



HAL
open science

Mise au point, optimisation et extrapolation de
nouveaux procédés d'agitation et d'aération aux échelles
2L, 900L et 10m³ pour les souches *D. Hansenii*, *s.*
Carnosus et *P. Candidum*

Hugues Canteri

► To cite this version:

Hugues Canteri. Mise au point, optimisation et extrapolation de nouveaux procédés d'agitation et d'aération aux échelles 2L, 900L et 10m³ pour les souches *D. Hansenii*, *s.* *Carnosus* et *P. Candidum*. Alimentation et Nutrition. Université de Lorraine, 2014. Français. NNT : 2014LORR0332 . tel-01751557

HAL Id: tel-01751557

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01751557v1>

Submitted on 20 Nov 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITÉ DE LORRAINE**École Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires****Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules****THESE DE DOCTORAT**

Présentée à l'Université de Lorraine par

Hugues CANTERI

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Ecole doctorale **R**essources, **P**rocédés, **P**roduits, **E**nvironnement (RP2E)Spécialité : **P**rocédés **B**iotecnologiques et **A**limentaires**Titre de la thèse :**

Mise au point, optimisation et extrapolation de nouveaux
procédés d'agitation et d'aération aux échelles 2L, 900L et 10m³
pour les souches *D. hansenii*, *S. carnosus* et *P. candidum*.

Soutenue en huis clos le 14 Novembre 2014 devant la commission d'examen

Membres du jury :

Jean-Marc ENGASSER	Examineur	Professeur, Université de Lorraine (ENSAIA), Nancy, France
Stéphane GUILLOUET	Rapporteur	Professeur, INSA, Toulouse, France
Ridha MOSRATI	Rapporteur	Professeur, UNICAEN, Caen, France
Mohamed GHOUL	Directeur de thèse	Professeur, Université de Lorraine (ENSAIA), Nancy, France

Membres invités :

Lilian LABUSSIÈRE	Membre invité	Ingénieur, société DSM, La Ferté-sous-Jouarre, France
-------------------	---------------	---

Travail de recherche préparé au Laboratoire d'ingénierie des biomolécules dans le cadre d'une convention
CIFRE avec la société DSM France

Cadre du financement de la thèse

Cette thèse a été réalisée au Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio), de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, à l'Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires (ENSAIA). Elle a été réalisée au sein de l'école doctorale Ressources, Procédés, Produits, Environnement (RP2E).

Elle a été financée dans le cadre d'une Convention Industrielle de Formation par la REcherche (CIFRE) avec l'Agence Nationale de Recherche Technologie (ANRT).

Le financement des équipements, des expériences ainsi que des missions a été réalisé avec la société Royal DSM située à La Ferté-sous-Jouarre.

Que ces différents partenaires qui nous ont aidés financièrement, scientifiquement et administrativement parlant soient chaleureusement remerciés.



Liste des Figures

Figure 1. <i>Asexual reproduction of Penicillium</i>	Erreur ! Signet non défini.
Figure 2. <i>Medium composition effects</i>	Erreur ! Signet non défini.
Figure 3. <i>Operating conditions effects</i>	Erreur ! Signet non défini.
Figure 4. <i>Stirring and shear-stress effects</i>	Erreur ! Signet non défini.
Figure 5. <i>Strategy for spore production</i>	Erreur ! Signet non défini.
Figure 6. <i>Représentation schématique du changement d'échelle</i>	50
Figure 7. <i>Transfert de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle</i>	51
Figure 8. <i>Stratégie d'approche de l'extrapolation</i>	55
Figure 9. <i>Opérations unitaires en amont et aval de l'étape de production</i>	61
Figure 10. <i>Photographie d'une boîte de Roux</i>	63
Figure 11. <i>Dimensions du fermenteur 2L</i>	70
Figure 12. <i>Photographie de l'installation à l'échelle 2L</i>	70
Figure 13. <i>Schéma du fermenteur de 900L équipé avec le nouveau mobile « oreilles d'éléphant »</i>	71
Figure 14. <i>Photographie d'une turbine Rushton pour le fermenteur de 2L</i>	72
Figure 15. <i>Schéma technique du mobile « oreilles d'éléphant EEU45 » pour le fermenteur de 2L</i>	73
Figure 16. <i>Schéma technique du mobile « Cell-lift » pour le fermenteur de 2L</i>	74
Figure 17. <i>Photographie de la turbine centripète pour le fermenteur de 900L</i>	75
Figure 18. <i>Photographie de la pale HTPG-4 (à gauche) et de la turbine Rushton (à droite) pour le fermenteur de 900L</i>	76
Figure 19. <i>Schéma technique du mobile « oreilles d'éléphant EEU45 » pour le fermenteur de 900L</i>	76
Figure 20. <i>Photographie du mobile « oreilles d'éléphant EEU45 » pour le fermenteur de 900L</i>	77
Figure 21. <i>Illustration du vortex permettant le transfert d'oxygène en aération de surface</i>	77
Figure 22. <i>Photographie du sparger classique en fer à cheval pour le fermenteur de 2L</i>	78
Figure 23. <i>Photographie du sparger classique pour le fermenteur de 900L</i>	78
Figure 24. <i>Photographie du microsparger 40µm pour le fermenteur de 2L</i>	79
Figure 25. <i>Photographie de la membrane de filtration porosité 20µm (à gauche) et du microsparger (à droite) pour le fermenteur de 900L</i>	79
Figure 26. <i>Courbe étalon pour la mesure de concentration en dextrose monohydrate (DXM) et en acétate de sodium (ACS)</i>	81
Figure 27. <i>Gamme de linéarité de la mesure de DO au spectrophotomètre à 560 nm pour la levure</i> ..	84
Figure 28. <i>Gamme de linéarité de la mesure de DO au spectrophotomètre à 560 nm pour la bactérie</i>	84
Figure 29. <i>Exemple de mesure expérimentale du KLa durant la fermentation</i>	88

Figure 30. Comparaison de la biomasse et de la numération finale sur boîte de Pétri en fonction de la stratégie d'aération.....	97
Figure 31. Comparaison activité nitrate réductase rapportée sur la biomasse en fonction de la stratégie d'aération et après lyophilisation.....	97
Figure 32. Comparaison biomasse finale en fonction de la stratégie d'aération avec et sans ajout de nitrate de potassium.	98
Figure 33. Comparaison numération finale sur boîte de Pétri en fonction de la stratégie d'aération avec et sans ajout de nitrate de potassium.	99
Figure 34. Comparaison numération finale sur boîte de Pétri en fonction de la stratégie d'aération avec et sans ajout de nitrate de potassium.	Erreur ! Signet non défini.
Figure 35. Comparaison activité nitrate réductase rapportée sur la biomasse en fonction de la stratégie d'aération et après lyophilisation avec et sans ajout de nitrate de potassium.	100
Figure 36. Comparaison des consommations totale en fin de batch en ammoniac 5% en fonction de la stratégie d'aération (sans limitation en oxygène dissous avec limitation) sans ajout de nitrate de potassium dans le milieu.	101
Figure 37. Cinétiques matière sèche et quantité de spores pour un batch avec choc pH (batch témoin DSM). (a) concentration en matière sèche en fonction du temps ; (b) concentration en spores (en millions par mL) en fonction du temps.	104
Figure 38. Cinétiques de consommations du dextrose et de l'acétate de sodium pour un batch avec choc pH en fonction du temps (batch témoin DSM). (bleu) concentration en acétate de sodium ; (rouge) concentration en dextrose ; (vert) azote soluble.	104
Figure 39. Effet du type d'eau utilisée pour la préparation du milieu sur la quantité finale de spores.	105
Figure 40. Effet de la température de consigne sur la production de spores.	106
Figure 41. Evolution du pH lors des batch avec pH libre et batch avec choc pH.....	107
Figure 42. Photographie au microscope (x40) des longs filaments de mycélium après un ajout trop important en substrat.....	111
Figure 43. Photographie au microscope (x40) de spores gonflées et de mycélium en cours de croissance en fed-batch.	111
Figure 44. Vessel dimensions.....	119
Figure 45. Elephant Ears in down-pumping mode 45°	120
Figure 46. Elephant Ears in down-pumping mode 45°	120
Figure 47. Picture of the classic sparger 1000µm (left) and the microsparger, two porosities: 20µm and 40µm (right)	121

Figure 48. Power number as a function of Reynolds number for EE's, RT, and cell-lift with baffles and without aeration (a) and with full aeration (2 vvm) with sparger 1000µm (b); microsparger 40µm (c); microsparger 20µm (d).....	124
Figure 49. Evolution of P_g/P_0 as a function of the flow number with different stirrers, different porosities and variable stirring speed at 0.25 vvm. (a): EEU45; (b):EED45; (c): 2 x Rushton; (d) Cell-lift.	127
Figure 50. Evolution of P_g/P_0 as a function of the flow number with different stirrers, different porosities and variable stirring speed at 2 vvm. (a): EEU45; (b): EED45; (c): 2 x Rushton; (d) Cell-lift.	128
Figure 51. Reduction of power uptake in a gassed STR with RT's at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM	130
Figure 52. Reduction of power uptake in a gassed STR with EEU45 at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM.....	130
Figure 53. Reduction of power uptake in a gassed STR with EED45 at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM.....	131
Figure 54. Reduction of power uptake in a gassed STR with Cell-lift at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM.....	131
Figure 55. <i>Vessel dimensions</i>	141
Figure 56. <i>Linear regression applied on experimental K_La values vs. stirrer speed at 0.15 vvm: (a): EEU45; (b): EED45; (c): 2 x Rushton.</i>	146
Figure 57. <i>logarithmic regression applied on experimental K_La values vs. airflow rate at 400 RPM for EE and 800 RPM for RT: (a): EEU45; (b):EED45; (c): 2 x Rushton.</i>	146
Figure 58. <i>K_La prediction with EEU45 at variable stirring speed (0.15vvm): (a): classic 1000µm sparger; (b): 40µm; (c): 20µm; at variable airflow rate (400RPM): (d): classic 1000µm sparger; (e): 40µm; (f): 20µm.</i>	149
Figure 59. <i>Correlations between K_La prediction model and K_La from experimental data with EED45 + 40µm microsparger.</i>	150
Figure 60. <i>Correlations between K_La prediction model and K_La from experimental data with RT + 1000µm sparger.</i>	150
Figure 61. <i>Pilot-scale vessel dimensions with EEU45 + sparger configuration.</i>	168
Figure 62. <i>Strategy of the approach of extrapolation.</i>	171
Figure 63. (a) <i>K_La vs. agitation speed at constant airflow rate (0.24vvm). (b) K_La vs. airflow rate at constant stirring speed (200RPM for all stirrers except for centripetal turbine 320RPM).</i>	177
Figure 64. <i>Correlations between K_La prediction model and K_La from experimental data with Rushton + Marine impellers + 1000µm sparger.</i>	178

Figure 65. (a) K_{La} en fonction de la vitesse d'agitation à débit d'air constant (0.24vvm) ; (b) K_{La} en fonction du débit d'air à vitesse d'agitation constante (200RPM pour tous les agitateurs sauf pour la turbine centripète qui est à 320RPM) à l'échelle pilote 900L. 183

Figure 66. Schéma du fermenteur de 10 000m³ équipé du nouveau mobile « oreilles d'éléphant ». ... 189

Figure 67. Représentation des limites d'utilisation du nouveau procédé pour un K_{La} et une vitesse superficielle de gaz (a) ou une vitesse en bout de pales (b) constants..... 216

Liste des Tableaux

Tableau 1. <i>Nombres adimensionnels.</i>	53
Tableau 2. <i>Valeurs d'extrapolation avec similitude géométrique en fixant un paramètre entre les échelles (en vert).</i>	54
Tableau 3. <i>Valeurs d'extrapolation sans similitude géométrique en fixant un paramètre entre les échelles (en vert).</i>	56
Tableau 4. <i>Modèles de prédiction du K_La en fonction du type de fermenteur et du micro-organisme.</i>	58
Tableau 5. <i>Modèles de prédiction du K_La en fonction du mobile d'agitation et du type d'aération.</i>	59
Tableau 6. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation pour <i>Penicillium candidum</i> en Erlenmeyer.</i>	64
Tableau 7. <i>Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments SOE-Br pour <i>Penicillium candidum</i> en Erlenmeyer.</i>	64
Tableau 8. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation pour <i>Penicillium candidum</i> en fermenteur (1^{ère} partie pour stérilisation à part).</i>	65
Tableau 9. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation pour <i>Penicillium candidum</i> en fermenteur (2^{ème} partie pour stérilisation à part).</i>	65
Tableau 10. <i>Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments M1 v.2 pour <i>Penicillium</i> en fermenteur.</i>	65
Tableau 11. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation JB pour <i>Debaryomyces hansenii</i> en Erlenmeyer.</i>	66
Tableau 12. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation JB <i>Debaryomyces hansenii</i> en fermenteur.</i>	66
Tableau 13. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation JB amélioré pour <i>Debaryomyces hansenii</i> en fermenteur.</i>	66
Tableau 14. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation SX21 pour <i>Staphylococcus carnosus</i> en Erlenmeyer.</i>	67
Tableau 15. <i>Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments manganèse pour <i>Staphylococcus carnosus</i> en Erlenmeyer.</i>	67
Tableau 16. <i>Composition d'un litre de milieu de fermentation M21-K100 pour <i>Staphylococcus carnosus</i> en fermenteur.</i>	68
Tableau 17. <i>Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments Mc pour <i>Staphylococcus carnosus</i> en fermenteur.</i>	68
Tableau 18. <i>Dimensions fermenteur 2L.</i>	69
Tableau 19. <i>Caractéristiques des pales pour fermenteur de 2L.</i>	72

Tableau 20. <i>Caractéristiques des pales pour fermenteur de 900L.</i>	75
Tableau 21. <i>Caractéristiques générales de l'installation HPLC utilisée</i>	81
Tableau 22. <i>Composition du milieu PCA + NaCl 9g/L</i>	86
Tableau 23. <i>Calculs des nombres adimensionnels</i>	91
Tableau 24. <i>Calculs des nombres dimensionnels</i>	92
Tableau 25. <i>Constantes déduites des différents essais effectués sur la souche D. hansenii.</i>	95
Tableau 26. <i>Quantité de cellules obtenues aux différentes échelles de production dans les conditions de référence.</i>	95
Tableau 29. <i>Composition des eaux de ville de LFSJ (entre 2004 et 2006 et en 2007) et de Nancy (2011).</i>	105
Tableau 30. <i>Production de spores par P. candidum avec différents points de consigne de pH constants.</i>	107
Tableau 31. <i>pKa des formes de CO₂.</i>	108
Tableau 32. <i>Production de spores par P. candidum avec différents profils de pH.</i>	109
Tableau 33. <i>Production de spores par P. candidum en fed-batch.</i>	110
Table 34. <i>Vessel dimensions</i>	119
Table 35. <i>Impellers characteristics</i>	120
Table 36. <i>List of dimensionless numbers</i>	122
Table 37. <i>Power number for different impellers</i>	125
Table 38. <i>K_La prediction in literature</i>	140
Table 39. <i>Impellers characteristics</i>	142
Table 40. <i>K_La_{max} values (hr⁻¹).</i>	145
Table 41. <i>Values of constants a, b and c of systems used in this study.</i>	147
Table 42. <i>K_La values obtained with experiments or with the developed model with EEU45 + 40µm microsparger.</i>	150
Table 43. <i>K_La values obtained with experiments or with the developed model with EED45 + 40µm microsparger.</i>	150
Table 44. <i>K_La values obtained with experiments or with the developed model with Rushton Turbine + 1000µm sparger.</i>	151
Tableau 45. <i>Données physico-chimiques à entrer (en jaune) dans le tableur d'extrapolation au début du procédé d'extrapolation et données calculées (en blanc).</i>	157
Tableau 46. <i>Données d'entrée (jaune) des caractéristiques géométriques et d'agitation / aération et les grandeurs calculées (blanc).</i>	158
Tableau 47. <i>Extrapolation avec similitude géométrique en fixant un paramètre entre les échelles (en vert).</i>	159

Tableau 48. <i>Extrapolation avec similitude géométrique entre un fermenteur de 1.5L et un fermenteur de 900L pour différents critères constants avec un rapport d'échelle, F, égal à 7.37.</i>	160
Tableau 49. <i>Extrapolation sans similitude géométrique entre un fermenteur de 1.5L (à 600RPM) et un fermenteur de 900L (à 200RPM). Seuls les diamètres de cuve et d'agitateur ont été changés.</i>	162
Tableau 50. <i>Caractéristiques des mobiles d'agitations aux échelles laboratoire et échelle pilote.</i>	163
Table 51. <i>Three systems studied</i>	169
Table 52. <i>Impellers characteristics for 900Liters bioreactor.</i>	169
Table 53. <i>List of dimensionless numbers.</i>	170
Table 54. <i>Stirring speed determination with K_La and superficial gas velocity (V_g) constants (0,0002 m/s)</i>	174
Table 55. <i>Airflow rate with K_La and stirring speed constants(2,4 m/s)</i>	175
Table 56. <i>Constant a, b and c values for K_La prediction at pilot-scale (900L) for different stirring and aeration modes.</i>	177
Table 57. <i>Results comparison between lab-scale and pilot-scale for <i>S. carnosus</i> (dry matter measurements) and <i>P. candidum</i> (spore population) and for different stirring systems.</i>	178
Tableau 58. <i>Valeurs des constantes a, b et c pour la prédiction du K_La à l'échelle du fermenteur de 900L en fonction de différents modes d'agitation et d'aération.</i>	182
Tableau 59. <i>Valeurs de K_La pour des valeurs de vitesse d'agitation et d'aération précises à l'échelle 900L.</i>	183
Tableau 60. <i>Dimensions des fermenteurs aux échelles pilote et industrielle.</i>	184
Tableau 61. <i>Données d'entrée (jaune) des caractéristiques géométriques et d'agitation / aération et les grandeurs calculées (blanc).</i>	185
Tableau 62. <i>Extrapolation sans similitude géométrique entre un fermenteur de 900L (à 200RPM) et un fermenteur de 10m³ (à 200RPM). Seuls les diamètres de cuve et d'agitateur ont été changés.</i>	186
Tableau 63. <i>Extrapolation entre échelles pilote et industrielle à K_La constant et à vitesse superficielle de gaz ou vitesse en bout de pales constantes.</i>	187
Tableau 64. <i>Conditions d'extrapolation pour un KLa et une vitesse superficielle de gaz constante.</i> .	187
Tableau 65. <i>Caractéristiques des mobiles d'agitation aux échelles pilote et industrielle.</i>	188
Tableau 66. <i>Valeurs d'extrapolation à K_La et vitesse superficielle de gaz ou vitesse en bout de pale constante pour une extrapolation sans similitude géométrique entre un fermenteur de 2L (à 600RPM) et un fermenteur de 600L.</i>	212
Tableau 67. <i>Limites du modèle suivant les spécifications du moteur d'agitation (limité à 300RPM maximum) et correspondances de vitesses d'agitation entre les échelles.</i>	214
Tableau 68. <i>Limites du modèle suivant les spécifications du compresseur d'air (0.15 vvm maximum) et correspondances des débits d'air entre les échelles.</i>	214

Liste des Annexes

Annexe 1. <i>Mesure de l'azote soluble par la méthode BCA.</i>	202
Annexe 2. <i>Méthode de mesure de la nitrate réductase.</i>	205
Annexe 3. <i>K_La en fonction de la vitesse d'agitation à l'échelle fermenteur 2L.</i>	208
Annexe 4. <i>K_La en fonction du débit d'air à l'échelle fermenteur 2L.</i>	208
Annexe 5. <i>Définir et fixer des critères</i>	209

Table des matières

GLOSSAIRE	18
ABREVIATIONS	18
NOMENCLATURE	18
INTRODUCTION ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	20
1. <i>Démarche utilisée</i>	22
2. <i>Structure du document</i>	23
CHAPITRE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	25
1.1. <i>Etude de l'influence des substrats et des conditions opératoires sur la croissance et la production des spores de Penicillium candidum en milieu liquide (review)</i>	25
1.2. <i>Présentation des différentes techniques d'extrapolation des bioréacteurs</i>	50
1.2.1. Extrapolation géométrique.....	52
1.2.2. Extrapolation non géométrique	55
1.2.2.1. Changement d'échelle basé sur l'agitation	56
1.2.2.2. Changement d'échelle basé sur l'aération	57
1.2.2.3. Conclusion et limites du changement d'échelle.....	60
CHAPITRE 2 : MATÉRIELS ET MÉTHODES.....	62
2.1. <i>Matériels</i>	62
2.1.1. Souches étudiées.....	62
2.1.2. Milieux de culture.....	62
2.1.2.1. Pour le champignon filamenteux	62
Cultures en boîte de Roux	62
Cultures en Erlenmeyer	63
Cultures en fermenteurs	64
2.1.2.2. Pour la levure	65
Cultures en Erlenmeyer	65
Cultures en fermenteurs	66
2.1.2.3. Pour la bactérie.....	67
Cultures en Erlenmeyer	67
Cultures en fermenteurs	67
2.1.3. Fermenteurs utilisés	68
2.1.3.1. Erlenmeyers	68
2.1.3.2. Fermenteur de 2L.....	68
2.1.3.3. Fermenteur de 900L.....	71

2.1.4.	Systèmes d'agitation	72
2.1.4.1.	Fermenteur 2L.....	72
2.1.4.1.1.	Turbines Rushton (RT)	72
2.1.4.1.2.	Oreilles d'éléphant	73
2.1.4.1.3.	Cell-lift	73
2.1.4.2.	Fermenteur de 900L.....	75
2.1.4.3.1.	Turbine centripète.....	75
2.1.4.3.2.	Rushton + 2 x HTPG4	75
2.1.4.3.3.	Oreilles d'éléphant	76
2.1.5.	Systèmes d'aération	77
2.1.5.3.	En surface.....	77
2.1.5.4.	Sparger classique.....	77
2.1.5.5.	Microspargers 40µm et 20µm	78
2.1.6.	La concentration par centrifugation	79
2.1.6.1.	En laboratoire.....	79
2.1.6.2.	A l'échelle semi-industrielle	79
2.1.7.	La concentration par lyophilisation	80
2.2.	Méthodes	80
2.2.1.	Technique de mesure des substrats par HPLC.....	80
2.2.2.	Mesure de l'azote soluble : méthode BCA.....	81
2.2.3.	Développement d'une méthode de mesure d'une activité enzymatique produite par la bactérie	82
2.2.4.	Méthode de numération des cellules	82
2.2.4.1.	Mesure de la matière sèche	83
2.2.4.1.1.	Pour le champignon.....	83
2.2.4.1.2.	Pour la bactérie et la levure.....	83
2.2.4.2.	Cellule de Malassez/Thoma	84
2.2.4.3.	Dénombrement des cellules sur milieu solide : boîte de Pétri.....	85
2.2.4.3.1.	Pour le champignon et la levure.....	85
2.2.4.3.2.	Pour la bactérie	85
2.2.5.	Définition des calculs.....	86
2.2.5.1.	Calcul des grandeurs de fermentation	86
2.2.5.2.	Mesure du coefficient de transfert d'oxygène ($K_L a$).....	86
2.2.5.3.	Calcul d'OUR / CPR / QR.....	88
2.2.5.4.	Calcul de la puissance dissipée par mesure du couple.....	89
2.2.5.5.	Calcul des principales grandeurs d'extrapolation	90
CHAPITRE 3 : ETUDE PRELIMINAIRE : CINETIQUE ET CARACTERISATION DE LA PERFORMANCE DE 2 SOUCHES (LEVURE, BACTERIE) A L'ECHELLE D'UN FERMENTEUR DE 2L		93
3.1.	<i>Cas de la production de levure : D. hansenii.</i>	93
3.2.	<i>Cas de la culture de bactérie : S. carnosus.</i>	95

3.2.1. Etude de l'effet des concentrations en oxygène dans le milieu de culture sur la croissance et sur l'activité enzymatique de la souche bactérienne.	96
3.2.2. Développement d'un milieu adapté pour compenser la baisse de l'activité enzymatique	98
Conclusion.....	101
CHAPITRE 4 : MISE AU POINT D'UN PROCEDE DE PRODUCTION DE SPORES EN MILIEU LIQUIDE...102	
4.1. <i>La culture de champignon filamenteux en batch</i>	102
4.1.1. Choix du milieu de culture pour la production de spores par <i>P. candidum</i>	102
4.1.2. Courbes cinétiques types de la croissance de <i>P. candidum</i>	103
4.1.3. Effets de l'eau sur la croissance et la sporulation	104
4.1.4. Effets de la température sur la croissance et la sporulation	106
4.1.5. Effets de l'oxygène dissous sur la croissance et la sporulation	106
4.1.6. Effets du pH sur la croissance et la sporulation.....	107
4.2. <i>La culture de champignon filamenteux en fed-batch</i>	109
CHAPITRE 5 : CARACTERISATION HYDRODYNAMIQUE DU FERMENTEUR DE 2L.....113	
5.1. <i>Influence du type d'agitation et d'aération sur le nombre de puissance et sur l'engorgement d'un mobile d'agitation l'échelle laboratoire (PUBLICATION Np)</i>	113
5.2. <i>Influence du type d'agitation et d'aération sur le transfert d'oxygène à l'échelle laboratoire dans le but d'effectuer une extrapolation (PUBLICATION K_La)</i>	136
CHAPITRE 6 : EXTRAPOLATION ET VALIDATION SUR 900L156	
6.1. <i>Développement d'un outil d'extrapolation géométrique et non géométrique : Application au dimensionnement du nouveau mobile d'agitation</i>	156
6.2. <i>Extrapolation de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote d'un nouveau procédé et comparaison avec des procédés déjà existants (PUBLICATION EXTRAPOLATION)</i>	164
CHAPITRE 7 : EXTRAPOLATION SUR 10 000L182	
7.1. <i>Développement d'un modèle de prédiction du K_La sur fermenteur de 900L en fonction du type d'agitateur et du type d'aérateur et mesure de la capacité de transfert maximale en oxygène</i>	182
7.2. <i>Extrapolation des résultats à l'échelle de 10 m³ : Calcul des dimensions (hauteur, diamètre, épaisseur, etc.) et du nombre de turbines d'agitation et du choix du module d'aération</i>	184
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....190	
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....193	
ANNEXES.....202	

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....217

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie tout d'abord tous ceux qui ont contribué de près ou de loin au bon déroulement de ce travail.

Je commencerai par remercier Monsieur **Mohamed GHOUL**, professeur à INPL pour son encadrement, son soutien tout au long de ma thèse et aussi pour m'avoir donné toute l'autonomie nécessaire pour mener à bien ce projet. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour sa confiance, son dynamisme et son enthousiasme. Je lui exprime ma vive reconnaissance et je lui dédie également ce travail.

Ce travail a été financé par la société **DSM Food Specialties Cultures SAS** dans le cadre d'une convention CIFRE. Je remercie très chaleureusement Monsieur **David THOMASSEY** (Manager R&D, équipe bioprocédés chez DSM) de m'avoir conseillé et fait confiance dès le début de la création de mon projet de thèse ainsi que tout au long de mon projet de thèse. Je souhaiterais remercier aussi grandement Monsieur **Lilian LABUSSIÈRE** d'avoir su reprendre les responsabilités de Monsieur THOMASSEY après son départ. J'adresse également mes chaleureux remerciements au personnel de l'entreprise : **Sylvain GOURDAUT** et **Dan GOURSAT** (mes deux mentors et gardes du corps du PG900), **Cyril CAUDRILLIER**, **Martin MUELLER**, **Danièle BOURRY**, **Gautier DUBOIS**, **Ludovic DELLIS** et **Claude BUCHET** qui ont contribué, chacun à leur façon et toujours dans la bonne humeur, au bon déroulement de cette étude.

Je souhaite remercier l'**Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT)** d'avoir accepté de financer ce travail de thèse. Je remercie vivement les membres de mon Jury. Leurs suggestions et remarques contribueront à l'amélioration de la version finale de ce mémoire. Je remercie Monsieur **Stéphane GILLOUET**, Professeur à l'INSA de Toulouse, Monsieur **Ridha MOSRATI**, Professeur à l'université de Caen (UNICAEN) qui ont assuré la fonction de rapporteurs en apportant une analyse détaillée du manuscrit. Je remercie également Monsieur **Jean-Marc ENGASSER**, professeur à l'université de Lorraine, qui m'a honoré en acceptant de se présenter comme examinateur.

Je remercie les doctorants du LIBio (et déjà docteurs pour certains) : **Christelle BIDOUIL**, **Florent FERRARI**, **Charlotte JACQUOT**, **Nidal MADAD**, **Hind CHAABAN**, **Manel SLIMANE** et tout le personnel du LIBio notamment messieurs **Jordane JASNIEWSKI** (Docteur Jazz, co-directeur virtuel), **Florentin MICHAUX** (Docteur Mich') et plus récemment **Frédéric BORGES** (Gayenne); avec qui j'ai passé des moments agréables au cours de ces années autant au RU (avec notre chère Nicole) qu'au sein des laboratoires du LIBio. La plus disponible durant mon projet : **Céline**

CHARBONNEL qui a su être patiente particulièrement au début de ma formation et présente tout au long de ma thèse. J'ai vécu au sein du laboratoire une expérience très enrichissante aussi bien sur le plan professionnel que sur le plan humain. Merci à vous qui êtes présents aujourd'hui et qui l'avez toujours été durant ces presque quatre années. Vous m'avez accompagné pendant mes moments de remise en cause, de questionnement, de doutes. J'espère être arrivé à faire la même chose pour vous en retour (au moins avec mon humour dévastateur).

De nombreuses personnes ont gravité autour de ce projet et personnellement et m'ont fait bénéficier de leur expérience. Je pense plus particulièrement à Monsieur **Jean-Paul Moulin**, assistant ingénieur au Laboratoire Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (LCPME), que je remercie pour son montage de microsparger pour notre pilote de 900L.

Plus personnellement, un très grand merci à tous mes amis, et surtout à mon sculpteur capillaire préféré : **Anthony** (Moulinex) ; et mon Hollandais **Nils** (Nitch) ainsi que leur famille mais aussi à mes amis d'enfance de la Team Goods : **Thibaut** (Tigro), **Rémi** (Bernouse), **Jean-Marie** (Jean-Marize), **Benjamin** (Bridé) et **Clément** (Momone ou GS).

Merci à tous mes amis de la plongée sous marine de tous les clubs que j'ai pu côtoyer (Les Poissons Volants, le Nancy Sports Subaquatiques, Le Cincle plongeur et le club de plongée universitaire), je pense aux deux personnes qui m'ont le plus appris dans ces activités : **Christophe BEAUBRAS**, un modèle de pédagogie et des connaissances illimitées en plongée et à **Alexis DENIS** son équivalent en apnée. Merci à tous mes amis de la Base Aérienne 133 de Ochev : **JP Longo**, **Mouss'**, **Balsa**, **Balloon**, **Patoo**, **Cobra**, **Fred**, *etc.*

Un grand merci à toi, **Joana**, d'être là tous les jours pour moi. Merci de t'occuper aussi bien de moi.

Je remercie ma mère **Solange** et mes deux sœurs **Elodie** et **Caroline**, pour leur gentillesse et leur soutien. Je remercie enfin mon père **Gilbert** sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu, tu m'as donné le goût des Sciences et de la Microbiologie. Vous m'avez donné le goût du travail, la capacité de se remettre en cause et de toujours faire face aux difficultés.

MERCI à vous tous pour tout cela et pour tout le reste.

Glossaire

Abréviations

ANRT	Association Nationale de la R echerche et de la T echnologie
CIFRE	Convention Industrielle de F ormation par la R Echerche
CPR	Carbon dioxide P roduction R ate / Vitesse de production de dioxyde de carbone
ENSAIA	Ecole Nationale Supérieure d'Agonomie et des Industries A limentaires
INPL	Institut National P olytechnique de L orraine
LFSJ	L a F erté- S ous- J ouarre
OUR	O xygen U ptake R ate / Vitesse de consommation de l'oxygène

Nomenclature

C	Distance entre les pales d'agitation, mm
C₁	Distance entre le bas du fermenteur et l'agitateur le plus bas, mm
C_s	Distance entre l'agitateur le plus haut et la surface du liquide, mm
g	Accélération gravitationnelle, 9.807 m/s ²
N_I	Nombre d'agitateurs sur l'axe d'agitation
v_g	Vitesse superficielle d'air diffusé à travers le sparger, m/s
D_I	Diamètre de l'agitateur, m
D_T	Diamètre du réacteur, m
EEU45	Oreilles d'éléphant pompage vers le haut 45° d'angle d'attaque (oreilles d'éléphant)
EED25	Oreilles d'éléphant pompage vers le bas 25° d'angle d'attaque (oreilles d'éléphant)
H_I	Hauteur de l'agitateur, m
H_L	Hauteur de liquide dans le réacteur
H_T	Hauteur du réacteur, m
ITS	Vitesse en bout de pale, m/s
F_I	Nombre d'aération
K_La	Coefficient de transfert d'oxygène, hr ⁻¹
N	Vitesse d'agitation, RPS ou RPM (tours par seconde ou tours par minute)
N_p	Nombre de puissance

N_{Fr}	Nombre de Froude
P	Puissance dissipée, kW
P₀	Puissance dissipée sans gaz, kW
P_g	Puissance dissipée avec gaz, kW
RT	Rushton Turbine (Turbine Rushton)
Q	Débit d'aération, m ³ /s
Q_{vvm}	Débit d'aération, Volume de gaz/volume de milieu/min
V_T	Volume total du réacteur
W	Largeur des chicanes, m
ρ	Masse volumique, kg/m ³
μ	Viscosité, MPa.s
μ_a	Viscosité apparente, MPa.s
Re	Nombre de Reynolds
τ	Couple (N.m)
τ₀	Couple fermenteur à vide (N.m)
σ	Tension de surface
We	Nombre de Weber

Introduction et objectifs de l'étude

Le site de la société DSM France de La Ferté-sous-Jouarre (LFSJ) produit des ferments d'aromatization pour la fabrication de produits laitiers, de produits carnés et pour la malterie. Elle dispose sur ce site de plusieurs fermenteurs de 10m³ et met en œuvre différents types de microorganismes (bactéries, levures, champignons). Ce sont des installations polyvalentes qui ont pour but de pouvoir s'adapter aux micro-organismes produits par la société sur le site. Ces fermenteurs sont actuellement utilisés uniquement pour les cultures de bactéries et de levures. La culture de champignons sur le site de LFSJ se fait encore sur milieu solide en boîte de Roux, une opération délicate, coûteuse et non optimale. L'ultime objectif de la société DSM est donc d'utiliser ces fermenteurs pour toutes les souches cultivées sur le site y compris le champignon. La réalisation de cet objectif nécessite le développement d'un procédé de production de spores de ce champignon en milieu liquide. Ce qui revient, à identifier les facteurs clefs qui gouvernent les performances de cette culture, à les optimiser, à les extrapoler, à les valider à l'échelle pilote et à l'échelle industrielle.

Le dispositif d'agitation utilisé actuellement sur le site est de type « turbine centripète » avec une aération de surface grâce un vortex formé par ce dispositif. Ce système d'aération est caractérisé par des performances très limitées en termes de transfert d'oxygène et énergivore. Dans la littérature et à l'échelle industrielle, les turbines Rushton sont les plus utilisées pour assurer une bonne homogénéisation du milieu et un bon transfert d'oxygène. Cependant, ces turbines présentent les inconvénients de créer des phénomènes de rétention de gaz sous les pâles de l'agitateur due au mouvement radial caractéristique de ce système et d'exercer des forces de cisaillement élevées non compatibles avec la culture des mycéliums. Ce système est donc non adapté pour permettre d'utiliser les fermenteurs du site de LFSJ pour les trois types de cultures pratiquées. Il ne peut convenir que pour la croissance de levures et de bactéries. Les objectifs de la thèse sont donc :

- Le choix et la caractérisation d'un nouveau système d'agitation permettant d'assurer un transfert d'oxygène le plus élevé possible tout en maintenant les forces de cisaillement les plus faibles possibles et adapté aux cultures de mycélium.

- De développer un procédé de production de spores par des champignons en milieu liquide. Ce qui revient à choisir un milieu approprié, à définir les conditions opératoires adéquates et à extrapoler ce procédé aux échelles pilote et industrielle.
- De valider le mobile d'agitation développé à l'échelle laboratoire pour les trois souches représentant les différents cas rencontrés à l'échelle industrielle. Il s'agit de la culture d'une levure (*Debaryomyces hansenii*), d'une bactérie (*Staphylococcus carnosus*) et d'un champignon (*Penicillium candidum*)
- L'extrapolation du procédé développé à l'échelle pilote et industrielle.

La levure *Debaryomyces hansenii* employée dans cette étude est utilisée comme agent d'affinage et participe à la protéolyse de la pâte du fromage, à la neutralisation de la croûte et à la désacidification des caillés en consommant le lactose et l'acide lactique. Elle permet de neutraliser le pH, ce qui favorise l'implantation des autres moisissures ou bactéries acido-sensibles. Elle peut servir aussi comme agent protecteur contre les contaminations tel que le mucor (texture peau de crapaud sur le fromage).

En ce qui concerne *S. carnosus*, ce sont des coques à Gram positif et catalase positive, immobiles et non sporulés. Parmi les 36 espèces décrites dans le genre *Staphylococcus*, seules les deux espèces : *S. carnosus* et *S. xylosus* appartenant à un groupe des staphylocoques à coagulase négative sont utilisées comme ferment dans la fabrication des produits carnés fermentés. Les *S. carnosus* sont commercialisés comme ferments de maturation dans l'élaboration des saucissons dans lesquels ils participent aux qualités sensorielles. Grâce à leurs propriétés anti-oxydantes, ils limitent également les processus d'oxydation des lipides. Ils dégradent certains acides aminés en composés impliqués dans l'arôme des produits. Via son enzyme : la nitrate réductase, il contribue à une meilleure conservation, une meilleure sécurité sanitaire, de meilleures qualités organoleptiques ((Sondergaard and Stahnke 2002)) et à la formation de la couleur caractéristique des saucissons ((Gotterup, Olsen et al. 2007)) en réduisant les nitrates en nitrites. La nitrate réductase serait une entité biochimique distincte du système respiratoire qui servirait d'accepteur d'électron, possédant la propriété d'activer l'ion NO₃⁻ et de catalyser sa réduction en nitrite ((Pichinoty 1963). Cette enzyme ne serait donc produite uniquement dans le cas où il y aurait une absence d'oxygène afin d'utiliser les nitrates comme source alternative d'accepteur d'élection ((Neubauer and Götz 1996). Il est possible de la trouver fixé à la membrane de la bactérie ou dans le cytosol ((Kraft, Strous et al. 2011)).

Le *Penicillium candidum* (également appelé *camembertii*) quant à lui, est une moisissure blanche particulièrement utilisée à la surface des fromages de type pâtes molles comme par exemple : le Camembert ou le Brie de Meaux, mais aussi sur des pâtes pressées ou pour recouvrir certains produits

carnés comme le saucisson. Le genre *Penicillium* appartient au groupe des ascomycètes. Ce groupe présente deux moyens de reproduction : par reproduction sexuée (ascospore) et par reproduction asexuée à travers une phase végétative. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à ce deuxième type de reproduction.

1. Démarche utilisée

Pour atteindre les objectifs de cette thèse, nous avons utilisé la démarche suivante :

- Etude comparative de différents mobiles d'agitation et de diffuseur d'air :

Nous avons étudiés six mobiles d'agitation : quatre de type « oreilles d'éléphant » (pompage vers le haut ou vers le bas et avec un angle d'attaque de 45° ou de 25°), une turbine Rushton et un mobile type Cell-lift ; et trois diffuseurs de gaz : un sparger classique (percé avec des trous de 1mm), un microsparger de 40µm de porosité et un microsparger de 20µm de porosité. Ces couples agitateur/diffuseur ont été étudiés en termes de nombre de puissance, d'engorgement et de coefficient de transfert d'oxygène (K_{La}) sur des gammes de vitesses d'agitation allant de 200 à 1200RPM et des débits d'air allant de 0 à 1,75vvm. Ces essais ont permis le choix d'un mobile d'agitation et d'un module d'aération adéquats aux spécifications des procédés de production des levures, des bactéries et des champignons.

- Développement d'un procédé de production de spores par les champignons en milieu liquide :

Ces travaux ont débuté par une étude bibliographique approfondie. Ensuite, ils se sont poursuivis par le choix d'un milieu de culture adapté et à une caractérisation de la croissance du micro-organisme et enfin par des expérimentations pour trouver les conditions de température, de pH, de qualité de l'eau et d'oxygène dissous adéquates. Nous avons terminé par une étude préliminaire sur la culture du champignon en mode semi-continu.

- Extrapolation du nouveau procédé à l'échelle pilote :

Grâce aux données obtenues précédemment sur la caractérisation des mobiles, nous avons pu développer des modèles d'extrapolation non géométrique à K_{La} constant afin de désigner le nouveau système d'agitation et d'aération à l'échelle pilote 900L.

- Validation du nouveau procédé :

Le nouveau procédé a été validé et comparé en termes de transfert d'oxygène et de concentration finale en biomasse à deux systèmes d'agitation : une turbine Rushton + deux hélices marines et une turbine centrifète ; et trois types d'aération : un microsparger 20µm, un sparger 1000µm et une

aération de surface. Les nouvelles données ont permis de valider les performances de notre procédé et de réaliser un nouveau modèle de prédiction du K_{La} .

- Extrapolation du procédé à l'échelle industrielle :

Comme pour l'extrapolation à l'échelle pilote, les données de prédiction du K_{La} ont été utilisées pour effectuer une extrapolation non géométrique à K_{La} constant pour un fermenteur de 10m³.

2. Structure du document

Notre mémoire est divisé en sept chapitres :

En chapitre 1, l'étude bibliographique rassemble l'état des connaissances en matière de production de spores en milieu liquide et présente les méthodes d'extrapolation de procédés d'agitation en bioréacteurs. Il vise principalement à positionner notre travail au sein de la communauté scientifique et du génie industriel.

En chapitre 2, l'ensemble du matériel et des méthodes est précisé.

Dans le chapitre 3, nous exposons l'étude des cinétiques de deux souches aérobies (*D. hansenii* et *S. carnosus*) ainsi que l'amélioration de leur production en procédant à des changements de leurs conditions opératoires.

Dans le chapitre 4, après avoir identifié les paramètres intervenants dans la production de spores de champignon, nous établissons un milieu modèle avec des conditions opératoires afin de permettre la production de spores à l'échelle industrielle.

Le chapitre 5 traite la caractérisation de différents mobiles d'agitation et modules d'aération par l'utilisation d'un couplomètre. Cette partie vise à définir leurs caractéristiques en matière de puissance dissipée, d'engorgement de mobile, *etc.* Ce chapitre comporte aussi des essais de mesure de coefficient de transfert d'oxygène à l'échelle de fermenteur de 2L afin de développer une modèle adaptable pour les fermenteurs de la société DSM. Cette partie est composée de deux publications en Anglais : une sur l'influence du mobile d'agitation et du module d'aération sur le nombre de puissance et l'engorgement d'un mobile ; et l'autre sur leur influence sur le coefficient de transfert d'oxygène, K_{La} , et sa prédiction à l'échelle 2L.

Le chapitre 6 vise à établir un modèle d'extrapolation géométrique et non géométrique sous la forme d'un tableur Excel. Nous y exposons l'ensemble des solutions adaptable à l'échelle industrielle pour la société DSM. Cette partie est composée d'une publication en Anglais sur l'utilisation des données de

prédiction du $K_L a$ pour effectuer une extrapolation à l'échelle 900L à $K_L a$ constant. Elle se conclue par les résultats de validation des essais sur le fermenteur de 900L.

Enfin, le chapitre 7 est consacré à l'application du modèle d'extrapolation à l'échelle d'un fermenteur pilote de 900L pour une extrapolation à l'échelle industrielle de 10m³. Cette partie va servir à améliorer la précision du modèle précédent afin de dimensionner la nouvelle installation pour l'échelle industrielle.

Les conclusions et perspectives rassemblent les résultats originaux obtenus dans ce travail et de nouvelles voies de travaux y sont proposées.

Chapitre 1 : Synthèse Bibliographique

Dans ce chapitre, nous allons procéder à un positionnement de nos travaux de recherche par rapport à la communauté scientifique de la microbiologie d'une part, par rapport génie industriel d'autre part. Ce chapitre bibliographique se divise en deux grandes parties qui composent ce rapport de thèse. La première partie concerne la production de spores de champignons filamenteux en milieu liquide. Cette partie a été rédigée en Anglais car elle est publiée dans le journal "Food International Reviews" (Canteri H. and Ghoul M. 2014). Enfin, nous terminerons ce chapitre par la deuxième partie qui concerne l'étude de la méthodologie d'extrapolation.

1.1. Etude de l'influence des substrats et des conditions opératoires sur la croissance et la production des spores de *Penicillium candidum* en milieu liquide (review)

Introduction :

Il existe un nombre important d'articles scientifiques étudiant la croissance des champignons sous formes filamenteuse ou de pelote mais très peu ont abordé les effets de la composition du milieu de fermentation, des conditions opératoires, de l'agitation et des forces de cisaillement sur la croissance et la sporulation de ces champignons.

Cet article est ainsi divisé en trois parties. La première partie de cette étude analyse les effets de la composition du milieu sur la croissance et la sporulation d'un champignon filamenteux. Il en ressort que la composition du milieu de culture est essentielle pour la croissance mais aussi pour la sporulation du champignon. De plus, il semblerait que la sporulation ne soit pas déclenchée par un seul facteur mais par l'association de plusieurs stress (carence en un certain substrat, ajout d'un composé déclencheur, *etc.*) qui entraîneraient un changement métabolique du micro-organisme vers un métabolisme de reproduction sous forme de spores.

La deuxième partie discute les effets des conditions opératoires. Comme pour la composition du milieu de fermentation, les conditions opératoires telles que le pH, la température, l'oxygène et le dioxyde de carbone dissous, le taux d'inoculum ont un rôle primordial dans la production de spores de champignons filamenteux. Chacun de ces paramètres doit être étudié séparément afin d'appliquer le point de consigne le plus adapté à la souche produite mais il faut aussi prendre conscience que ceux-ci peuvent avoir des interactions entre eux.

La troisième partie quant à elle traite des effets de l'agitation et du cisaillement. On y trouve que la rhéologie du milieu de culture d'un champignon peut énormément changer au cours de la fermentation surtout lorsque le champignon croît sous forme filamenteuse. Ce type de croissance implique une possible fragilité aux forces cisaillement. Il est donc nécessaire lorsque un procédé de production de champignon est développé de prendre en compte le système d'agitation / aération afin d'éviter un métabolisme non désiré ou la destruction du micro-organisme durant la culture.

Submerged liquid culture for production of biomass and spores of *Penicillium*

H. Canteri and M. Ghoul

Lorraine University – Laboratoire d'Ingénierie des Biomolécules (LIBio) – 2 Avenue de la Forêt de Haye – TSA 40602 – 54 518 VANDOEUVRE LES NANCY CEDEX, France

Author for correspondence: hugues.canteri@univ-lorraine.fr

ABSTRACT

Mold fungi such as *Penicillium*, as spores or in vegetative states, are widely used in food applications for texturizing, flavoring or to protect foodstuffs. These spores are usually produced on a solid medium in “Roux flasks”. However, to overcome the weaknesses of this process, the use of submerged liquid media has gained in importance over the past years. The aim of this paper is to review the recent progress in the field of production, in submerged liquid culture, of biomass and spores of mold fungi. The effect of the principal factors (medium composition, operating conditions, substrate, oxygen transfer, *etc.*) on the germination, growth and sporulation phases are reported and discussed.

Key words: *pellets, filamentous culture, shear stress, aeration, operating conditions.*

INTRODUCTION

The interest in *Penicillium* production on an industrial scale began during World War II for the synthesis of the antibiotic (penicillin) by *Penicillium notatum*. Nowadays, different species of fungi are cultivated and prepared as either suspensions or in concentrated or lyophilized forms. They are used in cheese and meat ripening (*P.candidum*, *P. nalgiovense*, *P. chrysogenum* and *P. roqueforti*) or in the biosynthesis of biomolecules such as Paxilline by *Penicillium paxilli*^(1,2,3). Unfortunately, some *Penicillium* species are also at the origin of food spoilage and their effect should be minimized to preserve sanitary and food quality⁽⁴⁾.

The main bottleneck in the field of spore production is due to the fact that spores are still, in some industries, produced on an agar medium in “Roux flasks”. This procedure has several weaknesses. It requires a large work force, large controlled (temperature and humidity) incubators, a long time of incubation (3-4 weeks) and incurs a high cost in the renewal of “Roux flasks”. Moreover, it presents high risks of contamination.

In spite of these drawbacks, this mode of culture is still the most widely used. To overcome these disadvantages, spore production in submerged liquid culture is presented as a promising alternative to Roux flasks and has been the subject of several debates of the scientific community in this area^(5,6,7). The submerged liquid culture process consists of growing an organism, most of the time from microbial origin, in a defined liquid medium in a tank called fermentor, which can be aerated and/or agitated. Submerged liquid culture is easier to automate, to scale up and it also needs shorter fermentation times than solid cultures⁽⁸⁾. However, the limiting factor of this process remains the lack of knowledge concerning the factors to be controlled in view of producing spores with quality and quantity at least equivalent to those obtained in solid-substrate fermentation.

To reach similar performances as “Roux flask” culture, a delicate balance between the adequate composition of the medium (carbon, nitrogen, and trace element sources), the operating condition (temperature, pH), and dissolved oxygen and carbon dioxide must be found. Physical factors affecting morphology include fermentor geometry, agitation systems, shear stress rate, rheology, and culture modes (batch, fed-batch or continuous) and these should be judiciously selected. Moreover, cost is an important factor for the large-scale expansion of biomass production and should be minimized.

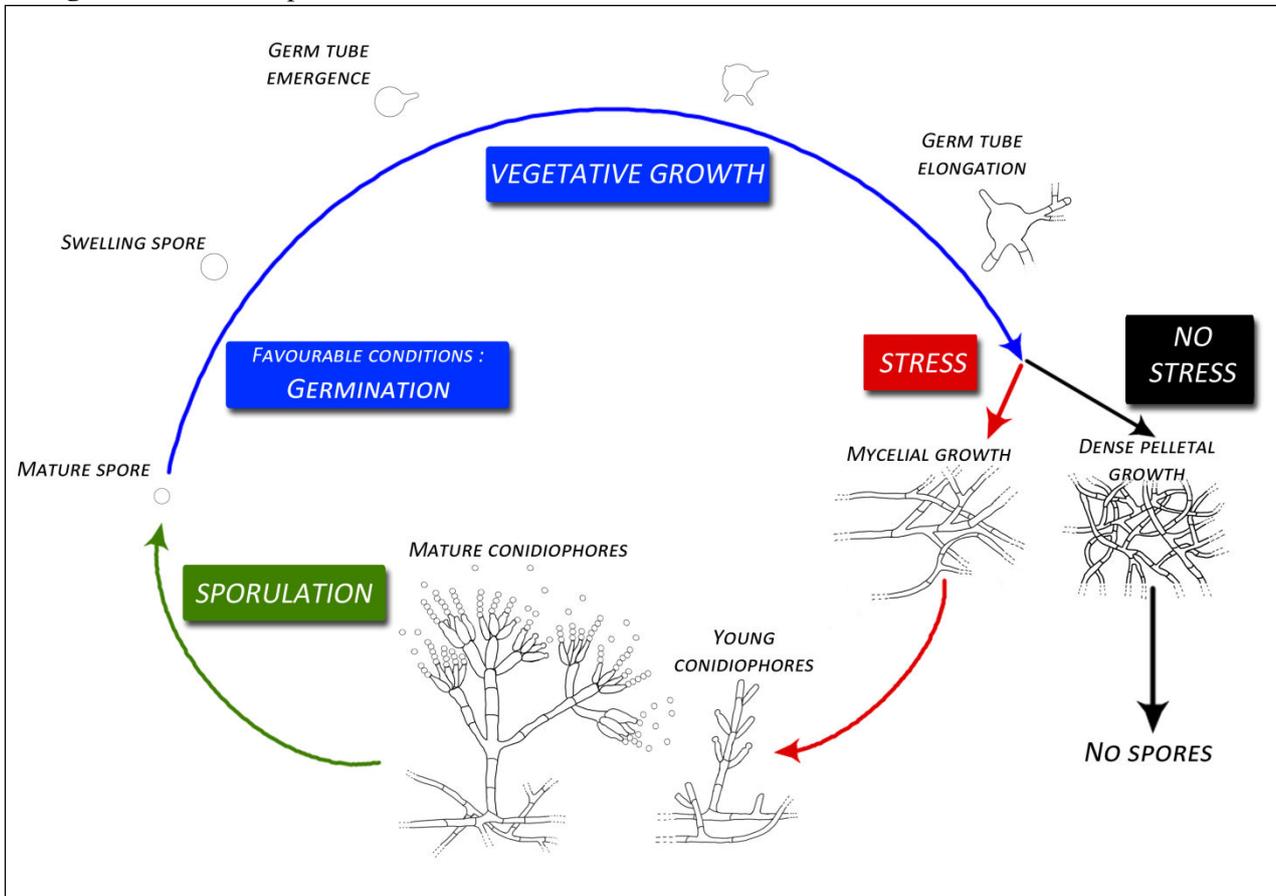
The successful production of a fungal metabolite and spores requires detailed knowledge of the growth characteristics, of the physiology of the fungus in question⁽²⁾, and adequate set points of operating conditions. Each of these three aspects will be presented and discussed in this paper.

THE *PENICILLIUM* GENUS

The genus *Penicillium* belongs to the group of ascomycetes. It can have two different types of reproduction-sexual (ascospore), or asexual reproduction by passing through a vegetative state.

The life cycle of *Penicillium* can be summarized as indicated in figure 1 by four phases^(5,9) : i) the adaptation of spores to the new physicochemical environment (lag phase), ii) the exponential phase corresponding to a significant increase in cell mass (swelling and branching of the spores), iii) the stationary phase resulting from the equilibrium between hyphal mass increase and decrease, and iv) the conidiation or sporulation phase.

Figure 1. Asexual reproduction of *Penicillium*



Spores can be considered as a dormant form, while the mycelium is considered as an active or reproductive form⁽¹⁰⁾. The time and nutrients necessary to provoke spore germination depend on the type of dormancy. Thus, spores can either be ready to germinate, or need a specific period of time to receive a stimulus or release an inhibiting effect. Swelling of the spore is the result of a formation or an accumulation of new active cell material, e.g., mitochondria, endoplasmic reticulum (absorption of water, germ-tube development; and elongation). Therefore, the germination can be characterized as a transformation of a low metabolic activity from the dormant phase to a high metabolic activity by a swelling of the spores and mycelium development.

The basic units of growth in fungi are hyphae. They are linear arrays of cells resembling slender branching filaments. Hyphae can grow in length only at their apical portion. Branching of the hyphae is the process of the creation of new tips. The accumulation of branching and sub-branching gives the mycelium the dense colored “mat” that covers some food products, e.g., cheeses or sausages⁽¹¹⁾.

Spore germination is dependent on several factors including the presence of essential nutrients, the availability of enzymes involved in the respiratory pathway, favorable environmental conditions to

enable metabolic activity to proceed, and innate spore regulatory mechanisms⁽¹²⁾. Dormancy can also be broken by an activation process such as heat, osmotic and pH shock, or by chemical treatment. Whatever the method of initiation, three basic structural changes during germination can be observed by microscopic investigation: spore swelling, germ tube emergence, and germ tube elongation⁽¹³⁾.

Morphological growth behavior is an important parameter in bioprocess design for filamentous fungi⁽¹⁴⁾. In general, the hyphae of *Penicillium candidum* measure a few tens of micrometers in length and a few micrometers in diameter. Its morphology can be characterized by different criteria such as the number of hyphae, the number of hyphal tips per hypha (branching frequency), their length and diameter, the number of conidiophores per hypha, hyphal flexibility, and hyphal-hyphal interactions⁽¹⁵⁾.

The control of mycelial morphology in fermentation is often a prerequisite to succeed in spore production at industrial level. In fact, a dispersed mycelial growth is at the origin of the increase of viscosity and thus a reduction in the efficiency of mixing and the oxygen supply.

The change in the morphology of fungi depends on the operating conditions in the bioreactor, which affects rheological properties, productivity and energy consumption. In fungal submerged cultivations, mycelial or pelletal forms can be obtained depending on the environmental and operating conditions^(16,17). The “pellet” form results from the aggregation of cells. They can be classified as stable spherical or oval agglomerates^(1, 10, 17). Depending on their structure they can be fluffy loose pellets, compact pellets, or hollow smooth pellets (which are a hybrid between the first two types of pellets).

In the case of compact pellets, the density varies over the radial coordinates, and therefore the transfer of oxygen and other nutrients becomes a limiting step, which provokes an autolysis of the core of the pellet (hollow pellet)^(18, 19). Thus, the proportion of the metabolically active biomass is restricted to the outer zone of less dense mycelium. This mass transport in fungal pellets is directly proportional to the porosity of the pellet, so that the flow can be considered as laminar inside the pellet^(20,21). On the other hand, a filamentous form of growth leads to the formation of a biofilm on the wall surface of the reactor, wraps itself around the impellers and fouls the agitator blades or blocks the gas distributors.

The pelleted growth is preferred and widely used in industry such as for citric acid production by *A. niger* or cellulolytic enzymes of *T. reesei*, while, for food application such as in cheese production, the filamentous form is preferred for spore production by *Penicillium species*.

Pellet formation occurs either by coagulating or by non coagulating mechanisms. In the coagulating process, the aggregation of spores takes place at the early stages of the fermentation and the pellets

result from the germination of only a fraction of the aggregated spores. In the non coagulating process, pellets are generated from individual spores by the aggregation of the formed mycelia^(10, 21).

More than 150 species of fungi were classified according to their ability to form pellets or not. *Penicillium* is one of those that can grow as pellets or in mycelial form depending on various major factors^(2, 15, 16). These factors can be classified as:

- Genetic factors and the ability to produce biofloculants
- Intensity of shear stress and shear rate (agitation)
- Composition of the medium (carbon, nitrogen and trace elements)
- Temperature, pH, dissolved oxygen and carbon dioxide
- Presence or not of surface-active agent or chelators
- Inoculum rate

Taking into account the high number of factors affecting the physiology of filamentous fungi, the control of the bioprocess to reach a desired goal (pellets or vegetative form) is not easy, so a judicious compromise among the different factors is needed. Moreover, the rheological behavior of the cultivation broth is influenced by the size of the pellets, biomass concentration, and the agitation rate, which contribute to the variation of the transfer rate of nutrients and heat.

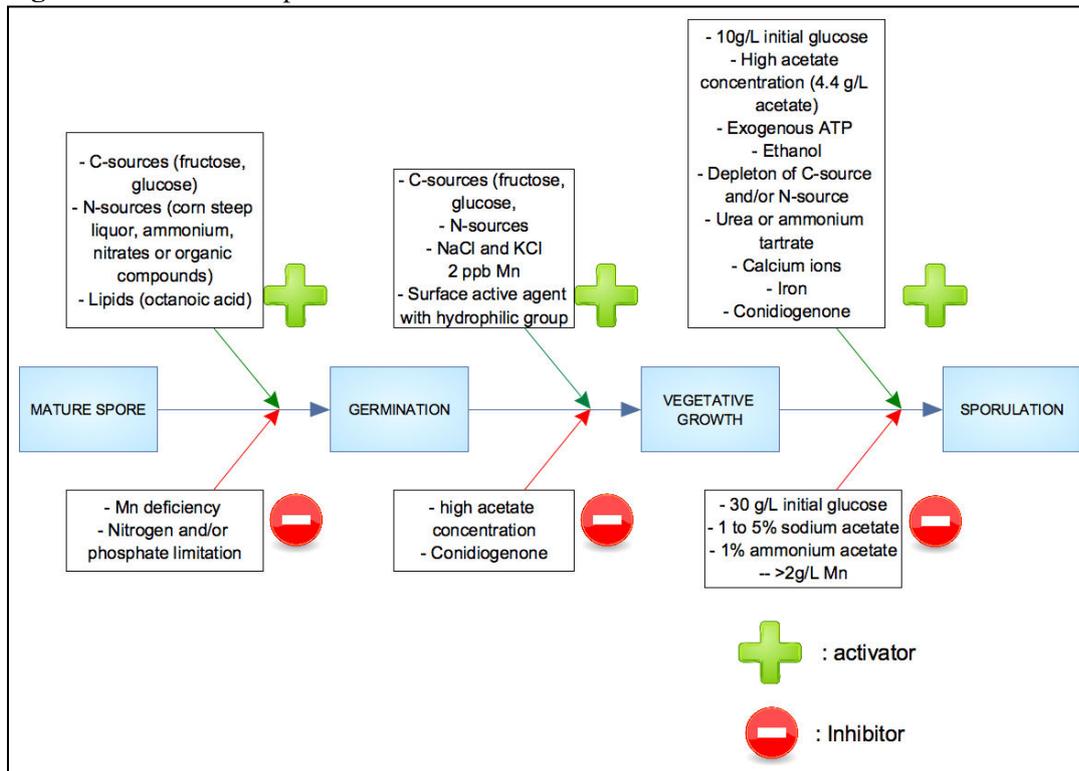
The remainder of this article is organized into three main sections. The first part reviews the medium composition effects. The second outlines the effects of the operating conditions in the bioreactor and the third focuses on the study of mixing and shear stress, which are critical for fungal growth and morphology.

GROWING AND SPORULATION FACTORS

1. Medium composition

The initiation of the spore germination leading to mycelium growth and then the production of spores is due either to a change in nutrient composition or to a limitation by one of the main substrates. For some fungi, germination is induced by a change in the temperature, pH, or osmotic pressure. The main effects of the medium composition on the transition between the three steps (germination, vegetative growth and sporulation) of the liquid submerged culture are summarized in figure 2. As for every living organism, activation or inhibition effects can be seen depending on the components added to the medium.

Figure 2. Medium composition effects



At least 13 elements are essential for growth, namely oxygen, carbon, hydrogen, nitrogen, phosphorus, potassium, sulphur, magnesium, manganese, iron, zinc, copper, and molybdenum⁽²⁾. The first eight are needed in relatively large quantities (macronutrients), while the latter five are only required in small amounts (micronutrients).

1.1 C-sources

Like all fungi, filamentous fungi are heterotrophic. This means that they require organic compounds as sources of carbon and energy⁽²⁾. Polysaccharides, amino acids, lipids, organic acids, proteins, alcohols and hydrocarbons are used as carbon sources. However, D-glucose, D-fructose, sucrose, molasses, and corn steep liquor are the preferred C-sources for *Penicillium* fermentation. Complex media with high salt concentrations seem to give the best sporulation indices but no explanations were found about the usefulness of these concentrations in the medium for better sporulation⁽²²⁾.

Both the type and the concentration of the carbon source play a major role in the evolution and the performance of fermentation since they affect the growth kinetics, the rate of production and the final yield. The initial glucose concentration clearly affects the length of filaments, so it seems that there is a link between specific growth rate and branching frequency⁽²³⁾. Spore production rate is higher with an initial glucose concentration of 10 g/L instead of 30 g/L⁽²⁴⁾. Thus, it seems that high glucose concentration favors growth (vegetative form), while a low concentration increases spore formation. This behavior was observed with several species, particularly with *P. candidum*.

Vézina *et al.*⁽²²⁾ found that the addition of 1 to 5% of sodium acetate almost completely inhibited sporulation, whereas ammonium acetate had no effect at 0.2% but was completely inhibitory at 1%. High acetate concentrations inhibited mycelial growth and favored the branching of mycelium and conidiation⁽²⁴⁾. Without acetate in the growth medium, nearly all hyphal tips were differentiated to conidiophores but branching was very low. Above 4.4 g/L of acetate, no further improvements of spore counts and sporulation indices were observed. Sporulation index (spore counts/mL in millions divided by dry weight in g/L) depends on the acetate form. It is higher with ammonium acetate than with ammonium chloride. The substitution of ammonium sulphate by urea or ammonium tartrate in a defined medium provoked high sporulation⁽²⁵⁾. These data clearly indicate that the acetate plays a major role in spore formation but the concentration must be adjusted at low level (<1 g/l). Some authors suggest feeding continuously with glucose to prolong the sporulation phase.

The addition of exogenous ATP is advised for stimulating sporulation⁽²⁶⁾. In fact, it can increase the stimulation of sporulation by one-third. The addition of ethanol can also increase this stimulatory effect by one-third more than with D-glucose in certain cases.

Carbon sources also have a strong influence on pH. Generally, good carbon sources such as glucose and fructose give a high acid production. This production is due to the fact that glucose oxidase is released into the medium and converts the glucose to gluconate leading to a strong and rapid acidification of the medium⁽²⁷⁾. This observation indicates that the effect of the glucose can be attributed to each central role as a carbon source but also to its effect on the environment of the growth of the fungus.

1.2 N-sources

The most frequently used nitrogen sources are ammonium, nitrates or organic compounds, such as amino acids or proteins. The omission of nitrogen in the medium greatly affects fungal growth and metabolite production⁽²⁾.

Corn steep liquor as the nitrogen source hinders pellet formation⁽²¹⁾, while a nitrogen-limited medium induces mycelial pellet formation⁽¹⁰⁾. In contrast, one of the most important sporulation factors is nutritional deficiency,^(28, 29) *e.g.*, depletion of N-source (and also C-source). Nitrogen limitation is the main sporulation trigger^(10, 22). In certain conditions, depriving the fungi of nitrogen can induce sporulation and this sporulation can be reversed completely by adding a fresh supply of nitrogen in the early stages of the process⁽³⁰⁾. So, nitrogen is needed to favor the growth step but it will be reduced at a low level to provoke sporulation. This finding was confirmed in unpublished work (confidential results) on *P. candidum* by monitoring nitrogen consumption and spore production. Thus, the observations showed that when nitrogen is completely depleted from the medium, spore production is

triggered, but conversely the addition of nitrogen provokes the stopping of sporulation and the resumption of vegetative growth.

1.3 Fatty acids

Penicillium strains need a C-source (sugars...) and an N-source (amino-acids...) but they can also use lipids as a substrate⁽²⁶⁾. The fungal spores may require the simultaneous utilization of lipids and carbohydrates for the initiation of germination. In the early germination period there is, firstly, a synthesis of polar lipids (unsaturated) followed by a decrease in the second stage⁽³¹⁾. The synthesis of unsaturated fatty acids reflects the *de novo* synthesis of palmitic acid and stearic acids from acetate and / or the absorption of fatty acids from the culture medium. Indeed, the fungal spore has the ability to oxidize octanoic acid. It constitutes an indicator of ATP production via acetyl-coA and the citric acid cycle. The use of D-glucose and octanoic acid (1 mmole/L) was given as the best stimulator of spore formation⁽²⁶⁾.

1.4 Trace elements

High osmolarity has been identified as a major conidiation stimulus in *Penicillia*^(28, 32, 33). The addition of calcium ions at a concentration of between 10 mM⁽²⁸⁾ and 14.3 mM⁽²⁴⁾ gives the best results in terms of spore counts. Calcium chloride seems to inhibit metabolic activity, since without calcium ions, sporulation cannot occur^(24, 28). The calcium ions must be added at the beginning of the culture to get the best conidiation. Bockelmann *et al.*⁽²⁴⁾ analyzed the effect of different calcium chloride concentration on final spore counts (from 0 mM to 23.8 mM Ca²⁺ ions). They observed that whatever the concentration of CaCl₂ used, the spore number remained unchanged and no sporulation occurred in the total absence of CaCl₂. Moreover, spore number was not affected when the Ca²⁺ was introduced initially or added during the culture⁽²⁶⁾. Other stimulus of sporulation can be found, for example for *P. griseofulvum*, sporulation is caused by the presence of anhydroglucose and traces of calcium ions⁽³⁴⁾. In addition, when distilled water was replaced by tap water, a 10% increase was noticed. However, this increase is variable depending upon of the composition of the tap water⁽²²⁾. Indeed, depending on the water treatment, the composition of water in terms of trace elements can be different according to the location where the fermentation is made.

Mycelial growth was reduced by 40% and 25% in the presence of 200 mM NaCl and KCl, respectively. Sodium ions inhibited the uptake of glucose by inhibiting its catabolism, which appeared to result from a leakage of K⁺ from the mycelium (if there is no catabolism of glucose, there is no mycelial growth, so no sporulation). The inhibition was reversed almost completely by the addition of 10 mM CaCl₂, which reduced the loss of K⁺, Na⁺ and sugar alcohols from the fungus⁽²⁾. Sodium ions also seem to play an important role in the control of conidiation. Indeed, Na²⁺ inhibits fungal

growth⁽²⁸⁾. In fact, an increase of calcium ions in the medium triggers a decrease of intracellular Na²⁺. Consequently, Ca²⁺ does not act as an inducer but rather as a remover of inhibition by sodium ions.

The addition of 500 to 1000 µg per mL of iron to a corn steep water lactose medium lowered pH, and promoted sporulation⁽³⁵⁾. At a higher concentration (2000 µg per mL), a drastic decrease was observed, probably because of the generation of hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$), which are particularly biotoxic⁽²⁹⁾.

Manganese at concentrations higher than 2 ppb favors filamentous growth⁽²¹⁾. Manganese ions are known to be specifically involved in many cellular processes, such as cell wall synthesis and sporulation and secondary metabolites⁽²³⁾. The influence of Mn ions on protein synthesis was considered to be of major importance since cycloheximide, an inhibitor of *de novo* protein synthesis, was found to reverse the effect of manganese addition. The omission of manganese ions from the nutrient medium resulted in abnormal morphological development, characterized by increased spore swelling and squat, bulbous hyphae. Cellular anabolism of *A. Niger* is impaired under manganese deficiency and/or nitrogen and phosphate limitation. Also zinc, copper, heavy metals and alkaline metals have been shown to affect fungal morphology⁽²⁾.

Endogenous factors can also influence the process of sporulation. One of these endogenous factors, a diterpenoid with conidiation inducing activity, is named conidiogenone. This factor can slow down the growth of mycelia but promotes spore production in liquid media. The synthesis of this inducer is enhanced by the presence of calcium ions bound to the external membrane of molds^(29, 36).

1.5 Surface-active agent

The influence of surface-active agents and polymer additives upon the morphology of fungi has been well documented in the literature. The use of an anionic polymer like Carbopol-934 (0.5 kg/m³) provokes a strong change in the morphology of *Aspergillus niger* and leads to less pellet formation. This effect is attributed to the reduction of the electrostatic forces between spores. Cationic polymers were found to have an opposite effect. An additional effect of the surface-active agents is the lower adherence of spores on the wall of shake flask and bioreactors⁽³⁷⁾. The addition of polymers such as alginates favors the formation of pellet with a reduced size. In fact, Suijdam *et al.*⁽³⁷⁾ have observed that the spore/pellet ratio is reduced 20-fold when 0.1% of alginate is added in the medium.

The coagulation can also be dependent on the addition of a surface-active agent, but the choice of this agent is essential⁽³⁸⁾. For example, the use of a surface-active agent with a hydrophilic group (hydroxyl) such as “Spans” decreases agglomerate formation in the culture.

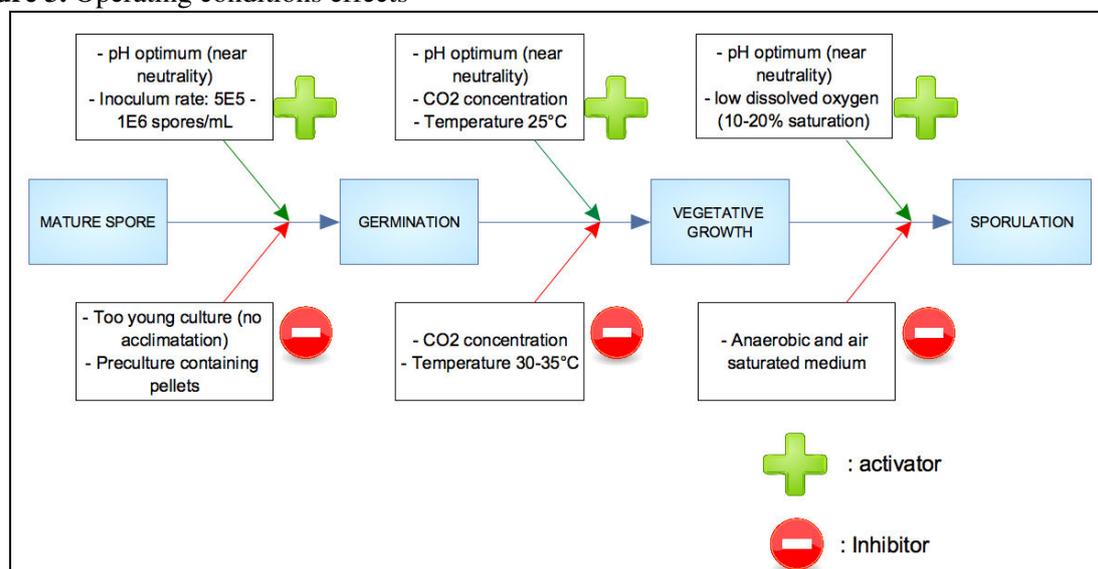
Summary of composition effects: It is difficult to say that sporulation is due to the lack of a particular substrate. What should be taken into consideration is the whole environment of the strain. It appears

that the crucial factors in the medium composition are the concentrations of N-Source, C-source and, some trace elements such as zinc⁽²²⁾ and calcium. These concentrations must be optimized for each strain to promote good mycelial growth and, so to generate enough phialid in order to obtain a good sporulation. There are, unfortunately, no global rules for ideal medium composition for the culture of every strain, an adjustment is always necessary to optimize its culture.

2. Operating conditions

The main operating conditions that affect the behavior of the growth and the germination of fungi are pH, dissolved oxygen, dissolved carbon dioxide, temperature, and inoculation rate. The effects of the operating conditions on the three steps of a liquid submerged culture of fungi are summarized in figure 3.

Figure 3. Operating conditions effects



2.1 pH

pH is a very important environmental factor, although one that it is often neglected. The phenomenon of pellet formation is strongly influenced by the pH level⁽¹⁶⁾. The increase of the pH is an indicator of the end of the dormancy phase.

Conidia fungi can grow over a wide range of pH between 4 and 9, but both growth and sporulation are usually reached near neutral pH. Poorly buffered media containing ammonium salts are likely to become more acidic during growth, while media containing nitrate are likely to become alkaline. High concentrations of ions such as phosphate are required for pH stability and can also influence growth and enzyme activity. Culture pH also affects fungal morphology.⁽³⁹⁾Increasing the pH of steady-state cultures of *P. chrysogenum* above pH6.0 caused a corresponding decrease in hyphal length, which

reached a minimum value at pH 7.0 – 7.4. Wall thickness and the length of the hyphal growth unit were found to be very sensitive to pH changes⁽²⁾.

The pH regulation at a set point of 6.5 is the optimum for *Aspergillus ochraceus* culture whereas pH 5.5 is ideal for *Fusarium moniliforme* culture⁽²²⁾. For *P. chrysogenum*, alkaline pH leads to shorter and thicker hyphae, and therefore to pellet formation. Various authors have reported that the agglomeration between vegetative cells and spores takes place progressively with pH until neutrality, and decreases afterwards^(12, 27, 40). They attributed this behavior to the formation of bridges between cations and protons for pH lower than 7. For pH higher than 7, the concentration of free protons and cations is too low to provoke agglomeration phenomena. Therefore, in order to avoid agglomerations, it is important to avoid neutral pH.

According to unpublished results, pH regulation between 5.6 and 7 does not inhibit the vegetative growth of *P. candidum*. However, it leads to lower spore numbers for pH 5.6 compared to pH 6.5-7. Pitt and Poole⁽²⁶⁾ attributed this behavior to the facility of the integration of Ca²⁺ at cellular levels at pH's near neutrality.

2.2 Dissolved oxygen

Aeration of the culture supplies the oxygen needed for mold growth and at the same time removes waste products such as CO₂⁽⁴¹⁾. The most important factor affecting aeration efficiency is the morphological form of the mycelium. Suspensions of a long filamentous type of mycelium always have a much higher viscosity than short-branched mycelia or pellets, and are therefore more difficult to aerate efficiently⁽⁴²⁾.

Fungi can grow over very wide ranges of oxygen tensions. However, previous investigations on the effect of oxygen near anaerobic conditions are still limited by the low precision of the available sensors. The increase of the respiratory activity is an indicator of the end of the dormancy phase. Industrial production of various metabolites by filamentous fungi is variable depending on the regulation of the dissolved oxygen tension in the medium⁽²⁾. The critical Dissolved Oxygen Tension (DOT) for growth, for product formation and for sporulation must be carefully adjusted for each step.

When fungi grow in pelleted form, they are only partly penetrated by oxygen at air-saturated bulk conditions, resulting in limitations on intra-particle mass transference. Therefore, oxygen can only enter by simple diffusion, so the growing region of the pellet is restricted to a peripheral zone (0.077 mm wide)⁽¹⁶⁾. On the other hand, when fungi grow as free mycelia, they are completely penetrated by oxygen due to a higher diffusivity⁽⁴³⁾. The specific rate of respiration of mycelial pellets was found to decrease significantly with increasing pellet size⁽⁴⁴⁾. It is clear that it is necessary to control the morphological state of the organism first before pointing out agitation and aeration efficiency issues.

Oxygen can have two effects on filamentous fungi growth: oxygen starvation in the case of low oxygenation and oxygen toxicity in the case of a high concentration of oxygen in the medium. Aeration is complex phenomenon because several fermentation pathways are either induced or repressed by the presence of DOT at various levels. Increased partial pressure of oxygen has been shown to affect cell wall composition and the flexibility of hyphae, and an excess of O₂ leads to the damage of enzymes, nucleic acids, or lipids^(2, 45). A higher concentration of dissolved oxygen results in a higher rate of growth, as well as a higher production of glucose oxidase⁽⁴¹⁾.

Low dissolved oxygen (10-20% of the saturation) is preferred to obtain the best sporulation index (spore quantity / biomass ratio)^(24, 28). These studies have also reported that anaerobic and air saturated medium conditions prevent the growth of *Penicillium*. At high DOT, denser pellets were formed, whereas a low DOT led to weak and fluffy pellets⁽²⁰⁾. As with glucose, a high concentration of O₂ leads to the development of the vegetative state without sporulation. For this reason, O₂ transfer must be controlled accurately for good spore production.

The level of oxygen in the media also affects the consistency index (gives an idea of the fluid viscosity)^(10,45). For stationary states (where the microbial growth occurs at constant rates), continuous cultures with DOTs above 10% of saturation lead to an increase of the consistency index with the dilution rate because of the specific growth rate. DOTs below 10% of saturation provoke a significant drop of this index leading to lower viscosity.

The effect of the oxygen concentration on mycelial growth was also reported by Zetelaki and Vas⁽⁴¹⁾. They indicated that the growth of *Aspergillus niger* in the presence of pure oxygen is characterized by lower viscosity (50 %) and higher cell concentration (10 - 15 %) compared to cultures carried out in an air bubbled reactor. Moreover, the microscopic observations indicated that cell walls of mycelia in the aerated culture are thicker with well-defined outlines, while the shape of walls of the non-oxygenated culture is rather faint meaning most likely that cells are less healthy.

2.3 Dissolved carbon dioxide

Carbon dioxide production and uptake significantly affect the activity of microorganisms. However, this effect remains the subject of debate. Some authors reported its stimulatory effects on fungal growth^(2, 46, 47), while other authors^(4, 48, 49) have considered that CO₂ is an inhibitor of fungal growth. The concentration inducing either the inhibition or the stimulation of fungus activity is variable from one author to another.

For filamentous fungi, pronounced effects on both morphology and metabolite formation have been observed at elevated levels of CO₂^(4, 48, 49). Nevertheless, depending on taxonomic and environmental conditions, the opposite behavior was also reported by Nyiri⁽⁴⁸⁾, who observed that the presence of 4-

5% of CO₂ in the air above the liquid culture medium does not influence the respiratory activity of microorganisms.

The effect of CO₂ should be compared for a given pH because the solubility of CO₂ varies considerably with the evolution of the pH. Depending on the pH values, three forms coexist:



In the range of pH 6 to 9, 90 % of CO₂ is in the HCO₃⁻ form.

The optimal conditions for growing should provide a sufficient concentration of gaseous CO₂ in the culture to prevent the solubility at the equilibrium between dissolved bicarbonate and gaseous CO₂. CO₂ fixation by pyruvate carboxylase and phosphoenol pyruvate carboxylase was responsible for biomass yield increases of 23% when the bicarbonate concentration in the culture broth was from 2.5 to 7.0 mM⁽²⁾. Studies with *P. chrysogenum* showed that levels lower than 5% CO₂ in the inlet gas stream had no marked effects on morphology and production⁽⁴⁸⁾.

The effects of dissolved CO₂ levels have also been discussed^(49, 50). Indeed, CO₂ can inhibit growth and product formation in submerged bioprocesses of filamentous fungi. CO₂ can alter membrane properties, specific enzymes, and intracellular pH, but only in certain cases, such as in fungal growth, CO₂ can have a stimulatory effect⁽²⁾. In *P. chrysogenum* between 0 and 8%, it appears that the filamentous growth is predominant, unlike at 15-20% where the appearance is stunted and the hyphae are swollen⁽⁴⁹⁾.

The levels of dissolved CO₂ (dCO₂) may vary significantly according to the scale of operation, and this may be a factor in the difficulties encountered in scale-up and down. Low levels of CO₂ (5%) stimulate biomass accumulation, whereas higher levels of enrichment (10 and 15%) lead to decreased and delayed biomass maxima associated with lengthened lag phases⁽⁴⁶⁾. This lag phase may be due to the synergistic effects of various “stress” factors facing the culture when it is transferred from the shake flask to the fermentor, such as the difference in substrate concentration, aeration/agitation rate and to the high level of dCO₂ present in the vessel. According to the same authors⁽⁴⁶⁾, it is clear that high CO₂ concentration has a significant impact upon the macro-morphology of these cultures because it favors the increase of the total clump area.

A likely factor in the efficacy of CO₂, is the ability to penetrate bacterial membranes causing intracellular pH changes. It is possible that the resultant pH changes might be sufficient to disrupt internal enzymatic equilibria⁽²⁾. Another conclusion⁽⁴⁾ is that the inhibitory action of CO₂ is probably exerted at the level of substrate uptake.

2.4 Temperature

As fungi cannot control their internal temperature, it is governed by the ambient environment. There are very few studies on the effects of temperature on sporulation compared to those on the stages of filamentous and pellet formation.

According to Papagianni⁽²⁾, pellet formation is affected by temperature. Low temperature can induce mycelial pellet formation in fermentation cultures. Studies carried out in a shake flask at constant rotation speed revealed that cell volume and the amounts of various morphological forms were also affected when the temperature was varied between 25 and 35°C. The highest cell volume was obtained at 25°C, where only pellets were observed. At 30°C, the pellets initially formed were progressively transformed into filamentous mycelium. For a higher temperature (35°C), the filamentous mycelium is the dominant form during the culture. The effect of the temperature seemed to be due to its effect on the solubility of oxygen⁽²⁾. This effect is variable depending on the strain studied. In the case of *P. candidum*, unpublished results showed that the spore number was similar in the range of 23 - 27°C and dropped drastically at 30°C.

Li *et al.*⁽⁵¹⁾ showed that the impact of temperature on growth rate and metabolic efficiency can be different. For mold fungus, the highest growth rate and carbon conversion efficiency are reached respectively at 25 °C and 20°C. For the species *Fusarium moniliforme*, sporulation was not affected by temperatures in the range of 25 to 32°C, whereas low temperatures induce mycelial pellet formation⁽¹⁰⁾.

2.5 Inoculum rate

Besides the factors cited above, the quantity and the quality of the inoculum such as its size, age and type can also affect the process^(52, 53). Indeed, the inoculum rate determines the number of tips per mycelium, mycelial length, size of clumps, roughness and compactness of pellets. Low inoculum induces mycelial pellet formation⁽¹⁰⁾. The same authors mentioned that an average inoculum rate for best results seems to be between 5.10⁵ and 1.10⁶ spores / mL. This observation is confirmed in unpublished work. Observations were made that an inoculum under 1.10⁶ spores / mL leads to only vegetative growth without any sporulation. This phenomenon is most likely due to an excess of nutrients. In fact, to initiate the sporulation a substrate starvation is needed.

The age of the culture is also an important factor since the strain needs a certain time to acclimate its metabolic activity to its surrounding environment. This acclimation is crucial for developing the capacity of germinability. Inoculum quality might be greatly improved not only in terms of total concentration of spores in the preparation, but also in terms of their percentage of viability⁽¹³⁾. The importance of a maturation step of the inoculum has been confirmed in unpublished work. In fact,

observations showed that after 5 days of fermentation a great improvement of the ability to germinate and sporulation was reached.

Paul *et al.*⁽¹³⁾ also noted that morphology and productivity are correlated with the spore concentration of inocula. A high concentration of spore inoculum gives filamentous mycelium, while low concentrations produce pellets. Inocula in excess of 10⁶ spores / mL tend to give more dense filamentous growth⁽²²⁾. It seems that at high concentrations, the hyphae interact with each other in the early stages of growth, thereby preventing the development of pellets. In addition, increasing the stirring speed in the case of an agitated bioreactor can compensate for the low level of inoculum by avoiding the agglomeration of spores thus reducing the risk of pellet formation. The inoculation, from a starter culture containing small and dense pellets, into a fresh medium, leads to the formation of pellets for the culture of *Penicillium chrysogenum*, *Aspergillus niger* and *Sporotrichum pulverulentum*⁽³⁷⁾.

An important percentage of inoculum can be lost on the wall of the fermentor during fermentation⁽⁵⁴⁾. In fact, spores can be dispersed into the atmosphere because of the stirring speed. After dispersion, these spores adhere to the wall of the fermentor and do not contribute to inoculation. So, it is crucial to take into consideration this loss during inoculation.

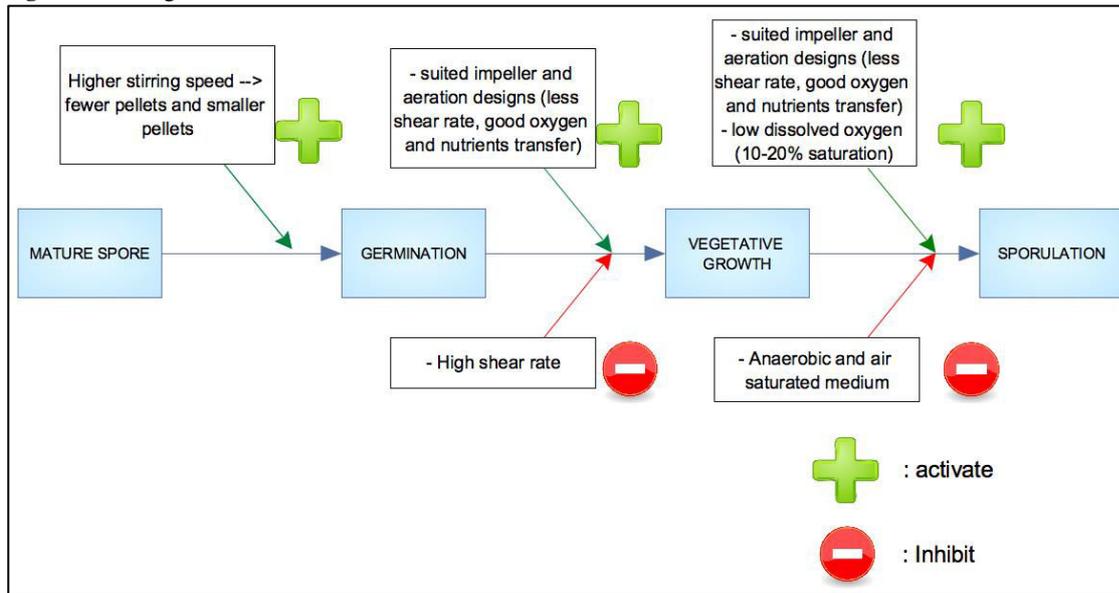
It is clear that a study of the inoculum ratio in shake flasks cannot be reliable for use with industrial scale bioreactors. As is the case with the medium composition, operating conditions can be optimum for sporulation of one organism but not necessarily for another one, even if it is closely related.

Summary of processing effects: As is the case with the medium composition, operating conditions must be taken into consideration very carefully because interactions can occur between the different factors. The main factors must be considered together instead of individually to avoid misleading results.

3. Stirring and shear stress

The aeration efficiency in fermentations with filamentous molds is always higher in stirred bioreactors than in the absence of agitation such as in a “Roux flask”⁽⁴²⁾. High stirring speeds required for a better mass transfer lead to shear stress, which lead to a lower viability and mortality. The effects of stirring and shear stress are summarized in figure 4.

Figure 4. Stirring and shear-stress effects



The rheology of the medium varies during fermentation because of biomass concentration, cell morphology^(55,56), cell surface structure, cell flexibility and deformability, mixing intensity, concentration of substrate and concentration of polymeric product. Mixing involves blending substrates, dispersing air, maintaining suspension of cells, dispersing immiscible liquids and promoting heat transfer^(10, 45). Stirring speed and airflow both have an effect on shear stress, oxygen transfer, pellet formation (morphology changes), and the quality of homogenization (mass-transfer).

Exposure to a high shear rate may not cause instantaneous damage, but damage may occur gradually due to hydrodynamic stresses. This implies that the microorganism has the ability to adapt to a certain level of mechanical stress. These effects may also be dependent on the age of the cell as discussed earlier⁽²⁾.

To characterize the intensity of damage caused by different impellers, the mean total hyphal length and the mean projected area for dispersed and aggregated forms were measured using image analysis. The application of this tool in fungal fermentations was reviewed recently⁽¹³⁾ and appears well adapted to monitoring the morphological and physiological evolution of mycelium under different operating conditions of the fermentation⁽²⁾.

Fermentors, stirrers and aeration design strategies can help to overcome possible limitations in mass, momentum, and heat transfer in fermentors. Shear damage can be decreased using larger impeller to tank diameter ratio with high flow agitators. Using agitators with larger diameters with low power numbers, instead of Rushton turbines, provides better homogenization, heat transfer and air handling capacity, and high power inputs under aerated conditions, giving a more effective mass transfer⁽⁵⁷⁾.

The rheological properties of many fungal fermentation broths appear to be linked to mycelial morphology. Although pelleted fermentation broths may be Newtonian and of low viscosity, problems might arise with the transport of nutrients into pellet cores, thus reducing productivity. The dispersed forms therefore predominate in most industrial fermentations^(2, 55). When fungi grow as free mycelia, a significant increase of apparent viscosity is observed, and this may change the rheological properties into a non-Newtonian media⁽¹⁾. As the concentration of mycelia increases, so does the viscosity of the fermentation mash and, as a consequence, the rate of oxygen absorption decreases^(58, 41).

The number of spores per pellet (pellet size), the structure of the pellet surface and main mean hyphal length are conversely proportional to the power input and the specific energy dissipation rate. As stirring speed becomes more rapid, the pellets become fewer, and the hyphae become smaller^(16, 21, 59, 60). The lower the stirring speed, the lower the shear stress and energy consumption will be⁽¹⁷⁾. Higher agitation intensities appears to cause more fragmentation, which could lead to increased formation of new growing tips⁽⁶¹⁾.

Summary of agitation effects: Agitation and aeration must be more thoroughly observed because they can lead to certain types of willing or unwilling metabolisms or to an uneconomical destruction of the mycelium because of shear stress.

CONCLUSION

The method for spore production under submerged liquid cultures conditions has been discussed in this review. It appears that inoculum size, temperature, pH and aeration-agitation play major roles in inducing sporulation, so they must be carefully adjusted to a specific set point for maximum sporulation⁽²²⁾. Besides the environmental and hydrodynamic factors, the genetic aspect of the strain should also be considered⁽²⁾. In fact, it has been observed that this factor influences the cell wall composition, the surface-active agent synthesis, and controls the composition and the intensity of the slim layer around the spore. The strategy for spore production is summarized in figure 5.

As for all other microorganisms, the scale-up factors must be taken into account for industrial applications which are i) biological and physico-chemical factors such as type and costs of substrates, preparation and inoculation steps (up to 5 at industrial scale), temperature, pH, sterilization, strain stability, kinetics of the each phase (growth and sporulation), ii) hydrodynamic factors such as bioreactor design, hydrostatic pressure, type of stirrer, aeration mode, agitation speed, airflow and viscosity.

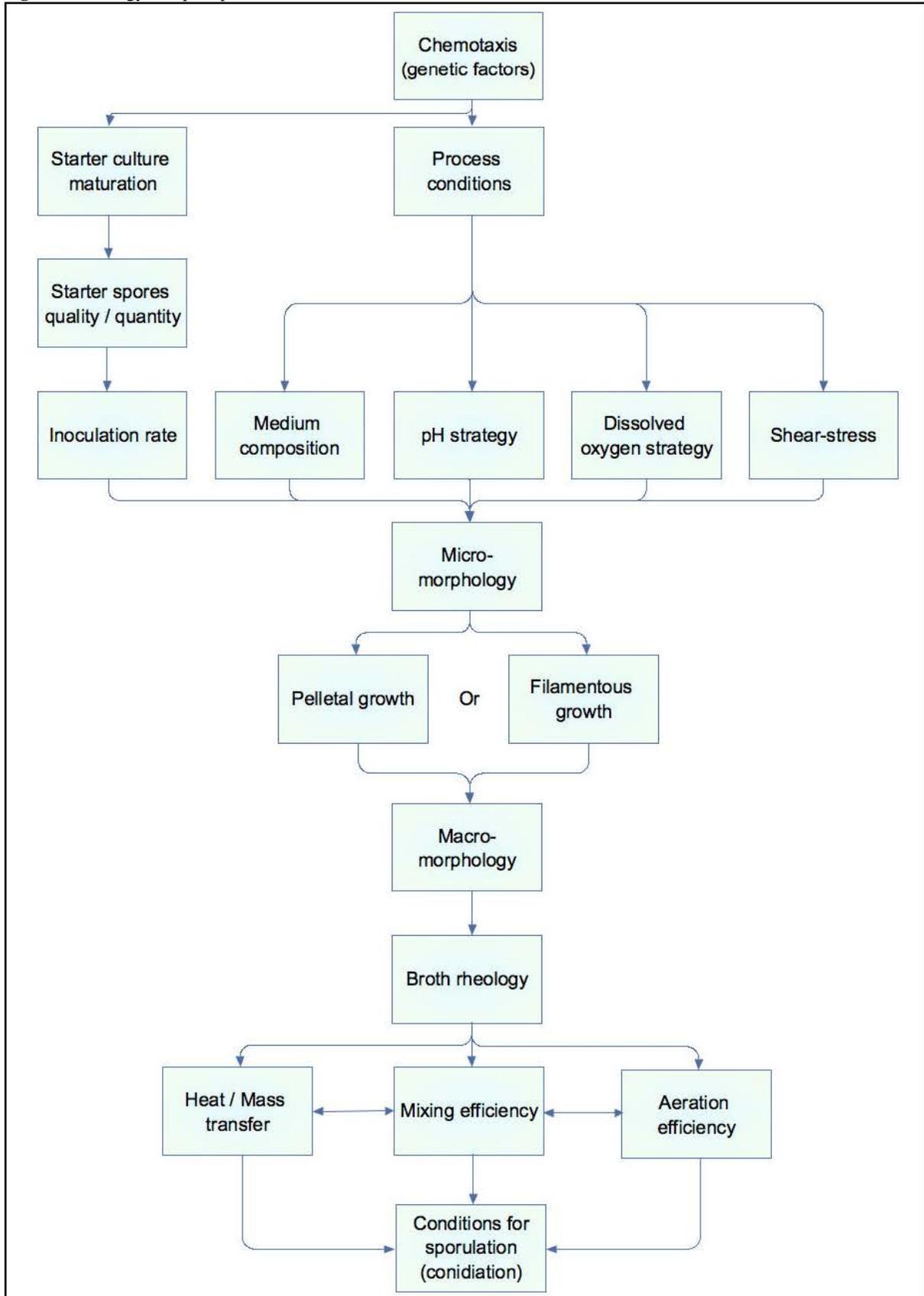
The effects of these factors should be adjusted for each type of fungi to reach the optimal sporulation rate and the highest productivity of the culture.

ACKNOWLEDGMENTS

We'd like to thank the DSM France Company for their financial support; and their employees for their helpful discussions and helping hands: David THOMASSEY, Gautier DUBOIS, Lilian LABUSSIÈRE, Catherine DUONG, Dan GOURSAT, and Sylvain GOURDAUT.

The authors also wish to express their sincere appreciation to the French association of research and technology (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, ANRT) for their financial support.

Figure 5. Strategy for spore production



ACKNOWLEDGMENTS

We'd like to thank the DSM France Company for their financial support; and their employees for their helpful discussions and helping hands: David THOMASSEY, Gautier DUBOIS, Lilian LABUSSIÈRE, Catherine DUONG, Dan GOURSAT, and Sylvain GOURDAUT.

The authors also wish to express their sincere appreciation to the French association of research and technology (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie, ANRT) for their financial support.

REFERENCES

1. Mariano, G.-S., Enrique, B.-A., Hugo, J.-I., José, N.-B., Eloy, B.-C. and Ramiro, R.-M. Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures. *Advances in Agricultural and Food Biotechnology*. **2006**, 17-34
2. Papagianni, M. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology advances*. **2004**, 22 288 - 259
3. Valik, L., Baranyi, J. and Görner, F. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*. *International Journal of Food Microbiology*. **1999**, 47 (1-2), 141-146
4. Dixon, N.M. and Kell, D.B. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Bacteriology*. **1989**, 67 (2), 109 - 136
5. Desfarges, C., Larroche, C. and Gros, J.B. Spore production of *Penicillium roqueforti* by solid state fermentation: Stoichiometry, growth and sporulation behavior. *Biotechnology and bioengineering*. **1987**, 29 (9), 1050-1058
6. Larroche, C., Desfarges, C. and Gros, J.B. Optimization of the spore production of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation on buckwheat seeds. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1988**, 28 (1), 85-92
7. Larroche, C. and Gros, J.B. Characterization of the growth and sporulation behavior of *Penicillium roquefortii* in solid substrate fermentation by material and bioenergetic balances. *Biotechnology and bioengineering*. **1992**, 39 (8), 815-827
8. Amrane, A., Plihon, F. and Prigent, Y. Kinetics of growth and medium de-acidification for *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* cultivated on complex liquid media. *World journal of Microbiology & Biotechnology*. **1999**, 15 489 - 491
9. Larroche, C., Desfarges, C. and Gros, J.B. Spore production of *Penicillium roqueforti* by simulated state fermentation. *Biotechnology letters*. **1986**, 8 (6), 453 - 456
10. Znidarsic, P. and Pavko, A. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. *Food technol. Biotechnol.* **2001**, 39 (3), 237-252
11. Edelstein, L. and Segel, L.A. Growth and metabolism in mycelial fungi. *Journal of Theoretical Biology*. **1983**, 104 (2), 187-210
12. Jones, E.B.G. Fungal adhesion. *Mycological Research*. **1994**, 98 (9), 961-981

13. Paul, G.C., Kent, C.A. and Thomas, C.R. Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis. *Biotechnology Bioengineering*. **1993**, 42 (1), 11 - 23
14. Posch, A.E., Spadiut, O. and Herwig, C. A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*. **2012**, 49 (7), 499-510
15. Olsvik, E. and Kristiansen, B. Rheology of filamentous fermentations. *Biotechnology Advances*. **1994**, 12 (1), 1-39
16. Whitaker, A. and Long, P.A. Fungal pelleting. *Process Biochemistry*. **1973**, 11. 27 - 31
17. Wucherpfennig, T., Kiep, K.A., Driouch, H., Wittmann, C. and Krull, R. Morphology and rheology in filamentous cultivations. *Adv. Appl. Microbiol.* **2010**, 72 89-136
18. Pirt, S.J. A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences*. **1966**, 166 (4), 369-373
19. McNeil, B., Berry, D.R., Harvey, L.M., Grant, A. and White, S. Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Biotechnology and bioengineering*. **1998**, 57 (3), 297-305
20. Cui, Y.Q., Van der Lans, R.G.J.M. and Luyben, K.C.A.M. Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation. *Biotechnology and bioengineering*. **1998**, 57 (4), 409-419
21. Metz, B. and Kossen, N.W.F. The Growth of Molds in the Form of Pellets - a literature Review. *Biotechnology and bioengineering*. **1977**, 19 781-799
22. Vézina, C., Singh, K. and Sehgal, S.N. Sporulation of filamentous fungi in submerged culture. *Mycologia*. **1965**, 57 (5), 722 - 736
23. Papagianni, M. Fungal morphology. *Citric acid biotechnology*. **1999**, 69 - 84
24. Bockelmann, W., Portius, S., Lick, S. and Heller, K.J. Sporulation of *Penicillium camemberti* in submerged batch culture. *Systematic and Applied Microbiology*. **1999**, 22 (3), 479-485
25. Meyers, E. and Knight, S.G. Studies on the nutrition of *Penicillium roqueforti*. *Applied microbiology*. **1958**, 6 (3), 174-178
26. Lawrence, R.C. and Bailey, R.W. Evidence for the role of the citric acid cycle in the activation of spores of *Penicillium roqueforti*. *BBA - General Subjects*. **1970**, 208 (1), 77-86
27. Poulsen, B.R. Characterization of pathway engineered strains of filamentous fungi in submerged cultures. **2005**, Chapter 9: Can submerged cultures of filamentous fungi be made reproducible?. 145 - 163
28. Pitt, D. and Poole, P.C. Calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* in submerged culture. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **1981**, 76 (2), 219 - 230
29. Roncal, T. and Ugalde, U. Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*. **2003**, 154 (8), 539-546
30. Morton, A.G.e.a. Changes in enzyme activity of fungi during nitrogen starvation. *Journal of experimental botany*. **1960**, 11 (1), 116 - 128
31. Fan, T.Y. and Kinsella, J.E. Changes in biochemical components during the germination of spores of *Penicillium roqueforti*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. **1976**, 27 (8), 745-752
32. Morton, A.G. The induction of sporulation in mould fungi. *Proc. R. Microscop. Soc.* **1961**, B (153), 548 - 569
33. Youatt, J. Calcium and microorganisms. *Critical Reviews in Microbiology*. **1993**, 19 (2), 83-97

34. Armstrong, J.J. Stimulation of sporulation in *Penicillium* by anhydroglucose. *Nature*. **1963**, 197 (4868), 723
35. William, J.G. and Richard, J.H. Production of conidia in submerged cultures of *Penicillium notatum*. *J Bacteriol*. **1946**, 51 (6), 731 - 733
36. Roncal, T., Cordobés, S., Sterner, O. and Ugalde, U. Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene. *Eukaryotic Cell*. **2002**, 1 (5), 823-829
37. Suijdam, J.C., Kossen, N.W.F. and Paul, P.G. An inoculum technique for the production of fungal pellets. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1980**, 10 (3), 211-221
38. Takahashi, J., Abekawa, Y. and Yamada, K.J. Effect of nonionic surface-active agent on the formation of *Aspergillus niger* pellets. *Agric. Chem. Soc. Jpn*. **1960**, 34 1043-1047
39. Pirt, S.J. and Callow, D.S. Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology. *Nature*. **1959**, (184), 307 - 10
40. Galbraith, J.C. and Smith, J.E. Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *Journal of General Microbiology*. **1969**, 59 (1), 31-45
41. Zetelaki, K. and Vas, K. The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture. *Biotechnology and bioengineering*. **1968**, 10 (1), 45 - 59
42. Carilli, A., Chain, E.B., Gualandi, G. and Morisi, G. Aeration studies. III. Continuous measurement of dissolved oxygen during fermentation in large fermenters. *Scientific Report of the Istituto Superiore di Sanita*. **1961**, 1 (177 - 89),
43. Cronenberg, C.C.H., Ottengraf, S.P.P., van den Heuvel, J.C., Pottel, F., Ziele, D., Schügerl, K. and Bellgardt, K.H. Influence of age and structure of *Penicillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles. *Bioprocess engineering*. **1994**, 10 209 - 216
44. Kobayashi, T., Van Dedem, G. and Mooyoung, M. Oxygen transfer into mycelial pellets. *Biotechnology and bioengineering*. **1973**, 15 (1), 27-45
45. Olsvik, E.S. and Kristiansen, B. Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth. *Biotechnology and bioengineering*. **1992**, 40 (11), 1293-1299
46. El-Sabbagh, N., McNeil, B. and Harvey, L.M. Dissolved carbon dioxide effects on growth, nutrient consumption, penicillin synthesis and morphology in batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Enzyme and Microbial Technology*. **2006**, 39 (2), 185-190
47. Rockwell, E. and Highberger, J.H. The necessity of CO₂ for the growth of bacteria, yeasts and moulds. *Journal Infection Disease*. **1927**, 40 (3),
48. Nyiri, L. Effect of CO₂ on the germination of *Penicillium chrysogenum* spores. *Zeitschrift für allg. Mikrobiologie*. **1967**, 7 (2), 107 - 111
49. Edwards, A.G. and Ho, C.S. Effects of carbon dioxide on *Penicillium chrysogenum*: an autoradiographic study. *Biotechnology and bioengineering*. **1988**, 32 (1), 1-7
50. Mc Intyre, M. and Mc Neil, B. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **1998**, 50 (3), 291-298
51. Li, Y., Wadsö, L. and Larsson, L. Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti*– correlations between produced heat, ergosterol content and biomass. *Journal of Applied Microbiology*. **2009**, 106 (5), 1494-1501

52. Tucker, K.G. and Thomas, C.R. Inoculum effects on fungal morphology: Shake flasks vs agitated bioreactors. *Biotechnology Techniques*. **1994**, 8 (3), 153-156
53. Tucker, K.G. and Thomas, C.R. Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level. *Biotechnology Letters*. **1992**, 14 (11), 1071-1074
54. Camici, L., Sermoniti, G. and Chain, E.B. Observations on *Penicillium chrysogenum* in submerged culture. 1. Mycelial growth and autolysis. *Bulletin of the World Health Organization. Supplement*. **1952**, 6 (1-2), 265-275
55. Riley, G.L., Tucker, K.G., Paul, G.C. and Thomas, C.R. Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology. *Biotechnology and bioengineering*. **2000**, 68 (2), 160 - 172
56. Roels, J.A., Van Den Berg, J. and Voncken, R.M. The rheology of mycelial broths. *Biotechnology and bioengineering*. **1974**, 16 (2), 181-208
57. Nienow, A.W. Agitators for mycelial fermentations. *Trends in biotechnology*. **1990**, 8 (8), 224-233
58. Solomons, G.L. and Weston, G.O. The prediction of oxygen transfer rates in the presence of mould mycelium. *Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering*. **1961**, 3 (1), 1-6
59. Cui, Y.Q., Van Der Lans, R.G.J.M. and Luyben, K.C.A.M. Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation. *Biotechnology and bioengineering*. **1997**, 55 (5), 715-726
60. Tanaka, H. Studies on the effect of agitation on mycelia in submerged culture. *Journal Fermentation Technology*. **1976**, 54 (11), 818 - 819
61. Justen, P., Paul, G., Nienow, A. and Thomas, C. Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity. *Biotechnology and bioengineering*. **1997**, 59 (6), 762 - 775

1.2. Présentation des différentes techniques d'extrapolation des bioréacteurs

L'extrapolation, c'est obtenir dans le même temps, avec les mêmes réactifs et dans les mêmes conditions opératoires, des résultats identiques aux échelles laboratoire, pilote et industrielle tout en minimisant le nombre d'étapes intermédiaires (laboratoire, pilotes) avant l'industrialisation ((Schmidt 2005)).

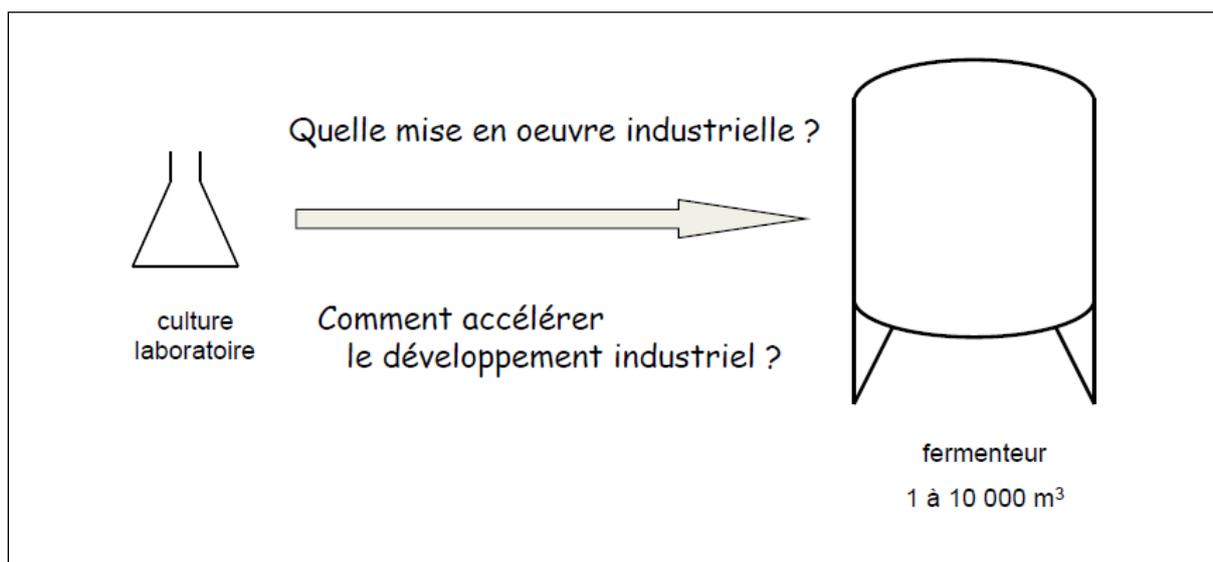


Figure 1. Représentation schématique du changement d'échelle

Ce changement d'échelle est crucial pour obtenir les mêmes performances aux échelles de production industrielles et pilotes (Figure 1).

Depuis le début des années 1940 suite à la réorganisation industrielle (Taylorisme puis Fordisme), le changement d'échelle devient d'une importance majeure pour l'industrialisation dans le domaine des biotechnologies. Une approche rationnelle de changement d'échelle permet une production de qualité, en masse, une baisse des coûts et un aménagement adéquat de l'espace ((Hourcade 1985)).

Le changement d'échelle appliqué à l'industrie biotechnologique a pris de l'ampleur lors de la seconde guerre mondiale pour satisfaire une demande croissante en pénicilline. En effet, les cultures en Erlenmeyers ont en général des rendements nettement inférieurs aux productions réalisées en fermenteur agité. Ceci est principalement dû aux difficultés de réguler le pH et l'oxygène dissous en Erlenmeyers. De plus, l'aération en surface réalisée en Erlenmeyer est nettement moins efficace en termes de transfert d'oxygène. Par ailleurs, la production spécifique (kg/m³) est très faible en

Erlenmeyers en comparaison à une production en fermenteur. Pour atteindre la même production en Erlenmeyers qu'en réacteur, l'investissement et l'espace seraient conséquents et inimaginables.

L'extrapolation peut se faire de deux manières. Soit l'installation est déjà existante et l'objectif est d'améliorer le procédé, la productivité, le rendement, ... Dans ce cas, l'idéal est de passer de l'échelle industrielle à l'échelle laboratoire pour optimiser tous les critères à ce niveau avant de les appliquer à l'échelle industrielle ; on parle alors de "scale-down" ((Möckel, Wolleschensky et al. 1990)). Soit on souhaite développer un nouveau bioprocédé. Ce développement se fait dans un premier temps aux échelles laboratoire et pilote pour concevoir et optimiser le procédé visé. Après cette étape on cherchera à appliquer le même procédé à l'échelle industrielle, on parle alors de "scale-up".

L'étape de mise en œuvre d'un procédé à l'échelle du laboratoire comprend : l'amélioration ou la sélection de nouvelles souches, le développement d'un milieu de culture adéquat, le choix d'un fermenteur adapté et des procédés d'extraction et de purification dédiés, etc. Cette étape va permettre d'évaluer les performances techniques du procédé et de caractériser les besoins et les limites de la souche microbienne utilisée. Elle fournit aussi les données cinétiques et thermodynamiques nécessaires à l'extrapolation. A l'issue de cette étape, on procède à un changement progressif d'échelle. Un ratio de 10 sur le volume est généralement respecté entre les échelles pour éviter des variations hydrodynamiques brusques qui peuvent affecter les performances. Le transfert est effectué en cascade jusqu'à atteindre les objectifs prévus à l'échelle industrielle (voir Figure 2).

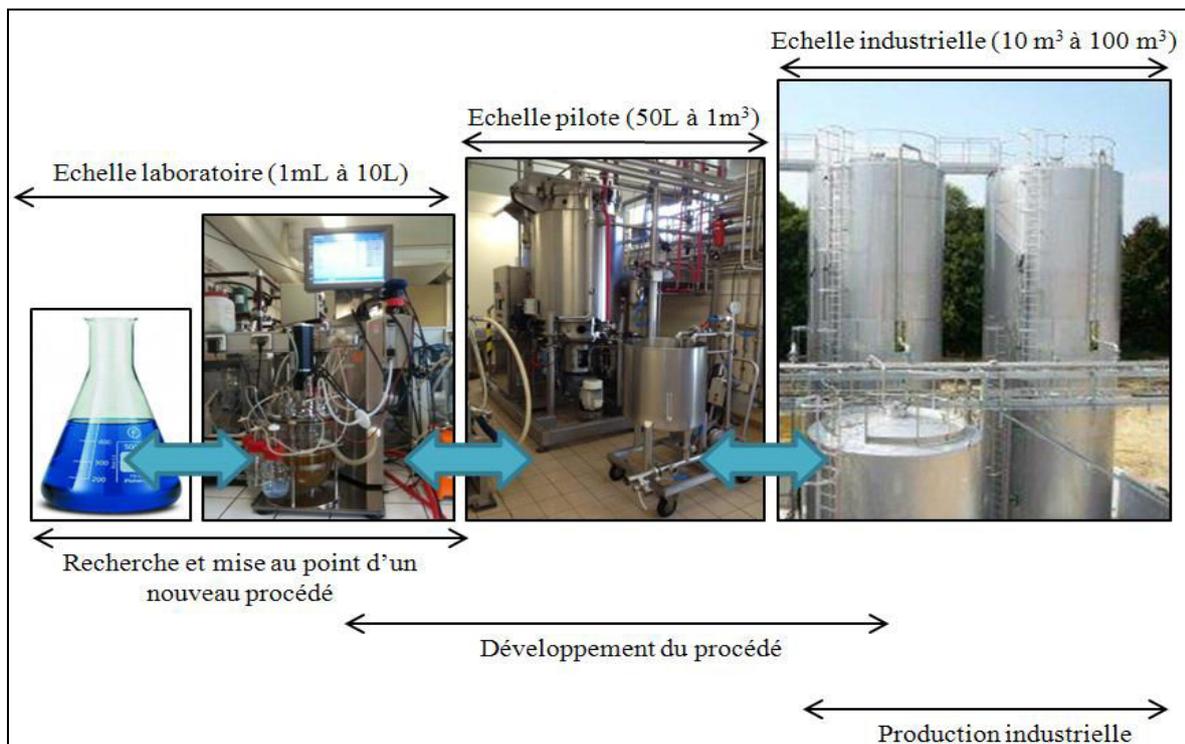


Figure 2. Transfert de l'échelle laboratoire à l'échelle industrielle

Le passage progressif d'une échelle à une autre se fait par l'intermédiaire de l'application d'une méthodologie appropriée qui consiste à garder constants un certain nombre de critères caractéristiques du système entre les deux échelles ((Ghasem D 2007)). Les critères les plus couramment utilisés sont :

- Similitude géométrique : conservation du même rapport échelle,
- Similitude dynamique : conservation de la même valeur des forces ((forces de cisaillement, *etc.*),
- Similitude cinématique : conservation de la même vitesse (vitesse en bout de pales, *etc.*),
- Similitude réactionnelle : conservation de la même cinétique (cinétique de croissance, cinétique de consommation de substrat, *etc.*),
- Similitude thermique : conservation du même gradient de température.

Du point de vue pratique ces critères peuvent être atteints en gardant constantes des grandeurs caractéristiques du système comme le nombre Reynolds, la puissance dissipée par unités de volume, le nombre de Froude, la vitesse en bout de pales, le temps de mélange, le coefficient de transfert d'oxygène, ou même la composition du milieu, *etc.* ((Junker 2004)).

L'objectif de l'extrapolation étant de trouver le moyen approprié pour conserver des performances identiques entre les échelles sans effectuer des changements drastiques. Pour parvenir à cet objectif, deux méthodes sont couramment utilisées, selon qu'il s'agisse de l'optimisation d'un procédé existant ou de la conception d'un nouveau procédé : l'extrapolation géométrique ou l'extrapolation non géométrique.

1.2.1. Extrapolation géométrique

Le principe ici consiste à conserver un rapport d'échelle constant aux différents stades du développement du procédé.

Historiquement, la plupart des extrapolations en fermentation (pour la production d'alcool ou acides organiques) sont basées sur une extrapolation géométrique et une puissance par unités de volume constante ((Ghasem D 2007); (Junker 2004)). Cette extrapolation se base sur l'utilisation de grandeurs adimensionnelles et la conservation de paramètres physico-chimiques et biologiques. Il existe une liste importante de nombre adimensionnel mais seuls certains sont utiles pour l'extrapolation de bioprocédés en bioréacteur. Les principaux sont exposés en Tableau. Les paramètres suivants sont les plus couramment utilisés pour une extrapolation : puissance par unités de volume, temps de mélange, transfert d'oxygène, cinétique de croissance, profils pH/PO₂, *etc.* ((Marques, Cabral et al. 2010); (Nielsen, Villadsen et al. 2003)). Nous appellerons ces paramètres "critères d'extrapolation" par la suite. Ces critères vont en effet être utiles par la suite pour l'établissement du cahier des charges du futur procédé.

Tableau 1. *Nombres adimensionnels.*

Nombres adimensionnels	Symboles	Formules
Nombre de Reynolds	Re	$\frac{N \times D_I^2 \times \rho}{\mu}$
Nombre de puissance	N _p	$\frac{P_0}{\rho \times N^3 \times D_I^5}$
Nombre d'aération	N _A	$\frac{Q}{N \times D_T^3}$

N : vitesse d'agitation (RPS)

D_I : Diamètre agitateur (m)

μ : Viscosité dynamique (Pa.s)

ρ : Masse volumique (kg/m³)

P₀ : Puissance dissipée sans aération (W)

Q : Débit de gaz (m³/s)

D_T : diamètre de la cuve (m)

Une fois les critères importants fixés, il s'agira de définir tous les paramètres pouvant influencer ces critères afin de ne pas obtenir de variations non identifiables. Ces paramètres peuvent être les suivants : la régulation de la température, la préparation de l'inoculum, la stérilisation du bioréacteur et de son milieu, le mode d'aération, le type de souche et sa stabilité, la viscosité du milieu, le type et les dimensions du bioréacteur, la pression hydrostatique, le type de mobile d'agitation/d'aération ((Nienow 1998)), la vitesse d'agitation et le débit d'air, *etc.* Le nombre important de ces facteurs montre que l'extrapolation d'un bioprocédé est encore aujourd'hui, extrêmement complexe.

En pratique, les grandeurs caractéristiques les plus couramment étudiées sont la vitesse de rotation, la vitesse au bout de pâle, la puissance par unité volume, le temps de mélange, les nombres de Reynolds, de Froude et de Weber.

Le Tableau 2 montre la variation des autres critères en maintenant un d'eux constant et un rapport d'échelle égal à « F ». Ce tableau indique la puissance n à appliquer selon les critères maintenus constant. On observe dans ces conditions que certains de ces critères atteignent des valeurs irréalisables expérimentalement pour des raisons techniques ou économiques ((Roustan, Pharamond et

al. 1999)). En conservant un critère fixe, les autres varient. On sait dans quel sens et de combien. En bas du tableau, on peut trouver les objectifs des applications faisant intervenir chacun de ces critères.

Illustration :

Considérons la vitesse de rotation, N, constante entre les échelles, la vitesse en bout de pales et le nombre de Froude seront alors influencés de F¹, la puissance volume, la hauteur théorique et le nombre de Reynolds de F², le nombre de Weber de F³ et enfin le temps de pompage et de le temps de mélange seront proportionnels à la vitesse de rotation (F⁰=1). On remarque que si l'on fixe la vitesse d'agitation, cela entraîne un risque de consommation énergétique et de cisaillement insensé, un risque de cavitation au niveau des pales de l'agitateur.

Il est donc nécessaire de sélectionner le ou les critères les plus importants considérer selon le système étudié.

Tableau 2. Valeurs d'extrapolation avec similitude géométrique en fixant un paramètre entre les échelles (en vert).

Effets d'un changement d'échelle sur les grandeurs caractéristiques							
F ^Λ	AVEC SIMILITUDE GEOMETRIQUE						
variables	N (s-1)	vpale (m/s)	P/V (W / m3)	Tm (s)	Re	Fr	We
Dimensions	N	ND	N ² D ²	D	ND ²	N ² D	N ² D ³
N (s-1)	0	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
N (min-1)	0	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
vpale (m/s)	1,00	0	0,33	1,00	-1,00	0,50	-0,50
P (kW)	5,00	2,00	3,00	5,00	-1,00	3,50	0,50
P/V (kW/m3)	2,00	-1,00	0	2,00	-4,00	0,50	-2,50
Qp (m3 / s)	3,00	2,00	2,33	3,00	1,00	2,50	1,50
Tp (s)	0,00	1,00	0,67	0,00	2,00	0,50	1,50
Tm (s)	0,00	1,00	0,67	0	2,00	0,50	1,50
H* (m)	2,00	0,00	0,67	2,00	-2,00	1,00	-1,00
Qp / H* (m ² / s)	1,00	2,00	1,67	1,00	3,00	1,50	2,50
Re	2,00	1,00	1,33	2,00	0	1,50	0,50
Fr	1,00	-1,00	-0,33	1,00	-3,00	0	-2,00
We	3,00	1,00	1,67	3,00	-1,00	2,00	0
Grad.vit. Max.	0,00	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
Grad.vit. Moy.	0,00	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
Objectifs	Turbulence	- Conservation vitesses - Dispersion sans coalescence - Cisaillement max	- Transfert de masse biphasique - Dispersion + coalescence - Suspension homogène - Economies énergétiques	Transfert de masse et de chaleur	Transfert de chaleur	- Transfert de masse - Hauteur de vortex - Mise en suspension	Tension superficielle

Le diagramme général d'extrapolation géométrique peut être résumé selon la Figure 3.

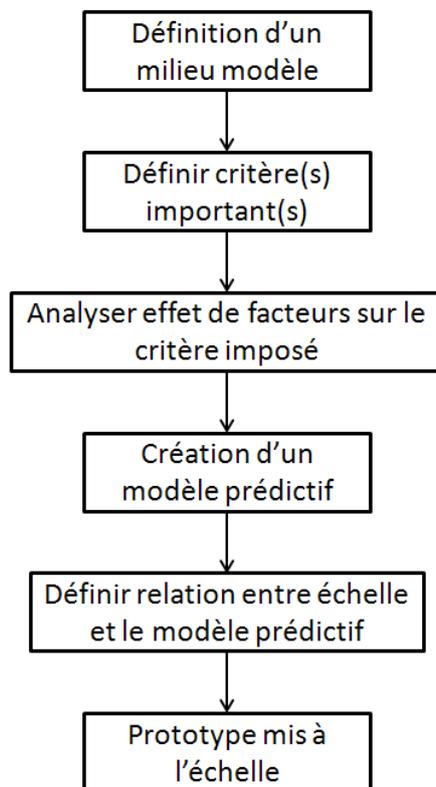


Figure 3. Stratégie d'approche de l'extrapolation

1.2.2. Extrapolation non géométrique

Dans certains cas les dimensions du fermenteur (diamètre, hauteur, volume) aux différentes échelles (laboratoire, pilote et industrielle) sont déjà fixées car le matériel est déjà installé. Elles ne respectent donc pas forcément les conditions de similitude géométrique. Dans d'autres cas, les dimensions du bioréacteur ne sont pas les facteurs clés pour l'optimisation du système étudié mais plutôt c'est le mobile d'agitation. C'est le cas de la production d'un système vivant sensible au cisaillement (champignons filamenteux ou cellules animales / végétales, *etc.*) ou un catalyseur solide, qui auraient besoin d'un agitateur aux dimensions plus importantes afin d'utiliser des vitesses d'agitation plus faibles. Dans ce cas de figure, la similitude géométrique ne permet pas de satisfaire les critères recherchés. La solution appropriée consiste à utiliser la similitude non géométrique. Il convient alors de focaliser sur la modification des dimensions du mobile d'agitation. On travaillera ainsi sur des ratios D_I/D_T (diamètre de l'agitateur sur le diamètre du bioréacteur) plus importants afin de diminuer la vitesse d'agitation sans abaisser l'efficacité de transfert de matières. On peut aussi travailler sur la hauteur, H_I , de l'agitateur.

En Tableau 3, comme pour l'extrapolation géométrique, il est possible de développer un tableau permettant de connaître les effets d'un critère gardé constant entre les échelles sur les autres critères.

Tableau 3. Valeurs d'extrapolation sans similitude géométrique en fixant un paramètre entre les échelles (en vert).

Effets d'un changement d'échelle sur les grandeurs caractéristiques		
R ^Λ	SANS SIMILITUDE GEOMETRIQUE	
variables	vpale (m/s)	P/V (W / m ³)
Dimensions	ND	N ³ D ³ H _l T ⁻³
N (s-1)	-1	-1,67
N (min-1)	-1	-1,67
vpale (m/s)	0	-0,67
P/V (kW/m ³)	-1	0
Re	1	0,33
Fr	-1	-2,33
We	1	-0,33

Si l'on souhaite fixer la vitesse d'agitation et le diamètre d'agitation entre les échelles la formule sera alors la suivante : $N_1^3 \times D_{I,1}^2 = N_2^3 \times D_{I,2}^2$

La vitesse d'agitation sera donc proportionnelle au diamètre à la puissance 2/3 car :

$$N_2 = N_1 \times \left(\frac{D_{I,1}}{D_{I,2}} \right)^{2/3}$$

Pour chaque critère, il est donc possible de trouver une relation avec un paramètre afin de trouver son influence sur le critère. L'agitation et l'aération peuvent avoir une importance considérable sur le bilan économique, il est donc primordial d'optimiser ces deux paramètres avant la conception du nouveau matériel à l'échelle pilote ou industrielle. Dans certains cas, les bioréacteurs sont déjà conçus et installés et il est donc impossible de les changer. Nous nous sommes donc limités aux paramètres qui restaient modifiables. Pour choisir ses critères d'extrapolation à fixer, il est possible de se baser soit sur des critères d'agitation soit sur des critères d'aération, selon les besoins du procédé.

1.2.2.1. Changement d'échelle basé sur l'agitation

Différent critères peuvent être fixés pour effectuer une extrapolation basée sur les qualités d'agitation :

- Temps de mélange (t_m)
- Puissance d'agitation par unité de volume (P/V)
- Vitesse en extrémité de pale (V_p)

Ces paramètres sont tous dépendants les uns des autres. Si l'on souhaite diminuer le P/V, on diminuera aussi par la même occasion le temps de mélange, le coefficient de transfert d'oxygène et la vitesse en bout de pales. Si le micro-organisme étudié est sensible au cisaillement il sera alors conseillé de travailler à vitesse en bout de pales constante ((Hewitt and Nienow 2007); (Marques, Cabral et al. 2010)).

Rodgers, Gangolf et al. 2011 ont effectué des travaux sur le temps de mélange et sa prédiction pour des ratios $H_T/D_T < 1$. Ils se sont basés sur les travaux de Grenville and Nienow 2004 qui ont développé le modèle suivant : $t_{m 95} = 5,2 N_p^{-1/3} \left(\frac{D}{T}\right)^{-2} \left(\frac{H}{T}\right)^{1/2}$. Ce modèle peut-être utilisé pour effectuer une extrapolation aux échelles pilotes ou industrielles basée sur l'agitation.

Cette partie a été beaucoup moins étudiée durant cette thèse car le changement d'échelle basé sur l'aération a été l'approche sélectionnée pour cette étude.

1.2.2.2. Changement d'échelle basé sur l'aération

Différent critères peuvent être fixés pour effectuer une extrapolation basée sur les qualités d'aération :

- Taux d'aération (VVM)
- Vitesse superficielle de gaz (V_g)
- K_{La} (hr^{-1})
- L'engorgement des mobiles d'agitation par le gaz injecté ((Möckel, Wolleschensky et al. 1990))
- La rétention de gaz

Pour une majorité des industries biotechnologiques, les cultures sont effectuées en aérobie. L'oxygène étant faiblement soluble en milieu liquide (7,49 mg O₂/L d'eau à 30°C et pression de 1 bar), le coefficient de transfert d'oxygène devient alors un critère clef pour l'extrapolation ((Bandaiphet and Prasertsan 2006); (Galaction, Cascaval et al. 2004); (Garcia-Ochoa and Gomez 2009); (Marques, Cabral et al. 2010); (Shukla, Parasu Veera et al. 2001); (Hewitt and Nienow 2007)). De plus, ce paramètre est souvent le facteur le plus limitant à l'échelle industrielle. Il est donc essentiel de trouver les conditions idéales pour maximiser la concentration d'oxygène dans le milieu pour satisfaire les besoins de la culture.

Il existe un nombre important de modèles dans la littérature, permettant de prédire le K_{La} à l'aide de corrélations déduites des données expérimentales. Ainsi, différentes corrélations sont disponibles dans la bibliographie, selon le type et les dimensions du fermenteur, le type de mobile, le milieu de fermentation et sa viscosité. Nous en présentons une liste non exhaustive en Tableau 4 et en Tableau 5. En Tableau 4, on peut observer différents modèles en fonction du type de fermenteur, son volume ou

encore le type de micro-organisme qui y est produit. Alors qu'en Tableau 5, on peut voir différents modèles en fonction de l'équipement du fermenteur.

Tableau 4. Modèles de prédiction du K_La en fonction du type de fermenteur et du micro-organisme.

Fermenteur (micro-organisme)	Formule du KLa	Constantes	Références
Erlenmeyer	$0,141 N^{0,88} (V/V_0)^{-0,8}$	N = Stirring speed (s^{-1}); V = volume utile; V_0 = Volume total	Liu (2006)
Réacteur agité	$k' (P_g/V_R)^a (V_g)^b (B/6)^{0,8} (j/D_1)^{0,3}$	k' , a et b = coefficients spécifiques au réacteur ; P_g = puissance sous aération (w/m^3) ; V = volume de milieu ; V_g = vitesse superficielle de gaz ; B = nombre d'agitateurs ; j = largeur des contrepales ; D_1 = diamètre de l'agitateur	Schmidt (2005)
Réacteur bien agité avec coalescence	$0,002 (P_g/V)^{0,7} V_g^{0,2}$	P_g/V = puissance volumique (w/m^3) ; V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s)	Nielsen J. <i>et al.</i> (2003)
Réacteur bien agité sans coalescence	$0,32 v_s^{0,7}$	V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s)	Nielsen J. <i>et al.</i> (2003)
Réacteur de laboratoire - 8L volume utile	$f_2 (P_g/V)^{0,95} V_g^{0,67}$	f_2 = valeurs dépendant du micro-organisme sélectionné et du volume utile	Junker B.H. (1998)
Réacteur pilote - 400L volume utile	$f_2 (P_g/V)^{0,67} V_g^{0,67}$	f_2 = valeurs dépendant du micro-organisme sélectionné et du volume	Junker B.H. (1998)
Réacteur industriel - 23 000 à 46 000L volume utile	$f_2 (P_g/V)^{0,5} V_g^{0,5}$	f_2 = valeurs dépendant du micro-organisme sélectionné et du volume utile	Junker B.H. (1998)
Réacteur de 100 mL (<i>E. coli</i>)	$0,224 (P/V)^{0,35} V_g^{0,52}$	P/V = puissance volumique (W/m^3); V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s)	Gill <i>et al.</i> (2008)
Réacteur de 5L rempli à 4L (<i>P. shermani</i> (bactérie))	$6,586 V_g^{0,429} / (C_x^{0,282} (P_g/V)^{0,0286})$	P/V = puissance volumique (W/m^3); V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s) ; concentration cellulaire (g/L)	Galaction <i>et al.</i> (2004)
Réacteur de 5L rempli à 4L (<i>S. cerevisiae</i>)	$6,586 V_g^{0,514} / (C_x^{0,702} (P_g/V)^{0,0762})$	P/V = puissance volumique (W/m^3); V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s) ; concentration cellulaire (g/L)	Galaction <i>et al.</i> (2004)
Réacteur de 5L rempli à 4L (<i>P. chrysogenum</i> sous forme de pelote)	$0,193 (V_g^{0,257} (P_g/v)^{0,0288}) / C_x^{0,269}$	P/V = puissance volumique (W/m^3); V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s) ; concentration cellulaire (g/L)	Galaction <i>et al.</i> (2004)
Réacteur de 5L rempli à 4L (<i>P. chrysogenum</i> sous forme mycéliale)	$33,59 V_g^{0,94} / (C_x^{1,012} (P_g/V)^{0,0463})$	P/V = puissance volumique (W/m^3); V_g = vitesse superficielle de gaz (m/s) ; C_x = concentration cellulaire (g/L)	Galaction <i>et al.</i> (2004)

Réacteur de 5L (culture haute densité cellulaire d' <i>E. coli</i>)	$0.0195 (P_g/V)^{0,55} (V_g)^{0,64} (1+2,12X+0,20X^2)^{-0,25}$	P/V = puissance volumique (W/m ³); Vg = vitesse superficielle de gaz (m/s) ; X = concentration cellulaire (g/L)	Shin (1996)
---	--	--	-------------

Tableau 5. Modèles de prédiction du K_{La} en fonction du mobile d'agitation et du type d'aération.

configurations	Formule du K_{La}	Erreur	Références
2 x RT (6 pales) + 4 contrepales + sparger en fer à cheval	$0.1379 N^{0.778} Q_{vvm}^{0.688} \mu^{-0.620}$	R ² = 98%	Bustamante <i>et al.</i> (2013)
1 x EEU45 (3 pales) + 4 contrepales + sparger en fer à cheval	$0.0247 N^{1.706} Q_{vvm}^{0.618} \mu^{-0.716}$	R ² = 99%	Bustamante <i>et al.</i> (2013)
1 x EED45 (3 blades) + 4 contrepales + sparger en fer à cheval	$0.0184 N^{0.120} Q_{vvm}^{0.585} \mu^{-0.521}$	R ² = 97%	Bustamante <i>et al.</i> (2013)
2 x RT + 3 contrepales + sparger en fer à cheval	$6.586 v_s^{0.429} / (C_x^{0.282} (P_a/V)^{0.0286})$	Déviati on max = ± 7.8%	Galaction <i>et al.</i> (2004)
2 x RT + aération de surface	$1/(e^{12.77+0.227 \ln CX} (P/V)^{0.62 - 0.109 \ln CX})$	Déviati on max = ± 8.8%	Galaction <i>et al.</i> (2004)
2 x RT	$0.0083 (P_g/V)^{0.62} v_s^{0.49}$	NA	Gogate <i>et al.</i> (2000)
1 x RT + 1 x pitched-blade pompage vers le bas	$0.00204 (P_g/V)^{0.68} v_s^{0.58}$	NA	Gogate <i>et al.</i> (2000)
RT + sparger en fer à cheval	$0.026 (P_g/V)^{0.4} v_s^{0.5}$	Déviati on max = ± 8%	Sardeing <i>et al.</i> (2004)
3 x Rushton + sparger en fer à cheval	$K_{La} \left(\frac{v}{g}\right)^{1/3} = 7.94 \times 10^{-4} \left[\frac{P/V_L}{\rho(vg^4)^{1/3}}\right]^{0.62} \left[\frac{q_G}{V_L} \left(\frac{v}{g^2}\right)^{1/3}\right]^{0.23}$	Erreur moyenne env. 8%	(Schlüter and Deckwer 1992)
4 x Intermig + sparger en fer à cheval	$K_{La} \left(\frac{v}{g}\right)^{1/3} = 5.89 \times 10^{-4} \left[\frac{P/V_L}{\rho(vg^4)^{1/3}}\right]^{0.62} \left[\frac{q_G}{V_L} \left(\frac{v}{g^2}\right)^{1/3}\right]^{0.19}$	Erreur moyenne env. 8%	(Schlüter and Deckwer 1992)
RT + pitched blade pompage vers le bas	$0.024 (P_G/V)^{0.725} V_G^{0.892}$	R ² = 82%	Shukla <i>et al.</i> (2001)
RT + sparger en fer à cheval	$0.026 (P_g/V)^{0.4} v_s^{0.5}$	déviati on max = ± 20-40%	(Van't Riet 1979)

De plus, un nombre conséquent de nombres adimensionnels liés au K_{La} ont été résumés dans la publication de (Garcia-Ochoa and Gomez 2009).

1.2.2.3. Conclusion et limites du changement d'échelle

Il existe une proportion importante de critères d'extrapolation et de corrélations mais leur utilisation dépend de la nature du micro-organisme utilisé (besoin en O₂, cisaillement, *etc.*). Il conviendra ainsi de fixer les critères qui affectent le plus la souche étudiée et de les considérer dans l'étape d'extrapolation ; car il est extrêmement difficile de maintenir tous les critères constants. Il n'existe malheureusement aujourd'hui aucun modèle permettant de réaliser l'extrapolation parfaite entre les échelles ((Marques, Cabral et al. 2010)). L'extrapolation va donc consister à trouver le meilleur compromis entre les différentes contraintes. Par conséquent, il est important de bien connaître les nombreux facteurs et leurs effets sur ces critères à optimiser. De plus, il est crucial de garder les mêmes conditions physico-chimiques, biologiques et hydrodynamiques entre les échelles laboratoires, pilotes et industrielles et pour cela il est nécessaire d'utiliser des protocoles spécifiques pour relever ce challenge. Les communautés scientifiques ((Hewitt and Nienow 2007); (Schmidt 2005)) et industrielles sont d'accord pour dire que les phénomènes de transfert de matières et thermiques sont les problèmes majeures dans le domaine de l'extrapolation aux grandes échelles. En effet, à grande échelle on rencontre souvent des gradients de température, de substrats, de pH, d'oxygène et de dioxyde de carbone. De plus, aux grandes échelles, il faut prendre en compte le gradient de la pression hydrostatique qui influence le transfert d'oxygène mais aussi sa solubilité. Le même phénomène s'applique sur le dioxyde carbone. On se retrouve donc avec des cellules au niveau du fond du fermenteur avec peu de substrat, une mauvaise régulation en pH, une mauvaise élimination du dioxyde de carbone, un surplus de chaleur dû à l'agitation mais avec potentiellement une meilleure oxygénation ((Hewitt and Nienow 2007); (Junker 2004); (Nienow 1998); (Schmidt 2005); (Vrabel, van der Lans et al. 2000)).

Dans cette partie, l'extrapolation est focalisée sur l'étape de production mais il ne faut pas oublier que la même approche doit être appliquée pour les opérations unitaires en amont et en aval. La Figure 4 représente schématiquement l'enchaînement des opérations unitaires à considérer pour une extrapolation entre échelle.

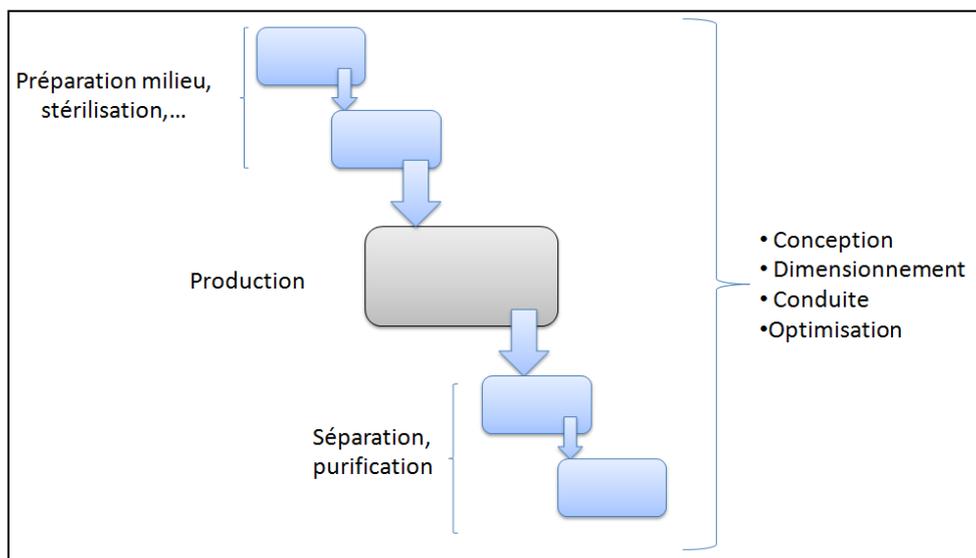


Figure 4. Opérations unitaires en amont et aval de l'étape de production

Chapitre 2 : Matériels et Méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Souches étudiées

Les micro-organismes choisis pour cette étude sont au nombre de trois :

Debaryomyces hansenii, souche de levure.

Staphylococcus carnosus, souche bactérienne exigeante en oxygène.

Penicillium candidum, souche de champignon filamenteux supposée être sensible au cisaillement.

Ils ont été sélectionnés et fournis par la société privée Royal DSM basée à La Ferté-sous-Jouarre (LFSJ) comme modèles pour la production de biomasse et d'activité enzymatique. Ils font partie des trois grandes classes produites par le site de production de LFSJ.

Les souches de levure, bactérie et champignon filamenteux ont été conservées dans leur milieu de fermentation avec du glycérol à 15% dans des cryotubes dans un congélateur à -80°C.

Dans cette étude, deux types de milieu de fermentation ont été utilisés : des fermentations sur milieu solide et des fermentations sur un milieu liquide. Un des buts de cette étude était de transférer toutes les souches produites en milieux solides dans des boîtes de Roux vers un milieu liquide en fermenteur.

2.1.2. Milieux de culture

2.1.2.1. Pour le champignon filamenteux

Cultures en boîte de Roux

Trente neuf grammes de Patatoes Dextrose Agar (PDA) ont été dissous dans un litre d'eau distillée. Le milieu a été porté à ébullition puis stérilisé à 121°C pendant 15 min en flacon Schott de 250 mL. 100 mL de ce milieu stérilisé encore sous forme liquide est versé à l'intérieur d'une boîte de Roux. Cette boîte est ensuite conservée à l'horizontale au réfrigérateur à 6°C pendant 24 heures pour que la gélose durcisse.

Une fois que la gélose a pris en masse, l'intégralité de la contenance d'un cryotube de la souche de *Penicillium* est versée dans la boîte Roux afin de l'inoculer. Le liquide est réparti en inclinant la boîte de Roux de chaque côté afin de bien recouvrir la boîte.

Au bout de 30 jours de maturation la boîte de Roux est prête à être utilisée pour inoculer des Erlenmeyers. Les boîtes de Roux peuvent être ensuite conservées plusieurs semaines au réfrigérateur à 6°C.

Pour récupérer les spores afin de préparer des pré-cultures en milieu liquide, 200 mL d'eau distillée stérile est versée dans la boîte de Roux, il faut ensuite mélanger énergiquement afin de récupérer les spores qui peuvent être piégées dans le mycélium. Le liquide avec les spores en suspension est ensuite placé dans un flacon stérile pour inoculer des Erlenmeyers.



Figure 5. Photographie d'une boîte de Roux.

Cultures en Erlenmeyer

Le milieu synthétique est un milieu développé par le laboratoire de recherche de DSM de LFSJ. Sa composition de base est indiquée dans le Tableau. Après avoir complété le volume à 1 litre, le pH est ajusté à 5.0 avec de l'acide lactique à 80%. La composition de la solution mère d'oligoéléments est présentée en Tableau 7. La solution de chlorure de calcium à 50% est stérilisée à part et ajoutée après refroidissement des Erlenmeyers afin d'éviter une précipitation des ions calcium à cause de la chaleur. Des Erlenmeyers de 250 mL ont été remplis à 125 mL (ratio ½). Le contenu de l'Erlenmeyer était mélangé jusqu'à homogénéisation totale et autoclavé à 121°C (1 bar de pression relative) pendant 20 minutes. Le milieu autoclavé était inoculé avec approximativement 2×10^6 spores/mL de milieu à partir de spores issues de boîte de Roux. La fermentation se déroulait à 23°C pendant 5 jours.

Tableau 6. *Composition d'un litre de milieu de fermentation pour Penicillium candidum en Erlenmeyer.*

Fructose	10.75 g
Phosphate de potassium	4.00 g
Nitrate de potassium	1.50 g
Extrait de levure en poudre 0207	0.25 g
Extrait de levure en poudre 2006	0.25 g
Glutamate de sodium	0.50 g
Chlorure de calcium 50% liquide	12 mL (ajouté après stérilisation)
Solution mère d'oligo-éléments SOE-Br	4 mL
H ₂ O distillée qsp	1 L

Le pH est ajusté à 5.0 (+/- 0.2) avec une solution d'acide lactique à 80%.

Tableau 7. *Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments SOE-Br pour Penicillium candidum en Erlenmeyer.*

Sulfate de cuivre, 5 H ₂ O	0.40 g
Sulfate de zinc, 1 H ₂ O	0.40 g
Sulfate de manganese, 1 H ₂ O	0.14 g
Chlorure de fer	0.10 g
Acide borique	0.06 g
Molybdate de sodium	0.04 g
H ₂ O distillée qsp	1 L

Cette solution est stockée à 4°C au réfrigérateur.

Cultures en fermenteurs

Au préalable, le milieu est stérilisé en autoclave à part en 2 parties, 20 min à 121°C. La première partie, en Tableau 8, est stérilisée dans la cuve alors que la deuxième partie, en Tableau 9, est stérilisée dans un flacon de type Schott. Après refroidissement des deux parties, le milieu est stabilisé à une température de 23°C, le contenu du Schott est transvasé dans la cuve à l'aide d'une pompe péristaltique. Le milieu est ensuiteensemencé à 2 x 10⁶ spores/mL à partir de la préculture décrite ci-dessus. La composition de la solution d'oligo-éléments est décrite Tableau 10.

Tableau 8. Composition d'un litre de milieu de fermentation pour *Penicillium candidum* en fermenteur (1^{ère} partie pour stérilisation à part).

Dextrose monohydrate	10 g
Chlorure de calcium 50%	12 g
H2O distillée qsp	100 mL

Stérilisée à part dans un Schott de 250mL.

Tableau 9. Composition d'un litre de milieu de fermentation pour *Penicillium candidum* en fermenteur (2^{ème} partie pour stérilisation à part).

Acétate de sodium, 3 H ₂ O	9.30 g
Sulfate d'ammonium	4.60 g
Citrate trisodique	4.40 g
Sulfate de magnésium, 7 H ₂ O	0.15 g
Phosphate de potassium	0.13 g
Chlorure de potassium	0.05 g
Sulfate de fer II, 7 H ₂ O	0.0002 g
Solution mère d'oligo-éléments M1 v.2	10 mL
H ₂ O distillée qsp	900 mL

Le pH est ajusté à 5.9 avec une solution d'acide lactique 80%.

Tableau 10. Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments M1 v.2 pour *Penicillium* en fermenteur.

Sulfate de cuivre, 5 H ₂ O	0.5 g
Sulfate de manganèse, 1 H ₂ O	0.338 g
Sulfate de zinc, 1 H ₂ O	0.125
H2O distillée qsp	1 L

Cette solution est stockée à 4°C au réfrigérateur.

Des échantillons étaient prélevés à heures régulières le matin, le midi et le soir.

2.1.2.2. Pour la levure

Cultures en Erlenmeyer

Le contenu de l'Erlenmeyer (Tableau 11) était mélangé jusqu'à homogénéisation totale et autoclavé à 121°C (1 bar de pression relative) pendant 20 minutes. Des Erlenmeyers de 500 mL ont été remplis à 100 mL (ratio 1/5). Le milieu autoclavé était ensuite refroidi à température ambiante puis inoculé avec 0.2 mL du contenu d'un cryotube (0.2%). La fermentation se déroulait à 25°C pendant 24 heures.

Tableau 11. Composition d'un litre de milieu de fermentation JB pour *Debaryomyces hansenii* en Erlenmeyer.

Glucose	50 g
Extrait de levure 0207	3 g
Sulfate de magnésium	6 g
Phosphate mono potassique	3 g
H ₂ O distillée qsp	1 L

Le pH est ajusté à 4.8 avec une solution d'acide lactique 80%.

Cultures en fermenteurs

La composition du milieu de culture de *Debaryomyces hansenii* est décrite en Tableau. Au préalable, le milieu est stérilisé complet en autoclave, 20 min à 121°C. Après refroidissement, le milieu est stabilisé à une température de 25°C. Le milieu est ensuiteensemencé afin d'obtenir une matière sèche de départ à 0.1 g/L à partir de la préculture décrite ci-dessus.

Suite à notre étude, ce milieu a été supplémenté en sulfate d'ammonium et en chlorure de calcium. Ce milieu est décrit en Tableau 13.

Tableau 12. Composition d'un litre de milieu de fermentation JB *Debaryomyces hansenii* en fermenteur.

Glucose	50 g
Extrait de levure 0207	3 g
Sulfate de magnésium	6 g
Phosphate monopotassique	3 g
H ₂ O distillée qsp	1 L

Le pH est ajusté à 4.8 avec une solution d'acide lactique 80%. Pendant la culture, le pH a été régulé à 4.8 par addition de NH₃ 5%.

Tableau 13. Composition d'un litre de milieu de fermentation JB amélioré pour *Debaryomyces hansenii* en fermenteur.

Glucose	50 g
Extrait de levure 0207	3 g
Sulfate de magnésium	6 g
Sulfate d'ammonium	6 g
Phosphate mono potassique	3 g
Solution de chlorure de calcium 50%	0.2 mL
H ₂ O distillée qsp	1 L

Le pH est ajusté à 4.8 avec une solution d'acide lactique 80%. Pendant la culture, le pH a été régulé à 4.8 par addition de NH₃ 5%.

2.1.2.3. Pour la bactérie

Cultures en Erlenmeyer

La préculture était préparée à partir du milieu décrit en Tableau accompagné de la solution d'oligo-éléments décrite en tableau 9. Le contenu de l'Erlenmeyer était ensuite mélangé jusqu'à homogénéisation totale et autoclavé à 121°C (1 bar de pression relative) pendant 20 minutes. Des Erlenmeyers de 500 mL ont été remplis à 100 mL (ratio 1/5). Le milieu autoclavé était ensuite refroidi à température ambiante puis inoculé avec 0.1 mL du contenu d'un cryotube (0.1%). La fermentation se déroulait à 30°C pendant 24 heures.

Tableau 14. Composition d'un litre de milieu de fermentation SX21 pour *Staphylococcus carnosus* en Erlenmeyer.

Glycérol	15 g
Extrait de levure HYP-A	12 g
Extrait de levure 0207	7.50 g
Acide ascorbique	0.80 g
Sel fin alimentaire	5 g
Sulfate de magnésium	0.80 g
Phosphate mono potassique	0.4 g
Solution mère d'oligo-éléments manganèse	1 mL
H ₂ O distillée qsp	1 L

Le pH est ajusté à 5.6 avec une solution de NaOH.

Tableau 15. Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments manganèse pour *Staphylococcus carnosus* en Erlenmeyer.

Sulfate de manganèse, 1 H ₂ O	28 g
H ₂ O distillée qsp	1 L

Cette solution est stockée à 4°C au réfrigérateur

Cultures en fermenteurs

La composition du milieu de culture de *Staphylococcus carnosus* est décrite en Tableau 16. La composition de solution d'oligo-éléments pour la culture de la bactérie est décrite en Tableau 17. Au préalable, le milieu est stérilisé complet en autoclave, 20 min à 121°C. Après refroidissement, le milieu est stabilisé à une température de 30°C. Le milieu est ensuiteensemencé afin d'obtenir une matière sèche de départ à 0.1 g/L à partir de la préculture décrite ci-dessus.

Tableau 16. Composition d'un litre de milieu de fermentation M21-K100 pour *Staphylococcus carnosus* en fermenteur.

Fructose	25 g
Extrait de levure HYP-A	9 g
Extrait de levure 0207	7.5 g
Acide ascorbique	0.8 g
Sulfate de magnésium	0.8 g
Sel fin alimentaire	2 g
Phosphate mono potassique	1 g
Strucktol J673 A	0.1 mL
Solution d'oligo-éléments Mc	0.133 mL
H ₂ O distillée qsp	1 L

Pas d'ajustement initial de pH. Pendant la culture, le pH a été régulé à 6 par addition de NH₃ 5%.

Tableau 17. Composition d'un litre de solution d'oligo-éléments Mc pour *Staphylococcus carnosus* en fermenteur.

Chlorure de fer anhydre	2.18 g
Molybdate de sodium, 2 H ₂ O	1.61 g
Sulfate de manganèse, 1 H ₂ O	6.91 g
H ₂ O distillée qsp	1 L

Cette solution est stockée à 4°C au réfrigérateur

2.1.3. Fermenteurs utilisés

Les fermentations réalisées pour cette étude ont été effectuées dans deux lieux différents : à l'ENSAIA de NANCY et au laboratoire pilote de DSM à LFSJ. Pour chacun de ces lieux, le matériel de fermentation utilisé a donc été différent et de différentes échelles.

2.1.3.1. Erlenmeyers

Des Erlenmeyers de volume total de 2000 mL, 500 mL ou 250 mL de différentes marques (Schott, VWR, Pyrex, *etc.*) ont été utilisés. Ces Erlenmeyers étaient remplis selon les spécifications de DSM et suite à des recherches sur le transfert d'oxygène adapté à la culture de champignon. Les ratios volume utile / volume total étaient les suivants selon les souches : 1/2 pour la souche de champignon et 1/5 pour les souches de levure et de bactérie.

2.1.3.2. Fermenteur de 2L

Le fermenteur de 2L du laboratoire de Nancy a été choisi spécifiquement pour le suivi de fermentations des 3 souches sélectionnées. Le volume du fermenteur est de 3.6 litres avec un volume utile de 2.3 litres. Les fermentations sont réalisées dans une cuve en verre de modèle LabFors 4

NW150 (Infors HT®) fermées hermétiquement par une platine en acier et équipées d'une double enveloppe pour la régulation de la température (Figure 6, Figure 7 et Tableau 18). La température est régulée par circulation d'eau alimentée par un cryostat. Le bioréacteur est équipé de modules de mesure et de régulation du pH (InGold, Mettler, France ; erreur expérimentale : 0,05 unité pH) calibré avant stérilisation, du potentiel Redox (405-DPAS-SC-K8S, Mettler, gamme de mesure -1000 à 1000 mV, précision : +/- 0.1), de mesure de la température (sonde Pt100 ; précision : +/- 0.2°C), de régulation de l'oxygène dissous (Electrode à fluorescence, VisiFerm DO, Hamilton, Suisse ; Temps de réponse moyen 0 à 98% en moins de 30s - Mesure entre 0 et 300% - Précision : 1+/-0.05%) ainsi que de contrôles d'agitation et d'aération. Le débit de gaz en entrée du fermenteur est mesuré à l'aide d'un débitmètre massique. Une analyse O₂ et CO₂ atmosphérique est effectuée en sortie de fermenteur à l'aide d'un analyseur de gaz (Bluesens ; gamme de mesure 0 à 25% ; précision : +/- 0.2%). Les suivis en ligne ainsi que l'acquisition des données au cours du temps sont réalisés par une connexion Ethernet à l'ordinateur de type PC, grâce au logiciel IRIS développé par Infors HT®.

La platine est équipée d'un moteur avec une garniture mécanique et d'un axe d'agitation de 12 mm, une canule de prélèvement, un condenseur et un bouchon avec un septum permettant l'ajout d'éventuel substrats de manière stérile. Pour assurer une meilleur homogénéisation du milieu, la pôle d'agitation est complétée par 3 contre-pales placées dans le fermenteur espacée également à 120° de distance. Le gaz dégagé en cours de fermentation s'échappe à travers un condenseur (colonne réfrigérante dans laquelle circule de l'eau à 10°C). L'arbre d'agitation est entraîné par un moteur de 430W. Le couple du moteur d'agitation est mesuré à l'aide d'un couplomètre directement branché en série entre le moteur et l'axe et peut être lu sur le panneau de contrôle ; il est exprimé en N.m. La configuration du réacteur nous permet d'appliquer une vitesse d'agitation entre 100 et 1200 rpm permettant la répartition optimale du gaz dans l'ensemble du réacteur.

Tableau 18. *Dimensions fermenteur 2L*

Dimensions	Valeurs
H _T (mm)	230
H _L (mm)	135
D _T (mm)	150
W (mm)	15

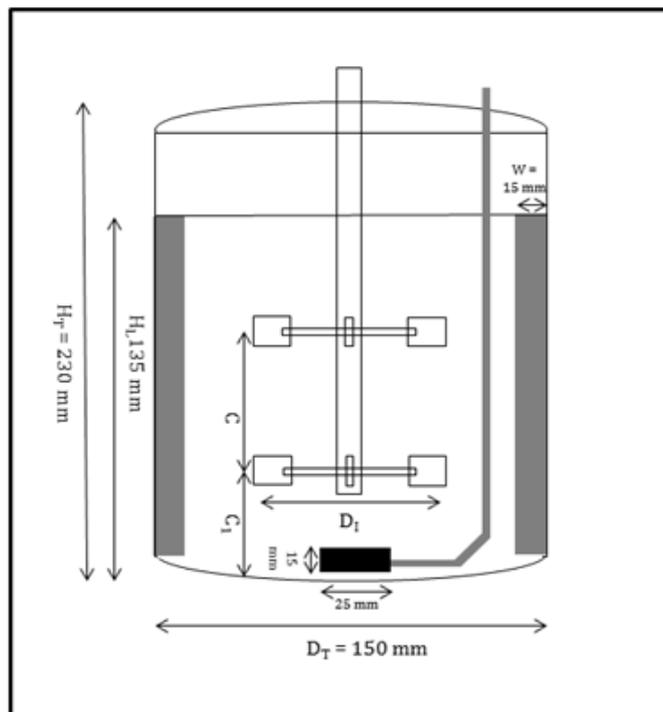


Figure 6. Dimensions du fermenteur 2L



Figure 7. Photographie de l'installation à l'échelle 2L

L'échantillonnage est effectué à l'aide d'une pompe péristaltique branché directement sur une canule de prélèvement connectée au fermenteur.

2.1.3.3. Fermenteur de 900L

Le fermenteur de 900L du laboratoire pilote de la société DSM à LFSJ était déjà installé lorsque nous avons commencé notre étude. Le volume total du fermenteur est donc de 900 litres avec un volume utile de 600 litres avec un arbre d'agitation entraîné par un moteur de 5.5 kW. Ce fermenteur est fabriqué en acier inoxydable 316L (PG900, Pierre Guerin, France). Il est stérilisable et nettoyable en place (SIP et CIP) à la vapeur à l'aide d'une chaudière qui fournit tout le site en vapeur. Il est équipé d'une double enveloppe, le refroidissement se fait à l'aide d'eau glycolée. Il est également équipé de systèmes de suivi de la fermentation qui sont les suivants : régulation de la température (sonde pt100), régulation du pH (InGold, Mettler, France), régulation de l'oxygène dissous (OxyFerm, Hamilton, Suisse) ainsi que des contrôles d'agitation et d'aération. Les suivis en ligne ainsi que l'acquisition des données au cours du temps sont réalisées par une connexion Ethernet à l'ordinateur de type PC grâce au logiciel WinProgress développé par Pierre Guerin®. Cette cuve n'a pas le même ratio hauteur/diamètre que le fermenteur de 2L.

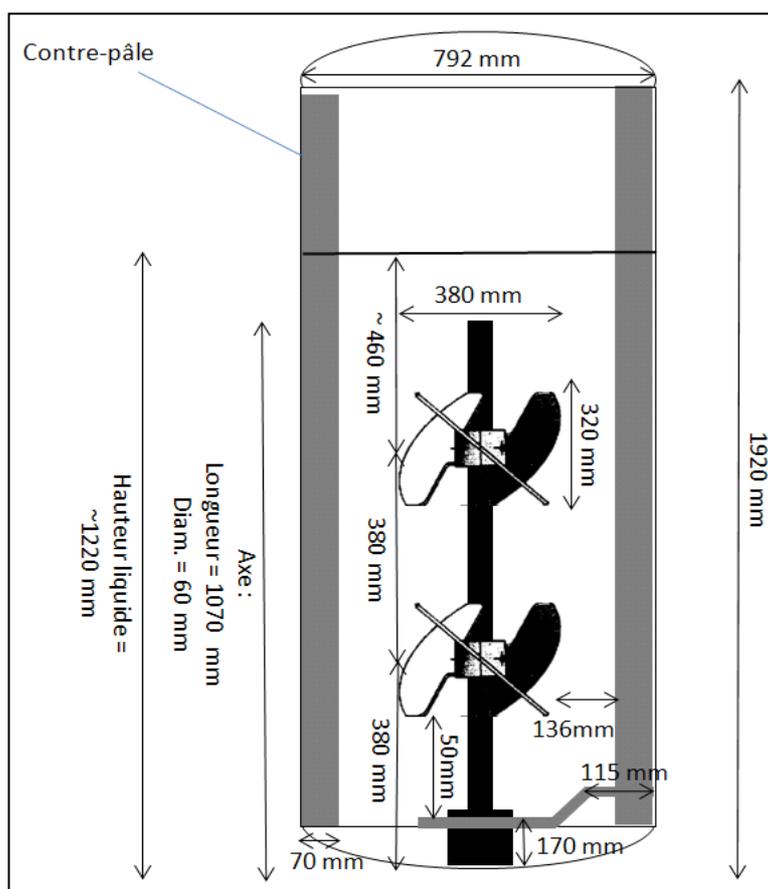


Figure 8. Schéma du fermenteur de 900L équipé avec le nouveau mobile « oreilles d'éléphant ».*

L'échantillonnage est effectué en ouvrant une vanne manuelle et en activant une électrovanne au bas du fermenteur.

2.1.4. Systèmes d'agitation

2.1.4.1. Fermenteur 2L

6 systèmes d'agitation différents ont été étudiés dans le cadre de cette thèse à l'échelle de 2L. Une seule pale à la fois était fixée sur l'axe d'agitation sauf pour l'étude des pales Rushton où deux mobiles ont été fixés sur l'axe. Les caractéristiques géométriques de ces systèmes sont décrites dans le Tableau 19.

Tableau 19. Caractéristiques des pales pour fermenteur de 2L.

Type de mobile d'agitation	No de mobiles	N _b	Angle d'attaque	Direction du flux	H _i (mm)	D _i (mm)	C ₁ (mm)	C (mm)	D _i /D _T	Mélange
Rushton	2	6	90°	Haut et bas	11	54	27	54	0.36	Radial
Oreilles d'éléphant 45°	1	3	45°	Haut ou bas	65	85	51	Seulement une pale	0.57	Axial
Oreilles d'éléphant 25°	1	3	25°	Haut ou bas	40	88	46		0.59	Axial
Cell-lift	1	6	45°	Bas	55	83	51		0.55	Axial

2.1.4.1.1. Turbines Rushton (RT)

La turbine Rushton (RT) a été sélectionnée comme système d'agitation témoin afin de comparer les efficacités des nouvelles pales dace à un système efficace et largement diffusé au sein des industries biotechnologiques. Ses caractéristiques sont en Tableau 19 et Figure 9. De plus, il existe des données permettant de comparer les pales Rushton entre elles : ratio Hauteur de pale / diamètre du mobile : 0.2. Ratio largeur de pale / largeur du mobile : 0.037. Ratio diamètre du disque / diamètre du mobile : 0.72. Epaisseur du disque et des pales : 2 mm.



Figure 9. Photographie d'une turbine Rushton pour le fermenteur de 2L

2.1.4.1.2. Oreilles d'éléphant

Les oreilles d'éléphant (EE pour Elephant Ears) ont été également choisies car elles sont relativement récentes, facile à confectionner et peu étudiées dans la littérature. Dans le cadre de notre étude, nous avons pu comparer différentes configurations : une inclinaison de pale à 25° ou une inclinaison à 45° mais aussi différents sens de pompage : vers le haut ou vers le bas. Les caractéristiques de ces pales sont en Tableau 19 et Figure 10.

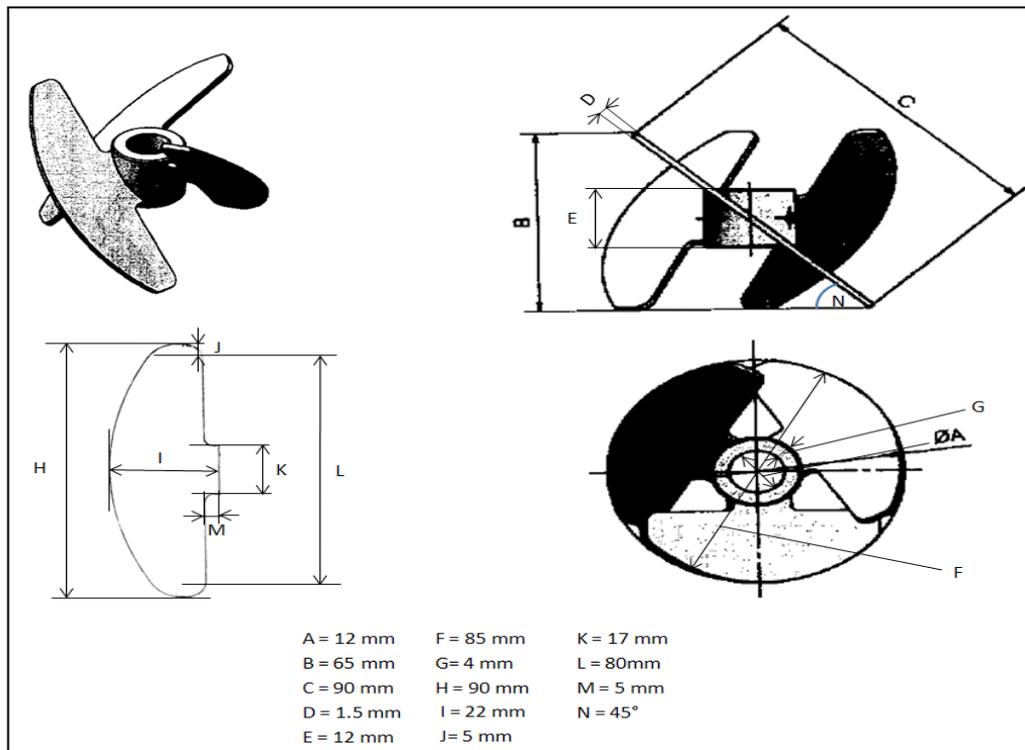


Figure 10. Schéma technique du mobile « oreilles d'éléphant EEU45 » pour le fermenteur de 2L

2.1.4.1.3. Cell-lift

Le Cell-lift est un système d'agitation développé par la société Infors HT. Ce système est supposé être peu cisailant (utilisé dans la culture de cellules animales) et efficace en transfert de matière. Ses caractéristiques sont en Tableau 19 et Figure 11.

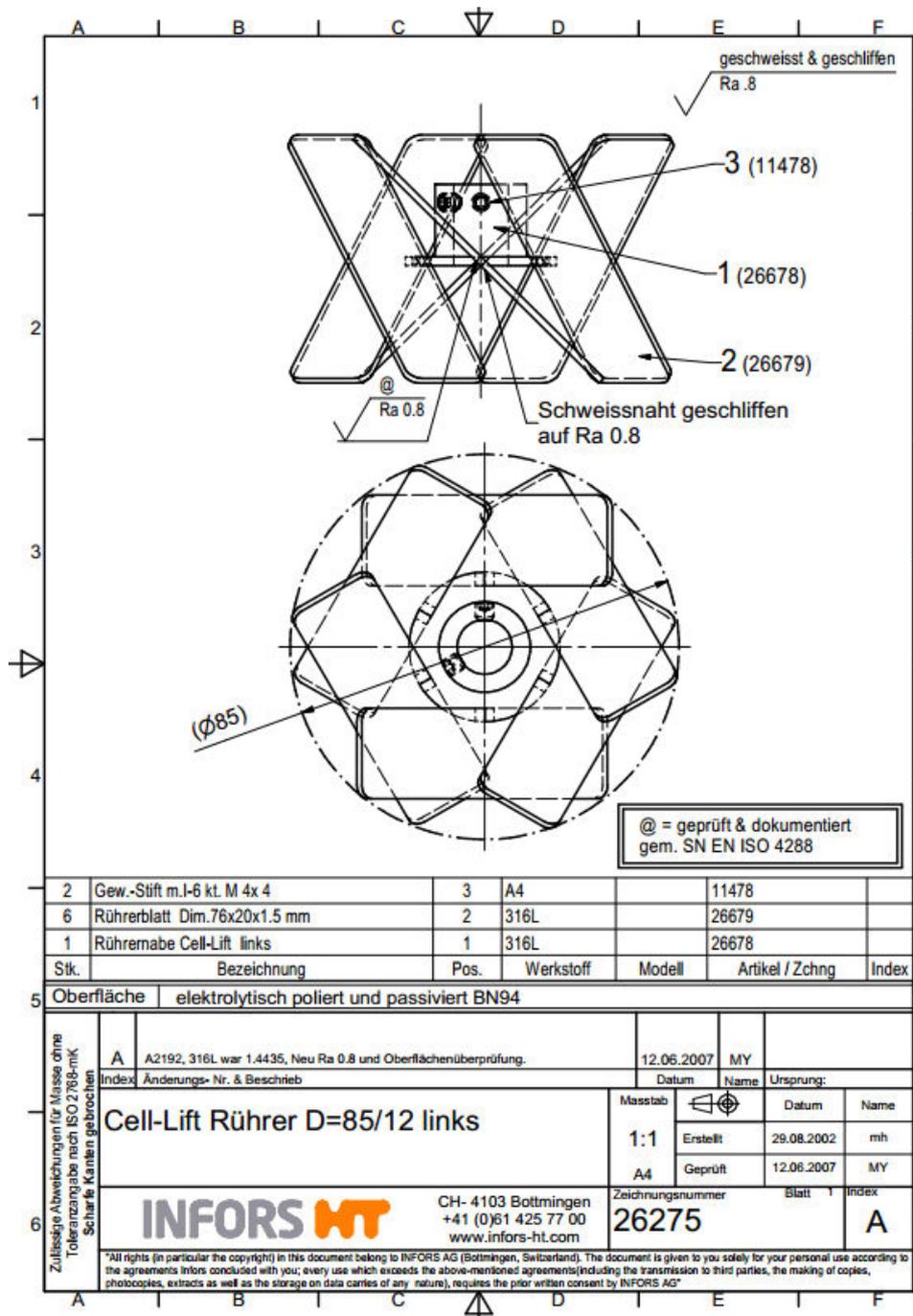


Figure 11. Schéma technique du mobile « Cell-lift » pour le fermenteur de 2L

2.1.4.2. Fermenteur de 900L

Trois systèmes d'agitation différents ont été étudiés à l'échelle de 900L. Ils sont décrits en Tableau 20.

Tableau 20. *Caractéristiques des pales pour fermenteur de 900L.*

Type de mobile d'agitation	No de mobiles	N _b	Angle d'attaque	Direction du flux	D _I (mm)	C ₁ (mm)	C (mm)	D _I /D _T	Mélange
Turbine Rushton + 2 x pales marines	3	6	90° + 25°	Haut et bas	270	335	335	0,34	Radial et axial
Oreilles d'éléphant 45°	2	3	45°	haut	380	380	380	0,48	Axial
Turbine centripète	1	3	45°	Haut et bas	330		X	0,42	Axial

2.1.4.3.1. Turbine centripète

La turbine centripète (Figure 12) est le système qui est actuellement utilisé par la société DSM à l'échelle de production industrielle. Ce système a été jugé vétuste et énergivore et nécessite d'être remplacé.



Figure 12. Photographie de la turbine centripète pour le fermenteur de 900L

2.1.4.3.2. Rushton + 2 x HTPG4

A l'échelle 900L, seul le système Rushton accompagné de deux tripales HTPG4 (Figure 13) en pompage vers le bas a pu être utilisé. Aucun essai avec uniquement des pales Rushton n'a pu être réalisé.

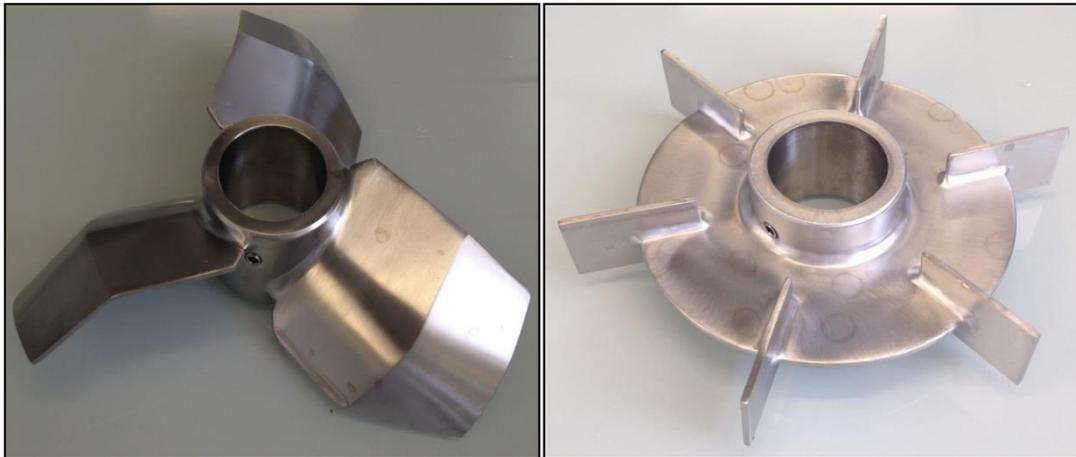


Figure 13. Photographie de la pale HTPG-4 (à gauche) et de la turbine Rushton (à droite) pour le fermenteur de 900L

2.1.4.3.3. Oreilles d'éléphant

Après un travail de dimensionnement et d'extrapolation de l'échelle laboratoire 2L vers l'échelle pilote 900L, nous avons pu obtenir un prototype fabriqué sur nos mesures par la société Applikon (France). Les caractéristiques de ces pales sont développées en Figure 14.

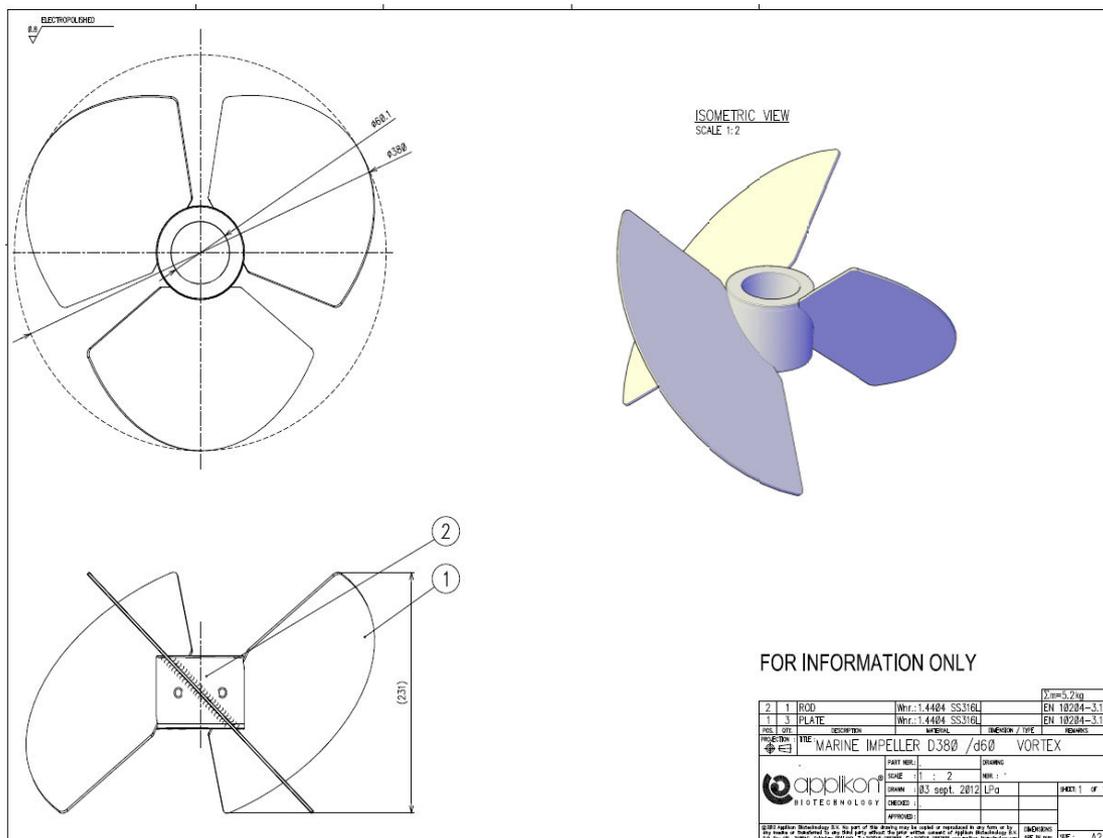


Figure 14. Schéma technique du mobile « oreilles d'éléphant EEU45 » pour le fermenteur de 900L



Figure 15. Photographie du mobile « oreilles d'éléphant EEU45 » pour le fermenteur de 900L

2.1.5. Systèmes d'aération

2.1.5.3. En surface

En cuve agitée l'aération de surface sans entraînement de bulle, c'est-à-dire par diffusion depuis le ciel à travers la surface libre du liquide, peut souvent être négligée devant $K_L a$ surtout avec la présence de contre pales. Dans le cas de l'entreprise DSM, il n'y a pas d'utilisation de contre pales donc formation d'un vortex (Figure 16) qui va servir de surface d'échange entre l'oxygène atmosphérique et le milieu de fermentation.



Figure 16. Illustration du vortex permettant le transfert d'oxygène en aération de surface

2.1.5.4. Sparger classique

La sparger classique a été sélectionné comme témoin avec les pales Rushton pour une comparaison significative des différents systèmes.

- **A l'échelle de laboratoire**, un sparger en acier inoxydable en forme de fer à cheval (Figure 17) a été utilisé. Ce sparger a un diamètre de 50 mm et est composé de 12 trous de 1 mm chacun.



Figure 17. Photographie du sparger classique en fer à cheval pour le fermenteur de 2L

- A l'échelle pilote, un sparger en acier inoxydable 316L en forme de fourche (Figure 18) a été utilisé. Il est composé de 34 trous de 1 mm chacun.



Figure 18. Photographie du sparger classique pour le fermenteur de 900L

2.1.5.5. Microspargers 40 μ m et 20 μ m

Le système innovant développé dans le cadre de cette thèse a été l'utilisation d'un sparger microporeux. Ce microsparger permettrait d'éviter l'utilisation d'un système comme les pales Rushton qui cisaille les bulles pour les rendre plus petites mais qui en même temps cisaille les cellules fragiles.

- A l'échelle laboratoire, un microsparger en acier fritté inoxydable (Figure 19) a été utilisé. Deux types de membranes poreuses ont pu être étudiés : 40 μ m et 20 μ m. Ces membranes avaient un diamètre de 15 mm pour une longueur de 25 mm.



Figure 19. Photographie du microsparger 40µm pour le fermenteur de 2L

- En ce qui concerne l'échelle **pilote**, une adaptation amovible du sparger a été effectuée. Cette adaptation correspond à l'ajout d'une membrane de filtration (Pall, France) directement sur le sparger classique. La fixation de la membrane sur le sparger se fait à l'aide du serrage d'un joint qui va rendre l'installation à la fois étanche et fixe. Ces membranes ont un seuil de coupure de 20µm pour un diamètre de 45 mm et une longueur de 450 mm (Figure 20)



Figure 20. Photographie de la membrane de filtration porosité 20µm (à gauche) et du microsparger (à droite) pour le fermenteur de 900L

2.1.6. La concentration par centrifugation

2.1.6.1. En laboratoire

La centrifugeuse (Heraeus Biofuge PrimoR, Thermo Scientific) utilisée à l'échelle laboratoire pour concentrer en fin de culture avant lyophilisation permet d'accéder à des vitesses allant de 300 à 15 000 RPM par incrémentation de 10 RPM avec possibilité de centrifuger des flacons de 15 mL ou de 50 mL.

2.1.6.2. A l'échelle semi-industrielle

Pour la concentration du milieu en fin de culture, il est nécessaire de pouvoir centrifuger en continu. Pour cela, une centrifugeuse à assiettes (CSA-8, Westfalia) stérilisable à vapeur saturée, a été utilisée.

Le mélange à séparer est mis en rotation à grande vitesse dans l'appareil, permettant ainsi de créer une force (ou accélération) centrifuge pouvant atteindre plusieurs centaines de fois l'accélération de la pesanteur afin de séparer les cellules du milieu de fermentation. Une fois les cellules suffisamment concentrées, un débouillage à l'eau stérile des assiettes est effectué pour récupérer les cellules concentrées dans une cuve stérilisée au préalable.

2.1.7. La concentration par lyophilisation

Elle consiste à porter rapidement à -40°C un petit volume de suspension microbienne, placés dans un plateau ou un ballon et à dessécher sous vide, en fixant la vapeur d'eau par un piège de glace. Le lyophilisat obtenu peut alors être conservé au réfrigérateur pendant une durée de plusieurs mois à plusieurs années. Ce procédé présente de nombreux avantages : La destruction des protéines et des enzymes des microorganismes est réduite au minimum à cause de la rapidité du séchage et la concentration indésirable des substances en solution est évitée par cette réfrigération rapide. La conservation est aussi améliorée et le transport vers le client simplifié et évite l'investissement dans un équipement de conservation à -80°C . Ce procédé présente cependant le désavantage de ne pas être compatible avec certaines souches et peut aussi engendrer des dégâts sur les cellules à cause de la déshydratation.

Afin d'augmenter les chances de survie des germes au cours de l'opération, on ajoute à la suspension des solutions de cryoprotecteur. En effet, au cours de la lyophilisation, un grand nombre de microorganismes sont tués mais la proportion de survivants qui varie entre 5 et 30% du chiffre initial, permet après addition d'eau stérile au lyophilisat, une mise en culture de microorganismes ayant conservés toutes leurs facultés de croissance et leurs propriétés métaboliques.

2.2. Méthodes

2.2.1. Technique de mesure des substrats par HPLC

La plateforme HPLC-DEDL ThermoFischer est composée d'un dégazeur (Spectra system SCM1000, ThermoFischer), d'une pompe quaternaire (Pump spectro system P1000XR, Thermo Finningan), d'un échantillonneur automatique (Autosampler AS3000, ThermoFischer) et d'un détecteur à diffusion de lumière DEDL (Eurosep Instruments). L'élution a été isocratique en utilisant un mélange à 10%/90% méthanol grade-HPLC avec de l'eau ultrapure, comme phase mobile à un débit de 1 mL/min. Un volume de 20 μL de chaque échantillon a été injecté dans une colonne Apollo C18 5u (250 mm x 4.6 mm, Grace Davison Discovery Sciences, USA) spécifique pour la séparation des alcools, acides organiques et des sucres (composés carbonés). Un lavage de la colonne a été effectué par l'injection du méthanol (qualité HPLC). La température de la colonne est fixée à 50°C et le volume de la boucle d'injection est de 20 μL . La détection de chaque composant se fait à l'aide d'un détecteur à diffusion

de lumière réglé à 50°C avec une sensibilité de 550. Un logiciel spécialisé (ChromQuest v.4.1) permet de calculer la surface des pics détectés. Ces caractéristiques sont résumées en Tableau 21. Cette surface est corrélée à une valeur de concentration par l'intermédiaire d'une droite de calibration déterminée préalablement pour chaque constituant (Figure 21).

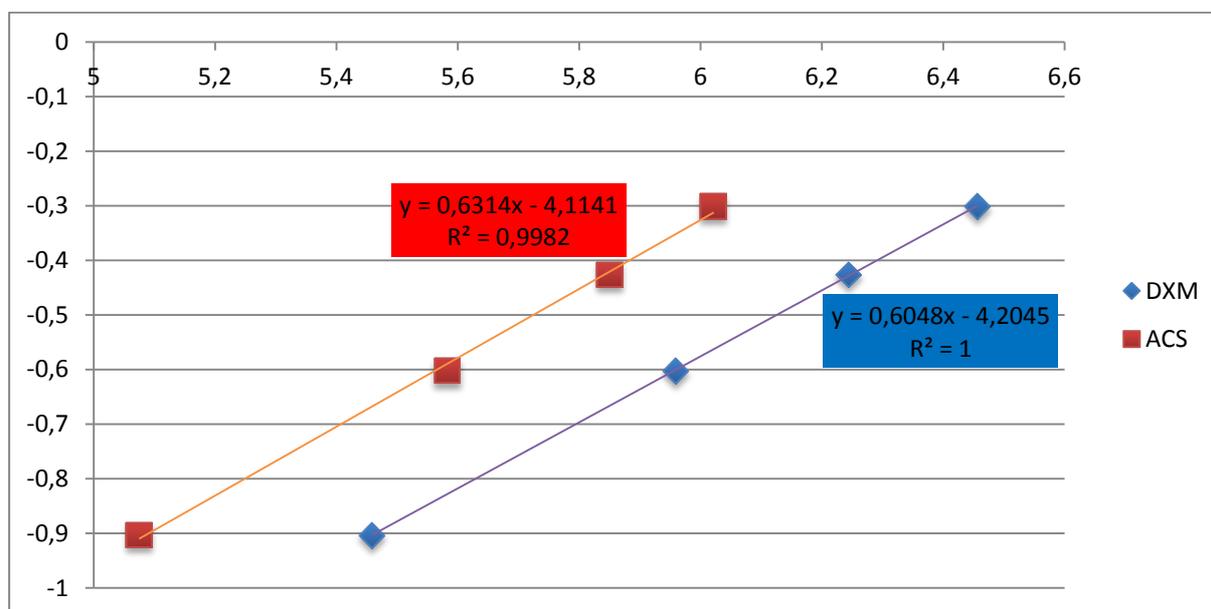


Figure 21. Courbe étalon pour la mesure de concentration en dextrose monohydrate (DXM) et en acétate de sodium (ACS).

Les pics de dextrose, fructose et acétate de sodium ont été déterminé par comparaison avec le temps de rétention du standard seul (Tableau 21). Compte tenu de l'interférence entre l'acétate de sodium et le fructose, les courbes étalons de ces deux composés ont été calibrées en utilisant un mélange dans les mêmes proportions que le milieu de fermentation. En plus de ces composés, il a été trouvé d'autres pics qui correspondraient au chlorure de calcium et au sodium trisodique. Il existe bien une variation de ces composés au cours du temps mais aucune logique n'a pu être décelée lors de cette thèse.

Tableau 21. Caractéristiques générales de l'installation HPLC utilisée

Colonne	Phase mobile	Débit (mL/min)	Détecteur DEDL	Température four (°C)	Temps rétention dextrose	Temps rétention acétate de sodium	Temps rétention fructose
C18	90% eau /10% MeOH	1	Sensibilité : 550	50°C	2,4 min	2,55 min	2,65 min
			Température : 50°C				

2.2.2. Mesure de l'azote soluble : méthode BCA

Les méthodes de dosage des protéines totales sont nombreuses et présentent chacune des caractéristiques différentes. Pour notre étude, nous avons utilisé la photométrie à 562 nm après

réaction au Cu(II) et révélation à l'acide bicinchoninique (méthode dite BCA). L'acide bicinchoninique (BCA) réagit avec les complexes de Cu²⁺ et de protéines de façon très similaire à la réaction du biuret. En formant de tels complexes, il prend une couleur pourpre typique. C'est une méthode sensible et rapide.

Elle consiste à mélanger un échantillon avec de l'acide bicinchoninique (BCA) de vortexer l'ensemble puis de le placer dans un bain marie à 37°C pendant 30 min. Après réaction, il suffit de laisser reposer l'échantillon 10 min à température et d'effectuer une mesure à l'aide d'un spectrophotomètre à 562 nm.

La méthode est décrite dans le document en Annexe 1.

2.2.3. Développement d'une méthode de mesure d'une activité enzymatique produite par la bactérie

La méthode de détermination des nitrates est basée sur la réduction des nitrates en nitrites par l'enzyme Nitrate Réductase (NR), à l'aide du donneur d'électrons naturel NADH. Les nitrites réagissent avec des réactifs en phase acide pour développer une couleur visible. Les nitrates peuvent être déterminés dans les échantillons aqueux, les extraits de tissus végétaux, dans le sol et dans les aliments.

La mesure de l'activité NR est réalisée à l'aide de préparations à 4°C d'un échantillon de culture en fin de fermentation. L'échantillon est centrifugé à 3000RPM à 4°C pendant 15 min puis le culot est repris dans un tampon phosphate KH₂PO₄/K₂HPO₄ à 0,1 M, pH= 7,0. Ce dernier est placé dans un sonicateur pendant 15 min afin de briser les cellules et de libérer toutes les cellules. Les solutions de dithionite et de benzylviologen (une couleur violette se forme) sont ajoutées à la solution puis on ajoute le substrat de l'enzyme : les nitrates. La réaction est incubée à 30°C pendant 30 min puis arrêtée en vortexant le tube eppendorf (l'enzyme est sensible à l'oxygène donc la réaction s'arrête). Cet extrait est fractionné grossièrement par précipitation à l'acétate de zinc (précipitation des protéines pouvant interférer la mesure). On ajoute de l'éthanol et on centrifuge à nouveau à 3000RPM à 4°C pendant 15 min. On prélève le surnageant et on ajoute une solution de sulfanilamide 1% et une solution de N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochloride 0,1% et on laisse réagir pendant 30 min. A l'issue, on effectue une mesure au spectrophotomètre à 548 nm pour déduire les nitrites formées par la réaction. L'activité nitrate réductase est exprimée en DO_{548nm}/g biomasse/L / 30 min d'incubation.

2.2.4. Méthode de numération des cellules

Pour pouvoir suivre la croissance des cellules, il faut avoir accès à la quantité de cellules dans le milieu au cours du temps. Il existe plusieurs méthodes de mesure de la densité cellulaire, par exemple comptage sous microscope avec une cellule de Malassez, mesures de poids secs, numérations sur boîtes de Pétri, cytométrie de flux, etc. Dans le cas du champignon filamenteux, il n'est pas possible de mesurer la densité optique à cause de la présence de filaments de mycélium qui empêchent une

mesure précise de l'absorption de la lumière ainsi le comptage des cellules reste la solution la plus rapide et la plus fiable pour le dénombrement des cellules de champignon.

2.2.4.1. Mesure de la matière sèche

2.2.4.1.1. Pour le champignon

La masse sèche (MS) est déterminée par mesure gravimétrique. Le poids sec est déterminé en filtrant 25 mL du milieu de culture à l'aide d'une pompe à vide au travers d'une membrane d'acétate de cellulose de porosité 0,2 µm (Sartorius) préalablement séchée et pesée. Le filtre est ensuite rincé avec 50mL d'eau physiologique puis séché au four (VWR) de 24h à une nuit à 105°C, puis remis à température ambiante dans le dessiccateur. La concentration en masse sèche (g/L) est déterminée par différence des deux pesées rapportée au volume filtré.

2.2.4.1.2. Pour la bactérie et la levure

La densité cellulaire est estimée par mesure turbidimétrique à l'aide d'un spectrophotomètre (Thermo Genesys 10UV scanning) à 560 nm dans une cuve en verre de 1 cm de trajet optique avec un blanc d'eau distillée. La culture prélevée est diluée manuellement à l'aide d'une pipette de précision afin d'obtenir une densité optique comprise dans la gamme de linéarité de l'appareil entre 0,05 et 0,9 unité d'absorbance. Pour chaque mesure d'échantillon, trois répétitions au minimum étaient effectuées.

Pour déterminer la gamme de linéarité de l'appareil, des dilutions successives d'une culture de levure et d'une culture de bactérie sont effectuées et la densité optique des suspensions est ensuite mesurée au spectrophotomètre à 560 nm. La concentration de biomasse est calculée à partir de la corrélation entre la DO et la MS. Une unité de DO_{560nm} correspond à 0.55 g/L de MS pour la levure (Figure 22) et à 0.52 g/L pour la bactérie (Figure 23).

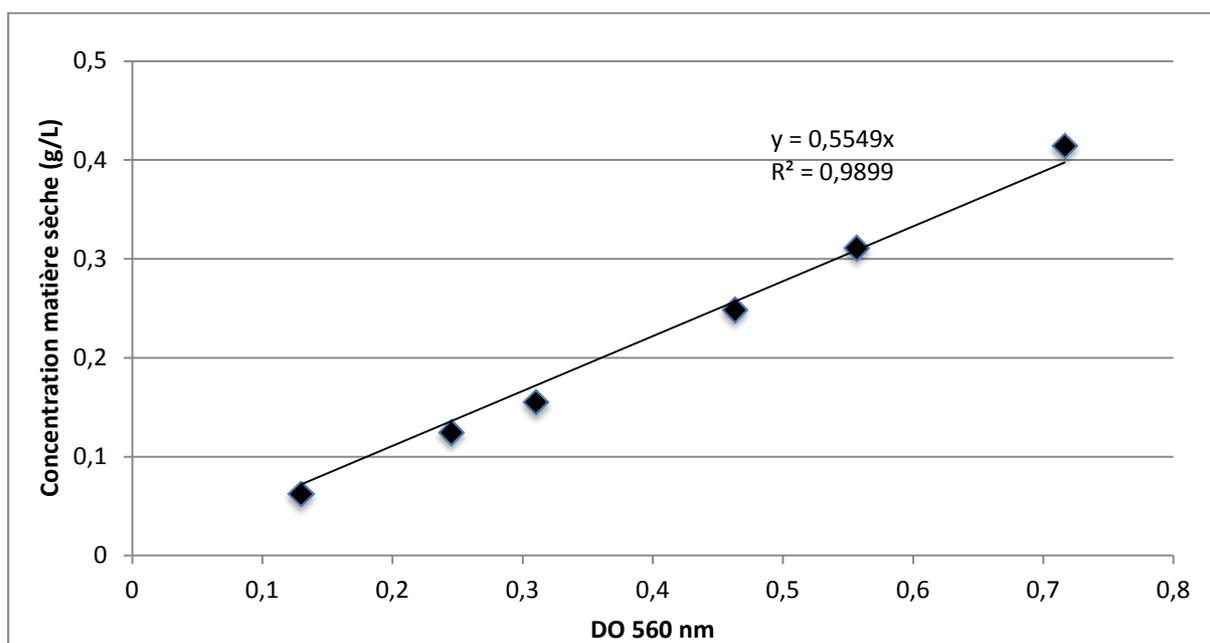


Figure 22. Gamme de linéarité de la mesure de DO au spectrophotomètre à 560 nm pour la levure

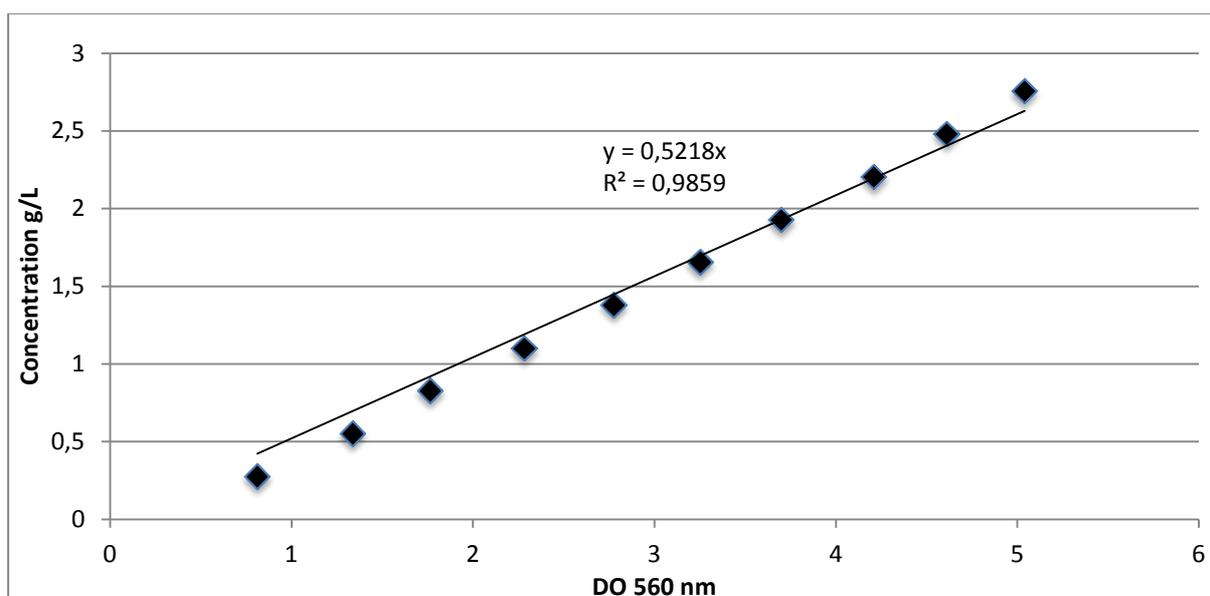


Figure 23. Gamme de linéarité de la mesure de DO au spectrophotomètre à 560 nm pour la bactérie

Pour chaque point de prélèvement, les mesures de DO et de MS sont réalisées en triple en vue de la vérification des valeurs mesurées.

2.2.4.2. Cellule de Malassez/Thoma

Le comptage de la population de spores ou de levures était effectué à l'aide d'un hémocytomètre (ou du nom de son inventeur : cellule de Malassez) au microscope. Cet outil a été développé à la base pour compter le nombre de globules rouges mais il peut aussi servir pour compter d'autres types de cellules dans la mesure où celle-ci ne sont pas trop nombreuses et visibles facilement au microscope. La

chambre de comptage est gravée au laser sous la forme de 20 carrés de taille parfaitement définie. La profondeur entre la lame et la lamelle de la cellule était aussi parfaitement connue, il est ainsi possible de connaître le nombre de cellule dans ce volume défini.

- La méthode de numération sur cellule de Malassez consiste à un comptage de cellules sous un microscope optique. La cellule de Malassez est constituée de 16 grands carreaux. Chaque comptage a été réalisé sur cinq grands carreaux (1 carreau à chaque angle (4 carreaux), et le cinquième carreau de la troisième ligne). De cette manière, il faut compter entre 100 et 150 cellules sur la lame afin d'obtenir un pourcentage d'erreur inférieur à 10% pour la numération. Dans le cas contraire, il est nécessaire de compter des carreaux supplémentaires (si pas assez de cellules) ou de diluer l'échantillon (si trop de cellules). La concentration cellulaire est obtenue grâce à l'équation suivante :

Une fois ce comptage effectué, il reste à appliquer le calcul suivant pour obtenir la population en cellules/mL :

$$\frac{\text{quantité de spores sur la quantité de carrés comptés} \times \text{Facteur de dilution} \times \text{Passage mm}^3 \text{ à mL}}{\text{Surface d'un carré (cm}^2\text{)} \times \text{Profondeur de la lame (cm)} \times \text{quantité de carrés comptés}}$$

Il est aussi conseillé d'effectuer plusieurs comptages sur la même cellule mais aussi sur la deuxième chambre de comptage présente sur la même lame.

2.2.4.3. Dénombrement des cellules sur milieu solide : boîte de Pétri

2.2.4.3.1. Pour le champignon et la levure

Trente neuf grammes de Patatoes Dextrose Agar (PDA, Fluka Analytical) ont été dissous dans un litre d'eau distillée. Le milieu a été porté à ébullition puis stérilisé à 121°C pendant 15 min en flacon Schott de 250 mL.

Des dilutions en cascade sont effectuées afin d'obtenir entre 15 et 150 Unités Formants Colonies (UFC) par boîte de Pétri pour le champignon et entre 30 et 300 UFC par boîte de Pétri pour la levure. Un millilitre de la solution diluée est prélevée et déposé dans une boîte de Pétri (8.5 cm, Greiner Bio-one) puis 9 mL de gélose sont ajoutés. Une fois le mélange effectué les boîtes sont conservées 3 jours à 23°C pour le champignon ou 1 à 2 jours à 25°C pour la levure pour dénombrement final par pointage en UFC / mL.

2.2.4.3.2. Pour la bactérie

Le milieu Plate Count Agar (PCA, CM0463, Oxoid) supplémenté en sel alimentaire pour garder une osmose adaptée est utilisé pour le dénombrement des cellules bactériennes. Il contient 23.5 g/L de PCA dilué avec de l'eau physiologique (NaCl 9g/L) et stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 15 minutes. La composition du milieu gélosé est décrite en Tableau 22.

Des dilutions en cascade sont effectuées afin d'obtenir entre 30 et 300 Unités Formants Colonies (UFC) par boîte de Pétri. Un millilitre de la solution diluée est prélevée et déposé dans une boîte de Pétri (9 cm de diamètre) puis 9 mL de gélose sont ajoutés. Une fois le mélange effectué les boîtes sont conservées 1 jour à 30°C pour dénombrement final en UFC / mL. Trois répétitions de la même dilution sont effectuées pour chaque numération.

Tableau 22. *Composition du milieu PCA + NaCl 9g/L*

Formule commerciale	g/L
Extrait de levure	2.5
Digestion pancréatique de caséine	5.0
Glucose	1.0
Agar	15.0
Chlorure de sodium	9.0
pH 7.0 ± 0.2 à 25°C	

2.2.5. Définition des calculs

2.2.5.1. Calcul des grandeurs de fermentation

Dans le cas d'une fermentation continue, le bilan de la vitesse volumique de la croissance du micro-organisme peut être résumée avec la formule suivante: $r''X = \mu X = \frac{dX}{dt}$ où $X = X_0 e^{-\mu t}$.

D'où : $\ln X = \ln X_0 + \mu \cdot t$ en h⁻¹.

La vitesse spécifique de croissance est donc égale à : $\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{t_2 - t_1}$.

Le rendement de la culture est égal à : $Y_{X/S} = \frac{[X_{final}] - [X_{initial}]}{[S_{initial}] - [S_{final}]}$ en %.

La productivité d'une fermentation est définie par l'équation:

$$P = \frac{[X_{final}] - [X_{initial}]}{[t_{final}] - [t_{initial}]}$$

Elle s'exprime en grammes de biomasse par litre de milieu par heure de culture.

2.2.5.2. Mesure du coefficient de transfert d'oxygène (K_{1a})

Le coefficient de transfert volumique, appelé K_{1a} a été mesuré à l'aide de la méthode dynamique ((Garcia-Ochoa and Gomez 2009) ; (Garcia-Ochoa, Gomez et al. 2010) ; (Scargiali, Busciglio et al. 2014)). Cette technique est basée sur la mesure de la pression partielle en oxygène (PO₂) dans un

milieu par l'absorption de l'oxygène par le micro-organisme à un temps donné. Après coupure de l'arrivée d'air du fermenteur et diminution de l'agitation à 100RPM, la PO₂ diminue due à la consommation de l'oxygène dissous du milieu par le micro-organisme. La consommation d'oxygène peut être donnée par la formule suivante : $(dC_L/dt)_{\text{air off}} = -rx$

Où r = consommation spécifique d'oxygène (h⁻¹)

Et x = Concentration en biomasse (g/L)

Après être passé en dessous de 20% d'oxygène dissous et afin d'éviter trop de changement au niveau du métabolisme du micro-organisme, l'arrivée d'air ainsi que l'agitation sont placés aux points de consigne voulus. La pente obtenue permet d'obtenir la valeur du K_La grâce à la formule suivante :

$$\ln \frac{C_{\text{éq}} - C_l}{C_{\text{éq}} - C_{\text{min}}} = -KLa \times (t_2 - t_1)$$

Où K_La = coefficient de transfert d'oxygène volumique (h⁻¹)

$C_{\text{éq}}$ = pression partielle d'oxygène lorsque le signal est stable dans le milieu (%)

C_l = pression partielle d'oxygène dans le milieu liquide au temps t (%)

C_{min} = pression partielle d'oxygène au moment où l'aération reprend (%)

La précision de la mesure de PO₂ dépend largement du temps de réponse de la sonde PO₂, de la résistance du film liquide et de la dynamique des phases liquide / gaz. Le temps de réponse de la sonde peut être déterminé en transférant la sonde d'une solution de sulfite de sodium (absence d'oxygène) à une autre solution saturée en oxygène (100% de saturation).

La Figure 24 montre un exemple d'un graphique expérimental de mesure du KLa en utilisant la méthode dynamique durant la phase exponentielle à 1.25 vvm et 400 RPM avec la souche *S. carnosus* dans un réacteur de 2L avec les oreilles d'éléphant et un microsparger 40µm.

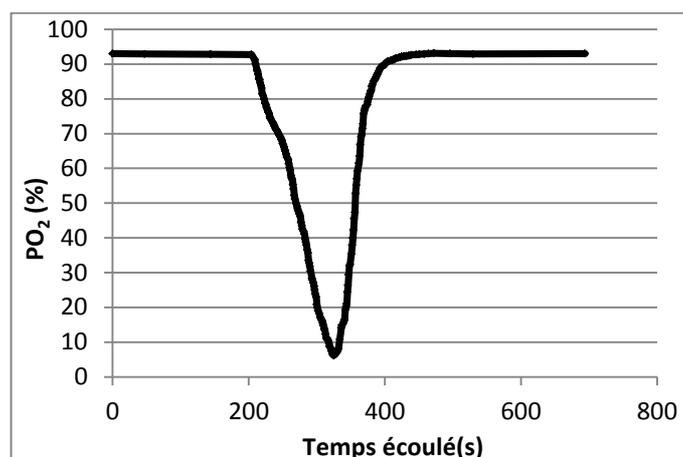


Figure 24. Exemple de mesure expérimentale du KLa durant la fermentation

2.2.5.3. Calcul d'OUR / CPR / QR

Les vitesses de consommation d'O₂ (r_{O_2}) et de production de CO₂ (r_{CO_2}) au cours de la fermentation sont calculées à partir d'un bilan de matière, combinaison de la composition des gaz d'entrée et de sortie, des débits d'entrée/sortie, en prenant en compte les variations des volumes des phases (liquide et ciel gazeux), le pH, la température, la pression et la PO₂ ainsi que la salinité.

La composition des gaz de fermentation est déterminée au moyen d'un système d'analyse de gaz (BCPreFerm, Bluesens). Ce dernier offre des mesures simultanées des compositions en oxygène (O₂) d'une mesure au dioxyde de zirconium et en dioxyde de carbone (CO₂) par spectroscopie infrarouge double longueur d'onde. Cet analyseur de gaz présente d'excellentes caractéristiques concernant la précision, la stabilité à long terme et un temps de réponse rapide. Ce système peut s'adapter à la fois sur un Erlenmeyer spécialement adapté ou directement en sortie de fermenteur.

L'étalonnage de l'analyseur est effectué avant le début de chaque expérimentation et doit être vérifié au moins une fois par mois afin de maintenir la précision optimale de la mesure. Pour l'étalonnage de l'O₂, l'azote est utilisé pour réaliser l'étalonnage zéro alors que le mélange du gaz étalon (5 % CO₂ et 21 % O₂) est utilisé pour effectuer l'étalonnage du gain pour le CO₂.

Le calcul de l'OUR (Oxygen Uptake Rate) et du CPR (Carbon dioxide Production Rate) s'est effectué en pratiquant un bilan gazeux sur le fermenteur. Pour ce calcul, l'accumulation du CO₂ dans le milieu a été volontairement considérée comme constante car nous ne pouvions la mesurer. De cette manière le calcul est le suivant :

$$OUR (g/h) = Q_{air_{in}} \times M_{O_2} \times [O_2]_{in} - \left([O_2]_{out} \times \frac{1 - [O_2]_{in} - [CO_2]_{in}}{1 - [O_2]_{out} - [CO_2]_{out}} \right)$$

$$CPR (g/h) = Q_{air_{in}} \times M_{CO_2} \times \left([CO_2]_{out} \frac{1 - [O_2]_{in} - [CO_2]_{in}}{1 - [O_2]_{out} - [CO_2]_{out}} - [CO_2]_{in} \right)$$

$Q_{air_{in}}$ est le débit d'air en entrée.

M_{O_2} et M_{CO_2} sont respectivement les masses molaires du dioxygène et du dioxyde de carbone.

$[O_2]_{in}$ et $[O_2]_{out}$ sont respectivement les concentrations en dioxygène gazeux en entrée et en sortie.

$[CO_2]_{in}$ et $[CO_2]_{out}$ sont respectivement les concentrations en dioxyde de carbone en entrée et en sortie.

Le quotient respiratoire est défini comme étant le rapport de la vitesse de production CO_2 sur la vitesse de consommation de l' O_2 ; sa formule est donc la suivante : $QR = \frac{CPR}{OUR}$

2.2.5.4. Calcul de la puissance dissipée par mesure du couple

Afin d'obtenir une relation entre le nombre de puissance, N_p , et le nombre de Reynolds, Re , différentes vitesses d'agitation ont été testées pour mesurer le couple nécessaire à cette agitation. La gamme de mesure des vitesses d'agitation se situait entre 200 et 1200 RPM (soit entre 0.33 et 20 RPS). Ces mesures ont aussi été effectuées en présence ou en absence d'aération dans une gamme située entre 0 et 2 vvm (soit une vitesse superficielle de gaz entre 0 et 0.0034 m/s) dans un volume de liquide de 2L. Le fluide utilisé pour ces mesures était de l'eau distillée à 23°C et le gaz injecté était de l'air ambiant.

La vitesse de rotation du moteur d'agitation est mesurée à l'aide d'un tachymètre rotatif avec un capteur photo-électrique avec une précision de +/- 5 RPM.

La puissance dissipée est habituellement calculée de cette manière : $P = N_p \times \rho \times N^3 \times D_i^5$.

Malheureusement, dans notre cas, nous ne pouvions obtenir les données du Nombre de Puissance (N_p) pour notre installation avec nos mobiles d'agitation et diffuseurs de gaz. Bien qu'il était possible d'obtenir, dans la littérature, les données concernant les pales Rushton, nous avons dû effectuer tous les essais nécessaires pour obtenir les données concernant le système oreilles d'éléphant et le système Cell-lift. De plus, l'utilisation d'un couplomètre (Sensel measurement, Vincennes, France), nous a permis d'obtenir non seulement les valeurs du nombre de puissance mais aussi d'étudier le phénomène d'engorgement d'un mobile d'agitation en phase d'aération. La reproductibilité de la mesure de couple était de 0.002 N.m.

Pour ce genre de mesure il est nécessaire d'acquérir des données les plus précises possibles car les valeurs sont généralement relativement bruitées à cause de l'hydrodynamique du fluide en mouvement mais

aussi à cause de la mécanique d'agitation. Pour éviter de prendre en compte les frictions mécaniques dues principalement aux frottements entre l'axe d'agitation et la garniture et donc d'ajouter une erreur à notre mesure, il est nécessaire d'ajouter une correction à ces mesures. Pour corriger ces mesures, nous avons utilisé le système à vide tel qu'il est habituellement utilisé puis nous avons effectué des mesures de couple dans la gamme de mesure que nous comptons utiliser pour le système à plein. Les mesures de couple à vide (τ_0) obtenues pour un fermenteur vide dans notre gamme de mesures étaient les suivantes :

Pour les pales Rushton : $\tau_0 = (\text{N.cm}) = 4\text{E-}5 \times N \text{ (RPM)} + 0.011$	avec un $r^2 = 0.9891$
Pour les oreilles d'éléphant 45°: $\tau_0 = 4\text{E-}5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0052$	avec un $r^2 = 0.9597$
Pour les oreilles d'éléphant 25) : $\tau_0 = 4\text{E-}5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0091$	avec un $r^2 = 0.9834$
Pour le Cell-lift: $\tau_0 = 2\text{E-}5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0104$	avec un $r^2 = 0.9762$

Le calcul de la puissance se réalise alors de cette manière : $P = 2 \times \pi \times N \times (\tau - \tau_0)$

Ces corrections sont essentiellement nécessaires et significatives pour les valeurs basses d'agitation car pour les hautes valeurs elles génèrent un impact moindre ((Junker, Stanik et al. 1998)).

2.2.5.5. Calcul des principales grandeurs d'extrapolation

Différentes grandeurs ont été utilisées pour réaliser une extrapolation la plus précise possible entre les échelles. Ces grandeurs peuvent être des nombres adimensionnels (qui n'ont ni dimensions ni unités explicites d'expression) tels que le nombre de Reynolds, nombre de Froude, nombre de Weber, *etc.* et des nombres qui contiennent des dimensions comme la puissance d'agitation, K_{La} , *etc.*

Afin de définir le régime de l'écoulement d'un fluide dans le réacteur, le nombre de Reynolds (Re) est déterminé d'après la définition suivante ((Roustan, Pharamond et al. 1999)) :

$$Re = \frac{N \times d^2}{\nu}$$

Où $\nu = \mu / \rho$

Re est le nombre de Reynolds

N est la vitesse de rotation (s^{-1})

d est le diamètre du mobile d'agitation (m)

ν est la viscosité cinématique de la solution (m^2/s)

μ est la viscosité dynamique (Pa/s)

ρ est la masse volumique (kg/m³).

La valeur de Re permet de distinguer les trois régimes hydrodynamiques : laminaire, intermédiaire et turbulent.

D'autres valeurs ont pu être déterminées de la même manière et depuis la même référence. Ces données exposées en Tableau 23 et

Tableau 24 Tableau 25, nous ont permis de développer un logiciel d'extrapolation géométrique et non géométrique sur un tableur Microsoft Excel.

Tableau 23. *Calculs des nombres adimensionnels*

Nombres adimensionnels	Symboles	Formules
Nombre d'aération	N_A	$\frac{Q}{N \times D_T^3}$
Nombre de puissance	N_p	$\frac{P_0}{\rho \times N^3 \times D_i^5}$
Nombre de Reynolds	Re	$\frac{N \times D_i^2 \times \rho}{\mu}$
Nombre de Froude	Fr	$\frac{N^2 \times d}{g}$
Nombre de Weber	We	$\frac{\rho \times N^2 \times d^3}{\gamma}$
Gradient de vitesse max	G_{\max}	$K_{\max} \times N$
Gradient de vitesse moyen	G_{moyen}	$K_{\text{moyen}} \times N$

Tableau 24. *Calculs des nombres dimensionnels*

Nombres dimensionnels	Symboles (unités)	Formules
Puissance agitation	P_0 (W)	$N_p \times \rho \times N^3 \times d^5$
Puissance volumique	P_0 / V (W/m ³)	$\frac{P_0}{V}$
Puissance massique	e (W/kg)	$\frac{P}{\rho \times V}$
Vitesse bout de pale	V_p (m/s)	$\Pi \times N \times d$
Couple	C_p (Nm)	$\frac{P_0}{2 \times \Pi \times N}$
Débit de pompage	Q_p (m ³ /s)	$N_q \times N \times d^3$
Débit de circulation	Q_c (m ³ /s)	$1.8 \times N_q \times N \times d^3$
Débit d'entraînement	Q_e (m ³ /s)	$Q_c - Q_p$
Hauteur théorique	H^* (m)	$\frac{N_p}{N_q \times g \times P^2} \times V_p^2$
Q_p/H^*	Q_p/H^* (m ² /s)	$\frac{Q_p}{H^*}$
Temps de pompage	t_p (s)	$\frac{V}{N_q \times N \times d^3}$
Temps de mélange	t_M (s)	$\frac{6 \times \left(\frac{D}{d}\right)^2}{N}$
Echelle moyenne de Kolmogorov	l_K (μm)	$\left(\frac{\nu^3}{\varepsilon_{tot}}\right)^{0.25}$
Cisaillement	t (s ⁻¹)	$\sqrt{\frac{\varepsilon_{tot}}{\nu}}$

Chapitre 3 : Etude préliminaire : cinétique et caractérisation de la performance de 2 souches (levure, bactérie) à l'échelle d'un fermenteur de 2L

Le procédé utilisé en production industrielle chez DSM au démarrage de cette thèse était mené sans régulation de pH et en conditions limitantes en oxygène. Dans ces conditions de culture, les rendements de conversion de substrat et de production de la biomasse sont faibles. De même, les concentrations résiduelles des substrats carbonés sont élevées. La limitation par l'oxygène est due essentiellement à l'utilisation d'un mobile d'agitation dit « centripète » et une aération de surface. Pour remplacer le mobile centripète utilisé par DSM, nous avons comparés plusieurs mobiles d'agitation (Turbines Rushton, mobiles « oreilles d'éléphant » avec deux modes de pompage et le mobile Cell-lift). Les résultats issus de cette comparaison ont permis de sélectionner le mobile d'agitation type « oreilles d'éléphant » comme étant le plus approprié pour assurer un compromis entre une efficacité en termes de transfert d'oxygène et de faibles forces de cisaillement. L'objectif de ce travail est d'une part, de valider ce système en présence de culture de levures et de bactéries, d'autre part, de proposer des améliorations faciles à implanter à l'échelle industrielle sans modifications majeures de l'installation existante.

3.1. Cas de la production de levure : *D. hansenii*.

Pour améliorer le procédé de production de levure utilisé par la société DSM nous avons réalisé successivement les essais suivants :

- Croissance sans limitation en oxygène et sans régulation de pH

- Croissance sans limitation en oxygène et avec régulation de pH
- Croissance sans limitation en oxygène et avec régulation de pH avec un milieu enrichi en source azotée
- Croissance en mode fed-batch.

Ces essais ont été réalisés en présence du mobile d'agitation « oreille d'éléphant » et avec une aération par microsparger 40µm au fond de la cuve. Les résultats obtenus ont été comparés à ceux obtenus dans les conditions utilisées à l'échelle industrielle. Ces résultats sont résumés dans le Tableau 25.

La culture menée avec une régulation de l'oxygène dissous à 50 % de la saturation mais sans régulation de pH est caractérisée par une vitesse spécifique de croissance de 0,16 h⁻¹ et un rendement de conversion de substrat carboné de 44 %. Le sucre résiduel est de 25 g/L. La comparaison de ces résultats aux conditions industrielles montre une légère amélioration en nombre de cellules soit 716 10⁶ cellules contre 500-600.10⁶ par millilitre de milieu de culture. L'arrêt de la croissance avant épuisement de substrat carboné pourrait être attribué à l'effet de pH. Ainsi un essai dans des conditions de régulation de pH et d'oxygène dissous a été réalisé. Dans ces nouvelles conditions, on observe une augmentation de rendement de conversion de sucre (48%), de la biomasse (25,6g/L), de la vitesse spécifique de croissance (0,47 h⁻¹) et de la productivité (0,7g/L/h). Cependant, en dépit de ces améliorations, le sucre n'est pas totalement consommé à la fin de l'essai (4g/L). Ceci pourrait être dû à une limitation par un autre élément dans le milieu, par exemple la source azotée. Pour vérifier cette hypothèse, un milieu enrichi en sulfate d'ammonium (source d'azote) et en chlorure de calcium a été utilisé. Les résultats obtenus ne montrent pas une amélioration du procédé. Le rendement et la vitesse spécifique sont comparables à l'essai précédent. Par contre, on observe une légère diminution des autres critères (productivité, concentration, *etc.*). L'alimentation en fed-batch du bioréacteur n'apporte pas une amélioration significative par rapport à l'essai réalisé avec contrôle de pH et d'oxygène dissous, ce qui est logique puisque cet essai a déjà donné un rendement de 48 %.

En conclusion, le nouveau système d'agitation « oreille d'éléphant » permet d'assurer un bon transfert d'oxygène avec des K_{La} de l'ordre de 305 h⁻¹. La régulation de pH est nécessaire pour cette souche pour assurer une croissance, une productivité et un rendement de conversion maximales. Dans les conditions optimales de la croissance de cette levure, la consommation de l'oxygène est de l'ordre de 0,8 à 1 gramme d'oxygène par gramme de biomasse. Le protocole développé à l'échelle du laboratoire a été appliqué à l'échelle industrielle, ce qui a permis à la société DSM de doubler la concentration en biomasse et d'augmenter la productivité sans perte significative de substrat carboné. Ce procédé peut faire l'objet d'amélioration notamment le développement d'un procédé en fed-batch avec une

alimentation en concentration plus élevée en substrat carboné et une conduite plus fine pour apporter la quantité de sucre en quantité nécessaire et suffisante sans accumulation dans le milieu. L'utilisation du quotient respiratoire comme un critère de contrôle peut être dans un premier temps suffisant pour la conduite du fed-batch.

Tableau 25. Constantes déduites des différents essais effectués sur la souche *D. hansenii*.

Essais réalisés	μ_{max} (g/g/h)	Rendement (%)	Productivité (g/L/h)	Biomasse finale (g/L)	Numération finale (x10 ⁶ cellules/mL)	Sucre résiduel (g/L)	Rendement en oxygène (g/g)
A l'échelle industrielle avant l'étude	NA	NA	NA	NA	500 - 600	25	NA
Batch sans limitation en oxygène et sans régulation pH	0,16	44%	0,3	10,95	716	25	0,8
Batch sans limitation en oxygène et avec régulation pH	0,47	49%	0,7	25,6	1250	4	1,1
Batch sans limitation en oxygène et avec régulation pH avec milieu enrichi en source azotée	0,44	48%	0,5	18,85	1070	0	0,4

3.2. Cas de la culture de bactérie : *S. carnosus*.

La souche *S. Carnosus* est utilisée pour l'affinage des produits carnés grâce sa capacité à métaboliser les nitrates en nitrites et donnant ainsi la couleur caractéristique du produit recherchée par le consommateur. La conversion de nitrate en nitrite se fait par l'intermédiaire de l'enzyme : nitrate réductase. Il est donc impératif d'avoir un procédé qui favorise la production de la biomasse mais aussi le maintien de l'activité enzymatique. Le procédé utilisé par DSM à l'échelle industrielle est mené en limitation d'oxygène due à l'utilisation d'un système d'agitation avec une turbine centrifète et une aération de surface par l'intermédiaire de la formation d'un vortex. Dans ces conditions limitantes en oxygène, la concentration maximale estimée en nombre de cellules par millilitre de milieu est de l'ordre de 10 à 12 milliards de cellules par millilitre de culture à l'échelle industrielle (voir Tableau 26).

Tableau 26. Quantité de cellules obtenues aux différentes échelles de production dans les conditions de référence.

	Levain	2L	900L	10m ³
<i>S. carnosus</i> (10 ⁹ cellules/mL)	2 - 5	14 - 15	15 - 18	10 - 12

L'objectif de ce travail est d'une part, de valider le nouveau système d'agitation type oreilles d'éléphant et de déterminer l'influence de l'oxygène dissous à la fois sur la croissance (biomasse en

g/L) et sur l'activité de la nitrate réductase ; d'autre part, de déterminer les conditions optimales pour trouver un compromis entre la concentration de biomasse et l'activité de l'enzyme les plus élevées.

Pour réaliser ces objectifs nous avons étudié :

- L'effet de l'oxygène dissous sur la croissance et l'activité enzymatique
- L'influence de la composition du milieu (ajout de nitrate de potassium) sur la croissance et l'activité enzymatique.

Ces essais ont été réalisés avec l'agitateur « Oreille d'Eléphant » et avec une aération par sparger au fond de la cuve. Le milieu de culture utilisé est le milieu M21-K100, très riche en deux types d'extraits de levures à raison d'un total de 16,5g/L. la croissance a lieu donc à la fois sur le sucre ajouté au milieu mais aussi sur les autres composants issus des extraits de levures. L'oxygène dissous a été varié entre 0 et 50% de la saturation.

3.2.1. Etude de l'effet des concentrations en oxygène dans le milieu de culture sur la croissance et sur l'activité enzymatique de la souche bactérienne.

Les influences de la concentration de l'oxygène dissous sur la biomasse et l'activité de la nitrate réductase sont résumées successivement sur la Figure 25 et la Figure 26. Ces résultats indiquent un accroissement de la concentration de biomasse en g/L qui augmente au fur et à mesure que la concentration en oxygène dissous augmente (Figure 25). La concentration la plus élevée a été obtenue à 50% d'oxygène dissous. Contrairement à son effet sur la biomasse, l'oxygène dissous mène à une forte réduction de l'activité de la nitrate réductase (Figure 26). À un pourcentage d'oxygène avoisinant le 0% l'activité est maximale et égale à 4 fois celle obtenue à 50%. Des observations similaires d'effets de l'oxygène dissous sur la concentration en biomasse et sur l'activité nitrate réductase ont pu être effectuées sur la souche de *Rhizobium japonicum* par (Lowe and Evans 1964). Cependant, il semblerait que des concentrations en oxygène dissous de 0,1 à 0,2atm auraient des effets bénéfiques sur l'activité nitrate réductase. D'après (Kraft, Strous et al. 2011), les transporteurs membranaires des nitrates sont inhibés en conditions aérobies entraînant une diminution de l'activité nitrate réductase. De plus, le fait d'utiliser l'oxygène en tant qu'accepteur d'électron au lieu des nitrates réduit l'activité de l'enzyme donc sa production par la bactérie.

Compte tenu de ces résultats, il s'avère nécessaire de chercher des conditions opératoires permettant d'assurer un compromis entre ces deux critères.

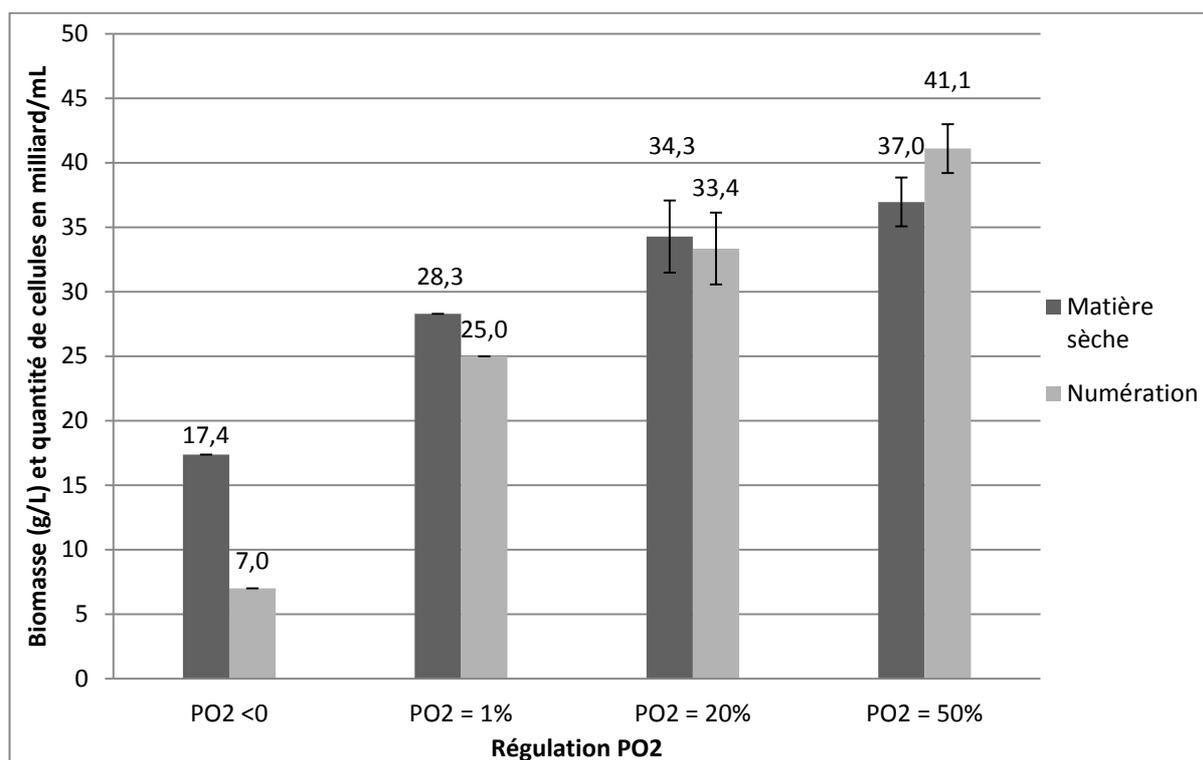


Figure 25. Comparaison de la biomasse et de la numération finale sur boîte de Pétri en fonction de la stratégie d'aération.

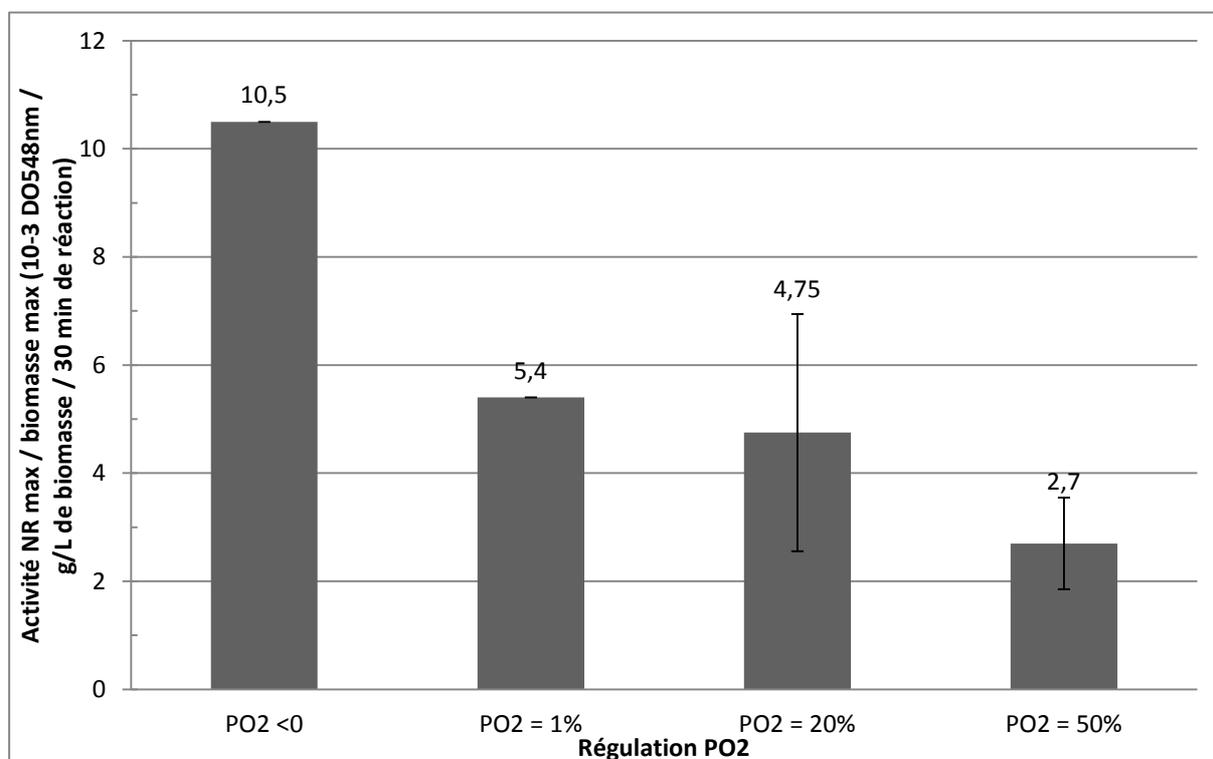


Figure 26. Comparaison activité nitrate réductase rapportée sur la biomasse en fonction de la stratégie d'aération et après lyophilisation

3.2.2. Développement d'un milieu adapté pour compenser la baisse de l'activité enzymatique

L'analyse de la bibliographie relative à l'activité du nitrate réductase indique que l'activité de cette enzyme pourrait être modulée par l'ajout d'une source de nitrate dans le milieu. Or, comme l'ajout d'une source de nitrate pourrait affecter aussi la croissance de *S. Carnosus*, nous avons vérifié l'effet de l'ajout de nitrate de potassium à raison de 3,33g/L sur la concentration finale en biomasse. La Figure 27, montre que l'ajout d'une source de nitrate a des effets négligeables sur la concentration finale en biomasse de la souche (matière sèche). La légère différence observée à 1% d'oxygène dissous pourrait s'expliquer par le fait que la régulation à 1% est très délicate et par conséquent qu'il est difficile de comparer les deux essais à ce niveau d'oxygène. On remarque aussi, que la présence de nitrate de potassium n'affecte pas l'augmentation de la concentration de la biomasse en g/L avec l'augmentation de l'oxygène dissous dans le milieu. En revanche, l'ajout du nitrate de potassium semble avoir un effet sur le nombre de cellules viables (nombre de cellules/mL). En effet, comme il est indiqué sur la Figure 28, une nette différence est observée en terme de nombre des cellules entre les essais réalisés avec la présence du nitrate de potassium et les essais sans ajout et ceci quel que soit la concentration d'oxygène dans le milieu.

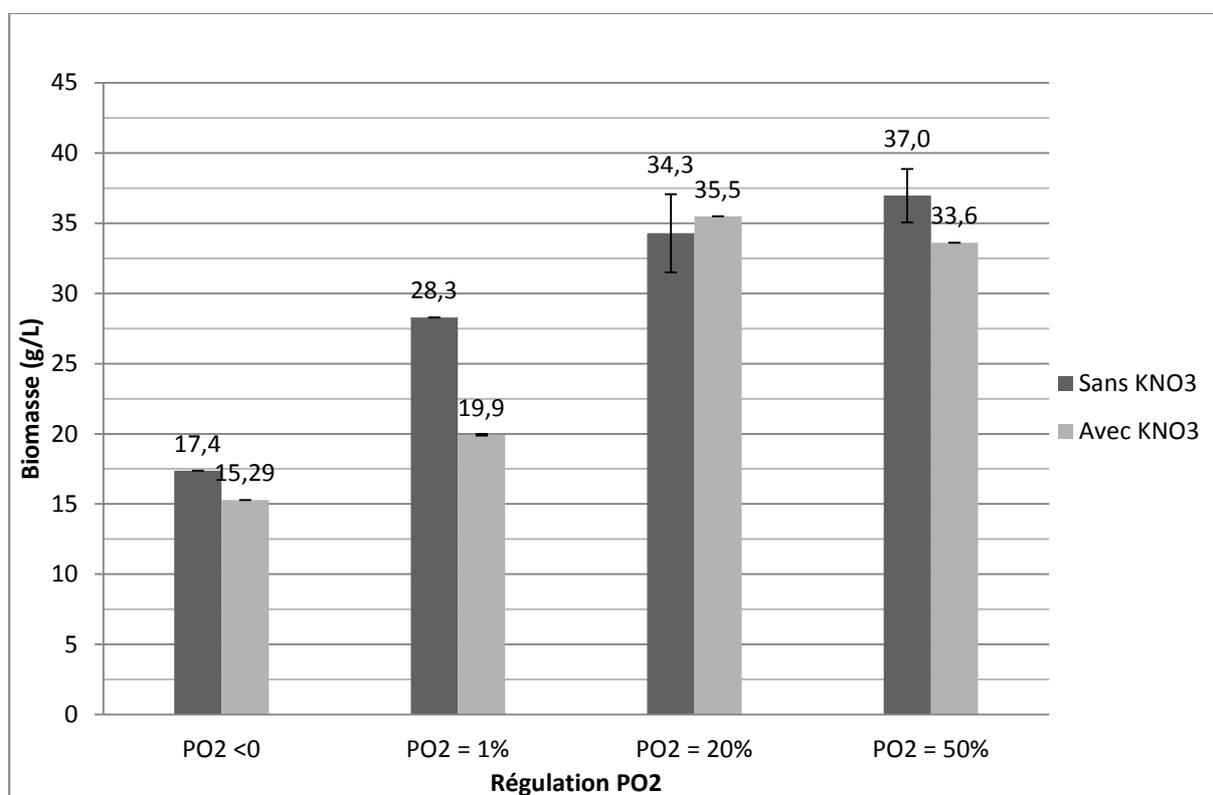


Figure 27. Comparaison biomasse finale en fonction de la stratégie d'aération avec et sans ajout de nitrate de potassium.

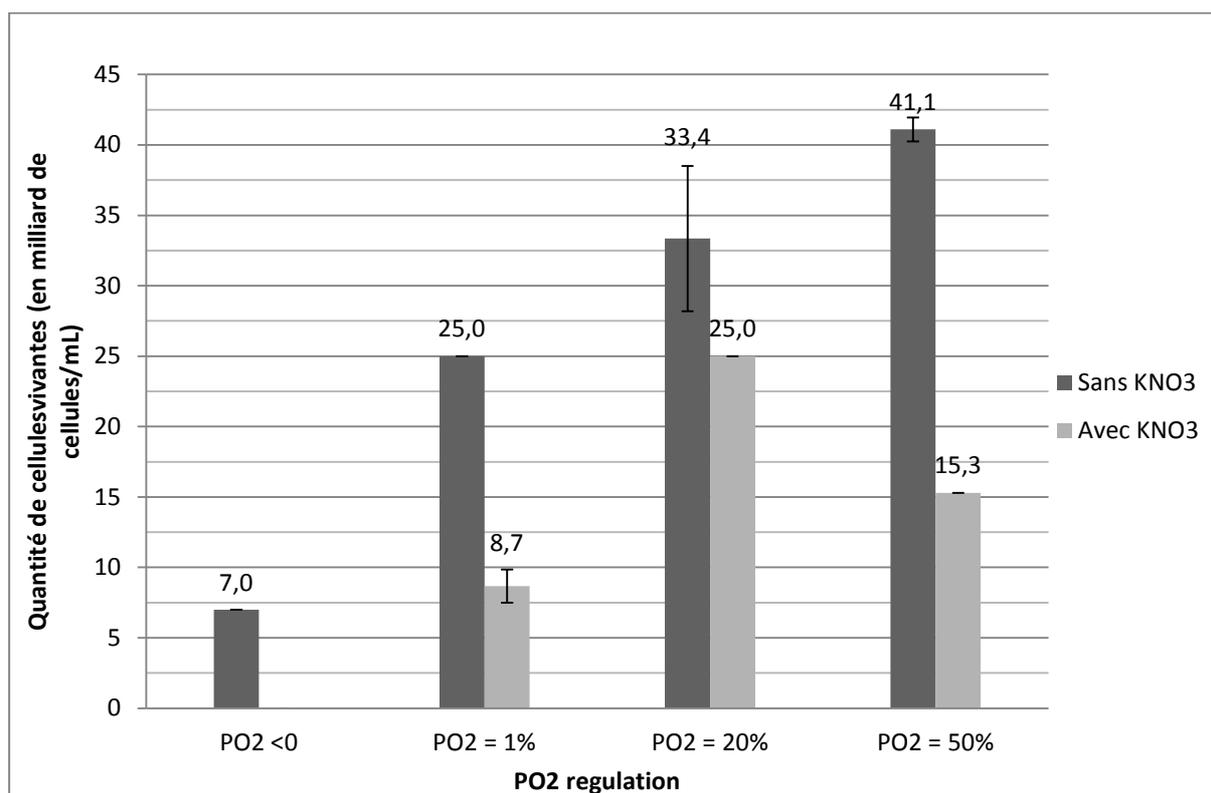


Figure 28. Comparaison numération finale sur boîte de Pétri en fonction de la stratégie d'aération avec et sans ajout de nitrate de potassium.

Parallèlement, à l'effet sur la biomasse et la viabilité cellulaire, nous avons analysé l'effet de l'ajout de nitrate de potassium sur l'activité enzymatique pour les différentes concentrations d'oxygène dissous dans le milieu testées dans ce travail. Les résultats obtenus sont donnés dans la Figure 29. On constate que l'ajout de nitrate de potassium entraîne une augmentation significative de l'activité enzymatique mais n'empêche pas sa chute accentuée avec l'augmentation de la concentration d'oxygène dissous. L'activité la plus élevée est observée quand l'oxygène dissous est régulé autour de 0 % de saturation. Ces résultats indiquent qu'il est possible de compenser la chute de l'activité enzymatique par ajout d'une source de nitrate. Des résultats similaires ont été observés par (Neubauer and Götz 1996) autant au niveau de la réduction de la biomasse que l'augmentation de l'activité nitrate réductase par l'ajout de 20mM (1,24g/L) de nitrates.

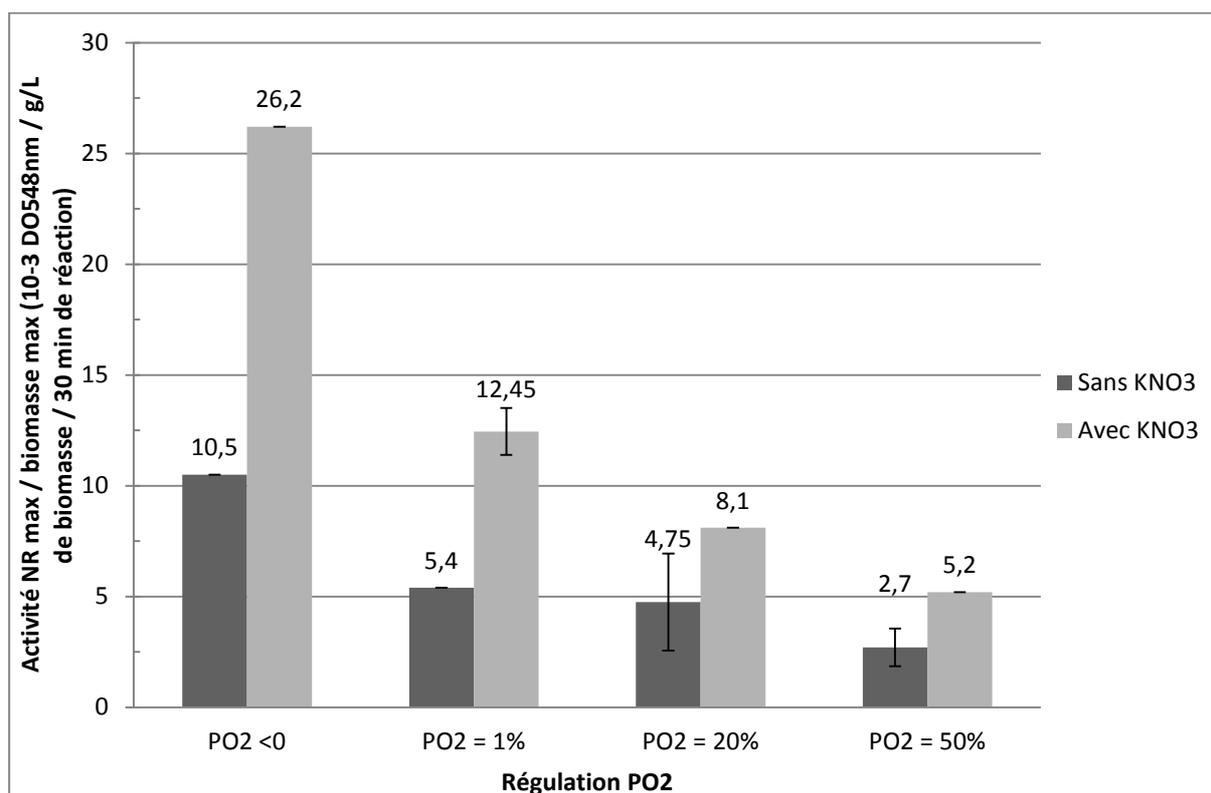


Figure 29. Comparaison activité nitrate réductase rapportée sur la biomasse en fonction de la stratégie d'aération avec et sans ajout de nitrate de potassium.

La limitation en oxygène affecte aussi la consommation d'ammoniac utilisée pour la régulation du pH. En effet, on observe (Figure 30) qu'en cas de limitation par l'oxygène, la consommation en ammoniac est beaucoup plus élevée soit 60% supérieure que lorsque l'oxygène n'est pas un facteur limitant. En revanche, il n'y a aucun effet de l'ajout du nitrate de potassium sur cette consommation pour un niveau d'oxygène dissous donné. Cette consommation en ammoniac supérieure en conditions limitantes en oxygène serait probablement due à un besoin plus important en source azotée pour la production d'enzymes comme la nitrate réductase ou à une production plus importante en acides organiques par le micro-organisme.

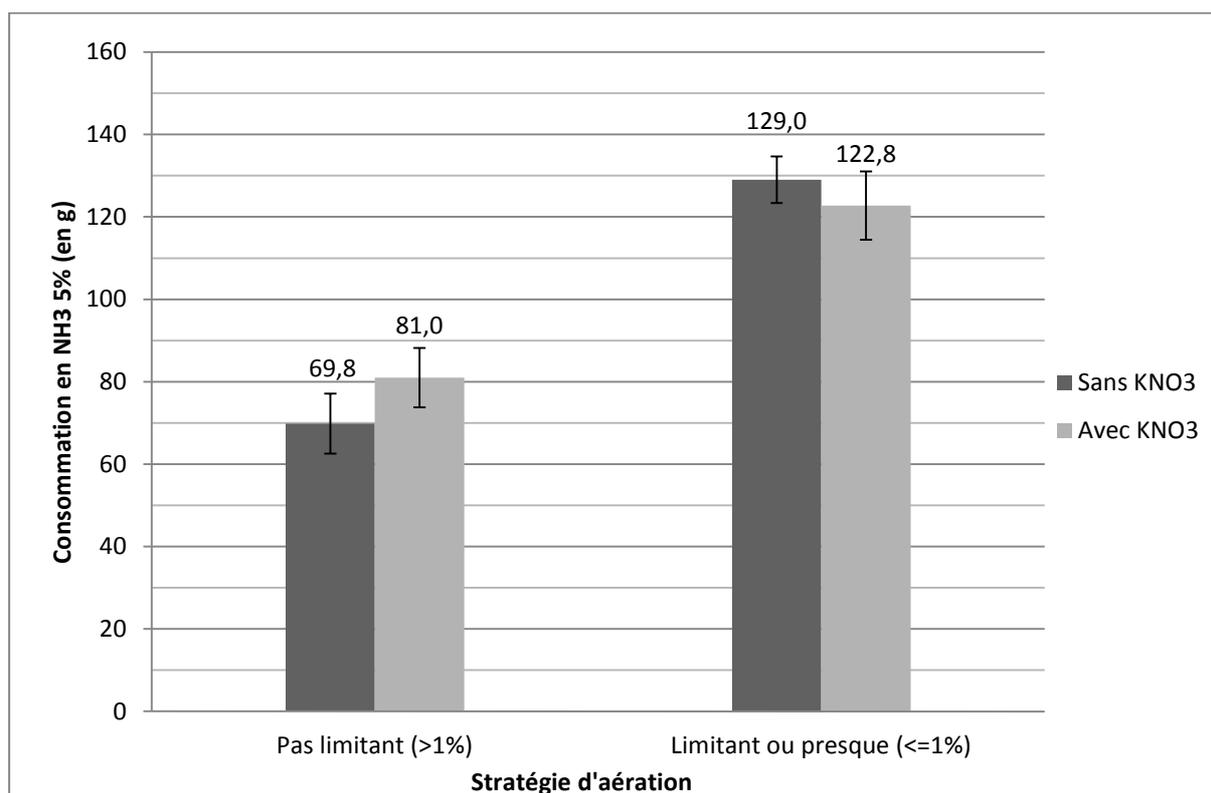


Figure 30. Comparaison des consommations totale en fin de batch en ammoniac 5% en fonction de la stratégie d'aération (sans limitation en oxygène dissous avec limitation) sans ajout de nitrate de potassium dans le milieu.

Conclusion

- Le système développé oreille d'éléphant permet d'assurer un bon transfert d'oxygène avec un K_{La} de l'ordre de $300h^{-1}$.
- L'augmentation de l'oxygène dissous favorise la croissance mais entraîne une réduction de l'activité du nitrate réductase qui est responsable dans le processus de la dégradation de nitrate en nitrite. Cette activité est importante pour l'application industrielle de la souche *S. Carnosus*.
- L'ajout dans le milieu d'une source de nitrate atténue l'effet de l'oxygène sur l'activité enzymatique, mais il semble affecter la viabilité cellulaire.
- Un compromis entre effet de l'oxygène sur la biomasse et effet du nitrate potassium est à trouver en fonction de l'activité minimale souhaitée dans le produit final à commercialiser.

Chapitre 4 : Mise au point d'un procédé de production de spores en milieu liquide

Au sein de la société DSM et ce jusqu'à ces travaux, les spores de *Penicillium* étaient produites sur des milieux dits « solides » composés de gélose PDA dans des boîtes de Roux. L'objectif de cette étude était de réaliser un transfert de ce milieu solide vers un milieu liquide en fermenteur. En effet, la procédure de production en milieu solide présente différents inconvénients : elle nécessite énormément de main d'œuvre, un contrôle des atmosphères des salles d'incubation (en température et en humidité), elle demande un long temps de maturation (30 jours) et induit des coûts de renouvellement de Boîtes de Roux importants. De plus, elle présente des risques de contaminations.

La culture en milieu liquide présente quant à elle beaucoup plus d'avantages : elle est plus facile à automatiser, à extrapoler et nécessite des temps de fermentation beaucoup plus courts (4-5 jours). Il n'existe par contre, que très peu de références pour la production de spores en milieu liquide.

Pour maîtriser une culture de champignon en milieu liquide, il est nécessaire de trouver les conditions opératoires idéales pour chaque phase de ce procédé : phase de germination, phase de croissance végétative, phase de sporulation. En effet, chaque phase a des besoins spécifiques et l'optimisation de chacune conditionne la réussite de la phase suivante.

Les travaux réalisés dans cette thèse sont focalisés sur l'effet du milieu, du pH, de l'oxygène dissous et de la température. Deux modes de mise en œuvre du procédé ont été expérimentés ; il s'agit de la mise en œuvre en mode discontinu et en mode semi-continu (fed-batch).

4.1. La culture de champignon filamenteux en batch

*4.1.1. Choix du milieu de culture pour la production de spores par *P. candidum**

Plusieurs études ont été effectuées par le personnel du laboratoire de recherche et développement du site de La Ferté-sous-Jouarre (LFSJ) sur les milieux de culture pour la production de spores par la souche *P. candidum*. Ces travaux ont été menés essentiellement en Erlenmeyers. Ces travaux

préliminaires ont concernés la température, l'aération, la méthode de stérilisation, le taux d'inoculum et la nature de la source carbonée.

Ainsi, différentes sources de carbone ont été testées : fructose, tréhalose, glycérol, dextrose, maltose, saccharose, lactose et maltodextrine. Des combinaisons de sources de carbone ont aussi été expérimentées mais le fructose apparait comme la source carbonée la plus adaptée à la culture de *P. candidum*. De même, différents taux d'inoculum ont été testés de 1.10^5 à 2.10^6 spores/mL Il en ressort qu'un taux d'inoculum de 2.10^6 spores/mL est souhaitable afin de respecter un ratio quantité de spores/mL sur quantité de substrat disponible assez élevé pour éviter une croissance soit sous forme de pelotes soit sous forme de long mycélium qui ne donnera aucunes spores. Les conditions de stérilisation du milieu jouent aussi un rôle important particulièrement à cause de risque de précipitation de certains éléments du milieu comme le chlorure de calcium. Le protocole retenu consiste à stériliser d'une façon séparée le chlorure de calcium pour minimiser le risque de précipitation.

En conclusion, ces travaux ont permis de sélectionner un milieu ayant la composition indiquée dans le Tableau 6. Le taux d'inoculum a été fixé à 2.10^6 spores/mL. Dans les conditions testées en Erlenmeyers le nombre de spores ne dépasse pas 120.10^6 .

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à l'ajustement de ces conditions opératoires pour augmenter le nombre de spores à au moins 130.10^6 (objectif industriel) et surtout augmenter la reproductibilité des essais. Les facteurs qui ont été étudiés sont : la température, le pH, l'oxygène dissous, et le mode de conduite de la fermentation.

4.1.2. Courbes cinétiques types de la croissance de *P. candidum*

Des cinétiques types de consommation des substrats (D-glucose, acétate de sodium, azote soluble) et de l'évolution de la matière sèche et de spores sont données dans la Figure 31 et la Figure 32. On observe une première étape de 25 à 30h caractérisée par une absence de consommation de substrats et correspondant au gonflement des spores et au début de la germination ; suivie par une étape de germination et de production de mycélium pendant la consommation de l'azote soluble et de l'acétate de sodium jusqu'à leur épuisement. L'épuisement de ces deux substrats déclenche l'étape de sporulation avec une consommation de glucose. L'arrêt de la phase sporulation correspond à l'épuisement total du glucose. Ces résultats indiquent que le démarrage de la sporulation est initié par une carence en azote. Le rôle de l'azote a été déjà discuté dans la littérature. En effet, (Vézina, Singh et al. 1965) ont observé aussi que la sporulation est liée à l'épuisement de la source azotée. De plus, (Morton 1960) ajoute que cet effet peut être réversible en ajoutant un milieu neuf avec une source

azotée. Ces profils de croissance et de consommation des substrats sont observés pour toutes les manipulations réalisées dans le cadre de ce travail.

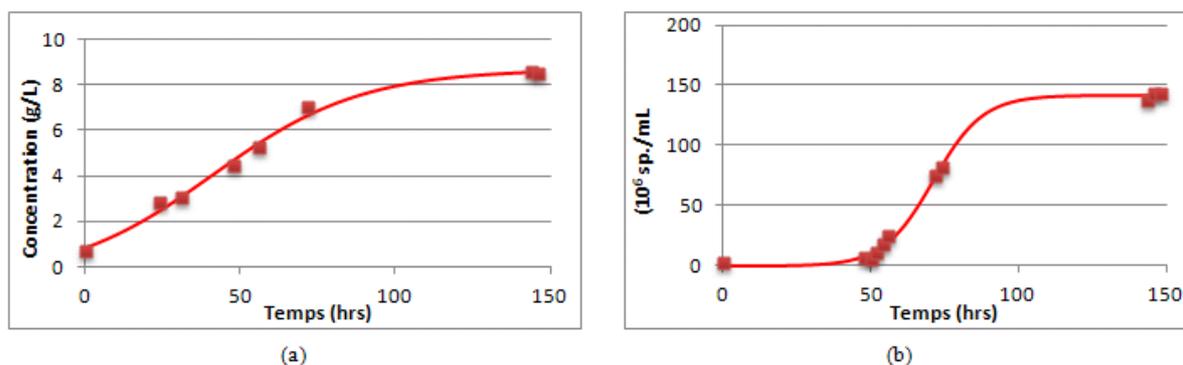


Figure 31. Cinétiques matière sèche et quantité de spores pour un batch avec choc pH (batch témoin DSM). (a) concentration en matière sèche en fonction du temps ; (b) concentration en spores (en millions par mL) en fonction du temps.

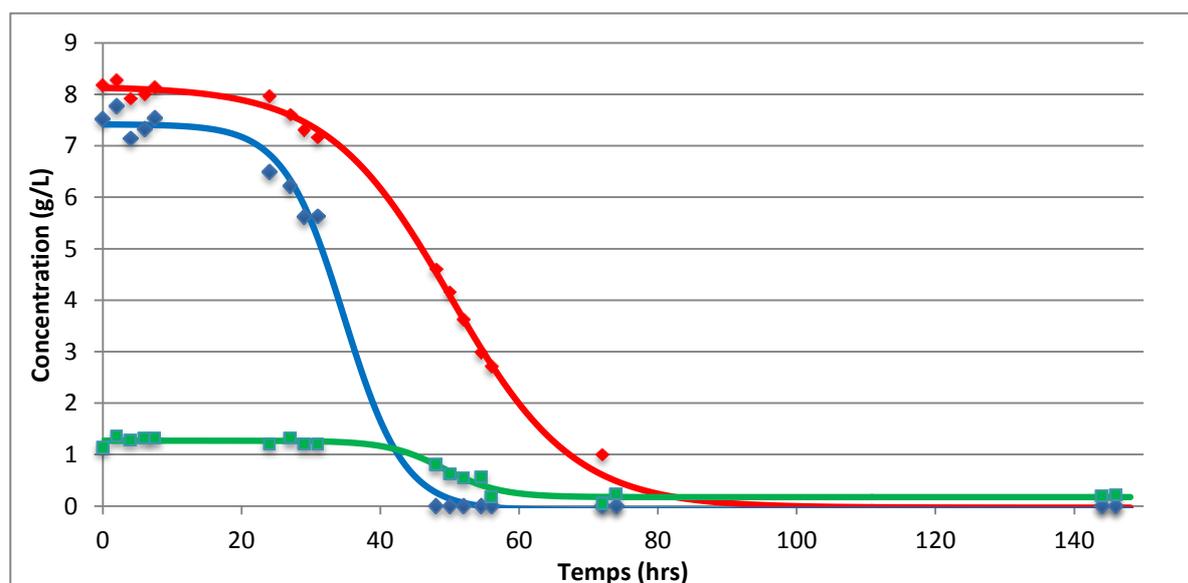


Figure 32. Cinétiques de consommations du dextrose et de l'acétate de sodium pour un batch avec choc pH en fonction du temps (batch témoin DSM). (bleu) concentration en acétate de sodium ; (rouge) concentration en dextrose ; (vert) azote soluble.

4.1.3. Effets de l'eau sur la croissance et la sporulation

L'étude bibliographique a montré que les champignons sont très sensibles à des faibles variations dans la composition du milieu notamment la variation en manganèse, en calcium, en magnésium, en fer et les oligoéléments ((Papagianni 2004)). Etant donné que des expérimentations étaient prévues sur les sites de Nancy et de LFSJ et que la composition des eaux de ces deux localités est différente (Tableau 27), il a été nécessaire de tester l'effet de la qualité de ces eaux sur la production de spores en milieu liquide et de la comparer à l'eau Milli-Q. Ainsi, des milieux de culture ont été préparés à partir des

eaux de ville de LFSJ, de Nancy et de l'eau déminéralisée (Milli-Q). Ces milieux ont été ensemencés à raison de 2.10^6 spores/ml et incubés en Erlenmeyer à 23°C. A la fin de la culture, le nombre de spores obtenu est dénombré et est donné dans la Figure 33. On observe une variation significative entre les trois eaux testées. Les meilleurs ont été obtenus avec l'eau de LFSJ. Ce facteur est donc à prendre en compte pour l'étude de la production de spores par *P. candidum*.

Tableau 27. Composition des eaux de ville de LFSJ (entre 2004 et 2006 et en 2007) et de Nancy (2011).

Lieu	LFSJ		Nancy
	2004 - 2006	2007	2011
pH	7,4	NA	8,3
Calcium	102	96,07	46
Chlorures	21	NA	19
Magnésium	14	13,97	7,2
Potassium	2,5	3,51	2
Sodium	8,53	10,13	17
Manganèse	30	<10	NA
Sulfates	NA	NA	67
Ammonium	0	NA	<0,005
Nitrates	5,8	NA	6
Nitrites	0	NA	<0,01
Bore	46,67	NA	NA
Fer	1,73	NA	NA

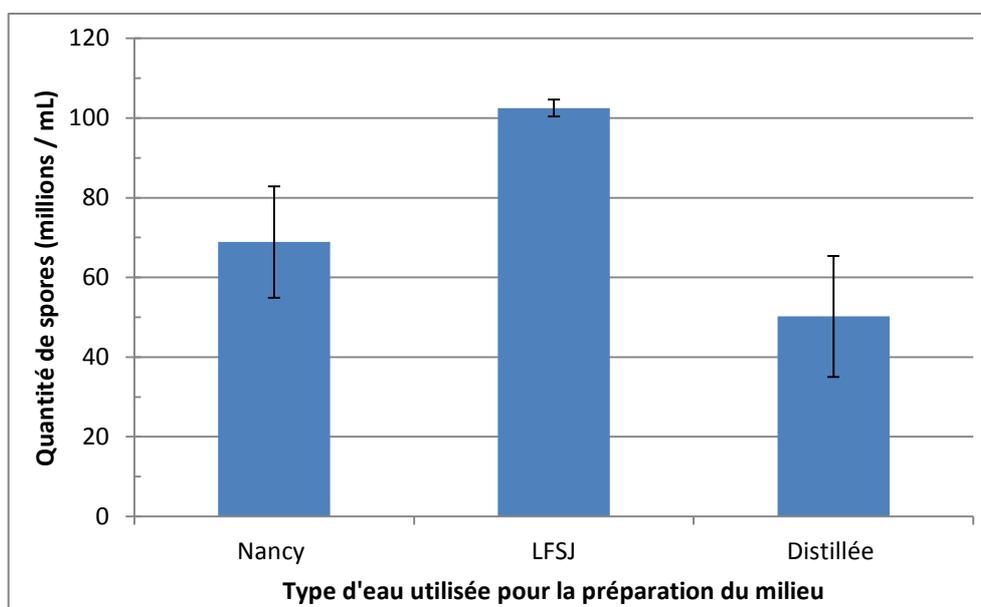


Figure 33. Effet du type d'eau utilisée pour la préparation du milieu sur la quantité finale de spores.

4.1.4. Effets de la température sur la croissance et la sporulation

Pour mettre en évidence l'effet de la température, des essais ont été réalisés à 23°C, 25°C, 27°C et 30°C en Erlenmeyer agité. La Figure 34 résume les résultats de ces essais. On constate que la température optimale de cette souche semble être de l'ordre de 25°C. En revanche, une température de 30°C paraît fatale pour cette souche, car aucune croissance n'a été observée. L'effet de la température a été déjà rapporté dans la littérature. (Bockelmann, Portius et al. 1999) indiquent qu'à une température de 29°C la croissance de *P. candidum* est bloquée. Ces auteurs indiquent aussi qu'à 23 - 25°C le degré de ramification de cette souche est plus important qu'à 27°C et que la température optimale pour la production de spores est de 25°C comparable aux résultats issus de nos travaux. Un choc thermique en fin de sporulation entraîne une légère augmentation du nombre de spores formées. On passe ainsi de 115.10⁶ spores/mL à 129.10⁶ spores/mL.

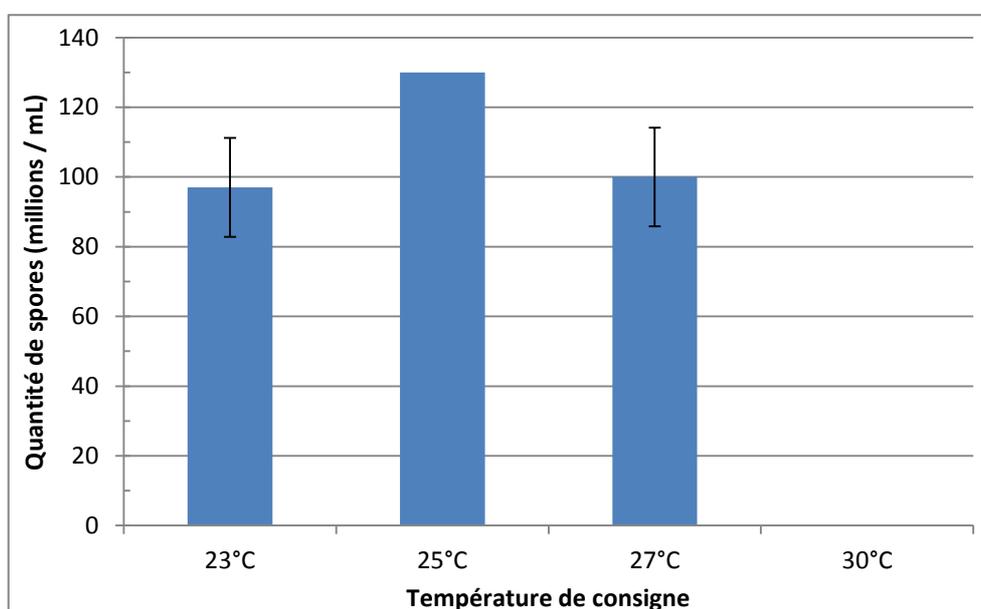


Figure 34. Effet de la température de consigne sur la production de spores.

4.1.5. Effets de l'oxygène dissous sur la croissance et la sporulation

L'oxygène dissous affecte la croissance et la morphologie des champignons. En effet, ((Bockelmann, Portius et al. 1999)) ont rapporté qu'une valeur de PO₂ supérieure à 10 - 15% de la saturation engendrerait une croissance sous forme de pelote, ce qui entraîne une absence totale de germination et par conséquent, de formation de spores. Des essais en Erlenmeyers dotés de chicanes favorables au transfert d'oxygène et d'autres, en Erlenmeyers sans chicanes moins favorables au transfert d'oxygène, ont montré que la présence de chicanes favorise la formation de pelotes alors qu'en absence de chicane, c'est plutôt la forme filamenteuse recherchée pour la production de spores qui est dominante. Ces résultats ont été aussi confirmés à l'échelle du fermenteur régulé en oxygène dissous. Pour le reste des travaux l'oxygène dissous a été fixé à 10% par le contrôle de l'agitation.

4.1.6. Effets du pH sur la croissance et la sporulation

L'effet de pH peut être exercé au niveau de chaque phase de la culture de champignon (germination, croissance végétative et sporulation). Pour étudier cet effet nous avons réalisé d'une part, des essais à différents pH maintenus constants et d'autre part, nous avons appliqué différents profils de pH pour les trois phases de la fermentation. Les résultats obtenus sont comparés à une fermentation de référence sans contrôle du pH.

Cas du pH laissé libre puis régulé à pH 5.6 pour la sporulation :

Au démarrage de la fermentation le pH est égal à 6,2 (pH du milieu). Le pH augmente progressivement jusqu'au point consigne désiré et ensuite il est régulé à ce point par ajout d'acide ortho-phosphorique à 5%. Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 28. Ces résultats indiquent que sans contrôle du pH le nombre de spores formées est très faible (24.10^6 sp./mL). Lors de cet essai le pH monte progressivement pour atteindre 8 ; puis le pH se stabilise à cette valeur (Figure 35a). Les meilleurs résultats ont été obtenus avec un pH régulé à 6,5 avec 157.106 cellules /ml. Nous avons également réalisé un essai où le pH a été laissé sans contrôle jusqu'à 36h, c'est à dire jusqu'à la fin de la phase végétative puis on a baissé brusquement le pH à 5,6 (choc pH, Figure 35b). Dans ces conditions le nombre de spores est comparable à un pH régulé à 6,5 - 7. Ces résultats indiquent qu'il est essentiel de maintenir le pH inférieur ou égal à 7 pendant la phase de sporulation. L'effet de pH peut être attribué à son effet sur la solubilité du chlorure de calcium. En effet, nous avons étudié la solubilité de cet élément à différents pH (Tableau 28) et on a observé que le ratio (volume précipité / volume total) diminue considérablement pour les pH élevés. Ainsi, il chute à moins de 50% à pH 7 alors qu'il est de 82% pour les autres pH testés. L'implication du chlorure de calcium dans le processus de sporulation a été rapporté par (Bockelmann, Portius et al. 1999) ; (Morton 1961) ; (Pitt and Poole 1981) et (Youatt 1993). Ces auteurs indiquent qu'il est nécessaire d'optimiser la concentration en ions Ca²⁺ afin d'obtenir un maximum de spores en fin de fermentation. De plus, l'absence de ces ions dans le milieu de culture entraîne une absence de sporulation.

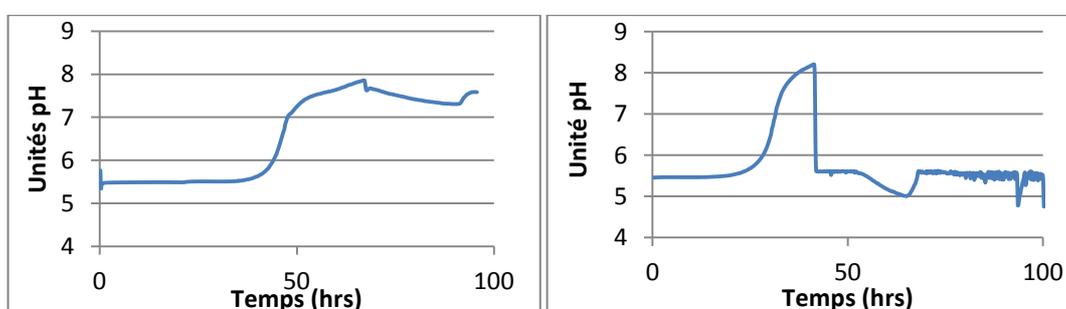


Figure 35. Evolution du pH lors des batch avec pH libre et batch avec choc pH.

Tableau 28. Production de spores par *P. candidum* avec différents points de consigne de pH constants.

Essais pH constants	5,6	6,5	7	pH libre	Choc pH
---------------------	-----	-----	---	----------	---------

Résultats (10 ⁶ sp./mL)	97,5 ±17%	157	150 ±1%	24	146,3 ±7%
Solubilité CaCl ₂	82%	82%	47%	NA	NA

Cas de l'application de profils variables selon la phase de la fermentation :

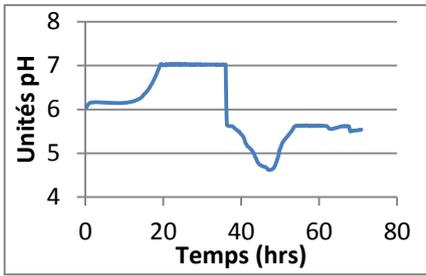
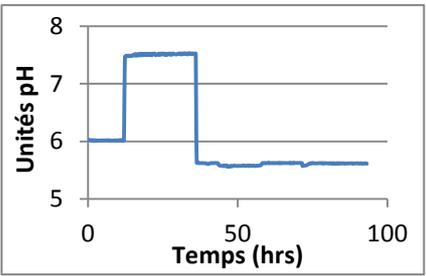
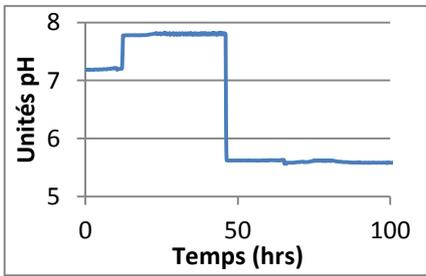
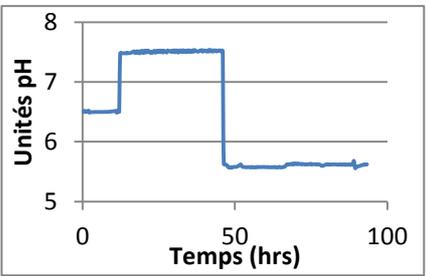
Les résultats obtenus précédemment semblent indiquer que l'étape de gonflement et de développement du mycélium ait besoin d'un pH relativement neutre ou légèrement basique alors que la phase de sporulation aurait besoin d'un pH plutôt acide. Pour vérifier cette constatation nous avons testé différents profils de pH avec des paliers fixés à 7 ; 7,2 ; 7,5 et 7,8 pour l'étape de germination et la croissance végétative, des paliers fixés à 5,6 ou non contrôlé pour l'étape de sporulation. Ces différents profils sont résumés dans le tableau 3. Les résultats obtenus indiquent que le pH idéal doit être maintenu à 7,5 pour la phase de croissance végétative et à 5,6 pour la phase de sporulation. Dans ces conditions plus de 209.10⁶ spores / mL ont été obtenues. En absence de régulation de pH, pour la phase sporulation, le choc pH est suivie par une baisse jusqu'à 4,8 puis une remontée et une stabilisation à 5,6. Cette chute de pH pourrait être attribuée à l'effet du pH sur la solubilité du gaz carbonique et par conséquence sur l'acidification du milieu. En effet, selon le pH du milieu, le CO₂ se présente sous trois formes : $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H_2CO_3 \leftrightarrow HCO_3^- + 2H^+$ dont le pKa est présenté en Tableau 29.

Tableau 29. pKa des formes de CO₂.

pKa des couples	
CO ₂ / HCO ₃ ⁻	6,35
HCO ₃ ⁻ / CO ₃ ²⁻	10,3

En conclusion, la production de spore par la souche *P. Candidum* est maximale avec un pH maintenu constant à 7,5 pour la phase de croissance végétative et constant à 5,6 pour la phase de sporulation. Le choc pH est nécessaire pour initier cette sporulation. Dans ces conditions la production de spores est reproductible mais elle est affectée par la qualité de l'inoculum. En effet, il est nécessaire d'avoir une maturité minimale pour assurer une germination adéquate. Ce temps de maturation doit être égal à au moins 5 jours.

Tableau 30. Production de spores par *P. candidum* avec différents profils de pH.

Essais	7 puis 5,6 à 36h	6 puis 7,5 à 12h puis 5,6 à 36h
Profil pH		
Résultats	195. 10 ⁶ sp./mL	209. 10 ⁶ sp./mL
Essais	7,2 puis 7,8 à 12h puis 5,6 à 46h	6,5 puis 7,5 à 12h puis 5,6 à 46h
Profil pH		
Résultats	64.10 ⁶ sp./mL	160. 10 ⁶ sp./mL

Nous avons aussi testé un double choc à la fois de température mais aussi de pH pour déclencher la phase de sporulation. Ce double choc a permis d'obtenir 218.10⁶ spores/mL. Il s'avère intéressant de combiner ces deux effets pour une production maximale de spores.

4.2. La culture de champignon filamenteux en fed-batch

Les objectifs de l'alimentation en semi continu est d'augmenter le nombre de spores en fin de culture soit en allongeant la phase de culture végétative soit en en allongeant la phase de sporulation soit les deux à la fois. L'ajout d'un milieu identique à celui de départ à la fin de la phase de sporulation lorsque le glucose devient limitant entraîne un arrêt de la sporulation. Ainsi, pour allonger la phase de sporulation l'alimentation a été réalisée par un milieu contenant 20 g/l de D-glucose et 0,6 g/l du chlorure de calcium et pour favoriser la phase végétative, le fermenteur a été alimenté durant cette phase par du sulfate d'ammonium et de l'acétate de sodium à raison de 46g/L et de 60g/L respectivement ; ces deux substrats sont essentiels pour ces phases. Trois stratégies ont été testées pour le contrôle du débit d'alimentation :

- Une alimentation avec un profil de débit basé sur la vitesse de consommation de l'acétate de sodium ou du glucose

- Une alimentation basée sur le contrôle de l'oxygène dissous à 10% de la saturation par l'intermédiaire de la vitesse d'agitation,
- Une alimentation basée sur le contrôle de la vitesse de consommation de l'oxygène (OUR), cette consommation est calculée en ligne à partir des bilans gaz.

Le démarrage de la fermentation se fait en batch avec un 1L de milieu et selon l'objectif visé, croissance végétative ou sporulation, 1L de milieu avec la composition appropriée est ajoutée.

Les résultats et les observations issus de ces essais sont résumés dans le Tableau 31, la Figure 36 et la Figure 37. Ces résultats indiquent que la stratégie de régulation basée sur la consommation en substrat et l'alimentation avec les substrats appropriés pendant les 2 phases (végétative et de sporulation) permet d'aboutir au nombre de spores le plus élevé ($110 \cdot 10^6$ sp./mL). Les régulations se basant soit sur la PO₂ soit sur l'OUR donnent des résultats toujours inférieurs. Ces essais préliminaires sont intéressants mais la réussite de cette stratégie nécessite une étude plus précise de chaque phase et des investigations poussées du point de vue des voies métaboliques pour définir la stratégie la plus appropriée en termes de composition du milieu, du profil de l'alimentation et du moment idéal de l'ajout. L'alimentation en solutions plus concentrées est un autre élément à considérer pour éviter les phénomènes de dilution.

Tableau 31. Production de spores par *P. candidum* en fed-batch.

Stratégies de régulation	Milieu neuf	Phase sporulation (D-glucose + CaCl ₂)	Phase végétative (acétate de sodium + sulfate d'ammonium) + Phase sporulation (D-glucose + CaCl ₂)
Régulation sur la consommation de substrat (observation)	$50 \cdot 10^6$ sp./mL (stop croissance)	$76 \cdot 10^6$ sp./mL	$110 \cdot 10^6$ sp./mL (beaucoup conidiophores)
Régulation sur la PO ₂ (observation)	NA	$54 \cdot 10^6$ sp./mL	NA
Régulation sur l'OUR (observation)	NA	$38 \cdot 10^6$ sp./mL (longs filaments)	$97 \cdot 10^6$ sp./mL (bonne croissance)

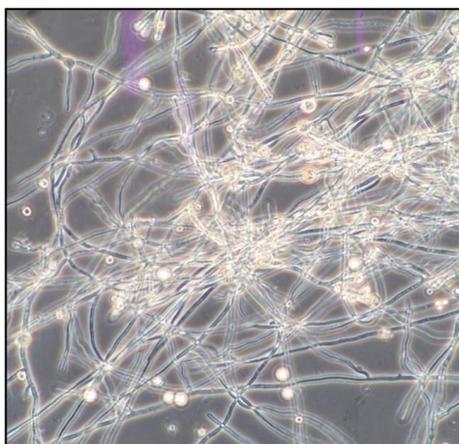


Figure 36. Photographie au microscope (x40) des longs filaments de mycélium après un ajout trop important en substrat.

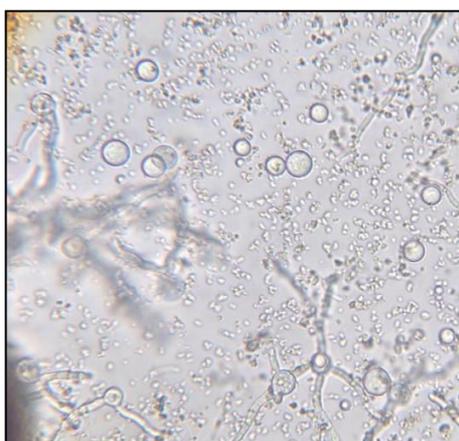


Figure 37. Photographie au microscope (x40) de spores gonflées et de mycélium en cours de croissance en fed-batch.

Conclusion :

- Le système développé « oreilles d'éléphant » permet la production de spores en limitant le cisaillement et en assurant un transfert adéquat de l'oxygène.
- La production de spores passe par l'optimisation des facteurs importants de la fermentation : la température, le pH, la PO₂, la solubilité des substrats et le mode de conduite du procédé.
- Chaque phase de la fermentation a ses conditions optimales pour la réussite du procédé, il faut donc considérer chaque phase à part autant au niveau de la régulation en pH, qu'au niveau de l'alimentation en substrat dans le cas du fed-batch.
- Une étude plus approfondie du mode fed-batch pour la culture de *P. candidum* est nécessaire pour cerner les effets de tous les facteurs responsables de la croissance végétative et de la

sporulation afin d'obtenir une concentration finale en spore plus importante qu'en mode de conduite en batch.

- En mode batch, les facteurs clefs de ce procédé ont été identifiés et « optimisés »,
- L'étude réalisée dans le cadre de cette thèse a permis de développer un procédé de production de spores de champignon en milieu liquide performant (plus de $200 \cdot 10^6$ spores/mL) et reproductible. Ce résultat dépasse largement l'objectif industriel fixé au début de la thèse.
- Le procédé a été extrapolé à l'échelle de 900L et en phase d'extrapolation à l'échelle de 10 m³.

Chapitre 5 :

Caractérisation

hydrodynamique du

fermenteur de 2L

5.1. Influence du type d'agitation et d'aération sur le nombre de puissance et sur l'engorgement d'un mobile d'agitation l'échelle laboratoire (PUBLICATION Np)

Introduction :

Cette partie est rédigée sous forme d'un article scientifique actuellement en attente d'un accord de publication de la part de la société DSM.

La plupart des études consacrées à la caractérisation hydrodynamique des mobiles d'agitation ont concerné plus particulièrement le mobile d'agitation « type turbine Rushton ». Plus récemment, on a assisté au développement d'une nouvelle génération de mobile d'agitation caractérisée par des mouvements axiaux et adaptés aux cellules sensibles aux cisaillements. Cependant, les caractérisations hydrodynamiques (Nombre de puissance, engorgement, temps de mélange, rétention de gaz, ..) nécessaires à l'extrapolation de ces mobiles ne sont que partiellement décrits dans la littérature. De même, l'effet de la porosité des diffuseurs d'air sur ces caractéristiques hydrodynamiques et sur les performances générales n'a jamais été décrit à notre connaissance. Cet article a pour objectif d'étudier et de comparer les caractéristiques hydrodynamiques de 6 mobiles d'agitation avec différentes porosités du système d'aération. Ces mobiles sont les suivants : quatre mobiles de type « oreilles d'éléphant » (angle d'attaque de 25° ou 45° ; en pompage vers le haut ou vers le bas), une turbine Rushton, un mobile confectionné par la société Infors appelé Cell-lift (développé pour la production

d'organisme sensibles aux cisaillements). Trois diffuseurs ont été comparés : un diffuseur classique en forme de fer à cheval avec des trous de diamètre 1 mm et un microsparger équipé d'un fritté en inox avec un seuil de coupure de soit un 20µm soit 40µm.

Influence of impeller and aeration types on power draw in a lab-scale fermentation vessel

H. CANTERI, C. CHARBONNEL, L. LABUSSIÈRE, M. GHOU

Abstract

Nowadays, the supply of oxygen in fermentation is one of the primary goals in the industry of biotechnologies. In spite of its shear-stress issues, Rushton Turbines (RT's) stay the most commonly impellers used in industry because of its good oxygen transfer efficiency. However, interesting alternatives solutions can be found in the literature such as axial flow impellers. In this paper, investigations comparing one type of radial flow impeller (RT's) and four axial flow impellers (Elephant Ears (EE's): 25° or 45°; up- or down-pumping and one six-blades Cell-lift impellers) under three types of aeration (classic sparger 1000, 40 and 20 μm porosity microspargers) have been made. They were compared for qualitative differences in power number behavior with Reynolds number and gassed to ungassed power reduction with flow number. The obtained results show motivating conclusions for the use of EE's in fermentation and almost no effects of the porosity of the spargers on power number and on power loss by flooding.

List of symbols

C	clearance between Rushton turbines, m
C ₁	distance between the lowest impeller and tank bottom, m
g	gravitational acceleration, 9.807 m/s ²
k	fluid consistency index
n _I	number of impellers
v _g	superficial velocity of sparged air based on tank diameter, m/s
D _I	diameter of impeller, m
D _T	tank diameter, m
EE	Elephant Ears
EEU45	Elephant Ears Up-pumping 45° angle of attack
EED25	Elephant Ears Down-pumping 25° angle of attack
H _I	impeller height, m
H _L	height of liquid in tank
H _T	impeller speed, s ⁻¹
ITS	Impeller Tip Speed, m/s
F _I	flow number

K_{La}	Oxygen Transfer Rate (hr ⁻¹)
N	Stirrer speed (RPS)
P_0	Power number
N_{Fr}	Froude number
P	Power draw, kW
P_0	ungassed power draw, kW
P_g	gassed power draw, kW
RT	Rushton Turbine
T_L	power loss, N.cm
Q	gas flow rate, m ³ /s
Q_{vvm}	gas flow rate, air volume/medium volume/min
S	impellers spacing, m
STR	Stirred Tank Reactor
V_T	total tank volume
W	baffles width, m
ρ	liquid density, kg/m ³
ρ_g	gas density, kg/m ³
μ	viscosity, MPa.s
μ_a	apparent viscosity, MPa.s
Re	Reynolds Number for impeller
τ	Torque (N.m)
τ_0	Torque with empty vessel (N.m)
σ	Surface tension
We	Weber number

Introduction

For a successful culture of yeasts, bacteria, fungi or animal cells in bioreactors, especially in aerobic processes, good mixing is one of a key parameter. For a long time, Rushton turbines (RT's) have been the most-used and studied stirrer at industrial scale for good oxygen transfer purpose (Ranade 1997); (Armenante and Chang 1998); (Ståhl Wernersson and Trägårdh 1999);(Montante and Magelli 2004); (Gimbun, Rielly et al. 2009); (Taghavi, Zadghaffari et al. 2011)). In spite of great progress in the bioreactor design, the oxygen transfer remains a limiting step for several processes. That's why industrialists are looking for new stirrers with more effectiveness on oxygen transfer while minimizing shear stress (for shear-sensitives strains such as filamentous fungi or animal cells) and power consumption.

Studies are most of the time based on impact of impellers and fermenters design on mixing efficiency ((Montante and Magelli 2004); (Rodgers, Gangolf et al. 2011)). These studies indicated that Rushton turbines are greatly efficient for mixing but it is affected by airflow rates. The optimization of oxygen transfer needs to increase both stirring and airflow rates. However, for high airflow rates, RT's are unable to disperse the air flowing into it, producing cavity structures behind the blades ((Luong and Volesky 1979);(Möckel, Wolleschensky et al. 1990); (Nienow 1997); (Junker, Stanik et al. 1998)). This undesirable phenomenon is called flooding. In these conditions, the pumping efficiency of stirrer is quite low and a circulation loop in the entire vessel promoted by the bubbling of the gas probably prevails acting like a bubble column reactor ((Gogate, Beenackers et al. 2000)). Due to this fact, it has been reported that Rushton turbines can lose up to 60% of filled ventilated cavities behind the blades. In high viscosity broths, these air cavities become stagnant around the blades and thus decrease power consumption and unfortunately it provokes also a drop of the mixing efficiency by up to 1.2 to 1.6-fold. Moreover, RT's generate also great shear-stress (Bustamante, Cerri et al. (2013)).

To overcome the drawbacks of RT's, Elephant Ears stirrers (EE's) were developed recently. According to (Bustamante, Cerri et al. 2013) and (Vrabel, van der Lans et al. 2000), Elephant Ears stirrers generated lower shear stress compared to RT impellers. This behavior renders them more suitable in bioprocesses that involve shear-sensitive aerobic microorganisms. Moreover, EE's used in up-pumping mode (EEU) can handle larger quantities of gas without flooding and with a minimal loss of power and negligible torque and flow instabilities ((Nienow and Bujalski 2004)). (Zhu, Nienow et al. 2009), indicated that the introduction of air, at low flow rates, does not have a profound effect on the shape of the flow pattern of EE's in up- or down-pumping mode. Compared to EEU, EE's in down pumping mode (EED) has a severe torque and flow instabilities which may lead to vessel vibrations ((Nienow 1998); (Sardeing, Aubin et al. 2004); (Vrabel, van der Lans et al. 2000)). Those authors and also (Gogate, Beenackers et al. 2000) indicated also that the axial flow impellers, with 4-6 blades placed at critical angles on a central hub of the bioreactor, offer attractive benefits in improved mixing and reduced shear for mycelial cultivations. However, a multi-impeller system needs a study of the position of the different impellers on the shaft in order to know the energy requirement of the system ((Armenante and Chang 1998); (Armenante, Mazzarotta et al. 1999); (Cui, van der Lans et al. 1996); (Gogate, Beenackers et al. 2000)). Finally, power consumption, shear, etc. not only depends on the type of impeller(s) and their localization on the shaft, the agitation rates, and the physical properties of fluid but also on the geometry of the vessel ((Armenante and Chang 1998)).

To enhance the oxygen transfer rate the main work focused on the effect of the stirring devices and the airflow rate. However, for a given mixing device, the oxygen transfer rate can also be improved by increasing the specific area (m²/m³). High specific area is reached by a judicious choice of the air

diffuser. So, (Czermak, Weber et al. 2006) have investigated the effect of the bubble diameter on the K_{La} for cell culture and he observed that the use of small bubble allow to reach similar performance with a low agitation rate. However, the reduction of the bubble sizes could lead to the phenomenon of coalescence at industrial scale ((Hasan and Zakaria 2011); (Martín, García et al. 2008); (Rodgers, Gangolf et al. 2011)). However, this phenomenon can be reduced by installing air sparger at a different level in the bioreactor. Besides the increase of the oxygen transfer, small bubble reduce the energy consumption ((Armenante and Chang 1998); (Armenante, Mazzarotta et al. 1999); (Albaek, Gernaey et al. 2008); (Taghavi, Zadghaffari et al. 2011)).

Despite the obvious interest of EE'S compared to RT's, few data are available on the flooding effect and power number profile with stirring rate. Moreover the effect of the air diffuser porosity is never reported, in our knowledge, neither on RT's nor on EE's and cell-lift stirrers.

The aim of this paper is to compare power numbers (P_0) and flooding effects (P_g/P_0) of six mixing systems (RT's, EE's, and cell-lift) under three spargers porosities (20, 40, and 1000 μ m)

Materials and methods

1. Vessel

Experiments were conducted at the 2Liters (working volume) lab scale in a 3.2Liters double-layer borosilicate glass fermenter (LabFors 4 NW150, Infors HT) with round bottom equipped with 430 W motor anti-clockwise rotation. The agitation tank has an internal diameter of 150 mm and a height of 235 mm. The tank was filled with distilled water up to a height of 135 mm for a working volume of 2L ($D_T/H_L = 0.9$) shown in ure 38 and Table 32.

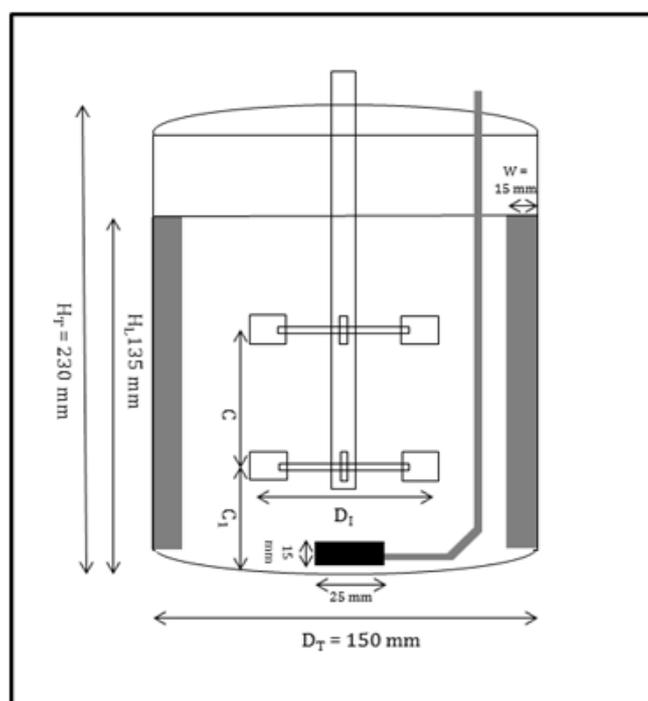


Figure 38. Vessel dimensions

The shaft consisted of stainless steel tube having an outer diameter of 12 mm.

Vessel possessed three 1.5 cm wide baffles positioned at 120° from one another and against the wall fermenter. The gap between the baffles and the tank bottom was 20mm.

Table 32. Vessel dimensions

Dimensions	Value
H_T (mm)	230
H_L (mm)	135
D_T (mm)	150
W (mm)	15

2. Stirrers

Three sets of different impellers were used:

- **Disk Turbines 6 blades** (Rushton Turbine: RT) ($D_I = 54$ mm; $H_I = 11$ mm): blade height-to-impeller diameter ratio: 0.2; blade width-to-impeller diameter ratio: 0.037; disk diameter-to-impeller diameter ratio: 0.72. The thickness of the disk was 2 mm.

- **Elephant ears 3 blades: EE** (Figure 39)

- 25° up- or down-pumping ($D_I = 85$ mm; $H_I = 40$ mm)
- 45° up- or down-pumping ($D_I = 85$ mm; $H_I = 65$ mm)

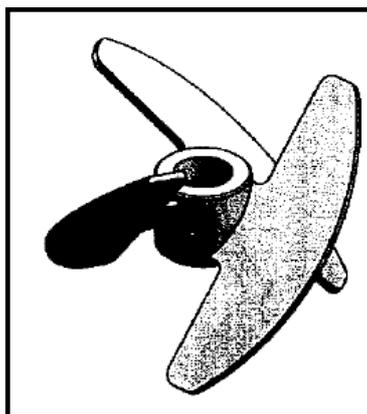


Figure 39. Elephant Ears in down-pumping mode 45°

- Cell-lift 6 blades (Figure 40) ($D_I = 85$ mm; $H_I = 55$ mm)

Only one impeller at a time was mounted on the shaft except for Rushton Turbine (2 stirrers). The main characteristics of these impellers are summarized in Table 33.

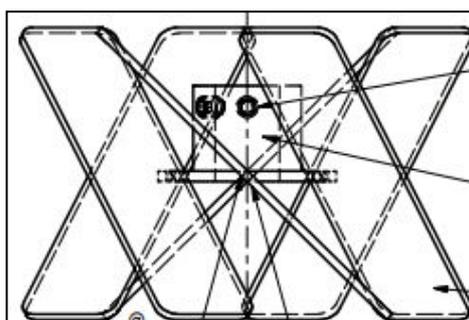


Figure 40. Elephant Ears in down-pumping mode 45°

Table 33. Impellers characteristics

Impeller type	No of impellers	N_b	Angle of attack	flow direction	D_I (mm)	C_1 (mm)	C (mm)	D_I/D_T	SR	Mixing
Rushton	2	6	90°	up and down	54	27	54	0.36	32%	Radial
Elephant Ears 45°	1	3	45°	up or down	85	51	Only one impeller	0.57	112%	Axial
Elephant Ears 25°	1	3	25°	up or down	88	46		0.59	135%	Axial
Cell-lift	1	6	45	down	83	51		0.55	168%	Axial

3. Sparging systems

Three different types of sparger were used (in Figure 41):

- Classic single ring-sparger with 50 mm diameter with 12 holes of 1 mm diameter

- Stainless steel tube microsparger with a porosity of 40 μm, with 15 mm diameter and 25 mm long
- Stainless steel tube microsparger with a porosity of 20 μm, same dimensions as the 40μm



Figure 41. Picture of the classic sparger 1000μm (left) and the microsparger, two porosities: 20μm and 40μm (right)

4. Instrumentation

The rotational speed was measured using a digital tachometer with a photoelectric pick-up sensor accurate within ± 5 RPM.

Usually, power draw is calculated as follow: $P = N_p \times \rho \times N^3 \times D_i^5$. Unfortunately, in the case of the study, a lack of data about the Power number of the EE's and cell-lift were missing. To find this Power number, a torquemeter (Sensel measurement, Vincennes, Fr) system has been implemented on the bioreactor for torque measurements during stirring. The reproducibility of the measurement was 0.002 N.m.

Unfortunately, this type of measurement is subject of noises such as gearbox losses and shaft vibration. So, corrections were made for power losses due to the gearboxes. Data were obtained for empty vessel over the range of stirrer speed. Torque losses, τ_0 , varied linearly with impeller speed, N , as:

$$\text{For RT: } \tau_0 = (N.cm) = 4E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.011 \quad \text{with } r^2 = 0.9891$$

$$\text{For EE's 45: } \tau_0 = 4E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0052 \quad \text{with } r^2 = 0.9597$$

$$\text{For EE's 25: } \tau_0 = 4E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0091 \quad \text{with } r^2 = 0.9834$$

$$\text{For Cell-lift: } \tau_0 = 2E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0104 \quad \text{with } r^2 = 0.9762$$

For power draw calculation from real data, the formula used was as follow:

$$P = 2 \times \pi \times N \times (\tau - \tau_0)$$

Correction of power draw data for bearing losses thus primarily would affect the data taken at lower agitator speeds with only a modest impact at higher speeds ((Junker, Stanik et al. 1998)).

5. Test liquid and operating conditions

Experiments were conducted in distilled water at 23°C for torque measurement, a typical cultivation temperature for fermentation. Viscosity was corrected for temperature effects using published data for water.

6. Methods of power draw calculation and analysis

To qualitatively obtain the relationship between power number, P_0 , and Reynolds number, N_{Re} , agitation rates were varied, in the absence or presence of aeration, from 200 to 1200 RPM (0.33 to 20 RPS respectively) for each impeller. The aeration rate was then varied from 0 to 2 vvm for this range of agitation rate for a liquid volume of 2liters corresponding to superficial air velocity from 0 to 0.0035 m/s. Air were used.

7. Dimensionless numbers

Dimensionless numbers were calculated as in Table 34.

Table 34. List of dimensionless numbers

Dimensionless number	Symbol	Formula
Flow number	N_A	$\frac{Q}{N \times D_T^3}$
Power number	P_g	$\frac{P_0}{\rho \times N^3 \times D_I^5}$
Reynolds number	Re	$\frac{N \times D_I^2 \times \rho}{\mu}$

Results and discussion

1. Effect of the sparger porosity and the stirrer type on the power number

The evolution of the power number versus Reynolds number for 6 stirrer devices (1 RT's, 2 EEU, 2 EED, and cell-lift) were determined and compared under 0 vvm and 2 vvm of air flow rate in the presence of three cut-off of air diffuser (20, 40, and 1000 μ m). The obtained results are summarized in Fig. 6a, b, c, and d. These results indicated that, in the range of investigated Reynolds number (from 10 000 to 100 000), expect for EEU25, the stabilization of the P_0 has not been reached for EE's and cell-lift even at high speed rate. This behavior was already observed by (Albaek, Gernaey et al. 2008) and (Junker, Stanik et al. 1998). For RT's the stability is obtained quickly.

These results indicated also that the aeration, the porosity and pumping mode affect only slightly the profile of the power number. However, this profile is affected by the stirrer type and airflow rate, and for the EE's by the angle of inclination (45° or 25°). In fact, for the EEU45 and EED45, the power number (P_0) in turbulent regime is around 1. For a less inclined impeller like the EE's 25, P_0 is lower than 0.37 in turbulent regime. As shown in table 4, for ungassed bioreactor and in the presence of RT's, the observed results are in good accord with those previously published in literature ((Armenante and Chang 1998); (Ranade 1997)). For the cell-lift, the P_0 is almost around 1 like EE's (except for EEU25).

Axial flow impellers, such as EE's or cell-lift, lead to lower P_0 compared to RT's. These devices are also characterized by low shear-stress and flow instabilities. While, RT's are characterized by a high shear stress and a low gas handling capacity. Moreover, RT's exhibit limited top-to-bottom mixing efficiency. ((Nienow and Bujalski 2004)).

The P_0 obtained at the highest Reynolds number for each stirring device are summarized in table 4 and compared to the available bibliography data. This table shows clearly the effect of the diameter of the stirrer. In fact, the diameter of RT's and Cell-lift are respectively 54 mm and 65 mm; while those of EE'S are equal to 85 mm. So, the effect of the diameter will be taken into account in the analysis of the results. For comparable diameter (RT's), the obtained results in this work are in agreement with bibliography data.

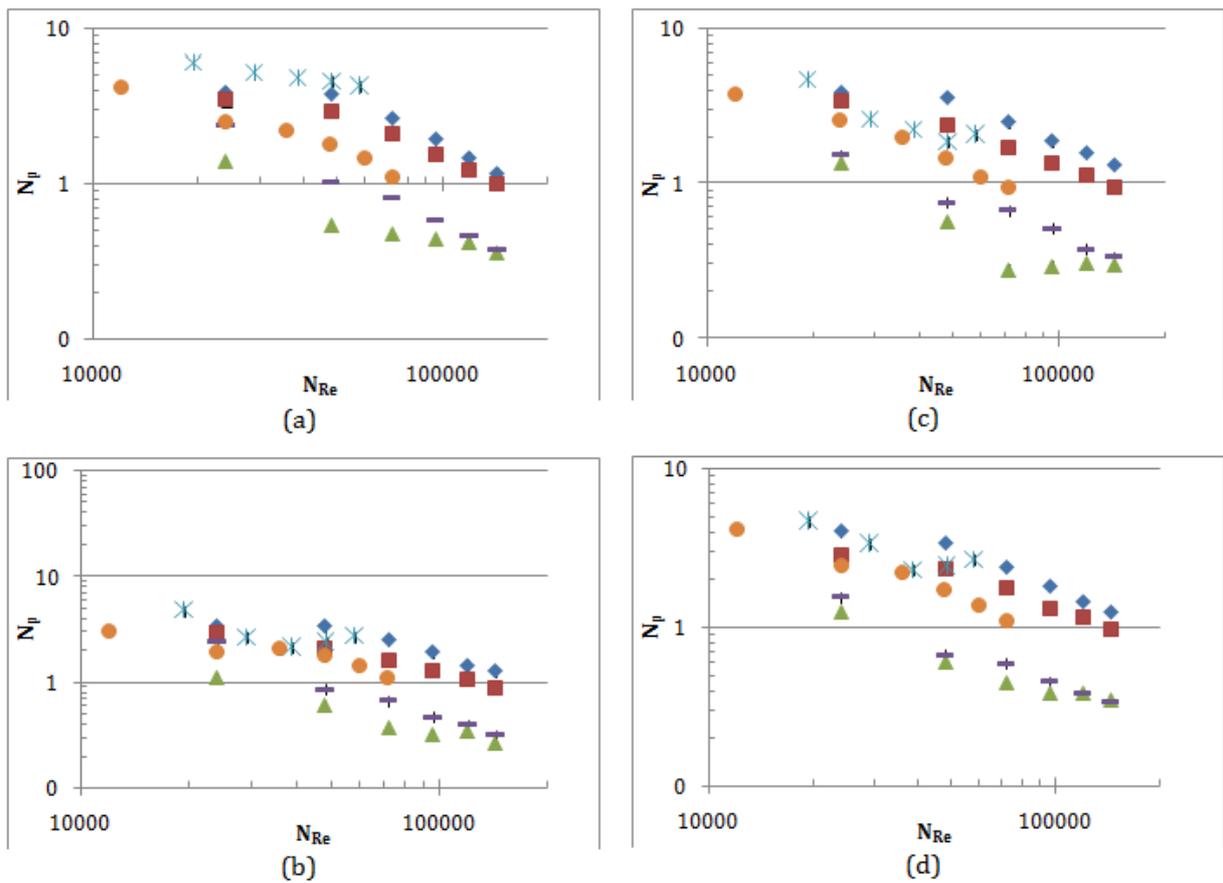


Figure 42. Power number as a function of Reynolds number for EE's, RT, and cell-lift with baffles and without aeration (a) and with full aeration (2 vvm) with sparger 1000µm (b); microsparger 40µm (c); microsparger 20µm (d).

Table 35. Power number for different impellers

Impeller type	P ₀ (literature)	Reynolds number	P ₀ (1000µm sparger)	P ₀ (microsparger 40µm)	P ₀ (microsparge r 20µm)
Rushton	4 – 6 *	58 320	4.06	3.81	4.52
EEU45	1.5 – 2 **	144 500	1.25	0.97	1.04
EED45	NA	144 500	0.93	1.04	1.01
EEU25	NA	144 500	0.34	0.35	0.39
EED25	NA	144 500	0.37	0.39	0.37
Cell-lift	NA	72 000	1.25	0.84	1.19

* Armenante and Chang (1998); Ranade (1997); Bujalski *et al.* (1987)

** Zhu *et al* (2009)

2. Effect of the porosity and the stirrer type on the flooding phenomenon

In order to investigate the flooding phenomenon in function of the stirrer type and porosity of sparger, gassed to ungassed power ratio (P_g/P_0) at a wide range of air flow and stirring rate was determined and compared. Four devices (2 EE45 up and down pumping, 1 Cell-lift, and 1 RT's) and 3 porosities (1000, 40, and 20 µm) were studied. Flooding effect is considered when P_g/P_0 drop under 1. The flooding reduces the dispersion efficiency of solid into liquid ((Nienow and Bujalski 2002)). So, an impeller to be effective for solid suspension under gassed conditions must also be a good gas dispersion impeller.

2.1. Effect of the stirring rate

The effect of stirring rate at 0.25 and 2 vvm for the three studied porosities and four stirrers is given in Fig. 7a and b. As the flow number is inversely proportional to stirring speed (tab 3); so the higher is the speed, the lower is the flow number. It appears that whatever the air flow (0.25 or 2 vvm) RT's exhibits a clear flooding effect (less than 20% at 0.25 vvm and 60% at 2 vvm). For the two air flow tested, this phenomenon becomes less pronounced at low stirring rates in the presence of diffuser with 1000 and 40 µm of cut-off. Furthermore, at low stirrer speed and low flow rate, an increase of the torque can be seen. This is seemed to be due to the opposite direction of the bulk flow patterns generated from the sparger and from the stirrer. This effect is also amplified by the size of the pores of the sparger. The reason is that a more narrow bubble plume will result in higher gas volume fractions in the blade wakes ((Arlov, Revstedt *et al.* 2008)). In addition, (Rodgers, Gangolf *et al.* 2011) have noticed that reactors with multiple stirrers with competing flow loops, as in the case of RT's configuration, can generated separate zone and reducing thus the mixing efficiency.

For EE's and cell-lift the flooding effect is negligible at 0.25 vvm for the three porosities and it is observed at moderate level at 2 vvm particularly for high stirring rate. Indeed, the flooding can reach 20% for the up-pumping mode at 600 RPM with the 20 μ m microsparger, 10% with the classic sparger 1000 μ m; and between 20% and 30% for the down-pumping mode depending on the sparger used. In this case, the porosity seemed to highlight the flooding effect for cell-lift at low speed rate and reduce this effect for higher speed rate (40 μ m) in the presence of EE'S up pumping. The porosity has no influence with EED 45.

This result indicated that EE's stirrers can handle larger quantities of gas without unwilling flooding. Thus leading to a minimum loss of power, negligible torque and flow instabilities and without altering gas dispersion ability compared to radial flow stirrers like Rushton Turbines.

In the case of a flooded impeller, the bioreactor is working like a bubble column without stirring resulting in a loss of mixing time and oxygen transfer coefficient efficiencies.

The observed behavior of P_g/P_0 with RT'S was already reported by (Nienow and Bujalski 2004). Depending to air flow and stirring rates the loss of the power can reach at least 60 %. For EE'S, (Zhu, Nienow et al. 2009) and (Nienow and Bujalski 2002), reported similar results as in this work for EED and a slight difference for EEU. No data are available in our knowledge for cell-lift.

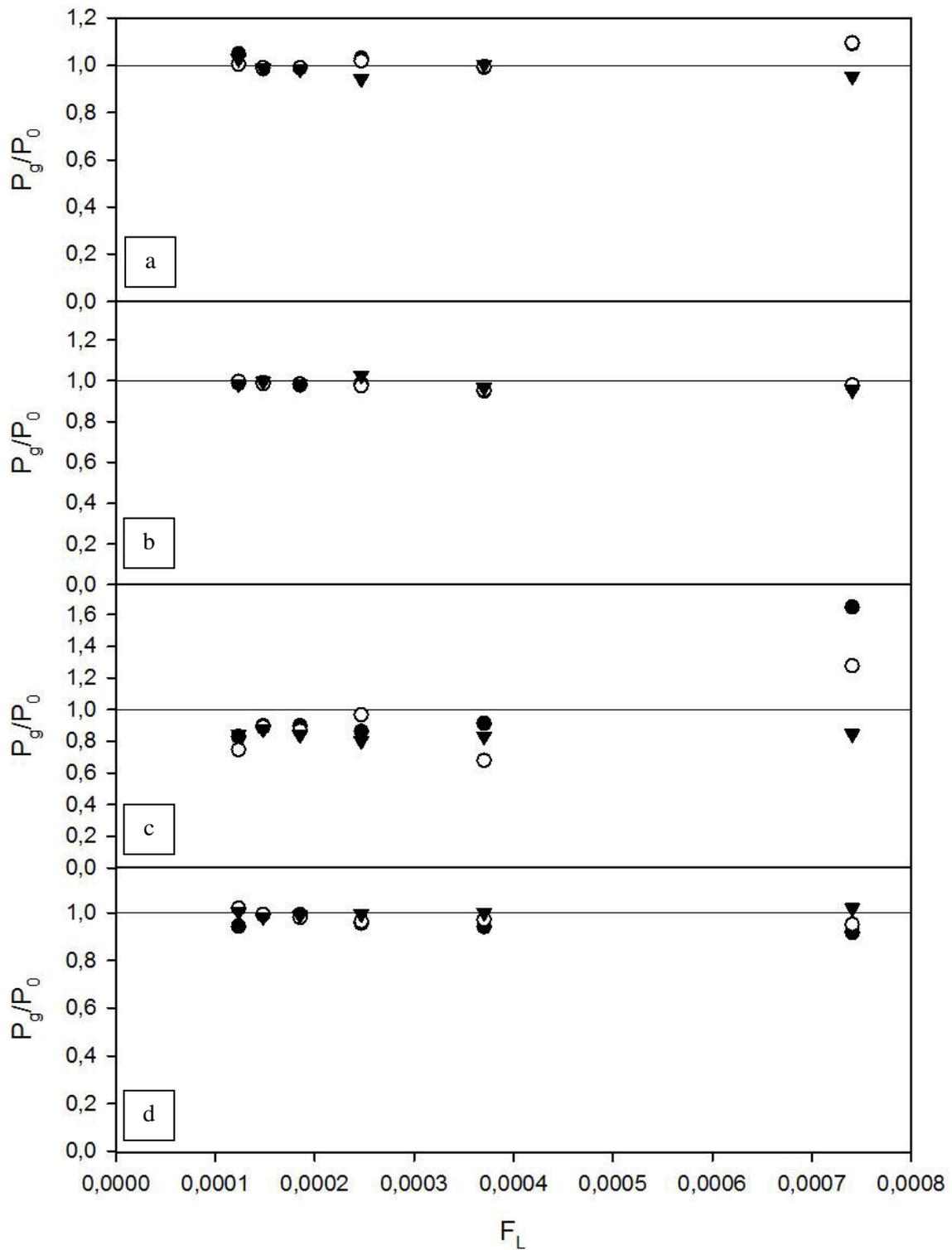


Figure 43. Evolution of P_g/P_0 as a function of the flow number with different stirrers, different porosities and variable stirring speed at 0.25 vvm. (a): EEU45; (b): EED45; (c): 2 x Rushton; (d) Cell-lift. ● : 1000µm sparger ; ○ : 40µm microsparger; ▼ : 20µm microsparger.

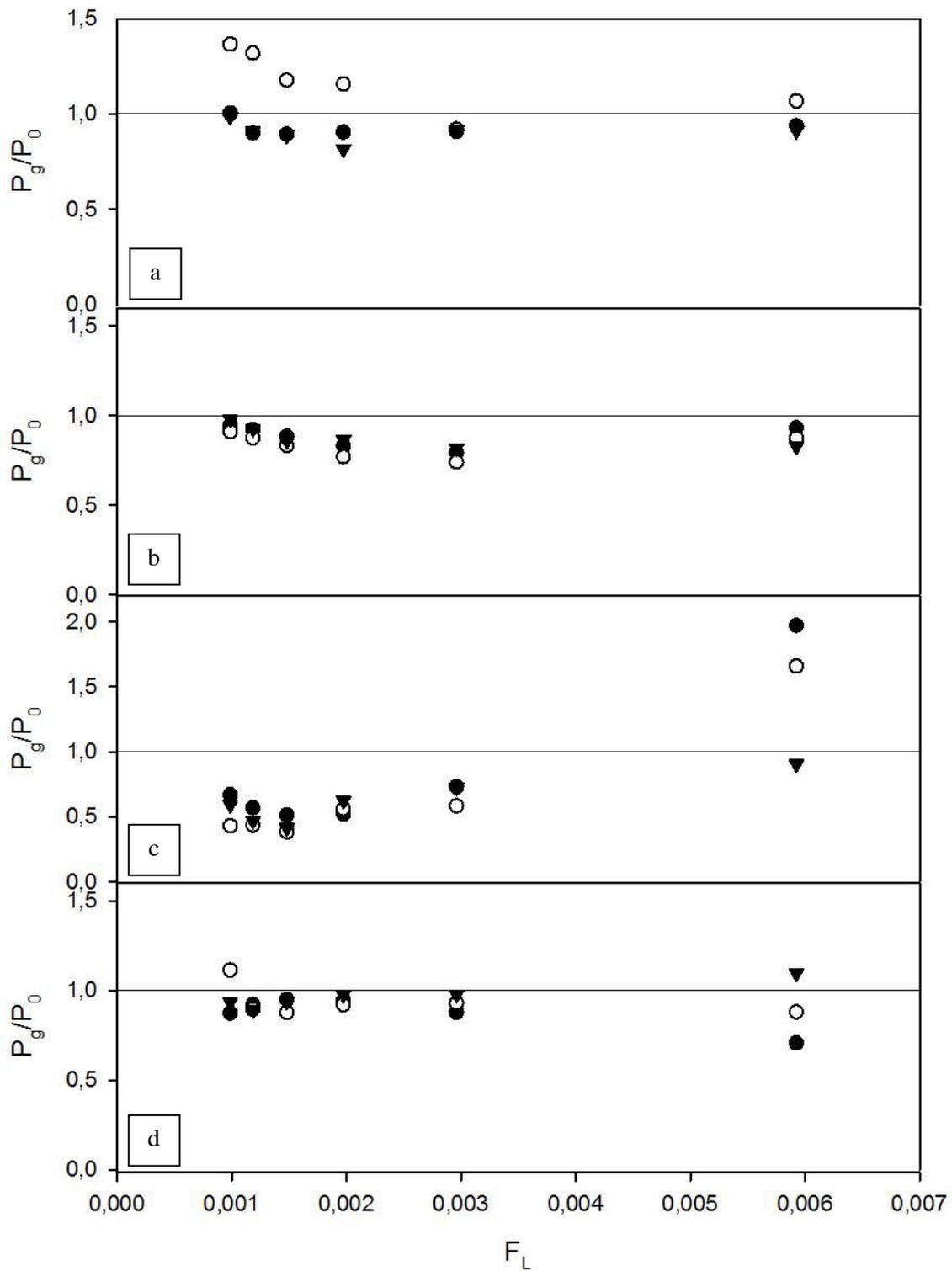


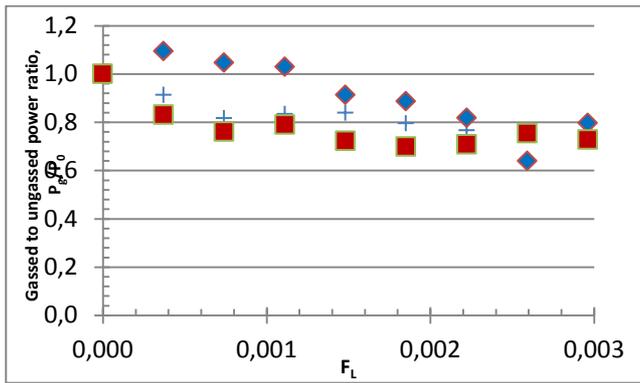
Figure 44. Evolution of P_g/P_0 as a function of the flow number with different stirrers, different porosities and variable stirring speed at 2 vvm. (a): EEU45; (b): EED45; (c): 2 x Rushton; (d) Cell-lift.

● : 1000µm sparger ; ○ : 40µm microsparger; ▼ : 20µm microsparger.

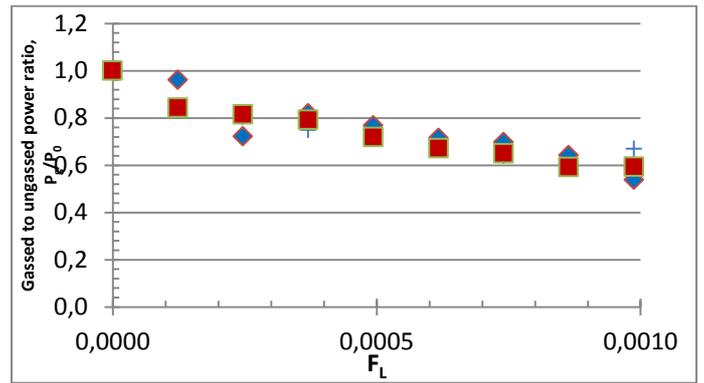
2.2. Effect of the air flow rate

The effect of the airflow rate on the flooding of the four stirrers and the three porosities was investigated for RT's (Figure 45a), EEU45 (Figure 45b), EED45 (Figure 45c) and cell-lift (Figure 45d) at 400, 800 and 1200 RPM. For RT's the flooding was observed for the three speed rates. However, the magnitude of this effect is linked to speed set point. The power reduction is about 30%, 60 % and 40 % respectively at 400, 800 and 1200 RPM. The obtained results at 1200 RPM indicated that high speed allows generating a circulation flow able to evacuate better the air flooded around the impeller. The influence of porosity is observed only at 400 RPM with a cut-off of 40 μm . For the both studied EE45 and the cell-lift, only a slight flooding effect is noticed (10% for EEU45, 20% for EED45 and less than 10% for cell-lift). Therefore, it seemed that EEU45 is less subject to flooding than EED45. This behavior could be attributed to the fact that for this device both air and liquid have the same flow direction. The effect of the porosity on the flooding is observed only with cell-lift at 40 and 1000 μm . Those effects are antagonists, an increase with 40 μm (+10%) and a decrease with 1000 μm (-15%). As for RT's, the flooding effect becomes negligible at high speed rate of the stirrer.

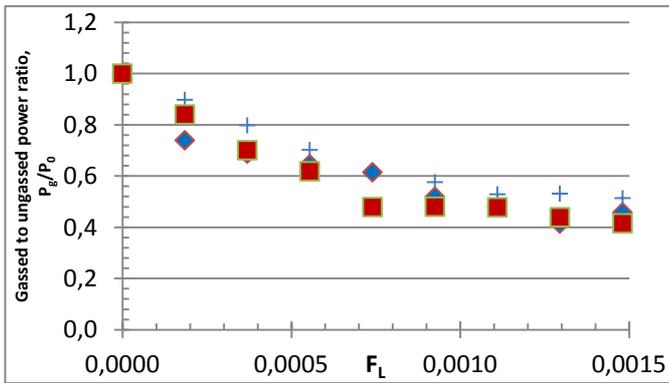
The flooding effect in the presence of axial and radial devices was the subject of several studies; but no one of them has considered the effect of the porosity. (Zhu, Nienow et al. 2009) have investigated the effect of aeration rate on flooding of EE's. These authors reported similar results as in this work. (Lu and Wu 2002) analyzed the flooding effect of pitched blade, an axial impeller as EE's. They observed a drastic loss of power that can reach 75 %. So, even if axial impellers are most of time considered as better stirrers in terms of flooding; this funding indicated that de flooding effect cannot be attributed only to the axial or radial flow pattern. In fact, RT's with semicircular blades can also minimize the flooding effect. According to (Fasano, Myers et al. 2011), the loss of power for semicircular blades don't exceed 20% whatever the width or number of blades used (from 2 to 8 blades).



(a)



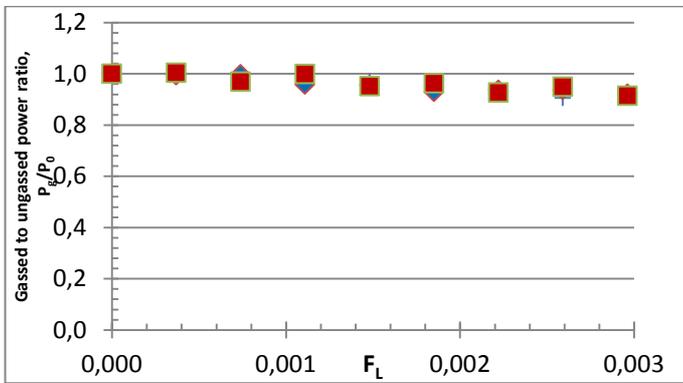
(c)



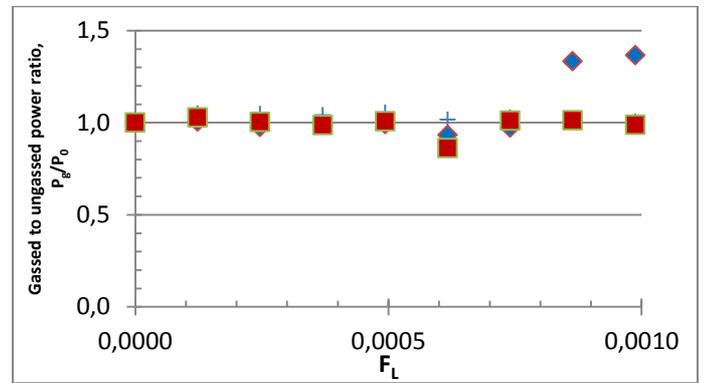
(b)

Figure 45. Reduction of power uptake in a gassed STR with RT's at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM

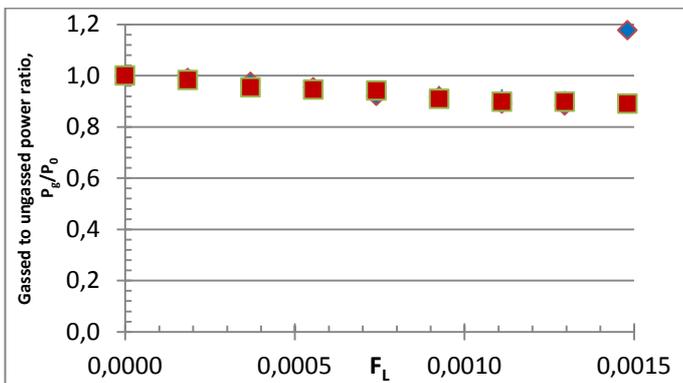
+ classic sparger ◆ 40 μ m ■ 20 μ m



(a)



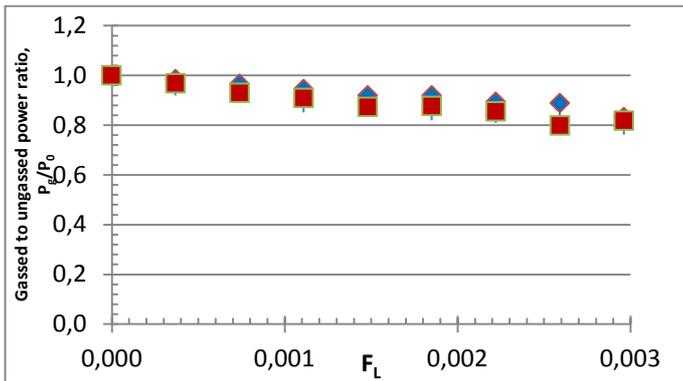
(c)



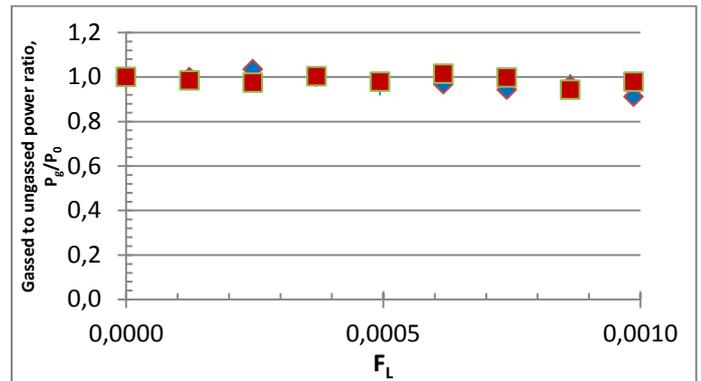
(b)

Figure 46. Reduction of power uptake in a gassed STR with EEU45 at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM

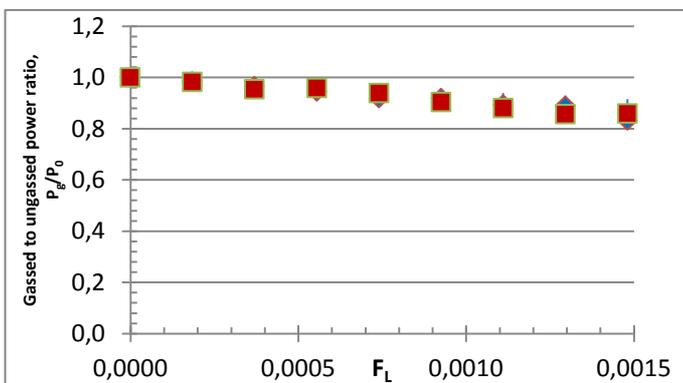
+ classic sparger ◆ 40 μ m ■ 20 μ m



(a)

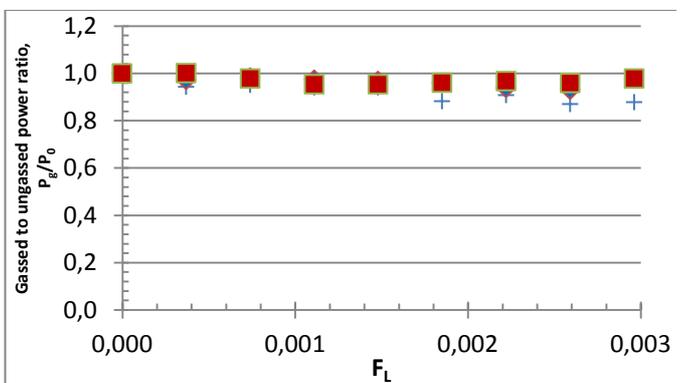


(c)

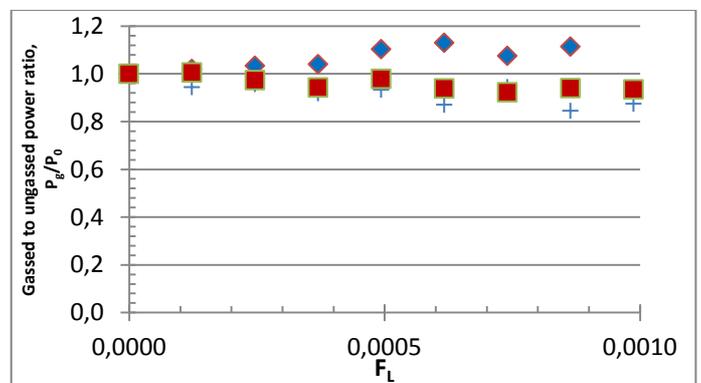


(b)

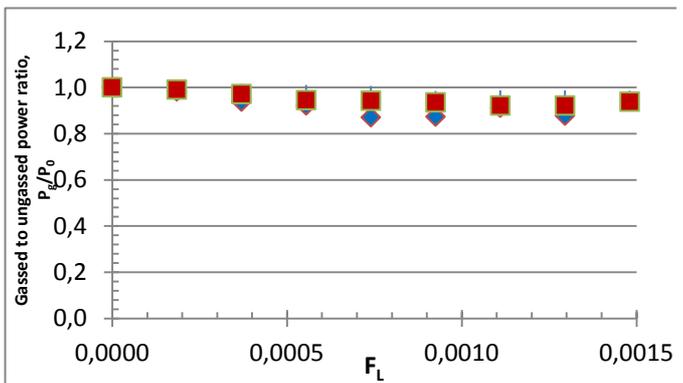
Figure 47. Reduction of power uptake in a gassed STR with EED45 at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM



(a)



(c)



(b)

Figure 48. Reduction of power uptake in a gassed STR with Cell-lift at: (a): 400RPM; (b): 800RPM; (c): 1200RPM



Conclusions

This paper analyzes the behavior of power number and flooding phenomenon in a wide range of airflow and stirring rates in the presence of 6 stirrers (EE's in down or up-pumping mode with 2 different angles of attack, cell-lift and Rushton Turbines) and three cut-off of air diffusers (1000, 40, and 20 μ m). The obtained results indicated that EE's and cell-lift lead to low power number (0.3 – 1.25) compared to RT's (~4). No effect of the diffuser porosity was observed on P_0 for all tested stirrer. However, for EE's and cell-lift, the stability is not reached even for high Reynolds number (>100 000).

The magnitude of the flooding effect depends upon air flow rate, stirrer type and stirring rate. RT's provoke a more drastic flooding effect compared to EE's and cell-lift. The porosity of diffuser has only slight effect particularly for 1000 μ m and 40 μ m. EEU stirrers seemed to be more efficient than down pumping. In addition, stirrers in down-pumping mode cause torque and flow instabilities which may lead to excessive vessel vibrations. The angle of attack for EE's will be also taken into account. In fact, in the case of a shear-sensitive strain, the use of an impeller with less angle of attack could be beneficial due to its less shear-stress. To compensate the loss of mixing efficiency of this device, multiple axial flow impeller system could be used.

Another factor could be taken into consideration is the solidity ratio. According to (Bakker and Van den Akker 1994), the advantage of a large solidity ratio (seen in Table 37) has been explained in detail in terms of the average pressure difference over the impeller blades. Although blade shape is also important, generally speaking an impeller with a large solidity ratio will be less susceptible to a decrease in pumping capacity when cavities are formed.

In conclusion, the best design configuration to achieve appropriate liquid mixing seemed to be EEU45 with microsparger 40 μ m porosity. However, the physical properties of fluid and the geometry of the vessel will be also taken into account for a global optimization of air-liquid dispersion. The obtained data in this work (P_0 of cell-lift and EE's) and the effect of porosity of air diffuser can help for an efficient design of mixing device characterized by low shear rate and low energy consumption.

Acknowledgement

We'd like to thank the DSM France Company for their financial support; and their employees for their helpful discussions and helping hands: Lilian LABUSSIÈRE, Catherine DUONG, Dan GOURSAT, and Sylvain GOURDAUT.

The authors also wish to express their sincere appreciation to the French association of research and technology (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) for their financial support.

REFERENCES

- Albaek, M. O., K. V. Gernaey and S. M. Stocks (2008). "Gassed and ungassed power draw in a pilot scale 550 litre fermentor retrofitted with up-pumping hydrofoil B2 impellers in media of different viscosity and with very high power draw." Chemical Engineering Science **63**(24): 5813-5820.
- Arlov, D., J. Revstedt and L. Fuchs (2008). "Numerical simulation of a gas liquid Rushton stirred reactor LES and LPT." Computers & Fluids **37**(7): 793-801.
- Armenante, P. M. and G.-M. Chang (1998). "Power Consumption in Agitated Vessels Provided with Multiple-Disk Turbines." Industrial & Engineering Chemistry Research **37**(1): 284-291.
- Armenante, P. M., B. Mazzarotta and G.-M. Chang (1999). "Power Consumption in Stirred Tanks Provided with Multiple Pitched-Blade Turbines." Industrial & Engineering Chemistry Research **38**(7): 2809-2816.
- Bustamante, M. C. C., M. O. Cerri and A. C. Badino (2013). "Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers." Chemical Engineering Science **90**: 92-100.
- Cui, Y. Q., R. G. J. M. van der Lans and K. C. A. M. Luyben (1996). "Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple rushton turbines." Chemical Engineering Science **51**(11): 2631-2636.
- Czermak, P., C. Weber and D. Nehring (2006). "A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors." Publication series of IBPT - University of Applied Sciences Giessen-Friedberg(1).
- Fasano, J. B., K. J. Myers and E. E. Janz (2011). "Effect of geometric variations on the performance of gas dispersion impellers with semicircular blades." The Canadian Journal of Chemical Engineering **89**(5): 961-968.
- Gimbun, J., C. D. Rielly and Z. K. Nagy (2009). "Modelling of mass transfer in gas-liquid stirred tanks agitated by Rushton turbine and CD-6 impeller: A scale-up study." Chemical Engineering Research and Design **87**(4): 437-451.
- Gogate, P. R., A. A. Beenackers and A. B. Pandit (2000). "Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review." **6**: 109 - 144.
- Hasan, N. and Z. B. Zakaria (2011). "Computational approach for a pair of bubble coalescence process." International Journal of Heat and Fluid Flow **32**(3): 755-761.
- Junker, B. H., M. Stanik, C. Barna, P. Salmon, E. Paul and B. C. Buckland (1998). "Influence of impeller type on power input in fermentation vessels." Bioprocess Engineering **18**(6): 401-412.
- Lu, W. M. and H. Z. Wu (2002). "Gassed power drawn by each impeller in multiple impeller agitated vessels." Journal of Chinese institute of chemical **33**(6): 541 - 553.
- Luong, H. T. and B. Volesky (1979). "Mechanical power requirements of gas-liquid agitated systems." AIChE Journal **25**(5): 893-895.
- Martín, M., J. M. García, F. J. Montes and M. A. Galán (2008). "On the effect of the orifice configuration on the coalescence of growing bubbles." Chemical Engineering and Processing: Process Intensification **47**: 1799-1809.
- Möckel, H. O., E. Wolleschensky, S. Drewas and H. J. Rahner (1990). "Modelling of the calculation of the power input for aerated single- and multistage impellers with special respect to scale-up." Acta Biotechnologica **10**(3): 215-224.
- Montante, G. and F. Magelli (2004). "Liquid Homogenization Characteristics in Vessels Stirred with Multiple Rushton Turbines Mounted at Different Spacings: CFD Study and Comparison with Experimental Data." Chemical Engineering Research and Design **82**(9): 1179-1187.
- Nienow, A. W. (1997). "On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime." Chemical Engineering Science **52**(15): 2557-2565.
- Nienow, A. W. (1998). "Hydrodynamics of Stirred Bioreactors." Applied Mechanics Reviews **51**(1): 3-32.
- Nienow, A. W. and W. Bujalski (2002). "Recent Studies on Agitated Three-Phase (Gas-Solid-Liquid) Systems in the Turbulent Regime." Chemical Engineering Research and Design **80**(8): 832-838.
- Nienow, A. W. and W. Bujalski (2004). "The Versatility of Up-Pumping Hydrofoil Agitators." Chemical Engineering Research and Design **82**(9): 1073-1081.
- Ranade, V. V. (1997). "An efficient computational model for simulating flow in stirred vessels: a case of Rushton turbine." Chemical Engineering Science **52**(24): 4473-4484.
- Rodgers, T. L., L. Gangolf, C. Vannier, M. Parriaud and M. Cooke (2011). "Mixing times for process vessels with aspect ratios greater than one." Chemical Engineering Science **66**(13): 2935-2944.
- Rodgers, T. L., L. Gangolf, C. Vannier, M. Parriaud and M. Cooke (2011). "Mixing times for process vessels with aspect ratios greater than one." Chemical Engineering Science **66**: 2935 - 2944.
- Sardeing, R., J. Aubin and C. Xuereb (2004). "Gas-Liquid Mass Transfer: A Comparison of Down- and Up-pumping Axial Flow Impellers with Radial Impellers." Chemical Engineering Research and Design **82**(12): 1589-1596.
- Ståhl Wernersson, E. and C. Trägårdh (1999). "Scale-up of Rushton turbine-agitated tanks." Chemical Engineering Science **54**(19): 4245-4256.

Taghavi, M., R. Zadghaffari, J. Moghaddas and Y. Moghaddas (2011). "Experimental and CFD investigation of power consumption in a dual Rushton turbine stirred tank." Chemical Engineering Research and Design **89**(3): 280-290.

Vrabel, P., R. G. J. M. van der Lans, K. C. A. M. Luyben, L. Boon and A. W. Nienow (2000). "Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements." Chemical Engineering Science **55**(23): 5881-5896.

Zhu, H., A. W. Nienow, W. Bujalski and M. J. H. Simmons (2009). "Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping Elephant Ear agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements." Chemical Engineering Research and Design **87**(3): 307-317.

Conclusion :

Cet article a pour objectif de comparer les effets de six mobiles d'agitation et trois porosités de diffuseur d'air sur les caractéristiques hydrodynamiques d'un fermenteur de 3,6L de volume total. Ce document est structuré en trois parties.

La première partie de cet article analyse les effets de la porosité du sparger sur le nombre de puissance pour les 6 mobiles d'agitation étudiés. Les résultats marquants sont :

- La stabilisation de la valeur du nombre de puissance, P_0 , n'a pu être atteinte pour les mobiles d'agitation oreilles d'éléphant et le Cell-lift, même pour des vitesses d'agitation élevées.
- L'aération et plus particulièrement la porosité du diffuseur affecte très peu le profil du nombre de puissance.

La deuxième partie est consacrée à l'étude de l'effet de la porosité des 3 spargers sur l'engorgement de quatre mobiles d'agitation, en l'occurrence deux oreilles d'éléphant inclinées à 45° en pompage vers le haut ou vers le bas, une turbine Rushton et un mobile Cell-lift. Les principaux résultats de cette partie sont :

- La turbine Rushton présente des effets d'engorgement importants. Ce phénomène est amplifié par la taille des pores du sparger.
- Pour les oreilles d'éléphant et le cell-lift, l'effet d'engorgement est négligeable à 0,25vvm pour les trois porosités. Ces résultats indiquent que les agitateurs à débit axial peuvent supporter des quantités de gaz plus importantes que la turbine Rushton sans être soumis au phénomène d'engorgement.
- Les oreilles d'éléphant en pompage vers le haut semblent plus résister au phénomène d'engorgement que les mêmes pales en pompage vers le bas.

La dernière partie discute et compare ces résultats à la bibliographie. Il ressort de cette étude que le meilleur système d'agitation qui assure une faible consommation d'énergie et un bon transfert efficace d'oxygène semble être le système oreilles d'éléphant inclinées à 45° en pompage vers le haut avec un microsparger de seuil de coupure 40µm.

5.2. Influence du type d'agitation et d'aération sur le transfert d'oxygène à l'échelle laboratoire dans le but d'effectuer une extrapolation (PUBLICATION K_La)

Introduction :

Cette partie est rédigée sous forme d'un article scientifique actuellement en attente d'un accord de publication de la part de la société DSM.

Comme pour la publication précédente, il existe un nombre important de références bibliographiques concernant l'étude du K_La en fonction du mobile d'agitation utilisé ainsi que le développement de modèles prédictif du K_La mais aucunes d'entre elles ne traitent les effets de la porosité du diffuseur d'air sur ces facteurs. L'approche est ici basée sur l'étude du K_La en utilisant la méthode de mesure dynamique décrite par (Garcia-Ochoa, Gomez et al. 2010). Les méthodes statiques sont habituellement jugées comme étant plus fiables que les méthodes dynamiques car moins de facteurs entre en jeu. Le fait qu'un état stationnaire soit plus facile à obtenir en mesure stationnaire qu'en dynamique réduit déjà le risque d'erreur. De plus, lors de mesures dynamiques, il existe toujours le problème de trouver l'instant initial de la mesure, le changement des propriétés du fluide dû à la croissance du micro-organisme ou à la consommation/production de substrat/produit. La méthode dynamique, nous paraissait être la méthode la plus fiable et la plus facile à mettre en œuvre en fonction des conditions que nous avons appliquées à notre système. Ces mesures ont été effectuées durant une culture en phase exponentielle de la souche *S. carnosus*. Quatre mobiles d'agitation ont été étudiés : deux oreilles d'éléphant inclinées à 45° en pompage vers le haut ou vers le bas, la turbine Rushton et le mobile Cell-lift. Trois diffuseurs d'air ont été étudiés : le sparger en fer à cheval et les deux microspargers (20 et 40 μm).

La première partie décrit les effets de la porosité du diffuseur d'air et du type d'agitateur utilisés sur la valeur du coefficient de transfert d'oxygène. La deuxième partie propose quelques modèles développés dans la littérature et vise à développer un modèle prédictif pour chaque couple de systèmes agitation/aération selon le modèle le plus couramment utilisé : $KLa = a \times (P/V)^b \times (v_g)^c$.

La dernière partie conclue sur les résultats et compare l'efficacité en matière de transfert d'oxygène des différentes méthodes d'agitation et d'aération.

Influence of impeller shape and diffuser porosity on oxygen transfer rate: K_La modeling and prediction

H. CANTERI, C. CHARBONNEL, M. GHOU

Abstract

The Ear Elephant impeller (EE) recently designed for the processes of fermentation have many advantages compared to the traditional turbines as the Rushton turbine (RT). However, very few data are available on the characterization of this axial flow turbine in terms of transfer of oxygen. This paper investigates deeply this impeller and compared it to the classical radial flow turbine (RT). Thus the efficiency of the oxygen transfer (K_La) were evaluated and compared in the presence of two types of Elephant Ears 45° up (EED4) or down-pumping (EEU45) and classical RT under a large domain of stirring and air flow rates. For each device three porosity of air diffuser (20, 40 and 1000 μm) were also investigated. The obtained results indicate that the K_La is affected by both the porosity and the impeller shape. At high speed rates, the EED45 gave the highest K_La ($K_{La_{max}}$) values of around 300hr⁻¹ with the 40 μm and 20 μm microspargers. While with classical sparger (1000 μm) the K_La max is reached with EEU45. In the presence of RT the K_La max is lower in any case compared to EE devices. These data indicated clearly that EE impeller is more efficient due to its capability to avoid flooding phenomenon. For each impeller a model linking the K_La to the stirring and air flow rates was developed and validated. It will be used as a predictive tool for the extrapolation of the process to the pilot and industrial scales.

List of symbols

A_b	Blade area (m ²)
C	clearance between Rushton turbines, m
C_1	distance between the lowest impeller and tank bottom, m
v_g	superficial velocity of sparged air based on tank diameter, m/s
D_I	diameter of impeller, m
D_T	tank diameter, m
EEU45	Elephant Ears Up-pumping 45° angle of attack
EED45	Elephant Ears Down-pumping 45° angle of attack
H_I	impeller height, m
H_L	height of liquid in tank
K_La	Oxygen Transfer Rate (hr ⁻¹)
N	Stirrer speed (RPS)
N_b	Number of blades

N_I	Number of impellers on the shaft
P_g/V_L	Volumetric power (kW/m ³)
RT	Rushton Turbine
Q_{vvm}	gas flowrate, air volume/medium volume/min
STR	Stirred Tank Reactor
V_T	total tank volume
W	baffles width, m
ρ	liquid density, kg/m ³
μ	Dynamic viscosity, Pa.s
Re	Reynolds Number for impeller
τ	Torque, N.m
τ_L	Torque loss, N.m

Introduction

For a successful aerobic culture of yeasts, bacteria, fungi or animal cells, the oxygen transfer is a key factor ((Galaction, Cascaval et al. 2004); (Garcia-Ochoa, Gomez et al. 2010)). The efficiency of the air transfer in the medium depends upon the used impeller. Rushton turbines (RT) with radial flow are the most-used stirrer at industrial-scale. However, these devices have several drawbacks such as high shear-stress, energy consumption, and flooding. To overcome these drawbacks new stirrers with an efficient oxygen transfer and less shear stress and power consumption were developed recently ((Bustamante, Cerri et al. 2013); (Zhu, Nienow et al. 2009)). These new impellers (Elephant Ears and cell-lift) are characterized by an axial flow patterns. However, very few data are available on the characterization of this axial flow turbine in terms of transfer of oxygen.

According to (Bustamante, Cerri et al. 2013) and (Vrabel, van der Lans et al. 2000), Elephant Ears stirrers (EE) generated lower shear-stress than RT impellers. It is also reported that EE impellers allow to obtain a good oxygen transfer and a low shear-stress with a higher gas hold-up ((Moucha, Linek et al. 2003); (Nienow 1998); (Sardeing, Aubin et al. 2004); (Zhu, Nienow et al. 2009)). Moreover, EE used in up-pumping mode can handle larger quantities of gas without flooding, minimal loss of power and negligible torque and flow instabilities ((Nienow and Bujalski 2004)). These characteristics render them appropriate for shear-sensitive aerobic microorganisms.

The efficiency of the oxygen transfer is often characterized by the evolution of the K_{La} . (Van't Riet 1979) reported that this coefficient is affected by the medium composition (salt, sugar, biomass concentration, antifoaming and surface active agents), hydrostatic pressure, gas velocity, vessel geometry and the stirrer characteristics (type, position and number). Temperature, pressure, viscosity and pH can also influence the oxygen transfer by affecting the solubility of the oxygen at the equilibrium. These factors were intensively investigated in the presence of RT but few of them deal

with diffuser porosity and EE impeller. The few data available reported that the use of microbubble diffusers for aerobic fermentation allows to reach high oxygen concentration even at low agitation rates ((Hensirisak, Parasukulsatid et al. 2002). In fact, the bubble sizes when aerated with this microspargers have a diameter from 100µm to 500µm compared to classic sparger: 800 – 3000µm ((Czermak, Weber et al. 2006)). Reducing the bubble size permits to increase the gas-liquid contact area, increase gas holding time and also oxygen transfer rate. (Czermak, Weber et al. 2006); (Nehring, Czermak et al. 2004) indicated that the use of ceramic sparger with pore size of 2 and 5 µm leads to a K_{La} values up to five folds higher than that obtained with classic 1000µm ring stainless steel sparger. According to (Poulsen and Iversen 1998) and (Arlov, Revstedt et al. 2008), this behavior is attributed to a large interfacial area between gas and liquid phases. In addition, (Michaels, Mallik et al. 1996) observed that, in the presence of small bubbles, the probability of coalescence is relatively low due to their rigidity. However, it seemed that this effect is occurred only for low porosities of the spargers. In fact, (Ashley, Hall et al. 1991) have reported that a decrease of the porosity from 140 to 40µm had no effect on K_{La} and no effect of airflow rate was observed on bubble size at 0.13 and 0.27 vvm.

For a given porosity, Rushton turbines are greatly affected by airflow rates. For High airflow rates, the turbines are unable to disperse the air flowing into it, leading to the formation of unoccupied cavity behind the blades ((Luong and Volesky 1979; Möckel, Wolleschensky et al. 1990; Nienow 1997; Junker, Stanik et al. 1998)). This undesirable phenomenon is called flooding and reduces the pumping efficiency of stirrer. It also provokes the formation of circulation loop inside the vessel. Therefore, the bioreactor works such as a bubble column ((Gogate, Beenackers et al.)). The observed cavity with Rushton turbines contribute also to the loss of the energy and the mixing efficiency. The energy loss can reach up to 60% and the mixing efficiency is reduced to 1.2 to 1.6-fold in the presence of high viscosity of the broth. In addition, at low impeller speeds, the gas hold-up is controlled by the sparger and is practically independent of the stirrer speed. Above a certain minimum speed, the gas bubbles can be dispersed by the stirrer action. This is called the "minimum impeller speed for gas dispersion". This value depends on the type of impeller and geometrical parameters like the clearance from the bottom, diameter of the tank, type of sparger (shape and diameter of holes) and also on the gas superficial velocities ((Gogate, Beenackers et al. 2000)).

The dependence of K_{La} to the impeller shape and the operating condition of the fermentation was the subject of several papers with the aim to develop a predictive tool. Thus, the K_{La} was modeled in function of different operating conditions such as stirring speed, air flow rate, sparger porosity, *etc.* These models are summarized in Table 36. However few of them deal with the new impeller under our development and scarcely taken into account to the porosity.

Table 36. K_{La} prediction in literature

configuration	K_{La} Formula	Error	Reference
2 x RT (6 blades) + 4 baffles + ring-sparger	$0.1379 N^{0.778} Q_{vvm}^{0.688} \mu^{-0.620}$	$R^2 = 98\%$	Bustamante <i>et al.</i> (2013)
1 x EEU45 (3 blades) + 4 baffles + ring-sparger	$0.0247 N^{1.706} Q_{vvm}^{0.618} \mu^{-0.716}$	$R^2 = 99\%$	Bustamante <i>et al.</i> (2013)
1 x EED45 (3 blades) + 4 baffles + ring-sparger	$0.0184 N^{0.120} Q_{vvm}^{0.585} \mu^{-0.521}$	$R^2 = 97\%$	Bustamante <i>et al.</i> (2013)
2 x RT + 3 baffles + ring-sparger	$6.586 v_g^{0.429} / (C_X^{0.282} (P_g/V)^{0.0286})$	Max deviation = $\pm 7.8\%$	Galaction <i>et al.</i> (2004)
2 x RT + Surface aeration	$1 / (e^{12.77+0.227 \ln CX} (P_g/V)^{0.62 - 0.109 \ln CX})$	Max deviation = $\pm 8.8\%$	Galaction <i>et al.</i> (2004)
2 x RT	$0.0083 (P_g/V)^{0.62} v_g^{0.49}$	NA	Gogate <i>et al.</i> (2000)
1 x RT + 1 x pitched-blade down flow	$0.00204 (P_g/V)^{0.68} v_g^{0.58}$	NA	Gogate <i>et al.</i> (2000)
RT + classic sparger	$0.026 (P_g/V)^{0.4} v_g^{0.5}$	Max deviation = $\pm 8\%$	Sardeing <i>et al.</i> (2004)
3 x Rushton + classic sparger	$K_{La} \left(\frac{v_g}{g^2}\right)^{1/3} = 7.94 \times 10^{-4} \left[\frac{P/V_L}{\rho(v_g g^4)^{1/3}}\right]^{0.62} \left[\frac{q_G}{V_L} \left(\frac{v_g}{g^2}\right)^{1/3}\right]^{0.23}$	Average error ca. 8%	Schlüter <i>et al.</i> (1992)
4 x Intermig + classic sparger	$K_{La} \left(\frac{v_g}{g^2}\right)^{1/3} = 5.89 \times 10^{-4} \left[\frac{P/V_L}{\rho(v_g g^4)^{1/3}}\right]^{0.62} \left[\frac{q_G}{V_L} \left(\frac{v_g}{g^2}\right)^{1/3}\right]^{0.19}$	Average error ca. 8%	Schlüter <i>et al.</i> (1992)
RT + pitched blade down pumping	$0.024 (P_g/V)^{0.725} v_g^{0.892}$	$R^2 = 82\%$	Shukla <i>et al.</i> (2001)
RT + air sparger	$0.026 (P_g/V)^{0.4} v_g^{0.5}$	Max deviation =	Van't Riet (1979)

The aim of this paper is, on one hand, to investigate deeply the performance of the Ear elephant impeller and to furnish new data on the effect of this impeller on transfer of the oxygen under a wide range of operating conditions and on the other hand to compare this interesting impeller to classical Rushton Turbine. This study analyzed also the effect of the air diffuser porosity. The obtained data was uses to build a robust model for $K_L a$ prediction by taking in consideration the impeller shape and the sparger porosity.

Materials and methods

1. Vessel

Experiments were conducted in a 3.2L double-layer borosilicate glass fermenter -LabFors 4 NW150, Infors HT (Figure 49). This reactor has an internal diameter of 150 mm and a height of 235 mm. The working volume of 2L ($D_T/H_L = 0.9$).

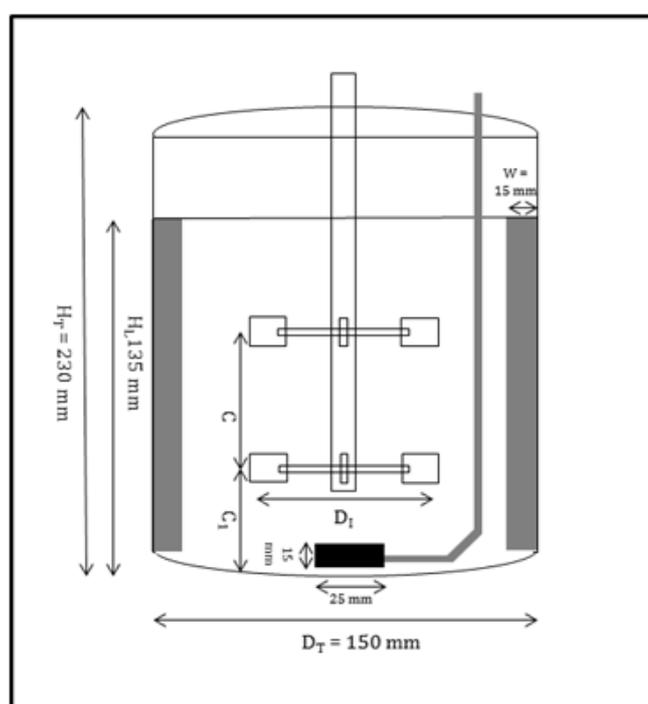


Figure 49. Vessel dimensions

2. Stirrers

Two sets of different impellers were used (characteristics shown on Table 37):

- **Disk Turbines 6 blades** (Rushton Turbine: RT) ($D_I = 54$ mm; $H_I = 11$ mm): Blade height-to-impeller diameter ratio: 0.2; blade width-to-impeller diameter ratio: 0.037; disk diameter-to-impeller diameter ratio: 0.72. The thickness of the disk was 2 mm.
- **Elephant ears 3 blades**: 45° up- or down-pumping ($D_I = 85$ mm; $H_I = 65$ mm)

Only one impeller at a time was mounted on the shaft except for Rushton Turbine.

Table 37. Impellers characteristics

Impeller type	N _I	N _b	Angle of attack	flow direction	D _I (mm)	C _I (mm)	C (mm)	D _I /D _T	Np (literature)	Np	SR	Mixing
Rushton	2	6	90°	up and down	54	27	54	0.36	4-6	4.7	32%	Radial
Elephant Ears 45°	1	3	45°	up or down	85	51	Only one impeller	0.57	1.5 - 2	1 - 1.5	112%	Axial

The solidity ratio SR (Bakker and Van den Akker 1994) is defined as the total blade area $N_b \times A_b$ divided by the area of the circle that encloses the projection in axial direction of the impeller onto a plane:

$$SR = \frac{N_b \times A_b}{\frac{\pi}{4} \times D_I^2}$$

Stirring speed was varied from 300 to 1000RPM for EE's and from 400 to 1200RPM for RT's.

3. Sparging systems

Three porosities of air diffuser were tested:

- Classic single ring-sparger with a porosity of 1000 μm,
- Stainless steel tube microsparger with a porosity of 40 μm,
- Stainless steel tube microsparger with a porosity of 20 μm.

The aeration rate was then varied from 0 to 1.75 vvm for this range of agitation rate for a liquid volume of 2Liters corresponding to superficial air velocity from 0 to 0.0035 m/s. Ambient air was used.

4. Instrumentation

The rotational speed was measured using a digital tachometer with a photoelectric pick-up sensor, accurate within ± 5RPM.

Dissolved oxygen was measured with an oxygen probe (VISIFERM, Hamilton) calibrated such as 100% saturation corresponded with saturation of the culture medium with air at high agitation and high airflow rates. The 0% calibration was made by desorption of oxygen by gaseous nitrogen injected through the sparger. It was assumed that the response of the oxygen electrode to the change in the oxygen concentration was sufficiently fast and did not affect the determination accuracy.

Power was measured using a torque meter (Sensel measurement, Vincennes, Fr) with a reproducibility of the measurement of 2 N.cm.

Corrections were made for power losses due to the gearboxes. Data were obtained for empty vessel over the range of stirrer speed. Torque losses, τ_L , varied linearly with impeller speed, N, as:

For RT: $\tau_L = (N.cm) = 4E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.011$ with $r^2 = 0.9891$

For EE45: $\tau_L = 4E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0052$ with $r^2 = 0.9597$

For EE25: $\tau_L = 4E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0091$ with $r^2 = 0.9834$

For Cell-lift: $\tau_L = 2E-5 \times N \text{ (RPM)} + 0.0104$ with $r^2 = 0.9762$

5. Microorganism, test liquid and medium conditions

Experiments were conducted in a fermentation media at 30°C and pH 6.0 with continuous regulation of the pH using ammonia 5% for K_{La} measurements. The viscosity of the fermentation follows Newtonian behavior. The temperature effect on the viscosity was considered.

Staphylococcus carnosus maintained at -80°C in cryotubes was used in this study for K_{La} dynamic measurements. The medium used for seed and cultivation contained sucrose (20g), Yeast extract (15g), ascorbic acid (1g), magnesium sulphate (1g), sodium chloride (2g), hydrogenophosphate (1g), anhydrous iron chloride (0.2g), dihydric sodium molybdate (0.1) per liter of medium before autoclave sterilization.

6. Determination of K_{La}

The volumetric oxygen transfer coefficient, K_{La} was assessed using “dynamic method” ((Garcia-Ochoa and Gomez 2009); (Scargiali, Busciglio et al.)). This technique is based on the measurement of dissolved oxygen concentration in the medium by absorption of oxygen by microorganisms. After a step change in the concentration in the inlet gas, the dynamic change in the dissolved oxygen concentration is analyzed.

When the air turned off, the rate of oxygen uptake is given by the cells is given by

$$(dC_L/dt)_{\text{air off}} = -rx$$

Where r = specific oxygen uptake rate (h^{-1})

And x = cell mass concentration (g/L)

After the aeration is resumed, the rate of change in dissolved oxygen concentration in the medium is given by:

$$\ln \frac{O_2^* - O_{2l}}{O_2^* - O_{2min}} = -KLa \times (t_2 - t_1)$$

Where K_{La} = volumetric oxygen transfer coefficient (h^{-1})

O_2^* = oxygen partial pressure when signal is stable in the bulk liquid (%)

O_{2l} = oxygen partial pressure in the bulk liquid (%)

O_{2min} = oxygen partial pressure when aeration is resumed (%)

Results and discussion

1. Effect of impeller shape, agitation speed, airflow rate and diffuser porosities on K_{La} behavior

Oxygen is a crucial substrate for microbial growth, maintenance and metabolite production. Due to his low solubility, oxygen transfer rate must be optimized by taking into account the effect of several factors. In this study impeller shape, agitation speed, airflow rate and diffuser porosities were

considered. The evolution of the K_La for the three impellers shapes and the 3 porosities with RPM and flow rate are summarized successively in Figure 50 and Figure 51.

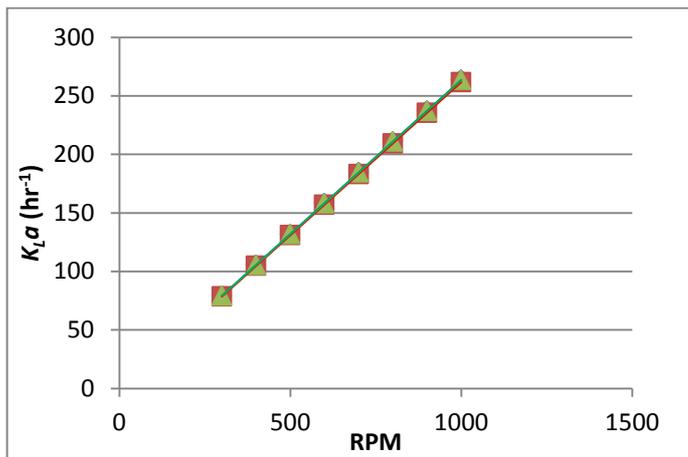
These results indicate the profiles of the evolution of the K_La with the stirring rate are linear but their magnitude for a given RPM is depending to the used impeller and the porosity of the diffuser. The lowest values of K_La were reached in the presence of RT (Figure 50c). For this device lower porosity (20 μm) leads to a constant K_La whatever the applied RPM set point (Figure 50c). For 40 μm and 1000 μm the K_La increase with RPM. Classical sparger (1000 μm) becomes more efficient for high speed rate. ((Banerjee 1993; Ahmad, Holland et al. 1994) reported also an increase of the K_La with speed rate and attributed this fact to the formation of smaller air bubbles with higher specific surface area. As K_La is a combining effect between the coefficient of the transfer (K_L) and specific area (a). The analysis of the results will take into account to the increase of K_L with the speed rate and the bubble size with the reduction of the porosity. The observed behavior of the K_La at 20 μm could be attributed to the coalescence phenomena. For Elephant Ears impellers the effect of porosity is observed only with pumping down mode (EED45). For this impeller lowest values of K_La are obtained with 40 μm and highest ones were reached with 20 μm . The difference between pumping up (EEU45) and pumping down (EED45) of Elephant Ears impeller was already described by (Moucha, Linek et al. 2003) and (Sardegna, Aubin et al. 2004). These authors attribute the better performance of EED45 to its better gas holdup capacity.

The air flow rate influence also the K_La . To analyze this effect this factor was varied in the range of 0.15 to 1.75 VVM. As for the speed rate, the effect of air flow rate was studied in the presence of three diffuser porosities and three impeller shape. Figure 51a, b, c summarize the obtained results under these operating conditions. It appears that whatever the shape of the used impeller, the diffuser porosity the K_La evolution is rather described by a logarithmic profiles. The effect of the porosity is observed for the three impellers. However, this effect is more pronounced with RT and EED45. Lowest values of K_La were obtained with 1000 μm (classical sparger) for the three studied impeller. For both elephant ears the best performance of K_La corresponds to 40 μm followed by 20 μm and 1000 μm . While for RT the 20 μm lead to highest value of K_La . As for the speed rate the effect of the porosity can be explained by gas holdup capacity of each impeller. The highest values of K_La obtained with different combination of impeller shape and diffuser porosity are given in Table 38. It appears that K_La_{max} is affected by both the porosity and the impeller shape. At high speed rates, the EED45 gave the best K_La_{max} values of around 300hr^{-1} with the 40 μm and 20 μm microspargers. While with classical sparger (1000 μm) the K_La_{max} is reached with EEU45. In the presence of RT the K_La_{max} is lower in any case compared to EE devices. The low values of K_La_{max} with RT seemed to be due to radial flow pattern. At high airflow rate, the microspargers (20 and 40 μm) allow to reach the highest

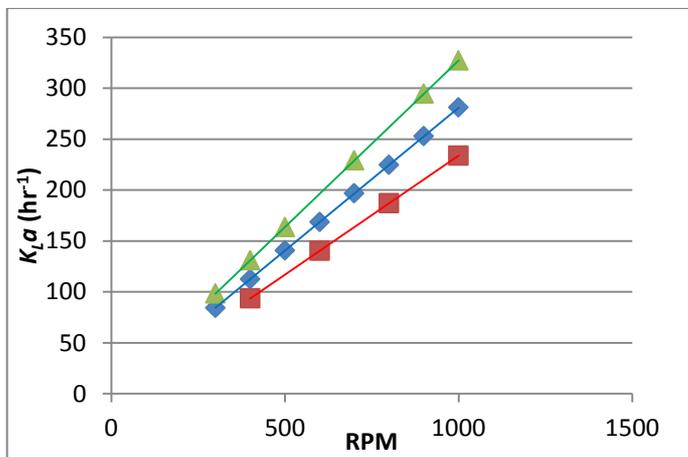
$K_L a$ compared to 1000 μm . As for high speed, RT is the less efficient. Flooding and radial flow can be in the origin of these results

Table 38. $K_L a_{max}$ values (hr^{-1}).

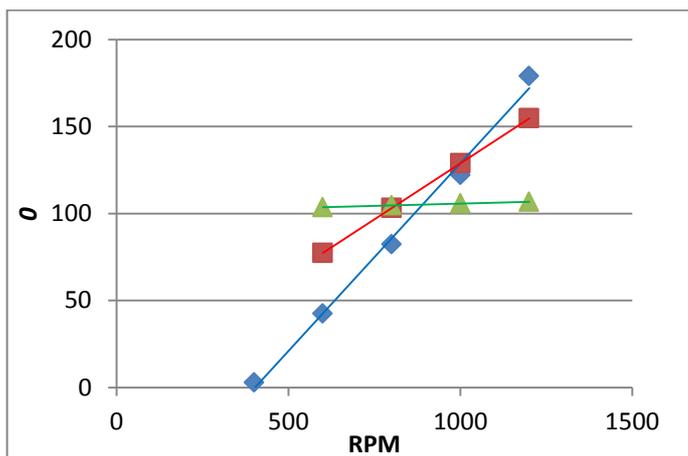
Impeller	Sparger	1200RPM / 0.15vvm	300RPM (EE); 500RPM (RT)/ 1.75vvm
EEU45	1000 μm	272	181
	40 μm	211	242
	20 μm	204	240
EED45	1000 μm	244	146
	40 μm	296	257
	20 μm	305	218
RT	1000 μm	179	151
	40 μm	150	173
	20 μm	107	213



(a)

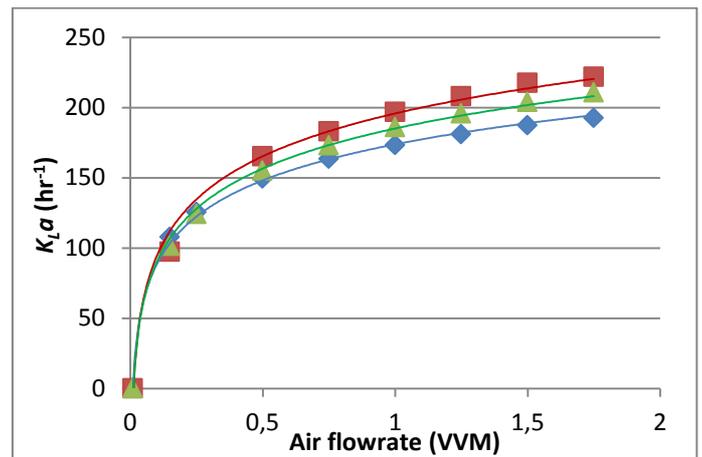


(b)

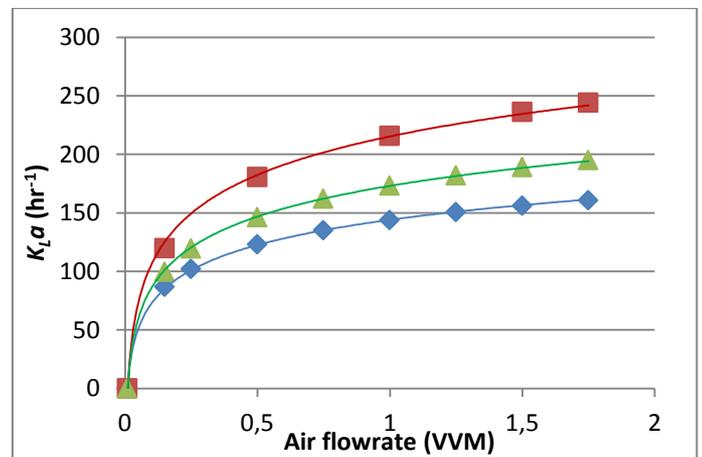


(c)

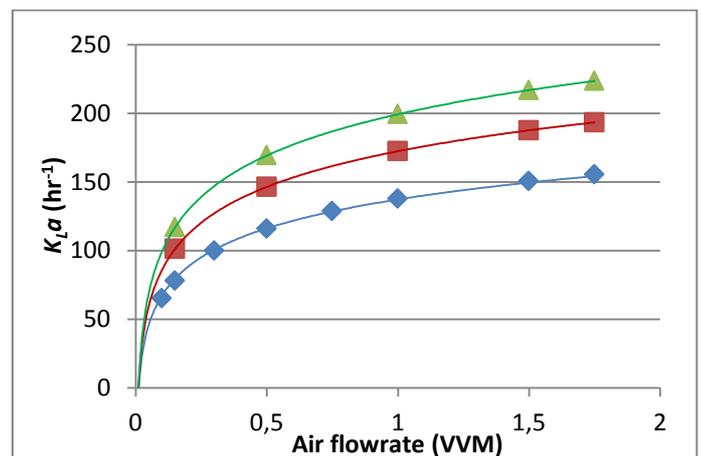
Figure 50. Linear regression applied on experimental K_{La} values vs. stirrer speed at 0.15 vvm: (a): EEU45; (b): EED45; (c): 2 x Rushton.



(a)



(b)



(c)

Figure 51. logarithmic regression applied on experimental K_{La} values vs. airflow rate at 400 RPM for EE and 800 RPM for RT: (a): EEU45; (b):EED45; (c): 2 x Rushton.

— : 1000µm (fitted); — : 40µm (fitted); — : 20µm (fitted)

2. K_{La} modeling and prediction

As indicated above (Table 36), the prediction of K_{La} according to the operational conditions of fermentations was the subject of many correlations. The most used is given in equation 1. It links the K_{La} to the power input and the superficial velocity of sparged air. This correlation presents the advantage to take into account at the same time to the stirring velocity and the air flow rate. We thus have used this correlation to model the evolution of the K_{La} obtained with the three studied system of agitation and the three diffuser of air. The K_{La} prediction for Ear Elephant devices and in the presence of different sparger diffusivities was never been described in our knowledge.

$$\text{Eq. 1. } KLa = a \times \left(\frac{P_g}{V}\right)^b \times v_g^c$$

Where a, b and c are constant characteristics of the studied system.

The determination of b is obtained by fitting the experimental data obtained at constant airflow and variable stirring speed by $\log K_{La}$ vs. $\log P_g/V_L$, "b" is the slope of this line. The fitting of this correlation at constant stirring speed and variable airflow rate leads to "c" using $\log K_{La}$ vs. $\log v_g$. Finally, the fitting of constant airflow and variable stirring speed data associate to the use of the numerical values of b and c gives the constant "a" plotting this function $\frac{KLa}{v_g^c}$ vs. $\frac{P_g}{V_L^b}$.

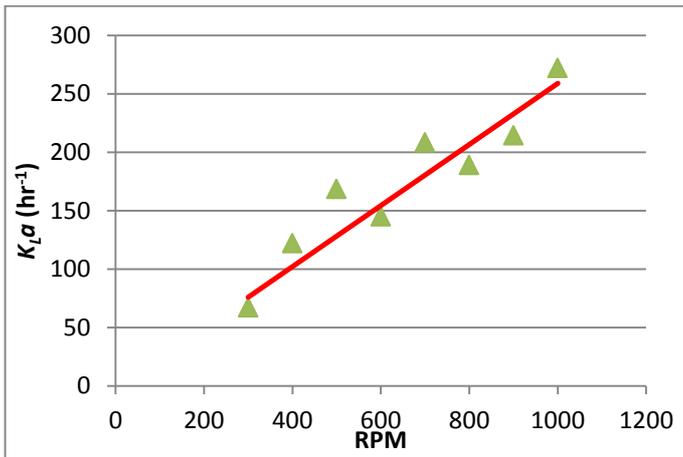
The constant a, b, and c values obtained for the different combinations of impellers and air diffusers are summarized in Table 39. It appears that these constants depend upon the diffuser porosity and impeller shape. (Gogate, Beenackers et al. 2000), (Sardeing, Aubin et al. 2004) and (Shukla, Parasu Veera et al. 2001) have established similar correlation of K_{La} with RT. Their values are close to those obtained in this paper with the 1000 μ m sparger; however as the exact porosity of the diffuser used by these authors is missed, it is difficult to explain the observed difference.

Table 39. Values of constants a, b and c of systems used in this study.

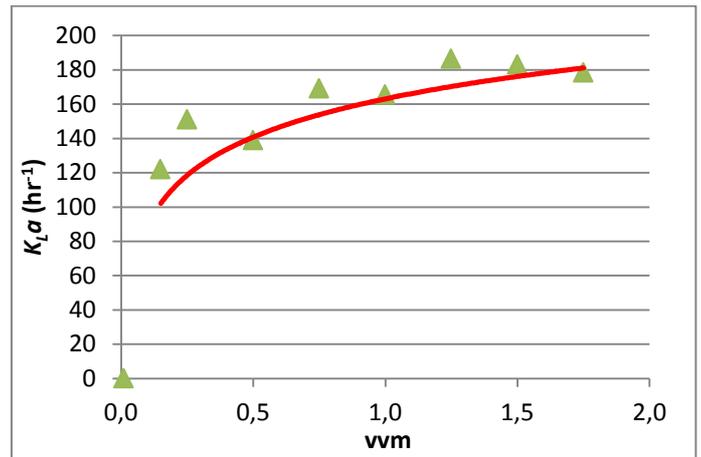
Type of impeller	Type of sparger	Constant a	Constant b	Constant c
EEU45	1000 μ m	0.0089	0.392	0.234
EEU45	40 μ m	0.0124	0.292	0.413
EEU45	20 μ m	0.0454	0.385	0.411
EED45	1000 μ m	0.0087	0.440	0.248
EED45	40 μ m	0.0007	0.763	0.290
EED45	20 μ m	0.0092	0.468	0.270
RT	1000 μ m	0.0002	0.899	0.298
RT	40 μ m	0.0065	0.460	0.263
RT	20 μ m	0.2184	0.017	0.263

The experimental and fitted data provided by the equation 1 are compared for the different studied combination of impeller and diffuser. For EEU45 and as an illustration this comparison was given in Figure 52a, b, and c for variable stirring speed and given flow rate (0.15vvm) and in Figure 52d, e and f for variable airflow rate and fixed RPM (400RPM). It appears clearly that the developed model fits well experimental data except with diffuser of 20 μ m at higher values of speed rate (Figure 52c). Similar behavior of fitting was also obtained with EED45 and RT.

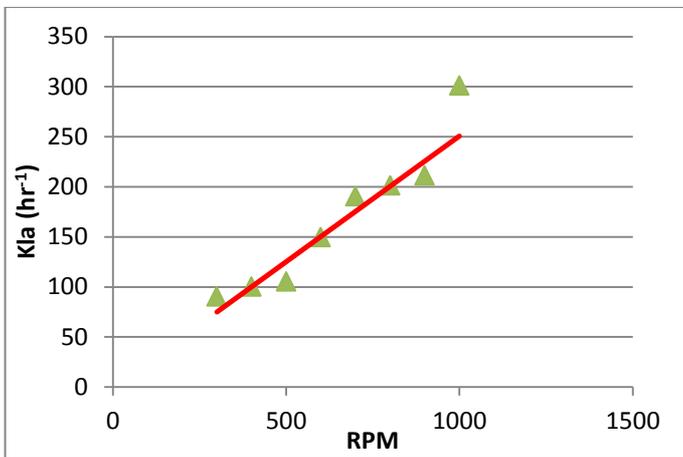
To validate the developed model the $K_{L,a}$ was determined experimentally under different stirring rate and airflows and predicated from the developed equation. The Figure 53 and Figure 54 show a satisfying agreement between predicate and experimentally determined $K_{L,a}$ values. Thus the model can be used either to evaluate the $K_{L,a}$ for the large operating conditions or to be used to extrapolation from lab to pilot scale. .



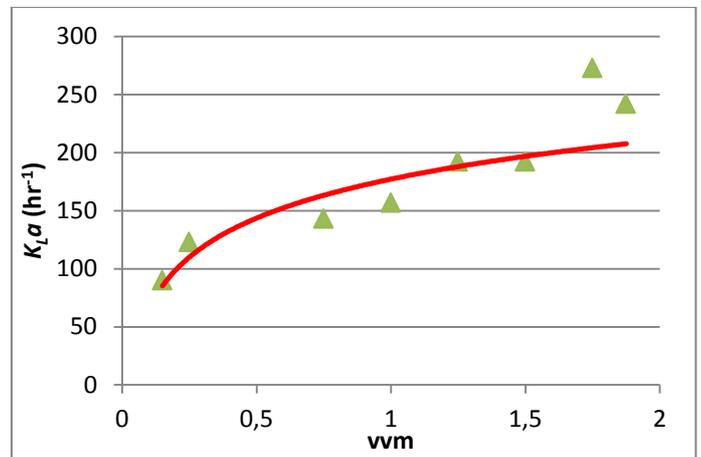
(a)



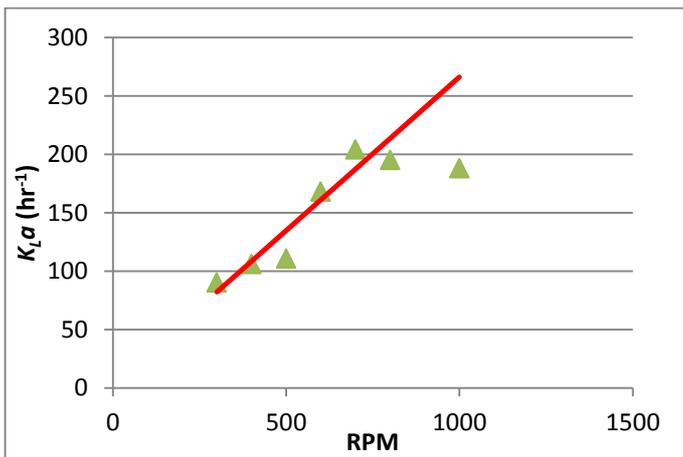
(d)



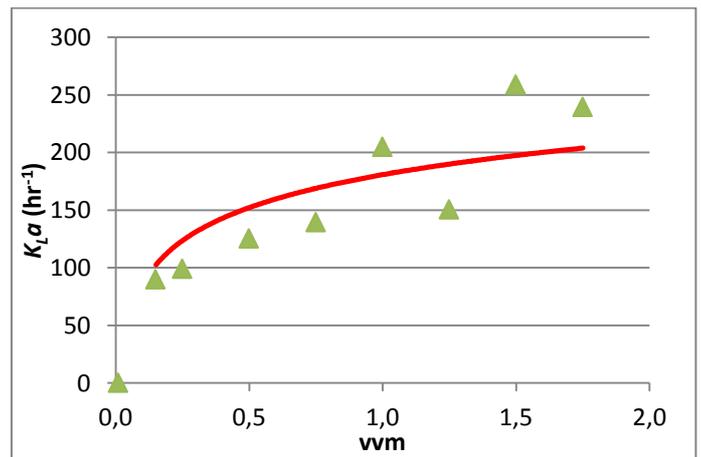
(b)



(e)



(c)



(f)

Figure 52. K_La prediction with EEU45 at variable stirring speed (fixed airflow of 0.15vvm): (a): classic 1000 μ m sparger; (b): 40 μ m; (c): 20 μ m; at variable airflow rate (fixed speed rate of 400RPM): (d): classic 1000 μ m sparger; (e): 40 μ m; (f): 20 μ m. ▲ Experimental — Model

Table 40. K_La values obtained with experiments or with the developed model with EEU45 + 40 μ m microsparger.

RPM	vvm	K_La exp	K_La mod	Error
200	0,4	105	85	20%
700	0,4	266	242	9%
200	1,6	102	127	-25%
700	1,6	392	363	7%
450	1,85	237	242	-2%
450	1	177	202	-14%

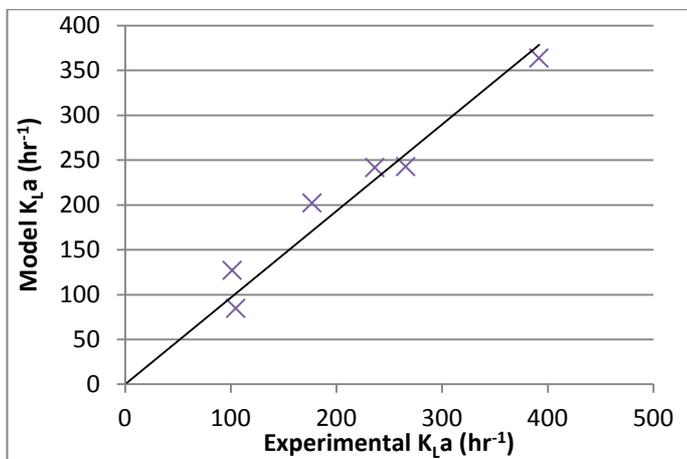


Figure 53. Correlations between K_La prediction model and K_La from experimental data with EED45 + 40 μ m microsparger.

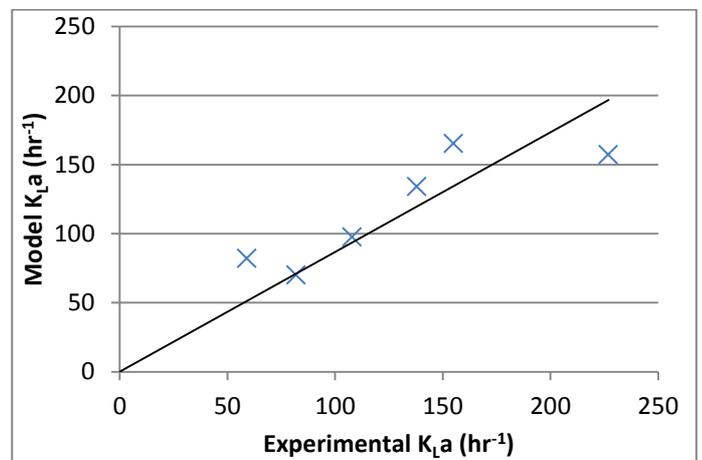


Figure 54. Correlations between K_La prediction model and K_La from experimental data with RT + 1000 μ m sparger.

Table 41. K_La values obtained with experiments or with the developed model with EED45 + 40 μ m microsparger.

RPM	vvm	K_La exp	K_La mod	Error
250	0,1	59	82	-39%
300	0,1	108	97	10%
500	0,1	227	157	31%
100	1,33	82	70	15%
200	1,33	138	134	3%
250	1,33	155	165	-7%

Table 42. K_{La} values obtained with experiments or with the developed model with Rushton Turbine + 1000 μ m sparger.

RPM	vvm	K_{La} exp	K_{La} mod	Error
500	0,13	42	35	17%
500	1,3	46	69	-51%
800	0,13	131	81	38%

Conclusions

This paper analyzed and compared the performance in terms of the transfer of the oxygen of three impellers (EE in down or up-pumping mode and Rushton) and three air diffusers (20, 40, and 1000 μ m). So, the power number, the power gassed to ungassed, the K_{La} determined under a wide range operating conditions (stirring and air flow rates) was investigated. The obtained results indicated clearly that EE impeller is the most efficient in terms of the oxygen transfer and the porosity of the diffuser affect also this transfer. But this effect is dependent to impeller shape and operating conditions. Whatever the studied conditions the highest value of K_{La} were reached with EED45 followed successively by EEU45 and RT. In fact, the EED45 gave the highest K_{La} ($K_{La_{max}}$) values of around 300hr⁻¹ with the 40 μ m and 20 μ m microspargers. While with classical sparger (1000 μ m) the $K_{La_{max}}$ is reached with EEU45. In the presence of RT the $K_{La_{max}}$ is lower in any case compared to EE devices.

A model linking the K_{La} to the stirring and air flow rates was developed and validated. It will be used as a predictive tool for the extrapolation of the process to the pilot and industrial scales.

Acknowledgement

We'd like to thank the DSM France Company for their financial support; and their employees for their helpful discussions and helping hands: Lilian LABUSSIÈRE, Catherine DUONG, Dan GOURSAT, and Sylvain GOURDAUT.

The authors also wish to express their sincere appreciation to the French association of research and technology (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) for their financial support.

References

- Ahmad, M. N., C. R. Holland, et al. (1994). "Mass transfer studies in batch fermentation: Mixing characteristics." *Journal of Food Engineering* 23(2): 145-158.
- Arlov, D., J. Revstedt, et al. (2008). "Numerical simulation of a gas liquid Rushton stirred reactor LES and LPT." *Computers & Fluids* 37(7): 793-801.

- Armenante, P. M. and G.-M. Chang (1998). "Power Consumption in Agitated Vessels Provided with Multiple-Disk Turbines." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 37(1): 284-291.
- Armenante, P. M., B. Mazzarotta, et al. (1999). "Power Consumption in Stirred Tanks Provided with Multiple Pitched-Blade Turbines." *Industrial & Engineering Chemistry Research* 38(7): 2809-2816.
- Ashley, K. I., K. J. Hall, et al. (1991). "Factors influencing oxygen transfer in fine pore diffused aeration." *Water Research* 25(12): 1479-1486.
- Bakker, A. and H. E. A. Van den Akker (1994). "Gas-liquid contacting with axial flow impellers." *Chemical Engineering Research and Design* 72(A4): 573 - 582.
- Banerjee, U. C. (1993). "Effect of stirrer speed, aeration rate and cell mass concentration on volumetric oxygen transfer coefficients (KLa) in the cultivation of *Curvularia lunata* in a batch reactor." *Biotechnology techniques* 7(10): 733 - 738.
- Bustamante, M. C. C., M. O. Cerri, et al. (2013). "Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers." *Chemical Engineering Science* 90: 92-100.
- Cui, Y. Q., R. G. J. M. van der Lans, et al. (1996). "Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple rushton turbines." *Chemical Engineering Science* 51(11): 2631-2636.
- Czermak, P., C. Weber, et al. (2006). "A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors." *Publication series of IBPT - University of Applied Sciences Giessen-Friedberg*(1).
- Galaction, A. I., D. Cascaval, et al. (2004). "Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths." *Biochemical Engineering Journal* 20(1): 85-94.
- Garcia-Ochoa, F. and E. Gomez (2009). "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview." *Biotechnology advances* 27(2): 153-176.
- Garcia-Ochoa, F., E. Gomez, et al. (2010). "Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview." *Biochemical Engineering Journal* 49(3): 289-307.
- Gogate, P. R., A. A. Beenackers, et al. (2000). "Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review." 6: 109 - 144.
- Hensirisak, P., P. Parasukulsatid, et al. (2002). "Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 101(3): 211-227.
- Iranzo, A., R. Barbero, et al. (2011). "Numerical Investigation of the Effect of Impeller Design Parameters on the Performance of a Multiphase Baffle-Stirred Reactor." *Chemical Engineering & Technology* 34(8): 1271-1280.
- Junker, B. H., M. Stanik, et al. (1998). "Influence of impeller type on power input in fermentation vessels." *Bioprocess Engineering* 18(6): 401-412.
- Luong, H. T. and B. Volesky (1979). "Mechanical power requirements of gas-liquid agitated systems." *AIChE Journal* 25(5): 893-895.
- Michaels, J. D., A. K. Mallik, et al. (1996). "Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells?" *Biotechnology and Bioengineering* 51(4).
- Möckel, H. O., E. Wolleschensky, et al. (1990). "Modelling of the calculation of the power input for aerated single- and multistage impellers with special respect to scale-up." *Acta Biotechnologica* 10(3): 215-224.
- Moucha, T., V. Linek, et al. (2003). "Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations." *Chemical Engineering Science* 58: 1839 - 1846.
- Nehring, D., P. Czermak, et al. (2004). "Experimental study of a ceramic microsparging aeration system in a pilot-scale animal cell culture." *Biotechnology Progress* 20(6): 1710-1717.
- Nienow, A. W. (1997). "On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime." *Chemical Engineering Science* 52(15): 2557-2565.
- Nienow, A. W. (1998). "Hydrodynamics of Stirred Bioreactors." *Applied Mechanics Reviews* 51(1): 3-32.
- Nienow, A. W. and W. Bujalski (2004). "The Versatility of Up-Pumping Hydrofoil Agitators." *Chemical Engineering Research and Design* 82(9): 1073-1081.

- Poulsen, B. R. and J. J. L. Iversen (1998). "Characterization of gas transfer and mixing in a bubble column equipped with a rubber membrane diffuser." *Biotechnology and bioengineering* 58(6): 633-641.
- Sardeing, R., J. Aubin, et al. (2004). "Gas-Liquid Mass Transfer: A Comparison of Down- and Up-pumping Axial Flow Impellers with Radial Impellers." *Chemical Engineering Research and Design* 82(12): 1589-1596.
- Scargiali, F., A. Busciglio, et al. "Mass Transfer And Hydrodynamic Characteristics Of Unbaffled Stirred Bio-Reactors: Influence Of Impeller Design." *Biochemical Engineering Journal*(0).
- Shukla, V. B., U. Parasu Veera, et al. (2001). "Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor." *Biochemical Engineering Journal* 8(1): 19-29.
- Van't Riet, K. (1979). "Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels." *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* 18(3): 357-364.
- Vrabel, P., R. G. J. M. van der Lans, et al. (2000). "Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements." *Chemical Engineering Science* 55(23): 5881-5896.
- Zhu, H., A. W. Nienow, et al. (2009). "Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping Elephant Ear agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements." *Chemical Engineering Research and Design* 87(3): 307-317.

Conclusion :

Cet article a pour objectif de comparer les effets de trois mobiles d'agitation (deux oreilles d'éléphant inclinées à 45° en pompage vers le haut ou vers le bas, une turbine Rushton) et trois porosités de diffuseur d'air (1000µm, 40µm et 20µm) sur le coefficient de transfert d'oxygène, K_La , d'un fermenteur de 3,6 L de volume total. Ce document est structuré en deux parties.

La première partie de cet article analyse les effets du mobile d'agitation et de la porosité du sparger sur le coefficient de transfert d'oxygène. Les résultats marquants sont :

- Le K_La évolue de manière linéaire pour des vitesses variables d'agitation et de manière logarithmique pour des débits d'air variables.
- La turbine Rushton donne les valeurs les plus faibles de K_La comparées aux autres systèmes d'agitation.
- Le microsparger 20µm donne un K_La constant lorsqu'il est utilisé avec la turbine Rushton probablement dû au phénomène de coalescence.
- Pour les oreilles d'éléphant, l'effet de la porosité est uniquement observé dans le cas du pompage vers le bas. Ce mode de pompage semble le plus efficace en termes de K_La car la rétention de gaz est meilleure.
- L'effet de la porosité du diffuseur d'air est le plus constaté dans le cas d'utilisation de la turbine Rushton ou des oreilles d'éléphant en pompage vers le bas. Le sparger 1000µm semble donner les valeurs les plus basses de K_La pour les trois mobiles d'agitation.

La deuxième partie est consacrée au développement d'un modèle de prédiction du K_La d'après les résultats obtenus précédemment selon la porosité du sparger et selon le mobile d'agitation utilisé. Le modèle suivant a été utilisé : $KLa = a \times \left(\frac{P_g}{V}\right)^b \times V_g^c$. Ces constantes : a, b et c varient en fonction de l'hydrodynamique (type/géométrie du fermenteur, les conditions opératoires appliquées), des propriétés physiques et chimiques du fluide étudié (présence de cellules, agents surfactants/tensio-actifs, viscosité, etc.) et évidemment de la température et du pH. Compte tenu de ces facteurs permettant le calcul du K_La , les valeurs des coefficients a, b et c peuvent être très dispersées en fonction des configurations ($0 < a < 0.22$ / $0.01 < b < 0.9$ / $0.2 < c < 0.7$). Ce modèle et les constantes déduites expérimentalement permettront de faciliter l'extrapolation d'un nouveau système d'agitation et d'aération à l'échelle pilote de 900L à K_La constant à l'aide d'un tableur Excel décrit plus loin dans ce manuscrit.

La dernière partie discute et compare ces résultats à la bibliographie. Il apparaît clairement qu'au niveau efficacité de transfert d'oxygène, la pale type « oreilles d'éléphant » est le système d'agitation le plus performant de toutes ceux étudiés quelque soit le système d'aération utilisé. Le système de

microsparger semble trouver sont intérêt essentiellement sur des vitesses basses d'agitation et à des débits supérieurs à 0,5 vvm. On trouve un effet négatif du microsparger sur les turbines Rushton, la cause de ce résultat serait probablement due aux phénomènes de coalescence des bulles ou d'engorgement du mobile. Il ressort de cette étude que le meilleur système d'agitation qui assure un transfert efficace d'oxygène semble être l'oreille d'éléphant inclinée vers le bas accompagné d'un microsparger

Chapitre 6 :

Extrapolation et

validation sur 900L

6.1. Développement d'un outil d'extrapolation géométrique et non géométrique : Application au dimensionnement du nouveau mobile d'agitation

Pour réaliser l'extrapolation des résultats obtenus au laboratoire et à l'échelle pilote (900L), nous avons développé un outil sur un tableur Microsoft Excel©. Cet outil est composé de cinq feuillets et a été exploité pour dimensionner la nouvelle turbine à concevoir et à installer sur l'échelle pilote de 900L.

Nous avons explorés deux approches d'extrapolation, une basée sur la similitude géométrique et une basée sur la similitude non géométrique. La première sert à concevoir une nouvelle installation et la seconde permet de modifier uniquement une partie d'une installation existante, en l'occurrence du mobile d'agitation dans le cadre de ce travail.

Le premier feuillet de cet outil concerne les données caractéristiques des propriétés physico-chimiques du fluide utilisé. Ce feuillet est présenté dans le Tableau 43. Ces données sont à renseigner au démarrage du processus d'extrapolation.

Tableau 43. Données physico-chimiques à entrer (en jaune) dans le tableur d'extrapolation au début du procédé d'extrapolation et données calculées (en blanc).

PARAMETRES FERMENTATION

durée du batch	h	27
Température	°C	30
Pression absolue	Pa	101500
O ₂ à saturation	O ₂ (% saturation air)	20,9%
O ₂ à saturation	mg/L	7,6
H	Pa.m ³ .mol ⁻¹	48840
Consigne PO ₂	%	10%
Rendement Y _{O₂/X}	g O ₂ / g X	1,2
O ₂ à la consigne	mg/L	0,76

CARACTERISTIQUES DU FLUIDE

densité	ρ (kg/m ³)	1050
viscosité	μ (Pa.s)	0,001
Tension superficielle	γ	73
viscosité cinématique	ν (m ² /s) = μ / ρ	9,52E-07

Le deuxième feuillet (Tableau 44) permet de calculer les différentes caractéristiques géométriques de l'installation à l'échelle de l'extrapolation (pilote ou industrielle) à partir des données fournies à l'échelle de base de l'extrapolation (laboratoire ou pilote). Ce calcul a été fait pour les similitudes géométrique et non géométrique. Etant donné que la vitesse maximale accessible à l'échelle pilote de 900L est de 200 RPM ; cette vitesse a été retenue pour faire le calcul des dimensions de la nouvelle pale d'agitation.

De plus, sur ce feuillet, les paramètres caractéristiques de l'agitation (N_p , N , K_{max} et K_{moyen}) et les constantes du modèle de prédiction du K_La sont indiqués. Les données à entrer dans ce feuillet pour initier le calcul sont obtenues soit expérimentalement ou à défaut à partir des données de la littérature.

Tableau 44. Données d'entrée (jaune) des caractéristiques géométriques et d'agitation / aération et les grandeurs calculées (blanc).

GEOMETRIE		Echelle initiale	Echelle visée GEOMETRIQUE	Echelle visée NON GEOMETRIQUE
Volume liquide	V (L)	1,5	600,00	600,00
Volume liquide	V (m ³)	0,0015	0,60	0,60
Pression hydrostatique	P (atm)	1,029	1,117	1,141
Diamètre agitateur	d (m)	0,085	0,63	0,380
Hauteur agitateur	w (m)	0,065	0,48	0,23
Diamètre cuve	D (m)	0,15	1,11	0,792
Hauteur liquide	H (m)	0,135	0,99	1,22
Taille chicanes	b (m)	0,02	0,11	0,08
Ratio diam. agit. / cuve	d/D	0,57	0,57	0,48
Fréquence agitation	N (tr/min)	600	200	200
Fréquence agitation	N (tr/s)	10,00	3,33	3,33
Facteur F	$(V_i / V_p)^{(1/3)}$		7,37	
Facteur R	$H_{i,z} / H_{i,1}$			0,48

PARAMETRES AGITATION

		Initial	Visée
Nombre de puissance	N_p	1,5	3
Nombre de pompage	N_o	0,68	0,68
K_{max}		35	35
K_{moyen}		10	10

PARAMETRES CALCUL K_{La}

		Initiale	Visée
k	=	0,0450	0,00123
α	=	0,385	0,528
β	=	0,411	0,138

Le troisième feuillet donne la puissance (n) à appliquer au facteur de l'échelle (F) pour prédire la valeur extrapolée des autres critères. Cet exposant a été calculé en fixant à chaque fois un des critères constant. Les différentes valeurs obtenues sont données dans le Tableau 45. La valeur zéro indique le critère constant. Du point de vue pratique, on fixe un ou deux critères constants pour réaliser l'extrapolation. Ce choix se fait selon l'objectif visé : meilleur transfert de matière, meilleure turbulence, cisaillement minimum, etc.

Tableau 45. Extrapolation avec similitude géométrique en fixant un paramètre entre les échelles (en vert).

Effets d'un changement d'échelle sur les grandeurs caractéristiques							
F [^]	AVEC SIMILITUDE GEOMETRIQUE						
variables	N (s-1)	vpale (m/s)	P/V (W / m3)	Tm (s)	Re	Fr	We
Dimensions	N	ND	N ³ D ²	D	ND ²	N ² D	N ² D ³
N (s-1)	0	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
N (min-1)	0	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
vpale (m/s)	1,00	0	0,33	1,00	-1,00	0,50	-0,50
P (kW)	5,00	2,00	3,00	5,00	-1,00	3,50	0,50
P/V (kW/m3)	2,00	-1,00	0	2,00	-4,00	0,50	-2,50
Qp (m3 / s)	3,00	2,00	2,33	3,00	1,00	2,50	1,50
Tp (s)	0,00	1,00	0,67	0,00	2,00	0,50	1,50
Tm (s)	0,00	1,00	0,67	0	2,00	0,50	1,50
H* (m)	2,00	0,00	0,67	2,00	-2,00	1,00	-1,00
Qp / H* (m ² / s)	1,00	2,00	1,67	1,00	3,00	1,50	2,50
Re	2,00	1,00	1,33	2,00	0	1,50	0,50
Fr	1,00	-1,00	-0,33	1,00	-3,00	0	-2,00
We	3,00	1,00	1,67	3,00	-1,00	2,00	0
Grad.vit. Max.	0,00	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
Grad.vit. Moy.	0,00	-1,00	-0,67	0,00	-2,00	-0,50	-1,50
Objectifs	Turbulence	- Conservation vitesses - Dispersion sans coalescence - Cisaillement max	- Transfert de masse biphasique - Dispersion + coalescence - Suspension homogène - Economies énergétiques	Transfert de masse et de chaleur	Transfert de chaleur	- Transfert de masse - Hauteur de vortex - Mise en suspension	Tension superficielle

Le feuillet quatre (Tableau 46) exploite les données issues des feuillets 1, 2 et 3 pour calculer les grandeurs caractéristiques (puissance, nombres adimensionnels, *etc.*) de l'installation initiale (laboratoire ou pilote) et examine leurs effets sur l'extrapolation à l'échelle visée (pilote ou industrielle) à différents critères constants (N, Vp, Re, Fr, P/V, *etc.*) pour une extrapolation géométrique.

Tableau 46. Extrapolation avec similitude géométrique entre un fermenteur de 1.5L et un fermenteur de 900L pour différents critères constants avec un rapport d'échelle, F, égal à 7.37.

EXTRAPOLATION AVEC SIMILITUDES GEOMETRIQUES									
CRITERES D'EXTRAPOLATION									
variables	Echelle initiale	Formules	N (s ⁻¹)	Formules	v _{pa} (m/s)	Formules	T _m (s)	Formules	Re
N (s ⁻¹)	10,00		10,00	Vp / (N.d) =	1,36	(6.(D/d) ²).Tm =	10,00	(a.Re) / (d ²) =	0,18
N (min-1)	600,0000		600	N . 60 =	81	N . 60 =	600,0	N . 60 =	11
v _{pa} (m/s)	2,670	Π.N.d =	19,7		2,670	Π.N.d	19,7	Π.N.d	0,36
P (W)	6,9884	Np.ρ.N ³ .d ⁵ =	252924	Np.ρ.N ³ .d ⁵ =	379,4	Np.ρ.N ³ .d ⁵ =	151755	Np.ρ.N ³ .d ⁵ =	0,95
P.V (W.m ³)	4659	P.V =	421540,5	P.V =	632,311	P.V =	252924,319	P.V =	1,581
Q _p (m ³ /s)	0,00	Nq.N.d ³ =	1,7	Nq.N.d ³ =	0,2	Nq.N.d ³ =	1,7	Nq.N.d ³ =	0,0
T _p (s)	0,36	V / (Nq.N.d ³) =	0,4	V / (Nq.N.d ³) =	2,6	V / (Nq.N.d ³) =	0,4	V / (Nq.N.d ³) =	19,5
T _g (s)	1,87	(6.(D/d) ²).N =	1,9	(6.(D/d) ²).N =	13,8		1,9	(6.(D/d) ²).N =	101,4
H* (m)	0,16	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	14,7	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	0,2	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	8,8	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	0,0
Q _p / H* (m ² /s)	0,03	Qp.H*	0,1	Qp.H*	1,4	Qp.H*	0,2	Qp.H*	10,3
Re	7,59E+04	(N.D ² .ρ) / v =	4,12E+06	(N.D ² .ρ) / v =	5,59E+05	(N.D ² .ρ) / v =	4,12E+06		7,59E+04
Fr	0,866	(N ² .d) g =	6,4	(N ² .d) g =	0,12	(N ² .d) g =	6,38	(N ² .d) g =	0,00
We	0,88	(ρ.N ² .d ³)/γ =	353,33	(ρ.N ² .d ³)/γ =	6,51	(ρ.N ² .d ³)/γ =	353,33	(ρ.N ² .d ³)/γ =	0,12
Grad.vit. Max	350,00	K _m . N	350,00	K _m . N	47,50	K _m . N	350,00	K _m . N	6,45
Grad.vit. Moy	100,00	K' _m . N	100,00	K' _m . N	13,57	K' _m . N	100,00	K' _m . N	1,84
τ (s ⁻¹)	2159	Racine(etot / μ) =	20531,5	Racine(etot / μ) =	795,2	Racine(etot / μ) =	15903,6	Racine(etot / μ) =	39,8
kla (h)	165,96	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	67972,42	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	22,56	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	36225,56	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	0,01
OTR (mg/L.h)	1135,19	Kla .(O2*-O2l) =	464931,33	Kla .(O2*-O2l) =	154,29	Kla .(O2*-O2l) =	247782,80	Kla .(O2*-O2l) =	0,10
dD	0,57	dD	0,57	dD	0,57	dD	0,57	dD	0,57

EXTRAPOLATION AVEC SIMILITUDES GEOMETRIQUES									
CRITERES D'EXTRAPOLATION									
variables	Formules	Fr	Formules	We	Formules	Kla	Formules	P/V	
N (s ⁻¹)	((Fr.g).d) ^(1/2)	3,68		0,50	((Np.ρ.d ⁵).P) ^(1/3) =	1,71	((Np.ρ.d ⁵).P) ^(1/3) =	0,38	
N (min-1)	N . 60 =	221	N . 60 =	30	N . 60 =	103	N . 60 =	23	
v _{pa} (m/s)	Π.N.d	7,2	Π.N.d	1,0	Π.N.d	3,4	Π.N.d	0,7	
P (W)	Np.ρ.N ³ .d ⁵ =	7588	Np.ρ.N ³ .d ⁵ =	19,0	P.V . V =	0,8	P.V . V =	2795	
P.V (W.m ³)	P.V =	12646,2	P.V =	31,6	EXP (Ln Kla / (Ln K . β Ln Ug . α))	1,27	P.V =	4659	
Q _p (m ³ /s)	Nq.N.d ³ =	0,6	Nq.N.d ³ =	0,1	Nq.N.d ³ =	0,3	Nq.N.d ³ =	0,06	
T _p (s)	V / (Nq.N.d ³) =	1,0	V / (Nq.N.d ³) =	7,2	V / (Nq.N.d ³) =	2,1	V / (Nq.N.d ³) =	9,5	
T _g (s)	(6.(D/d) ²).N =	5,1	(6.(D/d) ²).N =	37,4	(6.(D/d) ²).N =	10,9	(6.(D/d) ²).N =	49,3	
H* (m)	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	1,2	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	0,0	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	0,3	(Np/(Nq.g.IT ²))*Vp ² =	0,0	
Q _p / H* (m ² /s)	Qp.H*	0,5	Qp.H*	3,8	Qp.H*	1,1	Qp.H*	5,0	
Re	(N.D ² .ρ) / v =	1,52E+06	(N.D ² .ρ) / v =	2,06E+05	(N.D ² .ρ) / v =	7,05E+05	(N.D ² .ρ) / v =	7,05E+05	
Fr		0,866	(N ² .d) g =	0,02	(N ² .d) g =	0,19	(N ² .d) g =	0,01	
We	(ρ.N ² .d ³)/γ =	47,95		0,883	(ρ.N ² .d ³)/γ =	10,36	(ρ.N ² .d ³)/γ =	0,51	
Grad.vit. Max	K _m . N	128,94	K _m . N	17,50	K _m . N	59,94	K _m . N	13,25	
Grad.vit. Moy	K' _m . N	36,84	K' _m . N	5,00	K' _m . N	17,13	K' _m . N	3,79	
τ (s ⁻¹)	Racine(etot / μ) =	3556,2	Racine(etot / μ) =	177,8	Racine(etot / μ) =	35,6	Racine(etot / μ) =	2158,4	
kla (h)	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	903,95	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	0,56		165,96	K.(Prot.V) ^α .Ug ^β	264,15	
OTR (mg/L.h)	Kla .(O2*-O2l) =	6183,04	Kla .(O2*-O2l) =	3,85	Kla .(O2*-O2l) =	1135,19	Kla .(O2*-O2l) =	1806,81	
dD	dD	0,57	dD	0,57	dD	0,57	dD	0,57	

Les résultats issus du processus d'extrapolation montrent que l'application de l'approche basée sur la similitude géométrique engendre, pour certains critères maintenus fixes, des valeurs extrapolées trop élevées difficilement applicables à l'échelle industrielle voire à l'échelle pilote. La similitude géométrique n'est donc pas applicable systématiquement et peut engendrer des coûts très élevés. Néanmoins, il est possible de jouer sur les données géométriques de l'agitateur pour trouver un compromis entre les différents critères importants et imposer les conditions qui permettent de ne pas dépasser les limites tolérées par le micro-organisme ou par le procédé.

Dans le cadre de cette étude l'installation visée par l'extrapolation existe (pilote et industrielle). Les dimensions sont donc fixées et l'objectif ici, est de dimensionner un nouveau mobile sans modifier la géométrie du fermenteur (diamètre, hauteur). Pour concevoir et dimensionner le nouveau mobile d'agitation à installer sur l'échelle supérieur l'approche basée sur l'extrapolation non géométrique a été utilisée. Les effets sur les performances (K_{La} , P/V , V_p , *etc.*) des dimensions de la nouvelle turbine installée sur le 600 L ont été examinés. Les résultats sont présentés dans le Tableau 47 (cinquième feuillet) avec un mobile d'agitation type oreilles d'éléphant et un microsparger avec une porosité de 20 μ m pour les deux échelles. Il apparaît que la puissance volumique est plus faible à l'échelle pilote qu'à l'échelle laboratoire, la vitesse au bout de pale est légèrement plus élevée mais reste inférieure à 6 m/s et ainsi limite le phénomène de cavitation. Le système reste turbulent.

Tableau 47. Extrapolation sans similitude géométrique entre un fermenteur de 1.5L (à 600RPM) et un fermenteur de 900L (à 200RPM). Seuls les diamètres de cuve et d'agitateur ont été changés.

Echelle initiale				Echelle visée	
AGITATION				AGITATION	
Puissance agitation	P_o (W)	$Np \cdot \rho \cdot N^3 \cdot d^5 =$	6,9884	P_o (W)	924,41
Puissance volumique	P_o / V (W/m ³)	$P_o / V =$	4658,91	P_o / V (W/m ³)	1540,684
Puissance massique	ε (W/kg)	$P / (\rho \cdot V) =$	4,4371	ε (W/kg)	1,4673
Vitesse bout de pale	V_p (m/s)	$\Pi \cdot N \cdot d =$	2,670	V_p (m/s)	3,979
Couple	C_p (Nm)	$P_o / (2 \cdot \Pi \cdot N) =$	0,111	C_p (Nm)	44,137
Reynolds	Re	$(N \cdot d^2) / \nu =$	7,59E+04	Re	5,05E+05
Froude	Fr	$(N^2 \cdot d) / g =$	0,866	Fr	0,430
Weber	We	$(\rho \cdot N^2 \cdot d^3) / \gamma =$	0,8833	We	8,769
Débit de pompage	Q_p (m ³ /s)	$Nq \cdot N \cdot d^3 =$	0,0042	Q_p (m ³ /s)	0,12
Débit de circulation	Q_c (m ³ /s)	$1,8 \cdot Nq \cdot N \cdot d^3 =$	0,0075	Q_c (m ³ /s)	0,2239
Débit d'entraînement	Q_e (m ³ /s)	$Q_c - Q_p =$	0,0033	Q_e (m ³ /s)	0,0995
Hauteur théorique	H^* (m)	$(Np / (Nq \cdot g \cdot P^2)) \cdot V_p^2 =$	0,1625	H^* (m)	0,7216
Q_p / H^*	Q_p / H^* (m ² /s)	$Q_p / H^* =$	0,0257	Q_p / H^* (m ² /s)	0,1724
Temps de pompage	t_p (s)	$V / (Nq \cdot N \cdot d^3) =$	0,36	t_p (s)	4,82
Temps de mélange	t_m (s)	$(6 \cdot (D/d)^2) / N =$	1,87	t_m (s)	7,82
Echelle moyenne de Kolmogorov	l_k (μm)	$(\nu^3 / \varepsilon_{tot})^{0.25} =$	2,10E-05	l_k (μm)	2,74E-05
Gradient de vitesse max	G_{max}	$K_{max} \cdot N =$	350	G_{max}	117
Gradient de vitesse moyen	G_{moyen}	$K_{moyen} \cdot N =$	100	G_{moyen}	33
Cisaillement	τ (s ⁻¹)	$\text{racine}(\varepsilon_{tot} / \nu) =$	2159	τ (s ⁻¹)	1241
1,5 L --> 0,6 m ³				1,5 L --> 0,6 m ³	
AERATION				AERATION	
Débit de gaz	v_{vm}		0,150	v_{vm}	0,150
Débit de gaz	Q_g (L/min)	$Q_{vvm} \cdot V =$	0,225	Q_g (L/min)	90
Débit de gaz	Q_g (m ³ /s)		0,00000375	Q_g (m ³ /s)	0,0015
Vitesse superficielle	U_g (m/s)	$Q_g / S_{cuve} =$	0,000	U_g (m/s)	0,003044746
Nombre d'aération	Na	$Q_g / (N \cdot D^3) =$	0,00061	Na	0,0082009
Puissance corrigée	P_g / P_o	$P_g / P_o =$	0,992	P_g / P_o	0,618
Puissance corrigée	P_g (W)	$P_g / P_o \cdot P_o =$	6,935	P_g (W)	571,618
Apport puissance du gaz	P_{add} (W)	$\rho \cdot v \cdot U_g \cdot g =$	0,003	P_{add} (W)	38,262
Puissance réelle	P_{tot} (W)	$P_{add} + P_o =$	6,992	P_{tot} (W)	962,672
Puissance volumique réelle	P_{tot} / V (W/m ³)	$P_{tot} / V =$	4661	P_{tot} / V (W/m ³)	789
Puissance massique totale	ε_{tot} (W/kg)	$P_{tot} / (\rho \cdot V) =$	4,4391	ε (W/kg)	1,528
Coefficient de transfert volumique	$k_L a$ (h ⁻¹)	$k \cdot (P_{tot} / V)^{\alpha} \cdot U_g^{\beta} =$	130	$k_L a$ (h ⁻¹)	98
OTR	OTR (mg/L/h)	$K_L a \cdot (O_2^* - O_2) =$	888,60	OTR (mg/L/h)	670,51
Biomasse max	X_{max} (g/L/h)	$K_L a \cdot (O_2^* - O_2) \cdot Y_{O_2/x} =$	0,71	X_{max} (g/L/h)	0,54
1,5 L --> 0,6 m ³				1,5 L --> 0,6 m ³	

Conclusion :

La variation des critères importants (nombre de Reynolds, puissance volumique, vitesse au bout de pale) reste dans des domaines acceptables voire même plus faible que l'échelle laboratoire pour la puissance volumique. Le transfert d'oxygène caractérisé par le $K_L a$ diminue légèrement comme il est

attendu mais reste intéressant pour assurer une bonne croissance des micro-organismes objets de cette étude. Ainsi, les dimensions du mobile d'agitation à concevoir et à installer sur le pilote de 900L sont données dans le Tableau 48.

Tableau 48. *Caractéristiques des mobiles d'agitations aux échelles laboratoire et échelle pilote.*

Caractéristiques	Mobile d'agitation à l'échelle du laboratoire 2L	Mobile issu de l'extrapolation sur l'échelle pilote 900 L
Type d'agitateur	Oreilles d'éléphant 45°	Oreilles d'éléphant 45°
Nombre de mobiles sur l'axe	1	2
Nombre de pales par mobile	3	3
Angle d'attaque	45°	45°
Sens de pompage	haut	haut
D ₁ (mm)	85	380
C ₁ (mm)	51	380
C (mm)	NA	380
D _I /D _T	0,57	0,48
Type de débit	Axial	Axial

Ce mobile a été fabriqué et installé sur le 900 L pour la validation des meilleurs résultats obtenus à l'échelle du laboratoire.

6.2. Extrapolation de l'échelle laboratoire à l'échelle pilote d'un nouveau procédé et comparaison avec des procédés déjà existants (PUBLICATION EXTRAPOLATION)

Introduction :

Cette partie est rédigée sous forme d'un article scientifique qui est en cours de négociation avec la société DSM pour soumission à un journal. La confidentialité des données fait qu'il est délicat de publier ce genre de résultats.

Beaucoup de publications sont consacrées à l'extrapolation et à ses différentes approches mais un nombre restreint d'entre elles présente des applications réelles permettant la comparaison de résultats entre les échelles de 2L et 900L comme dans notre cas.

Le tableur de calcul développé dans le cadre de l'étude précédente, nous a permis de confectionner le prototype de notre système d'agitation « oreilles d'éléphant » et de notre système d'aération par microsparger. Des expérimentations pour comparer différents systèmes d'agitation et d'aération ont été effectuées à l'échelle 900L. Les systèmes d'agitation et d'aération étaient les suivants : turbine centripète avec une aération de surface, une pale Rushton accompagnée de deux pales HTPG (type marines) avec un sparger de porosité 1mm et des pales de type « oreilles d'éléphant » avec soit un sparger de porosité 1mm soit un microsparger de porosité 20 μ m. Les essais de validation du nouveau procédé ont été réalisés sur les souches de *S. carnosus* et *P. candidum*.

Dans une première partie, ces essais ont permis de valider les performances du nouveau système et de les comparer à celle obtenues à l'échelle 2L et celles obtenues par l'intermédiaire des calculs du tableau Excel. Ces expérimentations nous ont permis de confronter les systèmes entre eux et ainsi de déduire lequel était le plus efficace, le plus économique et le plus facile à nettoyer. En deuxième partie, nous avons effectué des mesures de $K_L a$ pour comparer les performances des systèmes d'agitation et d'aération. Ces mesures nous ont permis, à nouveau, d'obtenir les constantes a, b et c. Ces données vont nous permettre d'effectuer des corrections de précisions du modèle précédent à l'échelle 2L et de recréer un modèle de prédiction qui nous permettra, après sélection du nouveau système, d'effectuer l'extrapolation à l'échelle industrielle 10 000L.

Scale-up from lab-scale to pilot-scale comparing axial flow stirrer (elephant ears stirrer), Rushton turbines, centripetal turbine and different types of aeration

H. CANTERI, C. CHARBONNEL, M. GHOUL

Abstract

This paper describes the extrapolation of an Elephant Ears impeller (EE) from lab-scale 2L to pilot-scale 900L and the validation of the process. As dimensions of the fermenters of the laboratories are different of those of 900L, a non-geometric similarity method was used for the design of the new stirrer. The operating conditions at the pilot scale were obtained by an extrapolation tool based on keeping the $K_L a$ constant between the scales. The performances of the newly designed stirrer were compared to those reached by Rushton and centripetal turbines. The method of extrapolation based on $K_L a$ is well adapted to predict the operating condition at pilot-scale from that determined at lab scale. The results showed that the EE is more efficient, it allows the production of bacteria as well as filamentous fungi whereas the Rushton turbines which are unusable for the cell sensitive culture due to shear-stress. Centripetal impeller induces the formation of a vortex and is not adapted to culture with high requirement of oxygen.

The gathered data of $K_L a$ in function of stirring and air flow rates were modeled in satisfying way and the developed model will be used for an extrapolation from 900L to 10m³ with similar approach.

Keywords

Scale-up, bioprocess modeling, extrapolation, Elephant Ears, Rushton Turbine.

List of symbols

C	clearance between impellers, mm
C ₁	distance between the lowest impeller and tank bottom, mm
C _s	distance between the highest impeller and tank surface, mm
g	gravitational acceleration, 9.807 m/s ²
N _I	number of impellers
N _b	number of blades per impeller
D _I	diameter of impeller, m
D _T	tank diameter, m
EEU45	Elephant Ears Up-pumping 45° angle of attack

H_I	impeller height, m
H_L	height of liquid in tank
ITS	Impeller Tip Speed, m/s
K_La	Oxygen Transfer Rate, hr ⁻¹
N	Stirrer speed, RPS
P_g	gassed power draw, kW
RT	Rushton Turbine
Q	gas flow rate, m ³ /s
Q_{vvm}	gas flow rate, air volume/medium volume/min
V_T	total tank volume
W	baffles width, m
ρ	liquid density, kg/m ³
μ	viscosity, Pa.s
Re	Reynolds Number for impeller
V_g	superficial velocity of sparged air based on tank diameter, m/s

Introduction

The development of a new process or the optimization of an existing one requires several steps of adaptation to transfer a process from laboratory to industrial scale. The use of only experimental approach during these steps is time cost and expensive. To shorten these steps, the use of the modeling tools based on the geometrical, kinematic, thermodynamic and reactional similarities are often used. Different criteria can be fixed as target during the scaling-up or -down of the process. Among these criteria improving the operating conditions or the culture medium for increasing yield and productivity and/or final biomass concentration while minimizing energy consumption, environmental impact, production costs are the most used.

Many mathematical models for process scaling can be found in literature, but there is actually no universal model for perfect extrapolation between scales. In fact, depending on the target of the extrapolation many factors must be taken into consideration. Firstly, there are biological, physical and chemical factors which are involved in the growth of the strain. These factors are the temperature or pH regulation, the inoculation preparation, the sterilization of the bioreactor and of the medium, the aeration mode, the type of strains (yeast, bacteria, fungi, and animal cells) and its stability, the viscosity, the substrates and product concentrations, *etc.* Secondly, there are hydrodynamics parameters such as agitation and aeration types, power input, mass transfer, shear-stress, stirring speed, airflow rates, *etc.* Finally, there is bioreactor design

(dimensions and shape). Each of these factors can have a great effect on the target or criterion to be reached ((Hewitt and Nienow 2007); (Junker 2004); (Nienow 1998); (Schmidt 2005); (Vrabel, van der Lans et al. 2000)).

In biological processes the main target to be considered are the mass volumetric transfer (K_{La}), the power per volume unit (P/V), the mixing time (t_m), the shear-stress, the Reynolds number (Re), *etc.* Unfortunately, the variation of the biological, physic-chemical and hydrodynamic factors mentioned previously can have a contradictory effect on these criteria.

Thus, an excessive turbulence on one hand, the mass transfer of substrates on the other hand, may cause the cells damage due to high shear stress or bubble bursting ((Hewitt and Nienow 2007)). Long mixing time encountered at large scales particularly for the fed-batch or the chemostat production leads to nutrients, dissolved gas (dO_2 , $dCO_2...$), pH and even temperature gradients. The hydrostatic pressure due to the dimensions of the bioreactor can accentuate this heterogeneity. These gradients and particularly the dissolved oxygen induce changes in the metabolic ways of the microorganisms during fermentation ((Hewitt and Nienow 2007); (Schmidt 2005)).

For aerobic culture the transfer of the oxygen (K_{La}) is often the limiting step at industrial scale. To reduce the turbulence without affecting the K_{La} , microporous spargers are used. The advantage of this technique is to increase interfacial area of bubbles and also decreased bubble sizes which enhance the gas hold-up in the reactor ((Hensirisak, Parasukulsatid et al. 2002)). However, the reduction of the bubble sizes could lead to the phenomenon of coalescence for large bioreactor ((Hasan and Zakaria 2011); (Lau, Bai et al. 2014); (Martín, García et al. 2008)). This phenomenon can be reduced by installing air sparger at a long the bioreactor.

Increasing of oxygen mass transfer with minimal power input and lowering shear-stress is a big challenge and constitutes a major goal of many works on the laboratory and industrial scales. The easiest way to improve oxygen transfer is to increase either the stirring speed or airflow rate. Increasing the pressure or the use of pure oxygen are also interesting alternatives. However the stirring and the airflow rates remain the most used factors. The efficiency of the stirring rate on the oxygen transfer depends upon the shape of the used impellers. Rushton Turbine (RT) is the most commonly used system to mix and disperse substrates, nevertheless this device cause a drastic damage to sensitive cells due to its high shear stress and energy consumption. To overcome the inconvenience of this impeller new devices were developed these last years, among them : Elephant Ears system (EE) appeared to be the most promising impellers in terms of oxygen transfer and shear-rate ((Bustamante, Cerri et al. 2013)). For this

reason we have investigated the performance of this system on transfer of the oxygen (K_La) at lab-scale with a sensitive strain (fungi). The obtained results confirmed the high performances of this device. So, the aim of this paper is to extrapolate this system at pilot-scale (900L). The scaling consists into the adequate design of the impeller at pilot-scale, to develop a model for scaling based on the use of K_La as a main criterion and finally to validate the results at pilot-scale. This paper will present and discuss each steps of the extrapolation.

The remainder of the article is organized into two main sections. The first part focuses on the methodology of non-similar geometry extrapolation of the EE impellers. The second part is the implementation and the validation of a new process at 900L.

Materials and methods

8. 900Liters bioreactor

Pilot-scale assays were done in a 900Liters double-layer 316L stainless steel fermenter (PG900, Pierre Guerin) with round bottom equipped with 5.5kW motor anti-clockwise rotation. The working volume is equal to 600L ($D_T/H_L = 0.65$). The extrapolation was made using non similarity geometry with a 2Liters bioreactor. The characteristics of the reactor are given in Figure 55.

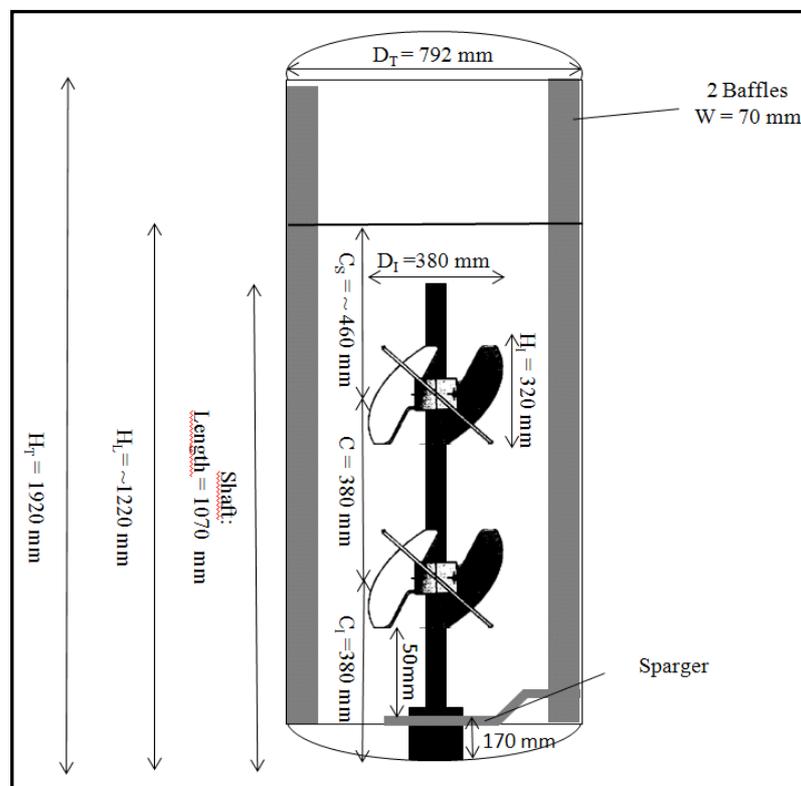


Figure 55. Pilot-scale vessel dimensions with EEU45 + sparger configuration.

9. Stirrers

Three sets of different impellers were used (Table 49): Centripetal turbine, Disk Turbines 6 blades with two marine impellers, and two Elephant ears 3 blades 45° up-pumping. The main characteristics of these impellers are summarized in Table 50.

Table 49. *Three systems studied*

System studied	C ₁ (mm)	C (mm)	C _S (mm)
Rushton Turbine + Marine impellers	335	335	215
Elephant Ears 45°	380	380	460
Centripetal turbine	330	NA	890

Table 50. *Impellers characteristics for 900Liters bioreactor.*

Impeller type	N _b	Angle of attack	flow direction	D _I (mm)	H _I (mm)	D _I /D _T	Mixing
Rushton Turbine	6	90°	up and down	270	45	0.34	Radial
Marine impellers	3	25°	down	300	60	0,38	Axial
Elephant Ears 45°	3	45°	up	380	231	0,48	Axial
Centripetal turbine	3	45°	up and down	330	180	0,42	Axial

10. Sparging systems

Three different air diffusers were used:

- Overlay aeration with a vortex (only with centripetal turbine).
- Classic single ring-sparger with a porosity of 1000µm.
- Stainless steel tube microsparger with a porosity of 20 µm.

a. Fermentation medium for *S. carnosus* and *P. candidum*

Experiments were conducted in a fermentation media at 30°C and pH 6.0 with continuous regulation of the pH using ammonia 5%. The viscosity of the fermentation broth has Newtonian behavior and the effect of the temperature was taken into account.

Staphylococcus carnosus maintained at -80°C in cryotubes was used in this study for K_La dynamic measurements. The medium used for seed and cultivation contained sucrose (20g), Yeast extract (15g), ascorbic acid (1g), magnesium sulphate (1g), sodium chloride (2g), hydrogenophosphate (1g), anhydrous iron chloride (0.2g), dihydric sodium molybdate (0.1) per liter of medium before autoclave sterilization. For *P. candidum* experiments were conducted in the medium as described in (Schroder 1978) at 23°C. Viscosity was corrected for temperature effects.

11. Dimensionless numbers

Dimensionless numbers used in the different steps of the extrapolation were calculated using the formula presented in Table 51.

Table 51. *List of dimensionless numbers.*

Dimensionless number	Symbol	Formula
Flow number	N_A	$\frac{Q}{N \times D_T^3}$
Power number	P_g	$\frac{P_0}{\rho \times N^3 \times D_I^5}$
Reynolds number	Re	$\frac{N \times D_I^2 \times \rho}{\mu}$

12. Strategy of the approach of scale-up/-down

The strategy followed for the scaling up is summarized in Figure 56.

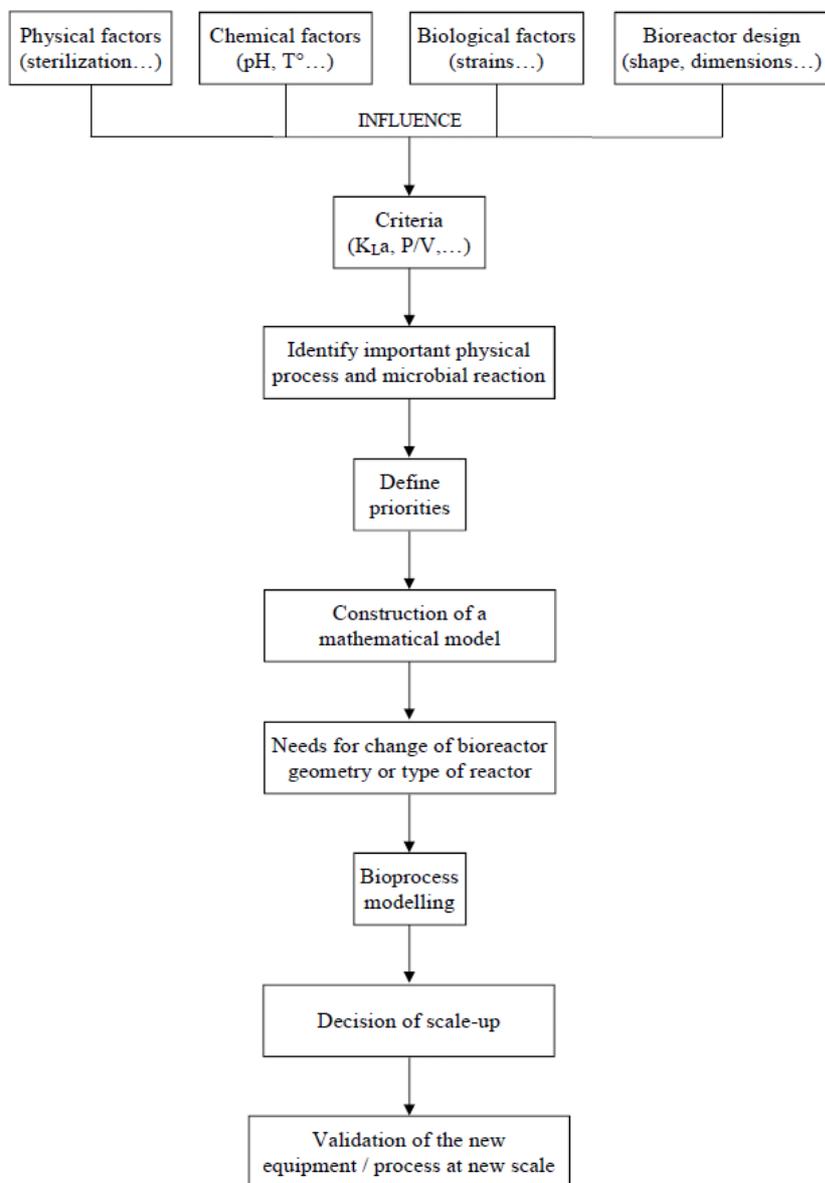


Figure 56. Strategy of the approach of extrapolation.

Results and discussion

1. Non geometric extrapolation from lab to pilot scale of Ear Elephant impeller based on the K_{La} modeling.

To reach high yield and productivity in aerobic fermentation the transfer of oxygen is the key factor to be optimized. However, the conditions supporting the transfer of oxygen can be unfavorable to the microorganisms sensitive to shear stress induced by the stirrer. The ideal mixing system must ensure a compromise between these two criteria. The recent investigation in this field showed that the Elephant Ears (EE) impellers can reach this compromise.

So, these stirrers were intensively studied at lab-scale and its performances in terms of oxygen transfer and adaptation to shear-sensitive cells were characterized. Thus, K_La was modeled according to the stirring velocity, the air flow and the physicochemical factors of the medium (density, viscosity). The obtained data were used to extrapolate and validate the performance of EE at 900L pilot-scale.

Since the bioreactor used at the lab-scale does not present a geometrical similarity with the pilot of 900L, the non-geometric extrapolation methodology was used to determine dimensions of the stirrer to design and implement at the pilot level. Then, the experimental conditions (stirring velocity and air flow rate) to be applied at pilot scale were determined using K_La as a constant criterion between the two scales.

The data concerning the transfer of the oxygen were used to establish a K_La model described by the following equation:

$$(1) \quad KLa = a \times \left(\frac{P}{V}\right)^b \times (Vg)^c$$

Where a, b, and c are constants of the system and estimated from experimental data.

This model is usually found in the literature. The constants a, b and c values depend on the bioreactor design, the impeller shape and the aeration type ((Garcia-Ochoa and Gomez 2009)).

In order to predict the range of stirring speed and airflow rate to apply at pilot-scale, K_La and superficial gas velocity, or K_La and tip speed were kept constant. The first condition leads to the stirring rate while the second condition furnishing the air flow rate.

$$(2) \quad \frac{P}{V} = \frac{Np \times \rho \times N^3 \times d^5}{V}$$

$$(3) \quad Vg = \frac{Q}{\pi \times \frac{d^2}{4}}$$

Equations (2) and (3) in equation (1) gives $K_La = \left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^5}{H_1}\right)^b \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2}\right)^c$

Let $K_La_1 = K_La_{laboratory}$ and $K_La_2 = K_La_{pilot}$

If $K_La_1 = K_La_2$ and if the density is unchanged between the two scales the simplified formula is then drawn:

$$(4) \quad \left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^b \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2} \right)^c = \left(\frac{N_2^3 \times d_2^3}{H_2} \right)^b \times \left(\frac{Q_2}{d_2^2} \right)^c$$

Equation 4 is the basic equation for the extrapolation.

After arrangement of the equation 4, the stirring rate at pilot scale is given by the following equation, (5):

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^b \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2} \right)^c \times H_2^b}{\left(\frac{Q_2}{d_2^2} \right)^c \times d_2^{3b}} \right)^{\frac{1}{3b}}$$

And the air flow rate by the equation (6):

$$Q_2 = \left[\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{N_2^3 \times d_2^3} \right)^b \times \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^b \times \left(\frac{d_2^2}{d_1^2} \right)^c \times Q_1^c \right]^{\frac{1}{c}}$$

Case 1: Stirring rate determination ($K_{L,a}$ and V_g^c constants):

In the case of keeping $K_{L,a}$ (equation 4) and superficial air velocity (equation 5 and 6) constant between scales, we used these equations:

$$(5) \quad \frac{4Q_1}{\pi \times d_1^2} = \frac{4Q_2}{\pi \times d_2^2}$$

$$(6) \quad Q_2 = Q_1 \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2$$

So, Eq. (4) gives:

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^b \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2} \right)^c \times H_2^b}{\left(\frac{Q_2}{d_2^2} \right)^c \times d_2^{3b}} \right)^{\frac{1}{3b}}$$

Replacing (6) in (3):

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^b \times H_2^b}{d_2^{3b}} \right)^{\frac{1}{3b}}$$

Simplified formula for constant air superficial velocity:

$$(7) \quad N_2 = \left(\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^b \times \frac{H_2^b}{d_2^{3b}} \right)^{\frac{1}{3b}}$$

The constants values used are a= 0.0124 / b = 0.292 / c = 0.413.

In this equation, the entire variables are known, so the equivalent stirring rate at pilot-scale can be estimated. For a given K_{La} set point, it is possible to estimate the stirring rate to use at pilot-scale from the known value of the stirring rate at lab-scale. The Table 52 summarizes the different values of stirring speed at pilot-scale estimated from lab-scale values and calculation. This result indicated that at pilot scale the highest stirring speed is about 279 RPM. Higher speed rate provoke mechanical vibration of the bioreactor. In these conditions K_{La} values at pilot scale are low compared to that to reach in Lab scale at high speed rate.

Table 52. *Stirring speed determination with K_{La} and superficial gas velocity (V_g) constants (0,0002 m/s)*

Lab-scale (RPM)	Pilot-scale (RPM)	K_{La} (hr-1)
200	93	25
300	140	42
400	186	60
500	233	79
600	279	99

Air flow rate determination (K_{La} and tip speed constants):

$$(8) \quad \Pi \times N_1 \times d_1 = \Pi \times N_2 \times d_2$$

$$(9) \quad N_2 = N_1 \times \frac{d_1}{d_2}$$

Eq. (4) gives:

$$Q_2 = \left[\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{N_2^3 \times d_2^3} \right)^b \times \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^b \times \left(\frac{d_2^2}{d_1^2} \right)^c \times Q_1^c \right]^{\frac{1}{c}}$$

Equation (9) in (4):

$$Q_2 = \left[\left(\frac{H_2}{H_1} \right)^b \times \left(\frac{d_2^2}{d_1^2} \right)^c \times Q_1^c \right]^{\frac{1}{c}}$$

Simplified formula with constant tip speed:

$$(10) \quad Q_2 = \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^{b/c} \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2 \times Q_1$$

This last equation allows calculating the flow rate at pilot scale.

Table 53 indicated the air flow rate to apply for a given K_La constant.

The Table 52 and Table 53 indicated the domain for the operating conditions (Q and N) to be applied at pilot scale.

This domain was used to compare the performance of the designed Ear Elephant impeller in terms of the oxygen transfer and biomass production; the performances of this new impeller are compared to that obtained with RT and centipede turbine. The effect of the air diffuser porosity was also investigated.

Table 53. Airflow rate with K_La and stirring speed constants(2,4 m/s)

Lab-scale (VVM)	Pilot-scale (VVM)	K_La (hr-1)
0,075	0,11	81
0,1	0,15	88
0,2	0,30	107
0,3	0,45	121
0,4	0,60	132
0,5	0,75	140
0,6	0,90	148
0,7	1,05	155
0,8	1,20	161
0,9	1,34	167
1	1,49	172

2. Validation of the new process at 900Liters pilot-scale

The above predicted domains for stirring rate and air flow rate were used to compare the performance of the new impeller (EE) to those obtained with RT or centripetal turbine. The effect of the air diffuser porosity was also investigated. The comparison of the performance was done on the transfer of the oxygen and the biomass concentration.

a. On oxygen transfer

Two sets of experiments were realized for K_{La} determination. The first were made at variable stirring speeds and constant airflow rate and the second were made at variable airflow rates and constant stirring speed. The centripetal turbine is designed to be used only with surface aeration; while the RT and the EE are used with the classic 1000 μ m sparger and 20 μ m microsparger. To avoid mechanical vibrations the maximal speed rate with EE is fixed at 200 RPM. The obtained results of K_{La} variation with agitation speed at constant airflow rate (0.24vvm) are presented in Figure 57a. It indicates clearly that the centripetal turbine with overlay aeration is clearly inefficient for oxygen transfer (K_{La}) compared to the EE or the RT with spargers. In the contrary, the EE gave the best results compared to RT. Indeed, the EE performances are 50% higher than the RT for higher speed rate. To reach similar performance as EE's the speed rate of RT will be increased to 270 RPM. Except for low RPM micro- and classic air sparger led to the similar results. So, it seems that microspargers could be useful only for very low stirring speed. At laboratory scale the microsparger enhance the oxygen transfer event at high speed rate.

The variation of the K_{La} vs. airflow rate at constant stirring speed (200RPM) is given in Figure 57b. These results indicated that the EE gave the highest values of K_{La} but the effect of the air diffuser porosity is not significant for the studied domain of airflow rate. This behavior is probably due to the phenomenon of coalescence discussed earlier. The centripetal turbine with overlay is the worst aeration mode even with a higher stirring speed than other stirrers, and then it is followed by RT.

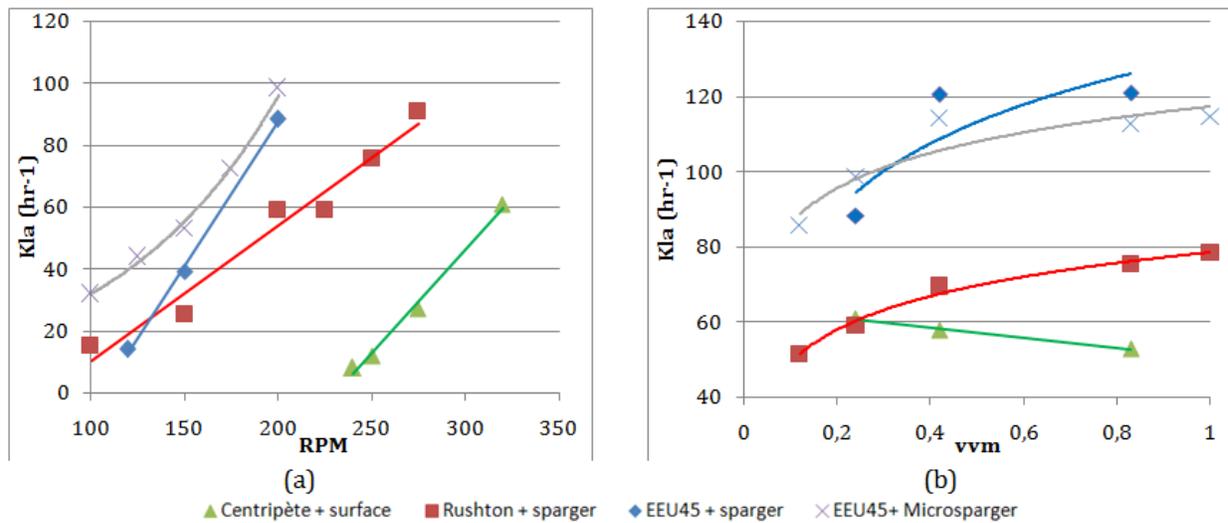


Figure 57. (a) K_La vs. agitation speed at constant airflow rate (0.24vvm). (b) K_La vs. airflow rate at constant stirring speed (200RPM for all stirrers except for centripetal turbine 320RPM) on *S. carnosus* cultures during exponential growth.

The K_La profiles obtained at 900L were modeled the same way as at laboratory scale by the following equation:

$$K_La = a \times \left(\frac{P_g}{V}\right)^b \times V_g^c$$

The constants a, b and c of the model are summarized in Table 54.

Table 54. Constant a, b and c values for K_La prediction at pilot-scale (900L) for different stirring and aeration modes.

Type of impeller	Type of sparger	Constant a	Constant b	Constant c
Centripetal turbine	Overlay	7×10^{-11}	2.245	-0.114
2 x HTPG + Rushton	1000 μ m Sparger	8.4×10^{-5}	1.050	0.218
EEU45	1000 μ m Sparger	1.7×10^{-5}	1.232	0.233
EEU45	20 μ m Microsparger	1.2×10^{-3}	0.528	0.138

The validity of the model was checked by a new set of experiments, as indicated in Figure 58; there is a good agreement between experimental and predicted K_La except for low speed rate. This new model will be used to extrapolate the process at industrial scale (10m³).

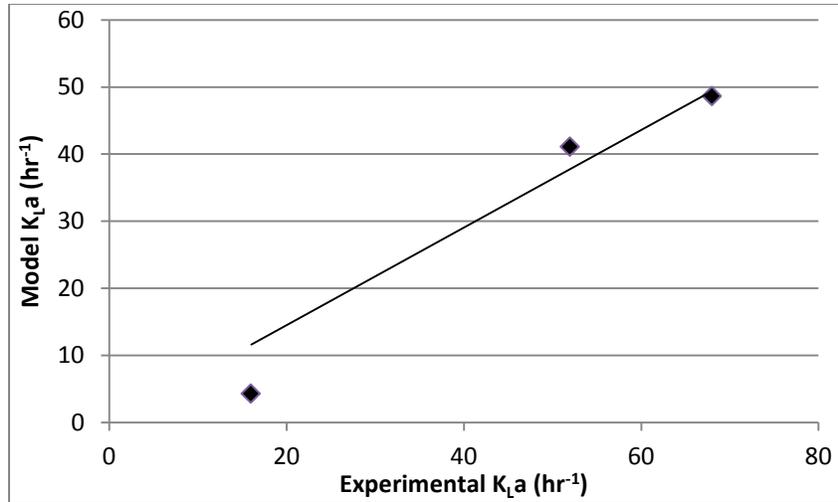


Figure 58. Correlations between K_{La} prediction model and K_{La} from experimental data with Rushton + Marine impellers + 1000 μ m sparger.

- b. Comparison of biomass concentration biomass between laboratory and pilot scale: validation the new developed process

To validate the new system of agitation (EE), the performances in terms of biomass and spore production respectively by a culture of *Staphylococcus carnosus* and a filamentous fungus called *Penicillium candidum* were compared. The obtained results in the laboratory and pilot scales for the different tested impellers are summarized in Table 55.

Table 55. Results comparison between lab-scale and pilot-scale for *S. carnosus* (dry matter measurements) and *P. candidum* (spore population) and for different stirring systems.

	EE		RT		Centripetal	
	Lab-scale	Pilot-scale	Lab-scale	Pilot-scale	Lab-scale	Pilot-scale
<i>S. carnosus</i> (g/L)	31,5	30,0	30,9	30,0	12,7	11,6
<i>P. candidum</i> ($\times 10^6$ spores/mL)	194	156	NA	NA	NA	NA

These results indicated that for EE impellers, comparable results were reached both at lab- and pilot-scales in the presence of the bacteria and the filamentous fungus. These results validate the interest of the new designed impeller even for shear-sensitive strains. For bacteria, the EE impeller leads at least to similar results as RT. Centripetal device gave the lowest performance. For optimized condition, the spore production can reach even 190-220 millions.

Conclusions

The extrapolation of Elephant Ears stirrers (EE) was carried out starting from the data obtained at laboratory scale. This extrapolation is based on a non-geometrical similitude because the dimensions of

the fermenter laboratory (2L) and pilot (900L) do not correspond to the criteria of geometrical similarity. The operating conditions to apply on the pilot-scale were obtained by an extrapolation by keeping the K_{La} constant between scales. The performances of new designed stirrer (EE) were characterized at various airflow rates and stirring velocities and compared to those obtained with classical Rushton Turbine and with a centripetal impeller. This comparison was done in presence of a bacterial strain and a filamentous fungus. The results showed that the EE stirrers allow reaching performances comparable with those of the laboratory scale. In all the tested operating conditions, the EE proves to be the most powerful stirrer. The porosity of air diffuser plays also a role; it enhances the performances of the EE impeller only at stirring speeds lower than 150RPM. The high performance of EE is due to its axial flow pattern minimizing the flooding phenomena and to its low generated shear stress. So, this stirrer can be used either with the shear-sensitive or non shear-sensitive cells. The Rushton Turbine is energy consuming and drastically affected by the flooding phenomenon. Moreover, it is not applicable for sensitive cells. The centripetal impeller is used only with surface aeration. Thus, it cannot be used with cells with a high demand of oxygen. It also creates a vortex in the bioreactor which reduces the working volume of the bioreactor.

The evolution of the K_{La} under a wide range of air-flow and stirring rates was modeled in function of volumetric power and superficial velocity of sparged air in agreement with predicted and experimental data. The developed model will be used for the scale-up of the EE from 900L to 10m³.

Acknowledgement

We'd like to thank the DSM France Company for their financial support; and their employees for their helpful discussions and helping hands: Lilian LABUSSIÈRE, Catherine DUONG, Sylvain GOURDAUT, and Dan GOURSAT.

The authors also wish to express their sincere appreciation to the French association of research and technology (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) for their financial support.

REFERENCES

- Bustamante, M. C. C., et al. (2013). "Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers." *Chemical Engineering Science* 90: 92-100.
- Garcia-Ochoa, F. and E. Gomez (2009). "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview." *Biotechnology advances* 27(2): 153-176.
- Hasan, N. and Z. B. Zakaria (2011). "Computational approach for a pair of bubble coalescence process." *International Journal of Heat and Fluid Flow* 32(3): 755-761.
- Hensirisak, P., et al. (2002). "Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation." *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology* 101(3): 211-227.
- Hewitt, C. J. and A. W. Nienow (2007). *The Scale-Up of Microbial Batch and Fed-Batch Fermentation Processes*. *Advances in Applied Microbiology*. S. S. Allen I. Laskin and M. G. Geoffrey, Academic Press. Volume 62: 105-135.

- Junker, B. H. (2004). "Scale-up methodologies for Escherichia coli and yeast fermentation processes." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 97(6): 347 - 364.
- Lau, Y. M., et al. (2014). "Numerical study of bubble break-up in bubbly flows using a deterministic Euler–Lagrange framework." *Chemical Engineering Science* 108(0): 9-22.
- Martín, M., et al. (2008). "On the effect of the orifice configuration on the coalescence of growing bubbles." *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification* 47: 1799-1809.
- Nienow, A. W. (1998). "Hydrodynamics of Stirred Bioreactors." *Applied Mechanics Reviews* 51(1): 3-32.
- Schmidt, F. R. (2005). "Optimization and scale up of industrial fermentation processes." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 425 - 435.
- Vrabel, P., et al. (2000). "Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements." *Chemical Engineering Science* 55(23): 5881-5896.

Conclusion :

Cet article a pour vocation de présenter une approche de la technique d'extrapolation non géométrique d'un système d'agitation développé à l'échelle laboratoire 3.6L et sa validation à l'échelle pilote de 900L. Ce document est structuré en deux parties.

La première partie de cet article présente la technique d'extrapolation sans similitude géométrique à K_La constant. Il est ainsi possible de connaître les conditions de fonctionnement d'un système d'agitation et d'aération avant même de le concevoir.

La deuxième partie est consacrée à la validation du nouveau procédé en le comparant soit au procédé actuel (turbine centripète) soit à un procédé largement répandu dans l'industrie des biotechnologies (turbines Rushton). Dans cette partie, l'effet de la porosité sur le K_La est aussi étudié. Les principaux résultats de cette partie sont :

- Le système « oreilles d'éléphant » est le plus efficace mais il est rattrapé par le système Rushton lorsque celui-ci est utilisé à 270RPM (contre 200RPM pour les « oreilles d'éléphant »)
- La porosité du sparger ne joue un rôle intéressant à cette échelle que pour des vitesses d'agitation inférieure à 150RPM pour le système oreilles d'éléphant
- Le nouveau système a été validé à l'échelle 900L pour une culture de bactérie *S. carnosus* et une culture de champignon filamenteux *P. candidum*.

La dernière partie discute et compare ces résultats à la bibliographie. Il ressort de cette étude que le meilleur système d'agitation qui assure une faible consommation d'énergie et un transfert efficace d'oxygène semble être toujours l'oreille d'éléphant incliné vers le haut mais cette fois-ci accompagné d'un sparger classique 1000 μ m.

Chapitre 7 :

Extrapolation sur

10 000L

7.1. Développement d'un modèle de prédiction du K_La sur fermenteur de 900L en fonction du type d'agitateur et du type d'aérateur et mesure de la capacité de transfert maximale en oxygène

Pour assurer l'extrapolation entre le fermenteur pilote de 900L et le fermenteur industriel de 10m³, on a procédé au préalable à la modélisation du K_La en présence du mobile « oreilles d'éléphant » (EEU45) en fonction du débit et de la vitesse d'agitation. Deux diffuseurs d'air ont été testés. Il s'agit du sparger d'air classique de 1000µm et de un microsparger de 20µm. Le modèle développé est de même type que celui réalisé sur le fermenteur de 2L. Ce modèle est représenté par l'équation suivante :

$$KLa = a \times (P/V)^b \times (v_g)^c.$$

Les valeurs des constantes a, b et c sont décrites en Tableau 56.

Tableau 56. Valeurs des constantes a, b et c pour la prédiction du K_La à l'échelle du fermenteur de 900L en fonction de différents modes d'agitation et d'aération.

Type d'agitation	Type d'aération	Constante a	Constante b	Constante c
EEU45	Sparger classique	2×10^{-5}	1.232	0.233
EEU45	Microsparger	1.2×10^{-3}	0.528	0.138

En Tableau 57, on peut comparer les performances de différents diffuseurs d'air. La vitesse maximale d'agitation a été limitée à 200RPM au lieu des 300RPM prévus par le fabricant du fermenteur. En effet, au-delà de 200RPM la puissance hydrodynamique est importante et présente le risque d'endommager les contre pales du fermenteur. Le K_La maximum (121 h⁻¹) a été obtenu en présence de diffuseur d'air

classique de 1000 μm et à 0,83vvm. Le microsparger, bien que performant sur les 2L, ne présente pas un intérêt à l'échelle pilote et industrielle ; ceci est probablement dû au phénomène de coalescence décrit dans différentes publications ((Hasan and Zakaria 2011) ; (Lau, Bai et al. 2014) ; (Martín, García et al. 2008)) et qui augmente en fonction de la colonne de liquide dans le bioréacteur.

Tableau 57. Valeurs de K_{La} pour des valeurs de vitesse d'agitation et d'aération précises à l'échelle 900L.

Type d'agitation	Type d'aération	K_{La}	K_{La}
		200 RPM / 0.24 vvm	200 RPM / 0.83 vvm
EEU45	Sparger classique	88	121
EEU45	Microsparger	99	113

La Figure 59 montre, sous forme de graphiques, les évolutions des K_{La} soit en fonction de la vitesse d'agitation (Figure 59a) soit en fonction du débit d'air (Figure 59b). On peut remarquer, en Figure 59a, l'efficacité du microsparger uniquement aux faibles vitesses d'agitation puis ses performances sont vite rattrapées par le sparger classique dès que l'on atteint des vitesses supérieures à 170RPM.

Pour l'extrapolation à l'échelle industrielle on a retenu le mobile d'agitation type « oreilles d'éléphant » (EE45) et le diffuseur classique d'air de 1000 μm .

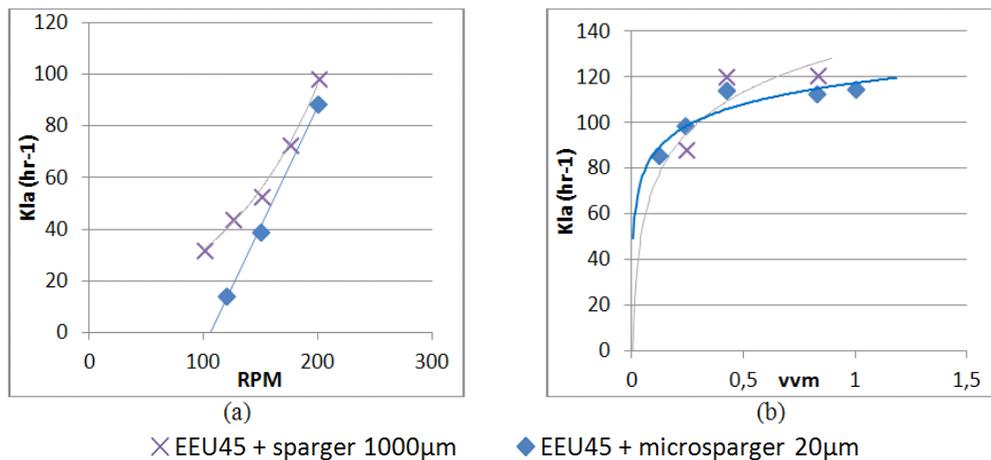


Figure 59. (a) K_{La} en fonction de la vitesse d'agitation à débit d'air constant (0.24vvm) ; (b) K_{La} en fonction du débit d'air à vitesse d'agitation constante (200RPM pour tous les agitateurs sauf pour la turbine centrifète qui est à 320RPM) à l'échelle pilote 900L.

7.2. Extrapolation des résultats à l'échelle de 10 m³ : Calcul des dimensions (hauteur, diamètre, épaisseur, etc.) et du nombre de turbines d'agitation et du choix du module d'aération.

- Détermination des dimensions de la turbine à l'échelle de 10 m³ :

L'installation existe déjà à l'échelle industrielle et ne présente pratiquement pas de similitudes géométriques avec le fermenteur pilote de 900L. Les dimensions de deux fermenteurs sont présentées en Tableau 58.

Tableau 58. Dimensions des fermenteurs aux échelles pilote et industrielle.

Dimensions	Echelle pilote	Echelle industrielle
H _T (mm)	1920	4600
H _L (mm)	1120	3540
D _T (mm)	792	1800
D _T /H _T (mm)	0,41	0,39

Comme pour le dimensionnement précédent entre l'échelle laboratoire et l'échelle pilote, nous avons utilisé notre tableur pour effectuer l'extrapolation entre l'échelle pilote et l'échelle industrielle. Les données physico-chimiques et les cinétiques de croissance reste les mêmes que précédemment. Le Tableau 59 présente les dimensions et les caractéristiques d'agitation et d'aération des systèmes aux échelles pilote et industrielle. Ces dimensions ont été définies suivant des limites que nous nous sommes imposées afin d'obtenir des valeurs les plus proches possibles de celle obtenues à l'échelle pilote suivant les contraintes de puissance volumique (P/V), de vitesse en bout de pale (V_p) et de coefficient de transfert d'oxygène (K_{La}). Les paramètres caractéristiques d'agitation (N_p , K_{max} et K_{moyen}) ont été estimées par rapport à la littérature et aux résultats que nous avons obtenus à l'échelle laboratoire. Etant donné que la vitesse maximale accessible aux échelles pilote et industrielle est de 200 RPM, cette vitesse a été retenue pour faire le calcul des dimensions de la nouvelle pale d'agitation.

Tableau 59. Données d'entrée (jaune) des caractéristiques géométriques et d'agitation / aération et les grandeurs calculées (blanc).

GEOMETRIE		900L	10m ³ GEOMETRIQUE	10m ³ NON GEOMETRIQUE
Volume liquide	V (L)	600	9000	9000
Volume liquide	V (m ³)	0,6000	9	9
Pression hydrostatique	P (bar)	1,25	3,09	3,64
Diamètre agitateur	d (m)	0,38	0,94	0,72
Hauteur agitateur	w (m)	0,23	0,57	0,23
Diamètre cuve	D (m)	0,792	1,95	1,8
Hauteur liquide	H (m)	1,22	3,00	3,54
Taille chicanes	b (m)	0,08	0,20	0,18
Ratio diam. D/H	D/H	0,65	0,65	0,51
Ratio diam. agit. / cuve	d/D	0,48	0,48	0,40
Fréquence agitation	N (tr/min)	200	200	200
Fréquence agitation	N (tr/s)	3,33	3,33	3,33
Facteur F	(Vi / Vp) ^(1/3)		2,47	
Facteur R	di / dp			0,41

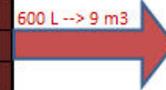
PARAMETRES AGITATION		900L	10m ³
Nombre de puissance	N _p	2	2,5
Nombre de pompage	N _q	0,68	0,68
K _{max}		35	35
K _{moyen}		10	10

PARAMETRES CALCUL KIa		900L	10m ³
k	=	0,00002	0,00002
α	=	1,232	1,232
β	=	0,233	0,233

Tableau 60. Extrapolation sans similitude géométrique entre un fermenteur de 900L (à 200RPM) et un fermenteur de 10m³ (à 200RPM). Seuls les diamètres de cuve et d'agitateur ont été changés.

AGITATION

Puissance agitation	P ₀ (W)	Np.p.N ³ .d ⁵ =	616,2735
Puissance volumique	P ₀ / V (W/m ³)	P ₀ / V =	1027,12
Puissance massique	ε (W/kg)	P/(ρ.V) =	0,9782
Vitesse bout de pale	Vp (m/s)	Π.N.d =	3,979
Couple	Cp (Nm)	P ₀ / (2 . Π . N) =	29,425
Reynolds	Re	(N.d ²) / ν =	5,05E+05
Froude	Fr	(N ² .d) / g =	0,430
Weber	We	(ρ.N ² .d ³)/γ =	8,7695
Débit de pompage	Qp (m ³ /s)	Nq.N.d ³ =	0,1244
Débit de circulation	Qc (m ³ /s)	1,8.Nq.N.d ³	0,2239
Débit d'entraînement	Qe (m ³ /s)	Qc - Qp	0,0995
Hauteur théorique	H* (m)	(Np/(Nq.g.P ^{0.2}))*Vp ² =	0,4810
Qp/H*	Qp/H* (m ² /s)	Qp/H*	0,2586
Temps de pompage	t _p (s)	V / (Nq.N.d ³) =	4,82
Temps de mélange	t _m (s)	(6.(D/d) ²)/N =	7,82
Echelle moyenne de Kolmogorov	l _k (μm)	(ν ³ /ε _{tot}) ^{0.25}	3,04E-05
Gradient de vitesse max	G _{max}	K _{max} . N	117
Gradient de vitesse moyen	G _{moyen}	K _{moyen} . N	33
Cisaillement	τ (s ⁻¹)	racine(ε _{tot} /ν)	1029

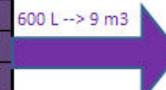


AGITATION

P ₀ (W)	18811,70
P ₀ / V (W/m ³)	2090,189
ε (W/kg)	1,9907
Vp (m/s)	7,540
Cp (Nm)	898,192
Re	1,81E+06
Fr	0,815
We	59,652
Qp (m ³ /s)	0,85
Qc (m ³ /s)	1,5229
Qe (m ³ /s)	0,6768
H* (m)	2,1587
Qp/H* (m ² /s)	0,3919
t _p (s)	10,64
t _m (s)	11,25
l _k (μm)	2,56E-05
G _{max}	117
G _{moyen}	33
τ (s ⁻¹)	1446

AERATION

Débit de gaz	v _m		0,15
Débit de gaz	Q _g (L/min)	Q _v v _m .V =	90
Débit de gaz	Q _g (m ³ /s)		0,0015
Vitesse superficielle	U _g (m/s)	Q _g / S _{couve} =	0,003
Nombre d'aération	Na	Q _g / (N . D ³) =	0,00820
Puissance corrigée	P _g / P ₀	P _g / P ₀ =	0,618
Puissance corrigée	P _g (W)	P _g / P ₀ * P ₀ =	381,079
Apport puissance du gaz	P _{od} (W)	ρ . v . U _g . g =	18,817
Puissance réelle	P _{tot} (W)	P _{od} + P ₀ =	635,091
Puissance volumique réelle	P _{tot} / V (W/m ³)	P _{tot} / V	1058
Puissance massique totale	ε _{tot} (W/kg)	P _{tot} / (ρ . V) =	1,0081
Coefficient de transfert volumique	k _l α (h ⁻¹)	k . (P _{tot} / V) ^α . U _g ^β	82
OTR	OTR (mg/L/h)	Kl _a . (O ₂ * - O ₂)	564,09
Biomasse max	X _{max} (g/L/h)	Kl _a . (O ₂ * - O ₂) . Y _{o₂/x}	0,45



AERATION

v _m	0,15
Q _g (L/min)	1350
Q _g (m ³ /s)	0,0225
U _g (m/s)	0,008841941
Na	0,0180845
P _g / P ₀	0,616
P _g (W)	11595,214
P _{od} (W)	322,117
P _{tot} (W)	19133,816
P _{tot} / V (W/m ³)	5410
ε (W/kg)	2,025
k _l α (h ⁻¹)	250
OTR (mg/L/h)	1707,48
X _{max} (g/L/h)	1,37

- **Détermination des conditions de fonctionnement du bioréacteur de 10m³ :**

La même démarche que précédemment pour l'échelle pilote a été effectuée pour prédire les conditions de fonctionnement du nouveau système développé pour l'échelle industrielle. Cependant, dans notre cas de figure, l'extrapolation à K_La et vitesse en bout de pales ne peuvent être maintenues constants (Tableau 61). Nous avons décidé d'effectuer l'extrapolation uniquement à K_La et vitesse superficielle de gaz constants mais en rajoutant une colonne de calcul de la vitesse en bout de pales pour observer à quelle vitesse maximum, nous ne devrions pas dépasser pour éviter le phénomène de cavitation visible à partir d'une

vitesse en bout de pales de 6m/s. Ces résultats sont visibles en Tableau 62. On remarque que pour rester en dessous de 6m/s de vitesse en bout de pales, il est nécessaire de ne pas dépasser une vitesse d'agitation de 151RPM, ce qui correspondrait à un K_{La} de $66h^{-1}$.

Tableau 61. Extrapolation entre échelles pilote et industrielle à K_{La} constant et à vitesse superficielle de gaz ou vitesse en bout de pales constantes.

GEOMETRIE		Echelle pilote	
Volume liquide	V_1 (L)		600
Volume liquide	V_1 (m^3)		0,600
Diamètre agitateur	d_1 (m)		0,38
Diamètre cuve	D_1 (m)		0,792
Hauteur liquide	H_1 (m)		1,22
Fréquence agitation	N_1 (tr/min)		200
Fréquence agitation	N_1 (tr/s)		3,3
Débit d'air	Q_1 (m^3/h)		8,640
Débit d'air	Q_1 (L/min)		144,0
Débit d'air	VVM		0,24
Puissance volumique	P/V (w/m^3)		978
Vitesse superficielle	V_g (m/s)		0,0049
K_{La}	hr^{-1}		85

Echelle industrielle	
V_2 (L)	9000,00
V_2 (m^3)	9,000
d_2 (m)	0,72
D_2 (m)	1,800
H_2 (m)	3,54

Vitesse superficielle constante	
N_2 (tr/min)	151
N_2 (tr/s)	2,51
Q_2 (m^3/h)	31,02
Q_2 (L/min)	517
VVM	0,06
Puissance volumique	848
Vitesse superficielle	0,0034
K_{La}	66

$$\Rightarrow N_2 = \left(\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^\alpha \times \frac{H_2^\alpha}{d_2^{3\alpha}} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

$$\Rightarrow Q_2 = Q_1 \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2$$

PARAMETRES CALCUL K_{La}		PILOTE
a	=	0,000017
b	=	1,232
c	=	0,2331



$$K_{La} = K \times (P/V)^\alpha \times (V_g)^\beta$$

Vitesse en bout de pale constante	
N_2 (tr/min)	106
N_2 (tr/s)	1,76
Q_2 (m^3/h)	8596,59
Q_2 (L/min)	143277
VVM	15,92
Puissance volumique	293
Vitesse superficielle	0,9384
K_{La}	66

$$\Rightarrow N_2 = N_1 \times \frac{d_1}{d_2}$$

$$\Rightarrow Q_2 = \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^{\alpha/\beta} \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2 \times Q_1$$

Tableau 62. Conditions d'extrapolation pour un K_{La} et une vitesse superficielle de gaz constante.

Vitesse d'agitation à K_{La} et vitesse superficielle de gaz (V_g) constants				
Echelle pilote	Echelle industrielle	Puissance volumique (W/h)	Vitesse en bout de pale (m/s)	K_{La} (hr^{-1})
100	75	106	2,8	5
125	94	207	3,5	12
150	113	358	4,3	23
175	132	568	5,0	40
200	151	848	5,7	66
225	169	1208	6,4	102
250	188	1657	7,1	150
275	207	2205	7,8	214
300	226	2863	8,5	295

Conclusion :

Les dimensions du mobile d'agitation à concevoir et à installer sur le fermenteur industriel de 10m³ sont données dans le Tableau 63 et la Figure 60.

Tableau 63. *Caractéristiques des mobiles d'agitation aux échelles pilote et industrielle.*

Caractéristiques	Mobile issu de l'extrapolation sur l'échelle pilote 900 L	Mobile issu de l'extrapolation sur l'échelle industrielle 10m ³
Type d'agitateur	Oreilles d'éléphant 45°	Oreilles d'éléphant 45°
Nombre de mobiles	2	3
Nombre de pales par mobile	3	3
Angle d'attaque	45°	45°
Sens de pompage	haut	haut
D_i (mm)	380	720
C_i (mm)	380	800
C (mm)	380	800
D_i/D_T	0,48	0,4
Type de débit	Axial	Axial

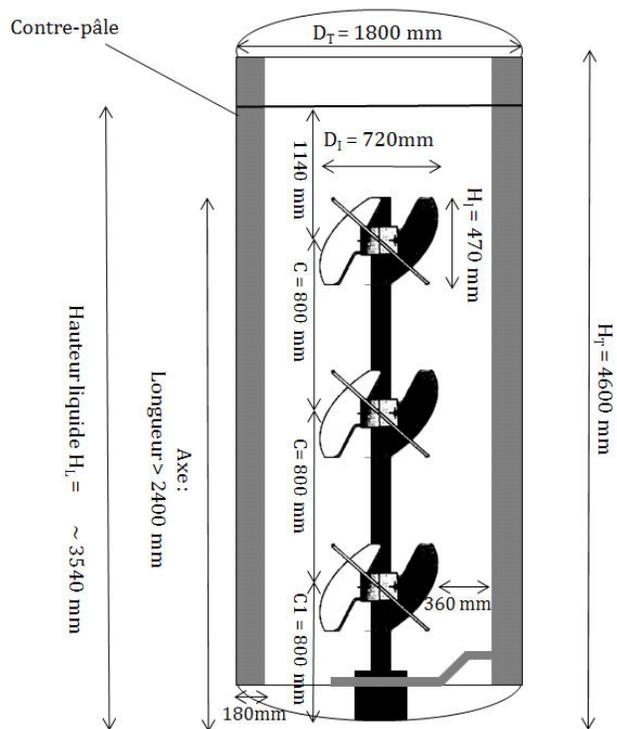


Figure 60. Schéma du fermenteur de 10m^3 équipé du nouveau mobile « oreilles d'éléphant ».

Conclusions et perspectives

Les objectifs initiaux de cette thèse étaient i) le choix, la caractérisation et l'extrapolation d'un système d'agitation permettant un transfert d'oxygène et des faibles forces de cisaillement adaptés aux besoins des souches cultivées sur le site de DSM basé à la Ferté-sous-Jouarre, ii) de développer un procédé de production de spores en milieu liquide pour remplacer le procédé sur milieu solide (boîte de Roux) utilisé à l'époque par DSM et de valider le système d'agitation ainsi développé sur des souches de levures, de bactéries et de champignons et enfin iii) d'extrapoler ce procédé aux échelles pilote et industrielle.

Le choix du mobile d'agitation a nécessité de comparer à l'échelle du laboratoire six mobiles d'agitation : quatre mobiles type « oreilles d'éléphant » (pompage vers le haut ou vers le bas et inclinaisons à 45° ou à 25°), une turbine Rushton, une turbine Cell-lift ; et trois diffuseurs d'air (20, 40 et 1000 μ m). Pour chaque mobile d'agitation, l'efficacité du transfert d'oxygène, exprimé par le K_La a été caractérisée dans une large gamme de débit d'air (0 et 1,7vvm) et de vitesse d'agitation (200 et 1200RPM) en présence de chacun des diffuseurs d'air. Les résultats obtenus ont montré que le mobile « oreilles d'éléphant » avec un pompage vers le haut (EEU45) permet d'atteindre la valeur la plus élevée de K_La (301h⁻¹) et que l'effet du diffuseur d'air a un effet variable selon le mobile d'agitation et les conditions opératoires appliquées en termes de débit d'air et de vitesse. Le mobile EEU45 a été retenu comme système approprié et a été extrapolé à l'échelle pilote par l'utilisation d'une approche de similitude non géométrique car les dimensions du fermenteur de laboratoire ne présentent pas la même échelle que le pilote. Les données issues du K_La ont été modélisées sous forme d'expression liant le K_La à la puissance volumique et à la vitesse superficielle du débit d'air. Ces modèles ont été validés à l'échelle du laboratoire et à l'échelle pilote de 900L. La détermination des conditions expérimentales à appliquer à l'échelle pilote ont été prédites à partir des conditions optimales du K_La observées à l'échelle laboratoire grâce à une similitude non géométrique et le maintien constant du K_La entre les deux échelles.

Pour le développement d'un procédé de production de spores de champignon en milieu liquide, les travaux ont été focalisés sur le choix du milieu, la détermination des conditions opératoires adaptées (température, pH, oxygène dissous, solubilité des substrats) et le mode de conduite. Ces travaux ont

permis de déterminer les conditions d'une culture reproductible et permettant d'atteindre aux moins 200.10^6 spore/mL. Ces résultats dépassent largement l'objectif industriel fixé au début de la thèse de 130.10^6 spores/mL. Les deux paramètres clefs de cette fermentation sont l'oxygène et le profil du pH pour chaque phase de culture des champignons. En effet, l'oxygène doit être maintenu à un point consigne de l'ordre de 10% de saturation et le pH doit être régulé pour chaque phase de la culture. Ainsi, il doit être de l'ordre de 7,5 pour la phase de croissance végétative et de 5,6 pour la phase de sporulation. L'initiation de la sporulation est réalisée grâce à un choc brusque de pH en passant de 7,5 à 5,6 à la fin de la croissance végétative. La phase de croissance nécessite la présence de l'acétate de sodium et une source azotée alors que la phase de sporulation nécessite la présence du D-glucose, de chlorure de calcium et une absence totale d'azote. La culture est réalisée en batch mais les premiers résultats en mode fed-batch sont prometteurs et à approfondir.

Pour les levures (*Debaryomyces hansenii*), le système d'agitation développé a été validé avec un contrôle de pH et d'oxygène dissous. Ce dispositif permet d'atteindre une vitesse spécifique de croissance de $0,47 \text{ h}^{-1}$, un rendement de conversion de glucose de 49%, une productivité $0,7 \text{ g/L/h}$. La concentration finale en biomasse ($25,6 \text{ g/l}$) est plus que doublé par rapport au système utilisé actuellement par DSM.

Pour la croissance de la bactérie modèle (*Staphylococcus carnosus*), le nouveau système d'agitation a aussi été validé. Pour cette bactérie, l'oxygène favorise d'une part la croissance et d'autre part, inhibe la production de son enzyme : la nitrate réductase. Cette enzyme est recherchée pour l'application industrielle de cette souche. Un compromis entre l'aération et la composition du milieu a été trouvé. Ce compromis consiste à maintenir l'oxygène à 20% et d'ajouter dans le milieu en début de fermentation une concentration de l'ordre de $3,33 \text{ g/L}$ en nitrate de potassium. Dans ces conditions la biomasse finale est de $35,5 \text{ g/l}$ et l'activité enzymatique est $8,1.10^{-3} \text{ DO}_{548\text{nm}}/\text{g biomasse/L}$. La biomasse est doublée mais l'activité spécifique de l'enzyme est légèrement inférieure au témoin industriel.

L'ensemble des conditions expérimentales ont été validées à l'échelle du pilote de 900L et sont en cours d'extrapolation à l'échelle industrielle de 10m^3 .

Du point de vue pratique, les apports de cette recherche sont au nombre de quatre. Premièrement, à l'issue de cette thèse, l'entreprise DSM est en mesure de produire plusieurs souches de champignons filamenteux à toutes les échelles (laboratoire, pilote et industrielle) et de manière reproductible en milieu liquide selon les conditions expérimentales déterminées dans ce travail. Cet apport a permis de fermer un atelier de fermentation en boîte de Roux afin de se concentrer sur la fermentation en milieu liquide en fermenteur. Cette amélioration a permis un gain important de place et de coûts pour l'entreprise. Deuxièmement, cette

étude a permis de définir les variables de croissance, consommation de substrat de trois souches principales produites par DSM. Cette étude a porté sur un projet conséquent visant à définir la croissance de toutes les souches produites par la DSM La-Ferté-sous-Jouarre. Cette étude permettra un suivi de la qualité des souches à l'échelle industrielle afin de pouvoir identifier rapidement une production problématique. Troisièmement, un outil de prédiction du K_{La} à l'échelle laboratoire et pilote a pu être développé au cours de cette thèse. Cet outil permet de prédire le K_{La} pour un milieu de fermentation, des paramètres d'agitation (type d'agitateur et vitesse d'agitation) et d'aération (type d'aération et débit d'aération) définis. Quatrièmement, un outil d'aide à l'extrapolation a pu être développé à partir des données K_{La} obtenues précédemment. Cet outil a permis la définition des dimensions des nouveaux systèmes aux échelles pilotes et industrielles. Ces différents modèles présentent des originalités aussi bien du point de vue scientifique mais aussi du point de vue industriel puisqu'ils prennent en compte à la fois une problématique de recherche de type académique mais ils présentent aussi une application à des échelles de production industrielle.

Perspectives de Recherche et de Développement :

- Appliquer à l'échelle industrielle $10m^3$, les conditions développées durant notre étude, pour les trois souches étudiées.
- Pour le champignon filamenteux, obtenir une meilleure maîtrise de la conduite de la fermentation particulièrement pour le fed-batch. Pour cela, il faut effectuer une investigation fine des voies métaboliques pour connaître quelle nature de substrat à ajouter, quel profil à appliquer, à quel moment et en quelles concentrations.
- En ce qui concerne la bactérie, il serait judicieux d'approfondir la recherche d'un meilleur compromis biomasse/activité enzymatique en travaillant sur les points de consigne de l'aération et sur la composition du milieu de culture.

Références

bibliographiques

- Abadias, M., A. Benabarre, et al. (2001). "Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*." International Journal of Food Microbiology **65**(3): 173-182.
- Achouri, R., S. B. Hamza, et al. (2013). "Volumetric mass transfer coefficient and hydrodynamic study of a new self-inducing turbine." Energy Conversion and Management **71**(0): 69-75.
- Ago, K. I., K. Nagasawa, et al. (2005). "Development of an aerobic cultivation system by using a microbubble aeration technology." Journal of Chemical Engineering of Japan **38**(9): 757-762.
- Ahmad, M. N., C. R. Holland, et al. (1994). "Mass transfer studies in batch fermentation: Mixing characteristics." Journal of Food Engineering **23**(2): 145-158.
- Al-Malack, M. H. (2007). "Performance of an immersed membrane bioreactor (IMBR)." Desalination **214**(1-3): 112-127.
- Albaek, M. O., K. V. Gernaey, et al. (2008). "Gassed and ungassed power draw in a pilot scale 550 litre fermentor retrofitted with up-pumping hydrofoil B2 impellers in media of different viscosity and with very high power draw." Chemical Engineering Science **63**(24): 5813-5820.
- Amrane, A., F. Plihon, et al. (1999). "Kinetics of growth and medium de-acidification for *Geotrichum candidum* and *Penicillium camemberti* cultivated on complex liquid media." World journal of Microbiology & Biotechnology **15**: 489 - 491.
- Arlov, D., J. Revstedt, et al. (2008). "Numerical simulation of a gas liquid Rushton stirred reactor LES and LPT." Computers & Fluids **37**(7): 793-801.
- Armenante, P. M. and G.-M. Chang (1998). "Power Consumption in Agitated Vessels Provided with Multiple-Disk Turbines." Industrial & Engineering Chemistry Research **37**(1): 284-291.
- Armenante, P. M., B. Mazzarotta, et al. (1999). "Power Consumption in Stirred Tanks Provided with Multiple Pitched-Blade Turbines." Industrial & Engineering Chemistry Research **38**(7): 2809-2816.
- Armstrong, J. J. (1963). "Stimulation of sporulation in *Penicillium* by anhydroglucose." Nature **197**(4868): 723.
- Arrua, L. A., B. J. McCoy, et al. (1990). "Gas-liquid mass transfer in stirred tanks." AIChE Journal **36**(11): 1768-1772.
- Ashley, K. I., K. J. Hall, et al. (1991). "Factors influencing oxygen transfer in fine pore diffused aeration." Water Research **25**(12): 1479-1486.
- Bakker, A. and H. E. A. Van den Akker (1994). "Gas-liquid contacting with axial flow impellers." Chemical Engineering Research and Design **72**(A4): 573 - 582.
- Bandaipheth, C. and P. Prasertsan (2006). "Effect of aeration and agitation rates and scale-up on oxygen transfer coefficient, kLa in exopolysaccharide production from *Enterobacter cloacae* WD7." Carbohydrate Polymers **66**(2): 216-228.
- Banerjee, U. C. (1993). "Effect of stirrer speed, aeration rate and cell mass concentration on volumetric oxygen transfer coefficients (KLa) in the cultivation of *Curvularia lunata* in a batch reactor." Biotechnology techniques **7**(10): 733 - 738.
- Bangalore, D. V. and D. D. Bellmer (2006). "Microbubbles for enhancement of oxygen transfer in xanthan gum fermentation." Chemical Engineering Communications **193**(10): 1232-1252.
- Bao, Y., J. Yang, et al. (2012). "Influence of the Top Impeller Diameter on the Gas Dispersion in a Sparged Multi-impeller Stirred Tank." Industrial & Engineering Chemistry Research **51**(38): 12411-12420.
- Barber, A. R., M. Henningson, et al. (2002). "Acceleration of high gravity yeast fermentations by acetaldehyde addition." Biotechnology Letters **24**(11): 891-895.

- Blank, G., R. Yang, et al. (1998). "Influence of sporulation a(w) on heat resistance and germination of *Penicillium roqueforti* spores." Food Microbiology **15**(2): 151-156.
- Bockelmann, W., S. Portius, et al. (1999). "Sporulation of *penicillium camemberti* in submerged batch culture." Systematic and Applied Microbiology **22**(3): 479-485.
- Brechot, P., L. Guibert, et al. (1958). "Freeze-drying of yeasts. II." La lyophilisation des levures. II. **95**(1): 62-72.
- Bredwell, M. D. and R. M. Worden (1998). "Mass-transfer properties of microbubbles. I. Experimental studies." Biotechnology Progress **14**(1): 31-38.
- Breman, B. B., A. A. C. M. Beenackers, et al. (1996). "The Gas-Liquid Mass Transfer Coefficient ($k_L a$) in the Gas-Liquid Multi-stage Agitated Contactor (MAC)." Chemical Engineering Research and Design **74**(8): 872-881.
- Bujalski, W., A. W. Nienow, et al. (1987). "The dependency on scale of power numbers of Rushton disc turbines." Chemical Engineering Science **42**(2): 317-326.
- Bustamante, M. C. C., M. O. Cerri, et al. (2013). "Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers." Chemical Engineering Science **90**: 92 - 100.
- Bustamante, M. C. C., M. O. Cerri, et al. (2013). "Comparison between average shear rates in conventional bioreactor with Rushton and Elephant ear impellers." Chemical Engineering Science **90**: 92-100.
- Camici, L., G. Sermonti, et al. (1952). "Observations on *Penicillium chrysogenum* in submerged culture. 1. Mycelial growth and autolysis." Bulletin of the World Health Organization. Supplement **6**(1-2): 265-275.
- Carilli, A., E. B. Chain, et al. (1961). "Aeration studies. III. Continuous measurement of dissolved oxygen during fermentation in large fermenters." Sci Rep Ist Super Sanita **1**(177 - 89).
- Cascaval, D., A.-I. Galaction, et al. (2011). "Comparative analysis of oxygen transfer rate distribution in stirred bioreactor for simulated and real fermentation broths." J Ind Microbiol Biotechnol **38**(9): 1449 - 66.
- Casey, G. P., C. A. Magnus, et al. (1984). "High-gravity brewing: Effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production." Applied and Environmental Microbiology **48**(3): 639-646.
- Cronenberg, C. C. H., S. P. P. Ottengraf, et al. (1994). "Influence of age and structure of *Penicillium chrysogenum* pellets on the internal concentration profiles." Bioprocess engineering **10**: 209 - 216.
- Cui, Y. Q., R. G. J. M. van der Lans, et al. (1996). "Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple rushton turbines." Chemical Engineering Science **51**(11): 2631-2636.
- Cui, Y. Q., R. G. J. M. Van Der Lans, et al. (1997). "Effect of agitation intensities on fungal morphology of submerged fermentation." Biotechnology and bioengineering **55**(5): 715-726.
- Cui, Y. Q., R. G. J. M. Van der Lans, et al. (1998). "Effects of dissolved oxygen tension and mechanical forces on fungal morphology in submerged fermentation." Biotechnology and bioengineering **57**(4): 409-419.
- Czermak, P., C. Weber, et al. (2006). "A ceramic microsparging aeration system for cell culture reactors." Publication series of IBPT - University of Applied Sciences Giessen-Friedberg(1).
- Dart, R. K. and J. O. Offem (1982). "The estimation of viable spores of *Penicillium*." Microbios Letters **20**(77): 15-20.
- Debourg, A. (2010). "Yeast management and high gravity fermentation." Cerevisia **35**(1): 16-22.
- Deckwer, W. D. and A. Schumpe (1993). "Improved tools for bubble column reactor design and scale-up." Chemical Engineering Science **48**(5): 889-911.
- Del Bove, M., M. Lattanzi, et al. (2009). "Comparison of molecular and metabolomic methods as characterization tools of *Debaryomyces hansenii* cheese isolates." Food Microbiology **26**(5): 453-459.
- Desfarges, C., C. Larroche, et al. (1987). "Spore production of *Penicillium roqueforti* by solid state fermentation: Stoichiometry, growth and sporulation behavior." Biotechnology and bioengineering **29**(9): 1050-1058.
- Dhariwal, A. (2007). "The significances of submerged ceramic membrane systems for production oriented bioprocesses." Ph. D. Thesis.
- Dion, W. M. and R. Kaushal (1961). "The effect of mechanical agitation on the morphology of some common fungi grown in submerged culture." Rendiconti - Istituto superiore di sanita **24**: 423 - 435.
- Dixon, N. M. and D. B. Kell (1989). "The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms." Journal of Applied Bacteriology **67**(2): 109 - 136.
- Dragone, G., S. I. Mussatto, et al. (2007). "High gravity brewing by continuous process using immobilised yeast: Effect of wort original gravity on fermentation performance." Journal of the Institute of Brewing **113**(4): 391-398.
- Edelstein, L. and L. A. Segel (1983). "Growth and metabolism in mycelial fungi." Journal of Theoretical Biology **104**(2): 187-210.

- Edwards, A. G. and C. S. Ho (1988). "Effects of carbon dioxide on *Penicillium chrysogenum*: an autoradiographic study." Biotechnology and bioengineering **32**(1): 1-7.
- El-Sabbagh, N., B. McNeil, et al. (2006). "Dissolved carbon dioxide effects on growth, nutrient consumption, penicillin synthesis and morphology in batch cultures of *Penicillium chrysogenum*." Enzyme and Microbial Technology **39**(2): 185-190.
- Fan, T. Y. and J. E. Kinsella (1976). "Changes in biochemical components during the germination of spores of *Penicillium roqueforti*." Journal of the Science of Food and Agriculture **27**(8): 745-752.
- Fasano, J. B., K. J. Myers, et al. (2011). "Effect of geometric variations on the performance of gas dispersion impellers with semicircular blades." The Canadian Journal of Chemical Engineering **89**(5): 961-968.
- Fayolle, Y., A. Cockx, et al. (2007). "Oxygen transfer prediction in aeration tanks using CFD." Chemical Engineering Science **62**: 7163 - 7171.
- Fiorentini, Ç. M., M. C. Sawitzki, et al. (2009). "Phenotypic and molecular characterization of *Staphylococcus xylosus*: Technological potential for use in fermented sausage." Brazilian Archives of Biology and Technology **52**(3): 737-746.
- Galaction, A. I., D. Cascaval, et al. (2004). "Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths." Biochemical Engineering Journal **20**(1): 85-94.
- Galbraith, J. C. and J. E. Smith (1969). "Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture." Journal of General Microbiology **59**(1): 31-45.
- Garcia-Ochoa, F. and E. Gomez (2009). "Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview." Biotechnology advances **27**(2): 153-176.
- Garcia-Ochoa, F., E. Gomez, et al. (2010). "Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview." Biochemical Engineering Journal **49**(3): 289-307.
- Ghasem D, N. (2007). Chapter 13 - Bioprocess Scale-up. Biochemical Engineering and Biotechnology. Amsterdam, Elsevier: 287-331.
- Ghribi, D., A. Sayari, et al. (2009). "Improvement of *Staphylococcus xylosus* lipase production through optimization of the culture conditions." European Journal of Lipid Science and Technology **111**(10): 967-971.
- Gibbs, P. A. (2000). "Growth of filamentous fungi in submerged culture: Problems and possible solutions." Critical Reviews in Biotechnology **20**(1): 17-48.
- Gill, N. K., M. Appleton, et al. (2008). "Design and characterisation of a miniature stirred bioreactor system for parallel microbial fermentations." Biochemical Engineering Journal **39**(1): 164-176.
- Gimbun, J., C. D. Rielly, et al. (2009). "Modelling of mass transfer in gas-liquid stirred tanks agitated by Rushton turbine and CD-6 impeller: A scale-up study." Chemical Engineering Research and Design **87**(4): 437-451.
- Gogate, P. R., A. A. Beenackers, et al. (2000). "Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review." **6**: 109 - 144.
- Gotterup, J., K. Olsen, et al. (2007). "Relationship between nitrate/nitrite reductase activities in meat associated staphylococci and nitrosylmyoglobin formation in a cured meat model system." International Journal of Food Microbiology **120**: 303 - 310.
- Grenville, R. K. and A. W. Nienow (2004). "Handbook of industrial mixing: science and practice." 507 - 542.
- Han, L. and M. H. Al-Dahhan (2007). "Gas-liquid mass transfer in a high pressure bubble column reactor with different sparger designs." Chemical Engineering Science **62**(1-2): 131-139.
- Han, S. J., H. N. Chang, et al. (2001). "Characterization of an oxygen-dependent inducible promoter, the nar promoter of *Escherichia coli*, to utilize in metabolic engineering." Biotechnology and bioengineering **72**(5): 573-576.
- Hasan, N. and Z. B. Zakaria (2011). "Computational approach for a pair of bubble coalescence process." International Journal of Heat and Fluid Flow **32**(3): 755-761.
- Hensirisak, P., P. Parasukulsatid, et al. (2002). "Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation." Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology **101**(3): 211-227.
- Hewitt, C. J. and A. W. Nienow (2007). The Scale-Up of Microbial Batch and Fed-Batch Fermentation Processes. Advances in Applied Microbiology. S. S. Allen I. Laskin and M. G. Geoffrey, Academic Press. **Volume 62**: 105-135.
- Hourcade, J. C. (1985). "Signification et impasses d'un concept banalisé : les économies d'échelle." Communication **42**: 103 - 119.
- Huang, X., C. H. Wei, et al. (2008). "Mechanism of membrane fouling control by suspended carriers in a submerged membrane bioreactor." Journal of Membrane Science **309**(1-2): 7-16.

- Ibba, M. e. a. (1987). "Submerged fermentation of *Penicillium pascilli* biosynthesizing pascilline, a process inhibited by calcium induced sporulation." Journal of General Microbiology **133**(11): 3109 - 3119.
- Iranzo, A., R. Barbero, et al. (2011). "Numerical Investigation of the Effect of Impeller Design Parameters on the Performance of a Multiphase Baffle-Stirred Reactor." Chemical Engineering & Technology **34**(8): 1271-1280.
- Jeantet, R., J. L. Maubois, et al. (1996). "Semicontinuous production of lactic acid in a bioreactor coupled with nanofiltration membranes." Enzyme and Microbial Technology **19**(8): 614-619.
- Jicinska, E. (Sept. 1968). "Note on the study of the sporulation of fungi: endotrophic sporulation in the genus *Penicillium*." Folia microbiologica **13**(5): 401 - 409.
- Jones, E. B. G. (1994). "Fungal adhesion." Mycological Research **98**(9): 961-981.
- Junker, B. H. (2004). "Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes." Journal of Bioscience and Bioengineering **97**(6): 347 - 364.
- Junker, B. H., M. Stanik, et al. (1998). "Influence of impeller type on power input in fermentation vessels." Bioprocess Engineering **18**(6): 401-412.
- Justen, P., G. Paul, et al. (1997). "Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity." Biotechnology and bioengineering **59**(6): 762 - 775.
- Jüsten, P., G. C. Paul, et al. (1996). "Dependence of mycelial morphology on impeller type and agitation intensity." Biotechnology and bioengineering **52**(6): 672-684.
- Jüsten, P., G. C. Paul, et al. (1998). "Dependence of *Penicillium chrysogenum* growth, morphology, vacuolation, and productivity in fed-batch fermentations on impeller type and agitation intensity." Biotechnology and bioengineering **59**(6): 762-775.
- Kamei, N., Y. Kato, et al. (2009). "Effects of sparger geometry on power consumption and mass transfer in a gas-liquid agitated vessel with disk turbine." Journal of Chemical Engineering of Japan **42**(9): 664-668.
- Kaster, J. A., D. L. Michelsen, et al. (1990). "Increased oxygen transfer in a yeast fermentation using a microbubble dispersion." Applied Biochemistry and Biotechnology **24-25**: 469-484.
- Kawamura, S., Y. Murakami, et al. (1995). "Freeze-drying of yeasts." Methods in molecular biology (Clifton, N.J.) **38**: 31-37.
- Kazuyuki, S. (1996). "A tutorial review on bioprocess systems engineering." Computers & Chemical Engineering **20**(6, Äi7): 915-941.
- Kilonzo, P. M. and A. Margaritis (2004). "The effects of non-Newtonian fermentation broth viscosity and small bubble segregation on oxygen mass transfer in gas-lift bioreactors: A critical review." Biochemical Engineering Journal **17**(1): 27-40.
- Kobayashi, T., G. Van Dedem, et al. (1973). "Oxygen transfer into mycelial pellets." Biotechnology and bioengineering **15**(1): 27-45.
- Kraft, B., M. Strous, et al. (2011). "Microbial nitrate respiration - Genes, enzymes and environmental distribution." Journal of Biotechnology **155**: 104 - 117.
- Larroche, C., C. Desfarges, et al. (1986). "Spore production of *Penicillium roqueforti* by simulated state fermentation." Biotechnology letters **8**(6): 453 - 456.
- Larroche, C., C. Desfarges, et al. (1988). "Optimization of the spore production of *Penicillium roqueforti* in solid substrate fermentation on buckwheat seeds." Applied Microbiology and Biotechnology **28**(1): 85-92.
- Larroche, C. and J. B. Gros (1992). "Characterization of the growth and sporulation behavior of *Penicillium roquefortii* in solid substrate fermentation by material and bioenergetic balances." Biotechnology and bioengineering **39**(8): 815-827.
- Lau, Y. M., W. Bai, et al. (2014). "Numerical study of bubble break-up in bubbly flows using a deterministic Euler-Lagrange framework." Chemical Engineering Science **108**(0): 9-22.
- Lawrence, R. C. (1965). "Activation of spores of *penicillium roqueforti*." Nature **208**(5012): 801-803.
- Lawrence, R. C. and R. W. Bailey (1970). "Evidence for the role of the citric acid cycle in the activation of spores of *P. roqueforti*." BBA - General subjects **208**(1): 77 - 86.
- Lawrence, R. C. and R. W. Bailey (1970). "Evidence for the role of the citric acid cycle in the activation of spores of *Penicillium roqueforti*." BBA - General Subjects **208**(1): 77-86.
- Li, Y., L. Wadsö, et al. (2009). "Impact of temperature on growth and metabolic efficiency of *Penicillium roqueforti*- correlations between produced heat, ergosterol content and biomass." Journal of Applied Microbiology **106**(5): 1494-1501.

- Lin, Y.-H., W.-S. Chien, et al. (2010). "Correlations between reduction-oxidation potential profiles and growth patterns of *Saccharomyces cerevisiae* during very-high-gravity fermentation." Process Biochemistry **45**(5): 765-770.
- Lin, Y.-H., W.-S. Chien, et al. (2011). "Effect of aeration timing and interval during very-high-gravity ethanol fermentation." Process Biochemistry **46**(4): 1025-1028.
- Lowe, R. W. and H. J. Evans (1964). "Preparation and some properties of a soluble nitrate reductase from *Rhizobium japonicum*." Biochimica Biophysica Acta **85**(3): 377 - 389.
- Lu, W. M. and H. Z. Wu (2002). "Gassed power drawn by each impeller in multiple impeller agitated vessels." Journal of Chinese institute of chemical **33**(6): 541 - 553.
- Luong, H. T. and B. Volesky (1979). "Mechanical power requirements of gas-liquid agitated systems." AIChE Journal **25**(5): 893-895.
- Mariano, G.-S., B.-A. Enrique, et al. (2006). "Growth morphology and hydrodynamics of filamentous fungi in submerged cultures." Advances in Agricultural and Food Biotechnology: 17-34.
- Marques, M. P. C., J. M. S. Cabral, et al. (2010). "Bioprocess scale-up: quest for the parameters to be used as criterion to move from microreactors to lab-scale." Journal of Chemical Technology & Biotechnology **85**(9): 1184-1198.
- Martín, M., J. M. García, et al. (2008). "On the effect of the orifice configuration on the coalescence of growing bubbles." Chemical Engineering and Processing: Process Intensification **47**: 1799-1809.
- Mc Intyre, M. and B. Mc Neil (1998). "Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation." Applied Microbiology and Biotechnology **50**(3): 291-298.
- McIntyre, M. and B. McNeil (1998). "Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation." Applied Microbiology and Biotechnology **50**(3): 291-298.
- McNeil, B., D. R. Berry, et al. (1998). "Measurement of autolysis in submerged batch cultures of *Penicillium chrysogenum*." Biotechnology and bioengineering **57**(3): 297-305.
- Meng, F., H. Zhang, et al. (2006). "Effect of filamentous bacteria on membrane fouling in submerged membrane bioreactor." Journal of Membrane Science **272**(1-2): 161-168.
- Metz, B. and N. W. F. Kossen (1977). "The Growth of Molds in the Form of Pellets - a literature Review." Biotechnology and bioengineering **19**: 781-799.
- Meyers, E. and S. G. Knight (1958). "Studies on the nutrition of *Penicillium roqueforti*." Applied microbiology **6**(3): 174-178.
- Michaels, J. D., A. K. Mallik, et al. (1996). "Sparging and agitation-induced injury of cultured animal cells: Do cell-to-bubble interactions in the bulk liquid injure cells?" Biotechnology and Bioengineering **51**(4).
- Miyamoto-Shinohara, Y., F. Nozawa, et al. (2010). "Survival of yeasts stored after freeze-drying or liquid-drying." Journal of General and Applied Microbiology **56**(2): 107-119.
- Möckel, H. O., E. Wolleschensky, et al. (1990). "Modelling of the calculation of the power input for aerated single- and multistage impellers with special respect to scale-up." Acta Biotechnologica **10**(3): 215-224.
- Montante, G. and F. Magelli (2004). "Liquid Homogenization Characteristics in Vessels Stirred with Multiple Rushton Turbines Mounted at Different Spacings: CFD Study and Comparison with Experimental Data." Chemical Engineering Research and Design **82**(9): 1179-1187.
- Montes, F. J., J. Catalan, et al. (1999). "Prediction of $k(L)a$ in yeast broths." Process Biochemistry **34**(6-7): 549-555.
- Morton, A. G. (1961). "The induction of sporulation in mould fungi." Proc. R. Microscop. Soc. **B** (153): 548 - 569.
- Morton, A. G. e. a. (1960). "Changes in enzyme activity of fungi during nitrogen starvation." Journal of experimental botany **11**(1): 116 - 128.
- Moucha, T., V. Linek, et al. (2003). "Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations." Chemical Engineering Science **58**: 1839 - 1846.
- Moucha, T., V. Linek, et al. (2003). "Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations." Chemical Engineering Science **58**(9): 1839-1846.
- Moueddeb, H., J. Sanchez, et al. (1996). "Membrane bioreactor for lactic acid production." Journal of Membrane Science **114**(1): 59-71.
- Nagy, E., B. Mayr, et al. (1994). "Bioprocess scale-up using a structured mixing model." Computers & Chemical Engineering **18, Supplement 1**(0): S663-S667.
- Nair, R., S. Raina, et al. (2011). "Application of fluorescent indicators to analyse intracellular calcium and morphology in filamentous fungi." Fungal Biology **115**(4,Äi5): 326-334.

- Navarrete, C., A. Siles, et al. (2009). "Oxidative stress sensitivity in *Debaryomyces hansenii*." FEMS Yeast Research **9**(4): 582-590.
- Ndagijimana, M., C. Chaves-López, et al. (2008). "Growth and metabolites production by *Penicillium brevicompactum* in yoghurt." International Journal of Food Microbiology **127**(3): 276-283.
- Nehring, D., P. Czermak, et al. (2004). "Experimental study of a ceramic microsparging aeration system in a pilot-scale animal cell culture." Biotechnology Progress **20**(6): 1710-1717.
- Neubauer, H. and F. Götz (1996). "Physiology and interaction of nitrate and nitrite reduction in *Staphylococcus carnosus*." Journal of bacteriology **178**(7): 2005 - 2009.
- Nielsen, J., J. Villadsen, et al. (2003). Scale-up of bioprocesses. Bioreaction Engineering Principles, Springer US: 477-518.
- Nienow, A. W. (1997). "On impeller circulation and mixing effectiveness in the turbulent flow regime." Chemical Engineering Science **52**(15): 2557-2565.
- Nienow, A. W. (1998). "Hydrodynamics of Stirred Bioreactors." Applied Mechanics Reviews **51**(1): 3-32.
- Nienow, A. W. (August 1990). "Agitators for mycelial fermentations." Trends in biotechnology **8**(8): 224-233.
- Nienow, A. W. (January 1998). "Hydrodynamics of stirred bioreactors." appl. Mech. Rev **51**(1): 3 - 32.
- Nienow, A. W. and W. Bujalski (2002). "Recent Studies on Agitated Three-Phase (Gas-Solid-Liquid) Systems in the Turbulent Regime." Chemical Engineering Research and Design **80**(8): 832-838.
- Nienow, A. W. and W. Bujalski (2004). "The Versatility of Up-Pumping Hydrofoil Agitators." Chemical Engineering Research and Design **82**(9): 1073-1081.
- Nyiri, L. (1967). "Effect of CO₂ on the germination of *Penicillium chrysogenum* spores." Zeitschrift für allg. Mikrobiologie **7**(2): 107 - 111.
- Olsvik, E. and B. Kristiansen (1994). "Rheology of filamentous fermentations." Biotechnology Advances **12**(1): 1-39.
- Olsvik, E. S. and B. Kristiansen (1992). "Influence of oxygen tension, biomass concentration, and specific growth rate on the rheological properties of a filamentous fermentation broth." Biotechnology and bioengineering **40**(11): 1293-1299.
- Olsvik, E. S. and B. Kristiansen (1992). "On-line rheological measurements and control in fungal fermentations." Biotechnology and bioengineering **40**(3): 375-387.
- Papagianni, M. (1999). "Fungal morphology." Citric acid biotechnology: 69 - 84.
- Papagianni, M. (2004). "Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes." Biotechnology advances **22**: 288 - 259.
- Patnaik, P. R. (2000). "Penicillin fermentation: Mechanisms and models for industrial-scale bioreactors." Critical Reviews in Biotechnology **20**(1): 1-15.
- Paul, G. C., C. A. Kent, et al. (1993). "Viability testing and characterization of germination of fungal spores by automatic image analysis." Biotechnology Bioengineering **42**(1): 11 - 23.
- Payot, T., Z. Chemaly, et al. (1999). "Lactic acid production by *Bacillus coagulans* - Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations." Enzyme and Microbial Technology **24**(3-4): 191-199.
- Perlot, P., F. Daujat, et al. (1989). "Fermentation alcoolique par bioréacteur à membrane : forte densité cellulaire, performance du process." Industries alimentaires et agricoles **106**(10): 855 - 860.
- Pham, T. N. L., N. H. D. Doan, et al. (2010). "Using fed-batch fermentation in very high gravity brewing: Effects of tween 80 and ergosterol supplementation on fermentation performance of immobilized yeast in calcium alginate gel." International Food Research Journal **17**(4): 995-1002.
- Piccoli-Valle, R. H., F. J. V. Passos, et al. (2003). "Influence of different mixing and aeration regimens on pectin lyase production by *Penicillium griseoroseum*." Process Biochemistry **38**(6): 849-854.
- Pichinoty, F. (1963). "The study and refinement of 2 methods permitting the measurement of bacterial nitrate reductase activity." Annales de l'Institut Pasteur **104**: 219-237.
- Pirt, S. J. (1966). "A theory of the mode of growth of fungi in the form of pellets in submerged culture." Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological sciences **166**(4): 369-373.
- Pirt, S. J. and D. S. Callow (1959). "Continuous-flow culture of the filamentous mould *Penicillium chrysogenum* and the control of its morphology." Nature(184): 307 - 10.
- Pitt, D. and P. C. Poole (1981). "Calcium-induced conidiation in *Penicillium notatum* in submerged culture." Trans. Br. Mycol. Soc. **76**(2): 219 - 230.

- Pollard, D. J., P. Ayazi Shamlou, et al. (1996). "Saccharomyces cerevisiae fermentations in a pilot scale airlift bioreactor: Comparison of air sparger configurations." *Bioprocess Engineering* **15**(5): 279-288.
- Pollard, D. J., T. F. Kirschner, et al. (2007). "Scale up of a viscous fungal fermentation: Application of scale-up criteria with regime analysis and operating boundary conditions." *Biotechnology and bioengineering* **96**(2): 307-317.
- Posch, A. E., O. Spadiut, et al. (2012). "A novel method for fast and statistically verified morphological characterization of filamentous fungi." *Fungal Genetics and Biology* **49**(7): 499-510.
- Poulsen, B. R. (2005). "Characterization of pathway engineered strains of filamentous fungi in submerged cultures." **Chapter 9: Can submerged cultures of filamentous fungi be made reproducible?**
- Poulsen, B. R. and J. J. L. Iversen (1997). "Mixing determinations in reactor vessels using linear buffers." *Chemical Engineering Science* **52**(6): 979-984.
- Poulsen, B. R. and J. J. L. Iversen (1998). "Characterization of gas transfer and mixing in a bubble column equipped with a rubber membrane diffuser." *Biotechnology and bioengineering* **58**(6): 633-641.
- Poulsen, B. R. and J. J. L. Iversen (1999). "Membrane sparger in bubble column, airlift, and combined membrane-ring sparger bioreactors." *Biotechnology and bioengineering* **64**(4): 452-458.
- Poulsen, B. R. F. A. U. I. and J. J. Iversen "Membrane sparger in bubble column, airlift, and combined membrane-ring sparger bioreactors." (1097-0290 (Electronic)).
- Ranade, V. V. (1997). "An efficient computational model for simulating flow in stirred vessels: a case of Rushton turbine." *Chemical Engineering Science* **52**(24): 4473-4484.
- Riley, G. L., K. G. Tucker, et al. (2000). "Effect of biomass concentration and mycelial morphology on fermentation broth rheology." *Biotechnology and bioengineering* **68**(2): 160 - 172.
- Rockwell, E. and J. H. Highberger (1927). "The necessity of CO₂ for the growth of bacteria, yeasts and moulds." *Journal Infection Disease* **40**(3).
- Rodgers, T. L., L. Gangolf, et al. (2011). "Mixing times for process vessels with aspect ratios greater than one." *Chemical Engineering Science* **66**(13): 2935-2944.
- Rodgers, T. L., L. Gangolf, et al. (2011). "Mixing times for process vessels with aspect ratios greater than one." *Chemical Engineering Science* **66**: 2935 - 2944.
- Roels, J. A., J. Van Den Berg, et al. (1974). "The rheology of mycelial broths." *Biotechnology and bioengineering* **16**(2): 181-208.
- Roncal, T., S. Cordobés, et al. (2002). "Conidiation in *Penicillium cyclopium* is induced by conidiogenone, an endogenous diterpene." *Eukaryotic Cell* **1**(5): 823-829.
- Roncal, T. and U. Ugalde (2003). "Conidiation induction in *Penicillium*." *Research in Microbiology* **154**(8): 539-546.
- Rouf, S. A., P. L. Douglas, et al. (2001). "Computer simulation for large scale bioprocess design." *Biochemical Engineering Journal* **8**(3): 229-234.
- Roustan, M., J. C. Pharamond, et al. (1999). "Agitation. Mélange - Concepts théoriques de base." *Techniques de l'Ingénieur Référence J3800*
- Sardeing, R., J. Aubin, et al. (2004). "Gas-Liquid Mass Transfer: A Comparison of Down- and Up-pumping Axial Flow Impellers with Radial Impellers." *Chemical Engineering Research and Design* **82**(12): 1589-1596.
- Scargiali, F., A. Busciglio, et al. "Mass Transfer And Hydrodynamic Characteristics Of Unbaffled Stirred Bioreactors: Influence Of Impeller Design." *Biochemical Engineering Journal*(0).
- Scargiali, F., A. Busciglio, et al. (2014). "Mass transfer and hydrodynamic characteristics of unbaffled stirred bioreactors: Influence of impeller design." *Biochemical Engineering Journal* **82**: 41-47.
- Scervino, J. M., V. L. Papinutti, et al. (2011). "Medium pH, carbon and nitrogen concentrations modulate the phosphate solubilization efficiency of *Penicillium purpurogenum* through organic acid production." *Journal of Applied Microbiology* **110**(5): 1215-1223.
- Schlüter, V. and W. D. Deckwer (1992). "Gas/liquid mass transfer in stirred vessels." *Chemical Engineering Science* **47**(9-11): 2357-2362.
- Schmidt, F. R. (2005). "Optimization and scale up of industrial fermentation processes." *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**: 425 - 435.
- Schroder, P. (1978). "Aufhebung der Glucoserepression auf die Zellspezialisierung durch Citrat und Ca⁺⁺ in submersen Kulturen von *Penicillium cyclopium*." *Biochemie und Physiologie der Pflanzen* **172**.
- Scott, J. A., J. A. Howell, et al. (1996). "Enhanced system k_{La} and permeate flux with a ceramic membrane bioreactor." *Biotechnology Techniques* **10**(4): 287-290.

- Shukla, V. B., U. Parasu Veera, et al. (2001). "Scale-up of biotransformation process in stirred tank reactor using dual impeller bioreactor." Biochemical Engineering Journal **8**(1): 19-29.
- Solomons, G. L. and G. O. Weston (1961). "The prediction of oxygen transfer rates in the presence of mould mycelium." Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering **3**(1): 1-6.
- Sondergaard, A. K. and L. H. Stahnke (2002). "Growth and aroma production by *Staphylococcus xylosus*, *S. carnosus* and *S. equorum* - a comparative study in model systems." International Journal of Food Microbiology **75**(99 - 109).
- Ståhl Wernersson, E. and C. Trägårdh (1999). "Scale-up of Rushton turbine-agitated tanks." Chemical Engineering Science **54**(19): 4245-4256.
- Stricot, M., A. Filali, et al. (2010). "Side-stream membrane bioreactors: Influence of stress generated by hydrodynamics on floc structure, supernatant quality and fouling propensity." Water Research **44**(7): 2113-2124.
- Suijdam, J. C., N. W. F. Kossen, et al. (1980). "An inoculum technique for the production of fungal pellets." Applied Microbiology and Biotechnology **10**(3): 211-221.
- Sweere, A. P. J., J. P. van Dalen, et al. (1988). "Theoretical analysis of the baker's yeast production: An experimental verification at a laboratory scale - Part 1: Liquid mixing and mass transfer." Bioprocess Engineering **3**(4): 165-171.
- Taghavi, M., R. Zadghaffari, et al. (2011). "Experimental and CFD investigation of power consumption in a dual Rushton turbine stirred tank." Chemical Engineering Research and Design **89**(3): 280-290.
- Takahashi, J., Y. Abekawa, et al. (1960). "Effect of nonionic surface-active agent on the formation of *Aspergillus niger* pellets." Agric. Chem. Soc. Jpn **34**: 1043-1047.
- Takors, R. (2012). "Scale-up of microbial processes: Impacts, tools and open questions." Journal of Biotechnology **1**(2): 3 - 9.
- Tanaka, H. (1976). "Studies on the effect of agitation on mycelia in submerged culture." Journal Fermentation Technology **54**(11).
- Tran, Q. H., T. T. Nguyen, et al. (2010). "Effect of Tween 80 and ergosterol supplementation on fermentation performance of the immobilized yeast in high gravity brewing." International Food Research Journal **17**(2): 309-318.
- Tucker, K. G. and C. R. Thomas (1992). "Mycelial morphology: The effect of spore inoculum level." Biotechnology Letters **14**(11): 1071-1074.
- Tucker, K. G. and C. R. Thomas (1994). "Inoculum effects on fungal morphology: Shake flasks vs agitated bioreactors." Biotechnology Techniques **8**(3): 153-156.
- Valik, L., J. Baranyi, et al. (1999). "Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Penicillium roqueforti*." International Journal of Food Microbiology **47**(1-2): 141-146.
- Van't Riet, K. (1979). "Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels." Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development **18**(3): 357-364.
- Vermande, S. p., K. Simpson, et al. (2007). "Impact of agitation and aeration on hydraulics and oxygen transfer in an aeration ditch: Local and global measurements." Chemical Engineering Science **62**(9): 2545-2555.
- Vézina, C., K. Singh, et al. (1965). "Sporulation of filamentous fungi in submerged culture." Mycologia **57**(5): 722 - 736.
- Vlaev, S. D. and M. Fialova (2003). "Bubble column bioreactors: Comparison with stirred fermenters based on local gas hold-up distribution." Canadian Journal of Chemical Engineering **81**(3-4): 535-542.
- Vrabel, P., R. G. J. M. van der Lans, et al. (2000). "Mixing in large-scale vessels stirred with multiple radial or radial and axial up-pumping impellers: modelling and measurements." Chemical Engineering Science **55**(23): 5881-5896.
- Vu, T. K. L. and V. V. M. Le (2010). "Using fed-batch fermentation in high-gravity brewing: Effects of nutritional supplementation on yeast fermentation performance." International Food Research Journal **17**(1): 117-126.
- Whitaker, A. and P. A. Long (1973). "Fungal pelleting." Process Biochemistry.
- William, J. G. and J. H. Richard (1946). "Production of conidia in submerged cultures of *Penicillium notatum*." J Bacteriol. **51**(6): 731 - 733.
- Wongwicharn, A., L. M. Harvey, et al. (1999). "Secretion of heterologous and native proteins, growth and morphology in batch cultures of *Aspergillus niger* B1-D at varying agitation rates." Journal of Chemical Technology and Biotechnology **74**(8): 821-828.
- Wucherpfennig, T., K. A. Kiep, et al. (2010). Morphology and rheology in filamentous cultivations. **72**: 89-136.

- Yepez Silva-Santisteban, B. O. and F. Maugeri Filho (2005). "Agitation, aeration and shear stress as key factors in inulinase production by *Kluyveromyces marxianus*." *Enzyme and Microbial Technology* 36(5-6): 717-724.
- Youatt, J. (1993). "Calcium and microorganisms." *Critical Reviews in Microbiology* 19(2): 83-97.
- Zetelaki, K. and K. Vas (1968). "The role of aeration and agitation in the production of glucose oxidase in submerged culture." *Biotechnology and bioengineering* 10(1): 45 - 59.
- Zhu, H., A. W. Nienow, et al. (2009). "Mixing studies in a model aerated bioreactor equipped with an up- or a down-pumping Elephant Ear agitator: Power, hold-up and aerated flow field measurements." *Chemical Engineering Research and Design* 87(3): 307-317.
- Zhu, T. Y., M. Q. Ma, et al. (2009). "Progress in research on high density fermentation of recombinant yeast cells." *Chinese Journal of Biologicals* 22(10): 1036-1039.
- Znidarsic, P. and A. Pavko (2001). "The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter." *Food technol. Biotechnol.* 39(3): 237-252.

Annexes

Annexe 1. Mesure de l'azote soluble par la méthode BCA.

❖ Préparation des réactifs

➤ Solution de caséinates de sodium (solution A)

▪ Réactifs

- Solvant : eau distillée
- Réactifs :
 - ◆ Caséinate de sodium

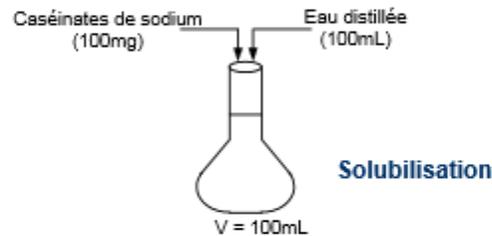
▪ Conditions opératoires :

- Fiole jaugée de 100mL
- Température : ambiante
- Volume : 100mL

▪ Concentrations utilisées :

- Caséinate de sodium : 1 g/L

▪ Résumé schématique



➤ Solution de dosage (solution B)

▪ Réactifs

- Réactifs :
 - ◆ Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination (Sigma, réf: BCA1)

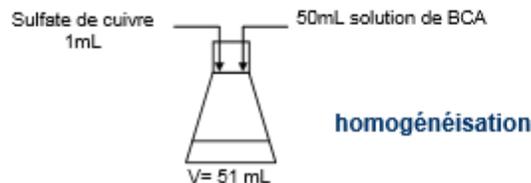
▪ Conditions opératoires :

- Température : ambiante
- Volume : 51mL

▪ Concentrations utilisées :

- BCA
- Sulfate de cuivre à 4% (w/v)

▪ Résumé schématique



❖ Mode Opérateur

➤ Courbe d'étalonnage de la caséinate de sodium

▪ Réactifs

- Solvant : eau
- Réactifs :
 - ◆ BCA
 - ◆ Solution de sulfate de cuivre
 - ◆ Solution de caséinate de sodium

▪ Dilutions de la solution de caséinates de calcium

▪ Conditions opératoires :

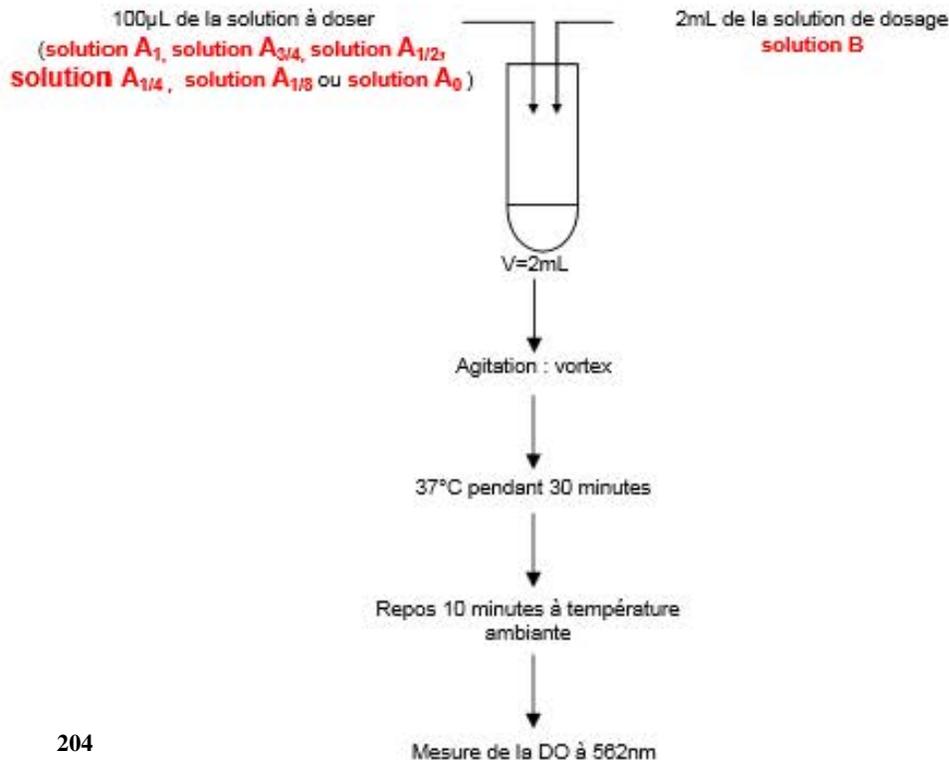
- Tubes de 5mL
- Température : ambiante
- Volume : 1mL

▪ Concentrations utilisées :

- Caséinates de calcium : 2,5g/L (solution A)

Solution n°	Concentration (g/L)	Dilution	Volume d'acide gallique à 40mg/L (µL)	Volume d'eau distillée (µL)
A ₁	1	0	1000	0
A _{3/4}	0,75	3/4	750	250
A _{1/2}	0,5	½	500	500
A _{1/4}	0,250	1/4	250	750
A _{1/8}	0,125	1/8	125	875
A ₀	0	-	0	1000

▪ Résumé schématique du dosage pour les caséinates de sodium



➤ **Dosage des protéines dans une solution de concentration inconnue**

▪ **Réactifs**

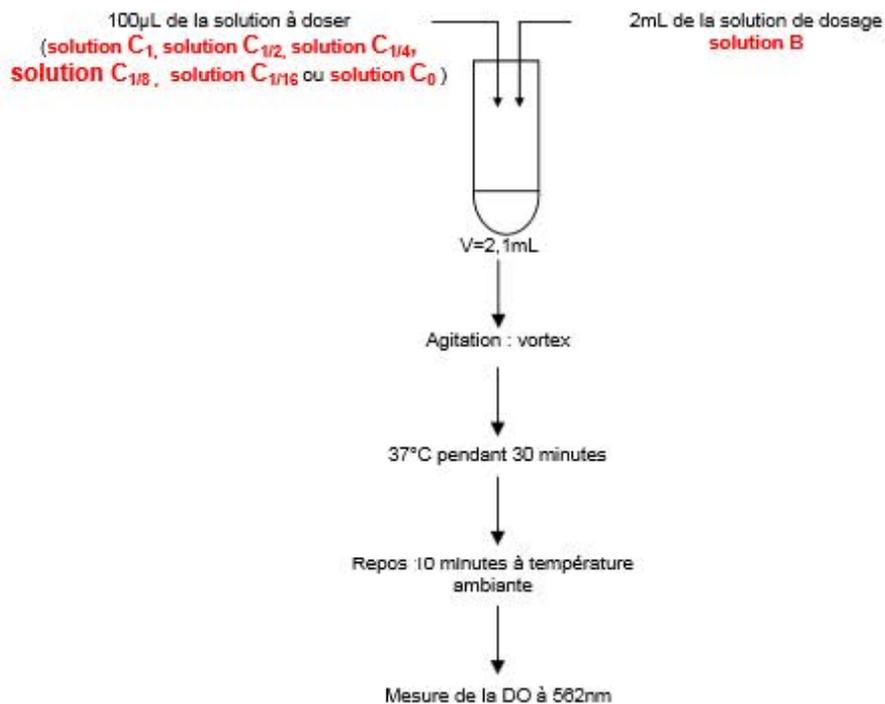
- Solvant : eau
- Réactifs :
 - ◆ Solution à doser
 - ◆ Solution de dosage (solution B)

▪ **Dilutions de la solution à doser**

- **Conditions opératoires :**
 - Tubes de 5mL
 - Température : ambiante
 - Volume : 1mL
- **Concentrations utilisées :**
 - Solution à doser (solution C)

Solution n°	Dilution	Volume de solution à doser (µL)	Volume solvant réactionnel (µL)
C ₁	0	1000	0
C _{1/2}	½	500	500
C _{1/4}	1/4	250	750
C _{1/8}	1/8	125	875
C _{1/16}	1/16	62,5	937,5
C ₀	-	0	1000

▪ **Résumé schématique du dosage pour la solution inconnue**



Annexe 2. Méthode de mesure de la nitrate réductase.

Protocole de dosage de l'activité nitrate réductase de *Staphylococcus xylosus* / *carneus* à partir de la méthode de Lowe and Evans (1964) (voir méthode complète en Annexe)

A) Préparation des réactifs

- Nitrate 0,2 M

Dissoudre 1.011 g de KNO_3 dans 50 ml d'eau distillée

- Tampon phosphate 0,1 M pH 7

- Solution A ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + 2\text{H}_2\text{O}$) à 0,1M → pour 1500 ml de solution : 23.4g de NaH_2PO_4 qsp 1,5L d'eau déminéralisée.
- Solution B ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + 12\text{H}_2\text{O}$) à 0,1M → pour 2000 ml de solution : 71.6 g de Na_2HPO_4 qsp 2L d'eau déminéralisée.
- Ajuster le pH de la solution B avec la solution A afin d'avoir une solution à pH 7. Ajouter environ 1340 ml de solution A dans les 2000 ml de solution B en contrôlant que le pH ne soit pas inférieur à 7.

- Benzyl viologène dichlorure 0,50 mM (pesée très précise)

Dissoudre 10.3 mg de BVCl_2 dans 50 ml d'eau distillée

- Acétate de Zinc à saturation

Mettre de l'acétate de zinc dans 10 ml d'eau distillée jusqu'à ce qu'il ne se dissolve plus après avoir bien vortexé.
(Environ 6 g)

- Sulfanilamide 1% (10 mg/mL)

Dissoudre 0.5 g de sulfanilamide dans 50 ml d'acide phosphorique à 5%

- N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochlorure 0,1% (1 mg/mL)

Dissoudre 0.05 g de N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochlorure dans 50 ml d'eau distillée

- Solution mère de nitrite à 0,1 M

Dissoudre 0.069 g de NaNO_2 dans 10 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,0

- Dithionite, 0,14 M

Dissoudre 0.122 g de NaHCO_3 et 0.143 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ à 87% dans 10 ml d'eau distillée (solution à réaliser au dernier moment car elle est photosensible)

Les solutions doivent être conservées à 4°C afin de limiter leur dégradation.

B) La gamme étalon

Il est nécessaire de refaire au moins quatre points de la gamme étalon lorsqu'une ou plusieurs solutions sont renouvelées (Sauf pour la solution de dithionite à refaire après chaque série de dosage)

Une gamme étalon à l'aide de la solution mère de nitrite à 0,1 M.

- Mettre 0,3 ml de solution de nitrite à 0,1M diluée dans 100 ml de tampon phosphate 0,1 M pH 7,0 pour avoir une concentration de 0,3 mM.

- Réaliser des dilutions en Tp phosphate de cette solution de NaNO_2 0,3 mM pour obtenir une gamme contenant 0 à 0,3 μmole par ml.
- Ajouter dans chaque tube :
 - 250 μl de sulfanilamide 1%
 - 250 μl de N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochloride 0,1% } Réactifs de GRIESS
- La lecture est effectuée à 540 nm contre du tampon phosphate 0,1 M à pH 7 au bout de 30 minutes de réaction.

Gamme étalon											
Volume de solution Mère à 0,3 mM (μl)	0	100	200	300	400	500	600	700	800	900	1000
Volume de Tp phosphate 0,1 M à pH7 (μl)	1000	900	800	700	600	500	400	300	200	100	0
Concentration en nitrite ($\mu\text{mole/ml}$)	0	0,03	0,06	0,09	0,12	0,15	0,18	0,21	0,24	0,27	0,3

C) Préparation des échantillons

Il est possible de réaliser un dosage de l'activité sur culture liquide pendant la fermentation ou sur culture lyophilisée (PSO). Il faut cependant préparer spécifiquement les échantillons.

a) Pour une mesure de l'évolution de l'activité nitrate réductase sur culture liquide

Des prélèvements de 1 ml sont effectués régulièrement. Les cultures sont centrifugées à 3000 rpm pendant 15 min à 4°C. Les culots sont lavés dans 1 ml de tampon phosphate 0,1 M, pH 7,0. Tous les échantillons sont congelés à -20°C et seront utilisés pour mesurer l'activité enzymatique.

Pour chaque prélèvement, une mesure de la matière sèche est effectuée avec un spectrophotomètre à 560 nm afin de rapporter l'activité enzymatique sur la concentration cellulaire.

b) Pour une mesure de l'activité nitrate réductase sur culture lyophilisée (45 min)

Réhydrater pendant 30 min à 480 rpm, 0,5g de lyophilisat dans 49,5 ml d'eau physiologique stérile.

D) Le dosage (2h)

- 1) Ajouter 200 μl de tampon phosphate 0,1 M à pH 7 dans un tube Eppendorf de 1,5 ml
- 2) Ajouter 40 μl d'échantillon à analyser
- 3) Soniquer les Eppendorfs pendant 15 minutes
- 4) Ajouter 120 μl de dithionite (*agent réducteur : donneur d'électrons*) dans chaque tube
- 5) Ajouter 120 μl de benzyl viologène (*agent oxydant : donneur d'hydrogènes artificiel*)

⇒ Apparition d'une couleur violette

- 6) Démarrer la réaction dans le premier échantillon :

- a. Ajouter 40 μl de KNO_3 (Ajout de nitrate en excès)

⇒ A ce stade, si la solution ne reste pas de couleur violette, cela signifie que la concentration en enzyme est trop importante et qu'il faut rediluer la solution.

- b. Incuber le tube à 30°C au Bain-marie (*réduction des nitrates en nitrites par la nitrate réductase présente*)

- c. Lancer le chronomètre

- 7) Recommencer l'opération toutes les minutes à partir du 6) pour les échantillons suivants

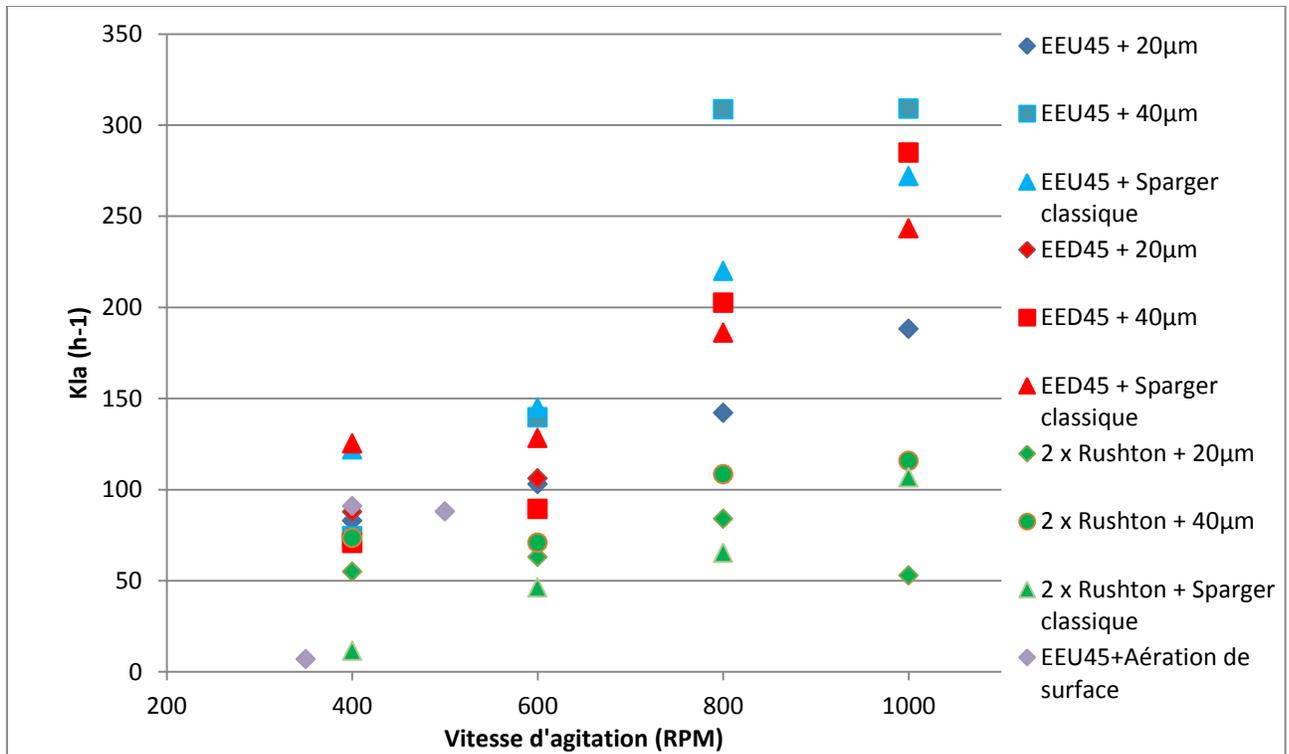
Catalyse

- 8) Après exactement 30 minutes d'incubation, vortexer un par un les tubes jusqu'à la disparition de la couleur bleue (ceci peut prendre une minute)
- ⇒ Arrêt de la réduction des nitrates par oxydation à l'air du benzyl viologen et du dithionite.
-

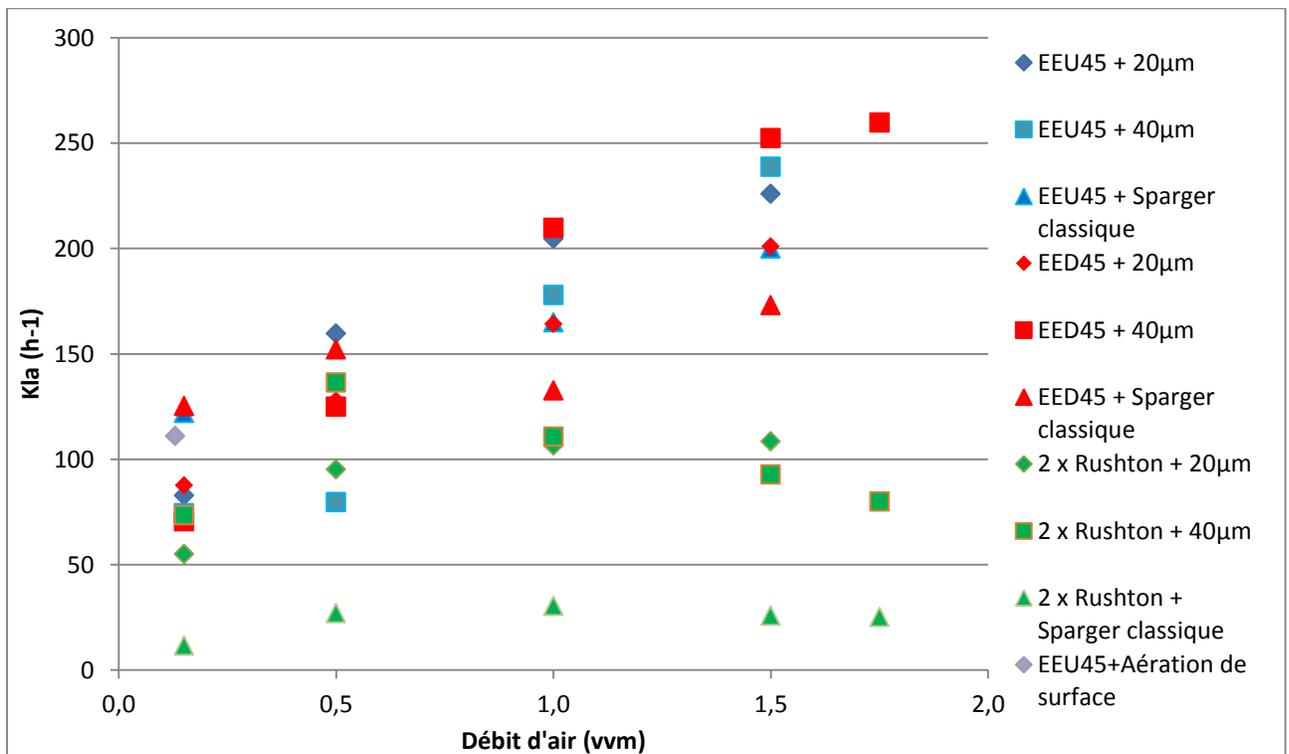
- 9) Ajouter de 40 µl de zinc acétate
- ⇒ L'acétate de zinc provoque la précipitation des substances pouvant interférer dans la mesure colorimétrique, en particulier les protéines.
- 10) Ajouter de 760 µl d'éthanol
- 11) centrifuger pendant 15 minutes à 3000 rpm
- ⇒ On constate la formation d'un précipité blanc de zinc associé aux protéines interférentes.
- 12) Prélever 1 ml de surnageant et les mettre dans un autre tube Eppendorf
- 13) Ajouter 250 µl de sulfanilamide 1%
- 14) Ajouter 250 µl de N-(1-naphtyl)éthylènediamine dihydrochloride 0,1% } Réactifs de GRIESS
- ⇒ En milieu acide, les nitrites libèrent de l'acide nitreux (HNO_2) qui réagit avec le sulfanilamide pour donner un composé diazoïque. En présence de naphtyléthylènediamine, il se forme un complexe de couleur rose.

15) La lecture colorimétrique (30 min)

La lecture est effectuée à 548 nm contre du tampon phosphate 0,1 M à pH 7 au bout de 30 minutes de réaction. On déduit la concentration de nitrites formés d'après la courbe étalon. L'activité nitrate réductase est exprimée en mM de NO_2^- /g de matière sèche /30 min d'incubation.



Annexe 3. K_{La} en fonction de la vitesse d'agitation à l'échelle fermenteur 2L.



Annexe 4. K_{La} en fonction du débit d'air à l'échelle fermenteur 2L.

Annexe 5. Définir et fixer des critères

Il est délicat lorsqu'on cherche à créer un nouveau procédé ou à améliorer un procédé déjà existant, de définir le ou les critère(s) clef(s), car les facteurs peuvent être nombreux. Il s'agit en effet de pouvoir garder la même qualité et la même (voire de l'augmenter) marge d'exploitation entre les échelles.

Pour notre étude, nous avons abordé cette phase en nous limitant au critère de coefficient de transfert d'oxygène, K_{La} et en maintenant la vitesse en bout de pale constante ou en maintenant la vitesse superficielle de gaz constante. Pour cela, nous avons utilisé l'équation la plus utilisée dans la littérature pour le calcul de prédiction du K_{La} afin de bénéficier un maximum des recherches précédentes.

Soit K_{La} :

$$Kla = K \times \left(\frac{P}{V}\right)^\alpha \times (Vg)^\beta$$

On sait que :

$$\frac{P}{V} = \frac{Np \times \rho \times N^3 \times d^5}{V}$$

et :

$$Vg = \frac{Q}{\Pi \times \frac{d^2}{4}}$$

$$\begin{aligned}Kla &= K \times \left(\frac{Np \times \rho \times N^3 \times d^5}{\Pi \times \frac{d^2}{4} \times H}\right)^\alpha \times \left(\frac{4Q}{\Pi \times d^2}\right)^\beta \\&= K \times \left(\frac{4 \times Np}{\Pi}\right)^\alpha \times \left(\frac{4}{\Pi}\right)^\beta \times \left(\frac{\rho \times N^3 \times d^5}{d^2 \times H}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q}{d^2}\right)^\beta \\&= K \times \left(\frac{4 \times Np}{\Pi}\right)^\alpha \times \left(\frac{4}{\Pi}\right)^\beta \times \left(\frac{\rho \times N^3 \times d^3}{H}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q}{d^2}\right)^\beta\end{aligned}$$

Si :

$$Kla_1 = Kla_2$$

Equation 1 :

$$\left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2}\right)^\beta = \left(\frac{\rho_2 \times N_2^3 \times d_2^3}{H_2}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_2}{d_2^2}\right)^\beta$$

On retire la masse volumique pour simplifier la formule :

$$\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2}\right)^\beta = \left(\frac{N_2^3 \times d_2^3}{H_2}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_2}{d_2^2}\right)^\beta$$

Si l'on souhaite fixer la vitesse superficielle de gaz constante nous aurons alors :

$$\frac{4Q_1}{\pi \times d_1^2} = \frac{4Q_2}{\pi \times d_2^2}$$

Equation 2 :

$$Q_2 = Q_1 \times \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2$$

L'équation 1 nous donne :

$$N_2^{3\alpha} = \frac{\left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2}\right)^\beta \times H_2^\alpha}{\left(\frac{Q_2}{d_2^2}\right)^\beta \times (\rho \times d_2^3)^\alpha}$$

Et équation 3 :

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2}\right)^\beta \times H_2^\alpha}{\left(\frac{Q_2}{d_2^2}\right)^\beta \times (\rho \times d_2^3)^\alpha} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

On remplace 2 dans 3 :

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{\rho_1 \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1}\right)^\alpha \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2}\right)^\beta \times H_2^\alpha}{Q_1^\beta \times \left[\frac{\left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2}{d_2^2}\right]^\beta \times (\rho \times d_2^3)^\alpha} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{\rho \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1}\right)^\alpha \times \left(\frac{1}{d_1^2}\right)^\beta \times H_2^\alpha}{\left(\frac{d_2^3}{d_1}\right)^\beta \times (\rho \times d_2^3)^\alpha} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

$$N_2 = \left(\frac{\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^\alpha \times H_2^\alpha}{d_2^{3\alpha}} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

La formule simplifiée pour la vitesse superficielle de gaz constante est :

$$N_2 = \left(\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^\alpha \times \frac{H_2^\alpha}{d_2^{3\alpha}} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

Cette fois-ci, si l'on souhaite garder la vitesse en bout de pale constante, nous aurons alors pour formule :

Equation 4 :

$$\Pi \times N_1 \times d_1 = \Pi \times N_2 \times d_2$$

Soit :

$$N_2 = N_1 \times \frac{d_1}{d_2}$$

Equation 5 :

$$Q_2 = \left(\frac{\left(\frac{\rho \times N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^\alpha \times \left(\frac{Q_1}{d_1^2} \right)^\beta \times (d_2^2)^\beta}{\left(\frac{\rho \times N_2^3 \times d_2^3}{H_2} \right)^\alpha} \right)^{\frac{1}{\beta}}$$

L'équation 4 dans 5 :

$$Q_2 = \left[\frac{N_1^3 \times d_1^3}{N_2^3 \times d_2^3} \right]^\alpha \times \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^\alpha \times \left(\frac{d_2^2}{d_1^2} \right)^\beta \times Q_1^\beta \right]^{\frac{1}{\beta}}$$

$$Q_2 = \left[\frac{d_1^3}{\left(\frac{d_1}{d_2} \right)^3 \times d_2^3} \right]^\alpha \times \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^\alpha \times \left(\frac{d_2^2}{d_1^2} \right)^\beta \times Q_1^\beta \right]^{\frac{1}{\beta}}$$

$$Q_2 = \left[\left(\frac{H_2}{H_1} \right)^\alpha \times \left(\frac{d_2^2}{d_1^2} \right)^\beta \times Q_1^\beta \right]^{\frac{1}{\beta}}$$

La formule simplifiée à vitesse en bout de pale constante est :

$$Q_2 = \left(\frac{H_2}{H_1}\right)^{\alpha/\beta} \times \left(\frac{d_2}{d_1}\right)^2 \times Q_1$$

Une fois toutes les formules nécessaires définies et simplifiées, il a suffi de créer un nouveau tableur de calcul. Comme pour le tableur précédent, il est divisé en plusieurs pages.

La première page constitue les éléments de base (Tableau 64). Sur cette page de calculs, les dimensions des fermenteurs et des systèmes d'agitation, les paramètres d'aération et d'agitation sont nécessaires pour effectuer l'extrapolation. Ce tableau présente les paramètres nécessaires à appliquer à l'échelle haute pour obtenir un coefficient de transfert d'oxygène et, soit une vitesse en bout de pale soit une vitesse superficielle de gaz identiques. Dans cet exemple, on peut observer que pour obtenir un K_{La} de 121hr^{-1} , une vitesse de 600RPM et un débit d'air de 0.15 vvm sont nécessaires à l'échelle 2L. Dans le cas d'une vitesse superficielle de gaz constante, il faudra appliquer à l'échelle de 600L une vitesse d'agitation de 279RPM et un débit d'air de 0.01 vvm pour obtenir une valeur de K_{La} de 114hr^{-1} . Alors que pour une vitesse en bout de pale constante, il faudra appliquer une vitesse d'agitation de 134RPM et un débit d'air de 0.22vvm pour obtenir aussi un K_{La} de 114hr^{-1} .

Tableau 64. Valeurs d'extrapolation à K_{La} et vitesse superficielle de gaz ou vitesse en bout de pale constante pour une extrapolation sans similitude géométrique entre un fermenteur de 2L (à 600RPM) et un fermenteur de 600L.

Masse volumique	ρ	1000
Nombre de puissance	N_p	2
Facteur multi impeller	F	1,8

GEOMETRIE	Echelle 1	
Volume liquide	V_1 (L)	2
Volume liquide	V_1 (m^3)	0,002
Diamètre agitateur	d_1 (m)	0,085
Diamètre cuve	D_1 (m)	0,15
Hauteur liquide	H_1 (m)	0,135
Fréquence agitation	N_1 (tr/min)	600
Fréquence agitation	N_1 (tr/s)	10,0
Débit d'air	Q_1 (m^3/h)	0,018
Débit d'air	Q_1 (L/min)	0,3
Débit d'air	VVM	0,15
Puissance volumique	P/V (w/m^3)	4437
Vitesse superficielle	V_g (m/s)	0,0003
K_{La}	hr^{-1}	121

Echelle 2	
V_2 (L)	600,00
V_2 (m^3)	0,600
d_2 (m)	0,38
D_2 (m)	0,792
H_2 (m)	1,22

Vitesse superficielle constante	
N_2 (tr/min)	279
N_2 (tr/s)	4,66
Q_2 (m^3/h)	0,36
Q_2 (L/min)	6
VVM	0,01
Puissance volumique	4800
Vitesse superficielle	0,0002
K_{La}	114

$$\Rightarrow N_2 = \left(\left(\frac{N_1^3 \times d_1^3}{H_1} \right)^\alpha \times \frac{H_2^\alpha}{d_2^{3\alpha}} \right)^{\frac{1}{3\alpha}}$$

$$\Rightarrow Q_2 = Q_1 \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2$$

PARAMETRES CALCUL K_{La}	PILOTE	
K	=	0,0119
α	=	0,408
β	=	0,292



$$K_{La} = K \times (P/V)^\alpha \times (V_g)^\beta$$

Vitesse en bout de pale constante	
N_2 (tr/min)	134
N_2 (tr/s)	2,24
Q_2 (m^3/h)	7,78
Q_2 (L/min)	130
VVM	0,22
Puissance volumique	532
Vitesse superficielle	0,0044
K_{La}	114

$$\Rightarrow N_2 = N_1 \times \frac{d_1}{d_2}$$

$$\Rightarrow Q_2 = \left(\frac{H_2}{H_1} \right)^{\alpha/\beta} \times \left(\frac{d_2}{d_1} \right)^2 \times Q_1$$

Comme pour beaucoup d'étape de l'extrapolation, un juste milieu doit être trouvé entre vitesse d'agitation et débit d'air pour trouver la meilleure association de paramètres. L'installation aux échelles pilote et industrielle ont malheureusement des limites qu'il faut prendre en compte. La limite maximale préconisé par le constructeur du fermenteur pilote (Pierre Guerin) est fixée à 300RPM et la limite en débit d'air du compresseur est fixée à 0.15vvm pour les fermenteurs à l'échelle industrielle. Pour cela, nous avons rajouté d'autres feuilles de calculs à notre tableur afin de vérifier les possibilités maximales de la nouvelle installation. Cette feuille est rapportée en Tableau 65 et en Tableau 68. Sur le Tableau 65, on peut remarquer la correspondance d'une vitesse d'agitation à l'échelle laboratoire par rapport à une vitesse d'agitation à l'échelle pilote à K_{La} et vitesse superficielle de gaz constants. On voit que pour une vitesse d'agitation maximale à l'échelle laboratoire de 600RPM, on atteint presque le maximum préconisé par le constructeur. Le Tableau 68 fonctionne sur le même principe mais cette fois la correspondance se fait en fonction du débit d'air injecté dans le fermenteur. On en déduit que pour un débit d'air de 0.1 vvm à l'échelle laboratoire, on devra utiliser un débit d'air de 0.14vvm à l'échelle pilote pour obtenir les mêmes performances qu'à l'échelle laboratoire soit la limite d'utilisation du compresseur à l'échelle industrielle.

Tableau 65. Limites du modèle suivant les spécifications du moteur d'agitation (limité à 300RPM maximum) et correspondances de vitesses d'agitation entre les échelles.

Vitesse d'agitation à K_{La} et vitesse superficielle de gaz (V_g) constants			
Echelle labo (RPM)	Echelle pilote (RPM)	Puissance volumique (W/h)	K_{La} (hr^{-1})
200	93	178	30
300	140	600	49
400	186	1422	69
500	233	2778	91
600	279	4800	114
700	326	7622	137
800	373	11378	162
900	419	16200	187
1000	466	22223	212

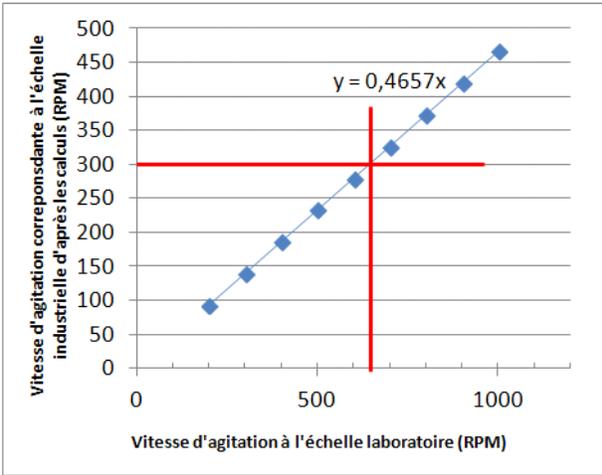
Légende couleurs
<270RPM
270<X≤300
>300RPM

Tableau 66. Limites du modèle suivant les spécifications du compresseur d'air (0.15 vvm maximum) et correspondances des débits d'air entre les échelles.

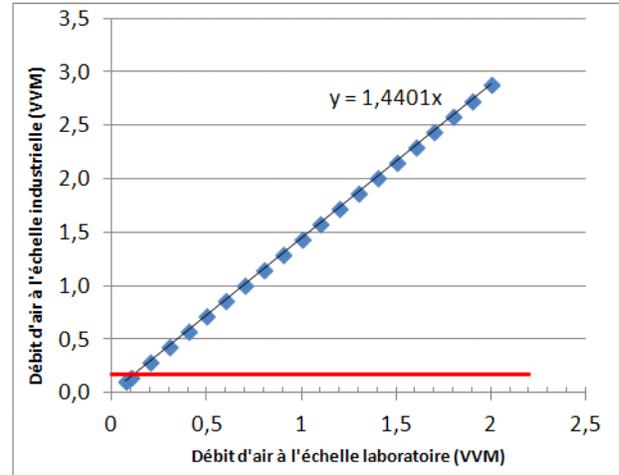
Débit d'air à K_{La} et vitesse d'agitation constants					
Echelle labo (L/min)	Echelle labo (VVM)	Echelle pilote (L/min)	Echelle pilote (VVM)	Vg (m/s)	K_{La} (hr^{-1})
0,15	0,075	65	0,11	0,0022	93
0,2	0,1	86	0,14	0,0029	101
0,4	0,2	173	0,29	0,0058	124
0,6	0,3	259	0,43	0,0088	139
0,8	0,4	346	0,58	0,0117	151
1	0,5	432	0,72	0,0146	161
1,2	0,6	518	0,86	0,0175	170
1,4	0,7	605	1,01	0,0205	178
1,6	0,8	691	1,15	0,0234	185
1,8	0,9	778	1,30	0,0263	192
2	1	864	1,44	0,0292	198
2,2	1,1	950	1,58	0,0322	203
2,4	1,2	1037	1,73	0,0351	209
2,6	1,3	1123	1,87	0,0380	213
2,8	1,4	1210	2,02	0,0409	218
3	1,5	1296	2,16	0,0438	223
3,2	1,6	1382	2,30	0,0468	227
3,4	1,7	1469	2,45	0,0497	231
3,6	1,8	1555	2,59	0,0526	235
3,8	1,9	1642	2,74	0,0555	238
4	2	1728	2,88	0,0585	242

Légende couleurs
<0.15 VVM
0.15<X<1
1<X<1.5
>1.5 VVM

On peut voir plus aisément sur la Figure 61 (a) et (b), les limites du procédé à grande échelle et ainsi la limite qu'il faudra s'imposer à l'échelle 2L pour éviter de travailler hors plage de restrictions. On constate donc que lorsque nous travailler à vitesse superficielle de gaz constante et si l'on souhaite travailler au maximum de la vitesse d'agitation à 300RPM, il faudra se limiter à une vitesse d'agitation d'environ 650 RPM à l'échelle 2L. La même conclusion pour la Figure 61 (b), pour un débit d'air à l'échelle industrielle limité à 0.15 vvm, il faudra se limiter à un débit de 0.1 vvm à l'échelle laboratoire. Ces données ne sont évidemment exploitables qu'avec les oreilles d'éléphant pompage vers le haut et inclinaison 45° accompagné du microsparger 40 μ m étant donné que les valeurs de prédiction du K_{La} sont essentiellement régies par les systèmes d'agitation et d'aération.



(a)



(b)

Figure 61. Représentation des limites d'utilisation du nouveau procédé pour un K_La et une vitesse superficielle de gaz (a) ou une vitesse en bout de pales (b) constants.

Productions scientifiques

CONFERENCES NATIONALES AVEC COMITE DE SELECTION ET ACTES (2) :

- Présentation orale : Développement et extrapolation d'un procédé de production de spore par culture d'un champignon filamenteux, 24 Colloque du Club Bioconversions en synthèse organique, 27-29 juin 2012, Evry
- Présentation orale pour l'école doctorale RP2E : Développement et extrapolation d'un procédé de production d'un ferment alimentaire.

RAPPORTS (4) :

- Rapport d'avancement 1^{ère} année pour l'école doctorale RP2E
- Rapports d'avancement pour l'ANRT (1^{ère}, 2^{ème}, 3^{ème} années)
- Rapport de réinscription en 4^{ème} année de doctorat
- PcK1 spore production in submerged liquid culture in 2L bench-scale fermenters (rapport confidentiel pour l'entreprise)

POSTER (1) :

- LIBio (AERES)

Revue internationale (5) :

- Chapitre d'un livre : Comparison of the Performance of the Laccase Bioconversion of Sodium Lignosulfonates in Batch, Continuous and Fed Batch Reactors. Environmental Biotechnology. InTech (Ed), 2012.
- Submerged liquid culture for production of biomass and spores of *Penicillium* (acceptée)
- Influence of impeller and aeration types on power draw in a lab-scale fermentation vessel (acceptée par DSM et en cours de soumission à un journal)
- Influence of impeller shape and diffuser porosity on oxygen transfer rate: K_{La} modeling and prediction (finalisée)
- Scale-up from lab-scale to pilot-scale comparing axial flow stirrer (elephant ears stirrer), Rushton turbines, centripetal turbine and different types of aeration (en cours de négociation avec l'entreprise pour publication)

Titre : Mise au point, optimisation et extrapolation de nouveaux procédés d'agitation et d'aération aux échelles 2L, 900L et 10m³ pour les souches *D. hansenii*, *S. carnosus* et *P. candidum*.

Résumé : Les objectifs de cette thèse sont, d'une part, de développer un système d'agitation performant en termes de transfert d'oxygène et de forces de cisaillement afin qu'il soit adapté aux cultures de levures, de bactéries et de champignons filamenteux. D'autre part, de mettre au point un procédé de production des spores de champignons en milieu liquide pour remplacer la culture sur milieu solide (boîte de roux) utilisée au démarrage de la thèse par la société DSM. Ces travaux ont permis de sélectionner le mobile type « oreilles d'éléphant » comme système d'agitation. Son efficacité de transfert d'oxygène a été caractérisée dans une large gamme de débits d'air et de vitesses d'agitation. Les données obtenues ont été modélisées pour développer un outil de prédiction du K_La et d'extrapolation de procédé d'agitation. L'approche utilisée pour l'extrapolation est basée sur la similitude non géométrique et le maintien du coefficient de transfert d'oxygène (K_La) constant entre les échelles. L'efficacité du nouveau mobile d'agitation a été validée à l'échelle pilote en présence des cultures de bactéries, de levures et de champignons. Parallèlement au choix du mobile d'agitation, un procédé de production de spores de champignons filamenteux en milieu liquide a été développé. Ainsi, le milieu de culture et les conditions opératoires de chaque étape de la fermentation (germination, croissance végétative et sporulation) ont été optimisés. Ce nouveau procédé permet d'obtenir jusqu'à $200 \cdot 10^6$ cellules par millilitre de culture aussi bien à l'échelle du laboratoire que pilote (900L). Il a été aussi validé en présence de cultures de levures et de bactéries. Sur le même principe, les données obtenues à l'échelle pilote ont permis de développer un outil d'extrapolation à l'échelle industrielle de 10 m^3 .

Mots clefs : Fermentation, levure, bactérie, champignon filamenteux, agitation, aération, modélisation, extrapolation.

Title: Development, optimization and scale-up of new stirring and aeration methods at 2L, 900L and 10m³ scales for *D. hansenii*, *S. carnosus* et *P. candidum*.

Abstract: The objectives of this thesis are, on one hand, to develop an efficient system of agitation in terms of oxygen transfer and shear stress, suited for the fermentation of yeasts, bacteria and filamentous fungi, on the other hand, to develop a process of spore production in a liquid medium. This new process will be used instead of the solid culture in Roux flasks used by DSM at the beginning of the PhD program. In a first step, we have selected “Elephant Ears” impellers as stirrers; its effectiveness of oxygen transfer was characterized in a broad range of stirring speeds and airflow rates. The data obtained were modeled and a predictive tool for K_La and process extrapolation was developed. The extrapolation is based on the non-geometrical similarity and the coefficient of oxygen transfer (K_La) was kept constant between scales. The effectiveness of the new stirrer was validated in a pilot-scale in the presence of the cultures of bacteria, yeasts and filamentous fungi. Besides the studies on the stirrer, a process in a liquid medium of filamentous fungi was developed. Thus, the fermentation medium and the operating conditions of each steps of the fermentation (germination, vegetative growth, and sporulation) were optimized. This new process makes possible to obtain up to $200 \cdot 10^6$ cells per milliliter of culture on both laboratory and pilot scale (900L). Finally, the data gathered on the pilot scale was used to extrapolate this process to the industrial-scale of 10 m^3 .

Key words: fermentation, yeast, bacteria, filamentous fungi, stirring, aeration, modeling, scale-up, scale-down.