



08 mars 2016
Journée SFGP-IEP
CNAM-Paris

Etude de la mise en suspension de microporteurs en réacteurs à agitation orbitale *Analyse dimensionnelle*

Eric OLMOS

Maître de conférences

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires / Université de Lorraine

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés

1. Généralités sur la problématique de mise en suspension

- a. Caractéristiques des microporteurs et des procédés les utilisant
- b. Réacteurs à agitation pendulaire vs. réacteurs à agitation orbitale et mise en suspension

2. Approche expérimentale

3. Analyse dimensionnelle

- a. Référencement des variables
- b. Modèle / dégradation

4. Interprétation phénoménologique

Détails de l'étude dans:

Olmos, E., Loubiere, K., Martin, C., Delaplace, G., & Marc, A. (2015). Critical agitation for microcarrier suspension in orbital shaken bioreactors: Experimental study and dimensional analysis. *Chemical Engineering Science*, 122, 545-554.

1. Généralités sur la problématique de mise en suspension

Caractéristiques des microporteurs

Diamètre de Sauter moyen : 100-300 μm .

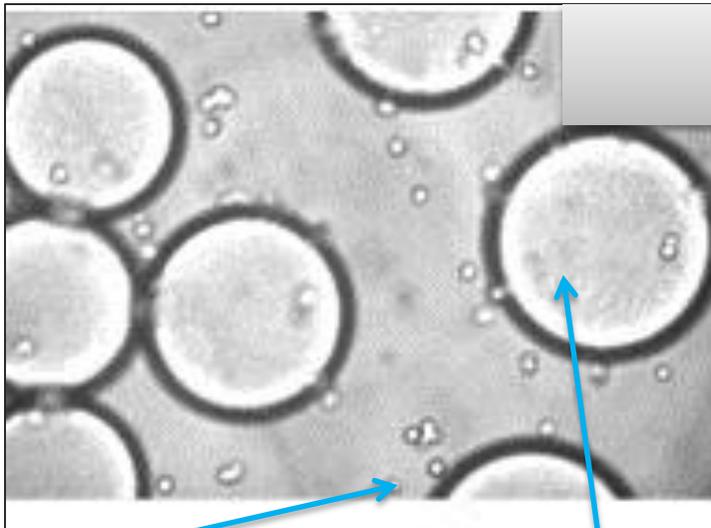
Densité : légèrement supérieure à celle de l'eau (décantation) $\approx 1,03-1,05$

Permet l'**adhérence des cellules** adhérentes-dépendantes (VERO, CHO, cellules souches mésenchymateuses).

Obtention de **grandes aires interfaciales** et **extrapolation** du procédé de culture.

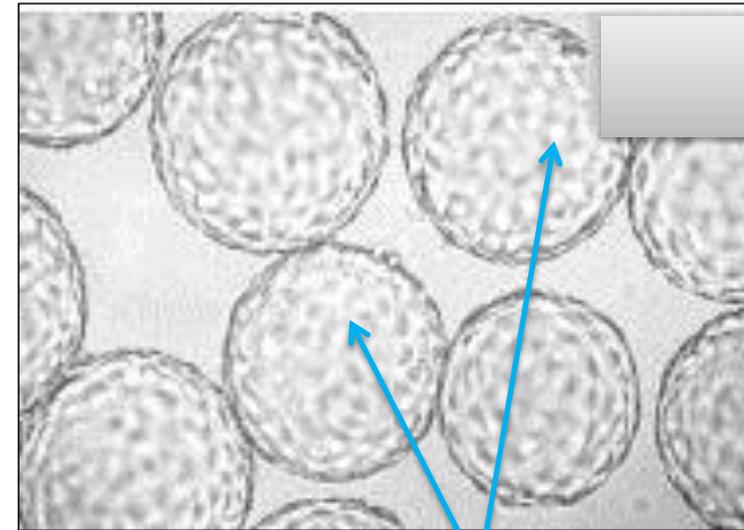
Structure lisse, microporeuse ou macroporeuse.

Principaux types : Cytodex (1/3), Cytopore, Hillex.



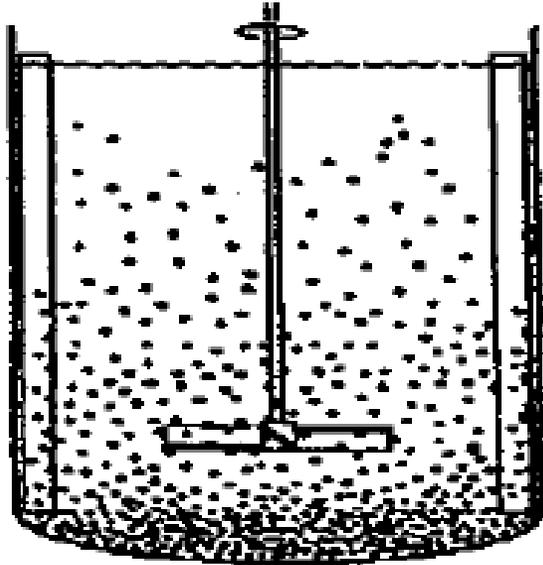
Cellules en suspension

Porteurs vides



Porteurs « chargés » de cellules adhérentes

La dualité de l'agitation en procédé de culture de cellules animales



Mise en suspension des cellules

- Triviale pour des “cellules en suspension”.
- A étudier pour des cellules adhérentes sur microporteurs

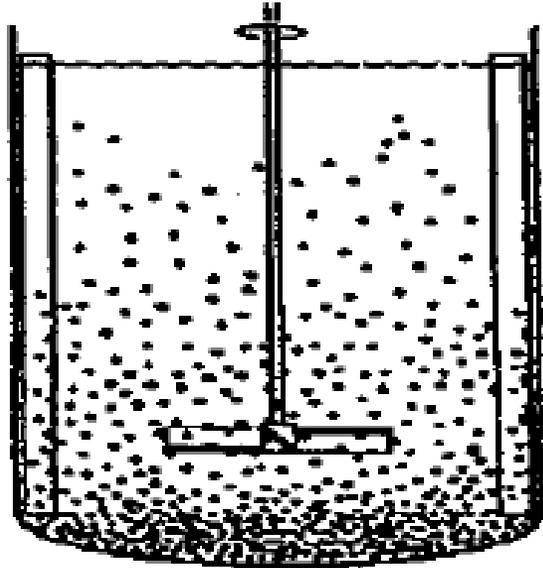
Agitation critique pour la mise en suspension

- Dissipation volumique
- Design des agitateurs et des cuves
- Effet de la phase gaz

Agitation < Agitation critique

- Décantation des microporteurs
- Diminution de la surface spécifique d'adhérence.

La dualité de l'agitation en procédé de culture de cellules animales



Dommages cellulaires et sur microporteurs

- Critique pour des cellules adhérees sur microporteurs
- Chocs / contraintes hydro.

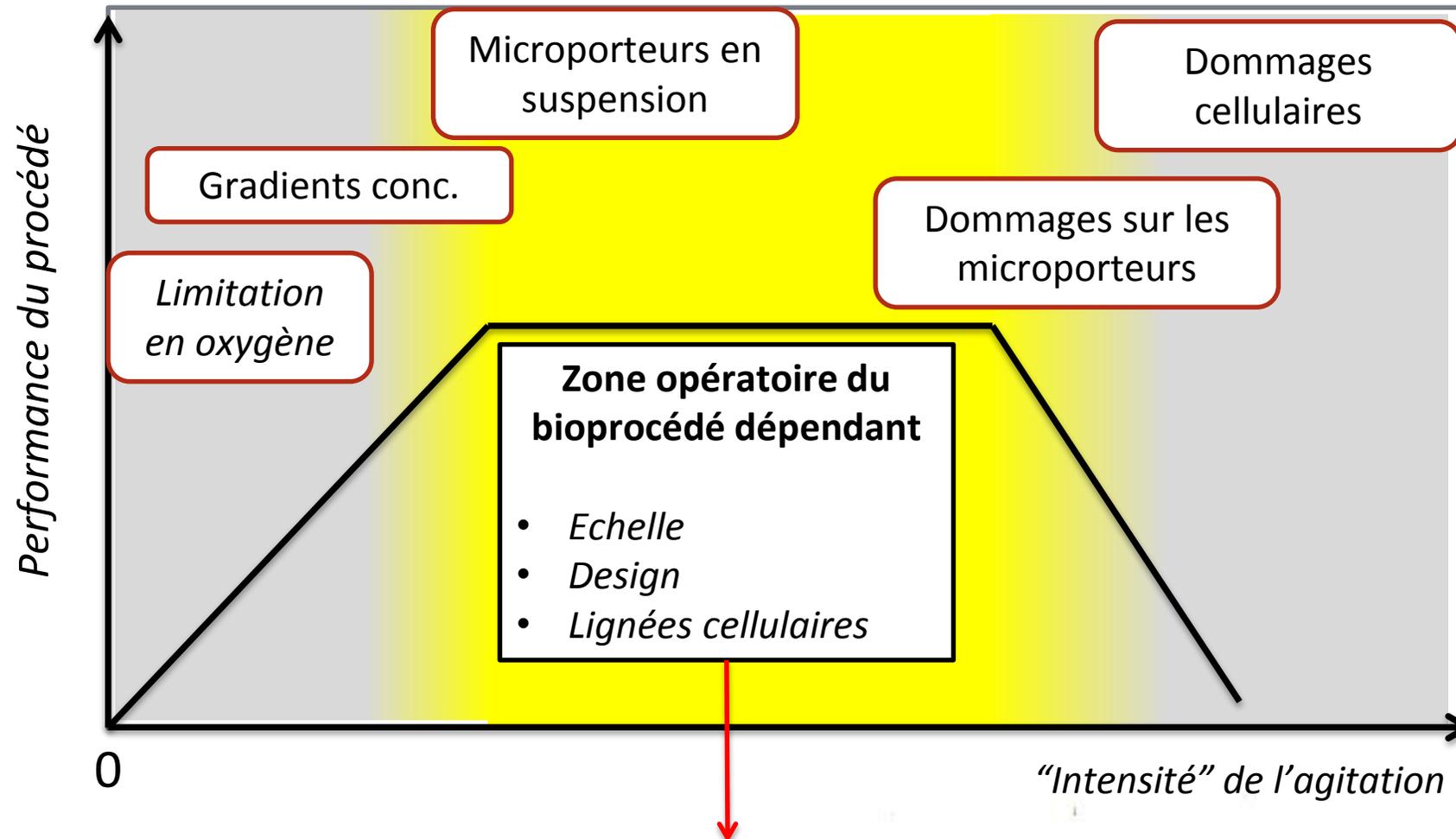
Agitation critique limitant les biodommages ?

- Hydrodynamique du bioréacteur / hétérogénéité
- Turbulence <-> échelle de Kolmogorov
- Contraintes locales normales et de cisaillement

Diamètre de particule > Taille des structures turbulentes

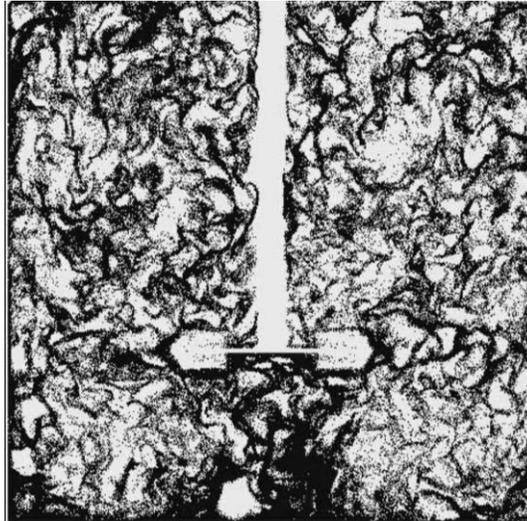
- Modification du métabolisme cellulaire
- Dommages cellulaires (nécrose, lyse)
- Détachement de cellules

La dualité de l'agitation en procédé de culture de cellules animales



Nécessité de cibler au plus juste les agitations minimales pour la mise en suspension

Agitation pendulaire



- Classique des bioréacteurs industriels
- **Très référencée dans la littérature, y compris la suspension de particules**

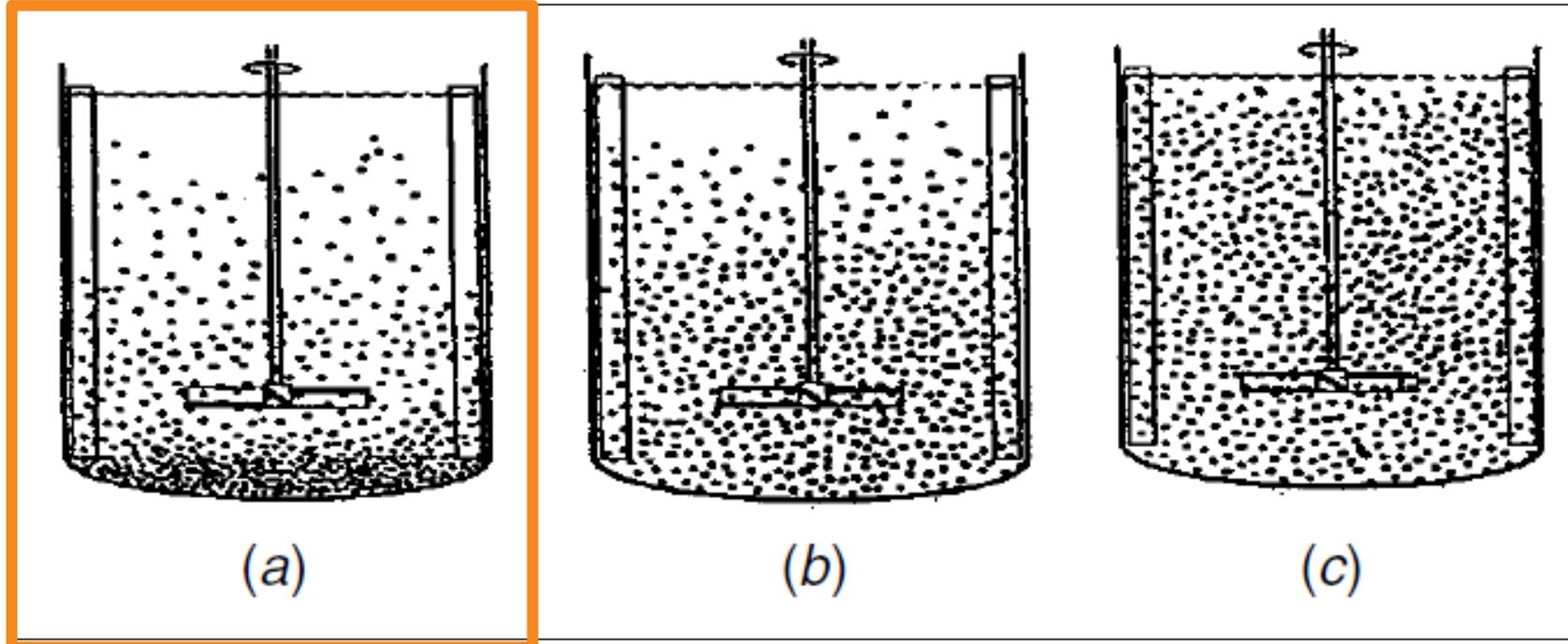
Agitation orbitale



Kühner 200 L

- En développement en culture de cellules animales (Tissot et al., 2010).
- Largement utilisée à l'échelle laboratoire (fioles d'Erlenmeyer)
- Ecoulements générés décrits récemment (Weheliye et al., 2013)
- **Pas de description de la mise en suspension de particules**

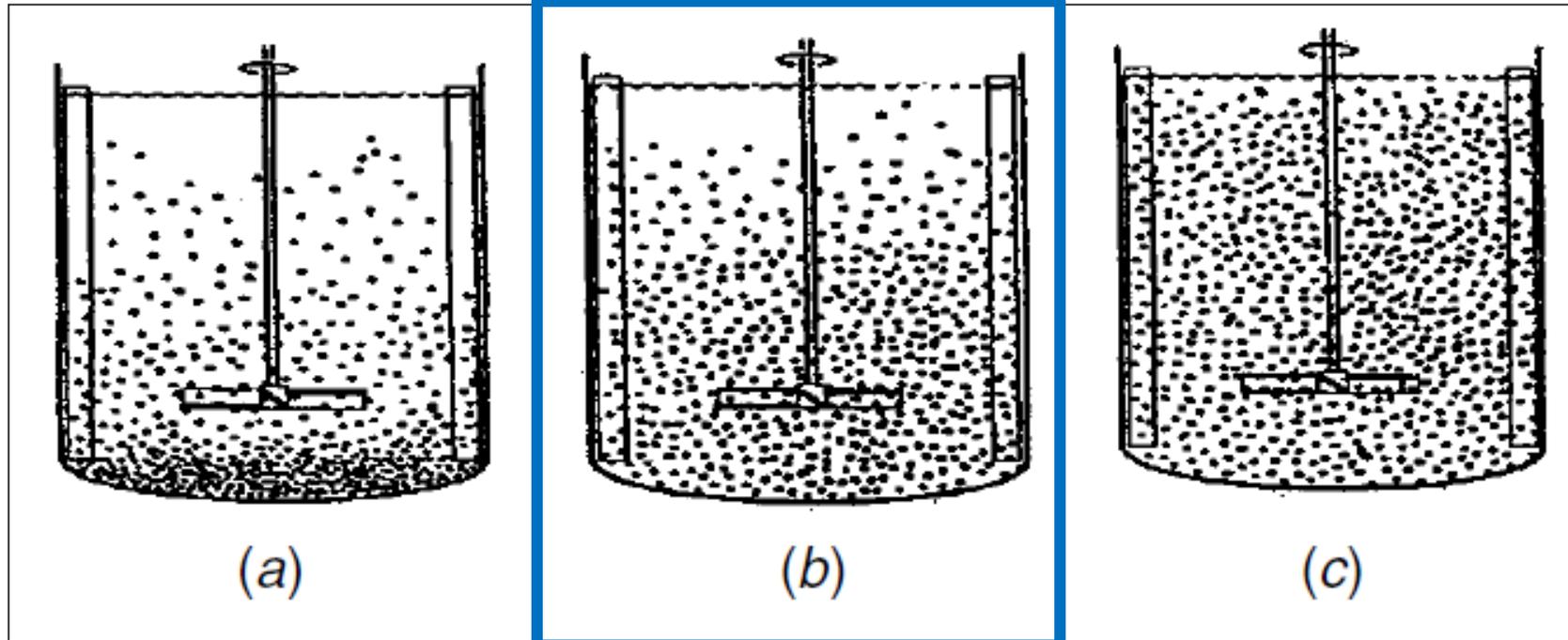
Etats de mise en suspension en bioréacteur à agitation pendulaire



(a) Suspension partielle

- Une fraction des porteurs est en contact avec le fond de la cuve.
- Des points de contact existent entre les porteurs, limitant ainsi la surface spécifique d'adhérence et les surfaces d'échange.

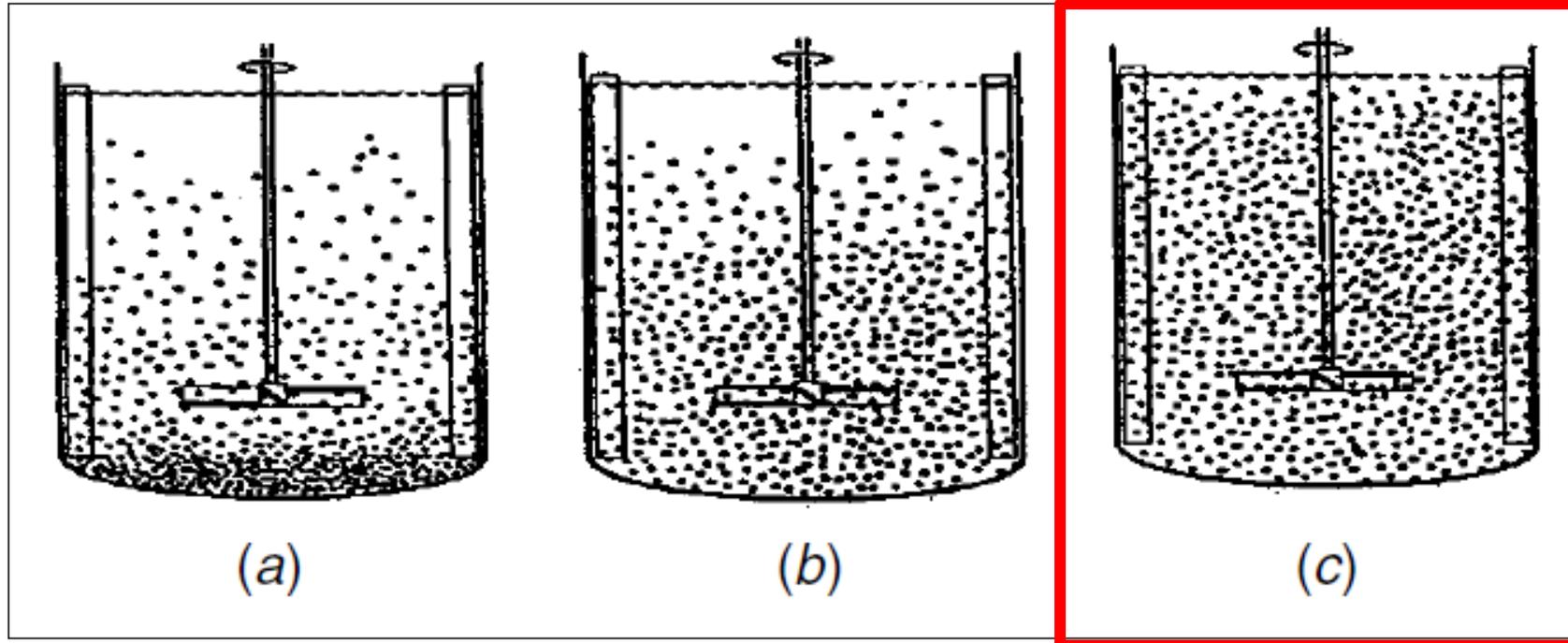
Etats de mise en suspension en bioréacteur à agitation pendulaire



(b) Suspension complète ou « just suspended »

- Temps de contact entre les particules et le fond de la cuve inférieur à 1 à 2 secondes.
- Pas de points de contact entre les porteurs : surface spécifique maximisée.
- Agitation critique fournie par le critère de Zwietering.

Etats de mise en suspension en bioréacteur à agitation pendulaire



(c) Suspension uniforme

- Distribution uniforme des particules dans la cuve (diamètre et concentration).
- Homogénéité généralement définie à un degré de 95 % (le degré de 100 % est asymptotique à cause de l'existence de zones à faibles vitesses près de la surface libre).

Critère de Zwietering en réacteur à agitation pendulaire

L'analyse dimensionnelle fournit:

$$Re_{imp}^{0,1} Fr^{0,45} \left(\frac{D}{d_p} \right)^{0,2} X^{0,13} = S$$
$$Re_{imp} = \frac{\rho_L N_{js} D^2}{\mu_L}$$
$$Fr = \frac{\rho_L}{\rho_P - \rho_L} \frac{N_{js}^2 D}{g}$$

D (m)	diamètre de l'agitateur
X (kg/kg)	fraction massique de solide
S ()	constante de Zwietering qui dépend des caractéristiques de l'agitateur et de la cuve
N_{js} (rps)	fréquence d'agitation au "juste suspendu"
ν (m ² .s ⁻¹)	viscosité cinématique

Sous forme explicite en N_{js} :

$$N_{js} = S \nu^{0,1} \left[\frac{g (\rho_P - \rho_L)}{\rho_L} \right]^{0,45} X^{0,13} d_p^{0,2} D^{-0,85}$$

2. Approche expérimentale

Agitation

Table orbitale Kühner (LTX-1) de diamètre orbital $d_o = 1,25; 2,5$ et 5 cm.

Particules

Cytodex 1 et 3, Cytopore 2, Hillex, Sephadex G10 et G25

Concentration entre 1 et 20 g/L.

Bioréacteurs

Fioles d'Erlenmeyer de volume total 125, 250, 500, 1000 et 5000 mL

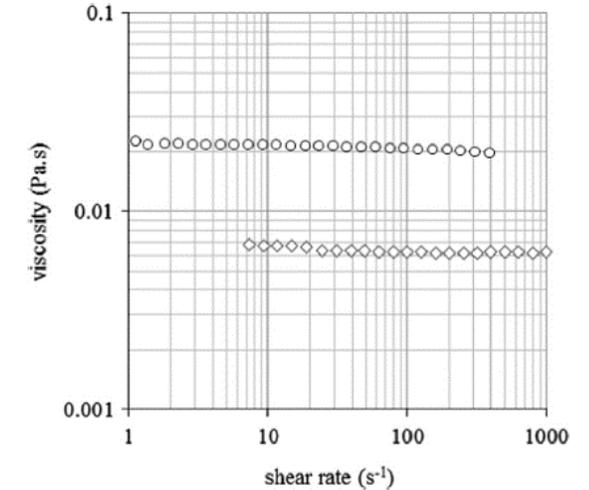
Béchers de volume total 10, 50, 100, 250, 500 et 2000 mL .

Volumes de remplissage α entre 8 et 80 % du volume total.

Fluides

Eau à 20 et 37°C ($\rho = 999-993$ kg.m⁻³, $\mu_L = 1-0,7$ mPa.s)

Mélange eau-CMC à 0,3 % ($\rho = 999$ kg.m⁻³, $\mu_L = 6,5$ mPa.s) et 1 % ($\rho = 999$ kg.m⁻³, $\mu = 20$ mPa.s)



Rhéogrammes des solutions de CMC utilisées

218 conditions opératoires

9 paramètres opératoires ($d, d_o, \alpha, \rho_L, \mu_L, \rho_p, \phi_p, d_p, design$)

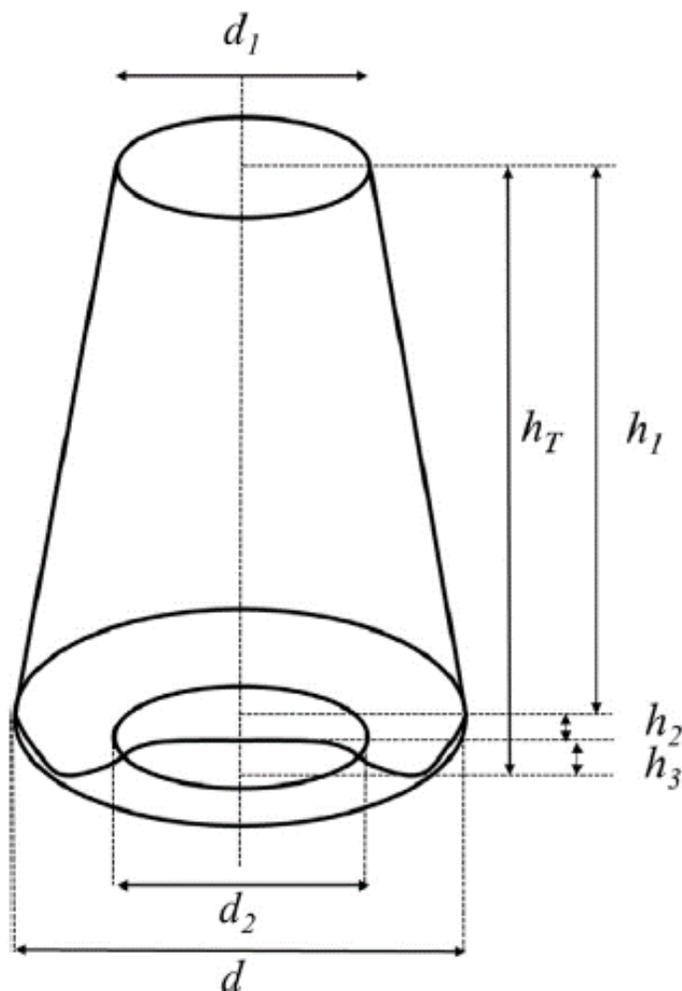


Schéma de la fiole étudiée

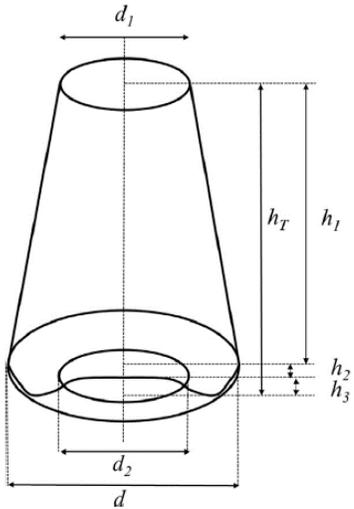
Dimensions des fioles

	Maximum liquid working volume V_T (mL)				
	125	250	500	1000	5000
d (cm)	6.6	8.3	10.1	12.8	22
d_1 (cm)	3.1	4.8	5.2	5.4	10.3
d_2 (cm)	4.2	4.9	6.6	6.6	14.4
h_1 (cm)	7.4	9.2	12.8	15.0	27.3
h_2 (cm)	0.4	1.1	1.5	2.2	1.7
h_3 (cm)	0.7	0.7	0.5	0.6	2.0

Ratio géométrique h_L / d

α (%)	Flask maximum working volume V_T (mL)				
	125	250	500	1000	5000
8	0.173	0.120	0.114	0.142	0.137
16	0.198	0.168	0.169	0.187	0.180
20	0.213	0.192	0.197	0.211	0.203
24	0.230	0.217	0.227	0.237	0.228
32	0.270	0.269	0.289	0.292	0.280
40	0.319	0.324	0.355	0.352	0.337
48	0.376	0.381	0.425	0.417	0.400
56	0.441	0.441	0.498	0.487	0.466
64	0.514	0.504	0.575	0.562	0.538
72	0.595	0.568	0.656	0.642	0.615
80	0.684	0.636	0.740	0.727	0.696

Des ratios géométriques conservés...ou pas



$$\frac{h_1}{d} = 1.17 \pm 0.07$$

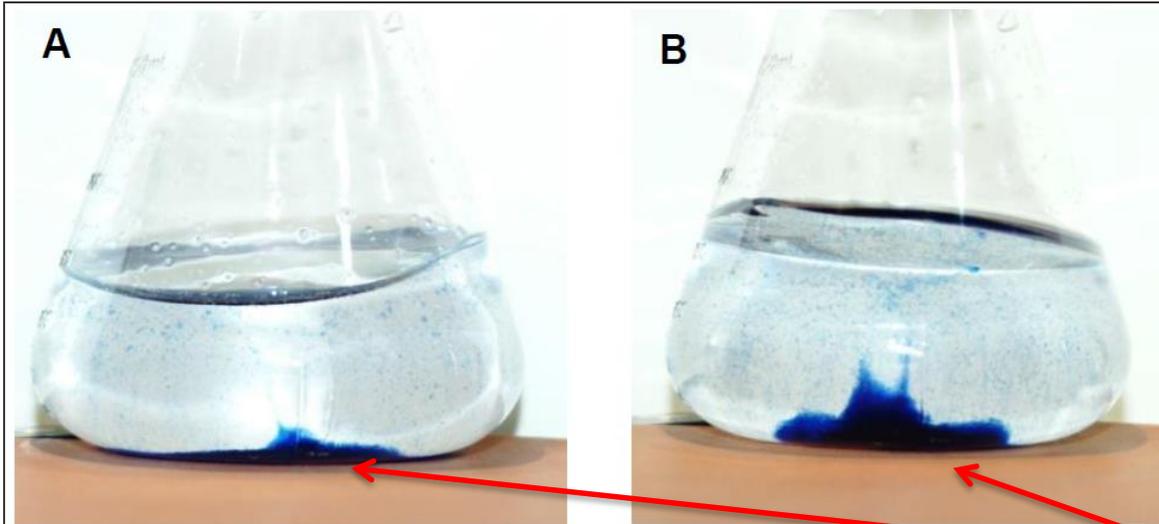
$$0.42 < \frac{d_1}{d} < 0.58, \quad 0.06 < \frac{h_2}{d} < 0.17,$$

$$0.05 < \frac{h_3}{d} < 0.11, \quad 0.52 < \frac{d_2}{d} < 0.65$$

Caractéristiques des particules

Particle	Cytodex-1	Cytopore-2	Hillex	Sephadex G10	Sephadex G25
Density (kg m^{-3})	1030	1030	1100	1242	1093
Mean diameter (μm)	260 ± 120	306 ± 98	145 ± 40	86.5 ± 24	79 ± 32
Surface quality	Rough	Porous	Smooth	Porous	Porous
Porosity	Low (MW cut-off < 100 000)	High (pore size = 30 μm)	No	Low (MW cut-off < 700)	Low (MW cut-off < 1000-5000)

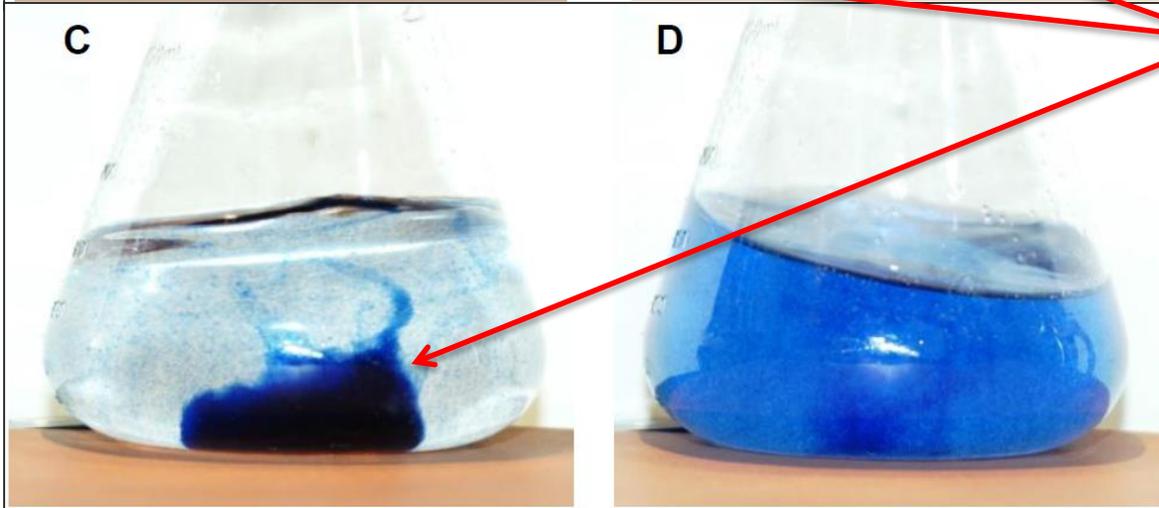
110 rpm



114 rpm

Porteurs
(teintés au
bleu Trypan)

116 rpm



$N_c = 120$ rpm

Photographies de la mise en suspension de microporteurs CYTODEX 1 en fioles d'Erlenmeyer de 250 mL de volume total.

Les conditions opératoires sont $V_L = 120$ mL, $d_0 = 2,5$ cm.

3. Analyse dimensionnelle

Identification des variables caractéristiques

$$\{p_{geo}\} = \{d_1, d_2, h_1, h_2, h_3\}$$

$$N_c = f(d_0, \alpha, d, \rho_L, \mu_L, \rho_p, d_p, \phi, g, \{p_{geo}\})$$

Hydrodynamique

Phase liquide

Phase solide

3. Analyse dimensionnelle

Matrice dimensionnelle

	Residual matrix								Core matrix		
	N_c	d_0	α	μ_L	ρ_p	d_p	ϕ	$\{p_{geo}\}$	g	ρ_L	d
Mass (M)	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
Length (L)	0	1	0	-1	-3	1	0	1	1	-3	1
Time (T)	-1	0	0	-1	0	0	0	0	-2	0	0

avec noyau diagonalisé

	Residual matrix								Core matrix		
	N_c	d_0	α	μ_L	ρ_p	d_p	ϕ	$\{p_{geo}\}$	g	ρ_L	d
	0.5	0	0	0.5	0	0	0	0	1	0	0
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0
	-0.5	1	0	1.5	0	1	0	1	0	0	1

$$\pi_1 = \left(\frac{N_c}{\sqrt{g/d}} \right) = Fr_c \quad \pi_2 = \left(\frac{d_0}{d} \right) \quad \pi_3 = \alpha \quad \pi_4 = \left(\frac{\mu_L}{\rho_L \cdot g^{0.5} \cdot d^{1.5}} \right) = \mu^*$$

$$\pi_5 = \left(\frac{\rho_p}{\rho_L} \right) = \rho^* \quad \pi_6 = \left(\frac{d_p}{d} \right) \quad \pi_7 = \phi \quad \{ \pi_{geo} \}$$

Equation générale du modèle adimensionnel

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{a_1} \cdot (\alpha)^{a_2} \cdot (\mu^*)^{a_3} \cdot (\rho^*)^{a_4} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{a_5} \cdot (\phi)^{a_6} \cdot \prod_j \pi_{geo,j}^{a_j}$$

Avec :

$$\prod_j \pi_{geo,j}^{a_j} = \left(\frac{d_1}{d}\right)^{a_7} \cdot \left(\frac{d_2}{d}\right)^{a_8} \cdot \left(\frac{h_1}{d}\right)^{a_9} \cdot \left(\frac{h_2}{d}\right)^{a_{10}} \cdot \left(\frac{h_3}{d}\right)^{a_{11}}$$

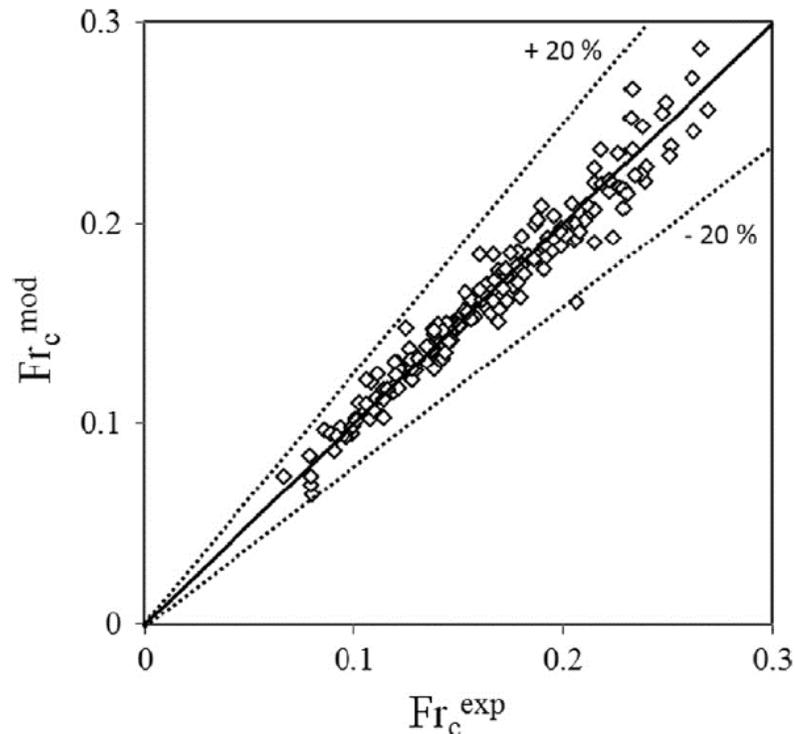
Simplification du modèle

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A_{ef} \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{a_1} \cdot (\alpha)^{a_2} \cdot (\mu^*)^{a_3} \cdot (\rho^*)^{a_4} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{a_5} \cdot (\phi)^{a_6}$$

$$A_{ef} = A \cdot \left(\frac{d_1}{d}\right)^{a_7} \cdot \left(\frac{d_2}{d}\right)^{a_8} \cdot \left(\frac{h_1}{d}\right)^{a_9} \cdot \left(\frac{h_2}{d}\right)^{a_{10}} \cdot \left(\frac{h_3}{d}\right)^{a_{11}}$$

Identification des paramètres du modèle

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = 0.105 \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot (\alpha)^{0.42} \cdot (\mu^*)^{0.01} \cdot (\rho^*)^{0.87} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.09} \cdot (\phi)^{0.002}$$



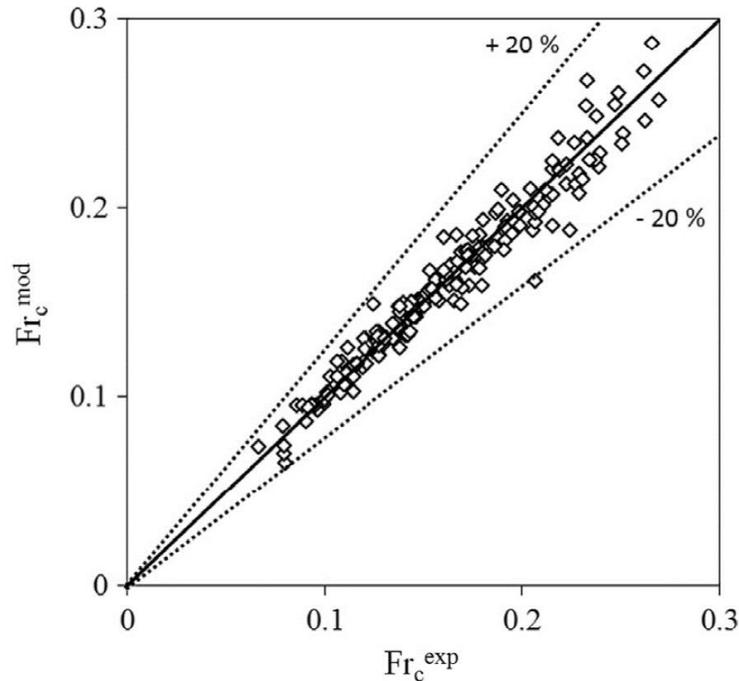
Domaine de validité

$6.62 \times 10^{-4} < d_p/d < 5.56 \times 10^{-3}$; $0.02 < \phi < 0.4$; $0.05 < \alpha < 0.8$;
 $0.058 < d_0/d < 0.91$; $0.42 < d_1/d < 0.58$; $0.52 < d_2/d < 0.65$; $1.1 < h_1/d < 1.24$;
 $0.06 < h_2/d < 0.17$; $0.05 < h_3/d < 0.11$; $0.067 < Fr_c < 0.27$
 $3.21 \times 10^{-6} < \mu^* < 4.96 \times 10^{-4}$

Erreur relative : 4 %

Réduction du modèle

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = 0.105 \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot (\alpha)^{0.42} \cdot (\rho^*)^{1.0} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.07}$$



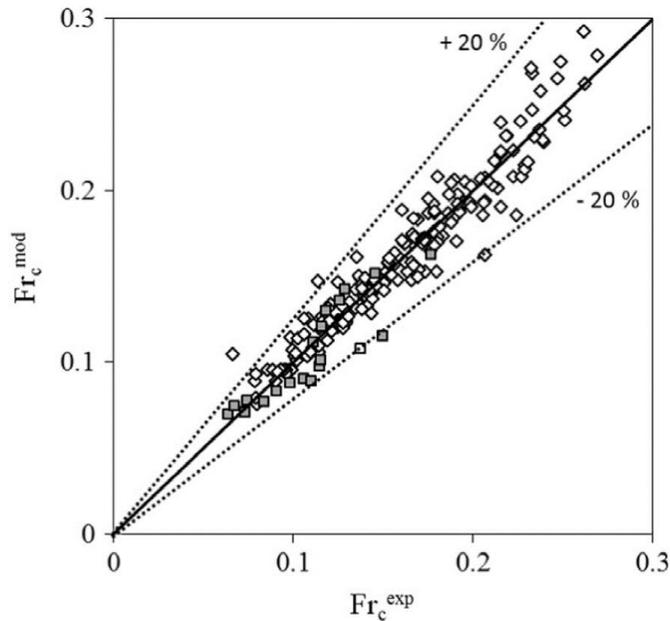
Domaine de validité

$6.62 \times 10^{-4} < d_p/d < 5.56 \times 10^{-3}$; $0.02 < \phi < 0.4$; $0.05 < \alpha < 0.8$;
 $0.058 < d_0/d < 0.91$; $0.42 < d_1/d < 0.58$; $0.52 < d_2/d < 0.65$; $1.1 < h_1/d < 1.24$;
 $0.06 < h_2/d < 0.17$; $0.05 < h_3/d < 0.11$; $0.067 < Fr_c < 0.27$
 $3.21 \times 10^{-6} < \mu^* < 4.96 \times 10^{-4}$

Erreur relative : 4 %

Modification du modèle

$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} = A \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25} \cdot \left(\frac{h_L}{d}\right)^{0.49} \cdot (\rho^*)^{1.0} \cdot \left(\frac{d_p}{d}\right)^{-0.07}$$



$A = 0.12$ (fioles) et 0.139 (cylindres)

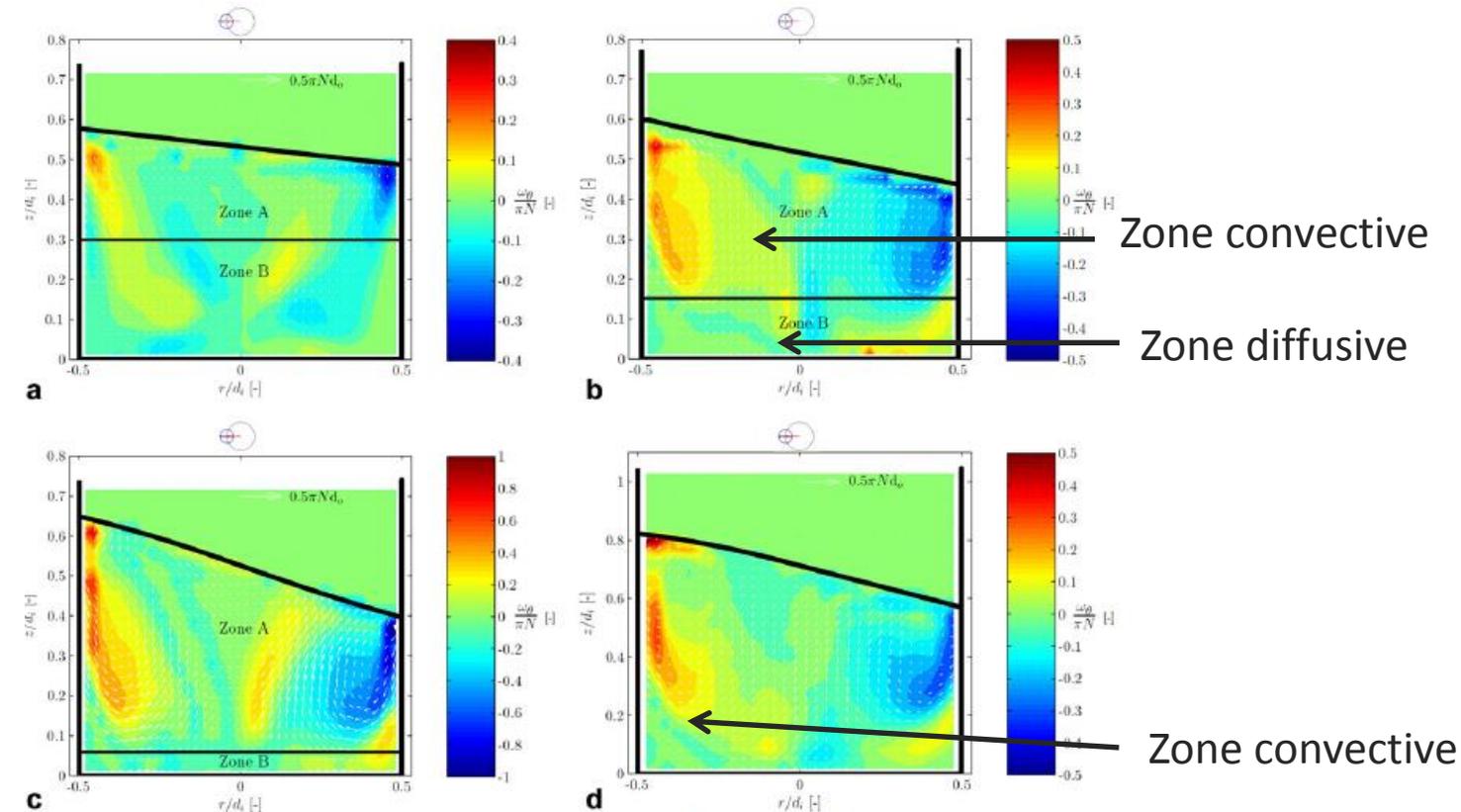
Domaine de validité

$6.62 \times 10^{-4} < d_p/d < 5.56 \times 10^{-3}$; $0.02 < \phi < 0.4$; $0.05 < \alpha < 0.8$;
 $0.058 < d_0/d < 0.91$; $0.42 < d_1/d < 0.58$; $0.52 < d_2/d < 0.65$; $1.1 < h_1/d < 1.24$;
 $0.06 < h_2/d < 0.17$; $0.05 < h_3/d < 0.11$; $0.067 < Fr_c < 0.27$
 $3.21 \times 10^{-6} < \mu^* < 4.96 \times 10^{-4}$

Erreur relative : 6 % (fioles), 10 % (cylindres)

4. Interprétation phénoménologique

4. Interprétation phénoménologique



Les contre-vortex atteignent le fond du réacteur si:

$$\left\{ \begin{array}{l} h_L/d < (d_0/d)^{0.5} \\ Fr_a = \frac{2(\pi \cdot N)^2 \cdot d_0}{g} = \left(\frac{1}{a_0}\right) \cdot \left(\frac{h_L}{d}\right) \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{0.5} \end{array} \right.$$

$$\left\{ \begin{array}{l} h_L/d > (d_0/d)^{0.5} \\ Fr_r = \frac{2(\pi \cdot N)^2 \cdot d}{g} = \left(\frac{1}{a_0}\right) \end{array} \right.$$

Fig. 3. Phase-resolved velocity vector fields and contour plots of the tangential component of the vorticity, ω , for increasing N ($d_0/d_i = 0.25$, $\varphi = 0^\circ$): (a) $N = 70$ rpm and $h/d_i = 0.5$, (b) $N = 90$ rpm and $h/d_i = 0.5$, (c) $N = 110$ rpm and $h/d_i = 0.5$, and (d) $N = 110$ rpm and $h/d_i = 0.7$.

Champs de vitesses dans un réacteur à agitation orbitale, Weheliye et al. (2013)

4. Interprétation phénoménologique

Travaux de Weheliye et al. (2013)

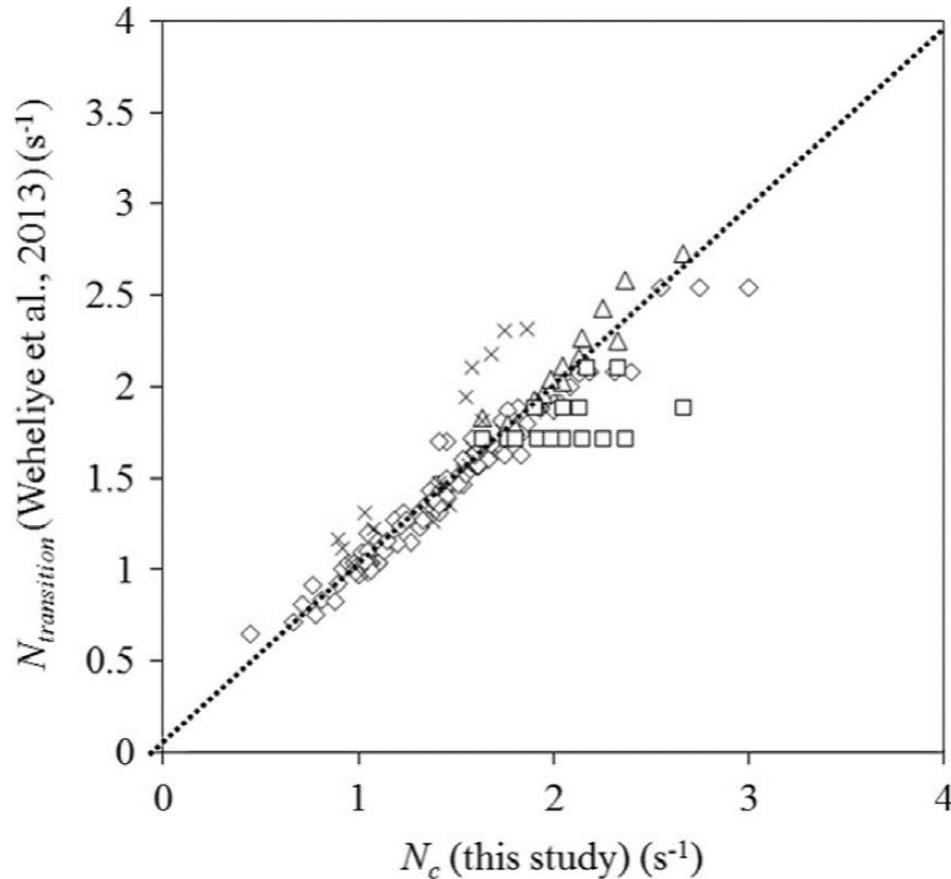
$$Fr_c = \frac{N_c}{\sqrt{g/d}} \propto Fr_a^{0.5} \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.5} \propto \left(\frac{h_L}{d}\right)^{0.5} \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25}$$

Analyse dimensionnelle en liquide-solide

$$Fr_c \propto \left(\frac{h_L}{d}\right)^{0.49} \cdot \left(\frac{d_0}{d}\right)^{-0.25}$$

4. Interprétation phénoménologique

Comparaison entre le critère de Weheliye et al. (2013) sur l'arrivée des vortex en fond de fioles et la modélisation AD de la mise en suspension des particules.



Excellent accord entre les
deux modèles.

- Etude originale de la mise en suspension L-S sous agitation orbitale.
- Analyse dimensionnelle -> Modélisation avec une excellente précision, sur une large gamme de conditions opératoires.
- Impact négligeable des forces de viscosité et de la fraction volumique de particules.
- Très bonne corrélation avec la mise en évidence de phénomènes hydrodynamiques.



08 mars 2016
Journée SFGP-IEP
CNAM-Paris

Etude de la mise en suspension de microporteurs en réacteurs à agitation orbitale *Analyse dimensionnelle*

Eric OLMOS

Maître de conférences

Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires / Université de Lorraine

Laboratoire Réactions et Génie des Procédés

4. Interprétation phénoménologique

Caractéristiques des microporteurs

Concentration	1 g/L
Nb porteurs / g	$6,8 \cdot 10^6$
Diamètre moyen	250 μm
Surface des porteurs / g	1,34 m^2
$S / V (\text{m}^2/\text{m}^3)$	1340

