



Cours GCH8650  
**GÉNIE BIOCHIMIQUE**

---

**Mixing, transfert de matière et  
cisaillement**

---

Mario Jolicoeur, ing., Ph.D.  
Professeur titulaire

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

- **Mixing**
  - Homogénéité des conditions environnementales
  - En deçà du seuil de cisaillement critique des cellules
- **Transfert de matière**
  - Répondre à la demande en oxygène des cellules
  - Retirer le CO<sub>2</sub> produit
- **Cisaillement**
  - Par l'agitateur
  - Par les bulles

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

- **Mixing**

- Homogénéité des conditions environnementales

- $t_m$  (temps de mélange)  $\leq 0,2 \times t_{\text{caractéristique}}$

- **Estimer** (turbines Rushton et chicanes) (Doran, 1997)

- $t_m = 4t_c$  (temps de circulation)

$$N_i t_m = \frac{1.54V}{D_i^3} \quad \text{à hauts Re}$$

- En deçà du **seuil de cisaillement critique**

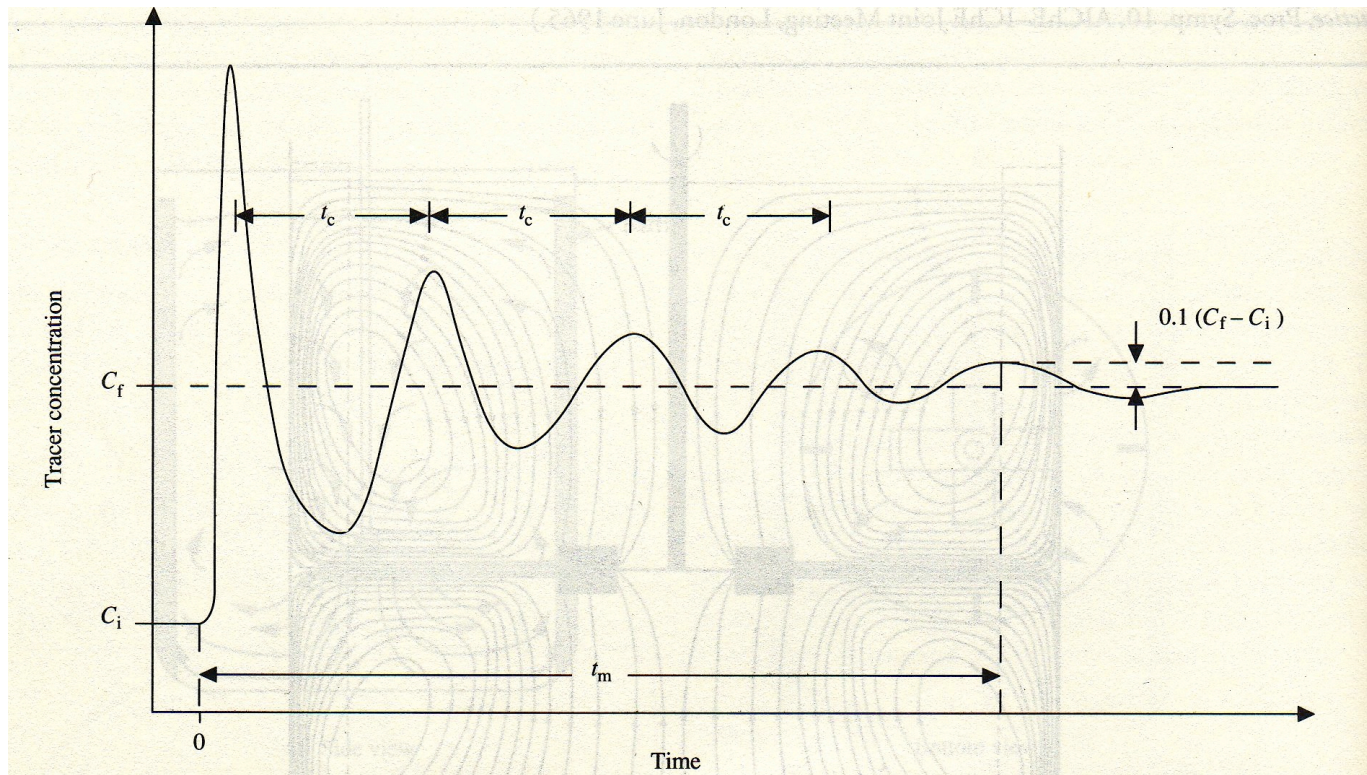
- Selon la taille des micro-vortex

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

- **Mixing** : mesure par ajout d'un traçeur

Estimé (turbines Rushton et chicanes) (Doran, 1997)

$$t_m = 4t_c \text{ (temps de circulation)}$$

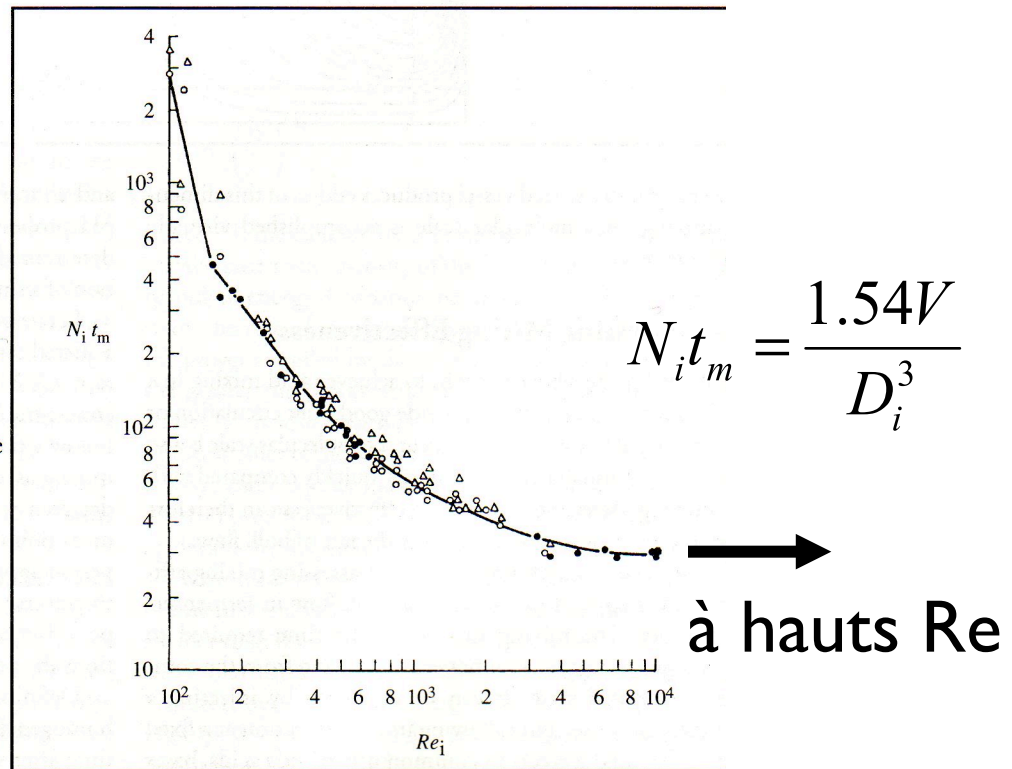




# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

- **Mixing** : Estimé (turbines Rushton et chicanes)  
(Doran, 1997)

**Figure 7.23** Variation of mixing time with Reynolds number for a six-blade Rushton turbine in a baffled tank. The impeller is located one-third the tank diameter off the floor of the vessel; the impeller diameter is one-third the tank diameter. The liquid height is equal to the tank diameter; the tank has four baffles of width one-tenth the tank diameter. Several measurement techniques and tank sizes were used: (●) thermal method, 1.8-m diameter vessel; (○) thermal method, 0.24-m vessel; (△) decoloration method, 0.24-m vessel. (Reprinted from C.J. Hoogendoorn and A.P. den Hartog, Model studies on mixers in the viscous flow region, *Chem. Eng. Sci.* 22, 1689–1699. Copyright 1967, with permission from Pergamon Press Ltd, Oxford.)



# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Demande cellulaire en $O_2$

- Type cellulaire (phénotype)
- Activité métabolique

## Offre en $O_2$

- Type cellulaire (phénotype et morphologie)
- Solubilité des gaz
- Capacité de transfert (agitation et/ou bullage)

## **Paramètres affectant la solubilité des gaz**

- La température
- La composition du milieu de culture



# Paramètres affectant la solubilité des gaz

- La composition du milieu de culture

solubilité de l'O<sub>2</sub> sans ions

cte pour l'ion « i »

cte pour un non-ion « j »

$$\log_{10} \left( \frac{C_{O_2,o}^*}{C_{O_2}^*} \right) = 0,5 \sum_i H_i Z_i^2 C_{i,L} + \sum_j K_j C_{j,L}$$

solubilité réelle de l'O<sub>2</sub> avec ions

valence de l'ion « i »

conc. dans le liquide

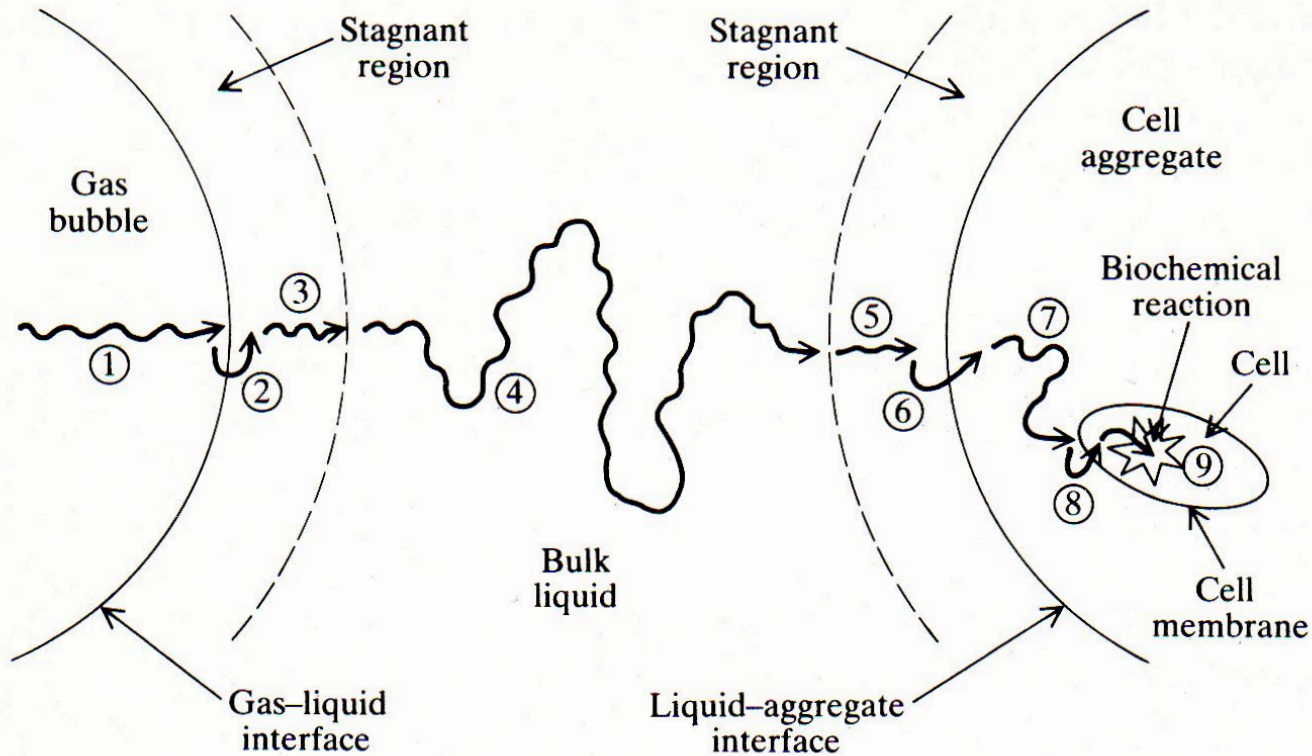
Table 9.5 Values of  $H_i$  and  $K_j$  in Eq. (9.45) at 25°C

(From A. Schumpe, I. Adler and W.-D. Deckwer, 1978, *Solubility of oxygen in electrolyte solutions*, Biotechnol. Bioeng. 20, 145–150; and G. Quicker, A. Schumpe, B. König and W.-D. Deckwer, 1981, *Comparison of measured and calculated oxygen solubilities in fermentation media*, Biotechnol. Bioeng. 23, 635–650)

Cation	$H_i \times 10^3$ (m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	Anion	$H_i \times 10^3$ (m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )	Sugar	$K_j \times 10^3$ (m <sup>3</sup> mol <sup>-1</sup> )
H <sup>+</sup>	-0.774	OH <sup>-</sup>	0.941	Glucose	0.119
K <sup>+</sup>	-0.596	Cl <sup>-</sup>	0.844	Lactose	0.197
Na <sup>+</sup>	-0.550	CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	0.485	Sucrose	0.149*
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.720	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.453		
NEt <sub>4</sub> <sup>+</sup>	-0.912	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	0.802		
Mg <sup>2+</sup>	-0.314	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	1.058		
Ca <sup>2+</sup>	-0.303	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	1.037		
Mn <sup>2+</sup>	-0.311	HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0.485		
		PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	0.320		

\* Approximately valid for sucrose concentrations up to about 200 g l<sup>-1</sup>.

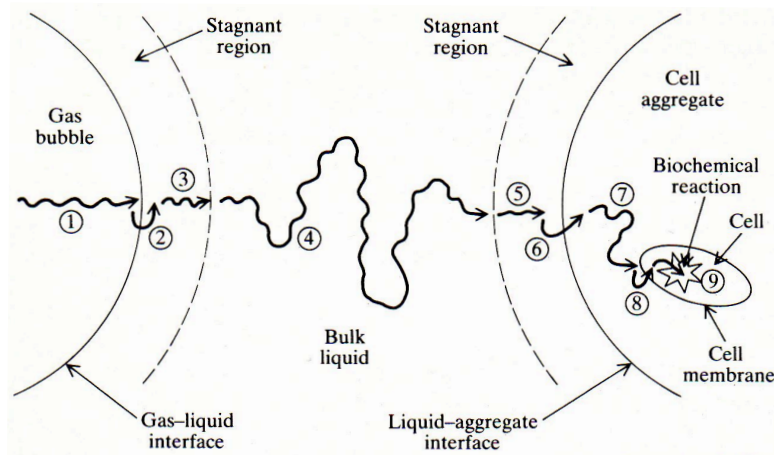
# Paramètres affectant le transfert des gaz



**Figure 8.1** Schematic diagram of steps involved in transport of oxygen from a gas bubble to inside a cell. (Bailey, Ollis. 1986. Biochemical engineering fundamentals. 2nd Ed.)

# Le transfert de matière : Oxygène

- L'O<sub>2</sub> est très peu soluble dans l'eau
  - $1/H = 0.041 \text{ kg/m}^3/\text{atm}$  (eau pure) @ 25 °C  $\implies 41 \text{ mg par L !!!!}$
- On pose que la **loi de Henry** s'applique à l'interface gaz-liquide :
  - $P_{O_{2,g}} = P_{tot} \times Y_{O_{2,g}}$  [mmol O<sub>2</sub>/L]
  - Et à l'équilibre
    - $P_{O_{2,g}} = H \times C_{O_{2,L}}$  où  $C_{O_{2,L}}$  est la concentration en O<sub>2</sub> dans l'eau [mg/L]
    - On aura  $C_{O_{2,L}}$  maximale à l'interface gas-liquide:
      - **$C_{O_{2,L,interface}} = C_{O_2}^* = \text{saturation}$**  [mmol O<sub>2</sub>/L]





# Le transfert de matière : Oxygène

## Bilan sur l'oxygène

### Côté liquide

$$\text{Flux} = k_L \times (C_{O_2, L \text{ interface gaz-liquide}} - C_{O_2, L \text{ bulk}})$$

### Côté gaz

$$\text{Flux} = k_g \times (C_{O_2, g} - C_{O_2, g \text{ interface gaz-liquide}})$$

- On pose  $K_L$  : coefficient de transfert global en  $O_2$
- Bilan sur les résistances au transfert:

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{1}{H \cdot k_g}$$

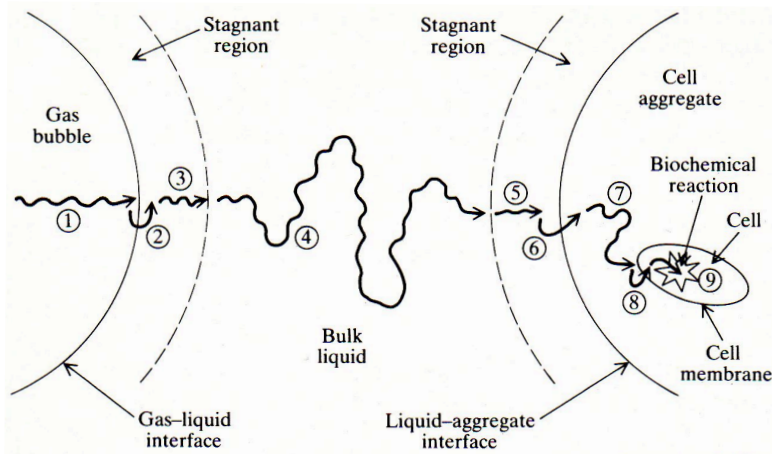
- Or, comme  $k_g \gg k_L$  on aura  $K_L \sim k_L$
- On aura donc que le transfert déterminant se produira entre l'interface gaz-liquide et le bulk :

$$\text{Flux} = k_L \times (C_{O_2, L \text{ interface gaz-liquide}} - C_{O_2, L \text{ bulk}})$$

$$N_{O_2, L} = k_L \times (C_{O_2, L}^* - C_{O_2, L}) \quad [\text{mmol } O_2/\text{m}^2/\text{s}]$$

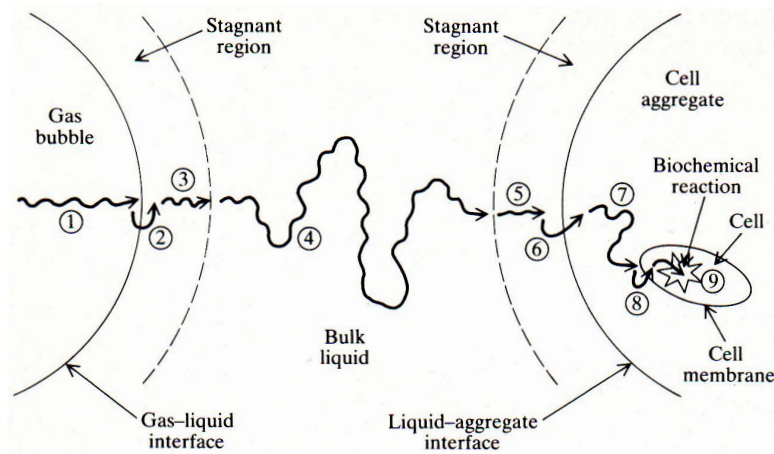
- La force motrice du transfert s'opérera sur la base du gradient de concentration en  $O_2$  entre l'interface gaz-liquide et le bulk liquide :

- $(C_{O_2}^* - C_{O_2, L})$



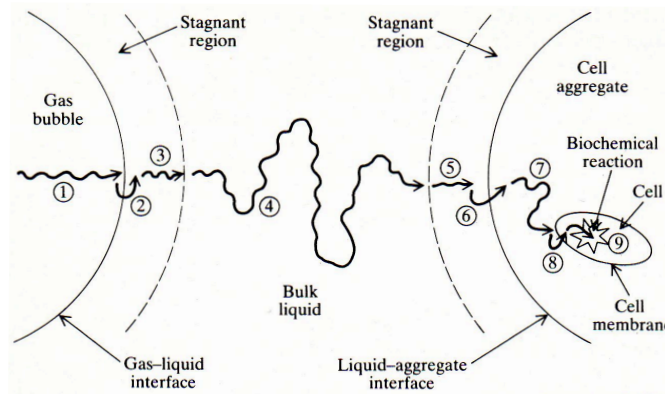
# Le transfert de matière : Oxygène

- Le flux d'O<sub>2</sub> transféré sera alors:  $N_{O_2} = k_L \times (C_{O_2}^* - C_{O_2})$  [mmol O<sub>2</sub>/m<sup>2</sup>/s]
- Et donc, si on multiplie par la surface d'échange (A) et divise par le volume de liquide (V) on obtient le taux de transfert en O<sub>2</sub> ou OTR:
  - **OTR =  $k_L \times a \times (C_{O_2}^* - C_{O_2})$**  [mmol O<sub>2</sub>/L/s] mais on écrit généralement  $k_L a$  :
    - où **a**: l'aire interfaciale [m<sup>2</sup>/m<sup>3</sup>]
    - et  **$k_L a$** : coefficient de transfert global (h<sup>-1</sup> ou s<sup>-1</sup>)



# Demande cellulaire en $O_2$ vs Offre en $O_2$ du bioréacteur

- Taux de consommation spécifique:  $qO_2$  [mmol/ $10^6$  cells/h]



- Bilan sur l' $O_2$  en phase liquide afin de déterminer :
  - $k_L a$  requis pour maintenir les cellules en vie durant la culture
  - $k_L a = f(N, \text{géométrie, type d'agitateur, fluide})$
- Donc, il faudra déterminer la plage de vitesse d'agitation  $N$  (rpm) et le taux d'aération  $Q$  (L/h) requis pour maintenir un transfert en  $O_2$  adéquat (i.e. répondant à la demande cellulaire)

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Taux de consommation spécifique: $qO_2$

voir les références suivantes pour les détails:

Lamboursain L, St-Onge F, Jolicoeur M. 2002. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. *Biotechnol. Prog.* 18: 1377-1386.

McMurray-Beaulieu, Hisiger, Durand, Perrier, Jolicoeur (2009) Na-Butyrate Sustains Energetic States of Metabolism and t-PA productivity of CHO Cells. *J Biosci. Bioeng.* 108:160-167.

**TABLE 10.1** Typical Respiration Rates of Microbes and Cells in Culture

Organism	$q_{O_2}$ (mmol O <sub>2</sub> /g dw-h)
Bacteria	
<i>E. coli</i>	10–12
<i>Azotobacter</i> sp.	30–90
<i>Streptomyces</i> sp.	2–4
Yeast	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Molds	
<i>Penicillium</i> sp.	3–4
<i>Aspergillus niger</i>	ca. 3
Plant cells	
<i>Acer pseudoplatanus</i> (sycamore)	0.2
<i>Saccharum</i> (sugar cane)	1–3
Pavot de Californie (Lamboursain et al. 2002)	0.243
Animal cells	
HeLa	0.4 $\frac{\text{mmol O}_2/\text{l-h}}{10^6 \text{ cells/ml}}$
CHO (McMurray et al. 2009)	~ 0.1 - 0.4 $\frac{\text{mmol O}_2/10^{10} \text{ cells/h}}{10^6 \text{ cells/ml}}$
Diploid embryo WI-38	0.15 $\frac{\text{mmol O}_2/\text{l-h}}{10^6 \text{ cells/ml}}$

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

Concentration critique en oxygène dissous:  $C_{O_2, \text{crit}}$

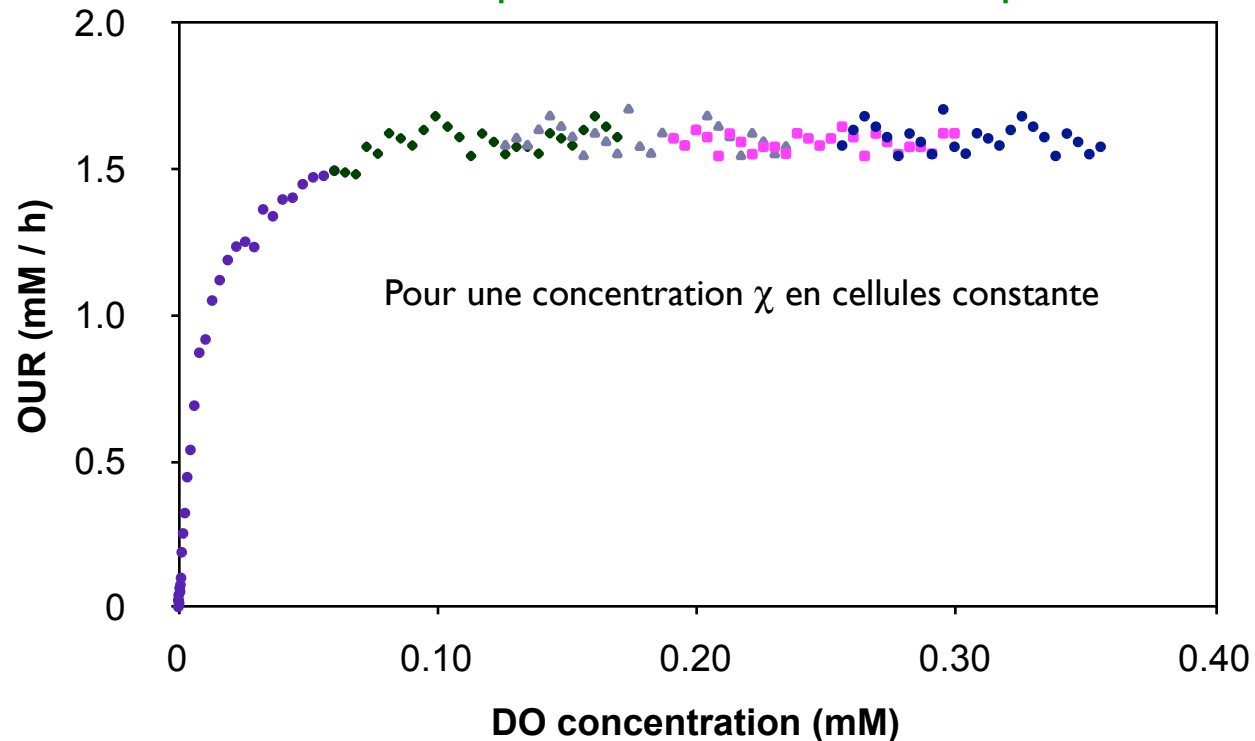
Table 8.2 Typical values of  $c_{O_2, \text{cr}}$  in the presence of substrate<sup>†</sup>

Organism	Temp, °C	$c_{O_2, \text{cr}}$ , mmol/L
<i>Azotobacter vinelandii</i>	30	0.018–0.049
<i>E. coli</i>	37.8	0.0082
	15	0.0031
<i>Serratia marcescens</i>	31	~0.015
<i>Pseudomonas denitrificans</i>	30	~0.009
Yeast	34.8	0.0046
	20	0.0037
<i>Penicillium chrysogenum</i>	24	~0.022
	30	~0.009
<i>Aspergillus oryzae</i>	30	~0.020

<sup>†</sup> Summarized by R. K. Finn, p. 81 in N. Blakebrough (ed.), *Biochemical and Biological Engineering Science*, vol. 1, Academic Press, Inc., New York, 1967.

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Cellules de pavot de Californie en suspension



Lamboursain L, St-Onge F, Jolicoeur M. 2002. A lab-built respirometer for plant and animal cell culture. Biotechnol. Prog. 18: 1377-1386.

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

- Corrélations empiriques
- Expérimental



# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

- Détermination de la vitesse d'agitation minimale pour alimenter les cellules en  $O_2$
- Sera fonction de la concentration cellulaire escomptée ( $\chi$ )

# Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

## Détermination du $k_L a$ pour un bioréacteur agité mécaniquement et aéré

### Cas à faible coalescence des bulles

(bouillons de culture)

$$k_L a = 2 \times 10^{-3} \times (P_g/V)^{0,7} \times u_{sg}^{0,2} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

$P_g$ : Puissance dissipée dans le volume  $V$  (W)

$u_{sg}$ : Vitesse superficielle du gaz (m.s<sup>-1</sup>)

( $Q_{\text{gaz}}/A$  du bioréacteur)

$V$ : Volume de liquide (m<sup>3</sup>)

### Cas avec coalescence

$$k_L a = 2,6 \times 10^{-2} \times (P_g/V)^{0,4} \times u_{sg}^{0,5} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

N.B. ces corrélations sont valables pour fluides non-visqueux et  
 $500 < P_g/V < 10\ 000 \text{ W/m}^3$

# Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

## Détermination du $k_L a$ pour un bioréacteur aéré

Configuration gazo-siphon « air-lift »

$$k_L a = 0,32 * u_{sg}^{0,7} \text{ (s}^{-1}\text{)}$$

# Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

Proposé par Doran (1997)

$$\frac{P_g}{P_o} = 0.10 \left( \frac{Q_g}{N_i V} \right)^{-0.25} \left( \frac{N_i^2 D_i^4}{g W_i V^{2/3}} \right)^{-0.20}$$

$g$  : Accélération gravitationnelle ( $m \cdot s^{-2}$ )

$P_g$  : Puissance dissipée avec gaz (W)

$P_o$  : Puissance dissipée sans gaz (W)

$Q_g$  : Débit de gaz ( $m^3 \cdot s^{-1}$ )

$N_i$  : Vitesse d'agitation ( $s^{-1}$ )

$V$  : Volume de liquide ( $m^3$ )

$D_i$  : Diamètre de l'agitateur (m)

$W_i$  : Largeur de la pale de l'agitateur (m)

# Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

Fluides Newtoniens non-aérés ( $P=P_o$ )

## Régime laminaire

$$N_p \propto \frac{1}{Re}$$

$$P = k_1 \mu N_i^2 D_i^3 \quad (P_o \text{ par agitateur})$$

## Régime turbulent

$$P = N'_p \rho N_i^3 D_i^5 \quad (P_o \text{ par agitateur})$$

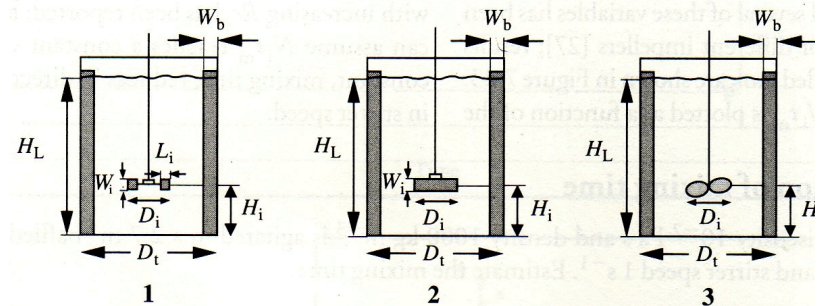
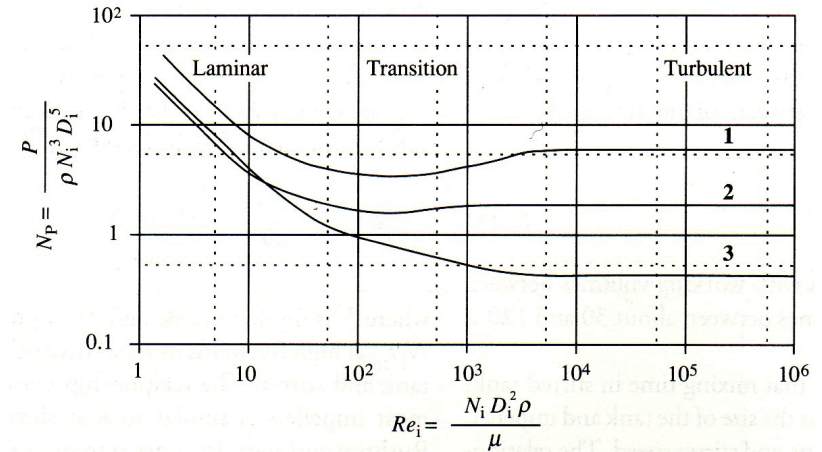


Table 7.3 Constants in Eqs (7.19) and (7.20)

Impeller type	$k_1$ ( $Re_i = 1$ )	$N'_p$ ( $Re_i = 10^5$ )
Rushton turbine	70	5–6
Paddle	35	2
Marine propeller	40	0.35
Anchor	420	0.35
Helical ribbon	1000	0.35

Impeller	$D_t/D_i$	$H_L/D_i$	$H_i/D_i$	Baffles	
				$W_b/D_t$	Number
1. Rushton turbine $W_i/D_i = 0.2, L_i/D_i = 0.25$	3	3	1	0.1	4
2. Paddle $W_i/D_i = 0.25$	3	3	1	0.1	4
3. Marine propeller Pitch = $D_i$	3	3	1	0.1	4

Figure 7.24 Correlation between power number and Reynolds number for Rushton turbine, paddle and marine propeller without sparging. (From J.H. Rushton, E.W. Costich and H.J. Everett, 1950, Power characteristics of mixing impellers. Parts I and II. *Chem. Eng. Prog.* 46, 395–404, 467–476.)

# Détermination du $k_L a$ d'un bioréacteur

Fluides Newtoniens non-aérés ( $P=P_o$ )

## Régime laminaire

$$N_p \propto \frac{1}{Re}$$

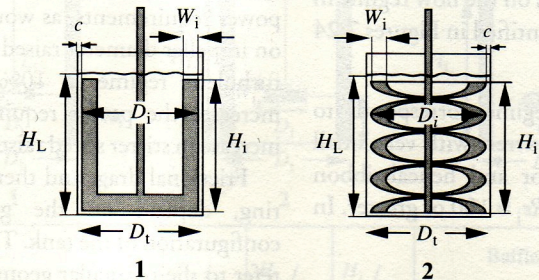
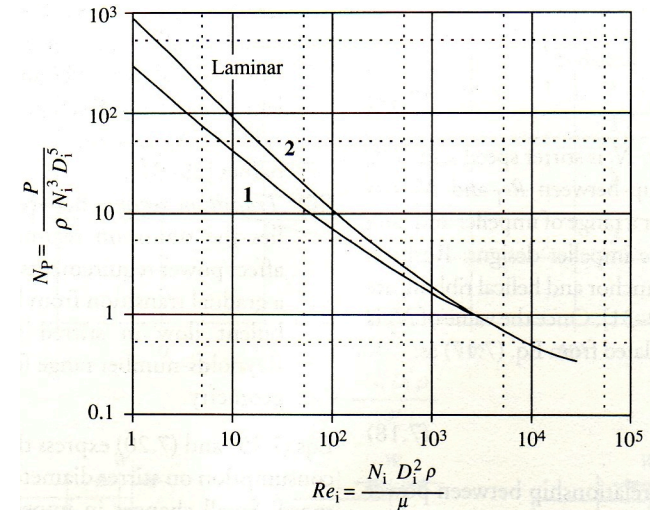
$$P = k_1 \mu N_i^2 D_i^3 \quad (P_o \text{ par agitateur})$$

## Régime turbulent

$$P = N'_p \rho N_i^3 D_i^5 \quad (P_o \text{ par agitateur})$$

Table 7.3 Constants in Eqs (7.19) and (7.20)

Impeller type	$k_1$ ( $Re_i = 1$ )	$N'_p$ ( $Re_i = 10^5$ )
Rushton turbine	70	5-6
Paddle	35	2
Marine propeller	40	0.35
Anchor	420	0.35
Helical ribbon	1000	0.35



Impeller	$D_t/D_i$	$c/D_i$	$H_i/D_i$	$W_i/D_i$
1. Anchor	1.02	0.01	1	0.1
2. Helical ribbon	1.02	0.01	1	0.1

Figure 7.25 Correlation between power number and Reynolds number for anchor and helical-ribbon impellers without sparging. (From M. Zlokarnik and H. Judat, 1988, *Stirring*. In: W. Gerhartz, Ed, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. B2, pp. 25-1-25-33, VCH, Weinheim.)

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## A. Procédure d'estimation du $k_L a$ requis

1. Poser un bilan sur l' $O_2$
2. Définir les conditions d'opération
  - Critique
  - Point de consigne désiré
  - Composition du gaz

## B. Procédure d'estimation de la vitesse d'agitation

1. Calcul de la puissance avec gaz
2. Calcul de la puissance sans gaz
  - Ajustement pour le nombre d'agitateurs
3. Calcul de la vitesse d'agitation



# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Estimation du $k_L a$ requis/possible en utilisant les corrélations

- Ces calculs ne serviront qu'à vous donner une idée des paramètres d'opération requis
- N'hésitez pas à faire des hypothèses, prendre des valeurs de la littérature etc.
- Mieux vaut avoir un calcul légèrement imprécis que pas d'estimé du tout!
- Essayez toujours de comprendre l'influence d'un paramètre sur le phénomène que vous calculez

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Estimation du $k_L a$ expérimentalement

- Résoudre le bilan sur l' $O_2$  durant une expérience dynamique, soit :

sans cellules

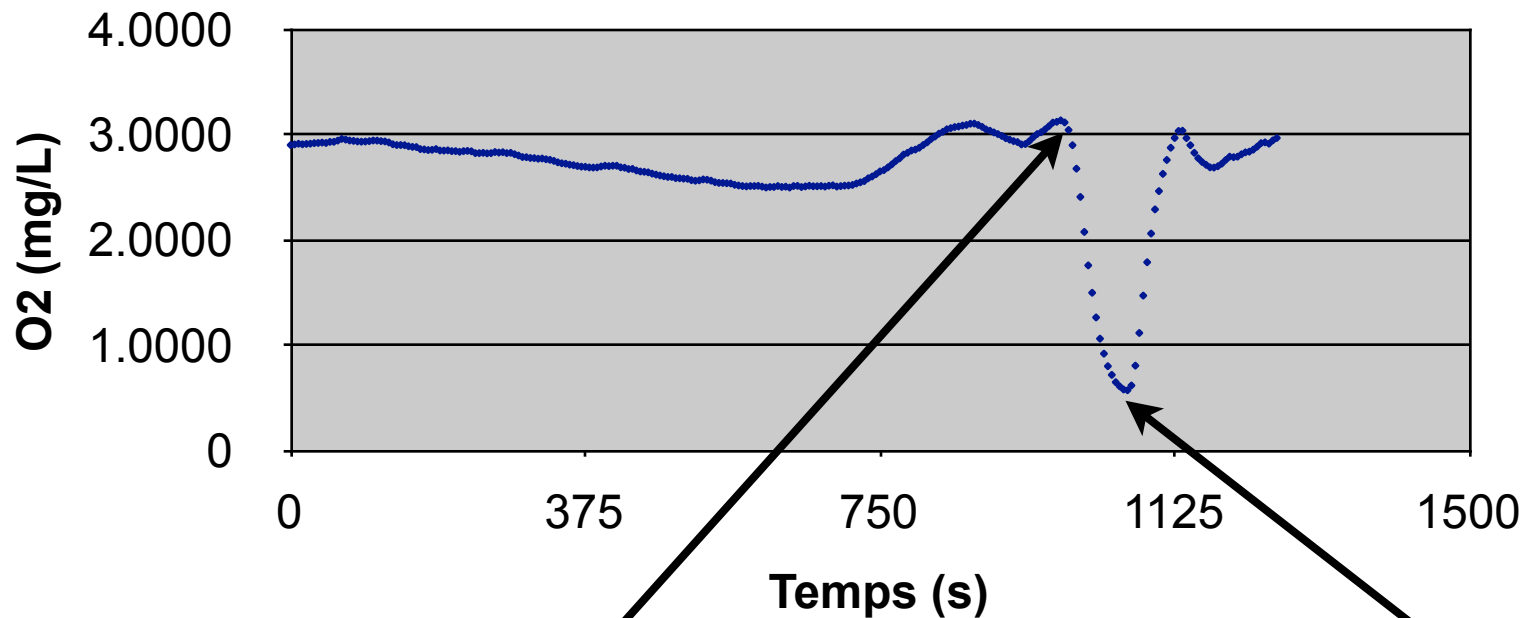
ou

avec cellules

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Estimation du $k_La$ expérimentalement

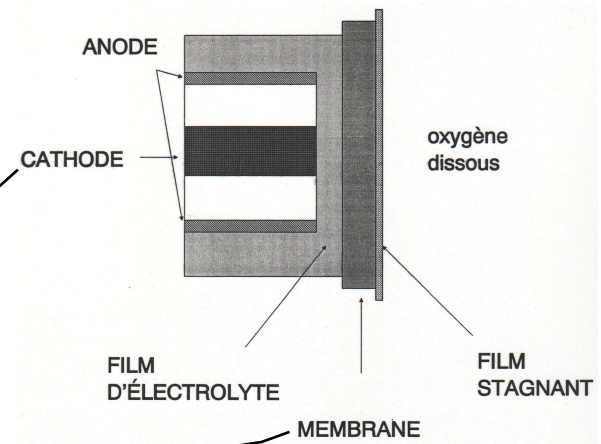
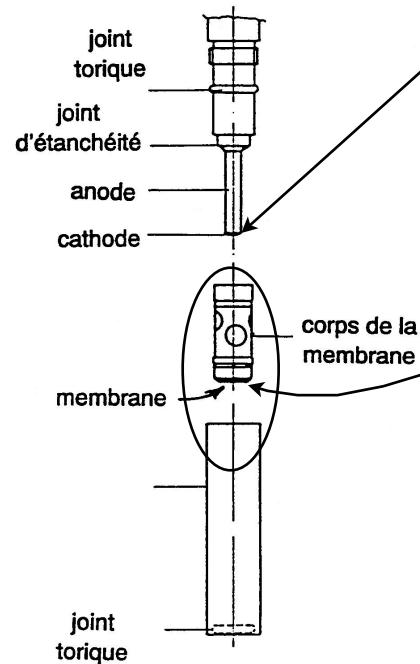
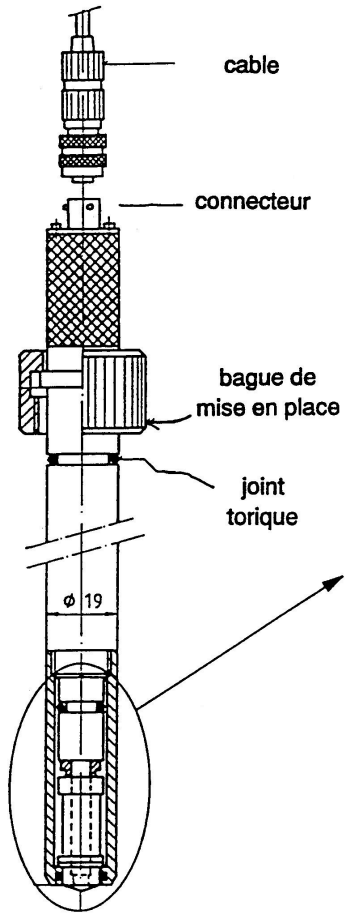
Oxygène dissous durant une culture typique



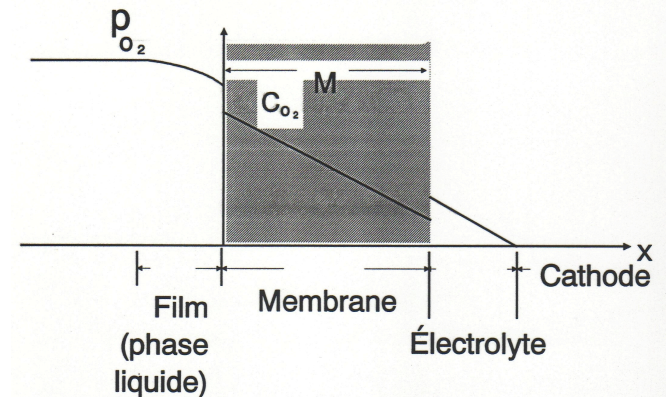
Alimentation en air coupée →  $k_{La} \sim 0$

Débit gazeux remis

# Sonde à oxygène dissous

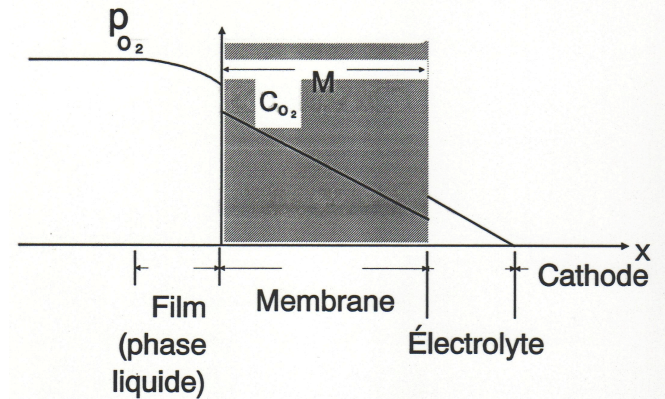


- La sonde consomme de l'O<sub>2</sub>, et le taux de consommation d'e<sup>-</sup> génèrera un courant selon  $C_{O_2,L}$
- Un gradient de concentration en O<sub>2</sub> s'établit de part et d'autre de la membrane, ce qui confèrera un temps de réponse  $\tau_r$



# Sonde à oxygène dissous

Ainsi, dû à la membrane, chaque sonde aura un délai, ou temps de réponse  $\tau_r$ , correspondant au temps d'atteinte de 67% de la réponse finale



Et on corrigera les valeurs de  $C_{O_2,L}$  en tenant compte du retard sur la dynamique de mesure à la cathode de la sonde, selon ce qui a été proposé et validé par Gnaiger et al. (1995):

$$C_{O_2,L,corr}(t) = C_{O_2,L,lecture}(t) + \tau_r \cdot \left( \frac{\partial C_{O_2,L,lecture}}{\partial t} \right)$$

Typiquement, les sondes présentent un  $\tau_r$  de quelques secondes

# exemple et TD

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteurs

## Et le cisaillement ?

### Eddies

- Représentation de courants rotationnels à l'intérieur d'un écoulement turbulent
- Plus on agite, plus les eddies sont petits



[www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg](http://www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg)



# Les cellules vs Les conditions de cisaillement

## Évaluation du cisaillement

Eddies - selon l'approche de Kolmogorov

- On présuppose qu'un vortex (micro-eddie) d'une taille  $\lambda$  près de celle de la cellule en culture générera un stress de cisaillement tel que la viabilité cellulaire en sera affectée

$$\text{On pose } \lambda = \frac{2}{3} \phi_{cellule}$$

où  $\phi_{cellule}$  est le diamètre moyen d'une cellule



# Les cellules vs Les conditions de cisaillement

## Évaluation du cisaillement

Eddies - selon l'approche de Kolmogorov

- On cherche à estimer la vitesse d'agitation maximale qui causera des eddies lytiques
- Calcul de la puissance dissipée dans le liquide:

$$\varepsilon = \frac{\text{Puissance dissipée dans le fluide}}{\text{Unité de masse de fluide}}$$



[www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg](http://www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg)

# Les cellules vs Les conditions de cisaillement

## Évaluation du cisaillement

Eddies - selon l'approche de Kolmogorov

- Calcul de la puissance dissipée dans le liquide:

$$\mathcal{E} = \frac{\text{Puissance dissipée dans le fluide}}{\text{Unité de masse de fluide}}$$

$$\mathcal{E} = \frac{P_g}{\rho_L \cdot \text{Volume où } P_g \text{ se dissipe}}$$

où le volume où  $P_g$  se dissipe représentera un volume caractéristique selon la géométrie de l'agitateur. Par exemple, pour une hélice marine ou une turbine Rushton :  $V_{diss} = D_i^3$



[www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg](http://www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg)

# Les cellules vs Les conditions de cisaillement

## Évaluation du cisaillement

Or, selon l'approche de Kolmogorov :

$$\varepsilon = \frac{\nu^3}{\lambda^4} \quad \text{et} \quad \lambda = \left( \frac{\nu^3}{\varepsilon} \right)^{1/4}$$

où  $\nu = \frac{\mu}{\rho}$  la viscosité cinématique [Pa/s]



[www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg](http://www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg)

# Les cellules vs Les conditions de cisaillement

## Évaluation du cisaillement

Donc, selon l'approche de Kolmogorov :

- Sachant la taille cellulaire et les propriétés du fluide, on peut calculer :

$$\varepsilon = \frac{v^3}{\lambda^4}$$

- Puis la puissance dissipée :

$$P_g = \varepsilon \cdot \rho_L \cdot V_{diss}$$

- Qui nous permettra de déterminer  $N_i - Q_g$  :

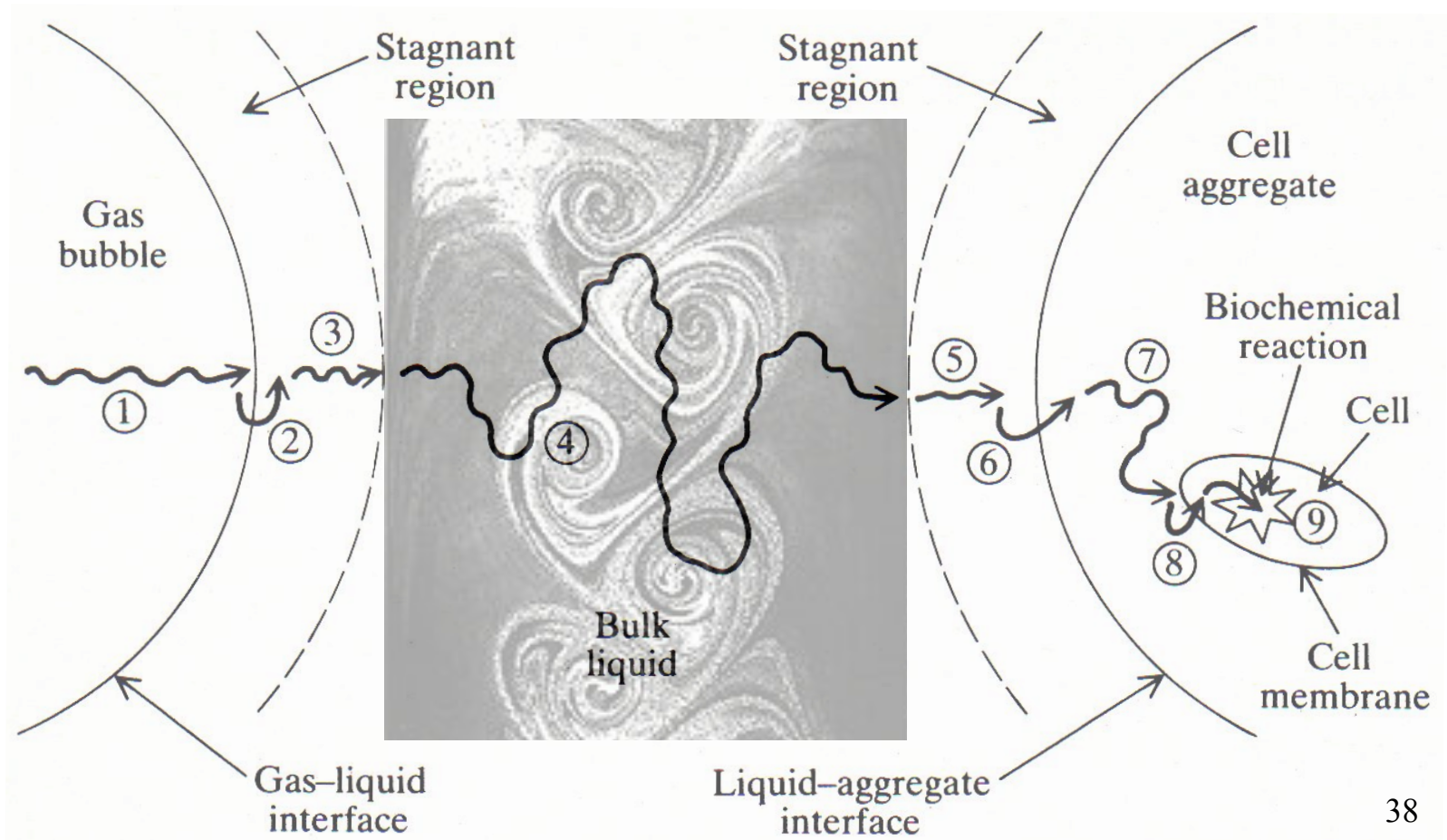
$$P_g = fct(N_i, Q_g)$$



[www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg](http://www.dhushara.com/book/chaos/sc1.jpg)

# Les cellules vs Les conditions en bioréacteur

En conclusion : le transfert d'O<sub>2</sub> est obligatoire  
et le cisaillement est donc un mal nécessaire,  
*sachez moduler vos actions*



# exemple et TD