

Bioréacteurs ou Réacteurs Enzymatiques

Construits en général sur les mêmes modèles que les réacteurs chimiques, ce sont des cuves ou enceintes en verre (pour les modèles de laboratoire) ou en acier inoxydable. Ils sont pourvus pour réaliser des réactions enzymatiques (réacteurs enzymatiques) ou des réactions à cellules (fermenteurs ou cytotculteurs). Les réacteurs biologiques sont aussi appelés bioréacteurs. Le bioréacteur permet de contrôler les conditions de culture (température, pH, aération, etc.), et de par ce fait, il permet de récolter des informations de plus grande fiabilité. Les bioréacteurs industriels permettent la fabrication de nombreux produits : bière, yaourts, vaccins, antibiotiques, anticorps, vitamines, acides organiques ...

Un fermenteur est construit en général sur le modèle d'un bioréacteur muni en plus d'un système d'aération. Cependant, le terme de fermenteur qui est parfois utilisé sans aucune distinction par rapport à celui de bioréacteur, permet de différencier le type de culture (bactérie, levure pour fermenteur et cellules animales pour bioréacteur).

Les bioréacteurs sont conçus tel qu'ils doivent assurer **4 grandes fonctions** :

- bons transferts de matière
- bon transfert de chaleur
- maintien de la stérilité
- suivi des paramètres et conduite de régulations

III.1-Réaction enzymatiques

La plupart des réactions biologiques sont catalysés par des substances particulières appelées « enzymes ». Ce sont des catalyseurs biologiques appartenant à la classe des protéines qui sont des polymères polypeptidiques. Ces macromolécules résultent de la polycondensation d'acide α -aminés du type : $\text{NH}_2\text{-CHR-COOH}$.

Dans les réactions enzymatiques le réactif s'appelle le substrat (S).

III.1.1. Mode de mise en œuvre

Lewis a généralisé la notion d'acide et de base par la définition suivante :

- Une substance pouvant accepter une paire d'électron (électrophile) est un acide
- Une substance pouvant céder une paire d'électron (nucléophile) est une base.

La présence de ces sites donneur-accepteur dans une substance permet la naissance de centre actif appelé sites actifs et qui sont à la base de beaucoup de réactions chimiques et biochimiques.

Chapitre III

La spécificité de la catalyse enzymatique est due à la nécessité, pour le substrat d'avoir une forme convenable pour venir occuper une place bien déterminée dans la protéine (site actif de la protéine), car l'enzyme engage le substrat dans un complexe avant de catalyser toute réaction. La molécule de substrat à transformer reconnaît le site actif et vient s'y fixer par des liaisons plus ou moins fortes.

Les sites actifs sont des groupements fonctionnels OH, N=C, etc.

III.1.2. Utilisation des enzymes

Les deux modes d'utilisation des enzymes sont soit sous forme d'enzyme soluble (le milieu est homogène) soit sous la forme insoluble et l'enzyme est immobilisée sur un support solide (le milieu réactionnel devient hétérogène). De là on peut étudier deux mécanismes cinétiques :

- La cinétique enzymatique homogène qui est régie par les lois de la catalyse homogène
- La cinétique enzymatique hétérogène qui est régie par les lois de la catalyse hétérogènes.

III.2. Réaction homogène et hétérogène

III.2.1. Cinétique enzymatique homogène

L'activité catalytique d'une enzyme dépend du pH (pH optimal). Cette activité augmente avec la température, selon la loi d'Arrhénius, mais au-dessus d'une température limite, la structure de la protéine est dénaturée et l'activité catalytique diminue. Une solution enzymatique possède un nombre fixe de sites catalytiques actifs auxquels le **substrat** peut se lier; aussi, à partir d'une certaine concentration en substrat, tous les sites sont occupés et la vitesse de réaction devient indépendante de la concentration en substrat.

La loi de vitesse de Michaelis et Menten est une des premières et des plus simples relations proposées pour modéliser la **cinétique des réactions enzymatiques** :

$$r = \frac{r_{\max}[S]}{K_m + [S]}$$

avec

- r ($\text{mole m}^{-3} \text{s}^{-1}$) vitesse de la réaction,
- r_{\max} ($\text{mole m}^{-3} \text{s}^{-1}$) vitesse maximale de la réaction,
- K_m (mol/m^3) constante de Michaelis et Menten,
- $[S]$ (mol/m^3) concentration en substrat.

Chapitre III

La vitesse maximale de la réaction r_{\max} est proportionnelle à la concentration enzymatique initiale de la solution (S_0). Cette forme de relation peut être expliquée par un mécanisme en deux étapes :

- La première étape est la formation rapide et équilibrée d'un complexe activé enzyme-substrat (ES^*)
- La seconde étape est la décomposition de ce complexe activé en produit (P) et enzyme régénéré (E).

La constante de Michaelis et Menten ; K_m mesure l'affinité de l'enzyme pour le substrat, qui est d'autant plus grande que la valeur de la constante est faible.

La relation de Michaelis et Menten ne peut pas traduire le comportement cinétique de toutes les réactions catalysées par des enzymes. Des relations plus complexes ont été développées pour rendre compte des **phénomènes d'inhibition** observés lorsque des molécules, autres que le substrat, peuvent se lier réversiblement sur les sites actifs des enzymes. Notons qu'il n'y sera pas question de cette partie dans ce cours.

III.2.2. Cinétique enzymatique hétérogène

Pour séparer facilement les enzymes des milieux liquides après réaction, on peut les fixer soit à la surface de particules non poreuses, soit à l'intérieur de particules poreuses. **On dit que les enzymes sont immobilisées.** L'immobilisation les rend plus stables grâce à la présence d'un microenvironnement favorable (température, pH...) et leurs liaisons avec le support. Les méthodes d'immobilisation enzymatique classiques sont décrites selon le mécanisme de fixation de l'enzyme au support. On distingue 3 principales méthodes d'immobilisation :

- L'immobilisation par adsorption
- L'immobilisation par liaison covalente
- L'immobilisation par inclusion

Les **lois de vitesse** sont de la même forme que celles non immobilisés, mais les vitesses r et r_{\max} s'expriment, lors d'une **fixation en surface**, en $\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ de surface de contact liquide-solide ou encore en $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ de masse de support. Si l'enzyme est **incluse dans des particules poreuses**, les vitesses r et r_{\max} s'expriment en $\text{mol}\cdot\text{m}^{-3}\cdot\text{s}^{-1}$ de phase solide ou en $\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ de support.

Toutefois, lorsque les particules sont de **forme sphérique ou cylindrique**, le passage d'une unité à l'autre s'effectue simplement à partir de la taille et de la masse volumique des particules solides.

Chapitre III

Les **concentrations en substrat** et **produit**, à prendre en compte dans les équations cinétiques, sont alors les concentrations à l'interface liquide-solide, dans le cas d'une immobilisation en surface, ou les concentrations dans la phase liquide qui imbibe les pores des particules solides, dans le cas d'une inclusion.

Dans les deux cas d'immobilisation, on doit tenir compte du phénomène de diffusion à l'interface liquide-solide ou gaz –solide.

La phase liquide ou gaz contient le substrat. La phase solide contient l'enzyme qui peut être sous forme de blocs, de membrane, de film ou de billes. Les différentes substances présente dans la phase liquide doivent être transportées (transférés) jusqu'à l'enzyme immobilisé. Ce transport de matière représente l'étape limitante de la cinétique : le transport n'est limitant que s'il franchie l'interface solide-liquide. C'est le phénomène de diffusion qui est décrit par la loi de Fick.

III.2.3. Diffusion de matière

Le flux de matière J est défini comme la quantité de matière (ou mole) qui traverse une section de surface (cm^2) pendant l'unité de temps (s).

La première loi de Fick dit que :

$$J = - D \text{ grad}[S]$$

D : coefficient de diffusion ou diffusivité moléculaire du soluté dans le solvant ($\text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$).

$\text{grad}[S]$: gradient de concentration à l'endroit ou est déterminé le flux.

$$\text{grad}[S] = \frac{d[S]}{dx} \quad x : \text{direction de la diffusion}$$

Milieu plus

$$\overleftarrow{\text{gradient de diffusion}}$$

Milieu moins

Concentré en soluté

$$\overrightarrow{\text{diffusion du solute}} \implies$$

Concentré en soluté

Si l'enzyme est fixé à l'intérieur du solide (membrane), la diffusivité du substrat à l'intérieur du support peut être différente de la diffusivité de la molécule en solution, du fait d'interactions avec le support, on appelle D_{eff} cette diffusivité effective :

$$J = - D_{\text{eff}} \frac{d[S]}{dx}$$

III.3. Réacteurs enzymatiques

Les réactions enzymatiques sont conduites généralement dans des réacteurs dont le choix du design et de la configuration est fait en considérant plusieurs paramètres tels que le type de la réaction mise en œuvre, la nature de la molécule d'intérêt, la quantité à produire, la forme de l'enzyme utilisée (libre ou immobilisée) et son coût. Ainsi, il existe des réacteurs industriels pour la catalyse homogène (enzymes libres) quand le coût du catalyseur est suffisamment faible pour permettre son utilisation unique et pour la catalyse hétérogène (enzymes immobilisées) qui permet la récupération et la réutilisation du catalyseur quand celui-ci est au contraire coûteux.

III.3.1. Fonctionnement discontinus

Dans les bioprocédés, les réactions sont généralement conduites dans des réacteurs fermés où le catalyseur (sous forme libre ou immobilisée) est mis en contact avec les substrats dans une cuve fermée agitée pendant un temps donné durant lequel le pH et la température sont contrôlés. La récupération des produits qui suit chaque cycle de biotransformation se fait, généralement, par filtration, par centrifugation ou par précipitation. Malgré sa simplicité, ce type de réacteur comporte plusieurs inconvénients inhérents aux réacteurs fermés tels que la variabilité de la qualité des produits, le coût de main d'œuvre lié à la fréquence des démarrages et des arrêts, l'utilisation de grands volumes, la perte des enzymes souvent actives en fin de cycle (pour les enzymes solubles) et la nécessité d'une étape supplémentaire de séparation des enzymes du milieu réactionnel.

III.3.2. Fonctionnement continu

Il existe, par ailleurs, plusieurs types de réacteurs enzymatiques qui fonctionnent en continu.

Parmi les différents réacteurs continus on distingue :

- Les réacteurs continus parfaitement agité
- Les réacteurs à lit fixe
- Les réacteurs à lit fluidisé
- Les réacteurs membranaires (REM)

Notons que les trois derniers types sont considérés comme étant des réacteurs en fonctionnement piston.

III.3.3. Réacteurs à limitation diffusionnelle

III.3.3.1. Transfert de matière liquide-solide dans le cas d'un film non poreux

C'est le cas d'une enzyme immobilisé à la surface d'un support. Il se produit un équilibre appelé couplage, entre la réaction biochimique et le transfert de matière liquide-solide entre la vitesse de la réaction enzymatique et la bioréaction. Ce couplage est observé lorsqu'un substrat réagit à la surface de particules solides sur lesquelles sont fixés une enzyme ou des micro-organismes. Le substrat se déplace du cœur de la phase liquide à l'interface liquide-solide où il est consommé par bioréaction. Un régime quasi -stationnaire est rapidement atteint, et la concentration en substrat à l'interface $[S_i]$ s'établit à une valeur telle que la vitesse de transfert de matière soit égale à la vitesse de la bioréaction. En choisissant ici, pour illustrer ce couplage, une réaction enzymatique obéissant à la loi cinétique simple de Michaelis et Menten, l'égalité des vitesses permet alors d'écrire :

$$k_l a' ([S] - [S_i]) = \frac{r_{\max} [S_i]}{K_m + [S_i]}$$

avec k_l (m/s) coefficient de transfert de matière liquide-solide,

a' (m²/kg) aire spécifique massique du solide (enzyme),

r_{\max} (mol.s⁻¹. kg⁻¹) vitesse spécifique maximale de bioréaction par unité de masse de support solide,

$[S]$ (mol/m³) concentration en substrat au cœur du liquide,

$[S_i]$ (mol/m³) concentration en substrat à l'interface liquide-solide,

K_m (mol/m³) constante de Michaelis et Menten

Après quelques transformations, la relation ci-dessus peut être mise sous forme adimensionnelle suivante :

$$\left(\frac{K_m + [S_i]}{[S]} \right) \left(1 - \frac{[S_i]}{[S]} \right) = Da \frac{[S_i]}{[S]}$$

avec $Da = \frac{r_{\max}}{k_l a' [S]}$ appelé : nombre de **Damkohler**

Le **nombre de Damkohler** représente le rapport entre la vitesse maximale de réaction et la vitesse maximale de transfert de matière. Transfert de matière et réaction étant en série, si leurs vitesses sont très différentes c'est le phénomène le plus lent qui sera l'étape limitante du processus.

Chapitre III

- Un nombre de Damkohler **très grand devant 1** ($Da \gg \gg 1$) correspond à une vitesse de réaction élevée devant la vitesse de transfert, ce dernier phénomène est donc limitant. La relation précédente montre alors que $[S_i]$ est très petit devant $[S]$ et la vitesse du processus est donc égale à $k_i a' S$
- Un nombre de Damkohler **très petit devant 1** ($Da \ll \ll 1$) ; c'est la réaction biochimique qui est le phénomène limitant, $[S_i]$ est très voisin de $[S]$ et la vitesse du processus est donc égale à $\frac{r_{\max}[S]}{K_m + [S]}$

Quand le nombre de Damkohler n'est **ni très grand, ni très petit devant 1**, la relation ci-dessus, du second degré par rapport à $[S_i]$ permet le calcul de $\frac{[S_i]}{[S]}$

$$\frac{[S_i]}{[S]} = \frac{1}{2} \left(Da + \frac{K_m}{[S]} - 1 \right) \pm \sqrt{1 + \frac{4 \frac{K_m}{[S]}}{\left(Da + \frac{K_m}{[S]} - 1 \right)^2} - 1}$$

Le signe à choisir devant la racine carrée est de manière à ce que le rapport soit positif. La concentration à l'interface en substrat $[S_i]$ permet alors le calcul du **facteur d'efficacité** η_e , défini classiquement comme le rapport entre la vitesse observée du processus en présence de la limitation différentielle et la vitesse maximale de réaction en absence de la limitation différentielle.

Ce facteur vaut ici :

$$\eta_e = \frac{\left(\frac{[S_i]}{[S]} \right) \left(1 + \frac{K_m}{[S]} \right)}{\left(\frac{[S_i]}{[S]} \right) + \left(\frac{K_m}{[S]} \right)}$$

On a bien sûr toujours intérêt à travailler avec un facteur d'efficacité proche de 1, en choisissant des conditions hydrodynamiques pour lesquelles la vitesse de transfert de matière est grande devant la vitesse de bioréaction (nombre de Damkohler très inférieur à 1).

III.3.3.2. Transfert de matière liquide-solide dans le cas d'un support solide poreux

Ce cas est observé lorsque des enzymes ou des micro-organismes sont inclus à l'intérieur de particules poreuses ou de gel ; on le rencontre aussi lors du développement de films microbiens (biofilm). Les phénomènes de transfert de matière intra particulaire et de consommation de substrat par réaction sont ici simultanés et non successifs comme

Chapitre III

précédemment. Il en résulte, à l'intérieur de la particule, un gradient de concentration en substrat et donc de vitesse de consommation de celui-ci.

En régime quasi-stationnaire, un bilan de matière différentiel sur le substrat conduit aux équations différentielles suivantes :

- en configuration sphérique (de rayon z)

$$D_{\text{eff}} \left(\frac{d^2[S]}{dz^2} + \frac{2}{z} \frac{d[S]}{dz} \right) = r$$

- en configuration film plan :

$$D_{\text{eff}} \left(\frac{d^2[S]}{dx^2} \right) = r$$

avec les conditions aux limites suivantes :

- $[S] = [Si]$ pour $x = L$ ou $z = R$; continuité de la concentration en substrat à l'interface liquide-solide ;
- $\frac{d[S]}{dz} = 0$ ou $\frac{d[S]}{dx} = 0$ pour $z = 0$ ou $x = 0$; arrêt de la diffusion au centre de la particule ou à l'extrémité du film.

Dans ces relations, L (m) représente l'épaisseur du film, R (m) le rayon de la particule, z et x les coordonnées courantes, $[S]$ (kg/m^3) la concentration en substrat dans la phase liquide qui imbibe le milieu solide poreux, $[Si]$ (kg/m^3) la concentration en substrat dans la phase liquide à la surface de la particule, r ($\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{m}^3$) la vitesse spécifique de bioréaction par unité de volume de support solide et D_{eff} (m^2/s) le coefficient de diffusion effectif du substrat dans le milieu poreux. Ce coefficient D_{eff} dépend de la diffusivité du substrat ainsi que de la tortuosité et de la porosité du solide.

A partir de la connaissance de la loi de vitesse : $r = r_m([S])$, la résolution des équations ci-dessus conduit au facteur d'efficacité η_e , défini comme le rapport entre la vitesse observée et la vitesse $r_m([Si])$ qu'aurait la réaction biochimique en l'absence de gradient de concentration intra particulaire en substrat.

Dans le cas d'une bioréaction obéissant à la loi cinétique de Michaelis et Menten : Le **facteur d'efficacité** η_e est alors fonction du rapport $K_m/[Si]$ et d'un **module de Thiele** Θ défini :

— en configuration sphérique, par : $\Theta = \frac{R}{3} \sqrt{\frac{r_m}{D_{\text{eff}} K_m}}$

— en configuration plane, par : $\Theta = L \sqrt{\frac{r_m}{D_{\text{eff}} K_m}}$

Chapitre III

Les paramètres intrinsèques r_m et K_m de la bioréaction sont difficiles à déduire d'expériences de laboratoire, car les phénomènes de diffusion et de réaction ne peuvent jamais être découplés; un traitement numérique est nécessaire pour les extraire des variations de la vitesse observée en fonction de la concentration en substrat $[S]$.

III. 4. Dimensionnement des bioréacteurs

Lors de la mise en œuvre d'une bioréaction, la première étape consiste à dimensionner les différents éléments constitutifs du bioréacteur en vue d'optimiser le procédé. Dans le génie chimique et biochimique, l'opération de mélange est le paramètre critique du procédé responsable des phénomènes de transferts intervenant au sein du réacteur.

III.4.1. Agitation mécanique et force de cisaillement

Les **mobiles d'agitation**, dont le seul rôle est de mélanger la phase liquide, peuvent être classés en deux catégories: les mobiles cisailants et les mobiles non cisailants.

Pour l'agitation mécanique des cuves standards, il existe **deux types de mobiles d'agitation avec des propriétés différentes** :

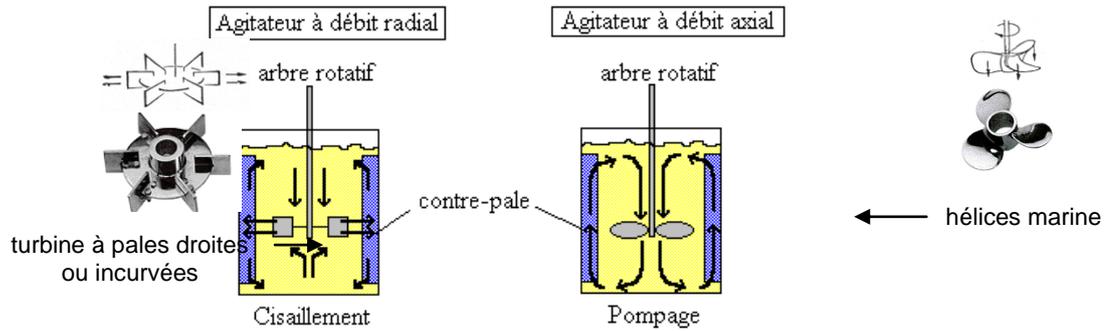
III.4.2. Mobile rotatif à débit radial (cisailant)

Le *mouvement* généré par cette turbine est radial, puis axial lorsque le liquide rencontre la paroi de la cuve, le cisaillement créé par la turbine accroît la turbulence et donc le mélange du liquide. Ce type d'agitation est traumatisant pour les cellules, il les projette contre les parois de la cuve ce qui entraîne un fort cisaillement et une bonne efficacité de transfert de l'oxygène, ce type de mobile convient bien aux bactéries et aux levures. ex : turbine à pales droites ou incurvées (six pales plates ou **turbine Rushton**).

III.4.3. Mobile rotatif à débit axial (non cisailant)

L'agitation génère un mouvement axial du liquide qui est moins traumatisant et peu de force de cisaillement. Grâce à une action de pompage, les cellules et le fluide sont poussés délicatement au fond de la cuve dans une sorte de tourbillon (comme pour l'hélice de bateau) puis ils remontent le long des parois. Les collisions et les zones stagnantes sont alors minimisées. Par contre, l'efficacité de transfert de l'oxygène n'est pas bonne. Ce type de mobile convient pour les cellules fragiles. ex : hélice type marine

Chapitre III



Pour les bioréacteurs fonctionnant nécessitant une aération, la circulation d'air joue les deux rôles (aération et agitation). On l'appelle l'agitation pneumatique ou **air-lift**. Elle est moins "traumatisante" pour les suspensions cellulaires très fragiles et elle est adaptée pour les processus aérobies. Le gaz d'oxygénation à lui seul crée la turbulence et permet le maintien des cellules en suspension homogène tout en assurant des transferts de matière corrects. La géométrie du bioréacteur est conçue avec soin de façon à ce que le transfert d'oxygène soit le plus efficace possible (la géométrie du fond de la cuve est de forme conique).

Par ailleurs, le volume de milieu ne constitue qu'une partie du volume total de la cuve. On garde environ $1/5^{\text{ème}}$ à $1/4$ du volume total libre pour tenir compte de l'augmentation du volume due à l'injection d'air, à l'agitation et à la formation de mousse en cours de fermentation.

III.4.4. Temps de mélange

Le temps de mélange t_M est le temps pour rendre la phase liquide homogène en concentration à la suite d'une perturbation.

En régime turbulent t_M est donné par les relations :

- Pour une hélice marine

$$t_M = \frac{6 \left(\frac{d_c}{d_a} \right)^2}{N}$$

- Pour une turbine

$$t_M = \frac{4 \left(\frac{d_c}{d_a} \right)^2}{N}$$

Chapitre III

On admet qu'un réacteur est parfaitement mélangé si le temps de mélange est supérieur au temps de demi-réaction.

En configuration standard, le temps t_M est atteint dès 55 tr/mn avec une hélice et dès 35 tr/mn pour une turbine.

III.5. Hydrodynamique des réacteurs

III.5.1. Nombres caractéristiques adimensionnels

Chacune de ces valeurs pouvant être exprimée à partir des trois unités fondamentales (masse, longueur, temps), le théorème de Vaschy-Buckingham permet de transformer l'expression de la puissance, dans une première approche, en 3 nombres adimensionnels liés les uns aux autres :

III.5.1.1. Le nombre de Reynolds (**Re**)

Il caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de viscosité. **Re** permet de prédire le type d'écoulement laminaire ou turbulent ; En régime laminaire (**Re** < 10) ; En régime turbulent (**Re** > 10⁴)

$$\mathbf{Re} = \frac{d_a^2 N \rho_l}{\mu}$$

avec d_a (m) diamètre de l'agitateur,

N (tr/s) vitesse de rotation,

ρ (kg/m³) masse volumique du liquide,

μ (Pa.s) viscosité du liquide.

En régime laminaire, le produit $N_p \cdot \mathbf{Re}$ est constant ; en régime turbulent, c'est le nombre de puissance qui est constant : $N_p = 6$ pour la turbine et 0,4 pour l'hélice marine. L'hélice marine consomme donc moins de puissance que la turbine.

III.5.1.2. Le nombre de Froude (**Fr**)

Il caractérise le rapport entre les forces d'inertie et les forces de gravité. **Fr** permet de prédire la formation d'un vortex

-si $\mathbf{Fr} \leq 1$ (pas de vortex),

-si $\mathbf{Fr} \geq 3$ (vortex),

$$F_r = \frac{N^2 d_a}{g}$$

Chapitre III

Avec

g : accélération de la pesanteur. $g = 9,81 \text{ m/s}^2$

Pour éviter la formation du vortex, les cuves sont équipées de contre-pales appelées : chicanes

III.5.1.3. Le nombre de Puissance (N_p)

Il caractérise le coefficient de trainée de l'agitateur dans le fluide et représente ainsi l'expression de la puissance consommée

$$N_p = \frac{P}{\rho N^3 d^5}$$

P (Watt): puissance mécanique consommée par le moteur de l'agitation

III.5.1.4. Le nombre de Weber (We)

il caractérise l'action des forces de tension superficielle.

$$We = \frac{\rho N^2 d_a^3}{\gamma}$$

Avec : γ : la tension superficielle (en kg.s^{-2} ou N.m^{-1})

III.5.1.5. Relation entre les nombres

Ces quatre nombres sont reliés par l'équation suivante :

$$N_p = K (Re)^x (Fr)^y (We)^z$$

Avec K , x , y et z : paramètres reliés à la géométrie des agitateurs, ces paramètres sont obtenus par expérimentation.

Les caractéristiques de puissance N_p en fonction du type d'agitateur et en fonction du nombre de Reynolds sont données par la courbe caractéristique du mobile d'agitation.

Chapitre III



Nombre de puissance de différents mobiles d'agitation en fonction du nombre de Reynolds

En régime laminaire, le produit $N_p \cdot Re$ est constant ; en régime turbulent, c'est le nombre de puissance qui est constant : $N_p = 6$ pour la turbine et $0,4$ pour l'hélice marine. L'hélice marine consomme donc moins de puissance que la turbine.

III.6. Cuve mécaniquement agitée standard

Cuve :

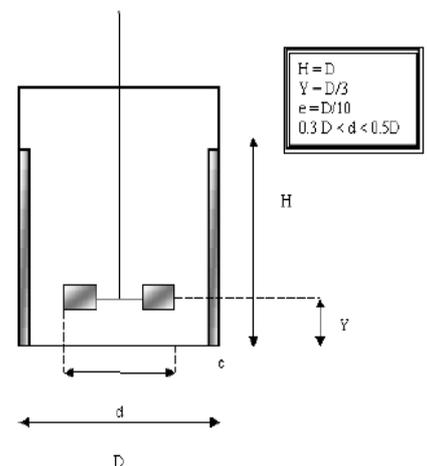
- Cuve cylindrique à fond plat.
- Hauteur de liquide (H) égale au diamètre de la cuve (D).
- Le rapport H/D peut être égal à 2 ou à 3 dans le cas de bioréacteurs aérés ou munis de plusieurs mobiles d'agitation.

Contre-pales :

- Nombre de contre-pales (n_p) = 4.
- Largeur des contre-pales (b) = D/12 ou D/10.
- Hauteur des contre-pales (h_b) = H.
- Écartement par rapport à la paroi de la cuve (e_b) = 0 ou 0,2D.

Mobiles d'agitation :

- Diamètre du mobile (d) = D/3.
- Distance par rapport au fond de la cuve (Y) = D/3.
- Le nombre de pales (n_p) et le rapport diamètre du mobile (d) sur largeur de la pale (l) sur hauteur de la pale (w) est fonction du type de mobile utilisé (pour une TD6 : $n_p = 6$ et $d/l/w = 20/5/4$)



Bioréacteur standard (cuve mécaniquement agitée)

Dans la pratique industrielle, les bioréacteurs sont construits sous de nombreuses formes de cuves et de mobiles d'agitation. La configuration appelée **cuve** standard assure une

Chapitre III

bonne homogénéité de la phase liquide. Le rôle des contres pales appelés chicanes est d'éviter la formation d'un vortex autour de l'axe du mobile d'agitation.

III.7. Réacteurs à lit fixe

Un autre moyen d'augmenter la concentration bactérienne ou d'améliorer l'activité de l'enzyme consiste à les fixer sur des supports. Le support d'immobilisation sont des particules ou billes sur lesquelles sont immobilisés des cellules ou des enzymes. Il est compacté dans une colonne au travers de laquelle le milieu peut être injecté. Les deux extrémités du réacteur sont fermées par des grilles ou des plaques perforées et permettant la percolation d'une phase liquide, mais empêchant tout mouvement de la phase solide dispersée. L'alimentation peut se faire de bas en haut ou de haut en bas selon le type de construction.

Le réacteur à lit fixe permet à la fois d'avoir une importante productivité et un produit final exempt d'enzymes étant donné que celles-ci sont confinées dans le réacteur, évitant ainsi une étape finale de séparation du biocatalyseur et du produit.

Le réacteur à lit fixe constitue la configuration classique utilisée dans la conduite de réactions catalytiques hétérogènes à grande échelle. Il est cependant important de noter que ce réacteur conduit à une forte perte de charge ainsi qu'au risque de colmatage du lit et d'importantes limitations diffusionnelles ce qui réduit ses performances

Si les particules sont de forme sphérique, la fraction de réacteur occupée par la phase solide est de l'ordre de **0,6** et celle occupée par la phase liquide est de **0,4**

La **perte de charge** subie par le liquide à la traversée d'un lit de particules sphériques peut être estimée par la relation d'Ergun :

$$\frac{\Delta P}{H} = \frac{150 \mu_l U_l}{d_p^2} \frac{(1 - \varepsilon_l)^2}{\varepsilon_l^3} + \frac{1,75 \rho_l U_l^2}{d_p} \frac{(1 - \varepsilon_l)}{\varepsilon_l^3}$$

ΔP : perte de charge (Pa)

H : hauteur du lit (m)

d_p : diamètre des particules (m)

U_l : vitesse superficielle du liquide (m/s)

ε_l : fraction de lit occupée par la phase liquide égale à 0,4 max

μ_l : viscosité du liquide (Pa.s)

III.8. Réacteur à lit fluidisé

Les particules support avec leurs cellules fixées (ou enzymes) sont en mouvement, fluidisées par un flux d'écoulement.

Chapitre III

Il est constitué d'un tube de section circulaire rempli de particules solides actives, mais forcément placé verticalement et dont seule une extrémité est fermée par une grille ou une plaque perforée. L'activité est assurée par des bactéries ou des enzymes qui sont fixées sur un support mobile, particules granulaires fines et poreuses comme le sable ou le charbon actif. La phase liquide traverse le réacteur de bas en haut et comme les particules solides ne sont pas confinées, dès que la vitesse superficielle du liquide dépasse la valeur appelée vitesse minimale de fluidisation, le lit s'expand et les particules solides se déplacent librement à l'intérieur de la suspension liquide-solide. On dit alors que le lit est fluidisé; les particules solides sont animées d'un mouvement du flux ascendant rapide et régulier de l'effluent qui assure leur mélange.

Ce système minimise les phénomènes de colmatage des colonnes et d'emprisonnement des gaz produits. Il assure un meilleur transfert de matière et de chaleur.

Chapitre III

Série de TD N°3

Exercice 1

Dans un bioréacteur, on hydrolyse le sucrose à la température ambiante par catalyse enzymatique selon la réaction suivante



Avec un débit volumique constant Q de 25 litre/ mn et une concentration initiale C_{A0} en sucrose de 10 M, on obtient un taux de conversion X_A de 90 % de sucrose.

La vitesse r d'hydrolyse du sucrose est décrite par la loi de Michaelis-Menten de la forme :

$$r_A = \frac{k_1 C_A}{1 + K_M C_A} \frac{(\text{mol})}{(\text{litre})(\text{min})} \quad \text{avec } C_A \text{ concentration de sucrose}$$

ou $k_1 = 0,2 \text{ min}^{-1}$ et $K_M = 1,0 \text{ (mol/litre)}^{-1}$,

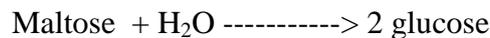
1- Ecrire le bilan matière du sucrose qui se décompose selon la réaction; sans variation de volume dans chacun des réacteurs suivant:

- Réacteur fermé uniforme
- Réacteur ouvert parfaitement mélangé en régime permanent
- Réacteur en écoulement piston en régime permanent

Calculer le temps de séjour ou de passage pour chacun des trois réacteurs. Conclure.

Exercice 2

La glucoamylase hydrolyse le maltose en glucose selon la réaction



On souhaite réaliser un réacteur enzymatique continu, impliquant la glucoamylase, enzyme (Enzyme michaelienne) ayant les paramètres cinétiques, déterminés à 40 °C, suivants: $r_{\max} = 0,02 \text{ mole de maltose (mn)}^{-1} \text{ (litre)}^{-1}$ et $K_M = 35 \text{ mmole /litre}$. On veut traiter en continu la solution de maltose à 1 mole/litre avec un débit de 1 litre/mn en ayant 95 % de conversion de maltose. Pour chaque cas, ci-dessous, faire un bilan massique (débit, volume du réacteur constants et régime permanent) et calculer le volume du réacteur à mettre en œuvre pour obtenir la conversion souhaitée.

1. dans le cas d'un réacteur parfaitement agité
2. dans le cas d'un réacteur piston.

Chapitre III

Exercice 3

On met en œuvre dans un réacteur enzymatique semi-continu l'hydrolyse d'une solution de saccharose par l'invertase. Déterminer le temps écoulé quand le volume du réacteur devient 10 fois égal au volume initial.

On donne :

- L'enzyme est michaelienne
- Concentration d'alimentation du substrat $S_0 = 50 \text{ g/l}$
- Concentration du substrat dans le réacteur $S_c = 10 \text{ g/l}$
- Volume initial du réacteur $V_0 = 1 \text{ litre}$
- Débit d'alimentation $Q = 5 \text{ l/h}$
- $K_M = 0,5 \text{ g/l}$
- Vitesse spécifique maximale de l'hydrolyse $r_{\max} = 2,5 \text{ g/h/mg d'enzyme}$
- Concentration d'enzyme $E = 2 \text{ mg/l}$

Exercice 4

Une solution de lactose est convertie par une β -galactosidase en glucose et galactose dans un réacteur agité continu

- Combien faut-il attendre pour atteindre le régime stationnaire ?
- Ecrire les équations des bilans matières du lactose et du glucose en régime dynamique.
- Comment varient les concentrations des différents composants du milieu à l'état stationnaire?
- Déterminer la relation entre la vitesse d'hydrolyse du lactose et la vitesse de production du glucose après la stabilisation du système.

Exercice 5

L'Acide 6-Aminopénicillanique (6-APA) sert de point de départ à la fabrication de nombreuses pénicillines synthétiques plus actives que la pénicilline naturelle. Il peut être synthétisé par action de la pénicilline amidase sur la benzylpenicilline. Un réacteur agité discontinu est utilisé pour la synthèse enzymatique de la 6-APA à partir de la benzylpenicilline.

- Ecrire les équations des bilans matières du substrat et du produit.
- On suppose que l'enzyme est Michaelienne et le volume du réacteur constant, déterminer la concentration du substrat en fonction du temps.
- Quel serait le temps nécessaire pour convertir 20 % de benzylpenicilline en 6-APA?

On donne : $r_{\max} = 2 \text{ g/l/h}$, $S_0 = 200 \text{ g/l}$, $K_M = 10 \text{ g/l}$

Chapitre III

Exercice 6

La glucoamylase hydrolyse le maltose en glucose selon l'équation :



Les paramètres de la glucoamylase, déterminés à 40 °C sont $r_{\max} = 10 \mu\text{mol de maltose.mn}^{-1} (\text{mg d'enzyme})^{-1}$ et $K_M = 35 \text{ mmol/l}$. L'hydrolyse enzymatique (Enzyme michaelienne) à 40 °C du maltose est mise en œuvre dans un réacteur discontinu de 1000 litres. La concentration initiale du maltose S_0 est de 1 mol/l et la concentration en enzyme E est de 1 g/l.

Quel est le temps nécessaire pour que le maltose soit hydrolysé à 99 %.

Problème 1

Une laiterie reçoit du lactosérum. Ce fluide contient du lactose et une quantité importante de protéines solubles. Il est prévu d'en faire un concentrat de protéines par ultrafiltration, puis de valoriser le perméat dans un bioréacteur en hydrolysant le lactose dans ce dernier en glucose et galactose. On suppose le volume du bioréacteur constant.

Il a été décidé d'effectuer l'ultrafiltration et l'hydrolyse enzymatique du lactosérum en continu (Réacteur Continu Parfaitement Mélangé CSTR). L'hydrolyse reçoit 46 894 litres par jour de lactose et on suppose que ce débit est constant. La concentration de lactose à l'entrée du réacteur est de 148,7 mM. A la fin de l'hydrolyse, 80 % de lactose sont transformés. Calculer le volume réactionnel à installer et la quantité d'enzyme (β -galactosidase) à mettre en œuvre si l'équation de la cinétique de l'hydrolyse enzymatique est de la forme

$$r_{Lac} = \frac{k_2 \cdot C_{Enz} \cdot C_{Lac}}{K_m \left(1 + \frac{C_{OLac} - C_{Lac}}{K_1} \right) + C_{Lac}}$$

Nous allons admettre que le travail se fasse avec deux équipes à raison de 8 h/jour chacune. La durée de fonctionnement des installations est limitée à 10 h/j, le reste du temps étant consacré au nettoyage et à la maintenance.

Les paramètres ont les valeurs suivantes :

Paramètre	Valeur	Unité
K_1	3	mM
K_2	12,2	$\text{mmole.g}^{-1}.\text{min}^{-1}$
K_m	53,9	mM
C_{Enz}	8	g.l^{-1}
Débit volumique Q	10^4	l.jour^{-1}

C_{enz} est la concentration d'enzymes immobilisés avec laquelle nous allons travailler.

Chapitre III

Les enzymes risquent d'être contaminés par des microorganismes, qui les dégradent. Il est proposé de combattre les infections en introduisant de temps en temps une charge d'un certain désinfectant dans le réacteur CSTR en fonction. L'hydrolysate contaminé par le désinfectant ne pourra pas être vendu, mais ce dernier sera évacué du réacteur par l'effluent après un certain temps.

En admettant que l'on introduise une quantité de désinfectant suffisante pour porter sa concentration initialement à 5 g/l, calculer le temps qu'il faut pour que la concentration de désinfectant soit tombée à 0,5 ppm. Calculer ensuite le volume de hydrolysate qui sera contaminé avec plus de 0,5 ppm de désinfectant. Utiliser les résultats de la partie précédente

Le propriétaire de la laiterie veut renoncer au procédé en continu, et vous demande de recalculer le volume réactionnel et la quantité d'enzymes dont il aurait besoin si l'hydrolyse se faisait en "batch". Après chaque cycle de production, on vidange le réacteur, on le rince et on le remplit à nouveau de perméat et de biocatalyseur. Ces opérations - d'entretiens - durent 30 minutes environ.

a) Formulez un bilan de masse sur le lactose qui vous permettra de calculer le temps de réaction nécessaire pour une charge.

b) En comparant le temps pour un cycle complet avec le temps de fonctionnement de 10 h/j, et en admettant que l'on utilise toujours 8 g/l d'enzymes, calculer le volume réactionnel et la masse d'enzymes nécessaire pour traiter le lactosérum.

Problème 2

Pour calculer le temps nécessaire (temps de séjour) pour transformer 100 moles de glucose en éthanol dans un bioréacteur, on peut supposer pour simplifier que le bioréacteur est un réacteur batch (réacteur fermé) de volume constant égal à 0,01 m³. Cette hypothèse simplificatrice permet d'estimer le temps t nécessaire pour atteindre un taux de conversion final X_f de 0,3. Selon cette hypothèse, le temps t (temps de séjour) est donné par :

$$t = N_{A0} \int_0^{X_f} \frac{dX}{V \cdot r}$$

N_{A0}: est le nombre de mole de glucose au début de la fermentation, V le volume du bioréacteur, X le taux de conversion, X_f le taux final de conversion de la réaction et r la vitesse de réaction de la fermentation.

1- Ecrire l'équation de bilan de matière du réactif A (glucose) de concentration initiale C_{A0} qui se décompose selon la réaction; sans variation de volume dans le réacteur fermé uniforme.

Retrouver l'expression du temps de séjour t donnée ci-dessus.

Chapitre III

2a- Calculer le temps t en minute si la vitesse de réaction r est du premier ordre et est de la forme:

$$r = k C_{A0} (1-X)$$

Où ; $k = 1 \text{ h}^{-1}$ la constante de réaction et $C_{A0} = 10^4 \text{ mole/m}^3$ la concentration initiale.

2b- Calculer le temps t en minute si la réaction est de type enzymatique et est de la forme

$$r = \frac{k C_A}{1 + K_2 C_A}$$

avec $C_A = C_{A0} (1-X)$

On donne : $k = 1 \text{ h}^{-1}$, $C_{A0} = 10^4 \text{ mole/m}^3$, et $K_2 = 10^{-5} \text{ m}^3/\text{mole}$

Problème 3

La glucose isomérase, immobilisée sur support solide, est utilisée industriellement pour produire des sirops de glucose enrichis en fructose. La réaction d'isomérisation du glucose en fructose est équilibrée, et la constante d'équilibre, qui varie peu avec la température, est voisine de 1.

On se propose de concevoir une unité permettant d'isomériser 45 % du glucose d'un sirop de glucose de concentration $2\,800 \text{ mol/m}^3$. La production souhaitée est de $20 \text{ m}^3/\text{h}$.

Cette réaction d'isomérisation par enzyme immobilisée a été étudiée par Illanes et coll. La vitesse de la réaction augmente avec la température, mais la stabilité de l'enzyme diminue avec ce paramètre. La température optimale est voisine de $60 \text{ }^\circ\text{C}$, c'est cette valeur que nous choisirons. Pour cette température, la constante d'équilibre vaut 1.

D'autre part, la cinétique de cette réaction équilibrée suit la loi de Michaelis et Menten

$$r = \frac{r_m [S]}{K_m + [S]} ;$$

Sous réserve de prendre comme concentration en substrat $[S]$ la différence : $[S] = [G] - [Ge]$

où $[G]$ représente la concentration en glucose de la solution et $[Ge] = 1400 \text{ mol/m}^3$, la concentration en glucose à l'équilibre, calculer la concentration en glucose à la sortie du réacteur, déduire la concentration du substrat à la sortie du réacteur.

A $60 \text{ }^\circ\text{C}$, les paramètres intrinsèques de la loi cinétique sont :

- $r_m = 17,52 \cdot 10^{-3} \text{ mol.s}^{-1} \text{ kg}^{-1}$ (kg de biocatalyseur)
- $K_m = 7\,815 \text{ mol/m}^3$.

Chapitre III

Ces deux valeurs ont été obtenues dans des conditions expérimentales telles que la vitesse de la bioréaction était l'étape limitante de l'isomérisation. Par ailleurs, les particules de forme sphériques de biocatalyseur ont une masse volumique $\rho_s = 1\,800\text{ kg/m}^3$.

Le bioréacteur qui s'impose naturellement est un réacteur à lit fixe. Dans une première étape, un dimensionnement approché peut être effectué avec les hypothèses simplificatrices suivantes : la phase liquide est en écoulement piston dans le réacteur, les résistances dues aux transferts de matière sont négligeables. Dans ces conditions, soit H la hauteur du réacteur, M la masse de biocatalyseur qu'il renferme, $[So]$ la concentration en substrat à l'entrée du réacteur, Q le débit volumique de substrat et z la cote courante dans le réacteur.

Calculer la masse du biocatalyseur requise pour cette conversion et quel volume occupe telle dans le bioréacteur. Déduire le volume total du réacteur.

Les auteurs cités préconisent un rapport H/dc de 3,5 . Calculer pour ce cas le diamètre dc de la cuve puis sa hauteur H . Quelle est dans ces conditions, la vitesse superficielle de la solution ?

La prise en compte du transfert de matière liquide-solide passe par le calcul du nombre de Damkohler Da , du rapport $Km/[S]$ et du facteur d'efficacité ε_e . mais dans un réacteur à lit fixe, la concentration en substrat varie et donc les paramètres cités plus hauts varient aussi

Sa masse volumique de la solution de glucose est de 1320 kg/m^3 la viscosité de la solution est $1.9 \cdot 10^{-3}\text{ Pa/s}$, le coefficient de diffusivité $D = 0.52 \cdot 10^{-9}\text{ m}^2/\text{s}$, calculer le coefficient de transfert de matière liquide-solide K_l et la surface spécifique d'échange a

Pour cela on applique les relations suivantes :

$$\varepsilon_l \left(\frac{K_l}{U_l} \right) \left(\frac{\mu_l}{\rho_l D} \right)^{2/3} = 0.765 \left(\frac{d_p U_l \rho}{\mu_l} \right)^{-0.82} + 0.365 \left(\frac{d_p U_l \rho_l}{\mu_l} \right)^{-0.38}$$

$$a = \frac{6}{d_p \rho_l}$$

on donne pour un lit fixe $\varepsilon_l = 0.4$

Déduire les valeurs de Da , du rapport $Km/[S]$ et du facteur d'efficacité η_e à l'entrée et à la sortie du réacteur. Conclure.

Le facteur d'efficacité lié à la diffusion intra particulaire se calcule en configuration sphérique à partir du module de Thiele et du rapport $Km/[S]$. si la diffusivité effective du glucose est égale à $1.5 \cdot 10^{-10}\text{ m}^2/\text{s}$, calculer le module de Thiele Φ . Si on suppose que les concentrations à l'interface solide-liquide et au cœur du liquide identiques calculer le rapport $Km/[S]$ et le facteur d'efficacité à l'entrée et à la sortie du bioréacteur. Conclure

Chapitre III

Pour garder au réacteur les performances souhaitées, que suggérez- vous