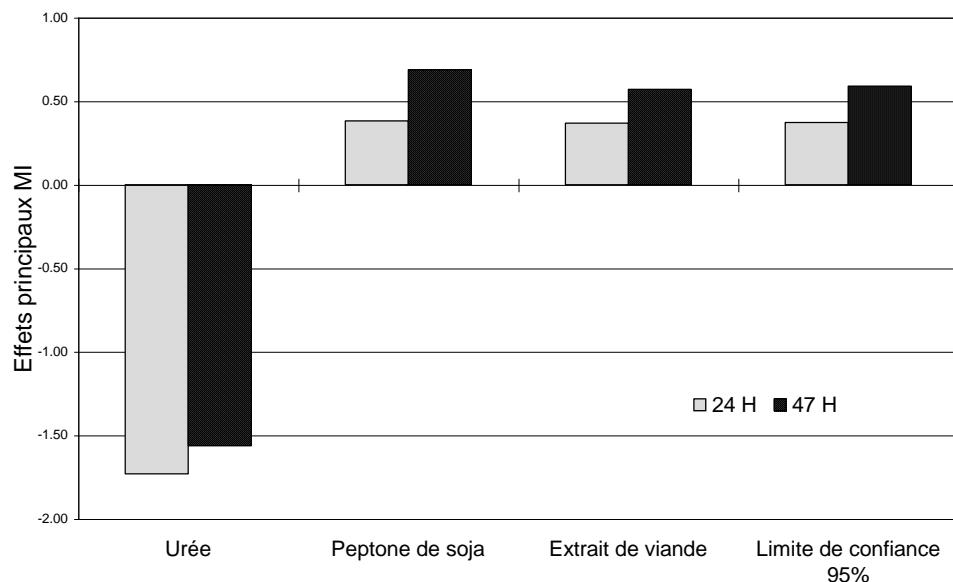


Figure 15 : Résultats du second plan de discrimination des variables

Les conclusions que l'on peut retirer de ce plan sont que l'**urée** a un effet fortement négatif (et devra être supprimé du milieu final), que la **peptone de soja** a un effet positif léger même dans des

conditions très défavorables pour la croissance, et que l'effet de l'extrait de viande se situe à la limite de confiance.

4.3.5 L'optimisation du milieu de culture

Étant donné les conditions défavorables (présence d'urée) du second plan de discrimination (ce qui pouvait masquer l'effet de l'extrait de viande), nous avons choisi d'optimiser les trois facteurs suivants : les concentrations en amidon, en peptone de soja et en extrait de viande. Le plan d'expériences correspondant est le plan présenté au Tableau 7 du § 4.3.1.8.

La base du milieu était la suivante:

- K₂HPO₄ 2 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0.6 g/l
- TE 1 ml/l
- TRIS 100 mM (ajusté à pH=8)

Les valeurs codées "+1", "0 "et "-1" pour les variables à optimiser valaient respectivement 15 g/l, 10 g/l et 5 g/l. Un seul Erlenmeyer a été préparé pour chaque point du plan, afin de pouvoir mettre tous les Erlenmeyers sur la même table agitante. Un point central supplémentaire a été ajouté, ce qui portait leur nombre total à 16.

Chaque Erlenmeyer contenait 100 ml de milieu dans un Erlenmeyer de 300 ml avec ressorts, inoculés avec 5 ml d'une préculture (préparée à partir d'un Eppendorf de préculture mère ajouté à 250 ml de milieu TSB, voir *Annexe I*) âgée de 31 heures. Deux poids secs ont été effectués dans chaque Erlenmeyer sur 10 ml de culture.

Tableau 19 : Résultats après 22 et 47 heures du plan d'optimisation

numéro	Poids sec après 22h (g/l)			Poids sec après 47h (g/l)		
	Mesures	moyenne	Écart type s_e	Mesures	moyenne	Écart type s_e
1	5.68 5.43	5.56	0.18	3.69 4.33	4.01	0.45
2	3.51 3.39	3.45	0.085	3.81 3.4	3.605	0.29
3	4.78 4.93	4.86	0.11	4.13 4.48	4.305	0.25
4	2.97 2.88	2.925	0.064	2.67 2.63	2.65	0.028
5	7.41 6.38	6.895	0.73	3.99 3.77	3.88	0.16
6	3.42 *	3.42		3.61 3.36	3.485	0.18
7	5.31 *	5.31		3.76 4.01	3.885	0.18
8	2.8 *	2.8		2.8 3.07	2.935	0.19
9	4.41 *	4.41		3.96 3.76	3.86	0.14
10	4.1 4.26	4.18	0.11	3.48 3.24	3.36	0.17
11	4.41 4.7	4.56	0.21	3.52 3.84	3.68	0.23
12	4.77 4.63	4.7	0.099	3.39 3.7	3.545	0.22
13 (PC1)	4.81 *	4.81		3.85 3.72	3.785	0.092
14 (PC2)	4.8 4.7	4.75	0.071	3.95 4.1	4.025	0.11
15 (PC3)	4.67 4.5	4.585	0.12	3.18 3.37	3.275	0.13
16 (PC4)	5.23 5.07	5.15	0.11	4.37 3.88	4.125	0.35
PC		4.82	0.24		3.80	0.38

* des problèmes expérimentaux n'ont pas permis l'obtention d'une mesure (collage du filtre)

L'analyse a été faite en utilisant le logiciel SAS et sa procédure RSREG.

L'estimation de l'erreur s_e^2 vaut 0.062 après 22 heures ($s_e = 0.25$) et $s_e^2 = 0.049$ ($s_e = 0.22$) après 447 heures.

4.3.5.1 L'analyse des résultats après 22 heures de culture

L'optimisation a d'abord pris en compte les trois facteurs (amidon, soja et viande). Seule la partie linéaire de la régression est significative. L'extrait de viande ne semble pas avoir d'influence sur la réponse du système. La solution du problème est un point de selle, ce qui ne permet pas l'optimisation (SAS propose même une concentration négative en extrait de viande).

En ne retenant que les grandeurs amidon et peptone de soja, il existe un optimum, qui est un maximum. Les concentrations optimales sont respectivement de 23.1 g/l pour l'amidon et 11.8 g/l pour la peptone de soja. Toutefois, la concentration proposée pour l'amidon sort des bornes d'exploration du plan, ce qui peut être sujet à caution. Il était dès lors plus cohérent de prendre comme valeur optimale réelle la concentration maximale testée pour cet élément (15 g/l).

4.3.5.2 L'analyse des résultats après 47 heures de culture

L'analyse faite sur les trois facteurs a mené à un point de selle, de même celle effectuée en ne prenant en compte que l'amidon et le soja. Si on recherchait l'optimum en ne prenant en compte qu'un seul facteur à la fois, seul le terme indépendant de l'équation (intercept) avait une valeur significative.

4.3.5.3 La composition du milieu optimisé

Étant donné le temps dont nous disposions pour cette phase du travail, il ne nous a pas été possible de pousser plus en avant la mise au point du milieu de culture. Les résultats les plus probants étaient ceux fournis par l'analyse du plan à trois niveaux après 22 heures de culture. L'objectif étant de mettre au point un milieu de culture simplifié mais performant, il nous semblait atteint.

La composition finale du milieu qui servira aux expériences en fermenteur est la suivante:

- Amidon 15 g/l
- Peptone de soja A3 12 g/l
- K₂HPO₄ 2 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0.6 g/l
- TE 1 ml/l

(la présence de tampon n'est plus nécessaire puisque la régulation du pH sera faite via un dispositif d'ajout d'acide ou de base).

La composition optimisée du milieu de culture est proche de celle de l'Erlenmeyer n°2 du premier plan mis en œuvre lors de la première phase de discrimination des variables (Tableau 9). Cet essai contenait 15 g/l d'amidon, 5 g/l de glucose, 10 g/l de peptone de soja et 10 g/l d'extrait de levure, soit 20 g/l de source d'azote (en plus de la base commune). Il donnait comme résultats un poids sec de 6.14 g/l après 24 heures de culture, et 7.13 g/l après 48 heures. Cette valeur élevée de la biomasse ainsi que son évolution continue montrent une composition équilibrée et répondant aux besoins de la souche lors de ses phases successives de développement.

Après 24 heures, l'essai n°6 donnait des résultats équivalents (6.23 g/l), mais la concentration après 48 heures diminuait à 5.67 g/l, ce qui indiquait un problème de composition en ce qui concerne la phase de maintenance. Seul l'essai n°8 permettait de produire une biomasse plus importante que le n°6 (8.58 g/l à 24h et 10.28 g/l à 48 h) mais il contenait l'ensemble des sources de carbone et d'azote à leur niveau le plus élevé (respectivement 10 g/l et 15 g/l), ce qui faisait un total de 30 g/l pour le carbone et 50 g/l pour l'azote. Il ne faut pas perdre de vue que le but de cette phase du travail était la mise au point d'un milieu simplifié, qui ne devait contenir qu'une seule source de carbone et d'azote, et ce type de composition ne répondait pas à ces exigences.

4.4 Les conclusions sur la mise au point préliminaire aux fermentations

Le choix d'une souche sensible au stress hydrodynamique s'est fait sur base de la comparaison de la croissance dans des conditions plus ou moins agressives. La souche *Actinomadura R39* a été retenue pour l'étude en fermenteur.

La mise au point d'un milieu de culture simplifié mais performant en utilisant la méthode des plans statistiques d'expériences s'est révélée une tâche complexe mais qui aurait été encore plus difficile à mettre en œuvre sans cet outil statistique. Le résultat final est un milieu ne comprenant que trois types d'éléments : une source de carbone (amidon), une source d'azote organique (peptone de soja, qui contient également du carbone) et des sels.

5 Fermentations

5.1 La préparation de l'inoculum

L'inoculum standardisé a été préparé comme décrit au § 4.2. Pour l'injection dans le fermenteur, nous avons utilisé un Erlenmeyer stérile préparé comme décrit au § 3.2.4. Le volume de l'inoculum était de 250 ml, ce qui correspond à 5% du volume utile du fermenteur.

5.2 Les conditions de fermentation

Toutes les fermentations ont été faites à 28°C et avec une surpression de 25 kPa. Le pH est régulé à 8. L'aération se faisait avec un débit fixe de 1 vvm (c'est-à-dire 1 volume d'air par volume de fermenteur et par minute, soit 5 litres par minute).

Afin d'étudier l'influence de la concentration en oxygène dissous, nous avons mené une première fermentation sans réguler la concentration en oxygène dissous. Nous avons choisi la plus faible vitesse d'agitation utilisée avec des turbines Rushton : 300 rpm. Lors d'une autre expérience, la concentration en oxygène dissous a été maintenue supérieure à un minimum de 10% de la saturation. Toutes les autres expériences ont été faites avec une consigne de concentration en oxygène dissous minimum à 30% de la saturation (les résultats sont présentés au § 5.4.2). La station de mélange des gaz était utilisée pour la régulation de l'oxygène dissous en enrichissant l'air en oxygène si nécessaire (le contrôle se faisait en ajustant la proportion des deux gaz dans le flux dont le débit était fixé à 1 vvm).

Nous avons choisi comme variable de référence (c'est-à-dire qui aura une valeur identique pour les deux mobiles) la vitesse périphérique des pales des mobiles. La vitesse de cisaillement maximale lui est proportionnelle, et c'est le facteur le plus utilisé pour caractériser l'influence du stress hydrodynamique (Reuss, 1988). De plus, cette variable permettait d'intégrer la différence de diamètre entre les deux mobiles utilisés dans la comparaison des résultats.

Le Tableau 20 reprend les conditions expérimentales des fermentations. Pour des raisons de durée des fermentations, nous n'avons examiné que deux vitesses de rotation des Intermig.

Tableau 20 : Conditions expérimentales

Turbines Rushton ($d=56\text{mm}$)	Intermig ($d=102\text{mm}$)	Vitesse périphérique
300 rpm (5 s^{-1})		0.88 m/s
450 rpm (7.5 s^{-1})	247 rpm (4.12 s^{-1})	1.32 m/s
600 rpm (10 s^{-1})	329 rpm (5.48 s^{-1})	1.76 m/s
900 rpm (15 s^{-1})		2.64 m/s

Afin de nous assurer de la reproductibilité, chaque expérience a été répétée au moins une fois. Leur ordre a été déterminé aléatoirement pour la première fermentation dans chaque condition.

Le Tableau 21 reprend l'ensemble des expériences qui ont été traitées. La première colonne contient le numéro de la fermentation et la seconde les conditions opératoires (sauf indication contraire, la consigne pour la concentration en oxygène dissous minimale était de 30%). Le taux d'inoculum est de 5%, sauf pour la fermentation n°20 où il est de 0.83%. Les notations comprennent le mobile (TR pour turbines Rushton et I pour Intermig) et la vitesse de rotation (en rpm) : TR300 signifie 300 rpm avec les turbines Rushton et I247 = 247 rpm avec les Intermig.

Tableau 21 : Tableau récapitulatif des expériences

N°	Type
1	TR300 (0% saturation)
3	TR300(10% saturation)
5	TR300
15	
9	TR450
17	
19	
22	
20	TR450 (inoculum 0.83%)
8	TR600
16	
7	TR900
18	
10	I247
13	
12	I329
14	

La liste des numéros des fermentations comprend des lacunes dues à des problèmes techniques (moussage, panne, etc.) ou à des contaminations.

À chaque prise d'échantillon, deux poids secs étaient effectués sur 10 ml de culture. Nous avons également préparé deux plaques de microscope destinées à l'analyse d'images ultérieure. La préparation des plaques est décrite plus en détails dans le *Chapitre IV : Morphologie*.

5.3 Le suivi des fermentations

Les graphiques caractéristiques des fermentations reprennent les grandeurs essentielles qui évoluent au cours de la culture : l'oxygène dissous (en % de saturation), la biomasse (poids sec et turbidité), le dioxyde de carbone dans les gaz de sortie et le signal de sortie du régulateur pH, noté "outpH". Si ce signal est positif, il correspond à l'ajout de base (et s'il est négatif, d'acide). La modification de ce signal correspond à un changement de substrat consommé : par exemple la métabolisation de l'amidon (du glucose) acidifie le milieu (ce qui entraîne l'ajout de base) alors que la consommation des protéines le basifie par production d'ammoniaque (d'où l'ajout d'acide).

Un exemple de fermentation avec les turbines Rushton à 450 rpm (avec $pO_2 = 30\%$ de la saturation au minimum) est repris à la Figure 16 :

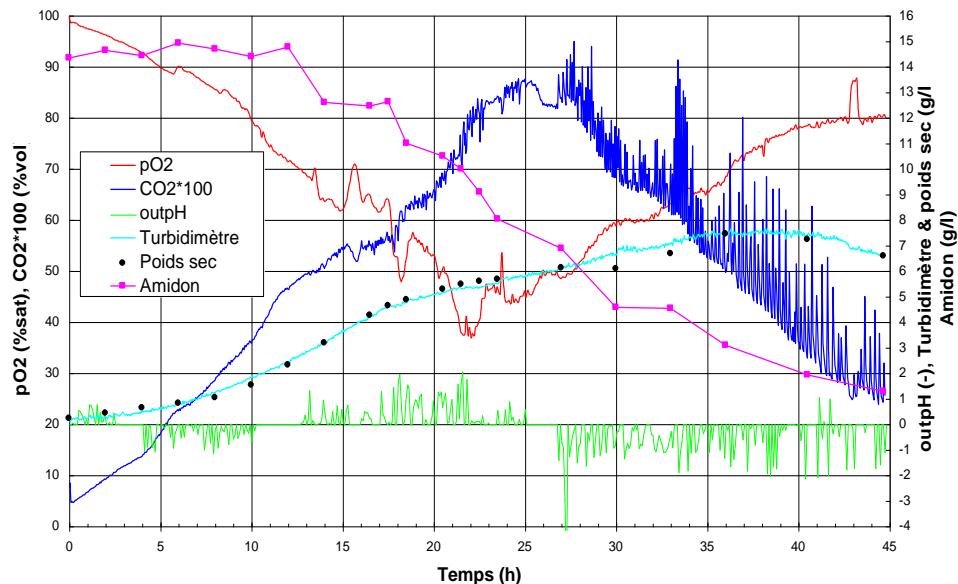


Figure 16 : Mesures enregistrées lors de la fermentation n°9, turbines Rushton à 450 rpm

On constate qu'à cette vitesse d'agitation (ainsi qu'aux vitesses supérieures), il n'y a pas besoin d'enrichir l'air injecté en oxygène. La capacité d'aération du fermenteur est suffisante pour subvenir aux besoins de la souche.

Il n'y a quasiment pas de phase de latence. Après une légère acidification du milieu (les trois premières heures), on observe une basification, sans doute due à la consommation de petits peptides. *Actinomadura R39* ne peut métaboliser l'amidon qu'après avoir produit une α -amylase, ce qui peut expliquer qu'elle commence par consommer un substrat plus accessible. Entre 12 et 26 heures de fermentation, le milieu s'acidifie en consommant l'amidon (dont la concentration diminue), puis la souche assimile également les protéines et le signal outpH passe définitivement en négatif (balance "en faveur" de la basification du milieu).

La concentration en oxygène dissous passe par un minimum (aux environs de 22 heures). Le maximum de la concentration en CO₂ dans les gaz de sortie est postérieur au minimum de l'oxygène dissous, et la diminution de la concentration en CO₂ se fait parallèlement au passage du signal outpH en négatif. La biomasse est alors à son maximum (en termes de poids sec).

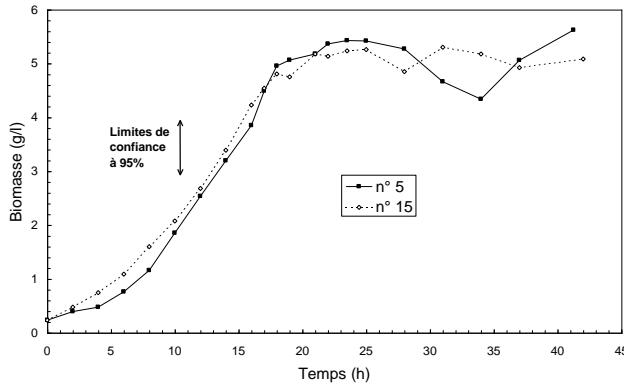
Il nous fallait choisir un moment précis des fermentations pour effectuer l'analyse de la morphologie (par analyse d'images). Plutôt que de prendre arbitrairement un temps donné de la fermentation, nous avons préféré opter pour un moment "métaboliquement donné" afin d'éviter des perturbations incontrôlables dues à une vitesse de croissance différente ou à la présence d'une éventuelle phase de latence. Notre choix s'est porté sur l'échantillon correspondant au minimum de la concentration en oxygène dissous. Les cellules sont alors en fin de croissance et entament la phase de maintenance. Un autre avantage était que cet instant se situait dans la journée où le suivi était fait manuellement : il était préférable de réaliser les plaques destinées à l'examen microscopique à partir d'un échantillon fraîchement prélevé plutôt que de devoir utiliser un échantillon prélevé automatiquement et stocké plusieurs heures à basse température (ce qui pouvait altérer la morphologie).

5.4 *Les résultats des fermentations : le poids sec*

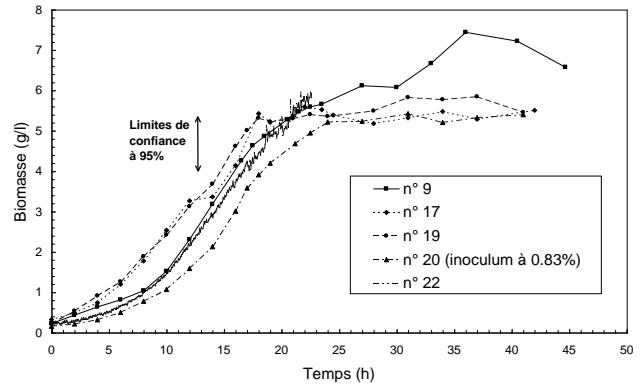
5.4.1 La reproductibilité

Les écarts entre les différentes expériences menées dans des conditions identiques ne diffèrent pas significativement, bien qu'un intervalle de temps de plus d'un an sépare certaines réplications (Figure 17). Pour rappel, l'estimation de l'erreur lors de la mesure du poids sec est $s_e = 0.2 \text{ g/l}$ (voir §3.1.1). Ce qui signifie que la précision de la mesure de la biomasse par le poids sec dans des

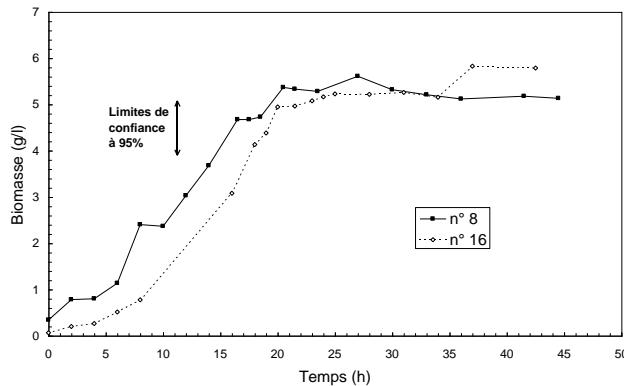
limites de confiance à 95% est de l'ordre de ± 0.5 g/l. Globalement et compte tenu de la variabilité biologique, la reproductibilité des expériences en termes de croissance est tout à fait satisfaisante.



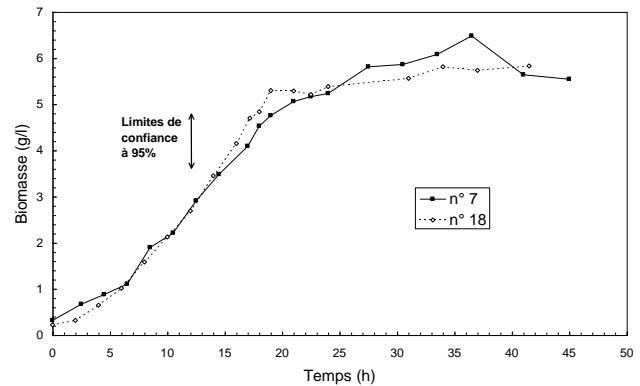
(a) turbines Rushton 300 rpm



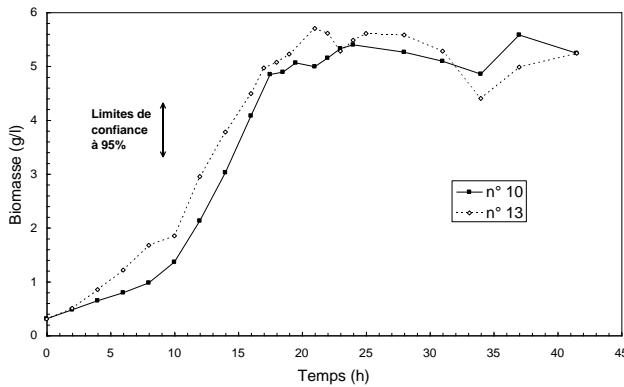
(b) turbines Rushton 450 rpm



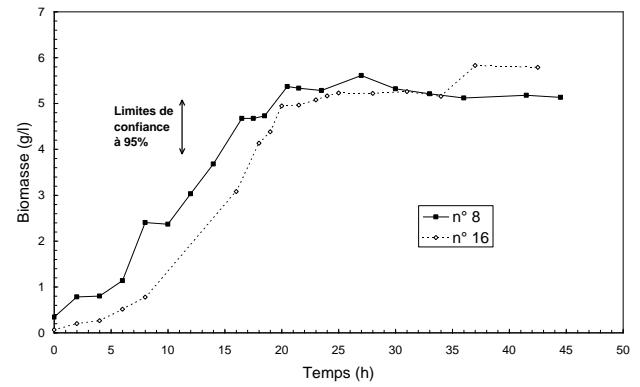
(c) turbines Rushton 600 rpm



(d) turbines Rushton 900 rpm



(e) Intermig 247 rpm



(f) Intermig 329 rpm

Figure 17 : Reproductibilité des expériences de fermentation

5.4.2

L'influence de la concentration en oxygène dissous

Nous avons étudié l'influence de la concentration en oxygène dissous sur la croissance d'*Actinomadura R39*. Ces expériences ont été menées avec les turbines Rushton à 300 rpm. Dans la

première expérience (Figure 18a), aucune régulation de la concentration en oxygène dissous n'est appliquée. On constate qu'il diminue et tombe à zéro au fur et à mesure de la croissance. La production de CO₂ chute lorsque la concentration en oxygène dissous atteint une valeur nulle, et le métabolisme diminue fortement (la régulation pH n'est plus nécessaire).

Nous avons alors fixé un minimum de 10% de la saturation comme consigne de régulation (Figure 18b). Un léger complément d'oxygène est nécessaire lorsque la biomasse atteint son maximum. L'activité métabolique se maintient même lorsque la concentration en oxygène dissous est à sa valeur minimale (la régulation du pH est activée durant l'entièreté de la fermentation).

Enfin, une troisième expérience avait pour consigne un minimum de 30% de la saturation (Figure 18c). L'apport en oxygène est beaucoup plus important dans ce dernier cas.

Malgré la contrainte imposée, on ne note pas de différence significative sur la biomasse produite, même si l'activité métabolique semble plus intense (en se référant à la régulation du pH) (Figure 18d).

Par sécurité, nous avons choisi d'imposer une concentration en oxygène dissous minimale de 30% de la saturation pour éviter tout risque de carence.

Remarque : lors de l'expérience n°3 à 10% de saturation, la culture a pris en cours de fermentation une coloration jaune foncé puis orange (au lieu de la coloration jaune pâle habituelle). On note un léger ralentissement de la croissance à partir de la 13^{ème} heure de culture, mais nous n'avons cependant pas relevé de contamination lors de l'examen au microscope des échantillons.

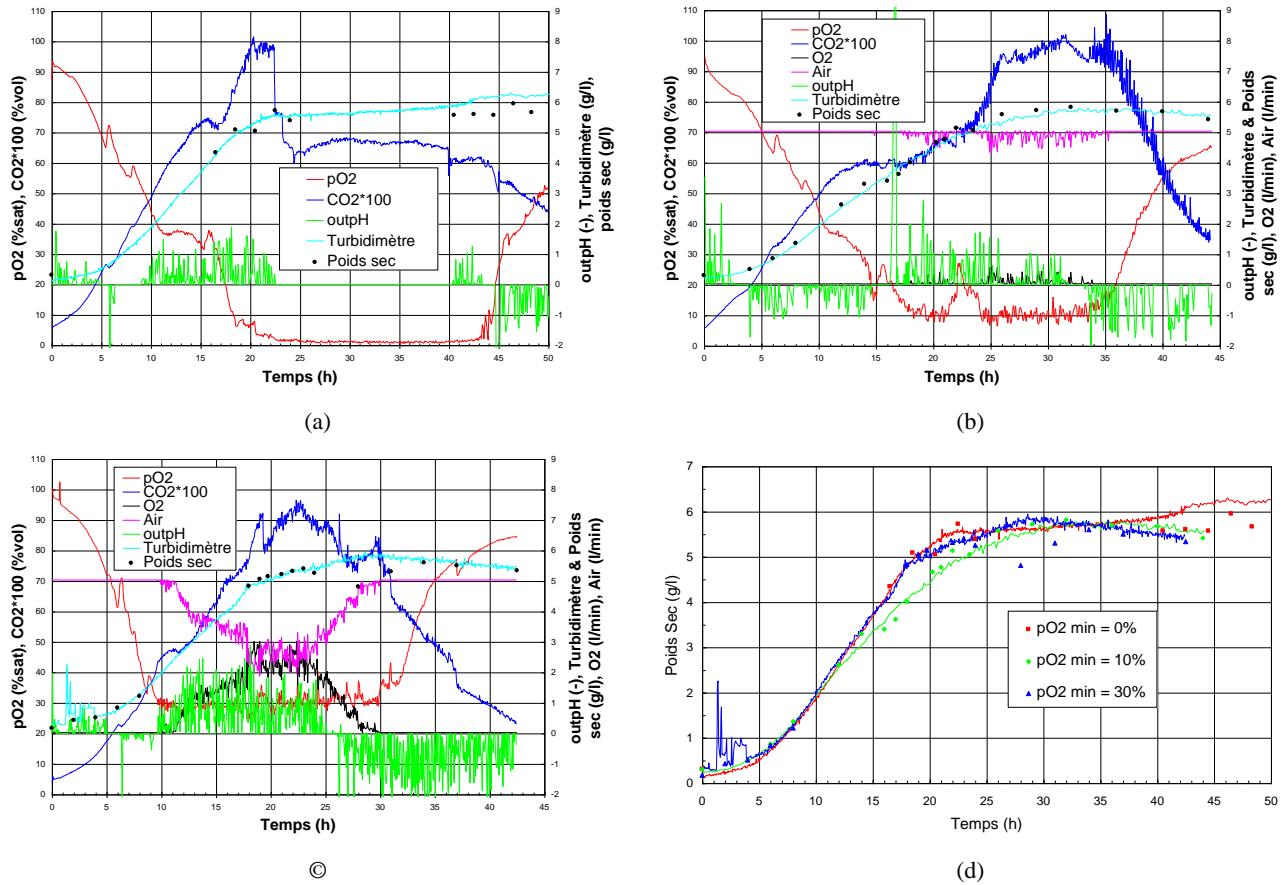


Figure 18 : Influence de la concentration minimale en oxygène dissous (a) pas de régulation, (b) pO_2 minimum = 10% sat, (c) pO_2 minimum = 30% sat, (d) poids sec (g/l)

5.4.3 L'influence du taux d'inoculation

La Figure 17b montre que la biomasse de l'expérience n°20 (turbines Rushton 450rpm) dont l'inoculum était de 0.83% (volumique) affiche un certain retard par rapport à celles dont l'inoculum était de 5 %, mais que la concentration finale rejoint celle des autres fermentations. Le même graphique en échelle logarithmique (Figure 19) montre que la pente des courbes de croissance (c'est-à-dire le taux de croissance maximale) est similaire. Le décalage ne provient donc que de la différence de concentration de l'inoculum.

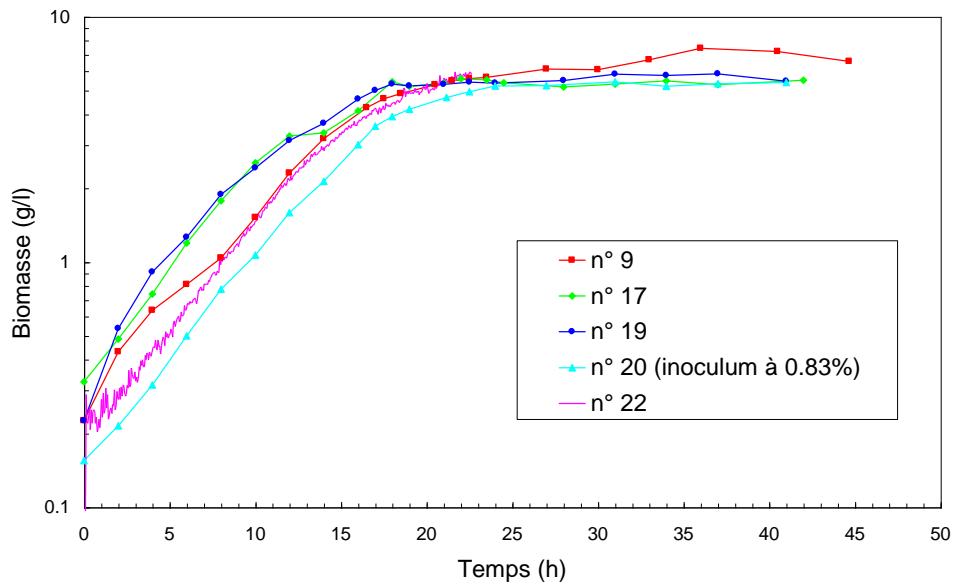
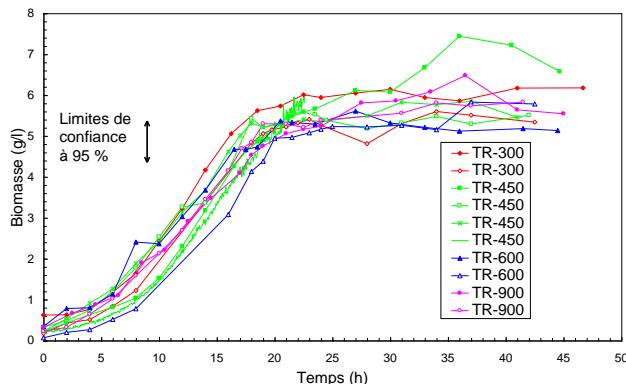


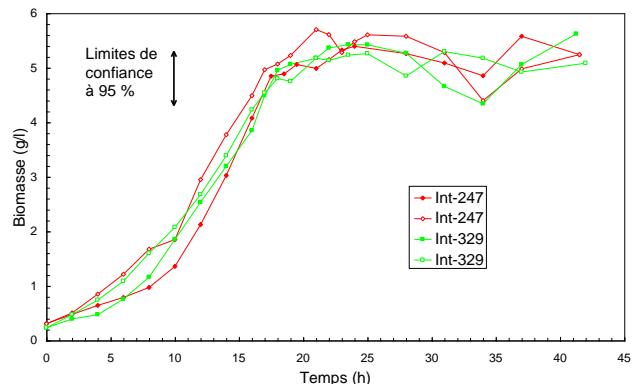
Figure 19 : Log biomasse pour les fermentations avec les turbines Rushton à 450 rpm

5.4.4 L'influence de la vitesse d'agitation

Les Figure 20 a et b montrent les résultats obtenus pour les différentes vitesses d'agitation pour les deux types de mobiles ($pO_2 \text{ min} = 30\%$). Étant donné la reproductibilité et l'erreur commise lors de la mesure du poids sec, il n'apparaît pas d'influence significative de la vitesse d'agitation pour un mobile donné.



(a) turbines Rushton



(b) Intermig

Figure 20 : Influence de la vitesse d'agitation sur la croissance

5.4.5 L'influence du type de mobile

La Figure 21 reprend l'ensemble des résultats obtenus pour la biomasse :

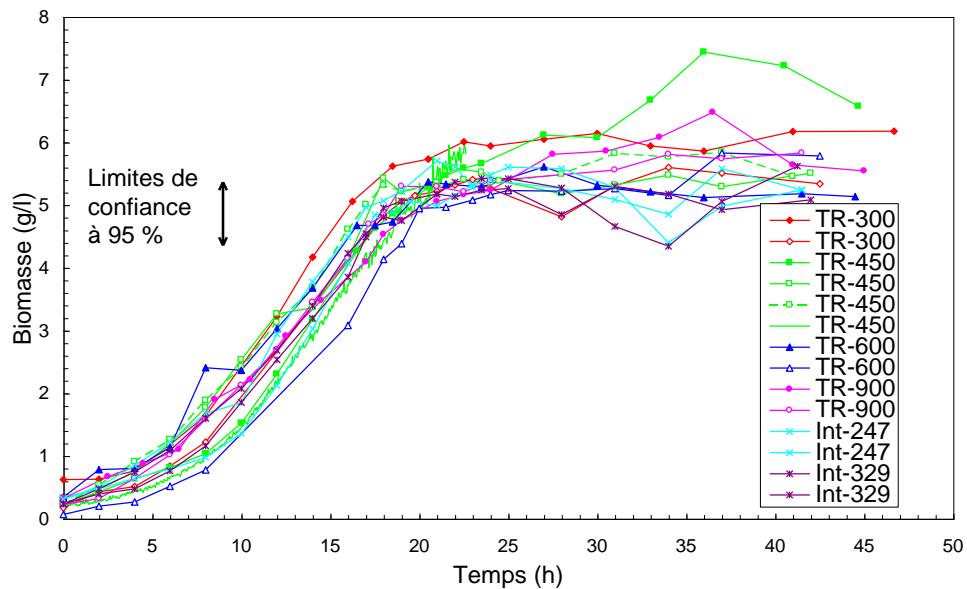


Figure 21 : Comparaison des courbes de croissance de l'ensemble des fermentations

On ne note aucune différence significative entre les courbes provenant des fermentations effectuées avec les Intermig ou avec les turbines Rushton. Une différence (éventuelle) de la morphologie ne sera due qu'à l'action de l'hydrodynamique du fermenteur et non à une différence de croissance (quelle qu'en puisse être la cause).

Les taux de croissance, représentés par les pentes des courbes de la biomasse sur le même graphique en coordonnées logarithmiques, sont également très proches (Figure 22). La partie linéaire du graphique, qui correspond à la phase de croissance exponentielle, ne s'étend pas au-delà de la 10^{ème} heure de fermentation. Sur la Figure 16, on voit que la phase exponentielle se termine lorsqu'*Actinomadura R39* commence à métaboliser l'amidon (avec passage du signal outpH au positif). Le ralentissement du taux de croissance traduit donc un passage progressif d'un métabolisme d'assimilation de petits peptides à un métabolisme plus lent d'assimilation de l'amidon.

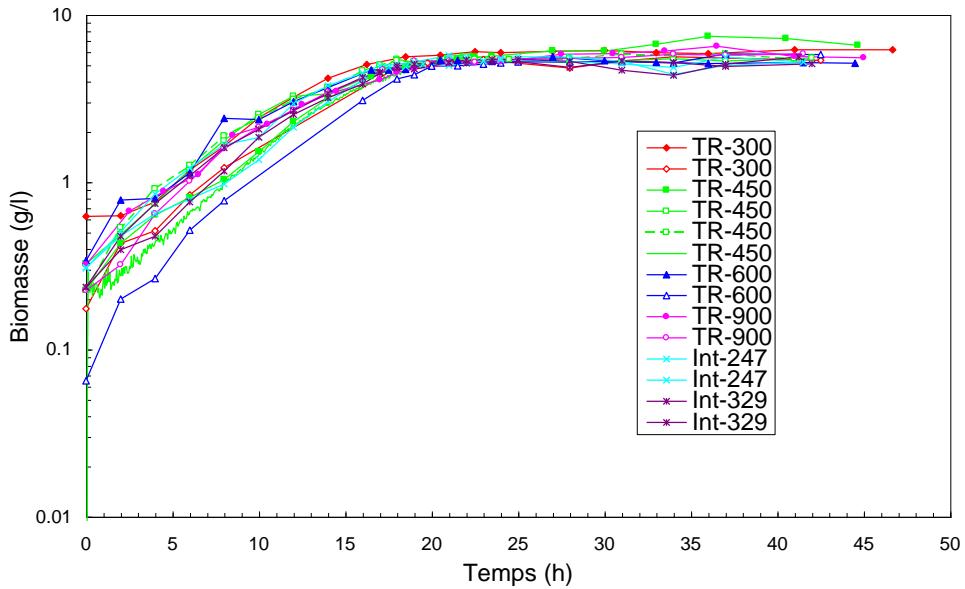


Figure 22 : Comparaison des courbes de croissance de l'ensemble des fermentations (log)

Le taux de croissance maximum μ_{max} varie peu (de 0.15 h^{-1} à 0.23 h^{-1}) : sa valeur moyenne vaut 0.19 h^{-1} (écart type = 0.025 h^{-1}). Le temps de doublement correspondant est de l'ordre de 3.65 h ($\sim 3\text{h}40'$).

6 Conclusions sur les fermentations et le stress hydrodynamique

Nous avons tout d'abord sélectionné une souche bactérienne filamentueuse sur base de sa sensibilité au stress hydrodynamique. Il s'agit d'*Actinomadura* R39. nous avons ensuite mis au point un milieu de culture simple et performant en utilisant la méthodologie des plans d'expériences. Sa composition est la suivante :

- Amidon 15 g/l
- Peptone de soja A3 12 g/l
- K₂HPO₄ 2 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0.6 g/l
- TE 1 ml/l

où TE sont des éléments en trace (voir *Annexe I*).

Nous avons ensuite cultivé *Actinomadura* R39 en fermenteur de laboratoire de 5 litres à plusieurs vitesses d'agitation et avec deux mobiles différents : les turbines Rushton et les Intermig. Les vitesses d'agitation ont été fixées en prenant comme point de comparaison la vitesse périphérique des pales (correspondant au cisaillement maximum).

Sur base de la production de biomasse mesurée par le poids sec, nous avons effectué la comparaison entre les différentes conditions de culture. Les conclusions sont les suivantes :

- grâce à un inoculum standardisé, la reproductibilité des fermentations est satisfaisante;
- la concentration minimale en oxygène dissous n'a pas d'influence significative;
- le taux d'inoculation n'a pas de d'influence significative;
- la vitesse d'agitation pour un mobile donné n'a pas de d'influence significative;
- le type de mobile utilisé n'a pas de d'influence significative.

Toutes les cultures ont ainsi donné des résultats similaires en termes de production de biomasse. Malgré les différentes conditions d'agitation, *Actinomadura* R39 ne semble pas trop souffrir du stress hydrodynamique. Cette caractéristique en fait un capteur morphologique satisfaisant : une différence de la morphologie de cette bactérie dans diverses conditions de culture sera due à l'action directe des contraintes liées au stress hydrodynamique sur les pelotes et non pas à une modification de sa croissance.

7 Bibliographie

Berovic M., Koloini T., Olsvik E.S. and Kristiansen B. (1993) Rheological and morphological properties of submerged citric acid fermentation broth in stirred-tank and bubble column reactors. *Chem. Eng. J.*, **53**, B35-B40

Box G.E.P. and Behnken D.W. (1960) Some three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*. **2**, 455-475

Bronnenmeier R. and Markl H. (1982) Hydrodynamic stress capacity of microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **24**, 553-578

Caulet P.J.C., van der Lans R.G.J.M. and Luyben K.Ch.A.M. (1996) Hydrodynamical interactions between particles and liquid flows in biochemical applications. *Chem. Eng. J.*, **62**, 193-206

Caussette M., Gaunand A., Delepine S., Planche H. and Lindet B. (1997) Inactivation d'enzyme en colonne à bulle: étude cinétique. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **11(57)**, 139-144

Cherry R.S. and Kwon K.Y. (1990) Transient shear stresses on a suspension cell in turbulence. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 563-571

Cooke M., Middleton J.C. and Bush J.R. (1988) Mixing and mass transfer in filamentous fermentations. Proceedings of the 2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics, Editor R. King, BHRA The Fluid Engineering Center, Cranfield, Bedford, UK, 37-64

Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M. and Luyben K.Ch.A.M. (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 715-726

Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M. and Luyben K.Ch.A.M. (1998) Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 409-419

Cutter L.A. (1966) Flow and turbulence in a stirred tank. *AIChE J.*, **12**, 35-45

Dunlop E.H. and Ye S.J. (1990) Micromixing in fermentors : metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to fluid turbulence. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 854-864

Erpicum T. (1990) Étude et optimisation de la production d'enzymes extracellulaires par des souches de *Streptomyces* transformées génétiquement. Thèse de Doctorat en Sciences Biochimiques. Université de Liège

Granier B. (1990) La DD-carboxypeptidase d'*Actinomadura* R39. Surproduction et utilisation analytique. Clonage et séquençage du gène. Thèse de Doctorat en Sciences Biochimiques. Université de Liège

Gusek T.W., Johnson R.D., Tyn M.T. and Kinsella J.E. (1991) Effect of agitational shear on growth and protease production by *Thermomonospora fusca*. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 371-374

Justen P., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. (1996) Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 672-684

Makagiansar H.Y., Shamlou P.A., Thomas C.R. and Lilly M.D. (1990) The influence of mechanical forces on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Bioprocess Eng.*, **9**, 83-90

Markl H., Bronnenmeier R. and Wittek B. (1991) The resistance of microorganisms to hydrodynamic stress. *Int. Chem. Eng.*, **31**, 185-197

Merchuk J.C. (1991) Shear effects on suspended cells. *Adv. Biochem. Eng.*, **44**, 65-95

Metz B., de Bruyn E.W. and van Suijdam J.C. (1981) Method for quantitative representation of the morphology of molds. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 149-162

Metz B., Kossen N.W.F. and van Suijdam J.C. (1979) The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.*, **11**, 103-156

Mitard A. and Riba J.P. (1988) Morphology and growth of *Aspergillus niger* ATCC 26036 cultivated at several shear rates. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 835-840

Murphy T.D. (1977) Design and analysis of industrial experiments. *Chem. Eng. Sci.*, **6**, 168-182

Nielsen J. (1993) A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 715-727.

Nienow A.W. (1999) Some recent studies related to bioprocess fluid dynamics, Proceeding of the 9th European Congress on Biotechnology (ECB9), Bruxelles, Belgique

Oh S.K.W., Nienow A.W., Al-Rubeai M. and Emery A.N. (1989) The effects of agitation intensity with and without continuous sparging on the growth and antibody production of hybridoma cells. *J. Biotechnol.*, **12**, 45-62

Olsvik E.S. and Kristiansen B. (1992) Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 1293-1299

Paul G.C. and Thomas, C.R. (1997) Characterization of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.*, **60**, 1-59

Peters H.U., Herbst H., Hesselink P.G.M., Lunsdorf H., Schumpe A. and Deckwer W.D. (1989) The influence of agitation rate on xanthan production by *Xanthomonas campestris*. *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1393-1397

Plackett R.L. and Burman J.P. (1946) The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, **33**, 305-325

Reuss M. (1988) Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem. Eng. Technol.*, **11**, 178-187

Schugerl K., Bayer T., Niehoff J., Moller J. and Zhou W. (1988) Influence of cell environment on the morphology of molds and the biosynthesis of antibiotics in bioreactors. Proceeding of the 2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics, Helsingor, Denmark, 229-243

Shamlou P.A., Makagiansar H.Y., Ison A.P. and Lilly M.D. (1994) Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 2621-2631

Smith J.J., Lilly M.D. and Fox R.I. (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1011-1023

Stoots C.M. and Calabrese R.V. (1995) Mean velocity field relative to a Rushton turbine blade. *AICHE J.*, **41**, 1-11

Toma M.K., Ruklisha M.P., Vanags J.J., Zeltina M.O., Leite M.P., Galinina N.I., Viesturs U.E. and Tengerdy R.P. (1991) Inhibition of microbial growth and metabolism by excess turbulence. *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 552-556

Tucker K.G. and Thomas C.R. (1993) Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentation broths. *Trans IChemE*, **71C**, 111-117

van Suijdam J.C. and Metz B. (1981) Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 111-148

van't Riet K. and Tramper J. (1991) Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker Inc., New York

Welsch M. (1963) *Bull. Soc. R. Sci. Liège*, **3**, 304-325

Yang J.D. and Wang N.S. (1992) Cell inactivation in the presence of sparging and mechanical agitation. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 806-816

Zhong J.J., Fujiyama K., Seki T. and Yoshida T. (1994) A quantitative analysis of shear effects on cell suspension and cell culture of *Perilla frutescens* in bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **44**, 649-654

8 Symboles

d	diamètre du mobile	m
d_f	diamètre de la zone de vortex	m
D	diamètre de la cuve	m
D_p	diamètre d'une particule	m
ISF	facteur de cisaillement intégré	
LC	limite de confiance	
MI	effet principal (=main interaction)	
n_b	nombre de pales	
N	vitesse de rotation de l'agitateur	s^{-1} ou rpm
Np	nombre de puissance	
P	puissance dissipée	W
PC	point central	
r	rayon du mobile	m
r	nombre de réplicates	
Re	nombre de Reynolds	
s_e	écart-type (estimation de l'erreur), écart standard	
t	variable de Student	
v_p	vitesse périphérique des pales	m/s
V	volume de fluide	m^3
X	variable indépendante	
Y	variable dépendante	
α	angle d'inclinaison des pales d'un mobile	$^\circ$
$\dot{\gamma}$	vitesse de cisaillement	s^{-1}
$\dot{\gamma}_m$	vitesse de cisaillement moyenne	s^{-1}
$\dot{\gamma}_{\max}$	vitesse de cisaillement maximale	s^{-1}
$\dot{\gamma}_{\tan,\max}$	vitesse de cisaillement tangentielle maximale	s^{-1}
ε_T	puissance spécifique moyenne	W/kg
θ_c	temps de circulation	s
λ_K	échelle de Kolmogoroff	m

μ	viscosité dynamique	Pa.s
ν	viscosité cinématique	m/s ²
ν	nombre de degrés de liberté	
ρ	densité	kg/m ³
τ	tensions de cisaillement	Pa
Φ	fraction de volume caractérisant la zone critique de dissipation d'énergie	

Annexe I

Milieux de culture

1. Milieu TAU avec glucose

- glucose 10 g/l
- urée 2 g/l
- peptone 7213 (Difco) 5 g/l
- extrait de levure 10 g/l
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.6 g/l
- K_2HPO_4 2 g/l
- TE 1 ml/l
- TRIS 100 mM (ajusté à pH=8)

où TE sont des éléments en trace et TRIS un tampon zwitterionique (Gibco BRL). Il se présente sous leur forme acide, et le pH est ajusté à la valeur désirée par du NaOH 4 N.

2. TE (éléments en trace)

- $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l
- $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ 1 g/l
- $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/l
- $CaCl_2$ 1 g/l

3. Gélose Asparagine-Glycérol

- Glycérol 10 g
- L-Asparagine 1 g
- K_2HPO_4 1 g
- Sels 1 ml
- Agar Difco (0140-01) 22 g

La solution de sels se compose de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnCl_2 \cdot 4 H_2O$ et $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ à raison de 1 g/l chacun.

Amener à 1 litre avec de l'eau distillée et autoclaver.

4. Milieu TBE

- TRIS 108 g/l
- Acide borique 55 g/l
- EDTA 9.3 g/l

5. Milieu LB

Le milieu LB (Luria Bertani, Miller, Difco) est un milieu vendu tout préparé. Il suffit de dissoudre 25 g dans un litre d'eau désionisée et d'autoclaver la solution. Cette concentration correspond à

- Bacto tryptone 10 g/l
- Bacto yeast extract 5 g/l
- NaCl 10 g/l

6. Milieu TSB

Le TSB (Trypton Soy Broth, Difco), est un milieu vendu préparé. Il suffit de dissoudre 30 g de TSB dans un litre d'eau désionisée. Cette concentration correspond à :

- Bacto tryptone 17 g/l
- Bacto soytone 3 g/l
- bacto dextrose 2.5 g/l
- NaCl 10 g/l
- K₂HPO₄ 2.5 g/l

7. Milieu TAU (Tris, Amidon, Urée)

- amidon 10 g/l
- urée 2 g/l
- peptone 7213 5 g/l (Difco)
- extrait de levure 10 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0.6 g/l
- K₂HPO₄ 2 g/l
- TE 1 ml/l
- TRIS 100 mM (ajusté à pH=8)

Chapitre II

RHÉOLOGIE

1. INTRODUCTION.....	1
2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
2.1. NOTIONS DE VISCOSITÉ – DÉFINITIONS.....	2
2.2. LES COMPORTEMENTS RHÉOLOGIQUES	3
2.2.1. Les fluides newtoniens.....	3
2.2.2. Les fluides non-newtoniens	3
2.3. LA RHÉOLOGIE DES FERMENTATIONS MYCÉLIENNES	6
2.4. L'IMPORTANCE DE LA RHÉOLOGIE POUR LES PROCÉDÉS DE FERMENTATION	8
2.5. LA MESURE DE LA VISCOSITÉ.....	9
2.5.1. les méthodes de laboratoire.....	10
2.5.2. Un cas particulier: la mesure de la viscosité des suspensions mycéliennes	11
2.5.3. Le choix d'une méthode	15
2.6. L'UTILISATION D'UN MILIEU ARTIFICIEL.....	15
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	17
3.1. LE VISCOSIMÈTRE.....	17
3.2. LA CELLULE DE MESURE.....	17
3.3. LE PROGRAMME D'AJUSTEMENT PARAMÉTRIQUE	19
4. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX	20
4.1. LA RHÉOLOGIE DU MILIEU RÉEL	20
4.1.1. La mesure de la viscosité du milieu avant inoculation.....	20
4.1.2. La mesure de la viscosité du milieu avec bactéries.....	21
4.1.3. La mesure de la viscosité du milieu sans bactéries	26
4.1.4. La modélisation de la viscosité du milieu avec bactéries.....	26
4.2. LA MISE AU POINT D'UN MILIEU ARTIFICIEL	32
4.2.1. Les carboxyméthylcelluloses (CMC).....	32
4.2.2. Le xanthane	36
5. CONCLUSIONS SUR LA RHÉOLOGIE	40
6. BIBLIOGRAPHIE.....	41
7. SYMBOLES	43

Chapitre II

RHÉOLOGIE

1. Introduction

La rhéologie est la science des écoulements et de la déformation de la matière. Elle décrit les interactions entre forces, déformations et temps. Le terme vient du grec *rheos* qui signifie écoulement. La rhéologie est applicable à tous les matériaux, des gaz aux solides. La science de la rhéologie n'est vieille que de 70 ans environ. Elle a été fondée par deux scientifiques à la fin des années 1920, qui éprouvaient le même besoin de décrire les propriétés des écoulements des fluides. Il s'agissait des professeurs Marcus Reiner et Eugène Bingham. Le philosophe grec Héraclite décrivait la rhéologie comme *panta rei – tout s'écoule*. Traduit en termes rhéologiques par Marcus Reiner, cela signifie que tout finit par s'écouler, il suffit d'attendre suffisamment longtemps !

La connaissance des caractéristiques rhéologiques des milieux de fermentation est d'une grande importance pour la maîtrise des phénomènes de transfert (masse et chaleur) (Roels et al., 1974; Blanch and Bhavaraju, 1976), pour l'interprétation des cinétiques réactionnelles et des réponses des capteurs (réponse et fiabilité des sondes), pour la récupération et la purification des produits, pour la conception des bioréacteurs et les études de changement d'échelle. Le comportement rhéologique des milieux de fermentation est souvent très complexe, en particulier du fait de leur caractère biphasique (liquide-solide), voire même triphasique si l'on prend en compte la phase gazeuse. De plus, plusieurs facteurs modifient ce comportement en cours de fermentation. Il faut également noter que les propriétés rhéologiques peuvent être des indicateurs sensibles de l'état de la fermentation et peuvent être utiles pour le contrôle et le suivi. En effet, la viscosité varie en cours de fermentation du fait du développement propre du micro-organisme (cas des micro-organismes filamentueux), de l'évolution de la densité cellulaire, de l'âge de la culture, ou de la synthèse des polysaccharides (entre autres) (Charles, 1978).

Dans ce chapitre, nous rappellerons quelques notions de base de rhéologie. Nous examinerons également les moyens existants pour mesurer la viscosité, et plus particulièrement la viscosité des suspensions mycéliennes.

Nous caractériserons le comportement rhéologique des fermentations effectuées avec *Actinomadura R39* et décrites au *Chapitre I*. Nous mettrons ensuite au point un milieu artificiel ayant des propriétés similaires, et que nous utiliserons ultérieurement pour étudier l'hydrodynamique du fermenteur (qui sera présentée au *Chapitre III*).

2. Étude bibliographique

2.1. Notions de viscosité – Définitions

La viscosité est définie comme une résistance de friction qu'un fluide en mouvement oppose à une force de cisaillement : si l'on considère un cube (de base l) constitué d'un fluide idéal (Figure 1) et qu'on lui applique une force F , il se déforme à vitesse constante v . La déformation de la hauteur est notée h et le déplacement de la base supérieure du cube dans la direction de la force est noté δu .

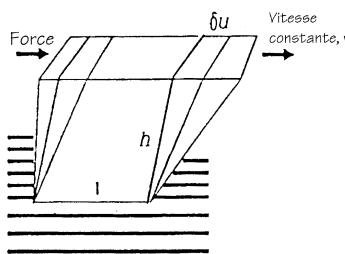


Figure 1 : Déformation d'un cube de fluide sous l'action d'une force F

La tension de cisaillement τ (Pa) est définie comme étant F/A (A étant la surface de la base du cube). Les déformations δu et h sont utilisées pour définir l'effort de cisaillement: $\gamma = \frac{\delta u}{h}$ (-) (Charles, 1978; Nienow, 1998). La vitesse de variation de cet effort est appelée vitesse de cisaillement $\dot{\gamma} = \frac{d\gamma}{dt} = \frac{d}{dt}\left(\frac{\delta u}{h}\right)$ (s^{-1}). La vitesse de cisaillement résultant de l'application d'une tension de cisaillement dépend de la résistance que la substance oppose à l'écoulement, la viscosité μ (Pa.s) :

$$\tau = \mu \dot{\gamma} \quad (Pa) \quad (1)$$

La viscosité résulte donc des forces de frottement qui s'opposent au glissement de couches de fluides les unes par rapport aux autres lorsqu'on les soumet à une force de cisaillement. Cette définition de la viscosité implique l'existence d'un écoulement dit *laminaire*, où une couche de fluide passe le long d'une autre sans transfert de matière entre elles.

Si une substance a une viscosité qui est indépendante de la tension de cisaillement, on l'appelle un fluide *newtonien*. Les fluides qui ne sont pas newtoniens sont regroupés sous le terme générique *non-newtonien*. On les définit comme des fluides pour lesquels la relation tension de cisaillement/vitesse de cisaillement n'est pas constante. On peut se représenter les fluides non-newtoniens comme un mélange de molécules ou de particules dont les tailles et les formes sont différentes. Lorsqu'elles passent les unes près des autres, comme cela arrive lors d'un écoulement, leur taille, leur forme et leur cohésivité déterminent la force nécessaire pour les mettre en mouvement. À chaque vitesse de cisaillement spécifique, leur alignement peut être différent et plus ou moins de force est requise pour maintenir l'écoulement.

Un des facteurs les plus influents sur la viscosité est la température. La viscosité des liquides diminue selon une loi d'Arrhénius, fonction de $\exp(1/T)$ (Coussot et Ancey, 1999; Ananda Rao, 1999).

On distinguera la viscosité *dynamique* μ (Pa.s) (qui est une mesure absolue), mesurée par un système géométrique dans lequel la gravité n'a pas d'influence, de la viscosité *cinétique* ν (m^2/s) mesurée par un système utilisant la gravité (Picque et al., 1994). Elle représente la viscosité rapportée à la masse volumique (ou densité) ρ (kg/m^3) :

$$\nu = \frac{\mu}{\rho} \quad (m^2/s) \quad (2)$$

La viscosité cinétique présente un certain nombre de particularités : elle est indépendante de l'unité de masse ou de force employée, et c'est une grandeur plus complexe que la viscosité dynamique puisqu'elle réunit deux propriétés.

2.2. Les comportements rhéologiques

On caractérise les fluides selon la relation existante entre la vitesse de cisaillement et la tension de cisaillement (van't Riet and Tramper, 1991; Picque et al., 1994; Charles, 1978).

2.2.1. Les fluides newtoniens

Ces fluides suivent la loi de Newton (équation (1)). La contrainte de cisaillement est proportionnelle au gradient de vitesse. Leur viscosité est constante et indépendante des contraintes (mécaniques) appliquées. Ce type de fluide est représenté par la courbe n° 1 des Figure 2 et Figure 3.

2.2.2. Les fluides non-newtoniens

Le rapport entre la contrainte de cisaillement et la vitesse de cisaillement n'est donc plus constant mais varie en fonction de cette dernière. Il traduit la viscosité apparente du fluide considéré μ_a , et il n'a de

signification que si l'on précise la vitesse de cisaillement à laquelle elle a été mesurée. Plusieurs comportements rhéologiques ont été observés et permettent une classification des fluides. Nous distinguerons cinq cas principaux :

- a) ***Les fluides rhéofluidifiants ou pseudoplastiques*** : la viscosité apparente de ces fluides diminue lorsque la vitesse de cisaillement augmente (Figure 2 et Figure 3, courbe 2). La relation la plus répandue pour les décrire est la loi d'Ostwald-de Waele ou loi en puissance :

$$\tau = K \dot{\gamma}^n \quad (Pa) \quad (3)$$

où K est l'indice de consistance ($N.s^n.m^{-2}$) et n est l'indice de comportement (-). K est une mesure directe de la viscosité à une vitesse de cisaillement donné (plus il est grand, plus le fluide est visqueux lorsque soumis à ce cisaillement). n varie de 1 (cas du fluide newtonien, K représentant alors sa viscosité) à des valeurs aussi faibles que 0.1 pour certains produits.

La combinaison des équations (1) et (3) permet d'obtenir l'expression de la viscosité apparente μ_a pour des fluides en loi de puissance :

$$\mu_a = K \dot{\gamma}^{n-1} \quad (Pa.s) \quad (4)$$

- b) ***Les fluides rhéoépaisseurs ou rhéodilatants*** : dans ce cas, la viscosité apparente augmente avec la vitesse de cisaillement. La loi d'Ostwald - de Waele peut également décrire ces fluides, avec cette fois un indice de comportement n supérieur à 1 (Figure 2 et Figure 3, courbe 3).

- c) ***Les fluides de Bingham ou fluides plastiques idéaux*** : ces fluides présentent une élasticité en dessous d'un certain seuil de contrainte de cisaillement τ_0 (Figure 2 et Figure 3, courbe 4) qu'il faut dépasser pour les mettre en mouvement. Au-delà de ce seuil, leur comportement est de type newtonien. Le modèle appliqué s'écrit :

$$\tau = \tau_0 + K_r \dot{\gamma} \quad (Pa) \quad (5)$$

où τ_0 est le seuil d'écoulement ou limite de contrainte (Pa) au-delà duquel le liquide s'écoule. K_r est un coefficient de rigidité (Pa.s).

- d) ***Les fluides à comportement plastique non idéal*** : ces fluides présentent également une limite de contrainte τ_0 , mais au-delà de ce seuil leur comportement est rhéofluidifiant (Figure 2 et Figure 3, courbe 5). Trois types de modèles caractérisent ce comportement:
- le modèle de Herschel-Buckley (qui est somme toute une extension de la loi en puissance) :

$$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n \quad (\text{Pa}) \quad (6)$$

- le modèle de Casson :

$$\tau^{1/2} = \tau_0^{1/2} + K\dot{\gamma}^{1/2} \quad (\text{Pa}^{0.5}) \quad (7)$$

- le modèle de Heinz-Casson :

$$\tau^n = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n \quad \text{ou} \quad \tau = (\tau_0 + K\dot{\gamma}^n)^{1/n} \quad (\text{Pa}) \quad (8)$$

e) ***Les fluides à comportement rhéologique à dépendance réversible au temps de cisaillement :***

les fluides dont la viscosité diminue ou augmente en fonction de la durée de cisaillement pour une vitesse de cisaillement constante sont appelés respectivement thixotropes et antithixotropes (ou rhéopexiques). Lorsque le cisaillement cesse, le fluide retrouve sa viscosité initiale. Ces comportements sont associés à des variations de structure réversibles.

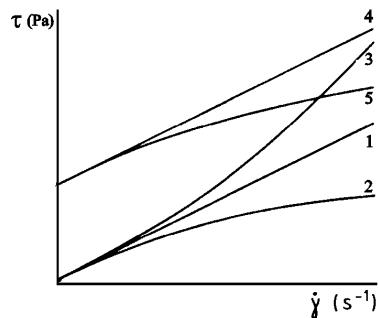


Figure 2 : Relation contrainte de cisaillement - vitesse de cisaillement, pour cinq modèles liquides : 1. newtonien, 2. rheofluidifiant, 3. dilatant, 4. Bingham, 5. Casson (van't Riet and Tramper, 1991)

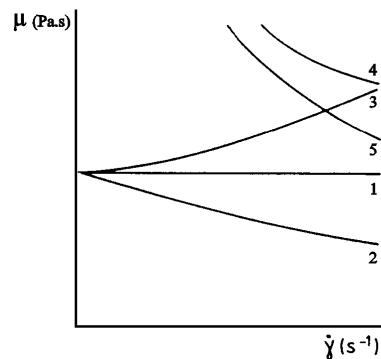


Figure 3 : Viscosité correspondant aux modèles de la Figure 2 (van't Riet and Tramper, 1991)

Les équations proposées ci-dessus ne sont que des relations empiriques, destinées à décrire le comportement rhéologique des liquides (et suspensions). Mais, en tant que telles, elles se révèlent bien souvent très utiles et très pratiques.

La viscosité d'une suspension dépend de divers éléments (Manchanda et al., 1982) :

- la taille, la forme et la masse des particules,
- la flexibilité et la déformabilité des particules,
- la concentration en particules,
- la vitesse de cisaillement.

Et pour les suspensions présentes dans les bioréacteurs :

- l'âge de la culture,
- la présence ou la production de substance exocellulaires (surtout les polysaccharides),

- la structure de la surface des particules (les pelotes).

2.3. La rhéologie des fermentations mycéliennes

On rencontre plusieurs types de comportement selon la composition initiale du milieu de culture. Généralement, le milieu avant inoculation montre un comportement newtonien et similaire à de l'eau du point de vue rhéologique (la viscosité de l'eau est de l'ordre de 10^{-3} Pa.s). Mais au fur et à mesure de l'évolution de la fermentation, son comportement tend à devenir plus complexe et généralement plus difficile à gérer (van't Riet and Tramper, 1991). Ces changements sont provoqués par l'augmentation de la concentration en biomasse et/ou l'accumulation de quantités appréciables de produits de haut poids moléculaire excrétés dans le milieu (Olsvik and Kristiansen, 1992). La viscosité du filtrat d'un échantillon (donc dépourvu de bactéries) est assez faible (de l'ordre de $2 \cdot 10^{-3}$ Pa.s) et ne varie pas significativement au cours de l'évolution de la fermentation (Berovic et al., 1993; Warren et al., 1995).

Il existe également des cas où le milieu initial lui-même montre un comportement rhéologique complexe qui est généralement associé à une grande quantité de solides non dissous (comme c'est souvent le cas dans les milieux industriels) ou à des concentrations modérées à élevées d'amidon. Toutefois, l'action hydrolytique d'enzymes extracellulaires diminue le poids moléculaire moyen de ces nutriments en vue de leur consommation par la bactérie, et la viscosité décroît assez rapidement durant les premières étapes de la fermentation (Charles, 1978; van't Riet and Tramper, 1991).

Dans le cas où des métabolites sont excrétés, ce sont essentiellement les polysaccharides qui ont une forte influence sur la rhéologie (voir le § 4.2.2 concernant le xanthane). Les propriétés de ces solutions sont dès lors déterminées par la nature de la phase continue. D'autres macromolécules, telles que les protéines, peuvent influencer les propriétés rhéologiques, particulièrement en présence de bulles de gaz finement dispersées, mais de tels effets sont généralement négligeables dans les bioprocédés (van't Riet and Tramper, 1991).

Les propriétés rhéologiques des suspensions mycéliennes sont généralement contrôlées par la concentration et la morphologie du mycélium (van't Riet and Tramper, 1991; Roels et al., 1974; Blanch and Bhavaraju, 1976; Olsvik and Kristiansen, 1992; Tucker and Thomas, 1993; Metz et al., 1979). La Figure 4 montre trois formes différentes que le mycélium peut prendre. On a respectivement un filament (a) (qui peut être ramifié ou non), un agrégat (b) qui se présente comme un enchevêtrement

structuré de filaments qui ne sont pas désolidarisés lorsque l'échantillon est dilué, et une pelote (c) qui est constituée d'un corps plein auréolé d'une chevelure plus ou moins touffue et longue.

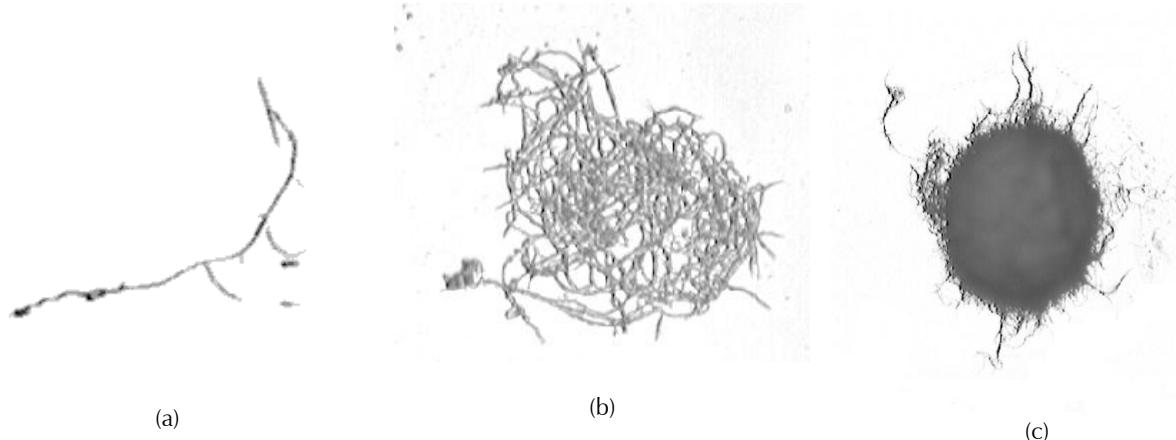


Figure 4 : Différentes morphologies d'*Actinomadura R39* : (a) filament, (b) enchevêtrement, (c) pelote (grossissement 10x)

La viscosité des cultures en filaments libres est généralement plus élevée que celles poussant sous forme de pelotes (Kim *et al.*, 1983; van't Riet and Tramper, 1991; Tucker and Thomas, 1993; Metz *et al.*, 1979). Une croissance sous forme filamenteuse dispersée tend à structurer l'entièreté de la suspension (Roels *et al.*, 1974) et entraîne l'existence d'une limite de contrainte et/ou d'un comportement rhéofluidifiant (Tucker and Thomas, 1993). Dans le cas des pelotes ou enchevêtements (Figure 4 b et c), la rhéologie dépend fortement des interactions entre les pelotes, qui sont fonction de leur structure externe (selon que les pelotes sont lisses ou chevelues). Par exemple, des pelotes lisses et denses pourront montrer un comportement newtonien à une concentration inférieure à 28 g/l, et éventuellement rhéofluidifiant du fait de mécanismes de flocculation-déflocculation (Kim *et al.*, 1983; van't Riet and Tramper, 1991). Généralement, un certain degré de réponse non-newtonienne est constaté du fait que les pelotes sont assez déformables (van't Riet and Tramper, 1991).

La littérature regorge d'informations sur la rhéologie des suspensions mycéliennes (ex. Roels *et al.*, 1974; Charles, 1978; Blakebrought *et al.*, 1978; Manchanda *et al.*, 1982; etc.), mais ces données ne sont pas compatibles entre elles et seules des tendances peuvent être extraites (van't Riet and Tramper, 1991; Olsvik and Kristiansen, 1992). La raison est qu'une relation simple dépourvue d'ambiguïté ne peut être attendue pour un phénomène aussi complexe. Les valeurs mesurées sont difficiles à relier aux valeurs réelles dans le fermenteur pour des raisons diverses :

- la morphologie n'est que très rarement décrite;
- les principes de base de la rhéologie ont été négligés dans de nombreux cas;
- l'utilisation de différents types de viscosimètres (voir § 2.4.3.) et leur étalonnage (Olsvik and Kristiansen, 1992);

- le viscosimètre approprié n'a pas toujours été utilisé, particulièrement pour la détermination de la limite de contrainte;
- des problèmes liés à l'utilisation du matériel semblent être ignorés dans de nombreux cas (séparation de phase dans un système rotatif, décantation);
- le milieu n'est pas toujours désaéré;
- le prétraitement est différent (par exemple l'application d'une précontrainte);
- les temps qui s'écoulent entre l'échantillonnage et la mesure diffèrent (ce qui peut provoquer une lyse).

Une orientation générale se détache toutefois en faveur d'un comportement rhéofluidifiant. Les pelotes ou agrégats de mycélium se déforment et/ou s'alignent dans le sens du cisaillement (Figure 5). Cette capacité de déformation et/ou d'alignement explique l'appellation *pseudo-plastique* qui parfois utilisée pour désigner ces fluides.

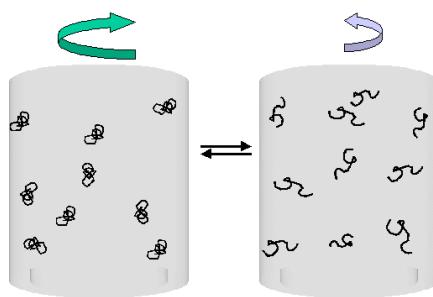


Figure 5 : Représentation schématique de l'allongement et de l'alignement réversibles de pelotes dans un viscosimètre

Les modèles de viscosité qui sont le plus souvent appliqués aux suspensions mycéliennes reposent sur la loi en puissance d'Ostwald-de Waele (Berovic et al., 1993; van't Riet and Tramper, 1991; Velasco et al., 1994, Belfares et al., 1990; Warren et al., 1995; Tucker and Thomas, 1993, Roels et al., 1974), éventuellement associée à une limite de contrainte suivant le modèle de Casson (Berovic et al., 1993; van't Riet and Tramper, 1991; Tucker and Thomas, 1993; Roels et al., 1974) ou de Bingham (Warren et al., 1995).

2.4. L'importance de la rhéologie pour les procédés de fermentation

Le comportement des fluides rhéofluidifiants dans une cuve agitée est assez complexe puisqu'il dépend de la vitesse de cisaillement $\dot{\gamma}$ (Charles, 1978). Elle est généralement assez haute près de l'agitateur mais diminue rapidement lorsqu'on s'en éloigne. En conséquence, la viscosité du fluide est faible près de l'agitateur mais élevée même à de relativement courtes distances de ce dernier (Figure 6) (Metzner and Otto, 1957; van't Riet et Smith, 1975). S'il existe une limite de contrainte, on peut avoir un fluide "solide" quasi immobile près des parois où le cisaillement est très faible (ainsi que dans les angles des

baffles), ce qui crée des zones mortes (Leong-Poi and Allen, 1993; Kembowski and Kristiansen, 1986). Les modifications de la viscosité influencent également les transferts de matière (notamment la diffusion de l'oxygène) et de chaleur (avec un effet négatif d'une augmentation de la viscosité) (Velasco *et al.*, 1994).

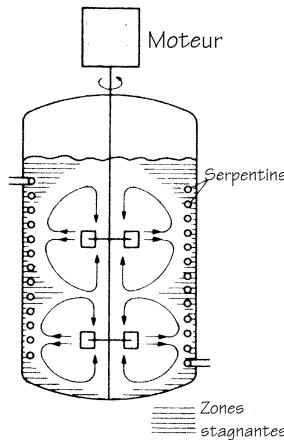


Figure 6 : Mélange d'une suspension rhéofluidifiante dans un bioréacteur (Metz *et al.*, 1979)

Il faudra dès lors concevoir les fermenteurs et leur système d'agitation de façon à créer une homogénéisation satisfaisante du milieu (du point de vue des transferts), avec un profil d'écoulement assurant un cisaillement suffisant pour mettre le fluide en mouvement (par diminution de la viscosité) dans toute la masse du liquide, mais sans que la valeur maximale (près des mobiles d'agitation) ne dépasse un seuil au-delà duquel des dommages surviennent aux micro-organismes.

En résumé, on peut dire que la viscosité (variable dans le temps en fonction de l'état d'avancement de la fermentation) influence les champs de cisaillement qui eux-mêmes déterminent la viscosité (dans l'espace). Parallèlement, le cisaillement influence la morphologie des bactéries, qui elle-même influence la viscosité qui influence le champ de cisaillement à son tour. Ces mécanismes ont de nombreuses rétroactions entre eux et évoluent au cours du temps. Tout le problème consistera donc à prédire l'évolution de la vitesse de cisaillement à la fois dans le temps et, à un moment donné, dans l'espace. Et ce en gardant à l'esprit que ces phénomènes ont des constantes de temps fort différentes (de quelques secondes pour le mélange à plusieurs heures pour la croissance des bactéries).

2.5. La mesure de la viscosité

Du fait de la forte dépendance de la viscosité d'un fluide par rapport à la température, il est important de maintenir cette dernière constante tout au long de la mesure. De plus, une viscosité n'aura de signification que si l'on précise à quelle température elle a été mesurée. Il faut également rappeler que

la viscosité est par définition associée à un écoulement laminaire. Quel que soit le dispositif utilisé pour la mesurer, cette condition d'écoulement doit être respectée, et aucun écoulement secondaire ne doit survenir. Les dispositifs de mesure doivent respecter ces conditions, ce qui est le cas pour une large gamme d'équipements disponibles commercialement (van't Riet and Tramper, 1991; Charles, 1978).

2.5.1. *Les méthodes de laboratoire*

Plusieurs méthodes permettent de répondre à ces contraintes et de mesurer la viscosité d'un fluide (van't Riet and Tramper, 1991; Charles, 1978; Picque *et al.*, 1994).

- a) Les viscosimètres capillaires : lorsqu'un fluide s'écoule dans un capillaire en régime laminaire, la perte de charge est proportionnelle à la viscosité. La loi de Poiseuille s'applique pour les fluides newtoniens, et la loi de Rabinowitch-Mooney pour les fluides non-newtoniens. Il s'agit de la méthode la plus employée pour les liquides (en raison notamment de la simplicité de la méthode et du matériel utilisé). Ils ne sont toutefois pas utilisables pour des fluides contenant des particules en suspension, par exemple des micro-organismes filamenteux sous forme de pelotes.
- b) Les viscosimètres à chute : ils sont basés sur la formule de Stokes donnant la vitesse de chute d'une sphère dans un fluide visqueux, et qui est fonction de la viscosité. Ces systèmes sont peu nombreux, surtout parce qu'ils sont limités à l'étude de fluides newtoniens et à écoulement lent ($Re < 2$).
- c) Les viscosimètres à vibration : la viscosité est mesurée à partir de l'amortissement que subit une sonde vibrante plongée dans un liquide. Cet amortissement est fonction de la densité et de la viscosité du fluide. Il peut être quantifié par différentes méthodes telles que les mesures de la puissance électrique consommée et le déphasage des oscillations, ou par des méthodes optiques.
- d) Les viscosimètres rotatifs : le liquide est cisaillé (laminairement) entre une surface mobile et une surface immobile. La viscosité est proportionnelle au couple résistant (mesuré par une balance de torsion) et à l'inverse de la vitesse de rotation (Charles, 1978). Si un écoulement turbulent ou secondaire (par exemple des tourbillons de Taylor) survient (lorsque la vitesse de cisaillement imposée est trop importante), cela se traduit par une augmentation subite de la viscosité.
 - *Le viscosimètre à cylindres coaxiaux* (Figure 7 a) : il peut poser problème pour la mesure de la viscosité de suspensions. Certains modèles fonctionnent à vitesse de cisaillement contrôlée. Il n'est pas recommandé pour mesurer la limite de contrainte de solutions ou suspension, et un problème de décantation peut se poser.
 - *Le viscosimètre à cône et à plateau ou à plateaux parallèles* (Figure 7 b et c) : on rencontre également le problème de séparation de phases près de la partie tournante, bien que n'étant pas

aussi prononcé que pour les viscosimètres à cylindres coaxiaux. Ce type de mobiles n'est utilisable que pour des fluides dont la viscosité est suffisamment grande que pour rester dans l'intervalle.

- *Le viscosimètre à mobile d'agitation* : il s'agit d'un viscosimètre de type Couette ou Searle où le cylindre rotatif intérieur est remplacé par un mobile d'agitation (turbine ou ruban hélicoïdal (Choplin, 2000). Ce viscosimètre sera présenté plus en détails au paragraphe suivant.

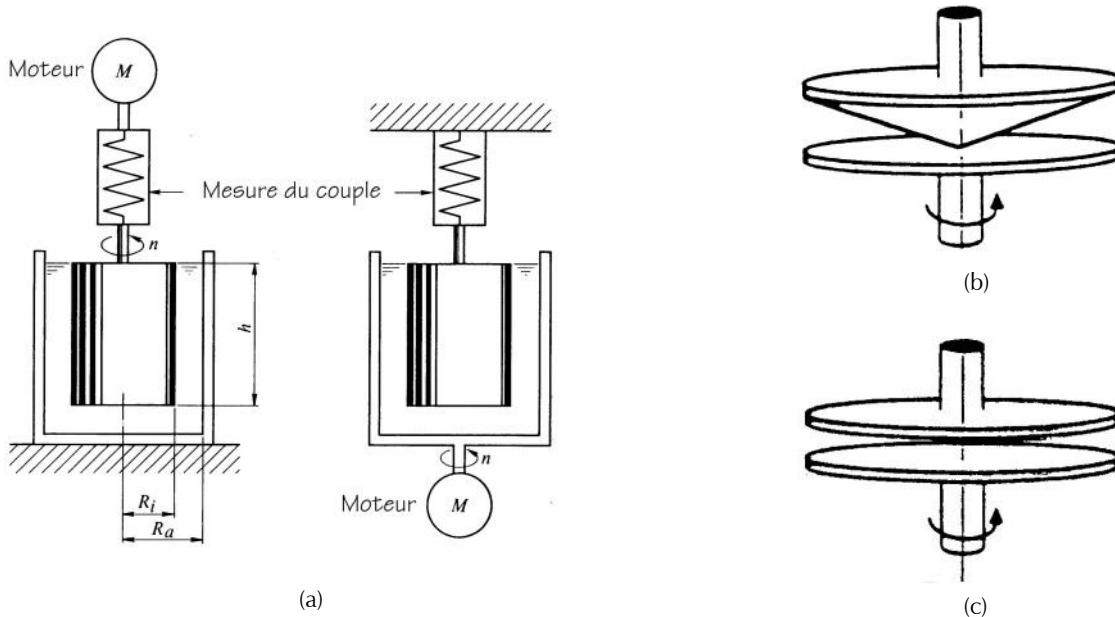


Figure 7 : Viscosimètres rotatifs (a) à cylindres coaxiaux de type Searle (gauche) et Couette (droite), (b) à cône et plateau, (c) à plateaux parallèles

2.5.2. Un cas particulier: la mesure de la viscosité des suspensions mycéliennes

Ces méthodes de laboratoire conviennent très bien pour la mesure de (bio)polymères en solution (van't Riet and Tramper, 1991; Charles, 1978). Certains problèmes peuvent toutefois se poser lors de la mesure de suspensions mycéliennes, et ce pour plusieurs raisons :

1. Il peut survenir une séparation des phases, accompagnée de la formation de couches moins denses à la surface du cylindre dans les viscosimètres de type rotatif à cylindres coaxiaux et à la liaison capillaire dans les viscosimètres capillaires. Ce phénomène est décrit comme le *glissement à la paroi*. (Berovic et al., 1993; Roels et al., 1974; Bongenaar et al., 1973)
2. La suspension peut avoir tendance à devenir hétérogène par décantation (Berovic et al., 1993; Roels et al., 1974; Bongenaar et al., 1973).

3. La présence de particules dont le diamètre est du même ordre de grandeur que le diamètre du capillaire ou des intervalles entre les différentes parties rotatives peut fausser totalement la mesure. Ce peut être le cas pour les pelotes (Roels et al., 1974).
4. On peut observer une destruction des particules dans le champ de cisaillement Bongenaar et al., 1973).

La première raison pose particulièrement problème car elle ne peut être détectée, sauf par comparaison avec d'autres types d'instruments. Cela arrive souvent et amène à des viscosités peu précises, trop faibles, surtout pour les milieux denses. La viscosité mesurée peut être sous-estimée d'un facteur 100. La troisième raison peut être contournée en utilisant un viscosimètre à tube de grand diamètre (Bongenaar et al., 1973).

Afin de circonvenir ces difficultés, Bongenaar et al. (1973) et Roels et al. (1974) ont développé un viscosimètre rotatif modifié (au départ équipé de cylindres coaxiaux) qui utilise une turbine plutôt qu'un cylindre intérieur mobile. Ils affirment que cette méthode permet d'éviter la séparation des phases du fait de l'agitation.

Cette méthode se base sur les considérations suivantes.

On fait l'hypothèse que la vitesse de cisaillement est une fonction simple de la vitesse d'agitation et est indépendante de la rhéologie du liquide (Roels et al., 1974; Charles, 1978). L'analyse des données, bien que n'étant pas absolument rigoureuse d'un point de vue rhéologique, est basée sur des relations empiriques bien prouvées et largement admises. On a montré que pour une turbine la vitesse de cisaillement à l'extrémité des pales peut être exprimée par (Metzner and Otto, 1957) :

$$\dot{\gamma} = k_s N \quad (s^{-1}) \quad (9)$$

où k_s est une constante dont la valeur se situe entre 10 et 13 pour une turbine à pales droites standard de type Rushton. D'autre part, la tension de cisaillement est directement proportionnelle au couple mesuré, pour autant que le nombre de Reynolds soit inférieur à 10. Après étalonnage pour déterminer les constantes du système, on peut en déduire la viscosité du fluide. La méthode est décrite en détails par Bongenaar et al. (1973) et Roels et al. (1974). Un certain nombre d'auteurs (Leong-Poi and Allen, 1993; Kemblowski and Kristiansen, 1986; Tucker and Thomas, 1993; Roels et al., 1974) préconisent la méthode de la turbine pour la mesure de milieux mycéliens.

Toutefois, la turbine établit un écoulement relativement complexe qui ne permet pas de calcul direct de la vitesse de cisaillement (un étalonnage est nécessaire pour déterminer la constante k_s) et fait surgir

quelques questions concernant la signification de la viscosité calculée. En particulier, l'instrument ne semble pas satisfaire aux exigences requises pour mesurer la viscosité telle que définie officiellement, et il n'est donc pas immédiatement clair que la quantité calculée correspond à une propriété intrinsèque du fluide. Néanmoins, l'instrument semble éliminer certains problèmes opérationnels associés aux viscosimètres rotatifs utilisés pour étudier les solutions mycéliennes et semble donner des résultats valables en "interne". Un autre inconvénient est que les conditions d'application de la méthode sont très restreintes du point de vue du nombre de Reynolds, qui doit être inférieur à 10. Cette contrainte limite fortement les variables opératoires (ce qui conduit à une limite inférieure de viscosité de 10 à 100 Pa.s et à des tailles de cellules de mesure très petites).

Une alternative à l'utilisation d'une turbine est de munir le viscosimètre d'un mobile à ruban hélicoïdal (Kim et al., 1983; Reuss et al., 1982; Choplín, 2000). Le ruban hélicoïdal est connecté au système d'entraînement/mesure d'un viscosimètre standard, ce qui permet de mesurer le couple. Pour convertir les lectures de couple à différentes vitesses en vitesse de cisaillement, ce système est calibré en utilisant un viscosimètre rotatif selon la procédure décrite par Bongenaar et al. (1973) et Roels et al. (1974). L'avantage de ce dispositif est que la plage d'écoulement laminaire est plus large que pour un système équipé d'une turbine. De plus, il semblerait que pour ce type de mobile, l'hypothèse que la vitesse de cisaillement moyenne est indépendante des propriétés rhéologiques du fluide soit moins erronée (Allen and Robinson, 1990).

Allen et Robinson (1990) se sont livrés à une critique des différentes méthodes de mesure de la viscosité susceptibles d'être utilisées pour une suspension mycélienne. Pour ce faire, ils ont mesuré la viscosité de plusieurs milieux de culture contenant des souches filamenteuses (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Streptomyces levori*) et ce dans plusieurs dispositifs : 3 viscosimètres à tube en ligne (un petit et deux plus grands), 2 viscosimètres rotatifs, des viscosimètres à ruban hélicoïdal et à turbine. Toutes les suspensions présentaient un comportement pseudoplastique et une limite de contrainte augmentant avec la concentration en biomasse. La comparaison des mesures à des vitesses de cisaillement équivalentes a révélé des valeurs inférieures de viscosité apparente pour le plus petit viscosimètre à tube (ceci étant dû à un effet de glissement aux parois). Au contraire, des viscosités apparentes supérieures ont été observées avec l'agitateur à turbine, amenant à la conclusion que la supposition communément faite que, dans ce type de viscosimètre, la vitesse de cisaillement moyenne est indépendante de la rhéologie du fluide, comme exprimé dans la relation (9), et ne dépend que de la vitesse de rotation, n'est pas valide. Cet effet augmente avec la concentration en biomasse. De fait, on a trouvé une dépendance entre la vitesse de cisaillement moyenne et la rhéologie du fluide (Berovic et

al., 1993), et qui est d'autant plus prononcée que le fluide s'écarte d'un comportement newtonien (c'est-à-dire que n est différent de 1 pour une loi en puissance) (Allen and Robinson, 1990; Allen and Robinson, 1987). Par contre, un accord raisonnable a été obtenu entre les mesures rhéologiques faites dans les deux plus grands tubes, le ruban hélicoïdal et deux viscosimètres à cylindres rotatifs de diamètres différents (à la condition que la contrainte de cisaillement soit dépassée dans l'intervalle des cylindres coaxiaux). Ceci suggère que les effets de glissement n'étaient pas significatifs dans ces viscosimètres. La décantation de la biomasse n'était pas non plus un problème dans les viscosimètres à cylindres coaxiaux et à tube utilisés dans cette étude. Ces observations ont été confirmées par d'autres auteurs (Berovic et al., 1993; Allen and Robinson, 1987) qui ont également comparé différents systèmes de mesure dont une turbine et n'ont pas relevé de problèmes particuliers pour les autres viscosimètres.

La différence principale entre les techniques de mesure relative (telles que le viscosimètre à turbine) et absolues est que la mécanique des fluides dans ces systèmes relatifs ne permet pas le calcul direct des variables fondamentales de la rhéologie (tensions et vitesse de cisaillement). Ces méthodes doivent donc se baser sur des étalonnages empiriques avec des fluides de propriétés rhéologiques connues. L'utilisation de tels systèmes de mesures relatives afin d'obtenir les propriétés rhéologiques pour l'étude des phénomènes de transport fondamentaux est discutable puisqu'il n'y a pas eu d'études concernant leur précision. De plus, les viscosimètres à mesure relative ne s'appliquent qu'à de faibles vitesses de cisaillement ($<40 \text{ s}^{-1}$ pour une turbine) qui ne sont pas nécessairement représentatives de celles rencontrées dans un bioréacteur, ce qui requiert des extrapolations incertaines des relations entre la tension de cisaillement et la viscosité effective.

Une remarque s'applique à toutes les méthodes de mesure de la viscosité : le prétraitement et la manipulation de l'échantillon avant la mesure sont très importants. En voici quelques aspects qui ne doivent pas être perdus de vue quelle que soit la technique utilisée :

- La présence de petites bulles peut influencer la rhéologie en elle-même. On doit dès lors désaérer l'échantillon (van't Riet and Tramper, 1991).
- L'échantillon contient des organismes vivants très sensibles à leur environnement. La rhéologie peut changer après l'échantillonnage, par exemple à cause du manque d'oxygène ou d'autres substrats qui peut conduire à la lyse des bactéries. C'est pourquoi le temps après le prélèvement dans le fermenteur doit être le plus court possible, et identique pour tous les échantillons traités (van't Riet and Tramper, 1991; Velasco et al., 1994).
- Durant la mesure elle-même, des effets du temps et la (dé)flocculation peuvent survenir. La procédure doit être identique pour toutes les mesures (van't Riet and Tramper, 1991).

2.5.3. *Le choix d'une méthode*

Il semble finalement que pour mesurer la viscosité d'un milieu contenant des micro-organismes filamenteux, on portera préférentiellement son choix sur un viscosimètre à cylindres rotatifs coaxiaux, à ruban hélicoïdal (Choplin, 2000) ou à tube, et qui couvre la gamme de vitesses de cisaillement dans le procédé concerné. Chacune de ces méthodes a ses partisans et ses détracteurs, tous proposant des arguments pertinents.

Pour notre part, nous avons opté pour la mesure par un viscosimètre rotatif. Un argument en faveur de cette méthode était la disponibilité d'un matériel précis et performant, ainsi que la possibilité d'utiliser une cellule à double intervalle qui augmente la précision de la mesure (ce dispositif sera décrit en détails dans la partie "Matériel et méthodes").

2.6. L'utilisation d'un milieu artificiel

La mesure de la viscosité poursuit un double but : d'une part caractériser le milieu de fermentation et suivre son évolution au cours du temps, et d'autre part servir de référence lors de l'étude des processus hydrodynamiques dans le fermenteur.

Il n'était guère aisé de réaliser cette étude dans un milieu réel de fermentation. Il était en effet difficile d'envisager, pour chaque essai hydrodynamique, de passer plusieurs jours pour obtenir une culture suffisamment dense pour ensuite la "gâcher" par un seul essai de traceur. De plus, cette façon de procéder aurait inévitablement posé le problème de la reproductibilité des propriétés rhéologiques du milieu étudié. La salinité et l'opacité du milieu réel constituaient d'autres obstacles qui empêchaient l'utilisation d'une méthode conductimétrique ou colorimétrique pour effectuer les essais de traceur. Il nous a dès lors semblé préférable de chercher à reproduire le comportement rhéologique du milieu de fermentation par un milieu synthétique.

Les substances les plus utilisées pour simuler un milieu de culture non-newtonien rhéofluidifiant sont les des polymères à longues chaînes tels que le carboxyméthylcellulose (CMC) (Schügerl, 1981) ou le xanthane (Mohseni and Allen, 1995). Les viscosités de ces deux substances répondent à la loi en puissance, dont les valeurs des paramètres sont fonctions de la concentration et de la longueur des chaînes. On peut également utiliser des suspensions de pulpe de papier pour simuler la rhéologie de

suspensions mycéliennes filamenteuses (Mukataka *et al.*, 1980). Une autre possibilité de remettre en solution de micro-organismes (tels que la levure de boulanger). Malheureusement, l'opacité des solutions obtenues ne convient pas pour les essais de traceur par colorimétrie. Une alternative est l'utilisation dans ce cas un système de détection conductimétrique, pour autant que la solution ne contienne pas de sels. Cependant, si l'on veut simuler un milieu non coalescent, ces derniers sont indispensables, et l'injection d'une impulsion de traceur salin n'est plus détectable.

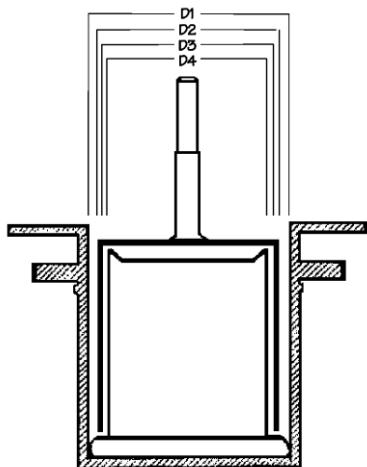
3. Matériel et méthodes

3.1. Le viscosimètre

Nous avons utilisé un rhéomètre rotatif (de type Searle, selon le principe présenté à la Figure 7a) (Bohlin CS). Il est équipé d'un moteur à couple constant qui fonctionne grâce à un entraînement à champ tournant. Un senseur de position angulaire de haute précision détecte les mouvements du système de mesure attaché à l'arbre. Le rhéomètre est contrôlé par un boîtier électronique qui reçoit les commandes et envoie les données collectées par l'intermédiaire d'une carte interface logée dans un ordinateur. Un logiciel (fourni avec le matériel) permet l'acquisition des données et le calcul des différentes grandeurs (tension de cisaillement, vitesse de cisaillement et viscosité). La régulation de température de la cellule de mesure (précise à 0.1°C) est assurée par un circuit fermé contenant de l'eau.

3.2. La cellule de mesure

La cellule que nous avons utilisée fait partie des dispositifs à cylindres coaxiaux (Figure 8). Leurs avantages proviennent de la capacité de ce type de géométrie à travailler avec des fluides de faible viscosité ainsi que des suspensions. Leur grande surface de contact leur donne une plus grande sensibilité, ce qui leur permet d'obtenir de très bons résultats à de faibles valeurs de vitesse de cisaillement et de viscosité. Parmi les différentes configurations, le système de mesure à double intervalle est celui qui a la surface la plus grande. La nomenclature DG40/50 se réfère à la géométrie ("double gap") et à la taille des cylindres (intérieur et extérieur).

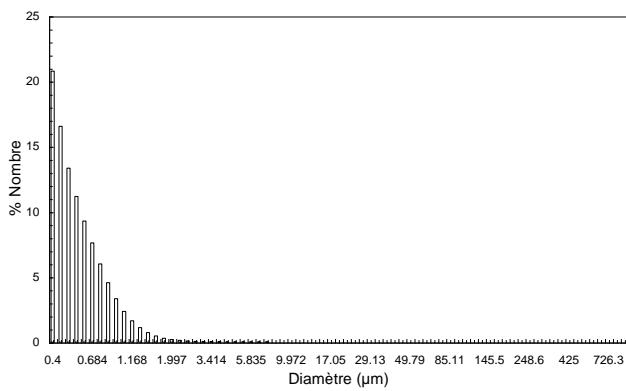


Diamètre du cylindre extérieur D1 : 50 mm
 Diamètre du cylindre intérieur D2 : 45.46 mm
 Diamètre du cylindre intérieur D3 : 43.80 mm
 Diamètre du cylindre extérieur D4 : 39.82 mm
 Profondeur d'immersion : 46 mm

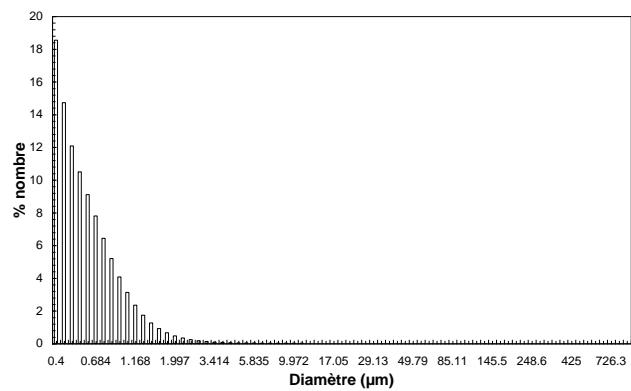
Figure 8 : Cellule de mesure à double intervalle (DG 40/50)

Nous désirions pouvoir suivre la viscosité du milieu de fermentation depuis le début (viscosité proche de celle de l'eau) jusqu'à la fin (viscosité inconnue avant mesures). La concentration en biomasse étant inférieure à 10 g/l, nous avons opté pour ce système pour toutes nos mesures. Aucun problème ne s'étant posé, nous n'avons pas testé d'autre mobile. Le volume d'échantillon nécessaire était assez important (de l'ordre de 30 ml), mais ce n'était pas un obstacle limitant dans notre cas.

Les intervalles D3-D4 et D1-D2 sont respectivement de 1.99 mm et 2.27 mm. Une analyse rapide de distribution de taille des pelotes (par diffraction laser, appareil Coulter L100) nous indique qu'elles ont un diamètre inférieur à 200 μm (Figure 9). L'analyse d'images nous a confirmé cette estimation par la suite (voir Chapitre IV: Morphologie). Les intervalles de la cellule de mesure sont 10 fois plus grands que le diamètre des pelotes, qui ne fausseront pas la mesure en se coinçant entre les cylindres.



(a)



(b)

Figure 9 : Distribution en nombre des diamètres (a) TR450, n°9, P12 et (b) I329, n°12, P15

3.3. Le programme d'ajustement paramétrique

La détermination de la viscosité des solutions étudiées s'est faite par ajustement paramétrique sur les rhéogrammes (couples de données tension de cisaillement/vitesse de cisaillement,) obtenus avec le rhéomètre Bohlin : $\tau = f(\dot{\gamma})$ (où f est une fonction dépendant du modèle envisagé).

La mesure comprenait un balayage ascendant puis descendant des tensions de cisaillement, et présentait une légère hystérésis (Figure 10). L'ajustement a été effectué sur la courbe "retour" (c'est-à-dire sur les tensions décroissantes) qui correspondait aux conditions rencontrées dans le fermenteur par le fluide qui subit constamment des contraintes. En l'absence d'hystérésis, l'ensemble des points a été pris en compte.

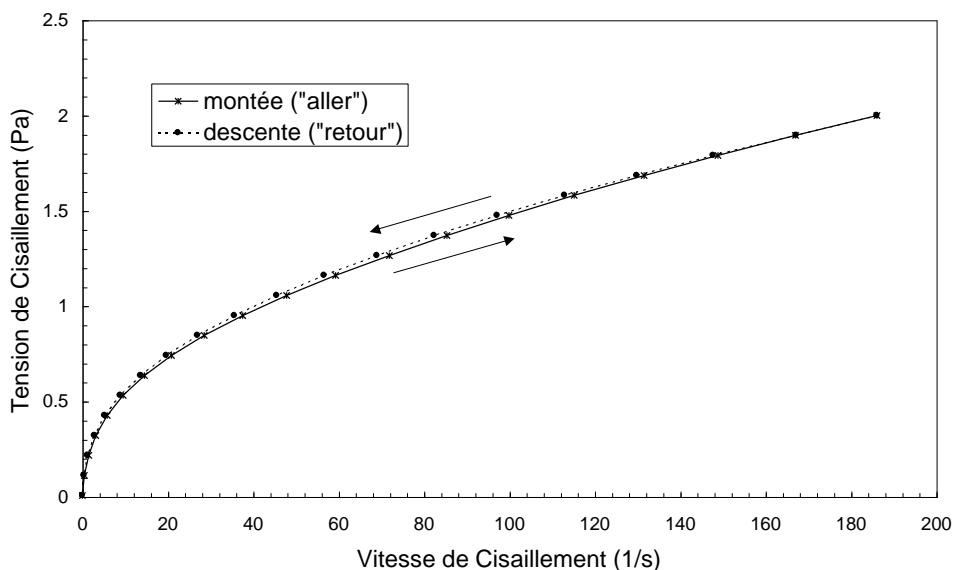


Figure 10 : exemple de rhéogramme (xanthane 1.25 g/l)

Nous avons utilisé le logiciel Matlab (version 5.3, MathWorks Inc.) pour effectuer nos ajustements paramétriques. La routine d'ajustement utilise la fonction *lsqcurvefit* qui permet de résoudre des problèmes non linéaires par la méthode des moindres carrés. Les écarts types sur les paramètres sont calculés en utilisant l'estimation de la matrice de covariance des paramètres calculée à partir du Jacobien évalué aux valeurs de convergence de l'algorithme (Froment and Bischoff, 1979). Le programme d'ajustement se trouve en Annexe II, avec comme exemple l'ajustement par une loi en puissance.

4. Résultats expérimentaux

Les fermentations ont été décrites en détails dans le *Chapitre I*. La souche utilisée est *Actinomadura R39*, un actynomycète filamentueux. Elle se développe principalement sous forme de pelotes et d'enchevêtrements, avec assez peu de filaments libres (et ramifiés). Le milieu contient de l'amidon (15 g/l), de la peptone de soja (12 g/l), des sels (K_2HPO_4 : 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.6 g/l) et des éléments en trace : 1 ml/l) ainsi que de l'antimousse. Le pH est maintenu à 8 et la température à 28°C durant toute la fermentation.

4.1. La rhéologie du milieu réel

La connaissance de la rhéologie du milieu de fermentation est indispensable pour mettre au point un milieu artificiel reproduisant ses propriétés, et qui servira à l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur et de ses conséquences sur la croissance et la morphologie de la bactérie.

Nous avons étudié la rhéologie du milieu avant inoculation, puis durant des fermentations menées avec les turbines Rushton à 450 rpm. Nous avons également mesuré la viscosité du surnageant d'échantillons centrifugés, c'est-à-dire sans micro-organismes, afin de déterminer la contribution de ces derniers aux caractéristiques rhéologiques des cultures. Toutes les mesures ont été faites à 28°C.

4.1.1. La mesure de la viscosité du milieu avant inoculation

Nous avons tout d'abord mesuré la viscosité de l'eau à 28°C à titre comparatif. L'échantillon de milieu a été prélevé après stérilisation mais avant inoculation. Pour rappel, la stérilisation est menée à 120°C pendant 20 minutes, sous une agitation constante de 300 rpm. Au cours de cette opération, l'amidon est dissous, et le milieu devient transparent et d'une couleur jaune ambrée. Les modifications que peut subir le milieu durant ce traitement thermique sont ainsi prises en compte pour la mesure de la viscosité.

Comme on peut le constater sur la Figure 11, les deux fluides (l'eau et le milieu avant inoculation) sont newtoniens. Leur viscosité a été calculée par régression linéaire sur la totalité des points (aller et retour) sauf les deux premiers et derniers pour l'eau et les trois premiers et derniers pour le milieu seul. À faible vitesse de cisaillement, on mesure plus l'inertie de la cellule à double intervalle que la viscosité de l'échantillon qui s'y trouve. Ceci est d'autant plus marqué pour la courbe "aller" (vitesse de cisaillement

croissante) que pour la courbe "retour" (vitesse de cisaillement décroissante) puisque dans le premier cas, il faut mettre la cellule en mouvement, alors que le retour ne fait intervenir que les propriétés rhéologiques du fluide présent dans la cellule. La présence d'amidon, de protéines et de sels augmente la viscosité d'environ 30%. L'écart-type est estimé par l'équation (10) :

$$s_e = \sqrt{\frac{\sum (Y_i - \bar{Y})^2}{(r-1)}} \quad (10)$$

où Y_i = valeur de la viscosité

\bar{Y} = moyenne des mesures de la viscosité

r = nombre de mesures

Tableau 1 : Viscosité de l'eau et du milieu avant inoculation à 28°C

	Viscosité (Pa.s)	écart-type
Eau à 28 °C	$0.971 \cdot 10^{-3}$	$2.3 \cdot 10^{-6}$
Milieu avant inoculation à 28 °C	$1.30 \cdot 10^{-3}$	$5.0 \cdot 10^{-6}$

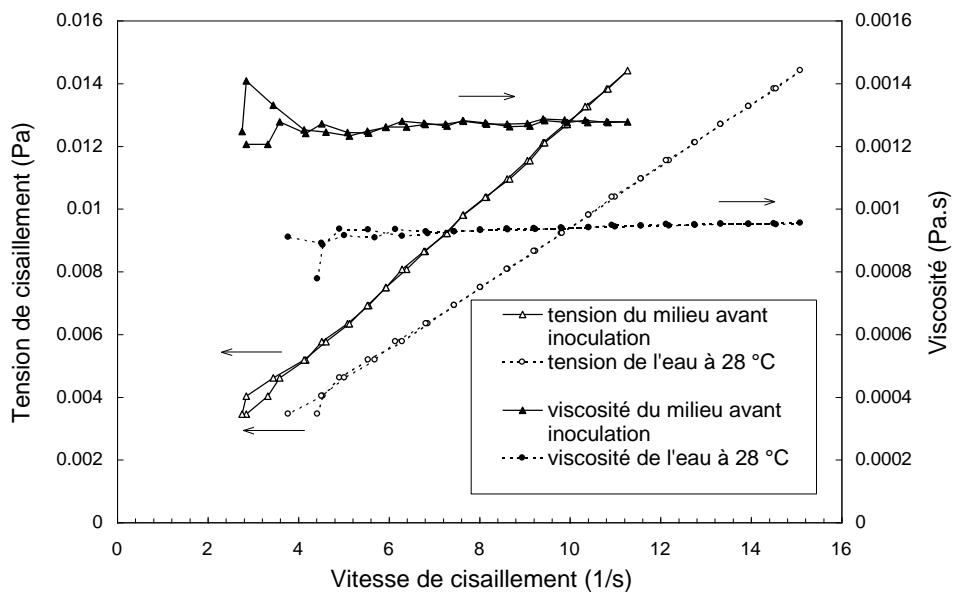


Figure 11 : Rhéogramme et viscosité de l'eau à 28 °C et du milieu avant inoculation

4.1.2. La mesure de la viscosité du milieu avec bactéries

Les mesures de viscosité portent sur plusieurs fermentations, numérotées respectivement n°21, n°22 et n°23. Toutes trois ont été menées à 450 rpm avec les turbines Rushton et un minimum de 30% d'oxygène dissous. Nous avons en plus mesuré la viscosité des deux précultures préparées pour la fermentation n°23 (selon la méthode présentée au Chapitre I). Nous avons également mesuré la

viscosité du surnageant du deuxième échantillon de la fermentation n°22. Le tableau suivant reprend les caractéristiques des différents échantillons :

Tableau 2 : Échantillons utilisés pour la mesure de la viscosité

Fermentation n°	Échantillon	Age (h)	Poids sec (g/l)
n°21	P1*	16.25	2.3
n°22	P1	16.58	4.1
	P2	18.5	4.7
	S2	18.5 (surnageant)	-
	P3	20.5	5.0
inoculum en erlenmeyer (1)		18	1.0
inoculum en erlenmeyer (2)		25	1.3
n°23	P0	0	0.25
	P1	4.5	0.4
	P2*	7	1.2
	P3*	23.25	2.8

Les échantillons notés * correspondent à un mélange de filaments et de bâtonnets (suite à des contaminations des cultures) (Figure 12), ce dont il faudra tenir compte pour l'interprétation des résultats. Les bâtonnets sont d'une taille beaucoup plus petite (quelques microns de longueur) et d'une géométrie très différente des pelotes et agrégats d'*Actinomadura R39*.

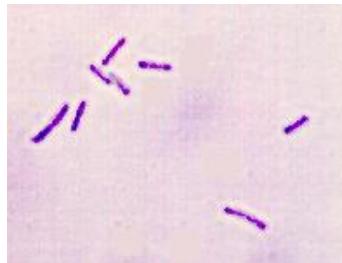


Figure 12 : Bactéries de type bacilles en forme de bâtonnets (grossissement 100 ×)

La Figure 13 présente un exemple de rhéogramme obtenu avec la fermentation n°22 (échantillon P1):

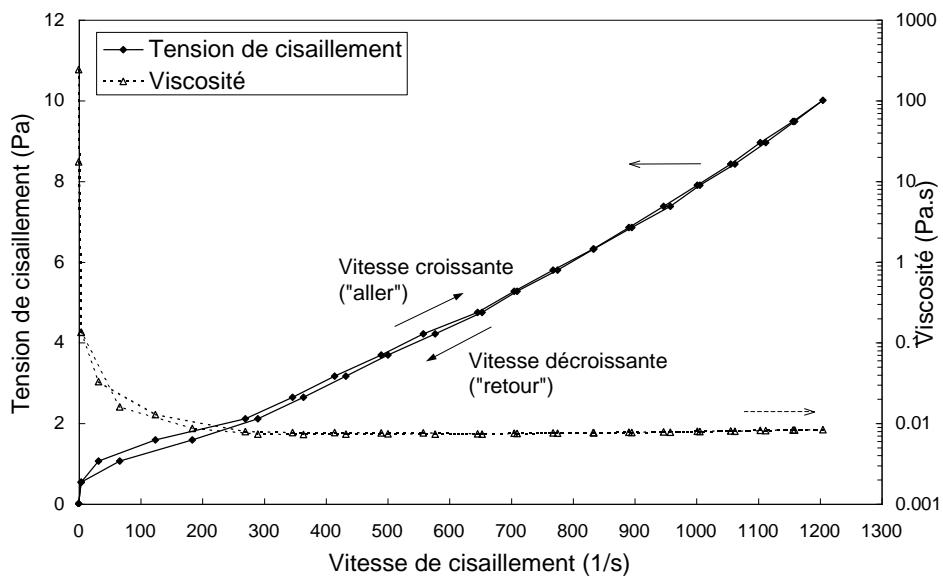


Figure 13 : Rhéogramme de l'échantillon n°22-P1

Ce graphique présente plusieurs caractéristiques :

1. Le fluide étudié est non-newtonien, de type rhéofluidifiant, ce qui correspond à ce qui est annoncé dans la littérature.
2. On observe une montée brutale de la tension de cisaillement à l'origine.

Ce phénomène pourrait être interprété comme une limite de contrainte. C'est toutefois peu plausible aux faibles concentrations en micro-organismes présentes dans les échantillons. Il s'agit plus vraisemblablement de l'inertie due à la taille importante de la cellule de mesure utilisée. De plus, les valeurs correspondant à la fois à la tension de cisaillement et à la vitesse de cisaillement au démarrage sont identiques dans tous les rhéogrammes, quelle que soit la concentration en micro-organismes. Nous atteignons en fait les limites de détection de l'appareil, ce qui se manifeste aussi parfois par une première valeur de la vitesse de cisaillement négative mais proche de zéro.

3. Il y a une "cassure" de la courbe décrivant la tension de cisaillement pour des valeurs de la vitesse de cisaillement de l'ordre de 275 s^{-1} , avec apparition d'un caractère plus linéaire (et donc newtonien).

Cette modification peut être due à plusieurs phénomènes :

- il apparaît un glissement à la paroi,
 - l'écoulement devient turbulent ou des écoulements secondaires surviennent. Toutefois, dans ce cas, la viscosité devrait augmenter rapidement, ce que nous n'observons pas,
 - l'alignement complet du mycélium dans la cellule à cause de la vitesse de cisaillement élevée.
- Cette dernière explication est la plus plausible, et elle expliquerait l'apparition d'un comportement plus newtonien.

4. Il y a une légère hystérésis.

L'hystérésis, qui montre des tensions de cisaillement plus grandes en vitesse croissante qu'en vitesse décroissante pour une même vitesse de cisaillement, est due à la structure que la présence de mycélium confère à la solution. Cette hystérésis disparaît quasiment si l'on refait un second rhéogramme directement après le premier. L'agitation qu'a subie l'échantillon a entraîné un "alignement" du mycélium, ainsi que son homogénéisation. Il disparaît également lorsqu'on applique un prétraitement à l'échantillon (c'est-à-dire si on fait tourner le rhéomètre à une vitesse donnée pendant un moment avant d'effectuer la mesure). Ce léger aspect de dépendance au temps n'a toutefois pas été pris en compte pour l'analyse des résultats puisque l'on peut espérer que le fermenteur n'a pas de zone morte, et que les micro-organismes qui s'y trouvent sont toujours en mouvement. On notera que le phénomène inverse (à savoir une tension de cisaillement systématiquement plus faible en augmentant la vitesse de cisaillement qu'en la diminuant) serait dû à une sédimentation à faible vitesse (Metz et al., 1979). De la même façon, on conseille alors de prémélanger la solution avant d'effectuer la mesure.

La Figure 14 présente l'ensemble des mesures effectuées sur les échantillons repris au Tableau 2. Les résultats sont classés par ordre de poids sec décroissant. Le n° correspond à celui de la fermentation et celui entre parenthèse à la prise d'échantillon. Les échantillons notés * sont contaminés par des bactéries en forme de bâtonnets. La vitesse de cisaillement est limitée à 175 s^{-1} : cette gamme de vitesse recouvre la zone laminaire du rhéogramme pour l'ensemble des échantillons et ne contient pas de "cassure" représentative d'un problème (voir le point 3 de la discussion précédente).

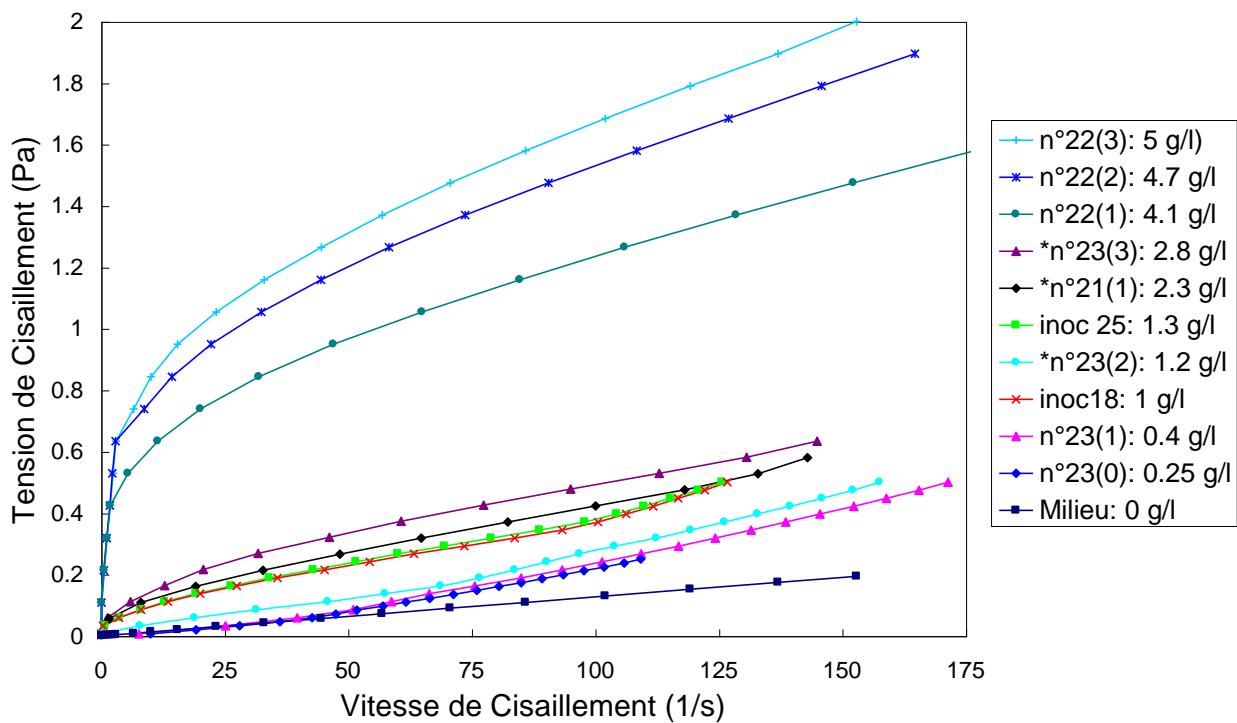


Figure 14 : Rhéogrammes des échantillons de fermentation
 * échantillons contaminés par des bâtonnets

On constate que la viscosité augmente avec la biomasse (tension de cisaillement plus élevée pour une vitesse de cisaillement donnée), et que le comportement non-newtonien s'accentue au fur et à mesure que la biomasse augmente (courbe plus incurvée).

Bien que présentant une concentration en biomasse plus faible, l'échantillon *inoc18* (1 g/l d'*Actinomadura R39*) est plus visqueux que l'échantillon *n°23(2)* (1.2 g/l d'un mélange d'*Actinomadura R39* et de bâtonnets). Par contre, l'échantillon *n°23(3)* (2.8 g/l d'un mélange d'*Actinomadura R39* et de bâtonnets) ne présente pas cette diminution de viscosité. Un examen (qualitatif) de l'échantillon au microscope nous a montré qu'il contenait beaucoup d'*Actinomadura R39* et assez peu de bâtonnets, ce qui explique que son comportement rejoint celui des échantillons ne contenant qu'*Actinomadura R39*.

Ces observations nous permettent de constater que l'on a bien une augmentation de la viscosité avec la concentration en biomasse, et que la morphologie sous laquelle elle se développe a également une grande importance. Les réseaux filamenteux structurent beaucoup plus le milieu et entraînent une viscosité plus élevée et un comportement non-newtonien plus marqué que pour les échantillons contenant un mélange de bâtonnets (dont la taille est de l'ordre de quelques microns) et de filaments (dont les pelotes et agrégats peuvent atteindre une taille de l'ordre de 200 µm).

4.1.3. La mesure de la viscosité du milieu sans bactéries

Le rhéogramme du surnageant de l'échantillon n°22(2) centrifugé (sans cellules bactériennes) est assez semblable à celui du milieu avant inoculation (Figure 15) avec toutefois une hystérésis plus marquée. La différence se marque principalement sur le trajet "retour". L'échantillon a une viscosité plus faible après avoir été soumis à un cisaillement, ce qui dénote un caractère légèrement thixotrope. Ce phénomène peut être dû à la modification de la composition du milieu lors de la fermentation (consommation des substrats tels que l'amidon et les protéines et excrétion de métabolites dans le milieu). Cette caractéristique est masquée dans les échantillons contenant les bactéries du fait que c'est alors la biomasse qui impose l'essentiel du comportement rhéologique du fluide.

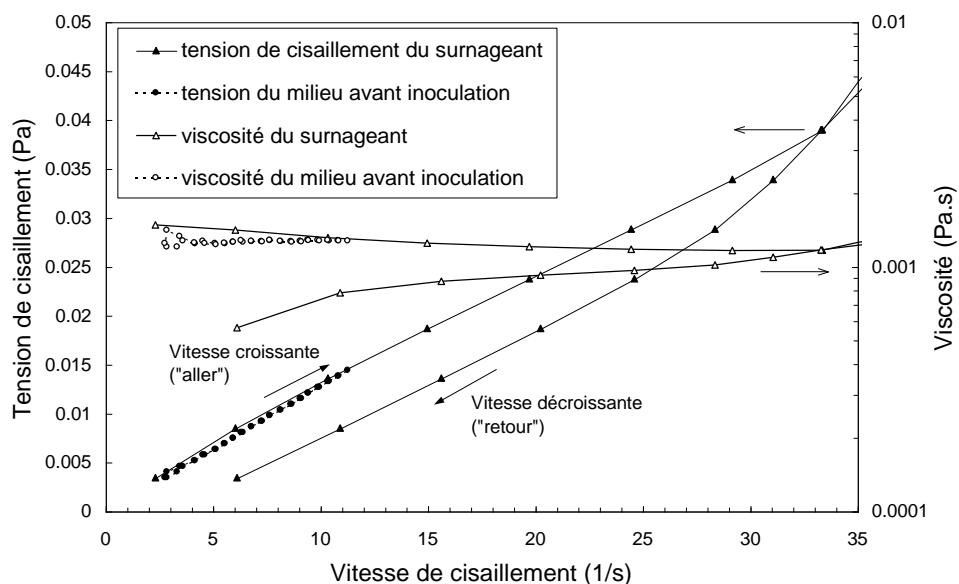


Figure 15 : Rhéogramme du surnageant de l'échantillon n°22(2) centrifugé et du milieu avant inoculation

4.1.4. La modélisation de la viscosité du milieu avec bactéries

Nous avons testé différents modèles non-newtoniens, choisis sur base de l'allure des rhéogrammes. Ces modèles sont présentés au Tableau 3.

Tableau 3 : Modèles de viscosité testés

Modèle	Équation
Loi en puissance ou modèle d'Ostwald- de Waele	$\tau = K\dot{\gamma}^n$
Modèle de Bingham	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}$
Loi en puissance généralisée ou modèle de Herschel-Buckley	$\tau = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$
Modèle de Casson	$\tau = (\tau_0^{1/2} + K\dot{\gamma}^{1/2})^2$
Modèle de Heinz-Casson	$\tau^n = \tau_0 + K\dot{\gamma}^n$ ou $\tau = (\tau + K\dot{\gamma}^n)^{1/n}$

L'ajustement paramétrique des modèles sur les courbes vitesse de cisaillement - tension de cisaillement a été faite en utilisant le logiciel Matlab (voir le §3.3 pour la description de la méthode et l'Annexe II pour le programme).

Nous avons utilisé les échantillons de la fermentation n°22 (non contaminée) pour discriminer les modèles. L'ajustement a été fait sur la courbe "retour" (où le fluide a déjà été mis en mouvement) : ce choix se justifie par le fait que le milieu dans le fermenteur est toujours en mouvement, et se trouve donc dans un état de "précontrainte" perpétuel. Un examen visuel par la vitre latérale du fermenteur nous a rassuré sur cette hypothèse : même à la paroi (et qui plus est dans le renforcement du hublot), nous pouvions voir le milieu en circulation. Nous avons limité la gamme des vitesses de cisaillement aux valeurs inférieures au point d'inflexion, afin de ne pas prendre en compte des données qui ne représentent pas la viscosité telle que définie (et qui ne peut se mesurer qu'en écoulement laminaire).

Les résultats sont présentés au Tableau 4 et à la Figure 16 :

Échantillon n°22-P1

Tableau 4 : Ajustement paramétrique du rhéogramme de l'échantillon n°22-P1

Modèle	Paramètres (écart type) [LC95]	$s_r^2(\nu_f)$	Remarques
1. Loi en puissance ou modèle d'Ostwald- de Waele	$K = 0.27 (0.014) [0.24 – 0.30]$ $n = 0.34 (0.011) [0.31 – 0.36]$	0.00179 (15)	
2. Modèle de Bingham	$\tau_0 = 0.40 (0.063) [0.27 – 0.54]$ $K = 0.0072 (0.00070) [0.0058 – 0.0087]$	0.0368 (15)	
3. Loi en puissance généralisée ou modèle de Herschel-Buckley	$\tau_0 = 0.025 (0.034) [-0.05 – 0.10]$ $K = 0.25 (0.030) [0.19-0.31]$ $n = 0.35 (0.020) [0.305 – 0.39]$	0.00186 (14)	$0 \in LC95 !$
4. Modèle de Casson	$\tau_0 = 0.54 (0.036) [0.46 – 0.61]$ $K = 0.056 (0.0036) [0.048 – 0.064]$	0.01465 (15)	
5. Modèle de Heinz-Casson	$\tau_0 = 0.65 (0.012) [0.625 – 0.68]$ $K = 0.25 (0.038) [0.17 – 0.33]$ $n = 0.086 (0.042) [-0.029 – 0.17]$	0.00151 (14)	$0 \in LC95 !$

LC95 représente l'intervalle de confiance à 95%, s_r^2 est le carré moyen de l'erreur de l'ajustement, et ν_f est le nombre de degrés de liberté de l'ajustement

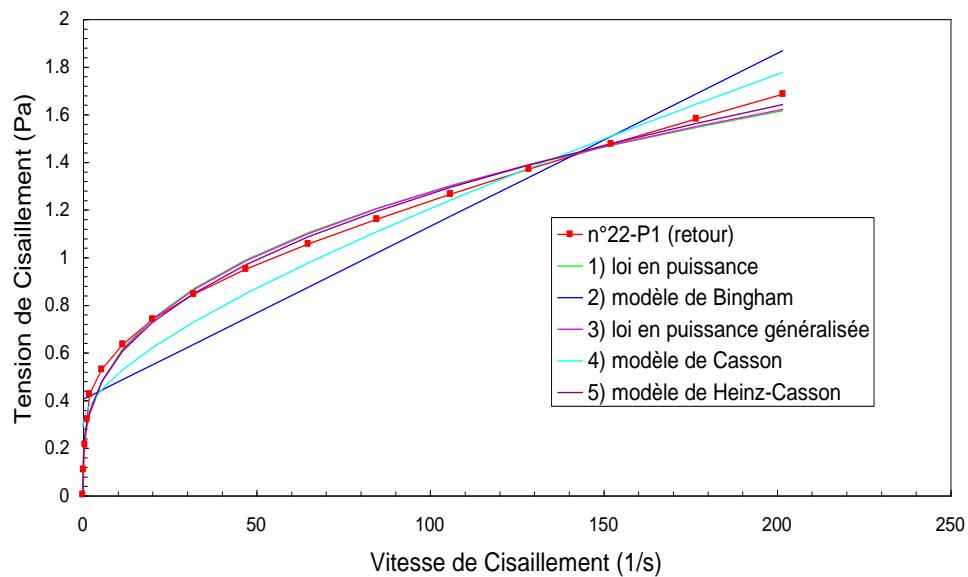


Figure 16 : Modélisation du rhéogramme de n°22-P1 (courbe de retour)

On constate *de visu* que les modèles en loi de puissance, en loi de puissance généralisée et de Heinz-Casson sont presque identiques à la courbe expérimentale, alors que les deux autres modèles (Bingham et Casson) sont d'allure assez différente. Néanmoins, cette analyse visuelle doit être complétée par une analyse statistique pour discriminer entre les modèles. Pour ce faire, nous avons appliqué le test de Fischer.

Ce test permet de comparer deux modèles sur base de leur erreur et de leurs degrés de liberté, et d'accepter ou de rejeter un modèle par rapport à un autre (en supposant que ces modèles sont bons, c'est-à-dire que leurs résidus sont distribués régulièrement).

Prenons deux modèles 1 et 2, dont les carrés moyens (et le nombre de degrés de liberté) valent respectivement $s_{r1}^2(\nu_{r1})$ et $s_{r2}^2(\nu_{r2})$, avec $s_{r1}^2(\nu_{r1}) > s_{r2}^2(\nu_{r2})$:

SI $\frac{s_{r1}^2}{s_{r2}^2} > F^*(\nu_{r1}, \nu_{r2}, 1-\alpha)$, **ALORS** $s_{r1}^2 > s_{r2}^2$ au niveau de confiance $(1-\alpha)$, et le modèle 1 **est rejeté**.

F^* étant la valeur du test de Fischer (fonction du nombre de degrés de liberté et du niveau de confiance).

Appliqué à notre problème et au niveau de confiance de 95%, cela donne:

$$F^*(15,15) = 2.4035$$

$$F^*(14,15) = F^*(15,14) = 2.4630$$

$$F^*(14,14) = 2.4867$$

La discrimination entre le modèle 1 (loi en puissance) et le modèle 2 (Bingham) conduit à :

$$\frac{s_{r2}^2}{s_{r1}^2} = \frac{0.0368}{0.00179} = 20.6 > F^*(15,15) = 2.4035$$

⇒ rejet du modèle 2 (Bingham) par rapport au modèle 1 (loi en puissance).

Tableau 5 : Discrimination entre les modèles

Discrimination	s_{r1}^2 / s_{r2}^2	Conclusion
2↔1	$0.0368 / 0.001798 = 20.6 > 2.4035$	rejet de 2 par rapport à 1
3↔1	$0.00186 / 0.00179 = 1.04 < 2.4630$? pas de conclusion
4↔1	$0.01465 / 0.00179 = 8.2 > 2.4035$	rejet de 4 par rapport à 1
1↔5	$0.00179 / 0.00151 = 1.18 < 2.4630$? pas de conclusion
2↔3	$19.8 > 2.4630$	rejet de 2 par rapport à 3
2↔4	$2.5 > 2.4035$	rejet de 2 par rapport à 4
2↔5	$24.4 > 2.4630$	rejet de 2 par rapport à 5
4↔3	$7.9 > 2.4630$	rejet de 4 par rapport à 3
3↔5	$1.2 < 2.4867$? pas de conclusion
4↔5	$9.7 > 2.4630$	rejet de 4 par rapport à 5

On constate que les modèles 2 (Bingham) et 4 (Casson) sont toujours moins bons que les autres, ce que nous indiquait déjà la distribution (non aléatoire) des résidus. Par contre, on ne peut pas départager les modèles 1 (loi en puissance), 3 (loi en puissance généralisée) et 5 (Heinz-Casson). Ce qui correspond à l'observation visuelle de la Figure 16.

En observant les équations des modèles, on constate que la différence essentielle consiste en l'existence d'une limite de contrainte pour les deux derniers. Or, la valeur de cette contrainte n'est pas

significativement non nulle pour la loi en puissance généralisée. Il s'agit plutôt, comme signalé précédemment, de la limite de mesure de l'appareil.

Les mêmes conclusions sont applicables pour les autres échantillons (résultats non montrés). Nous avons conservé le modèle en loi en puissance, sauf pour le milieu avant inoculation (voir § 4.1.1, Tableau 1) et les deux premiers échantillons de la fermentation n°23 (P0 et P1) qui semblent avoir un comportement newtonien ($n=1$).

Pour ces deux-ci, nous avons comparé les résultats de l'ajustement par une régression linéaire et par un modèle en loi de puissance (Tableau 6) :

Tableau 6 : Comparaison des modèles pour les échantillons n°23 P0 et P1

Échantillon	s_r^2 (linéaire)	s_r^2 (puissance)	V_r	$F^*(V_{r1}, V_{r2}, 95\%)$	s_{r1}^2 / s_{r2}^2
n°23 – P0	$2.1181 \cdot 10^{-6}$	$4.9386 \cdot 10^{-7}$	3	9.2766	$4.2389 < F^*$
n°23 – P1	$1.5621 \cdot 10^{-6}$	$1.1974 \cdot 10^{-6}$	2	19	$13.05 < F^*$

Dans les deux cas, on ne peut pas discriminer entre les modèles. Toutefois, l'index de comportement n de la loi de puissance est supérieur à 1 (respectivement 1.38 et 1.35 pour P0 et P1). Cette valeur est absurde dans la mesure où ni le milieu avant inoculation ni le surnageant de l'échantillon n°22 - P2 ne montrent un comportement rhéodilatant. Pour cette raison, le modèle rhéodilatant a été rejeté et le modèle newtonien a été conservé. Dans ce cas, la viscosité est donnée par la valeur du coefficient de proportionnalité de la régression linéaire (ou le K de la loi de puissance si n vaut 1). Ce choix est cohérent puisque le milieu seul est newtonien et que la charge en micro-organismes est assez faible. On note une légère augmentation de la viscosité avec la biomasse. Dans les deux cas, le terme indépendant de la régression linéaire n'était pas significativement non nul.

Les résultats des ajustements sont repris dans le Tableau 7 :

Tableau 7 : Modélisation de la rhéologie des suspensions d'*Actinomadura R39* par une loi en puissance

Échantillon	poids sec (g/l)	K (erreur) [LC95]	n (erreur) [LC95]
Milieu	0	0.0013 (5 $\cdot 10^{-6}$) [0.00129–0.00131]	1
n°23, P0	0.25	0.0015 (5.6 $\cdot 10^{-5}$) [0.0014–0.0017]	1
n°23, P1	0.365	0.0018 (12 $\cdot 10^{-5}$) [0.0013–0.0023]	1
inoculum 18h	0.99	0.029 (0.0024) [0.024–0.035]	0.52 (0.023) [0.47–0.58]
n°23, P2	1.205	0.0080 (0.00064) [0.006–0.010]	0.69 (0.023) [0.615–0.76]
inoculum 25h	1.265	0.028 (0.0015) [0.025–0.032]	0.54 (0.015) [0.51–0.57]
n°21, P1	2.345	0.036 (0.0028) [0.029–0.043]	0.52 (0.021) [0.46–0.57]
n°23, P3	2.8	0.044 (0.0015) [0.041–0.048]	0.52 (0.00083) [0.50–0.54]
n°22, P1	4.1	0.27 (0.014) [0.24–0.30]	0.34 (0.011) [0.31–0.36]
n°22, P2	4.7	0.36 (0.017) [0.33–0.40]	0.31 (0.011) [0.29–0.34]
n°22, P3	5	0.38 (0.016) [0.35–0.42]	0.32 (0.011) [0.30–0.34]

La Figure 17 présente l'évolution des rhéogramme au cours de la fermentation pour l'expérience n°22. Les prises d'échantillon sont respectivement âgées de 16H35 (P1), 18H30 (P2) et 20H30 (P3). On remarque que l'index de consistance K augmente avec l'âge de la culture. Par contre, l'index de comportement n ne varie plus à ce stade de la fermentation (les valeurs ne sont pas significativement différentes).

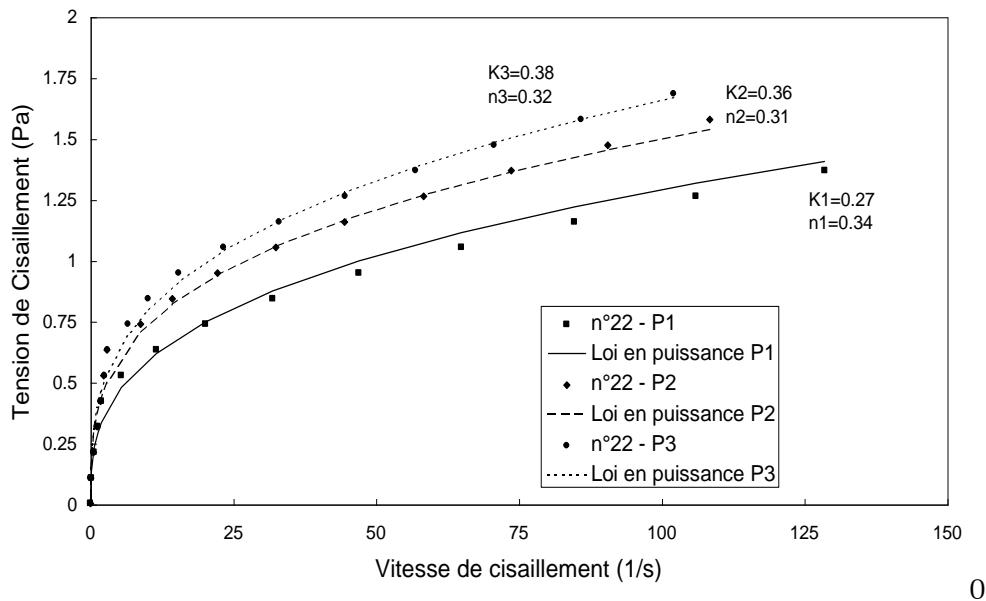


Figure 17 : Ajustement par une loi en puissance sur la fermentation n°22

La concentration en biomasse a une influence sur les paramètres de la loi en puissance (Figure 18). Nous avons éliminé les deux échantillons contaminés (n°21 – P1 et n°23 – P2) afin de supprimer le facteur d'erreur introduit par la présence de bactéries non filamenteuses à la fois sur le poids sec et sur les caractéristiques rhéologiques. Les échantillons des inoculums âgé de 18 et 25 heures ont été ajoutés à la figure sans être intégrés aux courbes. On constate que si l'index de consistance K est en bon accord avec celui des cultures en fermenteur, par contre l'index de comportement n est plus faible dans les cas de culture en Erlenmeyer. On peut supposer que cela est dû aux conditions de cultures qui sont très différentes. En effet, une observation qualitative au microscope a révélé que la proportion de filaments est beaucoup plus grande dans les Erlenmeyers. K augmente de façon monotone avec la concentration en biomasse, alors que n diminue pour se stabiliser à une valeur de l'ordre de 0.32. L'augmentation de K traduit une augmentation de la viscosité du milieu lorsque la biomasse augmente, et la valeur de n fortement inférieure à 1 correspond à un comportement fortement non-newtonien et rhéofluidifiant de ce type de solution.

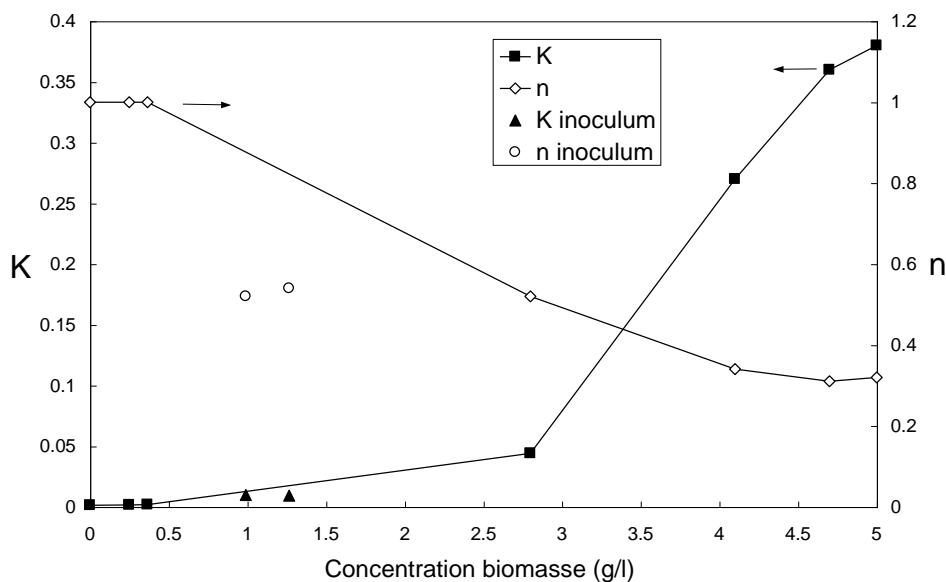


Figure 18 : Influence de la concentration en biomasse sur les paramètres de la loi en puissance

4.2. La mise au point d'un milieu artificiel

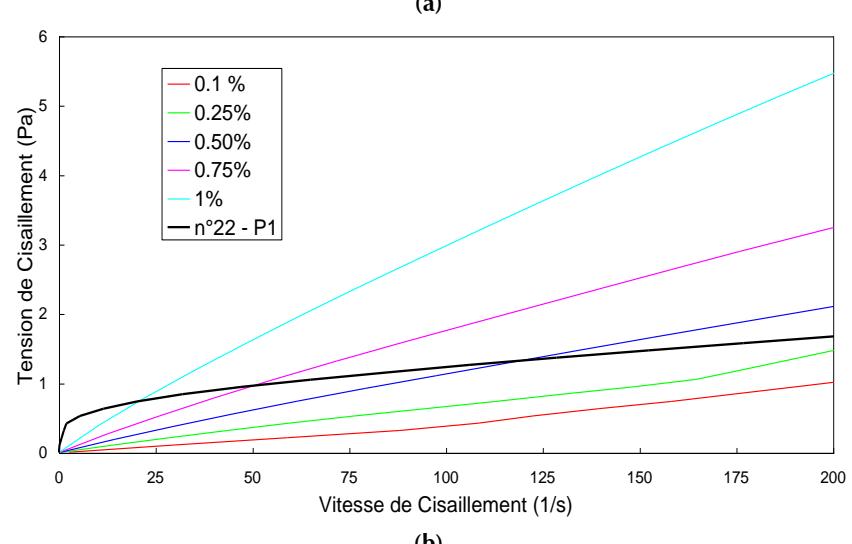
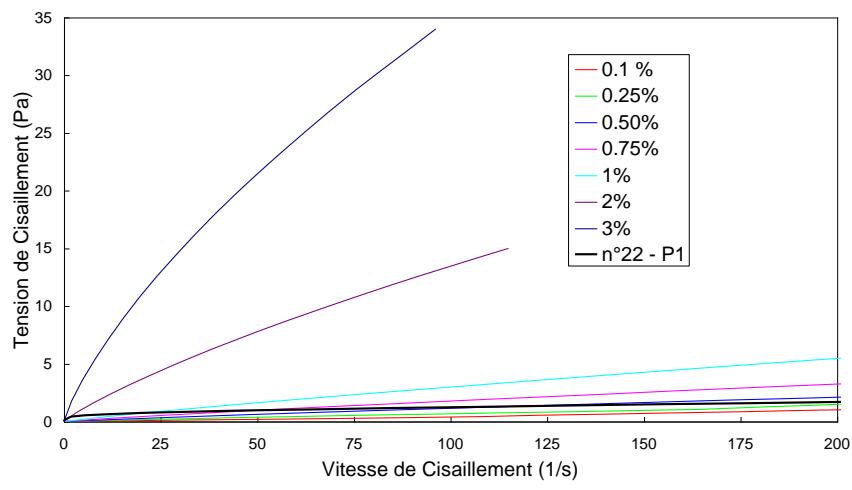
L'échantillon qui nous a servi de référence est n°22-P1. Il est très proche du minimum de la concentration en oxygène dissous, qui est le point que nous avons choisi pour effectuer l'analyse d'image de toutes les fermentations et auquel nous nous référerons pour faire l'étude hydrodynamique du fermenteur. Nous avons cherché à reproduire la rhéologie de ce milieu de fermentation par des substances solubles. La première à être testée fut le carboxyméthylcellulose.

4.2.1. Les carboxyméthylcelluloses (CMC)

Le carboxyméthylcellulose (CMC) (composant principal de la colle à tapisser) est une substance largement employée pour simuler les fermentations mycéliennes. Nous avons testé deux qualités de CMC : de faible viscosité et de plus forte viscosité, et ce à différentes concentrations. Les mesures de viscosité ont été faites à 20°C. Le Tableau 8 reprend les compositions des solutions pour lesquelles nous avons effectué un rhéogramme et les valeurs des paramètres de la loi en puissance ajustée sur ces essais expérimentaux. Le rhéogramme est présenté à la Figure 19(a) en comparaison avec l'échantillon n°22-P1. On voit que les concentrations de 2 et 3 % en poids sont beaucoup trop élevées. La Figure 19(b) propose un zoom sur les faibles concentrations.

Tableau 8 : Composition des solutions de CMC testées et paramètres de la loi en puissance leur correspondant

Produit	Concentration (% en poids)	Index de consistance K	Index de comportement n
CMC "faible viscosité"	0.1	0.00096	1.315
	0.25	0.0024	1.20
	0.5	0.012	0.98
	0.75	0.030	0.88
	1	0.050	0.87
	2	0.33	0.80
	3	1.25	0.72
CMC "haute viscosité"	0.1	0.004	1.15
	0.25	0.045	0.84
	0.5	0.10	0.83
	1	0.55	0.73
	1.5	1.33	0.70
CMC "faible viscosité" à 1% en poids + fumée de silice	0	0.05	0.87
	0.25	0.071	0.86
	0.5	0.071	0.88
	1	0.097	0.85
	3	0.22	0.835
	5	1.01	0.68

**Figure 19 :** Influence de la concentration (en % en poids) en CMC "faible viscosité" sur la viscosité
(a) graphe complet, (b) zoom

On constate que l'allure des rhéogrammes des solutions de CMC "faible viscosité" ne correspond pas à celle de l'échantillon. Le CMC "faible viscosité" n'est pas suffisamment non-newtonien pour simuler ce milieu de culture.

Nous avons testé une autre qualité de CMC, dite "haute viscosité". Les résultats sont repris au Tableau 8 et présentés dans les Figure 20(a) et (b) (zoom) :

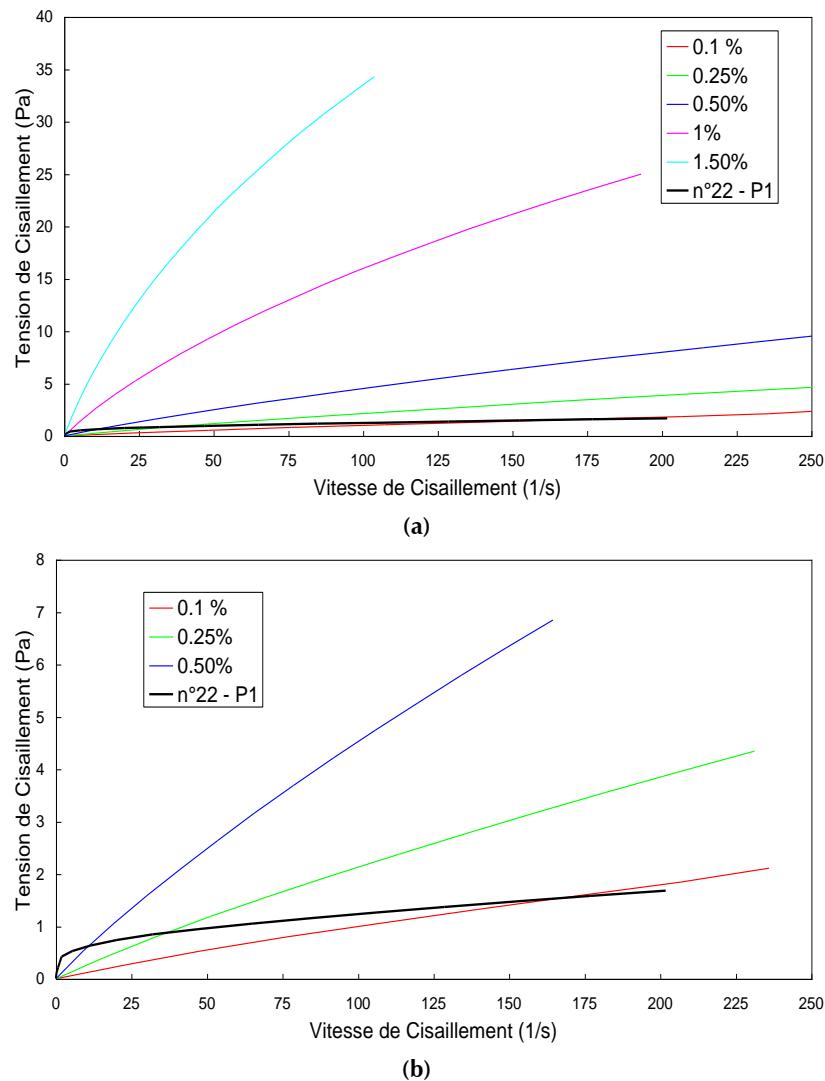


Figure 20 : Influence de la concentration (en % en poids) en CMC "haute viscosité" sur la viscosité
(a) graphe complet, (b) zoom

Bien que plus visqueux, le CMC "haute viscosité" n'est toutefois pas encore suffisamment non-newtonien.

Puisque l'essentiel du caractère non-newtonien du milieu de fermentation est dû à la présence de mycélium, nous avons ajouté une charge en suspension à la solution contenant 1% en poids de CMC "faible viscosité".

Le produit utilisé est de la fumée de silice (de la marque Cab-O-Sil). Il s'agit d'un matériau hyperporeux, utilisé entre autres pour améliorer et stabiliser la dispersion des poudres, notamment en alimentaire (par exemple : la dispersion de poudre de cacao soluble dans de l'eau). Il s'agit d'un excellent agent de contrôle de la viscosité, approuvé par la FDA, et largement utilisé dans des industries alimentaires et autres (pharmaceutiques par exemple). Elle aide à l'épaisseur des liquides (lait, eau, etc.) après ajout de poudres alimentaires. Les particules de fumée de silice sont invisibles dans le liquide.

Les résultats sont présentés au Tableau 8 et la Figure 21 :

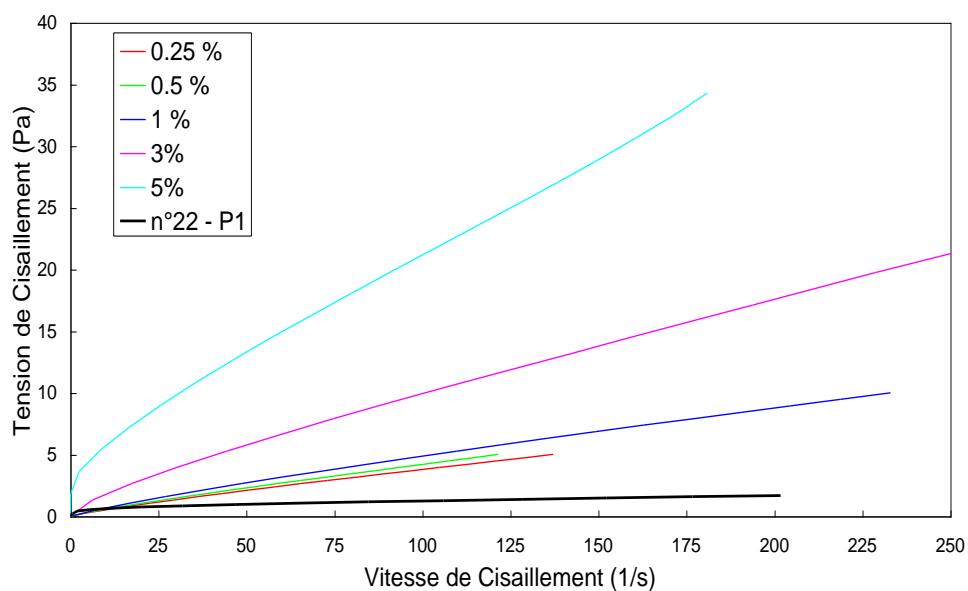


Figure 21 : Influence de la concentration (en % en poids) de fumée de silice ajoutée à une solution à 1% (en poids) de CMC "faible viscosité"

L'ajout de particules en suspension n'a pas suffit à augmenter le caractère non-newtonien de la solution sans dépasser la viscosité de l'échantillon provenant de la fermentation.

Il fallait trouver une substance qui ait un comportement plus proche de celui de notre échantillon. Une autre possibilité suggérée par la littérature était le xanthane.

4.2.2. Le xanthane

Le xanthane est un polysaccharide anionique d'origine bactérienne, produit par *Xanthomonas campestris*. Le xanthane est soluble dans l'eau à chaud comme à froid, compatible aussi bien avec les milieux acides qu'alcalins, et il est stable dans les solutions fortement salines. Les solutions de xanthane sont rhéofluidifiantes, et leur viscosité est élevée même à de faibles concentrations. Il est utilisé notamment en agro-alimentaire pour stabiliser les dispersions solides, liquides et gazeuses, ainsi que les émulsions. Il favorise la rétention d'eau, améliore la stabilité à la congélation-décongélation, inhibe la rétrogradation de l'amidon et allonge la durée de conservation. Une de ses caractéristiques intéressantes dans notre cas est sa capacité à former des solutions claires même à haute concentration.

La viscosité du xanthane obéit à une loi en puissance (avec limite de contrainte à partir de 5 g/l, Torres et al., 1993) dont les paramètres sont fonction de la concentration et des additifs.

Nous avons étudié l'influence de la concentration en xanthane, du pH et de la présence de sels. Les mesures ont été effectuées à 20°C.

Influence de la concentration en xanthane

La courbe vitesse de cisaillement/tension de cisaillement correspondant à la concentration de 0.15% (1.5 g/l) est très proche de celle de l'échantillon n°22 – P1 aux faibles vitesses de cisaillement, mais que dès que la vitesse augmente, l'échantillon de milieu réel se situe entre les courbes à 0.125% (1.25 g/l) et 0.1% (1 g/l) (Figure 22).

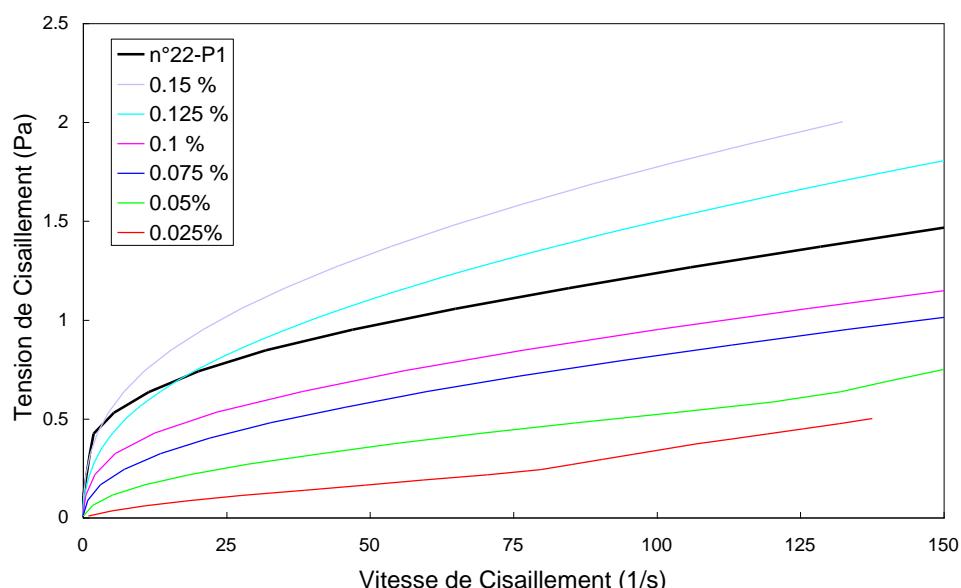


Figure 22 : Influence de la concentration en xanthane sur la viscosité

Influence du pH

Nous avons utilisé une solution à 0.075% (0.75 g/l) de xanthane pour étudier l'influence du pH (Figure 23). Seuls les pH extrêmes (2 et au-delà de 11) influencent sensiblement la valeur de la viscosité du xanthane. Dans la gamme moyenne du pH, il n'y a quasiment pas de modification du comportement. La solution "neutre" (pH=7.56) correspond au pH naturel suite à la dissolution du xanthane dans de l'eau désionisée.

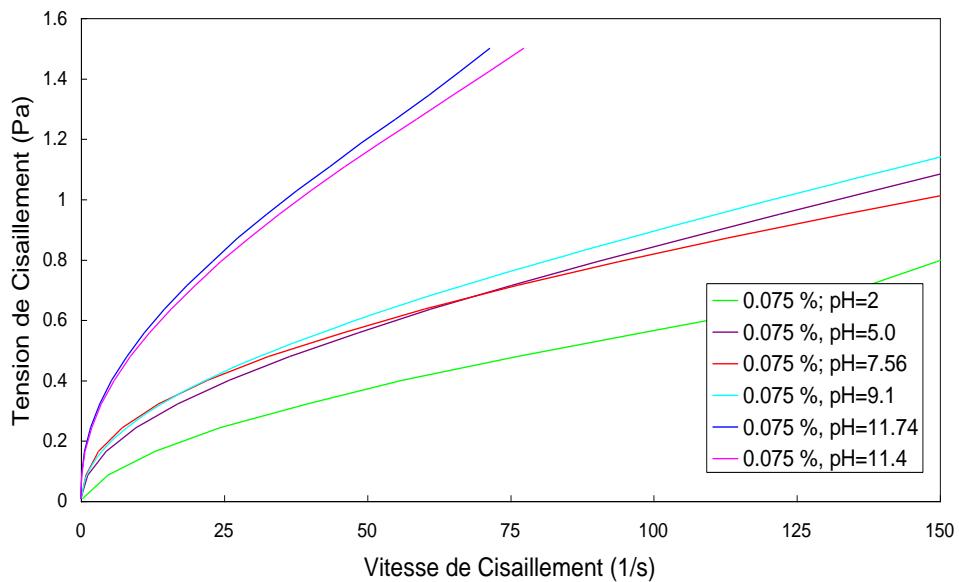


Figure 23 : Influence du pH sur la viscosité d'une solution à 0.075% en poids de xanthane

Influence de la présence d'additifs (sels, colorant)

Étant donné que nous désirons effectuer l'étude hydrodynamique du fermenteur dans des conditions aussi proches que possible de celles existant lors d'une fermentation, il était souhaitable de travailler avec un milieu non coalescent (en lui ajoutant des sels). Nous avons choisi d'utiliser les sels présents dans le milieu réel et à la même concentration (K_2HPO_4 : 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.6 g/l, en négligeant les éléments en trace), ainsi que de l'antimousse (noté AF). Nous avons également examiné si l'ajout du traceur que nous comptions utiliser, la rhodamine wt, ne perturbait pas trop le système.

La présence de sels et d'antimousse (noté AF) diminue la viscosité du xanthane (Figure 24), mais l'ajout de rhodamine n'exerce pas d'influence supplémentaire (les rhéogrammes sont identiques à ceux avec sels et antimousse, et ne sont pas montrés). Les résultats sont repris dans le Tableau 9 et à la Figure 24 (pour les solutions à 0.125% et 0.15%). Les Figure 25 et Figure 26 synthétisent l'ensemble des résultats.

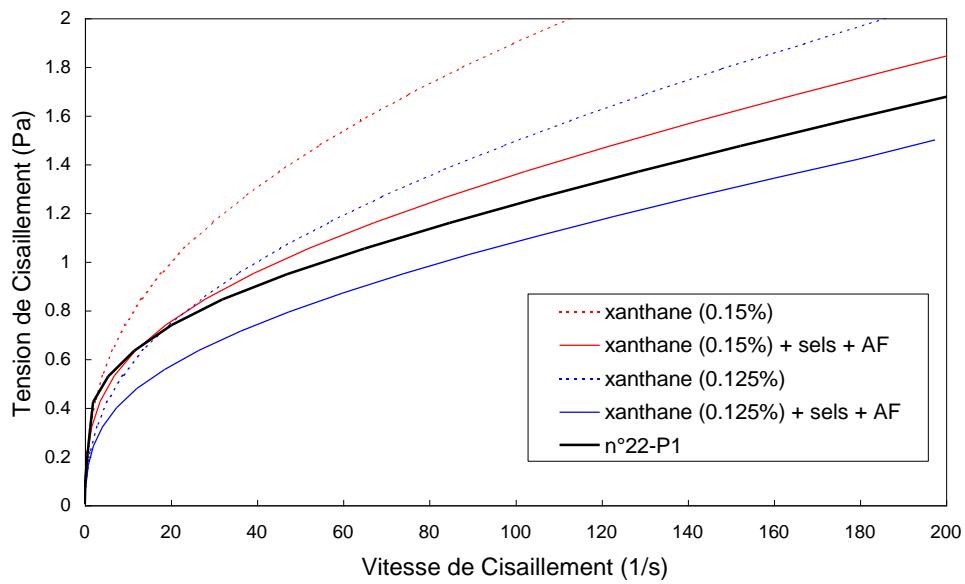


Figure 24 : Influence des additifs sur la rhéologie d'une solution à 0.125% et 0.15% en poids en xanthane

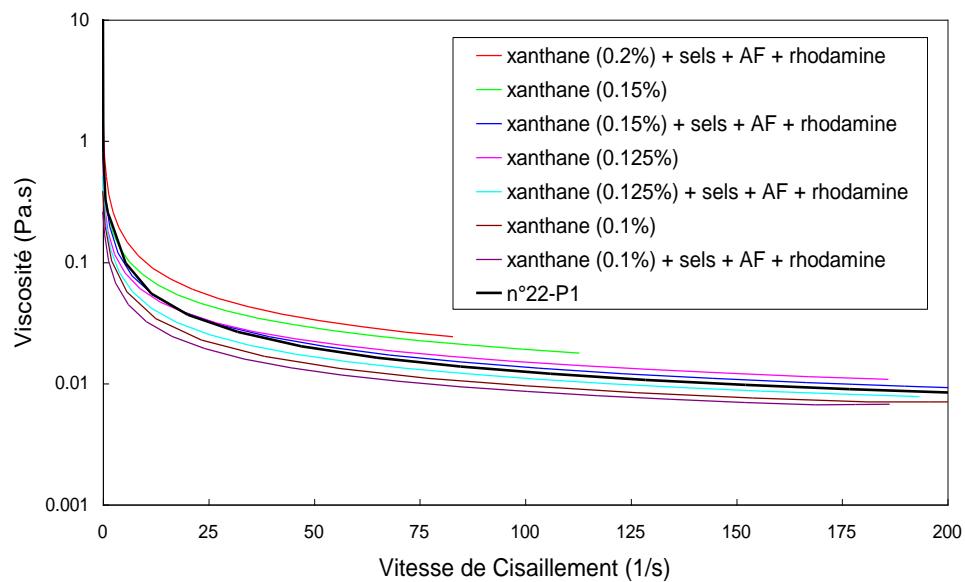


Figure 25 : Influence de la concentration et des additifs sur la viscosité du xanthane

Nous avons modélisé les rhéogrammes des solutions de xanthane par une loi en puissance, dont les résultats sont présentés au Tableau 9 et à la Figure 26.

Tableau 9 : Influence de la concentration en xanthane et de la présence de sels sur les paramètres du modèle en loi de puissance

Concentration (% en poids)	K	n	$K(\text{sels})$	$n(\text{sels})$
0.025	0.0099	0.72		
0.05	0.045	0.53		
0.075	0.087	0.49		
0.1	0.14	0.46	0.11	0.44
0.125	0.20	0.44	0.17	0.4
0.15	0.28	0.4	0.25	0.37
0.2			0.455	0.33
0.5	2.19	0.23		

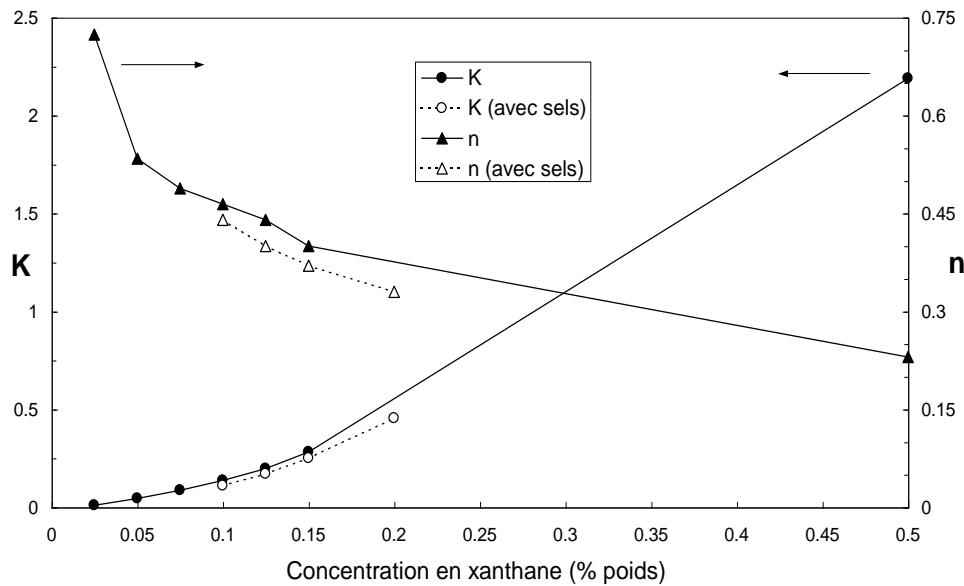


Figure 26 : Influence de la concentration en xanthane et des additifs sur les paramètres de la loi en puissance

Bien que les paramètres de l'échantillon de référence n°22-P1 ($K=0.27$ et $n=0.34$) soient plus proches de ceux de la solution à 1.5 g/l avec sels et antimousse, on constate sur les Figure 24 et Figure 25 que la courbe de la fermentation est comprise entre celle des solutions à 1.25 g/l et à 1.5 g/l (avec additifs dans les deux cas). Étant donné que l'échantillon n°22-P1 a été pris à moment postérieur d'environ 1 heure à celui qui correspond au minimum de la concentration en oxygène dissous (référence pour l'étude de la morphologie), nous avons opté pour la composition de 1.25 g/l (+ additifs) pour les essais de traceur destinés à effectuer l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur.

5. Conclusions sur la rhéologie

Nous avons mesuré la viscosité de milieu de fermentation contenant la bactérie filamentueuse *Actinomadura R39* à plusieurs stades de son développement. Ce milieu est non-newtonien rhéofluidifiant et les résultats ont été modélisés par une loi en puissance ($\tau = K\dot{\gamma}^n$) dont les paramètres évoluent en cours de fermentation.

Dans l'optique de l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur par essais de traceur colorimétriques, nous avons tenté de reproduire ces caractéristiques par un milieu synthétique transparent. Notre échantillon de référence est le n°22-P1 (produit avec des turbines Rushton à 450 rpm) qui est proche du moment correspondant au minimum de la concentration en oxygène dissous (celui choisi pour effectuer l'étude de la morphologie).

Nous avons testé deux grades de carboxyméthylcellulose (CMC), ainsi que l'ajout de fumée de silice (matériau de charge) pour reproduire la présence de solides en suspension. Les résultats n'étaient pas satisfaisants, et nous nous sommes alors tournés vers le xanthane, un polysaccharide d'origine microbienne. Les résultats étant concluants, nous avons étudié l'influence de la concentration en xanthane, du pH et de la présence de sels (pour obtenir un comportement non coalescent proche des milieux de fermentation réels), d'antimousse (qui modifie la tension superficielle de la solution) et du colorant devant servir de traceur.

C'est finalement une solution de xanthane à 1.25 g/l à laquelle sont ajouté 2.6 g/l de sels (K_2HPO_4 : 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.6 g/l) et de l'antimousse qui servira à reproduire les propriétés du milieu réel et au moyen de laquelle l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur sera effectuée. Les paramètres de la loi en puissance décrivant son comportement rhéologique valent respectivement (à 20°C) :

- index de consistance $K = 0.17$ (Pa.sⁿ)
- index de comportement $n = 0.4$ (-).

6. Bibliographie

- Allen D.G. and Robinson C.W. (1987) The influence of "slip" on rheological measurements on a mycelial broth of *Aspergillus niger*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **506**, 589-599.
- Allen D.G. and Robinson C.W. (1990) Measurement of rheological properties of filamentous fermentation broths. *Chem. Eng. Sci.*, **45**, 37-48.
- Ananda Rao M. (1999) Rheology of fluid and semi-solid foods – Principles and applications. Chapman & Hall Food Science Book, Aspen Publication.
- Belfares L., Pons M.N. et Vivier H. (1990) Production d'antibiotiques dans les bioreacteurs multiturbines biphasiques. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **4(10)**, 263-269.
- Berovic M., Koloini T., Olsvik E.S. and Kristiansen B. (1993) Rheological and morphological properties of submerged citric acid fermentation broth in stirred tank and bubble column reactors. *Chem. Eng. J.*, **53**, B35-B40.
- Blanch H.W. and Bhavaraju S.M. (1976) Non-newtonian fermentation broths: rheology and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 745-790.
- Bongenaar J.J.T.M., Kossen N.W.F., Metz B. and Meijboom F.W. (1973) A method for characterizing the rheological properties of viscous fermentation broths. *Biotechnol. Bioeng.*, **15**, 201-206.
- Charles M. (1978) Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures. *Adv. Biochem. Eng.*, **8**, 1-62
- Choplin L. (2000) In situ rheological follow-up of food processes : application to emulsification ad ice cream fabrication processes. Proceedings of the 2nd International Symposium on Food Rheology and Structure, 63-68. Zurich, Suisse
- Coussot P. et Ancet C. (1999) Rhéophysique des pâtes et suspensions. Éditions EDP Sciences, France
- Froment G.F. and Bischoff K.B. (1979) Chemical reactor analysis and design. John Wiley & Sons, New York
- Kemblowski Z. and Kristiansen B. (1986) Rheometry of fermentation liquids. *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1474-1483.
- Kim J.H., Lebeault J.M. and Reuss M. (1983) Comparative study on rheological properties of mycelial broth in filamentous and pelleted forms. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 11-16.
- Leong-Poi L. and Allen D.G. (1993) Direct measurement of the yield stress of filamentous broths with the rotationg vane technique. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 403-412.
- Loucaides R. and McManamey W.J. (1973) Mass transfer into simulated fermentation media. *Chem. Eng. Sci.*, **28**, 2165-2178.

Manchanda A.C., Jogdand V.V. and Karanth N.G. (1982) Studies on fermentation-broth rheology of a *Penicillium* strain with cellulose substrate. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **32**, 660-665.

Manfredini R., Cavallera V., Marini L. and Donati G. (1983) Mixing and oxygen transfer in conventionnal stirred fermentors. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 3115-3131.

Manikowski M., Bodemeier S., Lubbert A., Bujalski W. and Nienow A.W. (1994) Measurement of gas and liquid flows in stirred tanks reactors with multiple agitators. *Can. J. Chem. Eng.*, **72**, 769-781.

Metz B., Kossen N.W.F. and van Suijdam J.C. (1979) The rheology of mould suspensions. *Adv. Biochem. Eng.*, **11**, 103-156.

Metzner B. and Otto R.E. (1957) Agitation of non newtonian fluids. *AIChE J.*, **3**, 3-10.

Mohseni M. and Allen D.G. (1995) The effect of particle morphology and concentration on the directly measured yield stress in filamentous suspensions. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 257-265

Mukataka S., Kataoka H. and Takahashi J. (1980) Effects of vessel size and rheological properties of suspensions on the distribution of circulation times in stirred vessels. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 155-161.

Nienow A.W. (1998) Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Appl. Mech. Rev.*, **51**, 3-32.

Olsvik E.S. and Kristiansen B. (1992) On-line rheological measurements and control in fungal fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 375-387.

Picque G., Perret B., Latrille E. et Corrieu G. (1994) Mesure de la viscosité. Dans *Capteurs et mesures en biotechnologie*, Technique & Documentation Lavoisier, Paris, France, 208-217

Roels J.A., Van Den Berg J. and Voncken R.M. (1974) The rheology of mycelial broths. *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 181-208.

Rzyski E. (1985) Mixing time (time to homogenization) in the transition region of mixing. *Chem. Eng. J.*, **31**, 75-81.

Schügerl K. (1981) Oxygen transfer into highly viscous media. *Adv. Biochem. Eng.*, **19**, 72-174.

Torres L.G., Nienow A.W., Sanchez A. and Galindo E. (1993) The characterization of a viscoelasticity parameter and other rheological properties of various xanthan gum fermentation broth and solutions. *Bioprocess Eng.*, **9**, 231-237.

Tucker K.G. and Thomas C.R. (1993) Effect of biomass concentration and morphology on the rheological parameters of *Penicillium chrysogenum* fermentation broths. *Trans IChemE*, **71C**, 111-117.

van't Riet K. and Tramper J. (1991) Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker Inc., New York

Velasco D., Martinez A. and Galindo E. (1994) Hydrodynamics of industrial fermentations: rheology and power draw in rifamycin production. *AIChE Symp. Ser.*, **90(299)**, 157-165.

Warren S.J., Keshavarz-Moore E., Ayazi Shamlou P. and Lilly M.D. (1995) Rheologies and morphologies of three actinomycetes in submerged culture. *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 80-85.

7. Symboles

A	aire	m^2
d	diamètre du mobile d'agitation	m
F	force	N
F^*	test de Fischer	
h	déformation de la hauteur d'un cube	m
k_s	constante dépendant du mobile	
K	indice ou index de consistance (loi de puissance)	Pa.s^n
K_r	coefficient de rigidité	Pa.s
l	longueur de la base d'un cube	m
$LC95$	limites de confiances à 95%	
n	indice ou index de comportement (loi de puissance)	
N	vitesse de rotation	s^{-1} ou rpm
r	nombre de mesures (réplications)	
Re	nombre de Reynolds	
s_e	estimation de l'écart-type	
s_r^2	carré moyen de l'erreur de l'ajustement	
t	temps	s
T	température	K
v	vitesse de déplacement d'un cube de fluide	m/s
Y_i	variable dépendante	
\bar{Y}	valeur moyenne de la variable dépendante Y_i	
$(1-\alpha)$	niveau de confiance	
γ	effort de cisaillement	
$\dot{\gamma}$	vitesse de cisaillement	s^{-1}
δu	déplacement de la face supérieure d'un cube	m
μ	viscosité dynamique	Pa.s
μ_a	viscosité apparente	Pa.s
ν	viscosité cinématique	m/s^2
ν_r	nombre de degrés de liberté	
ρ	densité	kg/m^3
τ	tension de cisaillement	Pa
τ_0	seuil d'écoulement ou limite de contrainte	Pa

Annexe II

Programme d'ajustement paramétrique

Il se compose d'une routine principale qui lit les données et impose les conditions initiales, puis appelle une sous-routine contenant le modèle proprement dit.

Les commentaires sont indiqués en italique et précédés du signe "%".

1. Programme principal

```

load c:\mathablr53\work\xy.dat % lecture des pts expérimentaux
data=xy;
% la première colonne est appelée x(exp) et la deuxième y(exp)
xex=data(:,1);
yex=data(:,2);

% xp0 : valeurs initiales des paramètres (le nombre et l'ordre doit être cohérent avec la
% routine contenant le modèle
% Paramètres : xp=[pk pa ]
xp0=[1e2 -0.5]; % valeurs initiales
lb=[0. -10 ]; % bornes inférieures des paramètres
ub=[1000. 10. ]; % bornes supérieures des paramètres

xx=xex;
yy=yex;

% Appel de la fonction d'ajustement : 'ajustf' contient le modèle
[par,resnorm,residual,exitflag,output,lambda,jacobian]=lsqcurvefit('ajustf',xp0,xx,yy,lb,ub)

[nex zz]=size(xex); % nombre de points
[zz nparam]=size(par); % nombre de paramètres

R=sum(residual.^2); % Somme des carrés des résidus
ddl=nex-nparam % nombre de degrés de liberté
s2=R/ddl % estimation du carré de l'erreur sur l'ajustement
s=s2^0.5 % estimation de l'erreur sur l'ajustement
J=jacobian;
B=inv(J'*J)*s2; % Matrice de covariance

% calcul de l'écart type sur les paramètres
for i=1:nparam
    stdpar(i)=B(i,i)^0.5;
end

stdpar % affichage de l'écart type sur les paramètres

% Calcul de la matrice de corrélation des paramètres

```

```

for i=1:nparam
    for j=1:nparam
        corcoef(i,j)=B(i,j)/sqrt(B(i,i)*B(j,j));
    end
end

```

```

% calcul de la courbe ajustée
pk=par(1)
pa=par(2)
ff=pk*(exp(pa*log(xx)));

% Graphique de comparaison des courbes
figure
plot(xex,yex,'*',xex,ff,'r')
grid
legend('expérience','ajustement')

```

2. Sous-routine contenant le modèle

```

function f=ajustf(xp,xx)
% contient le modèle
% xex contient les variables indépendantes points xi
% xp contient les paramètres
% f est le vecteur donnant les estimations (à comparer à l'expérience)

% déclaration des paramètres :
pk=xp(1);
pa=xp(2);

% MODELE :
% loi en puissance :  $y = k * x^a$ 
% rappel:  $x^a = \exp[a * \ln(x)]$  et  $\ln$  se dit log en matlab
f=pk*(exp(pa*log(xx)));

```

Chapitre III

HYDRODYNAMIQUE D'UN FERMENTEUR À CUVE AGITÉE MÉCANIQUEMENT

1. INTRODUCTION.....	1
2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	1
2.1. L'IMPORTANCE DU MÉLANGE EN FERMENTATION	1
2.2. LA CONFIGURATION STANDARD	3
2.3. LES CONFIGURATIONS INDUSTRIELLES	4
2.4. LES RÉGIMES D'ÉCOULEMENT.....	6
2.4.1. <i>La viscosité apparente des fluides non-newtoniens</i>	6
2.4.2. <i>L'écoulement laminaire ($Re < 10-40$)</i>	8
2.4.3. <i>L'écoulement transitoire ($10-40 < Re < 2000-10000$)</i>	9
2.4.4. <i>L'écoulement turbulent ($Re > 2000-10000$)</i>	9
2.5. LES MOBILES D'AGITATION.....	11
2.5.1. <i>Les mobiles radiaux</i>	12
2.5.2. <i>Les mobiles axiaux</i>	13
2.5.3. <i>La répartition de l'énergie</i>	14
2.5.4. <i>Les critères de sélection</i>	16
2.6. LA PUISSANCE CONSOMMÉE.....	18
2.6.1. <i>Le nombre de puissance</i>	18
2.6.2. <i>L'influence du nombre de Reynolds</i>	19
2.6.3. <i>L'influence de la géométrie</i>	23
2.6.4. <i>L'influence de l'aération</i>	25
2.6.5. <i>Les méthodes de mesure</i>	28
2.6.5.1. <i>Le torquemètre</i>	28
2.6.5.2. <i>La mesure de la puissance électrique</i>	28
2.6.5.3. <i>La mesure de la production de chaleur</i>	28
2.7. LE MÉLANGE	29
2.7.1. <i>La définition du mélange</i>	29
2.7.2. <i>Les mécanismes de mélange</i>	32
2.7.3. <i>Les mouvements du fluide</i>	32
2.7.4. <i>Le pompage et la circulation</i>	33
2.7.5. <i>Le mélange avec plusieurs mobiles</i>	36
2.7.6. <i>Le mélange d'une cuve aérée</i>	39
2.7.7. <i>Les méthodes de caractérisation du mélange</i>	40

2.8.	LA MODÉLISATION D'UNE CUVE AGITÉE	41
3.	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	44
3.1.	LE FERMENTEUR.....	44
3.1.1.	<i>La cuve.....</i>	44
3.1.2.	<i>Les mobiles d'agitation</i>	45
3.1.2.1.	<i>Les mobiles radiaux.....</i>	45
3.1.2.2.	<i>Les mobiles axiaux-mixtes</i>	45
3.2.	LE MILIEU ARTIFICIEL.....	46
3.3.	LA CARACTÉRISATION DU MÉLANGE	47
3.3.1.	<i>Le traceur colorimétrique.....</i>	47
3.3.2.	<i>L'acquisition des données</i>	48
3.4.	LA MESURE DE LA PUISSANCE	48
3.5.	LA MODÉLISATION.....	49
4.	RÉSULTATS.....	51
4.1.	LES CONDITIONS EXPÉRIMENTALES ET HYDRODYNAMIQUES	51
4.2.	LES ESSAIS DE TRACEUR DANS LE FERMENTEUR EN CONDITIONS NON AÉRÉES	52
4.2.1.	<i>L'influence de la concentration en xanthane.....</i>	53
4.2.2.	<i>L'influence des conditions d'agitation.....</i>	54
4.3.	LES ESSAIS DE TRACEUR DANS LE FERMENTEUR EN CONDITIONS AÉRÉES.....	57
4.4.	LA MESURES DE LA PUISSANCE CONSOMMÉE.....	59
4.4.1.	<i>La puissance volumique sans aération</i>	59
4.4.2.	<i>Le nombre de puissance sans aération</i>	60
4.4.3.	<i>La puissance spécifique avec aération.....</i>	63
4.4.4.	<i>Le nombre de puissance avec aération</i>	65
4.4.5.	<i>La comparaison avec la littérature.....</i>	66
4.5.	LA MODÉLISATION DU MÉLANGE	68
4.5.1.	<i>La présentation des modèles.....</i>	68
4.5.2.	<i>La discrimination entre les deux modèles retenus</i>	73
4.5.3.	<i>La valeur des paramètres.....</i>	75
4.5.3.1.	<i>fp.....</i>	76
4.5.3.2.	<i>dz</i>	78
4.5.4.	<i>Le temps de mélange sans aération</i>	80
4.6.	LA MODÉLISATION DU MÉLANGE AVEC AÉRATION	84
5.	CONCLUSIONS SUR DE L'ÉTUDE HYDRODYNAMIQUE DU FERMENTEUR.....	87
6.	BIBLIOGRAPHIE.....	90
7.	SYMBOLES	97

Chapitre III

HYDRODYNAMIQUE D'UN FERMENTEUR À CUVE AGITÉE

1. Introduction

L'importance du mélange pour les fermentations a déjà été évoquée du point de vue des micro-organismes (au *Chapitre I*), ainsi que les conséquences de la rhéologie de type rhéofluidifiant des cultures mycéliennes sur cette opération (au *Chapitre II*). Dans le présent chapitre, nous avons étudié plus en détail l'hydrodynamique du fermenteur lorsqu'il contient une solution non-newtonienne rhéofluidifiante, en prenant le point de vue du macromélange.

Des essais de traceur ont été effectués dans le milieu artificiel décrit au *Chapitre II* avec les deux mobiles d'agitation utilisés lors des fermentations, et à plusieurs vitesses de rotation. Ces essais ont servi à valider un modèle compartimenté par lequel le macromélange dans le fermenteur est représenté. Le temps de mélange a ainsi pu être mesuré. La puissance consommée par le système dans les différentes conditions de mélange a également été mesurée.

Cette étude hydrodynamique du fermenteur a permis de mieux comprendre les phénomènes qui s'y déroulent lors du mélange, et de déterminer quelles sont les grandeurs qui en permettent la meilleure description.

2. Étude bibliographique

2.1. L'importance du mélange en fermentation

La vitesse de réaction observée pour un micro-organisme particulier (et donc sa croissance et sa productivité) dépend à la fois de la nature de l'environnement physico-chimique (concentrations en substrats ou métabolites, température, pH, etc.) et de l'hydrodynamique dans le voisinage immédiat de l'organisme (Kawase and Moo-Young, 1989; Ekato, 1992; Charles, 1978). Or tous deux varient dans le temps (pour les procédés discontinus) et dans l'espace. L'étendue de ces variations dépend non seulement des caractéristiques de l'organisme mais également des conditions de mélange qui dépendent fortement des propriétés rhéologiques de la culture, pour une configuration de réacteur et des

conditions opératoires fixées. Pour un réacteur à cuve agitée, une viscosité élevée et un comportement non-newtonien entraînent généralement une diminution de l'homogénéité (formation de régions stagnantes) qui, à son tour, entraîne de mauvaises performances (diminution du rendement et de la productivité). C'est pourquoi l'on souhaite que l'environnement des micro-organismes soit le plus homogène et le plus favorable possible du point de vue des concentrations en substrats et métabolites (Nienow, 1998; Kawase and Moo-Young, 1989). Dans le cas des fermentations aérobies, outre les capacités de transfert, il est important de connaître la façon dont l'oxygène est réparti dans la cuve lorsqu'il est dissous pour parvenir ensuite aux cellules (Kipke and Lagier, 1983).

Si cette homogénéité est facilement réalisable en fioles ou en petits fermenteurs, ce n'est plus vraiment envisageable dans les grands fermenteurs (Nienow, 1998). Pour atteindre cet objectif, le dispositif d'agitation devra fournir un bon macromélange (qui caractérise globalement l'écoulement à l'échelle macroscopique ou de la cuve) afin d'éviter les gradients locaux de concentration ou de température. Le micromélange (qui se réfère au transport et aux gradients de concentrations à l'échelle moléculaire ou du moins à l'échelle submacroscopique (Dunlop, 1992)), bien que nécessaire, n'est généralement pas aussi important que le macromélange (Charles, 1978). Les constantes de temps à cette échelle sont en effet largement inférieures à celles caractérisant la dynamique des micro-organismes.

Les buts de l'opération de mélange sont multiples : on doit assurer de bons coefficients de transfert de matière et de chaleur, la dispersion de bulles d'air (pour les fermentations aérobies), l'homogénéité et le maintien en suspension des micro-organismes, tout en préservant les cellules vivantes en ne les soumettant pas à des contraintes de cisaillement ou de gradients de pression trop élevés. Les inconvénients liés aux contraintes physiques générées par l'agitation sont regroupés sous le terme générique de *stress hydrodynamique*.

Une amélioration des performances des fermentations peut être ainsi obtenue par une meilleure compréhension de la dynamique des fluides dans les bioréacteurs (Amanullah et al., 1998). Malheureusement, on ne trouve que peu d'études du mélange dans les milieux industriels réels du fait du manque de données, ce à quoi il faut ajouter la difficulté d'obtenir une mesure précise de la puissance dissipée aux échelles laboratoire et pilote (Velasco et al., 1994).

Pour assurer le mélange, il existe toute une panoplie de mobiles d'agitation ayant des caractéristiques géométriques très variées. Leur géométrie détermine le type d'écoulement qu'ils induisent dans la cuve

(axial ou radial, ou une combinaison des deux), mais leur taille relative par rapport au réacteur ainsi que leur position et leur nombre sur un même arbre interviennent également.

Il serait vain de vouloir citer l'ensemble des références qui traitent de ce sujet tant il interpelle toutes les personnes concernées par les fermentations, à quelque niveau du procédé que ce soit. La plupart des articles traitent d'études réalisées dans les configurations de géométrie standard afin de permettre des comparaisons entre les études réalisées par différents auteurs, alors qu'en industrie les géométries non standard sont pratique courante en raison des contraintes de taille, de place disponible ou de besoins spécifiques des différents procédés (Velasco *et al.*, 1994).

2.2. La configuration standard

La configuration standard la plus couramment rencontrée est celle définie par Holland en 1966 (Midoux et Charpentier, 1979) et schématisée sur la Figure 1. Il s'agit d'une cuve cylindrique à fond plat dans laquelle la hauteur de liquide H_L est égale au diamètre de la cuve D et équipée d'une turbine Rushton dont le diamètre vaut $1/3$ de celui de la cuve et aux proportions déterminées disposée à une hauteur égale à son diamètre du fond de la cuve.

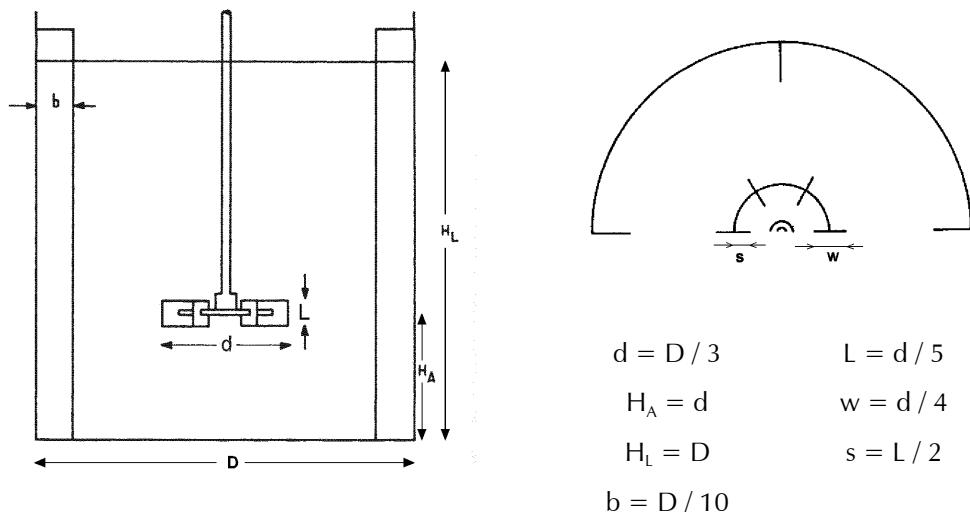


Figure 1 : Configuration standard d'une cuve agitée (Midoux et Charpentier, 1979)

où	d = diamètre de l'agitateur (m)	b = largeur des baffles (m)
	D = diamètre de la cuve (m)	L = hauteur de la pale (m)
	H_A = débattement (espace entre le fond et le mobile) (m)	w = largeur de la pale (m)
	H_L = hauteur de liquide (m)	s = partie de la pale sur le disque (m)

En général, Les conditions standard ne sont pas tout à fait respectées. Pour une cuve à un seul agitateur, les proportions sont comprises dans les intervalles suivants (Midoux et Charpentier, 1979) :

$$0.2 < d/D < 0.6$$

$$0.25 < H_A/D < 0.5$$

$$0.75 < H_l/D < 2$$

Si on fournit la puissance nécessaire à une bonne opération de mélange, la vitesse d'agitation est telle que, dans une cuve cylindrique, il se produit un écoulement essentiellement rotationnel, avec formation d'un vortex. Ce cas de figure est à éviter, car la présence de ce vortex rend l'écoulement vertical quasi négligeable avec pour conséquence un très faible mélange entre le haut et le bas de la cuve. C'est pourquoi presque tous les (bio)réacteurs, du laboratoire à l'échelle industrielle, sont équipés de baffles verticaux qui empêchent la formation d'un vortex. Même aux faibles vitesses d'agitation requises pour la culture de cellules animales, un tel bafflage aide à l'homogénéisation et ne produit pas de dommage aux cellules (Nienow, 1998). Ces chicanes peuvent être placées directement contre la paroi mais on peut également laisser un espace permettant la circulation du liquide et empêchant la présence de recoins stagnants lors de la culture et difficiles à nettoyer après. Une autre méthode consiste à incliner l'axe de l'agitateur ou à le disposer de façon excentrée si l'on ne désire pas installer des obstacles supplémentaires dans la cuve.

2.3. Les configurations industrielles

En pratique, la contrainte d'une hauteur de liquide égale au diamètre de la cuve n'est réalisable que pour de très faibles volumes. Pour des capacités plus importantes, cette contrainte géométrique amène à des cuves de grand diamètre où la puissance apportée par l'agitateur n'a plus aucune efficacité à la paroi (avec les conséquences que cela implique pour les opérations de mélange et de transfert). L'augmentation du rapport H_l/D impose de disposer plusieurs mobiles d'agitation sur le même arbre pour éviter l'apparition de zones non mélangées. Industriellement, on conseille généralement de passer à un système multi-étage pour des diamètres supérieurs à un mètre, ce qui permet une utilisation plus efficace de la puissance (Joshi et al., 1982). On place parfois des chicanes horizontales pour délimiter physiquement les étages (Figure 2). De plus, à volume égal, les unités multi-étagées demandent des parois plus minces que les mono-étagées (ce qui est particulièrement avantageux pour des systèmes

pressurisés) et occupent moins de place au sol (facteur important au niveau de l'investissement financier lors de la construction d'une unité de production).

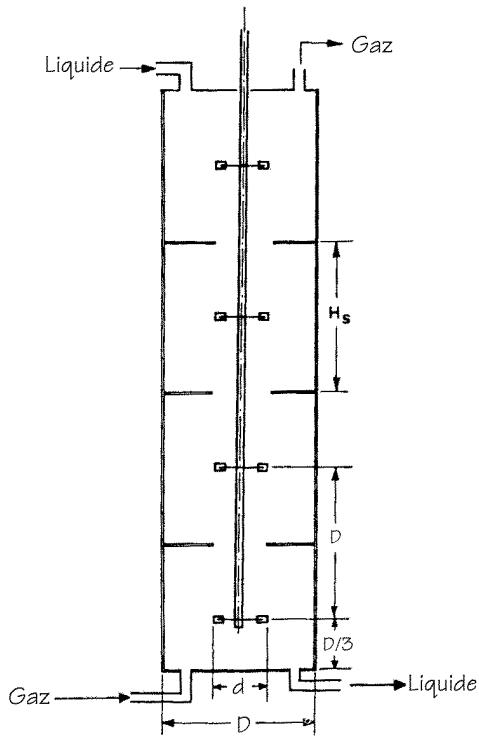


Figure 2 : Exemple de configuration non standard (Joshi et al., 1982)

Dans ces conditions, le nombre et la position des agitateurs provoquent des schémas d'écoulement dont les parcours sont très différents de ceux observés avec un seul agitateur, ce qui rend malaisées les prédictions faites à partir d'études effectuées en configuration standard (Velasco et al., 1994).

On peut également utiliser d'autres types de mobiles d'agitation, créant des écoulements autres que radial (axial ou mixte par exemple). La conception de ces mobiles peut être simple (hélice marine, turbine à pales inclinées) ou devenir très complexe (voir à ce sujet le § 2.5). La complexité du problème augmente encore lorsqu'on combine plusieurs types de mobiles différents sur le même arbre, et ce afin de profiter des avantages de chacun (pompage, dispersion, etc.).

Les caractéristiques des écoulements présents dans la cuve influenceront directement le mélange qui n'est que l'une de leurs conséquences.

2.4. Les régimes d'écoulement

On distingue plusieurs types d'écoulement, selon la façon dont les filets de fluide se comportent les uns par rapport aux autres. Chaque mode se caractérise par une plage du nombre de Reynolds qui est utilisé pour caractériser l'écoulement. Il représente le rapport des forces d'inertie (attribuées à l'énergie cinétique du fluide) aux forces visqueuses (Charles, 1978). Dans une cuve agitée mécaniquement, le nombre de Reynolds est celui du mobile d'agitation dont la vitesse caractéristique égale à (π) Nd et la longueur caractéristique égale à d .

$$Re = \frac{\rho Nd^2}{\mu} = \frac{Nd^2}{\nu} \quad (-) \quad (1)$$

où ρ est la densité du fluide (kg/m^3), N la vitesse de rotation de l'agitateur (s^{-1}), d le diamètre du mobile d'agitation (m), μ la viscosité dynamique du fluide (Pa.s) et ν sa viscosité cinématique (m/s^2). Si le cas des fluides newtoniens est simple, il n'est pas évident de savoir quelle valeur de viscosité choisir pour les fluides non-newtoniens puisque cette valeur varie en fonction de l'environnement hydrodynamique. On doit dans ce cas définir une viscosité apparente.

2.4.1. La viscosité apparente des fluides non-newtoniens

Metzner and Otto (1957) ont proposé la définition suivante :

on considère deux équipements (cuve et mobile d'agitation) identiques, dont l'un contient un fluide newtonien, et l'autre un fluide non-newtonien. Lorsque ces fluides sont agités de façon laminaire, à la même vitesse de rotation de l'agitateur, et lorsqu'on l'on modifie la viscosité du fluide newtonien en l'épaississant ou en le diluant afin d'obtenir la même puissance dissipée par l'agitateur dans les deux cuves, alors, puisque toutes les variables sont identiques, on peut affirmer que les viscosités apparentes sont égales dans les deux systèmes. On peut alors déterminer la viscosité apparente du fluide non-newtonien dans ces conditions expérimentales en mesurant celle du fluide newtonien.

Cette expérience définit la viscosité apparente. Il faut maintenant définir sa dépendance aux variables du système. Une approche repose sur l'hypothèse que la vitesse de cisaillement caractéristique dans un récipient est reliée à une vitesse et une longueur caractéristiques (Allen and Robinson, 1991) :

$$\dot{\gamma} \propto \frac{\text{vitesse caractéristique}}{\text{longueur caractéristique}} \quad (\text{s}^{-1}) \quad (2)$$

Dans le cas d'une cuve agitée, la vitesse de cisaillement à l'extrémité des pales est donc proportionnelle au rapport $\frac{Nd}{d}$ (Allen and Robinson, 1991), ce qui peut s'écrire :

$$\dot{\gamma} = k_s N \quad (\text{Pa.s}) \quad (3)$$

(cette relation a été évoquée au *Chapitre II*, §2.5.5, dans le cadre de la méthode de mesure de la viscosité utilisant une turbine). La valeur de la constante de proportionnalité k_s doit être déterminée expérimentalement pour une géométrie donnée. Toutefois, on peut s'attendre à ce que cette constante varie avec le caractère non-newtonien de la solution (la valeur de l'index de comportement n dans le cas d'un fluide en loi en puissance) comme signalé au *Chapitre II* lors de la présentation du viscosimètre à turbine. On a montré que par analogie avec l'écoulement dans un tube, on a (Calderbank and Moo-Young, 1959; Calderbank and Moo-Young, 1961; Moo-Young and Blanch, 1981) :

$$\mu_a = \frac{K}{(k_s N)^{1-n}} \left(\frac{3n+1}{4n} \right)^n = K(k_s N)^{n-1} \left(\frac{3n+1}{4n} \right)^n \text{ pour } n < 1 \quad (\text{Pa.s}) \quad (4)$$

L'usage de cette relation est préconisé par plusieurs auteurs (Schügerl, 1981; Loucaides and McManamey, 1973, etc.). Différentes valeurs ont été proposées pour k_s en fonction du type et du nombre de mobiles d'agitation:

Tableau 1 : Valeurs de k_s pour différents mobiles d'agitation

Mobile	k_s	Référence
Turbine Rushton	10	Metzner and Otto, 1957; Charles, 1978
	11	Blanch and Bhavaraju, 1976; Moo-Young and Blanch, 1981; Velasco et al., 1994 (2 mobiles)
	11.5	Moo-Young and Blanch, 1981; Velasco et al., 1994 (1 turbine)
	11.6	Calderbank and Moo-Young, 1961,
	12	Ekato, 1991; Manfredini et al., 1983 (4 mobiles)
	$4\pi (=12.57)$	Rzyski, 1985
	13	Mukataka et al., 1980; Metzner and Otto, 1957
Hélice marine	10	Ekato, 1991
Palette	8.7	Velasco et al., 1994
Hydrofoil	11.5	Manikowski et al., 1994
Ruban hélicoïdal	30	Ekato, 1991
Ancre	25	Ekato, 1991
Intermig	17	Nienow, 1998

On note que k_s n'est pas très sensible au type d'agitateur (Manikowski et al., 1994) sauf pour ceux qui ont une géométrie caractérisée par un grand rapport de leur diamètre à celui de la cuve (ruban

hélicoïdal, ancre, Intermig). Par contre, il semble d'après les travaux de certains auteurs que k_s est fonction de la distance radiale par rapport à l'agitateur (et augmente si l'on s'en rapproche) (Metzner and Taylor, 1960) mais aucun auteur n'en tient compte.

En remplaçant la viscosité dynamique par la viscosité apparente, l'expression du nombre de Reynolds (1) devient :

$$Re = \frac{\rho N^{2-n} d^2}{K k_s^{n-1}} \left(\frac{4n}{3n+1} \right)^n \quad (-) \quad (5)$$

Certains auteurs négligent la correction tenant compte de n (Velasco *et al.*, 1994; Nienow, 1998; Nienow, 1993; Charles, 1978), ce qui donne :

$$Re = \frac{\rho N^{2-n} d^2}{K k_s^{n-1}} \quad (-) \quad (6)$$

Cette approche se justifie par la relativement faible valeur de cette correction, comme montré dans le Tableau 2 :

Tableau 2 : valeurs de la correction de la viscosité apparente

n	$\left(\frac{4n}{3n+1} \right)^n$
1 (fluide newtonien)	1
0.75	0.94
0.5	0.89
0.25	0.87

On retombe toutefois sur les questions qui se sont posées lors de la présentation et la critique du viscosimètre à turbine (*Chapitre II*), à savoir la validité de l'hypothèse de l'existence d'une vitesse de cisaillement moyenne proportionnelle à la vitesse de rotation de l'agitateur et indépendante des caractéristiques rhéologiques du fluide. Il semble malgré tout préférable d'utiliser les corrélations (4) et (5) tenant compte de la correction pour le caractère non-newtonien des solutions étudiées.

2.4.2. L'écoulement laminaire ($Re < 10-40$)

Un écoulement est dit laminaire lorsque les trajectoires des différents filets de fluide sont toutes parallèles (à petite et moyenne distances) et ne se mélangent pas. Le travail nécessaire à la création de ce régime est dissipé en chaleur (frottement visqueux) mais n'est pas transformé en travail mécanique agissant dans des directions différentes de celle du courant. Les transferts de matière et de chaleur entre

couches parallèles sont dus uniquement à la diffusion moléculaire et à la conductibilité thermique, et sont indépendants de la puissance fournie (et sont très lents).

2.4.3. L'écoulement transitoire ($10-40 < Re < 2000-10000$)

Lorsque le nombre de Reynolds augmente, des tourbillons instables apparaissent : ils se forment en un point et disparaissent presque instantanément pour se reformer ailleurs. À des vitesses de rotation croissantes, cette turbulence apparaît d'abord dans le voisinage immédiat de l'agitateur et gagne ensuite progressivement le reste de la cuve. Le passage d'un régime à l'autre dépend de causes qui provoquent la naissance de tourbillons. En fait, les perturbations existant dans un fluide en mouvement ne peuvent se maintenir aux faibles nombres de Reynolds. Elles sont au contraire d'autant plus facilement entretenues que le nombre de Reynolds est élevé. Dans une cuve agitée, la valeur du nombre de Reynolds pour lequel les transitions se font entre les différents écoulements est fonction de la configuration du système d'agitation : hauteur de liquide par rapport au diamètre de la cuve, présence et nombre de baffles ou chicane ainsi que leur géométrie, rapport des diamètres du mobile d'agitation et de la cuve, position du mobile (débattement), type et géométrie du mobile d'agitation (hauteur et nombre des pales,...).

2.4.4. L'écoulement turbulent ($Re > 2000-10000$)

Lorsque l'écoulement devient suffisamment rapide, ou subit des accélérations assez sévères pour établir des composantes de vitesse perpendiculaires à l'écoulement principal (par exemple un brusque changement de direction), l'écoulement devient turbulent (Nienow, 1998). Le mouvement turbulent peut être considéré comme la superposition d'un spectre de fluctuations aléatoires de vitesse et de tailles de tourbillons à un écoulement global moyen à vitesse constante.

Les grands tourbillons primaires se caractérisent par des fluctuations importantes de vitesses à basse fréquence de rotation et sont d'une taille comparable aux dimensions physiques du système ou du moins de l'élément produisant la turbulence (par exemple le diamètre de la cuve ou de l'agitateur). Ils sont constamment renouvelés par le mobile en rotation. Ces tourbillons sont anisotropiques (leur vitesse moyenne varie selon la direction considérée) et contiennent la majorité de l'énergie cinétique. L'interaction de ces grands tourbillons (*macro-échelle*) avec des courants se déplaçant à faible vitesse produit des tourbillons plus petits de haute fréquence de rotation qui se désintègrent par la suite (*micro-échelle*). À cette échelle, les forces de frictions visqueuses qui surviennent résultent en une

transformation irréversible de l'énergie cinétique en énergie vibrationnelle moléculaire, qui est finalement dissipée en chaleur. On a donc un transfert d'énergie cinétique des grands tourbillons vers les plus petits, avec une perte progressive des éléments directionnels de l'écoulement principal. Ceci constitue la *cascade énergétique* (Figure 3). Il existe une limite dans l'échelle des plus petits tourbillons sans quoi nous arriverions à l'échelle moléculaire : les gradients de vitesse de ces tourbillons devenant de plus en plus importants, les tensions visqueuses contrecurrent leurs mouvements, c'est-à-dire que la viscosité finit par dissiper l'énergie qui leur est transférée.

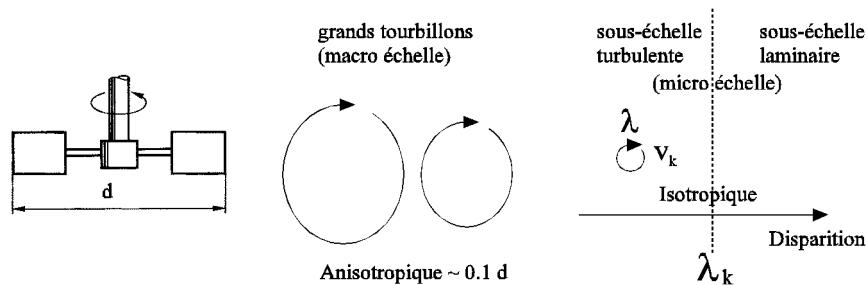


Figure 3 : Concept de Kolmogoroff d'un spectre de taille de tourbillons (Nienow, 1998)

On définit l'échelle de Kolmogoroff λ_k comme étant la taille de tourbillon à partir de laquelle les forces d'impulsion (turbulentes) et les forces visqueuses (laminaires) s'équilibrent et en dessous de laquelle la dissipation visqueuse prend place :

$$\lambda_k = f(\nu, \varepsilon_T) = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon_T} \right)^{1/4} = \frac{\mu^{3/4}}{\left(\frac{P}{V} \right)^{1/4}} \quad (m) \quad (7)$$

où ε_T est la puissance spécifique moyenne (W/kg), P la puissance dissipée (W) et V le volume de liquide (m^3). On voit que la taille des plus petits tourbillons diminue lorsque la puissance fournie augmente (van't Riet and Tramper, 1991). La puissance volumique sera ainsi une grandeur caractéristique importante pour corrélérer les grandeurs dépendant de la microturbulence.

Rappelons que pour des fluides non-newtoniens de type rhéofluidifiants, on peut avoir près de l'agitateur des conditions turbulentes qui, lorsque le fluide s'en éloigne, disparaissent rapidement et deviennent laminaires. On peut dès lors avoir à la fois des régions laminaires et turbulentes au même moment dans une cuve. Ceci rend les analyses de l'écoulement, de la puissance dissipée et de l'efficacité du mélange très difficiles, et indique une limitation considérable des corrélations basées sur des conditions globales moyennes telles que le nombre de Reynolds (Metzner and Taylor, 1960).

Il est évident que l'écoulement généré dans une cuve dépend fortement du type de mobile d'agitation utilisé.

2.5. Les mobiles d'agitation

La forme et la disposition d'un agitateur dans une cuve doivent être adaptées aux fonctions que doit remplir l'agitateur (Brauer, 1979) :

- transférer l'énergie au fluide (pour le mettre en mouvement)
- mélanger les composants du fluide impliqué dans le procédé

et pour les procédés faisant intervenir un flux gazeux:

- disperser le gaz dans le liquide

On aura donc dans le voisinage du mobile une zone d'action où prendront place le cisaillement et la turbulence (plus ou moins intenses), secondée d'un pompage qui aura pour mission de ramener périodiquement le fluide dans cette zone turbulente. Le résultat de l'opération de mélange dépendra du rapport de ces deux actions dont la valeur sera essentiellement liée au type et à la géométrie de l'agitateur.

Il existe une grande variété d'agitateurs qui sont fonction de l'application à laquelle on les destine. Les différentes formes peuvent être classées en plusieurs catégories selon les critères suivant :

- la direction de l'écoulement secondaire qui est induit (radial, axial);
- le rapport des diamètres de l'agitateur et de la cuve;
- la gamme de viscosité dans laquelle ils sont utilisables;
- la nature de l'écoulement : laminaire ou turbulent.

Dans la mesure où tout agitateur crée un écoulement tangentiel par la transmission de son mouvement rotatif au liquide, l'écoulement dans une cuve agitée est nécessairement tridimensionnel. Le schéma d'écoulement est fortement influencé par la présence de baffles contre la paroi, ainsi que par leur nombre et leur dimension. En effet, à cause des baffles, l'écoulement primaire rotationnel est amorti et entraîne des écoulements secondaires importants (Nienow, 1998). En pratique, il s'est avéré utile de différencier les mobiles d'agitation selon la direction de l'écoulement secondaire, en se rappelant que dans une cuve un écoulement axial est nécessairement suivi par un écoulement radial, et vice versa.

On distingue les mobiles à courant radial (perpendiculaire à l'axe) qui sont essentiellement des mobiles de turbulence, et les mobiles à courant axial (parallèle à l'axe) qui sont plutôt des mobiles de pompage. Les mobiles spécialement conçus pour le mélange des solutions très visqueuses (ancre, vis d'Archimède, double hélice en ruban) ne seront pas abordés ici.

2.5.1. *Les mobiles radiaux*

On trouve par exemple dans cette catégorie les turbines à pales plates (Figure 4a), les turbines à disque et à pales plates (Figure 5), les turbines à disque et à pales inclinées ou incurvées (Figure 4b).

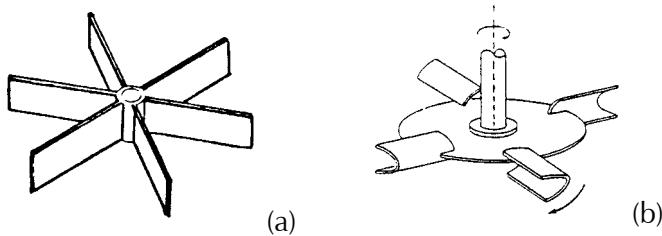
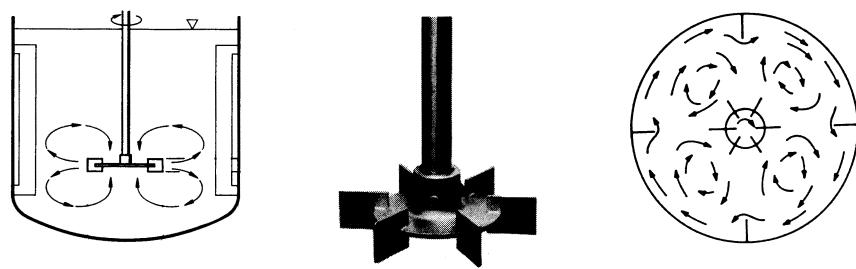


Figure 4 : Mobiles radiaux (a) turbine à pales plates ou droites, (b) Scaba 6SRGT (Nienow, 1998)

L'écoulement secondaire induit par les agitateurs radiaux est dirigé vers la paroi de la cuve. Il se divise alors à la fois vers le haut et vers le bas pour former deux tourbillons annulaires qui tournent en sens opposé. Ceci produit en retour un écoulement axial vers l'agicateur depuis le haut et le bas (Figure 5). En jouant sur le nombre et la géométrie des pales, la vitesse de rotation et le diamètre du mobile, on peut fixer à son gré la valeur des rapports des actions de pompage et de cisaillement (Bruxelmann, 1979).



(vu du haut, Midoux et Charpentier, 1979)

Figure 5 : Caractéristiques d'un mobile à écoulement radial : la turbine Rushton (Ekato, 1991)

Un exemple typique est la turbine à disque et à six pales plates, mieux connue sous le nom de turbine Rushton (Figure 5). C'est le mobile radial que nous utiliserons pour notre étude. Il est utilisable dans des solutions dont la viscosité est inférieure à 10 Pa.s. En pratique, le rapport entre le diamètre de la turbine

Rushton et celui de la cuve varie de 0.2 à 0.5 (ce qui diffère de la configuration standard où ce rapport est fixé à 0.33). Ce mobile possède un bon pouvoir de dispersion, et c'est pourquoi il est fréquemment utilisé pour des applications nécessitant l'injection de gaz ou pour diviser des gouttelettes (Pacek *et al.*, 1999). Les effets de mélange prennent place principalement dans la zone de cisaillement du jet qui émerge radialement des pales. L'écoulement autour de la pale a été présenté au *Chapitre I* (§2.4, Figure 3).

2.5.2. *Les mobiles axiaux*

Ce type de mobile pompe d'abord le fluide dans la direction axiale. On trouve dans cette catégorie des mobiles tels que l'hélice marine (Figure 6a), la turbine à pales inclinées (Figure 6b), ou d'autres mobiles de conception plus élaborée et de marques déposées (Figure 6 c et d, Figure 7). Les mobiles à courant axial ont une efficacité de pompage sensiblement supérieure à celle des mobiles radiaux.

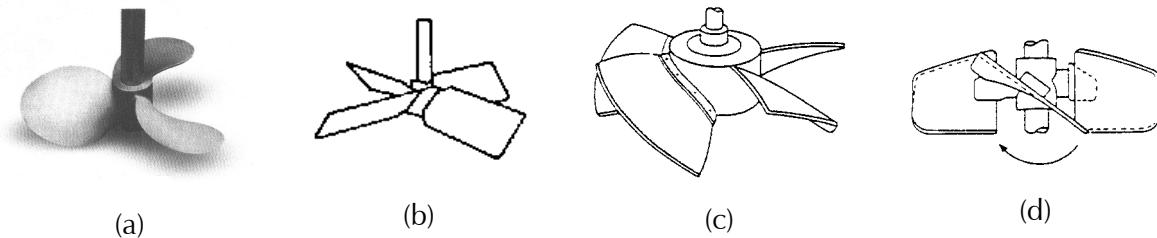


Figure 6 : Mobiles axiaux (a) hélice marine, (b) turbine à pales inclinées, (c) Prochem Maxflo Hydrofoil, (d) Lightnin A315

Certains de ces mobiles sont conçus pour pouvoir être utilisés en solitaire sur un axe. D'autres ont été prévus pour fonctionner en disposition multi-étageée, les mobiles étant perpendiculaires les uns aux autres. C'est le cas notamment pour les Intermig (conçus par la société Ekato Rühr-und Mischtechnik GmbH, Schopfheim, Allemagne) qui sont constitués par un bras avec un autre petit mobile constitué d'une pale double à leur extrémité, disposés avec un angle opposé (Figure 7). Pour notre étude, nous utiliserons des mobiles de type Intermig mais fabriqué par la société B. Braun (Melsungen, Allemagne).

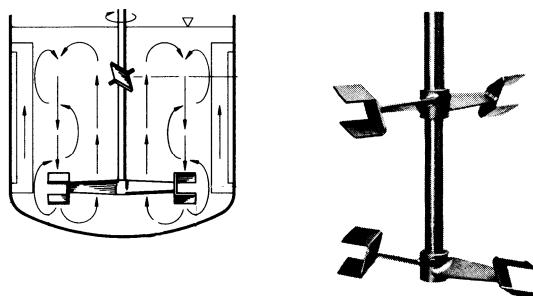


Figure 7 : Caractéristiques d'un mobile à écoulement axial mixte : les Intermig (Ekato, 1991)

Les Intermig produisent un écoulement axial à contre-courant multi-étage et à interférences, que l'on peut même qualifier de "chaotique" (Ibrahim and Nienow, 1995) et qui est très difficile à décrire (et semble-t-il assez éloigné du beau schéma fourni par les fabricants). L'effet axial est augmenté par le renversement des extrémités des mobiles.

On peut utiliser les Intermig dans des cuves aussi grandes que 5000 m³ avec des diamètres de mobile jusqu'à 10 m et dans des solutions de viscosité inférieure à 80 Pa.s. En pratique, le rapport entre le diamètre des Intermig et celui de la cuve varie de 0.5 à 0.95. Les Intermig ont également des caractéristiques très positives pour la dispersion du gaz, parce qu'ils dissipent l'énergie de façon beaucoup plus uniforme que les turbines classiques. Du fait que chaque étage d'agitateur possède deux bras, les cavités gazeuses sont libres de se propager vers la périphérie et ainsi ne s'accumulent pas en un point. Ceci élimine virtuellement le danger d'engorgement (qui est une obstruction à l'écoulement du fluide suite à une accumulation de gaz) et diminue la sensibilité des caractéristiques de puissance par rapport à l'aération.

2.5.3. *La répartition de l'énergie*

Il existe de fortes différences dans la répartition locale de l'apport d'énergie selon les systèmes d'agitation : la distribution de l'énergie est nettement plus homogène avec les systèmes d'agitation à plusieurs étages et ayant un plus grand diamètre relatif d/D (Intermig) qu'avec la turbine Rushton (Vanags et al., 1990). L'irrégularité de la distribution d'énergie dans un fermenteur fait que les cellules traversent des zones où les conditions régnantes sont très différentes, ce qui peut avoir des effets négatifs sur leur croissance (Vanags et al., 1990).

La densité de dissipation d'énergie est définie par le rapport entre la puissance spécifique locale ε_{loc} (W/kg) et la puissance spécifique moyenne dissipée par l'agitateur ε_T ($= P/\rho V$) (W/kg). La Figure 8 montre les distributions de densité de dissipation d'énergie (sous forme de courbes isoénergétiques) pour les turbines Rushton et les Intermig.

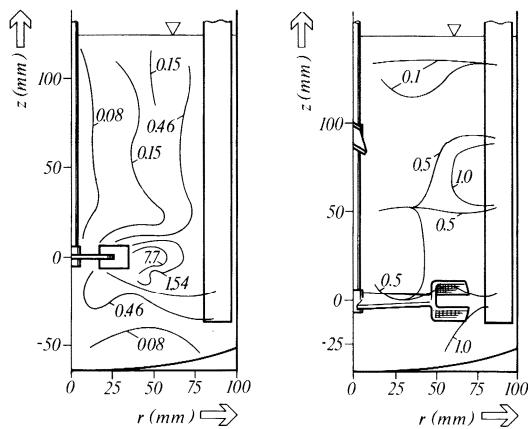


Figure 8 : Courbes isoénergétiques pour les turbines Rushton (gauche) et les Intermig (droite) (Ekato, 1991)

On peut voir que des valeurs nettement supérieures à 1 apparaissent dans le voisinage immédiat des pales de la turbine, alors que des valeurs beaucoup plus faibles existent dans des zones éloignées du mobile. Par contre, on n'observe pas de zones de valeurs supérieures à 1 avec les Intermig, et la répartition est globalement plus homogène. Avec les turbines Rushton, des rapports pouvant aller de 20 à 100 dans la zone de décharge de la turbine (qui se situe au voisinage latéral des pales) ont été mesurés (Nienow, 1998).

Ces caractéristiques ont des implications selon les tâches demandées au mélange.

- Les systèmes ayant des valeurs d'énergie locale faibles mais uniformes dans l'ensemble de la cuve sont avantageux pour les produits sensibles au cisaillement (par exemple les fermentations mycéliennes).
- Des valeurs élevées d'énergie locale sont souhaitables pour des tâches de dispersion extrêmes, pour produire des tensions de cisaillement intenses qui entraînent la désintégration des bulles ou des gouttelettes, ou des particules agglomérées (pigments).
- Dans le cas de systèmes biphasiques coalescents (liquide-liquide ou gaz-liquide), on doit fournir une énergie locale suffisante dans l'ensemble de la cuve pour assurer une "dispersion secondaire" suffisamment loin de l'agitateur, sinon l'aire interfaciale importante produite lors de la "dispersion primaire" près du mobile sera perdue. Dans ce cas, les Intermig qui créent des conditions équilibrées dans l'ensemble de la cuve sont avantageux, les bulles qui ont tendance à monter étant constamment redispersées (Kipke and Lagier, 1983).

À partir d'un bilan énergétique, il semblerait que la majeure partie de l'énergie transmise soit dissipée hors du courant de l'agitateur, c'est-à-dire au sein du fluide. Selon Cutter (Cutter, 1966),

approximativement 20% de l'énergie est dissipée au voisinage direct de l'agitateur dans les plus grands tourbillons (Rzyski, 1985), 50% dans la zone de décharge et 30% dans le reste de la cuve. D'autres auteurs affirment que la turbine Rushton dissipe 70% de son énergie à proximité du mobile (Kipke and Lagier, 1983), ou encore que la dissipation mesurée est maximale dans la région du jet quittant radialement le mobile, là où le rapport $\epsilon_{loc}/\epsilon_T$ est élevé (Mavros et al., 1997). Ces constatations sont malgré tout cohérentes si l'on assimile la "proximité du mobile" au "voisinage direct + la zone de décharge".

Selon les mesures de Norwood et Metzner (Norwood and Metzner, 1960), la quasi-totalité du mélange se passe dans une petit "volume parfaitement mélangé" près du mobile, et l'écoulement dans le reste de la cuve sert essentiellement à ramener le fluide dans cette zone de l'agitateur.

2.5.4. *Les critères de sélection*

Lors du choix d'un système, il ne faut pas perdre de vue que deux types de variables sont présents : celles qui sont indépendantes du système biologique considéré, et celles qui en sont directement dépendantes (Nienow, 1998).

Tableau 3 : Variables spécifiques et non spécifiques du système biologique

Variables d'une cuve agitée non spécifiques du système biologique	Variables de performance biologique qui sont spécifiques du système
<ul style="list-style-type: none"> - Dynamique des fluides <ul style="list-style-type: none"> 1. aspects macroscopiques (globaux) 2. près de l'agitateur (aspects locaux) 3. puissance spécifique locale et moyenne - Mélange des phases liquide et gazeuse - Puissance dissipée - Capacité de dispersion de la phase gazeuse - Coefficient global de transfert d'oxygène - Transfert de chaleur 	<ul style="list-style-type: none"> - Croissance et sécrétion de produits - Dégâts aux micro-organismes - Modifications de morphologie - Demande en nutriments y compris l'oxygène - Vitesses de transfert du CO₂ et de l'O₂

Nous nous attacherons ici aux choix liés uniquement aux variables indépendantes du système biologique. Les variables biologiques sont quant à elles étudiées dans les *Chapitres I et IV (Fermentation et Morphologie)*.

Si les turbines Rushton ont été les mobiles d'agitation préférés pour les fermenteurs pendant longtemps, de nombreux chercheurs ont relevé un certain nombre d'inconvénients à leur utilisation. Ils ont alors exploré de nouveaux concepts afin de dessiner des agitateurs possédant des caractéristiques mieux adaptées à la fermentation. Par exemple les turbines Rushton ne sont pas particulièrement efficaces pour le mélange des solutions non-newtoniennes (Charles, 1978). Le cas des milieux rhéofluidifiants a déjà été évoqué précédemment (changement de viscosité selon la distance à l'agitateur et diminution du mélange et des transferts). De plus, on a observé que dans le cas de cultures mycéliennes avec des turbines Rushton, la majeure partie du gaz s'écoule dans le voisinage du mobile. Ceci entraîne 1) une canalisation du gaz (channeling), 2) une augmentation de la taille des bulles , 3) une détérioration du mélange dans la masse du fluide, et 4) une distribution médiocre de l'oxygène dans la cuve (Charles, 1978). Tous ces facteurs contribuent à diminuer la capacité de transfert d'oxygène. Une solution proposée pour améliorer les transferts au sein du fluide est d'utiliser de plus larges turbines : un rapport d/D supérieur à la valeur 1/3 généralement préconisée pour les turbines Rushton permet une dissipation d'énergie plus uniforme au sein de la cuve (Charles, 1978; Nienow, 1997). Une autre possibilité est d'augmenter la vitesse de rotation, mais généralement les deux mesures sont nécessaires, ce qui entraîne une forte augmentation de la puissance consommée (et un risque de stress hydrodynamique trop intense via le produit $N \cdot d$). Dès lors, d'autres formes de mobiles ont été prises en considération.

Le choix d'un type d'agitateur est fonction de son utilisation (Tableau 4), le plus difficile étant de définir la tâche principale. Un procédé peut avoir des besoins contradictoires, et la configuration qui sera finalement adoptée correspondra à un compromis qui satisfera au mieux les différentes tâches dans le cadre du procédé global.

Tableau 4: Critères simples de choix d'agitateur : + convient très bien, ± convient, – ne convient pas

Application principale - Conditions d'utilisation	Mobile axial	Mobile "mixte" (Intermig)	Mobile radial (Rushton)
Mélange	+	+	±
Suspension	+	+	-
Dispersion	-	+	+
Aération	-	+	+
Transfert de Chaleur	±	+	±
Régime d'écoulement	turbulent	turbulent/laminaire	turbulent/laminaire
Re limite	> 500	> 100	> 100

Dans le cadre de ce travail, comme signalé précédemment, nous nous intéresserons plus particulièrement aux turbines Rushton (écoulement radial) et aux Intermig (écoulement axial-mixte).

2.6. La puissance consommée

La connaissance de l'énergie consommée pour l'agitation est d'une importance fondamentale en fermentation puisque la productivité du bioréacteur en dépend ainsi que la rentabilité financière du procédé (Calderbank and Moo-Young, 1959; Nienow, 1993; Velasco et al., 1994).

2.6.1. Le nombre de puissance

Si l'on se base sur l'équation de Bernouilli pour calculer la puissance dissipée par un mobile d'agitation et que l'on assimile ce dernier à une pompe située dans un "très grand corps de pompe", l'expression de la puissance est celle d'une augmentation de pression dans un écoulement volumétrique (van't Riet and Tramper, 1991) :

$$P = \Delta p * Q_p \quad (\text{W}) \quad (8)$$

où Q_p est le débit volumétrique (m^3/s) et Δp la variation de pression (Pa).

Le débit pompé Q_p est égal au produit de la vitesse périphérique des pales v_p ($=\pi N d$) et de la section balayée A (pour un mobile à écoulement axial $A=\frac{1}{4}\pi d^2$, et pour un mobile à écoulement radial $A=\pi L d$ où L est la hauteur de la pale avec $L=c d$ où c est une constante). La section balayée A est donc proportionnelle à d^2 dans tous les cas, ce qui entraîne :

$$Q_p \propto N d^3 \quad (\text{m}^3/\text{s}) \quad (9)$$

L'augmentation de pression Δp s'équilibre avec les pertes de charges du système, qui peuvent être exprimées selon la même expression que celle pour la perte de charge dans une conduite. Elles sont proportionnelles au coefficient de frottement ζ , à la densité ρ , et au carré de la vitesse de l'écoulement U , que l'on peut exprimer en fonction de la vitesse de rotation et du diamètre. On a:

$$\Delta p \propto \zeta \rho U^2 \quad (\text{Pa}) \quad (10)$$

$$\text{et } U = \frac{Q_p}{A} \Rightarrow U \propto \frac{Nd^3}{d^2} \propto Nd \quad (\text{m/s}) \quad (11)$$

D'où

$$\Delta p \propto \zeta \rho N^2 d^2 \quad (\text{Pa}) \quad (12)$$

et finalement :

$$P \propto \zeta \rho N^3 d^5 \quad (\text{W}) \quad (13)$$

C'est la relation fondamentale utilisée pour le calcul de la puissance dissipée en mélange, où ζ et les autres coefficients de proportionnalité sont regroupés pour former le *nombre de puissance* Np (adimensionnel), également appelé *nombre de Newton* ou *nombre d'Euler* (Moo-Young and Blanch, 1981) :

$$P = Np \rho N^3 d^5 \quad (\text{W}) \quad (14)$$

Le nombre de puissance Np est équivalent à un coefficient de frottement pour l'écoulement en conduite ou de résistance hydrodynamique pour les particules (Nienow, 1993). Il dépend du nombre de Reynolds, de la géométrie et du nombre de Froude Fr . Ce dernier vaut

$$Fr = \frac{N^2 d}{g} \quad (-) \quad (15)$$

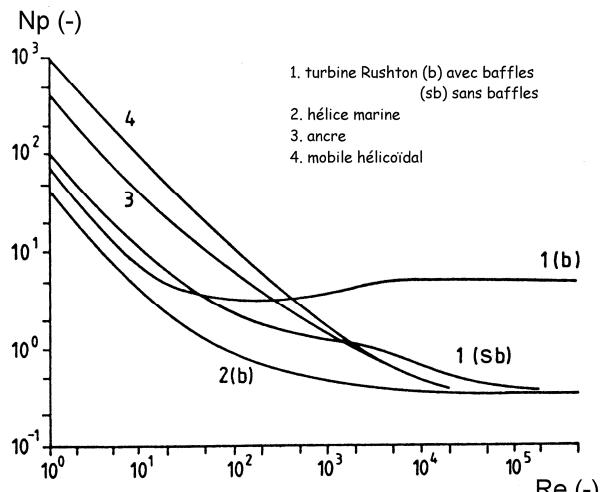
et représente le rapport des forces centrifuges et de la gravité (g).

Généralement, les effets du nombre de Froude sont négligeables dans une cuve bafflée (où il n'y a pas de vortex). Il n'a d'influence substantielle que dans le cas des applications aérées et ce uniquement pour des grands débits de gaz.

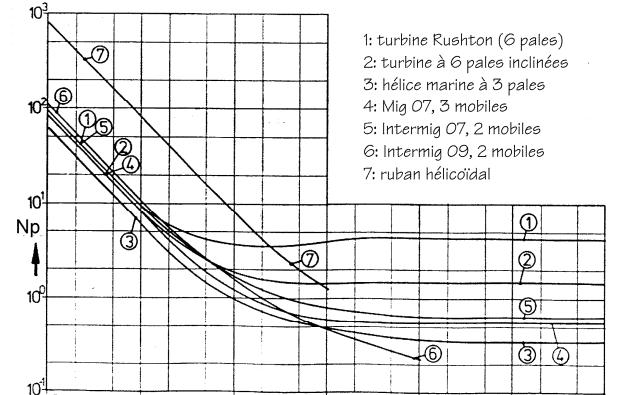
2.6.2. L'influence du nombre de Reynolds

On appelle *courbe caractéristique* ou *courbe de puissance* la façon dont varie le nombre de puissance en fonction du nombre de Reynolds (généralement en représentation logarithmique). Les courbes sont déterminées empiriquement en mesurant la puissance dissipée en fonction de la vitesse d'agitation. Elles représentent l'évolution de l'importance relative des régimes d'écoulement laminaires et turbulents.

Des courbes typiques de la relation $Np-Re$ sont présentées à la Figure 9.



(a)



(b)

La notation Intermig 07 et 09 fait référence au rapport d/D des mobiles, respectivement 0.7 et 0.9

Figure 9 : Nombre de puissance en fonction du Re ($H_l/D=1$)

Fondamentalement, on distingue plusieurs zones (les bornes sont données à titre indicatif puisque le passage d'un régime à l'autre varie en fonction du fluide, du mobile, de la géométrie globale) :

- **$Re < 10$** : en régime laminaire, le nombre de puissance diminue inversement au nombre de Reynolds (en coordonnées logarithmique) :

$$Np \propto Re^{-1} \quad \text{ou} \quad Np = \frac{c}{Re} \quad (-) \quad (16)$$

$$\text{c'est-à-dire que : } P \propto \mu N^2 d^3 \quad (\text{W}) \quad (17)$$

P varie donc en fonction de la viscosité (Moo-Young and Blanch, 1981).

La valeur de la constante c varie selon les mobiles : 70 pour une turbine Rushton, 40 pour une hélice marine, 100 pour les Mig, 110 pour les Intermig, 420 pour une ancre ou 270-440 ou 1000 pour un mobile hélicoïdal selon le pas de l'hélice (van't Riet and Tramper, 1991; Ekato, 1991).

- **$10 < Re < 10^4$** : en régime transitoire, il n'y a pas de relation simple entre Np et Re . La forme de la courbe est différente selon le schéma d'écoulement engendré par le mobile (Ibrahim et Nienow, 1995). Pour les mobiles axiaux ou mixtes, le nombre de puissance augmente alors que l'on observe une légère réduction pour les turbines Rushton (ceci étant sans doute dû à la réduction de la vitesse de rotation des vortex de traîne qui réduit la différence de pression entre l'avant et l'arrière des pales).

- $Re > 10^4$: en régime turbulent et en présence de baffles, le nombre de puissance est constant et indépendant du Re . Cela signifie que l'on a

$$P \propto N^3 d^5 \quad (W) \quad (18)$$

Dans ce cas, P est indépendante de la viscosité et fortement dépendante du diamètre du mobile d (Moo-Young and Blanch, 1981).

La Figure 9(a) (van't Riet and Tramper, 1991) met en évidence l'influence des baffles dans une cuve agitée par des turbines Rushton. En régime laminaire, le nombre de puissance dans une cuve non baffleée est supérieur à celui dans mesuré dans une cuve baffleée. Par contre, ce rapport s'inverse en régime turbulent : alors que le nombre de puissance diminue de façon monotone en l'absence de baffles, il se stabilise à une valeur constante (et supérieure à celle sans baffles) lorsqu'ils sont présents. La présence de baffles augmente donc la puissance nécessaire pour une même vitesse de rotation en régime turbulent.

La Figure 9(b) (Ekato, 1991) permet de souligner la différence entre les turbines Rushton et les Intermig. Si cette différence est faible en régime laminaire, elle devient beaucoup plus marquée en régime turbulent où la valeur du nombre de puissance (constant, cfr. cuve baffleée) des turbines Rushton est supérieure à celle des Intermig.

Remarque : les courbes de puissance pour les Intermig sont identiques qu'ils soient montés pour un pompage vers le haut ou vers le bas (Ibrahim and Nienow, 1995).

Des valeurs caractéristiques du nombre de puissance sont reprises au Tableau 5 pour différents types de mobiles pour $Re > 1000$. Sauf indication contraire, la géométrie comporte un seul mobile (d'une hauteur égale à 0.2 d), un rapport hauteur de liquide - diamètre de la cuve H_l/D égal à 1, et des baffles (van't Riet and Tramper, 1991).

Tableau 5 : Valeurs du nombre de puissance pour différents mobiles en régime turbulent
 (van't Riet and Tramper, 1991; Ekato, 1991; Nienow, 1998; Cooke et al., 1988)

Type de mobile	Np
Turbine Rushton à 6 pales	4.6 – 6.5
à 12 pales	7.5 – 9
à 18 pales	8.7 – 10
2 turbines Rushton à 6 pales	10 (Schugerl, 1981)
3 turbines Rushton à 6 pales	14.7 ± 0.2 (Dunn and Heinze, 1993; van't Riet and Tramper, 1991)
Turbine à pales incurvées	2 – 4 1.5 – 1.9 pour 6 pales
Agitateur à pales droites	1 - 3
Agitateur à pales inclinées à 45°	0.5 – 2
Hélice marine	0.1 – 1 0.35 pour 3 pales 0.85 pour 5 pales
Intermig	0.31 (1 seul mobile) 0.65 (2 sur le même arbre) 0.7 (2 sur un même arbre) 0.84 (3 sur le même arbre)
Mig	0.2 – 0.4 0.55 (3 sur le même arbre)
Scaba 6SRGT	0.57
Lightnin A310	0.31
Hydrofoil	0.67

On voit que les valeurs de nombre de puissance des turbines Rushton sont beaucoup plus élevées que pour les autres mobiles (que l'on appelle généralement *mobiles à faible nombre de puissance*) (van't Riet and Tramper, 1991). Cela signifie que, à diamètre égal, ils nécessitent une plus grande énergie pour obtenir la même vitesse de rotation (ou que la vitesse de rotation inférieure pour une même puissance). Il faut toutefois se rappeler que généralement les mobiles à faible nombre de puissance sont d'une conception telle que leur diamètre relatif est beaucoup plus grand que celui des turbines Rushton. On a généralement des valeurs de d/D de l'ordre de 0.3 pour ces dernières et par exemple 0.7 ou 0.9 pour les Intermig.

2.6.3. L'influence de la géométrie

Bien que les fabricants fournissent des abaques de Np versus Re pour de larges gammes du nombre de Reynolds et de la viscosité, la dépendance exacte entre ces grandeurs n'est que rarement connue ou disponible dans la littérature publique (Nienow, 1998). De nombreux facteurs géométriques influencent en fait la valeur de la puissance dissipée : position de l'agitateur par rapport au fond, nombre de mobiles, présence et nombre de baffles, hauteur de liquide, diamètre de l'arbre, etc. (Dunn and Heinze, 1993; Criot et al., 1988). L'importance d'un facteur tel que le débattement peut s'expliquer par le fait qu'une trop faible distance entre le fond et le mobile change radicalement les schémas d'écoulement du fluide. Par exemple, pour une turbine Rushton, un rapport $H_A/H_L < 1/5$ remplace la figure en huit traditionnelle par une boucle simple, ce qui entraîne une chute d'environ 20% du nombre de puissance (Figure 10) (Ibrahim and Nienow, 1995). Mais on ne dispose que de très peu d'informations sur les relations existant entre les schémas d'écoulement et le nombre de puissance.

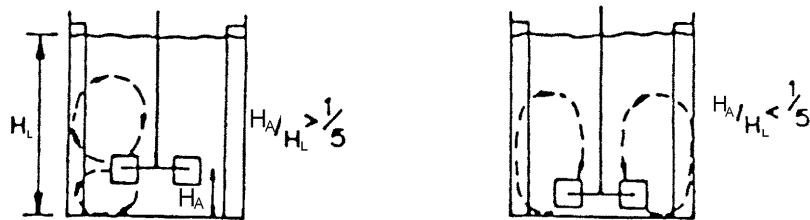


Figure 10 : Influence du débattement sur l'écoulement (Nienow, 1998)

En ce qui concerne la géométrie du mobile lui-même, les grandeurs qui influencent le plus la capacité de transfert d'énergie d'une turbine Rushton ou d'une hélice sont les rapports d/D et L/D (surtout dans le cas d'une cuve bafflée) et le nombre de pales n_b (Brauer, 1979). On a également une dépendance par rapport à l'épaisseur du matériau, notamment celle du disque du mobile x_d (m) (Fort et al., 1993). Pour une turbine Rushton (avec un débattement de $H_A/D=1/4$) on a pour $Re > 10000$ (Fort et al., 1993) :

$$Np = 2.5 \left(\frac{x_d}{d} \right)^{-0.2} \left(\frac{D}{D_0} \right)^{0.065} \quad (-) \quad (19)$$

où x_d est l'épaisseur du disque séparant les pales, et $D_0=1$ m (l'utilité de ce paramètre est de rendre l'équation adimensionnelle). Bien qu'il n'existe pas d'explication physique pour cette dépendance par rapport à l'échelle, cette approche s'est montrée la meilleure pour ajuster des données reproductibles. D'autres relations relient le nombre de puissance en régime turbulent aux caractéristiques géométriques des agitateurs : par exemple, on a pour une turbine Rushton à 6 pales (Calderbank and Moo-Young, 1961; Moo-Young and Blanch, 1981) :

$$Np = 160 \frac{wL(d-w)}{d^3} \quad (-) \quad (20)$$

où L est la hauteur de la pale, w sa largeur et d le diamètre du mobile (voir la Figure 1 pour le schéma). Cette corrélation est limitée aux fluides en loi de puissance, mais est valable aussi bien en régime laminaire qu'au-delà (Blanch and Bhavaraju, 1976), ce qui semble aberrant puisqu'en laminaire on n'a pas $Np = \text{cte.}$

La situation se complique lorsque la cuve est équipée de plusieurs mobiles puisque les schémas d'écoulement résultants peuvent être très différents. On ne peut négliger les interactions des mobiles entre eux (ou entre les mobiles et le fond de la cuve) que lorsque la distance entre deux mobiles (ou par rapport au fond) est supérieure au diamètre du mobile (van't Riet and Tramper, 1991). Sinon, la puissance dissipée par deux ou plusieurs turbines Rushton dépend de leur espacement ΔC (Nienow, 1998). La Figure 11(a) montre les modifications du schéma d'écoulement selon l'intervalle entre les mobiles dans le cas d'un fluide de faible viscosité. Si l'écart entre les deux mobiles est faible, les boucles de circulation engendrées par chacun des mobiles se rencontrent et se combinent. Par contre, si l'espacement est suffisant, les boucles deviennent indépendantes les unes des autres. La Figure 11(b) montre la variation du rapport de la puissance dissipée par deux mobiles à celle dissipée par un seul mobile en fonction de leur espacement relatif (la hauteur des mobiles standard étant de $0.2 d$, ils sont en contact lorsque leur espacement relatif vaut $0.2 d$). On recommande un espacement de l'ordre du diamètre de cuve pour ce type de milieu de faible viscosité (une étude plus complète des configurations à plusieurs mobiles sera présentée au § 2.7.5). On a alors pour n mobiles :

$$(Np)_n = n * Np \quad (-) \quad (21)$$

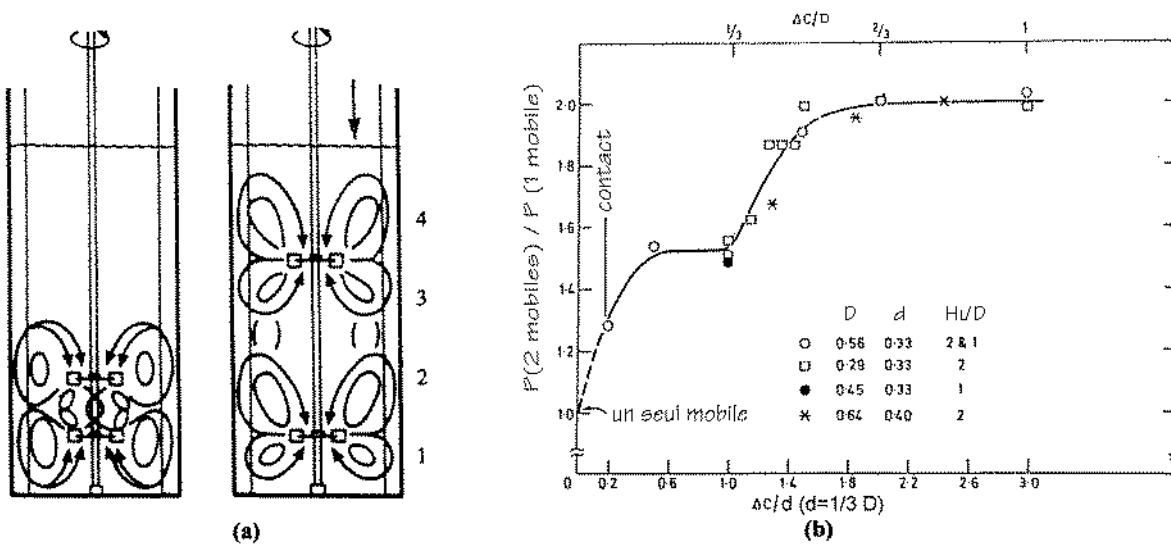


Figure 11 : Effet de l'espacement entre deux turbines Rushton (a) sur l'écoulement, (b) sur la puissance dissipée (Nienow, 1998)

Dans les milieux rhéofluidifiants, surtout lorsque l'index de comportement n devient inférieur à 0.2, on observe une certaine tendance à la formation de cavernes autour des mobiles, c'est-à-dire une zone de mélange intense et de mouvement autour du mobile au-delà de laquelle le fluide est quasi stagnant. Ce phénomène incite à rapprocher les mobiles : l'espacement est optimal lorsque les boucles de fluides circulant dans les cavernes ont une vitesse identique lorsqu'elles se touchent au niveau de la paroi. Dans le cas des turbines Rushton, cette caverne est généralement cylindrique, centrée sur le mobile et d'un rapport hauteur sur diamètre de l'ordre de 0.4. Dans ce type de configuration, une plus grande puissance est nécessaire pour atteindre un mélange satisfaisant (Nienow, 1998).

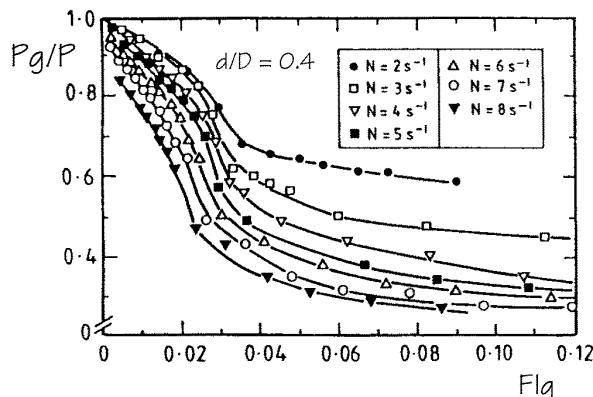
2.6.4. L'influence de l'aération

La présence d'air est une complication majeure pour la prédiction de la puissance dissipée (van't Riet and Tramper, 1991). L'introduction d'une densité moyenne dans la relation définissant le nombre de puissance ne permet pas de prédire la puissance P_g consommée dans un système aéré. La raison est que les phénomènes hydrodynamiques qui prennent place autour des pales d'un mobile changent en présence d'air. Des cavités remplies de gaz se forment à l'arrière des pales, ce qui diminue leur résistance hydrodynamique et donc la valeur du nombre de puissance en conditions aérées N_{pg} jusqu'à 0.3-0.5 fois sa valeur en mode non aéré pour les turbines Rushton. Les réductions sont de l'ordre de 40% pour les mobiles à pales droites et 30% pour les hélices (Brauer, 1979). Deux exemples sont

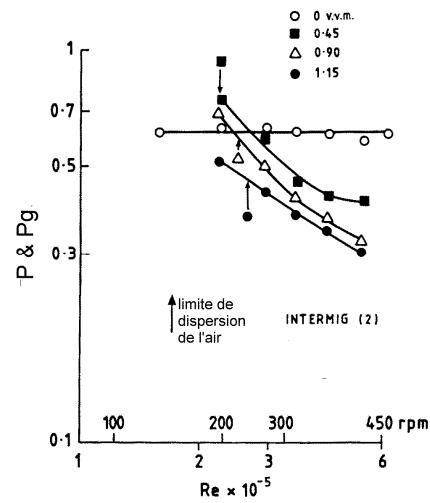
montrés à la Figure 12 : pour une turbine Rushton en fonction du nombre d'aération Flg et pour deux Intermig en fonction du nombre de Reynolds Re . Le nombre d'aération est défini par :

$$Flg = \frac{Q_g}{N d^3} \quad (-) \quad (22)$$

où Q_g est le débit de gaz (m^3/s).



(a)



(b)

Figure 12 : Rapport des puissances avec et sans gaz (a) pour une turbine Rushton (Nienow, 1998) et (b) pour deux Intermig (Nienow, 1990)

La géométrie et la position du système d'injection d'air (*sparger*) par rapport au mobile (inférieur) ainsi que la taille et le nombre de trous influencent la puissance consommée en mode aéré. Le rapport Pg/P est également influencé par la rétention gazeuse, la taille de la cuve et les propriétés physico-chimiques de la solution (Rewatkar and Joshi, 1991).

L'influence du nombre de Froude ($Fr = N^2 d/g$) est illustrée à la Figure 13. Cette influence n'est significative que pour les cuves non bafflées et pour les grands débits de gaz. C'est pourquoi elle n'est généralement pas prise en compte.

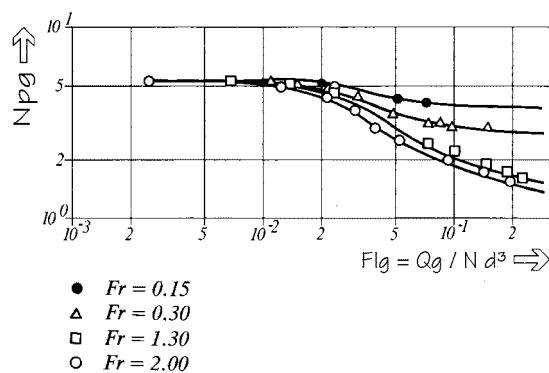


Figure 13 : Influence du nombre de Froude sur le nombre de puissance aéré pour une turbine Rushton (Ekato, 1991)

Il existe dans la littérature de nombreuses corrélations permettant de calculer la puissance consommée en présence de gaz à partir de celle nécessaire en milieu non aéré, ou des abaques corrélant la puissance en mode aéré, ou le rapport Pg/P , au nombre de Reynolds ou au nombre d'aération (Nienow, 1998; Joshi et al., 1982; Brauer, 1979; Fort et al., 1993; Rewatkar and Joshi, 1991; Midoux et Charpentier, 1979; Ozbas and Kutsal, 1991) (mais très peu font référence au nombre de Froude).

Quelques exemples sont proposés au Tableau 6 :

Tableau 6 : Calcul de la puissance en présence d'air

Relation	N°	Conditions - Origine
$\frac{Pg}{V} = 0.76 N^{2.59} Vg^{-0.1} \mu_a^{-0.21} (\text{W/m}^3)$	(23)	Vg = vitesse superficielle du gaz (m/s) μ_a = viscosité apparente (Pa.s) liquides visqueux ($\mu_a > 0.1$ Pa.s) divers mobiles (Arellano-Huacuja et al., 1997)
$\frac{Pg}{P} = 0.1 \left(\frac{N V}{Q_g} \right)^{0.25} \left(\frac{N^2 d^4}{g w V^{2/3}} \right)^{-1/5} (-)$	(24)	(Griot et al., 1988)
$\frac{Pg}{V} = \frac{c}{V} \left(\frac{P^2 N d^3}{Q_g^{0.56}} \right)^{0.45} (\text{W/m}^3)$	(25)	c dépend du type de mobiles (= 0.72 pour une turbine Rushton pour Q_g est en litre/heure, N en rpm, d en cm et V en litres) (Ozbas and Kutsal, 1991) (Fort et al., 1993) : $c = 0.83$ et P est calculé par la relation (19)

2.6.5. *Les méthodes de mesure*

2.6.5.1. Le torquemètre

Le torquemètre, appelé aussi dynamomètre, est un dispositif placé sur l'axe à l'extérieur de la cuve, qui permet de mesurer le couple M (N.m) exercé par l'axe. Il comprend un morceau d'axe (généralement d'un diamètre inférieur à celui de l'arbre de la cuve) ou un ressort dont on mesure la distorsion. Cela peut être fait par une jauge de contrainte ou par un système de mesure de déplacement (optique ou magnétique/électrique) (van't Riet and Tramper, 1991). On peut également utiliser un moteur monté sur roulements et relié par un bras à un capteur de force (voir §3.4). Le principal inconvénient est que l'on mesure également le couple exercé sur les joints et les roulements, M_b . On doit effectuer une correction en faisant une mesure à charge nulle (en faisant tourner le mobile dans l'air). Il apparaît que cette charge est quasi indépendante de la vitesse de rotation et des conditions de charge.

On peut alors déterminer la puissance consommée comme suit :

Le couple mesuré M_t inclut à la fois le couple dû à l'agitateur et celui dû aux joints et aux roulements :

$$M_t = M + M_b \quad (\text{N.m}) \quad (26)$$

La mesure à vide fournit M_b et l'on peut alors déduire le couple M pour des mesures à différentes vitesses de rotation et calculer la puissance consommée :

$$P = 2 \pi N M \quad (\text{W}) \quad (27)$$

2.6.5.2. La mesure de la puissance électrique

Cette méthode n'est pas vraiment applicable (van't Riet and Tramper, 1991). Le principal problème vient de la différence entre la puissance électrique consommée par le moteur et celle appliquée à l'arbre. En effet, le facteur d'efficacité est généralement assez faible à petite échelle (d'autant plus que les moteurs sont toujours surdimensionnés), et fortement dépendant de la charge appliquée. Les moteurs sont généralement équipés d'un variateur de vitesse dont les pertes sont inconnues et peuvent varier avec la vitesse. La valeur mesurée par un wattmètre ne donne donc pas nécessairement la puissance consommée par l'agitation. On ne peut utiliser cette méthode de façon fiable qu'à grande échelle ($> 10\text{kW}$), sans variateur de vitesse et entre 50% et 100% de la charge complète.

2.6.5.3. La mesure de la production de chaleur

La puissance consommée par l'agitateur est finalement dissipée sous forme de chaleur :

$$P = (V + V_e) \rho c_p \frac{dT}{dt} + r_{pc} \quad (W) \quad (28)$$

où V = volume de liquide (m^3)

V_e = volume équivalent de liquide correspondant à la capacité calorifique de l'agitateur, de l'arbre, des parois, de l'injecteur d'air, etc. (m^3)

c_p = chaleur spécifique du liquide ($J/kg K$)

dT = accroissement de température du liquide (K)

r_{pc} = autres sources de perte de chaleur (évaporation, pertes à la paroi, etc.) (W)

V_e peut être déterminé par étalonnage, en ajoutant une quantité de chaleur bien définie à puissance consommée nulle. Des méthodes existent pour mesurer les pertes à la paroi (van't Riet and Tramper, 1991). Cette méthode est fiable pour des échelles supérieures à $1 m^3$, mais à plus petite échelle, les pertes sont relativement trop importantes pour obtenir une mesure précise.

2.7. Le mélange

2.7.1. La définition du mélange

Le mélange peut être défini comme le processus qui diminue l'hétérogénéité d'un système, par exemple le contenu d'une cuve (van't Riet and Tramper, 1991). Une cuve est parfaitement mélangée si la probabilité de trouver un composé donné en un point donné est identique pour tout point dans la cuve. On peut caractériser le mélange par deux éléments : l'échelle de mélange et l'intensité du mélange.

L'échelle de mélange est définie comme la plus petite dimension à laquelle on peut rencontrer des hétérogénéités. Cette échelle sera toujours plus petite que celle du système en lui-même, et plus grande que les plus petites particules présentes dans le système. L'échelle à laquelle on s'intéressera dépendra du procédé étudié. Lorsque les méthodes de mesure impliquent un échantillonnage ou l'insertion d'une sonde dans la cuve, l'échelle sera celle de l'échantillon ou de la zone de détection de la sonde.

Le *micromélange* est l'étude du mélange à l'échelle moléculaire. Il caractérise l'étude du chemin suivi par chaque molécule au sein du récipient, et le profil de vitesse le long de ce chemin. On obtient ainsi une connaissance de l'environnement de chaque molécule durant ses trajets dans le récipient.

Le *macromélange* est une vision moins précise et moins détaillée des choses, qui étudie plus globalement l'écoulement à une échelle macroscopique (par exemple celle de l'appareillage utilisé pour

étudier l'écoulement ou d'un compartiment) mais suffisante pour détecter les non-idealités de l'écoulement et caractériser l'hydrodynamique du réacteur.

L'intensité du mélange est définie comme étant un écart par rapport au mélange parfait. Dans le cas d'un système fermé, cette intensité se définit comme étant l'écart relatif entre la concentration réelle et la concentration moyenne correspondant à une homogénéisation complète. Cette définition peut être illustrée par l'exemple suivant.

Une impulsion de traceur acide est injectée en $t=0$ dans une boucle de circulation, et une électrode pH détecte son passage après qu'il soit passé par la partie inférieure de la boucle. Cela est répété après chaque circulation.

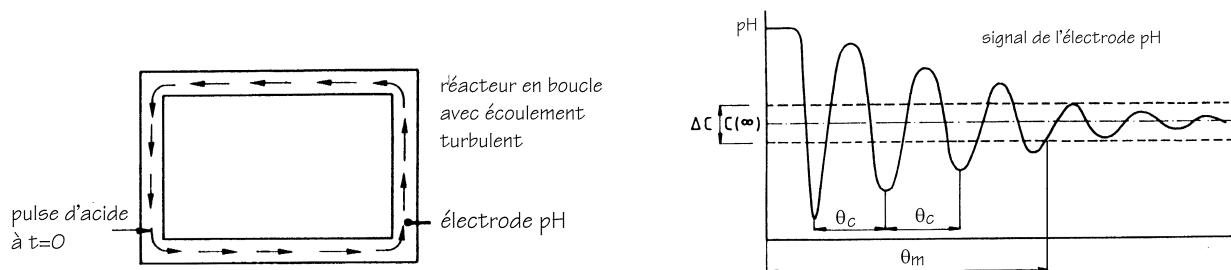


Figure 14 : Représentation schématique de la relation entre l'intensité de mélange et le temps de mélange
(van't Riet and Tramper, 1991)

Les fluctuations de pH s'amortissent à cause du mélange qui prend place lors de la circulation. Selon les éléments décrits à la Figure 14, on définit l'intensité de mélange par :

$$\text{Intensité de mélange} = \frac{C(\infty) - 0.5 \Delta C}{C(\infty)} \times 100\% \quad (\%) \quad (29)$$

où ΔC (kmol/m^3) est la déviation autorisée par rapport au mélange parfait.

En théorie, une intensité de 100% ne peut être atteinte qu'après un temps infini. En pratique, on considère un système comme étant suffisamment mélangé dès que l'écart à $C(\infty)$ (kmol/m^3) reste dans l'intervalle défini par le critère $\Delta C/2$, ou exprimé autrement, dès que l'intensité de mélange du système devient supérieure au critère défini par l'équation (29). Ceci signifie que le temps de mélange peut prendre différentes valeurs pour un même système, du fait que sa valeur augmente avec l'intensité de mélange désirée. On considère généralement comme satisfaisante une intensité de mélange de 95%, et on parle alors de θ_{m95} . Dans la suite de ce travail, le temps de mélange à 95% sera désigné par θ_m pour plus de simplicité.

Il est évident qu'une boucle de circulation existe dans l'exemple choisi. Mais c'est aussi généralement le cas dans les fermenteurs, bien que moins strictement définie. Dans une boucle, on peut définir un temps de circulation θ_c comme étant le temps moyen nécessaire au fluide pour effectuer deux passages successifs devant la sonde.

Pour un fluide donné, le mélange dépend de la géométrie globale du réacteur, du type d'agitateur et de la vitesse d'agitation. Pour un réacteur donné et pour des conditions fixées, le mélange peut être fortement affecté par la rhéologie du fluide (Hiby, 1981; Charles, 1978).

On doit utiliser le concept de temps de mélange avec précaution pour comparer des mobiles. C'est une mesure assez grossière de l'efficacité de mélange : on obtient des informations sur le temps durant lequel des hétérogénéités perdurent dans les recoins de la cuve, mais on n'a pas d'indication sur l'amplitude ou la forme des maxima de concentration transitoires : des temps de mélange égaux ne signifient pas que l'on a les mêmes transitions spatiales et temporelles après qu'un **pulse** de traceur soit ajouté. Cette information peut pourtant être d'une certaine importance lorsqu'il s'agit de substances interférant avec le métabolisme des bactéries (des pics de concentration locaux peuvent être dommageables). La représentation d'un fermenteur par un modèle prenant en compte les différentes échelles peut aider à la compréhension des mouvements du fluide dans la cuve. Par exemple, les modèles compartimentés découpent le réacteur en un nombre plus ou moins élevé de zones qui sont reliées entre-elles par des flux dont l'intensité et le sens permettent de représenter les phénomènes liés au mélange (voir le §2.8).

Il ne faut pas perdre de vue que lorsqu'on mesure un temps de mélange, le résultat obtenu va dépendre de la définition et de la technique utilisée pour mesurer les hétérogénéités du système (Manna, 1997; Bruxelmane et Roustan, 1982; Charles, 1978; Kawase and Moo-Young, 1989), de la nature de la sonde (technologie mise en œuvre, volume de la cellule de mesure) et de son emplacement, de la façon et de l'endroit où le traceur est introduit, etc. On ne pourra ainsi effectuer des comparaisons entre plusieurs expérimentateurs que si les méthodes utilisées sont identiques (avec le problème qu'elles ne sont pas toujours clairement décrites dans les publications).

À noter que, jusque maintenant, aucune corrélation n'a pu être établie entre les mesures du temps de mélange en fermenteur (bien que nombreuses) et les performances des fermentations (par exemple la croissance des micro-organismes) (Mukataka et al., 1980). Par contre, le taux de fuite de substances

intracellulaires de moisissures mycéliennes en suspension et le taux de croissance de moûts mycéliens ont pu être corrélés à la distribution des temps de circulation du mycélium (Mukataka *et al.*, 1981).

2.7.2. *Les mécanismes de mélange*

On peut distinguer plusieurs mécanismes qui interviennent dans le mélange (van't Riet and Tramper, 1991; Bruxelmann et Roustan, 1982; Holmes *et al.*, 1964):

- La diffusion moléculaire (échelle moléculaire) : ce processus peut être considéré comme le mélange ultime. Ce mélange est dû à l'échange à l'échelle moléculaire (van't Riet and Tramper, 1991). Il est déterminé par le mouvement Brownien et, pour les procédés aérobies, par la résistance à l'interface entre les phases liquides et gazeuses (Wernersson and Tragardh, 1999).
- La diffusion turbulente locale (échelle des microtourbillons) : elle est due aux effets de cisaillement microscopiques résultant des fluctuations de vitesse dans les tourbillons au sein de l'écoulement turbulent (Wernersson and Tragardh, 1999). Elle entraîne une érosion des agrégats et un accroissement de leur surface de contact.
- Le cisaillement : en régime laminaire, on peut observer un mélange dû aux couches de fluide qui se cisaillent les unes par rapport aux autres.
- L'échange : en régime turbulent, les particules de fluides sont continuellement déplacées les unes par rapport aux autres en un processus aléatoire.
- Le transfert par convection (échelle macroscopique) : suite à la circulation globale du fluide engendrée par le mobile d'agitation et au cisaillement qui l'accompagne, la convection réalise une répartition homogène des agrégats.

Dans le cas des fermenteurs, nous nous intéresserons essentiellement au macromélange. Il résulte de la superposition de deux mécanismes survenant à des échelles différentes : la circulation des paquets de fluide (échelle macroscopique) et le mélange au sein des paquets de fluide eux-mêmes (échelle microscopique). Le découpage d'une cuve en compartiments correspond à l'établissement d'échelles intermédiaires.

2.7.3. *Les mouvements du fluide*

Le mouvement du fluide dans une cuve agitée par un mobile rotatif peut être divisé en plusieurs schémas d'écoulement. Tout d'abord, le fluide subit un mouvement de rotation, ou tangentiel, dû à

l'entraînement direct par le mobile (Brauer, 1979). La majeure partie de l'énergie transférée par l'agitateur au fluide est consommée par ce mouvement primaire. Étant donné que ce mouvement n'intervient que de façon mineure dans le processus de mélange, l'énergie contenue dans ce mouvement est gaspillée.

Ce que l'on appelle le *mouvement secondaire* a été montré précédemment à la Figure 5 pour les turbines Rushton et à la Figure 7 pour les Intermig (§2.5). Il est constitué des composantes axiales et radiales du mouvement. Ce mouvement est le plus important pour le processus de mélange. Seule une petite fraction de l'énergie transférée au fluide est contenue dans ce mouvement. Cet écoulement secondaire est lié de près à des zones de mouvement très lent qui sont mal mélangées, et que l'on peut trouver dans les zones anguleuses et au centre des tourbillons (Brauer, 1979). L'intensité de ce mouvement secondaire dépend des forces centrifuges induites par le mouvement de rotation primaire du fluide. Ce mouvement est plus important près du mobile, où l'on trouve un flux dans la direction radiale (vers l'extérieur). L'importance de ce flux dépend de la conception de l'agitateur lui-même.

Comme signalé lors de la présentation du nombre de puissance, la position du mobile par rapport au fond de la cuve influence le schéma d'écoulement du fluide (Nienow, 1998), ainsi que d'autres facteurs géométriques tels que les dimensions de l'arbre d'agitation (Holmes et al., 1964). Dans le cas d'une seule turbine Rushton, un exemple est présenté à la Figure 10 et pour deux turbines Rushton à la Figure 11 (§2.6.3).

2.7.4. *Le pompage et la circulation*

Il est difficile de définir le débit volumique par unité de temps Q_p dans le cadre d'un écoulement libre comme celui qui existe dans une cuve agitée. Les effets d'entraînement existent parce que l'écoulement provoqué par le mobile et ceux de direction opposée au niveau de la paroi ne sont pas isolés les uns des autres. On doit donc différencier le débit de pompage primaire Q_p (qui prend place uniquement sur la hauteur d'un mobile radial ou sur la largeur d'un mobile axial) du débit de circulation Q_c (ou de pompage secondaire) qui prend en compte l'entraînement du fluide adjacent et qui est donc supérieur au débit de pompage primaire. Ce débit entraîné total Q_c peut valoir jusqu'à 2.5 fois plus que le débit de pompage (Nienow, 1997), bien que d'autres auteurs affirment qu'expérimentalement ce rapport vaut 2 (van't Riet and Tramper, 1991).

Le profil de vitesse réel a la forme d'une cloche (Figure 15). Ceci a des répercussions sur les distributions de vitesse dans tout le reste de la cuve, et en conséquence sur le débit de circulation. Il semblerait que le débit de pompage d'une turbine Rushton soit quasi indépendant de la position radiale où l'on se trouve par rapport au mobile (c'est-à-dire sa valeur est constante sur tout le rayon de la cuve) (Holmes et al., 1964).

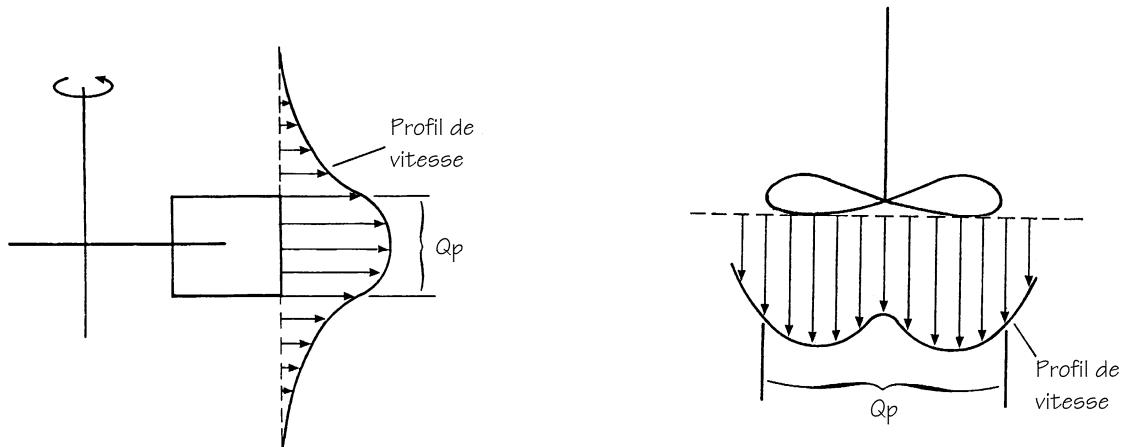


Figure 15 : Débit de pompage pour un mobile radial (gauche) et pour un mobile axial (droite) (Nienow, 1997)

Si l'on mesure le flux Q_p qui quitte un agitateur au niveau des pales pour des mobiles radiaux (turbine Rushton) ou qui passe effectivement dans le mobile pour des mobiles axiaux (hélice marine), on peut définir le nombre de pompage Fl (adimensionnel) (Nienow, 1997) :

$$Fl = \frac{Q_p}{Nd^3} \quad (-) \quad (30)$$

La Figure 16 montre la dépendance du nombre de pompage par rapport nombre de Reynolds pour une turbine Rushton dans des milieux newtoniens. On voit que le nombre de pompage est indépendant du nombre de Reynolds en régime turbulent.

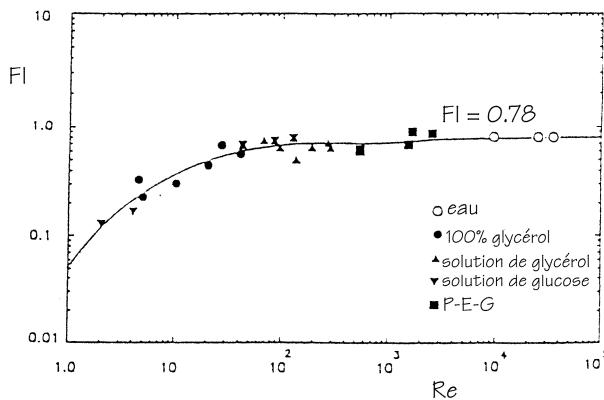


Figure 16 : Nombre de pompage Fl versus Re pour une turbine Rushton en milieu newtonien (Nienow, 1998)

Des valeurs typiques du nombre de pompage pour quelques mobiles sont données au Tableau 7 pour $Re > 1000$. Pour des nombres de Reynolds inférieurs à cette valeur, le nombre de pompage diminue (mais on ne trouve que peu de données dans la littérature, Nienow, 1998). Bien que Fl varie avec le type de mobile, la variation de sa valeur en régime turbulent est moins importante que celle du nombre de puissance.

Tableau 7 : Valeurs du nombre de pompage Fl pour $Re > 1000$

(Nienow, 1998; Nienow, 1993; Wernersson and Tragardh, 1999; Costes et Couderc, 1987)

Type de mobile	Fl
Turbine Rushton à 6 pales	0.72 – 0.78
Turbine à pales inclinées (4 pales)	0.79
(6 pales)	0.73
Hélice marine	0.5 - 0.56
Intermig	pas de données

De la même façon que le nombre de pompage, on définit le nombre de circulation Fl_c (-) :

$$Fl_c = \frac{Q_c}{Nd^3} \quad (-) \quad (31)$$

où Q_c est le débit de circulation (m^3/s). Par exemple, pour une turbine Rushton (à 6 pales) et une hélice marine (à 3 pales), le nombre de circulation vaudra respectivement 1.51 et 0.95. Par ailleurs (Costes et Couderc, 1987), on a noté une différence du nombre de circulation selon que l'on se place dans le plan d'un baffle ($Fl_c = 2$, confirmé par Costes and Couderc, 1988), ou dans le plan médian entre deux baffles ($Fl_c = 3.4$) (ou $Fl_c = 3.5 - 3.7$ pour une turbine, et $Fl_c = 2.9$ pour deux mobiles selon Costes and Couderc, 1988).

On peut relier le temps de circulation au débit et au nombre de circulation (Nienow 1990). Cette approche se base sur la réponse d'un essai de traceur : lorsqu'on injecte un traceur dans une cuve agitée mécaniquement, on observe des pics qui s'amortissent progressivement (Figure 14). On fait l'hypothèse que le temps entre deux pics est le temps de circulation θ_c , et qu'il est représenté par

$$\theta_c = \frac{V}{Q_c} = \frac{V}{Fl_c N d^3} \quad (\text{s}) \quad (32)$$

pour une cuve où $H_l/D=1$. On suppose alors que le système est homogène à 95% après 5 circulations (bien que d'autres auteurs proposent 4 circulations (van't Riet and Tramper, 1991), ou 5 circulations pour une intensité de mélange de 99% (Joshi *et al.*, 1982), mais tout cela est empirique ce qui explique ces quelques divergences). On a donc :

$$\theta_m = \frac{5V}{Fl_c N d^3} \quad (\text{s}) \quad (33)$$

2.7.5. Le mélange avec plusieurs mobiles

La littérature disponible est beaucoup plus limitée en ce qui concerne la consommation énergétique et le mélange des fermenteurs multi-étages (Joshi *et al.*, 1982). L'espacement entre les mobiles est notamment un problème délicat comme signalé lors de l'étude de la puissance.

Le temps de mélange pour des systèmes à plusieurs mobiles augmente significativement, mais on n'a pas discerné si cette augmentation était due au fait que dans ce type de géométrie la hauteur de liquide était beaucoup plus importante (on a au minimum $H_l \geq 2D$) ou si elle était due à la présence de mobiles supplémentaires (Cooke *et al.*, 1988; Nienow, 1998; Hari-Prajitno *et al.*, 1998). Par contre, les distributions du temps de circulation dans les deux régions des mobiles d'un système équipé de deux turbines Rushton ($H_l=2D$ et $d/D=0.48$) sont identiques à celles d'une cuve à un seul mobile (avec $H_l=D$) quand on a la même puissance volumique injectée (que ce soit dans l'eau ou dans une solution non-newtonienne de pulpe de papier) (Mukataka *et al.*, 1981).

Cette dernière observation justifie que lorsqu'on introduit plusieurs mobiles sur un même arbre, le fermenteur peut être facilement découpé en plusieurs compartiments parfaitement mélangés (Nienow, 1993; Nienow, 1996; Mukataka *et al.*, 1981). Les agitateurs radiaux sont très enclins à ce type de comportement. Dans ce cas, le mélange de haut en bas peut prendre plus de temps du fait que la cuve se comporte sur le modèle des cuves en séries avec seulement un faible échange entre les différents

étages. Les agitateurs axiaux sont moins sujets à cette compartimentation mais ne l'éliminent pas totalement.

Lorsqu'on effectue un essai de traceur avec plusieurs sondes réparties le long de la hauteur d'un fermenteur équipé de deux turbines Rushton (c'est-à-dire une dans chaque boucle de circulation de chacune des deux turbines Rushton, voir Figure 17) et numérotées de 1 à 4, on observe que le temps de mélange est identique pour chaque sonde (Nienow, 1996; Nienow, 1998). Cependant, le signal a une allure différente au niveau de chaque sonde lorsqu'on injecte la solution saline par le haut du fermenteur. La sonde la plus haute (n°4) présente un dépassement important par rapport à la concentration d'équilibre, alors que les sondes inférieures (n°1 et 2) montrent une montée graduelle vers ce même équilibre (Figure 17). Ces réponses peuvent être modélisées en utilisant un flux d'échange Q_E , qui lorsqu'on l'exprime en fonction du nombre de pompage d'échange $F_E (=Q_E/Nd^3)$, prend une valeur de l'ordre de 1.4 pour l'échange entre les zones 1 à 2 et 3 à 4 (entre les boucles d'une même turbine) et une valeur d'environ 0.4 pour les zones 2 à 3 (entre les deux mobiles). Ces valeurs sont à comparer au nombre de pompage pour une turbine Rushton qui est de l'ordre de 0.8 .

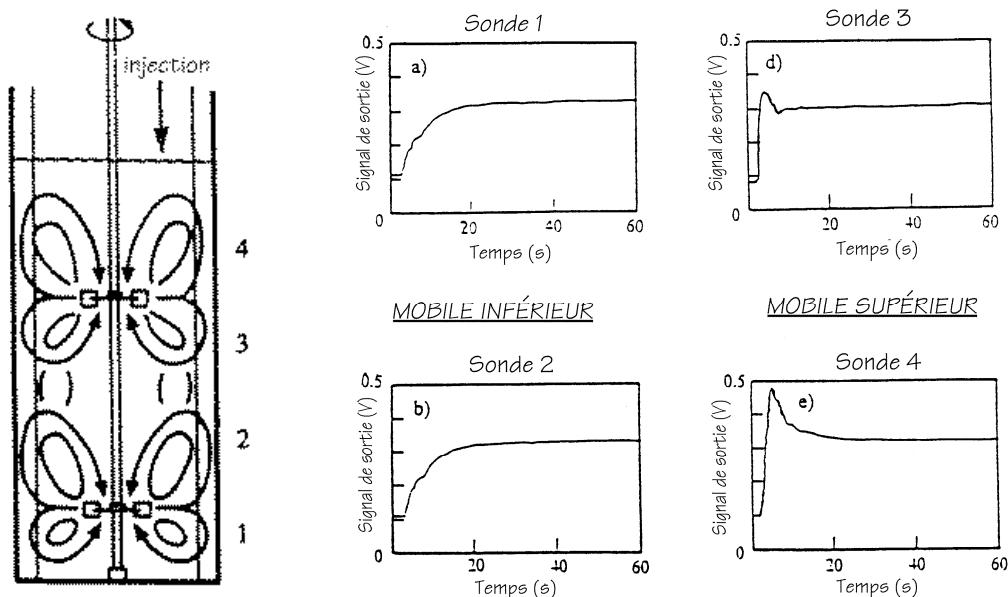


Figure 17 : Réponses des sondes conductimétriques dans un fermenteur à deux turbines Rushton (Nienow, 1998)

Une autre approche (Cronin et al., 1994) consiste à étudier l'influence de la position de l'injection de traceur dans un fermenteur équipé de deux turbines Rushton (espacées de deux fois leur diamètre) sur le temps de mélange global, ainsi que sur le "temps de mélange local" au niveau du mobile le plus proche du point d'injection :

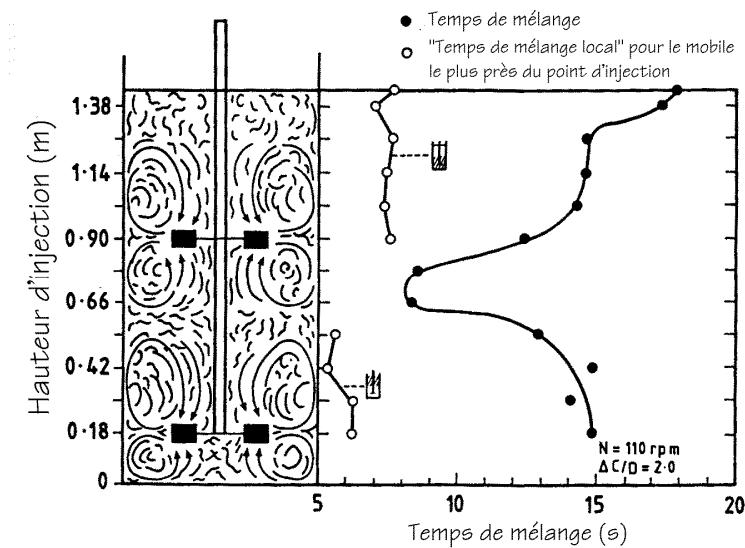


Figure 18 : Effet de la position du point d'injection sur le temps de mélange dans l'eau (Cronin et al., 1994)

La partie gauche de la Figure 18 présente le schéma du fermenteur avec, en axe vertical, la hauteur (ou l'altitude) du point d'injection de traceur. La partie droite montre les courbes représentant les mesures du temps de mélange global (●) et local (○) (pour le mobile le plus proche du point d'injection de traceur). La valeur de ces temps de mélange se lit sur l'axe horizontal. Comme on le voit sur la Figure 18, le temps de mélange varie de façon significative selon la position du point d'injection. Il est maximum (18 secondes) lorsque l'injection se situe à la surface du liquide, et minimum (8 secondes) pour une injection dans la zone où les boucles de circulation des mobiles supérieur et inférieur se rencontrent. Ce résultat est très intéressant dans la mesure où en pratique les additions d'acide/base ou d'antimousse se font généralement à la surface. On pourrait améliorer le contrôle (en réduisant le temps de mélange) en les ajoutant sous la surface du liquide (ou en mettant des points d'injections à plusieurs niveaux) et ainsi améliorer la qualité et/ou le rendement des substances produites. Cette étude a été réalisée avec de l'eau en régime turbulent. Si le milieu est rhéofluidifiant, les écarts seront encore plus marqués du fait de la formation de cavernes autour des turbines Rushton, avec apparition de zones mortes (ou moins agitées) près des baffles et de la surface.

On estime dans ce cas-ci (et avec de l'eau) que le flux d'échange Q_E varie entre 50% et 70% de Q_P (Cronin et al., 1994).

L'observation du découpage du fermenteur en plusieurs zones a inspiré un certain nombre de modèles dits "compartimentés" pour tenter de décrire la circulation du fluide et le mélange. Ils seront abordés dans la partie *Modélisation* (§2.8).

2.7.6. Le mélange d'une cuve aérée

Dans le cas d'une cuve aérée, l'écoulement se complique du fait des interactions et des actions combinées des mobiles et des bulles d'air (van't Riet and Tramper, 1991). Si pour une vitesse de rotation donnée on augmente le débit d'air (ou inversement si pour un débit de gaz donné on augmente la vitesse de rotation), le schéma d'écoulement se modifie. Aux faibles débits de gaz, les schémas d'écoulement sont proches de ceux observés en l'absence de gaz (Figure 19c). L'augmentation du débit de gaz change graduellement ce schéma jusqu'à ce que le gaz domine l'écoulement (Figure 19b). Au-delà, les bulles de gaz ne sont plus dérangées par le mouvement de l'agitateur et le gaz s'écoule dans la zone de l'axe d'agitation (Figure 19a).

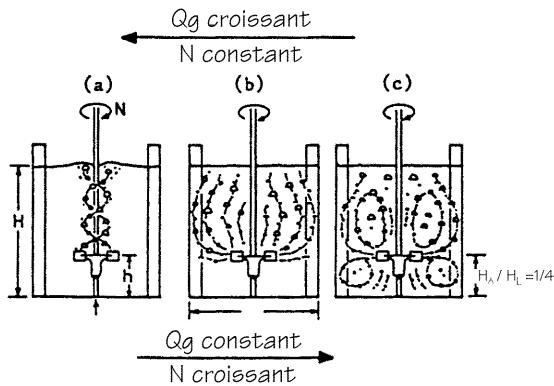


Figure 19 : Transitions pour une turbine Rushton ($H_L=D$) a) engorgement, b) point de charge, c) dispersion complète (Nienow, 1998)

La situation où l'écoulement gazeux domine est appelée l'engorgement (qui est une obstruction à l'écoulement du fluide suite à une accumulation de gaz). En général, on parle d'engorgement dans la situation décrite par le schéma (a) de la Figure 19, où l'air n'est pas dispersé dans l'ensemble du liquide mais s'écoule verticalement le long de l'axe à partir de son point d'injection. Cependant, on considère parfois que l'engorgement est déjà présent dans la situation (b) de la Figure 19 (ou dans d'autres situations intermédiaires non décrites ici). L'échelle du fermenteur modifie également la façon dont les choses évoluent. Tout cela explique les nombreuses corrélations que l'on peut trouver dans la littérature, en fonction de la définition retenue pour l'engorgement et de la taille du problème.

On a proposé par exemple la relation suivante pour les cuves de grande taille (van't Riet and Tramper, 1991) :

$$\frac{Q_g}{Nd^3} < 0.3 \frac{N^2 d}{g} \quad \text{ou} \quad Q_g < 0.3 \frac{N^3 d^4}{g} \quad (-) \quad (34)$$

où Q_g est le débit de gaz (m^3/s) et g l'accélération de la pesanteur (m/s^2).

Pour autant que les mobiles ne soient pas engorgés, le mélange en conditions aérées suit des lois similaires à celles établies en l'absence d'aération (Nienow, 1993). Il suffit de remplacer dans les corrélations la puissance ou le nombre de puissance mesuré en condition non aérée par l'équivalent avec aération (Nienow, 1997).

2.7.7. *Les méthodes de caractérisation du mélange*

Nous nous intéresserons dans le cadre de ce travail qu'aux méthodes physiques de mesure du macromélange, c'est-à-dire à l'échelle de la cuve ou du moins de la sonde dans un réacteur fonctionnant en mode discontinu.

Pour ce faire, on injecte un traceur inerte dans le système, et une ou plusieurs sondes mesurent une quantité qui est proportionnelle à la concentration en traceur (conductivité, absorbance, température). Le temps de mélange est alors l'intervalle de temps qui s'écoule entre l'injection et un écart fixé à l'homogénéité (Manna, 1997).

Le traceur utilisé doit répondre à certaines caractéristiques :

- il doit avoir des propriétés physiques proches de celles du fluide contenu dans la cuve;
- il ne doit pas interférer avec ce fluide;
- il doit être stable dans le temps (ne doit pas se modifier hors contrôle ou disparaître);
- le détecteur ne doit pas interférer avec le procédé.

À petite échelle, la méthode la plus utilisée est la méthode conductimétrique (van't Riet and Tramper, 1991). Elle est bon marché et fiable pour les systèmes monophasiques. L'inconvénient est qu'on ne peut que difficilement l'utiliser dans des systèmes contenant déjà une certaine concentration en sels (nécessaires pour obtenir un milieu non-coalescent). Une alternative peut être trouvée dans les méthodes de suivi d'absorbance (ou colorimétriques), pour autant que le milieu soit suffisamment transparent.

Pour les milieux de fermentation à grande échelle, on conseille plutôt la méthode par traceur radioactif ou pHmétrique (en prenant quelques précautions dans ce cas pour le calcul de l'intensité de mélange en interprétant le signal pH) (Cooke et al., 1988).

2.8. La modélisation d'une cuve agitée

La compréhension de l'hydrodynamique des fermenteurs peut se faire par une approche mécanistique, consistant en la résolution des équations de Navier et Stokes locales. Mais cette opération est très délicate en raison de la géométrie et des propriétés rhéologiques complexes des systèmes étudiés. C'est principalement pour cette raison qu'une approche systémique a été développée (Leclerc et al., 1995) dans le domaine de la fermentation. Cette approche, introduite pour la première fois par Danckwerts (Danckwerts, 1953), donne une représentation des écoulements non idéaux par des modèles constitués d'un agencement judicieux de modèles d'écoulements élémentaires bien définis, tels que l'écoulement piston et le mélange parfait. Ces *modèles compartimentés* ont depuis été utilisés pour représenter la dynamique intrinsèque des fluides au sein des réacteurs pour décrire les diverses situations de mélange imparfait (Reuss, 1993).

Appliqués à un réacteur agité (dont le fonctionnement tente de s'approcher du mélange parfait), ces modèles compartimentés se basent généralement sur l'assemblage de cuves parfaitement mélangées. Leur structure, c'est-à-dire la taille, le nombre et l'organisation des cuves, permet une représentation des différentes échelles de mélange (voir § 2.7.1) et de l'écoulement macroscopique (Mayr et al., 1994). La nature et l'intensité des échanges entre les compartiments (représentés par le sens et la grandeur des flux) permettent une représentation de la circulation du fluide dans le réacteur (par exemple les mouvements de circulation et de pompage secondaires). L'information macroscopique que renferme un essai de traceur est un outil de validation de ces modèles.

En mode opératoire continu, la construction des modèles est réalisée par l'interprétation des distributions de temps de séjour (DTS) expérimentales, obtenues sur un écoulement en régime permanent par injection d'un traceur approprié. Dans le cas d'un mode de fonctionnement discontinu, comme c'est le cas des fermentations qui font l'objet de cette étude, l'ajustement du modèle se fait sur l'évolution temporelle de la concentration du traceur en un point de la cuve (et non sur la DTS). La résolution des équations de bilan sur les différents compartiments qui constituent le modèle permet la détermination de ses paramètres.

Dans le cas des fermenteurs à plusieurs agitateurs, on peut assigner une cellule par mobile (indépendamment du type) (Nienow, 1998). Des modèles plus complexes, tenant compte de l'existence d'une zone de haute turbulence près du mobile suivie par une seconde zone plus calme lorsqu'on s'en écarte (Mayr et al., 1994; Shamlou et al., 1994), font intervenir un compartiment par mobile auquel sont ajoutées des cuves latérales, avec ou sans échange entre les différents étages (plus éventuellement des compartiments additionnels dans les boucles de circulation). Cette approche atteint cependant rapidement la situation où la complexité artificielle du modèle dépasse son utilité et où les paramètres trop nombreux n'ont plus aucune signification physique. Deux exemples sont proposés : un compartiment par mobile, avec des cuves latérales, sans (Figure 20) ou avec (Figure 21) échange axial entre les cuves latérales.

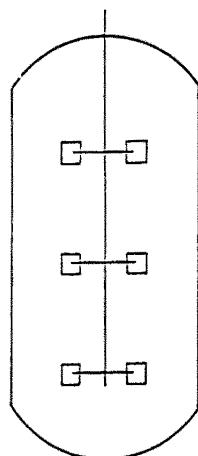


Figure 20 : Modèle compartimenté sans échange axial latéral (Nienow, 1998)

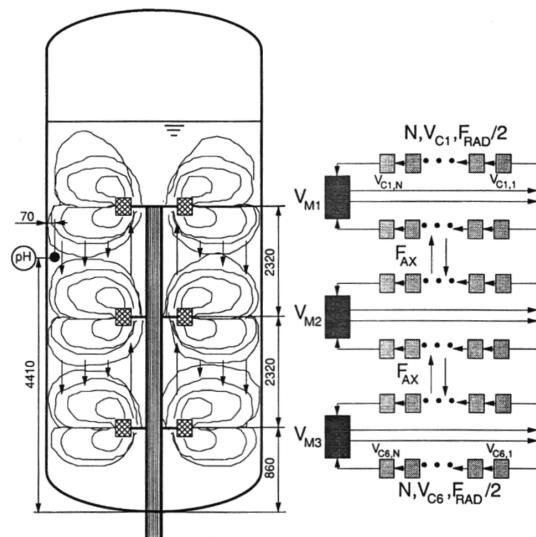


Figure 21 : Modèle compartimenté avec échange axial latéral(Mayr et al., 1994)

Dans le cas des écoulements multiphasés, on peut diviser les compartiments en plusieurs parties, et ensuite les assembler comme vu précédemment :

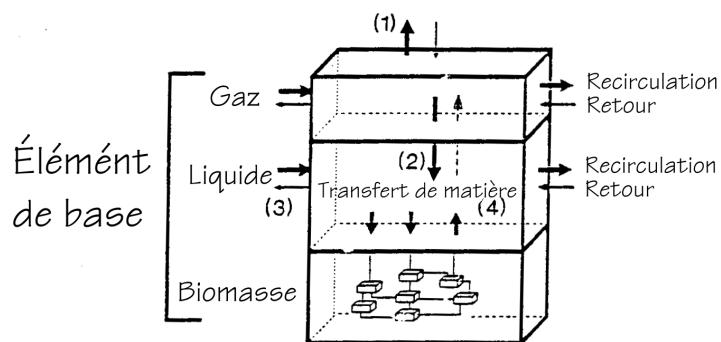


Figure 22 : Compartiment de modèle multiphasé (Reuss and Jenne, 1993)

Les modèles compartimentés sont capables de décrire l'influence de l'échelle, de la viscosité, de l'aération et de la vitesse d'agitation sur les performances des bioprocédés, tout en restant suffisamment simples que pour être implémentés sur des ordinateurs personnels standard. Un grand avantage de cette méthode est que la caractérisation du fonctionnement du fermenteur est basée sur des grandeurs opérationnelles (telles que la vitesse d'agitation) et géométriques (Mayr et al., 1994).

3. Matériel et Méthodes

3.1. Le fermenteur

Le fermenteur a été décrit dans sa globalité dans le *Chapitre I*.

Nous ne présentons ici qu'un schéma détaillé de la géométrie de la cuve et des mobiles.

3.1.1. La cuve

La hauteur de liquide correspondant à un volume utile de cinq litres est de $H_l = 305$ mm (cette hauteur mesurée tient compte de l'encombrement de l'axe, des mobiles, etc.). Le bas des bossages de 25 mm de diamètre est situé à 80 mm du fond et ils sont inclinés de 15° par rapport à l'horizontale (non représentés).

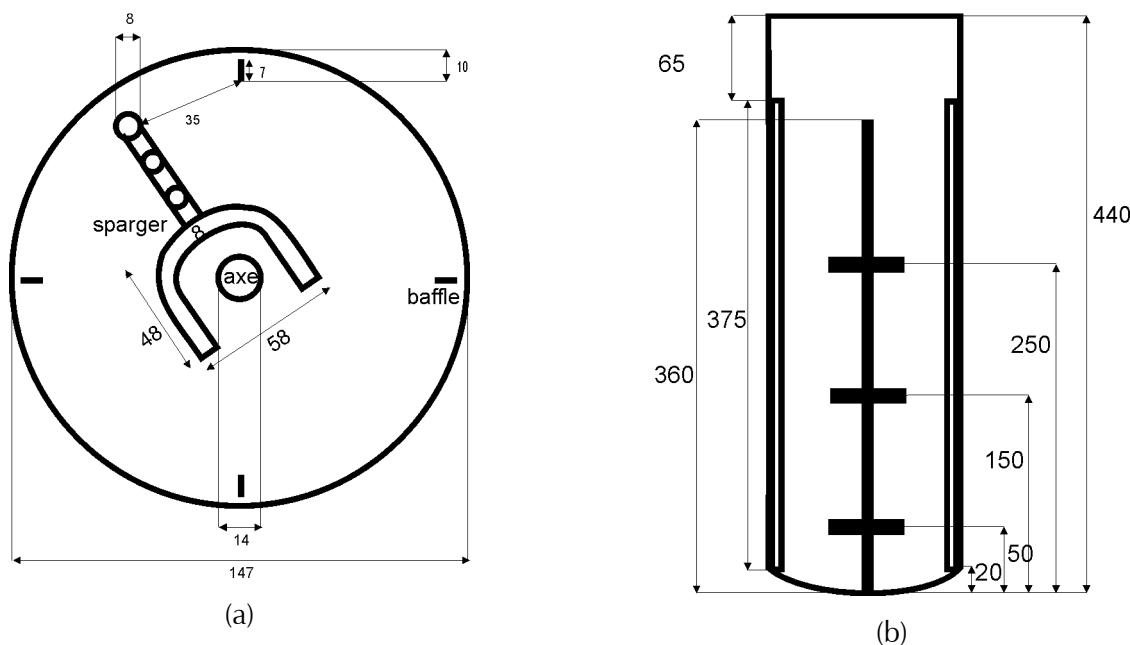


Figure 23 : Vue du haut (a) et de profil (b) du fermenteur (avec les turbines Rushton), cotes en mm

Le profil de l'injecteur d'air utilisé avec les Intermig est un peu différent afin de ne pas toucher les mobiles en rotation, et sa zone d'injection d'air est plus grande de façon à se situer sous les extrémités des palettes externes des Intermig.

Quel que soit le type de mobile, nous les avons disposés selon le schéma de droite de la Figure 23. Les turbines Rushton et les Intermig étaient donc placés aux même hauteurs sur l'arbre. Dans le cas des Intermig, chaque mobile est perpendiculaire à son voisin (les mobiles "1" et "3" sont donc parallèles).

3.1.2. *Les mobiles d'agitation*

Nous avons utilisé deux types de mobiles radiaux et axiaux-mixtes : les turbines Rushton et les Intermig.

3.1.2.1. Les mobiles radiaux

Les dimensions des turbines Rushton fournies par la société B. Braun ne sont pas aux dimensions standard. Les proportions sont les suivantes:

- $w/d = 14/56=0.25$ (standard)
- $L/d = 20/56=0.36$ (au lieu de 0.2)
- $d/D = 56/147=0.38$ (au lieu de 0.33)

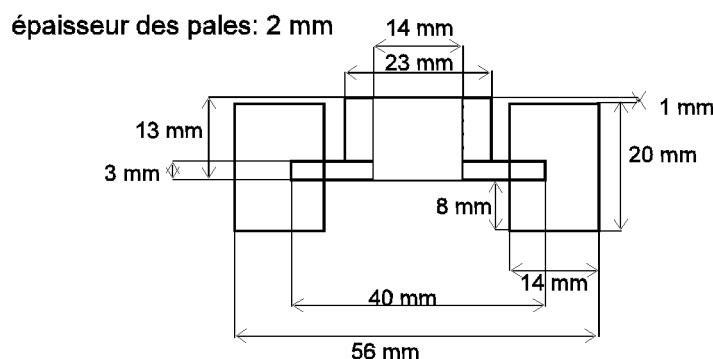


Figure 24 : Schéma coté d'une turbine Rushton

3.1.2.2. Les mobiles axiaux-mixtes

Les "Intermig" qui nous ont été fournis par la société B. Braun ne sont pas exactement conformes aux mobiles conçus par la firme Ekato. Malgré tout, l'allure générale et le principe de la pale inclinée (mais à 45°) par rapport à l'axe de rotation et prolongée par un élément courbe qui lui est perpendiculaire est conservé. L'épaisseur des pales et des palettes est de 3 mm, et leur hauteur projetée L est de 35 mm.

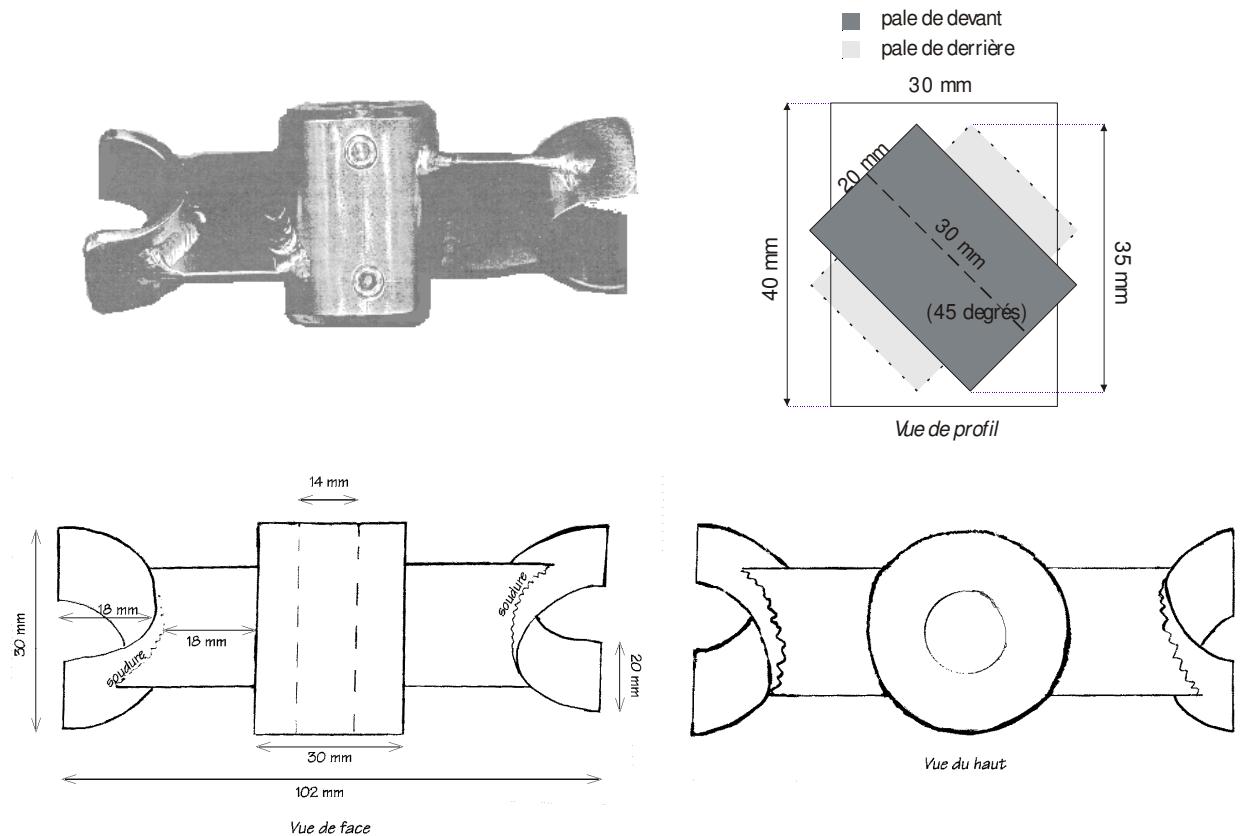


Figure 25 : Les Intermig

3.2. Le milieu artificiel

La nécessité de recourir à cet artifice a été expliquée au *Chapitre II*. Outre certaines mesures effectuées à titre comparatif dans l'eau ou dans des solutions de xanthane à diverses concentrations, les mesures de temps de mélange et de puissance ont été faites dans le milieu artificiel décrit dans le *Chapitre II*.

Sa composition est la suivante:

- xanthane 1.25 g/l
- K₂HPO₄ 2 g/l
- MgSO₄.7H₂O 0.6 g/l
- antimousse Goldschmidt (quelques gouttes)

Le pH de la solution n'est pas corrigé et vaut environ 7.1. La température est maintenue à 20°C.

La solution est préparée en deux étapes :

1. Les sels sont ajoutés à un litre d'eau préalablement chauffée (environ 2 minutes au four à micro-ondes), dans un Berlin agité par une puce magnétique. À la vitesse maximale de rotation, un vortex

se forme jusqu'au fond du récipient. Le xanthane est alors saupoudré lentement sur la "pente" du vortex. Cette façon de procéder permet d'éviter la formation de grumeaux qui ne se redissolvent pas. Après environ ½ heure d'agitation, la solution est devenue homogène (le xanthane s'est hydraté et dissous). La disparition du vortex témoigne de l'augmentation de la viscosité.

2. Le contenu du Berlin est alors ajouté à 1.5 litres d'eau dans le fermenteur agité à 300 rpm pour les turbines Rushton ou 127 rpm pour les Intermig. Le reste de l'eau (2.5 litres) sert à rincer la puce et le Berlin de préparation avant d'être ajouté. On ajoute l'antimousse, puis la solution est thermostatisée à 20°C.

Cette solution non-newtonienne a une viscosité qui répond à une loi en puissance $\tau = K\dot{\gamma}^n$ dont les paramètres valent (voir *Chapitre II*) :

- $K = 0.17 \text{ Pa.s}^n$
- $n = 0.4 \text{ (-)}$

et elle a une densité de 1004 kg/m³ (en négligeant la variation de volume due à l'ajout des sels).

La vitesse de rotation est progressivement amenée à la valeur à laquelle la mesure doit être faite. Un passage trop brusque de la vitesse "de préparation" à une vitesse beaucoup plus élevée se traduit par une violente incorporation d'air dans la solution, la rendant opaque et (très) moussante.

3.3. La caractérisation du mélange

3.3.1. *Le traceur colorimétrique*

Le mélange de la cuve est caractérisé par la méthode colorimétrique. L'avantage de cette méthode est qu'on peut l'utiliser dans un milieu contenant des sels.

Nous avons utilisé comme traceur colorimétrique de la rhodamine wt, de couleur rose. L'absorbance est mesurée à 550 nm par un spectrophotomètre Metrohm 662. La sonde a une longueur de 10 mm entre la fenêtre où arrivent les fibres optiques et le miroir. Elle est positionnée dans un bossage de 25 mm servant à l'insertion des sondes lors des fermentations (soit à 80 mm du fond de la cuve), c'est-à-dire un peu au-dessus du mobile inférieur. L'absorbance (ou l'extinction lumineuse) étant proportionnelle la concentration (dans la gamme 0-0.8), on obtient une réponse linéaire entre le signal enregistré et la concentration en traceur à l'emplacement de la sonde.

Le traceur est injecté à la surface du liquide au moyen d'une seringue (pour obtenir un **pulse** aussi proche que possible d'une Dirac). Le volume injecté est d'environ 0.8 ml de solution colorée. Aux vitesses de rotation faibles à moyennes, il n'y a pas trop d'incorporation superficielle d'air et deux essais successifs peuvent être effectués dans la même cuve aux vitesses faibles ou moyennes. Il suffit de remettre l'absorbance à zéro. Aux grandes vitesses, la turbidité de départ est trop importante que pour effectuer ensuite une remise à zéro. Cette turbidité est due à la présence de très petites bulles (les sels rendent le milieu non coalescent) qui donnent un aspect laiteux à la solution.

3.3.2. **L'acquisition des données**

Le spectrophotomètre a un signal de sortie de 0 à 1 volt. Ce signal est amplifié $5\times$ et enregistré sur PC (486, 40 MHz, Windows 3.1) via une carte d'acquisition et le logiciel Labview (National Instrument). L'acquisition est déclenchée par l'expérimentateur en même temps qu'il injecte le traceur, et arrêtée manuellement. La fréquence de l'acquisition a été fixée à 0.1 seconde entre deux points. Cet intervalle de temps étant légèrement inférieur aux performances du logiciel tel que configuré et de l'ordinateur, cela permet d'avoir la fréquence d'échantillonnage maximale (dès qu'il le peut, le logiciel enregistre un point). On obtient un fichier comprenant deux colonnes : le temps de l'acquisition et le signal en volts, directement exploitable dans un tableur (de type Excel) ou par tout autre traitement numérique (par exemple Matlab).

3.4. La mesure de la puissance

Les mesures de puissance ont également été effectuées dans le milieu artificiel pour des raisons de facilité de manipulation. Les courbes de puissance mesurées dans des cultures d'*Amycolatopsis mediterranei* (une bactérie filamentuse) ont montré des tendances et valeurs similaires à celles rapportées pour d'autres milieux industriels ou par des milieux simulés par des solutions de xanthane dans les mêmes configurations d'agitation (Velasco et al., 1994).

La puissance dissipée est mesurée selon la méthode du torquemètre (voir §2.6.5.1). Dans ce but, la cuve est découpée de son moteur (le joint mécanique est enlevé et remplacé par un simple bouchon) et placée sous le dispositif représenté à la Figure 26. Nous avons utilisé un arbre de même diamètre que celui d'origine, sur lequel les mobiles ont été installés dans la même position que celle qu'ils occupent lors des fermentations. Le nouvel arbre est couplé par un mandrin à un moteur monté sur un roulement

à billes. Lorsqu'on agite la solution, le moteur a tendance à tourner en sens opposé à celui de l'agitateur. Un bras de force relié à un capteur de force permet de mesurer directement la force nécessaire pour arrêter ce déplacement et permet ainsi une mesure du couple appliqué au milieu en multipliant cette force par la distance à l'axe.

- Moteur : 186 W, 0 à 1000 rpm
- Bras de force (à partir de l'axe) : 72 mm

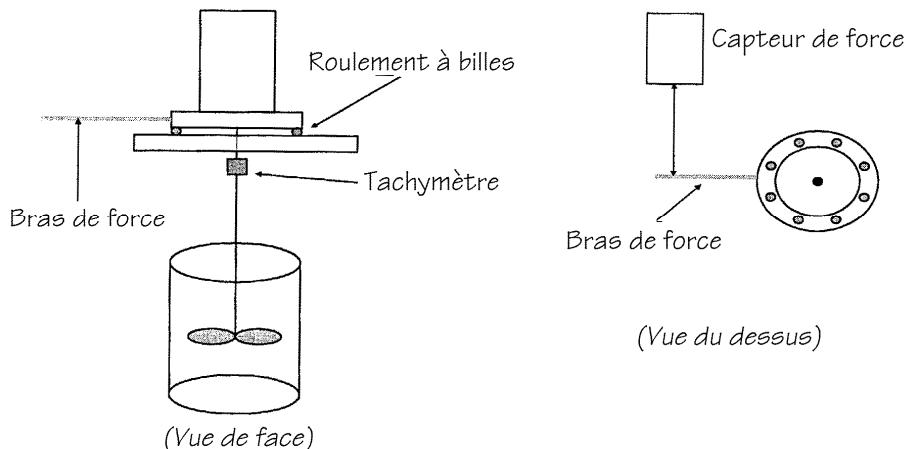


Figure 26 : Mesure de puissance

La vitesse du moteur est réglée mécaniquement par une roulette graduée. Un étalonnage a été réalisé, établissant une relation linéaire entre la vitesse de rotation et les graduations.

3.5. La modélisation

Tout comme pour l'ajustement en loi en puissance présenté au *Chapitre II*, nous avons utilisé le logiciel Matlab (version 5.3, MathWorks Inc.) pour effectuer nos ajustements paramétriques. La routine d'ajustement utilise la fonction *lsqcurvefit* qui permet de résoudre des problèmes d'ajustements paramétriques non linéaires par la méthode des moindres carrés. Les écarts types sur les paramètres sont calculés en utilisant l'estimation de la matrice de covariance des paramètres calculée à partir du Jacobien évalué aux valeurs de convergence de l'algorithme (Froment and Bischoff, 1979). Le listing du programme d'ajustement se trouve en *Annexe III.1*, avec comme exemple le modèle que nous avons finalement retenu. Le système d'équations différentielles de bilan de matière sur les compartiments a été résolu par la routine de résolution numérique de type Runge-Kutta (2,3) (routine *ode23*) qui ne nécessite la connaissance de la solution qu'au point précédent.

4. Résultats

4.1. Les conditions expérimentales et hydrodynamiques

Pour rappel (voir *Chapitre I*), nous avons choisi d'utiliser la vitesse périphérique des pales comme grandeur de référence. Les turbines Rushton et les Intermig ayant des diamètres de 56 mm et 102 mm, on obtient les vitesses de rotation équivalentes et les vitesses périphériques correspondantes :

Tableau 8 : Conditions expérimentales

Turbines Rushton	Re (turbines Rushton)	Intermig	Re (Intermig)	Vitesse périphérique
300 rpm (5 s ⁻¹)	927	165 rpm (2.75 s ⁻¹)	1494	0.88 m/s
450 rpm (7.5 s ⁻¹)	1773	247 rpm (4.12 s ⁻¹)	2849	1.32 m/s
600 rpm (10 s ⁻¹)	2810	329 rpm (5.48 s ⁻¹)	4507	1.76 m/s
900 rpm (15 s ⁻¹)	5376	494 rpm (8.23 s ⁻¹)	8636	2.64 m/s

Le nombre de Reynolds dans le milieu artificiel (voir composition au §3.2) est calculé selon la formule:

$$Re = \frac{\rho N^{2-n} d^2}{K k_s^{n-1}} \left(\frac{4n}{3n+1} \right)^n \quad (\text{présentée au § 2.4.1}) \quad \text{selon la méthode de la viscosité apparente (Calderbank}$$

and Moo-Young, 1959; Calderbank and Moo-Young, 1961; Moo-Young and Blanch, 1981) :

$$\mu_a = \frac{K}{(k_s N)^{1-n}} \left(\frac{3n+1}{4n} \right)^n = K(k_s N)^{n-1} \left(\frac{3n+1}{4n} \right)^n \quad (\text{pour } n < 1)$$

où k_s vaut 11.5 pour les turbines Rushton (valeur moyenne des différents auteurs) et 17 pour les Intermig (Tableau 1). L'index de consistance K vaut 0.17 et l'index de comportement n vaut 0.4 (à 20°C).

En remplaçant les constantes par leur valeur, on obtient (N étant exprimé en s⁻¹) :

- pour les turbines Rushton : $\mu_a = 0.0446 * N^{-0.6}$ (Pa.s)
(soit une viscosité variant de 0.0088 Pa.s à 900 rpm à 0.0170 Pa.s à 300 rpm)
- pour les Intermig : $\mu_a = 0.0353 * N^{-0.6}$ (Pa.s)
(soit une viscosité variant de 0.0100 Pa.s à 494 rpm à 0.0192 Pa.s à 165 rpm)

Dans tous les cas, nous sommes en régime intermédiaire ou turbulent (tous les auteurs ne sont pas d'accord pour la limite). On constate que pour une même vitesse périphérique, les Intermig provoquent un écoulement plus turbulent (sur base du nombre de Reynolds) que les turbines Rushton.

4.2. Les essais de traceur dans le fermenteur en conditions non aérées

Étant donné le manque de précision de la "synchronisation manuelle" des opérations injection-acquisition, nous avons supprimé pour tous les essais de traceur le délai qui apparaît avant la montée de la courbe (il variait pour des essais dans les mêmes conditions alors que leur allure était comparable pour le reste de la courbe). Ce retard représente à la fois le temps que met le traceur pour arriver à la sonde (qui fait partie du processus de mélange) et les réflexes de l'opérateur. Ce dernier facteur n'étant ni mesurable ni reproductible, il rendait impossible une interprétation correcte du retard en terme de trajet du colorant ou de circulation.

Les concentrations en traceur ont été normées par la concentration d'équilibre pour obtenir un signal relatif compris dans l'intervalle [0, 1]. Considérant que la durée de l'essai était suffisamment longue pour avoir atteint l'homogénéité (contrôle visuel de la stabilité de la concentration dans le programme d'acquisition), nous avons calculé la concentration d'équilibre $C(\infty)$ en faisant la moyenne sur les 50 derniers points.

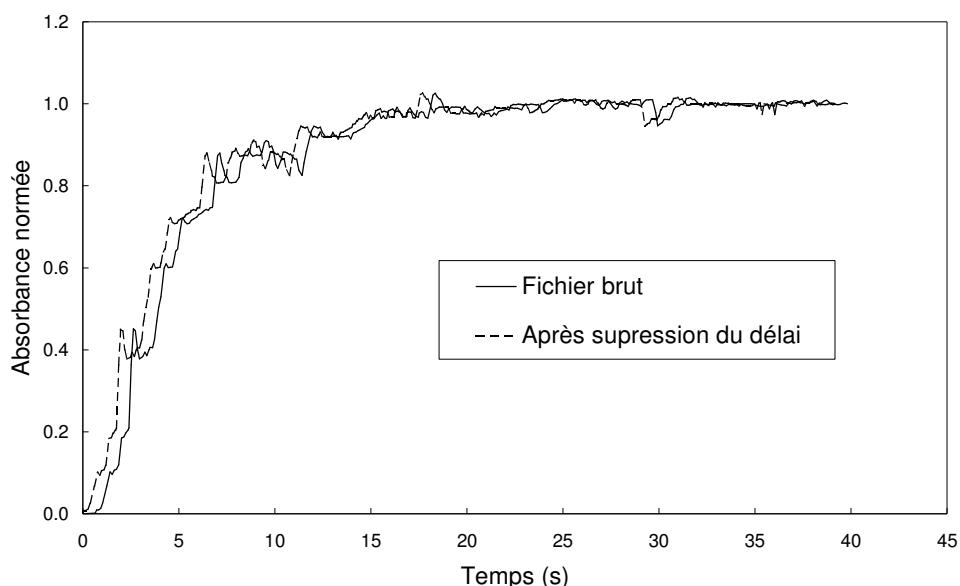


Figure 27 : Essai de traceur à 300 rpm (turbines Rushton) avant et après suppression du délai

Tous les essais de traceurs ont été répétés plusieurs fois. La bonne reproductibilité est illustrée par la Figure 28, où on peut constater que faire la moyenne de ces trois essais revient en fait à les lisser par un filtre passe-bas. Les fluctuations aléatoires disparaissent.

Nous avons mesuré l'intervalle de temps entre deux pics en espérant obtenir des informations sur des boucles de circulation éventuelles, mais aucune reproductibilité au sein d'une courbe ou d'une même série de courbes n'a pu être décelée, pas plus qu'une évolution selon les conditions d'agitation. Ces fluctuations n'ont donc pas pu être exploitées pour en retirer une information directe sur la circulation du fluide. La présence de ces pics illustre bien le caractère aléatoire des macro-tourbillons, ainsi que la perturbation due à l'aération superficielle.

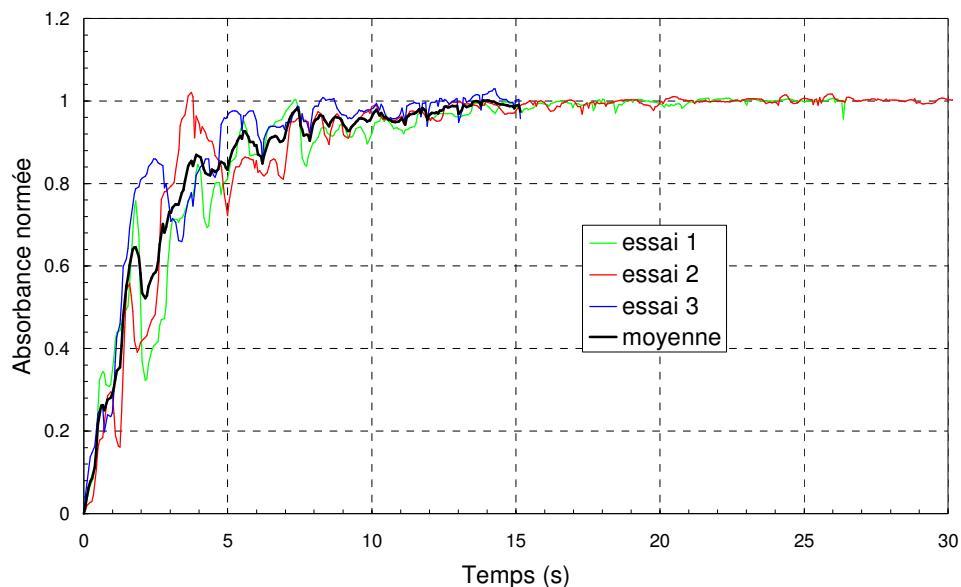


Figure 28 : Reproductibilité des mesures (turbines Rushton, 450 rpm, xanthane 1g/l)

Les traitements des différentes mesures ont dès lors été fait sur les courbes moyennes de chaque type d'essai.

4.2.1. *L'influence de la concentration en xanthane*

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la viscosité du milieu sur le mélange en faisant varier la concentration en xanthane. Ces essais ont été faits avec les turbines Rushton à 450 rpm :

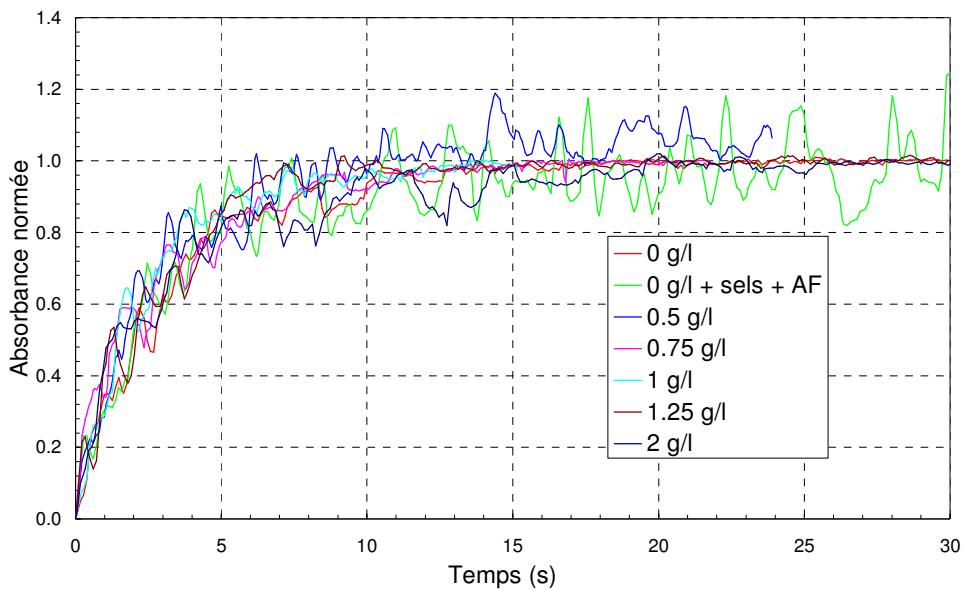


Figure 29 : Influence de la concentration en xanthane (turbines Rushton, 450 rpm)

On constate sur la Figure 29 que la concentration en xanthane, qui modifie la viscosité et le comportement de la solution, n'a guère d'influence sur l'évolution de la courbe de traceur. Dans la gamme de concentration de 0 à 2 g/l couverte, la viscosité varie de 0.00097 Pa.s à 0.0263 Pa.s, soit d'un facteur 27. La viscosité est calculée selon l'expression de la viscosité apparente (voir § 4.1), avec les index de comportement et de consistance (de la loi en puissance) qui varient respectivement de 0.00097 à 0.455 pour K et 1 à 0.33 pour n pour des concentrations en xanthane de 0 à 2 g/l (voir Chapitre II). Bien que non négligeable, la gamme de variation de la viscosité ne semble pas suffisante pour créer des différences marquées.

La concentration en xanthane qui a été fixée pour l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur devait refléter le comportement de la fermentation à un instant précis de son déroulement. La faible influence de la viscosité nous permettra ainsi d'étendre la validité des résultats obtenus avec cette concentration aux phases antérieures de la fermentation où le milieu est moins visqueux.

4.2.2. L'influence des conditions d'agitation

Les courbes de traceur moyennes obtenues pour les différentes vitesses de rotation avec les turbines Rushton sont présentées à la Figure 30.

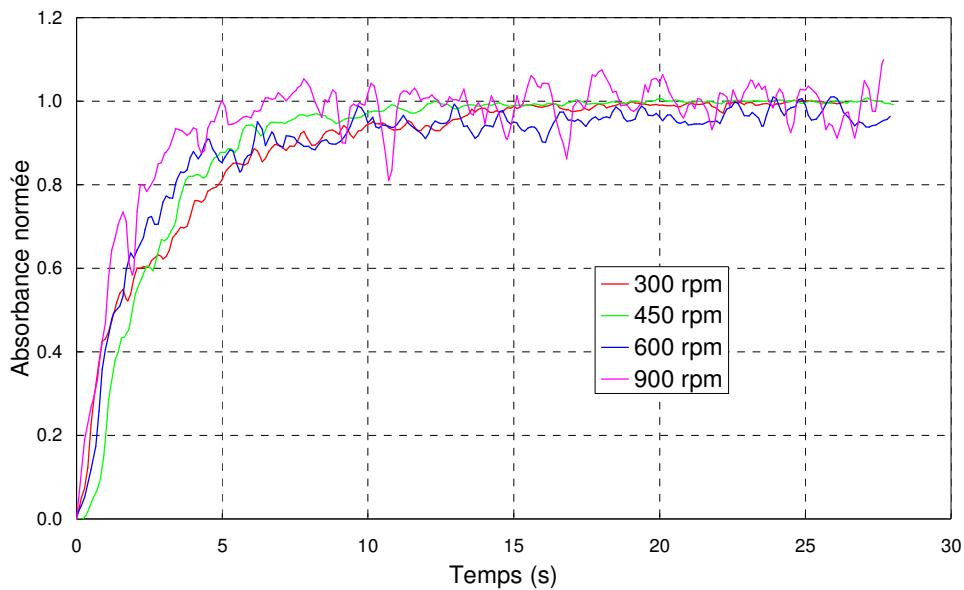


Figure 30 : Essais de traceur avec les turbines Rushton

On a de la même façon pour les Intermig (Figure 31) :

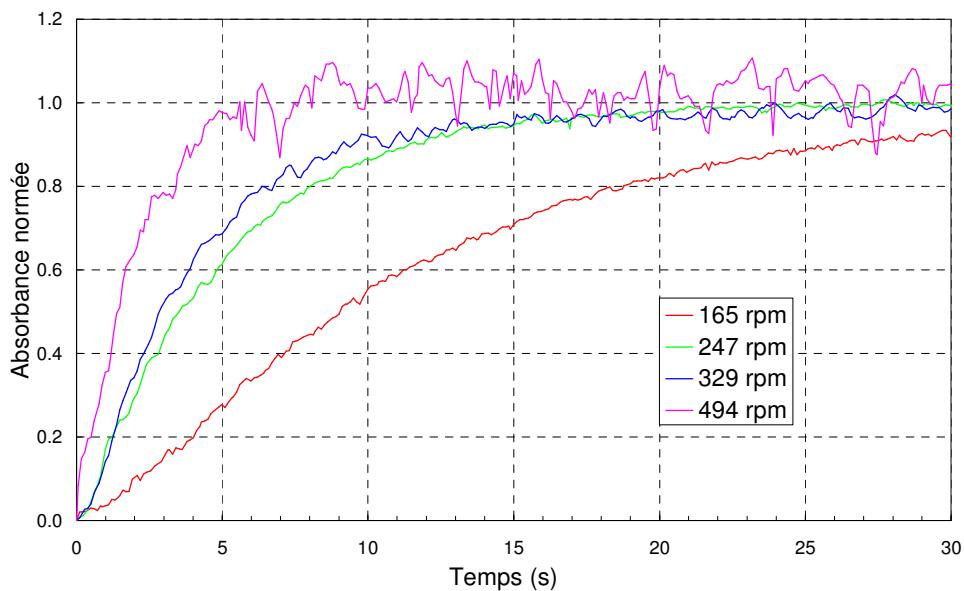


Figure 31 : Essais de traceur avec les Intermig

En réunissant les résultats obtenus avec les deux mobiles, on obtient la Figure 32 :

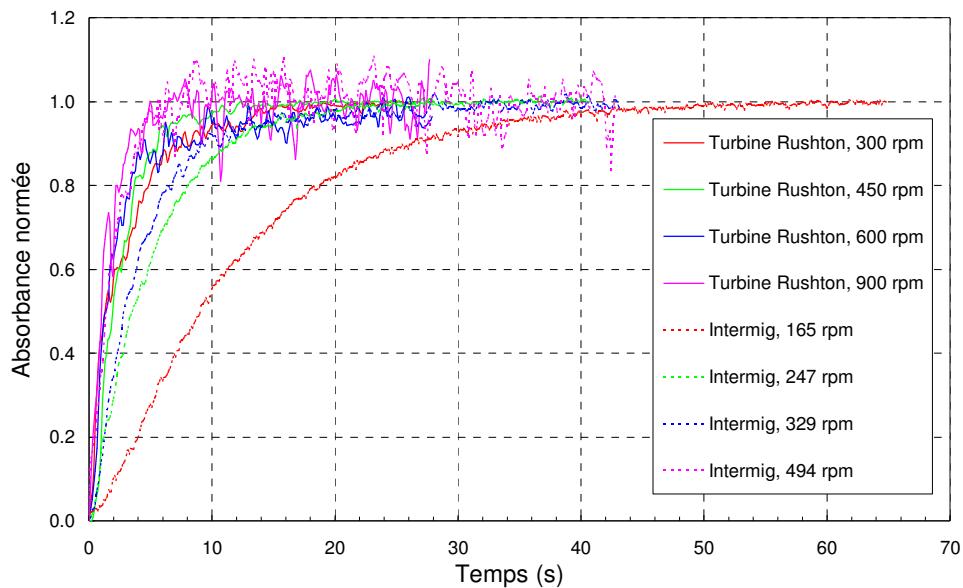


Figure 32 : Comparaison des essais de traceur avec les turbines Rushton et les Intermig

Quel que soit le mobile, la réponse du système se rapproche de la fonction échelon (qui correspondrait au mélange instantané d'un réacteur idéal discontinu parfaitement mélangé) lorsqu'on augmente la vitesse de rotation. Toutefois, cet état n'est pas atteignable et on tend en fait vers une asymptote : au-delà de ce point, tout apport supplémentaire d'énergie est dissipé en chaleur sans être utilisé pour le mélange et n'améliore donc pas les performances. Ce phénomène peut être dû au fait que le mouvement primaire (rotationnel) du fluide autour du mobile consomme de l'énergie mais n'est pas utile au mélange (qui découle du brassage dû aux mouvements secondaires). Quelle que soit la puissance injectée dans le fermenteur, on aura toujours une borne minimale au temps de mélange qui ne pourra être dépassée, rendant impossible un mélange instantané du fluide.

À vitesse périphérique égale, les turbines Rushton ont une capacité de mélange supérieure à celle des Intermig. Cette différence diminue avec l'augmentation de la vitesse de rotation pour devenir quasi inexistante à 900 rpm (pour les turbines Rushton) ou 494 rpm (pour les Intermig).

À vitesse de rotation égale, on observe deux tendances :

- aux faibles vitesses , les turbines Rushton (à 300 rpm) mélagent plus efficacement que les Intermig (à 329 rpm);
- cette différence diminue pour disparaître aux vitesses supérieures (la courbe des Intermig à 494 rpm rejoint la montée de celle des turbines Rushton à 600 rpm).

Bien que les Intermig à 165 rpm aient un Re proche des turbines Rushton à 450 rpm, ils provoquent un mélange beaucoup plus doux et progressif. La turbulence telle que décrite par le nombre de Reynolds ne suffit donc pas à caractériser le mélange (ou du moins sa rapidité). Une explication peut être trouvée dans les différences de répartitions de dissipation de l'énergie entre ces deux mobiles telles que montrées à la Figure 8 (§ 2.5.3). Les turbines Rushton présentent des zones d'énergie locale élevée (favorables à la dispersion du colorant) alors que les Intermig brassent le liquide de façon plus douce et plus homogène. On observe ainsi avec les turbines Rushton un bruitage des courbes beaucoup plus important que pour celles obtenues avec les Intermig.

4.3. Les essais de traceur dans le fermenteur en conditions aérées

Les essais ont été effectués à 1 vvm (volume d'air par volume de fermenteur et par minute) qui est le débit d'aération utilisé lors des fermentations (5 litres par minute ou $8.33 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$). Selon la relation (34) (§2.7.6), le débit de gaz maximum pour éviter l'engorgement pour les turbines Rushton à 300 rpm serait de 2.3 l/min et pour les Intermig à 165 rpm de 4.1 l/min. Or l'observation visuelle (tant latérale par le hublot que par le haut de la cuve) montrait une bonne dispersion du gaz dans l'ensemble du fermenteur. On notera que cette relation (proposée pour les grands fermenteurs) ne faisait intervenir ni la viscosité ni la tension superficielle, ce qui peut expliquer ses limites. Nous ferons l'hypothèse dès lors que le fermenteur fonctionnait sans engorgement.

Les essais de traceur avec une aération de 1 vvm ont posé d'importants problèmes de moussage, du fait du caractère non coalescent lié à la présence de sels (malgré une montée progressive du débit d'air injecté). Dès l'ajout du colorant, qui modifiait la tension superficielle, une abondante mousse se formait et débordait, et même un ajout massif d'antimousse ne parvenait pas à la maîtriser. Un autre problème était le piégeage du colorant dans la mousse, avec un relargage progressif qui rendait impossible l'analyse du signal par la méthode que nous avions choisie, l'injection de traceur n'étant plus une impulsion de Dirac (ce problème n'était pas résolu par l'injection du colorant sous la surface du liquide). Nous obtenions un signal qui n'atteignait pas de concentration d'équilibre mais continuait à augmenter même après un temps très long.

Nous n'avons réussi à obtenir qu'un seul signal exploitable, que nous présentons à titre indicatif. Il s'agit d'un essai à 247 rpm avec les Intermig.

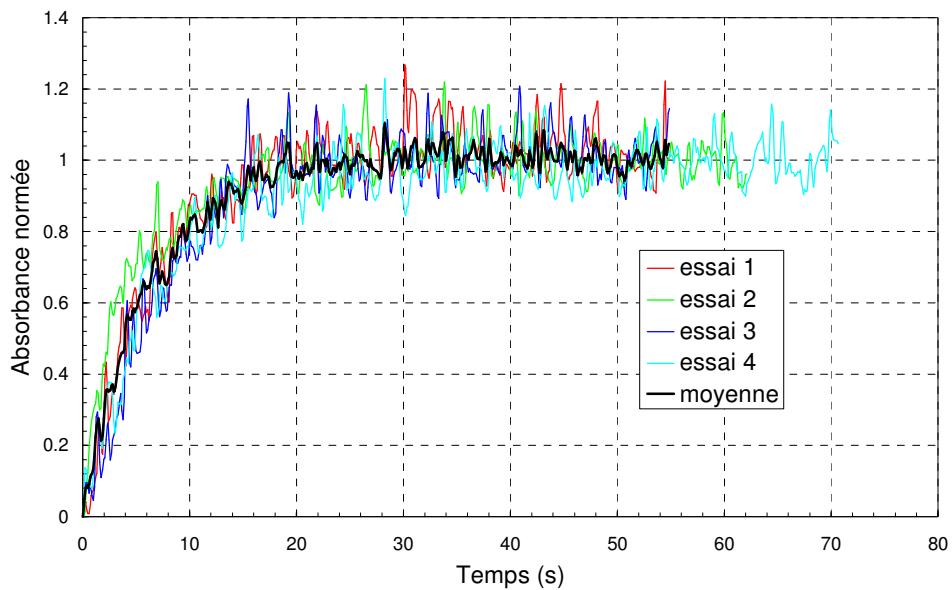


Figure 33 : Essai de traceur avec les Intermig à 247 rpm et injection d'air à 1 vvm

Le signal est beaucoup plus bruité que celui des essais sans aération du fait de la présence des bulles. Cependant, il n'y a pas de grande différence entre les signaux avec et sans aération (voir Figure 34), si ce n'est une courbure un peu moins prononcée (qui entraînera un temps de mélange un peu plus lent, voir §4.6). Les conclusions que nous tirerons de l'étude des essais de traceur en conditions non aérées resteront donc valables en conditions aérées (qualitativement au moins).

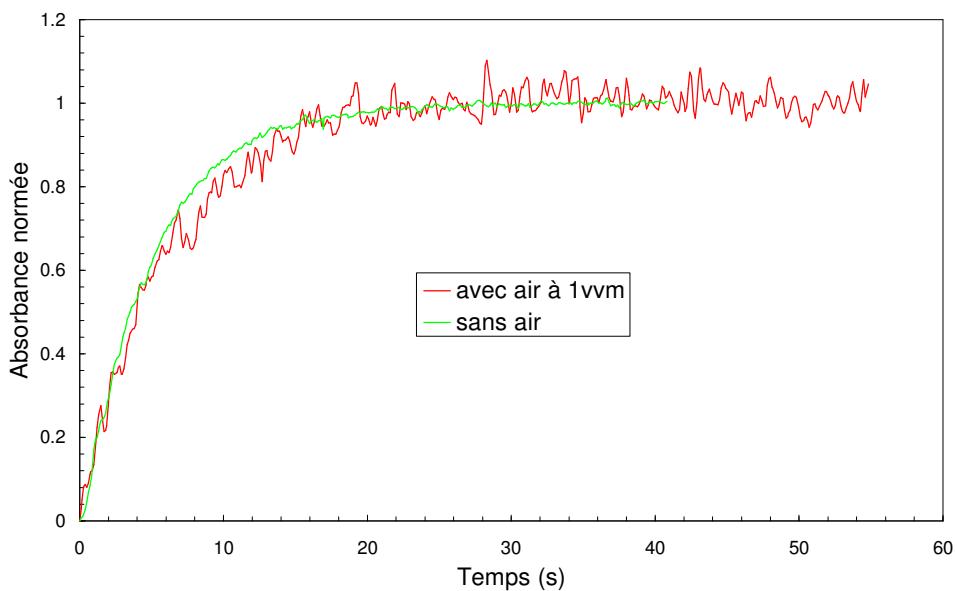


Figure 34 : Comparaison des essais de traceur avec les Intermig à 247 rpm avec et sans aération

4.4. La mesure de la puissance consommée

Nous avons fait tourner le moteur et les mobiles dans l'air pour mesurer le couple à vide. Celui-ci était inférieur à la limite de détection évaluée à 0.01 W. Les mesures effectuées représentent donc la puissance nette consommée par le dispositif d'agitation.

4.4.1. La puissance volumique sans aération

Les graphiques suivants montrent la puissance volumique dissipée P/V (W/l) en fonction de la vitesse

d'agitation et du nombre de Reynolds ($Re = \frac{\rho N^{2-n} d^2}{Kk_s^{n-1}} \left(\frac{4n}{3n+1} \right)^n$, présenté au § 2.4.1) :

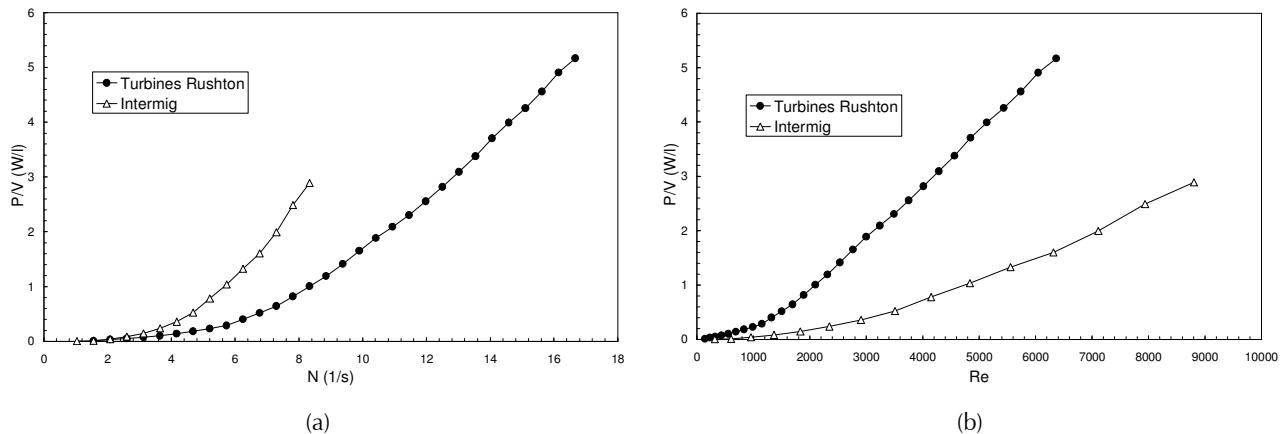


Figure 35 : Puissance volumique (W/litre) en fonction (a) de la vitesse de rotation et (b) du nombre de Reynolds

Les puissances volumiques que nous avons mesurées sont de l'ordre de grandeur généralement annoncé de 1 W/l pour les fermenteurs.

À même vitesse de rotation, la puissance volumique consommée par les Intermig est supérieure à celle consommée par les turbines Rushton. Ceci s'explique aisément par le fait de leur grand diamètre : leur moment d'inertie est supérieur à celui des turbines Rushton et une plus grande puissance est nécessaire pour les mettre en rotation.

Par contre, à même nombre de Reynolds, c'est l'inverse qui se produit. Ceci est également dû à la différence de diamètre des mobiles : une même vitesse de rotation correspondent des nombres de Reynolds beaucoup plus grands pour les Intermig que pour les turbines Rushton (voir Tableau 8). Pour

un même degré de turbulence (tel que décrit par le nombre de Reynolds), les Intermig nécessitent moins de puissance que les turbines Rushton.

4.4.2. *Le nombre de puissance sans aération*

Le nombre de puissance Np est calculé à partir de la mesure de la puissance (voir §2.6.1) :

$$Np = \frac{P}{\rho N^3 d^5} \quad (\text{W}) \quad (35)$$

L'allure des courbes expérimentales présentées à la Figure 36 correspond aux données de la littérature (Figure 9 au §2.6.2). Une comparaison quantitative n'est pas possible car la configuration de notre système est fort différente de celles correspondant à ces données. Conformément à leur appellation de "mobiles à faible nombre de puissance", les Intermig ont pour un même nombre de Reynolds un nombre de puissance inférieur à celui des turbines Rushton.

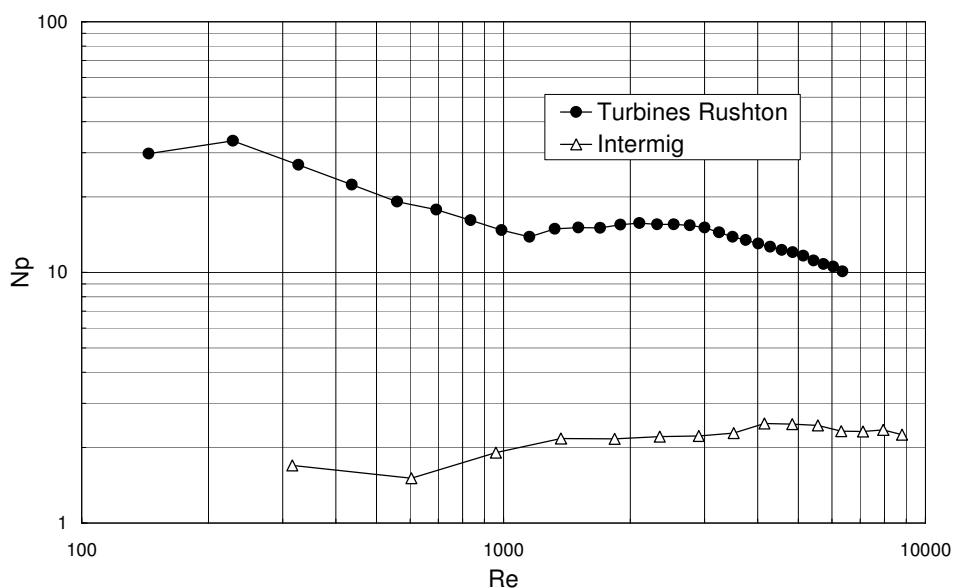


Figure 36 : Nombre de puissance sans aération Np en fonction du Re

- **Turbines Rushton :**

On observe la succession d'une zone en régime intermédiaire (où le nombre de puissance diminue lorsque le nombre de Reynolds augmente) et d'une zone turbulente où le nombre de puissance est constant (moyenne calculée sur les points pour lesquels le Re est compris entre 1000 et 3000) :

$$Np = 15.3 \pm 0.3$$

Cette valeur est très proche de celle annoncée pour trois turbines Rushton sur un même arbre, à savoir 14.7 ± 0.2 (voir Tableau 5 au § 2.6.2).

Pour des $Re > 3000$, le nombre de puissance diminue au lieu de rester à cette valeur constante. Cette décroissance du nombre de puissance peut s'expliquer par l'entraînement de gaz aux grandes vitesses de rotation (l'incorporation d'air fait chuter la puissance dissipée). En effet, le phénomène d'aspiration superficielle de gaz depuis le ciel de la cuve vient souvent compliquer l'interprétation des phénomènes hydrodynamiques. Si la circulation du liquide est suffisamment rapide, les bulles formées à proximité de la surface du liquide par les petits vortex locaux sont entraînées au sein de la solution agitée. Ce phénomène est d'autant plus important que les dimensions de la cuve sont petites. Pour qu'il soit négligeable, il faudrait que le volume de liquide soit au moins égal à 250 litres (Bruxelmane, 1979). Sinon l'aération de surface peut faire chuter le nombre de puissance même sans injection directe d'air pour des Re supérieurs à $2 \cdot 10^5$ (Amanullah et al., 1998; Velasco et al., 1994).

- **Intermig** : on ne distingue pas vraiment de zone laminaire linéaire (le matériel ne permettait pas de mesurer des couples à des vitesses inférieures). Par contre, la zone turbulente, où la valeur du nombre de puissance est constante, est bien marquée ($Re > 1000$), sans la diminution due à l'incorporation d'air (comme observé avec les turbines Rushton) :

$$\text{Np} = 2.3 \pm 0.1$$

(moyenne calculée sur les points pour lesquels $Re > 1000$).

La valeur mesurée est nettement inférieure à celle des turbines Rushton mais elle est beaucoup plus importante que celle annoncée de 0.84 pour trois Intermig sur le même arbre (voir Tableau 5 au § 2.6.2) ou les autres valeurs du même ordre de grandeur annoncées pour un ou deux mobiles. Cette différence peut être due au fait que nos mobiles ne sont pas de "vrais" Intermig, mais une libre interprétation de la firme B. Braun. Ils sont beaucoup plus massifs que les modèles originaux créés par la firme Ekato, avec notamment des pales primaires très larges, ce qui augmente leur section latérale apparente, et un gros manchon de fixation sur l'axe. Leur épaisseur de 3 mm augmente encore leur masse et leur résistance à l'écoulement (et par conséquent la puissance nécessaire pour les mettre en mouvement). De plus, leur espacement est identique à celui des turbines Rushton (fixé par la géométrie du fermenteur) et est donc relativement beaucoup plus faible surtout si on tient compte de la hauteur des mobiles : l'espace de 100 mm entre le centre des mobiles correspond en fait à un espace libre de 60 mm (soit presque la moitié du diamètre des Intermig).

Ces mesures ont été comparées avec les valeurs du nombre de puissance telles que calculées par des corrélations empiriques présentées au § 2.6.3 et en considérant l'additivité des mobiles, c'est-à-dire que $(Np)_n = n * Np$:

a) La relation $Np = 2.5 \left(\frac{x_d}{d} \right)^{-0.2} \left(\frac{D}{D_0} \right)^{0.065}$ (19) proposait de tenir compte de la géométrie et de l'épaisseur du disque du mobile x_d :

- turbines Rushton : $Np(1 \text{ mobile}) = 2.5 \left(\frac{0.003}{0.056} \right)^{-0.2} \left(\frac{0.147}{1} \right)^{0.065} = 3.96 \Rightarrow Np(3 \text{ mobiles}) = 11.9$
- Intermig : $Np = 2.5 \left(\frac{0.003}{0.102} \right)^{-0.2} \left(\frac{0.147}{1} \right)^{0.065} = 4.5 \Rightarrow Np(3 \text{ mobiles}) = 13.5$

La relation donne des résultats proches des mesures pour les turbines Rushton mais ne s'applique pas aux mobiles de type Intermig : la valeur calculée est 6 fois plus grande que la valeur mesurée. Cette constatation est sans doute valable pour les autres mobiles axiaux – axiaux/mixtes à faible nombre de puissance.

b) Pour une turbine Rushton à 6 pales, on a $Np = 160 \frac{wL(d-w)}{d^3}$ (20) où L est la hauteur de la pale, w

sa largeur et d le diamètre du mobile :

$$Np = 160 \frac{0.014 * 0.020 * (0.056 - 0.014)}{0.056^3} = 10.71 \Rightarrow Np(3 \text{ mobiles}) = 32.13$$

(on notera que pour une turbine Rushton standard dont la hauteur vaudrait 11.2 mm pour un diamètre de mobile de 56 mm, on retrouve bien la valeur $Np = 6$). Cette relation n'est vraiment applicable que dans le cas de configuration standard.

Ces corrélations ne semblent applicables que pour des mobiles de type turbines Rushton dont la géométrie respecte les proportions standard. Ces deux exemples illustrent la sensibilité de la puissance consommée et du nombre de puissance qui lui est associé au type de mobile, à sa géométrie, et à la géométrie générale du système complet. Un modèle prédictif général de la puissance consommée en fonction des conditions d'agitation ne semble pas actuellement réalisable. Trop de variables entrent en jeu, que ce soit la géométrie des mobiles eux-mêmes, leur disposition dans le réacteur, les différents obstacles ou accessoires (baffles, injecteur d'air, sondes, etc.) pour mettre au point une corrélation

universelle où il suffirait d'entrer les valeurs de ses propres caractéristiques géométriques ou opérationnelles pour obtenir la solution. Seules des tendances dans des systèmes simples et géométriquement proches peuvent être corrélées (ce qui justifie l'utilisation d'une géométrie standard). L'expérimentation et la mesure restent les méthodes les plus fiables pour obtenir des informations sur la consommation énergétique d'un système particulier.

4.4.3. La puissance spécifique avec aération

Nous avons aéré le milieu avec un débit de 1 vvm ($5 \text{ litres/min} = 8.33 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$), qui correspond aux conditions d'aération imposées lors des fermentations. Le milieu de fermentation réel, tel qu'observé à travers le hublot, ne présentait pas cette apparence d'émulsion qui caractérisait les mesures en milieu aéré. Le comportement de la solution artificielle en présence de gaz n'est pas identique à celui du milieu réel en raison des différences de tension superficielle. La présence de protéines notamment modifie sensiblement le comportement de la solution en présence d'air. La formation des bulles, leur taille, ainsi que les cavités présentes au niveau des pales des mobiles diffèrent, ce qui entraîne une modification de la puissance consommée.

Afin de faciliter la comparaison des résultats, les courbes de puissance mesurées avec et sans aération sont présentées simultanément (Figure 37). Les notations P (N_p) et P_g (N_{pg}) se réfèrent respectivement à la puissance dissipée (au nombre de puissance) sans et avec aération.

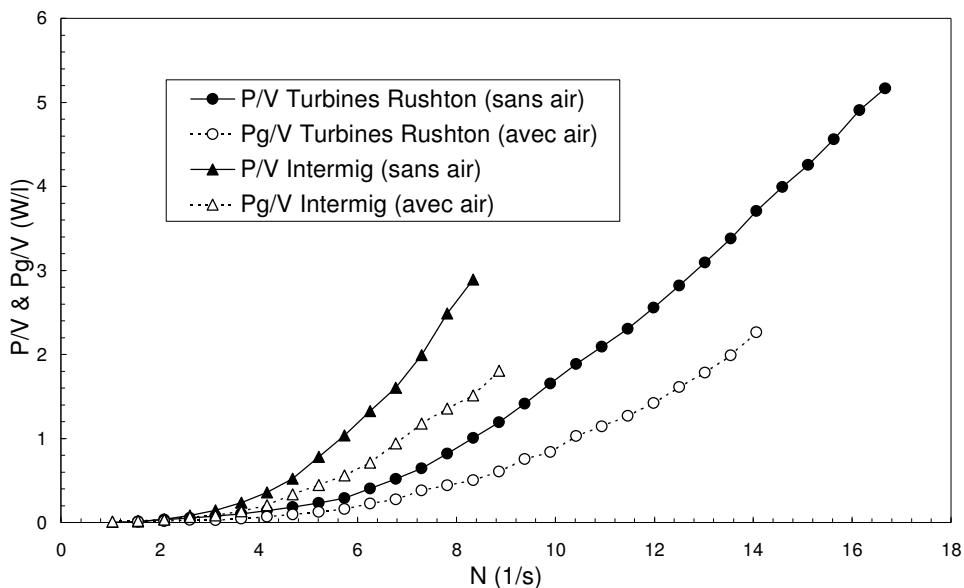


Figure 37 : Puissance spécifique sans (P) et avec aération (P_g) (à 1 vvm) en fonction de la vitesse d'agitation N

Pour les deux mobiles, la puissance consommée avec aération est inférieure à celle consommée sans air. Pour rappel, ce phénomène est lié à la formation de cavités derrière les pales des mobiles d'agitation.

Le rapport des puissances avec et sans aération est présenté à la Figure 38 :

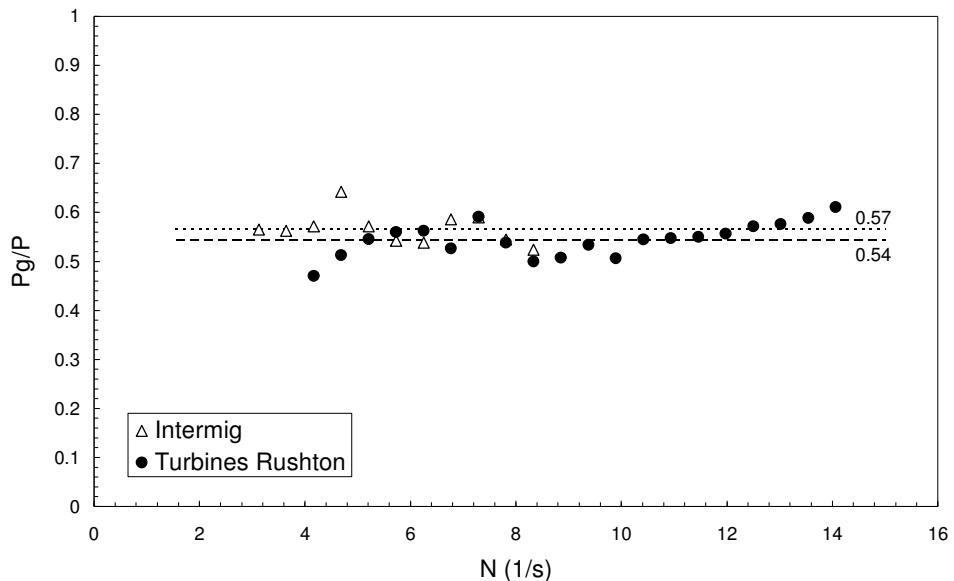


Figure 38 : Rapport Pg/P en fonction de N (s^{-1}) (1 vvm)

La mesure de la puissance consommée est très imprécise en dessous de $4 s^{-1}$ pour les turbines Rushton et de $3 s^{-1}$ pour les Intermig (points non représentés). Les mesures pour les vitesses inférieures à ces bornes étaient sujettes à caution étant donné le manque de précision de la mesure du couple.

On constate que le rapport Pg/P est à peu près constant. Nous avons calculé les moyennes à partir de $N=4 s^{-1}$ pour les turbines Rushton et de $N=3 s^{-1}$ pour les Intermig.

- **turbines Rushton** : $Pg/P = 0.54$

(écart-type=0.03)

On annonce généralement une valeur de 0.3 à 0.5, dont ces mesures ne sont pas très éloignées.

- **Intermig** : $Pg/P = 0.57$

(écart-type=0.03)

La valeur moyenne du rapport Pg/P vaut 0.555 et n'est pas statistiquement différente pour les deux mobiles.

4.4.4. Le nombre de puissance avec aération

La Figure 39 présente simultanément les courbes du nombre de puissance avec (Npg) et sans (Np) aération (1 vvm).

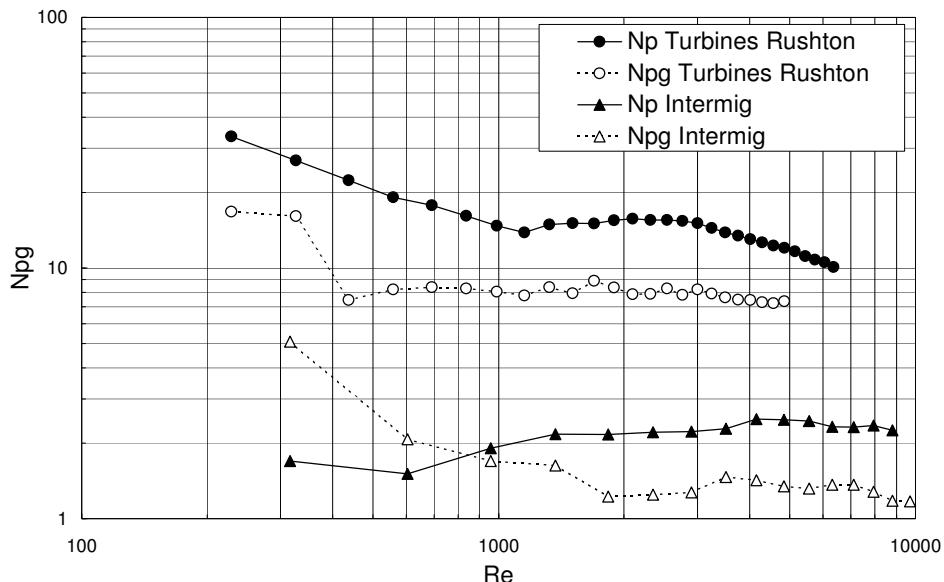


Figure 39 : Np et Npg en fonction du Re

Le nombre de puissance avec une aération de 1 vvm est inférieur à celui sans aération. Les courbes avec aération présentent la caractéristique inverse de celles sans aération : il n'y a pas vraiment de zone décroissante avec les turbines Rushton, mais bien avec les Intermig. Elle n'est toutefois pas linéaire, ce qui indique que l'on se situe en régime intermédiaire plutôt qu'en régime laminaire (ou encore que c'est l'erreur sur la mesure qui prime dans cette zone où l'on se situe à la limite de détection de la jauge de contrainte, ajouté au possible engorgement des mobiles pour des vitesses aussi faibles). Seules les valeurs du nombre de puissance (constant) en régime turbulent sont données ci-après ($Re>400$ pour les turbines Rushton et $Re>1800$ pour les Intermig, ce qui correspond dans les deux cas à $N>3 s^{-1}$).

- **Turbines Rushton :** $Npg = 7.9$ ($s_e=0.4$)
- **Intermig :** $Npg = 1.3$ ($s_e=0.1$)

Ces valeurs sont inférieures à celles trouvées en mode non aéré (respectivement 15.3 et 2.3) et valent 52% et 57% de ces valeurs.

L'allure de la courbe du nombre de puissance avec aération en fonction du nombre d'aération (Figure 40) correspond à celle proposée par la Figure 13 (§2.6.4) (où $Npg = \text{cte}$ pour la gamme des faibles

nombres d'aération). Les points mesurés à faible vitesse d'agitation ont été omis en raison du manque de précision de cette mesure. Au débit de gaz utilisé (1 vvm), la puissance et le nombre de puissance ne sont pas fortement affectés par la variation du nombre d'aération (via la vitesse d'agitation).

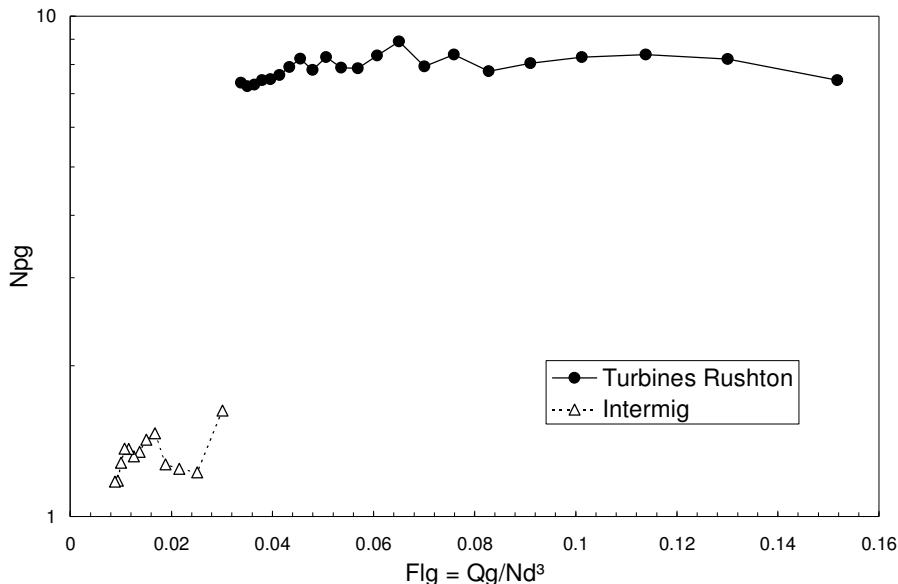


Figure 40 : N_{pg} en fonction du nombre d'aération Fl_g

4.4.5. La comparaison avec la littérature

Nous avons comparé nos mesures avec les valeurs calculées en utilisant les corrélations de la littérature (voir Tableau 6, § 2.6.4).

1. $\frac{Pg}{V} = 0.76 N^{2.59} Vg^{-0.1} \mu_a^{-0.21}$ (W/m³) (23), établie pour de nombreux mobiles et des liquides visqueux (> 0.1 Pa.s) conduit à des valeurs quasi identiques pour les deux mobiles (puisque leur différence n'intervient que dans la viscosité apparente), et donne des valeurs de 7.5 W/m³ (à $N=1$ s⁻¹) à environ 1700 W/m³ (à $N=14$ s⁻¹). Visiblement, cette relation n'est pas d'application dans notre configuration, éventuellement en raison de la faible viscosité de notre solution de xanthane par rapport aux conditions d'établissement de la relation.

2. $\frac{Pg}{P} = 0.1 \left(\frac{N V}{Q_g} \right)^{0.25} \left(\frac{N^2 d^4}{g w V^{2/3}} \right)^{-1/5}$ (24) : comme le montre les figure suivantes, cette corrélation (établie pour le scale-up de fermenteurs avec des turbines Rushton) est assez bonne pour les Intermig, mais surestime le rapport Pg/P pour les turbines Rushton (d'autant plus que la vitesse est

faible). Les deux courbes concernant les Intermig correspondent à deux valeurs pour la largeur de pale w : soit 18 mm (largeur de la palette à l'extrémité) ou 36 mm (largeur de la pale + la palette).

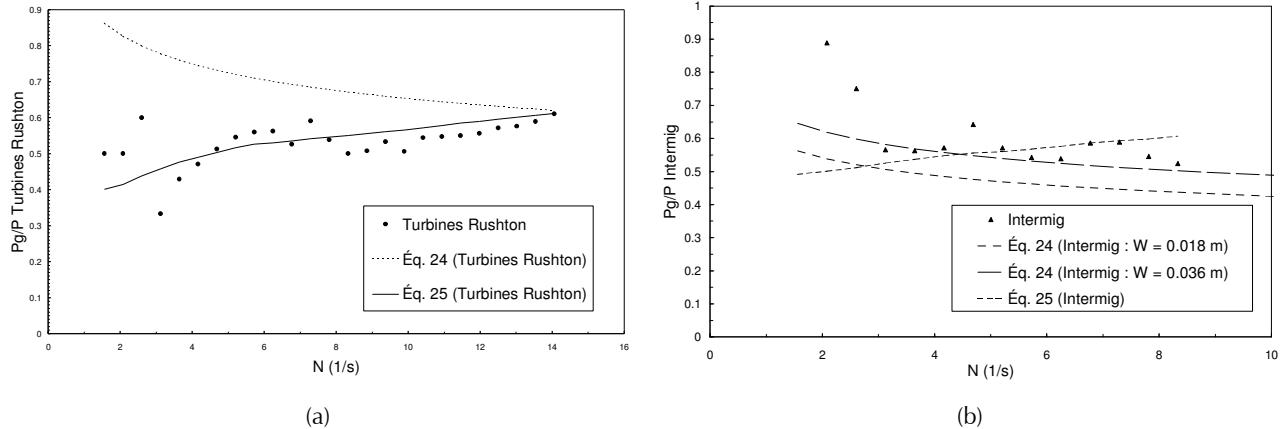


Figure 41 : Comparaison des résultats expérimentaux et des relations (24) et (25) (a) turbines Rushton et (b) Intermig

$$3. \frac{Pg}{V} = \frac{c}{V} \left(\frac{P^2 N d^3}{Q_g^{0.56}} \right)^{0.45} \quad (25)$$

(25): normalement, P doit être calculée selon la relation (19), mais cette

relation ne permet pas du tout une bonne évaluation de la puissance consommée comme c'est montré au paragraphe suivant traitant du nombre de puissance (surtout pour les Intermig) . Nous avons appliqué la corrélation en utilisant la puissance effectivement mesurée en l'absence d'aération. Nous avons utilisé la puissance en mode aéré mesurée pour ajuster la constante :

- Turbine Rushton : $c = 1.14$
- Intermig : $c = 0.62$

Nous avons alors inséré cette valeur dans la corrélation pour recalculer la puissance en mode aéré, et faire le rapport Pg/P . Comme on le constate à la Figure 41, cette relation fournit une bonne estimation du rapport Pg/P pour les Intermig. Pour les turbines Rushton cette corrélation "lisse" nos points expérimentaux par une courbe croissante.

Pour $Pg/P = \text{constante} = 0.53, s_r^2 = 0.0829$

Pour Pg/P par la relation (25), $s_r^2 = 0.0820$

Il n'est donc pas possible de discriminer entre ces deux modèles.

La conclusion que l'on peut toutefois en tirer est qu'il est difficile de comparer des corrélations établies dans des conditions géométriques et hydrodynamiques particulières avec des résultats expérimentaux se déroulant dans des conditions parfois fort différentes (avec en particulier plusieurs mobiles et une

géométrie non standard). La plus grande prudence s'impose lorsqu'on désire évaluer des grandeurs aussi sensibles aux conditions expérimentales et à la configuration du système que la puissance ou le nombre de puissance à partir de relations présentées dans la littérature. Cette constatation souligne la nécessité de déterminer expérimentalement cette grandeur.

4.5. La modélisation du mélange

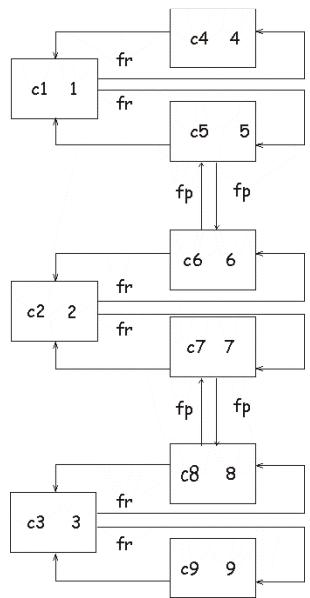
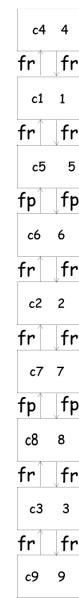
Le processus de mélange a été modélisé par des modèles compartimentés qui se basent sur l'assemblage de cuves parfaitement mélangées. Les modèles testés se distinguent essentiellement par le nombre de cuves, leur disposition et les flux d'échange.

Nous avons simulé l'injection de traceur en initialisant la concentration au sommet du fermenteur, et la détection du signal en effectuant l'ajustement sur la concentration dans la cuve inférieure la plus externe (correspondant physiquement à la position de la sonde colorimétrique). Les ajustements pour les deux mobiles et les différentes vitesses de rotation ont été faits sur les valeurs moyennes des essais de traceur. Nous traiterons essentiellement les essais de traceur effectués sans aération en raison des problèmes expérimentaux rencontrés lors des essais avec aération (voir §4.3).

4.5.1. *La présentation des modèles*

En nous inspirant de la géométrie du fermenteur et des modèles structurés présentés au § 2.8, nous avons construit un modèle comportant 9 compartiments (Figure 42). Il est basé sur le modèle proposé par Moser (Mayr et al., 1994) (Figure 21), mais avec une seule cuve latérale. Ce choix se justifie par le faible diamètre de la cuve. Les flux échangés entre les cuves centrales *fp* (*pompage*) et ceux vers les cuves latérales *fr* (*radial*) sont différents.

Remarque : les flux de pompages *fp* sont identiques entre eux. Il en est de même pour les flux radiaux *fr*.

**Figure 42 :** Modèle à 9 cuves et 2 paramètres fp et fr **Figure 43 :** Modèle à 9 cuves et 2 paramètres fp et fr déplié

Si on regarde ce modèle d'un peu plus près, en le dépliant verticalement (Figure 43), on s'aperçoit qu'il s'agit en fait uniquement de cuves en séries, avec des flux d'échange différents entre les étages (fp ou fr).

Ce modèle constitué uniquement des cuves en séries (et donc proche d'un écoulement piston) ne permettait pas une modélisation des écoulements survenant dans une cuve agitée par trois mobiles. Un modèle capable de représenter ce type d'écoulement devait reproduire la géométrie particulière du fermenteur, à savoir trois mobiles d'agitation, caractérisés chacun par une zone centrale (occupée par le mobile) et une zone latérale (correspondant à l'espace entre le mobile et la paroi de la cuve).

Nous avons alors opté pour un modèle à 8 cuves représenté à la Figure 44 :

- 2 cuves pour chaque mobile : 1 pour le mobile lui-même (cuves 1, 2 et 3) et 1 pour la zone annulaire (cuves 4, 5 et 6), soit 6 au total pour les trois mobiles
- 1 cuve supérieure (cuve 7) permettant à la cuve centrale du mobile supérieur (cuve 1) de conserver sa cuve latérale (cuve 4)
- 1 cuve inférieure (cuve 8) permettant à la cuve centrale du mobile inférieur (cuve 3) de conserver sa cuve latérale (cuve 6)

Les volumes des différentes cuves sont imposés comme suit :

- le diamètre des 5 cuves centrales est égal à celui du mobile d'agitation (0.056 m pour les turbines Rushton et 0.102 m pour les Intermig), et leur hauteur vaut 1/5 de la hauteur de liquide (0.30 m);
- les 3 cuves latérales se répartissent le reste du volume (soit 5 litres moins le volume de la zone centrale, divisé par 3).

La concentration est initialisée en C7 ("injection de traceur à la surface") et ajustée sur l'essai de traceur en C6 ("position de la sonde colorimétrique").

Ce modèle (Figure 44) permettait d'obtenir une courbe mieux ajustée que le celui à 9 cuves. Cependant, les paramètres fp et fr étaient corrélés, et leurs couples de valeurs ajustées des paramètres dépendaient fortement des couples de valeurs initiales. Leur interdépendance est illustrée par des simulations où nous avons imposé la valeur des paramètres (Figure 45).

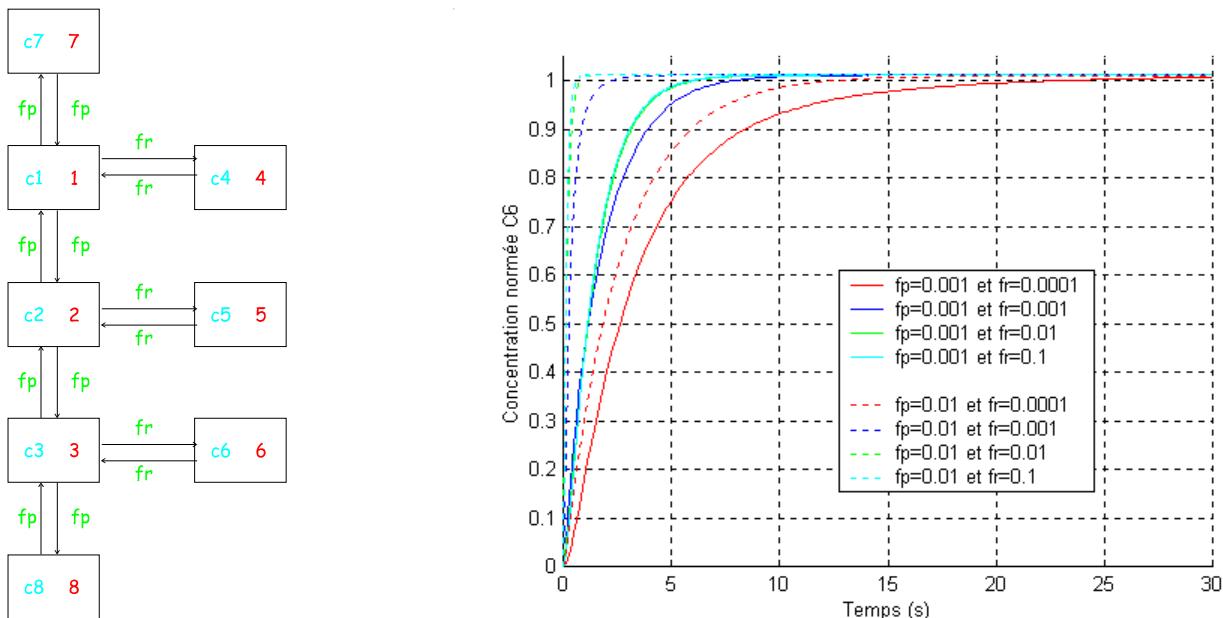


Figure 45 : Sensibilité paramétrique du modèle à 8 cuves et deux paramètres fp et fr

Figure 44 : Modèles à 8 cuves et 2 paramètres fp et fr

On constate que si fr varie de 0.001 à 0.01, cela n'entraîne qu'un léger décalage de la courbe vers l'échelon (ce qui peut rendre très aléatoire l'ajustement du modèle sur une courbe de traceur située entre ces deux bornes). Si fr varie de 0.01 à 0.1, la courbe ne se modifie plus. De même, on obtient des

courbes très proches pour des couples de paramètres aussi différents que [$fp=0.001, fr=0.001$] et [$fp=0.01, fr=0.0001$].

L'information contenue dans les essais de traceur n'étant pas suffisante pour séparer les paramètres, nous avons opté pour le modèle présenté à la Figure 46, avec le même flux d'échange fp entre tous les compartiments (les valeurs des paramètres seront présentées ultérieurement). Ceci revient en fait à poser $fp=fr$. Cette démarche est justifiée par le fait que fr a une valeur non nulle ($fr=0$ correspond à une mise en série de 5 cuves, modèle ne convenant pas). Imposer un rapport fixé entre fp et fr (0.1 ou 10) ne permettait pas de résoudre le problème (résultats non montrés). L'hypothèse que les deux flux sont du même ordre de grandeur est cohérente par rapport à l'existence de boucles de circulation de même débit entre les compartiments. Le paramètre fp ne présentait plus aucune dépendance par rapport à sa valeur initiale.

La numérotation du modèle se compose du nombre de compartiments suivi du nombre de paramètres (par exemple ce modèle à 8 cuves et 1 paramètre est noté **8-1**).

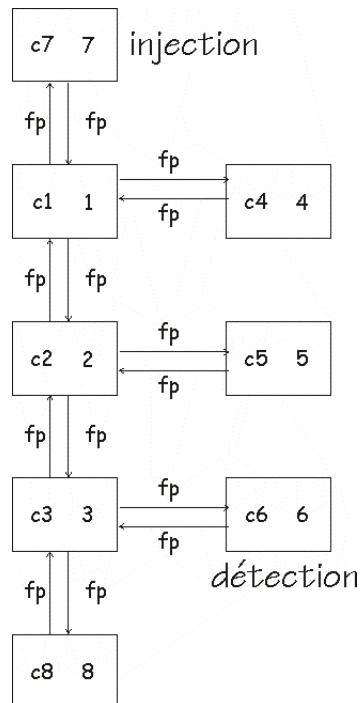
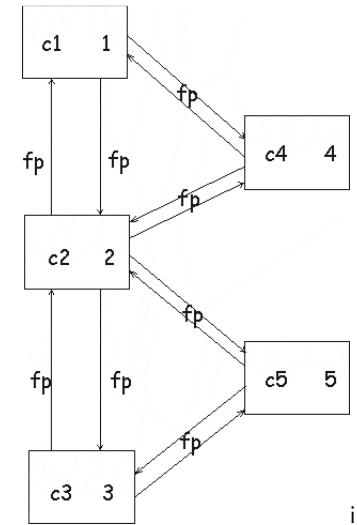
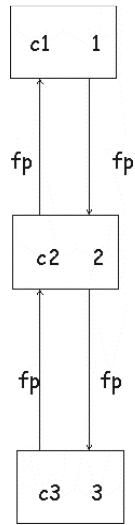
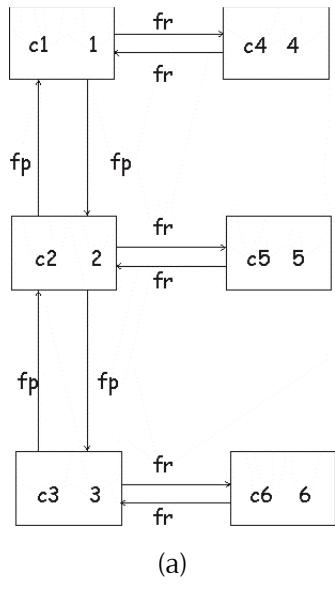


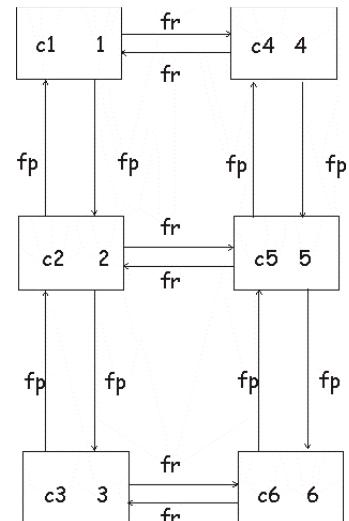
Figure 46 : Modèle à 8 cuves avec le même flux d'échange fp entre tous les compartiments (8-1)

Lors d'une première phase, les volumes des compartiments étaient calculés en fonction des diamètres réels des mobiles comme expliqué précédemment. La dimension de la zone centrale a ensuite été en paramétrée par un diamètre dz ajusté par le modèle. L'ensemble des ajustements pour les deux types de mobiles a aboutit à une valeur similaire pour ce paramètre. Ce diamètre fictif de la zone centrale dz a une valeur qui est comprise entre ceux des turbines Rushton et des Intermig. Ce dernier modèle à 8 cuves et 2 paramètres fp et dz sera désigné par **8-2**.

D'autres modèles ont fait l'objet d'une étude mais sans apporter de résultats convaincants. Ils sont présentés plus en détail à l'Annexe III.2 , ainsi qu'aux Figure 47 à Figure 49.

**Figure 47 :** Modèles compartimentés à 3 cuves (3-1)**Figure 48 :** Modèles compartimentés à 5 cuves (5-1)

(a)



(b)

Figure 49 : Modèles à 6 cuves (a) sans échange entre les cuves latérales (6-2a)

(b) avec échange entre les cuves latérales (6-2b)

4.5.2. *La discrimination entre les deux modèles retenus*

Le rapport des variances de deux modèles est comparé sur base du test de Fisher. Il est direct dans notre cas puisque le nombre de degrés de liberté est suffisamment grand pour que l'on considère que la valeur de F^* vaut 1. Le nombre de points moins le nombre de paramètres est assimilé au nombre de degrés de liberté bien que certaines polémiques existent en ce qui concerne le nombre de degrés de

liberté à attribuer à un essai de traceur où tous les points de l'acquisition ne sont pas vraiment indépendants.

Les résultats obtenus avec les modèles **(8-1)** (8 cuves, un seul paramètre fp , volume de la zone centrale fixé par le diamètre du mobile utilisé) et **(8-2)** (8 cuves, deux paramètres fp et dz , diamètre ajusté du volume de la zone centrale) ont été comparés pour l'ensemble des conditions d'agitation. Les essais avec les turbines Rushton sont désignés par "TR" et ceux avec les Intermig par "I", suivi de la vitesse de rotation en rotations par minutes (rpm).

Tableau 9 : Comparaison des modèles **(8-1)** et **(8-2)**

Conditions	$s_r^2(8-1)$	$s_r^2(8-2)$	$s_r^2(8-1)/s_r^2(8-2)$
TR300	0.00030	0.00032	0.94
TR450	0.00067	0.00017	3.98
TR600	0.0011	0.00076	1.42
TR900	0.0017	0.0016	1.06
I165	0.00015	9.5E-05	1.60
I247	0.00044	8.4E-05	5.27
I329	0.00033	0.00026	1.31
I494	0.0022	0.0022	1.00

Mis à part l'essai à 300 rpm avec les turbines Rushton, le modèle **(8-2)** – où le diamètre de la zone des mobiles est ajusté – semble meilleur (ou équivalent) à celui où le diamètre de la zone centrale est imposé comme étant celui des mobiles d'agitation. C'est donc ce modèle qui sera retenu comme étant le plus approprié pour représenter l'hydrodynamique du fermenteur.

L'ajustement paramétrique a été fait en comparant les essais de traceur à la concentration C6 (cuve latérale inférieure, n°6) (Figure 46). Le programme d'ajustement calcule également les concentrations dans les toutes les autres cuves du modèle. La Figure 50 montre les concentrations en traceur C4 et C5 dans les cuves latérales supérieure (cuve n°4) et médiane (cuve n°5), calculées pour les turbines Rushton à 450 rpm. On y retrouve l'allure des signaux de traceur enregistrés par d'autres auteurs dans le cas d'une cuve à plusieurs mobiles (Figure 17 au § 2.7.5), notamment la présence d'un pic dépassant la concentration de mélange (ou d'équilibre) en ce qui concerne la concentration dans le compartiment de la zone supérieure (C4) et une montée graduelle vers la concentration de mélange pour celles des compartiments inférieurs (C5 et C6). Ce résultat qualitatif montre la qualité "physique" de ce modèle.

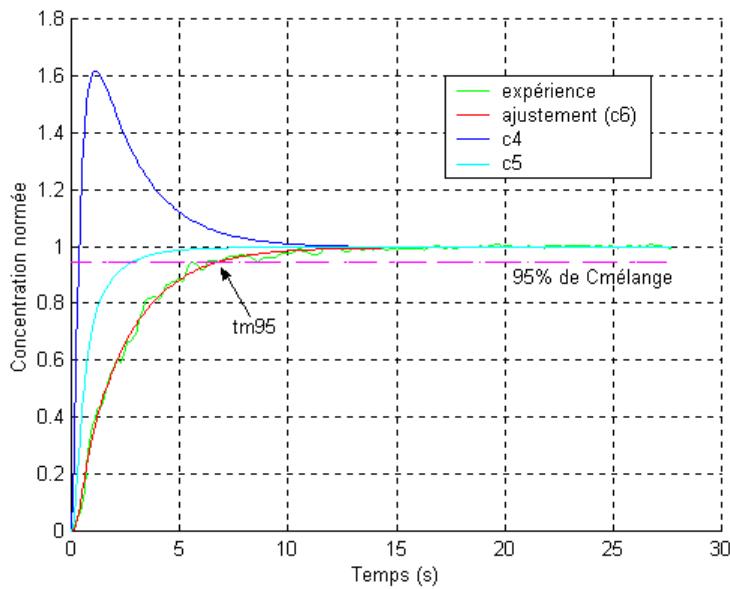


Figure 50 : Ajustement paramétrique par le modèle à 8 cuves : turbines Rushton 450rpm, f_p et dz ajustés

Par ailleurs, cette figure illustre l'importance de la définition du temps de mélange : la concentration C5 (correspondant au compartiment latéral médian) atteint sa concentration de mélange ou d'équilibre beaucoup plus tôt que celles des compartiments du haut et du bas.

4.5.3. *La valeur des paramètres*

L'ajustement des paramètres du modèle (8-2) sur les courbes de traceur moyennes donne les résultats suivants (Tableau 10). "s_r" représente l'écart-type sur les paramètres. Il est calculé en utilisant l'estimation de la matrice de covariance des paramètres calculée à partir du Jacobien évalué aux valeurs de convergence de l'algorithme (Froment and Bischoff, 1979).

Tableau 10 : Valeur des paramètres fp et fr du modèle (8-2)

Conditions	fp (m ³ /s)	$s_r(fp)$	dz (m)	$s_r(dz)$
TR300	0.000937	$1.2 \cdot 10^{-5}$	0.0567	$9.7 \cdot 10^{-4}$
TR450	0.001282	$1.1 \cdot 10^{-5}$	0.0845	$1.0 \cdot 10^{-3}$
TR600	0.001421	$2.9 \cdot 10^{-5}$	0.0733	$2.0 \cdot 10^{-3}$
TR900	0.001719	$5.3 \cdot 10^{-5}$	0.0663	$2.9 \cdot 10^{-3}$
I165	0.000235	$9.3 \cdot 10^{-7}$	0.0837	$3.8 \cdot 10^{-4}$
I247	0.000540	$2.6 \cdot 10^{-6}$	0.0741	$4.3 \cdot 10^{-4}$
I329	0.000655	$5.6 \cdot 10^{-6}$	0.0718	$7.8 \cdot 10^{-4}$
I494	0.001380	$4.3 \cdot 10^{-5}$	0.0700	$2.9 \cdot 10^{-3}$

L'erreur sur les paramètres est faible (de l'ordre du pour-cent). Les barres d'erreur sur la Figure 51 et la Figure 54 représentent l'intervalle de confiance à 95% (pour un nombre de degrés de liberté supérieur à 120, la variable de Student pour un intervalle de confiance à 95% vaut 1.96).

4.5.3.1. fp

Le flux d'échange entre les compartiments fp augmente avec la vitesse de rotation quel que soit le mobile. La Figure 51 montre que les valeurs du paramètre fp provenant de l'ajustement des essais de traceur effectués avec les turbines Rushton et les Intermig peuvent être réunies par un ajustement logarithmique :

$$fp = 9.8 \cdot 10^{-4} \ln(N) - 8 \cdot 10^{-4} \quad (\text{m}^3/\text{s}) \quad (36)$$

où N est en s⁻¹.

L'erreur sur l'ajustement $s_r^2 = 1.99 \cdot 10^{-8}$

Les paramètres et leur écart-type valent :

- terme proportionnel = $9.8 \cdot 10^{-4}$ ($s_r = 1.0 \cdot 10^{-4}$)
- terme indépendant = $-8.0 \cdot 10^{-4}$ ($s_r = 2.0 \cdot 10^{-4}$)

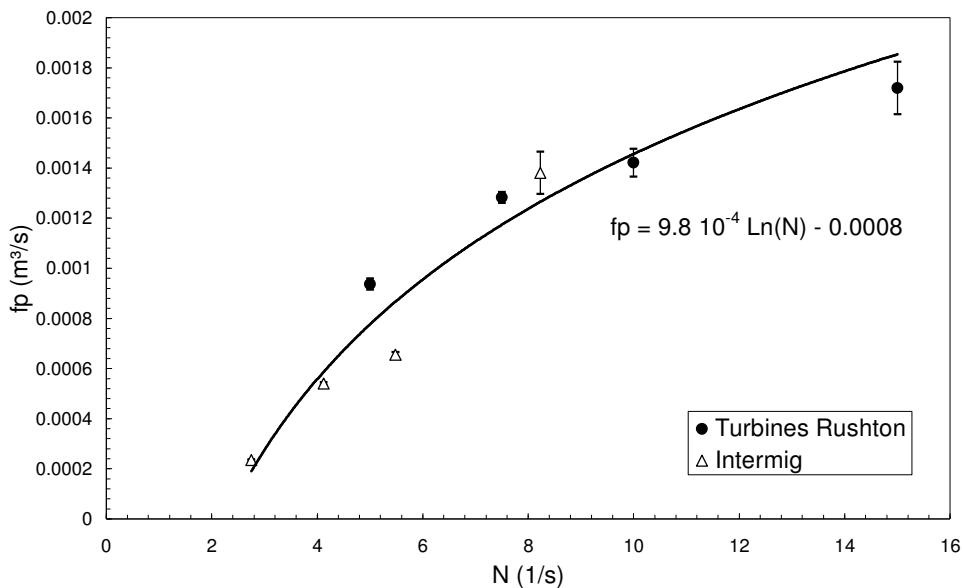


Figure 51 : fp (m^3/s) (et LC 95%) en fonction de N (s^{-1})

L'ajustement par une loi en puissance menait à de moins bons résultats :

$$fp = 2.14 \cdot 10^{-4} * N^{0.8} \quad (s_r^2 = 4.2 \cdot 10^{-8})$$

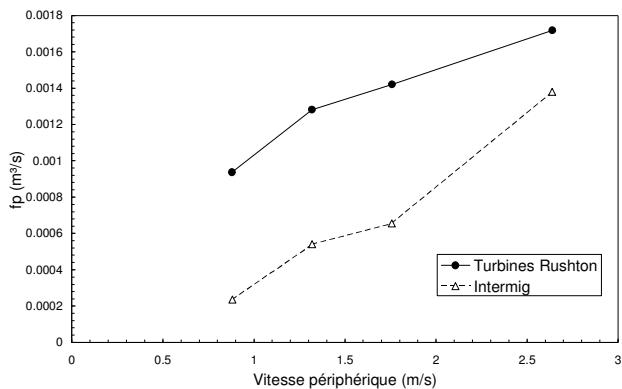
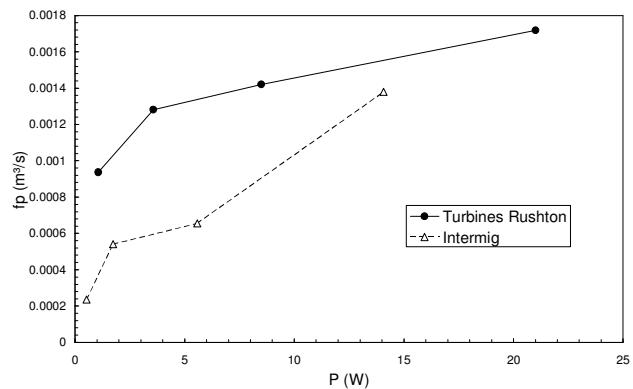
de même que celui par une régression linéaire en fonction de $1/N$:

$$fp = 0.0019 - 0.0051 * (1/N) \quad (s_r^2 = 3.2 \cdot 10^{-8}).$$

Cependant, la valeur critique de la variable $F^*(6,6,95\%)=4.2839$ ce qui signifie que l'on ne peut pas les discriminer statistiquement.

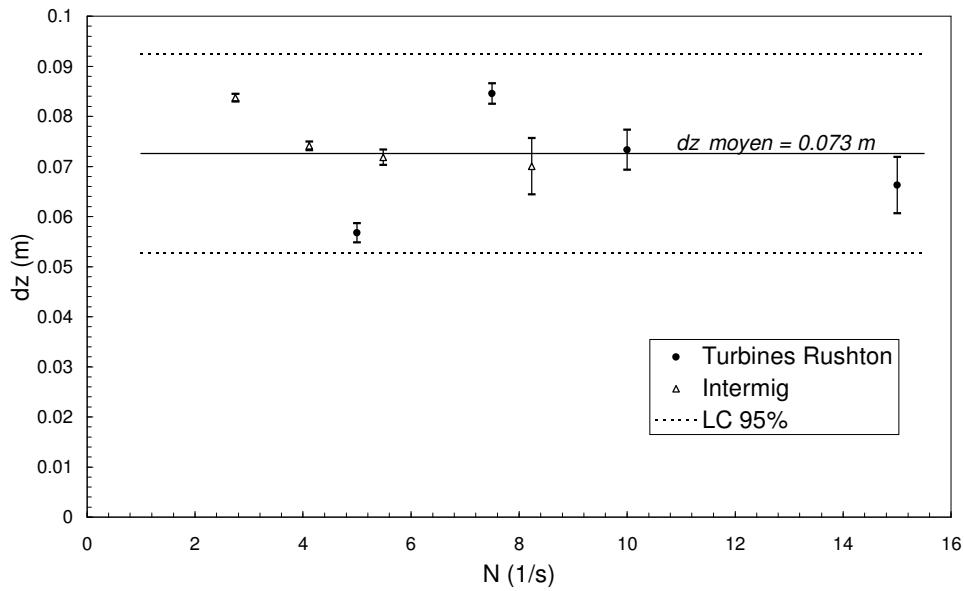
Quelle que soit la relation de dépendance de fp par rapport à N retenue, elle traduit une augmentation de fp de plus en plus lente lorsque N augmente. Ceci rejoint nos observations lors de l'examen des essais de traceurs où le système tendait asymptotiquement vers une vitesse de mélange finie (et non pas infinie) (voir Figure 32).

Pour une même vitesse périphérique (Figure 52) ou une même puissance injectée (Figure 53), les turbines Rushton provoquent un débit d'échange beaucoup plus intense que les Intermig. Ces derniers sont donc de plus grands consommateurs d'énergie.

Figure 52 : f_p en fonction de la vitesse périphériqueFigure 53 : f_p en fonction de la puissance

4.5.3.2. dz

Le diamètre de la zone centrale dz a une valeur qui varie peu en fonction de la vitesse de rotation (Figure 54). La valeur moyenne de dz est de 0.073 ± 0.008 . La variable t de Student pour 7 degrés de liberté dans les limites de confiance de 95% vaut 2.365.

Figure 54 : dz (m) en fonction de N (1/s)

Cette valeur est comprise entre les diamètres des turbines Rushton et des Intermig. Pour les turbines Rushton, il décrit une zone dont le diamètre est légèrement supérieur au diamètre des turbines Rushton, formant une sorte de caverne cylindrique autour de l'axe qui pourrait représenter la zone principale de turbulence du mobile. Pour les Intermig, cette zone est inférieure au diamètre *total* du mobile. Par contre, si l'on ne considère que la pale inclinée principale du mobile, on obtient un diamètre de 0.066m qui est inférieur à cette zone centrale. La pale inclinée principale pourrait donc

être la partie de l'Intermix qui assure le pompage et le mélange, l'extrémité servant à modifier le schéma d'écoulement du fluide mais ne créant pas de pompage principal.

Au *Chapitre I* (§ 2.6.2.2), nous avions évoqué l'éventualité que la fragmentation des hyphes se produise dans la région proche de l'agitateur, où l'on a montré qu'avait lieu la plus grande dissipation d'énergie spécifique (voir Bibliographie du *Chapitre I* : Stoots and Calabrese, 1995; Cutter, 1966; van Suijdam et Metz, 1981). Ce volume critique dans la région de l'agitateur est égal à $V\Phi$ (Justen *et al.*, 1996) où

$$\Phi = \left(\frac{d}{D}\right)^2 \left(\frac{L}{d}\right)^{2/3} n_b^{0.6} (\sin \alpha)^{1.15} \quad (-) \quad (37)$$

où L est la hauteur de la pale pour un mobile radial et la hauteur projetée pour un mobile axial, n_b est le nombre de pales et α leur angle (l'exposant dans la corrélation pour calculer Φ a été déterminé empiriquement).

Si l'on calcule ce volume en fonction de la géométrie des mobiles utilisés dans ce travail, on obtient respectivement :

- avec les turbines Rushton : $V\Phi = 1.07$ litres ($L=0.02m$, $\alpha=90^\circ$)
- avec les Intermig : $V\Phi = 1.2$ litres ($L = 0.035 m$, $\alpha=45^\circ$)

\Rightarrow moyenne = 1.135 litres, ce qui correspond à un diamètre de 0.07 m, ce qui est quasiment égal à la valeur moyenne de dz .

Le paramètre dz ajusté dans notre modèle correspondrait ainsi au diamètre de la zone critique de l'agitateur où a lieu la plus grande dissipation d'énergie spécifique. Cette constatation rejoint les mesures de Norwood et Metzner (1960) selon lesquelles la quasi-totalité du mélange se passe dans un petit "volume parfaitement mélangé" près du mobile, et l'écoulement dans le reste de la cuve sert essentiellement à ramener le fluide dans cette zone de l'agitateur.

Il est surprenant de constater que des mobiles aussi différents que ceux qui sont utilisés dans ce travail mènent à une zone critique identique. Ils se différencient pourtant à la fois par le type d'écoulement qu'ils engendrent, le diamètre, le nombre de pales et leur inclinaison.

L'ajustement paramétrique a été refait en modifiant légèrement le modèle et en imposant comme valeur au diamètre de la zone centrale la valeur moyenne du paramètre dz . On obtenait un modèle à un seul

paramètre fp avec comme contrainte $dz=0.073$ m. Les valeurs du paramètre fp et l'erreur sur l'ajustement étaient similaires à celles obtenues avec le modèle (8-2) où fp et dz étaient ajustés.

4.5.4. Le temps de mélange sans aération

Les temps de mélange à 95% θ_m (s) ont été calculés sur les courbes ajustées par notre modèle. En effet, les signaux sont assez bruités et le lissage effectué par le modèle nous a semblé plus objectif que l'application d'un filtre passe-bas (qui de toute façon impliquerait aussi l'usage d'un modèle).

Le Tableau 11 donne les temps de mélange à 95% ainsi que la puissance dissipée pour les différentes conditions expérimentales :

Tableau 11 : Temps de mélange (à 95%) et puissance dissipée

Conditions	$N(s^{-1})$	θ_m (s)	P (W)
TR300	5	9.3	1.1
TR450	7.5	6.6	3.6
TR600	10	6.0	8.5
TR900	15	5.0	21.0
I165	2.75	34.9	0.5
I247	4.12	15.7	1.7
I329	5.48	13.0	5.6
I494	8.23	6.2	14.0

Le temps de mélange diminue avec l'augmentation de la vitesse de rotation, ce qui est tout à fait logique. Pour une même vitesse de rotation, les Intermig prennent plus de temps pour homogénéiser le fermenteur mais cette différence diminue et disparaît au-delà de 500 rpm environ.

La représentation du temps de mélange θ_m (s) en fonction de la vitesse de rotation N (s^{-1}) (Figure 55) montre qu'une relation en loi en puissance comportant un terme indépendant permet de concilier les mesures provenant des deux mobiles en une relation unique :

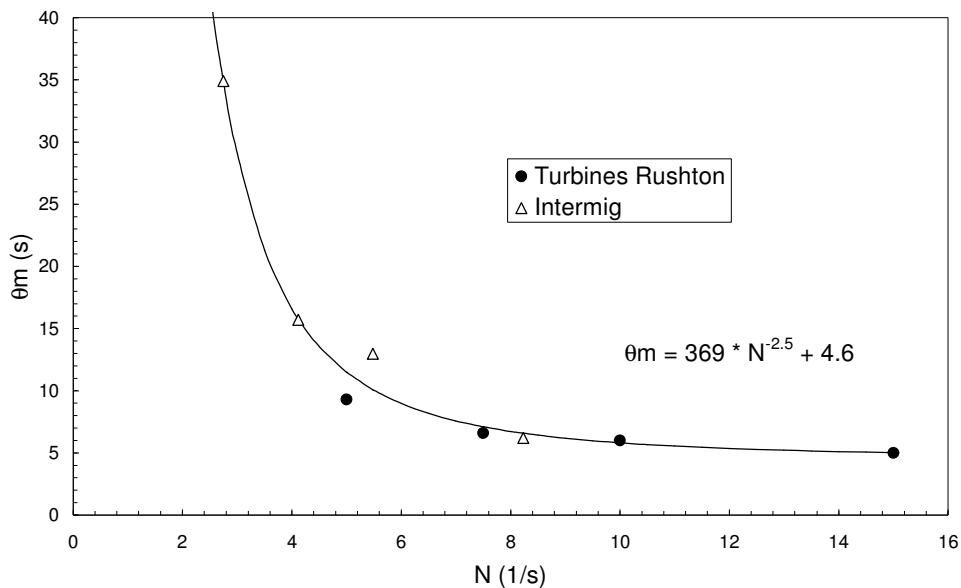


Figure 55 : θ_m (s) en fonction de la vitesse de rotation N (1/s)

L'équation de la courbe s'écrit :

$$\theta_m \text{ (s)} = 369 * N^{-2.5} + 4.6 \quad (\text{s}) \quad (38)$$

Les erreurs sur les paramètres valent respectivement 145, 0.4 et 1.4; $s_r^2 = 2.72$

Cette relation a une allure similaire à celle proposée par Rzyski (Rzyski, 1985) (la constante n'était pas précisée) :

$$\theta_m * N^{1.76} = \text{constante} \quad (-) \quad (39)$$

Cette relation était valable pour une cuve avec ou sans baffles, pour différents mobiles et différentes méthodes de mesure. L'absence de terme indépendant signifie toutefois que le temps de mélange tend asymptotiquement vers zéro, ce qui ne correspond pas aux mesures effectuées pour ce travail.

On obtient une relation en loi en puissance qui, dans la géométrie de notre cuve, relie le temps de mélange à la vitesse de rotation de l'agitateur indépendamment de la nature du mobile utilisé dans ce travail. Le terme indépendant permet de prendre en compte l'existence d'une valeur asymptotique minimale du temps de mélange ainsi que rencontrée lors de nos expérimentations.

Si l'on reporte le temps de mélange en fonction de la puissance dissipée (Figure 56), on remarque que les turbines Rushton sont avantageuses aux faibles puissances par rapport aux Intermig. Ceci est contraire à ce que d'autres auteurs ont constaté (Kipke and Lagier, 1983) : le temps de mélange avec des Intermig devrait être meilleur qu'avec des turbines Rushton pour une même puissance dissipée.

Cette inversion peut être due à la configuration du système d'agitation (3 mobiles peu espacés) et à la géométrie particulière de nos "pseudo" Intermig (pour rappel, le nombre de puissance était également supérieur à celui annoncé par la littérature). Nos mobiles semblent donc beaucoup plus "énergivores" que les vrais Intermig. Cette différence diminue aux puissances supérieures (mais qui correspondent à la limite du système par rapport à l'apport énergétique comme les essais de traceur le montraient, Figure 32).

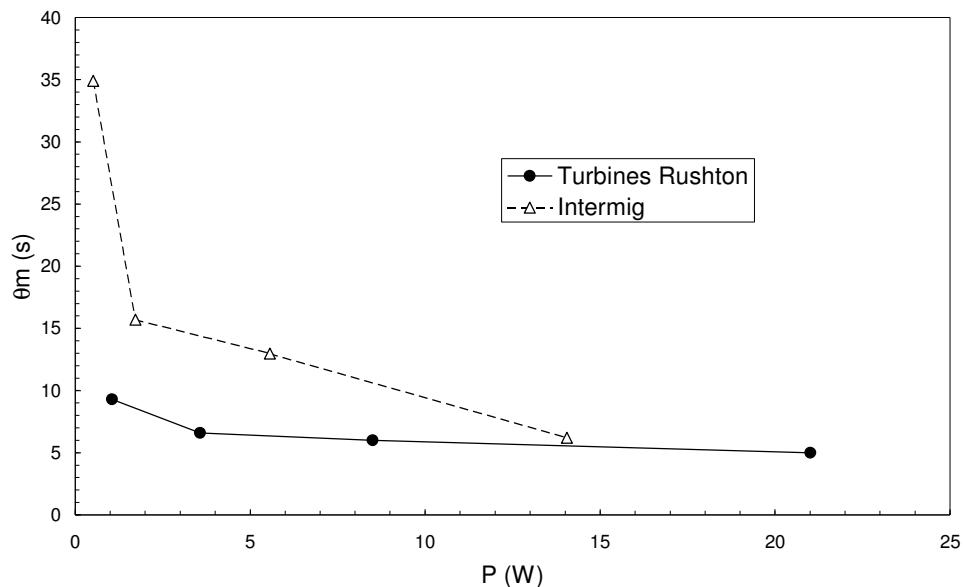


Figure 56 : θ_m (s) en fonction de la puissance dissipée

Selon l'équation (32) $\theta m = \frac{5V}{Q_c} = \frac{5V}{Fl_c N d^3}$, le temps de mélange est inversement proportionnel au débit de circulation Q_c (ou au nombre de circulation Fl_c). Or le débit de circulation Q_c est proportionnel au débit de pompage Q_p et donc le nombre de circulation Fl_c est proportionnel au nombre de pompage Fl (voir §2.7.4).

On a donc $\theta m = c \frac{5V}{Q_p} = c \frac{5V}{Fl N d^3}$ où c est une constante.

Le nombre de pompage Fl étant constant en régime turbulent, on doit s'attendre à trouver une proportionnalité entre le temps de mélange et le facteur $1/Nd^3$ (puisque le volume est constant) :

$\theta m \propto \frac{1}{N d^3}$. La Figure 57 illustre cette dépendance linéaire.

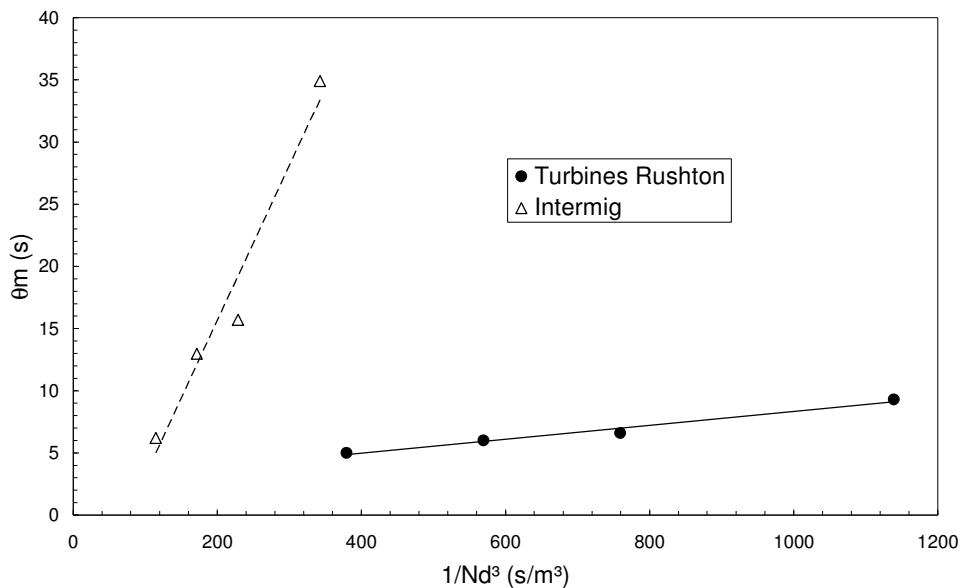


Figure 57 : θ_m versus $1/Nd^3$ (s/m^3)

Les équations des droites valent respectivement :

- **turbines Rushton :**

$$\theta_m = \frac{0.056}{Nd^3} + 2.7 \quad (s) \quad (40)$$

erreur sur les paramètres : 0.0006 pour le terme proportionnel et 0.4 pour le terme indépendant ($s_r^2 = 0.105$)

- **Intermig :**

$$\theta_m = \frac{0.12}{Nd^3} - 9.3 \quad (s) \quad (41)$$

erreur sur les paramètres : 0.02 pour le terme proportionnel et 4.0 pour le terme indépendant ($s_r^2 = 8.4$)

Le temps de mélange étant proportionnel au facteur $1/Nd^3$, lui-même proportionnel à l'inverse du pompage, il était logique de rechercher une relation entre θ_m et $1/fp$, le paramètre représentant l'intensité du pompage dans notre modèle compartimenté. La Figure 58 montre cette relation :

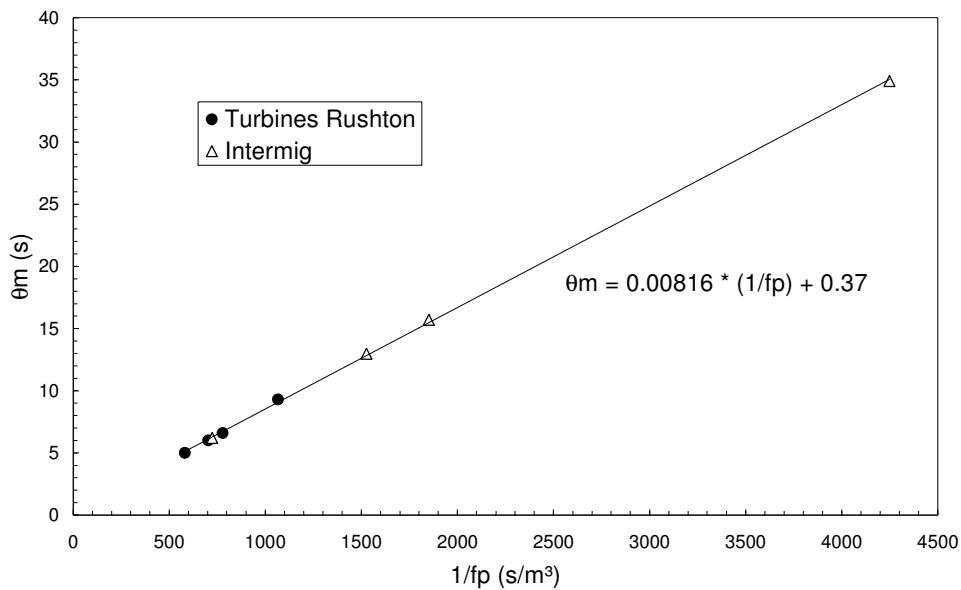


Figure 58 : θ_m en fonction de $1/fp$

On obtient une relation linéaire qui est valable à la fois pour les turbines Rushton et pour les Intermig.

L'équation de la droite s'écrit :

$$\theta_m = 0.00816 \cdot \frac{1}{fp} + 0.37 \quad (\text{s}) \quad (42)$$

erreur sur les paramètres : $5.4 \cdot 10^{-5}$ pour le terme proportionnel et 0.10 pour le terme indépendant ($s_r^2 = 0.031$)

Pour $fp \rightarrow \infty$ (c'est-à-dire pour une vitesse de rotation infinie), le temps de mélange n'est pas nul, ce qui cadre avec nos observations (bien que sa valeur asymptotique soit sous évaluée par cette relation qui l'estime à 0.37 secondes au lieu des 4.6 secondes selon la relation (38)).

Notre modèle permet ainsi de concilier en une relation unique des mesures de macromélange effectuées avec des mobiles très différents tant au niveau de leur géométrie que du type d'écoulement qu'ils engendrent dans la cuve. Leur seul point commun est l'emplacement sur l'arbre d'entraînement (voir §3.1.1).

4.6. La modélisation du mélange avec aération

Les essais ont été effectués à 1 vvm qui est le débit d'aération utilisé lors des fermentations (soit 5 litres par minute ou $8.33 \cdot 10^{-5} \text{ m}^3/\text{s}$). Seul l'essai avec les Intermig à 247 rpm est exploitable (suite à

d'importants problèmes de moussage, voir §4.3) et a été ajusté par le modèle (8-2) à 8 cuves et 2 paramètres fp et dz .

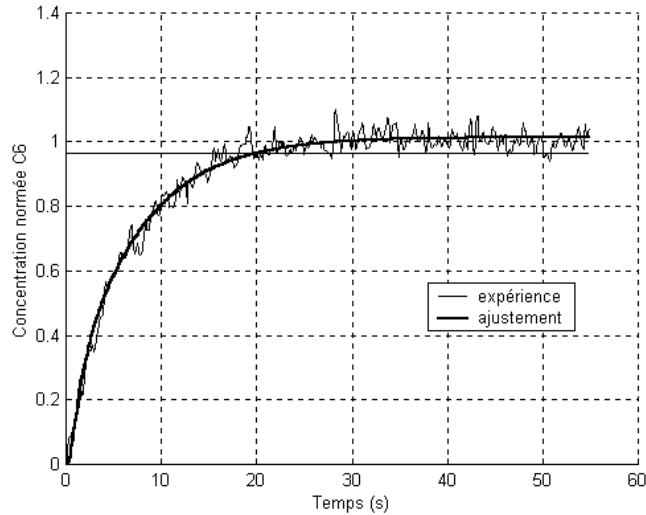


Figure 59 : Ajustement paramétrique de l'essai avec les Intermig à 247 rpm et aération à 1 vvm

Les paramètres et la précision sur l'ajustement valent respectivement :

- $fp = 0.000432 \pm 6 \cdot 10^{-6} (\text{m}^3/\text{s})$
- $dz = 0.066 \pm 0.001 (\text{m})$
- $s_r^2 = 0.00095$

Le temps de mélange est de 19.9 secondes lorsque le milieu est aéré au lieu de 15.7 secondes sans aération à la même vitesse de rotation.

Une explication peut être trouvée dans l'existence d'une vitesse critique d'agitation en dessous de laquelle l'introduction de gaz diminue le temps de mélange jusqu'à un certain niveau, et ensuite se stabilise aux valeurs supérieures de la vitesse superficielle de gaz. Au voisinage de cette vitesse critique, l'injection de gaz commence par augmenter le temps de mélange pour ensuite diminuer et se stabiliser (Pandit and Joshi, 1983). Il est possible que l'essai traité se trouve dans cette configuration particulière. Malheureusement, les corrélations proposées par ces auteurs n'étaient pas applicables (problèmes de configuration, etc.), et nous n'avons pas pu calculer cette vitesse critique de rotation. N'ayant testé qu'un seul débit d'air (celui utilisé lors des fermentations), nous n'avons pas pu étudier son influence pour cette vitesse de rotation.

Une comparaison entre les temps de mélange sans et avec aération peut être obtenue en tenant compte de la relation entre le temps de mélange et la puissance dissipée sans aération (Figure 56) et du rapport mesuré entre les puissances dissipées sans et avec aération ($Pg/P=0.57$ pour les intermig). Si on approxime la relation entre le temps de mélange et la puissance dissipée (sans aération) par une loi en puissance d'équation $\theta_m = 24.1*P^{-0.48}$, l'estimation du temps de mélange avec aération avec les Intermig à 247 rpm serait de 24.3 secondes.

Le pompage fp avec aération est inférieur à celui obtenu dans les mêmes conditions d'agitation sans air (qui vaut $0.00054 \text{ m}^3/\text{s}$), ainsi que le diamètre de la zone centrale dz (dont la valeur moyenne est 0.073 m sans aération). Si l'on applique à cet essai la relation unifiée (42) établie – en conditions non aérées – entre le pompage fp et le temps de mélange sans aération, on obtient une estimation du temps de mélange avec aération de 19.3 secondes. Cette estimation est très proche de la valeur mesurée, et confirme la validité de la relation établie entre θ_m et fp , quelles que soient les conditions d'aération. La Figure 60 illustre cette unification entre les résultats provenant des conditions aérées et non aérées, et des deux types de mobiles.

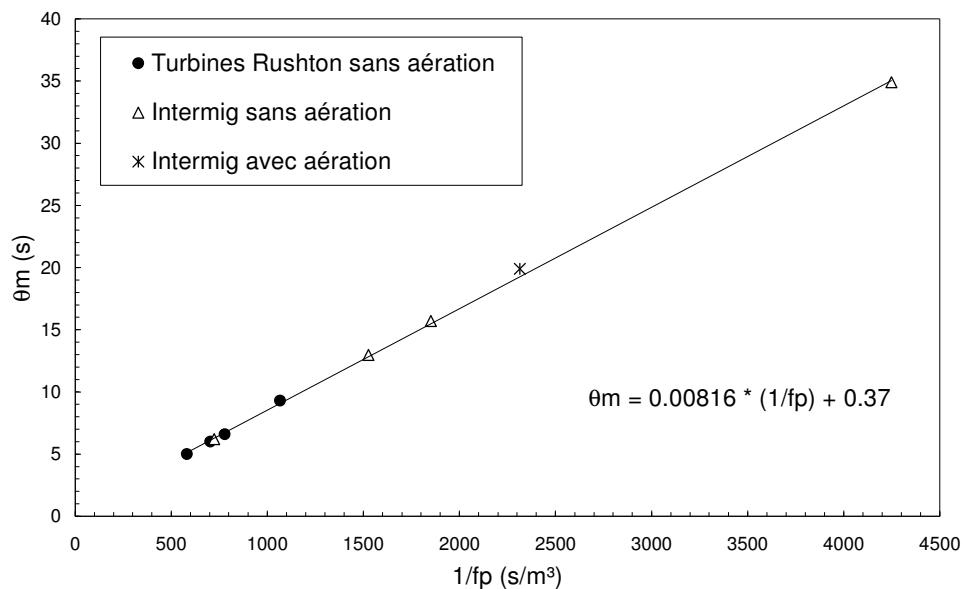


Figure 60 : Temps de mélange θ_m en fonction de $1/fp$: avec et sans aération

5. Conclusions sur de l'étude hydrodynamique du fermenteur

Nous avons étudié l'hydrodynamique et le macro-mélange du fermenteur à cuve agitée mécaniquement qui a servi aux fermentations présentées au Chapitre I. Pour ce faire, nous avons effectué des essais de traceur (par colorimétrie) et des mesures de puissance à plusieurs vitesses de rotation et avec les deux types de mobile utilisés : les turbines Rushton ($d=0.056$ m, écoulement radial) et les Intermig ($d=0.102$ m, écoulement mixte axial-radial) dans le milieu artificiel mis au point au *Chapitre II* (solution de xanthane à 1.25 g/l + sels et antimousse, à 20°C).

Les essais de traceur ont montré une bonne reproductibilité. Quel que soit le mobile, la réponse du système se rapproche de la fonction échelon (qui correspondrait au mélange instantané d'un réacteur idéal discontinu parfaitement mélangé) lorsqu'on augmente la vitesse de rotation. Toutefois, cet état n'est pas accessible et on tend en fait vers une asymptote. À vitesse périphérique égale, les turbines Rushton ont une capacité de mélange supérieure à celle des Intermig. Cette différence diminue avec l'augmentation de la vitesse de rotation pour devenir quasi inexistante à lorsque la vitesse atteint 900 rpm pour les turbines Rushton et 494 rpm pour les intermig.

À vitesse de rotation égale, on observe deux tendances :

- aux faibles vitesses , les turbines Rushton (à 300 rpm) mélagent plus efficacement que les Intermig (à 329 rpm);
- cette différence diminue pour disparaître aux vitesses supérieures (la courbe des Intermig à 494 rpm rejoint la montée de celle des turbines Rushton à 600 rpm).

Les résultats en milieu aéré se sont avérés difficilement exploitables pour ce qui concerne les essais de traceur (moussage, piégeage du colorant, etc.). Il n'y a pas de grande différence entre les signaux avec et sans aération, si ce n'est une courbure un peu moins prononcée (qui entraînera un temps de mélange un peu plus lent).

Suite aux mesures de puissance, nous avons pu déterminer le nombre de puissance ($Np = P/\rho N^3 d^5$) en conditions non aérées et aérées turbulentes pour les deux mobiles. La valeur moyenne du rapport Pg/P n'est pas statistiquement différente pour les deux mobiles et vaut 0.555.

- non aéré : Np (turbines Rushton) = 15.3 ± 0.3
 Np (Intermig) = 2.3 ± 0.1
- aéré : Npg (turbines Rushton) = 7.9 ± 0.4
 Npg (Intermig) = 1.3 ± 0.1

Sur base des courbes "temps – concentration" obtenues lors des essais de traceur, le macromélange a été modélisé par un modèle compartimenté qui se base sur l'assemblage de cuves parfaitement mélangées dont la taille et le nombre permettent une représentation des différentes échelles de mélange et des écarts à l'idéalité. L'assemblage représentant le mieux notre fermenteur est un modèle à 8 cuves comprenant une zone centrale avec les mobiles et une zone latérale : 3 cuves pour les mobiles + 1 cuve latérale pour chacun + 1 cuve supérieure + 1 cuve inférieure. Les paramètres sont le flux de pompage fp (ou débit d'échange entre les compartiments) et le diamètre de la zone centrale des mobiles dz .

Le flux d'échange fp (ou de pompage) entre les compartiments du modèle augmente avec la vitesse de rotation quel que soit le mobile. Les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig peuvent être conciliées par un ajustement logarithmique :

$$fp = 9.8 \cdot 10^{-4} \ln(N) - 8 \cdot 10^{-4} \text{ (m}^3/\text{s)}$$

Pour une même puissance dissipée, les turbines Rushton entraînent un débit de pompage supérieur à celui obtenu avec les Intermig (plus énergivores).

Le diamètre de la zone centrale dz a une valeur qui varie peu en fonction du mobile ou de la vitesse de rotation. La valeur moyenne de dz est de 0.073 ± 0.008 m. Il correspondrait au diamètre de la zone critique de l'agitateur où a lieu la plus grande dissipation d'énergie spécifique. La quasi-totalité du mélange se passerait dans un petit "volume parfaitement mélangé" près du mobile, et l'écoulement dans le reste de la cuve servirait essentiellement à ramener le fluide dans cette zone de l'agitateur. On peut supposer que le temps de séjour des micro-organismes dans cette région circonscrite autour du mobile – où règnent des champs de cisaillement intenses – est suffisamment court pour ne pas perturber leur croissance.

Les temps de mélange à 95% θ_m (s) en milieu non aéré ont été calculés sur les courbes ajustées (et lissées) par le modèle à 8 cuves. Le temps de mélange diminue avec l'augmentation de la vitesse de rotation. Pour une même vitesse de rotation, les Intermig prennent plus de temps pour homogénéiser le

fermenteur mais cette différence diminue et disparaît au-delà de 500 rpm environ. Une relation en loi en puissance, en fonction de la vitesse de rotation et comportant un terme indépendant, permet de concilier les mesures provenant des deux mobiles.

$$\theta_m = 369 * N^{2.5} + 4.6 \text{ (s)}$$

Le temps de mélange affiche une dépendance linéaire par rapport à l'inverse du flux de pompage fp paramétrant le modèle, indépendamment du mobile utilisé. Ce paramètre fp permet ainsi d'intégrer en une seule grandeur caractéristique l'intensité et la nature de l'écoulement provoqué par un mobile en rotation dans une cuve agitée, et leurs conséquences sur la capacité d'homogénéisation d'une cuve agitée (via le temps de mélange). Il semble que cette relation soit également valable en conditions aérées.

$$\theta_m = 0.00816 * \frac{I}{fp} + 0.37 \text{ (s)}$$

Les difficultés rencontrées lorsqu'il s'est agi de comparer des corrélations de la littérature avec nos résultats expérimentaux se déroulant dans des circonstances parfois fort différentes (en particulier avec plusieurs mobiles et une géométrie non standard du fermenteur et des agitateurs) souligne l'importance de la géométrie du système sur les caractéristiques hydrodynamiques. La modification des schémas d'écoulement (fortement liés à la géométrie) entraîne celle de nombreuses autres grandeurs (puissance, mélange, etc.). La plus grande prudence s'impose lorsque l'on désire évaluer des grandeurs aussi sensibles aux conditions expérimentales et à la configuration du système que la puissance ou le nombre de puissance à partir de relations présentées dans la littérature.

La méthodologie des essais de traceur permet ainsi de rendre compte du macromélange d'un fermenteur à cuve agitée et de le représenter par un modèle compartimenté dont les paramètres sont directement reliés à des grandeurs caractéristiques macroscopiques (telles que le temps de mélange) indépendamment du type de mobile utilisé et des conditions d'aération.

6. Bibliographie

Allen D.G. and Robinson C.W. (1991) On the calculation of shear rate and apparent viscosity in airlift and bubble column bioreactors (comments). *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 212-216.

Amanullah A., Serrano-Carreon L., Castro B., Galindo E. and Nienow A.W. (1998) The influence of impeller type in pilot scale xanthan fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **57**, 95-108

Arellano-Huacuja A., Khare A.S. and Nirajan K. (1997) Power consumption in aerated mechanical agitated contactors containing highly viscous liquids. Proceedings of the First European Congress on Chemical Engineering (ECCE1), Florence, Italie, 1827-1830

Blakebrough N. and Sambamurthy K. (1966) Mass transfer and Mixing rates in fermentation vessels. *Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 25-42

Blanch H.W. and Bhavaraju S.M. (1976) Non-newtonian fermentation broths: rheology and mass transfer. *Biotechnol. Bioeng.*, **18**, 745-790

Brauer H. (1979) Power consumption in aerated stirred tank reactor systems. *Adv. Biochem. Eng.*, **13**, 87-119

Bruxelmann M. (1979) Aération et agitation des réacteurs biochimiques. *Revue des fermentations et des industries alimentaires*, 35-53

Bruxelmann M. et Roustan M. (1982) Homogénéisation des liquides miscibles. *Techniques de l'Ingénieur, Volume Génie Chimique*, A5910, Paris, 1-11

Calderbank P.H. and Moo-Young M.B. (1959) The prediction of power consumption in the agitation on non-newtonian fluids. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **37**, 26-33

Calderbank P.H. and Moo-Young M.B. (1961) The power characteristics of agitators for the mixing of newtonian and non-newtonian fluids. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **39**, 337-342

Charles M. (1978) Technical aspects of the rheological properties of microbial cultures, *Adv. Biochem. Eng.*, **8**, 1-62.

Cooke M., Middleton J.C. and Bush J.R. (1988) Mixing and mass transfer in filamentous fermentations. 2nd International Conference on *Bioreactor Fluid Dynamics*, 37-64, Editor R. King, BHRA The Fluid Engineering Center, Cranfield, Bedford, UK

Cooper R.G. and Wolf D. (1968) Velocity profiles and pumping capacities for turbine type impellers. *Can. J. Chem. Eng.*, **46**, 94-100

Costes J. et Couderc J.P. (1987) Critères d'extrapolation des écoulements turbulents en agitation mécanique. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **1(2)**, 17-22

Costes J. and Couderc J.P. (1988) Study by laser doppler anemometry of the turbulent flow induced by a Rushton turbine in a stirred tank : influence of the size of the unit. I. Mean flow and turbulence. *Chem. Eng. Sci.*, **43**, 2751-2764.

Cronin D.G., Nienow A.W. and Moody G.W. (1994) An experimental study of mixing in a proto-fermenter agitated by dual Rushton turbines. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **72C**, 35-40

Cutter L.A. (1966) Flow and turbulence in a stirred tank. *AIChE J.*, **12**, 35-45

Danckwerts P.V. (1953) Continuous flow systems – Distribution of residence times, *Chem. Eng. Sci.s*, **2**, 1-13

Dunlop E.H. (1992) Micromixing in fermentation - The response of microorganisms to hydrodynamic forces. In *Frontiers in Bioprocessing II*, Todd P. : ACS Conference Proceedings Series

Dunn, I.J. and Heinze, E. (1993) Types of understanding in scaling down and up, as illustrated with an oxygen sensitive-culture. Proceedings of the International Symposium on Bioreactor Performance, Helsingør, Denmark, 189-203

Ekato (1991) Handbook of Mixing Technology, publié par Ekato Rühr-und Mischtechnik GmbH, Schopfheim, Allemagne

Ekato (1992) L'agitation. Facteur essentiel de productivité. *Information Chimie*, **336**, 158-162

Forschner P., Geisler R. and Krebs R. (1995) Influence des conditions de procédé sur le débit de pompage des mobiles d'agitation. *Information Chimie*, **374**, 123-126

Fort I., Machon V. and Kadlec P. (1993) Distribution of energy dissipation rate in an agitated gas-liquid system. *Chem. Eng. Technol.*, **16**, 389-394

Froment G.F. and Bischoff K.B. (1979) Chemical reactor analysis and design. John Wiley & Sons, New York

Griot M., Saner U., Heinze E., Dunn I.J. and Bourne J.R. (1988) Fermenter scale-up using oxygen sensitive-culture, *Chem. Eng. Sci.*, **43**, 1903-1908

Hari-Prajitno D., Mishra V.P., Takenaka K., Bujalski W., Nienow A.W. and McKemmie J. (1998) Gas-liquid mixing studies with multiple up- and down-pumping hydrofoil impellers : power characteristics and mixing time. *Can. J. Chem. Eng.*, **76**, 1056-1068

Hiby J.W. (1981) Definition and measurement of the degree of mixing in liquid mixtures. *Int. Chem. Eng.*, **21**, 197-204

Holmes D.B., Voncken R.M. and Dekker J.A. (1964) Fluid flow in turbine-stirred, baffled tanks - I. Circulation time. *Chem. Eng. Sci.*, **19**, 201-208

Ibrahim S. and Nienow A.W. (1995) Power curves and flow patterns for a range of impellers in newtonian fluids: $40 < \text{Re} < 5 \cdot 10^5$. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **73A**, 485-491

Jenne M. and Reuss M. (1997) Fluid dynamic modelling and simulation of gas-liquid flow in baffled stirred tank reactors. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **11(52)**, 201-208

Joshi J.B., Pandit A.B. and Sharma M.M. (1982) Mechanically agitated gas-liquid reactors. *Chem. Eng. Sci.*, **37**, 813-844

Justen P., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. (1996) Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 672-684

Kawase Y. and Moo-Young M. (1989) Mixing time in bioreactors. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **44**, 63-75

Kipke K.D. et Lagier J.C. (1983) Calcul des mobiles aéres. *Information Chimie*, **236**, 117-122

Leclerc J.P., Detrez C., Bernard A. et Schweich D. (1995) DTS : un logiciel d'aide à l'élaboration des modèles d'écoulement dans les réacteurs. *Revue de l'Institut Français du Pétrole*, **50**, 641-656

Lee K.C. and Yianneskis M. (1997) Measurement of temperature and mixing time in stirred vessels with liquid crystal thermography. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **11(51)**, 121-128

Leng D.E. (1991) Succeed at scale-up. *Chem. Eng. Prog.*, **June**, 23-31

Manikowski M., Bodemeier S., Lubbert A., Bujalski W. and Nienow A.W. (1994) Measurement of gas and liquid flows in stirred tanks reactors with multiple agitators. *Can. J. Chem. Eng.*, **72**, 769-781

Manna L. (1997) Comparison between physical and chemical methods for the measurement of mixing times. *Chem. Eng. J.*, **67**, 167-173

Mavros P., Xuereb C. and Bertrand J. (1997) Effect of radial or axial impeller and liquid viscosity on energy dissipation in agitated vessels. *Récents Progrès en Génie des Procédés*, **11(51)**, 51-58

Mayr B., Nagy E., Horvat P. and Moser A. (1994) Scale-up on basis of structured mixing models: a new concept. *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 195-206

Metzner A.B. and Taylor J.S. (1960) Flow patterns in agitated vessels. *AIChE J.*, **6**, 109-114

Midoux N. et Charpentier J.C. (1979) Les réacteurs gaz-liquide à cuve agitée mécaniquement : Partie 1 : hydrodynamique. *Entropie*, **88**, 5-38

Moo-Young M. and Blanch H.W. (1981) Design of biochemical reactors : mass transfer criteria for simple and complex systems. *Adv. Biochem. Eng.*, **19**, 1-69

Mukataka S., Kataoka H. and Takahashi J. (1980) Effects of vessel size and rheological properties of suspensions on the distribution of circulation times in stirred vessels. *J. Ferment. Technol.*, **58**, 155-161

Mukataka S., Kataoka H. and Takahashi J. (1981) Circulation time and degree of fluid exchange between upper and lower circulation regions in a stirred vessel with a dual impeller. *J. Ferment. Technol.*, **59**, 303-307

Nienow A.W. (1990) Gas dispersion performance in a fermenter operation. *Chem. Eng. Prog.*, **February**, 62-71

Nienow A.W. (1993) Introduction to fluid dynamics : stirred bioreactors. Proceedings of the International Symposium on Bioreactor Performance, Helsingør, Denmark, 33-46

Nienow A.W. (1996) Gas-liquid mixing studies : a comparison of Rushton turbines with some modern impellers. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **74A**, 417-423

Nienow A.W. (1997) On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime. *Chem. Eng. Sci.*, **52**, 2557-2565

Nienow A.W. (1998) Hydrodynamics of stirred bioreactors. *Appl. Mech. Rev.*, **51**, 3-32

Norwood K.W. and Metzner B. (1960) Flow patterns and mixing rates in agitated vessels. *AIChE J.*, **6**, 432-437

Ozbas T. and Kutsal T. (1991) Effects of agitation and aeration rates on riboflavin fermentation by *Ashbya gossypii*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **13**, 97-105

Pacek A.W., Chamsart S., Nianow A.W. and Bakker A. (1999) The influence of impeller type on mean drop size and drop size distribution in agitated vessel. *Chem. Eng. Sci.*, **54**, 4211-4222

Pandit A. and Joshi J.B. (1983) Mixing in mechanically agitated gas-liquid contactors, bubble columns and modified bubble columns. *Chem. Eng. Sci.*, **38**, 1189-1215

Reuss M. and Jenne M. (1993) Compartments models, Proceedings of the International Symposium on Bioreactor Performance, Helsingør, Denmark, 63-77

Rewatkar V.B. and Joshi J.B. (1991) Role of sparger design in mechanically agitated gas-liquid reactors. Part 1: Power consumption. *Chem. Eng. Technol.*, **14**, 333-347

Roberts R.M., Gray M.R., Thompson B. and Kresta S.M. (1995) The effect of impeller and tank geometry on circulation time distributions in stirred tanks. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **73A**, 78-86

Rzyski E. (1985) Mixing time (time to homogenization) in the transition region of mixing. *Chem. Eng. J.*, **31**, 75-81

Rzyski E. (1993) Liquid homogenization in agitated tanks. *Chem. Eng. Technol.*, **16**, 229-233

Schugerl K. (1981) Oxygen transfer into highly viscous media. *Adv. Biochem. Eng.*, **19**, 72-174

Shamlou P.A., Makagiansar H.Y., Ison A.P. and Lilly M.D. (1994) Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 2621-2631

Stevens J.M. (1990) Étude de l'influence du milieu de culture sur la turbulence dans un fermenteur, travail de fin d'études 1989-1990, Université de Liège

Vanags, J.J., Rikmanis, M.A., Ushkans, E.J. and Viestur, U.E. (1990) Stirring characteristics in bioreactors. *AIChE J.*, **9**, 1361-1369

van't Riet K. and Tramper J. (1991) Basic Bioreactor Design, Marcel Dekker Inc., New York

Velasco D., Martinez A. and Galindo E. (1994) Hydrodynamics of industrial fermentations: rheology and power draw in rifamycin production. *AIChE Symp. Ser.*, **90(299)**, 157-165

Wernersson E.S. and Tragardh C. (1999) Scale-up of Rushton turbine agitated tanks. *Chem. Eng. Sci.*, **54**, 4245-4256

7. Symboles

A	section	m^2
b	largeur des baffles	m
c	constante	
c_p	chaleur spécifique	J/kg K
ΔC	espacement entre les mobiles	m
ΔC	déviation par rapport au mélange parfait	g/l
$C(\infty)$	concentration après un temps infini	g/l
d	diamètre du mobile d'agitation	m
dT	accroissement de température du liquide	K
dz	paramètre du modèle compartimenté	m
D	diamètre de la cuve	m
fp	paramètre du modèle compartimenté	m^3/s
fr	paramètre du modèle compartimenté	m^3/s
F^*	test de Fischer	
Fl	nombre de pompage	
Fl_c	nombre de circulation	
Fl_E	nombre de pompage d'échange	
Fr	nombre de Froude	
g	accélération de la pesanteur	m/s^2
H_A	débattement (hauteur entre le fond de la cuve et le mobile)	m
H_L	hauteur de liquide	m
H_s	espacement entre deux chicanes	m
k_s	constante dépendant du mobile	
K	index (ou indice) de consistance (loi de puissance)	Pa.s^n
L	hauteur de la pale	m
M	couple exercé par l'agitateur	Nm
M_b	couple exercé sur les joints et les roulements	Nm
M_t	couple total	Nm
n	index (ou indice) de comportement (loi de puissance)	
n_b	nombre de pales d'un mobile	
N	vitesse de rotation	s^{-1} ou rpm

N_p	nombre de puissance	
Δp	perte de charge	Pa
P	puissance dissipée	W
P_g	puissance dissipée en mode aéré	W
Q_E	débit d'échange	m^3/s
Q_g	débit de gaz	m^3/s
Q_p	débit de pompage	m^3/s
Q_c	débit de circulation	m^3/s
r	rayon	m
r_{pc}	sources de perte de chaleur	W
Re	nombre de Reynolds	
s	partie de la pale sur le disque (turbine Rushton)	m
s_e	écart-type (expérience)	
s_r	écart-type (régression)	
t	temps	s
t	variable de Student (statistique)	
T	température	K
U	vitesse de l'écoulement	m/s
v_k	vitesse (Kolmogoroff)	m/s
v_p	vitesse périphérique	m/s
V	volume de fluide	m^3
V_c	vitesse de circulation	m/s
V_e	volume équivalent de liquide	m^3
V_g	vitesse superficielle du gaz	m/s
w	largeur de la pale	m
We	nombre de Weber	
x	épaisseur des pales	m
x_d	épaisseur du disque entre les pales pour une turbine à disque	m
α	angle des pales du mobile	$^\circ$
$\dot{\gamma}$	vitesse de cisaillement	s^{-1}
ε_{loc}	puissance spécifique locale	W/kg
ε_T	puissance spécifique moyenne	W/kg

ζ	coefficient de frottement	
θ_c	temps de circulation	s
θ_m	temps de mélange à 95%	s
λ_k	échelle de Kolmogoroff	m
μ	viscosité dynamique	Pa.s
μ_a	viscosité apparente	Pa.s
ν	viscosité cinématique	m/s ²
ρ	densité	kg/m ³
σ	tension superficielle	N/m
τ	tensions de cisaillement	Pa
Φ	fraction du volume de dissipation d'énergie maximale	

Annexe III.1

Programme de modélisation du fermenteur

Il se compose d'une routine principale qui lit les données et impose les conditions initiales, puis appelle une sous-routine contenant le modèle proprement dit, qui lui-même fait appel à une troisième routine comprenant les équations de bilan. Ces dernières sont des équations différentielles résolues par une routine de type Runge-Kutta.

Les commentaires sont indiqués en italique et précédés du signe "%"'

1. Programme principal

```
% fichier : tex=première colonne et cex=deuxième colonne
global cinit
global c4
global c5
global c6

load d:\docsg\hydro\mctr450.dat           % lecture des points expérimentaux.
data=mctr450;

% la première colonne est appelée "t" et la deuxième "c"
tbrut=data(:,1);
cbrut=data(:,2);

% Fichier brut : il faut soustraire le premier temps de tous les autres
tzero=tbrut(1);
tex=tbrut-tzero;

% si l'absorbance à l'origine n'est pas nulle:
cmin=min(cbrut);
cgex=cbrut-cmin;

% calcul de la concentration d'équilibre de cex (sur les 50 derniers points)
[nex zx]=size(cgex);
cmel=mean(cgex((nex-50):nex));

% normation des concentrations par la concentration d'équilibre
cex=cgex./cmel;

% xp0 : valeurs initiales des paramètres (le nombre et l'ordre doit être cohérent avec la
% routine contenant le modèle

% Paramètres : xp=[fp dz cinit] (fp en m3/seconde et dz en cm)
xp0=[0.1 4. 10.];                         % valeurs initiales des paramètres
lb=[0.0001 2. 1.];                         % bornes inférieures des paramètres
ub=[50.0 14. 100.];                        % bornes supérieures des paramètres
[par,resnorm,residual,exitflag,output,lambda,jacobian]=lsqcurvefit('braun8b',xp0,tex,cex,lb,ub)
```

```

[zz nparam]=size(par);
% nombre de paramètres
R=sum(residual.^2);
% Somme des carrés des résidus
ddl=nex-nparam;
% nombre de degrés de liberté
s2=R/ddl;
% estimation du carré de l'erreur sur l'ajustement
J=jacobian;
B=inv(J'*J)*s2;
% matrice de covariance
for i=1:nparam
    stdpar(i)=B(i,i)^0.5;
    % écart standard des paramètres
end

% intervalle de confiance des paramètres à 95%:
% si le nombre de ddl > 120 : on a t=1.960
for i=1:nparam
    lowpar(i)=par(i)-stdpar(i)*1.96;
    highpar(i)=par(i)+stdpar(i)*1.96;
end

% Calcul de la matrice de corrélation des paramètres
for i=1:nparam
    for j=1:nparam
        corcoef(i,j)=B(i,j)/sqrt(B(i,i)*B(j,j));
    end
end

% Calcul du temps de mélange sur la courbe ajustée: cest (lissée par l'ajustement)
cest=cex+residual;
[nest zz]=size(cest);
cestinf=cest(nest);
cmel95=0.95*cestinf;
% trouver les points qui sont SOUS la limite
ii=find(cest<cmel95);
ni=size(ii);
% et le mélange correspond au temps qui suit directement le DERNIER point sous la limite
ind=ii(ni);
tm=tex(ind+1);
tm95=tm(1);

% fp
fp=par(1)*1e-03;
stdfp=stdpar(1)*1e-03;
lowfp=lowpar(1)*1e-03;
highfp=highpar(1)*1e-03;

% diamètre de la zone centrale: dz
dz=par(2)*1e-02;
stddz=stdpar(2)*1e-02;
lowdz=lowpar(2)*1e-02;
highdz=highpar(2)*1e-02;

% concentration initiale:c0
c0=par(3);

```

```

stdc0=stdpar(3);
lowc0=lowpar(3);
highc0=highpar(3);

% Affichage des résultats
exitflag
sprintf('%c','Paramètre','Estimation','Ecart std','Low95','High95')
sprintf('%c','fp',fp,"stdfp","lowfp","highfp")
sprintf('%c','dz',dz,'stddz',"lowdz","highdz")
sprintf('%c','cinit',c0,"stdc0","lowc0","highc0")
s2
dll
corcoef
tm95
diff

% Graphique de comparaison des courbes
figure
hold on
plot(tex,cex,'g',tex,cest,'r')
grid
%plot(tex,c4,'b',tex,c5,'c')
title('mctr450 : Braun-8B avec fp et dz ajustés')
xlabel('Temps (s)')
ylabel('Concentration normée C6')
legend('expérience','ajustement')

% Pour faire joli sur le dessin avec le mélange:
for i=1:nex
    clim(i)=cmel95;
end
plot(tex,clim,'b')

text(17,0.35,['fp = ' num2str(fp) ' +/- ' num2str(stdfp) ' m³/s'])
text(17,0.25,['dz = ' num2str(dz) ' +/- ' num2str(stddz)])
text(6,0.25,['s² = ' num2str(s2)])
text(3,1.15,['tm95 = ' num2str(tm95) ' sec. '])
text(17,0.7,[num2str(corcoef)])
text(12,1.3,['Exitflag = ' num2str(exitflag)])

```

2. Sous-routine contenant le modèle

```

function k=braun8b(xp,tex)
% contient le modèle
% tex contient les variables indépendantes points xi
% xp contient les paramètres
% k est le vecteur donnant les estimations (à comparer à l'expérience)

% braun8b calls mbraun8
global fp

```

```

global cinit
global vm
global va
global nc
global c4
global c5
global c6

% déclaration des paramètres
fp=xp(1)*1e-03;
dz=xp(2)*1e-02;
cinit=xp(3);
hliq=0.2946; % hauteur de liquide (m)
dtr=0.056; % diamètre des TR (m)
di=0.102; % diamètre des Intermig (m)
vm=pi*dz ^ 2/4*hliq/5; % volume des 5 compartiments de la zone des mobiles (m³)
va=pi*(0.147 ^ 2-dz ^ 2)/4*hliq/3; % volume des 3 compartiments de la zone annulaire (m³)

t0=0;
tf=60;
tspan=[t0 tf];

% nc = nombre total de cuves dans le modèle
nc=8;

x0=zeros(1,nc);
x0(7)=cinit;

[t,x]=ode23('mbraun8',tspan,x0);

% Remise de x(:,6) (=c6) au même temps que les pts expérim.
k=spline(t,x(:,6),tex);
c6=k;
%c4=spline(t,x(:,4),tex);
%c5=spline(t,x(:,5),tex);

```

3. Équations de bilan

```

function ff=mbraun8(t,x)

% appelé par braun8 (ajustement).
% modèle avec 8 cuves,
% échange entre les zones des mobiles (fp)
% concentration initiale cinit (resizée pour les autres)

```

```

global fp
global cinit
global vm
global va
global nc

```

% Définition des variables locales

```
c1=x(1);  
c2=x(2);  
c3=x(3);  
c4=x(4);  
c5=x(5);  
c6=x(6);  
c7=x(7);  
c8=x(8);
```

% Équations de bilan entre les cuves

```
f(1)=(c7*fp+c4*fp+c2*fp-c1*(fp+fp+fp))/vm;  
f(2)=(c1*fp+c5*fp+c3*fp-c2*(fp+fp+fp))/vm;  
f(3)=(c2*fp+c6*fp+c8*fp-c3*(fp+fp+fp))/vm;  
f(4)=(c1*fp-c4*fp)/va;  
f(5)=(c2*fp-c5*fp)/va;  
f(6)=(c3*fp-c6*fp)/va;  
f(7)=(c1*fp-c7*fp)/vm;  
f(8)=(c3*fp-c8*fp)/vm;
```

% vecteur ligne => colonne

```
ff=f';
```

Annexe III.2

Modèles compartimentés

1. Description des modèles

La numérotation des modèles (entre parenthèses sur les légendes des figures) se compose du nombre de compartiments suivi du nombre de paramètres (par exemple un modèle à 6 cuves et 1 paramètre est noté 6-1). Les volumes des différentes cuves sont imposés comme suit :

- le diamètre des cuves centrales est égal à celui du mobile d'agitation (0.056 m pour les turbines Rushton et 0.102 m pour les Intermig), et leur hauteur vaut 1/5 de la hauteur de liquide (0.30 m);
- les 3 cuves latérales se répartissent le reste du volume (soit 5 litres moins le volume de la zone centrale, divisé par 3).

Dans le modèle à trois cuves (une pour chaque mobile) représenté à la Figure 1, les cuves sont reliées par un flux noté fp (pompage) : modèle **3-1**.

Un modèle à cinq compartiments est obtenu en disposant deux cuves latérales entre les cuves des mobiles (Figure 2) : modèle **5-1**.

Si l'on représente chaque mobile par une cuve centrale + une cuve latérale, on obtient un modèle à six cuves sans échange entre les cuves latérales (Figure 3a) : modèle **6-2a**. Mais cela correspond en fait à mettre 5 cuves en séries avec une seule cuve latérale échangeant avec la cuve centrale médiane. C'est pourquoi nous avons ajouté un échange entre les cuves latérales, identique à fp (Figure 3b) : modèle **6-2b**. Les flux entre les cuves centrales fp (flux de pompage) et ceux vers les cuves latérales fr (pour *radial*) sont différenciés.

La Figure 4 représente le modèle à 8 cuves "non dépliable" (avec de "vraies" cuves latérales) : les 3 cuves des mobiles + 1 cuve latérale pour chacun + 1 cuve supérieure + 1 cuve inférieure (ces deux cuves empêchant la simple mise en série et conservant leur caractère "latéral" aux cuves externes). Le modèle **(8-1)** se réfère au modèle à 8 cuves et 1 paramètre fp alors que le modèle **(8-2)** désigne celui à 8 cuves et 2 paramètres fp et dz , le diamètre ajusté de la zone des mobiles.

Le modèle comportant 9 compartiments est basé sur celui proposé par Moser (Mayr et al., 1994) avec une seule cuve latérale (ce choix se justifiant par le faible diamètre de la cuve) (Figure 5). Le

modèle **9-2** comprend deux paramètres fp et fr alors que dans le modèle **9-1** ces deux flux sont identiques et désignés par le seul paramètre fp .

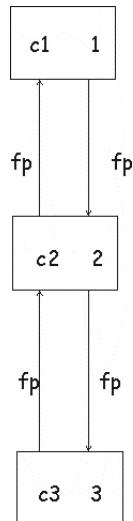


Figure 1 : Modèles compartimentés à 3 cuves (3-1)

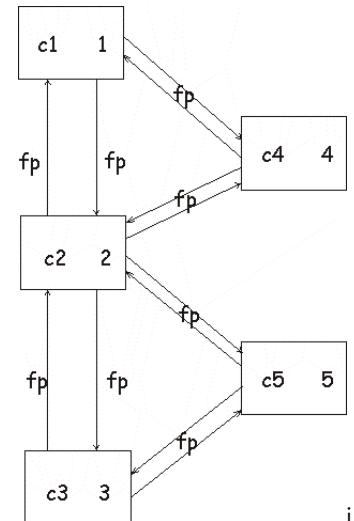


Figure 2 : Modèles compartimentés à 5 cuves (5-1)

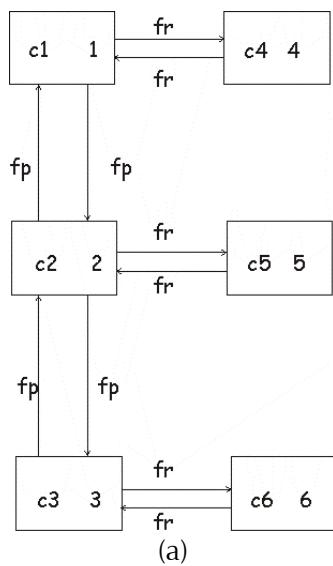
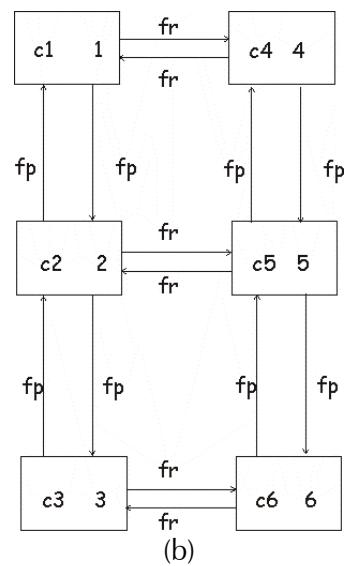


Figure 3 : Modèles à 6 cuves (a) sans échange entre les cuves latérales (6-2a)
(b) avec échange entre les cuves latérales (6-2b)



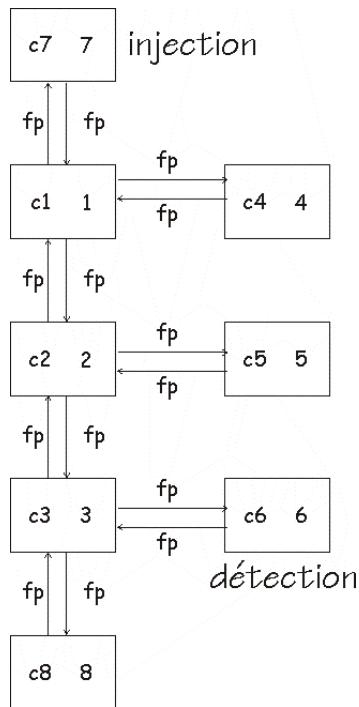


Figure 4 : Modèle à 8 cuves avec le même flux d'échange fp entre tous les compartiments (8-1)

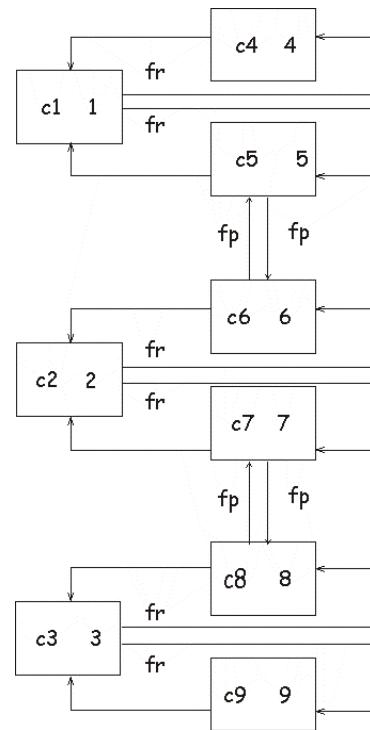


Figure 5 : Modèle à 9 cuves selon Moser (Mayr et al., 1994) (9-2)

2. Discrimination entre les modèles

Une discrimination a été faite entre les modèles présentés ci-dessus sur base de l'ajustement effectué sur la moyenne des essais à 450 rpm avec les turbines Rushton.

Le rapport des variances de deux modèles comparé sur base du test de Fisher. Il est direct dans notre cas puisque le nombre de degrés de liberté est suffisamment grand pour que l'on considère que la valeur de F^* vaut 1. Le nombre de points moins le nombre de paramètres est assimilé au nombre de degrés de liberté bien que certaines polémiques existent en ce qui concerne le nombre de degrés de liberté à attribuer à un essai de traceur où tous les points de l'acquisition ne sont pas vraiment indépendants.

Le modèle (9-2) a été disqualifié d'office (malgré ses bons résultats apparents) du fait du problème de sensibilité paramétrique qu'il soulevait. En effet, selon le point de départ, les valeurs obtenues pour les paramètres variaient fortement :

Tableau 1 : Valeur des paramètres du modèle (9-2) en fonction des valeurs initiales

Valeurs initiales	<i>fp</i> (erreur)	<i>fr</i> (erreur)	<i>s_r</i> ²
<i>fp</i> = 0.01 <i>fr</i> = 0.01	0.0011 (1.1 10 ⁻⁵)	0.012 (0.00011à)	0.00045
<i>fp</i> = 0.1 <i>fr</i> = 0.1	0.0046 (0.00018)	0.0015 (2.6 10 ⁻⁵)	0.00016
<i>fp</i> = 1.0 <i>fr</i> = 1.0	0.0017 (3.5 10 ⁻⁵)	0.0031 (7.7 10 ⁻⁵)	0.00029

La variation est surtout impressionnante pour *fr* (facteur 10). Il était impossible de quadriller le plan des points initiaux pour ensuite retenir celui qui donnait le meilleur ajustement. Si on regarde ce modèle d'un peu plus près (en le "dépliant" verticalement), on s'aperçoit en fait qu'il s'agit uniquement de cuves en séries, avec des flux d'échange différents entre les étages (*fp* ou *fr*). Ceci explique le fait que la forte influence des valeurs initiales des paramètres, comme déjà souligné au § 4.5.1 du Chapitre III.

Pour éliminer toute ambiguïté, nous avons testé ce même modèle avec un seul débit d'échange *fp*, noté (9-1). Les résultats de la comparaison avec le modèle (8-2) sont présentés au Tableau 2.

Tableau 2 : Discrimination entre les modèles

Modèle (paramètres)	Figure	<i>s_r</i> ²	<i>s_r</i> ² / <i>s_r</i> ² (8-2)
3-1 (fp)	Figure 1	0.00050	2.94
5-1 (fp)	Figure 2	0.00026	1.53
6-2 a (fp,fr) sans éch. lat.	Figure 3 a	0.00026	1.53
6-2 b (fp,fr) avec éch. lat.	Figure 3 b	0.00024	1.41
9-2* (fp,fr)	Figure 5	?	?
9-1** (fp)	Figure 5 avec <i>fr</i> = <i>fp</i>	0.00021	1.24
8-1 (fp)	Figure 4	0.00067	3.94
8-2 (fp,dz)	Figure 4	0.00017	1

* varie selon des valeurs initiales des paramètres

** avec un seul débit *fp* identique partout

Le meilleur ajustement est obtenu avec est le modèles (8-2), comportant à huit cuves avec un seul débit d'échange *fp* entre les compartiments et ajustement du diamètre de la zone des mobiles *dz* (Figure 4).

CHAPITRE IV

MORPHOLOGIE

1. INTRODUCTION.....	1
2. ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	2
2.1. L'ANALYSE D'IMAGES	2
2.2. LES APPLICATIONS EN BIOTECHNOLOGIE.....	3
2.3. LES GRANDEURS MESURABLES.....	3
2.3.1. Le nombre de connexités et nombre de trous.....	3
2.3.2. Le nombre d'interceptions.....	4
2.3.3. Les mesures de taille.....	4
2.3.4. Les mesures de forme	6
2.4. LES LIMITES DE LA MÉTHODE	6
2.5. LES APPLICATIONS DE L'ANALYSE D'IMAGES AUX MICRO-ORGANISMES FILAMENTEUX	7
2.5.1. La préparation des échantillons.....	7
2.5.2. La différenciation et la classification	8
2.5.3. Les mesures quantitatives sur les filaments	9
2.5.4. Les mesures quantitatives sur les pelotes et agrégats.....	10
2.6. LES FACTEURS INFLUENÇANT LA MORPHOLOGIE DES MICRO-ORGANISMES FILAMENTEUX.....	11
3. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	13
3.1. LE CHOIX DE L'ÉCHANTILLON	13
3.2. LA PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS	14
3.3. L'ACQUISITION DES IMAGES.....	15
3.4. LE TRAITEMENT NUMÉRIQUE DES IMAGES	16
3.4.1. Le nettoyage des images	17
3.4.1.1. L'extraction des contours 	19
3.4.1.2. Le seuillage 	21
3.4.1.3. La réunion des images obtenues 	22
3.4.1.4. L'extraction des noyaux 	22
3.4.1.5. La réunion des cœurs et des chevelures 	24
3.4.2. La nature des objets traités.....	26
3.4.3. Les mesures.....	27
3.4.4. La discrimination entre crasses et pelotes	27
4. RÉSULTATS	29
4.1. LES RÉSULTATS DES DIFFÉRENTES FERMENTATIONS	29
4.2. LA REPRÉSENTATIVITÉ DES MESURES.....	32

4.3.	LA DISTRIBUTION DES FRÉQUENCES DES VALEURS DE L'AIRE (TURBINES RUSHTON À 300 RPM).....	33
4.4.	L'INFLUENCE DE LA CHRONOLOGIE	35
4.5.	L'INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN OXYGÈNE DISSOUS	36
4.6.	L'INFLUENCE DE L'INOCULUM.....	37
4.7.	L'INFLUENCE DES CONDITIONS HYDRODYNAMIQUES SUR LA MORPHOLOGIE.....	38
4.7.1.	L'aire	40
4.7.2.	Le diamètre équivalent.....	48
4.7.3.	Le périmètre de Crofton.....	50
4.7.4.	Le diamètre de Féret maximum	52
4.7.5.	Le diamètre de Féret minimum.....	54
4.7.6.	Le nombre de trous	56
4.7.7.	La circularité	58
4.7.8.	L'échelle de Kolmogoroff	60
5.	MESURES COMPLÉMENTAIRES	64
5.1.	MESURES ADIMENSIONNELLES	64
5.1.1.	Rapport diamètres de Féret	64
5.1.1.1.	Valeurs moyennes.....	64
5.1.2.	Nombre de trous par unité de surface	67
5.2.	ÉVOLUTION DE LA MORPHOLOGIE	68
6.	CONCLUSIONS SUR LA MORPHOLOGIE.....	71
7.	BIBLIOGRAPHIE.....	75
8.	SYMBOLES	80

Chapitre IV

MORPHOLOGIE

1 Introduction

Pour rappel, la première étape de ce travail a été la sélection d'une bactérie filamentueuse sensible au stress hydrodynamique *Actinomadura R39*. Après mise au point d'un milieu de culture simple mais performant, elle a été cultivée dans un fermenteur de cinq litres à cuve agitée, équipé de trois mobiles d'agitation identiques. Ces mobiles peuvent être de deux types : des turbines Rushton (écoulement radial, diamètre égal à 56 mm) ou des Intermig (écoulement axial-radial, diamètre égal à 102 mm). Les cultures ont été menées à différentes vitesses d'agitation : 300, 450, 600 et 900 rpm avec turbines Rushton, et 247 et 329 avec les Intermig. La grandeur de référence est la vitesse périphérique des pales (*Chapitre I*).

Toutes les cultures ont donné des résultats similaires en termes de production de biomasse. Malgré les différentes conditions d'agitation, la croissance d'*Actinomadura R39* ne semble pas trop affectée par le stress hydrodynamique. Cette caractéristique en fait un capteur morphologique satisfaisant : une différence de la morphologie des pelotes d'*Actinomadura R39* dans diverses conditions de culture sera due à l'action directe des contraintes liées au stress hydrodynamique sur les pelotes et non pas à une modification de sa croissance. L'outil le plus approprié pour cette caractérisation est l'analyse d'images.

Dans ce quatrième chapitre, nous rappellerons les applications de l'analyse d'images aux procédés biologiques, et plus particulièrement aux micro-organismes filamentueux. Nous présenterons l'algorithme qui nous a permis d'extraire l'information contenue sur les plaques de microscope réalisées à partir des échantillons prélevés lors des fermentations présentées au *Chapitre I*. Nous étudierons ensuite les relations qui peuvent exister entre la morphologie des pelotes d'*Actinomadura R39* et les conditions hydrodynamiques régnant dans le fermenteur (qui seront notamment caractérisées par le modèle compartimenté présenté au *Chapitre III*).

2 Étude bibliographique

2.1 L'analyse d'images

L'analyse d'images est basée sur des concepts mathématiques qui permettent de décrire des images de provenances diverses (Coster et Chermant, 1985). Elle ne forme pas un bloc monolithique en raison même de son universalité. Les méthodes et techniques employées dépendent essentiellement de la nature des images à analyser et du but que se fixe l'expérimentateur. On peut diviser l'analyse d'images en deux grands domaines, utilisant chacun des techniques spécifiques :

- le premier a pour objectif l'identification des formes en les comparant à celles d'images type : on l'appelle **reconnaissance des formes** (par exemple reconnaissance des caractères alphabétiques ou tri d'objets) et peut aboutir à la **classification** des objets étudiés.
- le second concerne l'analyse morphologique des structures et la quantification de cette morphologie par des grandeurs : ce que l'on appelle plus communément **l'analyse quantitative d'images**. Cet aspect quantitatif permet l'établissement de relation entre des caractéristiques morphologiques et d'autres propriétés représentant des caractéristiques biologiques, botaniques, chimiques, géologiques, mécaniques, métallurgiques, physiques, etc. L'analyse d'images est utilisée, par exemple, pour déceler des cellules cancéreuses ou pour optimiser la résistance d'un acier ou d'une céramique à partir de la connaissance des corrélations entre ses caractéristiques morphologiques et mécaniques.

Les domaines d'application sont nombreux (sciences des matériaux, de la vie, de la terre, robotique, etc.) mais les outils restent très proches. Il serait d'ailleurs souvent difficile, sans légende, de faire la différence entre des images de provenances totalement différentes, que ce soit par la nature des échantillons ou par leur échelle (photo satellite ou provenant d'un microscope optique ou électronique).

Un système d'analyse d'images se présente globalement sous la forme suivante : un échantillon est transformé en image via un système optique. Cette image est digitalisée et traitée par un logiciel qui permet d'en extraire les informations, qui seront ensuite analysées au moyen de méthodes statistiques.

Nous ne nous attarderons pas ici sur les bases techniques de l'analyse d'images, qui constitue un outil et non une d'étude en soi dans le cadre de ce travail. Quelques notions sont reprises dans l'*Annexe IV.1 : Notions d'analyse d'images*.

2.2 ***Les applications en biotechnologie***

L'utilisation de l'analyse d'images en biotechnologie voit ses possibilités se développer en parallèle avec la puissance de calcul des ordinateurs et la robotisation des installations. De nombreuses tâches peuvent ainsi être automatisées, accroissant le champ d'application de la technique.

Les applications de l'analyse d'images en biotechnologie se répartissent en quatre grands domaines (Vivier et Pons, 1994; Thomas, 1993; Vecht-lifshitz and Ison, 1992; Pichon, 1993):

1. le comptage et la croissance des micro-organismes, et la détermination de la concentration en biomasse. L'utilisation de colorations vitales permet également de distinguer la biomasse active (vivante);
2. la caractérisation de la morphologie;
3. la mesure de concentrations intracellulaires (ARN, calcium, potassium, etc.);
4. l'automatisation de certains appareils d'analyse (lecture de gels d'électrophorèse, par exemple).

Nous nous intéresserons plus particulièrement aux applications et aux mesures spécifiques aux micro-organismes filamentueux.

2.3 ***Les grandeurs mesurables***

On doit tout d'abord rechercher les grandeurs qui décrivent correctement l'image. L'analyse peut être *globale* (tout l'espace à étudier est accessible, c'est-à-dire l'ensemble des objets) ou *locale* dans le cas contraire. Dans ce cas, on ramène ces grandeurs à l'unité d'espace dans lequel ils sont considérés (unités de volume, d'aire, de longueur). Parmi les plus courants dans le cadre qui nous intéresse, on peut citer :

2.3.1 **Le nombre de connexités et nombre de trous**

Quel que soit l'espace considéré, il y aura toujours une mesure de base : on l'appelle le *nombre de connexités*. Il peut être assimilé au *nombre d'objets distincts* constituant l'ensemble. Un ensemble

est dit connexe si pour deux points lui appartenant on peut trouver un chemin allant d'un point à l'autre entièrement dans cet ensemble (Coster et Chermant, 1985; Vivier et Pons, 1994). Par la construction d'Euler-Poincaré, le nombre de connexités permet de déterminer le nombre de trous dans un objet (Coster et Chermant, 1985; Vivier et Pons, 1994).

2.3.2 Le nombre d'interceptions

Une autre propriété est le *nombre d'interceptions*. On détermine le nombre de points de contour (c'est-à-dire d'entrées ou de sorties de l'objet, voir Figure 1) selon une direction donnée ou un ensemble de directions (on obtient alors la rose des interceptions) (Pichon, 1993).

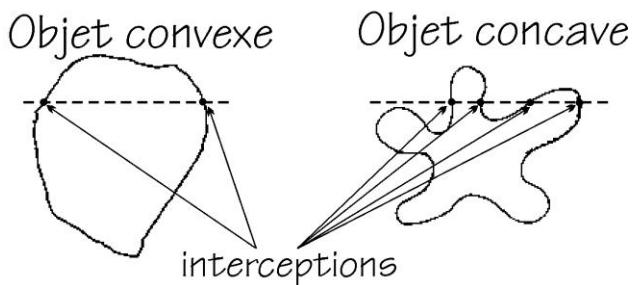


Figure 1 : Objets convexes et concaves, et interceptions
(d'après Vivier et Pons, 1994)

2.3.3 Les mesures de taille

Parmi les mesures les plus intéressantes pour l'analyse d'images de bactéries, on trouve (Paul and Thomas, 1997):

- **l'aire ou l'aire projetée** : aire de la projection d'un objet tridimensionnel en une image bidimensionnelle. Elle est généralement obtenue par comptage du nombre de pixels composant un objet
- **le périmètre** : longueur de la frontière (totale) d'un objet (y compris les frontières intérieures si l'objet comporte des trous). **Le périmètre de Crofton** est calculé non pas en comptant les pixels de bord mais en faisant la moyenne du produit du nombre d'interceptions selon une direction donnée (voir la Figure 1) par la distance entre deux interceptions, pris selon plusieurs directions (dont les angles sont choisis par les programmes d'analyse d'images). Cette procédure est plus précise que le comptage des pixels des bords du fait que les pixels sont sur une grille rectilinéaire, ce qui rend nécessaire l'inclusion des distances inter-diagonales entre les pixels là où c'est approprié, sinon un carré et son cercle inscrit sembleraient avoir le même périmètre (Paul and Thomas, 1997).

- **le périmètre convexe** (Figure 2) : longueur du périmètre obtenu en joignant les points extérieurs (c'est-à-dire en remplaçant les concavités d'un objet : voir la Figure 1 pour des exemples d'objets convexes et concaves)

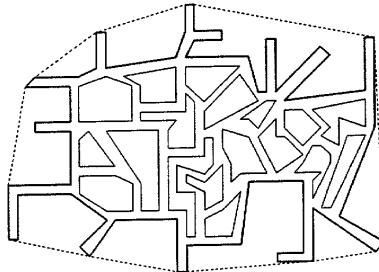


Figure 2 : Périmètre convexe (en pointillés) (Tucker *et al.*, 1992)

- **l'aire convexe** : aire comprise dans le périmètre convexe
- **le diamètre équivalent** : diamètre d'un cercle ayant la même surface que l'objet mesuré :

$$de = \sqrt{\frac{4 * \text{Aire}}{\pi}}$$

- **la largeur et la longueur (diamètres de Féret)** : ils correspondent à un diamètre mesuré par une paire de compas. Ils sont obtenus par projections de l'objet sur les axes des x et/ou des y et ils prennent alors le nom de diamètres de Féret horizontaux et verticaux. Ces valeurs sont généralement biaisées car elles dépendent de l'orientation (Vivier et Pons, 1994). Une alternative consiste à mesurer ces diamètres selon plusieurs directions : on parle alors de *rose des diamètres de Féret*, et il peut être intéressant d'en considérer les valeurs maximale et minimale.

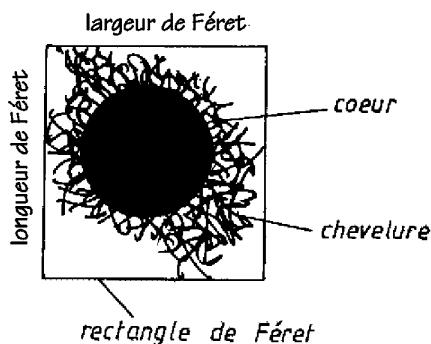


Figure 3 : Diamètres de Féret d'une pelote (Vivier et Pons, 1994)

2.3.4 Les mesures de forme

Certaines grandeurs provenant de la géométrie Euclidienne, et que l'on qualifie d'*indices de forme*, permettent de caractériser un objet.

La **circularité** est un facteur de forme qui compare l'objet à un disque plein (Paul and Thomas, 1997). Cette mesure est dérivée de l'aire et du périmètre (y compris les contours à l'intérieur, et pris au carré pour obtenir une grandeur adimensionnelle) :

$$\text{circularité} = \frac{\text{périmètre}^2}{4 \pi \text{ aire}} \quad (-) \quad (1)$$

Ce facteur vaut 1 pour un disque plein (valeur minimale).

Dans le cas d'objets concaves, on fait souvent référence à l'*enveloppe convexe de la forme* (Figure 2). Elle donne une mesure de la proportion de vide d'une particule (Paul and Thomas, 1997). On définit l'**index de concavité en surface** ou la **compacité** par le rapport de l'aire de l'objet sur l'aire de son enveloppe convexe. Dans le cas d'un objet convexe, cet index vaut 1 (la forme et l'enveloppe sont confondues) (Vivier et Pons, 1994).

$$\text{compacité} = \frac{\text{aire réelle}}{\text{aire convexe}} \quad (-) \quad (2)$$

2.4 Les limites de la méthode

Les systèmes étudiés doivent être homogènes (c'est-à-dire que l'ensemble des éléments qui les composent doivent posséder des propriétés proches) afin de permettre l'analyse statistique des mesures effectuées (pour pouvoir caractériser le système à partir d'un échantillon) (Vivier et Pons, 1994).

La préparation des échantillons est une étape essentielle du processus, ainsi que la première source d'erreur, chronologiquement parlant. Les erreurs suivantes proviennent du dispositif de visualisation (résolution du microscope, projection 2D d'un objet 3D) et d'acquisition (résolution de la caméra). La numérisation introduit également un biais par rapport à l'image analogique. Enfin la méthode statistique de traitement des mesures introduit à son tour une dernière approximation, puisque l'ensemble de la population est caractérisé par un échantillon.

2.5 *Les applications de l'analyse d'images aux micro-organismes filamentueux*

La préparation des échantillons revêt une certaine importance dans la mesure où elle dépend des buts poursuivis par l'analyse. Dans le cas des micro-organismes filamentueux, les utilisations les plus souvent rencontrées sont la classification (étude de la répartition des différentes formes de morphologie) et les mesures quantitatives (taille, etc.).

2.5.1 La préparation des échantillons

Les images peuvent être enregistrées à partir d'échantillons liquides sur une plaque ou dans un petit bac (à traiter directement après l'échantillonnage) ou fixés sur des lames de microscope (ce qui permet une conservation à plus ou moins long terme).

Si on utilise l'échantillon en phase liquide, on peut bloquer le métabolisme des bactéries avant de les remettre en suspension en fixant le prélèvement par un mélange d'acide acétique, de formaldéhyde et d'éthanol (Tucker *et al.*, 1992; Packer *et al.*, 1992; Durant *et al.*, 1994b).

L'utilisation de divers colorants permet d'augmenter les contrastes ou de mettre en évidence le métabolisme des micro-organismes (certains colorants ne se fixant que dans des zones ayant une activité particulière). Parmi les plus utilisés, on trouve le violet cristallisé (ou violet de méthyle, réactif de détermination Gram) (Durant *et al.*, 1994a; Durant *et al.*, 1994b), le trypan bleu (Tucker *et al.*, 1992; Packer and Thomas, 1990), le rouge neutre (Paul *et al.*, 1994), le "cotton blue" (Cox and Thomas, 1992), le bleu de méthylène (Packer and Thomas, 1990; Vanhoutte *et al.*, 1995), la fuschine de Ziehl (Vanhoutte *et al.*; 1995; Pichon, 1993).

La coloration au violet cristallisé peut être suivie d'une décoloration (Durant *et al.*, 1994a; Durant *et al.*, 1994b). Cette méthode permet de mettre en évidence le cœur compact d'une pelote (Figure 4) qui n'est pas décoloré, contrairement à la chevelure ou à des agrégats ou filaments qui sont décolorés beaucoup plus rapidement (du fait de la diffusion plus aisée des réactifs). Cette procédure est un moyen de mettre en évidence différentes morphologies et est utilisée pour la classification.

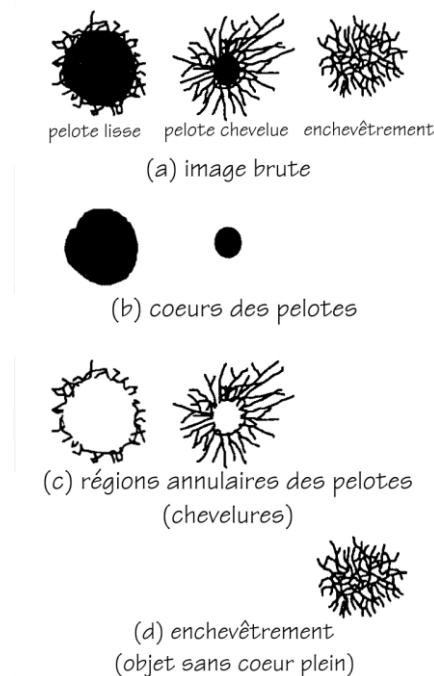


Figure 4 : Pelotes et enchevêtrement : (a) exemples, (b) cœur, (c) chevelure, (d) enchevêtrement (Paul and Thomas, 1997)

2.5.2 La différenciation et la classification

La Figure 5 propose une vue d'ensemble des classifications des micro-organismes filamentueux sur base de la présence ou non d'un cœur ou noyau compact, de la complexité des objets, ou de paramètres physiologiques.

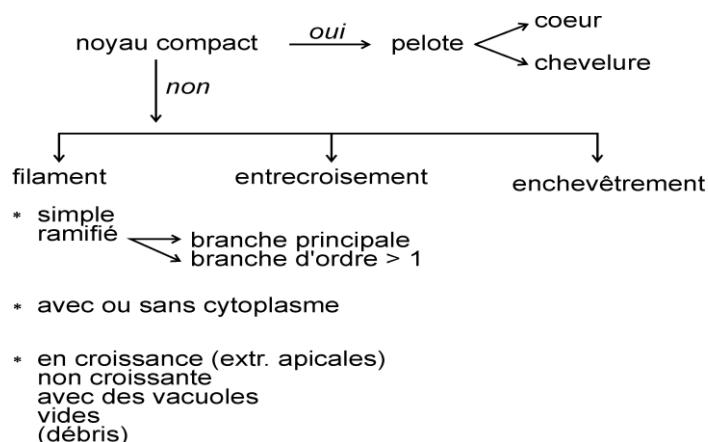


Figure 5 : Schéma de classification des objets

Les filaments peuvent être simples (Figure 6a) ou ramifiés (Figure 6b). La branche principale (ou d'ordre 1) est le plus long trajet que l'on peut parcourir dans le filament. Les branches secondaires sont d'ordre 2 si elles partent de la branche d'ordre 1, etc.

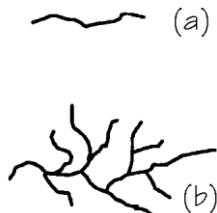


Figure 6 : Filaments (a) simple, (b) ramifié

On fait parfois une différence entre les entrecroisements et les enchevêtrements selon la taille et le degré de complexité des objets. Nous ne rentrerons pas dans ces détails et les désignerons par le terme générique d'*agrégats* (par opposition aux filaments).

Différents critères sont applicables pour différencier les classes, tels que la taille (Reichl *et al.*, 1992b), le nombre de trous (Logan and Wilkinson, 1991; Patankar *et al.*, 1993), le résultat après squelettisation (Tucker *et al.*, 1992; Durant *et al.*, 1994a) ou coloration/décoloration avec éventuellement choix du seuillage (Durant *et al.*, 1993; Durant *et al.*, 1994a; Durant *et al.*, 1994b), le nombre d'ouvertures possibles (Cox and Thomas, 1992), un critère d'enchevêtrement ou l'utilisation de la logique floue (Pichon, 1993), la lecture des différents canaux dans le cas d'une acquisition couleur (Durant *et al.*, 1994b), etc.

2.5.3 Les mesures quantitatives sur les filaments

Différentes mesures sont réalisables sur les filaments libres (Belmar-Beiny and Thomas, 1991; Tucker *et al.*, 1992; Packer *et al.*, 1992; Thomas, 1993; Larralde-Corona *et al.*, 1994; Nielsen, 1993; Reichl *et al.*, 1990; Reichl *et al.*, 1992a; Yang *et al.*, 1992; Packer and Thomas, 1990; Adams and Thomas, 1988, Metz *et al.*, 1981; Lejeune *et al.*, 1995):

- longueur totale, longueur de l'hyphe principale et des branches d'ordre supérieur à 1, longueur des segments entre deux branchements;
- nombre d'extrémités ou de branchements;
⇒ calcul d'unité de croissance hyphale (longueur totale/nombre d'extrémités);
- proportion des différentes branches;
- angles de branchement;

- surface;
- périmètre;
- diamètre moyen;
 - ⇒ calcul d'une longueur adimensionnelle (longueur hyphe principale/diamètre moyen).

On peut également mesurer diverses grandeurs physiologiques, en ayant par exemple recours à des colorations spécifiques (les extrémités en croissance sont colorées par le rouge neutre) ou par choix du niveau de seuillages (pour différencier les zones avec ou sans cytoplasme ou les vacuoles) (Paul *et al.*, 1994) :

- surface des zones cytoplasmiques ou dégénérées (et volume par le diamètre) et poids sec par la somme pondérée (Packer *et al.*, 1992);
- distinction entre 4 zones : en croissance ou non, contenant des vacuoles (qui sont des cavités du cytoplasme des cellules renfermant diverses substances en solution dans l'eau), vides;
- distinction entre 3 états : en croissance, en production, inactive (ou dégénérée);
- relation entre la vitesse de croissance et les variations de longueur et du nombre d'extrémités (Larralde-Corona *et al.*, 1994; Nielsen, 1993).

2.5.4 Les mesures quantitatives sur les pelotes et agrégats

Les pelotes et agrégats se prêtent à différentes mesures (Tucker *et al.*, 1992; Logan and Wilkinson, 1991; Thomas, 1993; Durant *et al.*, 1994a; Durant *et al.*, 1994b; Cox and Thomas, 1992) :

- périmètre (réel et convexe);
- surface (réelle et convexe);
 - ⇒ calcul de la circularité;
 - ⇒ calcul de la compacité;
- porosité;
- nombre de trous;
- rose des diamètres de Féret;
- nombre d'interceptions dans les quatre directions principales.

On peut effectuer des mesures plus spécifiques qui permettent de caractériser leur morphologie (Figure 4) :

Pelotes :

- mesures sur le cœur : aire, diamètre équivalent, aire convexe;
- mesures sur la couronne (ou chevelure) : aire, diamètre équivalent, épaisseur équivalente, circularité, plénitude annulaire (aire convexe/aire réelle);
- fraction filamenteuse;
- taux d'aire convexe (aire convexe du cœur/aire convexe);
- diamètre géodésique (diamètre le plus long entre deux points entièrement compris dans un objet).

Enchevêtrement ou agrégats : deux compacités sont calculables (Priede *et al.*, 1995) :

- aire des hyphes / aire totale comprise dans le périmètre extérieur réel;
- aire des hyphes / aire convexe.

et dans tous les cas les proportions des différentes catégories

2.6 *Les facteurs influençant la morphologie des micro-organismes filamentueux*

Selon la littérature, la **vitesse d'agitation** a une importance considérable sur la morphologie des pelotes (Schügerl *et al.*, 1997; Ayazi *et al.*, 1994; Priede *et al.*, 1995; van Suijdam and Metz, 1981; Schügerl *et al.*, 1988; Justen *et al.*, 1996; etc.) et sur la longueur (Belmar-Beiny and Thomas, 1991) et le diamètre (Nielsen, 1993) des filaments. Cependant, les résultats publiés sont parfois contradictoires (Schügerl *et al.*, 1997), ce qui indique que l'effet de la vitesse d'agitation sur la morphologie est influencé par de nombreuses variables opératoires telles que la préculture, la composition du milieu, la viscosité, le type de mobiles, etc. Il semblerait cependant qu'une augmentation de la vitesse d'agitation réduise la taille des pelotes (Tucker and Thomas, 1994) et puisse induire une fragmentation (Durant *et al.*, 1993).

Parmi les autres facteurs qui peuvent modifier la morphologie des micro-organismes filamentueux, on peut citer :

- **les conditions de culture** (température, composition du milieu, taux de dilution pour une culture continue) qui influencent le diamètre et le taux de branchement des filaments (Larralde-Corona *et al.*, 1994; Nielsen, 1993) ainsi que la taille des pelotes. Par exemple, les

pelotes de *Streptomyces tendae* se présentent sous forme de pelotes duveteuses dont la taille augmente lorsque le taux ce cisaillement, le pH, la température diminuent (Vivier et Pons, 1994).

- **la production de métabolites secondaires** (Vivier et Pons, 1994; Nielsen, 1993; Vecht-Lifshitz and Ison, 1992).
- **l'inoculum** : la taille des pelotes diminue lorsque le taux d'inoculation ou la concentration en spores augmente (Vivier et Pons, 1994; Pichon, 1993; Schügerl *et al.*, 1997). Ce facteur influence également le type de morphologie qui se développe (filaments ou pelotes) (Tucker and Thomas, 1994).
- **l'âge de la fermentation** : la taille des pelotes augmente avec la durée de la culture (Schügerl *et al.*, 1997).

Dans ce travail expérimental, l'accent a été mis plus particulièrement sur l'influence de la vitesse d'agitation et du type de mobile. Les influences potentielles des conditions de culture et de l'inoculum expliquent les précautions de standardisation que nous avons prises lors des fermentations (voir *Chapitre I*). L'importance de l'âge de la culture a été prise en compte lors du choix des échantillons dont la morphologie a été caractérisée.

3 Matériel et méthodes

3.1 Le choix de l'échantillon

Afin de pouvoir comparer les différentes fermentations entre elles, il était important de choisir quel échantillon (et donc quel "instantané") allait être désigné pour les représenter. Plusieurs possibilités s'offraient à nous : choisir un temps de fermentation identique pour toutes (par exemple l'échantillon prélevé 12 ou 20 heures après inoculation), ou un instant "physiologique" déterminé (maximum de biomasse, milieu de la croissance ou fin de la phase exponentielle, inversion du signe du signal de sortie de la régulation du pH "outpH").

L'utilisation d'un temps figé risquait d'induire une variable non maîtrisable, à savoir la présence d'une phase de latence plus ou moins longue selon les expériences (variation pouvant être due à une légère dégénérescence de la préculture mère conservée à -70 °C). Il nous semblait donc plus approprié de nous baser sur un signal physiologique de la culture. Nous avons choisi le (premier) minimum de teneur en oxygène dissous (voir le *Chapitre I* pour les figures des courbes de fermentations, avec indication des différents points évoqués). Cet instant se caractérise par une modification du métabolisme : la croissance des micro-organismes est proche de son terme puisqu'on se situe au début du plateau correspondant à la phase de maintenance. Les pelotes ont atteint leur maturité, nous permettant de saisir en quelque sorte l'aboutissement morphologique de la culture, et ce avant que la lyse des bactéries (phase de décès) ne commence à effacer les traces de leur mémoire hydrodynamique. Le choix d'un instant antérieur risquait d'introduire un trop grand facteur d'erreur du fait de la rapidité de la croissance (un décalage de quelques minutes correspond alors à une plus grande différence quantitative de la biomasse et donc vraisemblablement de sa morphologie, que ce soit du point de vue de la taille des pelotes ou de leur densité).

Un autre avantage du moment choisi est qu'il se situe (pour toutes les fermentations) aux alentours de la vingtième heure de culture, ce qui fait que l'échantillon correspondant est prélevé durant la journée et préparé immédiatement en vue de l'analyse d'images qui sera effectuée ultérieurement. L'utilisation d'un échantillon récolté par l'échantillonneur automatique durant la nuit risquait d'introduire une erreur (risque de lyse ou de dégénérescence de la structure des pelotes) malgré le stockage à basse température (4°C).

3.2 ***La préparation des échantillons***

La planification des expériences ne nous permettait pas d'effectuer immédiatement l'enregistrement des images des échantillons prélevés. Il était dès lors important de pouvoir conserver les plaques microscopiques pour pouvoir les digitaliser ultérieurement.

Chaque échantillon a été dilué dans de l'eau de distribution, dont la pression osmotique est un peu plus élevée que celle de l'eau désionisée (très hypotonique par rapport aux bactéries et risquant de provoquer une absorption d'eau). L'utilisation de sérum physiologique (dont la pression osmotique est plus proche de celle des bactéries) déposait des cristaux de sel sur les plaques lors de leur séchage, ce qui risquait de créer des difficultés lors de l'analyse des images.

La dilution n'était pas faite dans des proportions précises (ceci étant sans importance puisque l'analyse d'image ne serait pas utilisée pour une quantification de la biomasse produite). Il suffisait de veiller à ce que la teneur en micro-organismes fut suffisamment faible pour éviter les recouvrements des objets sur les plaques. En pratique, deux gouttes d'échantillons étaient diluées dans 1.5 ml d'eau.

Afin d'augmenter le contraste entre le fond et les micro-organismes, la solution était colorée avant également sur la plaque. Nous avons choisi du violet cristallisé (hexaméthylènepararosaniline chlorure, violet de méthyle 10 B) qui est le premier des réactifs utilisés pour la détermination du caractère Gram des bactéries. Il a l'avantage de se fixer sur les membranes de toutes les bactéries. Lors de la détermination Gram, les échantillons sont étalés sur une plaque en verre, séchés puis fixés à la flamme avant d'être plongés dans la solution colorante pendant environ une minute avant d'être rincés. Lorsqu'on suivait cette procédure, il arrivait que des cristaux restent fixés sur la plaque, contaminant ainsi l'échantillon. La coloration directe de l'échantillon avant son étalement nous a permis d'éviter ce problème, tout en étant plus simple qu'une méthode de conservation en phase liquide avec scellage de la lame sur la plaque (Packer *et al.*, 1992).

Pour chaque échantillon, deux types de plaque étaient préparés. D'une part les micro-organismes colorés étaient étalés à l'aide d'une anse de platine sur une plaque de verre (76×26 mm), avant d'être mis à sécher puis fixés à la flamme avant stockage. D'autre part, de petites gouttes étaient déposées sur une plaque de verre et recouvertes d'une lame couvre-objet (60×24 mm) en prenant soin de ne

pas faire glisser les gouttes (pour ne pas déformer les pelotes ou les enchevêtrements). Les plaques ainsi recouvertes étaient mises à sécher à température ambiante.

Le but de cette double opération (en plus d'assurer une quantité statistiquement suffisante d'objets pour les mesures) était de ne pas fausser les mesures selon le mode de préparation des plaques. L'étalement brutal à l'anse de platine permettra de vérifier la solidité de la structure des pelotes (éventuellement désagrégées par l'opération, ou déformées) en comparant les résultats avec les pelotes moins malmenées (simplement écrasées sous la lame couvre-objet).

Les lames ainsi préparées peuvent être conservées durant plusieurs années. Ce système permet des études ultérieures (par exemple pour l'étude de l'évolution de la morphologie au cours d'une fermentation).

3.3 *L'acquisition des images*

L'acquisition des images se fait sur un microscope optique (Zeiss Axioplan, Allemagne). Le contraste est amélioré par l'utilisation d'un filtre bleu. L'éclairement des plaques est identique (réglage physique au microscope et ajustement de paramètres informatiques tels que le contraste) pour tous les échantillons. Cette précaution est importante par la suite pour permettre le choix du seuillage des images enregistrées lors du traitement informatique. De même, le grossissement est conservé d'une acquisition à l'autre (objectif Zeiss Neofluar-epiplan, 5× / 0.15 dic). Une caméra monochrome (Ikegami, caméra CCD, modèle ICD-42E, type L REV. A) envoie les images vers un PC équipé d'une carte d'acquisition sur laquelle la caméra est branchée et l'acquisition se fait en utilisant le logiciel Microsoft Photo Editor, avec sauvegarde des images sous format TIFF. Les fichiers d'images sont transférés sur une station Sun et traités par le logiciel Visilog 5.0 (Noesis, France).

Au grossissement utilisé, la largeur de champ de l'écran de visualisation est de 1.5 mm environ (d'après la visualisation au même grossissement d'une échelle graduée). Afin de ne pas introduire de subjectivité dans le choix des images enregistrées, nous avons effectué un balayage systématique des plaques, en déplaçant la plaque selon sa largeur et en enregistrant toutes les pelotes, puis en la déplaçant latéralement de 2 mm en 2 mm, pour éviter d'enregistrer deux fois les mêmes images puisque parfois des pelotes apparaissant incomplètement dans le champ étaient recadrées pour être vues entièrement. La plaque était ensuite mise à la position qu'elle occupait avant le recadrage

(repérée sur un vernier solidaire de la plate-forme supportant la plaque) pour poursuivre le balayage.

Soixante images ont été enregistrées à partir de chaque plaque, ce qui correspond à cent vingt images par point expérimental puisque deux plaques ont été préparées par échantillon. Ces images comportent au total deux cents à deux cent cinquante objets, ce qui fournit un échantillon statistiquement représentatif à traiter.

Les images sont rectangulaires, comportant 576×768 pixels carrés. Au grossissement de $5\times$, le facteur de conversion est de 0.001632 mm pour 1 pixel, ce qui correspond à une image de 0.94×1.25 mm.

3.4 *Le traitement numérique des images*

Malgré les précautions prises lors de la préparation des plaques, il reste des débris ou des crasses sur les images. Ces dernières doivent être éliminées au maximum avant de pouvoir faire des mesures sur les objets intéressants. Le filtrage se fait en plusieurs étapes en utilisant des outils de base de la morphologie mathématique. Nous désignerons par *objets* les éléments de l'image que nous souhaitons étudier (pelotes, agrégats).

D'une façon générale, le traitement des images consiste à fournir, au départ d'une image en niveaux de gris, une image binaire dans laquelle les objets conservent leur structure morphologique, c'est-à-dire sont les plus proches possible de ce qu'ils étaient dans l'image originale. Ce traitement doit être le plus général possible afin de pouvoir traiter (transformer) les données de façon automatique.

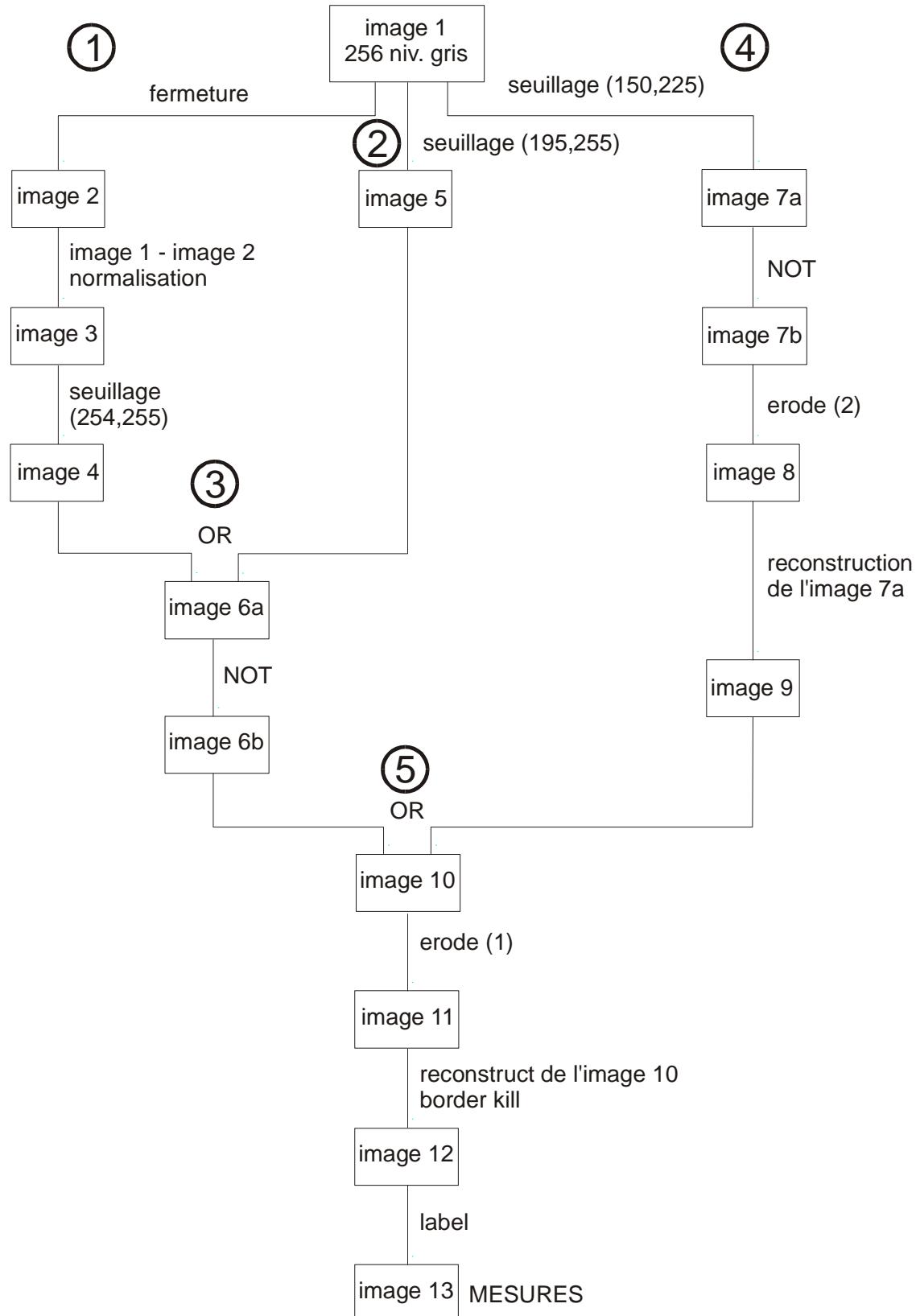
Les éléments apparaissant sur les images présentent des morphologies différentes – pelotes, enchevêtements, crasses – ou sont composés de plusieurs parties de morphologies différentes : par exemple, les pelotes comportent un cœur et une chevelure (voir Figure 4). Il n'est donc pas possible de traiter chaque objet par un seul et même algorithme capable d'extraire l'ensemble des informations contenues dans l'image. Le traitement doit ainsi s'effectuer par étapes, la première étant une séparation des parties qui ont des propriétés structurales différentes, puis le filtrage et la binarisation de chaque partie et finalement la recomposition de l'image d'origine avec les objets intéressants mais sans les éléments parasites.

La méthode présentée ici comporte essentiellement deux filières : la première consiste en l'extraction des contours (c'est-à-dire la chevelure des pelotes et les enchevêtrements) alors que la seconde extrait les cœurs des pelotes. La réunion des objets obtenus dans ces deux étapes permet de récupérer l'ensemble des objets. Cette méthode permet d'éliminer les grosses crasses de façon automatique.

Même si certaines étapes peuvent sembler inutiles dans les exemples présentés, le point fort de cet algorithme est de pouvoir traiter automatiquement l'ensemble des images enregistrées sans devoir se préoccuper de la nature des objets qui les composent. De plus, bien que n'étant pas exploité dans le cadre de ce travail, l'algorithme permet un traitement séparé et des mesures spécifiques sur les différentes parties des pelotes et agrégats. On pourrait, en effectuant des mesures lors des étapes intermédiaires du processus, mesurer les tailles des différentes zones des pelotes et calculer leurs proportions.

3.4.1 Le nettoyage des images

Le schéma suivant présente l'algorithme de traitement des images. La routine qui est écrite en métalangage proche du C (et compris par Visilog) est reprise dans l'*Annexe IV.2*.

**Figure 7 :** Organigramme de l'algorithme de traitement des images

L'explication de l'algorithme est illustrée par deux exemples d'images et de leur traitement.

Tout d'abord, l'image digitalisée est chargée par le logiciel. Cette première image (image 1, Figure 8) comporte 256 niveaux de gris (blanc=255, noir=0). Cette image est brute, et comporte à la fois des objets intéressants (pelotes, agrégats) et des débris ou des crasses (quelques filaments libres ou des fragments, des poussières, des cristaux, etc.). Le premier exemple (Figure 8a) comporte à la fois une pelote et des objets plus filamenteux de type agrégats, ainsi que quelques crasses plutôt sphériques. Le second exemple (Figure 8b) se compose d'objets plus filamenteux (agrégats, filaments) et il est plus encrassé mais par des crasses plus petites.

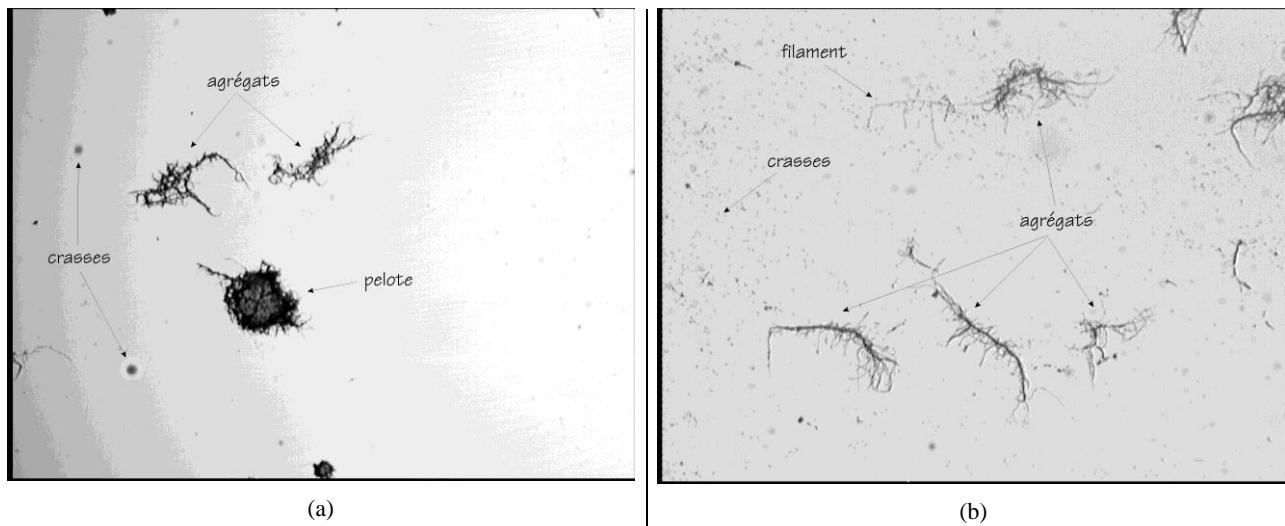


Figure 8 : Image 1 : image brute digitalisée (0.94x1.25 mm)

Comme expliqué précédemment, le traitement de cette image comprend deux étapes principales: l'extraction des contours et celle des noyaux. Les opérations utilisées sont définies et décrites dans l'*Annexe IV.1*.

3.4.1.1 L'extraction des contours

1. fermeture (de 1 pixel) de l'image 1 (Figure 8) → image 2 (Figure 9). Cette procédure élargit les contours des objets, et les lisse.

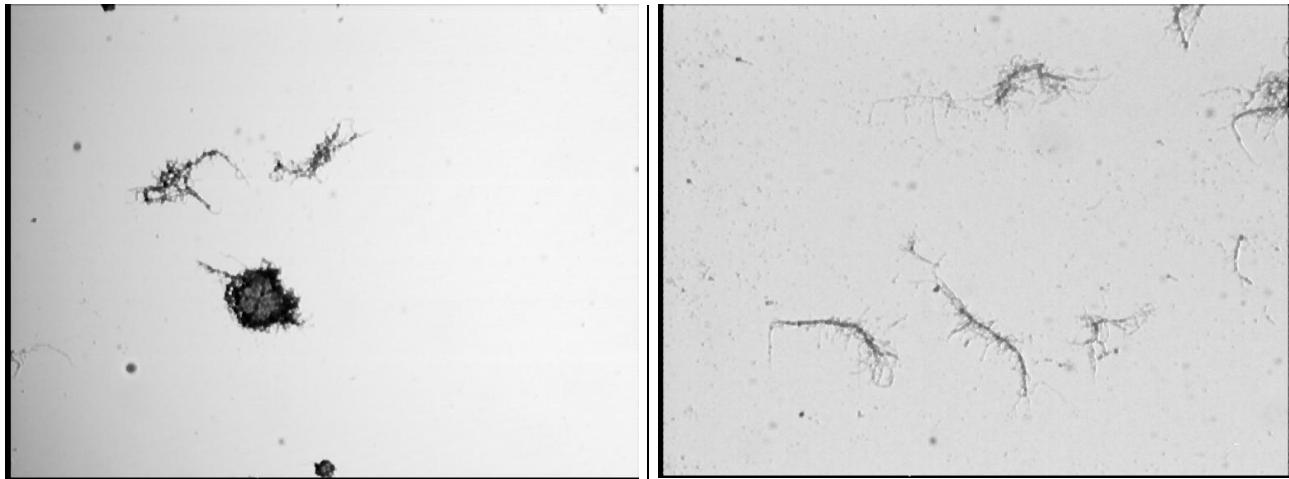


Figure 9 : Image 2 : après une fermeture

2. soustraction de l'image 2 (élargie) de l'image 1 (originale) → donne les contours des objets (Figure 10), et normalisation de l'image obtenue (c'est-à-dire que l'on réétale les niveaux de gris utilisés entre les bornes) → image 3. La soustraction des deux images provoque un adoucissement du contraste de l'image (c'est-à-dire que la gamme des niveaux de gris utilisés est fortement réduite). La normalisation permet de rétablir une gamme plus large des niveaux de gris de l'image et donc son contraste.



Figure 10 : image 3 avant normalisation

3. seuillage de l'image 3 sur le dernier niveau de gris (entre 254 et 255) → image 4 (Figure 11). Le seuillage transforme l'image en niveaux de gris en une image binaire (un pixel blanc a une valeur de 1 et un pixel noir vaut 0). On ne voit plus que les contours des objets (c'est-à-dire un cœur noir délimité par un contour blanc).

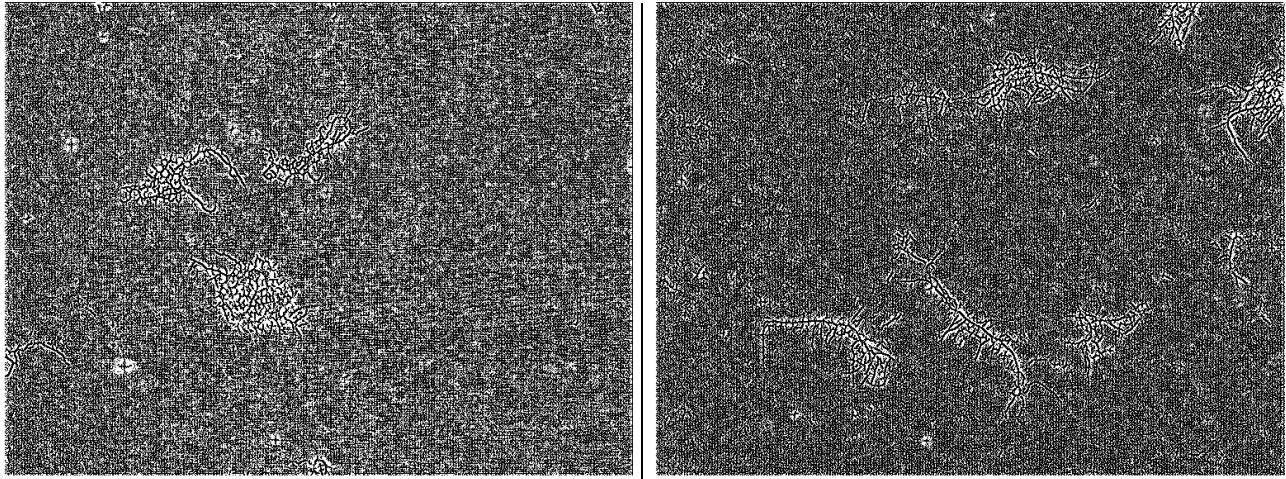


Figure 11 : Image 4 : seuillage de l'image 3 entre 254 et 255

3.4.1.2 Le seuillage ↗

4. parallèlement, l'image originale (image 1, Figure 8) est seuillée entre 195 et 255 (les objets foncés dont la valeur est comprise entre 195 et 255 apparaissent en noir, alors que le fond plus clair est devenu blanc) → image 5 (Figure 12).

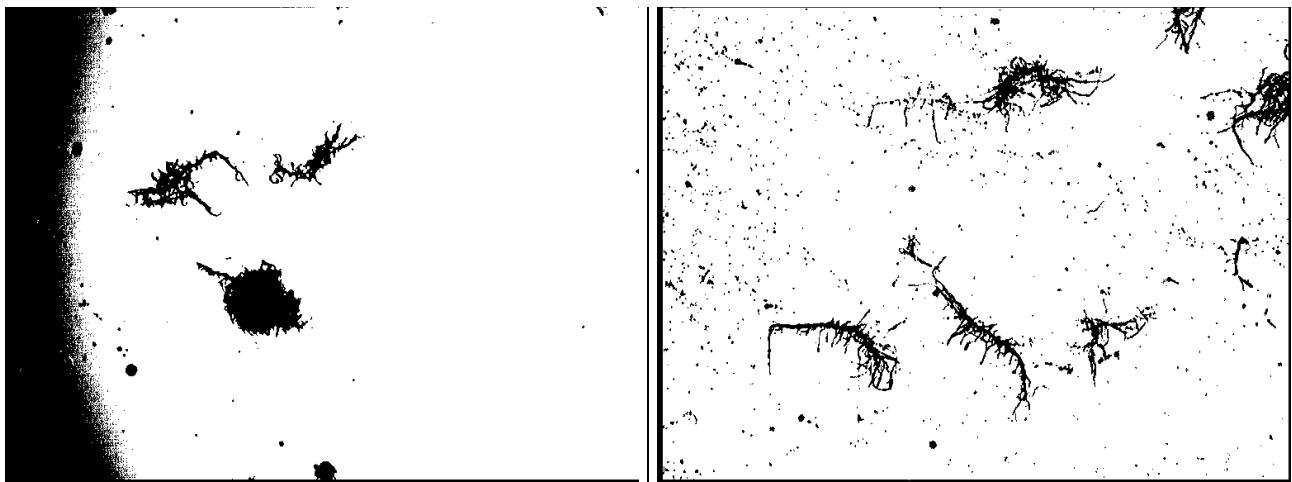


Figure 12 : image 5

La valeur du seuil a été choisie sur base de l'histogramme des niveaux de gris sur une série d'images et est restée fixée pour l'ensemble des images de toutes les expériences. La standardisation de l'enregistrement des images (luminosité et contraste) permet de ne pas devoir réajuster les valeurs de seuillage pour chaque image ou expérience. Cette image n'est cependant pas utilisable telle quelle du fait de la présence de nombreuses crasses et de la perte d'information qu'introduit ce seuillage. En effet, les bords des pelotes présentent un dégradé de gris qui fait que l'on perd de l'information à partir du moment où l'on supprime certains pixels en fonction du seuil choisi (qui

résulte d'un compromis entre l'élimination du fond et des ombres éventuelles, et la conservation de l'information contenue dans l'image).

3.4.1.3 La réunion des images obtenues ↴

5. on compare alors les images 4 et 5 par un "ou logique" (opération OR) → image 6a (Figure 13). Ce OR conserve les pixels blancs (valeur=1) contenus soit dans l'image 4 (contenant les contours élargis mais pas le noyau des pelotes) ou soit dans l'image 5 (image originale seuillée). L'image 6a contient les objets avec les contours affinés mais pas de cœur (c'est-à-dire uniquement la "chevelure" des pelotes).
6. l'image 6a est inversée (NOT) → image 6b (chevelures blanches sur fond noir) (Figure 14)

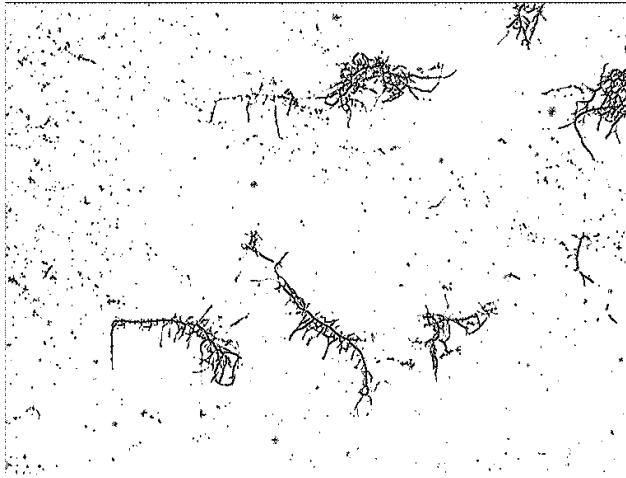
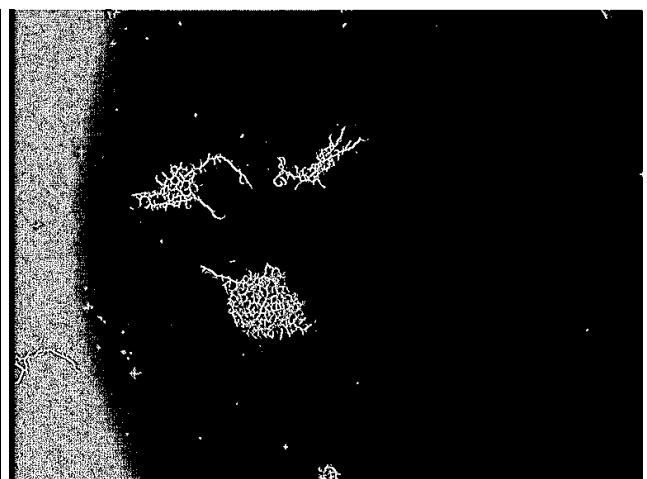
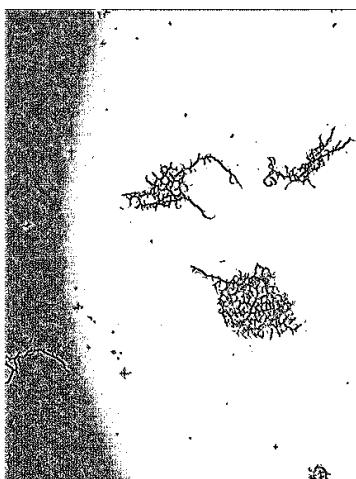


Figure 13 : image 6a

Figure 14 : image 6b

3.4.1.4 L'extraction des noyaux ↴

D'autre part,

7. l'image originale (image 1, Figure 8) est seuillée entre 150 et 255 → image 7a (Figure 15). On notera une forte perte d'information au niveau de la périphérie des objets
8. inversion de l'image 7a → image 7b (Figure 16)

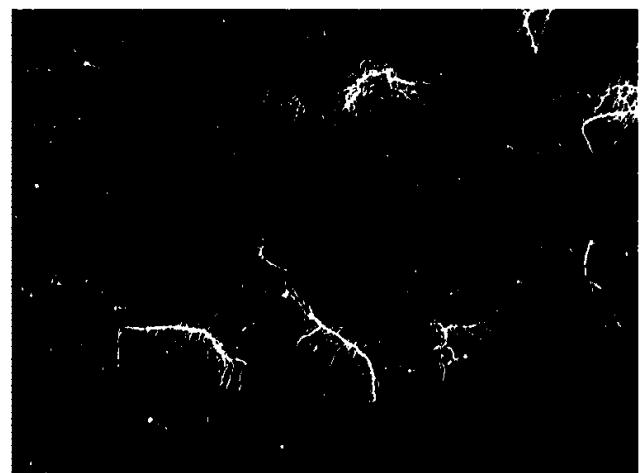
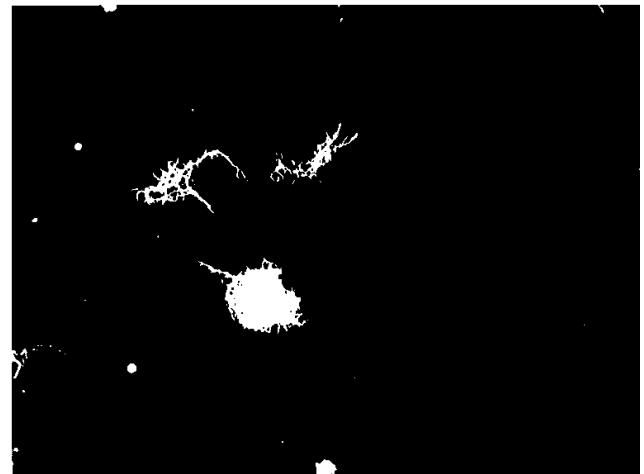
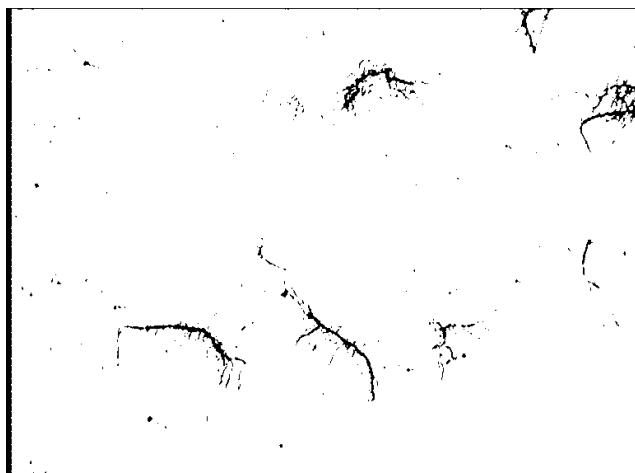
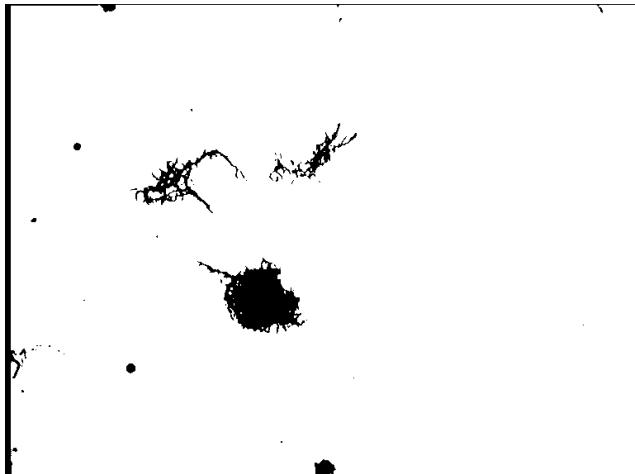


Figure 15 : image 7a

Figure 16 : image 7b

9. érosion (erode) de l'image 7b de deux pixels → image 8 (Figure 17). Cette image apparaît très (trop!) bien nettoyée. Les débris ont disparus, mais presque la totalité de l'information aussi.



Figure 17 : image 8

10. reconstruction de l'image 7b à partir de l'image 8 → image 9 (Figure 18). En effectuant cette reconstruction, on récupère dans l'image 7b les objets (entiers) qui correspondent aux objets rescapés de l'image 8. L'image 9 a été nettoyée de ses crasses, mais le seuillage utilisé ne laisse que des objets incomplets. On a en fait obtenu par cette procédure les cœurs des pelotes.

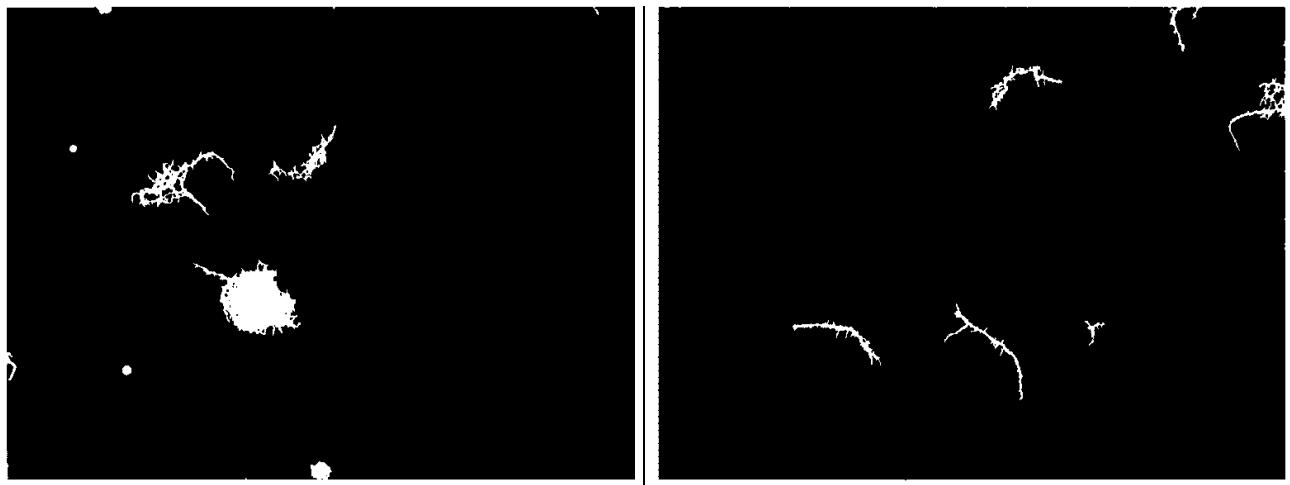


Figure 18 : image 9

3.4.1.5 La réunion des cœurs et des chevelures ⇔

Il suffit de remettre ensemble les chevelures et les cœurs des pelotes pour récupérer les objets entiers :

11. on effectue un OR entre les images 6b et 9, c'est-à-dire que l'on conserve les pixels blancs qui sont soit dans la chevelure, soit dans le cœur des pelotes → image 10 (Figure 19) qui comporte

les pelotes entières. Malheureusement, cette opération réintroduit quelques crasses, qu'il faut éliminer.

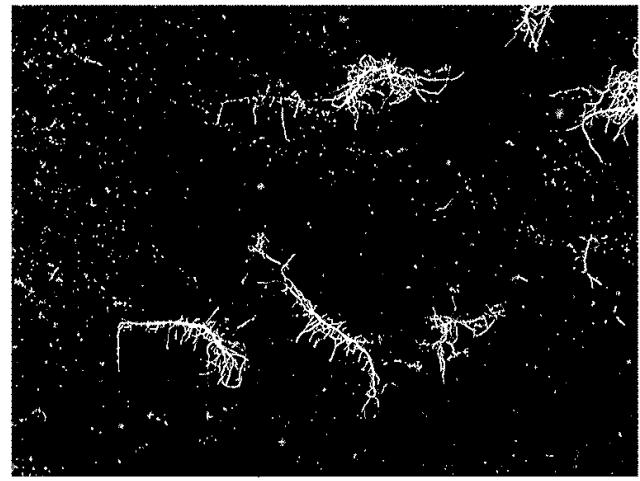


Figure 19 : image 10

12. érosion (de 1 pixel) de l'image 10 → image 11 (Figure 20), et

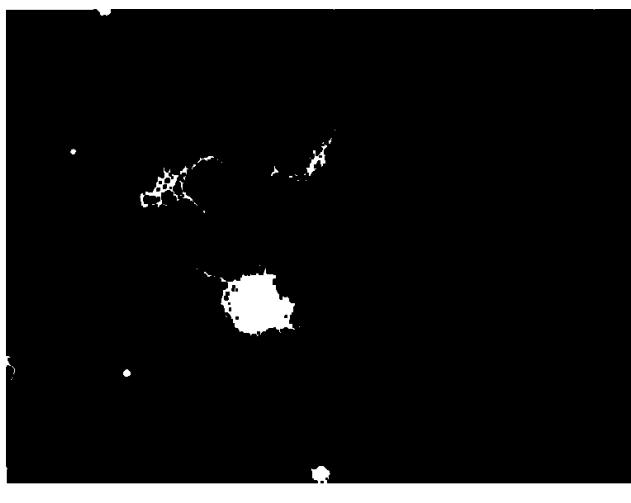


Figure 20 : image 11

13. reconstruction de l'image 10 à partir de l'image 11, et suppression des objets en contact avec les bords ("bordure killing") → image 12 (Figure 21). On récupère ainsi les objets entiers sans les crasses. L'élimination des objets en contact avec le bord est indispensable pour éliminer des objets qui seraient incomplets et fausseraient les mesures. L'utilisation de cette opération lors du traitement des données peut être mise à profit lors de l'enregistrement des images pour éliminer automatiquement des débris. Il suffit de cadrer l'image en leur faisant toucher le bord.



Figure 21 : image 12

14. il n'y a plus qu'à étiqueter les objets binaires pour les repérer et d'effectuer les mesures désirées.

3.4.2 La nature des objets traités

Les objets bactériens sur lesquelles notre étude a porté étaient automatiquement des pelotes et des enchevêtrements "stables" puisqu'ils ont résisté à la dilution et à l'étalement. Un examen visuel des échantillons montrait que seule une très faible partie de la biomasse se présentait sous forme de filaments libres (voir Figure 8 et Figure 22). Ces filaments libres ainsi que les très fins agrégats étant éliminés automatiquement lors du traitement des images, seules des mesures quantitatives sur la morphologie ont été faites (aire, périmètres, etc.), mais pas de classification (telle que la répartition selon les différentes formes).

Quelques exemples sont présentés à la Figure 22. Les conditions de culture ne sont pas mentionnées dans la mesure où ces pelotes ne sont pas forcément représentatives de l'échantillon dont elles proviennent. Ces images montrent des pelotes de différentes tailles, plus ou moins chevelues, ainsi que des agrégats, des filaments et des crasses (voir la Figure 8 pour des détails sur ces différents types d'objets).

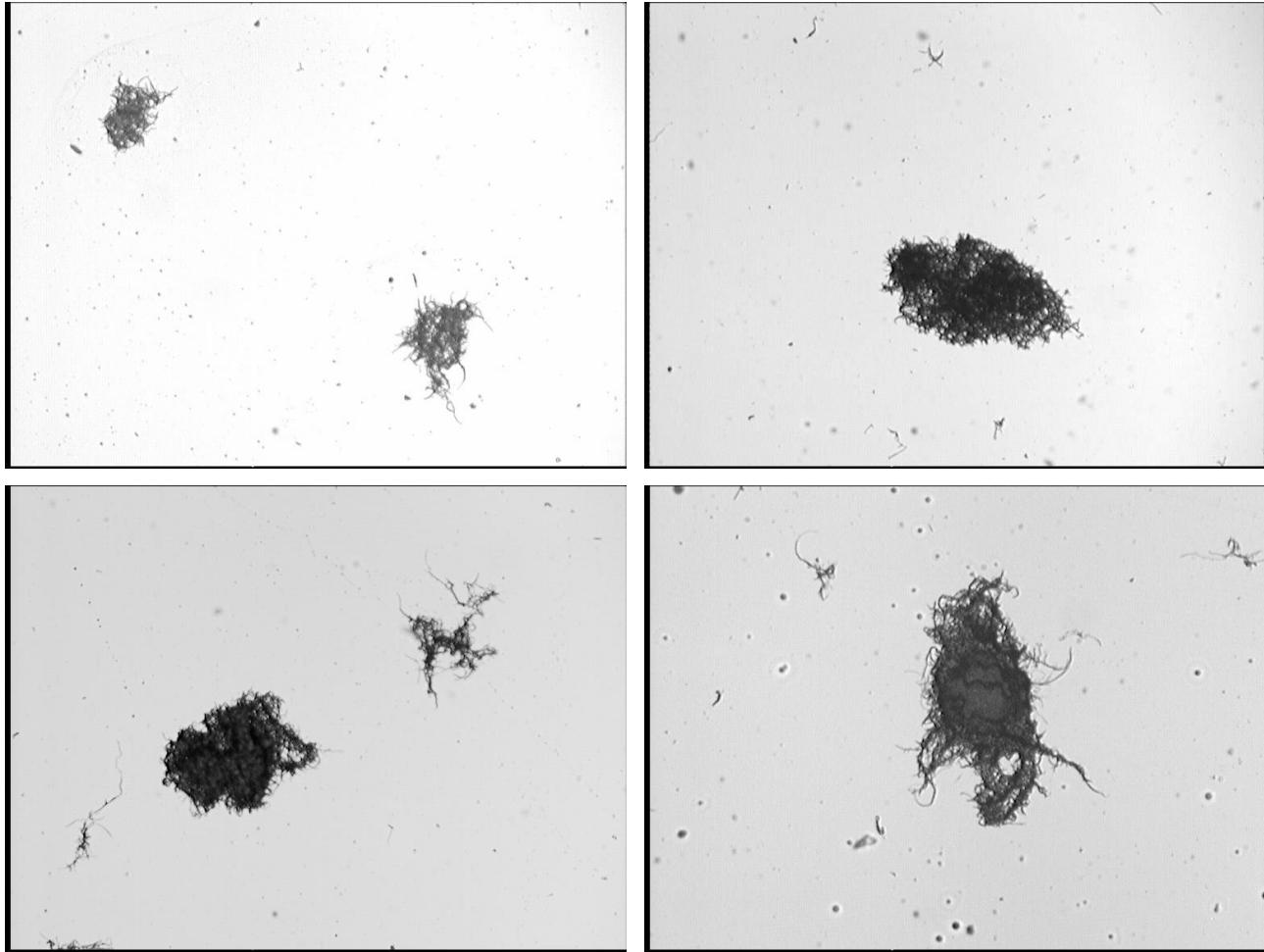


Figure 22 : Quelques exemples d'images traitées

3.4.3 Les mesures

Les différentes mesures effectuées sont (voir §2.3.3 et 2.3.4 pour les définitions) :

- l'aire
- le périmètre de Crofton
- le facteur de forme ou la circularité
- la rose des diamètres de Féret ainsi que les diamètres de Féret minimum et maximum
- le nombre de trous

3.4.4 La discrimination entre crasses et pelotes

Malgré le nettoyage informatique des images (qui élimine surtout les petites crasses et les filaments libres, méthode confirmée par Tucker *et al.*, 1992; Paul *et al.*, 1993; Reichl *et al.*, 1990; Pons *et al.*, 1993), des débris de plus grande taille peuvent rester et être pris en compte. Nous avons analysé

visuellement quatre-vingts images, comptant les objets les composant et leur attribuant (visuellement) la qualité "pelote" ou "crasse". Nous avons alors comparé notre analyse à celle du logiciel en nous basant sur l'aire comme critère, en repérant le nombre d'objets conservés par le logiciel ainsi que leur position (Tucker *et al.*, 1992; Reichl *et al.*, 1990; Reichl *et al.*, 1992b). Nous avons constaté que la taille maximale des crasses était de 420 pixels², et que la taille minimale des pelotes rencontrées était de 450 pixels², ce qui constituera notre seuil de discrimination. Nous avions choisi les images dans les expériences devant produire les pelotes de plus petite taille, selon les tendances relevées dans la littérature (vitesse d'agitation élevée).

4 Résultats

4.1 Les résultats des différentes fermentations

Le Tableau 1 reprend l'ensemble des expériences qui ont été analysées. La première colonne reprend le numéro de la fermentation, la deuxième les conditions opératoires (sauf indication contraire, la consigne pour la concentration en oxygène dissous minimale était de 30%), et la troisième l'instant de la fermentation correspondant au minimum de la concentration en oxygène dissous (échantillon sur lequel l'analyse d'images a été effectuée). Les notations comprennent le mobile (TR pour turbines Rushton et I pour Intermig) et la vitesse de rotation (en rpm) : TR300 signifie 300 rpm avec les turbines Rushton et I247 = 247 rpm avec les Intermig. Le taux d'inoculation est de 5% par rapport au volume du fermenteur, sauf pour la fermentation n°20 qui a un taux d'inoculation de 0.83%.

Tableau 1 : Tableau récapitulatif des expériences

n°	Conditions d'agitation	heure du min pO ₂	Remarques
1	TR300 (min pO ₂ =0%)	23h	
3	TR300 (min pO ₂ =10%)	20h15	coloration anormale des échantillons (en fin de culture)
5	TR300	20h07	
15		19h	
9	TR450	21h30	
17		19h	
19		19h15	
22		16h35	
20	TR450 (inoculum=0.83%)	22h30	
8	TR600	21h36	
16		21h12	
7	TR900	23h30	
18		21h18	
10	I247	18h	
13		21h18	
12	I329	20h15	
14		22h15	

La liste des numéros des fermentations comprend des lacunes. Un certain nombre d'expériences ont été éliminées en raison de problèmes techniques (moussage, panne, etc.) ou de contaminations.

Nous n'avons pas observé de différence significative ou systématique entre les résultats des plaques de microscope avec ou sans lame couvre-objet (par exemple un type de préparation qui aurait donné des résultats toujours supérieurs ou inférieurs à l'autre). Les résultats présentés au Tableau 2 sont donc la moyenne de l'ensemble des mesures des objets étudiés pour une même expérience, avec l'écart-type s_e de la distribution. La distribution des valeurs au sein d'une même expérience sera analysée par la suite.

Tableau 2 : Caractéristiques de la morphologie d'*Actinomadura R39* selon les conditions de culture (\pm écart-type)

Conditions	n°	Aire (mm ²)	Diamètre équivalent (mm)	Périmètre de Crofton (mm)	Nombre de trous
TR300	1	0.021±0.029	0.16	4.71±4.59	118±187
	3	0.0073±0.0073	0.096	2.28±1.73	30±32
	5	0.032±0.037	0.20	5.58±5.49	138±155
	15	0.015±0.0155	0.14	2.91±2.29	65±62
TR450	9	0.0091±0.010	0.11	1.24±0.93	19±21
	17	0.016±0.0165	0.14	2.97±2.75	73±86
	19	0.010±0.012	0.115	2.28±1.85	52±55
	20	0.0010±0.011	0.11	3.35±4.25	37±51
	22	0.014±0.014	0.13	5.50±5.02	130±145
TR600	8	0.023±0.021	0.17	3.57±2.70	107±120
	16	0.0155±0.018	0.14	3.11±2.66	81±99
TR900	7	0.011±0.0105	0.12	1.86±1.60	53±59
	18	0.012±0.012	0.13	2.445±1.95	64±68
I247	10	0.021±0.019	0.16	3.88±3.25	122±125
	13	0.0094±0.079	0.11	2.42±1.81	65±68
I329	12	0.014±0.019	0.13	2.90±2.70	71±86
	14	0.0093±0.0090	0.11	2.24±1.65	29±30

Conditions	N°	Diam. Féret max (mm)	Diam. Féret min (mm)	Circularité (-)
TR300	1	0.28±0.15	0.18±0.10	103.4±88.65
	3	0.21±0.091	0.12±0.054	62.6±44.5
	5	0.38±0.22	0.21±1.13	88.4±90.0
	15	0.29±0.17	0.15±0.085	50.4±31.3
TR450	9	0.19±0.10	0.10±0.05	16.5±11.2
	17	0.27±0.15	0.15±0.073	52.9±50.4
	19	0.23±0.11	0.13±0.066	46.7±33.7
	20	0.24±0.13	0.13±0.076	116.2±215.1
	22	0.33±0.17	0.18±0.096	181.2±152.4
TR600	8	0.30±0.14	0.17±0.077	57.8±51.6
	16	0.26±0.15	0.15±0.080	56.1±37.4
TR900	7	0.19±0.10	0.12±0.050	32.9±30.6
	18	0.23±0.12	0.13±0.053	48.5±39.2
I247	10	0.30±0.16	0.17±0.082	69.5±62.9
	13	0.22±0.093	0.12±0.054	57.1±46.6
I329	12	0.26±0.14	0.14±0.076	58.5±53.9
	14	0.22±0.093	0.13±0.057	52.0±43.1

L'écart-type sur le diamètre équivalent n'est pas mentionné car le calcul a été effectué sur l'aire moyenne et non pas sur chaque objet puis moyenné.

On constate que l'écart-type est du même ordre de grandeur que la grandeur mesurée, ce qui indique une distribution des valeurs assez large pour toutes les mesures (population très hétérogène). Il faut cependant tenir compte du fait que ces grandeurs ne sont pas distribuées selon une loi normale (sinon un écart-type proche de la moyenne poserait problème quant à la signification de cette dernière). Ce point sera abordé par la suite au § 4.3.

La fermentation n°3 (turbines Rushton 300 rpm, min. pO₂ 10%) n'a pas été prise en compte pour le calcul des moyennes sur les résultats obtenus dans des conditions de fermentation identiques (voir §4.7), du fait de la coloration anormale d'échantillons prélevés postérieurement. Leur coloration jaune très foncé puis orange au lieu de jaune clair indiquait un comportement anormal de la culture. Les résultats sont signalés au Tableau 2 pour montrer qu'un développement anormal de la culture influence la morphologie. Il est cependant intéressant de constater que l'ensemble des mesures morphologiques est assez différent des fermentations sans contamination. Cette observation a été

confirmée pour une autre fermentation contaminée (résultats non montrés) : les pelotes formées sont de taille inférieure.

La Figure 23 montre une image contenant à la fois des pelotes ou des agrégats d'*Actinomadura R39* et des bacilles (contamination, apparaissant sous forme de petites taches). La différence de taille entre la contamination et *Actinomadura R39* bien visible.

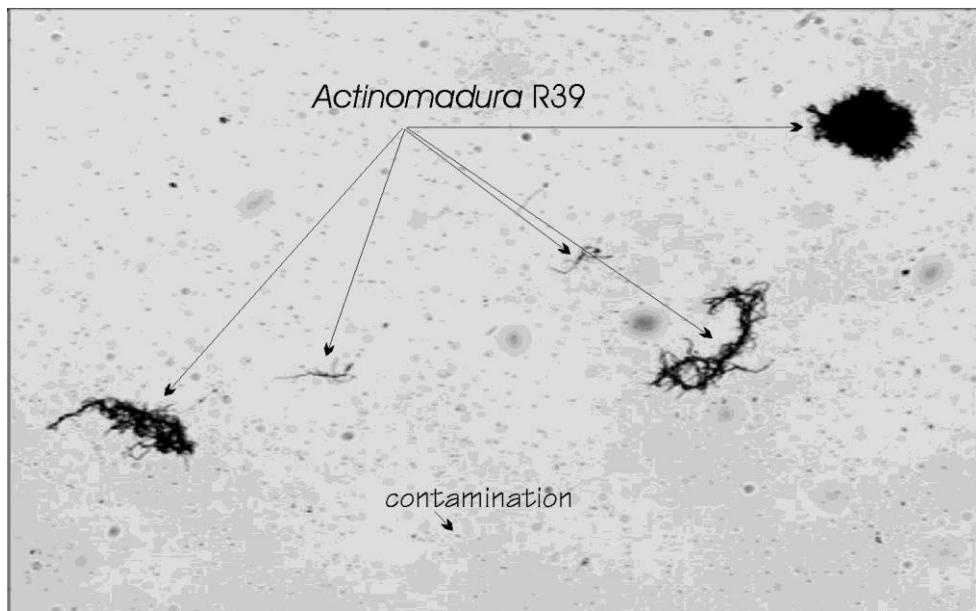


Figure 23 : Image provenant d'une fermentation contaminée

4.2 *La représentativité des mesures.*

Le nombre des objets mesurés pour chaque expérience est supérieur à 200. L'évolution de la moyenne flottante ou progressive (c'est-à-dire effectuée sur un nombre de points croissant) tend à se stabiliser, ce qui montre que l'échantillon analysé est bien représentatif de la population. À titre d'exemple, la figure suivante montre cette évolution pour l'expérience n° 18 (turbines Rushton 900 rpm). La ligne verticale indique la limite entre les mesures provenant d'objets enregistrés à partir des plaques sans puis avec lame couvre-objet.

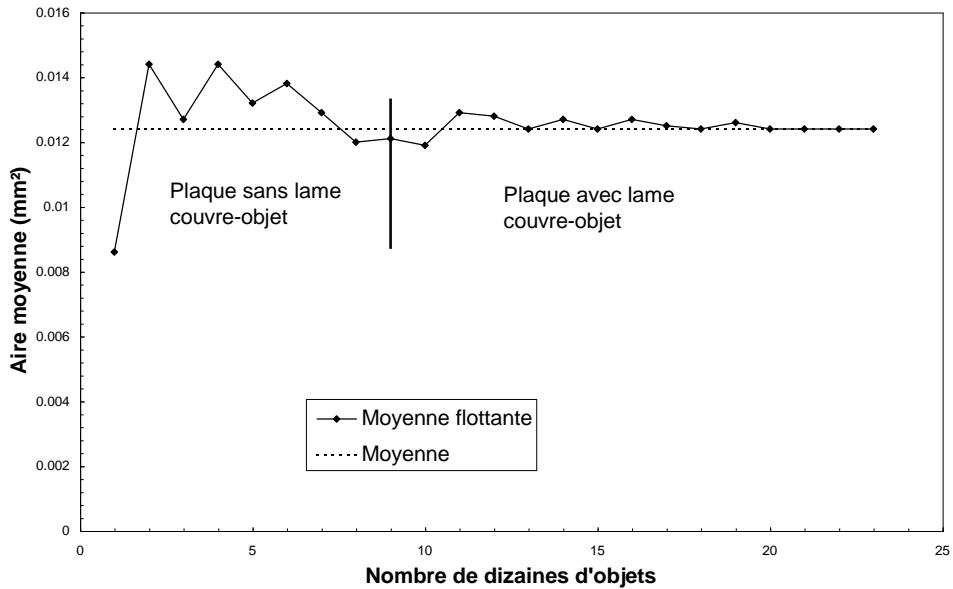


Figure 24 : Évolution de la moyenne flottante (ou progressive) de l'aire (n°18, TR900)

La morphologie des objets analysés pour chaque expérience est assez variable en raison de l'hétérogénéité des échantillons. Ces fluctuations sont compréhensibles si l'on tient compte qu'un seul échantillon a été prélevé lors de la culture, dont deux gouttes ont été diluées dans 1,5 ml d'eau, dont on a prélevé quelques gouttes pour les étaler sur des plaques de microscope dont 120 images ont été arbitrairement extraites et sont supposées statistiquement représentatives de la population totale du fermenteur. Le nombre d'objets mesurés est élevé (> 200), ce qui donne un sens statistique à ces observations.

4.3 La distribution des fréquences des valeurs de l'aire (turbines Rushton à 300 rpm)

Les deux exemples d'histogrammes proposés à la Figure 25 montrent la répartition de l'aire des pelotes pour les fermentations n°5 et n° 15, menées avec les turbines Rushton à 300 rpm.

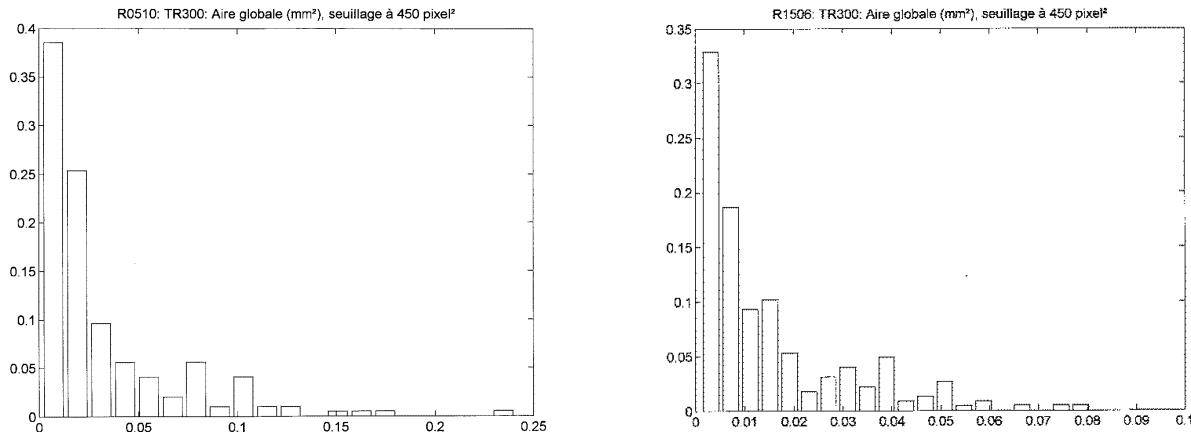


Figure 25 : Histogrammes des fréquences de répartition de l'aire pour deux fermentations à 300 rpm (turbines Rushton)

On constate que les distributions des mesures ne suivent pas une loi normale mais plutôt une loi de type "exponentielle décroissante". Cette allure de l'histogramme des fréquences indique que les événements (ici l'aire des pelotes) sont indépendants les uns des autres. En effet, si des événements i sont indépendants les uns des autres, la probabilité qu'une suite d'événements arrive i fois, notée $p(i)$, vaut $(1-a) a^i$ (avec $0 \leq a \leq 1$). Dans ce cas-ci, l'événement est l'accroissement de la taille d'une pelote d'une unité (1 pixel²), et il est indépendant de la présence d'objets d'une autre taille. Ceci s'explique par le fait que les micro-organismes se développent simultanément dans un environnement identique puisqu'ils sont cultivés ensemble dans la même cuve parfaitement mélangée.

Les pelotes de petite taille sont majoritaires.

La distribution peut être caractérisée en utilisant ses moments. On définit le moment centré d'ordre r , c'est à dire le moment d'ordre r par rapport à la moyenne, par

$$m_r = \frac{\sum_{j=1}^k f_j (x_j - \bar{x})^r}{n} \quad (3)$$

- si $r=1 : m_1 = 0$
- si $r=2 : m_2 = s^2$ (variance) $\Rightarrow \sqrt{m_2} = s$ (écart-type)

et les moments sans dimension :

$$a_r = \frac{m_r}{s^r} \quad (4)$$

- si $r=3$: a_3 est le coefficient de dissymétrie ($a_3 = 0$ pour des courbes symétriques dans une distribution gaussienne)

Toutes les distributions sont asymétriques ($a_3 \neq 0$). On n'observe pas de lien entre les caractéristiques de la distribution et les conditions de culture (voir le Tableau 3 pour l'aire, les autres résultats ne sont pas montrés).

Tableau 3 : Caractéristiques des distributions de l'aire pour les différentes fermentations

n°	Conditions	Moyenne (mm²)	écart-type s_e	coefficient de dissymétrie a_3
1	TR300 (0%)	0.021	0.029	3.24
3	TR300 (10%)	0.0073	0.0073	2.92
5	TR300	0.032	0.037	2.21
15	TR300	0.015	0.0155	1.58
9	TR450	0.0091	0.0103	2.55
17	TR450	0.016	0.0165	2.30
19	TR450	0.010	0.012	2.94
20	TR450	0.010	0.011	2.31
22	TR450	0.014	0.014	1.92
8	TR600	0.023	0.021	1.24
16	TR600	0.0155	0.018	2.78
7	TR900	0.011	0.0105	2.60
18	TR900	0.012	0.012	2.26
10	I247	0.021	0.019	1.31
13	I247	0.0094	0.0079	1.56
12	I329	0.014	0.019	4.66
14	I329	0.0093	0.0090	2.42

4.4 L'influence de la chronologie

Il importait de vérifier avant tout que l'ordre de déroulement des fermentations n'avait pas une influence significative sur les résultats (dû à une dégénérescence de la souche et des Eppendorf de préculture-mère stockés à -70°C). Le test est effectué sur l'aire des objets (Figure 26)

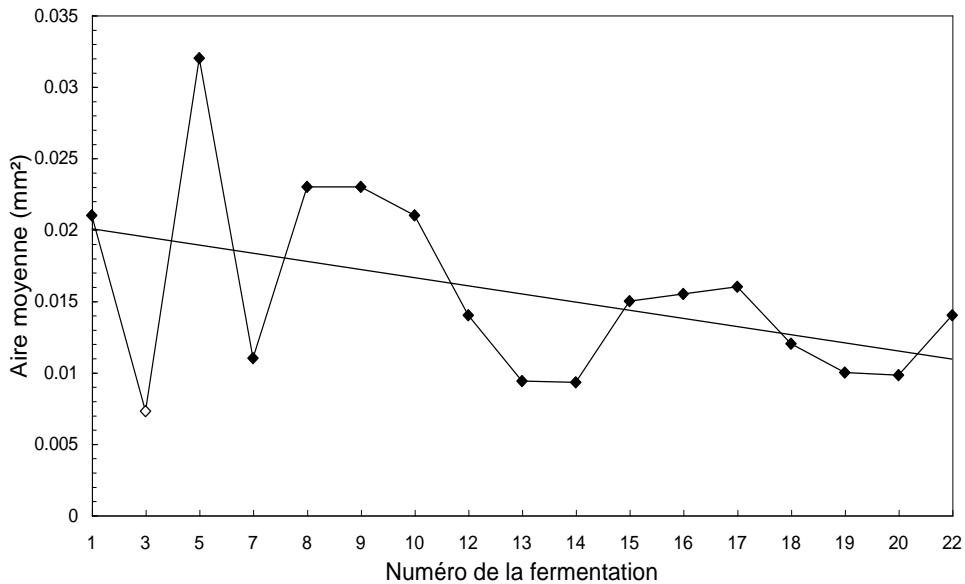


Figure 26 : Influence de la chronologie

La droite de régression sur les points a comme équation :

$$\text{aire} = -0.00046 \text{ numéro} + 0.212$$

L'écart-type sur le coefficient angulaire est égal à 0.00025, et l'intervalle de confiance à 95% vaut [-0.00099, $6.6 \cdot 10^{-5}$]. La pente de la droite n'est donc pas significativement non nulle, et on peut considérer qu'il n'y a pas de dérive systématique de l'aire des objets au cours du temps.

Le point provenant de la fermentation n°3 a une valeur anormalement faible, mais l'échantillon provenait d'une culture ayant un comportement anormal (voir §4.1).

4.5 L'influence de la concentration en oxygène dissous

Les expériences avec les turbines Rushton à 300 rpm ont été menées à trois consignes de concentration minimale en oxygène dissous: 0% (n°1), 10% (n°3) et 30% de la saturation (n°5 et n°15). Pour rappel (voir *Chapitre I*), on n'a pas constaté de différence significative quant à la biomasse produite en fonction des différentes conditions de culture. Ni le poids sec atteint au terme de la fermentation ni la vitesse maximale de croissance ne semblent affectés par la concentration minimale en oxygène dissous, la vitesse d'agitation, le type de mobile ou le taux d'inoculation.

On n'observe pas d'influence significative de la concentration en oxygène dissous (Figure 27). Les fermentations menées à 0% et 30% ont des résultats similaires, et celle menée à 10% (n°3), affichant une valeur inférieure, provenait d'une fermentation qui a eu un comportement anormal (voir §4.1).

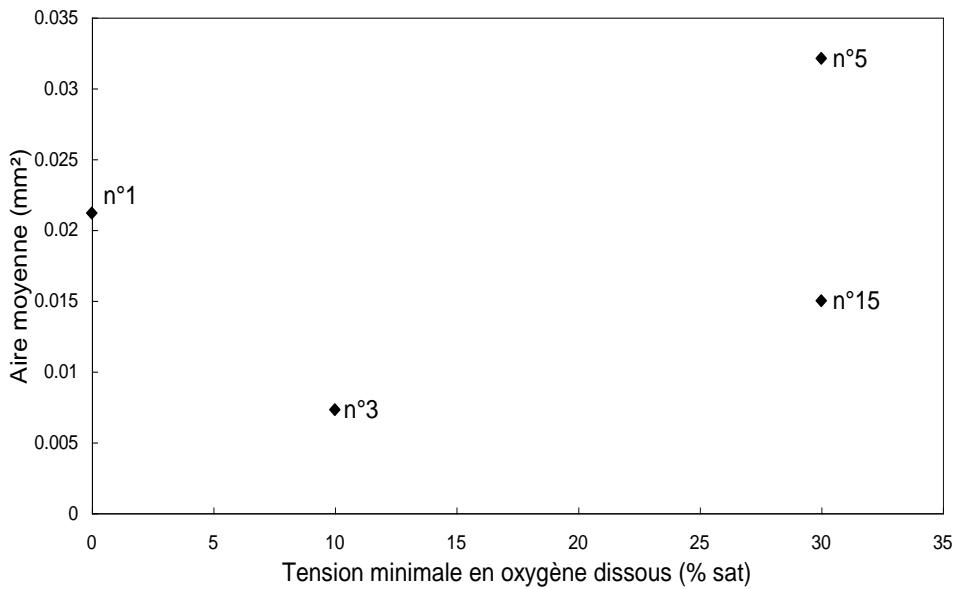


Figure 27 : Influence de la concentration en oxygène dissous sur l'aire des pelotes (TR300)

4.6 L'influence de l'inoculum

Une fermentation (n°20) a été menée avec les turbines Rushton à 450 rpm avec un taux d'inoculation de 0.83% au lieu des 5% habituels, mais du même âge (environ 24 heures). On ne note pas de différence significative entre l'aire des pelotes obtenues lors de ces fermentations (Figure 28). C'est pourquoi nous utiliserons également la valeur de cette expérience pour le calcul des valeurs moyennes. Une conséquence importante est que même si la préculture mère souffre quelque peu de son séjour prolongé à -70°C, un démarrage un peu plus lent (amenant à une concentration en biomasse moindre) n'a pas d'influence sur la morphologie d'*Actinomadura R39*.

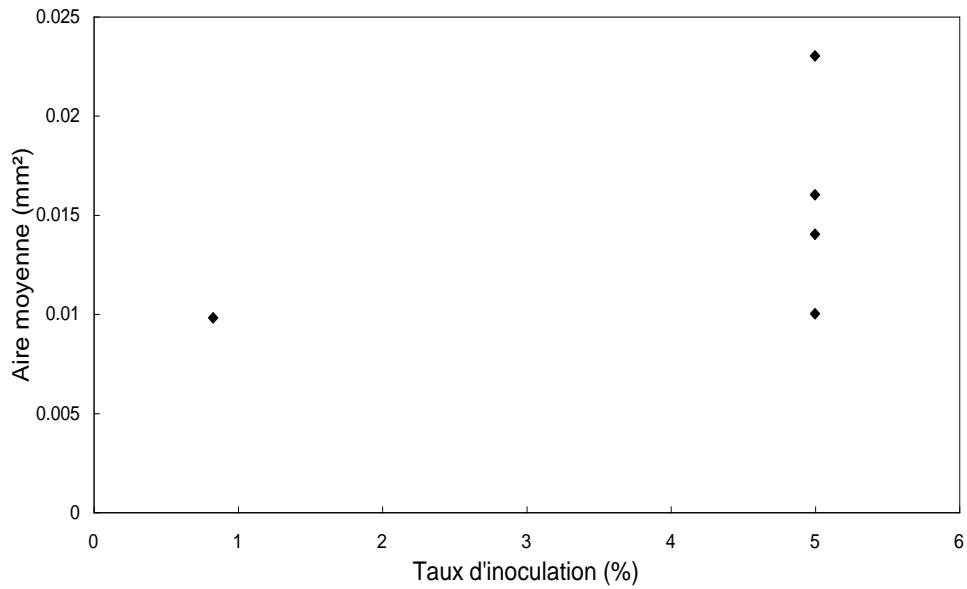


Figure 28 : Influence du taux d'inoculation sur l'aire (TR450)

4.7 *L'influence des conditions hydrodynamiques sur la morphologie*

Pour chaque expérience, on a calculé la valeur moyenne des mesures (aire, périmètre, etc.) sur l'ensemble des objets provenant d'une même fermentation (résultats présentés au Tableau 2). Nous avons ensuite fait la moyenne de ces résultats pour les fermentations menées dans des conditions identiques (par exemple les fermentations n°9, 17, 19 et 22 pour les turbines Rushton à 450 rpm).

Le Tableau 4 présente ces valeurs moyennes des différentes mesures (\pm écart-type s_e).

Tableau 4 : Valeurs moyennes et écart-type s_e des mesures

Conditions	Aire (mm ²)	diamètre éq. (mm)	Périmètre de Crofton (mm)	Circularité (-)
TR300	0.023 ± 0.009	0.17 ± 0.03	4.4 ± 1.4	81 ± 27
TR450	0.012 ± 0.003	0.12 ± 0.015	3.1 ± 1.6	83 ± 66
TR600	0.019 ± 0.006	0.16 ± 0.02	3.3 ± 0.3	57 ± 1
TR900	0.01175 ± 0.0009	0.122 ± 0.005	2.15 ± 0.4	41 ± 11
I247	0.0151 ± 0.0008	0.14 ± 0.04	3.15 ± 1.0	63 ± 9
I329	0.012 ± 0.003	0.12 ± 0.02	2.6 ± 0.5	55 ± 5
s_e global	0.005	0.02	1.2	40

Conditions	diam. Féret max (mm)	diam. Féret min (mm)	Nombre de trous
TR300	0.32 ± 0.05	0.18 ± 0.03	107 ± 31
TR450	0.25 ± 0.05	0.14 ± 0.03	62 ± 38
TR600	0.28 ± 0.025	0.16 ± 0.01	94 ± 13
TR900	0.21 ± 0.03	0.13 ± 0.006	58 ± 5.5
I247	0.26 ± 0.06	0.15 ± 0.03	93 ± 28
I329	0.24 ± 0.03	0.14 ± 0.009	50 ± 21
s_e global	0.045	0.025	30

Les paragraphes suivants détaillent les liens que nous avons établis entre les caractéristiques morphologiques mesurées par analyse d'images et les conditions de culture.

Le but poursuivi était de trouver quelles étaient les variables (reliées aux conditions d'agitation et à la géométrie des mobiles) qui permettaient de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig en une seule et même corrélation. On pouvait alors faire l'hypothèse que ces variables étaient celles qui influençaient et modifiaient les caractéristiques morphologiques d'*Actinomadura R39*.

Les conditions de culture peuvent être caractérisées par diverses grandeurs, telles que la vitesse d'agitation ou des produits du type $N^a * d^b$. Selon la valeur des exposants de la vitesse d'agitation N et du diamètre du mobile d , ces produits représentent des grandeurs caractéristiques de l'hydrodynamique, qui sont identiques pour des installations différentes si ces grandeurs sont maintenues constantes. Par exemple, le produit $N * d^{0.67}$ est proportionnel à la puissance volumique P/V dissipée dans le fermenteur. Le maintenir constant d'une expérience à l'autre revient à maintenir constante la puissance volumique. De plus amples explications ainsi que les correspondances d'autres valeurs de couples d'exposants sont présentées dans l'*Annexe IV.3*.

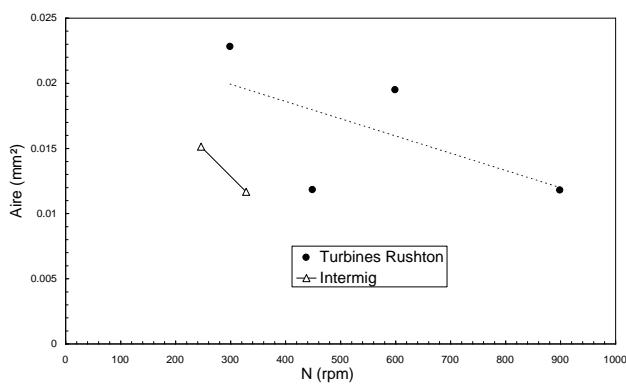
Les résultats provenant de l'étude hydrodynamique du fermenteur (mesures de puissance, temps de mélange, paramètres du modèle structuré, tels que présentés au *Chapitre III*) ont également été reliés aux mesures de la morphologie d'*Actinomadura R39*.

Au *Chapitre I* (§2.6), nous avons présenté les différentes causes de détérioration des micro-organismes (ou de modifications de la morphologie) proposées par divers auteurs. Elles sont essentiellement liées au cisaillement, à la puissance dissipée, à la fréquence de passage dans la zone du mobile et aux micro-tourbillons. Ce sont ces variables, ou les produits $N^a * d^b$ qui leur correspondent, dont on a principalement étudié l'influence sur la morphologie.

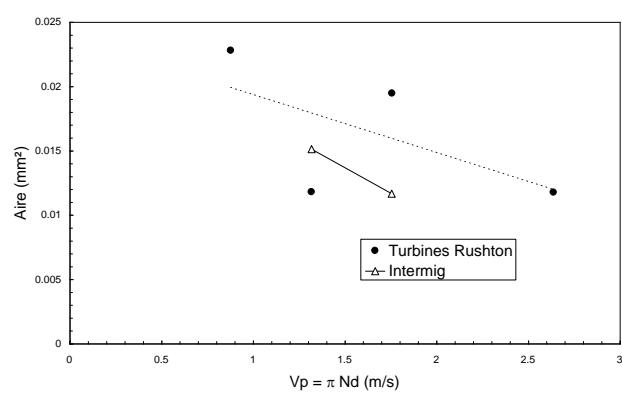
4.7.1 L'aire

Les graphiques de la Figure 29 présentent les mesures de l'aire des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , de la vitesse périphérique πNd , du produit $Nd^{0.67}$ (proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentielle maximale (entre le mobile en rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\tan,\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2}$ et du facteur de cisaillement intégré $ISF = \frac{2 \pi N d}{(D-d)}$, qui représente

une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile (voir *Chapitre I* §2.6.1.).



(a)



(b)

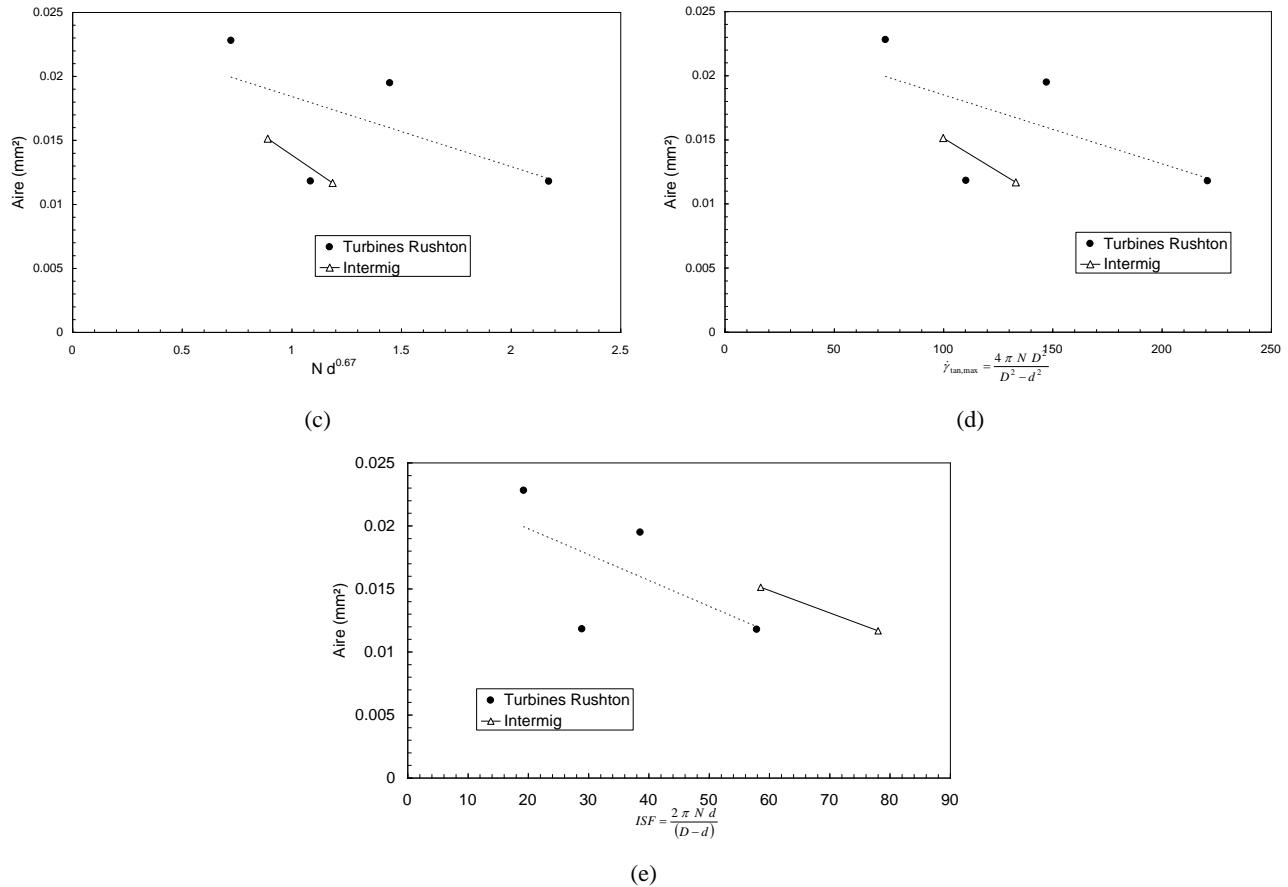


Figure 29 : Aire des pelotes (mm^2) en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) la vitesse périphérique, (c) $N d^{0.67}$ (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximale, (e) le facteur de cisaillement intégré

On constate que, pour les deux types de mobiles, l'aire des pelotes diminue avec une augmentation de la vitesse d'agitation (et des grandeurs qui en découlent). Cette constatation est conforme à ce qui a été observé par d'autres auteurs (Tucker and Thomas, 1994).

Dans des conditions hydrodynamiques identiques, les Intermig entraînent une aire inférieure à celle des turbines Rushton. Le point à 450 rpm avec les turbines Rushton affiche une valeur anormalement faible par rapport à l'évolution des autres points avec ces mobiles. C'est pourquoi nous avons choisi de lisser ces points par une droite pour en indiquer la tendance (nous ne possédons pas suffisamment d'information pour utiliser une autre corrélation). Il est difficile de comparer les points en fonction du facteur de cisaillement intégré du fait du décalage entre les valeurs de ce facteur pour les deux mobiles et du manque de points à des abscisses communes.

Aucun de ces facteurs $N^a * d^b$ ou des autres facteurs de cisaillement proposés dans la littérature (voir les *Chapitres I et III*) ne permettent de réunir les données provenant des deux types de mobiles (Figure 29).

Par contre, la Figure 30 montre que si l'on reporte l'aire en fonction du produit N^3d^5 (qui est proportionnel à la puissance dissipée dans le fermenteur, voir le *Chapitre III*, §2.6), les deux types de mobiles voient leurs influences se rejoindre : les points provenant des turbines Rushton et des Intermig se mélangent. Les deux points correspondants aux valeurs les plus élevées du produit N^3d^5 sont quasiment confondus.

Lorsqu'on ajuste librement les exposants du diamètre et de la vitesse d'agitation selon une relation $Aire = k N^a d^b$ (modèle 1, Tableau 5), leur rapport vaut 1.60, ce qui est proche du rapport 5/3 (=1.67) que l'on a dans le facteur N^3d^5 (modèle 2, Tableau 5).

En tenant compte de l'allure de la Figure 30, nous avons testé plusieurs modèles - linéaire et loi en puissance - tenant compte des conditions d'agitation permettant de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig. Les résultats sont présentés au Tableau 5.

Tableau 5 : Modélisation de l'aire (mm^2) en fonction de N et d

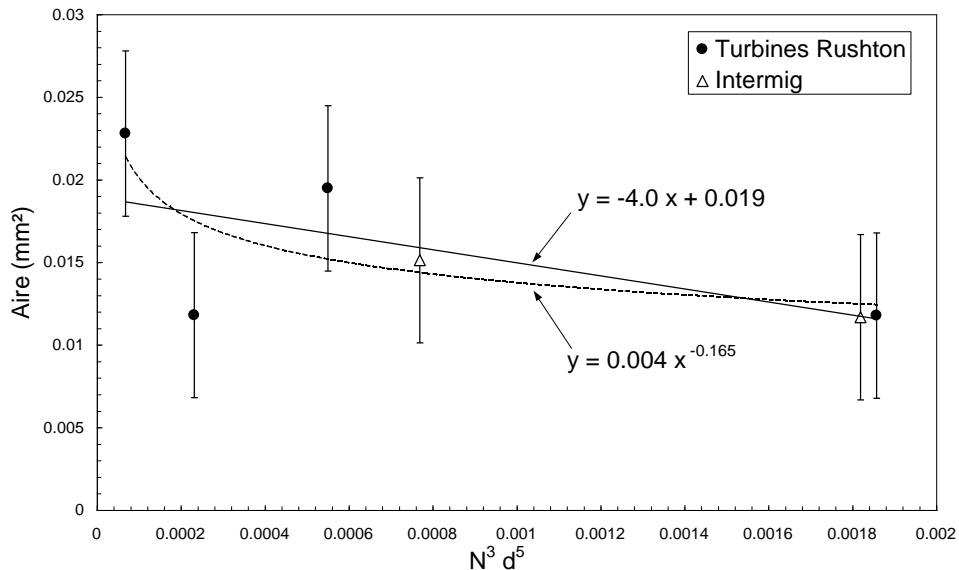
Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
1. $Aire = k N^a d^b$	$k=0.005 (\pm 0.005)$ $a=-0.5 (\pm 0.3)$ $b=-0.8 (\pm 0.5)$	$1.8 \cdot 10^{-5}$	$b/a=1.60$
2. $Aire = a + b N^3 d^5$	$a=0.019 (\pm 0.003)$ $b=-4 (\pm 2)$	$1.6 \cdot 10^{-5}$	$5/3=1.67$
3. $Aire = k (N^3 d^5)^a$	$k=0.004 (\pm 0.003)$ $a=-0.165 (\pm 0.08)$	$1.4 \cdot 10^{-5}$	

Nous avons tenté de discriminer les modèles 2 et 3 sur base d'un test en F. Les nombres de degré de liberté de ces modèles valent 4 (6 points utilisés pour l'ajustement et 2 paramètres) :

$$\frac{s_r^2(\text{modèle 2})}{s_r^2(\text{modèle 3})} = 1.14 < F^*(4,4,95\%) = 6.4 \Rightarrow \text{on ne peut pas les discriminer.}$$

Le modèle 1 est en fait identique au modèle 3 : l'exposant de N vaut $3*-0.165=-0.5$ et celui de d vaut $5*-0.165=-0.8$. La différence sur la valeur de l'erreur s_r^2 vient du fait qu'il y a un degré de liberté en moins dans le modèle 1.

Les modèles 2 et 3 sont représentés à la Figure 30.

**Figure 30 :** Aire des pelotes en fonction de $N^3 d^5$

Les barres d'erreur correspondent à l'erreur globale $s_e (=0.005 \text{ mm}^2)$ telle que calculée à partir des erreurs sur l'ensemble des conditions (voir Tableau 4).

Étant donné le décalage du point à 450 rpm avec les turbines Rushton par rapport à la tendance affichée par les autres points, nous avons également ajusté les régressions linéaires ou en loi en puissance en omettant ce point (Tableau 6 et Figure 31). Le rapport entre la somme des carrés des écarts moyenne sur la régression avec et sans ce point est égal à 4.8 dans le cas de la régression linéaire, et ce rapport est égal à 2.8 pour la loi en puissance. Il semble que la régression linéaire en fonction du produit $N^3 d^5$ soit un peu meilleure que celle en loi en puissance pour corrélérer les données provenant à la fois des expériences menées avec les turbines Rushton et les Intermig.

Tableau 6 : Modélisation de l'aire (mm^2) en fonction de N et d sans le point à 450 rpm

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	s_r^2 avec 450 / s_r^2 sans
$\text{Aire} = a + b N^3 d^5$	$a=0.023 (\pm 0.001)$ $b=-6.2 (\pm 1.1)$	$3.3 \cdot 10^{-6}$	4.8
$\text{Aire} = k (N^3 d^5)^a$	$k=0.004 (\pm 0.001)$ $a=-0.18 (\pm 0.04)$	$4.9 \cdot 10^{-6}$	2.8

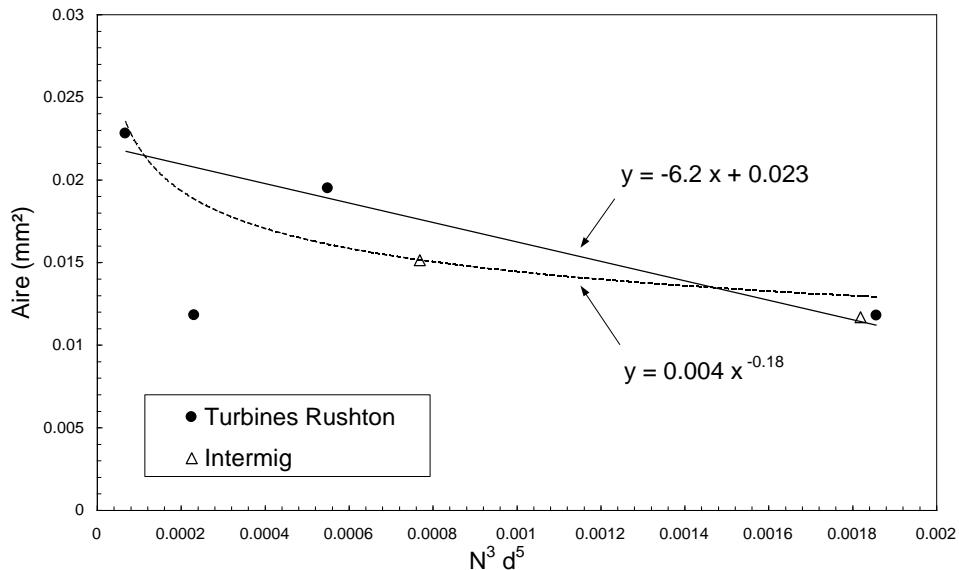


Figure 31 : Aire des pelotes (sans le point à 450 rpm) en fonction de $N^3 d^5$

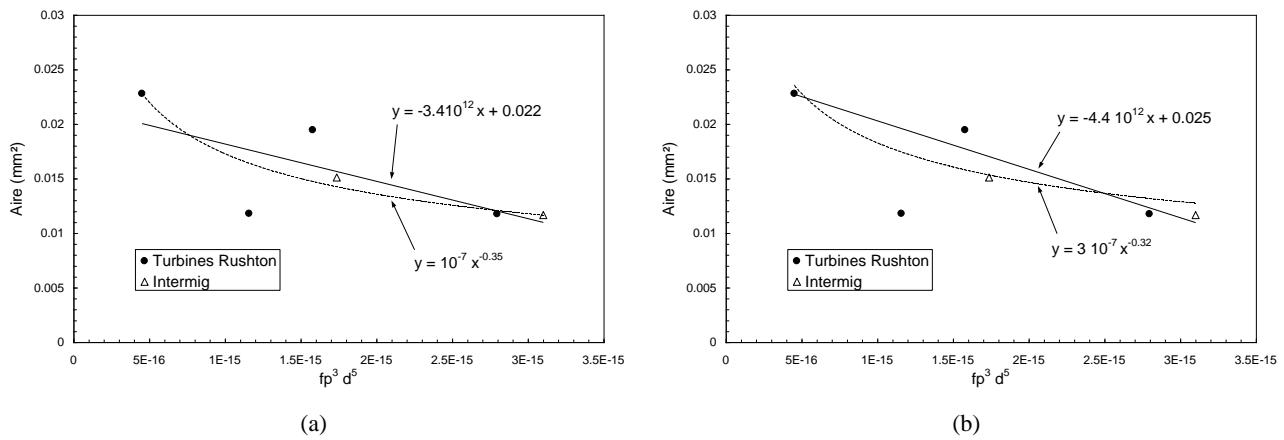
Puisque $F^*(4,4,95\%)=6.4$, on ne peut pas établir de discrimination entre les régressions et ou sans le point à 450 rpm.

Lors de la modélisation du fermenteur (voir *Chapitre III*), nous avions établi une relation entre le débit de pompage du modèle fp et la vitesse de rotation N . Il était donc logique de chercher à établir une corrélation entre l'aire des pelotes et fp (via le produit $fp^3 d^5$). Par souci de concision, les résultats des ajustements avec et sans les points des turbines Rushton à 450 rpm sont présentés en parallèle :

Tableau 7 : Modélisation de l'aire (mm^2) en fonction de fp et d

Modèle	Paramètres (\pm écart-type) avec 450 rpm [s_r^2]	Paramètres (\pm écart-type) sans 450 rpm [s_r^2]	s_r^2 avec 450 / s_r^2 sans
1. $Aire = k fp^a d^b$	$k=2.56 10^{-7} (\pm 1.3 10^{-6})$ $a=-0.97 (\pm 0.49)$ $b=-1.59 (\pm 0.70)$ [$1.5 10^{-5}$] NB : b/a=1.64		
2. $Aire = a + b fp^3 d^5$	$a=0.022 (\pm 0.003)$ $b=-3.4 10^{12} (\pm 1.6 10^{12})$ [$1.3 10^{-5}$]	$a=0.025 (\pm 0.002)$ $b=-4.4 10^{12} (\pm 7.5 10^{11})$ [$2.5 10^{-6}$]	5.3
3. $Aire = k (fp^3 d^5)^a$	$k=10^{-7} (\pm 4 10^{-7})$ $a=-0.35 (\pm 0.1)$ [$1.1 10^{-5}$]	$k=3.0 10^{-7} (\pm 8.6 10^{-7})$ $a=-0.32 (\pm 0.08)$ [$5.7 10^{-6}$]	2.0

Il est de nouveau statistiquement impossible de discriminer entre les modèles (les modèles 1 et 3 étant identiques) que ce soit avec ou sans le point à 450 rpm. L'erreur sur la régression (avec le point à 450 rpm) est quasiment identique à l'erreur sur l'ajustement de l'aire en fonction de $N^3 d^5$.

**Figure 32 :** Aire des pelotes en fonction de $fp^3 d^5$ et ajustement (a) avec 450 rpm, (b) sans 450 rpm

Puisque le **temps de mélange** θ_m et la **puissance dissipée** P sont fonction de la vitesse d'agitation et du diamètre du mobile, nous avons également examiné leur influence sur l'aire des pelotes, mais nous n'avons pas relevé de relation unifiante entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et l'aire des pelotes (Figure 33). Au *Chapitre I*, nous avions évoqué la possibilité d'existence d'une relation entre la puissance dissipée dans un volume critique dans la région de l'agitateur $P/V\Phi$ et la morphologie des bactéries filamenteuses (§ 2.6.2.2). Cependant, comme signalé dans le *Chapitre III*, ce volume tel que déterminé lors de l'ajustement paramétrique est identique pour les deux

mobiles étudiés. Il revient donc au même de relier l'aire à la puissance dissipée que de la relier à la puissance dissipée dans ce volume critique.

Nous avons utilisé la puissance en mode non aéré bien que les fermentations aient été menées avec un débit d'aération de 1 vvm du fait des problèmes de moussage rencontrés lors de la mesure. En effet, comme signalé dans le *Chapitre III*, le milieu artificiel présentait une émulsion que nous n'avions pas observée lors des fermentations. Il nous a semblé plus cohérent d'utiliser la mesure de la puissance en mode non aéré pour établir les corrélations entre la morphologie et la puissance. Nous avons montré au *Chapitre III* (§4.4.3) que la puissance sans et avec aération étaient proportionnelles, que la valeur moyenne du rapport Pg/P est égale à 0.555, et que cette valeur n'est pas statistiquement différente pour les deux mobiles. En conséquence, il suffit de remplacer Pg par $(0.555 * P)$ dans les relations établies pour pouvoir les utiliser en mode aéré.

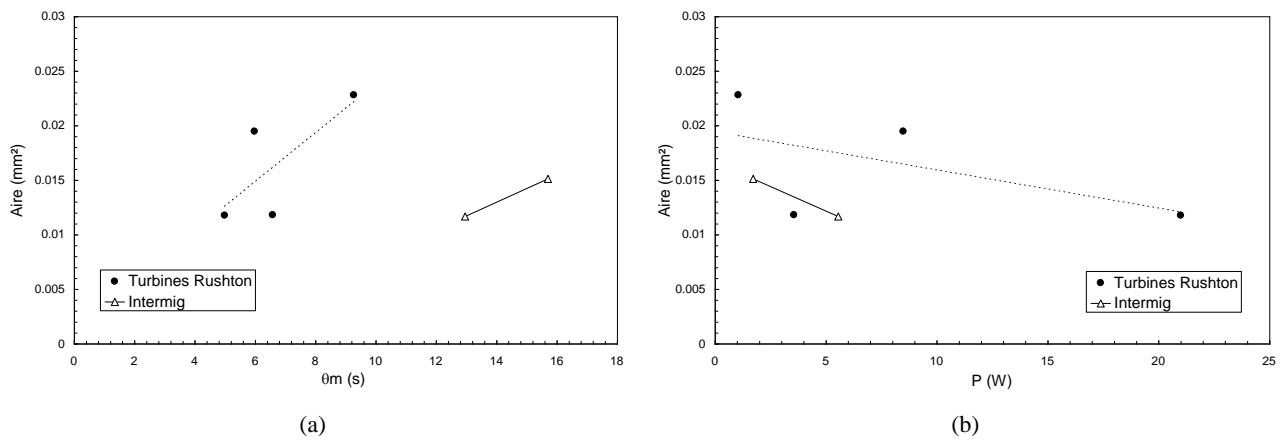
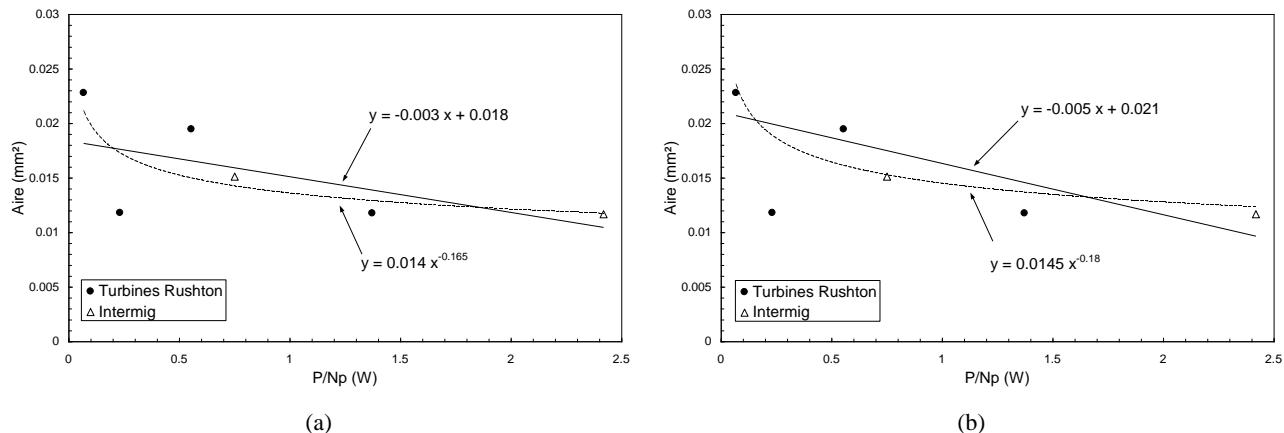


Figure 33 : Aire des pelotes en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P (W)

Si la puissance ne lie pas directement l'aire des pelotes cultivées avec les différents mobiles, par contre le rapport de la puissance au nombre de puissance P/Np est, par définition de ce dernier, directement proportionnel au produit $N^3 d^5$ (à la masse volumique près). On devrait donc retrouver une relation directe entre P/Np et l'aire des pelotes (les résultats des ajustements avec et sans le point à 450 rpm sont présentés en parallèles) :

Tableau 8 : Modélisation de l'aire (mm^2) par P/Np avec et sans le point à 450 rpm

Modèle	Paramètres (\pm écart-type) avec 450 rpm [s_r^2]	Paramètres (\pm écart-type) sans 450 rpm [s_r^2]	s_r^2 avec 450 / s_r^2 sans
$Aire = a + b \frac{P}{Np}$	$a=0.018 (\pm 0.003)$ $b=-0.003 (\pm 0.002)$ [$1.8 \cdot 10^{-5}$]	$a=0.021 (\pm 0.002)$ $b=-0.005 (\pm 0.0015)$ [$7.7 \cdot 10^{-6}$]	2.3
$Aire = k \left(\frac{P}{Np} \right)^a$	$k=0.014 (\pm 0.002)$ $a=-0.165 (\pm 0.08)$ [$1.4 \cdot 10^{-5}$]	$k=0.0145 (\pm 0.001)$ $a=-0.18 (\pm 0.05)$ [$5.3 \cdot 10^{-6}$]	2.6

**Figure 34 :** Aire des pelotes en fonction de P/Np et ajustement (a) avec 450 rpm, (b) sans 450 rpm

Dans le *Chapitre I* (§ 2.6.4), la combinaison de la puissance dissipée et du temps de circulation avait été évoquée comme possible cause de dégâts aux micro-organismes filamentueux. Pour rappel, Reuss (1988) a proposé de diviser la puissance par le flux de circulation V/θ_c où le temps de circulation θ_c représente le temps nécessaire au fluide pour effectuer deux passages successifs au même endroit (voir *Chapitre III*). Il a ainsi corrélé la vitesse de croissance maximale de *Rhizopus nigricans* et la constante cinétique de rupture de *Tetrahymenae pyriformis* au produit $(P/V)*\theta_c$ (Ws/m^3). Mais Smith *et al.* (1990) ont argumenté contre l'utilisation de ce produit $(P/V)*\theta_c$ et ont proposé une dépendance de la fréquence de rupture avec le terme $(P/d^3)*(1/\theta_c)$ ($\text{W/m}^3\text{s}$). Cette adaptation fut plus fructueuse et montra une corrélation simple entre la production ou la morphologie et la grandeur $(P/d^3)*(1/\theta_c)$.

Mais ni le produit $(P/d^3)*\theta_m$ ni l'autre forme $(P/d^3)/\theta_m$ n'ont conduit à une unification des mesures de l'aire provenant des cultures avec les deux mobiles (résultats non présentés).

Aucun des cas étudiés ne permet de discriminer entre les modèles linéaires et en loi de puissance, que ce soit avec ou sans le point à 450 rpm. Nous choisirons donc de ne garder que le modèle linéaire avec le point à 450 rpm. Ce choix se justifie par le manque de points expérimentaux pour pouvoir véritablement départager les modèles. Le modèle linéaire est le plus approprié pour extraire une tendance et l'influence d'une variable, que ce soit N^3d^5 , fp^3d^5 ou P/Np .

En résumé, on peut réunir les résultats obtenus avec les points provenant des fermentations avec les turbines Rushton et les Intermig par des **modèles linéaires** en fonction des variables N^3d^5 , fp^3d^5 et P/N . Ces modèles sont présentés au Tableau 9.

Tableau 9 : Modèles de tendance pour l'aire des pelotes

Corrélation (mm ²)	s_r^2
Aire = 0.019 – 4.0 N^3d^5	1.6 10 ⁻⁵
Aire = 0.022 – 3.4 10 ¹² fp^3d^5	1.3 10 ⁻⁵
Aire = 0.018 – 0.003 P/Np	1.8 10 ⁻⁵

La corrélation en fonction de fp^3d^5 semble un peu meilleure que celle en fonction de N^3d^5 , ce qui peut s'expliquer par le fait que fp intègre l'influence de l'écoulement (via le modèle structuré dont il est issu), contrairement à la vitesse d'agitation N . Mais le rapport des s_r^2 ($1.6 \cdot 10^{-5}/1.3 \cdot 10^{-5} = 1.23 < F^*(4,4,95\%) = 6.4$) montre que cette différence n'est pas significative.

En ce qui concerne les autres caractéristiques morphologiques, nous ne présenterons que l'ajustement en loi en puissance $k N^a d^b$ où les exposants sont ajustés indépendamment l'un de l'autre, ainsi que la corrélation linéaire retenue en suivant la même démarche que celle présentée en détail pour l'aire (avec le point à 450 rpm des turbines Rushton). Les autres graphiques sont repris en dans l'*Annexe IV.4* afin de ne pas alourdir la présentation des résultats.

4.7.2 Le diamètre équivalent

Le diamètre équivalent découlant directement de l'aire des pelotes $\left(de = \sqrt{\frac{4 * aire}{\pi}} \right)$, les

observations sont identiques à celles trouvées pour l'aire : diminution avec l'augmentation de l'agitation, et valeurs obtenues lors des fermentations avec les Intermig inférieures à celles avec les turbines Rushton.

Le modèle de tendance permettant de concilier les résultats obtenus avec les turbines Rushton et avec les Intermig est la régression linéaire en fonction de $\sqrt{N^3 d^5}$, ce qui est logique puisque le diamètre équivalent est proportionnel à la racine carrée de l'aire des pelotes (qui est elle-même proportionnelle à $N^3 d^5$) (Figure 35). L'équation, les valeurs des paramètres (\pm écart-type) et l'estimation de l'erreur sur la régression s_r^2 valent respectivement (Tableau 10):

Tableau 10 : Modèles de tendance pour le diamètre équivalent

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
$de = k N^a d^b$	$k=0.075 (\pm 0.043)$ $a=-0.23 (\pm 0.16)$ $b=-0.39 (\pm 0.25)$	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$b/a=1.68 (\approx 1.67)$
$de = a + b \sqrt{N^3 d^5}$	$a = 0.16 (\pm 0.02)$ $b = -0.95 (\pm 0.5)$	0.0003	$5/3=1.67$

On notera que lorsqu'on laisse les exposants de N et d s'ajuster indépendamment, la valeur de leur rapport est proche de 1.67, soit 5/3.

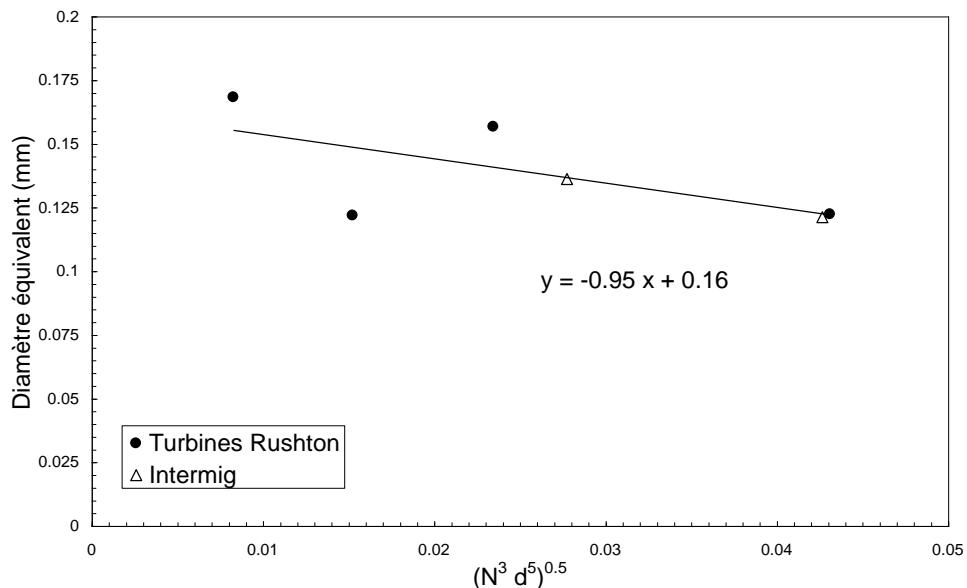


Figure 35 : Diamètre équivalent (mm) des pelotes en fonction du produit $(N^3 d^5)^{0.5}$

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le diamètre équivalent des pelotes (voir Annexe IV.4).

Par contre, on trouve une corrélation conciliant les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $\sqrt{fp^3 d^5}$ et $\sqrt{P/Np}$ (Figure 36), puisque ces deux termes sont proportionnels à $\sqrt{N^3 d^5}$.

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 11 :

Tableau 11 : Modèles de tendance pour le diamètre équivalent

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$de = a + b \sqrt{fp^3 d^5}$	$a = 0.19 (\pm 0.02)$ $b = -1.18 \cdot 10^6 (\pm 5 \cdot 10^5)$	0.0002
$de = a + b \sqrt{\frac{P}{Np}}$	$a = 0.16 (\pm 0.02)$ $b = -0.03 (\pm 0.02)$	0.0003

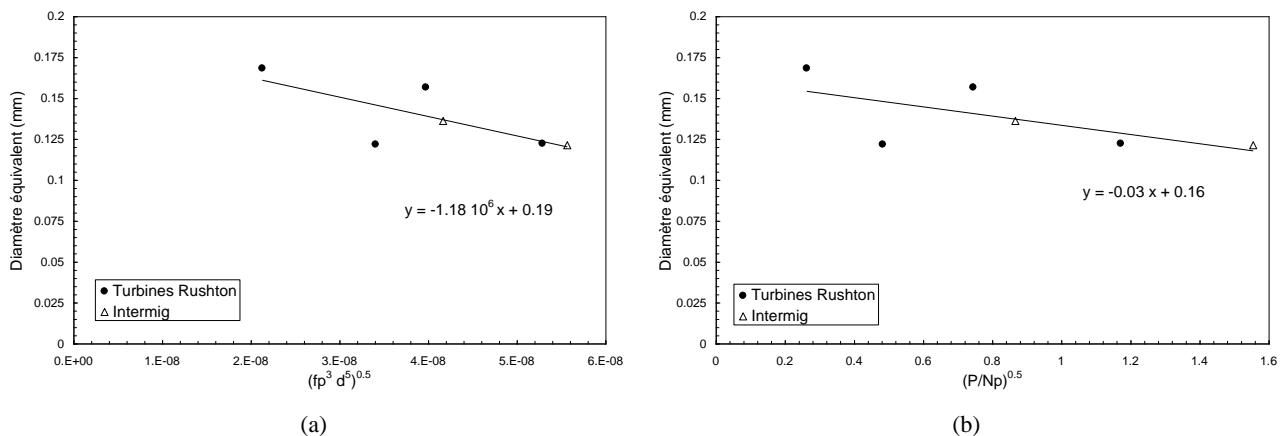


Figure 36 : Diamètre équivalent des pelotes en fonction de (a) $\sqrt{fp^3 d^5}$ et (b) $\sqrt{P/Np}$

Le diamètre équivalent diminue lorsque la puissance dissipée augmente.

4.7.3 Le périmètre de Crofton

Tout comme pour l'aire, les Intermig provoquent la formation de pelotes qui ont un périmètre inférieur à celui obtenu avec des turbines Rushton à conditions hydrodynamiques égales (voir *Annexe IV.4*). Le modèle de tendance permettant de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et avec les Intermig est la régression linéaire en fonction de $\sqrt{N^3 d^5}$ (Figure 37). L'équation, les valeurs des paramètres (\pm écart-type) et l'estimation de l'erreur sur la régression s_r^2 valent respectivement (Tableau 12) :

Tableau 12 : Modèles de tendance pour le périmètre de Crofton

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
$PC = k N^a d^b$	$k=1.3 (\pm 0.6)$ $a=-0.58 (\pm 0.1)$ $b=-0.65 (\pm 0.2)$	0.12	$b/a=1.12$
$PC = a + b \sqrt{N^3 d^5}$	$a = 4.4 (\pm 0.4)$ $b = -48 (\pm 12)$	0.15	$5/3=1.67$

Si on laisse les exposants s'ajuster librement, le rapport b/a est proche de 1. Cependant, la vitesse périphérique ne permet pas de concilier les données provenant des deux mobiles (voir *Annexe IV.4*).

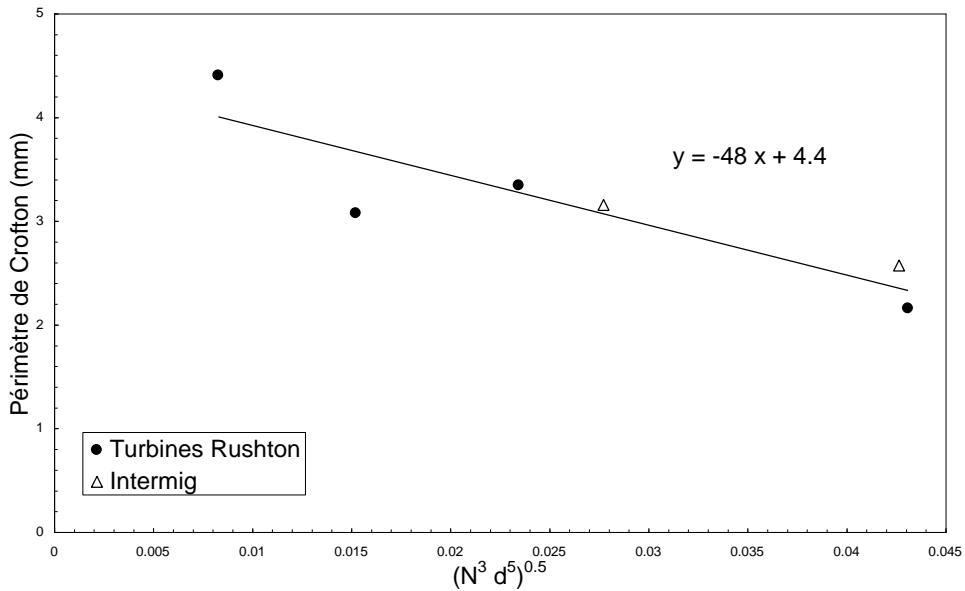


Figure 37 : Périmètre de Crofton (mm) des pelotes en fonction du produit $\sqrt{N^3 d^5}$

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le périmètre de Crofton des pelotes (voir *Annexe IV.4*).

Par contre, on trouve une corrélation réunissant les résultats obtenus avec les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $\sqrt{fp^3 d^5}$ et $\sqrt{P/Np}$, puisque ces deux termes sont proportionnels à $\sqrt{N^3 d^5}$ (Figure 36).

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 13 :

Tableau 13 : Modèles de tendance pour le périmètre de Crofton

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$PC = a + b \sqrt{fp^3 d^5}$	$a = 5.4 \pm 0.5$ $b = -5.7 \cdot 10^7 (\pm 1.1 \cdot 10^7)$	0.1
$PC = a + b \sqrt{\frac{P}{Np}}$	$a = 4.2 (\pm 0.45)$ $b = -1.3 (\pm 0.5)$	0.25

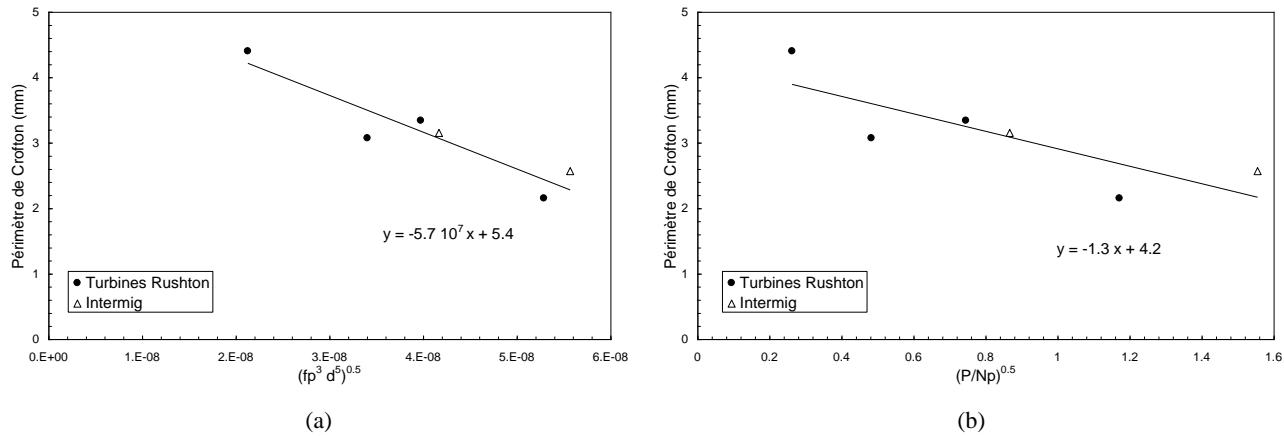


Figure 38 : Périmètre de Crofton (mm) des pelotes en fonction de (a) $\sqrt{fp^3 d^5}$ et (b) $\sqrt{P / Np}$

Le périmètre de Crofton diminue lorsque la puissance dissipée augmente.

4.7.4 Le diamètre de Féret maximum

Tout comme pour l'aire, les Intermig provoquent la formation de pelotes qui ont un diamètre de Féret maximum inférieur à celui obtenu avec des turbines Rushton à conditions hydrodynamiques égales. Les remarques sont identiques à celles faites pour l'aire en ce qui concerne le facteur de cisaillement intégré (voir *Annexe IV.4*).

Le modèle de tendance permettant de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig est la régression linéaire en fonction de $N^3 d^5$ (Figure 39). L'équation, les valeurs des paramètres (\pm écart-type) et l'estimation de l'erreur sur la régression s_r^2 valent respectivement (Tableau 14) :

Tableau 14 : Modèles de tendance pour le diamètre de Féret maximum

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
$dF_{\max} = k N^a d^b$	$k=0.15 (\pm 0.05)$ $a=-0.32 (\pm 0.11)$ $b=-0.43 (\pm 0.16)$	0.00052	$b/a=1.34$
$dF_{\max} = a + b N^3 d^5$	$a=0.29 (\pm 0.02)$ $b=-39 (\pm 14)$	0.0006	$5/3=1.67$

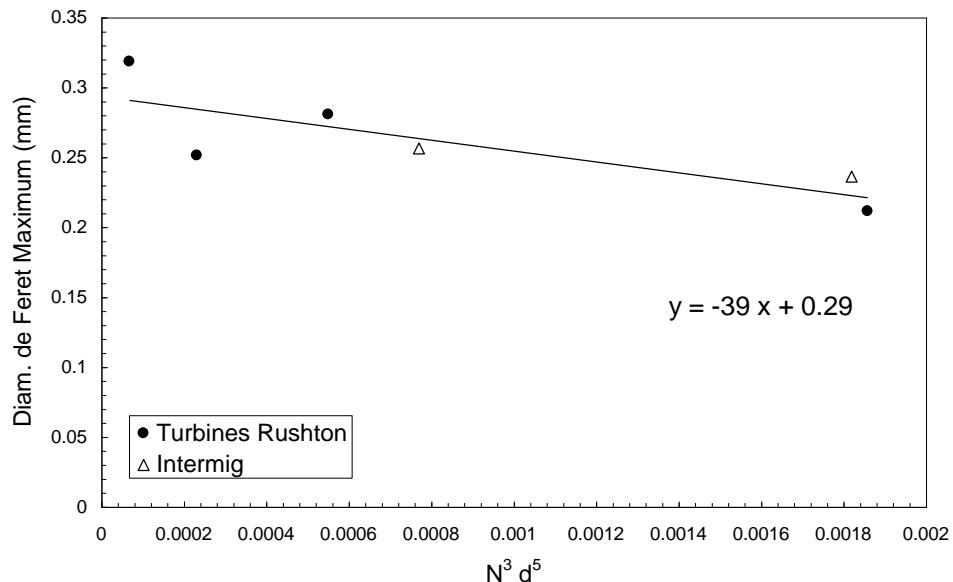


Figure 39 : Diamètre de Féret maximum des pelotes en fonction du produit $N^3 d^5$

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le diamètre de Féret maximum des pelotes (voir *Annexe IV.4*).

Par contre, on trouve une corrélation réunissant les résultats obtenus avec les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $fp^3 d^5$ et P/Np , puisque ces deux termes sont proportionnels à $N^3 d^5$ (Figure 40).

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 15 :

Tableau 15 : Modèles de tendance pour le diamètre de Féret maximum

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_e^2
$dF_{\max} = a + b fp^3 d^5$	$a=0.32 (\pm 0.02)$ $b=-3.2 \cdot 10^{13} (\pm 10^{13})$	0.0005
$dF_{\max} = a + b \frac{P}{Np}$	$a = 0.28 (\pm 0.02)$ $b = -0.03 (\pm 0.02)$	0.0009

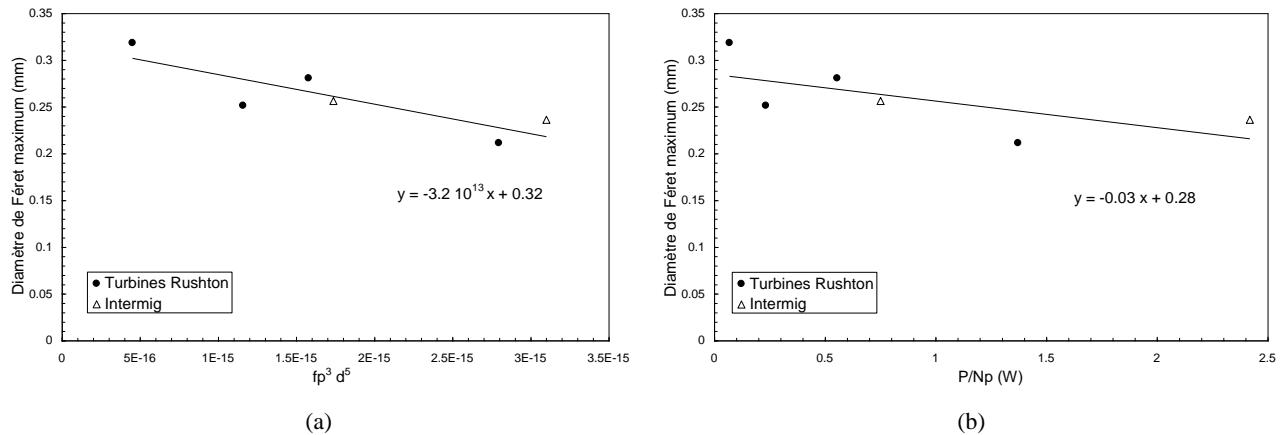


Figure 40 : Diamètre de Féret maximum (mm) en fonction de (a) $fp^3 d^5$ et (b) P/Np ,

Le diamètre de Féret maximum diminue lorsque la puissance dissipée augmente.

4.7.5 Le diamètre de Féret minimum

Tout comme pour l'aire, les Intermig provoquent la formation de pelotes qui ont un diamètre de Féret minimum inférieur à celui obtenu avec des turbines Rushton à conditions hydrodynamiques égales. Les remarques sont identiques à celles faites pour l'aire en ce qui concerne le facteur de cisaillement intégré (voir *Annexe IV.4*).

Le modèle de tendance permettant de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig est la régression linéaire en fonction de $N^3 d^5$ (Figure 41). L'équation, les valeurs des paramètres (\pm écart-type) et l'estimation de l'erreur sur la régression s_r^2 valent respectivement (Tableau 16) :

Tableau 16 : Modèles de tendance pour le diamètre de Féret minimum

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
$dF_{\min} = k N^a d^b$	$k=0.10 (\pm 0.04)$ $a=-0.27 (\pm 0.12)$ $b=-0.36 (\pm 0.18)$	0.0002	$b/a=1.33$
$dF_{\min} = a + b N^3 d^5$	$a=0.16 (\pm 0.01)$ $b=-18 (\pm 8)$	0.0002	$5/3=1.67$

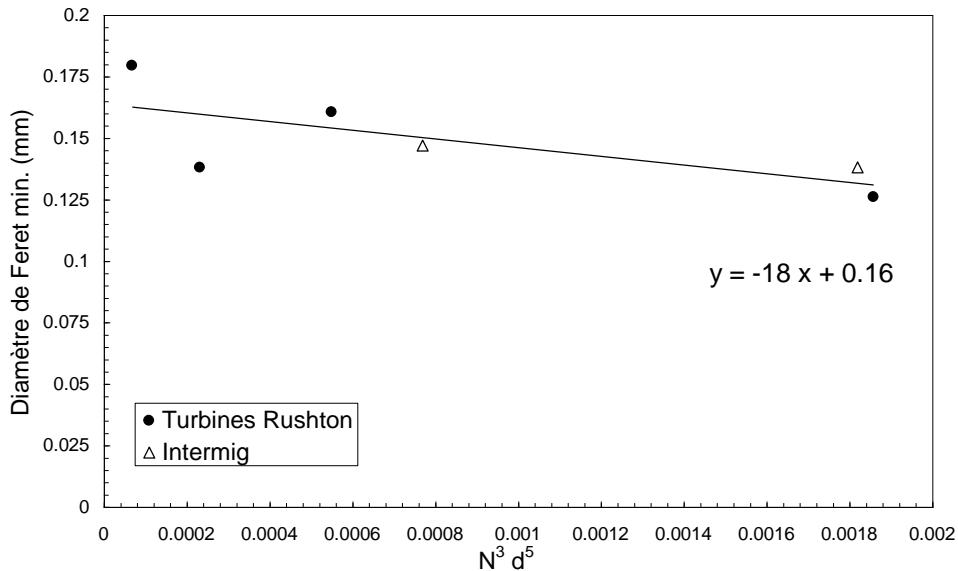


Figure 41 : Diamètre de Féret minimum des pelotes en fonction du produit $N^3 d^5$

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le diamètre de Féret minimum des pelotes (voir *Annexe IV.4*).

Par contre, on trouve une corrélation réunissant les résultats obtenus avec les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $fp^3 d^5$ et P/Np , puisque ces deux termes sont proportionnels à $N^3 d^5$ (Figure 42).

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 17 :

Tableau 17 : Modèles de tendance pour le diamètre de Féret minimum

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$dF \text{ min} = a + b fp^3 d^5$	$a = 0.17 (\pm 0.01)$ $b = -1.5 \cdot 10^{13} (\pm 6 \cdot 10^{12})$	0.0002
$dF \text{ min} = a + b \frac{P}{Np}$	$a = 0.16 (\pm 0.01)$ $b = -0.013 (\pm 0.009)$	0.0003

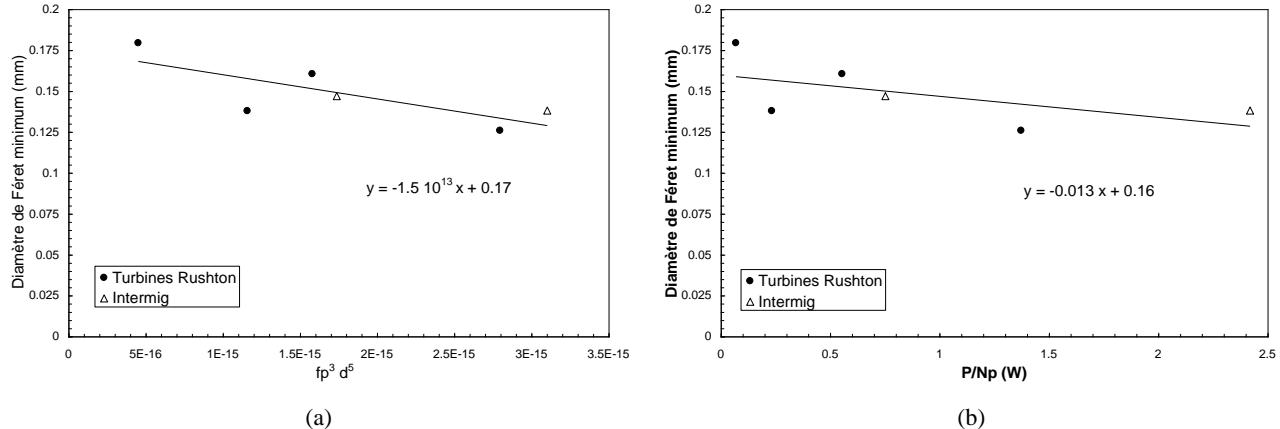


Figure 42 : Diamètre de Féret minimum (mm) en fonction de (a) $fp^3 d^5$ et (b) P/Np ,

Le diamètre de Féret minimum diminue lorsque la puissance dissipée augmente.

4.7.6 Le nombre de trous

Les Intermig provoquent la formation de pelotes qui ont moins de trous qu'avec des turbines Rushton à conditions hydrodynamiques égales (voir *Annexe IV.4*).

Le modèle de tendance permettant de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig est la régression linéaire en fonction de $N^3 d^5$ (Figure 43). L'équation, les valeurs des paramètres (\pm écart-type) et l'estimation de l'erreur sur la régression s_r^2 valent respectivement (Tableau 18) :

Tableau 18 : Modèle de tendance pour le nombre de trous

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$N_{trous} = a + b N^3 d^5$	$a=97 (\pm 12)$ $b=-21700 (\pm 10451)$	332

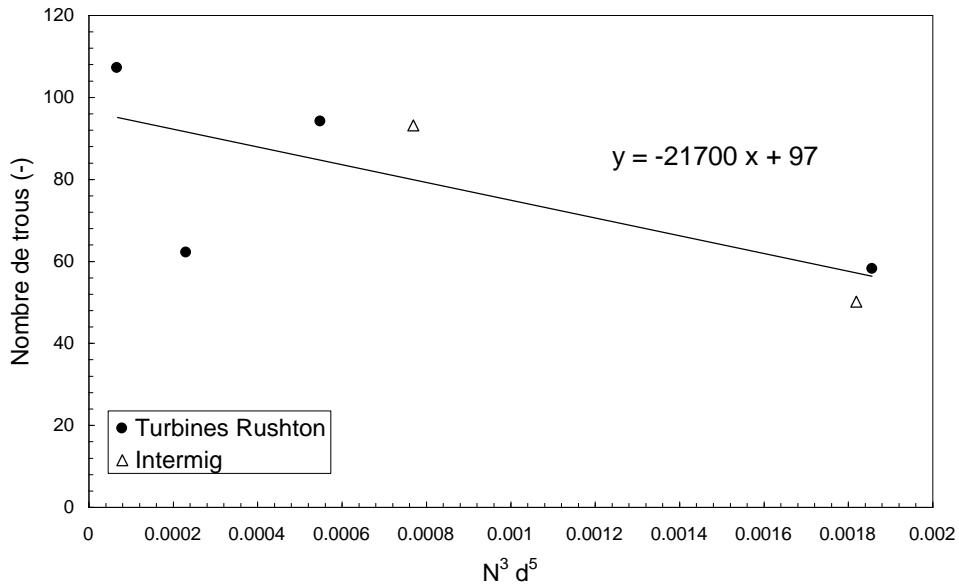


Figure 43 : Nombre de trous des pelotes en fonction du produit $N^3 d^5$

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le nombre de trous des pelotes (voir *Annexe IV.4*).

Par contre, on trouve une corrélation réunissant les résultats obtenus avec les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $fp^3 d^5$ et P/Np , puisque ces deux termes sont proportionnels à $N^3 d^5$ (Figure 44).

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 19 :

Tableau 19 : Modèles de tendance pour le nombre de trous

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_e^2
$N \text{ trous} = a + b fp^3 d^5$	$a = 110 (\pm 15)$ $b = -1.8 \cdot 10^{16} (\pm 8 \cdot 10^{15})$	285
$N \text{ trous} = a + b \frac{P}{Np}$	$a = 95 (\pm 11)$ $b = -19.2 (\pm 9.4)$	338

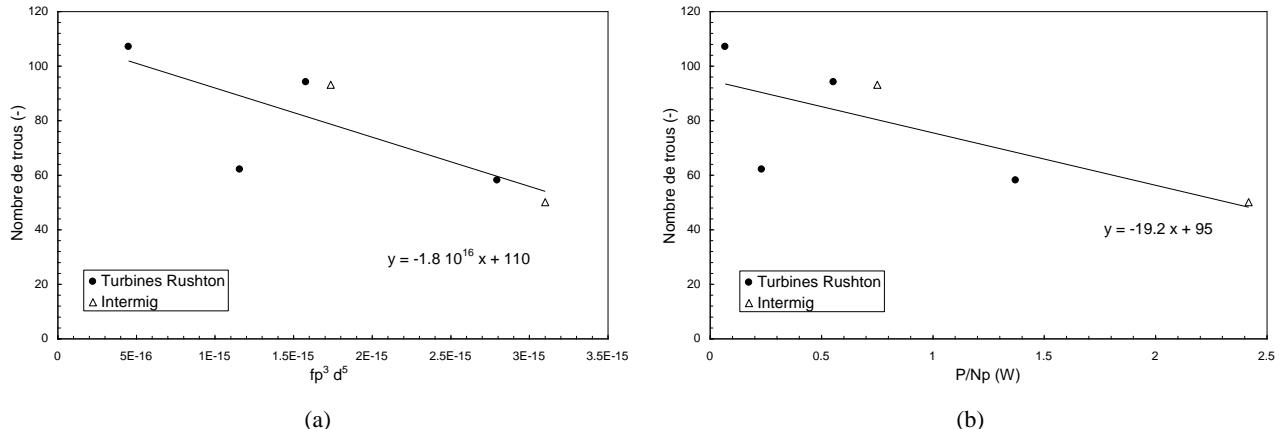


Figure 44 : Nombre de trous en fonction de (a) $fp^3 d^5$ et (b) P/Np ,

Le nombre de trous diminue lorsque la puissance dissipée augmente.

4.7.7 La circularité

La circularité, qui compare la forme de l'objet à un disque parfait (pour laquelle elle vaut 1), montre des tendances différentes. À vitesse de rotation égale, les Intermig induisent la formation de pelotes un peu plus proche d'un disque plein que les turbines Rushton, mais c'est l'inverse qui est observé lorsqu'on les compare en fonction du facteur $N^3 d^5$ ou du facteur de cisaillement intégré (voir Annexe IV.4).

La vitesse périphérique permet de réunir les résultats obtenus avec les données provenant des turbines Rushton et des Intermig (Figure 45). La circularité serait ainsi corrélée à la vitesse périphérique des pales, elle-même proportionnelle au cisaillement maximum.

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 20 :

Tableau 20 : Modèles de tendance pour la circularité (-)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	rapport des exposants
$circularité = k N^a d^b$	k=29 (\pm 17) a=-0.56 (\pm 0.18) b=-0.69 (\pm 0.26)	88	b/a=1.23
$circularité = a + b (\pi Nd)$	a= 102 (\pm 10) b=-24 (\pm 6)	59	=1

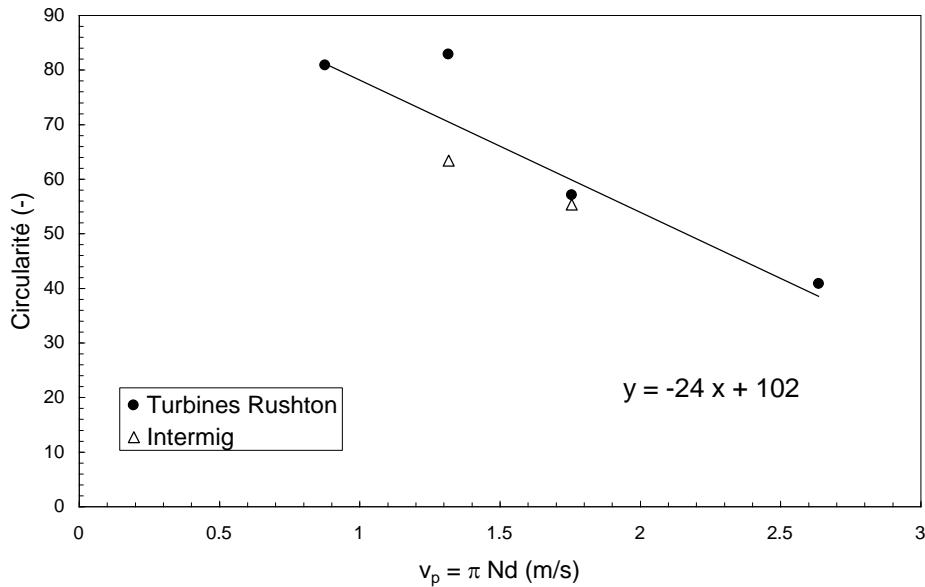


Figure 45 : Circularité (-) en fonction de la vitesse périphérique des pales v_p (m/s)

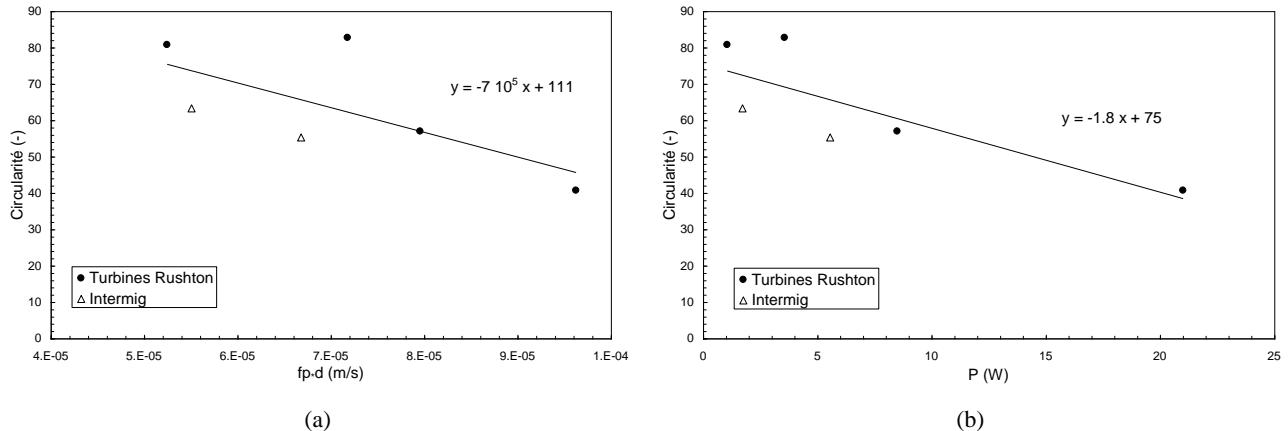
Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou le rapport P/Np et la circularité (voir Annexe IV.4).

Par contre, on trouve une corrélation conciliant les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $fp * d$ (proportionnel à $N * d$) et à la puissance dissipée (Figure 46). Ce résultat rejoint celui de Cui (Cui *et al.*, 1997) qui avait trouvé que la porosité des pelotes était inversement proportionnelle à la puissance spécifique moyenne ($=P/\rho V$, et dans notre cas V et ρ sont identiques pour toutes les expériences).

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 21.

Tableau 21 : Modèles de tendance pour la circularité (-)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$circularité = a + b fp * d$	$a = 111 (\pm 26)$ $b = -7 \cdot 10^5 (\pm 4 \cdot 10^5)$	171
$circularité = a + b P$	$a = 75 (\pm 6)$ $b = -1.8 (\pm 0.6)$	111

Figure 46 : Circularité en fonction de (a) $fp \cdot d$ et (b) P

La circularité des pelotes diminue lorsque la puissance injectée augmente, c'est-à-dire que les pelotes se rapprochent d'un disque plein. Cette diminution est liée au fait que le périmètre diminue plus rapidement que l'aire. Étant donné qu'il s'agit du périmètre **total** de la pelote (périmètre externe + ensemble des périmètres des trous), cela signifie que les vides se remplissent et que la pelote est moins "poreuse" lorsque le stress hydrodynamique augmente. Cette observation rejoint celle qui avait été faite sur le nombre de trous au paragraphe précédent. Le fait que la circularité soit liée à la vitesse périphérique (elle-même proportionnelle au cisaillement maximum, qui est une grandeur locale), au paramètre représentant le pompage et à la puissance dissipée indique que cette grandeur est directement influencée par la "valeur absolue" des contraintes que les pelotes rencontrent et non à la façon dont elles sont distribuées dans le fermenteur.

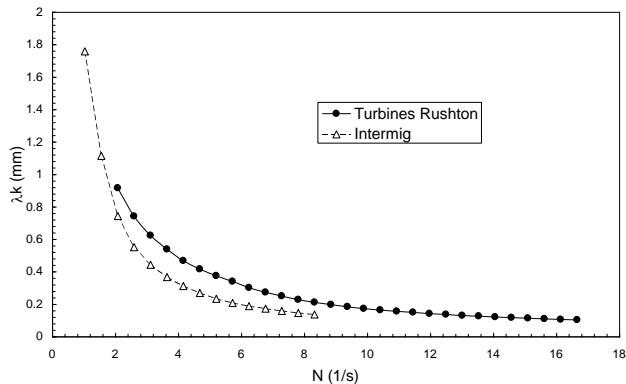
4.7.8 L'échelle de Kolmogoroff

Au *Chapitre I*, il avait été signalé que les tourbillons capables de causer des lésions aux pelotes devaient avoir une taille du même ordre de grandeur que ces dernières (§ 2.6.5.). La taille de ces tourbillons est caractérisée par l'échelle de Kolmogoroff λ_K , qui est directement liée à la puissance dissipée. L'analyse d'images ayant fourni des résultats quantitatifs en ce qui concerne la taille des pelotes, il est possible de comparer les mesures de taille à celle des tourbillons.

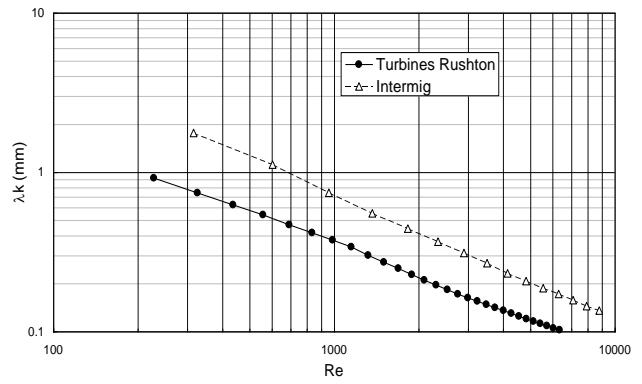
L'échelle de Kolmogoroff λ_K est définie par (éq. (7), *Chapitre III*, §2.2.4.) :

$$\lambda_k = f(\nu, \varepsilon_T) = \left(\frac{\nu^3}{\varepsilon_T} \right)^{1/4} = \frac{\mu^{3/4}}{\left(\frac{P}{V} \right)^{1/4}} \quad (m) \quad (5)$$

Si on effectue ce calcul en tenant compte de l'ensemble du volume de la cuve, on obtient les résultats présentés à la Figure 47 :



(a)



(b)

Figure 47 : Échelle de Kolmogoroff λ_k (mm) calculée sur le volume total, (a) en fonction de N (1/s) et (b) du Re

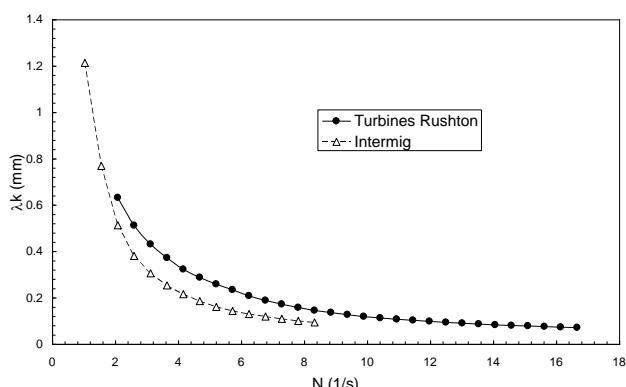
L'échelle de Kolmogoroff varie selon le mobile utilisé et la vitesse de rotation :

- turbines Rushton : 0.9 à 0.1 mm (900 à 100 μm) pour N variant de 2.1 à 16.67 s^{-1}
- Intermig : 1.8 mm à 0.13 mm (1800 à 130 μm) pour N variant de 1.03 à 8.33 s^{-1}

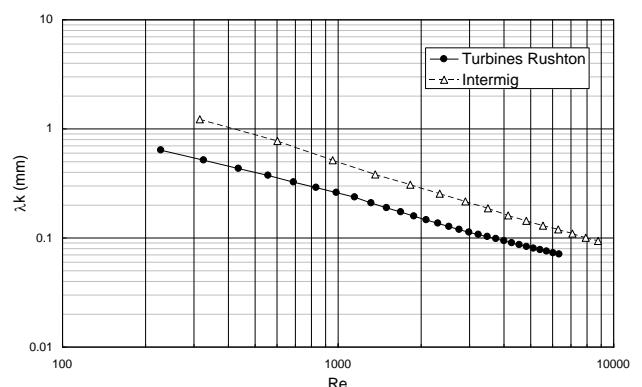
Au *Chapitre I* (§ 2.6.2.2), nous avions évoqué l'éventualité que la fragmentation des hyphes prenne place dans la région proche de l'agitateur, où l'on a montré qu'avait lieu la plus grande dissipation d'énergie spécifique, et nous avions calculé ce volume $V\Phi$ au *Chapitre III* pour les deux mobiles étudiés (§ 4.5.3.2.) :

- turbines Rushton : $V\Phi = 1.07$ litres ($L=0.02\text{m}$, $\alpha=90^\circ$)
- Intermig : $V\Phi = 1.2$ litres ($L = 0.035 \text{ m}$, $\alpha=45^\circ$)

La moyenne est de 1.135 litres. C'est en fait sur ce volume que doit être calculée l'échelle de Kolmogoroff, et non pas sur le volume total. On obtient alors :



(a)



(b)

Figure 48 : Échelle de Kolmogoroff λ_{kz} (mm) calculée sur le volume de la zone de dissipation d'énergie maximale,

(a) en fonction de N (1/s) et (b) du Re

L'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} (calculée sur la zone où la dissipation d'énergie est maximale) varie selon le mobile utilisé et la vitesse de rotation :

- turbines Rushton : 0.63 à 0.07 mm (630 à 70 μm) pour N variant de 2.1 à 16.67 s^{-1}
- Intermig : 1.21 mm à 0.09 mm (1210 à 90 μm) pour N variant de 1.03 à 8.33 s^{-1}

Des mesures avec un anémomètre à film chaud effectuées dans le même fermenteur avec des turbines Rushton (Stevens, 1990) montraient que l'échelle de Kolmogoroff variait de 0.14 mm à 200 rpm à 0.07 mm à 800 rpm pour un milieu à 26% de sucre. La viscosité d'une solution à 26% en sucre à 20 °C est de 2.568 mPa.s (CRC Handbook of Chemistry and Physics), c'est-à-dire 3 à 10 fois plus faible que pour la solution non-newtonienne à 0.125 % de xanthane. En tenant compte de la différence de masse volumique, le numérateur de la relation (5) est 3 à 5 fois plus élevé dans le cas de la solution de xanthane. Les valeurs de l'échelle de Kolmogoroff mesurées dans le même fermenteur par ces méthodes différentes sont du même ordre de grandeur, bien que l'une utilise une méthode locale (anémomètre à film chaud) et l'autre une méthode globale (puissance).

Dans la littérature, on trouve que l'échelle de Kolmogoroff dans le voisinage du mobile est de l'ordre de 10 à 500 μm (van Suijdam and Metz, 1981; Shamlou *et al.*, 1994; Dunlop and Ye, 1990), ce qui correspond à l'ordre de grandeur de nos mesures.

L'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} a une taille légèrement inférieure au diamètre de Féret maximum et elle est du même ordre de grandeur que le diamètre de Féret minimum (Tableau 22 et Figure 49, avec la diagonale $DF=\lambda_{Kz}$).

Tableau 22 : Diamètres de Féret maximum et minimum et échelle de Kolmogoroff λ_{Kz}

Conditions	DFmax (mm)	DFmin (mm)	λ_{Kz} (mm)
TR300	0.32	0.18	0.27
TR450	0.25	0.14	0.165
TR600	0.28	0.164	0.12
TR900	0.21	0.13	0.08
I247	0.26	0.15	0.26
I329	0.24	0.14	0.17

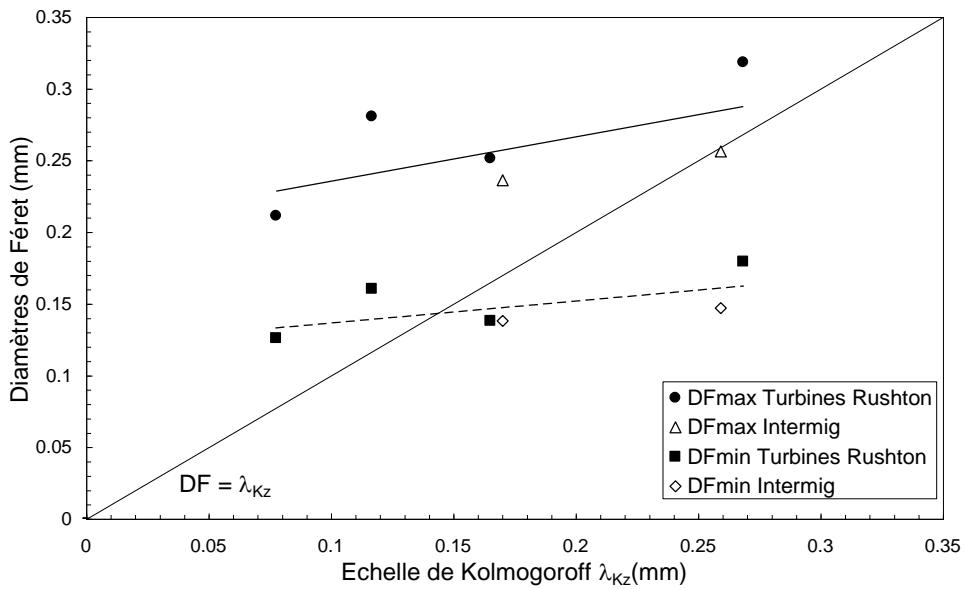


Figure 49 : Diamètres de Féret maximum et minimum en fonction de l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz}

En ce qui concerne le diamètre de Féret maximum, les valeurs obtenues avec les deux types de mobiles sont proches, bien que les turbines Rushton restent légèrement supérieures aux Intermig.

On peut toutefois les réunir les résultats par une régression linéaire :

$$DF_{max} = 0.20 + 0.31 * \lambda_{Kz}$$

erreur sur le terme indépendant = 0.04 et erreur sur le terme proportionnel = 0.19 ($s_r^2 = 0.001$)

Pour le diamètre de Féret minimum, les valeurs obtenues avec les deux types de mobiles sont plus proches que pour le diamètre de Féret maximum. La régression linéaire en fonction de λ_{Kz} (mm) s'écrit :

$$DF_{min} = 0.12 + 0.15 * \lambda_{Kz}$$

erreur sur le terme indépendant = 0.02 et erreur sur le terme proportionnel = 0.10 ($s_r^2 = 2.9 \cdot 10^{-4}$)

Que ce soit pour le diamètre de Féret maximum ou minimum, le terme proportionnel n'est pas significativement non nul (à 95% de seuil de confiance). Dans la gamme qui concerne ce travail, on peut donc dire que les diamètres de Féret des pelotes sont indépendants de l'échelle de Kolmogoroff.

Quelle que soit la vitesse d'agitation, l'échelle de Kolmogoroff n'a pas d'effet significatif sur la croissance des micro-organismes (voir les conclusions du *Chapitre I*). Étant donné que la croissance se fait aux extrémités des hyphes (dont la taille est de l'ordre de quelques microns), l'échelle de

Kolmogoroff est beaucoup plus grande que ces extrémités apicales. Ces phénomènes se passent à des échelles trop différentes que pour pouvoir interférer.

Par contre, le fait que l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} soit du même ordre de grandeur que les diamètres de Féret (et donc des dimensions de l'enveloppe externe des pelotes d'*Actinomadura R39*) explique qu'une modification de la vitesse d'agitation (donc de l'hydrodynamique du fermenteur) a une influence sur la morphologie des pelotes, notamment sur leur aire. Cette relation est représentée à la Figure 50. Pour une même échelle de turbulence, les Intermig entraînent la formation de pelotes d'une taille inférieure à celle des Turbines Rushton. Si λ_{Kz} augmente (c'est-à-dire si la puissance ou la vitesse de rotation diminuent) les pelotes ont une aire plus grande.

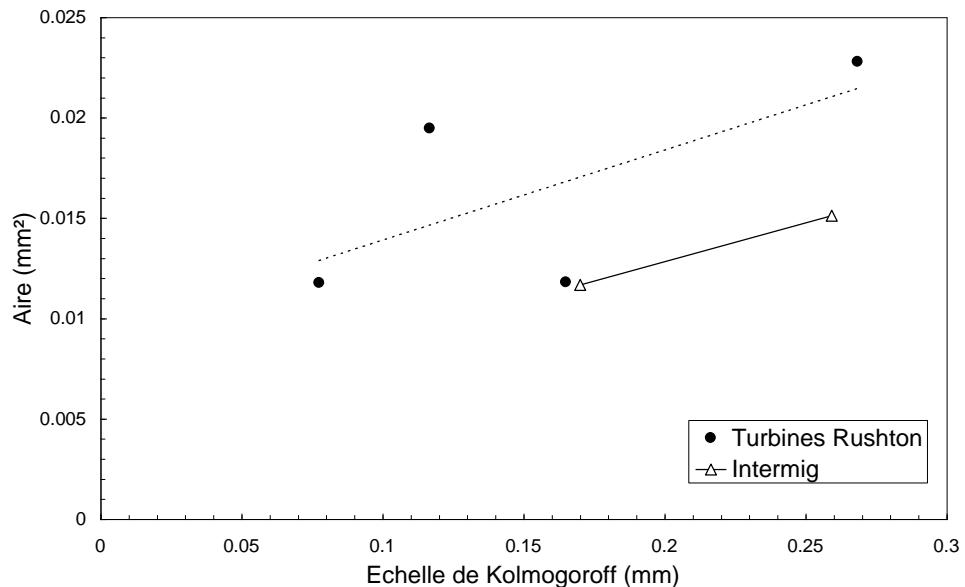


Figure 50 : Influence de l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} (mm)

5 Mesures complémentaires

5.1 Mesures adimensionnelles

5.1.1 Rapport diamètres de Féret

5.1.1.1 Valeurs moyennes

On constate sur la Figure 51 que, pour les deux types de mobiles, le rapport des diamètres de Féret des pelotes semble augmenter légèrement avec une augmentation de la vitesse d'agitation et se

rapprocher de 1 (c'est-à-dire d'un objet inscrit dans un carré) . La valeurs obtenues avec les turbines Rushton ou les Intermig sont très proches et semblent quasiment constantes.

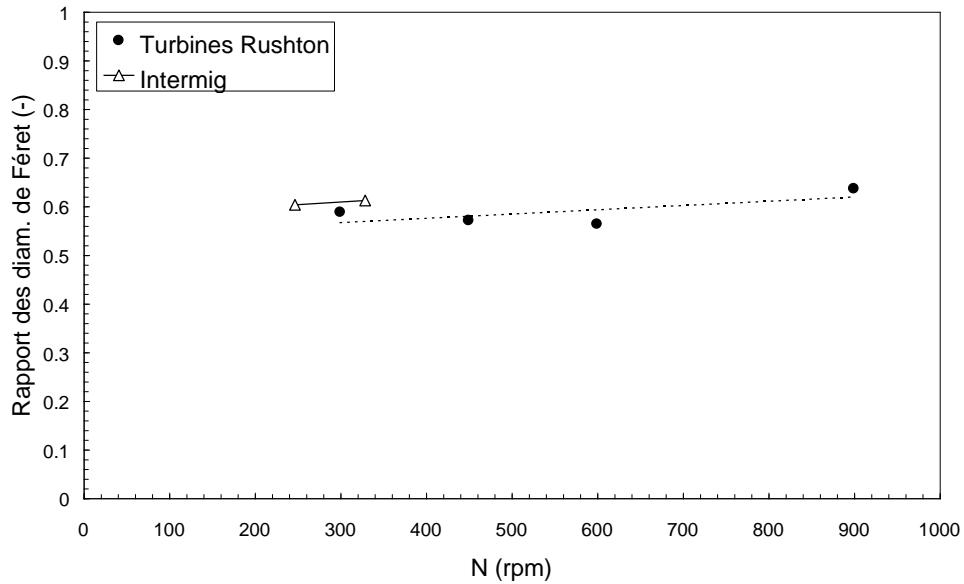


Figure 51 : Rapport des diamètres de Fåret (-) en fonction de la vitesse de rotation

Le modèle de tendance permettant de réunir les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig est la régression linéaire en fonction de N^3d^5 (Figure 52).

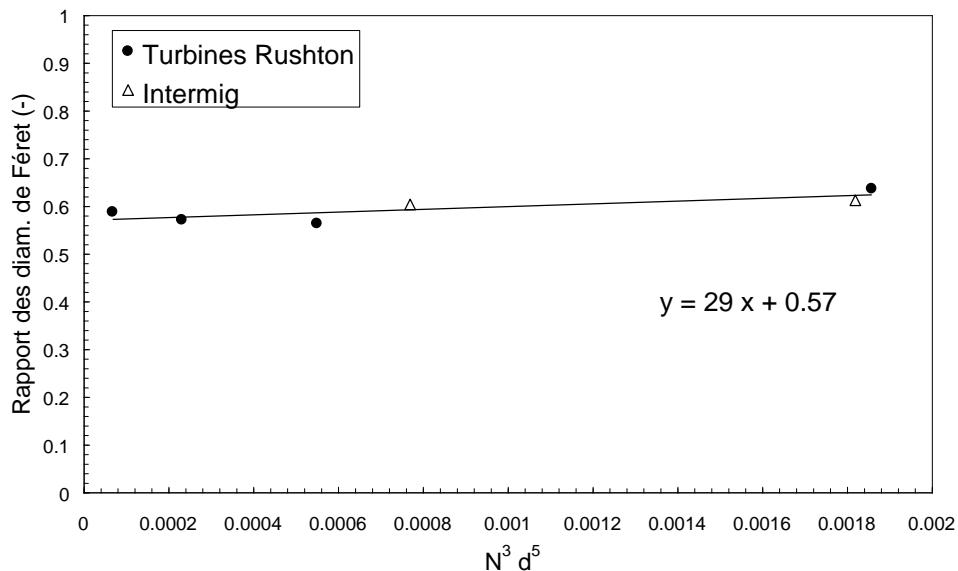


Figure 52 : Rapport des diamètres de Fåret des pelotes en fonction du produit N^3d^5

L'équation, les valeurs des paramètres (\pm écart-type) et l'estimation de l'erreur sur la régression s_r^2 valent respectivement (Tableau 23) :

Tableau 23 : Modélisation du rapport des diamètres de Féret (-)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$RapdF = a + b N^3 d^5$	$a=29 (\pm 0.01)$ $b=0.57 (\pm 0.01)$	0.0003

La valeur de la pente est significativement non-nulle (à 95% de confiance).

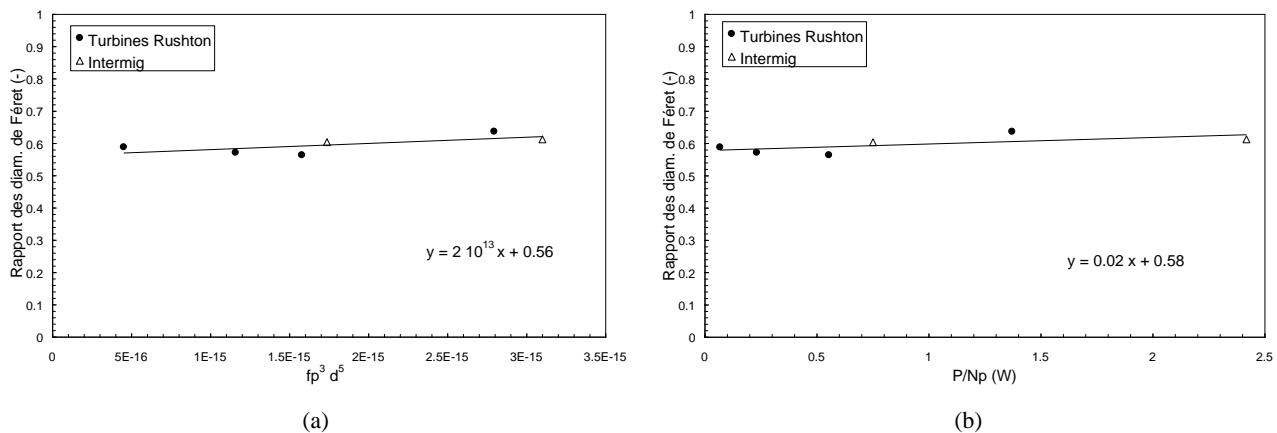
On trouve une corrélation réunissant les résultats obtenus avec les données des turbines Rushton et des Intermig en fonction du produit $fp^3 d^5$ et P/Np (Figure 40).

Les modèles de tendance linéaires sont présentés au Tableau 15 :

Tableau 24 : Modèles de tendance pour le diamètre de Féret maximum

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
$RapdF = a + b fp^3 d^5$	$a= 0.56 (\pm 0.02)$ $b=1.9 \cdot 10^{13} (\pm 10^{13})$	0.0005
$RapdF = a + b \frac{P}{Np}$	$a = 0.58 (\pm 0.01)$ $b = 0.03 (\pm 0.01)$	0.0005

Dans ces deux équations, le terme proportionnel n'est pas significativement non nul.

**Figure 53 :** Rapport des diamètres de Féret (-) en fonction de (a) $fp^3 d^5$ et (b) P/Np ,

Il semble donc que le rapport des diamètres de Féret soit constant et indépendant des conditions de culture. Sa valeur moyenne serait de l'ordre de 0.57.

5.1.2

Nombre de trous par unité de surface

Si l'on rapporte le nombre de trous à l'aire pour chaque pelote, on observe que cette densité de trou est indépendante des conditions hydrodynamiques régnant dans le fermenteur (Figure 54).

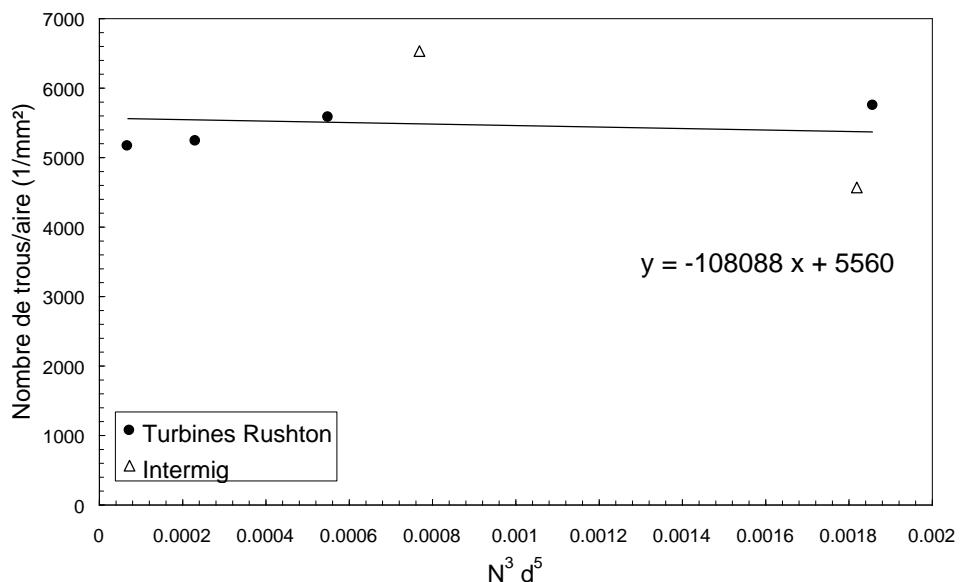


Figure 54 : Rapport des diamètres de Féret des pelotes en fonction du produit $N^3 d^5$

Tableau 25 : Modélisation du rapport des diamètres de Féret (-)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2
Nombre de trous/ mm^2 = $a + b N^3 D^5$	$a=5560 (\pm 476)$ $b= -108088 (\pm 419677)$	535399

La valeur de la pente de la droite de régression n'étant pas significativement non nulle (dans les limites de confiance à 95%) (Tableau 25), on peut donc considérer que la densité de trous (par mm^2) est constante et vaut 5560 trous/ mm^2 .

Étant donné que la circularité diminue avec l'augmentation de l'agitation, alors que la densité de trous par mm^2 reste constante, on peut supposer que cette diminution est essentiellement due à la modification du périmètre extérieur de la pelote (en supposant que la taille des trous ne varie pas significativement). Les pelotes deviennent plus "lisses", moins "chevelues".

5.2 Évolution de la morphologie

L'influence de l'hydrodynamique sur la morphologie d'*Actinomadura R39* a été évaluée à un moment métaboliquement donné de la fermentation (qui correspond au premier minimum de la concentration en oxygène dissous).

Afin de nous assurer que l'échantillon choisi pour l'analyse n'influence pas significativement les résultats et les conclusions de ce travail, nous avons étudié l'évolution de la morphologie au cours d'une fermentation.

Nous avons (arbitrairement) choisi la fermentation n° 17 (turbines Rushton à 450 rpm). Le point qui a servi de référence pour l'analyse d'images est la prise d'échantillon effectuée après 19 heures de culture. Il s'est écoulé 4 mois entre la préparation de la lame de microscope et l'enregistrement des images. Les points supplémentaires (soient les échantillons prélevés à 6h, 12h, 23.5h et 34 h de culture) ont par contre été stockés durant 48 mois avant que les images soient encodées. On note sur la Figure 55 que l'aire moyenne des pelotes dont les images ont été encodées après 48 mois est systématiquement inférieure à celle de l'échantillon encodé après seulement 4 mois.

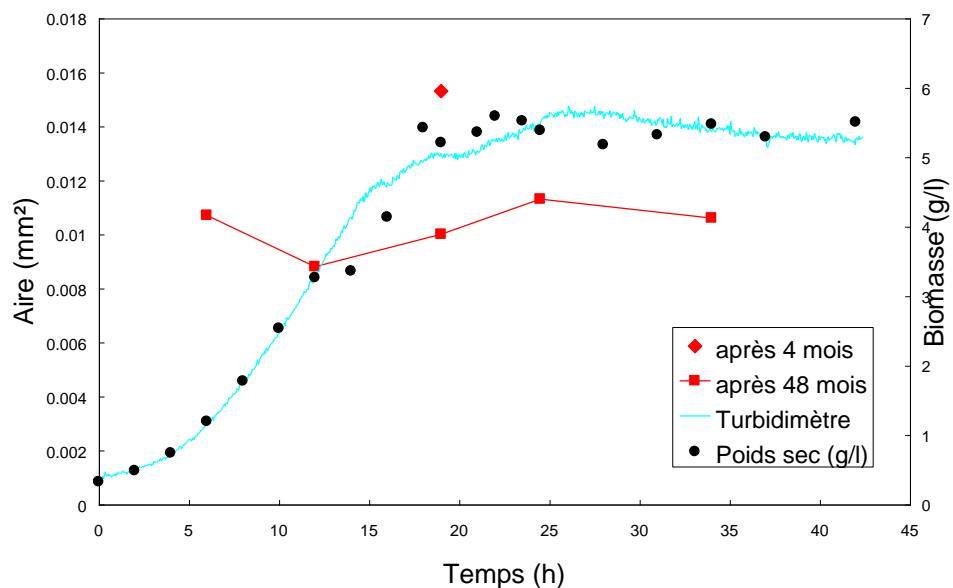


Figure 55 : Influence du temps écoulé entre la prise d'échantillon et l'enregistrement des images

Nos avons alors réencodés les images du point situé à 19h. Il est apparu après analyse que l'aire moyenne de ces pelotes avait diminué d'environ 34% (mesure sur 259 pelotes).

En ne comparant que les mesures effectuées sur les échantillons pour lesquels le même intervalle de temps s'est écoulé entre la fermentation et l'acquisition (ici après 48 mois), on ne note pas de modification significative de l'aire selon l'âge de la culture au moment de l'échantillonnage. Les autres paramètres mesurés montrent les mêmes caractéristiques (Figure 56).

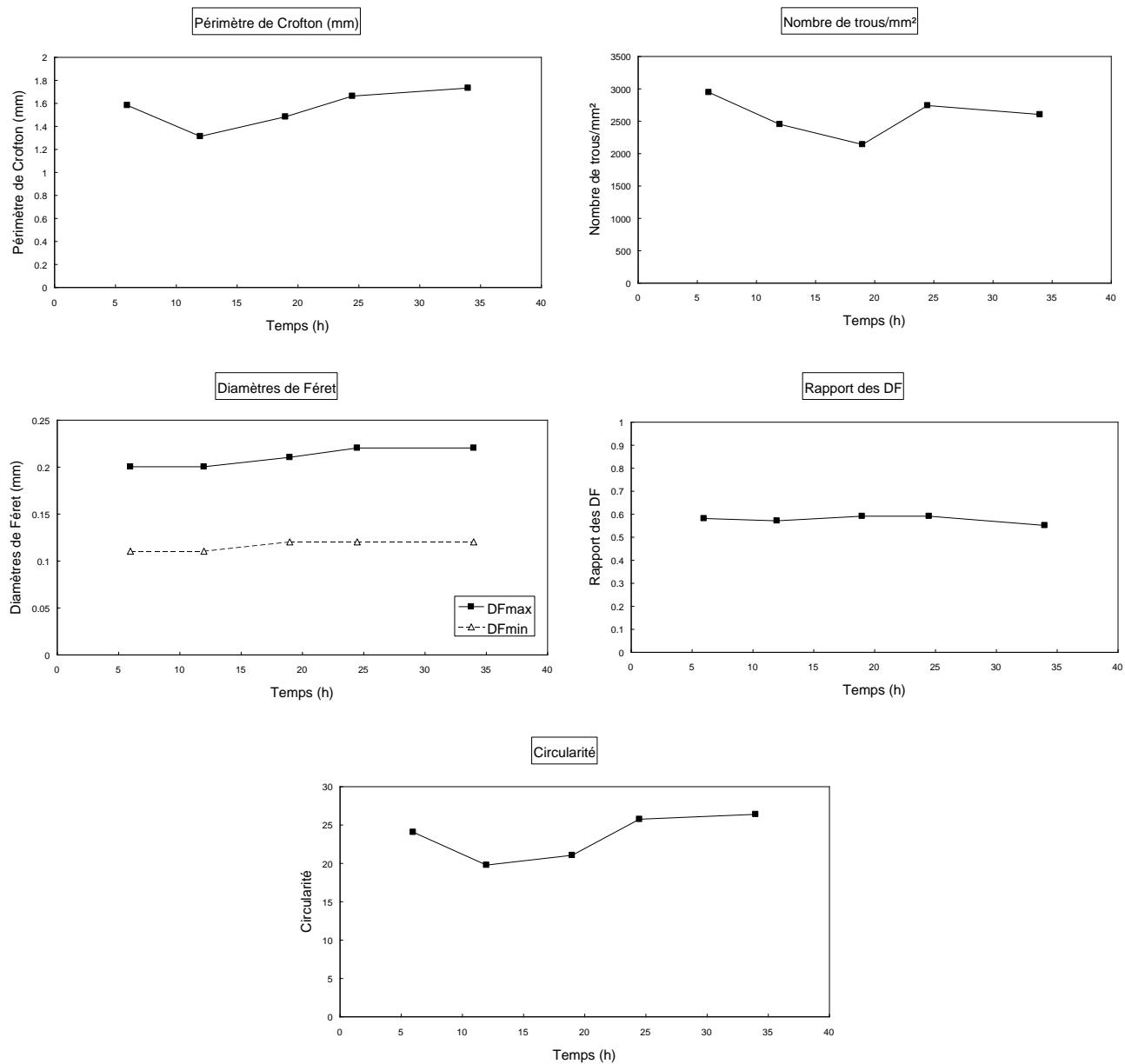


Figure 56 : Évolution des différentes grandeurs morphologiques au cours de la fermentation n°17

Le fait que l'âge de la culture n'influence pas significativement les grandeurs morphologiques mesurées signifie que :

- le choix de l'échantillon pour effectuer cette étude n'est pas sujet à caution puisque l'aire moyenne des pelotes ne varie pas significativement au cours de la fermentation;

- les caractéristiques morphologiques des pelotes d'*Actinomadura R39* sont une propriété liée aux conditions hydrodynamiques tout au long de la fermentation, quel que soit l'âge de la culture.

Il apparaît dès lors que la conservation des échantillons n'est pas possible à long terme.

L'intervalle maximum de temps entre le prélèvement de l'échantillon (fermentation n°1) et l'encodage est de l'ordre de 24 mois. Si ce délai avait été suffisant pour observer ce phénomène de rétrécissement des pelotes conservées sur les plaques de microscope, l'aire moyenne des pelotes encodées longtemps après leur prélèvement serait systématiquement inférieure à celle des pelotes encodées beaucoup plus rapidement après leur prélèvement. Or ce n'est pas le cas (voir Figure 26 du Chapitre IV), au contraire.

6 Conclusions sur la morphologie

Les échantillons prélevés lors des fermentations présentées au *Chapitre I* et conservés après coloration ont été étudiés par analyse d'images. L'échantillon qui a servi de point de comparaison entre les différentes conditions de culture est celui qui correspond au (premier) minimum de la concentration en oxygène dissous.

L'algorithme du programme d'analyse d'images permet d'éliminer une grande partie des objets qui ne sont pas des pelotes ou agrégats d'*Actinomadura R39*, d'extraire les objets et de réaliser sur eux un certain nombre de mesures telles que l'aire, le périmètre de Crofton, les diamètres de Féret maximum et minimum, le nombre de trous et la circularité. Les objets dont l'aire est inférieure à 450 pixel² sont éliminés suite à un calibrage de la taille des éléments parasites (crasses).

L'analyse de l'influence des conditions opératoires sur la morphologie des pelotes obtenues lors des fermentations a été rendue difficile par de fortes fluctuations dues à des problèmes d'échantillonnage. Toutefois, les influences du type de mobile (turbines Rushton ou Intermig) et de la vitesse d'agitation ont pu être clairement mises en évidence. La taille des pelotes ou agrégats, leur nombre de trous et leur circularité diminuent avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. À même vitesse, les mobiles Intermig produisent des pelotes plus petites et plus compactes que les turbines Rushton. Les distributions des mesures ne suivent pas une loi normale mais plutôt une loi de type "exponentielle décroissante". La dispersion des mesures est toujours importante. À vitesse de rotation ou à vitesse périphérique des pales identiques (qui était la grandeur de référence des fermentations), les mobiles Intermig produisent des pelotes plus petites et plus compactes que les turbines Rushton.

Les résultats obtenus ont été corrélés aux paramètres caractéristiques de l'hydrodynamique du fermenteur. Les données provenant des expériences menées avec les deux types de mobiles (turbines Rushton et Intermig) ont pu être réunies et corrélées indépendamment du type de mobile utilisé.

- L'aire des pelotes, les diamètres de Féret maximum et minimum, et le nombre de trous sont corrélés aux produits N^3d^5 (qui est proportionnel à la puissance dissipée en régime turbulent pour un mobile donné) et fp^3d^5 (où fp est le paramètre décrivant l'écoulement dans le modèle compartimenté établi lors de l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur présentée au

Chapitre III), ainsi qu'au rapport P/Np . Ces caractéristiques morphologiques diminuent lorsque ces grandeurs augmentent.

- Le diamètre équivalent des pelotes ainsi que leur périmètre de Crofton sont corrélés à $\sqrt{N^3 d^5}$ et $\sqrt{fp^3 d^5}$ ainsi qu'au rapport $\sqrt{\frac{P}{Np}}$. Ils diminuent lorsque ces variables augmentent.
- La circularité (qui mesure l'écart à un disque plein) est corrélée à la vitesse périphérique des pales (elle-même proportionnelle à la vitesse de cisaillement tangentiel maximale) et à la puissance dissipée P . La circularité diminue lorsque la vitesse périphérique ou la puissance augmentent.

Les corrélations établies entre ces paramètres représentatifs de l'hydrodynamique et la morphologie des pelotes d'*Actinomadura R39* sont soit linéaires soit en loi en puissance. Nous ne disposions pas d'un nombre suffisamment élevé de points expérimentaux pour établir une discrimination statistique entre ces deux modèles, c'est pourquoi nous avons choisi le modèle linéaire pour exprimer cette tendance. Le Tableau 26 reprend les équations de ces modèles de tendance linéaires :

Tableau 26 : Récapitulatif des modèles de tendance linéaires

aire = $0.019 - 4 N^3 d^5$	aire = $0.022 - 3.4 \cdot 10^{12} fp^3 d^5$	aire = $0.018 - 0.003 P/Np$
$de = 0.16 - 0.95 \sqrt{N^3 d^5}$	$de = 0.19 - 1.18 \cdot 10^6 \sqrt{fp^3 d^5}$	$de = 0.16 - 0.03 \sqrt{\frac{P}{Np}}$
$PC = 4.4 - 48 \sqrt{N^3 d^5}$	$PC = 5.4 - 5.7 \cdot 10^7 \sqrt{fp^3 d^5}$	$PC = 4.2 - 1.3 \sqrt{\frac{P}{Np}}$
$dFmax = 0.29 - 39 N^3 d^5$	$dFmax = 0.32 - 3.2 \cdot 10^{13} fp^3 d^5$	$dFmax = 0.28 - 0.03 P/Np$
$dFmin = 0.16 - 18 N^3 d^5$	$dFmin = 0.17 - 1.5 \cdot 10^{13} fp^3 d^5$	$dFmin = 0.16 - 0.013 P/Np$
nombre de trous = $97 - 21700 N^3 d^5$	nombre de trous = $110 - 1.8 \cdot 10^{16} fp^3 d^5$	nombre de trous = $95 - 19.2 P/Np$
circularité = $102 - 24 \pi Nd$	circularité = $111 - 7 \cdot 10^6 fp * d$	circularité = $75 - 1.8 P$

D'autre part, les tourbillons capables de causer des lésions aux pelotes doivent avoir une taille du même ordre de grandeur que ces dernières. La taille de ces tourbillons est caractérisée par l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} qui est directement liée à la puissance dissipée, et calculée par rapport à la zone proche du mobile où la dissipation d'énergie est maximale. Nous avons calculé la taille de l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} à partir des mesures de la puissance dissipée. Elle varie selon le mobile utilisé et la vitesse de rotation :

- turbines Rushton : 0.63 à 0.07 mm (630 à 70 µm) pour N variant de 2.1 à 16.67 s⁻¹

- Intermig : 1.21 mm à 0.09 mm (1210 à 90 μm) pour N variant de 1.03 à 8.33 s^{-1}

Les diamètres de Féret maximum et minimum sont du même ordre de grandeur que l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} , ce qui explique que l'hydrodynamique a une influence sur la morphologie d'*Actinomadura R39*.

Cependant, dans la gamme qui concerne ce travail, aucune corrélation directe entre la taille des pelotes et l'échelle de Kolmogoroff n'a pu être établie. Il est possible que les pelotes en se déformant continuellement sous l'effet des tensions rencontrées lors de leurs déplacements dans le fermenteur absorbent une partie de l'énergie contenue dans les petits tourbillons, et ne subissent ainsi pas une modification de taille drastique lorsque les conditions d'agitation se modifient. Selon le diamètre apparent qu'une pelote présente aux tourbillons qui l'entraînent, elle subira plus ou moins fortement les contraintes imposées par les tensions turbulentes qui agissent à l'échelle de Kolmogoroff.

L'influence de l'hydrodynamique sur la morphologie d'*Actinomadura R39* se divise en deux catégories : d'une part l'influence sur la taille des pelotes et agrégats, d'autre part l'influence sur la complexité des objets. L'effet sur la taille se traduit par une modification de l'aire, du périmètre ou des diamètres de Féret, alors que l'influence sur la complexité se manifeste par une modification de la circularité. La circularité intègre en effet dans son calcul le périmètre intérieur et celui de la chevelure des pelotes et agrégats, ce qui donne une information sur le découpage interne et externe des objets, donc sur la façon dont l'aire (c'est-à-dire la matière composant l'objet) est répartie. Elle est en quelque sorte une expression de la "porosité" des objets. Cette "porosité" peut influencer le développement des micro-organismes en modifiant les transferts de matières au sein des pelotes ou agrégats par limitation de la diffusion des nutriments, de l'oxygène, etc., vers les cellules situées au centre des objets.

La taille est corrélée au rapport P/Np (ou de sa racine carrée). La dépendance à ce rapport P/Np indique que le facteur qui influence la taille des micro-organismes n'est pas seulement la puissance injectée dans le milieu, mais également la façon dont les mobiles la dissipent, ce qui est exprimé par le nombre de puissance. La taille des pelotes et agrégats d'*Actinomadura R39* est influencée de façon similaire par des mobiles qui entraînent pourtant des schémas d'écoulement et des répartitions de l'énergie dans le fermenteur fort différents (voir le *Chapitre III*, §2.5.3 pour les schémas de répartitions de l'énergie de ces deux mobiles). Les pelotes d'*Actinomadura R39* réalisent donc une intégration spatiale et temporelle des conditions hydrodynamiques régnant dans le fermenteur. La taille semble être fonction des caractéristiques globales de l'hydrodynamique.

Par contre, la circularité est proportionnelle à la puissance et à la vitesse périphérique des pales. Cette dernière est elle-même proportionnelle à la vitesse de cisaillement maximale. Il semble donc que la complexité des pelotes ou agrégats dépende de la contrainte hydrodynamique maximale rencontrée lors du déplacement dans le fermenteur, quelles que soient les conditions régnant dans le reste de la cuve. La circularité semble être fonction des caractéristiques locales de l'hydrodynamique.

Si, pour une production particulière, une morphologie spécifique est nécessaire (sous forme de pelotes plutôt compactes ou au contraire sous une forme plus filamenteuse telle que des agrégats assez lâches), on pourra ainsi agir sur ces deux caractéristiques : la taille globale des pelotes ou agrégats et la façon dont leur biomasse est organisée.

Le fait que nous ayons pu corrélérer les mesures morphologiques des pelotes à la fois aux variables hydrodynamiques ($N^3 d^5$ ou $\pi N d$) ainsi qu'au paramètre provenant de l'ajustement d'un modèle compartimenté sur les essais de traceurs réalisés dans le même fermenteur (fp) permet une validation supplémentaire de la pertinence de notre modèle quant à la description des schémas d'écoulement dans une cuve agitée mécaniquement.

7 Bibliographie

Adams H.L. and Thomas C.R. (1988) The use of image analysis for morphological measurements on filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 707-712

Ayazi , Shamlou P., Makagiansar H.Y., Ison A.P. and Lilly M.D. (1994) Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 2621-2631

Belmar-Beiny M.T. and Thomas C.R. (1991) Morphology and clavulanic acid production of *Streptomyces clavuligerus* : effect of stirrer speed in batch fermentations. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 456-462

Coster M. et Chermant J.L. (1985) Précis d'analyses d'images. Éditions du CNRS, Paris, France

Cox P.W. and Thomas C.R. (1992) Classification and measurement of fungal pellets by automated image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 945-952

CRC Handbook of Chemistry and Physics (1981), CRC Press, Boca Rato, Floride, USA

Cui Y.Q., van der Lans R.G.J.M. and Luyben K.Ch.A.M. (1997) Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 715-726

Dunlop E.H. and Ye S.J. (1990) Micromixing in fermentors : metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to fluid turbulence. *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 854-864

Durant G., Formisyn P. et Crawley G. (1993) Étude par analyse d'image de l'influence des conditions d'agitation lors de fermentations fongiques. *4^{ème} Congrès Français de génie des Procédés*, Grenoble, France

Durant G., Crawley G. and Formisyn P. (1994a) A simple staining procedure for the characterisation of Basidomycetes pellets by image analysis. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 395-400

Durant G., Cox P.W., Formisyn P. and Thomas C.R. (1994b) Improved image analysis algorithm for the characterisation of mycelial aggregates after staining. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 759-764

Justen P., Paul G.C., Nienow A.W. and Thomas C.R. (1996) Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity. *Biotechnol. Bioeng.*, **52**, 672-684

Larralde-Corona C.P., Gonzalez-Blanco P.C. and Viniegra-Gonzalez G. (1994) Comparison of alternative kinetic models for estimating the specific growth rate of Gibberella fujikuroi by image analysis techniques. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 261-266

Lejeune R., Nielsen J. and Baron G.V. (1995) Morphology of Trichoderma reesei QM 9414 in submerged cultures. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 609-615

Logan B.E. and Wilkinson D.B. (1991) Fractal dimension and porosities of Zoogloea ramigera and Saccharomyces cerevisea aggregates. *Biotechnology and Bioengineering*, **38**, 389-396

Metz B., de Bruyn E.W., van sijndam J.C. (1981) Method for quantitative representation of the morphology of molds. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 149-162

Nielsen J. (1993) A simple morphologically structured model describing the growth of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 715-727

Packer H.L. and Thomas C.R. (1990) Morphological measurements on filamentous microorganisms by fully automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 870-881

Packer H.L., Keshavarz-Moore E., Lilly M.D. and Thomas C.R. (1992) Estimation of cell volume and biomass of Penicillium chrysogenum using image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 384-391

Patankar D.B., Liu T.C. and Oolman T. (1993) A fractal model for the characterization of mycelial morphology. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 571-578

Paul G.C., Kent C.A. and Thomas C.R. (1993) Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 11-23

Paul G.C., Kent C.A. and Thomas C.R. (1994) Image analysis for characterizing differentiation of *Penicillium chrysogenum*. *Trans. Instn. Chem. Engrs.*, **72C**, 95-105

Paul G.C. and Thomas, C.R. (1997) Characterization of mycelial morphology using image analysis. *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.*, **60**, 1-59

Pichon D. (1993) Analyse d'images en biotechnologie. Quantification de la morphologie des micro-organismes filamenteux au cours de fermentations et suivi de la croissance de cellules animales sur microporeurs au cours de cultures. Thèse de Doctorat de L'Institut National Polytechnique de Lorraine.

Pons M.N., Vivier H., Remy J.F. and Dodds J.A. (1993) Morphological characterization of yeast by image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 1352-1359

Priede M.A., Vanags J.J., Viestures U.E., Tucker K.G., Bujalski W. and Thomas C.R. (1995) Hydrodynamic, physiological, and morphological characteristics of *Fusarium moniliforme* in geometrically dissimilar stirred bioreactors. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 266-277

Reichl U., Buschulte T.K. and Gilles E.D. (1990) Study of the early growth and branching of *Streptomyces tendae* by means of an image processing system. *J. Microsc.*, **158**, 55-62

Reichl U., King R. and Gilles E.D. (1992a) Effect of temperature and medium composition on mycelial growth of *Streptomyces tendae* in submerged culture. *J. Basic Microbiol.*, **32**, 193-200

Reichl U., King R. and Gilles E.D. (1992b) Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 164-170

Reuss M. (1988) Influence of mechanical stress on the growth of *Rhizopus nigricans* in stirred bioreactors. *Chem. Eng. Technol.*, **11**, 178-187

Schügerl K., Bayer T., Niehoff J., Moller J. and Zhou W. (1988) Influence of cell environment on the morphology of molds and the biosynthesis of antibiotics in bioreactors. *Proceedings of the 2nd International Conference on Bioreactor Fluid Dynamics*, Editot R. King, Elsevier , 229-243

Schügerl K., Gerlach S.R. and Siedenberg D. (1997) Influence of the process parameters on the morphology and enzyme production of *Aspergillus*. *Adv. Biochem. Eng./ Biotechnol.*, **60**, 195-266

Shamlou P.A., Makagiansar H.Y., Ison A.P. and Lilly M.D. (1994) Turbulent breakage of filamentous microorganisms in submerged culture in mechanically stirred bioreactors. *Chem. Eng. Sci.*, **49**, 2621-2631

Smith J.J., Lilly M.D. and Fox R.I. (1990) The effect of agitation on the morphology and penicillin production of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnol. Bioeng.*, **35**, 1011-1023

Thomas C. (1993) Applications of image analysis in biotechnology. *GFGP-SCI*, 17-29

Tucker K.G., Kelly T., Delgrazia P. and Thomas C.R. (1992) Fully-automatic measurement of mycelial morphology by image analysis. *Biotechnol. Prog.*, **8**, 353-359

Tucker K.G. and Thomas C.R. (1994) Inoculum effects on fungal morphology : shake flasks vs agitated bioreactors. *Biotechnol. Tech.*, **8**, 153-156

van Suijdam J.C. and Metz B. (1981) Influence of engineering variables upon the morphology of filamentous molds. *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 111-148

Vanhoutte B., Pons M.N., Thomas C.R., Louvel L. and Vivier H. (1995) Characterization on *Penicillium chrysogenum* physiology in submerged cultures by color and monochrome image analysis. *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 1-11

Vecht-Lifshitz S.E. and Ison A.P. (1992) Biotechnological applications of image analysis : present and future prospects. *J. Biotechnol.*, **23**, 1-18

Vivier H. et Pons M.N. (1994) Application de l'analyse d'images. In *Capteurs et mesures en biotechnologie*, pp. 315-354. Technique et Documentation Lavoisier, Paris, France.

Yang H., Reichl U., King R. and Gilles E.D. (1992) Measurement and simulation of the morphological development of filamentous microorganisms. *Biotechnol. Bioeng.*, **39**, 44-48

8 Symboles

a	constante	
a_r	moment adimensionnel d'ordre r	
a_3	coefficient de dissymétrie	
A	aire	m^2
b	constante	
d	diamètre du mobile	M
de	diamètre équivalent d'une pelote	m
D	diamètre de la cuve	m
DF_{max}	diamètre de Féret maximum	mm
DF_{min}	diamètre de Féret minimum	mm
f	fréquence	
fp	débit de pompage (paramètre du modèle compartimenté)	m^3/s
ISF	facteur de cisaillement intégré	
k	constante	
L	hauteur de la pale	m
m_r	moment centré d'ordre r	
n	nombre de variables	
n_b	nombre de pales d'un mobile	
N	vitesse de rotation de l'agitateur	rpm ou s^{-1}
Np	nombre de puissance	
$p(i)$	probabilité de i	
P	puissance dissipée sans aération	W
PC	périmètre de Crofton	mm
Pg	puissance dissipée avec aération	W
r	ordre	
s	écart-type	
s^2	variance	
V	volume	m^3
v_p	vitesse périphérique des pales	m/s
x	variable	
\bar{x}	moyenne d'une variable x	

α	angle des pales du mobile	°
$\dot{\gamma}_{\tan,\max}$	vitesse de cisaillement tangentielle maximale	s^{-1}
ε_T	puissance spécifique moyenne	W/kg
θ_c	temps de circulation	s
θ_m	temps de mélange	s
λ_K	échelle de Kolmogoroff	mm
λ_{Kz}	échelle de Kolmogoroff calculée sur la zone de dissipation d'énergie maximale	mm
μ	viscosité dynamique	Pa.s
ν	viscosité cinématique	m/s^2
ρ	densité	kg/m^3
Φ	fraction de volume caractérisant la zone critique de dissipation d'énergie	

Annexe IV.1

Notions d'analyse d'images

Remarque préliminaire : les références bibliographiques ainsi que les symboles se rapportent au texte principal du *Chapitre IV : Morphologie*

1. Types de traitement des images

Après préparation des échantillons (en fonction des buts poursuivis) et acquisition des images, les images sont traitées en vue de leur analyse. Nous ne parlerons pas ici des images analogiques antérieures à l'utilisation des ordinateurs.

Marion (cité par Pichon, 1993; Vivier et Pons, 1994) propose cinq types de traitement d'images :

- **amélioration** : de la qualité objective ou subjective des images
- **restauration** : correction de distorsions ou de flous
- **détection** : recherche de la présence de contours ou de textures
- **compression et codage** : manipulation de l'image pour réduire sa taille de stockage sans en dégrader la qualité
- **analyse et compréhension** : le but est d'analyser l'image pour la comprendre et par cela accéder à la compréhension du phénomène dont elle est issue (ce qui rejoint nos préoccupations).

2. Acquisition des données

Un système d'analyse d'images typiques se compose d'un ordinateur, parfois équipé de hardware spécifique, qui peut capturer des images et être programmé pour extraire les informations souhaitées.

La source des images est généralement une caméra digitale montée sur un microscope (ou une autre source telle que vidéo, microscope électronique, photographie, etc.) (Paul and Thomas, 1997) et reliée à l'ordinateur par une carte d'acquisition, en passant parfois par un écran de visualisation. L'image est digitalisée, c'est à dire que le signal analogique est transformé en une matrice contenant des éléments d'images appelés *pixels* ("picture element") dont la valeur indique le niveau de gris ou la couleur.

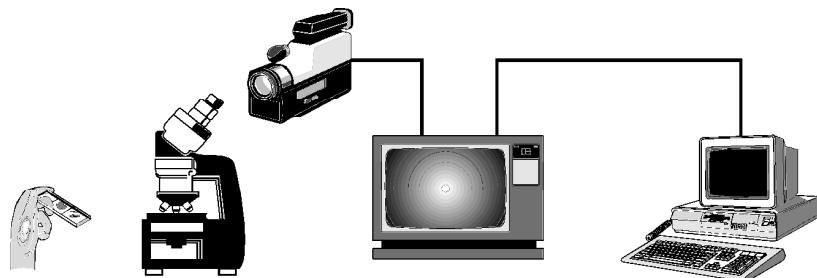


Figure 1 : Chaîne d'acquisition et de traitement d'images

Nous nous intéresserons ici aux images en noir et blanc, comprenant 256 le nombre de niveaux de gris. L'histogramme des niveaux de gris est la fréquence de distribution des niveaux de gris (Vivier et Pons, 1994; Pichon, 1993; Paul and Thomas, 1997), les niveaux étant répartis entre 0 (noir) et 255 (blanc). Il renseigne sur les contrastes de l'image et sur les possibilités de segmentation. Les objets bien contrastés par rapport au fond se marquent généralement sur l'histogramme par un pic. La plupart des utilisations fonctionnent avec des systèmes monochromes, dans lesquelles les différences d'intensité sont utilisées pour distinguer les caractéristiques. Des systèmes couleurs sont également disponibles, mais leur prix est beaucoup plus élevé et les logiciels plus complexes (on doit alors traiter les trois canaux Rouge-Vert-Bleu) (Paul and Thomas, 1997).

Les images en niveaux de gris sont traitées afin d'augmenter le contraste et pouvoir en extraire les objets importants.

3. Détection des objets

La détection est une étape au cours de laquelle on tente d'identifier et de séparer les objets que l'on souhaite traiter du reste de l'image. Cette détection est effectuée en établissant des niveaux de seuillage parmi les niveaux de gris selon ceux correspondant aux régions présentant un intérêt. Le résultat de cette opération est une image binaire (dont les niveaux sont réduits à deux valeurs). Les pixels dont la valeur de gris est supérieure à un seuil fixé prennent la valeur "1" (blanc=objet) alors que ceux dont la valeur est inférieure au seuil sont mis à "0" (noir=fond) (Vivier et Pons, 1994; Pichon, 1993). Le choix du seuil peut être déterminé par l'examen de l'histogramme des niveaux de gris (maxima locaux, points d'inflexion, etc.) ou selon d'autres critères tels que la forme, la connexité, etc. Cette étape réduit l'information contenue dans l'image par rapport à celle en niveaux de gris, mais le gain de taille se répercute sur la mémoire d'ordinateur nécessaire ainsi que sur la rapidité de traitement des données. Si

l'information supplémentaire contenue dans l'image en niveaux de gris n'est pas indispensable, cette étape de détection-binariséation est très utile (Paul and Thomas, 1997).

4. Traitement des images binaires

Les images binaires doivent être traitées en vue de leur analyse car elles contiennent souvent des objets parasites qui n'offrent aucun intérêt. La morphologie mathématique fournit des outils qui permettent le nettoyage et le traitement des images (binaires ou en niveaux de gris).

4.1. Érosion et dilatation morphologique

L'érosion est la première de transformation tout ou rien à avoir été utilisée. Une couche externe de pixels est supprimée des frontières des objets binaires. Les protubérances étroites sont éliminées, et les objets reliés par un isthme étroit sont séparés (cette liaison étant ôtée) (Paul and Thomas, 1997). L'érosion ne conserve pas le nombre d'objets (suppression des plus petits et fragmentation de certains). Lors de l'érosion, si l'élément structurant est inclus dans l'objet, le centre de l'élément structurant est conservé. Sur la Figure 2, le pixel (x_1, y_1) est conservé, mais le pixel (x_2, y_2) est éliminé.

La dilatation (Figure 3) est l'opération inverse de l'érosion. On peut la décrire comme une érosion du fond. Elle augmente la taille des objets en ajoutant un pixel à leur frontière, qui comble les trous, épaisse les objets et unit les objets proches (Vivier et Pons, 1994; Pichon, 1993; Coster et Chermant, 1985).

Ces deux opérations font intervenir un ensemble particulier appelé *élément structurant* qui va servir d'outil. Cet élément est pris le plus isotrope possible dans l'espace où on raisonne (un cercle pour l'espace analogique à deux dimensions ou un carré de trois pixels de côté pour une image numérique dont les pixels sont carrés). Cet élément structurant se déplace dans l'image et sa position est repérée par son pixel central. Pour chaque position, on se pose la question concernant la position de l'élément structurant par rapport à l'objet. La réponse ne peut être que *oui* ou *non*, d'où son appellation de transformation *tout ou rien*.

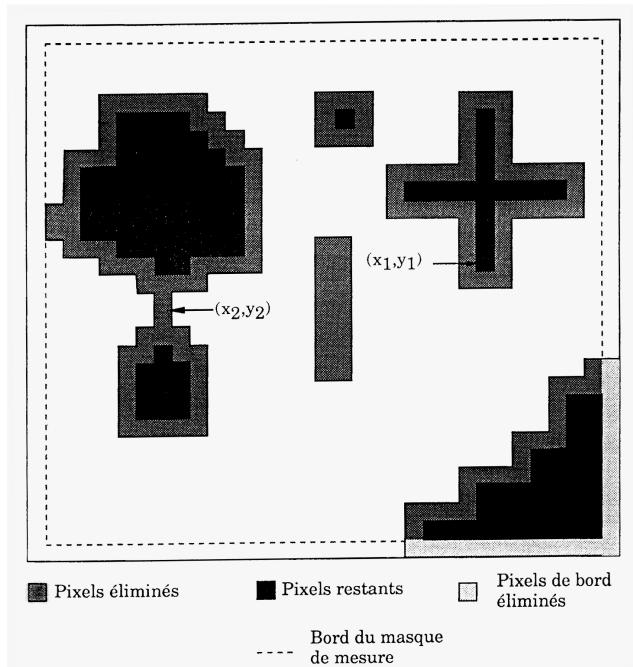


Figure 2 : Érosion morphologique par un élément structurant carré de 3x3 pixels (Vivier et Pons, 1994)

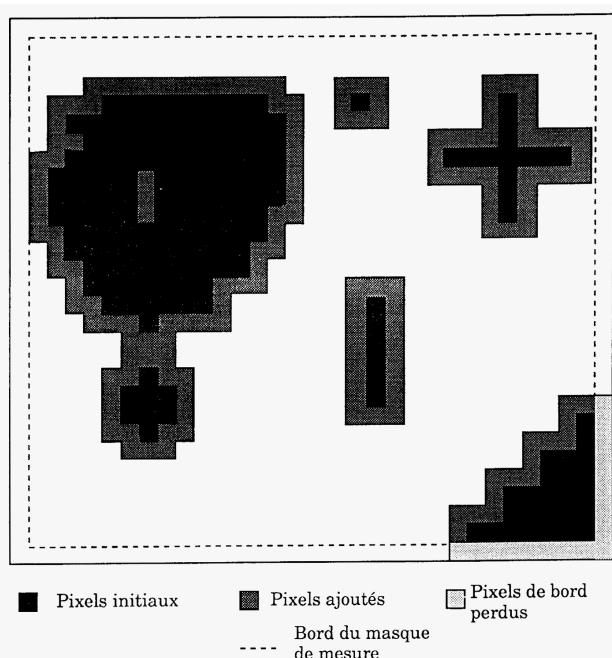


Figure 3 : Dilatation morphologique par un élément structurant carré de 3x3 pixels (Vivier et Pons, 1994)

4.2. Ouverture et fermeture morphologique

La combinaison des deux opérations précédentes crée l'ouverture et la fermeture. Ce sont des filtres morphologiques.

Une ouverture est une érosion par un élément structurant suivie d'une dilatation de même taille (Figure 4). Le résultat est un objet qui a approximativement la même taille (nombre de pixels) que l'original, mais dont la forme est modifiée pour devenir plus arrondie, lisse et moins bruitée.

La fermeture est une dilatation par un élément structurant suivie d'une érosion de même taille (Figure 5). Elle comble les petits vides et peut réunir des objets proches (selon la taille de l'élément structurant) (Vivier et Pons, 1994; Pichon, 1993; Coster et Chermant, 1985).

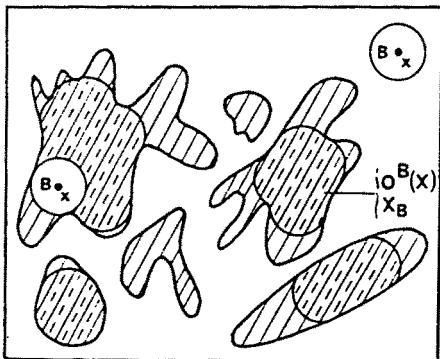


Figure 4 : Ouverture par un élément structurant circulaire
(Coster et Chermant, 1985)

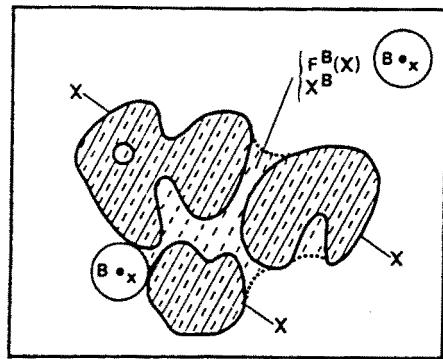


Figure 5 : Fermeture par un élément structurant circulaire
(Coster et Chermant, 1985)

4.3. Squelettisation

La squelettisation est une opération qui conserve la connexité (c'est à dire le nombre d'objets), contrairement aux opérations tout ou rien précédentes (Vivier et Pons, 1994). Le squelette d'un objet est l'ensemble des points qui sont à égale distance de deux points appartenant aux bords de l'objet. Après squelettisation, les objets sont réduits à un ensemble de lignes continues ou cercles d'une épaisseur de 1 pixel (ou même à un point pour les objets circulaires) mais ni leur nombre ni leur voisinage ne sont modifiés.

4.4. Reconstruction

Le principe de cette opération est de reconstruire une image en partant de marqueurs et de retrouver uniquement les objets de l'image d'origine contenant des marqueurs. Après obtention des marqueurs par une ou plusieurs érosions, des dilatations successives sont pratiquées sur l'image, mais chaque dilatation est suivie d'une intersection avec l'image originale, jusqu'à ce que l'objet initial soit récupéré sans perte d'information, contrairement à l'ouverture (Pichon, 1993).

5. Traitement des images en niveaux de gris

Les opérations morphologiques décrites pour les images binaires sont applicables aux images en niveaux de gris. Un élément structurant balaye l'image, mais l'érosion (resp. la dilatation) consiste à attribuer au pixel central le niveau de gris minimum (resp. maximum) de son environnement. L'érosion abaisse le niveau moyen de l'image alors que la dilatation l'augmente (Pichon, 1993).

Annexe IV.2

Routine d'analyse d'images pour Visilog 5.0

La routine présentée ci-dessous traite les images numérotées 1 à 60 et qui ont été enregistrées à partir de la plaque étalée à l'anse de platine et sans lame couvre-objets. Les résultats sont sauvés dans un fichier. Une seconde routine, identique en tous points traite les images numérotées 61 à 120 (enregistrées à partir de la plaque avec lame couvre-objets) et sauve les résultats dans un fichier distinct.

```

/* V5 Script V5.02 */

/* script1
Title: untitled
Date: Fri Oct 30 14:45:41 1998
Author: sylvia
Comment: None
*/
SCRIPT script1 {
date = "Fri Oct 30 14:45:41 1998";
author = "sylvia";
title = "untitled";
comment = "None";
functions = {"Function1"};

/* variables used in this script: */

closing = 0;
subtract = 0;
normalize = 0;
threshold = 0;
aa = "r071301.tif";
not = 0;
or = 0;
erode = 0;
reconstruct = 0;
border_kill = 0;
size = 3;
marray1 = {93,8,105};
marray2 = {104,7,110};
marray3 = {109,6,115};
marray4 = {115,7,112};
marray5 = {109,8,112};
marray6 = {94,10,111};
marray7 = {72,10,100};
marray8 = {57,10,90};
marray9 = {56,9,94};
marray10 = {72,8,98};
marray11 = 0;
marray12 = 0;
marray13 = 0;
marray14 = 0;
marray15 = 0;
marray16 = 0;
marray17 = 0;

```

```
i = 3;
hole_fill = 0;
p = 0;
size1 = 0;
marray18 = 0;
l = 0;
opening = 0;
label = 0;
analyze = 0;
j = 1;
size2 = 0;
marray19 = 0;
k = 0;
txtfile = 0;
txtfile1 = 0;
n = 1;
```

case:

```
/* ----- function Function1 ----- */
Function1:
{
    txtfile=fopen("/usr/people/sblacher/silvia/Sylvie/r0912a1.data","aa");
    txtfile1=fopen("/usr/people/sblacher/silvia/Sylvie/r0912a2.data","aa");
    txtfile2=fopen("/usr/people/sblacher/silvia/Sylvie/r0912a.data","aa");

    for (n=1;n <= 60;n=n + 1)
    {
        if (n == 1)
        {
            LoadData(IMAGE_DATA,"/usr/people/sblacher/silvia/sg/r091201.tif",aa,0);/** Load image from file */
            visilog.MIP_DISPLAY(aa);      /** Display image */
            P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);  /** Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
            P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE(); /* Display the scroll rectangle */
            fprintf(txtfile2," r091201.tif, n= %d\n",n);
        }
        if (n == 2)
        {
            LoadData(IMAGE_DATA,"/usr/people/sblacher/silvia/sg/r091202.tif",aa,0);/** Load image from file */
            visilog.MIP_DISPLAY(aa);      /** Display image */
            P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);  /** Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
            P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE(); /* Display the scroll rectangle */
            fprintf(txtfile2," r091202.tif, n= %d\n",n);
        }
    }
}
```

etc. (idem pour les images 3 à 58)

```
if (n == 59)
{
    LoadData(IMAGE_DATA,"/usr/people/sblacher/silvia/sg/r091259.tif",aa,0);/** Load image from file */
    visilog.MIP_DISPLAY(aa);      /** Display image */
    P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);  /** Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
    P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE(); /* Display the scroll rectangle */
    fprintf(txtfile2," r091259.tif, n= %d\n",n);
}
if (n == 60)
{
    LoadData(IMAGE_DATA,"/usr/people/sblacher/silvia/sg/r091260.tif",aa,0);/** Load image from file */
    visilog.MIP_DISPLAY(aa);      /** Display image */
```

```

P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
fprintf(txtfile2," r091260.tif, n= %d\n",n);
}
RmSendMessage("visilog",TOP_SET_STATE,0,"ProcessRight1");/* Starts the package and Pop Up */
RmSendMessage("recorder",TOP_SET_STATE,0,"CmdEditor");/* Starts the package and Pop Up */
closing(aa,1,"bb");           /* closing */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
subtract(aa,"bb","cc");        /* subtract */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
normalize("cc",0,0,{0,255},"cc"); /* normalize */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
threshold("cc",{254,255}, "dd"); /* threshold */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
threshold(aa,{120,254}, "ee");   /* threshold */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
or("dd","ee","ff");            /* or */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
not("ff","ff");                /* not */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
threshold(aa,{120,254}, "thre"); /* threshold */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
not("thre","thre");            /* not */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
erode("thre",2,"erod");         /* erode */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
reconstruct("thre","erod","pelote"); /* reconstruct */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
or("ff","pelote","fin1");        /* or */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
erode("fin1",1,"fin2");         /* erode */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
reconstruct("fin1","fin2","fin"); /* reconstruct */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
border_kill("fin","fin");        /* border_kill */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
label("fin","labe");            /* label */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
RmSendMessage("visilog",TOP_SET_STATE,0,"Analysis");/* Starts the package and Pop Up */
P_image.MIP_SCROLL_POS(-1,-1);    /* Set the scroll origin of image (Upper left corner) */
P_smallimage.SCROLL_RECTANGLE();  /* Display the scroll rectangle */
analyze("labe","none","adjust","none",1,"a1");/* L'ecriture */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"Area",marray1);/* Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"CroftonPerimeter",marray2);/* Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"Excentricity",marray3);/* Read measure from a1 */

```

```

RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"NbHoles",marray4);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"Shape_AP",marray5);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"Length",marray6);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE,0,"Width",marray7);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",0,marray8);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",1,marray9);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",2,marray10);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",3,marray11);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",4,marray12);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",5,marray13);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",6,marray14);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",7,marray15);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",8,marray16);/** Read measure from a1 */
RmSendMessage("a1",READ_MEASURE_FROM_DISTRIB,0,"FeretDiameter",9,marray17);/** Read measure from a1 */
size=CRmGetSize(marray1);
for (i=0;i < size;i += 1)
{
    if ((marray1[i]) >= 10)
    {
        fprintf(txtfile,"%f %f %f %f %f %f      ",marray1[i],marray2[i],marray3[i],marray4[i],marray5[i],marray6[i],marray7[i]);
        fprintf(txtfile1,"%f      %f      %f      %f      %f      %f      %f      %f      %f
",marray8[i],marray9[i],marray10[i],marray11[i],marray12[i],marray13[i],marray14[i],marray15[i],marray16[i],marray17[i]);
        fprintf(txtfile,"\n");
        fprintf(txtfile1,"\n");
    }
}
}

fclose(txtfile);
fclose(txtfile1);
fclose(txtfile2);
};

};

```

Annexe IV.3

Grandeurs caractéristiques de l'hydrodynamique

Remarque préliminaire : les références bibliographiques ainsi que les symboles se rapportent au Chapitre III : Hydrodynamique)

La comparaison de différentes installations peut se faire sur base de plusieurs grandeurs caractéristiques, qui peuvent également servir à des fins de conception ou de changement d'échelle (Moo-Young and Blanch, 1981; Bruxelmann, 1979; Leng, 1991; Nienow, 1996; Costes and Couderc, 1987). Le Tableau 1 présente les grandeurs les plus fréquemment rencontrées et le facteur qu'elles influencent dans le procédé (c'est-à-dire ce qui aura une valeur identique dans le procédé après changement d'échelle si on maintient cette grandeur constante) (NB : l'utilisation de ces règles n'est valable qu'en régime turbulent et pour des géométries de proportions similaires) :

Tableau 1 : Grandeurs caractéristiques et facteur influencé

Paramètre	Facteur influencé
$N d$ \propto vitesse périphérique \propto vitesses locales \propto couple/volume	efficacité de dispersion, vitesse de cisaillement maximum (\Rightarrow diamètre minimum des bulles), mélange simple
$N d^{0.85}$	suspension des solides (facilement mis en suspension)
$N d^{0.75}$	suspension des solides (mise en suspension moyenne)
$N d^{0.67} \Leftrightarrow P/V$ ou ε_T ($\propto N^3 d^2$)	transferts de matière et de chaleur, efficacité de suspension (solides à décantation rapide), diamètre moyen des bulles à la sortie du mobile, k, a , micro-mélange, structure fine
$N d^{0.5} \Leftrightarrow Re$	régime hydrodynamique, transfert de chaleur
N (\propto capacité de pompage)	temps de mélange (rarement utilisée : conduit à des puissances dissipées énormes et une augmentation du gradient de vitesse maximum et donc du cisaillement)

Si on utilise les règles précédentes en extrapolation géométrique (généralement en scale-up), on peut se baser sur le tableau suivant pour prévoir l'évolution des différents paramètres du système (Costes and Couderc, 1987).

Tableau 2 : Règles de scale-up (NB : D = diamètre du mobile) (Costes and Couderc, 1987)

Grandeur conservée constante dans l'extrapolation géométrique de facteur K					
	N	πND	ϵ	Re	We
Evolution des autres grandeurs	N	1	K^{-1}	$K^{-2/3}$	$K^{-3/2}$
	πND	K	1	K^{-1}	$K^{-1/2}$
	$\epsilon (N^3 D^2)$	K^2	K^{-1}	K^{-4}	$K^{-5/2}$
	$P (\div N^2 D^5)$	K^5	K^2	K^3	$K^{+1/2}$
	$Re (\div ND^2)$	K^2	K	$K^{4/3}$	1
	$We (\div N^2 D^3)$	K^3	K	$K^{5/3}$	1
	Vitesse \bar{V}	K	1	$K^{1/3}$	$K^{-1/2}$
	Débit de pompage ($\div ND^3$)	K^3	K^2	$K^{7/3}$	$K^{3/2}$
	Temps de mélange	1	K^{-1}	$K^{-2/3}$	$K^{-3/2}$
	gradient de vitesse moyen ($\div N$)	1	K^{-1}	$K^{-2/3}$	$K^{-3/2}$
	gradient de vitesse maximum ($\div ND$)	K	1	$K^{1/3}$	$K^{-1/2}$
	Macroéchelle spatiale ($\div D$)	K	K	K	K
	Microéchelle de Kolmogoroff ($\div \epsilon^{-1/4}$)	$K^{-1/2}$	$K^{1/4}$	1	$K^{5/8}$
	Coefficient de diffusion turbulente ($\div ND^2$)	K^2	K	$K^{4/3}$	1
					$K^{1/2}$

Le nombre de Weber $We = \frac{\rho N^2 d^3}{\sigma}$ caractérise le processus de dispersion (σ étant la tension superficielle, N/m).

Ces règles peuvent être également utiles de faire du scale-down, pour étudier à l'échelle pilote ou même du laboratoire le (dys)fonctionnement d'un fermenteur industriel (Dunn and Heinze, 1993).

Annexe IV.4

Influence des conditions hydrodynamiques sur la morphologie (compléments)

1. Influence de l'hydrodynamique sur le diamètre équivalent

Les graphes de la figure suivante présente les mesures du diamètre équivalent des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , de la vitesse périphérique $\pi N d$, du produit $Nd^{0.67}$ (qui est proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentielle maximale (entre le mobile en rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2}$ (voir *Chapitre I*) et du facteur de cisaillement intégré (qui représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile) $ISF = \frac{2 \pi N d}{(D-d)}$ (voir *Chapitre I*).

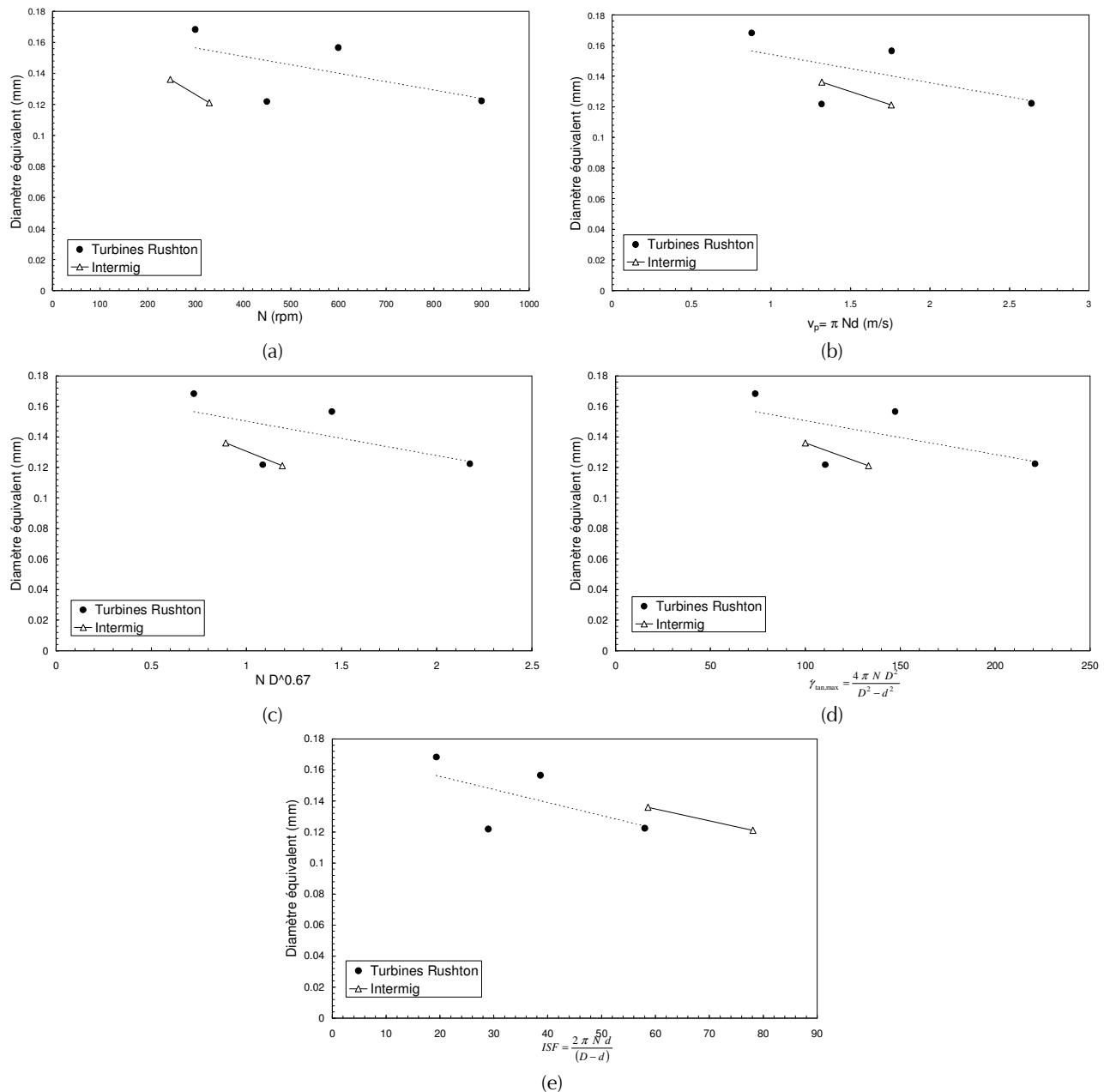


Figure 1 : Diamètre équivalent (mm) des pelotes en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) la vitesse périphérique, (c) $N d^{0.67}$, (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximale, (e) le facteur de cisaillement intégré

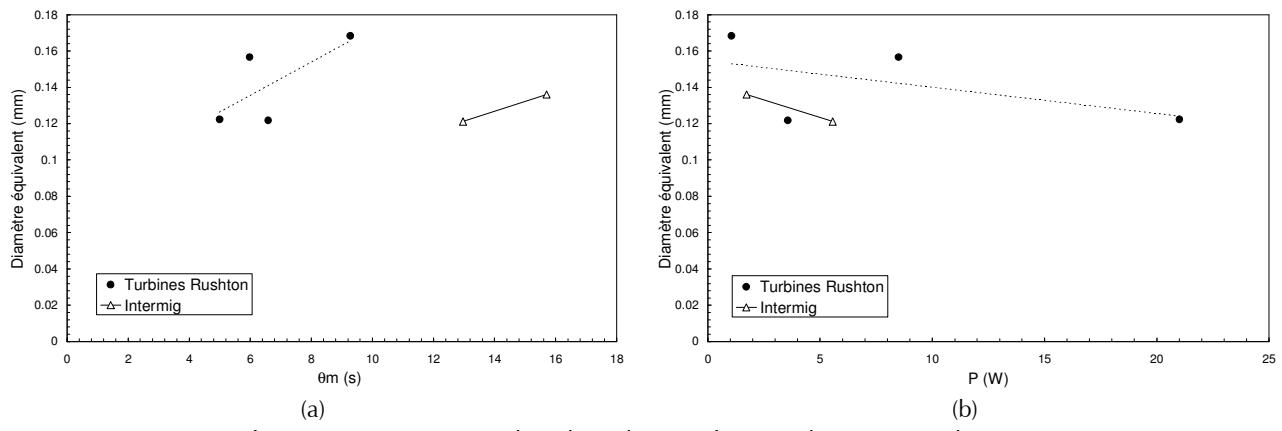
Nous avons testé les mêmes modèles que pour l'aire (linéaire et loi en puissance) tenant compte des conditions d'agitation permettant de concilier les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig. Ils sont repris au tableau suivant (et ne peuvent pas être discriminés) :

Tableau 1 : Modélisation du diamètre équivalent (mm)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
1. $de = k N^a d^b$	$k=0.075 (\pm 0.043)$ $a=-0.23 (\pm 0.16)$ $b=-0.39 (\pm 0.25)$	$3.6 \cdot 10^{-4}$	$b/a=1.68 (\approx 1.67)$
2. $de = a + b N^3 d^5$	$a=0.16 (\pm 0.01)$ $b=-19.7 (\pm 9.0)$	0.00025	$5/3=1.67$
3. $de = k (N^3 d^5)^a$	$k=0.07 (\pm 0.02)$ $a=-0.09 (\pm 0.04)$	0.0002	facteur $1/2$ par rapport à l'aire pour l'exposant a
4. $de = a + b \sqrt{N^3 d^5}$	$a = 0.16 (\pm 0.02)$ $b = -0.95 (\pm 0.5)$	0.0003	

Dans le modèle 3, l'exposant du produit $N^3 d^5$ vaut la moitié de celui trouvé pour l'aire des pelotes, ce qui est logique.

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le diamètre équivalent des pelotes :

**Figure 2 :** Diamètre équivalent des pelotes en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P (W)

2. Influence de l'hydrodynamique sur le périmètre de Crofton

Les graphes de la figure suivante présente les mesures du périmètre de Crofton des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , de la vitesse périphérique $\pi N d$, du produit $N d^{0.67}$ (qui est proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentiel maximale (entre le mobile en rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2}$ (voir Chapitre I) et du facteur de cisaillement intégré (qui

représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile)

$$ISF = \frac{2 \pi N d}{(D - d)} \text{ (voir Chapitre I).}$$

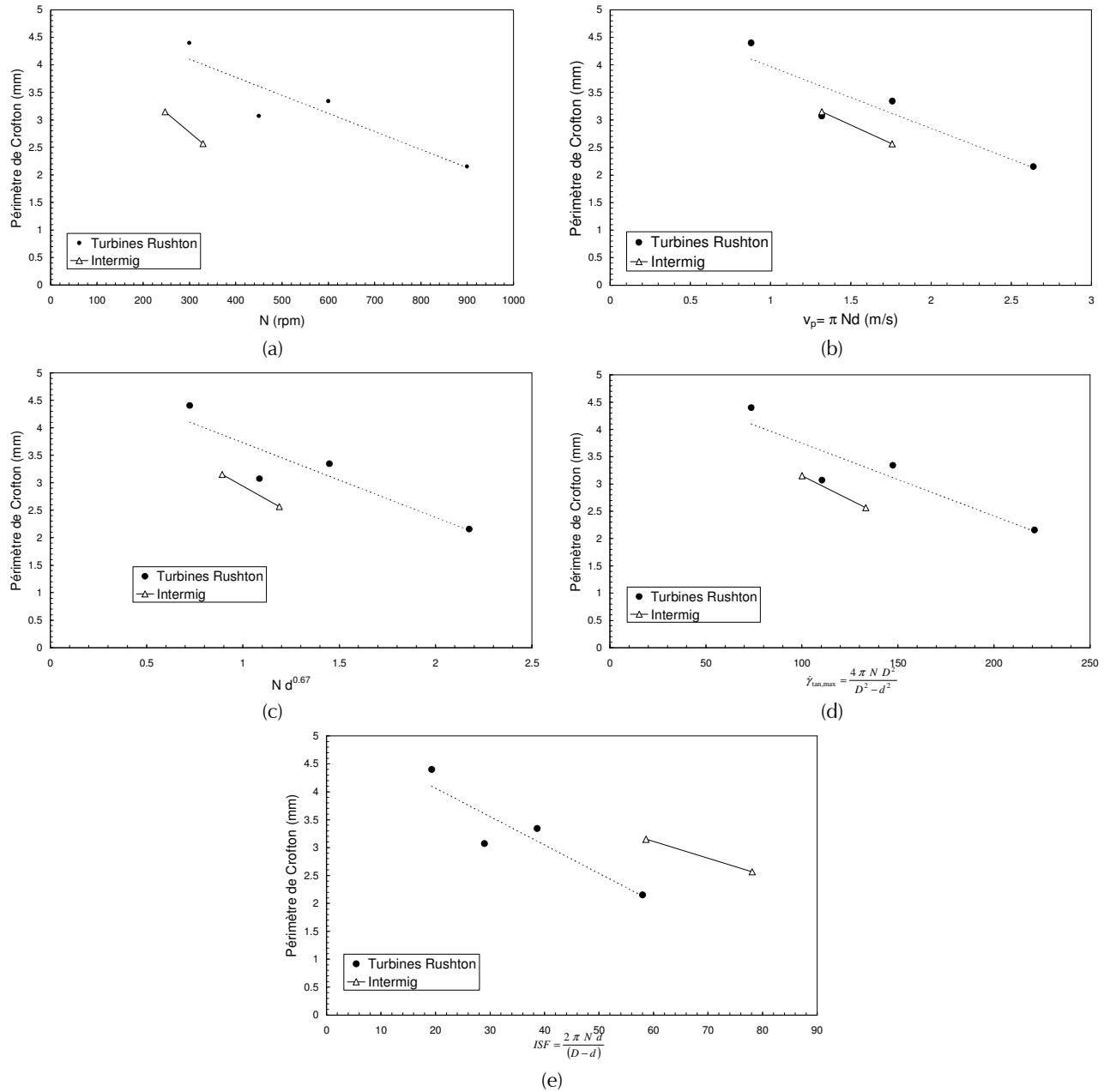


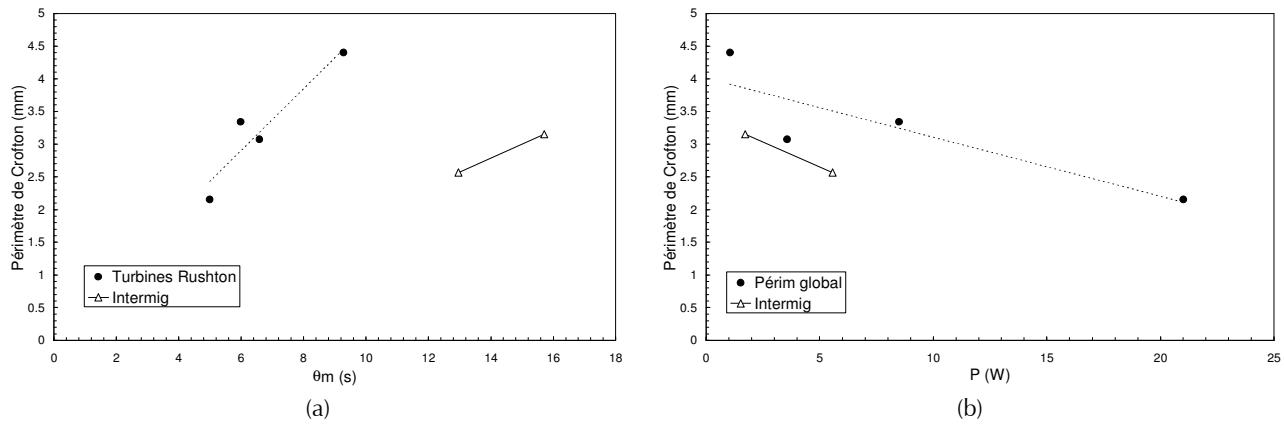
Figure 3 : Pérимètre de Crofton (mm) en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) la vitesse périphérique, (c) $N d^{0.67}$, (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximale, (e) le facteur de cisaillement intégré

Nous avons testé les mêmes modèles que pour l'aire (linéaire et loi en puissance) tenant compte des conditions d'agitation permettant de concilier les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig. Ils sont repris au tableau suivant (et ne peuvent pas être discriminés) :

Tableau 2 : Modélisation du périmètre de Crofton (mm)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
1. $PC = k N^a d^b$	$k=1.3 (\pm 0.6)$ $a=-0.58 (\pm 0.1)$ $b=-0.65 (\pm 0.2)$	0.12	$b/a=1.12$
2. $PC = a+b N^3 d^5$	$a=3.6 (\pm 0.4)$ $b=-702 (\pm 318)$	0.3	$5/3=1.67$
3. $PC = a+b \sqrt{N^3 d^5}$	$a = 4.4 (\pm 0.4)$ $b = -48 (\pm 12)$	0.15	
4. $PC = k (N^3 d^5)^a$	$k=0.96 (\pm 0.4)$ $a=-0.15 (\pm 0.05)$	0.2	

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le périmètre de Crofton des pelotes :

**Figure 4 :** Périmètre de Crofton (mm) des pelotes en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P (W)

3. Influence de l'hydrodynamique sur le diamètre de Féret maximum

Les graphes de la figure suivante présente les mesures du diamètre de Féret maximum des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , de la vitesse périphérique $\pi N d$, du produit $N d^{0.67}$ (qui est proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentiel maximale (entre le mobile en rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2}$ (voir *Chapitre I*) et du facteur de cisaillement intégré

(qui représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile)

$$ISF = \frac{2 \pi N d}{(D-d)} \text{ (voir } \text{Chapitre I).}$$

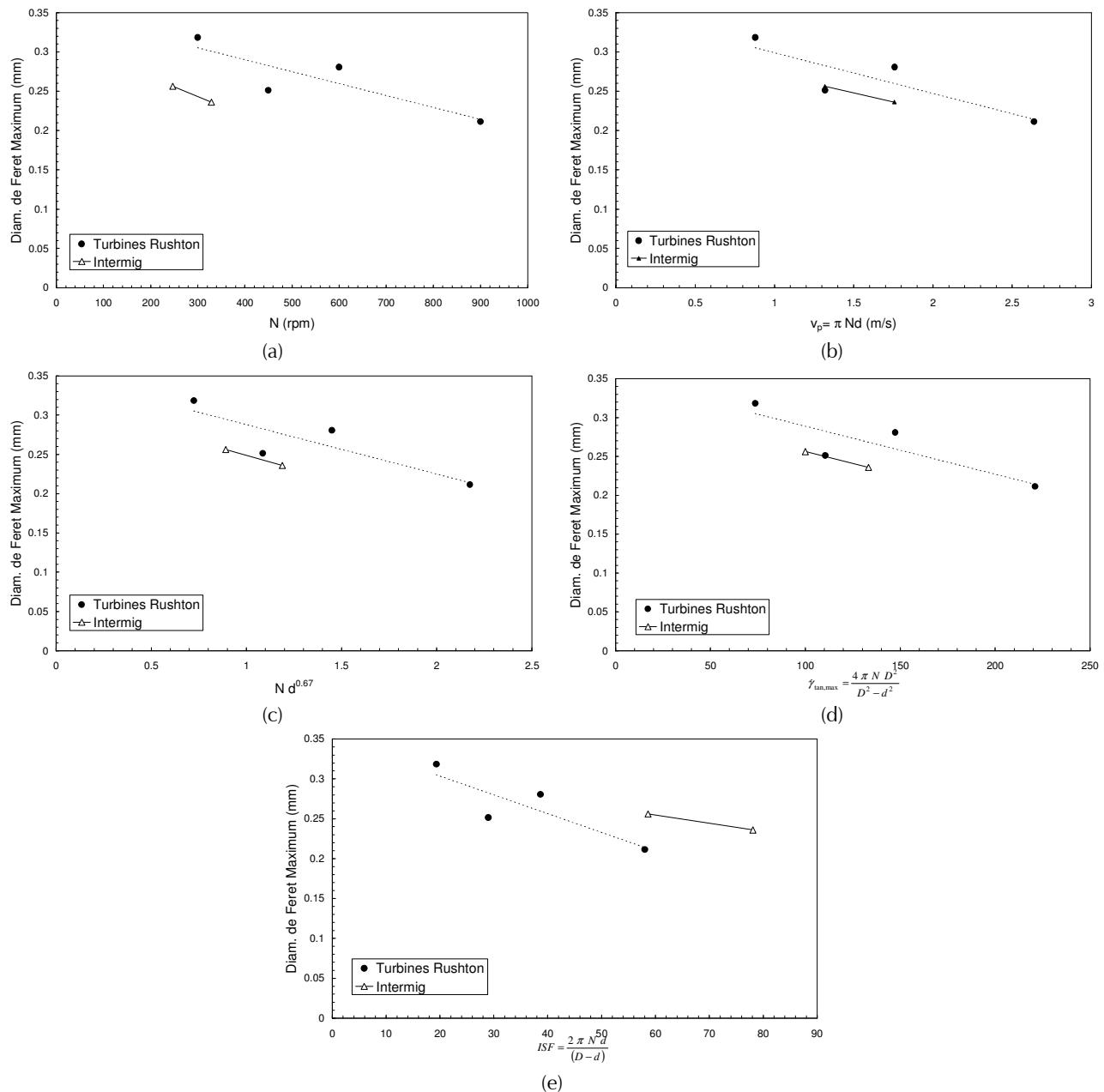


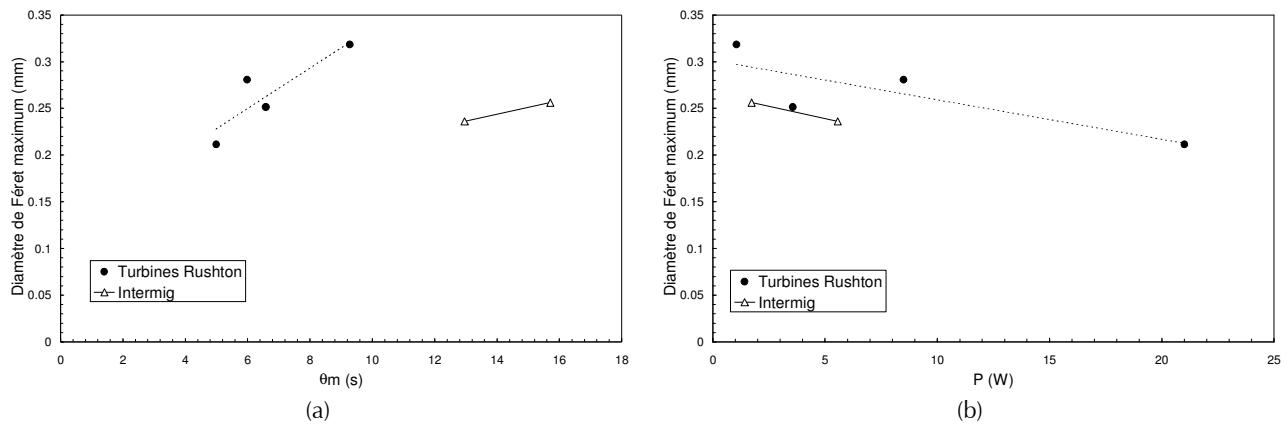
Figure 5 : Diamètre de Féret maximum des pelotes (mm^2) en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) la vitesse périphérique, (c) $N d^{0.67}$, (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximale, (e) ISF

Nous avons testé plusieurs modèles (linéaire et loi en puissance) tenant compte des conditions d'agitation permettant de concilier les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig. Ils sont repris au tableau suivant :

Tableau 3 : Modélisation du diamètre de Féret maximum (mm)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
1. $dF \text{ max} = k N^a d^b$	$k=0.15 (\pm 0.05)$ $a=-0.32 (\pm 0.11)$ $b=-0.43 (\pm 0.16)$	0.00052	$b/a=1.34$
2. $dF \text{ max} = a + b N^3 d^5$	$a=0.29 (\pm 0.02)$ $b=-39 (\pm 14)$	0.0006	$5/3=1.67$
3. $dF \text{ max} = k (N^3 d^5)^a$	$k=0.11 (\pm 0.03)$ $a=-0.11 (\pm 0.03)$	0.0005	

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le diamètre de Féret maximum des pelotes :

**Figure 6 :** Diamètre de Féret maximum (mm) des pelotes en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P (W)

4. Influence de l'hydrodynamique sur le diamètre de Féret minimum

Les graphes de la figure suivante présente les mesures du diamètre de Féret minimum des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , de la vitesse périphérique $\pi N d$, du produit $N d^{0.67}$ (qui est proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentiel maximale (entre le mobile en rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2}$ (voir Chapitre I) et du facteur de cisaillement intégré (qui représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile)

$$ISF = \frac{2 \pi N d}{(D - d)} \text{ (voir Chapitre I).}$$

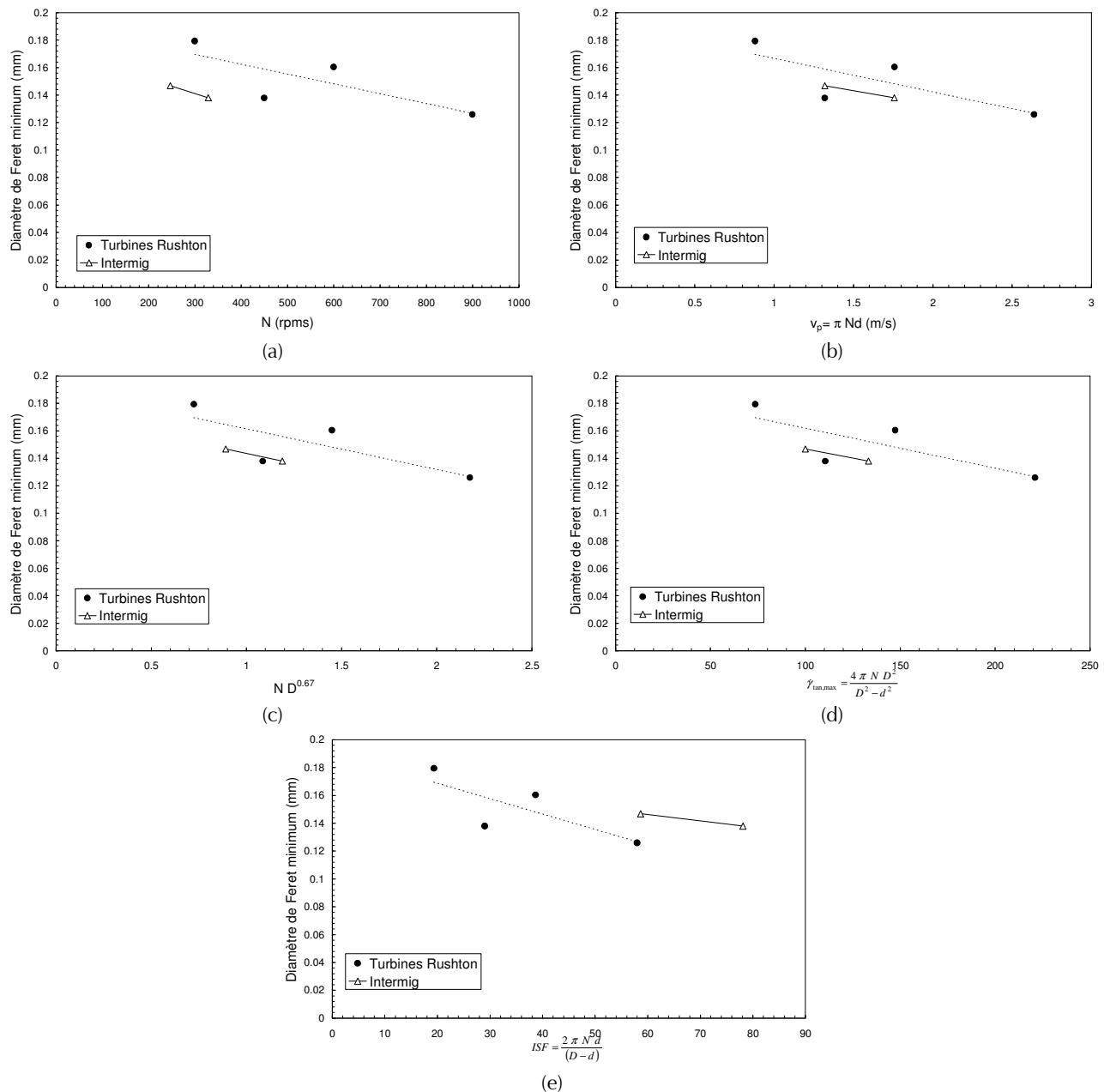


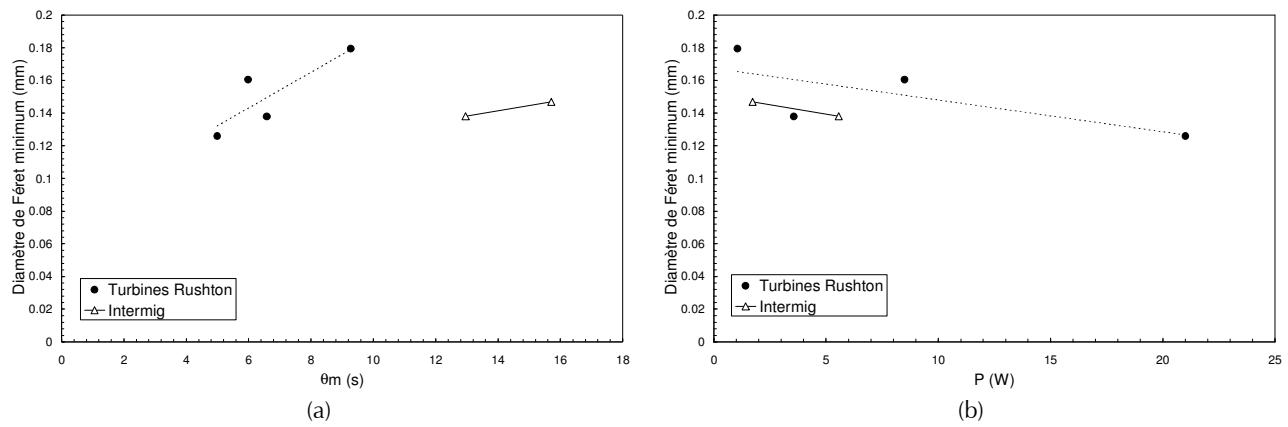
Figure 7 : Diamètre de Féret minimum des pelotes (mm^2) en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) la vitesse périphérique, (c) $N D^{0.67}$, (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximale, (e) ISF

Nous avons testé les mêmes modèles que pour l'aire (linéaire et loi en puissance) tenant compte des conditions d'agitation permettant de concilier les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig. Ils sont repris au tableau suivant (et ne peuvent pas être discriminés) :

Tableau 4 : Modélisation du diamètre de Féret minimum (mm)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	Remarques
1. $dF \text{ min} = k N^a d^b$	$k=0.10 (\pm 0.04)$ $a=-0.27 (\pm 0.12)$ $b=-0.36 (\pm 0.18)$	0.0002	$b/a=1.33$
2. $dF \text{ min} = a + b N^3 d^5$	$a=0.16 (\pm 0.01)$ $b=-18 (\pm 8)$	0.0002	$5/3=1.67$
3. $dF \text{ min} = k (N^3 d^5)^a$	$k=0.08 (\pm 0.02)$ $a=-0.08 (\pm 0.03)$	0.0002	

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le diamètre de Féret minimum des pelotes :

**Figure 8 :** Diamètre de Féret minimum (mm) des pelotes en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P (W)

5. Influence de l'hydrodynamique sur le nombre de trous

Les graphes de la figure suivante présente les mesures du nombre de trous des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , de la vitesse périphérique πNd , du produit $Nd^{0.67}$ (qui est proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentiale maximale (entre le mobile en

rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\max} = \frac{4 \pi N D^2}{D^2 - d^2}$ (voir Chapitre I) et du facteur de cisaillement intégré (qui représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile)

$$ISF = \frac{2 \pi N d}{(D - d)} \text{ (voir Chapitre I).}$$

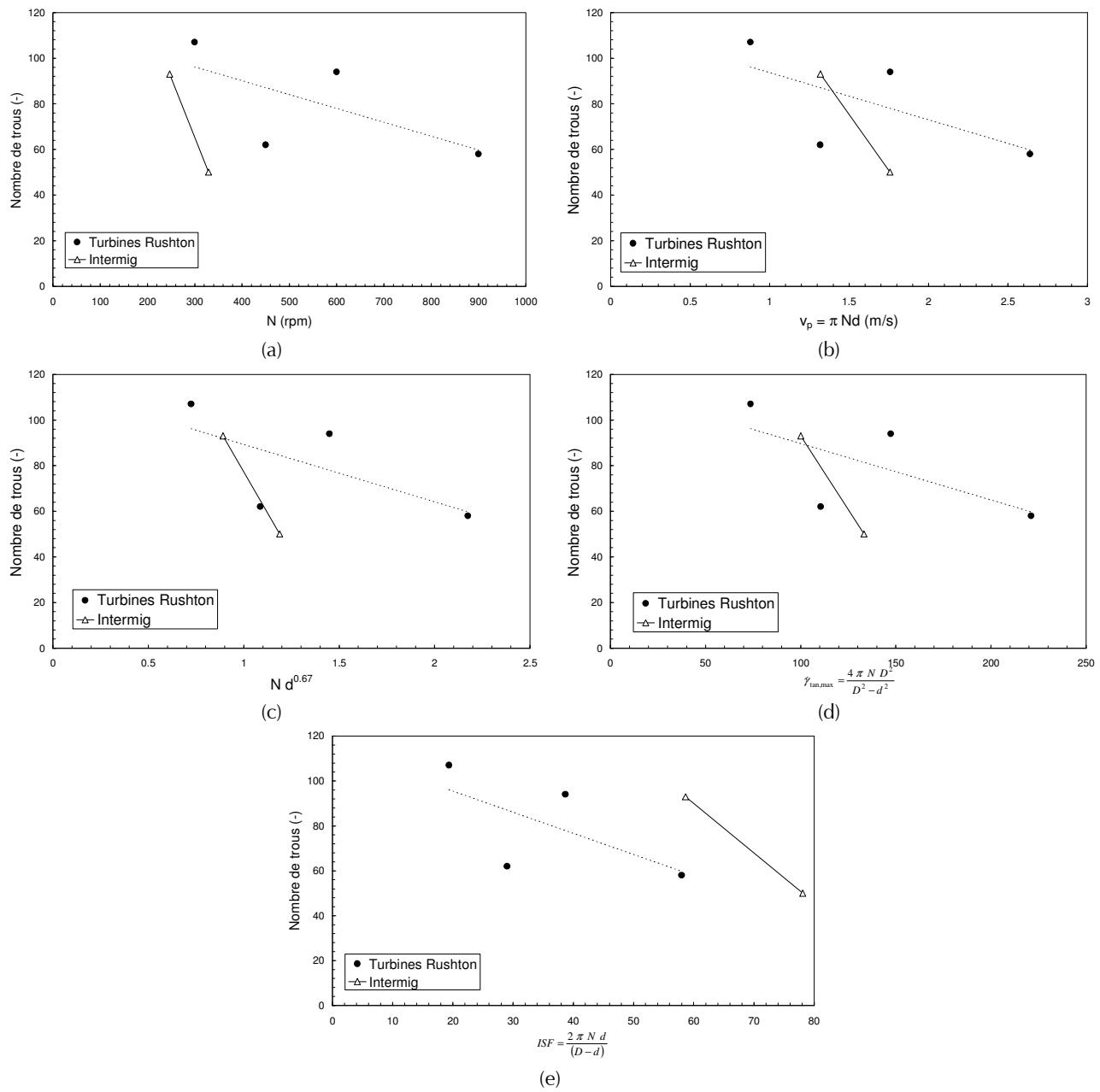


Figure 9 : Nombre de trous en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) la vitesse périphérique, (c) $N d^{0.67}$, (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximal, (e) ISF

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou la puissance dissipée et le nombre de trous des pelotes :

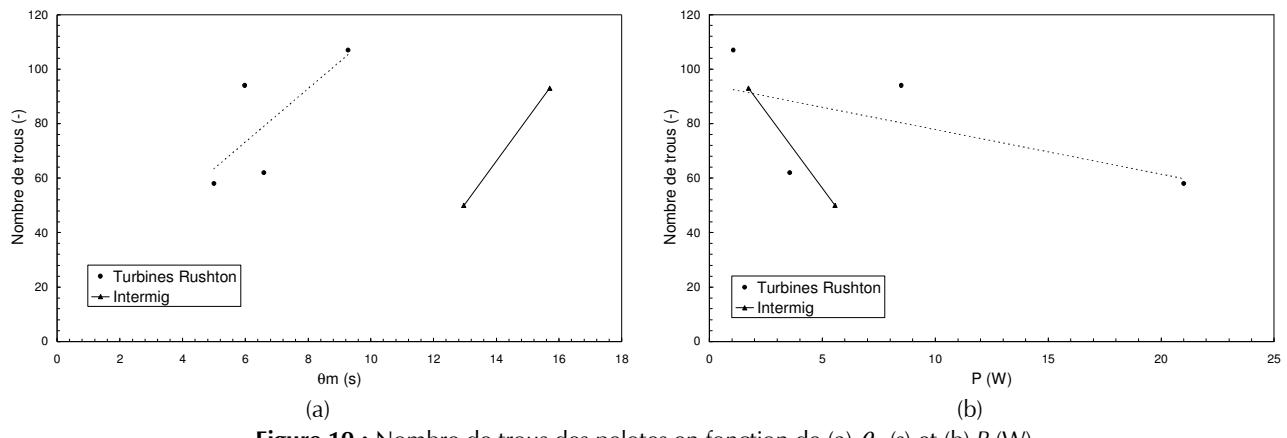


Figure 10 : Nombre de trous des pelotes en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P (W)

6. Influence de l'hydrodynamique sur la circularité

Les graphes de la figure suivante présente les mesures du diamètre de Féret maximum des pelotes en fonction de la vitesse d'agitation N , du produit N^3d^5 , du produit $Nd^{0.67}$ (qui est proportionnel à la puissance volumique P/V), de la vitesse de cisaillement tangentielle maximale (entre le mobile en

rotation et la paroi) $\dot{\gamma}_{\max} = \frac{4\pi N D^2}{D^2 - d^2}$ (voir Chapitre I) et du facteur de cisaillement intégré (qui représente une mesure du champ de cisaillement entre la paroi de la cuve et le mobile)

$$ISF = \frac{2\pi N d}{(D-d)} \text{ (voir Chapitre I).}$$

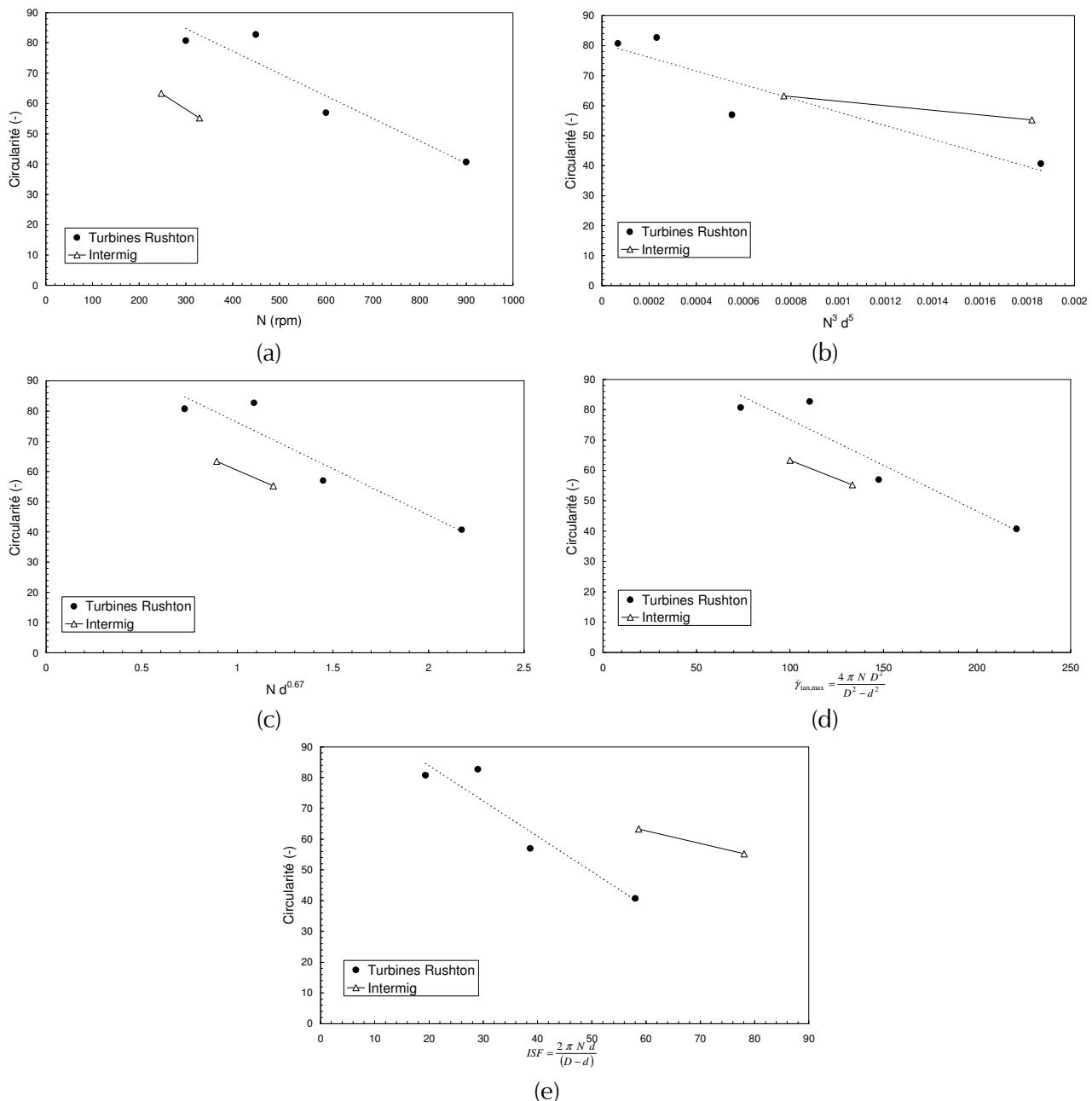


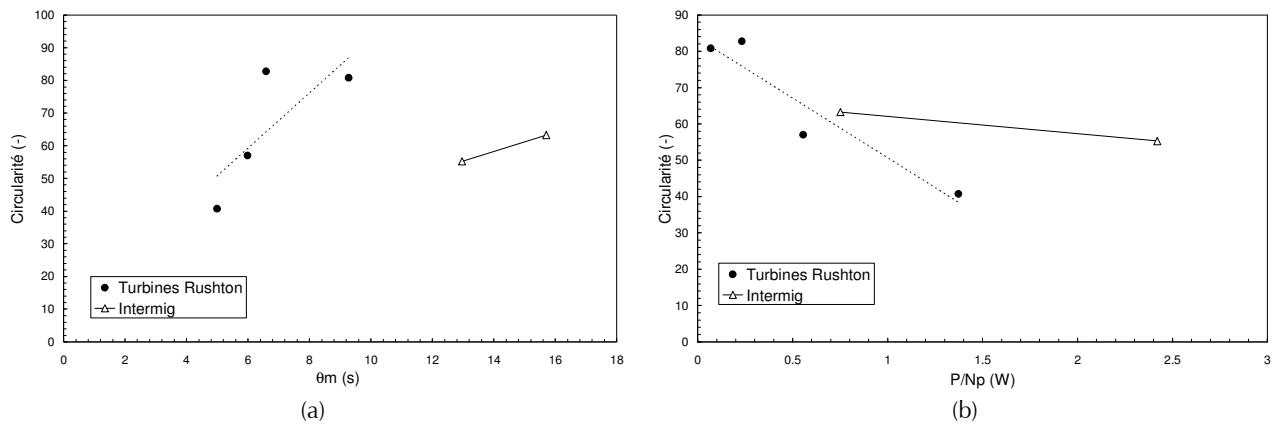
Figure 11 : Circularité (-) en fonction de (a) la vitesse d'agitation, (b) $N^3 d^5$,
(c) $N d^{0.67}$, (d) la vitesse de cisaillement tangentiel maximale, (e) ISF

Nous avons testé plusieurs modèles (linéaire et loi en puissance) tenant compte des conditions d'agitation permettant de concilier les résultats obtenus avec les turbines Rushton et les Intermig. Ils sont repris au tableau suivant :

Tableau 5 : Modélisation de la circularité (-)

Modèle	Paramètres (\pm écart-type)	s_r^2	rapport des exposants
1. $circularité = k N^a d^b$	$k=29 (\pm 17)$ $a=-0.56 (\pm 0.18)$ $b=-0.69 (\pm 0.26)$	88	$b/a=1.23$
2. $circularité = a + b (\pi Nd)$	$a= 102 (\pm 10)$ $b=-24 (\pm 6)$	59	=1
3. $circularité = k (\pi N d)^a$	$k=79 (\pm 6)$ $a=-0.6 (\pm 0.2)$	73	=1

Nous avons également étudié l'influence du mélange et de la puissance, mais nous n'avons pas relevé de relation directe entre le temps de mélange ou le rapport P/Np et la circularité :

**Figure 12 :** Circularité en fonction de (a) θ_m (s) et (b) P/Np

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence les relations qui peuvent exister entre l'hydrodynamique d'un fermenteur à cuve agitée mécaniquement et le développement d'une bactérie filamenteuse qui y est cultivée.

Notre première étape fut de sélectionner une souche sensible au stress hydrodynamique : *Actinomadura R39*. Nous avons ensuite mis au point un milieu de culture simple et performant en utilisant la méthodologie des plans statistiques d'expériences. Ce milieu comprend une source carbonée (amidon), une source d'azote organique (peptone de soja) et des sels. Les démarrages des fermentations ont été standardisés par préparation d'une préculture mère stockée à basse température (-70°C) et qui a servi à la préparation des inoculums de toutes les expériences. Cette méthodologie a permis d'obtenir une bonne reproductibilité des fermentations.

Nous avons cultivé *Actinomadura R39* dans un fermenteur de laboratoire de 5 litres à cuve agitée mécaniquement, à plusieurs vitesses d'agitation et avec deux mobiles différents : les turbines Rushton (écoulement radial, $d=56$ mm) et les Intermig (écoulement mixte axial-radial, $d=102$ mm). Trois mobiles (identiques) sont disposés sur le même arbre d'agitation. Les vitesses d'agitation ont été fixées en prenant comme grandeur de référence la vitesse périphérique des pales (correspondant à la vitesse de cisaillement maximale).

Nous avons comparé les résultats obtenus avec les différentes conditions de culture. Elles ont donné des performances similaires en termes de production de biomasse (évaluée par le poids sec) et de vitesse de croissance maximale. On n'observe pas de d'influence significative de la concentration minimale en oxygène dissous, du taux d'inoculation, de la vitesse d'agitation pour un mobile donné ou du type de mobile utilisé. On peut supposer que, même aux vitesses d'agitation élevées qui entraînent des champs de cisaillements intenses (surtout dans la région de l'agitateur) et un stress hydrodynamique élevé, le temps de séjour des bactéries dans cette zone proche des mobiles est suffisamment court que pour ne pas handicaper leur croissance. Une autre explication pourrait être que ces phénomènes ont lieu à une échelle suffisamment différente des extrémités apicales (où a lieu la croissance) pour que leur influence sur le métabolisme soit négligeable.

Afin de réaliser l'étude de l'hydrodynamique du fermenteur dans un milieu artificiel transparent dont les propriétés sont identiques au milieu de culture (avec les micro-organismes), nous avons mesuré la

viscosité du milieu de fermentation contenant *Actinomadura* R39 à plusieurs stades de son développement. Ce milieu est non-newtonien rhéofluidifiant, et les résultats ont été modélisés par une loi en puissance ($\tau = K\dot{\gamma}^n$) dont les paramètres évoluent en cours de fermentation. L'échantillon qui nous a servi de référence a été obtenu lors d'une culture avec les turbines Rushton à 450 rpm et prélevé à un moment qui est proche du stade de la fermentation choisi pour effectuer l'analyse d'images (qui correspond au minimum de la concentration en oxygène dissous). Ses caractéristiques correspondent à une solution de xanthane à 1.25 g/l à laquelle sont ajoutés 2.6 g/l de sels (K_2HPO_4 : 2 g/l, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 0.6 g/l) et de l'antimousse (milieu non coalescent comprenant les mêmes additifs que le milieu réel). Les paramètres de la loi en puissance décrivant son comportement rhéologique valent respectivement 0.17 pour l'index de consistance K et 0.4 pour l'index de comportement n (à 20°C).

C'est dans ce milieu que nous avons mesuré la puissance dissipée en conditions aérées ou non, et nous en avons déduit la valeur (constante) du nombre de puissance Np en régime turbulent pour les deux mobiles ($Np=15.3$ et $Npg=7.9$ pour les trois turbines Rushton, $Np=2.3$ et $Npg=1.3$ pour les trois Intermig). Le rapport des puissances en conditions aérées et non aérées Pg/P est indépendant du mobile et vaut 0.55 (en régime turbulent). Bien que n'étant pas conformes aux vrais Intermig, les mobiles que nous avons utilisés et qui ont une géométrie proche de ces derniers ont un nombre de puissance beaucoup plus faible que celui des turbines Rushton.

En utilisant la méthodologie des essais de traceur, nous avons modélisé le fermenteur par un modèle compartimenté à huit cuves dont les paramètres sont le flux de pompage fp (ou débit d'échange entre les compartiments) et le diamètre de la zone centrale des mobiles dz . Le pompage augmente avec la vitesse de rotation : fp (m³/s) = $9.8 \cdot 10^{-4} \ln(N) - 8 \cdot 10^{-4}$ (pour N en s⁻¹) alors le diamètre de la zone centrale dz est indépendant de la vitesse de rotation et du mobile utilisé : $dz=0.073$ m.

Le temps de mélange à 95% θ_m a été mesuré sur les courbes de traceur (temps-concentration) lissées par le modèle. Il diminue lorsque la vitesse d'agitation augmente, et peut lui être corrélé par une loi en puissance indépendamment du mobile utilisé : θ_m (s) = $176 * N^{-1.6}$ (pour N en s⁻¹). Le temps de mélange affiche une dépendance linéaire par rapport à l'inverse du flux de pompage fp paramétrant le modèle précité : $\theta_m = 0.00816 * \frac{1}{fp} + 0.37$. Le paramètre fp permet ainsi d'intégrer en une seule grandeur caractéristique l'intensité et la nature de l'écoulement provoqué par un mobile en rotation dans une

cuve agitée, et leurs conséquences sur la capacité d'homogénéisation d'une cuve agitée (via le temps de mélange).

Les échantillons prélevés lors des fermentations et conservés après coloration ont été étudiés par analyse d'images. L'échantillon qui a servi de point de comparaison entre les différentes conditions de culture est celui qui correspond au minimum de la concentration en oxygène dissous.

L'algorithme du programme d'analyse d'images permet d'éliminer une grande partie des objets qui ne sont pas des pelotes ou agrégats d'*Actinomadura R39*, d'extraire les objets et de réaliser sur eux un certain nombre de mesures telles que l'aire, le périmètre de Crofton, les diamètres de Féret maximum et minimum, le nombre de trous et la circularité. Les objets dont l'aire est inférieure à 450 pixel² sont éliminés suite à un calibrage de la taille des éléments parasites (crasses).

La taille des pelotes ou agrégats, leur nombre de trous et leur circularité diminuent avec l'augmentation de la vitesse d'agitation. Ce qui signifie qu'une augmentation de la vitesse d'agitation entraîne la formation de pelotes qui sont plus petites et plus compactes. À vitesse de rotation ou à vitesse périphérique des pales identiques, les Intermig produisent des pelotes plus petites et plus compactes que les turbines Rushton.

Les résultats morphologiques ont été corrélés en fonction des paramètres hydrodynamiques des fermentations. Les données provenant des expériences menées avec les deux types de mobiles (turbines Rushton et Intermig) ont pu être réunies et corrélées linéairement aux produits N^3d^5 et fp^3d^5 pour l'aire des pelotes, les diamètres de Féret maximum et minimum et le nombre de trous, à $\sqrt{N^3 d^5}$ et $\sqrt{fp^3 d^5}$ pour le diamètre équivalent (diamètre d'un cercle ayant la même surface que la pelote) et le périmètre de Crofton, et à la vitesse périphérique des pales ($=\pi N d$) pour la circularité.

Les valeurs des diamètres de Féret maximum et minimum sont du même ordre de grandeur que l'échelle de Kolmogoroff λ_{Kz} (calculée par rapport à la zone proche du mobile où la dissipation d'énergie est maximale), ce qui explique que l'hydrodynamique a une influence sur la morphologie d'*Actinomadura R39*. Cependant, il est possible que les pelotes en se déformant absorbent une partie de l'énergie contenue dans les petits tourbillons, et ne subissent ainsi pas une modification de taille drastique lorsque les conditions d'agitation se modifient. Les extrémités apicales de filaments sont

beaucoup plus petites que l'échelle de Kolmogoroff, ce qui peut expliquer que cette dernière n'a pas d'influence sur la croissance (dans la gamme des vitesses d'agitation utilisées pour ces expériences).

Mis à part la circularité (proportionnelle à la puissance), les autres grandeurs morphologiques sont corrélées au rapport P/Np , qui intègre à la fois la puissance fournie et la façon dont elle est dissipée dans le fermenteur (via le nombre de puissance).

L'influence de l'hydrodynamique sur la morphologie d'*Actinomadura R39* se divise en deux catégories : d'une part l'influence sur la taille des pelotes et agrégats, d'autre part l'influence sur la complexité des objets. L'effet sur la taille se traduit par une modification de l'aire, du périmètre ou des diamètres de Féret, alors que l'influence sur la complexité se manifeste par une modification de la circularité. La taille semble être fonction des caractéristiques globales de l'hydrodynamique (via P/Np). Par contre, la complexité des objets semble être fonction des caractéristiques locales de l'hydrodynamique (la circularité est proportionnelle à la vitesse périphérique, elle-même proportionnelle à la vitesse de cisaillement maximale).

Les pelotes d'*Actinomadura R39* réalisent ainsi au cours de leur croissance et de leurs déplacements une intégration spatiale et temporelle des conditions hydrodynamiques régnant dans le fermenteur. Nous ayons pu corrélérer les mesures morphologiques des pelotes à la fois aux caractéristiques hydrodynamiques brutes (N^3d^5 ou πNd , P/Np ou P) et au paramètre fp (provenant de l'ajustement d'un modèle compartimenté sur les essais de traceurs réalisés dans le même fermenteur) en une relation réunissant les résultats obtenus avec les deux types de mobiles. Cette double corrélation valide la pertinence du modèle utilisé quant à la description des schémas d'écoulement dans une cuve agitée mécaniquement.

Les résultats obtenus lors de l'étude hydrodynamique du fermenteur sont difficilement comparables aux données ou corrélations disponibles dans la littérature. Cette incompatibilité montre la grande influence que la géométrie peut avoir sur les schémas d'écoulement dans une cuve agitée, lesquels conditionnent des processus tels que la dissipation d'énergie ou la capacité de mélange. Toute géométrie non standard, surtout en présence d'un milieu non-newtonien, nécessite une étude spécifique pour une bonne compréhension des phénomènes qui y prennent place.

Cette étude présente la mise au point d'une méthodologie d'étude des procédés de fermentation, utilisant les outils du génie chimique et de l'analyse d'images. Elle permet de relier la morphologie d'une

bactérie filamenteuse aux résultats obtenus par la modélisation du macromélange via des essais de traceur inerte dans un fermenteur à cuve agitée mécaniquement.

PERSPECTIVES

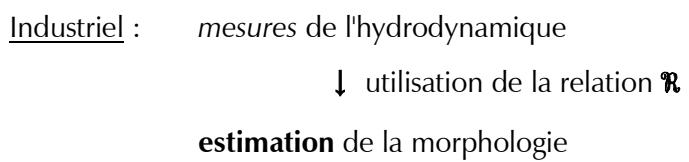
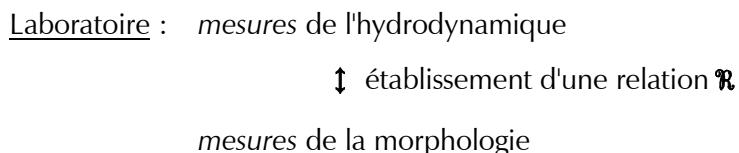
Les essais de traceur inerte sont beaucoup plus simples (et économiques) à réaliser que des cultures de micro-organismes, et le modèle, une fois sa géométrie établie, est relativement simple à ajuster et à modifier selon la configuration du système. Après quelques fermentations de calibration, il est ainsi possible d'estimer la morphologie que l'on obtiendra dans des conditions hydrodynamiques déterminées. Cette proposition doit bien entendu être validée en comparant les résultats obtenus dans des fermenteurs de différentes tailles.

Si par exemple, pour une production à grande échelle, on souhaite obtenir une morphologie particulière, on peut étudier à l'échelle du laboratoire l'influence des conditions hydrodynamiques de culture sur la morphologie de la bactérie. Les deux fermenteurs (de laboratoire et industriel) sont caractérisés par un modèle compartimenté (de paramètre fp) et par des mesures de la puissance dissipée.

Des cultures à l'échelle du laboratoire permettent d'établir une relation entre l'hydrodynamique (et le modèle) et la morphologie : c'est la phase de calibration.

À partir des caractéristiques hydrodynamiques du fermenteur industriel et en utilisant la relation d'étalonnage établie entre les conditions de laboratoire et la morphologie, on peut déduire la morphologie que l'on obtiendra dans les conditions industrielles (avec quelques fermentations de vérification de la validité de la relation de hydrodynamique-morphologie à l'échelle industrielle).

On a le schéma d'exploitation suivant :



Inversement, sur base ce même étalonnage, on pourrait caractériser l'hydrodynamique d'un système complexe sur base de l'étude de la morphologie d'*Actinomadura R39*. Il suffirait de cultiver la souche

dans un fermenteur de géométrie originale et de comparer la morphologie résultante avec les résultats obtenus dans une cuve dont l'hydrodynamique est connue pour en déduire les caractéristiques hydrodynamiques du fermenteur comportant des écoulements complexes.